

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA - PPGEM**

ANA CAROLINE CREMA DE ALMEIDA

**EFEITO DA TEMPERATURA DE TRATAMENTO TÉRMICO NAS PROPRIEDADES
DE TRIBOCORROSÃO E BIOATIVIDADE DE NANOTUBOS DE TiO_2 DOPADOS
COM ÍONS DE Ca E P**

CURITIBA

2015

ANA CAROLINE CREMA DE ALMEIDA

**EFEITO DA TEMPERATURA DE TRATAMENTO TÉRMICO NAS PROPRIEDADES
DE TRIBOCORROSÃO E BIOATIVIDADE DE NANOTUBOS DE TiO_2 DOPADOS
COM ÍONS DE Ca E P**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Eng. Mecânica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de mestre em Engenharia Mecânica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo C. Soares Jr.
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos A. H. Laurindo

CURITIBA

2015

ANA CAROLINE CREMA DE ALMEIDA

**EFEITO DA TEMPERATURA DE TRATAMENTO TÉRMICO NAS PROPRIEDADES
DE TRIBOCORROSÃO E BIOATIVIDADE DE NANOTUBOS DE TiO_2 DOPADOS
COM ÍONS DE Ca E P**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Eng. Mecânica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de mestre em Engenharia Mecânica.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Diego Torres
Escola Politécnica – Departamento de Engenharia Mecânica
Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR

Prof. Dr^a. Ana Paula R. Alves Claro
Faculdade de Eng. de Guaratinguetá - Departamento de Materiais
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr^a Michelle Sostag Merúvia
Escola Politécnica – Departamento de Engenharia Mecânica
Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR

Prof. Dr. Paulo César Soares Jr. - *Orientador*
Escola Politécnica – Departamento de Engenharia Mecânica
Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR

Curitiba, 15 de Dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus amigos, colegas e meu noivo pelo amizade e apoio durante o curso. Principalmente minhas amigas que estão comigo no grupo de pesquisa em Materiais, Tuany, Luciane e Denise, por todo o apoio, ajuda e companheirismo durante este tempo.

Aos Professores da Engenharia Mecânica que de alguma forma me ajudaram, em especial ao Prof. Carlos Laurindo por todo o apoio com os ensaios de Tribocorrosão, ao Prof. Ricardo Torres que me abriu as portas do mestrado e ao Prof. Paulo por toda a ajuda, paciência, compreensão e, principalmente, por ter me aceitado como sua aluna sem me conhecer.

Ao Prof. Ketul Popat por ter me recebido de forma tão atenciosa em seu laboratório na Colorado State University, a Rachael por me auxiliar com os ensaios e as meninas (Jess e Viktoria) por terem me oferecido sua casa, durante minha estadia nos EUA.

A PUC pelas oportunidades que tive durante nesses quase dois anos e a CAPES pela bolsa concedida.

A Dona Jane que desde o início sempre fez muito mais do que o necessário para me ajudar e garantir que tudo que eu precisasse fosse atendido.

Meu agradecimento especial aos meus pais que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e decisões. Minha mãe que sempre fez questão de dizer o quanto se sente orgulhosa e meu pai que foi quem me fez criar o amor pela vida acadêmica. Espero um dia ser uma grande professora, assim como você sempre foi. Obrigada por todo o suporte que vocês me deram nesses (mais) 2 anos de estudos.

RESUMO

O titânio (Ti) vem sendo utilizado na odontologia por mais de cinco décadas, mas sempre surgem novas pesquisas com o intuito de melhorar suas propriedades superficiais visando favorecer interações moleculares, resposta celular e assim, a osseointegração. Nanotubos de TiO_2 proporcionam tipos completamente diferentes de interações entre a superfície do implante e as células devido ao aumento da área de superfície, e a topografia do implante pode ser modificada para se assemelhar à do tecido ósseo nativo. A produção de nanotubos de TiO_2 através da técnica de anodização é relativamente simples, e as propriedades dos nanotubos podem ser controladas alterando os parâmetros utilizados no processo. Entre eles, a temperatura de tratamento térmico altera a cristalinidade dos nanotubos, passando de amorfo a cristalino, com a formação das fases anatase e rutilo combinadas ou não. Geralmente os implantes dentários sofrem micro-movimentações durante a mastigação e quando expostos ao ambiente biológico, pode ocorrer a *fretting-corrosion*. Tribocorrosão pode ser definida como o fenômeno de degradação da superfície de um material sujeita a ação combinada de um carregamento mecânico e ataque corrosivo causado pelo ambiente. O objetivo deste trabalho é avaliar a influência do tratamento térmico em diferentes temperaturas na superfície e nas propriedades tribocorrosivas dos nanotubos de TiO_2 . Amostras de titânio comercialmente puro (grau 4) foram anodizadas através do método potencioestático usando um eletrólito aquoso contendo Cálcio (Ca) e Fósforo (P), depois da anodização, as amostras foram tratadas termicamente (TT) a diferentes temperaturas. As superfícies modificadas foram caracterizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), difração de raios-X (DRX), molhabilidade e ensaios de tribocorrosão. Os ensaios de bioatividade envolveram análises de citotoxicidade (LDH), contagem celular (DAPI/Faloidina-Rodamina) e análise morfológica das células (MEV). A partir das imagens de MEV, observa-se que a resistência ao desgaste da camada de nanotubos aumentou com o aumento da temperatura de tratamento térmico. Através das curvas de tribocorrosão, conclui-se que o melhor comportamento tribocorrosivo foi da amostra tratada a 700°C . A resistência à tribocorrosão aumenta com a presença da fase rutilo, que de acordo com a literatura, possui uma dureza mais elevada que a fase anatase. As amostras tratadas a 700°C apresentaram os melhores resultados de bioatividade *in vitro*.

ABSTRACT

Titanium has been used in dentistry for more than five decades but there still ongoing research to improve the surface properties of the material in order to improve the molecular interactions, cellular response and thereby, osseointegration. TiO₂ nanotubes array give completely new types of interactions between implant surfaces and cells because the surface area is increased and the surface topography can be modified to resemble native bone tissue. Usually the dental implants undergo micro-movements under loading mastication when exposed to a biological aggressive environment, causing fretting corrosion. Tribocorrosion can be defined as a degradation phenomenon of material surfaces subjected to the combined action of mechanical loading and corrosion attack caused by the environment. The aim of this work is to evaluate the influence of the annealing treatment at different temperatures on the surface and on the tribocorrosion properties of TiO₂ nanotubes. Commercially pure titanium (grade 4) samples were anodized through the potentiostatic method using an aqueous electrolyte containing Ca and P and, after anodizing, heat-treated at different temperatures. The modified surfaces were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Energy-Dispersive spectrometer (EDS), X-ray diffraction (DRX), wettability, and tribocorrosion assays. In the State University of Colorado (CSU) were performed the bioactivity assays involving cytotoxicity analysis (LDH), cell count (DAPI/Rhodamine-phalloidin) and morphological analysis of cells (SEM). From SEM images, it is observed that the nanotubes layer resistance to wear increase with the heat treatment temperature. Verifying the tribocorrosion curves, we can conclude that the best behavior is attributed to the sample treated at 700° C. The tribocorrosion resistance increases with the presence of rutile phase, which according to literature is harder than anatase. The TT samples showed the best results for cell proliferation. The samples treated at 700 ° C showed the best results for in vitro bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Células aderidas a implante dentário, após 24 horas de imersão em suspensão com células ósseas (osteoblastos).....	7
Figura 1 - Implante, abutment e coroa de uma prótese dentária, e sua respectiva montagem.....	8
Figura 2 - Imagens de MEV das superfícies SMO, SLA e TPS. As superfícies são mostradas antes (a) e depois (b) de 3 horas de incubação das células ósseas.....	9
Figura 3 - Efeitos das diferentes superfícies de titânio no crescimento celular primário.....	9
Figura 5 – Identificação da Matriz Extracelular (ECM).....	12
Figura 4 - Efeitos da alteração nanotopográfica na resposta celular.....	13
Figura 5 - Micrografias de MEV da interação das superfícies com as células osteoprogenitoras. Sequência da amostra com nanopits (a–d) onde as células formam agregados semelhantes aos nódulos ósseos (a, b). As células usam seus filopódios para detectar os nanopits da superfície (c, d). Na superfície plana as células estão completamente espalhadas (e, f) e proliferadas, formando uma camada de tecido confluyente. Também (g, h) células utilizando seus filopódios para sentir o substrato.....	14
Figura 8 - Diagrama esquemático do ângulo de contato e das tensões interfaciais das três superfícies e na fronteira das três fases.....	14
Figura 9 - Valores do ângulo de contato para cada regime.....	15
Figura 10 - Estruturas cristalinas da anatase e do rutilo.....	16
Figura 11 - Micrografias de MEV das superfícies após imersão em SBF por 14 dias.....	18
Figura 12 - Posições do grupo hidroxil no plano (0001) no cristal de hidroxiapatita comparado com as posições do oxigênio no plano (110) da anatase e (101) do rutilo.....	19
Figura 13 - Esquema da célula eletroquímica.....	21
Figura 14 - Esquema da célula de anodização (a) e óxido formado (b). Dependendo da natureza do eletrólito, a camada de óxido será compacta ou nanotubular.....	21
Figura 15 - Resultado da presença de fluoretos no crescimento dos nanotubos.....	23
Figura 16 - Variação da corrente com o tempo para eletrólito com e sem presença de Flúor	23
Figura 17 - Curvas densidade de corrente - tempo para eletrólito à base de etileno glicol contendo NH ₄ F e HF a 45° C por 4 horas: adição de água deionizada (a) 2 vol.% e (b) 0 vol.%; diferentes tensões (1) 20 e (2) 30 V.....	24
Figura 18 - Etapas da formação dos nanotubos de TiO ₂	24
Figura 19 - Espectros obtidos por GAXRD em nanotubos de TiO ₂ , tratados termicamente em temperaturas entre 230 e 880° C.....	26
Figura 20 - Esquema da definição de Tribocorrosão.....	27

Figura 21 - Modos de contato na Tribocorrosão.....	28
Figura 22 - Áreas possivelmente afetadas pela tribocorrosão, em implantes dentários.....	29
Figura 23 - Fluxograma das etapas do procedimento experimental.....	31
Figura 24 - Sequência da preparação das amostras. Amostra cortada (a), fixação no porta amostras (b), lixamento (c), polimento (b) e limpeza (e).....	32
Figura 25 - Aparato experimental para anodização das amostras.....	33
Figura 26 - Montagem da cuba de tribocorrosão: vista superior (a) e inferior da cuba (b), peça de latão utilizada para o contato elétrico com o potenciostato e fita de cobre colada na amostra (c), O-ring posicionado para vedação da cuba (d), vista inferior da cuba montada (e) e vista superior da cuba montada (f).....	36
Figura 27 - Detalhe do sistema montado, com os eletrodos imersos no eletrólito (a) e imagem do tribômetro conectado ao potenciostato e aos dois computadores (b).....	37
Figura 28 - Esquema da disposição das trilhas nas amostras.....	38
Figura 29 - Preparação do meio de cultura e início da cultura celular. Soro fetal bovino (a) e penicilina estreptomicina (b) adicionados ao meio de cultura DMEM (c), células fibroblásticas congeladas (d) e bancada preparada para o procedimento (e).....	40
Figura 30 - Cabine preparada para o procedimento.....	40
Figura 31 - Disposição das amostras na placa de 48 poços (a) e esquema da mudança do meio celular para a placa de 96 poços (b).....	43
Figura 32 - Leitor de placas.....	43
Figura 33 - <i>Dark hood</i> preparada para o procedimento de marcação das células.....	45
Figura 34 - Microscópio de Fluorescência e no detalhe, os filtros utilizados.....	46
Figura 35 - Exemplo de imagem feita com o filtro DAPI para contagem de núcleos.....	46
Figura 36 - Sequência da fixação para MEV.....	47
Figura 37 - Curva obtida durante a anodização.....	49
Figura 38 - Imagens de MEV das amostras STT com ampliações de 10 k (a), 20 k (b) e 50 k (c). Amostra TT 350 °C com ampliações de 10 k (d), 20 k (e) e 50 k (f). Amostra TT 530 °C com ampliações de 10 k (g), 20 k (h) e 50 k (i). Amostra TT 700 °C com ampliações de 10 k (j), 20 k (k) e 50 k (l).....	50
Figura 39 - Medidas dos diâmetros dos nanotubos na amostra STT, com ampliação de 50 k.....	51
Figura 40 - Seção transversal da camada de nanotubos, da amostra STT.....	52
Figura 41 - Difractogramas obtidos para as amostras de titânio (a), STT (b), TT 350 °C (c), TT 530 °C (d) e TT 700 °C (e). Resultados indexados de acordo com os padrões ICDD [00-044-1294] Titânio, [00-021-1272] Anatase e [01-078-1510] Rutilo.....	55

Figura 42 - Determinação dos maiores picos de anatase e rutilo nas amostras TT 530 °C e TT 700 °C. Resultados indexados de acordo com os padrões [00-021-1272] Anatase e [01-078-1510] Rutilo.....	57
Figura 43 - Distribuição aproximada da cristalinidade da superfície das amostras.....	58
Figura 44 - Ensaio de molhabilidade para a amostra de titânio puro, utilizando água ultrapura (MiliQ), com volume de gota igual a 0,3 µL.....	58
Figura 45 - Ensaio de molhabilidade para amostra STT, utilizando água ultrapura (MiliQ), com volume de gota igual a 0,3 µL.....	59
Figura 46 - Ensaio de molhabilidade para amostra TT 350 °C (a), TT 530 °C (b) e TT 700 °C (c), utilizando água ultrapura (MiliQ), com volume de gota igual a 0,3 µL.....	59
Figura 47 - Comparação dos valores de ângulos de contato para as diferentes amostras....	60
Figura 48 - Curvas de tribocorrosão para os ensaios com 3N (superior) e 5N (inferior).....	61
Figura 49 - Imagens de MEV das trilhas das amostras de titânio puro. Trilha feita na amostra para o ensaio com 3 N (a) e ampliação de 10 k do centro da trilha (b), trilha para o ensaio com 5 N (c) e ampliação de 10 k do centro da trilha (d).....	64
Figura 50 - Imagens de MEV das trilhas das amostras STT. Trilha na amostra com ensaio de 3 N (a), ampliação de 10 k do centro da trilha (b) e ampliações dos detalhes (c) e (d).....	65
Figura 51 - Imagens de MEV das trilhas das amostras STT. Trilha na amostra com ensaio de 5 N (a), ampliação de 10 k do centro da trilha (b) e ampliações de 3 k e 15 k dos detalhes (c) e (d).....	66
Figura 52 - Imagens de MEV das trilhas das amostras TT 350 °C. Trilha na amostra com ensaio de 3 N (a), ampliação de 10 k do centro da trilha (b) e ampliações de 3 k e 10 k dos detalhes (c) e (d).....	67
Figura 53 - Imagens de MEV das trilhas das amostras TT 350 °C. Trilha na amostra com ensaio de 5 N (a), ampliação de 10 k do centro da trilha (b) e ampliações de 8 k e 3 k dos detalhes (c) e (d).....	68
Figura 54 - Imagens de MEV das trilhas das amostras TT 530 °C. Trilha na amostra com ensaio de 3 N (a), ampliação de 10 k do centro da trilha (b) e ampliações de 8 k e 10 k dos detalhes (c) e (d).....	69
Figura 55 - Imagens de MEV das trilhas das amostras TT 530 °C. Trilha na amostra com ensaio de 5 N, imagem feita com elétrons retroespalhados (a), imagem da mesma trilha, feita com elétrons secundários (b) e ampliações de 3 k e 10 k do centro da trilha (c) e (d).....	71
Figura 56 - Imagem feita através de elétrons retroespalhados da região da trilha na amostra TT 700 °C, testada com 3 N (a), imagem feita da mesma região com elétrons secundários (b), ampliação de 10 k do centro da trilha e ampliação de 8 k do detalhe (retângulo) (d).....	72

Figura 57 - Imagem feita através de elétrons secundários da região da trilha na amostra TT 700 °C, testada com 5 N (a), imagem feita da mesma região com elétrons secundários (b), ampliação de 10 k do centro da trilha e ampliação de 8 k do detalhe (d).....	73
Figura 58 - Curvas obtidas para as medidas de coeficiente de atrito para o ensaio com carga de 3N (superior) e 5N (inferior).....	75
Figura 59 - Resultados do ensaio de LDH.....	77
Figura 60 - Imagens de microscopia de fluorescência para as amostras analisadas no dia 1 do crescimento celular, com ampliações de 100 x na coluna da esquerda, e 200 x na coluna da direita.....	80
Figura 61 - Imagens de microscopia de fluorescência para as amostras analisadas no dia 4, com ampliações de 100 x na coluna da esquerda, e 200 x na coluna da direita.....	81
Figura 62 - Resultados da contagem celular para o dia 1 e dia 4.....	82
Figura 63 - Aumento celular, em percentual, na superfície das amostras.....	83
Figura 64 - Imagens de MEV para as células na superfície do titânio nos dias 1 e 4.....	84
Figura 65 - Imagens de MEV para as células na superfície da amostra STT nos dias 1 e 4..	85
Figura 66 - Nanotubos soltos na superfície de uma célula na amostra STT.....	86
Figura 67 - Imagens de MEV para as células na superfície da amostra TT 350 °C nos dias 1 e 4.....	87
Figura 68 - Imagens de MEV para as células na superfície da amostra TT 530 °C nos dias 1 e 4.....	88
Figura 69 - Imagens de MEV para as células na superfície da amostra TT 700 °C nos dias 1 e 4.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da interação dos implantes com os tecidos.....	4
Tabela 2 - Metais comumente usados como implantes.....	4
Tabela 3 - Composição química dos graus de titânio puro e da liga TiAl ₆ V ₄	5
Tabela 4 - Valores de resistência à tração, tensão de escoamento e alongamento, para os quatro graus de titânio puro e para a liga TiAl ₆ V ₄	5
Tabela 5 - Métodos de alterações químicas em implantes.....	11
Tabela 6 – Composição das soluções de óxido de titânio.....	17
Tabela 7 - Estruturas obtidas nas superfícies das amostras antes da imersão em SBF.....	18
Tabela 8 - Estruturas obtidas nas superfícies das amostras após a imersão em SBF.....	18
Tabela 9 - Gerações de nanotubos, com seus respectivos eletrólitos e características morfológicas dos nanotubos obtidos.....	25
Tabela 10 - Composição do eletrólito utilizado.....	32
Tabela 51 - Parâmetros utilizados na anodização do trabalho de Srimuangmak e Niyomwas (2011), comparados com os parâmetros utilizados neste trabalho.....	52
Tabela 62 - Resultados das análises químicas das amostras STT, TT 350 °C, TT 530 °C e TT 700 °C.....	53
Tabela 73 - Frações em peso das fases cristalinas.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCM	Centro de Caracterização Microestrutural
CSU	<i>Colorado State University</i>
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle's Medium</i>
DRX	Difração de Raios-X
ECM	Matriz extracelular
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro Fetal Bovino)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HDF	<i>Human Dermal Fibroblasts</i> (Fibroblastos Dérmicos Humanos)
LDH	Lactato Desidrogenase
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N	Newton
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SEM	Scanning Electron Microscopy
STT	Sem Tratamento Térmico
TT	Tratamento Térmico
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo geral	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
2. TITÂNIO E LIGAS PARA APLICAÇÕES EM BIOMATERIAIS	4
2.1 BIOATIVIDADE E OSSEOINTEGRAÇÃO DE BIOMATERIAIS.....	5
2.1.1 Rugosidade	8
2.1.2 Composição química	10
2.1.3 Influência da nanotopografia	12
2.1.4 Molhabilidade e energia de superfície	14
2.1.5 Cristalinidade da camada (influência da anatase e rutilo na bioatividade, propriedades mecânicas, resistência ao desgaste)	16
2.2 TÉCNICAS DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO Ti.....	20
2.2.1 Métodos Mecânicos	20
2.2.2 Métodos Químicos	20
2.3 PRODUÇÃO DE NANOTUBOS DE TiO ₂	22
2.4 TRIBOCORROSÃO EM TiO ₂	27
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	31
3.2 ANODIZAÇÃO.....	32
3.3 TRATAMENTO TÉRMICO	33
3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	34
3.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	34
3.4.2 Difração de raios-X (DRX)	34
3.5 MOLHABILIDADE.....	35
3.6 TRIBOCORROSÃO.....	35
3.7 ESTUDOS DE BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i>	38
3.7.1 Preparação/esterilização das amostras	38
3.7.2 Preparação do meio e Cultura celular	39
3.7.3 Semeadura celular	40
3.7.4 Ensaio de LDH (lactato desidrogenase)	42
3.7.5 Marcação celular	44
3.7.6 Microscopia de Fluorescência	45

3.7.7 Fixação para MEV (<i>SEM fixing</i>) e caracterização das células	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 CURVA DE ANODIZAÇÃO	49
4.2 MORFOLOGIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CAMADA.....	50
4.4 MOLHABILIDADE.....	58
4.5 ENSAIOS DE TRIBOCORROSÃO	61
4.5.1 Comportamento eletroquímico	61
4.5.2 Análise das trilhas de desgaste	64
4.5.3 Coeficiente de atrito	75
4.7 ESTUDOS DE BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i>	77
4.7.1 Ensaio de LDH	77
4.7.2 DAPI/Actin	78
4.7.3 Caracterização das células	83
5. CONCLUSÕES	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

Há algumas décadas, a solução para pacientes edêntulos era a utilização de coroas ou dentaduras removíveis com a única função de melhorar a mastigação. Porém, com o passar dos anos, as pessoas passaram a se preocupar mais com a estética, e no início da década de 1980 surgiram os primeiros implantes osseointegráveis. Foi um grande avanço, contudo, tanto pacientes quanto dentistas, atualmente, querem que um implante apresente tempo de tratamento e recuperação mais rápidos, com a aceleração da cicatrização (Elias et al., 2008; Trulsson et al., 2006; Buser et al., 2004). Visando satisfazer ambas as expectativas, muito foi investido em pesquisa e desenvolvimento de novos produtos.

Atualmente o titânio e suas ligas são os metais mais usados na fabricação de implantes dentários e próteses ortopédicas, devido principalmente às suas excelentes propriedades mecânicas e resistência à corrosão (Liu et al., 2004). O que confere biocompatibilidade ao titânio é a camada de óxido (TiO_2) formada espontaneamente quando exposto ao ar ou outras atmosferas ricas em oxigênio (Sul et al., 2001). Entretanto, essa camada natural de TiO_2 não é bioativa, resultando em uma fraca osseointegração, que pode levar à falha do implante após um longo tempo de uso (10 a 15 anos). Para solucionar esse problema, várias técnicas foram e estão sendo desenvolvidas para melhorar as propriedades da superfície de implantes de titânio, e, conseqüentemente, melhorar sua osseointegração.

Dentre estas técnicas, uma das mais estudadas é a oxidação anódica ou eletroquímica, tema deste trabalho, que consiste em uma técnica de passivação eletrolítica utilizada para aumentar a camada de óxido superficial do metal. A amostra a ser anodizada (no caso o titânio) é considerada o ânodo e conectada ao terminal positivo da fonte de alimentação. O cátodo, que é ligado ao terminal negativo, é geralmente um material inerte como a platina e dentro da célula eletroquímica é colocada a solução eletrolítica (Liu et al., 2004; Sul et al., 2001).

O processo de anodização depende de vários parâmetros tais como o potencial elétrico (método potenciostático) ou densidade de corrente (método galvanostático), composição e concentração do eletrólito, pH e tempo de oxidação. Além disso, modificações na composição química da camada de óxido de titânio foram testadas com a incorporação de íons de magnésio, cálcio e fósforo, com o objetivo de melhorar

a osseointegração (Zhu et al., 2001; Suh et al., 2003; Li et al., 2004; Liu et al., 2005; Sul et al., 2001; Park et al., 2007).

Fatores como a rugosidade, composição química, molhabilidade, cristalinidade e morfologia da superfície, são as principais características que afetam a osseointegração. Todas essas características podem ser controladas através de modificações de superfície.

Sabe-se que adicionando íons de Flúor (F^-) ao eletrólito utilizado na anodização é possível obter estruturas completamente diferentes, que são os nanotubos do óxido do metal no substrato (Macak et al., 2007). Superfícies contendo modificações topográficas em escala micro- e nanométrica de maneira controlada tem mostrado um efeito significativo nas funções celulares (Desai et al., 2000; Dalby et al., 2003; Berry et al., 2005).

Uma modificação de superfície em nanoescala em um implante endósseo também afeta as reações químicas da superfície (Mendonça et al., 2008). Logo, um material que possua a superfície com características nanotopográficas, irá apresentar melhores resultados de resposta celular do que superfícies com topografias convencionais (modificadas em micro e macro escala).

Outra modificação importante, é a adição de elementos bioativos melhorando as propriedades osteocondutivas do implante, ou seja, acelerando a formação do osso novo ao redor do implante (Cheng et al., 2013), como é o caso de eletrólitos contendo íons de cálcio e fósforo.

Além dos parâmetros de anodização, as propriedades da camada de nanotubos de TiO_2 (cristalinidade e propriedades mecânicas) são alteradas pelo tratamento térmico e, conseqüentemente, irão afetar sua resistência à tribocorrosão.

Um dos principais desafios no sucesso de um implante dentário, é que ele resista ao processo constante de tribocorrosão (ocorrência do desgaste e da corrosão simultaneamente) que ocorre no ambiente bucal. Primeiramente, o implante é submetido a um contato tribológico com o osso que, aliado ao processo de mastigação e à presença de partículas de comida, líquidos e saliva, propicia a tribocorrosão (Mathew et al., 2009). A corrosão do implante é o principal motivo de rejeição devido a infecções causadas por liberação de íons do metal (Song et al., 2007). Quando a tribocorrosão ocorre no ambiente biológico, ela é chamada de bio-tribocorrosão e sua compreensão é de extrema importância, para que sejam feitas melhorias prolongando a vida útil do implante.

Dentro deste contexto, pretende-se avaliar a tribocorrosão de nanotubos dopados com cálcio e fósforo, preparados via oxidação anódica e submetidos à diferentes temperaturas de tratamentos térmicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da temperatura de tratamento térmico nas propriedades físicas, químicas e de tribocorrosão e bioatividade de nanotubos de TiO_2 dopados com íons de Ca e P.

1.1.2 Objetivos específicos

- (a) Avaliar o efeito da temperatura de tratamento térmico na cristalinidade dos nanotubos de TiO_2 ;
- (b) Avaliar a fração das fases cristalinas rutilo e anatase formadas após o tratamento térmico na camada de nanotubos de TiO_2 ;
- (c) Avaliar a influência da cristalinidade nas propriedades de tribocorrosão da camada de nanotubos de TiO_2 ;
- (d) Avaliar a influência da cristalinidade na bioatividade da camada de nanotubos de TiO_2 .

2. TITÂNIO E LIGAS PARA APLICAÇÕES EM BIOMATERIAIS

Biomateriais são materiais utilizados para fabricação de órgãos artificiais, melhorar o funcionamento de outros órgãos ou repor estruturas específicas do corpo, através de contato direto ou indireto com o organismo (Bauer et al., 2013).

Para o sucesso da implantação no corpo humano, é fundamental que o material implantado possua a habilidade de desempenhar uma resposta adequada de acordo com o hospedeiro. Isso é chamado de Biocompatibilidade (Williams, 2008). A Tabela 1 apresenta a classificação da interação dos implantes com os tecidos.

Tabela 8 – Classificação da interação dos implantes com os tecidos.

Incompatível	Produção de substâncias em concentrações tóxicas que conduzem a efeitos nocivos ao organismo vivo, que resultam em uma rejeição do implante.
Biotolerante	Produção de substâncias, porém não em concentrações tóxicas levando a uma encapsulação dentro do tecido conjuntivo.
Bioinerte	Não há produção de substâncias tóxicas.
Bioativo	Interação positiva que conduz a uma adesão e interconexão ao longo da interface do implante/tecido.

Fonte: Bauer et al., 2013.

Para o caso de implantes metálicos, devem ser selecionados metais que não tenham tendência a sofrer corrosão, pois isso afeta diretamente a biocompatibilidade. A Tabela 2 apresenta os metais mais utilizados para fabricação de implantes.

Tabela 9 - Metais comumente usados como implantes.

Metal	Aplicação
Ligas Cobalto-Cromo	Próteses valvulares cardíacas, próteses dentárias, componentes de juntas artificiais, <i>stents</i> vasculares, placas de fixação ortopédica
Aço Inoxidável	Próteses dentárias, placas de fixação ortopédica, <i>stents</i> vasculares
Ligas de Titânio	Válvulas artificiais de coração, implantes dentários, componentes de juntas artificiais, parafusos ortopédicos, marca-passos, <i>stents</i> vasculares
Ouro ou Platina	Obturações dentárias, eletrodos para implantes cocleares
Ligas de Prata-Estanho-Cobre	Amálgamas dentários

Fonte: Bauer et al., 2013.

Existem quatro graus de titânio puro utilizados para fabricação de implantes, cuja composição está na Tabela 3 e, além do Ti puro, a liga TiAl₆V₄ também é bastante utilizada.

Tabela 10 - Composição química dos graus de titânio puro e da liga TiAl₆V₄.

Elemento	Composição % (massa/massa)				
	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	TiAl ₆ V ₄
N	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05 máx
C	0,08	0,08	0,08	0,08	0,10 máx
H	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015 máx
Fe	0,20	0,30	0,30	0,50	0,30 máx
O	0,18	0,25	0,35	0,40	0,20 máx
Al	-	-	-	-	5,5 – 6,75
V	-	-	-	-	3,5 – 4,5
Ti	Eq.				

Fonte: ASTM F 67 e F 136.

A seleção entre um dos quatro graus de titânio puro ou da liga TiAl₆V₄, dependerá, principalmente, das propriedades mecânicas desejadas e das considerações dos custos.

O titânio puro possui excelente resistência a corrosão, e a sua resistência a tração e tensão de escoamento irá variar de acordo com o grau de impurezas (principalmente os teores de oxigênio e ferro). A liga TiAl₆V₄ possui excelente conformabilidade a frio e suas propriedades de tração são superiores às do titânio puro (*Handbook of Materials for Medical Devices*, 2003). A Tabela 4 apresenta as comparações das propriedades mecânicas do titânio puro com a liga TiAl₆V₄.

Tabela 11 - Valores de resistência à tração, tensão de escoamento e alongamento, para os quatro graus de titânio puro e para a liga TiAl₆V₄.

Designação	Resistência à Tração (MPa)	0,2 % Tensão de Escoamento (MPa)	Alongamento (%)
Ti Grau 1	240	170	24
Ti Grau 2	340	280	20
Ti Grau 3	450	380	18
Ti Grau 4	550	480	15
TiAl ₆ V ₄	860	795	10 - 15

Fonte: Adaptado de *Handbook of Materials for Medical Devices*, 2003.

2.1 BIOATIVIDADE E OSSEOINTEGRAÇÃO DE BIOMATERIAIS

Além das características de biocompatibilidade, os implantes que serão fixados no osso (como o caso de implantes dentários) devem possuir um alto grau de bioatividade, ou seja, é preciso que a superfície deste implante estimule o crescimento e adesão celular sobre sua superfície.

Os estudos sobre osseointegração iniciaram-se na década de 1960, quando Branemark investigava a microcirculação sanguínea em tíbias de coelho com a ajuda

de uma câmara de observação feita em titânio. No entanto, ao tentar removê-la, percebeu uma perfeita união metal/osso. Assim, ele mudou radicalmente o rumo de sua pesquisa e começaram as primeiras pesquisas sobre integração óssea (Branemark et al., 1977).

O titânio puro é utilizado para fabricação de implantes dentários, devido à sua capacidade de osseointegração. Sabe-se que as células aderem à camada de óxido da superfície do metal (Elias et al., 2013). Essa camada de óxido é estável, aderente, contínua e, assim que exposta ao ar ou a meios corrosivos, pelo fato do titânio ser altamente reativo, é formada instantaneamente. Outra característica importante é que o óxido, ao ser danificado, é capaz de se regenerar em microssegundos (Ratner et al., 1996). As propriedades desse óxido protetor dependem das condições do ambiente. Em meios aquosos, o óxido é tipicamente TiO_2 , TiO_3 ou TiO e em altas temperaturas há o favorecimento da formação de TiO_2 (Donachie, 2000). O TiO_2 (dióxido de titânio) é o óxido mais estável e tem sido tema de muitos estudos pela possibilidade de ser utilizado como biomaterial.

As principais células envolvidas na osseointegração são os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea. É necessária a compreensão de duas definições importantes na área de osseointegração: adesão celular e ligação celular. A adesão se refere a força de fixação da célula em uma superfície ou o grau de dificuldade para deslocar essa célula. Já a ligação, está relacionada com o número de células aderidas à superfície, em relação ao número total de células que tiveram a oportunidade de se ligar. Os osteoblastos são células que dependem de estar ligados a uma superfície para produzir e mineralizar sua matriz extracelular. E somente após essa ligação é que começará a ocorrer a integração óssea, propriamente dita (Boyan et al., 2001).

A Fig. 1 apresenta a micrografia de um implante dentário, de titânio grau II, após 24 horas de imersão em uma suspensão contendo osteoblastos. Este experimento foi conduzido por Alves e Wassall (2009), onde foi analisada a biocompatibilidade e adesão celular na superfície do implante. As amostras foram submetidas a tempos de imersão de 24, 48 e 72 horas e os pesquisadores utilizaram um implante Titamax Liso[®], da empresa Neodent. Os resultados obtidos demonstraram que as células apresentaram boa ligação e adesão celular.

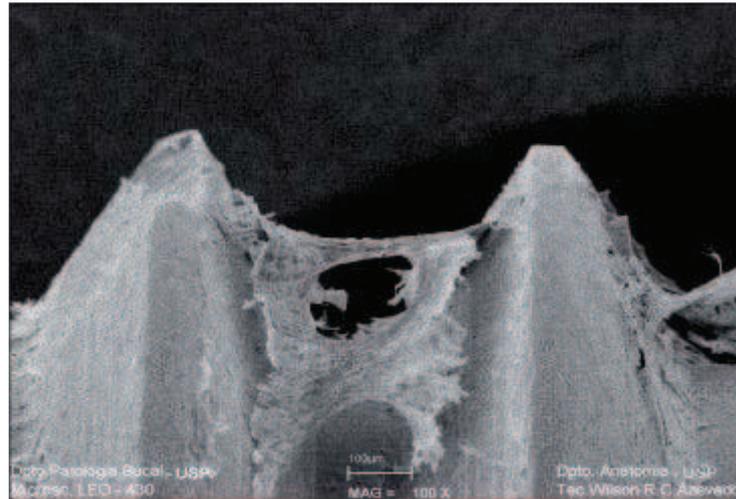


Figura 1 - Células aderidas a implante dentário, após 24 horas de imersão em suspensão com células ósseas (osteoblastos).
Fonte: Alves e Wassall, 2009.

Existe um protocolo convencional de implantação dentária, proposto por Branemark (1969 apud Elias, 2008), onde são determinadas duas etapas:

- 1 - estágio cirúrgico que é quando ocorre a preparação dos alvéolos e instalação do implante;
- 2 - fase protética que ocorre de 4 a 6 meses após a 1ª etapa. Molde, fabricação e instalação da prótese cerâmica.

Nesse período entre a primeira e a segunda etapa, é quando ocorre a osseointegração, que é o crescimento do osso em torno do implante e sua integração com ele. Durante esse tempo o paciente utiliza restaurações temporárias ou dentaduras e o implante não pode sofrer cargas funcionais até a cicatrização.

Na segunda etapa, após a cicatrização, é inserido o *abutment* (Fig. 2) que é a conexão entre o implante e a coroa (dente de cerâmica). Sobre o *abutment*, instala-se o dente, rigorosamente fabricado para se enquadrar no padrão dos outros dentes do paciente.

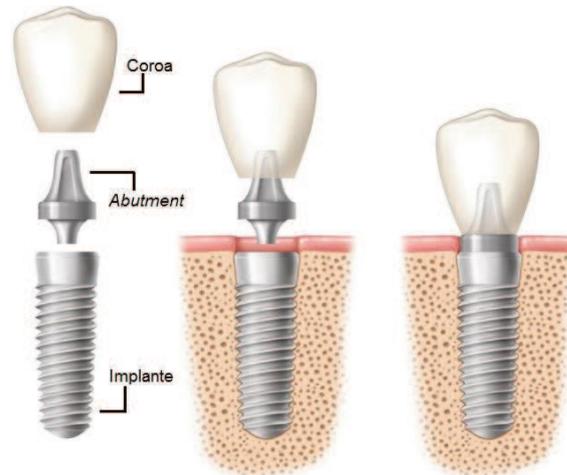


Figura 6 - Implante, *abutment* e coroa de uma prótese dentária, e sua respectiva montagem.
 Fonte: Adaptado de <<http://www.aaid-implant.org/about-dental-implants/what-are-dental-implants/>>.

Os principais fatores que influenciam o processo da integração óssea, são as propriedades da superfície como por exemplo rugosidade, composição química, molhabilidade e energia de superfície, cristalinidade e nanotopografia. Cada um desses fatores será comentado a seguir.

2.1.1 Rugosidade

Sabe-se que de acordo com as características da rugosidade da superfície do implante, a osseointegração irá responder de modos diferentes. Existem três escalas para a rugosidade: (i) macro, que varia de milímetros a dezenas de micrômetros e está, diretamente, relacionada com a geometria do implante; (ii) micro, com valores entre 1 e 10 μm , que está relacionada com a ancoragem mecânica no osso; (iii) nano, que está relacionada com adsorção de proteínas e adesão celular, e assim, diretamente influenciando a taxa de osseointegração (Le Guéhennec et al., 2007). A rugosidade irá influenciar a adsorção de proteínas, afetando a distribuição espacial dos locais de adsorção. Antes que ocorra a adesão celular, deve ocorrer a adsorção de proteínas na superfície do implante e quanto mais locais para as proteínas de fixarem, melhor será a adesão celular (Lee et al., 2014).

Em 2004, Brett et al. publicaram um trabalho onde compararam a resposta de um tipo de célula óssea, em relação a três superfícies de titânio puro com diferentes rugosidades. Foram utilizadas amostras com superfície polida (SMO), jateada (SLA) e com tratamento à plasma (TPS), com Ra iguais a 0,6, 4 e 5,2 μm respectivamente. Três importantes aspectos foram analisados: influência na morfologia celular, adesão

celular e crescimento celular. Como se observa na Fig. 3, as amostras SMO e TPS apresentaram melhor espalhamento celular, enquanto a amostra SLA exibiu regiões com células arredondadas. Segundo os autores, quanto maior o espalhamento, melhores os resultados da osseointegração.

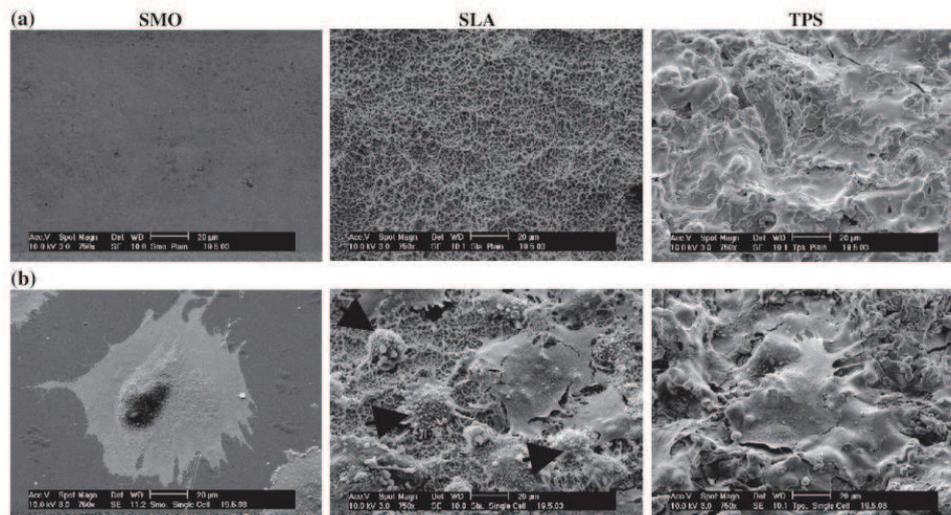


Figura 7 - Imagens de MEV das superfícies SMO, SLA e TPS. As superfícies são mostradas antes (a) e depois (b) de 3 horas de incubação das células ósseas.

Fonte: Brett et al., 2004.

Quanto à ligação celular, verificou-se que após 3 horas de incubação, das células adicionadas às amostras, 99% estavam fixadas na amostra SMO, 91% na SLA e 85% na TPS. E, por fim, o crescimento celular apresentou melhores resultados para as amostras SMO e TPS, como mostra a Fig. 4.

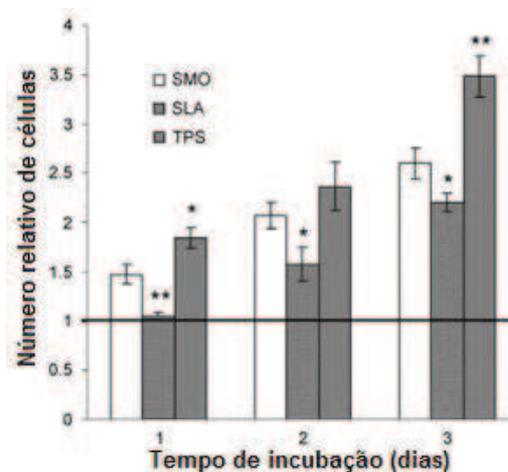


Figura 8 - Efeitos das diferentes superfícies de titânio no crescimento celular primário.

Fonte: Brett et al., 2004.

Cumpra frisar que esses ensaios foram feitos em amostras de titânio puro, focando apenas na relação da rugosidade com o comportamento celular. Não quer dizer que, apenas reduzindo-se o valor de Ra será obtida uma boa osseointegração.

2.1.2 Composição química

Existem dois tipos, principais, de alterações químicas possíveis para superfícies de biomateriais: (i) adição de fases inorgânicas (hidroxiapatita ou fosfatos de cálcio) e (ii) adição de fases orgânicas (Ehrenfest et al., 2010). A adição de fases inorgânicas melhora as propriedades osteocondutivas do implante, ou seja, acelera a formação do osso novo ao redor do implante (Cheng et al., 2013). Isso ocorre porque a barreira de energia para nucleação da apatita é muito alta e apenas no local do tecido ósseo essa barreira é reduzida, portanto o fenômeno só ocorre se o tecido estiver sob condições normais. Assim, para um material artificial promover a nucleação da apatita, é necessário que em sua superfície estejam presentes grupos funcionais que favoreçam o evento da nucleação. Passada essa fase, a apatita consome íons de cálcio e fosfatos presentes no fluido corporal, para continuar seu crescimento (Uchida et al., 2002). Por isso, na maior parte dos casos, as fases inorgânicas são adicionadas por meio de revestimentos à base de fosfato de cálcio e composto por hidroxiapatita. A região ao redor do implante irá liberar fosfato de cálcio, aumentando a concentração de fluidos corporais e, assim, favorecendo a deposição de apatita biológica sobre o implante (Daculsi et al., 2003).

Quando um implante possui CaP (fosfato de cálcio) na sua superfície, assim que inserido no corpo, o CaP irá sofrer dissolução, cujos produtos são Ca^{2+} e PO_4^{3-} , que são os maiores constituintes do osso no corpo humano (Lee et al., 2014).

Existem outros métodos que visam aprimorar a biocompatibilidade do titânio, que estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Métodos de alterações químicas em implantes.

Métodos químicos	Camada modificada	Objetivo
Tratamento ácido	Camada óxida superficial < 10 nm	Remover pontos de óxidos e contaminação.
Tratamento alcalino	~ 1 µm de gel de titanato de sódio	Melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou osteocondutividade.
Tratamento com peróxido de hidrogênio	~ 5 nm óxido com interior denso e exterior poroso	Melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou osteocondutividade.
Sol-gel	~ 10 nm de fina película, como fosfatos de cálcio, TiO ₂ e sílica	Melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou osteocondutividade.
CVD (Deposição química a vapor)	~ 1 µm de TiN, TiC, TiCN, diamante, DLC	Melhorar resistência ao desgaste, resistência a corrosão e compatibilidade sanguínea.
Oxidação Anódica	~ 10 nm até 40 µm de uma camada de TiO ₂ , adsorção e incorporação de ânions do eletrólito	Produzir topografias específicas na superfície; melhorar a resistência a corrosão; melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou osteocondutividade.
Métodos bioquímicos	Deposição de revestimento Modificação através de titânio silanizado, fotoquímico, <i>self-assembled monolayers</i> , <i>protein-resistance</i> , etc.	Induzir a resposta de células e tecidos específicos.

Fonte: Adaptado de Kulkarni et al., 2014.

Os tratamentos ácido, alcalino e com peróxido de hidrogênio, se baseiam na utilização de soluções e as reações ocorrem na interface superfície da amostra/solução. Por outro lado o método Sol-gel, se caracteriza por reações que ocorrem na solução e não na interface entre a amostra e a solução e é utilizado para depositar revestimentos cerâmicos. Esse método produz um filme homogêneo, com possibilidade de controle da sua microestrutura através de parâmetros utilizados (Liu et al., 2004).

CVD é um processo que envolve reações químicas entre um gás e a superfície do substrato, originando a deposição de um composto não-volátil. E os métodos bioquímicos envolvem a deposição de biomoléculas sobre a superfície do implante. Existem alguns métodos disponíveis para esta prática, porém a desvantagem é que não garantem uma camada homogênea (Kulkarni et al. 2014).

O método que envolve a anodização, é tema deste trabalho e será explicado com detalhes no ítem 3. Trata-se de um método de passivação eletrolítica, onde é forçado, através de corrente elétrica, o crescimento de uma camada de óxido.

2.1.3 Influência da nanotopografia

Para o funcionamento ideal das células, é necessário que ocorra perfeita interação entre elas e a matriz extracelular (ECM) (Fig. 5). Essa matriz é composta por uma rede de substratos, que interage com a célula em um nível nanométrico. Estudos mostram que no caso de superfícies com nanoestruturas artificiais, a resposta celular ocorre na mesma proporção da ECM natural.

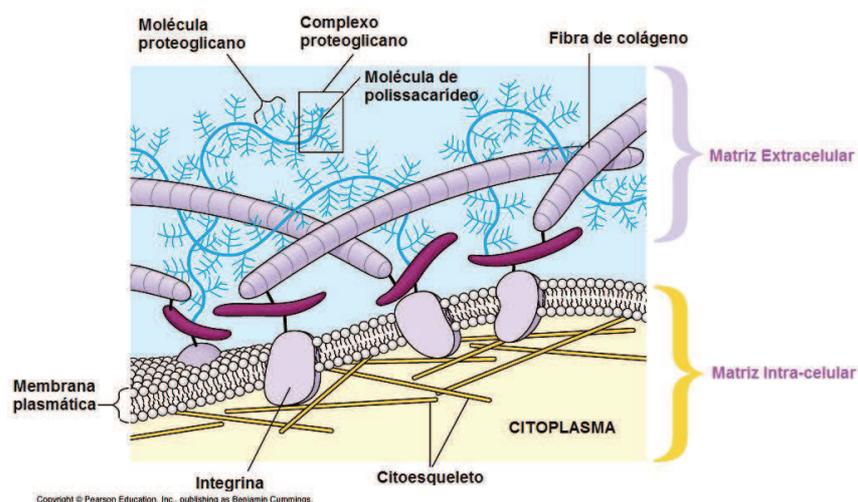


Figura 9 - Identificação da Matriz Extracelular (ECM).

Fonte: Adaptado de <<http://www.swiss-alp-health.ch/science.php?lang=en>> Acesso em 29 de jul. 2015.

Uma modificação de superfície em nanoescala, em um implante endósseo, também afeta a química da superfície (Mendonça et al., 2008). Sendo assim, um material que possua a superfície com alterações topográficas em escala nanométrica, irá apresentar melhores resultados de resposta celular do que superfícies com topografias convencionais.

A Fig. 6 traz um esquema que pode ser utilizado para relacionar a influência da rugosidade, composição química e nanotopografia da superfície de um implante.

Existem vários tipos de proteínas envolvidas no processo de adesão celular. O esquema mostra a interação dessas proteínas com uma superfície lisa e com uma

superfície que possua certa rugosidade. Verifica-se que quanto mais locais disponíveis para a adsorção de proteínas, maior será a quantidade de proteínas na superfície atraindo maior quantidade de células. Os locais onde contém CaP, ao sofrer dissolução irá gerar Ca^{2+} e PO_4^{3-} (cargas positivas e negativas) permitindo a ligação com qualquer grupo funcional carregado nas moléculas de proteína.

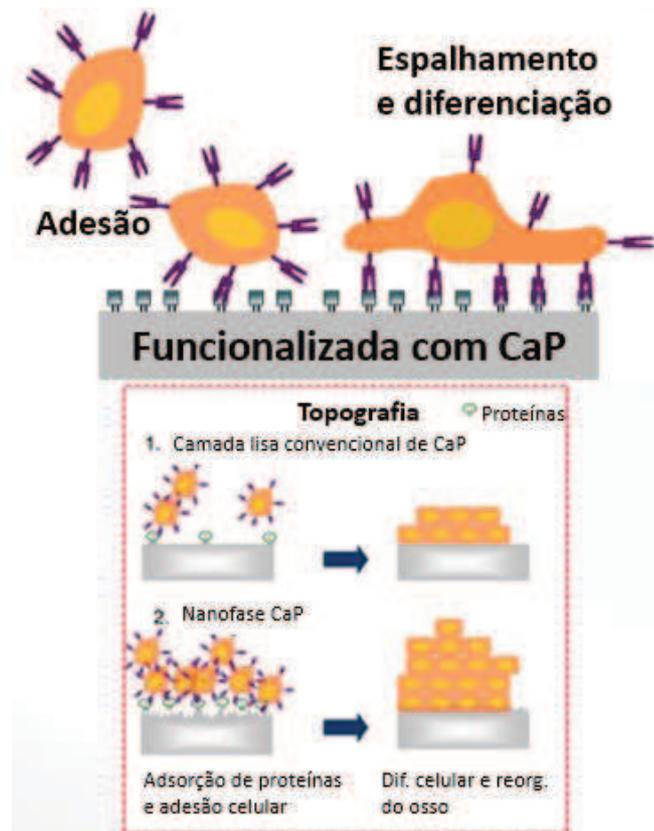


Figura 10 - Efeitos da alteração nanotopográfica na resposta celular.
Fonte: Adaptado de Lee et al., 2015.

Como foi mostrado no item 2.1.1, a rugosidade da topografia, irá influenciar o espalhamento, adesão e mobilidade das células. Kantawong et al. (2009) testaram o comportamento de amostras de Níquel que possuíam *nanopits* em relação a amostras com a superfície lisa. O autor comenta que pelo fato dos filopódios das células, possuírem a mesma ordem de magnitude isto melhoraria a adesão celular (Fig. 7).

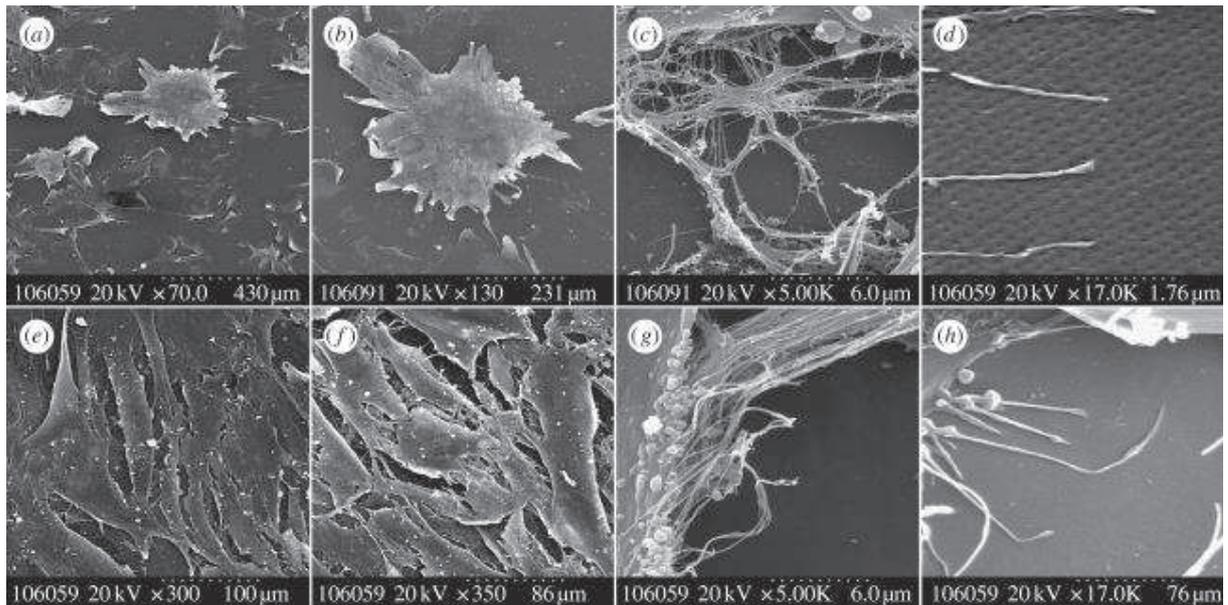


Figura 11 - Micrografias de MEV da interação das superfícies com as células osteoprogenitoras. Sequência da amostra com nanopits (a–d) onde as células formam agregados semelhantes aos nódulos ósseos (a, b). As células usam seus filopódios para detectar os nanopits da superfície (c, d). Na superfície plana as células estão completamente espalhadas (e, f) e proliferadas, formando uma camada de tecido confluenta. Também (g, h) células utilizando seus filopódios para sentir o substrato. Fonte: Kantawong et al., 2009.

2.1.4 Molhabilidade e energia de superfície

Devido à ação da gravidade, ao depositar uma gota sobre uma superfície sua tendência é se espalhar até que a coesão do líquido (forças internas), forças gravitacionais e tensões superficiais entrem em equilíbrio (Kubiak et al., 2011). Sendo assim, a análise da molhabilidade e energia de superfície ajuda a compreender as propriedades da superfície de um sólido. Para avaliar a molhabilidade de um sólido por um líquido é medido o ângulo de contato θ (Fig. 8).

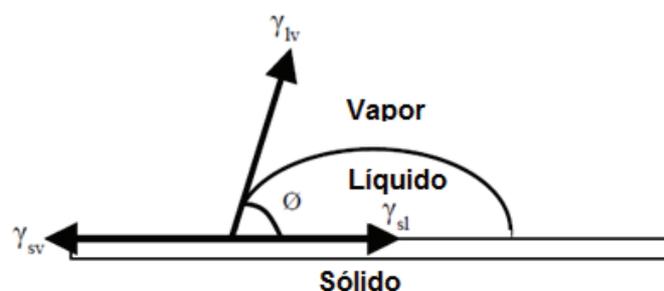


Figura 8 - Diagrama esquemático do ângulo de contato e das tensões interfaciais das três superfícies e na fronteira das três fases.

Fonte: Subedi, 2001.

A relação mais importante que envolve ângulo de contato, é a equação de Young (*Equação 1*). Ela relaciona o ângulo de contato (θ), energia de superfície do sólido (γ_{sv}), tensão interfacial entre o sólido e o líquido (γ_{sl}) e tensão na superfície do líquido (γ_{lv}) (Subedi, 2011).

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}} \quad \text{Equação 1}$$

Observando a equação, percebe-se que existem duas maneiras de aumentar o valor do $\cos \theta$ e assim diminuir o ângulo de contato: (i) diminuindo a tensão na superfície do líquido ou (ii) aumentando a energia de superfície do sólido. Para o caso da molhabilidade de biomateriais, a opção (i) não é considerada, pois não podemos alterar as propriedades de fluidos corporais. No entanto, podemos aumentar a energia de superfície do implante, através de modificações superficiais.

Wenzel (1936 apud Kubiak, 2011) foi quem primeiro constatou que quanto mais elevada a rugosidade de uma superfície, maior seria a área da interface sólido-líquido e isso afetaria diretamente a molhabilidade.

A Fig. 9 exibe os limites de ângulo de contato e os regimes em que a superfície se encontra. Varia desde superhidrofílico, θ entre 0 e 10° , que é uma superfície que absorve o líquido totalmente, ou quase totalmente, e superhidrofóbico, θ acima de 150° , que é uma superfície que repele totalmente o líquido.

Regime	Super-hidrofílico	Hidrofílico	Hidrofóbico	Super-hidrofóbico
Diagrama da gota				
Ângulo de Contacto	$\theta < 10^\circ$	$\theta < 90^\circ$	$\theta > 90^\circ$	$\theta > 150^\circ$

Figura 9 - Valores do ângulo de contato para cada regime.

Fonte: http://alfaconnection.net/pag_avsf/fqm0101.htm.

Através de modificações superficiais em um implante, é possível alterar o regime de molhabilidade e a energia de superfície de um material e assim influenciar a adsorção de proteínas e adesão celular. Quanto mais hidrofílico, melhor será essa adsorção. Vários trabalhos descrevem essas modificações por meio de metodologias

que envolvem luz UV (Lai et al., 2008) e deposição de revestimentos orgânicos (Schmidt-Stein et al., 2009). Porém, também existem pesquisas que tratam da influência da superfície hidrofóbica na adsorção de fibrinogênio, que é uma glicoproteína essencial para a coagulação sanguínea. Testes apontam que a hidrofobicidade favorece a adsorção dessa glicoproteína (Rodrigues et al., 2006).

2.1.5 Cristalinidade da camada (influência da anatase e rutilo na bioatividade, propriedades mecânicas, resistência ao desgaste)

O TiO_2 cristaliza em três principais estruturas: rutilo, anatase e bruquita. No entanto, apenas rutilo e anatase possuem aplicações industriais. As células unitárias das fases anatase e rutilo são mostradas na Fig. 10.

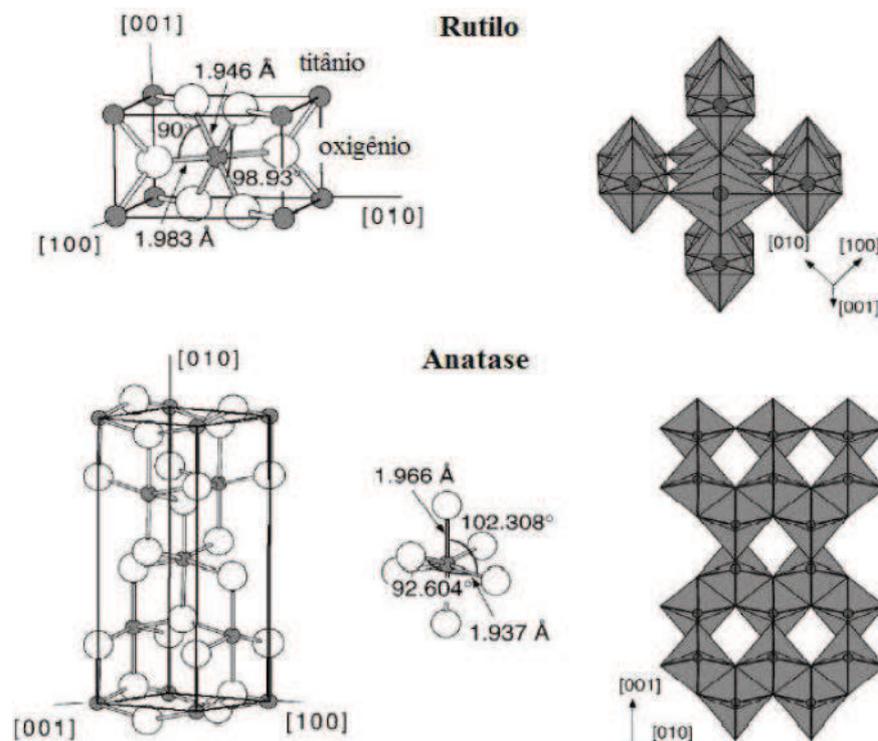


Figura 10 - Estruturas cristalinas da anatase e do rutilo.
Fonte: Diebold et al., 2003.

As duas estruturas, consistem em um átomo de titânio rodeado por seis átomos de oxigênio em uma configuração octaédrica distorcida. A simetria de cada estrutura é o que as difere. O rutilo e anatase possuem simetria tetragonal e a bruquita, simetria romboédrica, os comprimentos e ângulos das ligações, na bruquita, diferem entre si.

Uma célula unitária do rutilo contém duas moléculas de TiO_2 , e a anatase contém 4, mas devido a estrutura da anatase ser mais alongada, sua densidade é menor (Diebold, 2003 e Landmann et al., 2012). O rutilo é considerado mais estável que a anatase que é metaestável, por se transformar em rutilo em temperaturas acima de 600 °C.

É conhecido que estruturas cristalizadas propiciam melhores propriedades térmicas e mecânicas, assim como o aprimoramento de propriedades ópticas e elétricas. A cristalização é obtida através de tratamentos térmicos e o controle de parâmetros como o tempo, temperatura de tratamento e modo de resfriamento, decidem o tipo e o teor da estrutura cristalina (Du et al., 2011 e Kondo, 2007).

No entanto, quando há apenas um tipo de estrutura cristalina na superfície do implante, espera-se que algumas propriedades sejam melhoradas e essas propriedades variam de acordo com a estrutura. Por exemplo, foi observado que a cristalização da fase anatase apresenta maior habilidade de induzir a deposição de apatita que a fase rutilo. Sendo assim, interfere diretamente na osseointegração (Tang et al., 2004). Solazzo et al. (2007) comprovaram a eficácia de um revestimento à base de anatase (AC) para utilização em biomateriais. Foram inseridos 8 implantes em tíbias de coelhos, onde 4 implantes eram revestidos com AC e, os outros 4 o autor chamou de ‘implantes de titânio comercial’. Os autores verificaram que os implantes com AC apresentaram resultados superiores em relação à osseointegração.

Uchida et al. (2002) testaram a deposição de revestimentos sol-gel, cujas composições encontram-se na Tabela 6, em placas de sílica de alta pureza. Após as deposições, as amostras foram tratadas termicamente entre 300 e 800 °C e imersas em solução de SBF (*Simulated Body Fluid*) por um período de 14 dias. As nomenclaturas Ti-NO, Ti-AC e Ti-DC são apenas para diferenciar quanto a composição química das soluções.

Tabela 6 – Composição das soluções de óxido de titânio.

Designação	Razões Molares					
	TiPT	C ₂ H ₅ OH	H ₂ O	HNO ₃	AcDc	DEA
Ti-NO	1	9,3	1	0,1	-	-
Ti-AC	1	9,3	1	0,1	1	-
Ti-DE	1	9,3	1	0,1	-	1

TiPT, Tinatano de tetráisopropil; AcDc, acetilacetona ; DEA, dietanolamina.

Fonte: Adaptado de Uchida et al., 2002.

Através da análise da superfície utilizando difratometria de raios-X no modo Filmes Finos, foi identificado as estruturas indicadas na Tabela 7, antes da imersão em SBF. Na Tabela 8 são mostrados os resultados da análise após os 14 dias de imersão.

Tabela 7 - Estruturas obtidas nas superfícies das amostras antes da imersão em SBF.

Designação	Temperaturas de Tratamento Térmico (°C)				
	300	500	600	700	800
Ti-NO	Amorfa	Anatase	Anatase	Anatase	Anatase
Ti-AC	Amorfa	Anatase	Anatase	Anatase	Anatase
Ti-DE	Amorfa	Amorfa	Anatase	Anatase + Rutilo	Rutilo

Tabela 8 - Estruturas obtidas nas superfícies das amostras após a imersão em SBF.

Designação	Temperaturas de Tratamento Térmico (°C)				
	300	500	600	700	800
Ti-NO	Amorfa	Apatita + Anatase	Apatita + Anatase	Apatita + Anatase	Apatita + Anatase
Ti-AC	Amorfa	Apatita + Anatase	Apatita + Anatase	Apatita + Anatase	Apatita + Anatase
Ti-DE	Amorfa	Amorfa	Apatita + Anatase	Apatita + Anatase + Rutilo	Apatita + Rutilo

Analisando, conjuntamente, os resultados do DRX com as imagens de MEV feitas após a imersão de SBF (Fig. 11), o autor concluiu que as deposições em formato esférico que aparecem nas imagens, são cristais de apatita.

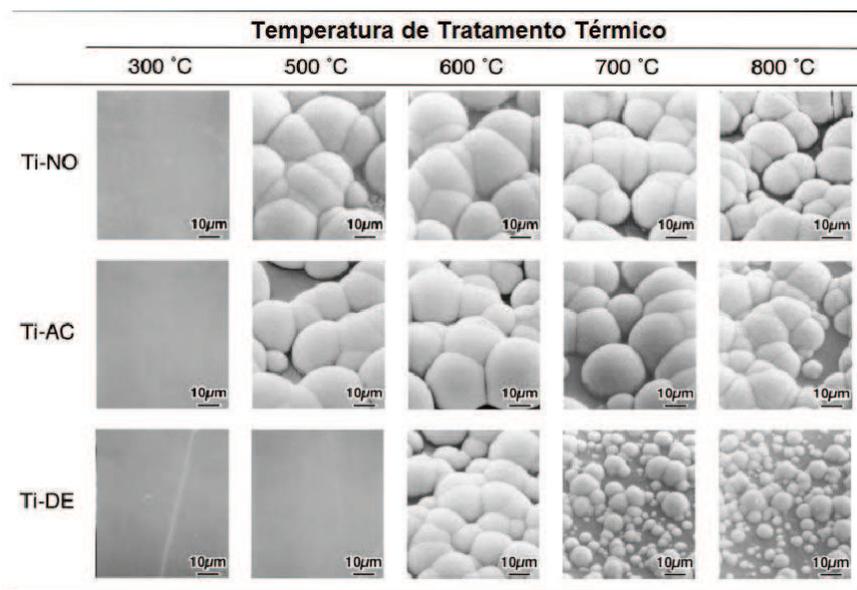


Figura 11 - Micrografias de MEV das superfícies após imersão em SBF por 14 dias.
Fonte: Uchida et al., 2002.

Verificou-se que nas superfícies com estrutura amorfa não houve nucleação de apatita, nas superfícies com rutilo e anatase houve nucleação, porém onde havia anatase a nucleação foi mais uniforme e nítida.

Como é possível verificar na Fig. 12, o autor explica que o ajuste do plano (0001) da apatita ao plano (110) da anatase ou (101) do rutilo, propicia uma sobreposição dos cristais de OH presentes na apatita e de O presentes na anatase e no rutilo. Isto tornaria a anatase mais favorável a formação de apatita, do que o rutilo.

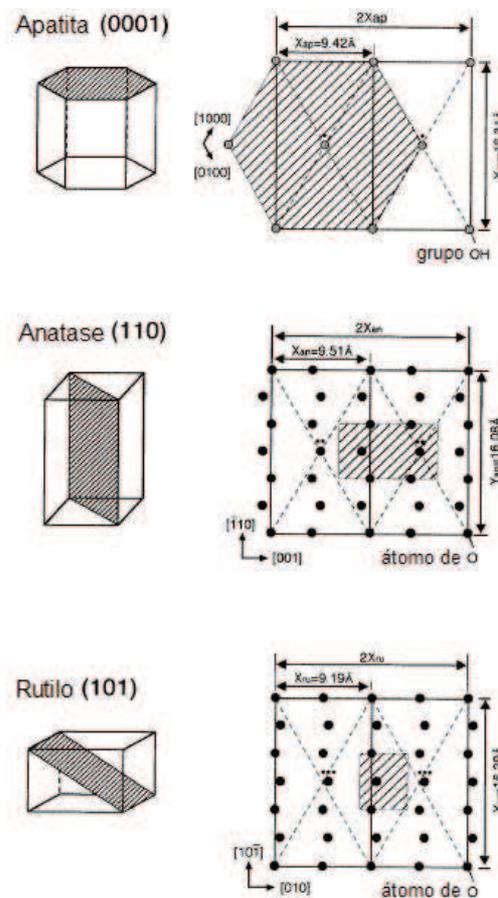


Figura 12 - Posições do grupo hidroxil no plano (0001) no cristal de hidroxiapatita comparado com as posições do oxigênio no plano (110) da anatase e (101) do rutilo.

Fonte: Uchida et al., 2002.

2.2 TÉCNICAS DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO Ti

Existem várias técnicas de modificação superficial utilizadas para melhorar a bioatividade e osseointegração do titânio. Elas podem ser divididas em métodos mecânicos, químicos, bioquímicos e físicos, como foi mostrado na Tabela 4.

2.2.1 Métodos Mecânicos

Entre estes métodos, estão a usinagem, jateamento, lixamento e polimento, cujo principal objetivo é alteração da rugosidade para obtenção de topografias específicas. Todos esses métodos envolvem a aplicação de forças externas e remoção de material da superfície. O processo de usinagem pode alterar propriedades superficiais de um material, como por exemplo, o aumento da dureza (Liu et al., 2004). Como foi mostrado no item 2.1.1, um material que teve sua superfície usinada ou jateada, pode apresentar melhores resultados de bioatividade. Para obtenção de superfícies com um grau de acabamento maior, é utilizado o polimento que muitas vezes antecede outro tipo de modificação.

2.2.2 Métodos Químicos

Os principais métodos químicos foram listados na *Tabela 4* na seção 2.1.2. Aqui será dada atenção especial a Anodização.

A anodização é uma técnica de passivação eletrolítica utilizada para aumentar a camada de óxido superficial do metal. A amostra a ser anodizada (no caso o titânio) é considerado o ânodo e conectada ao terminal positivo da fonte de alimentação. O cátodo, que é ligado ao terminal negativo, é geralmente um material inerte como a platina e dentro da célula eletroquímica é colocada a solução eletrolítica (Fig. 13). O metal irá reagir com o íon O^{2-} (proveniente da água do eletrólito) para formar a camada óxida.

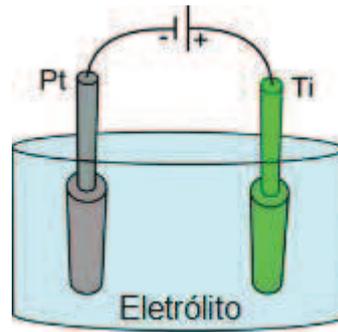


Figura 13 - Esquema da célula eletroquímica.
Fonte: Galstyan et al., 2013.

Há várias décadas, estudos pioneiros mostraram ser possível crescer uma camada de óxido ($\cong 100$ nm) na superfície do titânio, via anodização em eletrólito aquoso (Young, 1961 e Vermilyea, 1963). A estrutura do óxido pode ser amorfa ou cristalina, dependendo dos parâmetros utilizados no processo, como: o potencial aplicado, corrente elétrica e tempo de anodização. Geralmente baixas tensões geram uma estrutura amorfa.

Uma morfologia completamente diferente pode ser obtida, se íons F^- estiverem presentes no eletrólito e se as condições da anodização forem propícias. Estruturas ordenadas em forma de nanotubos/nanoporos podem ser formadas como mostra a Fig. 14. A morfologia da estrutura é afetada pelas condições da anodização e pelos parâmetros da solução (concentração de HF, pH e teor de água no eletrólito) (Macak et al., 2007).

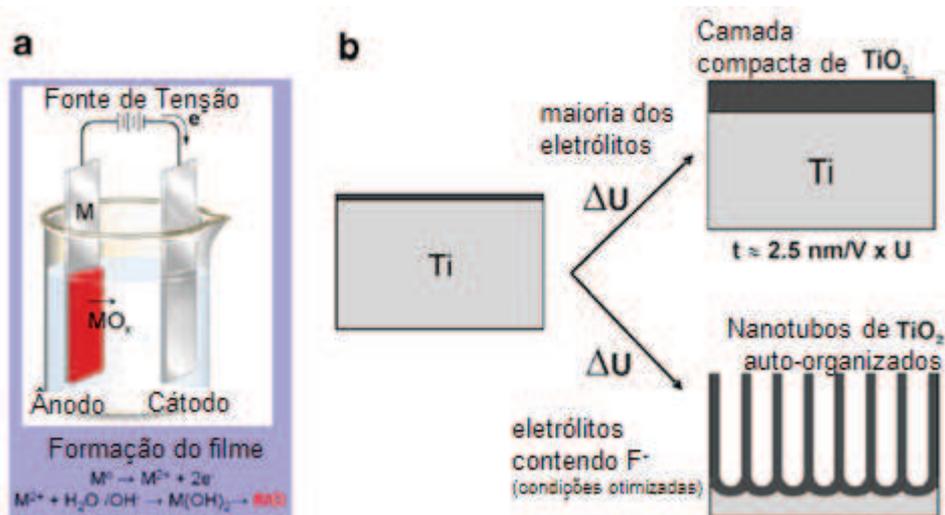


Figura 14 - Esquema da célula de anodização (a) e óxido formado (b). Dependendo da natureza do eletrólito, a camada de óxido será compacta ou nanotubular.

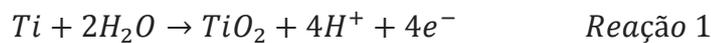
Fonte: Adaptado de Macak et al., 2007.

2.3 PRODUÇÃO DE NANOTUBOS DE TiO₂

Apesar de o titânio ser conhecido há muito tempo por suas aplicações em biomateriais, o estudo de nanotubos de TiO₂ é relativamente novo. Por volta de 1990, com a descoberta dos nanotubos de carbono, iniciou-se o interesse por materiais nanotubulares e abriu-se caminho para a pesquisa de nanotubos de não-carbono. Outros tipos de materiais nanotubulares representavam uma diversidade química, estendendo a área de possíveis aplicações, novas combinações de propriedades físico-químicas, e muitas vezes uma síntese mais fácil (e mais barata) que a dos nanotubos de carbono. Essas características, tornaram os nanotubos de não-carbono em materiais atrativos para aplicações tecnológicas (Bavykin et al., 2006).

Sendo assim, as técnicas para produção de nanotubos de TiO₂, foram desenvolvidas por volta de 1998 com a Síntese Hidrotérmica, 1999 através da Síntese Química e 2001 com a Síntese Eletroquímica, que será abordada neste trabalho.

A fabricação de nanotubos, pode ser explicada por três reações. A *Reação 1* apresenta a reação do titânio com o íon O²⁻, proveniente da água, para a formação da camada de óxido.



A *Reação 2* representa a dissolução química do óxido pelo íon F⁻. O crescimento dos nanotubos baseia-se na competição entre essas duas reações.



O permanente processo de dissolução, faz com que os íons Ti⁴⁺ que chegam à interface óxido/eletrólito possam ser solubilizados em TiF_6^{2-} (*Reação 3*). No crescimento da camada de óxido compacta, pode ocorrer a formação de um hidróxido indesejável $[Ti(OH)_2O_y]$ que não precipita na presença de íons F⁻, justamente devido à formação do $[TiF_6]^{2-}$ (Beranek et al., 2003).



A Fig. 15 esquematiza essas três reações.

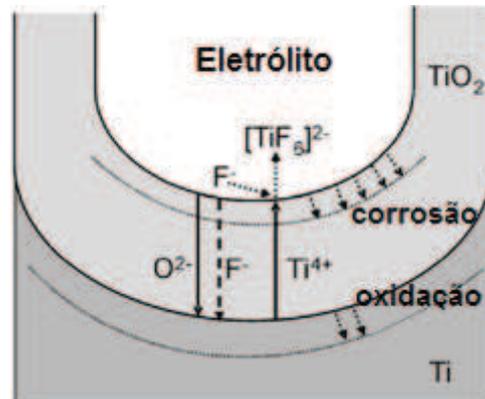


Figura 15 - Resultado da presença de fluoretos no crescimento dos nanotubos.
Fonte: Adaptado de Macak et al., 2007.

Observando o comportamento da corrente, com o passar do tempo da anodização (Fig. 16), percebe-se que para o caso do eletrólito sem Flúor, o valor da corrente sofre uma queda acentuada e depois esse valor se mantém baixo devido ao crescimento da camada de óxido que é isolante. Essa camada de óxido possui espessura limitada que pode estar relacionada com a precipitação do hidróxido $[Ti(OH)_2O_y]$ (Macak et al., 2006). Para o eletrólito com presença de Flúor, após a queda o valor da corrente volta a subir e se mantém constante. Isso ocorre porque a formação dos nanotubos aumenta a área da superfície, elevando a corrente novamente.

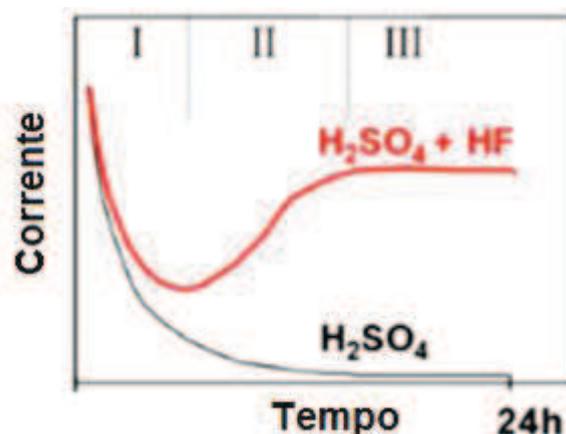


Figura 16 - Variação da corrente com o tempo para eletrólito com e sem presença de Flúor.
Fonte: Adaptado de Macak et al., 2007.

Em 2011, Srimuangmak e Niyomwas publicaram um estudo sobre a influência dos efeitos da tensão e do teor de água no eletrólito, para anodização do titânio. Eles

utilizaram eletrólito à base de etilenoglicol com adição de 2 vol.% de água e sem adição de água, e também variaram as tensões aplicadas em 20 e 30 V. As curvas obtidas foram muito semelhantes entre si, porém não são parecidas com a curva teórica da produção de nanotubos (Fig. 16). No trabalho de Srimuangmak e Niyomwas, a anodização durou cerca de 4 horas. Na Fig. 17 é possível observar as curvas de anodização utilizando eletrólito à base de etilenoglicol.

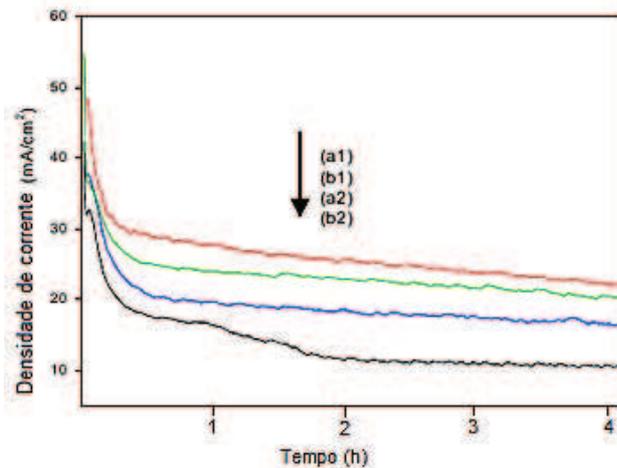


Figura 17 - Curvas densidade de corrente - tempo para eletrólito à base de etileno glicol contendo NH_4F e HF a 45°C por 4 horas: adição de água deionizada (a) 2 vol.% e (b) 0 vol.%; diferentes tensões (1) 20 e (2) 30 V.

Fonte: Adaptado de Srimuangmak e Niyomwas, 2011.

Diferentes eletrólitos irão influenciar o aspecto desta curva e consequentemente influenciar a morfologia dos nanotubos. Porém, o esquema do processo de crescimento dos nanotubos de TiO_2 via anodização, seguirá as mesmas etapas independente da composição do eletrólito (Fig. 18).

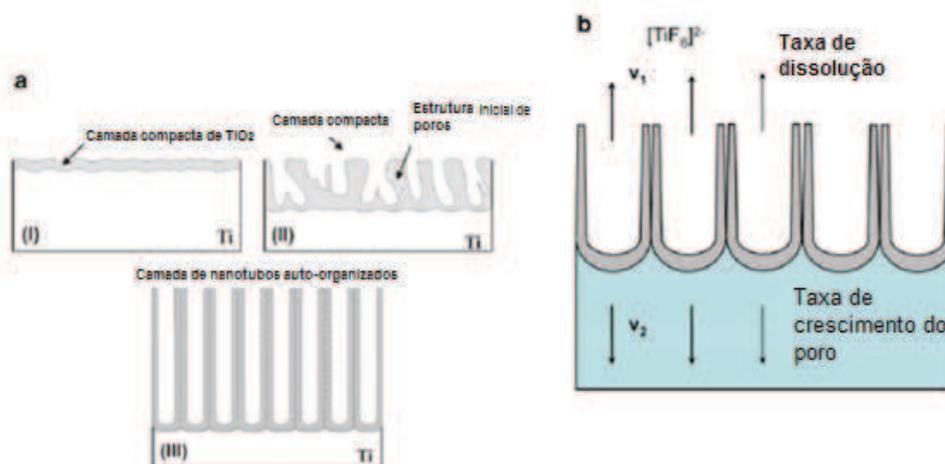


Figura 18 - Etapas da formação dos nanotubos de TiO_2 .

Fonte: Adaptado de Macak et al., 2007.

I – formação da barreira de óxido, simultânea queda da corrente;

II – a superfície é atacada localizadamente, e começa o crescimento de poros que após algum tempo já estão em grande número;

III – o processo é estabilizado quando o crescimento dos poros (já com formato de tubos) e a dissolução do óxido entram em equilíbrio (Macak et al., 2007), tornando a corrente estável.

Assim que o processo de anodização termina, os nanotubos possuem estrutura amorfa. Então são submetidos a um tratamento térmico para que eles sejam aderidos ao substrato, e sua estrutura se transforme em cristalina (anatase e rutilo).

Alguns autores dividem os nanotubos em 4 gerações em função dos parâmetros de anodização, como apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Gerações de nanotubos, com seus respectivos eletrólitos e características morfológicas dos nanotubos obtidos.

Nanotubos de TiO_2	Eletrólito	Características
1ª geração	Soluções aquosas de HF	(i) 0,5 μm de comprimento; (ii) pouco organizados; (iii) estriados.
2ª geração	Soluções aquosas de sais de fluoretos (0,1 – 0,5 wt%)	(i) Mais do que 0,5 μm de comprimento; (ii) auto organizados; (iii) estriados.
3ª geração	Soluções orgânicas contendo sais de fluoretos (0,1 – 0,5 wt%) e pequenas quantidades de água (0,1 – 5 wt%)	(i) Comprimento entre 100 – 1000 μm ; (ii) auto organizados; (iii) lisos (estriados se o teor de água for acima de um limite crítico).
4ª geração	Soluções orgânicas contendo sais de fluoreto (0,1 – 0,5 wt%) e pequenas quantidades de água (geralmente de 0,1 – 5 wt%)	(i) Comprimento entre 100 – 1000 μm ; (ii) altamente organizados; (iii) lisos (estriados se o teor de água é acima de um limite crítico); (iv) refinamento das condições de anodização ou técnicas com múltiplos passos.

Fonte: Regonini et al., 2013.

Em 2003, Varghese et al. publicaram um trabalho abrangente sobre os efeitos do tratamento térmico em nanotubos de TiO_2 . Os autores afirmaram que os nanotubos são estáveis até 580° C e não sofrem retrações significativas ao serem tratados em atmosferas com oxigênio. A Fig. 19 exhibe os resultados de difração de raios-X em ângulo rasante (GADRX). Observou-se a presença de cristais de anatase na faixa de temperatura entre 280 e 430° C, com a camada de nanotubos se tornando uma mistura de anatase e rutilo a partir de 480°C. Com o aumento da temperatura, ocorre

o aumento do teor de rutilo, até os nanotubos colapsarem. Em 880° C não existem mais a presença de nanotubos. O fato da célula unitária do rutilo ser mais densa e possuir um formato diferente da célula unitária da anatase, pode ser o principal fator no colapso dos nanotubos. Quando ocorre a transformação da anatase em rutilo, o espaço nas paredes dos nanotubos se torna insuficiente para a nova estrutura.

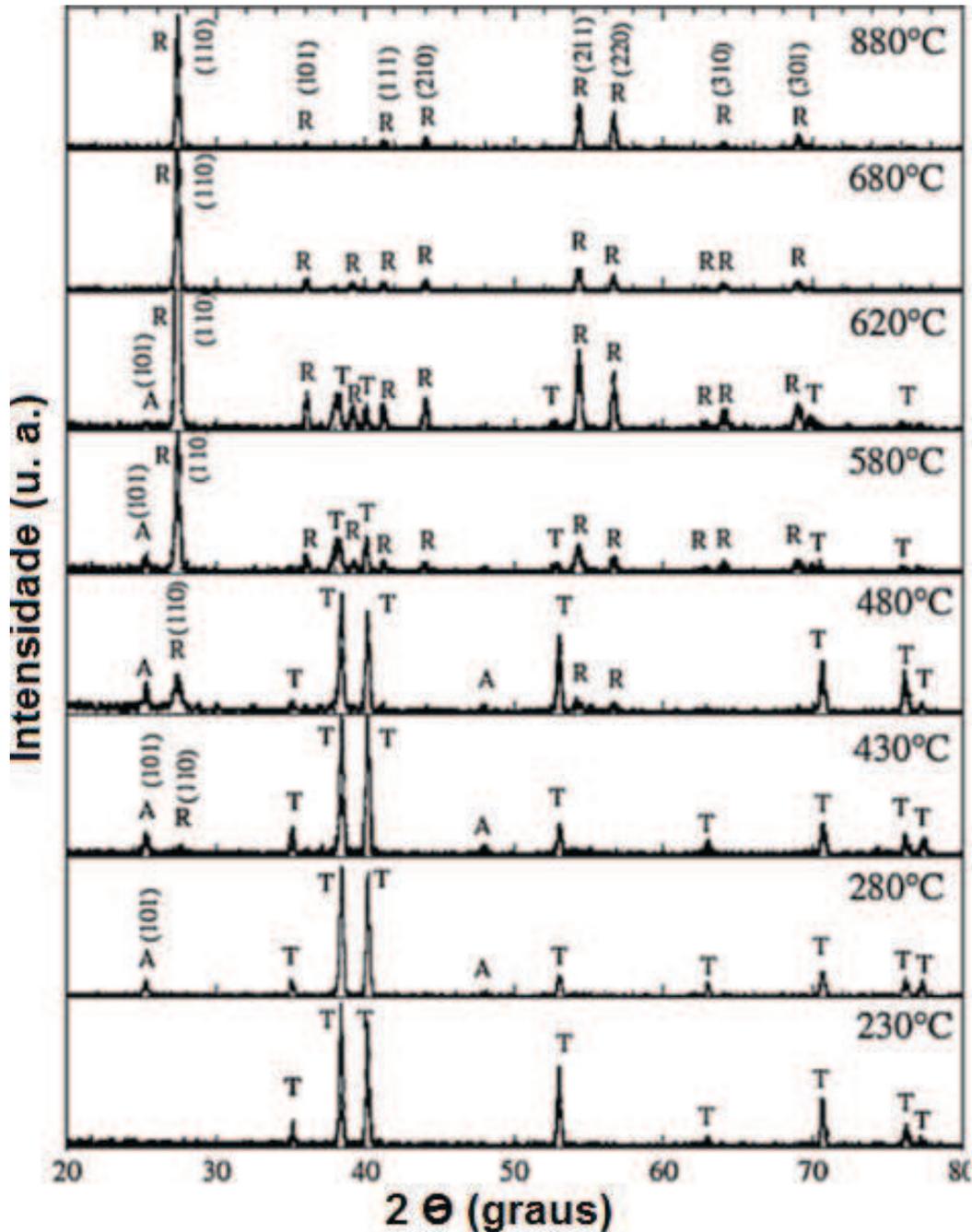


Figura 19 - Espectros obtidos por GAXRD em nanotubos de TiO_2 , tratados termicamente em temperaturas entre 230 e 880° C.

Fonte: Adaptado de Varghese et al., 2003.

2.4 TRIBOCORROSÃO EM TiO_2

A tribocorrosão é a junção de duas importantes áreas de estudo dos sistemas mecânicos: Tribologia e Corrosão. Onde, a Tribologia é a ciência que estuda a fricção, desgaste e lubrificação entre dois corpos, e a Corrosão trata dos aspectos químicos da degradação de um material em um sistema (Fig. 20) (Mathew et al., 2009).

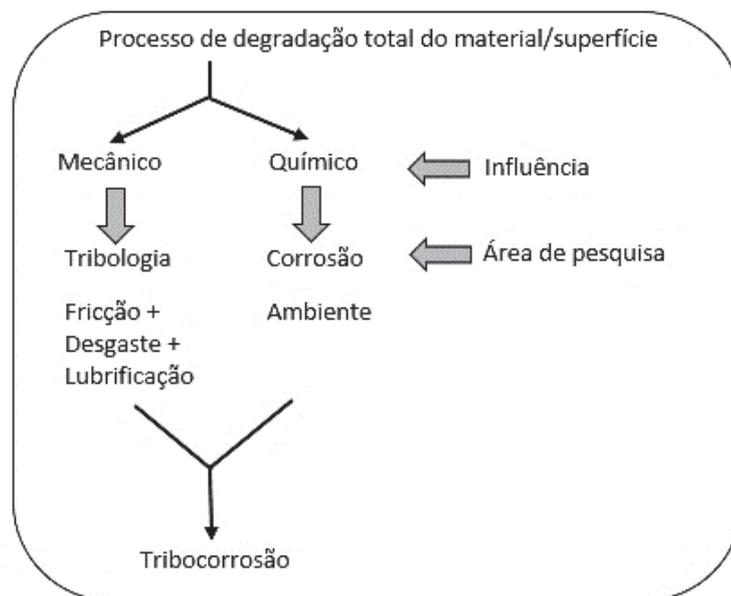


Figura 20 - Esquema da definição de Tribocorrosão.
Fonte: Adaptado de Mathew et al., 2009.

Logo, a Tribocorrosão pode ser definida com um fenômeno de degradação da superfície de um material onde ocorra a ação combinada de um carregamento mecânico, com o ataque corrosivo causado pelo ambiente.

A Tribocorrosão reúne interações mecânicas e químicas que provocam degradação de materiais em movimento relativo. O sistema tribológico é composto, geralmente, por dois materiais em fricção, o meio e os produtos formados. As propriedades de cada um destes componentes, influencia acelerando ou desacelerando a perda de material (Mathew et al., 2009). O que é reconhecido, é que os efeitos apenas da corrosão ou do desgaste, quando não associados, são muito mais tênues do que na Tribocorrosão (Wood, 2013).

Em seres vivos, esse fenômeno pode ocorrer quando há a presença de próteses. Por exemplo, para o caso de prótese dentária, um dos principais desafios

no sucesso de sua implantação, é que ela resista ao processo constante de tribocorrosão que ocorre no ambiente bucal.

Do ponto de vista da influência mecânica, existem vários modos de contatos entre dois corpos, que podem ocorrer na Tribocorrosão. Esses modos de contato são exibidos na Fig. 21 e são classificados em: Deslizamento, *Fretting*, Rolante, Microabrasão e Impacto. O modo denominado *Fretting*, que está assinalado, é o modo possível de ocorrer em implantes dentários. A principal diferença entre o Deslizamento e o *Fretting*, é a amplitude da movimentação que para o caso do *Fretting* é inferior a 500 μm , ou seja, são micro movimentações. Como o esquema mostra, esse contato pode acontecer entre dois ou três corpos (presença de partículas).

Modo de contato	Esquema
Deslizamento <ul style="list-style-type: none"> ▪ Unidirecional ▪ Recíproco Desgaste corrosivo Polimento químico-mecânico	
<i>Fretting</i> Odontologia Articulações do corpo (quadril e joelho)	
Rolante Odontologia Articulações do corpo (quadril e joelho)	
Microabrasão Rolante <i>Grooving</i>	
Impacto Erosão, corrosão Ataque por impacto	

Figura 21 - Modos de contato na Tribocorrosão.
 Fonte: Adaptado de Mathew et al.2009.

Em nossa boca, ocorre um processo constante de Tribocorrosão devido ao processo de mastigação, que ocasiona o *Fretting*, e à presença de partículas de comida, líquidos e saliva, que favorecem a Corrosão (Mathew et al., 2009). A

corrosão do implante é o principal motivo de rejeição devido a infecções causadas pela liberação de íons do metal (Song et al., 2007). A denominação dada a Tribocorrosão quando ela ocorre com o modo de contato *Fretting*, é *Fretting-corrosion*.

A Tribocorrosão em um implante dentário pode ocorrer em duas regiões: na conexão entre o implante e o *abutment* e no contato do implante com o osso. Quando ocorre entre o *abutment* e o parafuso, se deve, principalmente, ao desajuste rotacional das duas peças ou afrouxamento do parafuso. A presença de micro lacunas na interface *abutment*/implante pode favorecer a entrada de fluidos (saliva ou líquidos), microrganismos e pequenas partículas (alimentos) na conexão do sistema (Alves et al., 2015). A interface implante/osso também é propícia para a ocorrência da Tribocorrosão, uma vez que durante todo o processo da mastigação, o implante sofre micro movimentações e também pode favorecer a presença de micro lacunas. As duas regiões afetadas pela Tribocorrosão em uma prótese dentária, estão realçadas em vermelho na Fig. 22.



Figura 22 - Áreas possivelmente afetadas pela tribocorrosão, em implantes dentários.
Fonte: Adaptado de Mathew et al., 2009.

O comportamento da tribocorrosão está diretamente relacionado a três fatores: (i) propriedades dos materiais em contato, (ii) a mecânica do contato tribológico e (iii) propriedades físico-químicas do ambiente (Wood, 2013).

Vieira et al. (2006), verificaram os efeitos da *Fretting-corrosion* em titânio puro grau 2, utilizando soluções de saliva artificial (SA), SA + ácido cítrico, SA + inibidor catódico, anódico e orgânico. Os resultados indicaram que a evolução da repassivação estava fortemente relacionada com a natureza do eletrólito. Os melhores resultados foram obtidos para SA + ácido cítrico e SA + inibidor anódico. Isto ocorreu, provavelmente, devido à natureza da oxidação e reações de redução ocorrendo na área de contato durante a *Fretting-corrosion*.

Laurindo (2014) estudou a influência do método de oxidação por plasma eletrolítico (PEO) e do tratamento térmico nas propriedades de tribocorrosão da camada de óxido de titânio. Foi utilizado titânio puro grau 2, e para o PEO, um eletrólito aquoso contendo Ca e P. Verificou-se que condições de oxidação com maior energia produziram uma camada interna compacta mais espessa que refletiu nas melhores propriedades. O tratamento térmico também afetou as propriedades alterando a cristalinidade da camada, e assim promovendo uma melhora na resistência à corrosão e ao desgaste.

Fica claro nesta revisão, que a importância dos nanotubos na osseointegração já é conhecida. Porém, ainda não é conhecido o comportamento dessas nanoestruturas em situações de Tribocorrosão. Para que o implante seja viável por longo tempo, ele deve atender não apenas a solicitações biológicas, mas também às que se referem a engenharia de materiais.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O fluxograma da Fig. 23 mostra as etapas seguidas no procedimento experimental, que serão detalhadas nos próximos itens.

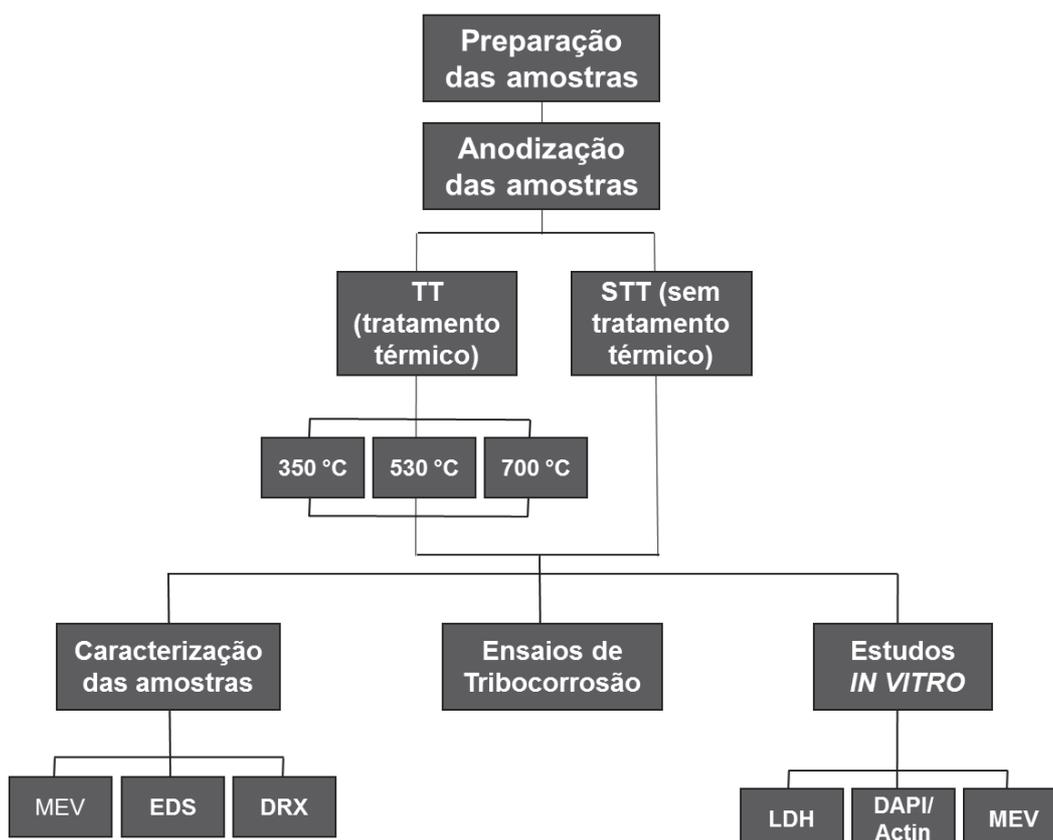


Figura 23 - Fluxograma das etapas do procedimento experimental.

3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a realização dos experimentos, foi utilizado titânio Grau 4 ASTM F67 (Acnis do Brasil), cuja composição encontra-se na Tabela 3. Foram utilizadas amostras na forma de placas com a dimensão de 20 x 30 x 1 mm (Fig. 24a). Para facilitar o preparo metalográfico, as amostras foram coladas em um porta amostras (Fig. 24b), lixadas com lixas de SiC de granulometrias #320, #600, #800 e #1200 (Fig. 24c) e polidas com Sílica Coloidal (Fig. 24d). A limpeza foi feita em banho de ultra-som, com acetona, álcool e água deionizada, durante 15 minutos (Fig. 24e).

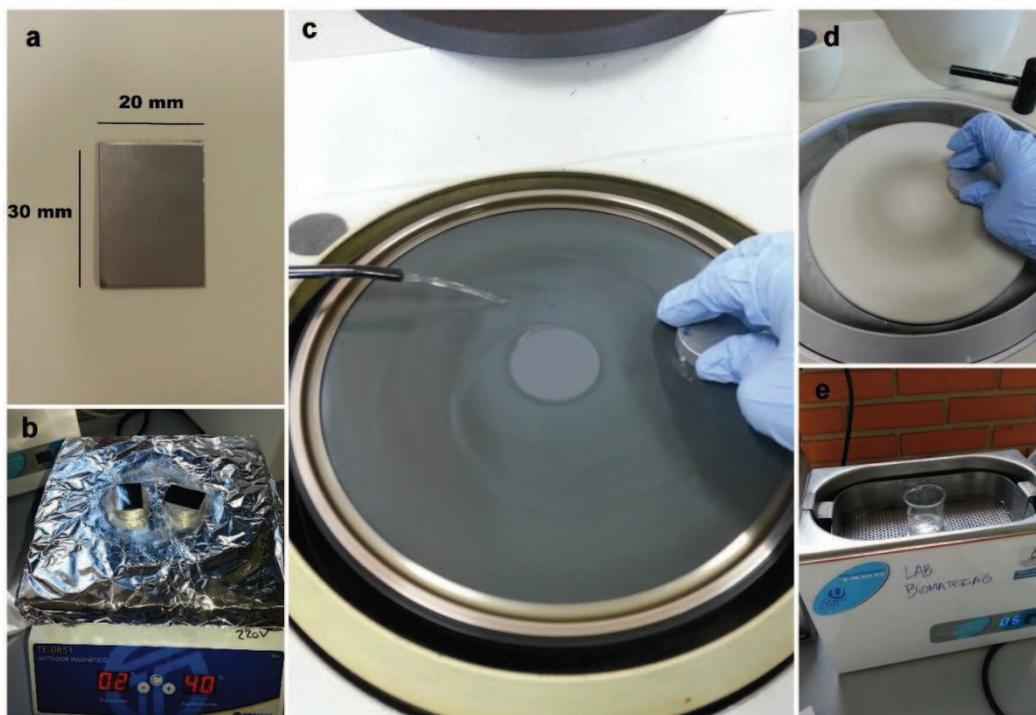


Figura 24 - Sequência da preparação das amostras. Amostra cortada (a), fixação no porta amostras (b), lixamento (c), polimento (b) e limpeza (e).

3.2 ANODIZAÇÃO

Para o processo de fabricação dos nanotubos, foi utilizado o método da anodização. A composição do eletrólito utilizado, se encontra na Tabela 10. Os teores da água deionizada (H_2O), ácido fluorídrico (HF) e do etilenoglicol, estão expressos em porcentagem de volume, onde, o volume da solução aquosa de Ca e P utilizado é proveniente da solução 0,02 M (3,88 g/L) de Glicerofosfato de Cálcio (Reagen) e 0,15 M (26,424 g/L) de Acetato de Cálcio (Ermex).

Tabela 10 - Composição do eletrólito utilizado.

Elemento	Teor
Solução aquosa de Ca e P	20 % vol.
HF	0,7 % vol.
Etilenoglicol	79,3 % vol.

➔

GpCa + AcCa (para 1 L de solução)
3,88 g GpCa
26,4 g AcCa

Utilizando uma fonte de corrente contínua programável (Chroma), a anodização foi conduzida no modo potencioestático com tensão de 60 V, corrente limitada a 1 A, durante 6 horas. Esses parâmetros (programação da fonte e teor

do eletrólito) foram selecionados por terem sido aplicados em trabalhos anteriores do mesmo grupo de pesquisa, e apresentado bons resultados. Houve formação de nanotubos e deposição de CaP na superfície.

A Fig. 25 mostra a imagem de três béqueres (cubas eletrolíticas) contendo o eletrólito dopado com CaP, os cabos vermelhos (amostra) e pretos (platina) conectados a fonte.

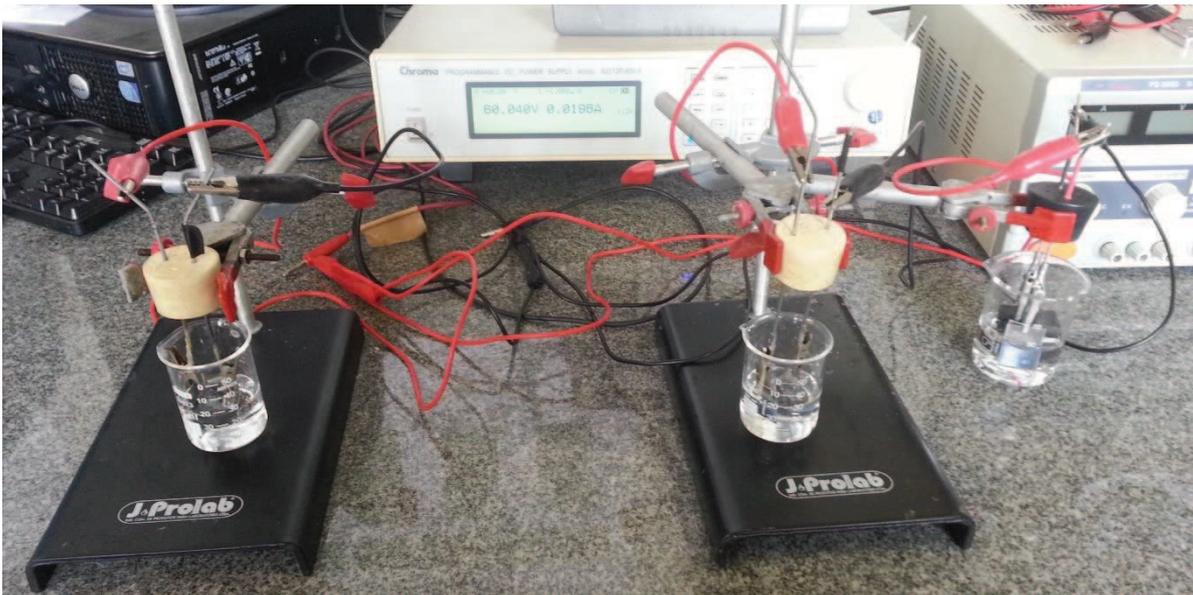


Figura 25 - Aparato experimental para anodização das amostras.

Com o término da anodização, as amostras foram lavadas com água deionizada e secas em ar comprimido.

3.3 TRATAMENTO TÉRMICO

Após limpas e secas, as amostras foram encaminhadas ao forno para tratamento térmico. O forno elétrico (EDG) foi programado para um aquecimento de 5 °C/minuto, até atingir a temperatura estabelecida, e assim manter-se por 10 horas. Três temperaturas de tratamento térmico foram escolhidas: 350 °C, 530 °C e 700 °C, sendo as amostras amorfas empregadas como grupo controle. A intenção na seleção dessas temperaturas, era estudar as transformações cristalinas até uma condição que fosse uma mistura de anatase e rutilo, sem chegar na condição de 100% rutilo. Como foi mostrado previamente, a camada de nanotubos sofre um colapso quando é toda transformada em rutilo.

Para facilitar o entendimento dos passos seguintes, serão utilizadas as seguintes abreviações:

Sem tratamento térmico → STT

Tratadas termicamente a 350 °C → TT 350 °C

Tratadas termicamente a 530 °C → TT 530 °C

Tratadas termicamente a 700 °C → TT 700 °C

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

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

Para a realização das caracterizações por MEV/EDS foi utilizado o equipamento Tescan Vega III LV do Centro de Caracterização de Materiais (CCM) - PUCPR. O objetivo da análise com o MEV foi analisar a morfologia da camada de nanotubos, e verificar se houve alteração nas camadas tratadas em temperaturas diferentes. O EDS foi realizado para confirmar a composição química dos nanotubos e verificar se não foi depositado na superfície algum elemento indesejado, como o Flúor.

3.4.2 Difração de raios-X (DRX)

A análise por difração de Raios-X foi realizada empregando um difratômetro (Shimadzu, DRX-7000) do CCM/PUCPR, com radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV e corrente elétrica de 30 mA. O objetivo do emprego desta técnica foi determinar as fases cristalinas formadas após os tratamentos térmicos. A geometria utilizada foi de filmes finos, com ângulo de incidência igual a 10° , varredura variando de 10° a 80° , passo de $0,02^\circ$, velocidade de 1° por minuto e rotação de 20 rpm.

Também foi realizada uma segunda varredura, mais lenta, com o objetivo de utilizar os resultados na análise quantitativa de Anatase e Rutilo. A geometria utilizada foi de filmes finos, com ângulo de 10° , varredura variando de 10° a 30° , passo de $0,02^\circ$, velocidade de $0,25^\circ$ por minuto e rotação de 20 rpm.

3.5 MOLHABILIDADE

O ensaio de molhabilidade foi conduzido utilizando o goniômetro (Kruss Easydrop) do CCM/PUCPR. A medição do ângulo de contato foi realizada por meio de medição contínua do ângulo de contato da gota de água ultrapura (MiliQ), com volume igual a 0,3 μL , sobre a superfície durante 10 segundos. Devido à característica superhidrofílica da superfície das amostras, foi considerado o último valor do ângulo de contato, pois em menos de 10 segundos a gota já estava totalmente espalhada. Foram utilizadas as imagens obtidas, para a melhor análise de cada condição.

3.6 TRIBOCORROSÃO

Para os ensaios de Tribocorrosão, foi empregado um tribômetro universal (CSM Instruments) e uma cuba especialmente fabricada para adaptação no equipamento, utilizando poliacetal (Delrin®).

Nas Fig. 26a e b, é possível observar as faces superior e inferior da cuba, respectivamente. A face inferior foi feita sob medida para que coubessem exatamente as placas de titânio mostradas na Fig. 24a. A Fig. 26c apresenta a peça de latão que também foi confeccionada para este experimento, e que serviu para fazer o contato elétrico entre a amostra e o potenciostato InviumStat (Invium). Sobre essa peça de latão foi colada a amostra com a ajuda de uma fita de cobre, colocada na região de interface (nanotubos/titânio puro) para reforçar o contato elétrico, pois, verificou-se que a região que continha os nanotubos estava isolando a amostra.

Para a vedação da cuba foi utilizado um O-ring, que aparece devidamente posicionado na Fig. 26d, e a Fig. 26e exibe a face inferior da cuba montada. Por cima da peça de latão foram coladas duas tiras de papel adesivo, para evitar o contato elétrico com a plataforma do tribômetro. A Fig. 26f mostra a face superior da cuba, onde uma região da amostra foi pintada com esmalte de unhas, para limitar a área exposta ao eletrólito.

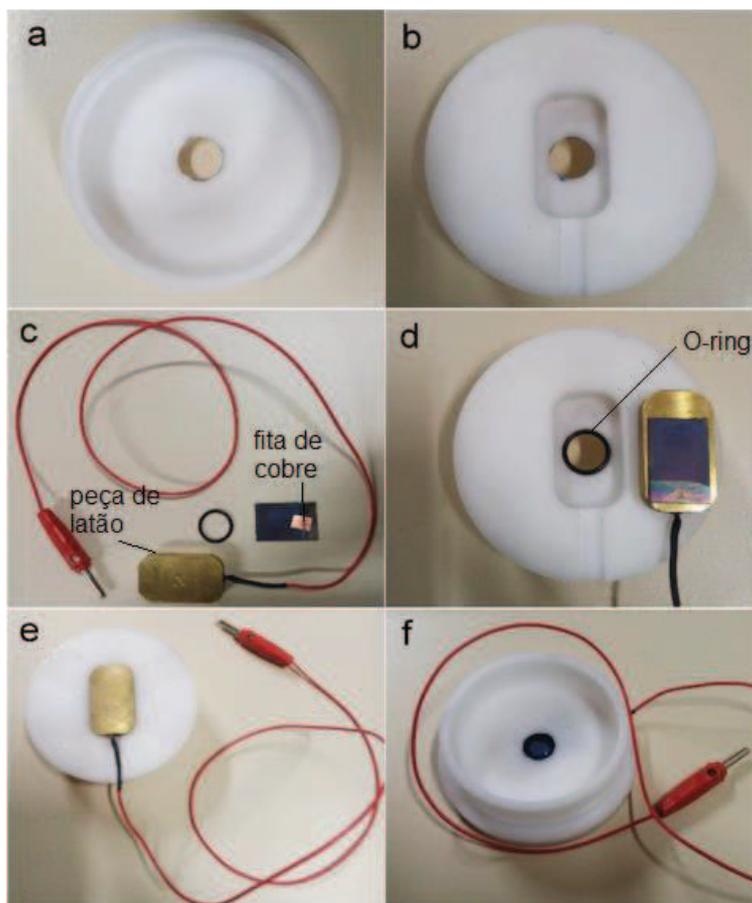


Figura 26 - Montagem da cuba de tribocorrosão: vista superior (a) e inferior da cuba (b), peça de latão utilizada para o contato elétrico com o potenciostato e fita de cobre colada na amostra (c), O-ring posicionado para vedação da cuba (d), vista inferior da cuba montada (e) e vista superior da cuba montada (f).

A cuba foi fixada na plataforma por meio de quatro elementos de fixação em forma de “L” e 4 parafusos Allen de aço inoxidável, possíveis de serem observados na Fig. 27a. Ao apertar esses parafusos, o O-ring é pressionado contra a amostra, vedando da cuba. Na mesma figura também se observa o eletrodo de referência e o contra eletrodo já imersos no eletrólito. Para o ensaio de cada amostra, foram utilizados 40 mL de solução de NaCl (9 mg/mL).

A Fig. 27b mostra o sistema pronto para o início do ensaio, com os computadores responsáveis pela aquisição de dados do tribômetro e do potenciostato.



Figura 27 - Detalhe do sistema montado, com os eletrodos imersos no eletrólito (a) e imagem do tribômetro conectado ao potenciostato e aos dois computadores (b).

A primeira etapa do teste consistiu na montagem do sistema e da programação do potenciostato para monitorar o potencial de circuito aberto (OCP) da amostra imersa durante 1 hora. Após este período o potencial final foi registrado. Esse valor (OCP final) foi aplicado entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho (amostra) e foi monitorada a corrente de corrosão (I_{corr}) que passava através do eletrodo de trabalho.

A detecção amperométrica foi iniciada, e após um tempo de 58 segundos foi iniciado o ensaio tribológico com deslizamento linear-recíproco. A detecção continuou por 2 minutos após o término da movimentação.

Os ensaios foram realizados com cargas normais de 3 e 5 N, com a repetição de duas vezes para cada carga (Fig. 28). Cada parâmetro foi testado duas vezes, sendo assim foram feitas 4 trilhas de cada carga para cada parâmetro estudado. A amplitude total de deslocamento foi, aproximadamente,

1 mm. A frequência foi mantida em 1 Hz, sendo o deslizamento finalizado após 300 ciclos. Como contra corpo foi utilizada uma esfera de Alumina (Al_2O_3) de 6 mm de diâmetro.

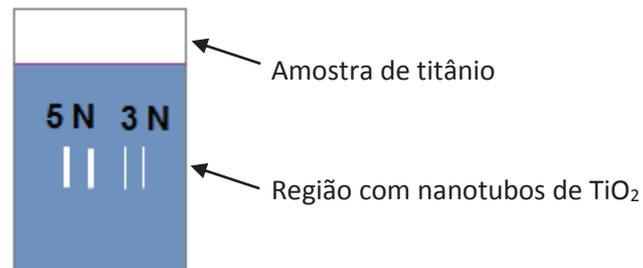


Figura 28 - Esquema da disposição das trilhas nas amostras.

Após os ensaios de tribocorrosão foram realizadas as análises das trilhas, por meio de microscopia eletrônica de varredura.

3.7 ESTUDOS DE BIOATIVIDADE *IN VITRO*

Os estudos de bioatividade *in vitro* foram realizados com células do tipo fibroblastos, na *Colorado State University (CSU)*, na cidade de *Fort Collins, CO* - EUA. Foram utilizados os laboratórios localizados no prédio da Bioengenharia, sob a supervisão do Prof. Dr. Ketul Popat e da aluna de doutorado, Rachael Simon-Walker.

3.7.1 Preparação/esterilização das amostras

Todos os procedimentos foram realizados dentro da cabine de segurança biológica que, todas as vezes, foi esterilizada com álcool 70%, teve seu ventilador ligado e a abertura posicionada na altura *sash level*. Todos os materiais necessários para o ensaio, colocados dentro da cabine, também foram borrifados com álcool 70%.

Para a esterilização das amostras, primeiramente elas foram colocadas em placas de petri (amostras com diferentes condições em placas separadas), cobertas com acetona e mantidas assim por 10 minutos. Em seguida a acetona foi aspirada e o mesmo procedimento foi realizado com álcool 70% e água deionizada. As amostras foram enxaguadas com solução de PBS duas vezes

seguidas, sendo que o PBS também foi totalmente aspirado e as amostras foram expostas à luz Ultravioleta por 5 minutos.

3.7.2 Preparação do meio e Cultura celular

Para a preparação do meio para o crescimento celular foi utilizada uma garrafa de 500 mL de DMEM (*Dubecco's Modified Eagle's Medium*) e, nela, foram adicionados 50 mL de soro fetal bovino (FBS) e 5 mL de penicilina estreptomicina (*Pen & Strep*) (Fig. 29a, b e c). O FBS foi descongelado em banho-maria a 37° C sendo sua função enriquecer com nutrientes, o meio utilizado. Já a penicilina serve para garantir que não haverá proliferação de bactérias.

Após a preparação do meio, iniciou-se o processo para a cultura celular. As células fibroblásticas (HDF – *Human Dermal Fibroblasts*) estavam armazenadas a -80° C (Fig. 29d) e foram descongelados três tubos de quarta passagem (P4), em banho-maria a 37° C. Após o FBS e o HDF estarem descongelados, tudo foi esterilizado e levado para a cabine (Fig. 29e).

Em um tubo de ensaio cônico, foram adicionados 10 mL do meio de cultura e mais os conteúdos dos três tubos de HDF. O tubo cônico, foi centrifugado por 5 minutos a 1000 min^{-1} e em seguida, com cuidado, aspirado todo o sobrenadante deixando as células no fundo. Então, foram adicionados 5 mL de meio de cultura ao tubo e pipetado para misturar, formando uma solução concentrada de células. Após estar bem misturado foram adicionados mais 34 mL do meio de cultura ao tubo, a solução foi pipetada várias vezes a fim de homogeneizá-la. Em seguida, foram utilizados três frascos para cultura celular do tipo T-75 e, em cada um, colocados 13 mL da cultura celular preparada. Os frascos foram armazenados na estufa a 37 °C.

As trocas do meio celular foram realizadas a cada 48 horas sendo necessária para que as células possam se alimentar e continuar se desenvolvendo.



Figura 29 - Preparação do meio de cultura e início da cultura celular. Soro fetal bovino (a) e penicilina estreptomicina (b) adicionados ao meio de cultura DMEM (c), células fibroblásticas congeladas (d) e bancada preparada para o procedimento (e).

3.7.3 Semeadura celular

Antes de começar o procedimento, todo o material necessário foi esterilizado e colocado dentro da cabine para evitar contaminações, como mostra a Fig. 30.



Figura 30 - Cabine preparada para o procedimento.

A semeadura celular foi conduzida seguindo os passos abaixo, de acordo com protocolo utilizado no laboratório:

1. Foi aspirado todo o meio celular contido nos dois frascos de cultura, tomando cuidado para não aspirar as células aderidas à parede do frasco;
2. Tripsina-EDTA 25% foi retirada do refrigerador e descongelada em banho-maria;
3. Foi colocado 1 mL de Tripsina em cada frasco de cultura vazio, espalhada pela parede onde continham as células e aspirado;
4. Em seguida adicionados mais 6 mL de Tripsina em cada frasco e aguardaram-se, aproximadamente, 5 minutos para as células se soltarem da parede do frasco.
5. Depois que as células se soltaram, foram adicionados 7 mL do meio de cultura, a cada frasco, para parar a tripsinização (desprendimento das células do frasco) e todo o conteúdo dos frascos foi transferido para um tubo de ensaio cônico;
6. Os tubos foram centrifugados a 1000 min^{-1} por 7 minutos;
7. O meio de cultura foi aspirado com cuidado para não aspirar as células (que estavam na parte inferior do tubo);
8. Foi adicionado 1mL de meio de cultura ao tubo e pipetado, para cima e para baixo, várias vezes a fim de misturar as células com o meio;
9. O passo 8 foi repetido até completar 10 mL de meio celular no tubo;
10. Foram pipetados 200 μL dessa solução de células, para fazer a contagem celular com o contador eletrônico.

O contador fornece um valor referente a quantidade de células por mL de meio celular. Por exemplo, para o caso da semeadura realizada para ensaio de LDH o contador indicou $1,103 \times 10^5$ células/mL. Como foram preparados 10 mL da solução com células (*passo 9*), portanto, foram obtidas aproximadamente $1,103 \times 10^6$ células. Esse valor deveria ser dividido pelo número de poços (amostras) (*Equação 2*), que para o exemplo deste dia foram 25 amostras do LDH e 10 para a fixação do MEV (35 amostras):

$$\frac{1,103 \times 10^6 \text{ células}}{35 \text{ poços (amostras)}} \cong 31.514 \frac{\text{células}}{\text{poço}} \quad \text{Equação 2}$$

Foi calculado que para cada poço teriam, aproximadamente, 31.514 células. O valor ideal para a semeadura, são sempre valores próximos a 30.000 células.

Então foi calculado quantos μL de solução celular deveriam ser colocados em cada poço para conseguir o valor desejado de células (*Equação 3*):

$$\frac{1,103 \times 10^6 \text{ células}}{10 \text{ mL}} = \frac{31.514 \text{ células}}{x} \therefore x \cong 0,286 \frac{\mu\text{L}}{\text{poço}} \quad \text{Equação 3}$$

Em cada poço foram colocados 0,286 μL de solução celular e mais 0,714 μL (o que faltava para completar 1000 μL) de meio de cultura celular. Esse cálculo foi seguido para todas as semeaduras realizadas, variando os valores de acordo com o obtido no contador eletrônico.

Todos os ensaios realizados dependiam de uma semeadura celular prévia.

3.7.4 Ensaio de LDH (lactato desidrogenase)

O ensaio de LDH, que visa analisar se as amostras são citotóxicas, foi conduzido de acordo com o protocolo da empresa *Cayman Chemical* (<https://www.caymanchem.com/pdfs/601170.pdf>). O modo de preparo de todas as soluções utilizadas para este ensaio e a relação de materiais, se encontram no endereço eletrônico indicado.

Para esse ensaio, as células foram semeadas (de acordo com a seção 3.7.3) 24 horas antes utilizando a cultura explicada na seção 3.7.2 e armazenadas na estufa. Foi utilizada uma placa com 48 poços e 5 amostras de cada condição, dispostas como na Fig. 31a.

Nos poços contendo amostras (linhas A até E) foram depositados 200 μL do meio de cultura e na linha F (poços marcados com C), não haviam amostras e o meio não continha células, esse era o controle do ensaio.

No dia seguinte, foi retirado 100 μL do meio de cultura de cada poço, e transferidos para uma placa com 96 poços, na mesma disposição que estavam anteriormente (Fig. 31b). As amostras foram descartadas.

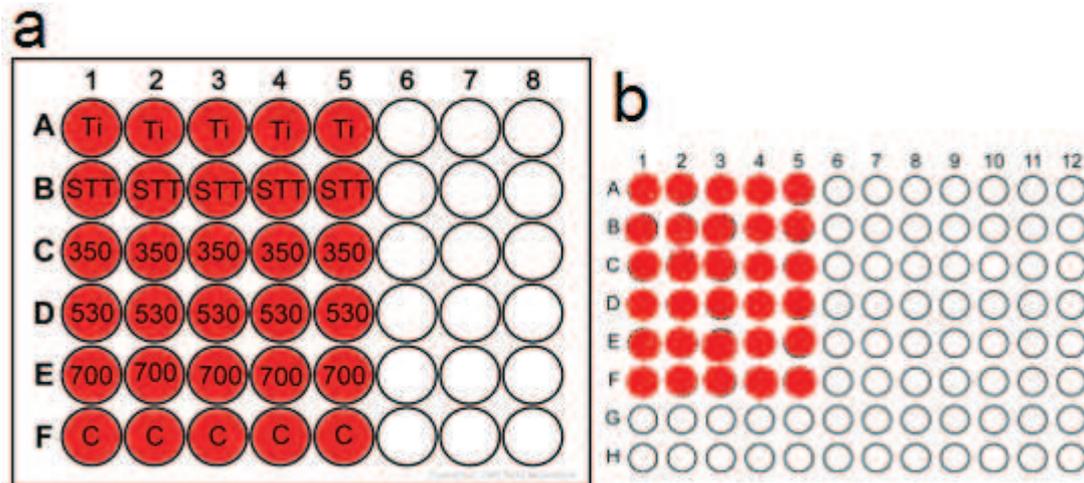


Figura 31 - Disposição das amostras na placa de 48 poços (a) e esquema da mudança do meio celular para a placa de 96 poços (b).

Foram adicionados mais 100 μ L da solução de reação (descrita no protocolo) a cada poço com meio de cultura (inclusive no poço da linha F que não continha células). A placa foi embrulhada em papel alumínio e mantida em um agitador orbital durante 30 minutos. Em seguida, a placa foi inserida no leitor de placas *FLUOstar Omega* (Fig. 32).



Figura 32 - Leitor de placas.
Fonte: <http://www.biocompare.com>.

O leitor emite luz em um comprimento de onda específico (490 nm) e mede a quantidade de luz absorvida e refletida por um objeto, como uma proteína. O LDH (lactato desidrogenase) é uma proteína estável presente no citoplasma de células normais, uma vez em que ocorrem danos a membrana celular, o LDH é liberado para o meio extracelular. Sendo assim, o resultado desse ensaio fornece um indicador de morte celular.

3.7.5 Marcação celular

Foram utilizados dois marcadores para revelar as estruturas das células, o 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI – Invitrogen) que evidencia os núcleos das células em azul e a Faloidina-Rodamina (Cytoskeleton) que marca em vermelho os filamentos de actina, presentes no citoesqueleto das células. Esses dois marcadores são adquiridos do fabricante, em pó e devem ser reconstituídos para serem utilizados. A solução feita a partir do pó reconstituído é chamada de *stock solution* e a partir dela é preparada a solução de trabalho, que é uma quantidade menor e mais diluída. Os protocolos para preparação das soluções de trabalho encontram-se no site do fabricante (<https://www.thermofisher.com>).

As células foram semeadas previamente nas placas de 48 poços e a marcação foi feita no dia 1 e no dia 4. O protocolo do procedimento de marcação utilizado no laboratório está descrito abaixo:

1. Todo o meio de cultura dos poços foi aspirado e enxaguado 2 vezes com solução de PBS;
2. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de formaldeído em cada poço, para fixação das células, e aguardaram-se 15 minutos;
3. O formaldeído foi aspirado e os poços foram enxaguados 3 vezes com PBS;
4. Adicionou-se 500 μ L de Triton-X a cada poço e aguardaram-se 3 minutos;
5. O Triton-X foi aspirado e os poços foram enxaguados uma vez com PBS;
6. As amostras foram transferidas para uma nova placa e em cada poço foram adicionados 500 μ L da solução de trabalho da Faloidina-Rodamina. Aguardaram-se mais 25 minutos;
7. Sem aspirar a Faloidina-Rodamina, foram adicionados 52,5 μ L do DAPI a cada poço e aguardaram-se 5 minutos;
8. Tudo foi aspirado e cada poço enxaguado com PBS uma vez;
9. Foi colocado PBS nos poços para manter as amostras molhadas e a placa foi enrolada em papel alumínio, sempre protegendo da luz.

Tanto o DAPI quanto a Faloidina-Rodamina não podem ser expostos a luz em momento algum, portanto todo o procedimento é realizado na *dark hood*, que aparece na Fig. 33.

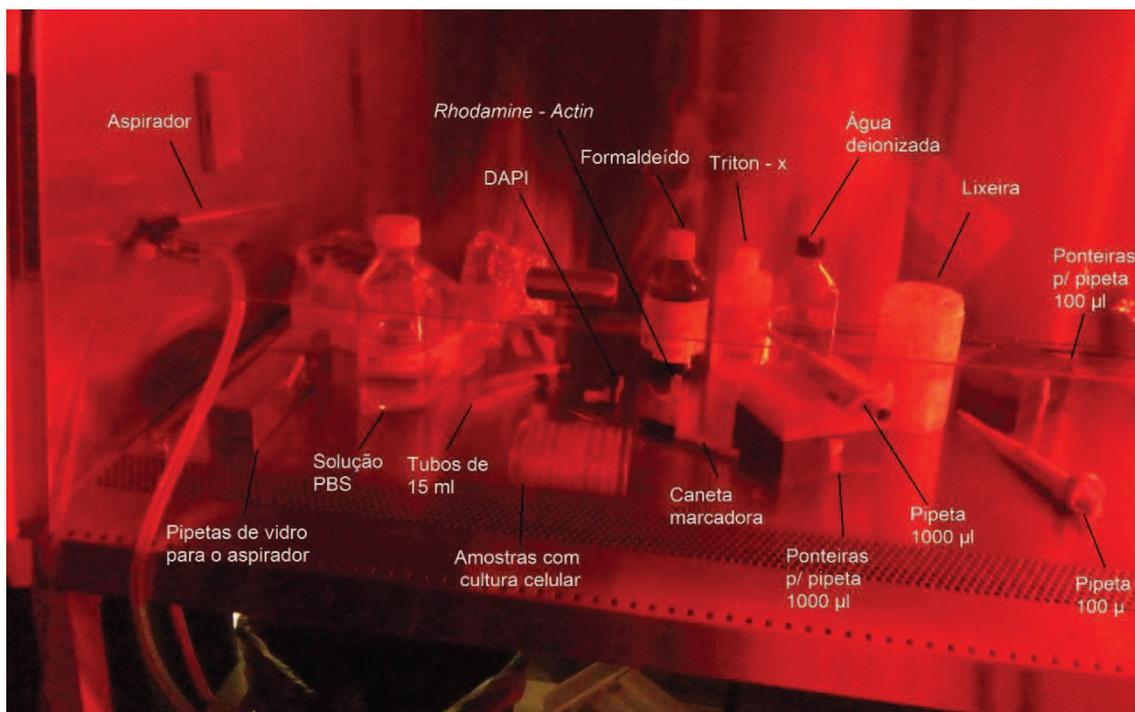


Figura 33 - *Dark hood* preparada para o procedimento de marcação das células.

Esse procedimento foi realizado com 24 horas de cultivo celular, que foi o dia 1, e depois no dia 4.

3.7.6 Microscopia de Fluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência foram realizadas em um microscópio óptico Zeiss Axioplan 2, mostrado na Fig. 34, e analisadas com o software AxioVision (Zeiss). Foram empregados dois filtros para que fosse possível visualizar a actina (vermelho) e em seguida o núcleo (azul). As imagens foram sobrepostas e obtidas as imagens finais que se encontram nos resultados.

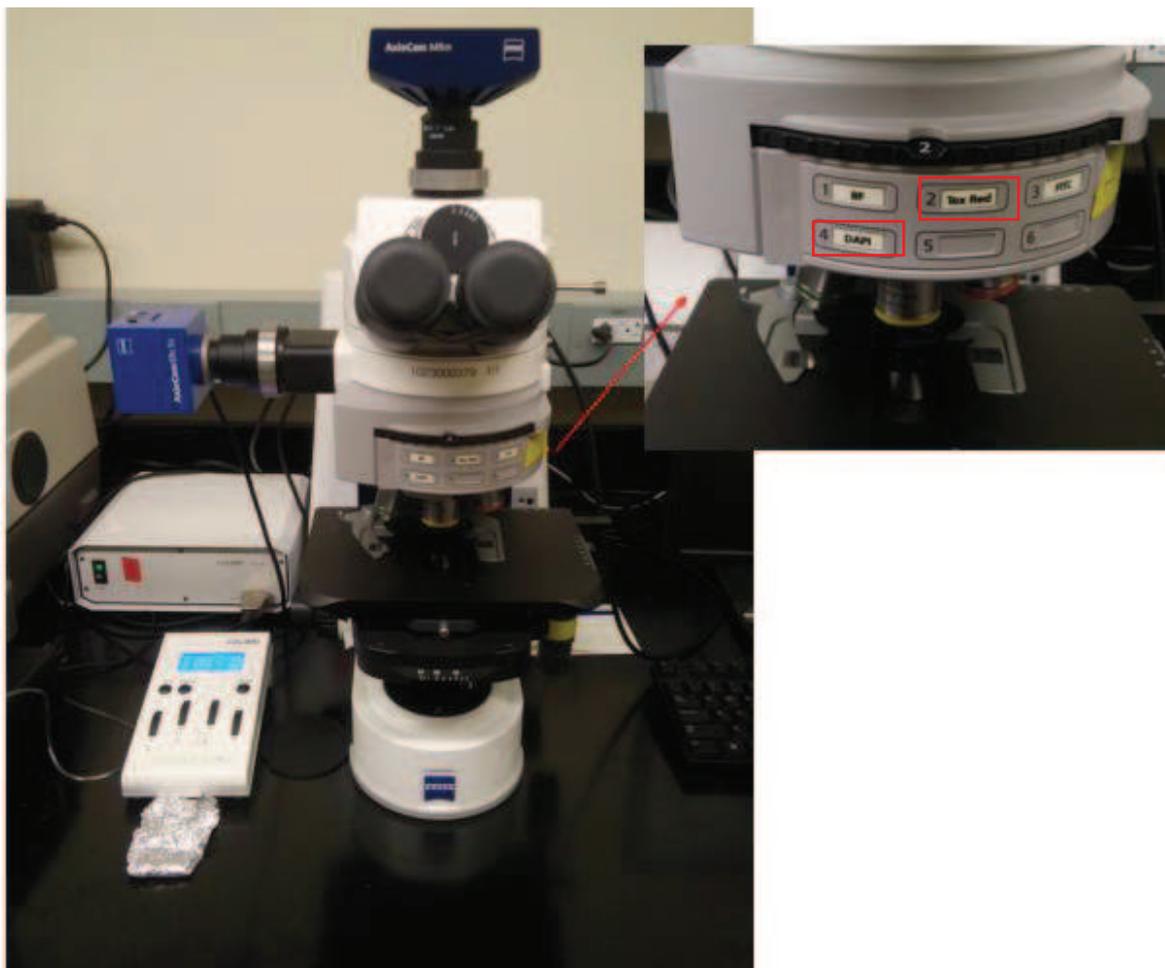


Figura 34 - Microscópio de Fluorescência e no detalhe, os filtros utilizados.

Foram feitas imagens apenas com o filtro do DAPI (Fig. 35), para que fosse feita a contagem das células, para isto, utilizou-se o software ImageJ. Para cada condição foram feitas 15 imagens apenas dos núcleos.

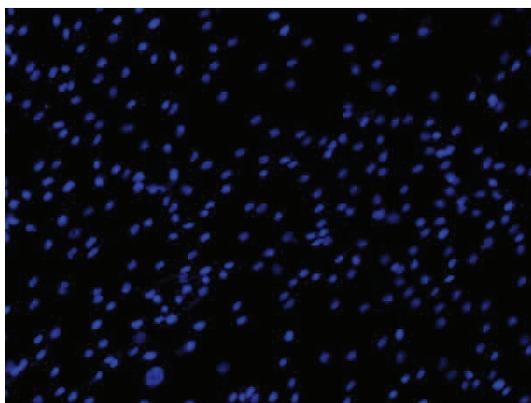


Figura 35 - Exemplo de imagem feita com o filtro DAPI para contagem de núcleos.

3.7.7 Fixação para MEV (*SEM fixing*) e caracterização das células

Esse procedimento foi realizado nas amostras para análise no MEV. Consiste em uma série de etapas que permitem com que as células presentes na superfície das amostras sejam desidratadas e fixadas, permanecendo ali mesmo depois de retiradas do meio celular ou estufa. Dessa forma, as amostras podem ser transportadas e visualizadas no MEV.

A técnica é simples e consiste em submergir as amostras em soluções específicas, durante determinado intervalo de tempo como indicado na Fig. 36.

Para a preparação da solução *Buffer* foram necessários 19,4 mL de água deionizada, 0,68 g de sacarose e 0,42 g de cacodilato de sódio. Foram separados 10 mL dessa solução e colocados na placa de petri 'Solução Buffer'. O restante foi misturado com mais 0,6 mL de glutaraldeído 30% e colocado na placa 'Fixador primário'.

As placas de III a V foram preparadas com soluções de Etanol em água e na placa VI foi utilizado Etanol puro. A placa VII continha o reagente *hexametildisilazeno* (HMDS - Sigma)

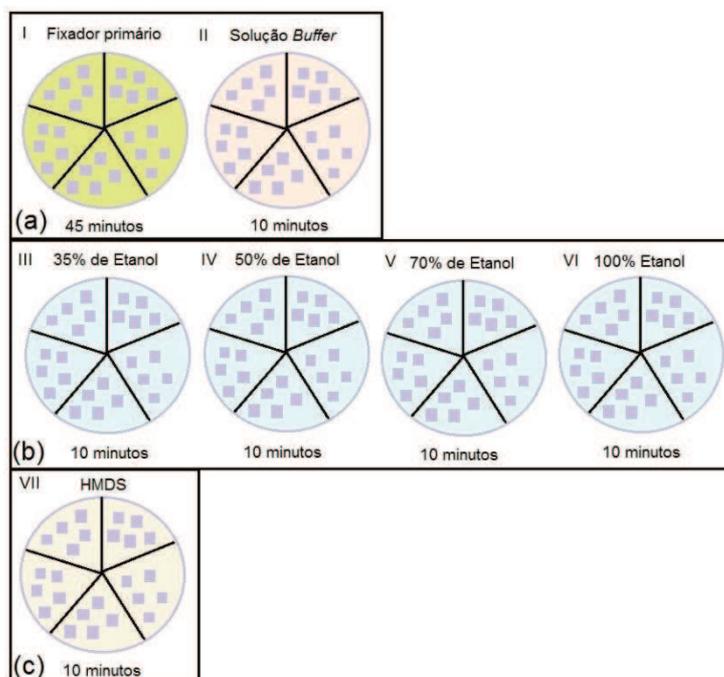


Figura 36 - Sequência da fixação para MEV.

As imagens de MEV foram feitas no Centro de Caracterização de Materiais da PUCPR. Antes de serem analisadas, as amostras foram metalizadas com uma camada de 10 nm de ouro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CURVA DE ANODIZAÇÃO

A Fig. 37 apresenta a curva representativa de anodização de uma amostra. O valor inicial da corrente, ao ligar a fonte, foi de 68,55 mA. Esse valor inicial variou de acordo com a área exposta das amostras. Após aproximadamente 10 minutos ocorre uma queda brusca na corrente que está relacionada com a formação da camada de óxido. Em seguida, próximo a 15 min, se pode perceber a formação de um “ombro” na curva que está relacionado com o início da formação dos poros. Entre 15 minutos e 2 horas ocorre a formação dos nanotubos e a partir de então a corrente começa a estabilizar, o que indica apenas a fase de crescimento.

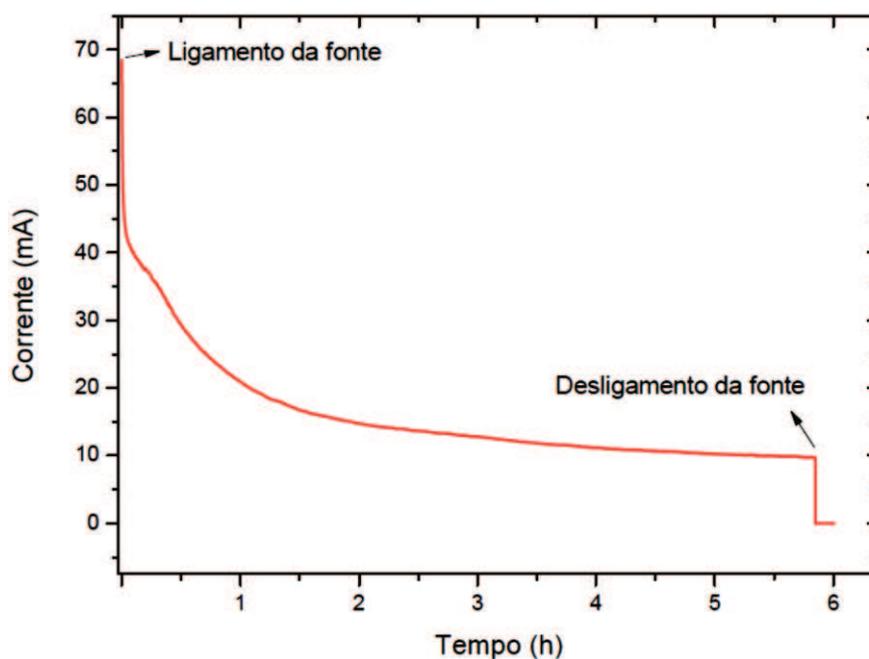


Figura 37 - Curva obtida durante a anodização.

A curva é semelhante à curva da Fig. 17, apresentada no trabalho de Srimuangmak e Niyomwas (2011), que também utilizaram etilenoglicol como eletrólito, e que serviu de base para a análise das fases da formação dos nanotubos no presente trabalho.

4.2 MORFOLOGIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CAMADA

A Fig. 38, apresenta as imagens de MEV das superfícies das amostras STT, TT 350 °C, TT 530 °C e TT 700 °C, para as ampliações de 10, 20 e 50 k.

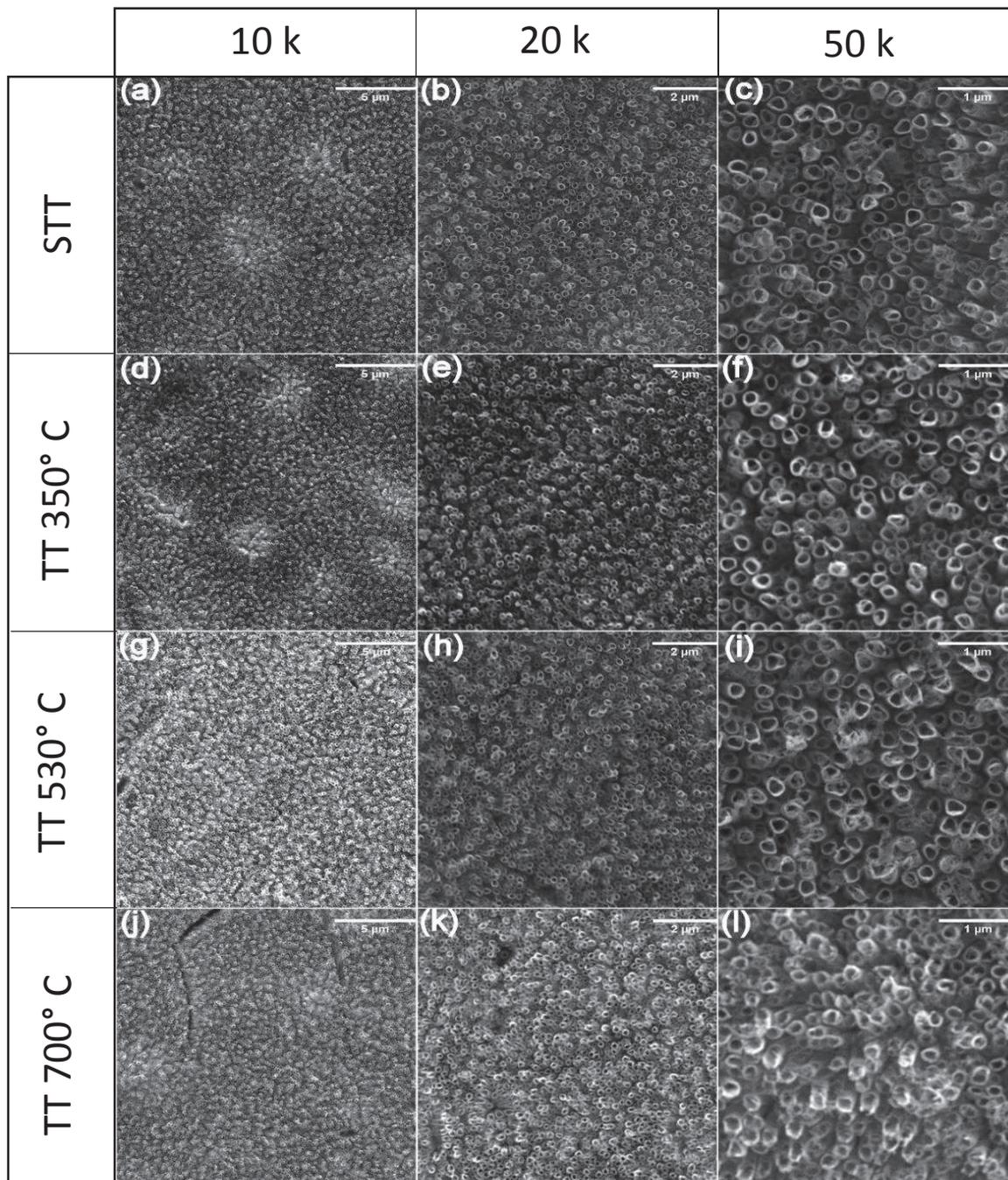


Figura 38 - Imagens de MEV das amostras STT com ampliações de 10 k (a), 20 k (b) e 50 k (c). Amostra TT 350 °C com ampliações de 10 k (d), 20 k (e) e 50 k (f). Amostra TT 530 °C com ampliações de 10 k (g), 20 k (h) e 50 k (i). Amostra TT 700 °C com ampliações de 10 k (j), 20 k (k) e 50 k (l).

As amostras STT, TT 350 °C e TT 530 °C ficaram com camadas de nanotubos de aspecto semelhante, sendo impossível diferenciá-las visualmente.

As amostras TT 700 °C, apresentaram um aspecto diferente. Podemos observar na Fig. 38j algumas trincas na camada de nanotubos. Com ampliação maior (Fig. 38l) percebe-se que os nanotubos possuem uma morfologia distinta das condições anteriores. Alguns nanotubos começam a abrir e isso está relacionado com a transformação da estrutura cristalina de anatase para rutilo, que faz com que os nanotubos comecem a se decompor a partir de temperaturas superiores a 750 °C.

A Fig. 39 mostra os nanotubos na amostra STT e as algumas medidas do diâmetro dos nanotubos. Todas as condições estudadas apresentaram valores semelhantes, variando entre 170 e 210 nm de diâmetro.

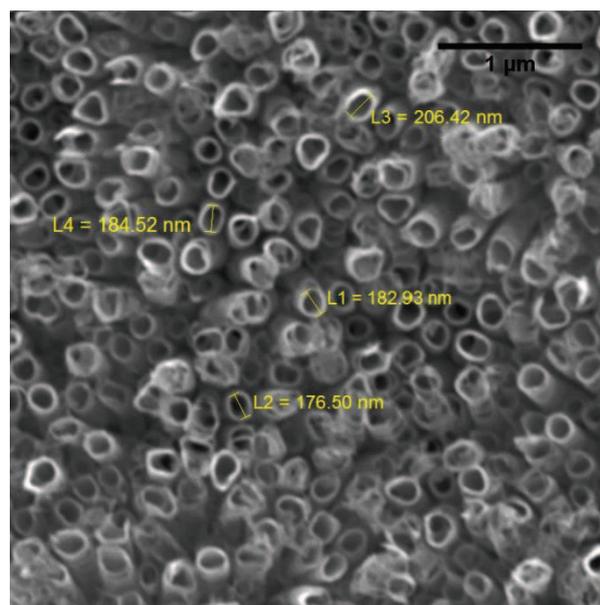


Figura 39 - Medidas dos diâmetros dos nanotubos na amostra STT, com ampliação de 50 k.

Ao analisar imagens feitas da seção transversal das amostras (Fig. 40) verifica-se que os comprimentos medidos variaram entre 1,12 e 1,67 µm. O comprimento dos nanotubos é definido pelo tempo de anodização e todas as amostras deste trabalho foram anodizadas por 6 horas, portanto o comprimento dos nanotubos foi semelhante para todas as condições.

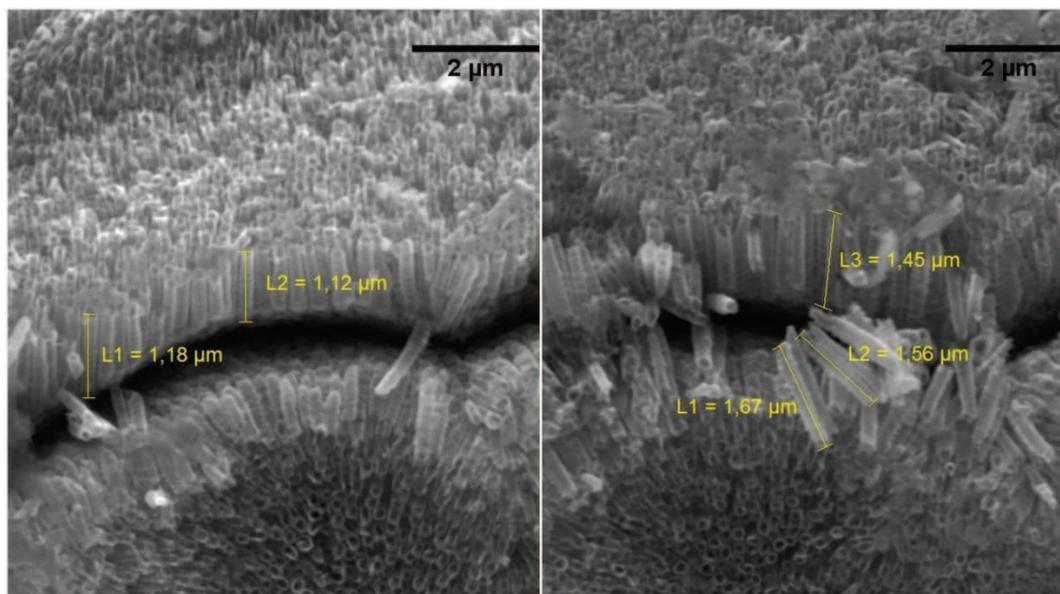


Figura 40 - Seção transversal da camada de nanotubos, da amostra STT.

Apenas as medidas dos diâmetros e dos comprimentos dos nanotubos da amostra STT foram exibidas, pelo fato das condições da anodização terem sido as mesmas para todas as amostras, independente do tratamento térmico. Os parâmetros da anodização e eletrólito utilizado, são o que definem a morfologia dos nanotubos (Yoriya et al., 2012; Macak et al., 2007) O tratamento térmico não influencia no diâmetro e nem no comprimento, por isso apenas as dimensões dos nanotubos de uma amostra foram exibidas.

Ao comparar a morfologia dos nanotubos com o trabalho de Srimuangmak e Niyomwas (2011), que também utilizaram eletrólito a base de etilenoglicol, verificou-se algumas diferenças. Segundo os autores, os diâmetros de seus nanotubos ficaram em torno de 71 nm e os comprimentos variaram entre 600 – 700 nm. Porém, mesmo sendo eletrólito a base de etilenoglicol, existem várias diferenças no processo da anodização, mostradas na Tabela 11, que podem ter causado as diferenças, principalmente relativas ao diâmetro.

Tabela 121 - Parâmetros utilizados na anodização do trabalho de Srimuangmak e Niyomwas (2011), comparados com os parâmetros utilizados neste trabalho.

Parâmetros da anodização	Srimuangmak e Niyomwas (2011)	Este trabalho
Tensão aplicada	30 V	60 V
Uso de NH ₄ F em conjunto com o HF	Sim	Não
Tempo de anodização	4 horas	6 horas
Eletrólito aquecido	Sim, 45° C	Não

Um outro estudo publicado por Yoriya et al. (2012), mostraram que o tamanho do diâmetro dos nanotubos está diretamente relacionado com a tensão utilizada na anodização. Segundo os autores, que utilizaram eletrólito a base de etilenoglicol e NH_4F como fonte de flúor, amostras anodizadas a 25 V apresentaram diâmetros em torno de 60 nm, e amostras anodizadas a 40 V, diâmetros em torno de 118 nm. Neste trabalho não foi citado o comprimento dos nanotubos.

As análises químicas obtidas por EDS foram conduzidas com tensão de aceleração de 10 kV e os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 132 - Resultados das análises químicas das amostras STT, TT 350 °C, TT 530 °C e TT 700 °C.

Elemento	Wt. %	σ
STT		
Ti	54,3	0,3
O	37,4	0,3
P	0,2	0
F	8,2	0,2
TT 350 °C		
Ti	53,9	0,3
O	45,2	0,3
P	0,9	0
TT 530 °C		
Ti	55,4	1,2
O	42,7	1,2
P	1,9	0,4
TT 700 °C		
Ti	41,6	0,3
O	54,2	0,3
P	4,2	0,1

Três aspectos importantes podem ser verificados nesta tabela: o desaparecimento do flúor após os tratamentos térmicos (i), o aumento do teor de oxigênio com o aumento da temperatura de tratamento térmico (ii), o aumento do teor de fósforo, também, com o aumento da temperatura de tratamento térmico (iii).

Quanto ao desaparecimento do flúor, esse comportamento é ótimo para os nanotubos, uma vez que se o flúor continuar presente na camada ele irá degradar os nanotubos. Como foi mostrado na *Reação 2* na seção 2.3, o íon F^- é o responsável pela dissolução química da camada de óxido originando os

nanotubos. Portanto, se essa dissolução não for feita de forma controlada, os nanotubos serão degradados.

Regonini et al., 2010, estudaram o efeito da temperatura de tratamento térmico na composição química dos nanotubos. Os autores verificaram, através de XPS, que os nanotubos assim que preparados, possuíam um teor de até 8 At% de flúor em sua superfície. Eles fizeram a mesma análise para amostras tratadas termicamente em 300, 400 e 550 °C e foi verificado que após 400 °C não havia mais sinais de flúor. Os autores concluíram que em temperaturas acima de 400° C a espécie $[\text{TiF}_6]^{-2}$, formada durante o processo de anodização, é totalmente expelida da camada de nanotubos.

Laurindo, 2014, verificou o aumento do teor de fósforo, após tratamento térmico, na superfície de amostras oxidadas via PEO utilizando eletrólito contendo CaP. Ele analisou amostras oxidadas com tensões de 250, 300, 350 e 400 V.

4.3 ESTRUTURA CRISTALINA

Com os dados do ensaio de DRX, foram obtidos os difratogramas da Fig.41. Observa-se que a camada de nanotubos da amostra STT está amorfa. Comparando-se com o espectro da amostra padrão de titânio, as superfícies das duas amostras não apresentaram diferenças quanto a presença de estrutura cristalina.

Na amostra com TT 350 °C aparecem os primeiros picos da fase anatase, juntamente com picos de titânio provenientes do substrato. Na amostra com TT 530 °C foi detectado apenas um pico de rutilo (em $2\theta = 27.4^\circ$), enquanto que os picos de anatase são mais intensos. São observados ainda os picos de titânio do substrato. Para esta temperatura há uma mistura das fases cristalinas anatase e rutilo.

Para a amostra TT 700 °C, o difratograma apresenta picos das duas fases cristalinas (anatase e rutilo). Entretanto, podemos observar uma diminuição na intensidade dos picos de anatase e um aumento na intensidade dos picos de rutilo.

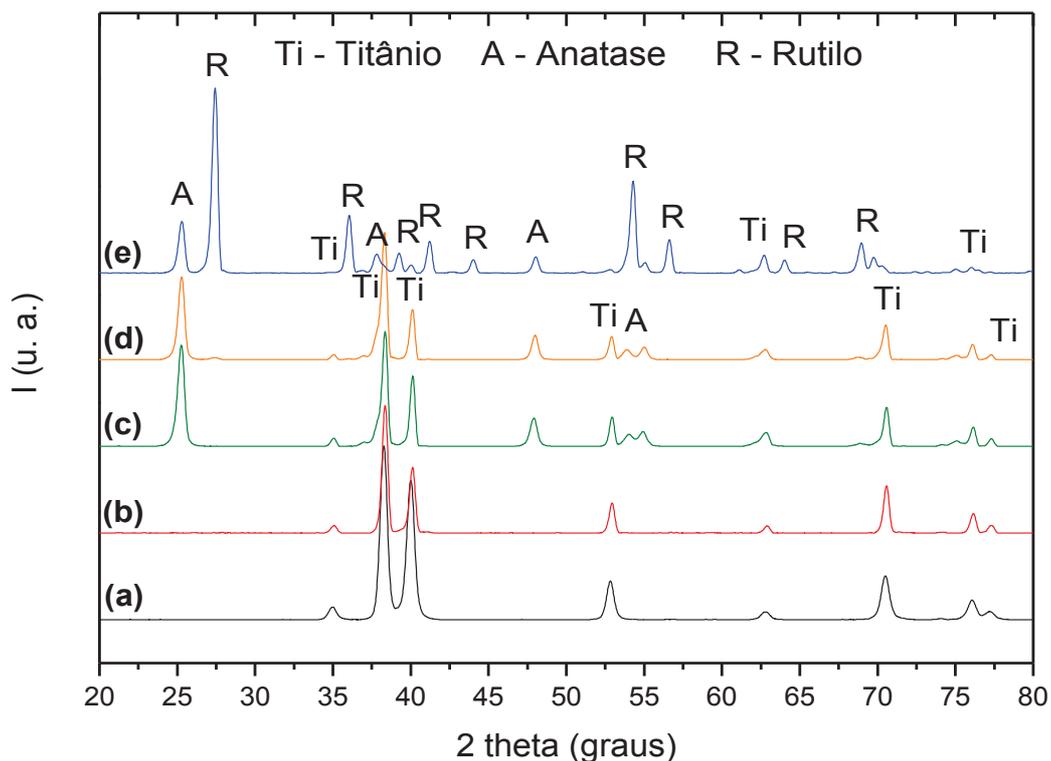


Figura 41 - Difractogramas obtidos para as amostras de titânio (a), STT (b), TT 350 °C (c), TT 530 °C (d) e TT 700 °C (e). Resultados indexados de acordo com os padrões ICDD [00-044-1294] Titânio, [00-021-1272] Anatase e [01-078-1510] Rutilo.

Da mesma maneira que os parâmetros da anodização influenciam a morfologia dos nanotubos, a cristalinidade dos mesmos, é diretamente relacionada com a temperatura de tratamento térmico.

Li et al., 2009, mostraram que os nanotubos de TiO_2 produzidos com outro tipo de eletrólito utilizando NH_4F como fonte de F^- , tratados termicamente a 400 °C apresentaram os primeiros picos de anatase nesta temperatura, e em 700 °C havia mistura de anatase e rutilo, assim como no caso deste trabalho.

Liu et al., 2011, fabricaram nanotubos utilizando eletrólito com diferentes concentrações de NH_4F e H_3PO_4 , aplicando tensões de até 30 V por até 300 minutos. Os tratamentos térmicos foram conduzidos nas temperaturas de 300 a 800 °C durante 2 horas. Verificou-se que os nanotubos eram amorfos após a anodização, em 300 °C havia uma mistura de amorfo com anatase e em 500 °C a estrutura era completamente cristalina, formada por anatase. Os autores também verificaram que os nanotubos sofreram leve retração entre as temperaturas de 600 e 700 °C, pois foi quando começou a ocorrer a transformação de anatase para rutilo. Eles verificaram que em 800 °C os

nanotubos colapsaram devido aos densos cristais de rutilo formados na estrutura.

Regonini et al., 2013, concluíram que as nucleações dos cristais de rutilo ocorrem, preferencialmente, na interface titânio/TiO₂ (na base dos nanotubos). Por isso a camada de nanotubos começa a abrir e, vista de cima, parece que a camada está trincando. Os autores também afirmam que, geralmente, a faixa de temperatura onde o rutilo será dominante é entre 500 e 600 °C. Porém, eles ressaltam que o processo de cristalização, além de ser afetado pela temperatura de tratamento, depende fortemente do histórico da anodização. Eletrólitos de naturezas diferentes, tensão aplicada e outros parâmetros, podem modificar as faixas de transição de cristalinidade, de uma amostra para outra.

Para o caso das amostras deste trabalho, nos três grupos que sofreram tratamento térmico havia mistura de estrutura. Porém, no caso da amostra TT 350 °C a mistura foi de anatase e amorfo, a camada de nanotubos não estava totalmente cristalizada. Já as amostras TT 530 °C e TT 700 °C possuem em sua superfície uma mistura dos óxidos cristalinos anatase e rutilo, sendo assim, foi possível determinar a fração em peso de cada óxido, utilizando o método proposto por Spurr e Myers (1957). Esse método não pode ser aplicado para a amostra TT 350° C, uma vez que para sua aplicação depende dos valores de I_A (reflexão mais forte de anatase) e I_R (reflexão mais forte de rutilo). Os autores utilizam uma função de intensidade (f), onde são relacionados os valores de I_A e I_R (*Equação 4*). Como a amostra TT 350 °C não possui pico de rutilo, fica inviável a aplicação do método.

$$f = \frac{1}{1 + 1,26 \cdot \frac{I_R}{I_A}} \quad \text{Equação 4}$$

Para essa análise foram utilizados os valores da varredura lenta (0,25° por minuto) para obter-se os valores de I_A e I_R, os valores desses picos encontram-se na Fig. 42.

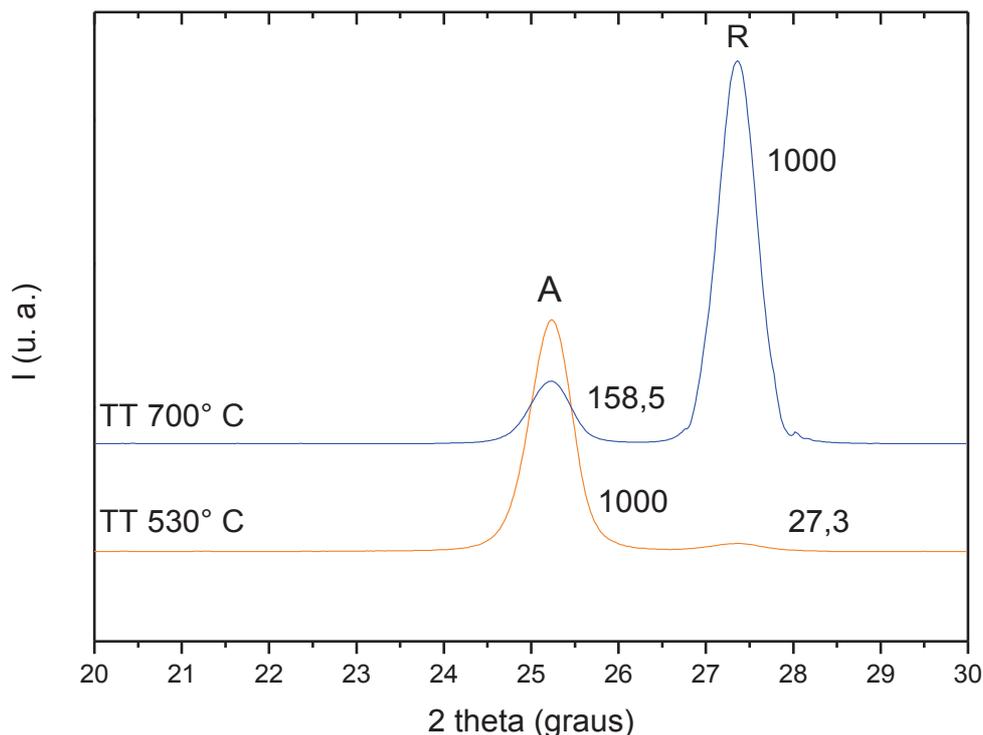


Figura 42 - Determinação dos maiores picos de anatase e rutilo nas amostras TT 530 °C e TT 700 °C. Resultados indexados de acordo com os padrões [00-021-1272] Anatase e [01-078-1510] Rutilo.

Segundo os autores, o valor de f (Equação 4) é aproximadamente igual a X_A que seria a fração em peso de anatase no TiO_2 .

Utilizando os dados do DRX e aplicando-os a equação, foram obtidos os seguintes resultados (Tabela 13):

Tabela 143 - Frações em peso das fases cristalinas.

	$f \cong X_A$ (%)	$\therefore X_R$ (%)
Amostra TT 530 ° C	96,67	3,33
Amostra TT 700 ° C	11,17	88,83

Com 230 °C de diferença de tratamento térmico, a fração de anatase caiu quase 90% e a fração de rutilo teve um aumento superior a 95%.

A Fig. 43 apresenta uma distribuição aproximada da cristalinidade na superfície das amostras deste trabalho.

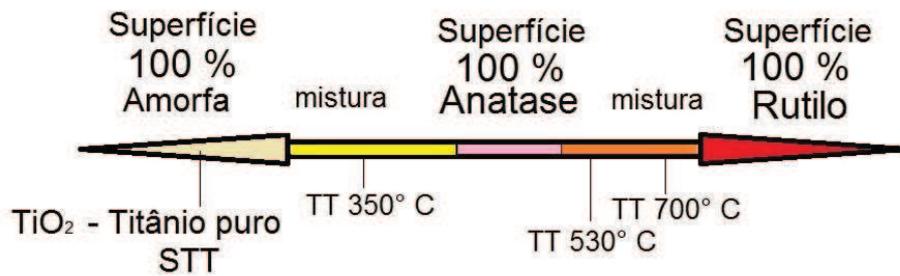


Figura 43 - Distribuição aproximada da cristalinidade da superfície das amostras.

Observando a figura acima, fica claro porque o rutilo é considerado mais estável que a anatase. Sabe-se que em temperaturas acima de 800 °C os nanotubos podem se decompor por causa da nucleação dos cristais de rutilo, porém é difícil determinar com exatidão onde começa a transformação anatase → rutilo.

4.4 MOLHABILIDADE

O ensaio de molhabilidade mostrou a grande diferença do ângulo de contato entre a amostra de titânio puro e as amostras com nanotubos. Na Fig. 44 verifica-se que o ângulo final medido pelo goniômetro foi de 46° para o titânio puro, enquadrando a amostra no regime hidrofílico.

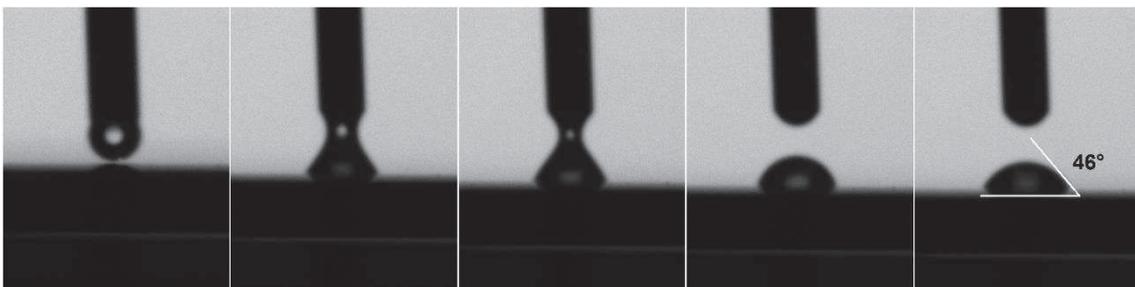


Figura 44 - Ensaio de molhabilidade para a amostra de titânio puro, utilizando água ultrapura (MiliQ), com volume de gota igual a 0,3 µL.

A amostra STT apontou um ângulo final de 15° (Fig. 45), inferior a anterior, porém ainda considerada como superfície hidrofílica (entre 10 e 90°).

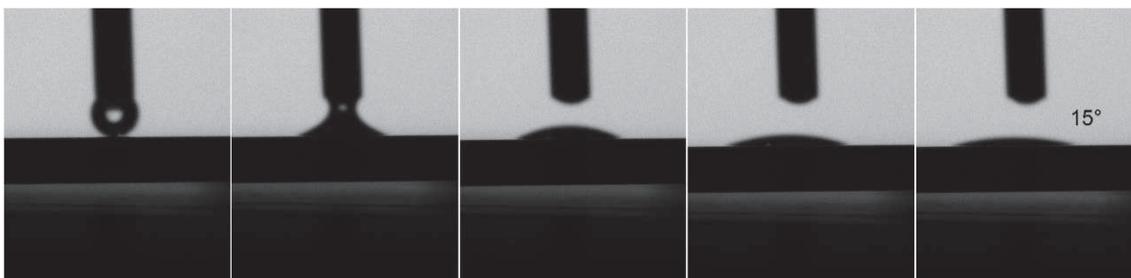


Figura 45 - Ensaio de molhabilidade para amostra STT, utilizando água ultrapura (MiliQ), com volume de gota igual a 0,3 μ L.

As amostras TT 350 $^{\circ}$ C, TT 530 $^{\circ}$ C e TT 700 $^{\circ}$ C, apresentaram ângulos finais, respectivamente, de 7 $^{\circ}$, 3 $^{\circ}$ e 5 $^{\circ}$ (Fig. 46). As diferenças entre esses três valores não são significativas, e as amostras passaram a apresentar um comportamento superhidrofílico ($\Theta < 10^{\circ}$).

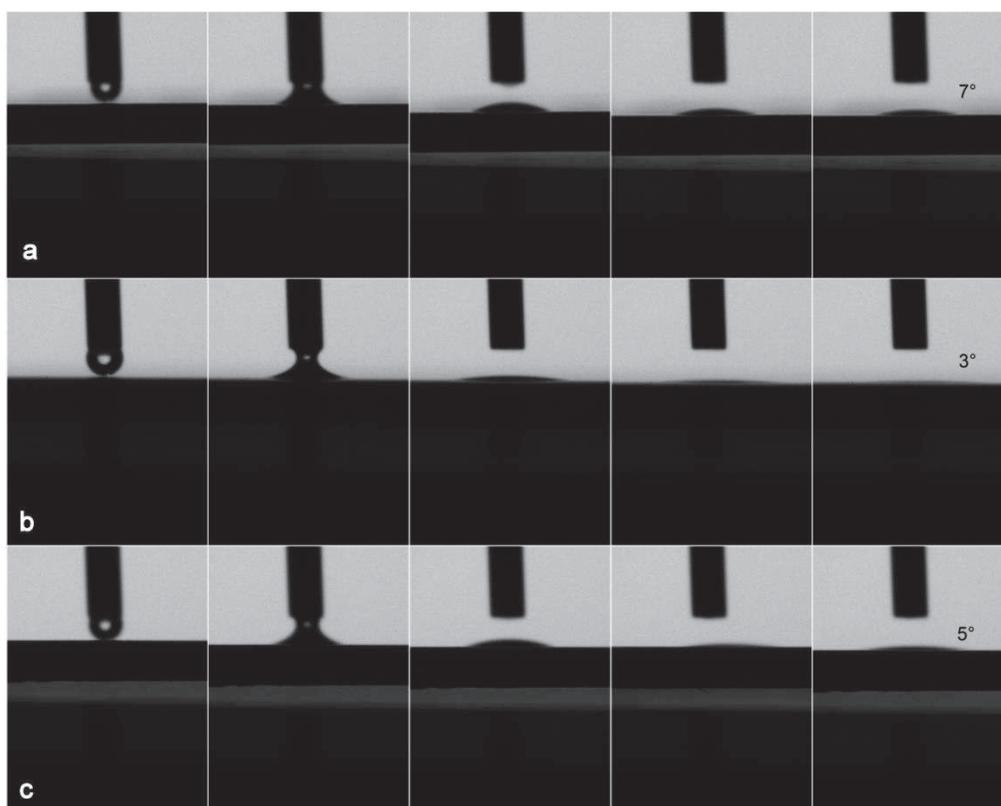


Figura 46 - Ensaio de molhabilidade para amostra TT 350 $^{\circ}$ C (a), TT 530 $^{\circ}$ C (b) e TT 700 $^{\circ}$ C (c), utilizando água ultrapura (MiliQ), com volume de gota igual a 0,3 μ L.

A Fig. 47 mostra o gráfico comparativo dos valores de ângulo de contato entre as amostras. Percebe-se a grande diferença entre os valores das amostras com nanotubos, para o titânio.

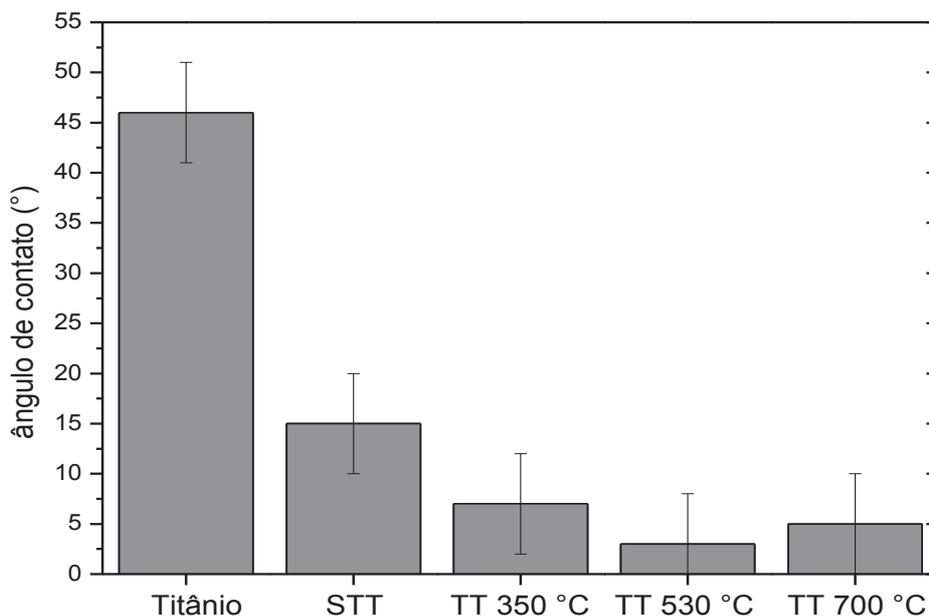


Figura 47 - Comparação dos valores de ângulos de contato para as diferentes amostras.

Muitos trabalhos citam o aumento do ângulo de contato depois dos processos de anodização e tratamento térmico. Não apenas para o titânio puro, mas também para suas ligas, como é o caso da pesquisa de Hang et al., 2012. Os autores fabricaram nanotubos de TiO_2 em amostras de Nitinol (NiTi - 50,7 at. % de Níquel) e utilizando eletrólito a base de etilenoglicol. Conduziram os ensaios de molhabilidade depositando gotas de água destilada em amostras de NiTi sem nanotubos, com nanotubos e sem tratamento térmico, e com tratamentos de 450 °C e 600 °C. Verificaram que a amostra de NiTi puro apresentou um ângulo de contato de 76,7°, a amostra sem tratamento térmico 18,5°, e as amostras tratadas a 400 °C e 600 °C, 19,8° e 6,5° respectivamente.

Sorkin et al., 2015, estudaram a influência do eletrólito utilizado na anodização, na molhabilidade dos nanotubos. Foram fabricados nanotubos em eletrólito a base de água (NT - H_2O) e a base de dietilenoglicol (NT - DEG). As amostras foram tratadas termicamente a 530 °C e os ensaios de molhabilidade foram conduzidos utilizando água. Os ângulos de contato para as amostras de titânio puro, NT - H_2O e NT - DEG, foram respectivamente, $52^\circ \pm 12^\circ$, $21^\circ \pm 4^\circ$ e $11^\circ \pm 1^\circ$.

Quando um biomaterial é implantado no corpo humano, logo após o contato com os fluidos biológicos, ele será recoberto por proteínas. Essa camada

então irá traduzir informações da superfície do biomaterial, em linguagem biológica, para modular a resposta celular. Portanto, a resposta celular será influenciada pela adsorção de proteínas, que segundo a literatura, está fortemente relacionada com a molhabilidade da superfície. Superfícies hidrofílicas facilitam a adesão e proliferação dessas proteínas. Logo, uma boa molhabilidade é preferível para aplicação em biomateriais (Wilson et al., 2005).

4.5 ENSAIOS DE TRIBOCORROSÃO

4.5.1 Comportamento eletroquímico

A Fig. 48 mostra os resultados obtidos para os ensaios de tribocorrosão utilizando cargas de 3 e 5 N.

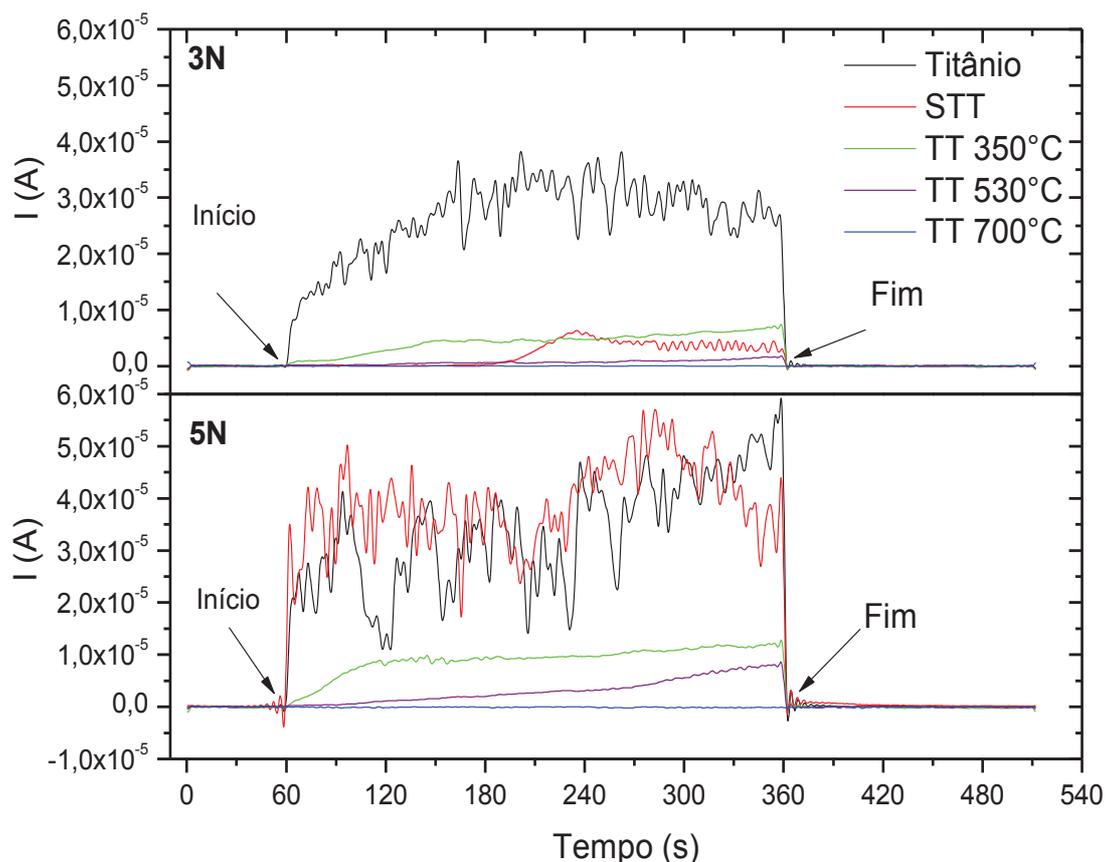


Figura 48 - Curvas de tribocorrosão para os ensaios com 3N (superior) e 5N (inferior).

Analisando as curvas percebe-se a diferença no comportamento tribocorrosivo entre as amostras. Para a amostra de titânio puro, assim que o deslizamento da esfera iniciou (por volta de 60 segundos) a corrente começou a subir, para as duas cargas testadas. Esse era o comportamento esperado, uma vez que essa amostra padrão não possuía nenhuma modificação superficial. Portanto, ao iniciar o deslizamento, a esfera arranca a camada de óxido passivo do metal e a corrente de tribocorrosão tende a subir. Quando o deslizamento é paralisado (por volta de 360 segundos) a tendência dessa camada é se recompor e, assim, a corrente cai novamente. A habilidade do titânio em formar a camada passiva de óxido é o motivo pelo qual a curva dessa amostra é tão instável, pois o titânio tenta recuperar essa camada durante todo o tempo do ensaio.

Para a amostra STT, no ensaio com 3N a corrente permanece com valor igual a zero até cerca de 210 segundos quando há um aumento repentino, seguido de uma leve queda, mantendo a corrente por volta de $0,5 \times 10^{-5}$ A até o fim do deslizamento. O que ocorre em 210 segundos, provavelmente é a remoção da camada de nanotubos, expondo o substrato e elevando a corrente. No ensaio com carga de 5 N, a amostra STT teve sua camada de nanotubos rompida desde o início, apresentando menor resistência que para 3 N. Após o rompimento, os valores da corrente ficaram muito próximos a curva do titânio puro, indicando que, realmente, o substrato estava exposto, sem nenhum vestígio de óxido protetor ou nanotubos.

A amostra TT 350 °C, apresentou elevação na corrente desde o início do ensaio com 3 N, indicando a exposição do substrato. A corrente sofreu uma elevação atingindo o ponto máximo próximo de $0,8 \times 10^{-5}$ A em 360 segundos, quando o deslizamento foi encerrado. Para o ensaio com 5 N, a amostra TT 350 °C, novamente, apresentou rompimento da camada de nanotubos assim que ensaio iniciou e o valor da corrente ficou em torno de 1×10^{-5} A (dobro do ensaio com 3 N).

A curva de tribocorrosão da amostra TT 530 °C, para o ensaio com 3 N, manteve-se com valor próximo de zero até os 120 segundos de ensaio, quando sofreu uma leve elevação e seu valor máximo se aproximou de $0,25 \times 10^{-5}$ A. Para o ensaio com 5N, por volta de 90 segundos houve uma elevação progressiva da corrente, alcançando o máximo próximo de $0,5 \times 10^{-5}$ A. Esse

comportamento foi muito superior ao das outras amostras pois as curvas da amostra TT 530 °C foram as segundas mais baixas.

A curva da amostra TT 700 °C, foi a que apresentou a maior resistência à tribocorrosão. Durante todo o ensaio a corrente estava em zero, indicando que não houve exposição do substrato para as duas cargas aplicadas.

4.5.2 Análise das trilhas de desgaste

A Fig. 49a mostra a trilha formada na superfície no titânio, para o ensaio com 3 N, e em 49b a ampliação de 10 k do centro dessa trilha. A trilha ficou bem marcada na superfície da amostra, sendo de fácil visualização. Observando o centro da trilha, nota-se que o dano à superfície foi intenso, com várias *debris* e camadas danificadas (que podem ser mistura da camada óxida com o próprio substrato). A Fig. 49c mostra a trilha para o ensaio com 5 N e percebe-se que a trilha ficou mais larga. Na Fig. 49d (ampliação de 10 k do centro da trilha) repara-se que o dano a superfície foi ainda mais profundo, possivelmente arrancando maior quantidade do óxido passivo da amostra.

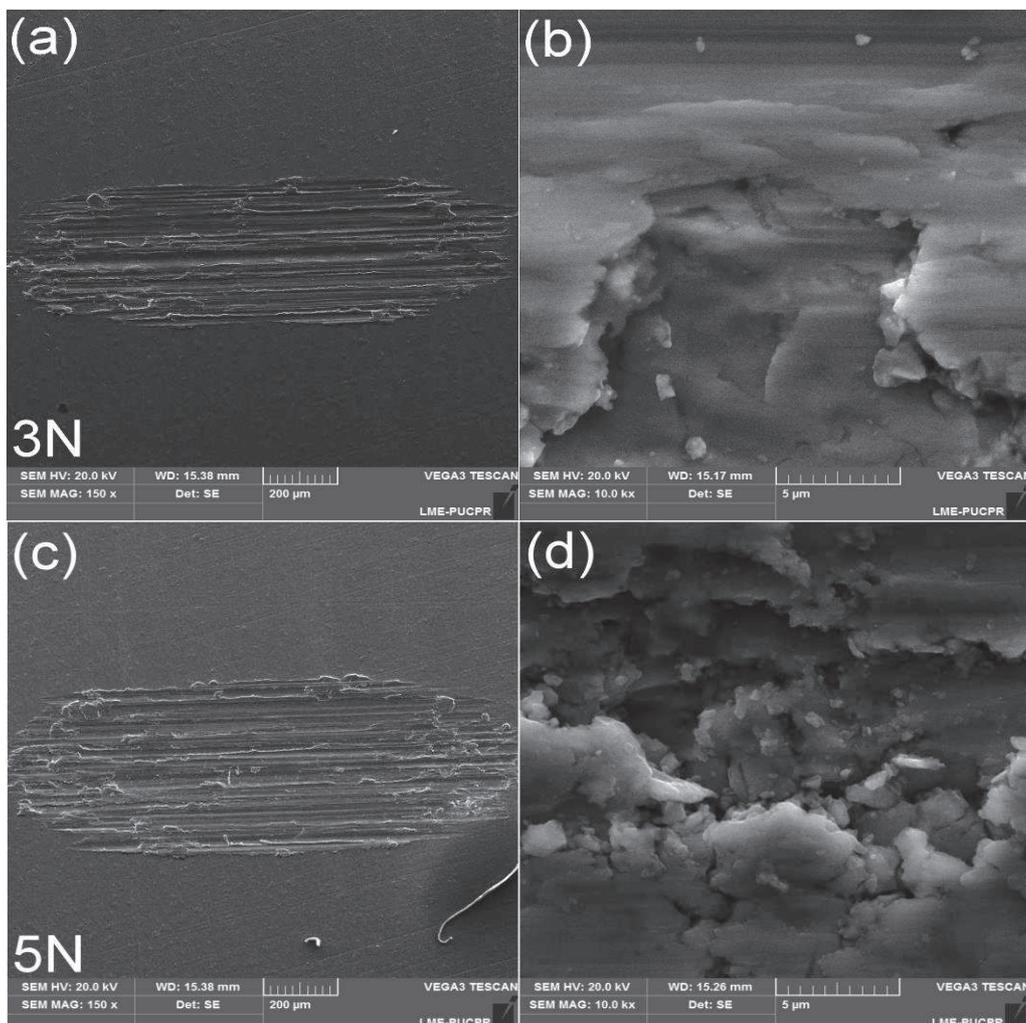


Figura 49 - Imagens de MEV das trilhas das amostras de titânio puro. Trilha feita na amostra para o ensaio com 3 N (a) e ampliação de 10 k do centro da trilha (b), trilha para o ensaio com 5 N (c) e ampliação de 10 k do centro da trilha (d).

Como se pode observar na Fig. 50a, feita com elétrons retroespalhados, a trilha na amostra sem tratamento térmico (STT) está rodeada por uma área de tonalidade mais clara, indicando a área onde ocorreu o deslocamento da camada de nanotubos. No caso da amostra STT, a adesão dos nanotubos é fraca e eles são arrancados pela base removendo toda a camada ao redor da trilha. A Fig. 50b é uma ampliação de 10 k do centro desta trilha. As Fig. 50c e 50d, são ampliações dos retângulos indicados na trilha e nelas pode-se ver, claramente, o ‘degrau’ formado pela remoção da camada de nanotubos. Essas regiões indicam a interface dos nanotubos com a região danificada. É possível ver que na trilha, estão presentes pequenos poros que seriam as bases dos nanotubos.

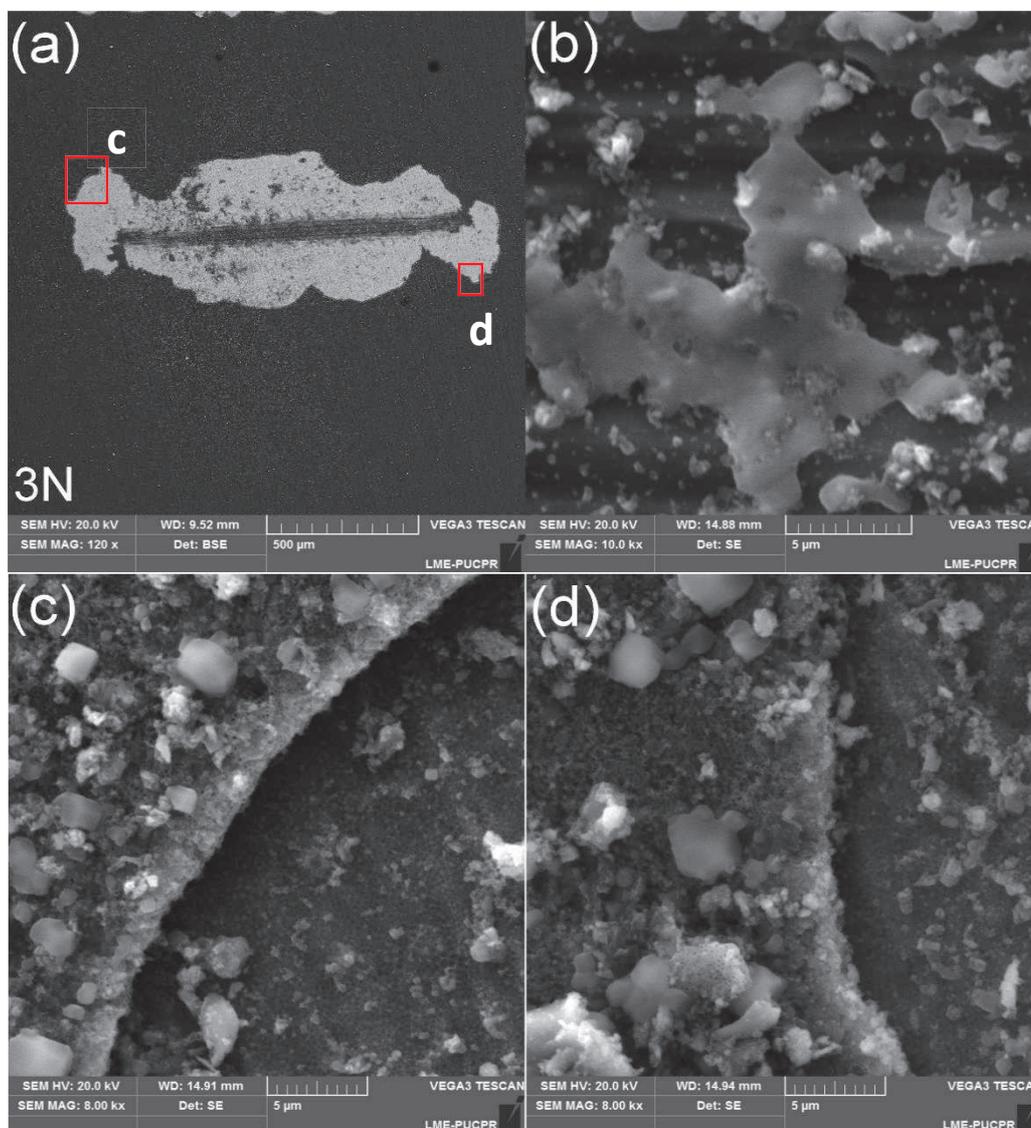


Figura 50 - Imagens de MEV das trilhas das amostras STT. Trilha na amostra com ensaio de 3 N (a), ampliação de 10 k do centro da trilha (b) e ampliações dos detalhes (c) e (d).

Na Fig. 51a, feita com elétrons retroespalhados, vê-se a trilha muito mais clara para o carregamento com 5 N, indicando maior exposição do substrato. A Fig. 51b é uma ampliação de 10 k do centro da trilha e exibe partículas espalhadas. Na Fig. 51c, (ampliação de 3 k do detalhe), observa-se os ‘degraus’ formados pelo deslocamento da camada de nanotubos. E na Fig. 51d (ampliada 15 k), verifica-se a interface nanotubos-trilha, com nanotubos intactos na parte superior da imagem. Novamente foi observado os poros no substrato, que são a primeira etapa da formação dos nanotubos.

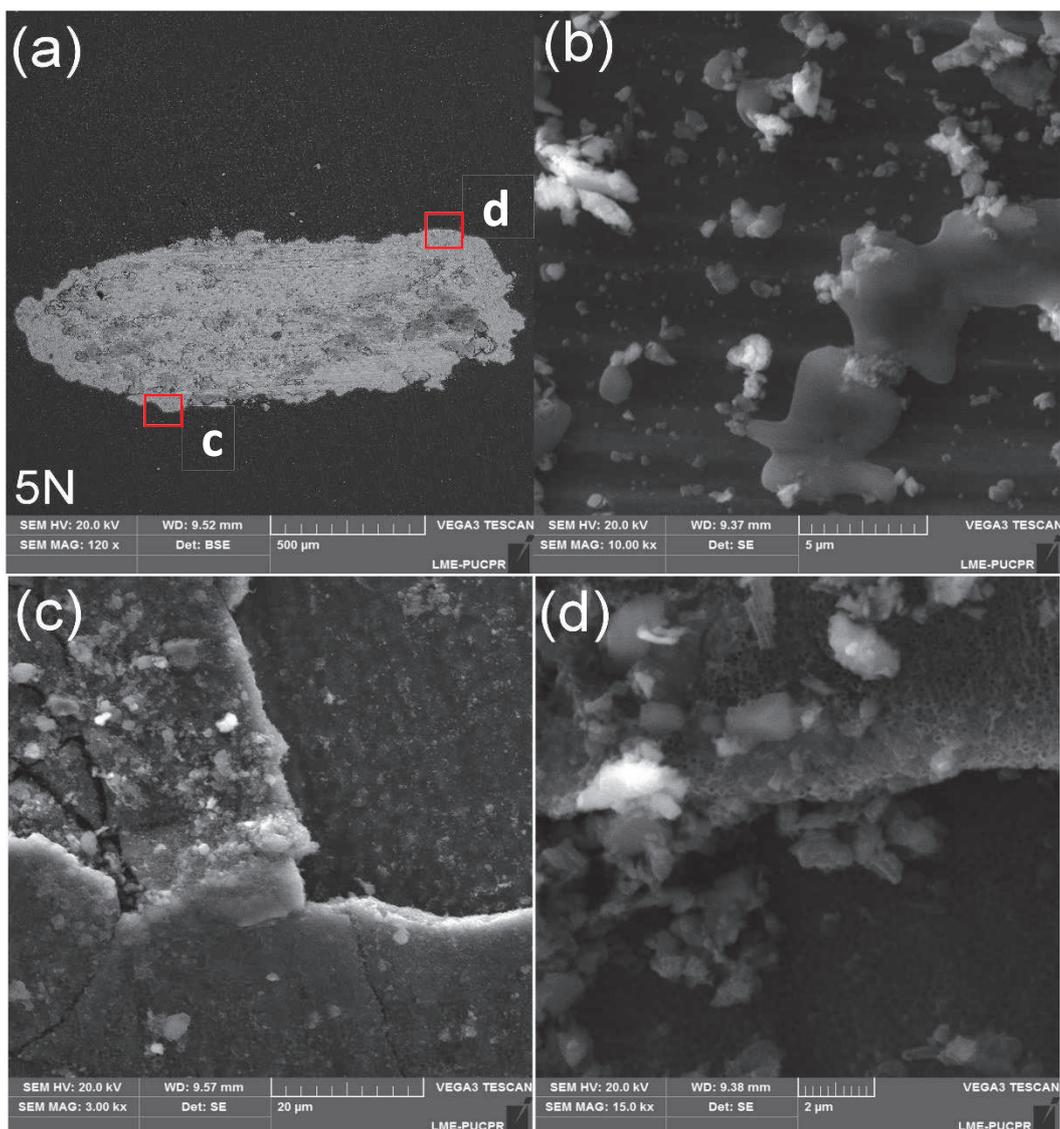


Figura 51 - Imagens de MEV das trilhas das amostras STT. Trilha na amostra com ensaio de 5 N (a), ampliação de 10 k do centro da trilha (b) e ampliações de 3 k e 15 k dos detalhes (c) e (d).

Para o ensaio com carregamento de 3 N da amostra TT 350 °C, observa-se a micrografia da Fig. 52a, feita através de elétrons retroespalhados, nota-se que a trilha possui um aspecto diferente da anterior. Não há deslocamento de camada, mas sim, um desgaste da camada de nanotubos, e as regiões expostas (claras) aparecem em menor quantidade. Na ampliação de 10 k do centro da trilha (Fig. 52b) vê-se o que parecem ser vestígios de nanotubos misturados a óxidos, como é o caso da esfera branca que aparece à esquerda. As ampliações (Fig. 52 c e 52d), mostram que a exposição do substrato não ocorreu de maneira uniforme, e que existem regiões com e sem óxidos na superfície. Também consegue-se identificar alguns nanotubos danificados na Fig. 52d.

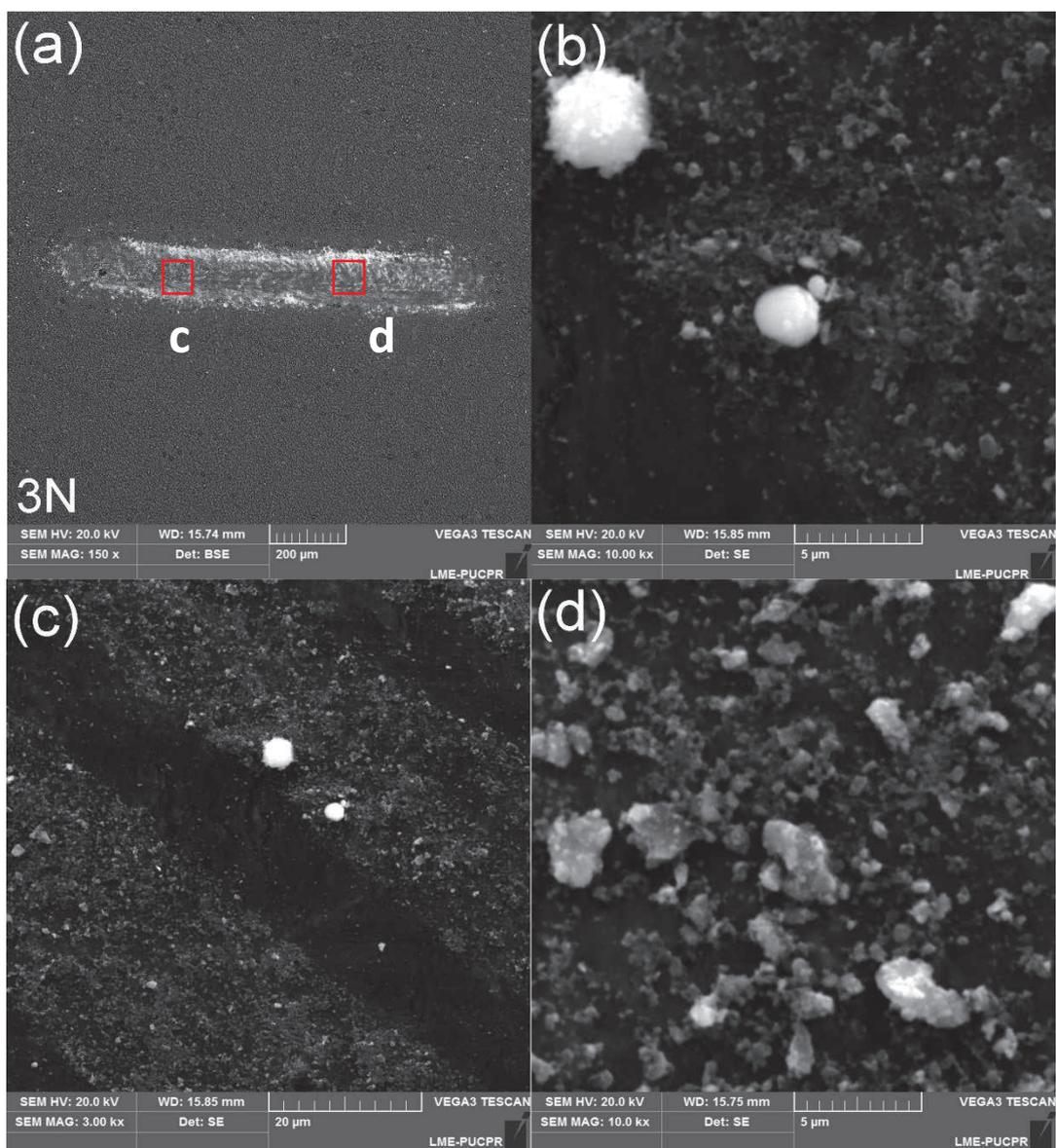


Figura 52 - Imagens de MEV das trilhas das amostras TT 350 °C. Trilha na amostra com ensaio de 3 N (a), ampliação de 10 k do centro da trilha (b) e ampliações de 3 k e 10 k dos detalhes (c) e (d).

Na Fig. 53a, observa-se uma trilha mais clara que no ensaio anterior devido ao aumento da carga (maior exposição do substrato). A Fig. 53b é uma ampliação de 10 k do centro da trilha. As imagens das trilhas ficaram muito semelhantes às do ensaio com 3 N. Na Fig. 53c consegue-se verificar vestígios de nanotubos e alguns aglomerados que (como no ensaio anterior) podem ser óxido ou nanotubos acumulados. A Fig. 53d é uma ampliação de 3 k do centro da trilha, onde é possível verificar a presença de muitas *debris*.

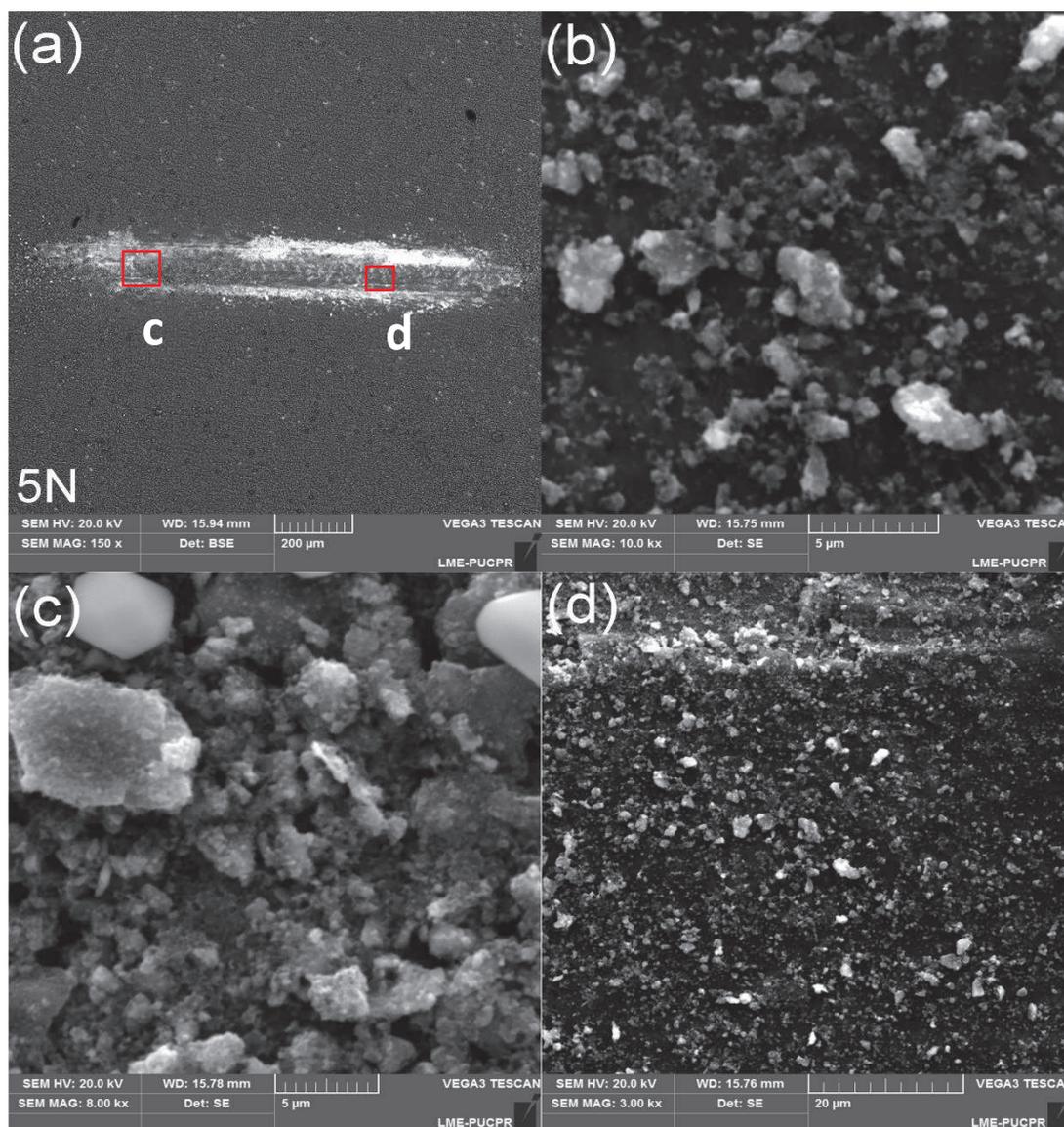


Figura 53 - Imagens de MEV das trilhas das amostras TT 350 °C. Trilha na amostra com ensaio de 5 N (a), ampliação de 10 k do centro da trilha (b) e ampliações de 8 k e 3 k dos detalhes (c) e (d).

A Fig. 54a, amostra TT 530 °C, mostra uma trilha escura para o ensaio com 3 N, a imagem foi feita com o sinal de elétrons retroespalhados. Pela cor da trilha, conclui-se que apenas uma pequena área do substrato foi exposta. A Fig. 54b é uma ampliação de 10 k do centro da trilha e sugere que houve um amassamento dos nanotubos devido a alguns sinais de que a superfície foi compactada (região estriada na parte inferior).

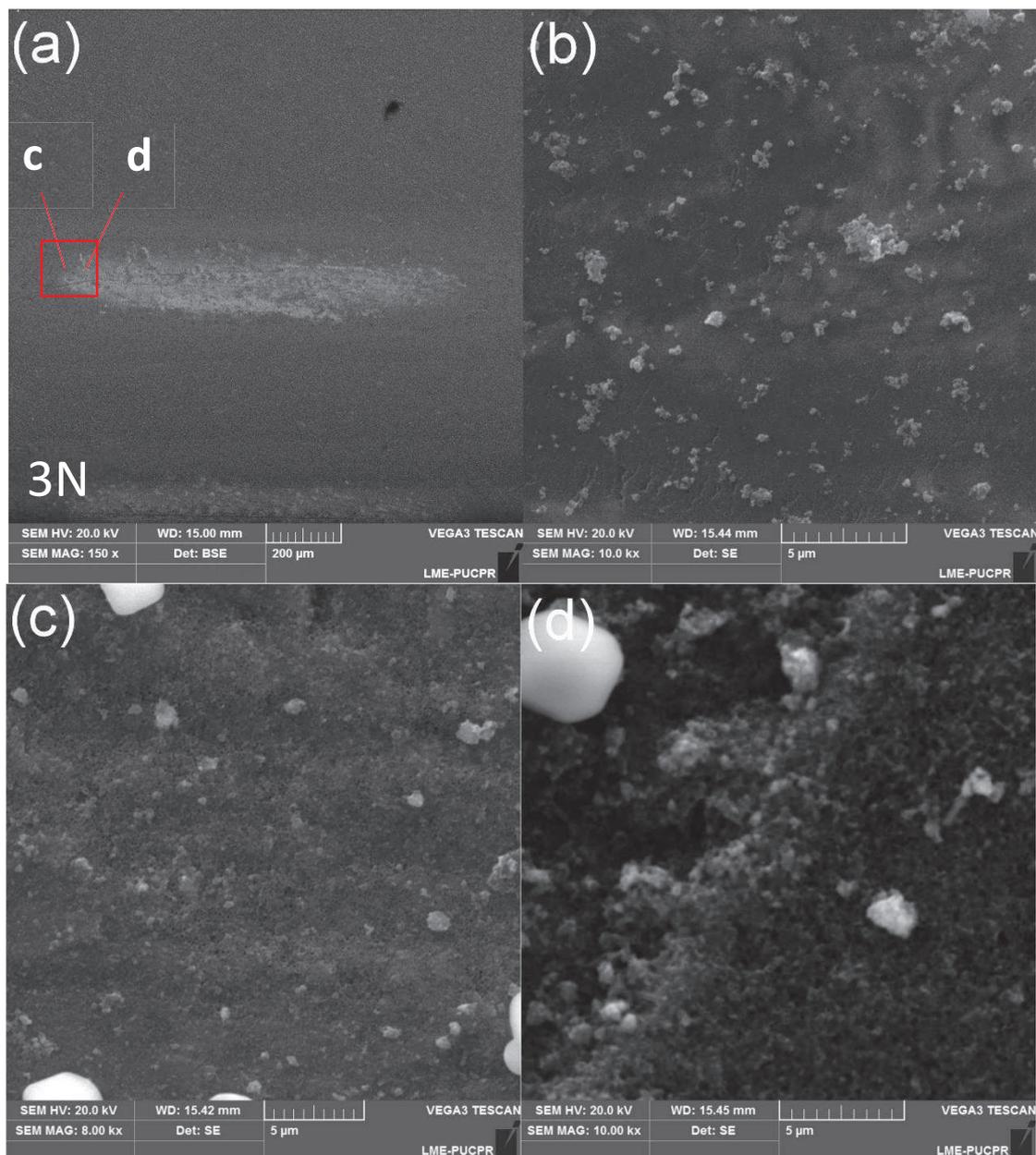


Figura 54 - Imagens de MEV das trilhas das amostras TT 530 °C. Trilha na amostra com ensaio de 3 N (a), ampliação de 10 k do centro da trilha (b) e ampliações de 8 k e 10 k dos detalhes (c) e (d).

Não foi observado a presença de partículas de óxido agindo como um terceiro corpo. A Fig. 54c é uma ampliação de 8 k da região final da trilha (retângulo), onde é possível verificar apenas os topos de vários nanotubos, como se tivessem sido envoltos em uma camada de óxido. A Fig. 54d é uma ampliação de 10k k de uma região um pouco mais à direita da imagem anterior, onde verifica-se uma camada espessa de nanotubos, misturada a óxidos e *debris*. Através dessas ampliações e pela morfologia da trilha, constata-se que a amostra TT 530 °C apresentou um comportamento mais resistente que as amostras anteriores. Principalmente pelo fato de ainda haverem muitos nanotubos intactos tão próximos a trilha.

Para os ensaios com 5 N, os resultados foram muito semelhantes. A trilha que aparece na Fig. 55a, feita com elétrons retroespalhados, mostra uma trilha escura que apresentou pouca exposição do substrato. Na Fig. 55b, é possível visualizar, com mais nitidez, a mesma trilha, porém com imagem feita através de elétrons secundários. As Fig. 55c e 55d são ampliações de 3 k e 10 k do centro da trilha.

A Fig. 56a, feita com elétrons retroespalhados, mostra a região da trilha na amostra TT 700 °C, porém, como o substrato não foi exposto, não foi possível identificar a trilha. Na Fig. 56b observa-se a trilha através da imagem feita por elétrons secundários. A Fig. 56c exhibe a ampliação do centro da trilha, mostrando que a camada de nanotubos foi amassada novamente, sendo assim o substrato continuou recoberto pelo óxido sem ser exposto. Essa camada de nanotubos amassados serviu como um lubrificante para o deslizamento da esfera.

A ampliação do retângulo (Fig. 56d) exhibe perfeitamente um cristal de rutilo, no lado esquerdo. Padrões como esse se repetiram por toda a extensão da trilha, como é possível observar na Fig. 56b ao redor do retângulo. Ainda na Fig. 56d consegue-se ver claramente a interface da trilha (camada amassada de nanotubos) com a camada intacta de nanotubos. Percebe-se que a camada amassada dos nanotubos se comportou como uma camada de óxido protetor muito aderente.

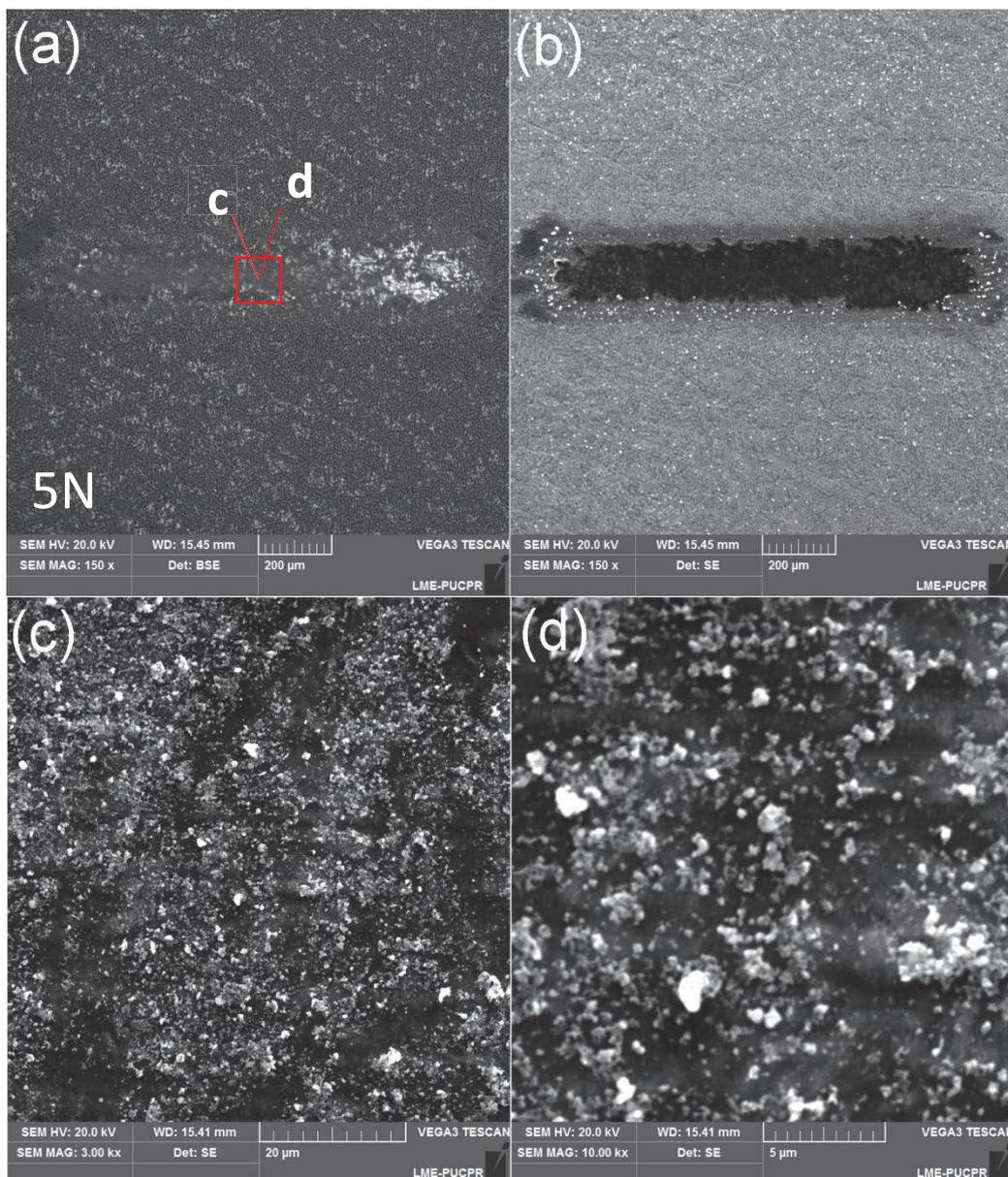


Figura 55 - Imagens de MEV das trilhas das amostras TT 530 °C. Trilha na amostra com ensaio de 5 N, imagem feita com elétrons retroespalhados (a), imagem da mesma trilha, feita com elétrons secundários (b) e ampliações de 3 k e 10 k do centro da trilha (c) e (d).

A amostra testada com carga de 5 N apresentou o mesmo comportamento, não expondo o substrato, como é possível ver na Fig. 57a (imagem feita com elétrons retroespalhados). Na Fig. 57b pode-se observar a mesma trilha, porém na imagem feita com elétrons secundários. A Fig. 57c é uma ampliação de 10 k do centro da trilha, e a Fig. 57d é uma ampliação de 8 k do detalhe no retângulo.

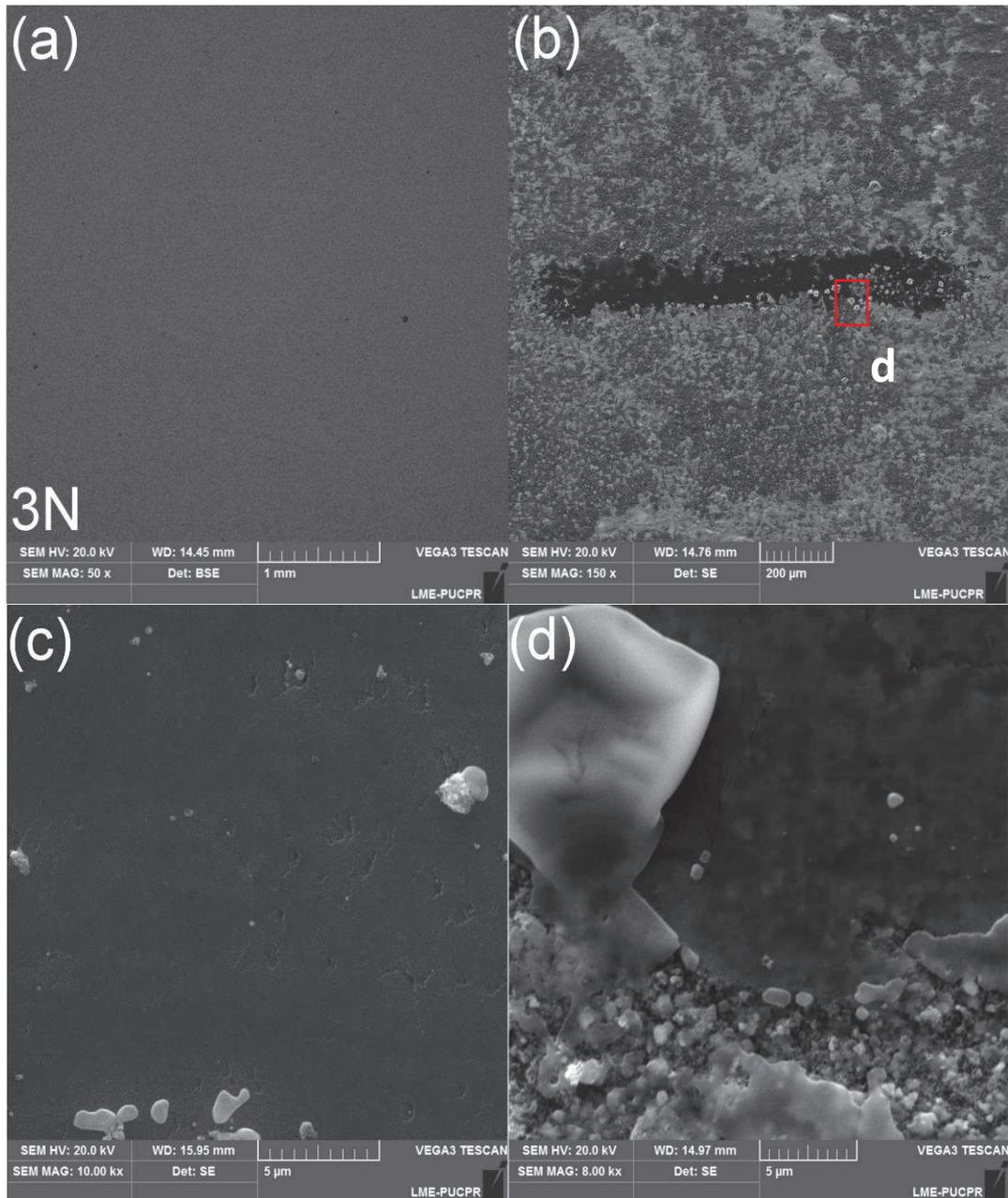


Figura 56 - Imagem feita através de elétrons retroespalhados da região da trilha na amostra TT 700 °C, testada com 3 N (a), imagem feita da mesma região com elétrons secundários (b), ampliação de 10 k do centro da trilha e ampliação de 8 k do detalhe (retângulo) (d).

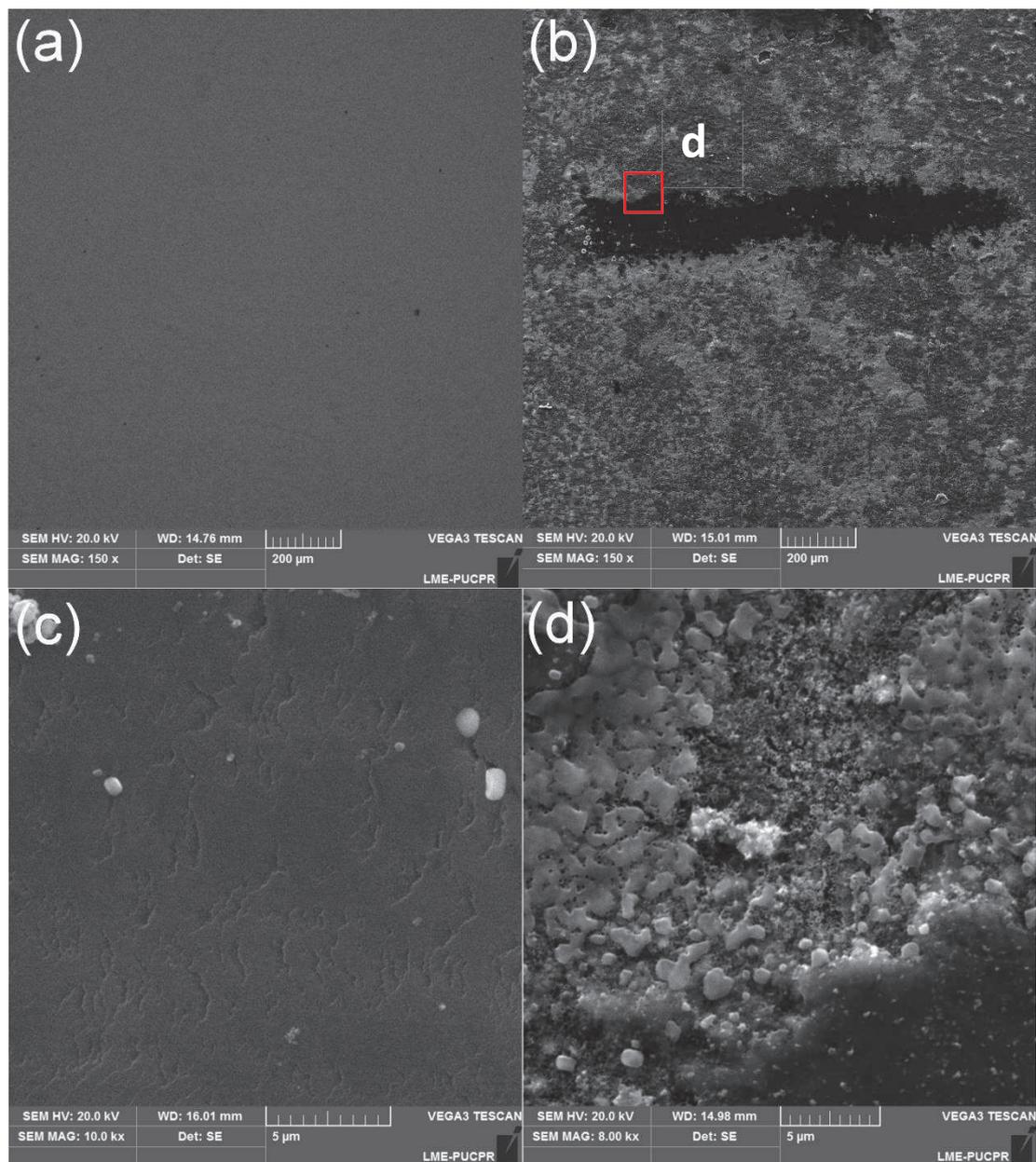


Figura 57 - Imagem feita através de elétrons secundários da região da trilha na amostra TT 700 °C, testada com 5 N (a), imagem feita da mesma região com elétrons secundários (b), ampliação de 10 k do centro da trilha e ampliação de 8 k do detalhe (d).

Atualmente, os trabalhos que estudam a tribocorrosão de implantes estão relacionados ao estudo do titânio puro, camadas de óxidos compactas e, mais recentemente, camadas de óxidos obtidas por PEO. Portanto, ainda não há resultados para serem comparados com os resultados obtidos neste trabalho.

Laurindo, 2014, realizou ensaios de tribocorrosão em amostras oxidadas por PEO (com eletrólito contendo CaP), tratadas e não tratadas termicamente, e variando as tensões aplicadas (250, 300, 350 e 400 V). Foram utilizadas cargas de 1, 3 e 5 N e verificou-se que amostras submetidas a tratamento térmico e que foram oxidadas a potenciais mais altos, apresentaram melhor resistência à tribocorrosão. Porém, uma camada oxidada via PEO, possui em média 100 nm de espessura. Se levarmos em consideração a camada de nanotubos deste estudo (até 1,67 nm), pode-se concluir que os nanotubos foram mais resistentes que a camada de PEO estudada por Laurindo.

Alves et al., 2015, também estudaram o comportamento tribocorrosivo de amostras de titânio oxidadas por PEO em dois tipos de eletrólitos contendo CaP, e variando a densidade de corrente. Para os ensaios de tribocorrosão, utilizaram carga de 2 N e as amostras foram imersas em saliva artificial. Verificou-se que amostras oxidadas com densidade de corrente de 25 A/dm² e utilizando eletrólito composto por 0,35 M de acetato de cálcio e 0,02 M de glicerofosfato de sódio, apresentaram os resultados mais resistentes ao desgaste e a corrosão. Os pesquisadores concluíram que esse resultado se deve ao fato desta condição possuir uma mistura das estruturas anatase e rutilo, melhorando sua resistência mecânica e a corrosão.

4.5.3 Coeficiente de atrito

Com os dados adquiridos pelo computador conectado ao tribômetro, durante o ensaio de tribocorrosão, foi possível traçar as curvas com o coeficiente de atrito das amostras, para os ensaios com 3 e 5 N (Fig. 58).

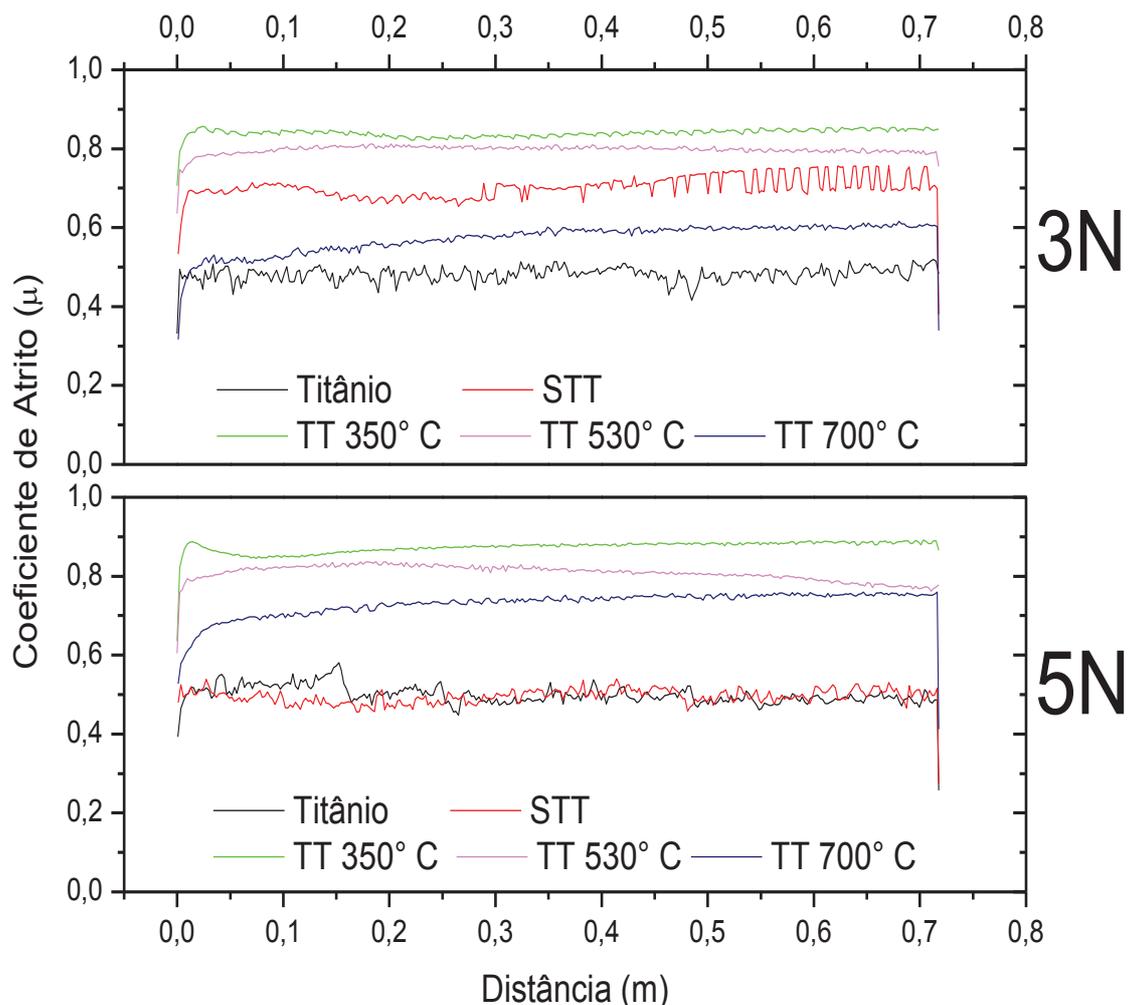


Figura 58 - Curvas obtidas para as medidas de coeficiente de atrito para o ensaio com carga de 3N (superior) e 5N (inferior).

O coeficiente de atrito para as amostras de titânio puro, ficou próximo a 0,5 para os dois ensaios (3 e 5 N). Todas as amostras com nanotubos (STT, TT 350 °C, TT 530 °C e TT 700 °C), apresentaram coeficiente de atrito maiores que o titânio puro, durante os dois ensaios, com exceção da amostra STT no ensaio com 5 N. Isso pode ter ocorrido porque quando a camada de nanotubos rompeu,

o coeficiente de atrito obtido foi praticamente o do substrato (titânio puro), por isso valores tão semelhantes.

As amostras TT 350 °C e TT 530 °C, tiveram valores que se mantiveram próximos, por volta de 0,8, para o ensaio com 3N, e entre 0,8 e 0,9 para o ensaio com 5N. As diferenças entre os dois ensaios não foram significativas. Não houveram flutuações nos valores, pois as amostras tratadas termicamente não deslocaram a camada de nanotubos e, assim, quase não houve formação de *debris* atuando como terceiro corpo.

A amostra TT 700 °C, apesar de ser constituída majoritariamente por rutilo, que é mais duro que a anatase presente nas amostras TT 350 °C e TT 530 °C, apresentou coeficiente de atrito um pouco mais baixo que as outras amostras TT, nos dois ensaios. Isso pode estar relacionado com o fato da amostra TT 700 °C não expor o substrato durante todo o ensaio e a esfera de alumina ter apenas amassado os nanotubos e deslizado sobre eles (camada lubrificante). No ensaio com 5N a amostra TT 700 °C sofreu um leve aumento no coeficiente de atrito, que também pode ser justificado pelo aumento da carga. Como foi comentado anteriormente, a dureza superficial dessa amostra é muito superior as outras, e conforme a carga aumenta o deslizamento se torna mais difícil.

Laurindo, 2014, verificou que amostras oxidadas via PEO e não tratadas termicamente, apresentaram variações bruscas no coeficiente de atrito. A distância total de deslizamento nos ensaios foi de 10 m e o autor constatou que após 4 m, os coeficientes de atrito de todas as amostras ficaram muito próximas do valor do titânio nesse ensaio (aproximadamente 0,8). Isso indica que os substratos estavam expostos. Já para as amostras tratadas termicamente, ele verificou que todas as amostras oxidadas apresentaram coeficientes de atrito superiores ao titânio puro.

Alves et al., 2015, também analisou os coeficientes de atrito de amostras oxidadas via PEO, porém os autores não citam tratamento térmico. Foi verificado que todas as amostras oxidadas apresentaram coeficiente de atrito superior ao titânio puro, que neste caso ficou em torno de 0,59.

4.7 ESTUDOS DE BIOATIVIDADE *IN VITRO*

4.7.1 Ensaio de LDH

Com a análise dos valores adquiridos no ensaio de LDH foi obtido o gráfico da Fig. 59. Sabe-se que o titânio puro não é citotóxico, sendo assim essa amostra foi considerada o controle. Comparando os resultados das outras amostras foi possível verificar se são ou não citotóxicas. Quanto maior o valor de absorbância, em relação a amostra controle, mais citotóxica é a superfície, indicando maior liberação de LDH. Apesar de, a amostra TT 530° C ter apresentado medida de absorbância um pouco mais elevada que o titânio puro, e a amostra TT 350° C, medida um pouco inferior, em todas as condições os valores ficaram muito semelhantes. Através do teste estatístico de valor extremo (Grubbs), verificou-se que a diferença entre os valores médios de cada condição não foi significativa, portanto, as amostras não são citotóxicas.

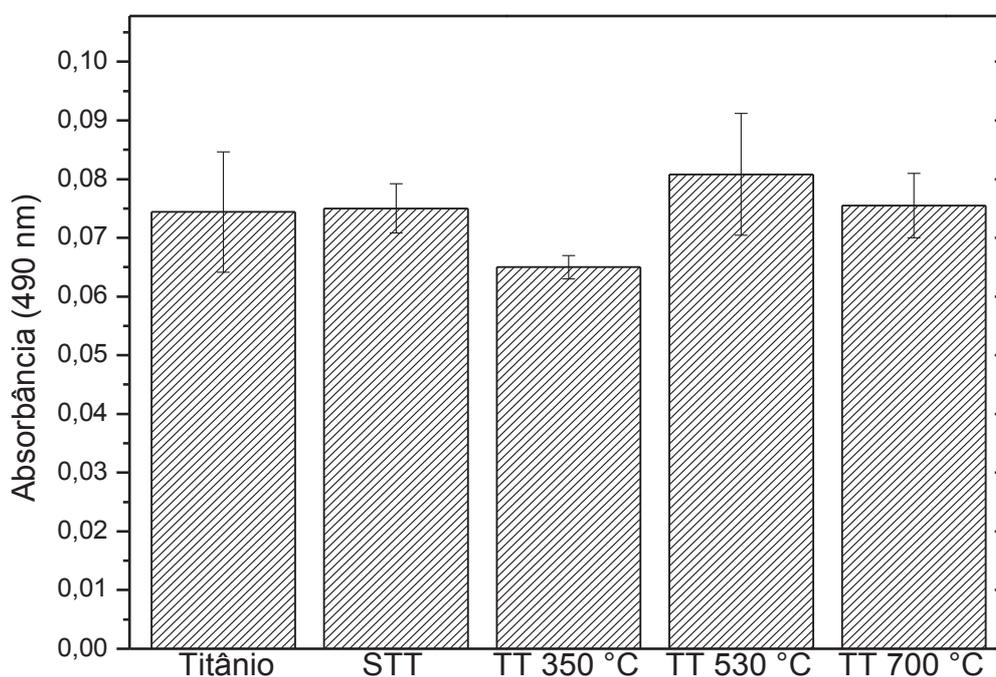


Figura 59 - Resultados do ensaio de LDH.

Smith, 2012, realizou ensaio de LDH em nanotubos de TiO₂ fabricados em amostras de titânio puro, utilizando eletrólito contendo dietilenoglicol, ácido fluorídrico e água deionizada. A anodização foi conduzida em modo

potenciostático (60 V) durante 24 horas, as amostras foram tratadas termicamente a 530° C por 3 horas. A autora também utilizou uma amostra de titânio puro como controle. A medida de absorvância da amostra com nanotubos foi estatisticamente a mesma que para o titânio puro. Sendo assim, concluiu-se que ao nanotubos não eram citotóxicos.

Leszczak, 2014, aplicou o ensaio de LDH para *nanowires* e nanofibras feitas a base de *policaprolactona* modificada superficialmente, para aplicações cardiovasculares. Como a *policaprolactona* (polímero) é não tóxica e autorizada pela FDA (*Food and Drug Administration*), ela foi utilizada como amostra controle. A autora concluiu que modificações de natureza topográfica e biomolecular, não tornaram as amostras citotóxicas.

Como foi mostrado, o ensaio de LDH pode ser aplicado a vários tipos de materiais utilizados para biomateriais.

4.7.2 DAPI/Actin

O citoesqueleto celular é composto por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários. Para que ocorra a proliferação celular, o primeiro estágio é a fixação da célula em uma superfície. A proliferação irá depender da habilidade do citoesqueleto em se reorganizar, pois ele será o responsável por realizar a comunicação intra- e extracelular, integração e diferenciação celular. Sendo assim, a análise do citoesqueleto é um indicador de como está a interação célula/superfície (Lan et al., 2013). A actina é um tipo de microfilamento que através da utilização de corantes, se torna visível para visualização no microscópio. Através das técnicas explicadas nas seções 3.7.7 e 3.7.8 foram obtidas imagens que, ao serem analisadas, forneceram dados sobre a proliferação celular nas amostras.

Observando a Fig. 60, pode-se observar as células na superfície das amostras após 1 dia de cultivo. É perceptível que a quantidade de células na superfície do titânio puro é maior do que nas amostras com nanotubos. A amostra STT apresentou a segunda maior quantidade de células e todas as amostras com TT (350, 530 e 700 °C) continham poucas células na superfície, em comparação com as outras amostras. A coluna da esquerda apresenta as imagens feitas com ampliações de 100x e a coluna da direita ampliações de

200x. Morfologicamente, as amostras tratadas termicamente possuem células parecidas e não muito alongadas. As células na superfície do titânio e da amostra STT estão mais alongadas, o que é desejável pois indica que a célula está tendo uma boa interação com a superfície.

No entanto, as imagens feitas no dia 4 do cultivo (Fig. 61) mostraram grande proliferação celular para quase todas as amostras. A amostra STT foi a que apresentou menos células, elas estavam alongadas, conectadas, porém formando uma malha vazada com muitas regiões sem células. A proliferação no titânio já era esperada pois sabe-se que a superfície é biocompatível. A amostra TT 350 °C também apresentou um grande número de células, alongadas e conectadas, mas, visualmente, consegue-se perceber que a quantidade é menor que nas amostras TT 530 °C e TT 700 °C. Para essas duas condições, praticamente não foi possível visualizar a amostra, pois as superfícies estavam cobertas com células.

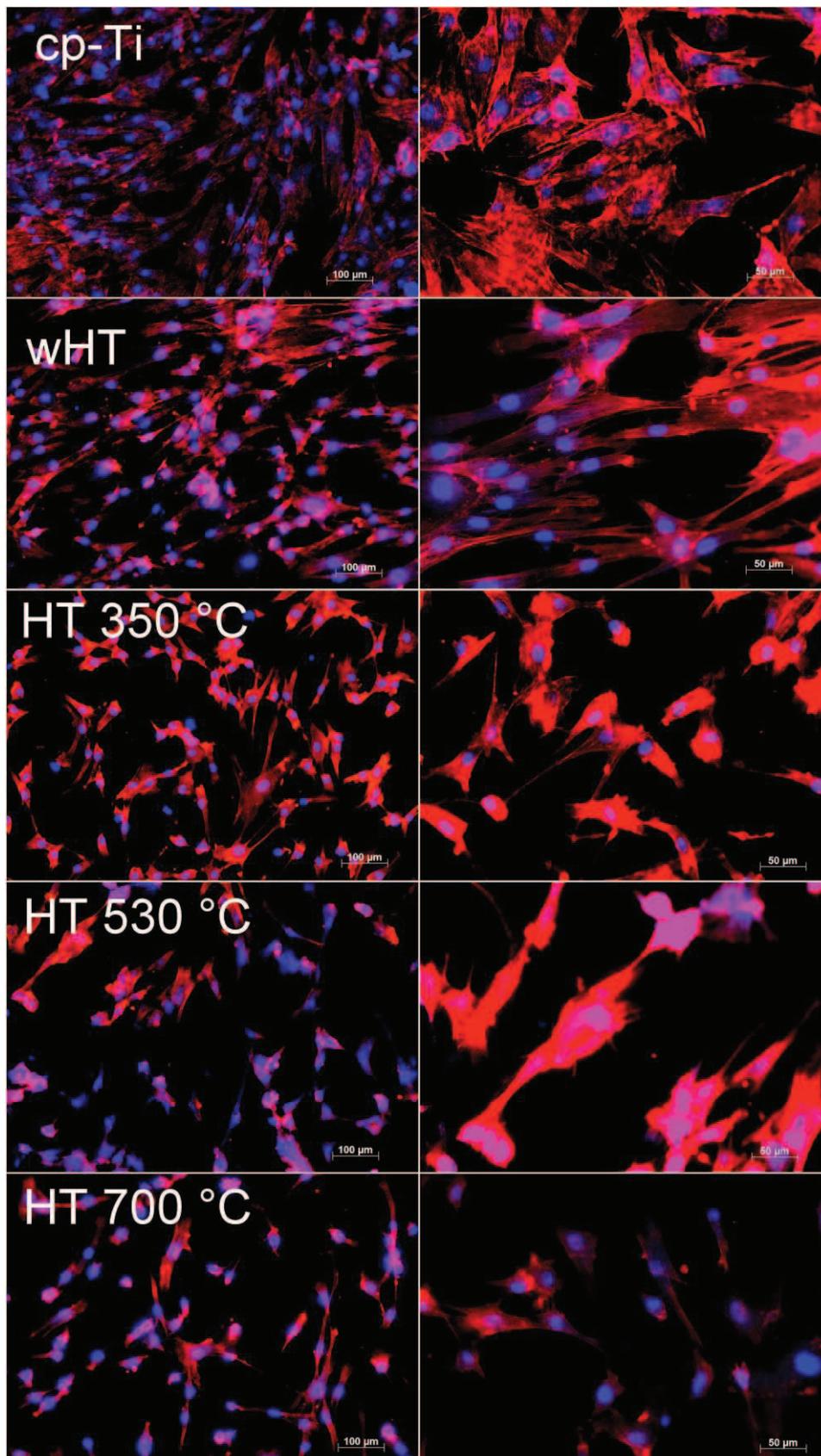


Figura 60 - Imagens de microscopia de fluorescência para as amostras analisadas no dia 1 do crescimento celular, com ampliações de 100 x na coluna da esquerda, e 200 x na coluna da direita.

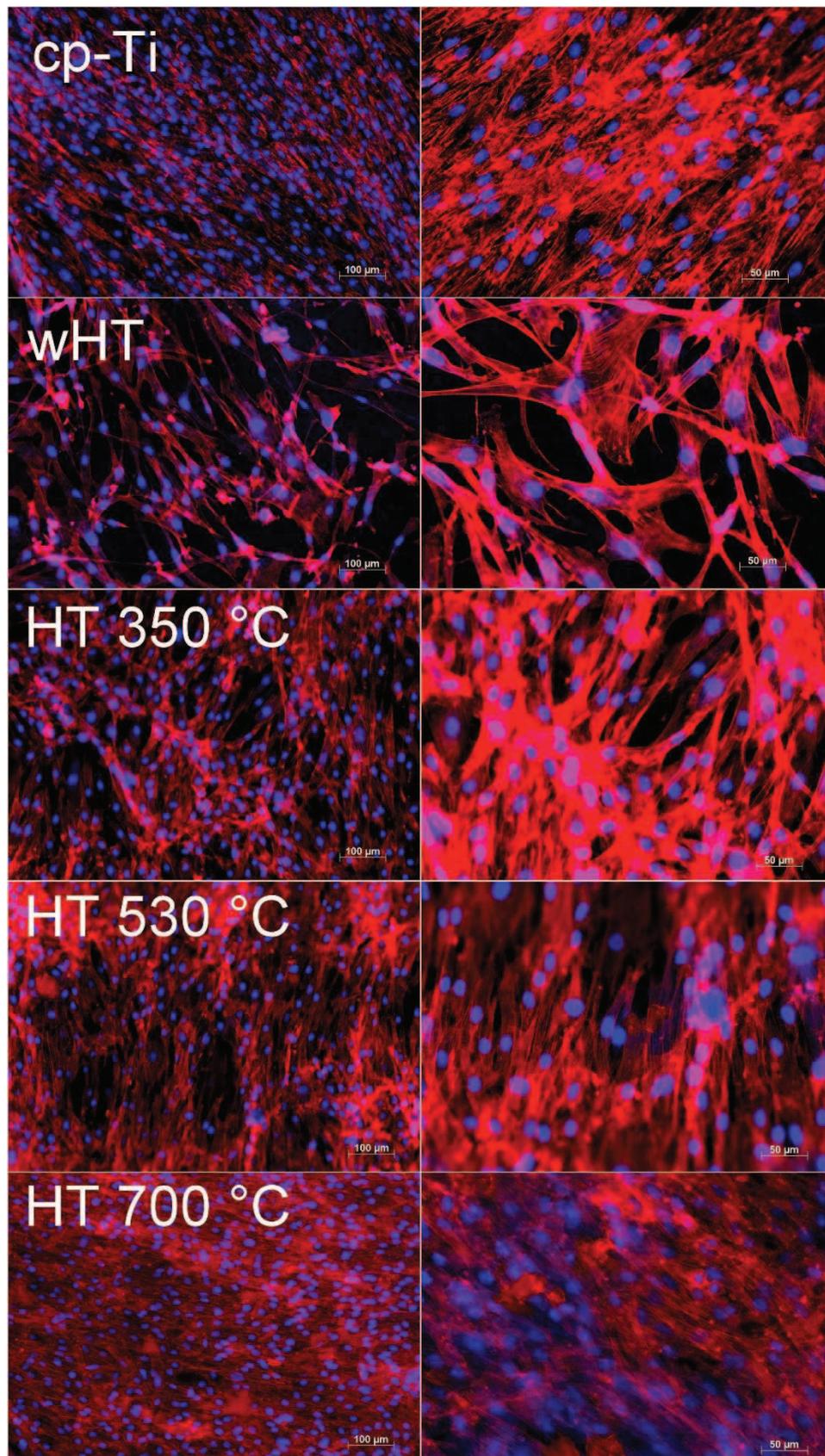


Figura 61 - Imagens de microscopia de fluorescência para as amostras analisadas no dia 4, com ampliações de 100 x na coluna da esquerda, e 200 x na coluna da direita.

Observando as imagens da amostra TT 700 °C é evidente que a interação células/superfície foi a melhor condição e que as células se proliferaram rapidamente. Essa proliferação celular pode estar relacionada com o alto teor de fósforo detectado na superfície dessas amostras (até três vezes mais que nas amostras TT 350 °C e TT 530 °C), através da análise de EDS.

A contagem celular foi feita para o dia 1 e para o dia 4, como mostra a Fig. 62.

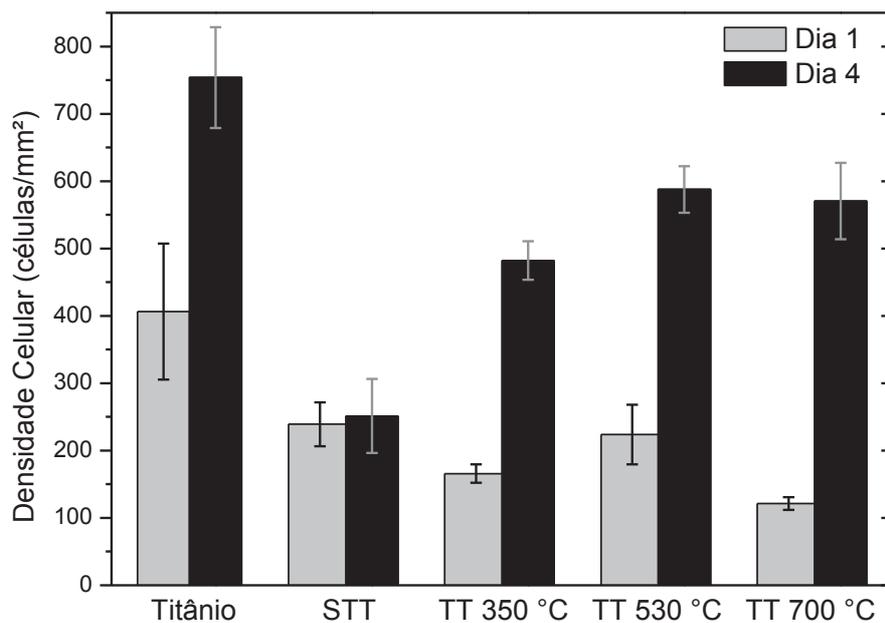


Figura 62 - Resultados da contagem celular para o dia 1 e dia 4.

Os resultados dessas contagens foram obtidos em densidade celular (células/mm²) e verificou-se que apenas a amostra STT apresentou uma proliferação muito baixa. Os resultados desta amostra variaram muito pouco do dia 1 para o dia 4.

A Fig. 63 apresenta uma análise do aumento, em percentual, do número de células nas amostras, o que é um indicador da proliferação em cada condição. Por exemplo, o titânio puro apresentou a maior contagem celular no dia 4, mas sua proliferação celular foi muito inferior as amostras TT, pois ele já continha um valor superior de células no dia 1. Analisando pelo aumento celular, todas as amostras TT apresentaram ótimos resultados sendo que, as amostras TT 350 °C e TT 530 °C apresentaram um aumento de quase 200% e a mostra TT 700 °C quase 400%, novamente, confirmando ser a melhor condição do ponto de vista de bioatividade.

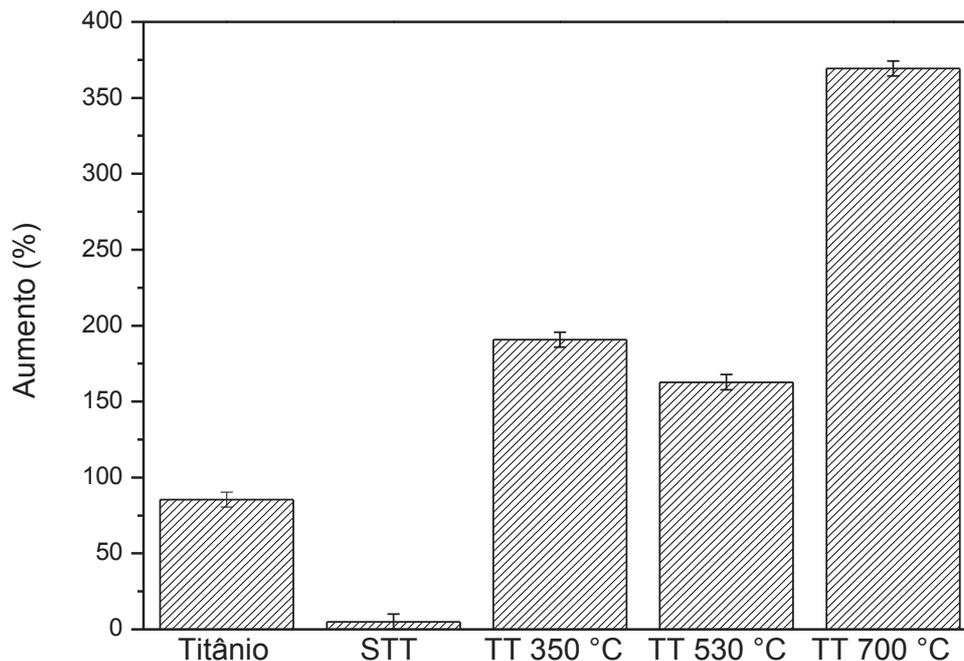


Figura 63 - Aumento celular, em percentual, na superfície das amostras.

An et al., 2011, testaram a bioatividade de nanotubos de TiO_2 sem tratamento térmico, e tratados em temperaturas entre 300 e 850 °C. Os autores utilizaram células osteoblásticas de ratos e verificaram que as amostras tratadas a 700 °C apresentaram os melhores resultados de bioatividade. Eles afirmam que esse resultado é devido à mistura anatase/rutilo.

4.7.3 Caracterização das células

As imagens de MEV foram tratadas no software GIMP 2 para que as células pudessem ser coloridas e se tornassem mais fáceis de serem visualizadas. O objetivo da análise dessas imagens, não é verificar a quantidade de células, mas sim a sua forma.

Para a amostra de titânio (Fig. 64), no dia 1 é possível visualizar algumas células se conectando e o surgimento de alguns filopódios detectando a superfície. No dia 4 as células estavam mais espalhadas e com maior quantidade de filopódios partindo delas, como o esperado. Os filopódios são responsáveis pela ancoragem da célula, por isso é importante que eles estejam presentes e em grande quantidade.

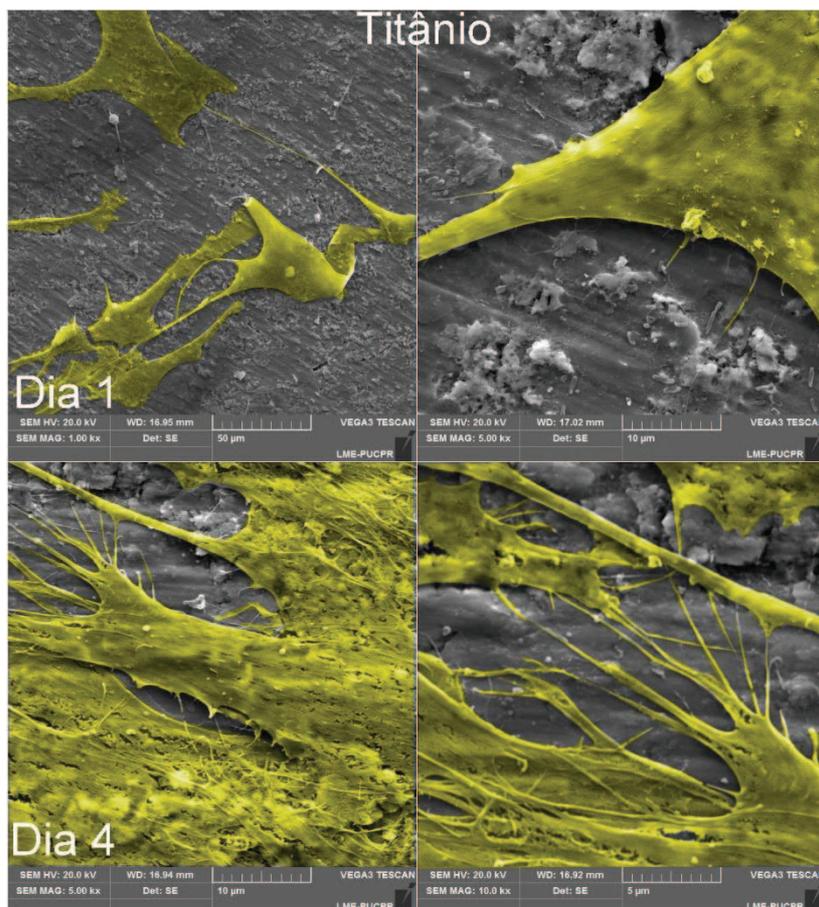


Figura 64 - Imagens de MEV para as células na superfície do titânio nos dias 1 e 4.

A amostra STT apresentou células menos espalhadas, mais arredondadas e menos conectadas. Tanto para o dia 1 quanto para o dia 4, foi verificado que não era comum os filopódios de células vizinhas se conectarem, como pode-se observar na Fig. 65, nas ampliações de 10 k (coluna da direita). As células estão muito próximas, porém não formam uma rede como no caso do titânio.

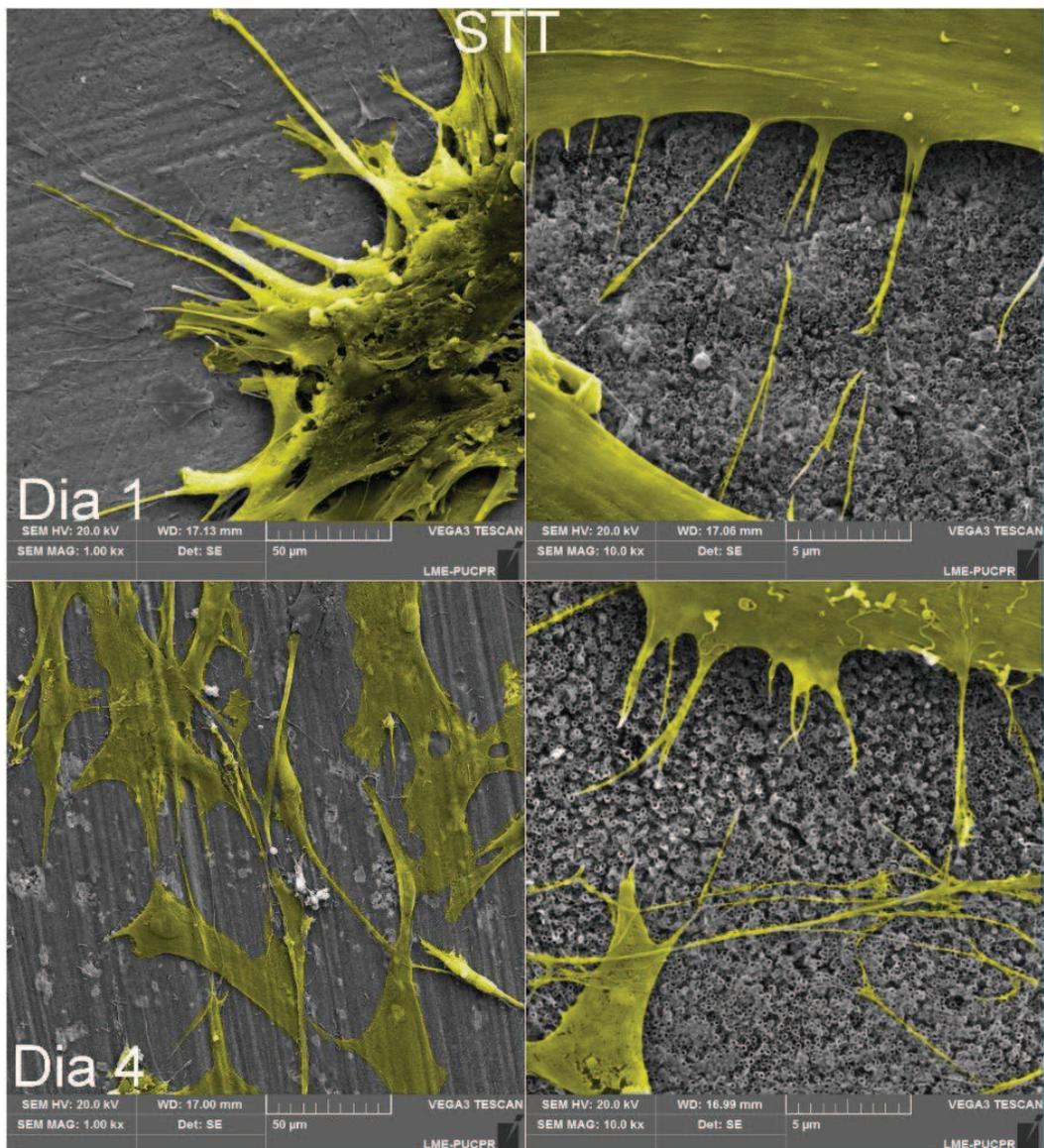


Figura 65 - Imagens de MEV para as células na superfície da amostra STT nos dias 1 e 4.

Uma imagem foi feita, onde aparece uma célula sobre a superfície da amostra STT (Fig. 66) e nesse caso célula não está espalhada e não existem filopódios partindo dela. Na parte superior é possível ver uma aglomeração de nanotubos. Como foi explicado anteriormente, nessa condição os nanotubos possuem baixa aderência e, provavelmente, se soltaram de alguma região da amostra.

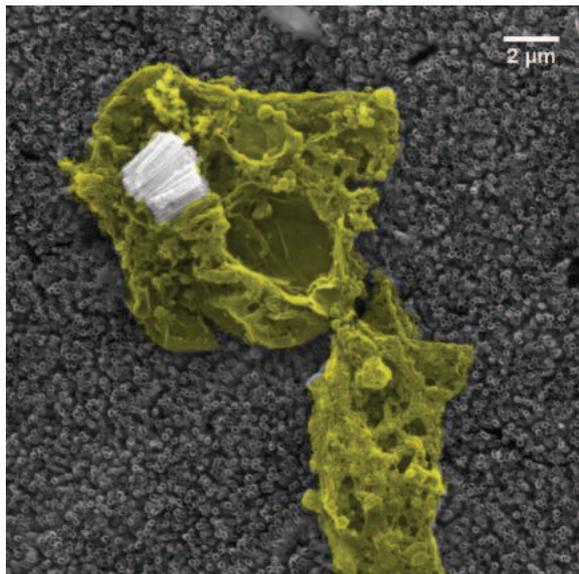


Figura 66 - Nanotubos soltos na superfície de uma célula na amostra STT.

As imagens reforçam os resultados da contagem celular, que foi muito baixo para esta condição, mostrando que as células não interagiram bem com a superfície.

As imagens da amostra TT 350 °C (Fig. 67) mostram células se espalhando e conectando-se no dia 1 e com os filopódios detectando a superfície. No dia 4, em algumas regiões, era possível observar células espalhadas e, muito próximo, outras células com formatos esféricos (sem tentar se conectar a outras células ou detectar a superfície). Mesmo com as células em formatos diferentes, a contagem para esta condição apresentou bons resultados.

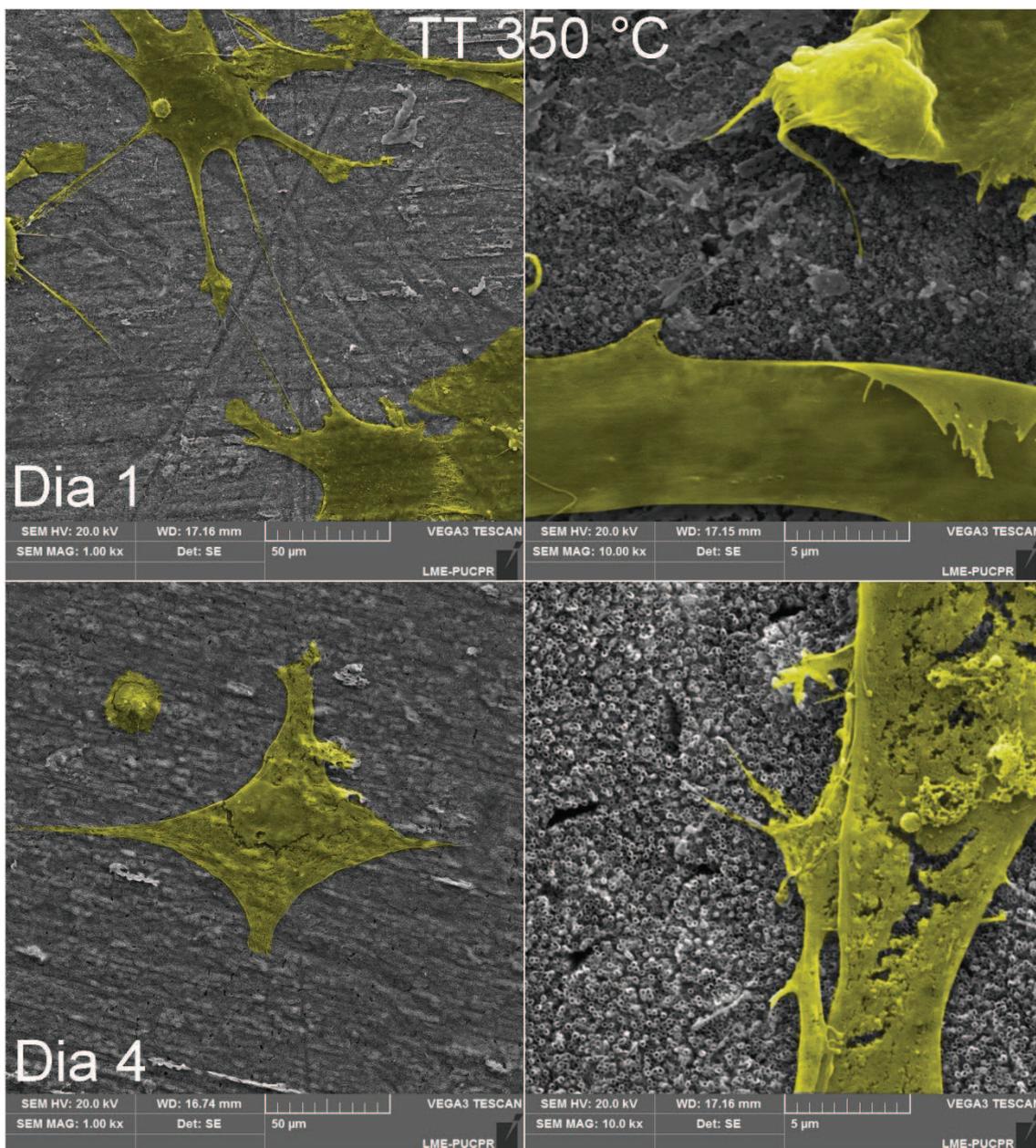


Figura 67 - Imagens de MEV para as células na superfície da amostra TT 350 °C nos dias 1 e 4.

A amostra TT 530 °C não apresentou células esféricas (Fig. 68), e estavam bem espalhadas e conectando-se. Em todas as imagens é possível verificar vários filopódios detectando as superfícies.

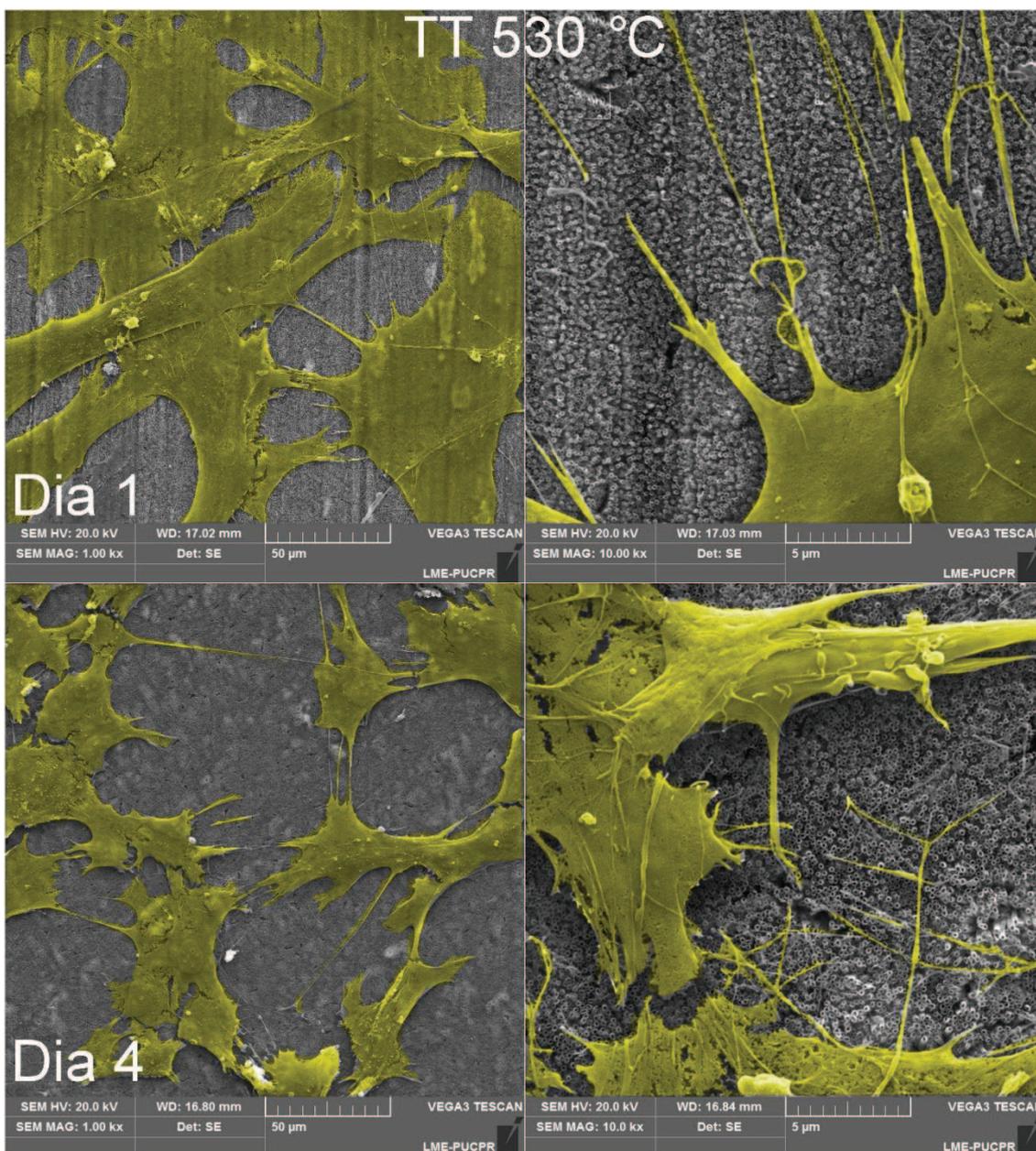


Figura 68 - Imagens de MEV para as células na superfície da amostra TT 530 °C nos dias 1 e 4.

O mesmo comportamento foi verificado na amostra TT 700 °C (Fig. 69), com células conectadas e espalhando. Também se pode observar vários filopódios detectando as superfícies dos nanotubos.

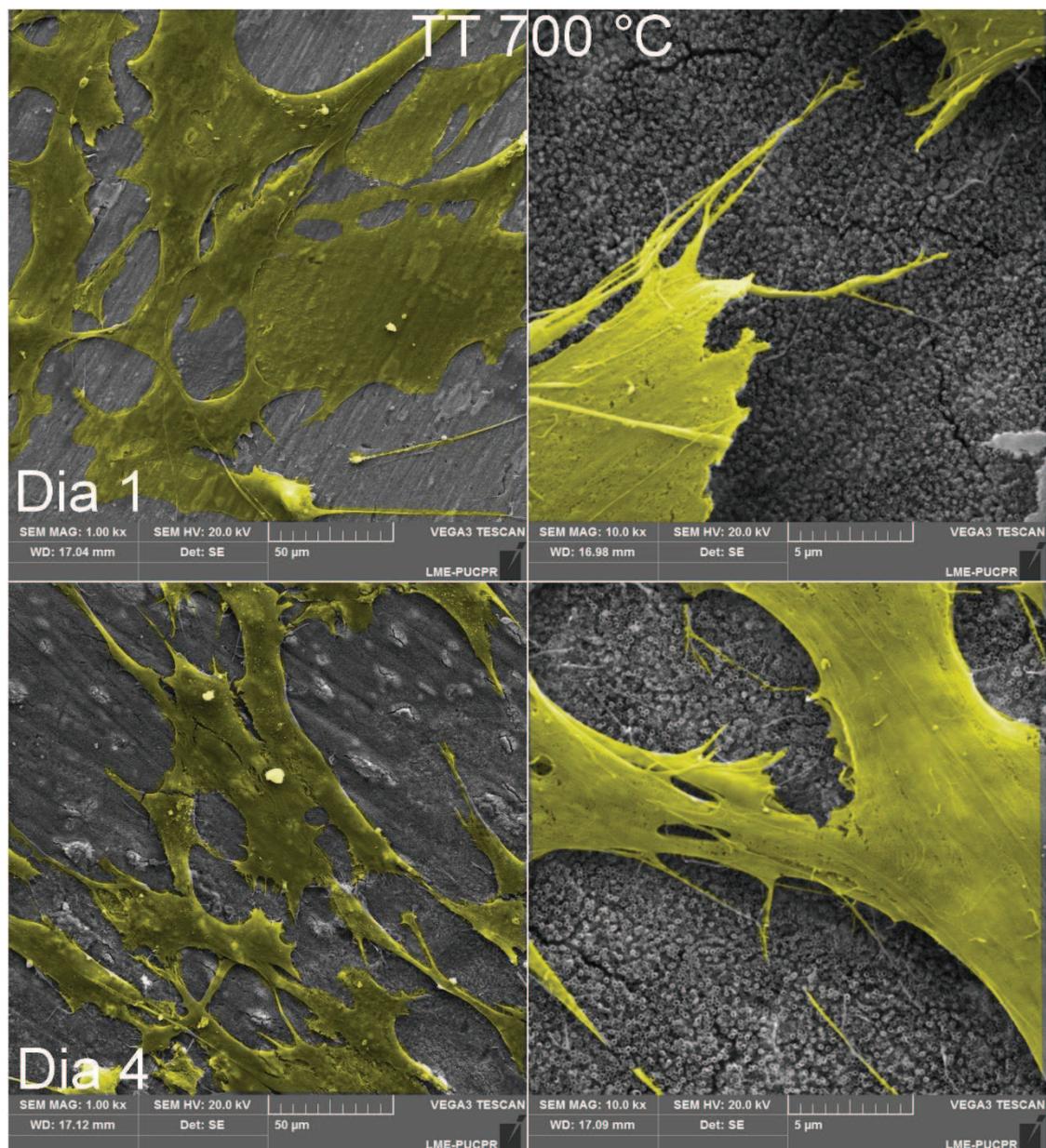


Figura 69 - Imagens de MEV para as células na superfície da amostra TT 700 °C nos dias 1 e 4.

Com exceção da amostra STT, todas as outras condições que continham nanotubos apresentaram células com morfologias adequadas para proliferação, e células com vários filopódios tentando detectar a superfície.

Relacionando os três ensaios com os fibroblastos, as amostras TT apresentaram bons resultados indicando que são superfícies ideais ao crescimento celular. Com exceção da amostra TT 350 °C, que é constituída por estrutura amorfa e anatase, as outras TT (530 °C e 700 °C) são misturas de anatase e rutilo em diferentes proporções.

Trabalhos anteriores relatam que superfícies totalmente cristalinas, desde que sejam puramente anatase ou misturas anatase/rutilo, apresentam melhor bioatividade que camadas amorfas (Sul et al. 2001, 2005; Uchida et al. 2002; Tsuchiya et al. 2005).

5. CONCLUSÕES

Com a análise dos resultados, chegou-se às seguintes conclusões:

(a) Os nanotubos, sem tratamento térmico possuem estrutura amorfa. Os resultados de DRX mostram que à medida que a temperatura de tratamento térmico é aumentada, ocorre a cristalização da fase anatase e a transformação dessa fase na fase rutilo. Na amostra TT 350 °C está presente uma mistura anatase+amorfo, na TT 530 °C anatase+rutilo (com predominância de anatase) e na TT 700 °C anatase+rutilo (com predominância de rutilo).

(b) Após o tratamento térmico, as frações em peso de anatase e rutilo na amostra TT 530 °C, foi de respectivamente 96,67 % e 3,33 %. Para a amostra TT 700 °C as frações em peso foi de 11,17 % de anatase e 88,83 % de rutilo.

(c) A análise das trilhas de tribocorrosão mostraram que as amostras tratadas termicamente apresentaram um comportamento tribocorrosivo superior à amostra STT e ao titânio. A amostra TT 700° C foi a melhor condição na resistência a tribocorrosão e em nenhum momento do ensaio, expôs o substrato. A camada de nanotubos foi amassada e a esfera de alumina ficou deslizando sobre essa camada que funcionou como um lubrificante.

(d) Quanto à bioatividade, novamente, as amostras tratadas termicamente apresentaram os melhores resultados, enquanto a proliferação celular na amostra STT foi muito inferior. Isso indica que as amostras com nanotubos com óxidos cristalinos possuem uma superfície favorável ao crescimento celular. Não houve redução no número de células em nenhuma condição. Analisando o aumento celular em porcentagem, a amostra TT 700 °C apresentou o melhor resultado com um aumento de quase 375 %. O aumento do teor de fósforo na amostra TT 700 °C pode estar associado a formação de algum fosfato que favoreceu o crescimento celular.

e) A condição da amostra com nanotubos e TT 700 °C apresentou os melhores resultados de Tribocorrosão e de Bioatividade, indicando que o método é favorável para modificação superficial de implantes de titânio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. A.; BAYÓN, R.; VITERI, V. S.; GARCIA, M. P.; IGARTUA, A.; FERNANDES, M. H.; ROCHA, L. A. Tribocorrosion Behavior of Calcium- and Phosphorous-Enriched Titanium Oxide Films and Study of Osteoblast Interactions for Dental Implants. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, p. 1 – 23. 2015.
- ALVES, S. F.; WASSALL, T. In vitro evaluation of osteoblastic cell adhesion on machined osseointegrated implants. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 32, On-line version. 2009.
- AN, S.; Narayanan, R.; Matsumoto, T.; Lee, H.; Kwon, T.; Kim, Ky. Crystallinity of Anodic TiO₂ Nanotubes and Bioactivity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 6. 2011.
- ASTM F67, 2000, Standard Specification for Unalloyed Titanium, for Surgical Implant Applications, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2000.
- ASTM F136, 2002, Standard Specification for Wrought Titanium-6Aluminum-4Vanadium ELI (Extra Low Interstitial) Alloy for Surgical Implant Applications, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2002.
- BAUER, S.; SCHMUKI, P.; MARK, K., PARK, J. Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. **Progress in Materials Science**, v. 58, p. 261-326. 2013.
- BAVYKIN, D. V.; FRIEDRICH, J. M.; WALSH, F. C. Protonated Titanates and TiO₂ Nanostructured Materials: Synthesis, Properties, and Applications. **Advanced Materials**, v.18, p. 2807-2824. 2006.
- BERANEK, R.; HILDEBRAND, H.; SCHMUKI, P. Self-Organized Porous Titanium Oxide Prepared in H₂SO₄/HF Electrolytes. **Electrochem. Solid-State Letter**, v. 6, 2003.
- BERRY, C. C.; DALBY, M. J.; McCLOY, D.; AFFROSSMAN, S. The fibroblast response to tubes exhibiting internal nanotopography. **Biomaterials**, v. 26, p. 4985 – 4992. 2005.
- BOYAN, B. D.; LOHMANN, C. H.; DEAN, D. D.; SYLVIA, V. L.; COCHRAN, D. L.; SCHWARTZ, Z. Mechanisms Involved in Osteoblast Response to Implant Surface Morphology. **Annual Review of Materials Research**, v. 31, p. 357–71. 2001.
- BRANEMARK, P. I. et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., Almqvist & Wiksell International**, Stockholm (1977) 1977: 11: Suppl. 16, and as a monograph from.

BRETT, P. M.; HARLE, J.; SALIH, V.; MIHOC, R.; OLSEN, I.; JONES, F. H.; TONETTI, M. Roughness response genes in osteoblasts. **Bone**, v. 35, p. 124 – 133. 2004.

BUSER, D.; MARTIN, W.; BELSER, W.M. Optimizing esthetic for implant restorations in the anterior maxilla. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. 19 (suppl), 43. 2004.

CHENG, L.; SHI, Y.; YE, F.; BU, H. Osteoinduction of calcium phosphate biomaterials in small animals. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 1254 – 1260. 2013.

DACULSI, G.; LABOUX, O.; MALARD, O.; WEISS, P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, n. 3, p. 195 – 200. 2003.

DALBY, M.; CHILDS, S.; RIEHLE, M. O.; JOHNSTONE, H. J. H.; AFFROSSMAN, S.; CURTIS, A. Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time. **Biomaterials**, v. 24, p. 927 – 935. 2003.

DAVIS, J. R. Handbook of Materials for Medical Devices. ASM International, 2003, 341 p.

DESAI, T. A. Micro- and nanoscale structures for tissue engineering constructs. **Medical Engineering and Physics**, v. 22, p.595 - 606. 2000.

DIEBOLD, D. The surface science of titanium dioxide. **Surface Science Reports**, New Orleans, v. 48, p. 53-229. 2003.

DONACHIE, M. J. Jr. **Titanium: A Technical Guide**. 2^a Ed. Ohio: ASM International, 2000. 388 p.

DU, G.; WAN, B.; GUO, Z.; SHEN, J.; LI, Y.; LIU, H. Effect of Annealing on Electrochemical Performance of Anodized TiO₂ Nanotubes for Lithium Ion Batteries. **Advanced Science Letters**, v. 4, n. 2, p. 469-473. 2011.

EHRENFEST, D. M. D.; COELHO, P. G.; KANG, B.; SUL, Y.; ALBREKTSSON, T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 198 - 206. 2010.

ELIAS, C. N.; OSHIDA, Y.; LIMA, J. H. C.; MULLERE, C. A. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 1, p. 234 – 242. 2008.

ELIAS, C. N.; MEYERS, M. A.; VALIEVC, R. Z.; MONTEIRO, S. N. Ultrafine grained titanium for biomedical applications: An overview of performance. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 2, p. 340-350, 2013.

- HANG, R.; HUANG, X.; TIAN, L.; HE, Z.; TANG, B. Preparation, characterization, corrosion behavior and bioactivity of Ni₂O₃-doped TiO₂ nanotubes on NiTi alloy. **Electrochimica Acta**, v. 70, p. 382 – 393. 2012.
- KANTAWONG, F.; BURCHMORE, R.; GADEGAARD, N.; OREFFO, R. O. C.; DALBY, M. J. Proteomic analysis of human osteoprogenitor response to disordered nanotopography. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, p. 1075 – 1086. 2009.
- KONDO, J. N.; DOMEN, K. Crystallization of mesoporous metal oxides. **Chemistry of Materials**, v. 20, p. 835-847. 2007.
- KUBIAK, K. J.; WILSON, M. C. T.; MATHIA, T. G.; CARVAL, Ph. Wettability versus roughness of engineering surfaces. **Wear**, v. 271, p. 523-528. 2011.
- KULKARNI, M.; MAZARE, A.; SCHMUKI, P.; IGLIČ, A. Biomaterial surface modification of Titanium and titanium alloys for medical applications, **Nanomedicine**, UK Central Press, p. 111-136. 2014.
- LAI, Y.; LIN, C.; WANG, H.; HUANG, J.; ZHUANG, H.; SUN, L. Superhydrophilic-superhydrophobic micropattern on TiO₂ nanotube films by photocatalytic lithography. **Electrochemistry Communications**, v. 10, p. 387 – 391. 2008.
- LAN, M.; LIU, C.; HUANG, H.; CHANG, J.; LEE, S. Diameter-sensitive biocompatibility of anodic TiO₂ nanotubes treated with supercritical CO₂ fluid. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, p. 150 – 157. 2013.
- LANDMANN, M.; RAULS, E.; SCHMIDT, W. G. The electronic structure and optical response of rutile, anatase and brookite TiO₂. **Journal of Physical Condensed Matter**, v.24, 2012.
- LAURINDO, Carlos Augusto Henning. **Influência dos Parâmetros de Oxidação nas Propriedades Físicas, Químicas e de Bioatividade da Camada de Óxido de Titânio Enriquecida com Cálcio e Fósforo**. 2014. 137 f. Tese para obtenção do título de doutor – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2014.
- LE GUÉHENNEC, L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, v. 23, p. 844 – 854. 2007.
- LEE, W.; LOO, C.; ROHANIZADEH, R. A review of chemical surface modification of bioceramics: Effects on protein adsorption and cellular response. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 823 – 834. 2014.
- LESZCZAK, Victoria. **Polycaprolactone Nanowire Surfaces as Interfaces for Cardiovascular Applications**. 2014. 223 f. Tese para obtenção do título de doutor – Colorado State University, 2014.

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

LI, L. H.; KONG, Y. M.; KIM, K. W.; *et al.* Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. **Biomaterials**, v. 25, p. 2867 – 2875. 2004.

LIU, F.; SONG, Y.; WANG, F.; SHIMIZU, T.; IGARASHI, K.; ZHAO, L. Formation characterization of hydroxyapatite on titanium by microarc oxidation and hydrothermal treatment. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 100 – 104. 2005.

LIU, R.; YANG, W.; QIANGA, L.; WUB, J. Fabrication of TiO₂ nanotube arrays by electrochemical anodization in an NH₄F/H₃PO₄ electrolyte. **Thin Solid Films**, v. 519, p. 6459 – 6466. 2011.

LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering**, p. 49 – 121. 2004.

MACAK, J. M.; TAVEIRA, L. V.; TSUCHIYA, H.; SIROTNA, K.; MACAK, J.; SCHMUKI, P. Influence of different fluoride containing electrolytes on the formation of self-organized titania nanotubes by Ti anodization. **Journal of Electroceramics**, v. 16, p. 29-34. 2006.

MACAK, J. M.; TSUCHIYA, H.; GHICOV, A.; YASUDA, K.; HAHN, R.; BAUER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. **Solid State & Materials Science**, v.11, p. 3-18. 2007.

MATHEW, M. T.; SRINIVASA PAI, P.; POURZAL, R.; FISCHER, A.; WIMMER, M. A. Significance of Tribocorrosion in Biomedical Applications: Overview and Current Status. **Advances in Tribology**, 12 p. 2009.

MENDONÇA, G.; MENDONÇA, D. B. S.; ARAGÃO, F.; COOPER, L. F. Advancing dental implant surface technology – From micron - to nanotopography. **Biomaterials**, v. 29, p. 3822 – 3835. 2008.

MISCHLER, S. Triboelectrochemical techniques and interpretation methods in tribocorrosion: A comparative evaluation. **Tribology International**, v. 41, p. 573-583. 2008.

PARK, I. S.; WOO, T. G.; JEON, W. Y.; PARK, H. H.; LEE, M. H.; BAE, T. S.; SEOL, K. W. Surface characteristics of titanium anodized in the four different types of electrolyte. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 863 – 870. 2007.

PARK, J.; LAKES, R. S. Biomaterials: An Introduction. **Metallic Implant Materials**. 3^a Ed. New York: Springer, 2007. cap. 5, p. 99 – 137.

- RATNER, D. B.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. 497 p.
- REGONINI, D.; BOWEN, C. R.; JAROENWORALUCK, A.; STEVENSA, R. A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. **Materials Science and Engineering R**, v. 74, p. 377 – 406. 2013.
- REGONINI, D.; JAROENWORALUCK, A.; STEVENS, R.; BOWEN, C.R. Effect of heat treatment on the properties and structure of TiO₂ nanotubes: phase composition and chemical composition. **Surface and Interface Analysis**, v. 42, p. 139 – 144. 2010.
- RODRIGUES, S. N.; GONÇALVES, I. C.; MARTINS, M. C. L.; BARBOSA, M. A.; RATNER, B. D. Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl-/methyl-terminated self-assembled monolayers. **Biomaterials**, v. 27, p. 5357 – 5367. 2006.
- SCHMIDT-STEIN, F.; GNICHWITZ, J. F.; SALONEN, J.; HAHN, R.; HIRSCH, A.; SCHMUKI, P. Electrochemical wettability control on conductive TiO₂ nanotube surfaces modified with a ferrocene redox system. **Electrochemistry Communications**, v. 11, p. 2000 – 2003. 2009.
- SMITH, Barbara Symie. **Titania Nanotube Arrays: Interfaces for Implantable Devices**. 2012. 184 f. Tese para obtenção do título de doutor – Colorado State University, 2012.
- SOLLAZZO, V.; PEZZETTI, F.; SCARANO, A.; PIATTELLI, A.; MASSARI, L.; BRUNELLI, G.; CARINCI, F. Anatase Coating Improves Implant Osseointegration In Vivo. **The journal of craniofacial surgery**, v. 18, p. 806 – 810. 2007.
- SORKIN, J. A.; HUGHES, S.; SOARES, P.; POPAT, K. C. Titania nanotube arrays as interfaces for neural prostheses. **Materials Science and Engineering**, C 49, p. 735 – 745. 2015.
- SPURR, R. A.; MYERS, H. Quantitative Analysis of Anatase-Rutile Mixtures with an X-Ray Diffractometer. **Analytical Chemistry**, v. 29, p. 760 – 762, n. 5. 1957.
- SRIMUANGMAK, K.; NIYOMWAS, S. Effects of Voltage and Addition of Water on Photocatalytic Activity of TiO₂ Nanotubes Prepared by Anodization Method. **Energy Procedia**, v. 9, p. 435 – 439. 2011.
- SONG, H.; KIM, M.; JUNG, G.; VANG, M.; PARK, Y. The effects of spark anodizing treatment of pure titanium metals and titanium alloys on corrosion characteristics. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p. 8738 – 8745. 2007.

SUBEDI, D. P. Contact Angle Measurement for the Surfaces Characterization of Solids. **The Himalayan Physics**, v.II. 2011.

SUH, J.; JANG, B.; ZHUB, X.; ONG, J. L.; KIM, K. Effect of hydrothermally treated anodic oxide films on osteoblast attachment and proliferation. **Biomaterials**, v. 24, p. 347 – 355. 2003.

SUL, Y.; JOHANSSON, C. B.; JEONG, Y.; ALBREKTSSON, T. The electrochemical oxide growth behavior on titanium in acid and alkaline electrolytes. **Medical Engineering & Physics**, v. 23, p. 329 – 346. 2001.

SUL, Y.T.; JOHANSSON, C. B.; WENNERBERG, A.; CHO, L.; CHANG, B.; ALBREKTSSON, T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 3, p. 349 – 359. 2005.

TANG, G.; ZHANG, R.; YAN, Y.; ZHU, Z. Preparation of porous anatase titania film. **Materials Letters**, v. 58, p. 1857 – 1860. 2004.

TRULSON, M. The tooth as a sensor in the masticatory system. **The Journal of the SDA**; 98: 30-38., 2006.

TSUCHIYA, H.; MACAK, J. M.; MÜLLER, L.; KUNZE, J.; MÜLLER, F.; GREIL, P.; VIRTANEN, S.; SCHMUKI, P. Hydroxyapatite growth on anodic TiO₂nanotubes. **Journal of Biomedical Materials Research**, Part A DOI 10.1002/jbm.a, p. 534 – 541. 2005.

UCHIDA, M., KIM, H.; KOKUBO, T.; FUJIBAYASHI, S.; NAKAMURA, T. Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. **Journal of biomedical materials research**. Part A, 64(1), p.164–70. 2002.

VARGHESE, O. K.; GONG, D.; PAULOSE, M.; GRIMES, C. A.; DICKEY, E. C. Crystallization and high-temperature structural stability of titanium oxide nanotube arrays. **Journal of Materials Research**, v. 18, p 156-165. 2003.

VERMILYEA, D. A. Anodic Films. In: *Advances in electrochemistry and electrochemical engineering*. London: Wiley; 1963. P. 248.

VIEIRA, A. C. et al. Influence of pH and corrosion inhibitors on the tribocorrosion of titanium in artificial saliva. **Wear**, v. 261, p. 994 – 1001. 2006.

WILLIAMS, F. D. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, p. 2941 – 2953. 2008.

WILSON, C.J.; CLEGG, R. E.; LEAVESLEY, D. I.; PEARCY, M. J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. **Tissue Engineering**, v. 11, p. 1 – 18. 2005

WOOD, R. J. K. Bio-Tribocorrosion in Biomaterials and Medical Implants. **Woodhead Publishing**, p. 111-129. 2013.

YORIYA, S.; KITTIMETEEWORAKUL, W.; PUNPRASERT, N. Effect of Anodization Parameters on Morphologies of TiO₂ Nanotube Arrays and Their Surface Properties. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 6, p. 686 – 691. 2012.

YOUNG, L.; Anodic Oxide Films. **Academic Press Ltda.**, London, p. 377. 1961.

ZHU, X.; Kim, K.; JEONG, Y. Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial. **Biomaterials**, v. 22, p. 2199 – 2206. 2001.