



Dissertação de Mestrado

Marcus Vinícius Marques Hott

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES FINOS DE TIO₂ MICRO E NANOESTRUTURADOS SOBRE A LIGA TI6AI4V DEPOSITADOS ATRAVÉS DE PROCESSO ELETROQUÍMICO ANÓDICO

Belo Horizonte Julho / 2020 Marcus Vinícius Marques Hott

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES FINOS DE TIO2 MICRO E NANOESTRUTURADOS SOBRE A LIGA TI6AI4V DEPOSITADOS ATRAVÉS DE PROCESSO ELETROQUÍMICO ANÓDICO

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa de Biomateriais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

Belo Horizonte Julho / 2020

Hott, Marcus Vinícius Marques.

H834p Produção e caracterização de filmes finos de TIO2 micro e nanoestruturados sobre a liga TI6AL4V depositados através de processo eletroquímico anódico / Marcus Vinícius Marques Hott. – 2020.

95 f. : il.

Orientador: Sidney Nicodemos da Silva

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2020. Bibliografia.

1. Anodização. 2. Filmes finos. 3. Dióxido de titânio. 4. Nanotubos. 5. Ligas de titânio. I. Silva, Sidney Nicodemos da. II. Título.

CDD: 620.189322

Ficha elaborada pela Biblioteca - Campus I – CEFET-MG Bibliotecário: Wagner Oliveira Braga CRB6 - 3261



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO "PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES FINOS DE TIO₂ MICRO E NANOESTRUTURADOS SOBRE A LIGA TI6AL4V DEPOSITADOS ATRAVÉS DE PROCESSO ELETROQUÍMICO ANÓDICO"

Autor: Marcus Vinicius Marques Hott Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva (ORIENTADOR) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof. Dr. Claudinei Rezende Calado Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof. Dr. Rogério Felício dos Santos Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG

Prof. Dr. Kátia Michelle Freitas

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 27 de Julho de 2020.

Dedico este trabalho à minha esposa Cristiane, à nossa pequena Ana Clara, aos meus pais Júlio e Rosário e aos meus irmãos Stela e Julinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pela oportunidade de realizar os estudos que serão apresentados neste trabalho.

Agradeço muito à minha esposa Cristiane Alda de Matos Hott pelo apoio em minha tomada de decisão para realização deste mestrado e por toda compreensão e carinho durante a jornada no curso, sempre me ajudando nos momentos de dúvidas e incertezas. Também não posso deixar de agradecer à nossa Ana Clara de Matos Hott por toda alegria e leveza que sua chegada nos trouxe.

Agradeço aos meus pais Júlio Antônio Hott e Maria do Rosário Marques Hott pela vida, por me transmitirem todos os valores morais que hoje carrego comigo, e por não medirem esforços ao proverem minha educação ao logo de minha vida. Agradeço muito também aos meus irmãos Stela Cristina Hott Corrêa e Júlio Antônio Marques Hott por todo incentivo que me deram nos estudos até aqui.

O meu muito obrigado também ao meu orientador Professor Sidney Nicodemos da Silva pela confiança, apoio e dedicação em meu processo de aprendizado durante o curso.

À Professora Kátia Michelle Freitas por toda colaboração nos ensaios e caracterizações biológicas, além do incentivo, compreensão e paciência durante todo processo.

Aos Professores Rogério F. Santos, Joel Lima, Leonardo R. Silva e Elaine C. S. Corrêa do DEMAT / CEFET-MG pela ajuda nas atividades de laboratório para preparação e caracterizações dos materiais desta pesquisa. Agradeço também ao Professor Rubens Marcos S. Filho (DEEB / CEFET-MG) pelo empréstimo da fonte de corrente contínua utilizada no processamento dos filmes de TiO₂ deste trabalho.

Aos solícitos colegas e alunos do laboratório de Biomateriais (CEFET-MG): Gabriel, Amanda, Marcelle, Camila, Matheus, Daniel e Leo pelo auxílio durante os ensaios da pesquisa. Ao amigo Marcelo Augusto Brito Madureira pelas dicas e conversas para contribuição e melhorias do trabalho.

Ao Jorge Wanderson Barbosa pela colaboração com as análises no laboratório de caracterização.

Aos técnicos dos laboratórios de química do CEFET-MG pela prontidão em nos ajudar com insumos e materiais para utilização na pesquisa.

Aos Professores João Batista e Tércio Pedrosa do CDTN pelas colaborações prestadas durante a pesquisa. À professora Arieti Righi da UFMG pela prontidão e muito boa vontade em nos ajudar no trabalho.

Ao Professor César Bozzi e sua doutoranda Daniela Bahiense da UFES pelas colaborações na área da tribologia valorizando ainda mais o trabalho.

Por fim, agradeço à CAPES pelo auxílio à pesquisa e ao CEFET-MG pela bolsa de pesquisa, suporte técnico e instrumental que possibilitaram a conclusão dos trabalhos.

Muito obrigado a todos!

"Fé inabalável só o é a que pode encarar frente a frente a razão, em todas as épocas da Humanidade"

Allan Kardec

RESUMO

A literatura tem demonstrado que a interação entre um implante e o tecido ósseo depende de fatores como a morfologia e a composição superficial do dispositivo a ser implantado. Em vista disso, é de extrema importância o estudo e o aprimoramento de técnicas capazes de modificar a superfície dos materiais utilizados como implantes, no sentido de potencializar suas propriedades osteocondutoras e bioativas, melhorando seu desempenho biológico. Neste trabalho, a superfície da liga Ti6Al4V foi modificada através do processo eletroquímico de anodização com o objetivo de alterar a morfologia de sua camada natural de dióxido de titânio (TiO2). Foram produzidos dois tipos de filmes finos distintos de TiO₂, com características microporosas (MP) e nanotubulares (TNT), a fim de serem avaliados morfologicamente, fisicamente e biologicamente. Os MPs foram obtidos a partir da anodização com eletrólito de H₃PO₄ (1,0 mol/L), aplicação de uma diferença de potencial (DDP) de 174 V CC, durante 5 minutos; e os TNTs foram produzidos a partir da anodização com eletrólito de C₆H₈O₇ (0,1 mol/L) + NaF (0,5 %p/p), aplicação de DDP de 20 V CC, durante 90 minutos. A caracterização morfológica e química foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV / EDS), Difração de Raios X (DRX) e Fluorescência de Raios X (FRX). Os MPs obtiveram diâmetro médio aproximado de 0,49 µm, distribuídos aleatoriamente sobre o substrato e os TNTs alcançaram um valor médio de 73 nm em seu diâmetro, auto organizados paralelamente entre si. A camada de TNT se mostrou mais rugosa (0,188 µm) que a MP (0,159 µm). Ambos os filmes obtiveram características hidrofílicas apresentando ângulos de contato entre 36° e 38°. Após o ensaio de SBF (Simulated Body Fluid), foram identificadas deposições de Ca e P sobre os dois filmes, podendo sinalizar formação de apatita na superfície. Os MPs e os TNTs revelaram indícios de não serem citotóxicos ao final dos ensaios de difusão em ágar e macrodiluição com o teste resazurina: a adesão celular, avaliada com cepa bacteriana, se apresentou morfologicamente mais favorável sobre a superfície nanotubular. Por fim, através do ensaio de riscamento, o TNT apresentou uma carga Lc1 na ordem de 6,2 N, se mostrando mais frágil que o MP, com uma carga Lc1 na ordem de 8,3 N.

PALAVRAS-CHAVE: anodização; filmes de TiO₂; microporos; nanotubos; Ti6Al4V.

ABSTRACT

The literature has demonstrated that the interaction between an implant and bone tissue depends on factors such as morphology and surface composition of the device to be implanted. Therefore, it is extremely important to study and improve techniques capable of modifying the surface of materials used as implants, in order to enhance their osteoconductive and bioactive properties, improving their biological performance. In this work, the surface of the Ti6AI4V alloy was modified through the anodic oxidation electrochemical process in order to change the morphology of its natural layer of titanium dioxide (TiO₂). Two different types of TiO₂ films, with microporous (MP) and nanotubular (TNT) characteristics, were produced in order to be evaluated morphologically, physically and biologically. The MP films were obtained from anodizing with H₃PO₄ electrolyte (1.0 mol/L), applying 174 V DC potential, during 5 minutes; and the TNT films were produced from anodizing with C₆H₈O₇ electrolyte (0.1 mol/L) + NaF (0.5% w/w), applying 20 V DC potential, during 90 minutes. The MPs reached an approximately average diameter of 0.49 µm, randomly distributed on the substrate and the TNTs got an average diameter of 73 nm, aligned in parallel to each other. The TNT layer showed to be rougher (0,188 µm) than the MP (0,159 µm). Both films obtained hydrophilic characteristics getting contact angle values between 36° and 38°. After the Simulated Body Fluid (SBF) test, depositions of Ca and P on both films were identified, which may sign the apatite formation on the surface. The MPs and TNTs showed evidence of not being cytotoxic through the agar diffusion and macrodilution assays with the resazurin test; the cell adhesion, evaluated with bacterial strain, was morphologically more favorable on the nanotubular surface. Finally, through the scratch test, TNT layer showed be more fragile, with Lc₁ load close to 6 N, than MP layer with Lc1 load about 8 N.

KEYWORDS: anodizing; micropores; nanotubes; Ti6Al4V; TiO₂ layer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura cristalina do titânio. 26
Figura 2: Imagens de MEV da superfície do Ti submergido em SBF por 3 dias após
tratamento térmico precedido pela exposição em soluções com diferentes valores de
pH31
Figura 3: Célula eletrolítica para anodização do Ti32
Figura 4: Imagens obtidas por MEV de nanotubos de TiO2 formados pelo processo
de anodização em diferentes voltagens35
Figura 5: (a) Formação dos nanotubos de TiO2. (b) Separação dos tubos36
Figura 6: Curva da densidade de corrente em função do tempo
Figura 7: (a) Corrosão na base dos nanotubos por efeito de íons H ⁺ e F ⁻ resultantes
do processo. (b) Afinamento das paredes mais ao topo dos nanotubos por efeito de
tempo prolongado de anodização
Figura 8: Diagrama esquemático da célula eletrolítica utilizada por Sul et al. (2001).
Figura 9: Interface titânio e tecido ósseo. O dióxido de titânio é coberto por uma fina
camada gelatinosa de peróxido de titânio que faz o contato com a estrutura óssea.40
Figura 10: Processo de formação de apatita com tratamento ácido41
Figura 11: Cargas superficiais do TiO2 em função do pH da solução de tratamento.
41
Figura 12: (a) ilustração do ângulo de contato, (b) ilustração da molhabilidade44
Figura 13: Esquema do teste de riscamento
Figura 14: Esquema do dano ao risco progressivo47
Figura 15: Fluxograma de trabalho
Figura 16: Amostras de Ti6Al4V utilizadas como substrato nos ensaios50
Figura 17: Amostra embutida para avaliação da espessura do filme de TiO251
Figura 18: Componentes da cuba eletrolítica52
Figura 19: Montagem da bancada de ensaio com as fontes retificadoras52
Figura 20: Esquema elétrico básico da fonte retificadora de 174 V53
Figura 21: Ilustração esquemática do equipamento de ensaio de riscamento60
Figura 22: (a) difratograma da liga Ti6Al4V, (b) microestrutura da liga Ti6Al4V61

Figura 23: (a) difratograma com recobrimento por filme nanotubular de TiO2, (b)	
difratograma com recobrimento por filme microporoso TiO26	52
Figura 24: Curvas de anodização: (a) nanotubos - TNT, (b) microporos - MP6	63
Figura 25: Curvas de anodização: (a) TNT (ARRUDA, 2018), (b) MP (BONATTO,	
2009)6	53
Figura 26: (a) substrato de Ti6Al4V, (b) disco com filme TNT, (c) disco com filme	
MP6	54
Figura 27: Filme de óxido formado sobre o substrato de Ti6Al4V.	55
Figura 28: (a; b) filme nanotubular (TNT) em MEV e seu respectivo tratamento em	
Image J, (c; d) filme microporoso (MP) e seu respectivo tratamento em Image J6	6
Figura 29: Morfologia dos nanotubos6	57
Figura 30: Morfologia dos microporos6	57
Figura 31: Ângulo de contato: (a) substrato Ti6Al4V, (b) filme de TNT, (c) filme de	
MP6	;9
Figura 32: (a) filme MP do presente trabalho, (b) filme MP produzido por Wang7	0
Figura 33: Amostras: (a) substrato de Ti6Al4V, (b) amostra com TNT, (c) amostra	
com MP7	'2
Figura 34: Deposição de P e Ca após ensaio de SBF7	'3
Figura 35: Evolução da deposição de Ca e P sobre o substrato e os filmes de TNT	е
MP7	'4
Figura 36: Ensaio disco-difusão em ágar: (a) Escherichia coli com antibiótico	
ampicilina, (b) Staphylococcus aureus com antibiótico tetraciclina7	'5
Figura 37: Viabilidade celular: (a) Escherichia coli, (b) Staphylococcus aureus7	'6
Figura 38: Adesão celular: (a) substrato sem micro, (b) substrato com micro, (c) MF	>
com micro, (d) TNT com micro7	7
Figura 39: Trincas conformais nos revestimentos de TiO2: (a) nanotubular, (b)	
microporoso7	'8
Figura 40: Exemplo de trinca conformal: (a) desenho esquemático, (b) imagem de	
MEV7	'9
Figura 41: Ensaio de riscamento: (a) carga crítica TNT, (b) carga crítica MP, (c)	
distância da carga crítica TNT, (d) distância da carga crítica MP8	30

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AISI American Iron and Steel Institute
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASTM American Society for Testing and Materials
- CCC Estrutura cúbica de corpo centrado
- CDTN Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
- CEFET-MG Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais
- DEEB Departamento de Eletrônica e Biomédica do CEFET-MG
- DRX Difração de Raios X
- EDS Electron Diffraction Spectroscopy (Espectroscopia de Energia Dispersiva)
- ELI Extra Low Interstitial (Intersticiais Extra Baixos)
- FRX Fluorescência de Raios X
- HC Estrutura hexagonal compacta
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ISO International Organization for Standardization
- IOF International Osteoporosis Foundation
- LCSM Laboratório de Caracterização de Superfícies de Materiais
- MAO Micro-arc Oxidation (Oxidação a micro-arco)
- MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
- MP Filmes Microporosos
- ONU Organização das Nações Unidas
- OPAS Organização Pan-Americana da Saúde
- PAHO Pan American Health Organization
- PDF Ficha cristalográfica (Powder Diffraction File)
- POSMAT Departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-

MG

- SBF Simulated Body Fluid (Fluído Corporal Simulado)
- TNT Filmes Nanotubulares
- UFC Unidade Formadora de Colônia
- UFES Universidade Federal do Espírito Santo
- UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

- % m/m Percentual massa/massa
- % p/v Percentual peso/volume
- n_i Número de moles da espécie *i*
- γ_{LV} Energia ou tensão interfacial entre o líquido e o vapor
- γ_{SL} Energia ou tensão interfacial entre o sólido e o líquido
- γ_{SV} Energia ou tensão interfacial entre o sólido e o vapor
- μ_i Potencial químico da espécie *i*
- °C Unidade de temperatura graus Celsius
- µF Unidade de capacitância microfarad
- µg/ml Unidade de densidade microgramas por mililitro
- µI Unidade de volume microlitro
- µm Unidade de comprimento micrômetro
- A Unidade de corrente elétrica Ampère
- AE Acoustic Emission
- Ag Elemento químico prata
- Al Elemento químico alumínio
- An Anatásio
- C Elemento químico carbono
- C₆H₈O₇ Ácido cítrico
- Ca Elemento químico cálcio
- Ca²⁺ Íon de cálcio
- Ca₃(PO₄)₂ Fosfato de cálcio

Ca₅(PO₄)₃(OH) – Hidroxiapatita

- CH₃COOH Ácido acético ou ácido etanoico
- D Distância percorrida
- F Elemento químico flúor
- F⁻ Íon de flúor
- Fe Elemento químico ferro
- F_N Carga normal
- Ft Força tangencial
- G Energia Livre de Gibbs

- g Unidade de massa gramas
- GPa Unidade de pressão ou tensão giga Pascal
- H Elemento químico hidrogênio
- H⁺ Íon de hidrogênio
- H₂O Água
- H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄ Ácido sulfúrico
- H₃PO₄ Ácido fosfórico
- HA Hidroxiapatita
- HF Ácido fluorídrico
- HNO3 Ácido nítrico
- Hz Unidade de frequência Hertz
- kV Unidade de tensão elétrica quilovolts
- kΩ Unidade de resistência elétrica quilo-ômio
- Lc Carga crítica do ensaio de riscamento (Lc1, Lc2, Lc3)
- mA Unidade de corrente elétrica miliampère
- mA/cm² Unidade de densidade de corrente miliampère por centímetro quadrado
- ml Unidade de volume mililitros
- mm Unidade de comprimento milímetro
- mm/s Unidade de velocidade milímetros por segundo
- mN Unidade de força milinewton
- mol/I Unidade de concentração mol por litro
- MPa Unidade de pressão ou tensão megapascal
- ms Unidade de tempo milissegundos
- N Elemento químico nitrogênio
- N Unidade de força Newton
- N/s Unidade de taxa de carregamento Newton por segundo
- Na Elemento químico sódio
- Na⁺ Íon de sódio
- Na₂SO₄ Sulfato de sódio
- NaCI Cloreto de sódio
- NaF Fluoreto de sódio
- NaOH Hidróxido de sódio

- Nb Elemento químico nióbio
- nm Unidade de comprimento nanômetro
- O Elemento químico oxigênio
- OH- Grupo funcional hidroxila
- P Elemento químico fósforo
- pH Potencial hidrogeniônico
- PO43- Íon fosfato
- Pt Elemento químico platina
- R Rutilo
- Ra Rugosidade média
- rpm Unidade de rotações por minuto
- s Unidade de tempo segundos
- Ta Elemento químico tântalo
- Ti Elemento químico titânio
- Ti35Nb7Zr5Ta Liga de titânio com 35% de nióbio, 7% de zircônio e 5% de tântalo
- Ti5Al2,5Fe Liga de titânio com 5% de alumínio e 2,5% de ferro
- Ti6Al4V Liga de titânio com 6% de alumínio e 4% de vanádio
- Ti6Al7Nb Liga de titânio com 6% de alumínio e 7% de nióbio
- Ticp Titânio comercialmente puro
- TiO₂ Dióxido de titânio
- V Elemento químico vanádio
- V Unidade de tensão elétrica Volts
- V Velocidade
- W Unidade de potência elétrica Watts
- α Alfa (fase hexagonal compacta do titânio)
- β Beta (fase cúbica de corpo centrado do titânio)
- γ Tensão superficial
- θ Ângulo de contato entre a superfície e o líquido.

SUMÁRIO

1	. IN1	ſRODUÇÃO	19
2	. JU	STIFICATIVA E RELEVÂNCIA	22
3	. OE	JETIVOS	23
	3.1.	Objetivo geral	23
	3.2.	Objetivos específicos	23
4	. RE	VISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
	4.1.	Titânio como biomaterial	25
	4.2.	Oxidação anódica	31
	4.3.	Bioatividade nos filmes de TiO2	
	4.4.	Ensaio de riscamento (Scratch Test)	46
5	. MA	TERIAIS E MÉTODOS	49
	5.1.	Processo de trabalho	49
	5.2.	Materiais e sua preparação	50
	5.3.	Confecção do sistema de anodização	51
	5.4.	Parâmetros do processamento eletroquímico para os filmes de TiO2	53
	5.5.	Caracterizações físico-química e estrutural	54
	5.5.1	. Caracterização química elementar e identificação das fases	54
	5.5.2	. Caracterização morfológica e estrutural	54
	5.5.3	. Avaliação da rugosidade	55
	5.5.4	. Avaliação da molhabilidade	55
	5.6.	Ensaios e caracterizações biológicas dos filmes de TiO2	56
	5.6.1	. Ensaio de SBF (Simulated Body Fluid)	56
	5.6.2	. Avaliação da citotoxicidade	57
	5.6.3	. Avaliação da adesão bacteriana	58
	5.7.	Ensaio de riscamento (Scratch Test)	59
6	. RE	SULTADOS E DISCUSSÃO	61
	6.1.	Caracterização físico-química do substrato (Ti6Al4V) e dos filmes de T	⁻ iO ₂ 61
	6.2.	Morfologia dos filmes nanotubulares e microporosos de TiO2	64
	6.3.	Rugosidade dos filmes de TiO ₂	68
	6.4.	Molhabilidade do substrato e dos filmes de TiO2	68
	6.5.	Ensaio de SBF	71

8	. SU	GESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
•	. 00	~	00
7	00	NCLUSÕES	83
	6.8.	Ensaio de riscamento (scratch test) sobre os filmes de TiO2	77
	6.7.	Avaliação da adesão celular sobre o substrato e os filmes de TiO2	76
	6.6.	Avaliação da citotoxicidade sobre o substrato e os filmes de TiO2	74

1. INTRODUÇÃO

Recentemente, ao redor do mundo, a literatura tem revelado o grande interesse de pesquisadores pelo estudo e o aprimoramento de técnicas de processamento capazes de modificar a superfície dos materiais utilizados como implantes ósseos. O objetivo principal dessas técnicas visa potencializar suas propriedades mecânicas (adesão de filmes superficiais e sua resistência ao desgaste) e suas propriedades biológicas (bioatividade e osteocondução), reforçando a ideia de que a interação entre um implante e o tecido ósseo depende de fatores como a morfologia e a composição superficial do dispositivo a ser implantado (CHEN *et al.*, 2017; CAO *et al.*, 2018).

As principais razões para o uso de próteses e implantes na substituição óssea estão associadas as doenças degenerativas relativas ao envelhecimento (artroses e artrites), alterações metabólicas (osteoporose) e a obesidade, bem como os traumas relacionados as práticas do desporto, aos acidentes de trabalho e/ou em vias públicas, como por exemplo de trânsito (WHO, 2018; IOF, 2017). No Brasil, estudos relacionados ao perfil de longevidade, conduzidos pelo IBGE (2018), mostram que a expectativa de vida da população brasileira em 2017 era de 76 anos, e que ela vem aumentando desde 1940, cerca de 67%. Nas Américas esses valores alcançaram 75 anos de expectativa com um aumento médio de 27% nos últimos 45 anos (PAHO, 2017). De acordo com a ONU (2016), somente entre os anos 2000 a 2015, a população mundial passou a viver 5 anos a mais. Em países como Coreia do Sul, pesquisas revelam que mulheres nascidas em 2030 irão superar os 90 anos de idade e homens passarão dos 84 anos (WIGHTON, 2017).

A osteoporose, por exemplo, é responsável por 8,9 milhões de fraturas por ano no mundo (IOF, 2017). Já a obesidade, em pouco mais de 40 anos, aumentou cerca de 6,7 vezes atingindo mais de 670 milhões de adultos ao redor do mundo em 2016 (OPAS BRASIL, 2017). No Brasil, 18,9% da população já era considerada obesa em 2017 (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2018). Com relação aos acidentes de trânsito, estima-se que mundialmente 40 a 50 milhões de pessoas sofram traumatismos não letais nessas ocorrências (WHO, 2018). Um estudo com cerca de 380 motociclistas

vitimados no Brasil mostra que 75,5% das lesões acometem os membros inferiores, das quais 95,4% necessitam de tratamento cirúrgico (MIZIARA *et al.*, 2014). Para atenuar estes dados estatísticos a ONU proclamou o período de 2011-2020 como sendo o "Decênio das ações para segurança no trânsito" (WHO, 2018).

Dentre as classes de materiais estudadas na bioengenharia para aplicações na reconstituição e ou substituição óssea, os metais são os mais frequentemente utilizados, sendo o titânio e suas ligas uma das alternativas mais eficazes para esse propósito. Seu primeiro êxito como biomaterial está na sua elevada relação resistência-peso, que aliada ao baixo módulo de elasticidade, proporciona uma melhor transferência de cargas mecânicas entre implante e osso (TADDEI *et al.*, 2007; GOMES, 2010). E sua segunda característica, não menos importante, é a resistência à corrosão impulsionada por uma fina camada de dióxido de titânio (TiO₂) naturalmente passivada sobre sua superfície (LIU; CHU; DING, 2004). Isso o coloca na classe dos materiais bioinertes, e consequentemente biocompatíveis (MÄNDL; RAUSCHENBACH, 2002). O grande trunfo das pesquisas então passa a ser a promoção da bioatividade na superfície do titânio através de tratamentos superficiais como a oxidação anódica.

A engenharia de superfícies é uma subárea do conhecimento que, quando vinculada ao desenvolvimento de biomateriais, busca otimizar a topografia (rugosidade), porosidade, adesão do filme ao substrato e, sobretudo, a nanoestrutura das superfícies para uma melhor interface com os sistemas biológicos (FERNANDES, 2007). Dessa forma, se tratando de uma técnica bastante antiga, a oxidação anódica é um dos melhores meios para se produzir ou aprimorar uma camada pura de óxido superficial, a qual suas características podem ser reguladas controlando-se os parâmetros físico-químicos do processo. Através dessa técnica, pode-se modificar físico-químicamente a superfície dos implantes à base de titânio, mesmo que esses tenham geometria irregular (XIE *et al.*, 2012), com o intuito de se alcançar a bioatividade, e consequente osteointegração desse material (LIU; CHU; DING, 2004; YANG *et al.*, 2004).

A grande maioria dos implantes apresentam suas falhas iniciadas na superfície do material, seja por desgaste, fadiga de contato ou corrosão (GONÇALVES, 2012). A biotribologia é definida como sendo a ciência e tecnologia que estuda a interação entre as superfícies dos biomateriais com o meio fisiológico considerando movimento relativo entre ambos, bem como assuntos ou práticas a ela correlacionadas, tais como o atrito, lubrificação, desgaste e adesão de filmes superfíciais (FERNANDES, 2007).

O ponto crucial relacionado ao desgaste nos biomateriais é que, em meio fisiológico, os detritos desse processo consistem, em grande parte, de óxidos existentes em sua superfície e que foram removidos através de falhas coesivas e ou adesivas. Essa remoção pode levar ao afrouxamento prematuro de implantes ou próteses, bem como provocar a liberação de íons metálicos do substrato potencialmente tóxicos (SÁENZ, 2013). Sendo assim, uma forma de avaliar a adesão dos filmes de TiO₂ produzidos sobre o substrato da liga Ti6Al4V é através do ensaio de riscamento desenvolvido no início dos anos 1950 e aprimorado nas décadas de 1960 e 1970 (ALVES, 2010). Esse método permite determinar a força de adesão prática e os modos de falhas mecânicas de filmes cerâmicos finos (\leq 30 µm) sobre substratos metálicos à temperatura ambiente (ASTM, 2015).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas várias técnicas para melhorar a bioatividade e consequente fixação dos implantes à matriz óssea. Com a técnica plasma spray, por exemplo, o pó de do material a ser depositado (hidroxiapatita e/ou TiO₂) é fundido e pulverizado a altas temperaturas e velocidades sobre o substrato. Contudo, essa técnica não permite a utilização de substratos sensíveis ao calor, além de ter um custo relativamente elevado quando comparada à anodização. Outro método encontrado na literatura é a deposição de hidroxiapatita ou vidro bioativo através do processo sol-gel (POURHASHEM; AFSHAR, 2014). A grande questão nesse caso, é a incompatibilidade mecânica entre o revestimento cerâmico e o substrato formado pela liga de metal. Essa incompatibilidade pode causar baixa adesão entre ambos, gerar trincas no revestimento e levar ao desprendimento da prótese (HWANG et al., 2003). Um terceiro método se faz através da utilização de solução simuladora de fluído corporal (SBF - Simulated Body Fluid). Também conhecido como método biomimético, o substrato é introduzido nessa solução e mantido por vários dias submerso até que haja formação de hidroxiapatita sobre o mesmo. Sua grande desvantagem é o elevado tempo para deposição e a incerteza quanto à camada final depositada devido à metaestabilidade da própria solução (PRADO, 2019).

Por outro lado, a produção de filmes de dióxido de titânio (TiO₂) através do tratamento eletroquímico anódico se mostra bastante eficaz no sentido em que esse processo é capaz de potencializar uma camada de óxido que já é naturalmente passivada sobre os substratos formados pelo titânio e suas ligas, tornando-a mais espessa, porosa, rugosa e, principalmente, bioativa (LIU; CHU; DING, 2004; YANG *et al.*, 2004). Além disso, com uma mesma técnica é possível de se obter camadas com diferentes características morfológicas. A relevância do presente trabalho encontra-se na produção e estudo de filmes microporosos e nanotubulares de TiO₂ através dessa técnica aplicada sobre a liga Ti6Al4V. Ambos os filmes possuem grande potencial na osteointegração, aumentando significativamente a área superficial do implante, o que acaba promovendo a adesão e proliferação celular (PISZCZEK *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar parâmetros de processamento eletroquímico anódico para obtenção de filmes finos de dióxido de titânio (TiO₂) sobre a liga Ti6Al4V (ASTM F136), e caracterizar as alterações promovidas na estrutura da camada produzida, avaliando aspectos físico-químicos, morfológicos e biológicos, visando potenciais aplicações biomédicas.

3.2. Objetivos específicos

- Produzir por técnica eletroquímica anódica filmes microporosos (MP) e nanotubulares (TNT) de TiO₂ sobre a superfície do substrato (liga Ti6Al4V), seguindo parâmetros referenciados na literatura;
- Caracterizar físico-quimicamente o substrato e os filmes formados;
 - Verificar a composição química do substrato e dos filmes através de Fluorescência de Raios X (FRX) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) acoplada ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV);
 - ✓ Identificar as fases do substrato e dos filmes através de Difração de Raios X (DRX);
- Caracterizar morfologicamente o substrato e ambos os filmes formados;
 - Avaliar a forma, distribuição, tamanho e espessura dos filmes através de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV);
 - Medir a rugosidade do substrato e dos filmes produzidos com auxílio de rugosímetro;
 - Avaliar a molhabilidade do substrato e dos filmes produzidos através da medição do ângulo de contato;
- Caracterizar biologicamente o substrato e ambos os filmes formados;

- Realizar ensaio em fluído corporal simulado (SBF Simulated Body Fluid) para verificação da bioatividade sobre o substrato e sobre os filmes produzidos.
- ✓ Realizar ensaios de disco-difusão em ágar e teste de macrodiluição, utilizando-se de duas cepas bacterianas (*E. coli* e *S. aureus*) para avaliação da citotoxicidade dos filmes formados.
- Realizar ensaio de adesão bacteriana com a cepa *E. coli* para verificar sua adesão e colonização sobre o substrato e sobre os filmes processados.
- Realizar ensaio de riscamento (*scratch test*), para avaliação da adesão dos filmes produzidos sobre o substrato da liga.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Titânio como biomaterial

Aplicado já há bastante tempo na área militar e aeroespacial, o titânio se tornou um biomaterial devido à sua excelente capacidade para o trabalho em ambientes corrosivos, associado à sua baixa densidade, ou seja, alta relação resistência-peso, além de possuir propriedades não-magnéticas. Outro grande atrativo desse material para aplicações biomédicas é o seu baixo módulo de elasticidade que varia entre 100 GPa e 110 GPa, dependendo da liga. Isso resulta numa flexibilidade duas vezes maior e resistência à fadiga cerca de 30% maior, ambos comparados ao aço inox (GOMES, 2010).

A questão mais importante referente ao módulo de elasticidade do titânio está relacionada ao fenômeno conhecido como stress shielding. Esse fenômeno, também conhecido como blindagem do osso, está associado à diminuição da capacidade do mesmo em suportar cargas devido à grande diferença entre o módulo de elasticidade do material do implante e do tecido ósseo. Devido à essa diferença, as cargas passam a ser sustentadas mais pelo dispositivo implantado, que geralmente apresenta um módulo de elasticidade maior, do que pela estrutura óssea em si, em função da distribuição dos esforços entre eles. Dessa forma, com essa estrutura diminuindo sua atividade, ocorre uma remodelação óssea no sentido de diminuir sua massa, o que pode levar à osteoporose e também à diminuição do tempo de utilização do implante (MONNERAT; LIMA; ALIAGA, 2016). Alguns estudos verificaram que a adição de nióbio (Nb) e tântalo (Ta) às ligas de titânio provocou uma queda mais acentuada em seu módulo de elasticidade, reduzindo esse valor para 55 GPa em média, diminuindo essa diferença entre o módulo do implante e da estrutura óssea, isso sem perda das propriedades mecânicas após o endurecimento por envelhecimento (TADDEI et al., 2007) (Tabela 1).

Material	Módulo de Elasticidade [GPa]	Resistência à Tração [MPa]	Resistência ao Escoamento [MPa]		
Osso Cortical	15	100	80		
Osso Esponjoso	1	2	-		
Aço 316L (recozido)	200	> 500	>200		
Ti6Al4V	100	900	800		
Ti35Nb7Zr5Ta	55	≈ 800	≈ 800		

Tabela 1: Propriedades mecânicas do osso e das ligas aplicáveis às próteses.

Fonte: adaptado de Taddei et al. (2007) e Gomes (2010).

O titânio possui dois tipos de estrutura cristalina. A primeira se apresenta através de uma rede hexagonal compacta (HC), conhecida como fase alfa (α) que se mantém até 885 °C. A outra, denominada fase beta (β), possui uma rede cristalina cúbica de corpo centrado (CCC) que se mantém entre 885 °C e 1670 °C (Fig. 1). A temperatura a qual as fases α e β se apresentam pode ser alterada adicionando-se elementos de liga ao titânio puro. Esses elementos podem ser divididos em alfa-estabilizadores, beta-estabilizadores e neutros. A adição desses elementos de liga promove o surgimento de uma terceira estrutura conhecida como alfa-beta (α + β) em que as fases α e β coexistem no material (FROES, 2015).



Fonte: adaptado de Froes (2015).

As ligas α não são tratáveis e geralmente são soldáveis. Possuem ótima resistência à fluência e à oxidação em elevadas temperaturas. Como exemplo de alfaestabilizadores tem-se: o alumínio, nitrogênio e o carbono. As ligas α + β (Ti grau 5) são as mais comuns e em maior número entre as ligas de titânio. Tais ligas, além de soldáveis, são tratáveis termicamente. Geralmente são adequadas para conformação a quente, contudo a resistência à fluência em altas temperaturas não é tão boa. Por fim, as ligas β respondem bem a tratamentos térmicos e ao trabalho a frio. São ligas soldáveis e sua resistência à fluência é boa em médias temperaturas. São exemplos de beta-estabilizadores: vanádio, nióbio, tântalo, níquel e cromo, entre outros. Os elementos neutros, como o zircônio e háfnio, são usados para reduzir a temperatura de transição β e garantir a presença dessa fase à temperatura ambiente em uma ampla faixa de composição (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006; OSHIDA, 2007).

Há ainda o titânio comercialmente puro (Ticp) que apresenta uma elevada biocompatibilidade, porém suas propriedades mecânicas não são ideais para aplicações protéticas (MONNERAT; LIMA; ALIAGA, 2016). O Ticp é dividido em quatro graus de pureza de acordo com o percentual dos elementos utilizados em sua composição química. A Tabela 2 mostra o percentual limite para cada elemento químico utilizado na produção do titânio puro (ASTM-F67, 2017).

Elemento	Grau 1 UNS R50250	Grau 2 Grau 3 UNS R50400 UNS R50550		Grau 4 UNS R50700			
N [máx.]	0,030	0,030	0,050	0,050			
C [máx.]	0,080	0,080	0,080	0,080			
H [máx.] ^A	0,015	0,015	0,015	0,015			
Fe [máx.]	0,200	0,300	0,300	0,500			
O [máx.]	0,180	0,250	0,350	0,400			
Ті		Bala	anço				

Tabela 2: Composição química do Ticp em %m/m.

^A O percentual máximo de hidrogênio para o Ti em tarugo é 0,010 %m/m

Fonte: adaptado de ASTM F67-13 (2017).

De acordo com Monnerat *et al.* (2016), a biocompatibilidade das ligas de titânio pode ser ligeiramente menor em relação ao Ticp, mas suas propriedades mecânicas para

aplicações protéticas se tornam superiores quando também comparadas ao Ticp. Dentre as ligas mais utilizadas em aplicações biomédicas destaca-se a liga α + β Ti6Al4V com 6% de alumínio e 4% de vanádio, ambos em peso. A Tabela 3 apresenta a composição química com o percentual de cada elemento utilizado na produção dessa liga. O percentual de Ti é determinado pela diferença com os outros elementos e não é necessário ser certificado (ASTM-F136, 2015).

Tabela 3: Composição química da liga Ti6Al4V.

Elemento	N [máx.]	C [máx.]	H [máx.]	Fe [máx.]	O [máx.]	Al	V	Ti
Composição [% m/m]	0,050	0,080	0,012	0,250	0,130	5,5 a 6,5	3,5 a 4,5	Balanço
Fonte: adaptado de ASTM E136-13 (2015)								

Fonte: adaptado de ASTM F136-13 (2015).

Apesar de bastante utilizada, a liga Ti6Al4V pode apresentar problemas de toxicidade devido à formação do óxido de vanádio em sua superfície. Estudos indicam que esse óxido, quando presente no organismo, pode afetar o sistema respiratório e comprometer o funcionamento dos pulmões (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006). Como resultado de pesquisas para o desenvolvimento de uma liga livre de vanádio, obtiveram-se outras alternativas com a substituição do mesmo por nióbio ou ferro (Ti6Al7Nb; Ti5Al2,5Fe) (LÜTJERING; WILLIAMS, 2007). A liga contendo nióbio, quando comparada à liga contendo vanádio, apresenta uma melhor resposta celular provavelmente devido à toxicidade reduzida do nióbio. Estudos de Challa *et al.* (2013), comprovaram esses resultados através de ensaios de viabilidade, proliferação e morfologia celular. Outra forma de contornar a toxicidade relativa ao vanádio é evitar a sua exposição direta nas superfícies da liga através de tratamentos superficiais como a própria oxidação anódica que será apresentada no próximo tópico.

Aliada à questão da toxicidade das ligas de titânio, existe também um outro ponto a ser melhorado nesse material, a baixa resistência ao desgaste. Essa característica indesejada acaba por liberar fragmentos e íons causando reações alérgicas e inflamatórias que podem levar à necessidade de substituição da prótese no futuro. A quantidade de íons liberados de um implante que é ligado ao osso é muito maior que a quantidade de íons metálicos liberados de um implante ligado separadamente a um

músculo. Isso indica que atrito e desgaste entre osso e implante pode destruir a camada de TiO₂ formada na superfície da liga (HANAWA, 1999).

Dentre as diversas ligas possíveis de titânio, há uma característica que pode ser considerada transversal a todas elas: a elevada resistência à corrosão. Essa propriedade se deve principalmente à camada de passivação, constituída pelo dióxido de titânio (TiO₂), formada sobre sua superfície. Esse filme fino de óxido, em escala nanométrica, cristalina ou amorfa, previne que o material subjacente sofra ataques corrosivos (SILVA, 2017). Quando o filme de óxido é danificado, a liberação de íons metálicos continua e a corrosão prossegue até a regeneração completa desse filme novamente (HANAWA, 2004), contudo num tempo bastante inferior guando comparado ao aço inox. Por ser uma camada termodinamicamente estável, com energia de formação bastante negativa, seu tempo de repassivação chega a atingir valores na ordem de 45 ms para a liga Ti6Al4V, enquanto que no aco inox AISI 316L essa repassivação ocorre em tempo superior a 6000 ms. Tanto o potencial de corrosão do Ti (2,4 V), quanto o da liga Ti6Al4V (2,0 V) estão acima do potencial dos fluidos corporais (cerca de 0,4 V). Em se tratando de um biomaterial, isso é uma condição favorável, pois evita a penetração da camada de passivação no interior do corpo (MÄNDL; RAUSCHENBACH, 2002).

Devido à sua composição e energia de superfície a camada de óxido superficial formada sobre a liga de titânio o torna um material biocompatível, com potencial que o possibilita ser osteocondutor. Sua estabilidade química evita a formação de tecido fibroso ao redor do implante e possibilita o contato direto com o tecido ósseo (DE JONGE *et al.*, 2008), ou caso haja o encapsulamento por tecidos fibrosos, esse será muito fino, permitindo que os tecidos ósseos se recuperem e se desenvolvam bastante próximos ao metal (LIU; CHU; DING, 2004). É essa estabilidade química do filme de óxido que deixa a superfície do titânio pouco reativa (RUIZ, 2015), o que o caracteriza como um material bioinerte.

Sendo assim, a bioatividade superficial dos implantes à base de titânio deve ser estimulada a fim de que a biofixação do dispositivo seja promovida num ambiente já

favorável físico-quimicamente, chegando à osteointegração almejada (DOS SANTOS, 2013; CHALLA, 2013).

Uma forma de promover a bioatividade das ligas de titânio é através da deposição superficial de materiais bioativos capazes de interagir com o tecido ósseo. Por exemplo, a aplicação de íons de fósforo e cálcio sobre a superfície do titânio. Esses compostos compõem a estrutura óssea do corpo humano e a adição dos mesmos sobre as superfícies dos implantes induzem a bioatividade proporcionando uma adesão mais rápida entre o osso e a prótese (DE LIMA *et al.*, 2016). Outro exemplo de material bioativo são os vidros bioativos que podem ser depositados sobre o substrato metálico através da técnica de *dip coating* em um meio aquoso (sol-gel). Após implantado no paciente, o vidro bioativo estimulará a produção de hidroxiapatita (HA) aderida sobre o implante, além de ser uma proteção a mais contra corrosão (POURHASHEM; AFSHAR, 2014; GONZALEZ GALDOS *et al.*, 2017). No entanto, a diferença no comportamento mecânico entre o substrato metálico e as características do revestimento cerâmico (elevado módulo de elasticidade e baixa tenacidade à fratura) pode causar baixa adesão entre ambos, gerar trincas no próprio revestimento e levar ao desprendimento da prótese (HWANG *et al.*, 2003).

Estudos recentes sobre tratamentos superficiais nas ligas de titânio, revelaram que a produção de um recobrimento de nanotubos de dióxido de titânio sobre a superfície do titânio metálico através do processo de anodização melhora substancialmente sua bioatividade (PISZCZEK *et al.*, 2017; LEWANDOWSKA *et al.*, 2015). E aliado a esse recobrimento, há a possibilidade de dopá-lo com nanopartículas de prata e manganês com a finalidade de melhorar a biocompatibilidade e a proliferação celular, respectivamente (HUANG *et al.*, 2018). Além dos nanotubos, encontra-se também na literatura a produção de recobrimentos de nanofibras e nanofios de TiO₂ produzidos a partir dos métodos de eletrofiação, ablação a laser e oxidação anódica com a mesma finalidade de se obter uma superfície bioativa sobre substrato de titânio (RADTKE *et al.*, 2017).

Liu *et al.* (2004) também apresenta em seus estudos que é possível de se nuclear hidroxiapatita diretamente sobre o titânio sem a necessidade de adicionar materiais bioativos sobre o mesmo. Recentemente, algumas pesquisas demonstraram formação de apatita sobre a superfície do titânio após a imersão do mesmo em soluções com diferentes níveis de pH, seguido de tratamento térmico em solução de NaCl e posterior imersão em SBF (Fig. 2). Ao se medir o potencial Zeta na superfície do titânio, submetido a esse procedimento, constatou-se um alto potencial positivo ou negativo após a exposição a soluções fortemente ácidas ou fortemente alcalinas, respectivamente. O estudo indicou que a formação de apatita na superfície do metal estava fortemente relacionada à carga superficial obtida após o procedimento (KOKUBO; YAMAGUCHI, 2015).



Fonte: Kokubo et al. (2015).

Como já descrito anteriormente, a oxidação anódica é uma das formas de se conseguir uma estrutura bioativa na superfície do titânio e suas ligas. A intenção desse método é conseguir um filme de dióxido de titânio mais espesso, rugoso, poroso e com energia de superfície ideal para promoção dessa bioatividade.

4.2. Oxidação anódica

Se tratando de um recurso bastante antigo, a oxidação anódica, também conhecida simplesmente como anodização ou passivação imposta é um dos melhores meios para se produzir uma camada pura de óxido, a qual suas características podem ser reguladas controlando-se os parâmetros físico-químicos do processo. Em outras palavras é a conversão da superfície do metal em seu próprio óxido através de um processo eletrolítico em que o ânodo é a superfície da peça a ser passivada (SILVA, 1981).

Com esse processo pode-se conseguir na superfície do material, no caso de nosso estudo a liga Ti6Al4V, uma camada protetora mais aderida ao substrato e com maior espessura, o que aumenta a resistência à corrosão. Outro ganho no material é o aumento de sua porosidade e a capacidade de torna-lo bioativo (SILVA, 2017). A Figura 3 a seguir mostra o esquema de uma célula eletrolítica para anodização do titânio e suas ligas.



Figura 3: Célula eletrolítica para anodização do Ti.

Fonte: adaptado de Silva (2017).

Normalmente é utilizada a platina (Pt) como cátodo, uma vez que na série galvânica ela se encontra em extremidade mais catódica que o titânio (Ti), porém não é impeditivo o uso de outros materiais como por exemplo o aço inoxidável, visto que o processo é executado por uma diferença de potencial imposta por uma fonte retificadora de corrente contínua. O material que se deseja anodizar, no caso o titânio, é o ânodo. E pode-se usar ainda um terceiro eletrodo de referência, normalmente de prata (Ag) (SILVA, 1981; WEBSTER; YAO, 2016). No cátodo ocorre a reação de redução e no ânodo ocorre a reação de oxidação. Ambos são imersos em uma

solução eletrolítica (eletrólito), que é usualmente um ácido ou um sal, e conectados a uma fonte de energia elétrica de corrente contínua que realiza o trabalho da reação química. Esse processo de oxidação pode ocorrer de dois modos na célula eletrolítica. Quando ocorre através de uma densidade de corrente constante diz-se que o modo é galvanostático. E quando acontece sob diferença de potencial constante se trata do modo potenciostático (SILVA, 2017).

Diversos parâmetros devem ser considerados no processo de formação da camada anodizada de dióxido de titânio. Dentre eles são estudados o tipo, concentração e agitação do eletrólito, nível de tensão aplicada, o tempo e temperatura de reação (SOUZA, 2010).

Dentre os eletrólitos utilizados podem ser encontrados na literatura o ácido sulfúrico (H₂SO₄) e o sulfato de sódio (Na₂SO₄), que promovem filmes de TiO₂ em fase cristalina. Já filmes anodizados em fase amorfa podem ser obtidos com a utilização ácido fosfórico (H₃PO₄), e ácido acético (CH₃COOH) (CUI et al., 2009). Ainda de acordo com Cui et al. (2009), titânio com filmes superficiais cristalinos apresentam melhores condições para formação de apatita do que filmes superficiais amorfos após ficarem submersos em SBF. Uma forma de reverter esse filme amorfo numa estrutura cristalina como o rutilo e/ou anatásio é realizando-se um tratamento térmico após a oxidação anódica (CUI et al., 2008). O tratamento térmico utilizado normalmente é o recozimento. A temperatura é elevada em uma taxa de 5 °C/min até temperaturas entre 400 °C e 600 °C, mantido por 1 hora e posteriormente resfriado lentamente (CUI et al., 2008; PATTANAYAK et al., 2012; DE LIMA et al., 2016). Os eletrólitos alcalinos também são apresentados na literatura. Alguns estudos com hidróxido de sódio (NaOH) mostram resultados positivos com relação à formação de apatita na superfície do substrato, principalmente devido à formação dos grupos Ti-OH, precursores no desenvolvimento do fosfato de cálcio (ZHANG et al., 2013). A concentração molar desses eletrólitos também deve ser avaliada. O tempo para formação de apatita no titânio anodizado é menor ao se utilizar eletrólitos com concentração molar maior (YANG et al., 2004). A espessura do filme de óxido formado também se torna maior sob maiores concentrações do eletrólito. E esse é um dos fatores que mais influenciam nessa grandeza (SILVA, 2017).

Outro ponto importante no processo de oxidação anódica é a diferença de potencial aplicada entre os eletrodos. De acordo com Souza (2010), o filme de TiO₂ será bioativo somente se formado sob regime de ruptura dielétrica. A espessura final da camada de dióxido depende quase que linearmente da tensão aplicada (LIU; CHU; DING, 2004). A espessura da camada do dióxido formado naturalmente sobre o titânio varia em torno de 1,5 nm a 10 nm. Após a oxidação anódica sob tensão de 250 V é possível verificar uma espessura de 1,7 μ m (KUROMOTO; SIMÃO; SOARES, 2007). Silva (2017) verificou uma espessura de até 2,5 μ m após anodização sob tensão de 170 V. Acima do limite de ruptura dielétrica, a resistência à passagem de corrente do óxido cai drasticamente, permitindo a passagem de corrente elétrica. Há ainda a ocorrência de centelhas, o que favorece a formação de um filme de óxido mais poroso. De acordo com Yang *et al.* (2004), essas centelhas elétricas podem ser vistas em diferenças de potencial com corrente contínua acima de 105 V. Esse processo sob o regime de ruptura dielétrica é também conhecido por oxidação anódica a microarco (*micro-arc oxidation – MAO*).

Contudo, novos estudos verificam a formação de uma camada de nanotubos de TiO₂ a partir da oxidação anódica sob tensões de 3 V a 30 V por 1 hora em solução 0,5 M de ácido fluorídrico (HF) (LEWANDOWSKA, 2015). Sendo que, quando realizada sob tensão próxima a 20 V observa-se uma estrutura tubular mais bem definida, com diâmetros de aproximadamente 100 nm (Fig.4). Esse processo, quando realizado a 30 V acaba colapsando os nanotubos devido à grande quantidade de bolhas que dificulta o seu crescimento (HUANG *et al.*, 2018).

Figura 4: Imagens obtidas por MEV de nanotubos de TiO₂ formados pelo processo de anodização em diferentes voltagens.



Fonte: adaptado de Lewandowska (2015).

O processo de formação dos nanotubos ainda não é bem conhecido, porém sabe-se que é uma consequência direta da competição entre a taxa de dissolução química do TiO₂ pelos íons fluoreto e a taxa de formação eletroquímica do mesmo óxido, (LEWANDOWSKA *et al.*, 2015). Os íons de flúor podem oferecer solubilidade para formar complexos fluorados com uma larga gama de cátions metálicos. Essa solubilidade é um fator primordial para manter o estado de equilíbrio do crescimento do óxido de titânio sob a forma de estruturas nanotubulares (ARRUDA, 2018). Algumas pesquisas têm apresentado outras explicações para o fenômeno de formação dos nanotubos:

"A dissolução química, a dissolução assistida em campo e a oxidação são as três principais reações na anodização com eletrólito de flúor. Entre esses, a dissolução em campo alto tem sido considerada como o mecanismo predominante de formação de estrutura tubular de TiO₂ por muitos pesquisadores. [...] a formação inicial de poros se deve à dissolução localizada do metal nos seus pontos fracos mantendo porções metálicas não anodizadas entre esses poros. Posteriormente, espaços vazios são formados nessas regiões inter porosas através da oxidação/dissolução em campo alto. O crescimento desses vazios em equilíbrio com os poros forma as estruturas nanotubulares finais. [...] a separação dos nanotubos individuais da camada de dióxido de
titânio dos nanoporos interligados pode ser atribuída às forças de repulsão das vacâncias de cátions geradas pela dissolução de cátions de Ti [...]. " (WEBSTER; YAO, 2016) (Fig. 5).



Arruda (2018) descreve ainda que a formação dos nanotubos em eletrólitos contendo flúor pode ser dividida em três etapas. Na primeira etapa (I) ocorre a formação de uma camada de óxido não condutivo sobre o metal, da mesma forma como ocorre em eletrólitos sem flúor. No estágio dois (II) o efeito do flúor já pode ser notado através de um aumento na densidade de corrente devido a interação da camada de óxido de barreira com os próprios íons de flúor. Isso resultará na dissolução da camada de óxido levando à nucleação de nanoporos. Por fim, na terceira etapa (III), há o crescimento dos nanotubos sob uma densidade de corrente constante, ou seja, o equilíbrio entre as reações de oxidação e dissolução é alcançado (Fig. 6). A espessura da camada dependerá linearmente do tempo de anodização. Contudo, tempos muito prolongados levarão a um efeito de afinamento das paredes mais ao topo dos nanotubos, conhecido também como formação de nanogramas e tempos muito curtos não promoverão a completa dissolução da camada de barreira (Fig. 7b). Outro defeito comum na membrana de nanotubos de TiO₂ ocorre ao final do processo após a lavagem da peça anodizada. Uma pequena quantidade de íons H⁺ e F⁻ pode

permanecer nas regiões entre os nanotubos. Esses íons causam uma corrosão lenta formando defeitos estruturais na base dos nanotubos (Fig. 7a).



Figura 6: Curva da densidade de corrente em função do tempo.

Figura 7: (a) Corrosão na base dos nanotubos por efeito de íons H⁺ e F⁻ resultantes do processo. (b) Afinamento das paredes mais ao topo dos nanotubos por efeito de tempo prolongado de anodização.



Fonte: adaptado de Arruda (2018).

Voltando à discussão dos parâmetros aplicados à anodização sob tensões acima do limite de ruptura dielétrica do meio titânio/eletrólito, o tempo é mais um importante fator na formação e característica do óxido formado. Recobrimentos anodizados por 10 s apresentam poros de até 0,38 µm de diâmetro. Se esse tempo for aumentado para 60 s é possível obter diâmetros de até 0,67 µm. Sob maior tempo de ação (entre 180 s e 360 s), os poros passam a ficar interconectados, o que pode favorecer a adesão celular e a ligação do implante com o osso. Contudo, a camada de óxido formada se torna frágil e mais fácil de se soltar do substrato metálico (SANTOS *et al.*, 2017). Alguns estudos demonstram que tempos mais prolongados de oxidação anódica promovem a dissolução do filme de óxido formado e a espessura do mesmo diminui drasticamente. Contudo, esse tempo deve estar sempre relacionado à diferença de potencial aplicada, que pode acelerar ou retardar o processo se a mesma for maior ou menor, respectivamente (XING *et al.*, 2013).

Por fim e não menos importante, há a influência da temperatura do eletrólito e de sua velocidade de agitação na célula eletrolítica. Algumas pesquisas relatam que o aumento na temperatura do eletrólito inibe a formação do filme de óxido. Esse aumento provém de uma reação exotérmica e resulta numa camada mais porosa, porém com menor espessura (SUL *et al.*, 2001; ARAÚJO, 2012). Em seus trabalhos, Sul *et al.* (2001), utilizou um trocador de calor na célula eletrolítica (Fig. 8), conseguindo uma precisão menor que 2 °C no controle de temperatura do processo de anodização que variou entre 17 °C e 42 °C. Em relação à velocidade de agitação da solução eletrolítica, o trabalho de Sul *et al.* (2001) constata que o crescimento do óxido é influenciado mais pelo tipo de eletrólito utilizado do que pela agitação propriamente dita. Foi observado que sob velocidades de 250 rpm a 800 rpm em soluções ácidas com H₃PO₄ obteve-se uma eficiência aproximada de 6% na formação de óxido, enquanto que a mesma agitação aplicada num eletrólito alcalino com NaOH alcançou 18% de eficiência na formação do filme.





Fonte: adaptado de Sul et al. (2001).

A título de informação, as aplicações biológicas do TiO₂ vão muito além dos implantes e da reparação óssea. Podem ser utilizados também como biosensores, coagulantes sanguíneos, no transporte de fármacos, em atividades antimicrobianas e até nas terapias fotodinâmicas (SZAJNMAN *et al.*, 2018). Contudo, este trabalho se aterá somente às aplicações voltadas para implantes e reparação óssea.

4.3. Bioatividade nos filmes de TiO₂

A fina camada de TiO₂ formada espontaneamente sob condições atmosféricas sobre a superfície do titânio e suas ligas tende a aumentar quando submetida ao meio biológico. Células inflamatórias, como macrófagos, podem contribuir para o aumento dessa camada em meio biológico através da excreção de enzimas proteolíticas, citocinas e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Há uma hipótese no meio científico de que a interface real entre o implante de titânio e o tecido vivo seja uma matriz de peróxido de titânio hidratada, com aspecto gelatinoso, conhecido também como Ti-peróxido gel ou gel de titânia (TiO₂). A formação de tal matriz gelatinosa é quase que exclusiva para titânio e suas ligas, uma vez que a solubilidade e estabilidade do óxido de titânio nos grupos peróxidos dos fluídos corporais são relativamente mais elevadas quando comparadas a outras ligas metálicas (BRÅNEMARK *et al.*, 2001; FRANCATTO, 2016). Alguns estudos sugerem o tratamento superficial do substrato de titânio ou de suas ligas com peróxido de hidrogênio para formação dessa matriz gelatinosa com o intuito de aumentar a bioatividade da superfície, comprovada através da deposição de hidroxiapatita (HA) após ensaio em SBF (LIU; CHU; DING, 2004). A Figura 9 apresenta esquematicamente a interação na interface entre o implante de titânio e o tecido ósseo. Destaque para a matriz gelatinosa que faz a transição entre o implante e o material biológico.

Figura 9: Interface titânio e tecido ósseo. O dióxido de titânio é coberto por uma fina camada gelatinosa de peróxido de titânio que faz o contato com a estrutura óssea.



O mecanismo de nucleação de hidroxiapatita sobre a superfície do titânio e suas ligas foi proposto por Kokubo *et al.*, (2015) em função do pH da solução utilizada para o tratamento superficial. Após o tratamento superficial da liga com uma solução ácida, seguida de tratamento térmico, o óxido formado (TiO₂) fica adsorvido com radicais ácidos. Esses radicais se dissociam durante o ensaio de SBF produzindo um ambiente ácido no óxido de titânio. Os estudos de Kokubo *et. al*, (2015) constataram ainda, através da medição do potencial Zeta, que esse ambiente ácido proporciona uma

carga superficial positiva no material (Fig. 10). Durante o ensaio de SBF, a carga positiva na superfície do substrato irá atrair preferencialmente os íons fosfato negativos (PO_4^{-3}) existentes na solução de SBF. O acúmulo desses íons torna a superfície do material carregada negativamente, atraindo os íons cálcio positivos (Ca^{+2}) provindos também da solução de SBF. Dessa forma, ocorrerá sobre a superfície do titânio a formação de fosfato de cálcio ($Ca_3(PO_4)_2$) que, posteriormente, se cristaliza em hidroxiapatita ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$) (Fig. 10).

Caso o tratamento superficial do substrato seja em solução alcalina a carga inicial resultante da superfície será negativa e em meios com pH próximo a 7 a carga superficial será neutra, resultando na formação de uma fina camada de fosfato de cálcio ao final do ensaio de SBF (Fig. 11).



Fonte: adaptado de Kokubo et al. (2015).

Figura 11: Cargas superficiais do TiO₂ em função do pH da solução de tratamento.



Fonte: adaptado de Kokubo et al. (2015).

A modificação superficial do titânio e suas ligas para aplicação como implantes tem o propósito principal de estimular o processo de osteointegração, melhorando a bioatividade desse material. Com o intuito de produzir uma superfície que favoreça a interação entre o implante e o tecido ósseo, o tratamento eletroquímico de anodização irá atuar diretamente sobre quatro fatores relacionados a essa interação: energia de superfície, composição da superfície, rugosidade e topografia superficiais (GEETHA *et al.*, 2009).

A energia de superfície, também conhecida como *Energia Livre de Gibbs de uma superfície à temperatura e pressão constantes*, se relaciona de forma diretamente proporcional à área e tensão superficial do filme. Por outro lado, a composição química e a fase presente em sua superfície também interferem diretamente na energia superficial de Gibbs por alterarem o potencial químico do filme formado. A relação entre esses parâmetros é dada pela Equação 1 a seguir (RABÓCZKAY, 2016; CASTELLAN, 1995).

$$G_{T,P} = \gamma A + \sum_{i=1}^{n} \mu_i n_i$$
(1)

Onde,

- $G \rightarrow$ Energia Livre de Gibbs de uma Superfície ou energia de superfície [J];
- $\gamma \rightarrow$ Tensão superficial ou energia interfacial específica [J/m²];
- $A \rightarrow \text{Årea superficial [m²];}$
- $\mu_i \rightarrow$ Potencial químico da espécie *i* [J/kmol];
- $n_i \rightarrow N$ úmero de moles da espécie *i*.

Através da Equação 1 verifica-se que um aumento da área superficial induz um acréscimo proporcional na energia de superfície do material ou filme. A literatura já comprova que o aumento da energia superficial melhora aspectos como a

molhabilidade do material, tornando-o mais hidrofílico (CHAVES *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2018).

A molhabilidade de uma superfície pode ser medida através do ângulo de contato entre a gota de um líquido (normalmente água) e a própria superfície. O líquido depositado sobre a superfície sólida tende a se espalhar até atingir o estado de equilíbrio entre a força de coesão do líquido, a força da gravidade e a força da tensão superficial. Atingido o estado de equilíbrio, que corresponde ao estado de energia mínima entre as três fases, o ângulo de contato pode ser medido. A Equação (2), de Young, define esse estado de equilíbrio para superfícies sólidas, planas e homogêneas (ANTONINI, 2016) (Fig. 12a).

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \times \cos\theta \, \therefore \, \cos\theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}}$$
(2)

Onde,

 $\gamma_{SV} \rightarrow$ Energia ou tensão interfacial entre o sólido e o vapor [J/m²]; $\gamma_{SL} \rightarrow$ Energia ou tensão interfacial entre o sólido e o líquido [J/m²]; $\gamma_{LV} \rightarrow$ Energia ou tensão interfacial entre o líquido e o vapor [J/m²]; $\theta \rightarrow$ Ângulo de contato entre a superfície e o líquido.

Uma superfície é considerada hidrofílica quando esse ângulo apresenta valores menores que 90° e hidrofóbica quando esse ângulo é superior a 90° (Fig. 12b).



Figura 12: (a) ilustração do ângulo de contato, (b) ilustração da molhabilidade.

Fonte: elaboração própria.

Sendo assim, de acordo com a Equação (1), se o tratamento for capaz de maximizar a área de contato superficial e alterar quimicamente sua superfície, poderá promover um filme com características hidrofílicas. Alguns estudos mostram que a adsorção de proteínas tende a ser maior em superfícies hidrofílicas quando comparadas às superfícies hidrofóbicas (NOVAES et al., 2010; CHAKRAVORTY et al., 2012). Essa adsorção proteica é responsável pela adesão celular (osteoblastos) logo nos primeiros instantes do implante no meio biológico (WEBSTER et al., 2000). Contudo, superfícies super-hidrofílicas, com $\theta \rightarrow 0^{\circ}$, podem apresentar baixa capacidade de adsorverem proteínas devido às condições energéticas desfavoráveis que podem suprimir o filme de proteína (JIMBO et al., 2010).

Outros fatores afetados pela anodização que favorecem a bioatividade na superfície do titânio e suas ligas são a rugosidade e topografia superficial. A rugosidade possui influência significativa nas interações entre células e proteínas com a superfície do implante (JIMBO et al., 2010). Alguns estudos relatam que um aumento na rugosidade induz uma melhora na ancoragem mecânica do implante (DELIGIANNI et al., 2001; WANG et al., 2017; ROSA et al., 2012). Por outro lado, há pesquisas indicando que rugosidades abaixo de 1 µm são mais favoráveis à adesão e proliferação de células (NARAYANAN; KWON; KIM, 2009; OLIVEIRA et al., 2014). E existem ainda investigações sugerindo que a proliferação celular não é afetada somente pelo fator rugosidade isoladamente (KIM et al., 2013).

A literatura aponta três escalas distintas para definir a magnitude da rugosidade média (Ra): nanorugosidade (Ra < 1 μ m), microrugosidade (1 μ m < Ra < 10 μ m) e a macrorugosidade (10 μ m < Ra < 1 mm) (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004; ROSA *et al.*, 2012). Contudo, a rugosidade de uma superfície não deve ser considerada somente no âmbito de sua amplitude (distância entre picos e vales), mas também nos termos da organização superficial, ou seja, da topografia (ANSELME, 2000). A literatura apresenta que superfícies com topografia organizada (morfologia uniforme ao longo de toda área) são definidas como anisotrópicas e superfícies com topografia desorganizada (morfologia aleatória) são conhecidas como isotrópicas (BIGERELLE *et al.*, 2002).

Anselme *et al.* (2010), constatou em seus estudos que osteoblastos humanos são mais sensíveis à organização e morfologia topográfica do que ao valor da rugosidade na sua amplitude em si. De acordo com esses mesmos estudos, uma topografia irregular ou desorganizada proporciona um ambiente menos favorável para a célula estabelecer área de contato com a superfície. Além da organização superficial, algumas pesquisas consideram a topografia superfícial em duas escalas. Uma quando essa topografia está acima da escala celular, então as células irão apreciar uma superfície com a rugosidade isotrópica (aleatória). A outra quando a topografia está abaixo da escala celular, as células apreciarão uma superfície menos rugosa, ou mais lisa (BIGERELLE *et al.*, 2002).

Diante de vários conceitos e considerações a respeito da rugosidade e topografia, pode-se sintetizar que superfícies altamente rugosas, na faixa de micro e até macrorugosidade, favorecem a ancoragem mecânica e a fixação primária do osso. Já topografias a nível nanométrico se concentram no aprimoramento da resposta do hospedeiro promovendo a adsorção de proteínas e adesão celular osteoblástica durante os estágios iniciais da cicatrização na região peri-implante (NOVAES *et al.*, 2010). Para que haja uma osteointegração robusta deve ser associado à topografia superficial do material tanto elementos em escala nanométrica, como elementos em escala micrométrica (MENDONÇA *et al.*, 2008).

4.4. Ensaio de riscamento (Scratch Test)

O ensaio de riscamento, também conhecido como esclerometria retilínea ou prova de adesão, é uma técnica utilizada para se determinar a adesão de um recobrimento cerâmico fino e duro sobre um substrato metálico ou substrato cerâmico à temperatura ambiente (ASTM-C1624, 2015). O ponto crucial dessa técnica é a determinação da força de adesão prática do recobrimento ao substrato, ou seja, a determinação das cargas críticas as quais aparecem os diferentes tipos de falha no material (SÁENZ, 2013).

A importância da verificação da adesão do recobrimento ao substrato está relacionada ao fato de que durante o manuseio e instalação do implante no paciente, esse implante pode ficar sujeito a mecanismos de desgaste por forças de cisalhamento. O destacamento desse recobrimento seguido de geração de resíduos são indesejáveis, pois seus fragmentos podem causar reações adversas no organismo e levar à necessidade de substituição do implante (DOS SANTOS, 2013).

Nesse ensaio um penetrador com forma hemisférica ou piramidal é arrastado com velocidade constante e ao longo de uma distância definida através do recobrimento de uma superfície plana. Esse movimento ocorre sob uma força normal definida, podendo essa ser constante ou aumentada progressivamente. O defeito provocado no recobrimento ao longo do risco é avaliado em função da força aplicada e os níveis específicos de danos estão associados ao aumento da carga normal do penetrador. O método também se utiliza da medição da força tangencial e da emissão acústica como informações secundárias para identificar diferentes níveis de danos no revestimento (ASTM-C1624, 2015) (Fig. 13). A utilização da emissão acústica se revela muito importante por permitir elucidar a dinâmica da falha. No caso de filmes finos não transparentes, como nanotubos de TiO₂, o sinal da emissão acústica pode revelar trincas subsuperficiais e detectar cargas críticas antes da observação visual (TOMASTIK *et al.*, 2018).



Figura 13: Esquema do teste de riscamento.

Fonte: adaptado de ASTM-C1624 (2015).

No ensaio de riscamento com força progressiva, caso do presente estudo, podem ocorrer dois tipos de falhas: as falhas adesivas e as falhas coesivas. A primeira ocorrerá na interface entre o revestimento e o substrato e está relacionada com as propriedades desse dueto. Já a falha coesiva ocorrerá no interior do revestimento e se deve unicamente à suas propriedades. As cargas as quais surgem os diferentes tipos de falha são denominadas cargas críticas (Lc). Lc1 é onde ocorre o início de desprendimento de material e possui característica coesiva. Em Lc₂ surge a primeira ruptura e início de exposição do substrato. Por fim, em Lc3 ocorre o desprendimento total do recobrimento. Ambas, Lc₂ e Lc₃ possuem características adesivas (GONÇALVES, 2012; SÁENZ, 2013) (Fig. 14).



Fonte: adaptado de ASTM-C1624 (2015).

Existem alguns fatores que influenciam o resultado do ensaio. Esses são fatores relacionados ao próprio dispositivo de teste e fatores ligados aos materiais a serem ensaiados. Com relação aos primeiros tem-se: a taxa de carregamento, a velocidade de riscamento, a geometria do penetrador, o desgaste do penetrador e design do aparelho em si. Com relação aos materiais observa-se a importância da dureza e módulo de elasticidade do substrato, bem como a espessura, dureza, módulo de elasticidade e tensão residual do recobrimento, além de sua rugosidade superficial e coeficiente de atrito do par substrato/recobrimento (ALVES, 2010).

O ensaio apresenta em seu resultado alguns modos de falhas básicos. O primeiro pode ser classificado como trincas através da espessura do recobrimento (trincas de tensão, conformais e Hertzianas). O segundo compreende o destacamento do substrato que pode ocorrer à frente do penetrador através de um lascamento compressivo ou afivelamento, ou atrás do penetrador por recuperação induzida. Há ainda o lascamento dentro do recobrimento muito comum em recobrimentos espessos. E por fim, o lascamento dentro do substrato característica em sistemas com recobrimentos frágeis sobre substratos também frágeis (GONÇALVES, 2012). As falhas tipo afivelamento são mais comuns em recobrimentos finos (< 10 µm). Já os lascamentos são característicos de recobrimentos espessos (ALVES, 2010).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Processo de trabalho

O trabalho possui característica experimental e foi desenvolvido conforme fluxograma a seguir (Fig. 15).



Figura 15: Fluxograma de trabalho.

Todo processo pode ser dividido em 4 etapas. Primeiramente se deu a aquisição do material, preparação dos corpos de prova e caracterização do substrato. Em uma segunda etapa ocorreu o processo de tratamento eletroquímico para produção dos filmes. Num terceiro momento executou-se as caracterizações e ensaios sobre os filmes produzidos. E por fim, numa quarta fase, realizou-se a análise dos resultados e elaboração das conclusões.

Fonte: elaboração própria.

5.2. Materiais e sua preparação

O material utilizado no desenvolvimento deste trabalho foi a liga Ti6Al4V ELI (*Extra Low Interstitial*) (ASTM-F136, 2015). Os ensaios foram conduzidos utilizando-se dois tipos de amostras no formato circular: uma com diâmetro de 10 mm e espessura de 5 mm para caracterizações e ensaios biológicos (Fig. 16a); e a outra, com diâmetro de 25 mm e espessura de 2 mm, para avaliação morfológica, estrutural e ensaio de riscamento (Fig. 16b).



Figura 16: Amostras de Ti6Al4V utilizadas como substrato nos ensaios.

Fonte: elaboração própria.

Após a usinagem dos discos, o material foi limpo com água e detergente. As amostras foram lixadas em lixas de carbeto de silício nas granulometrias de 180, 220, 320, 400, 600, 1200 e 3000 *mesh*, nessa sequência. Posteriormente foram limpas em banho de ultrassom com água destilada, seguido de limpeza em álcool etílico absoluto e secas com ar quente para evitar manchas de secagem.

Na avaliação da espessura da camada anodizada, utilizou-se as amostras de 25 mm de diâmetro cortadas ao meio. Essas amostras foram embutidas a quente com resina de baquelite, juntamente com um anel de contenção ao seu redor a fim de evitar o arredondamento de suas bordas durante o processo de lixamento e polimento, garantindo a visualização em perfil da camada anodizada ao microscópio (Fig. 17).



Figura 17: Amostra embutida para avaliação da espessura do filme de TiO₂.

Fonte: elaboração própria.

Na sequência da preparação as amostras foram lixadas nas mesmas granulometrias informadas anteriormente, seguidas de polimento em pasta de diamante nas granulometrias de 9, 3 e 1 µm, nessa sequência. Para o ataque metalográfico foi utilizada solução de *Kroll* (HNO₃ 6%; HF 3%; H₂O_{deionizada} 91%). O tempo de ataque foi de 5 minutos.

5.3. Confecção do sistema de anodização

Para a cuba de anodização utilizou-se um recipiente de polietileno com capacidade total de 3 litros. Esse recipiente foi preparado de forma a possibilitar a fixação das placas de cátodo a uma distância de 50 mm entre si, bem como do suporte para o ânodo, equidistante na parte central entre as placas de cátodo. Foram utilizadas duas placas de aço inoxidável AISI 316 para a função de cátodo (Fig. 18).



Figura 18: Componentes da cuba eletrolítica.

Fonte: elaboração própria.

Uma fonte retificadora (FCC-3005D, 0 - 30 V) foi utilizada na produção do filme nanotubular de TiO₂ (Fig. 19a). Na produção do filme microporoso foi confeccionada uma fonte também de corrente contínua com capacidade de fornecimento de 174 V (Fig. 19b). Essa fonte foi projetada de forma a retificar a tensão alternada de 127 V da rede elétrica. Para isso foram utilizados: uma ponte retificadora (KBPC5010, 50 A - 1000 V), seis capacitores (470 μ F - 400 V) para a correção do efeito da corrente contínua pulsante, uma resistência (27 k Ω - 10 W) para descarga dos capacitores ao término de utilização da fonte e um fusível (20 A) para proteção do circuito (Fig. 20).





Fonte: elaboração própria.



Figura 20: Esquema elétrico básico da fonte retificadora de 174 V.

5.4. Parâmetros do processamento eletroquímico para os filmes de TiO₂

O processo eletroquímico de anodização foi realizado no modo potenciostático (sob diferença de potencial constante) e em temperatura ambiente aproximada de 20 °C.

A produção dos nanotubos (TNT) se deu conforme Munirathinam e Neelakantan (2015) adaptado, utilizando-se uma solução de fluoreto de sódio (NaF – 0,5 %p/p) com ácido cítrico ($C_6H_8O_7 - 0,1$ mol/L). O tempo de processamento foi de 90 minutos sob diferença de potencial de 20 V (Tabela 4).

Já para a obtenção dos microporos (MP), seguiu-se a metodologia proposta por Silva (2017) adaptada. Foi utilizada uma solução de ácido fosfórico (H₃PO₄ – 1 mol/L), com tempo de processamento de 5 minutos, sob diferença de potencial de 174 V (Tabela 4).

Recobrimento	Solução Eletrolítica	Tempo [min]	Diferença de Potencial [V]	
TNT	NaF (0,5% p/p) + C ₆ H ₈ O ₇ (0,1 mol/L)	90	20	
MP	H ₃ PO ₄ (1,0 mol/L)	5	174	

Tabela 4: Parâmetros de anodização

Fonte: elaboração própria.

5.5. Caracterizações físico-química e estrutural

5.5.1. Caracterização química elementar e identificação das fases

Para a confirmação da composição química do substrato formado pela liga Ti6Al4V, antes do processo de anodização, foi utilizado o ensaio de Fluorescência de Raios X (FRX) (Shimadzu Corporation, EDX-720). Essa técnica permitiu quantificar o percentual em massa (% m/m) dos elementos que compõem a liga utilizada para o desenvolvimento do trabalho. Após o procedimento de anodização, a composição química (% m/m) dos filmes de TiO₂ foi obtida por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS) (Bruker Nano GmbH, XFlash 410-M) acoplado ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Carl Zeiss Microscopy, SIGMA VP).

Tanto a identificação das fases do substrato de Ti6Al4V, bem como do filme de TiO₂ foi realizada através do ensaio de Difração de Raios X (DRX) (Shimadzu Corporation, XDR-7000). As medições no substrato foram realizadas utilizando radiação Cu-K α 1 em 40 kV e corrente de 30 mA. O ângulo de varredura de 20 partindo de 10° a 80° com passo de medição de 0,02° e velocidade de varredura de 0,2°/min. Já as medições nos filmes de TiO₂ foram feitas com radiação Cu-K α 1 em 30 kV e corrente de 20 mA. O ângulo de varredura de 20 partindo de 10° a 80°, porém com incidência rasante de 3° para que a difração pudesse ser mais sensível à superfície do material. O passo dessa medição foi de 0,05° com velocidade de varredura de 0,5°/min. Os resultados das fases foram obtidos por comparação com as seguintes fichas cristalográficas: PDF n° 89-5009 (Ti6Al4V – fase α), PDF n° 89-4913 (Ti6Al4V – fase β), PDF n° 21-1272 (TiO₂ – Anatásio) e PDF n° 21-1276 (TiO₂ – Rutilo).

5.5.2. Caracterização morfológica e estrutural

A visualização metalográfica do substrato, bem como a avaliação da forma, distribuição, tamanho e espessura dos filmes de TiO₂, foram realizados com o auxílio do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Carl Zeiss Microscopy, SIGMA VP),

acoplado à Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS) (Bruker Nano GmbH, XFlash 410-M). Para tratamento das imagens utilizou-se do *software* de análise de imagem *Image J*.

5.5.3. Avaliação da rugosidade

Na avaliação da rugosidade utilizou-se rugosímetro (Tesa Technology, Rugosurf / resolução: 0,001 µm) para comparativo entre as superfícies do substrato, dos filmes nanotubulares e dos filmes microporosos. Foram realizadas 6 medidas por amostra num total de 6 amostras de cada tipo. As medições foram feitas no sentido radial de cada amostra. O comprimento de amostragem (*cut off*) foi ajustado para 0,8 mm e o número de *cut off* foi de 5. O parâmetro utilizado na medição foi a rugosidade média (Ra).

5.5.4. Avaliação da molhabilidade

Para a medição do ângulo de contato foi utilizado o goniômetro (Kruss, DAS-100) com o intuito de se verificar a molhabilidade tanto do substrato de Ti6Al4V, quanto dos filmes de TiO₂ depositados por anodização. Esse ensaio foi realizado com água destilada e o volume colocado sobre as amostras foi de 2,5 µl. O ensaio foi realizado pelo Método da Gota Séssil com 6 medições por amostra em 6 amostras de cada tipo. O método consiste em que uma gota é depositada sobre a superfície plana do material por meio de uma seringa e o ângulo é medido entre as fases sólida, líquida e o ar após 1 minuto da deposição da gota. O ângulo é obtido através do tratamento da imagem capturada pelo próprio equipamento de ensaio utilizando um *software* específico do fabricante (Kruss, ADVANCE).

5.6. Ensaios e caracterizações biológicas dos filmes de TiO₂

5.6.1. Ensaio de SBF (Simulated Body Fluid)

A avaliação da formação de apatita sobre a superfície de um material submetido ao ensaio de SBF tem sua utilidade para prever a bioatividade óssea do material quando for aplicado *in vivo*. Com o ensaio biomimético em SBF é possível avaliar essa bioatividade tanto qualitativamente, como também quantitativamente (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

Além das amostras com recobrimento, o ensaio foi realizado também em amostras contendo somente o substrato como forma de controle. Tanto o ensaio, quanto a solução foram reproduzidos conforme procedimento descrito em Kokubo e Takadama (2006). Os experimentos foram realizados em tubos-falcon de polipropileno de 15 ml, estéreis e com tampas. O volume de solução foi calculado conforme norma ISO-23317 (2014). Os corpos de prova foram imersos em solução e mantidos por 28 dias em estufa à 37 °C. As soluções foram trocadas em intervalos de 7 dias. As amostras foram retiradas e lavadas suavemente com acetona para análise visual e química semiquantitativa com 7, 14 e 28 dias.

As análises após o ensaio de SBF foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Carl Zeiss Microscopy, SIGMA VP) com Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS) (Bruker Nano GmbH, XFlash 410-M). A Tabela 5 apresenta os reagentes com respectiva quantidade e na ordem em que são utilizados para elaboração de 1 litro da solução de SBF conforme Kokubo e Takadama (2006).

Ordem	Reagentes		Quantidade	Massa Molar [g/mol]	Pureza [%]
1	Cloreto de Sódio	NaCl	8,035 g	58,4430	99,5
2	Bicarbonato de Sódio	NaHCO ₃	0,355 g	84,0068	99,5
3	Cloreto de Potássio	КСІ	0,225 g	74,5515	99,5
4	Fosfato dipotássico tri-hidratado	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0,231 g	228,2220	99,0
5	Cloreto de Magnésio hexa-hidratado	MgCl ₂ 6H ₂ O	0,311 g	203,3034	98,0
6	Ácido Clorídrico	HCl - 1M	39 ml	***	***
7	Cloreto de Cálcio	CaCl ₂	0,292 g	110,9848	95,0
8	Sulfato de Sódio	Na ₂ SO ₄	0,072 g	142,0428	99,0
9	Tris(hidroximetil)aminometano	(HOCH ₂) ₃ CNH ₂	6,118 g	121,1356	99,0
10	Ácido Clorídrico	HCl - 1M	0 a 5 ml	***	***

Tabela 5: Reagentes para 1 litro de solução de SBF.

Fonte: adaptado de Kokubo e Takadama (2006).

5.6.2. Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos filmes foi avaliada através do teste disco-difusão em ágar e teste de macrodiluição, ambos com as cepas microbiológicas *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 11229) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 6538). Previamente aos ensaios, as amostras foram esterilizadas em autoclave por calor úmido a 121 °C durante 30 minutos.

Para o ensaio de disco-difusão em ágar foi preparada placa Petri com 20 ml de solução de Ágar Miller-Hilton (Kasvi®, Itália). Após a solidificação do meio e avaliação quanto à ausência de microrganismos, foi aplicado 10 µl de suspensão microbiana (2x10⁷ UFC - Unidade Formadora de Colônia) por toda superfície da placa de Petri com o auxílio de um "*Swab*" (cotonete estéril). Em seguida as amostras e os controles foram acomodados sobre o meio sólido. Como controle positivo foram utilizados discos de filtros com antibiótico tetraciclina (CECON®, São Paulo) para cepa *S. aureus* e antibiótico ampicilina (CECON®, São Paulo) para *E. coli*. Já no controle negativo foi utilizado 10 µl de salina 0,9 % gotejada sobre o disco de filtro estéril. As placas foram acondicionadas em estufa microbiológica (Quimis®, Q316M) a 37 °C durante período de 24 horas e posteriormente avaliadas quanto ao halo de inibição conforme norma ANVISA M2-A8 (2003). Esse ensaio foi realizado em triplicata.

O ensaio de macrodiluição foi realizado conforme norma ANVISA M7-A6 (2003). As amostras foram submetidas ao ensaio de resazurina (Sigma-Aldrich®, USA) em cultura de bacteriana a fim de se avaliar a densidade celular. No controle positivo desse ensaio também se utilizou discos com tetraciclina (CECON®, São Paulo) para cepa *S. aureus* e discos com ampicilina (CECON®, São Paulo) para *E. coli*. No controle negativo foi utilizada solução salina 0,9 % gotejada sobre o disco estéril. Para o volume de caldo nutriente (solvente extrator) aplicou-se a relação de 1 ml do mesmo para cada 0,2 g de massa da amostra. Tanto as amostras quanto os controles foram mantidos submersos nos respectivos caldos (extratos) em estufa microbiológica (Quimis®, Q316M) a 37 °C por um período de 24 h. Em seguida, foi retirado 1 ml dos extratos de cada amostra e também dos controles para serem colocados em tubos com suspensão microbiana equivalente à 5 x 10⁵ UFC/ml. Esses tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 24 h. Posteriormente, 5 µl da solução de resazurina (280 µg/ml) foi adicionada em cada tubo e mantidos em estufa a 37 °C por 3h.

A resazurina (Sigma-Aldrich®, USA) é um indicador colorimétrico com a propriedade redox em que a forma oxidada é azul (célula não viável) e a forma reduzida é rósea (célula viável). A absorbância foi determinada por Espectrofotômetro de Ultravioleta Visível (UV/VIS) (Varian Cary 50, Agilent) nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. Os ensaios de macrodiluição foram realizados por quatro repetições independentes e calculados em comparação com o controle negativo (100%).

5.6.3. Avaliação da adesão bacteriana

Para o ensaio de adesão bacteriana a cepa *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi cultivada em caldo nutriente a pH 7 e as células colhidas ao final da fase de crescimento exponencial. O volume de 10 µl de inóculo foi estriado em placa com ágar nutriente, a qual foi incubada a 37 °C por 24 h. Três colônias únicas foram selecionadas aleatoriamente e inoculadas em 10 ml de caldo nutritivo. Posteriormente, 1 ml de suspensão bacteriana, equivalente à 5 x 10⁵ UFC/ml, foi transferida para tubos falcon contendo, em cada um, amostras do substrato puro e amostras com filmes de TiO₂, todos esterilizados. Após 20 minutos de incubação a 37 °C em estufa

microbiológica (Quimis®, Q316M), essas amostras foram cuidadosamente retiradas dos tubos e submetidas ao processo de fixação em tetróxido de ósmio a 1 % (Sigma-Aldrich®, USA) por 12 h. Em seguida, foram desidratadas por imersões sequenciais em concentrações crescentes de acetona (50 %p/v, 70 %p/v, 80 %p/v e 90 %p/v), seguidas de duas vezes em acetona anidra e finalmente secas. Para avaliação da adesão bacteriana, as amostras foram revestidas com ouro e examinadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Carl Zeiss Microscopy, SIGMA VP).

5.7. Ensaio de riscamento (Scratch Test)

Para a avaliação da adesão dos filmes produzidos, executou-se o ensaio de riscamento utilizando o micro-tribômetro (CETR / BRUKER, APEX) situado no laboratório de caracterização de superfícies de materiais (LCSM) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Seguindo diretrizes da norma ASTM-C1624 (2015), as medições foram realizados em 6 amostras, sendo 3 medições em cada uma, para ambos os filmes estudados (microporos e nanotubos).

Os riscos foram executados com endentador de diamante dureza Rockwell C. A velocidade de deslocamento horizontal adotada foi de 0,1 mm/s. O ensaio foi realizado no modo de carga progressiva com carga normal inicial de 0,2 N e carga final de 10 N a uma taxa de carregamento de 0,1 N/s. O comprimento total do risco foi de 10 mm. O sinal de emissão acústica (AE) não pôde ser medido devido a limitações do equipamento. Os dados referentes à carga normal (F_N), força de atrito (força tangencial – Ft), velocidade (V) e distância percorrida (D) foram aquisitados a uma taxa de 50 Hz. A Figura 21 apresenta o desenho esquemático do equipamento e do procedimento do ensaio de riscamento (*scratch test*).



Figura 21: Ilustração esquemática do equipamento de ensaio de riscamento.

Fonte: http://tricorrmat.ufes.br/microtribômetro-cetrbruker.

As análises foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Carl Zeiss Microscopy, SIGMA VP) com Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS) (Bruker Nano GmbH, XFlash 410-M).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização físico-química do substrato (Ti6Al4V) e dos filmes de TiO2

Através do ensaio de Fluorescência de Raios X (FRX) constatou-se que os percentuais em massa (% m/m) de alumínio (Al) e vanádio (V) presentes na liga Ti6Al4V a ser processada em tratamento eletroquímico de anodização se encontravam dentro dos parâmetros especificados pela norma ASTM F136 (2015) (Tabela 6).

Tabela 6: Composição química da liga Ti6Al4V.

Elementos	Al [% m/m] V [% m/m]		Ti
Especificado (ASTM F136)	5,5 a 6,5	3,5 a 4,5	Dalanca
Obtido por FRX (CEFET-MG)	6,0 ± 0,3	4,1 ± 0,2	Balanço

Fonte: elaboração própria.

A caracterização por Difração de Raios X (DRX) identificou os picos inerentes à presença das fases $\alpha \in \beta$ no substrato, confirmando se tratar da liga Ti6Al4V (Ti grau 5 / $\alpha + \beta$) (Fig. 22a). Na avaliação metalográfica é possível visualizar a fase β globular (região clara) dispersa na fase α (região escura) (Fig. 22b).



Fonte: elaboração própria.

Após o tratamento eletroquímico, foi identificado na avaliação por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) a presença de elevado percentual em massa (% m/m) de titânio (Ti) e oxigênio (O) na superfície dos materiais, indicando a possível formação de TiO₂. A análise também detectou, em menor quantidade, outros elementos químicos como flúor (F) e o sódio (Na) provenientes do eletrólito para obtenção de nanotubos (TNT); e o fósforo (P) originário do eletrólito para produção de microporos (MP). Notou-se também a presença de cálcio (Ca) e carbono (C) que podem estar relacionados ao aparato experimental, impurezas nos reagentes utilizados, ou à água utilizada na solução. Já o alumínio (AI) está presente na composição do substrato formado pela liga de titânio (Tabela 7).

Tabela 7: Elementos identificados por EDS nos filmes formados por anodização.

Elementos [% m/m]	Ti	0	F	Na	Ca	Al
TNT	52,3 ± 1,7	31,5 ± 1,9	9,4 ±0,8	0,3 ± 0,1	1,9 ± 0,2	4,7 ± 0,5
Elementos [% m/m]	Ti	0		Р	С	AI
МР	46,8 ± 1,8	43,2 ± 1,8	1,6	± 0,3	4,9 ± 0,5	3,6 ± 0,3

Fonte: elaboração própria.

A formação dos filmes de TiO₂ pôde ser confirmada através da técnica de Difração de Raios X (DRX) que identificou picos inerentes à presença de anatásio (An) e um indício de rutilo (R), tanto para a formação dos nanotubos (TNT) (Fig. 23a), quanto na formação dos microporos (MP) (Fig. 23b).





Outro fator que auxilia na percepção da formação dos filmes de TiO₂ é a densidade de corrente elétrica (mA/cm²). Na formação dos nanotubos (TNT) pôde-se constatar as três fases de formação do óxido sobre o substrato, conforme apresentado na literatura. O primeiro estágio foi caracterizado por uma queda brusca da densidade de corrente, de aproximadamente 140 mA/cm² para 10 A/cm², devido à formação da primeira camada de óxido, também conhecida como camada de barreira. Em um segundo estágio percebeu-se ligeiro aumento da densidade de corrente, de 10 mA/cm² para 25 mA/cm², devido à corrosão localizada dessa camada de barreira ocasionada pelos íons de flúor e início da nucleação dos nanotubos. E por fim, o crescimento dos nanotubos sob densidade de corrente constante, em torno de 20 mA/cm² (Fig. 24a), conforme também observado por outros autores (WEBSTER; YAO, 2016; ARRUDA, 2018) (Fig. 25a).





Figura 25: Curvas de anodização: (a) TNT (ARRUDA, 2018), (b) MP (BONATTO, 2009).

Na formação dos microporos (MP), o comportamento da densidade de corrente se diferenciou apenas pela ausência da fase 2 ocorrida no processo de formação dos nanotubos (TNT), conforme esperado. Para os microporos ocorreu também uma queda acentuada no valor da densidade de corrente que se iniciou no ensaio em aproximadamente 160 mA/cm² e se estabilizou em aproximadamente 12 mA/cm² (Fig. 24b). Esse comportamento está similar ao encontrado na literatura (DOS SANTOS, 2013; BONATTO, 2009) (Fig. 25b). Ainda, conforme Dos Santos (2013), a densidade de corrente é um dos fatores responsáveis para formação do rutilo, enquanto que a concentração do eletrólito influencia na formação do anatásio.

6.2. Morfologia dos filmes nanotubulares e microporosos de TiO₂

Ao término do tratamento as amostras recobertas por nanotubos (TNT) de TiO₂ ganharam um aspecto visual com uma tonalidade de cor entre rosa e verde (Fig. 26b). As amostras recobertas com microporos (MP), ficaram com um aspecto visual cinza escuro (Fig. 26c). Ambos os aspectos são um indicativo da espessura do filme de óxido formado e depende do processo utilizado para anodização. De acordo com a literatura, tonalidades mais escuras tendem a apresentar filmes mais espessos (KUROMOTO; SIMÃO; SOARES, 2007; KARAMBAKHSH *et al.*, 2011).



Figura 26: (a) substrato de Ti6Al4V, (b) disco com filme TNT, (c) disco com filme MP.

Fonte: elaboração própria.

A espessura média das camadas nanotubulares (TNT) e microporosas (MP) de TiO₂ foi medida com a utilização de MEV e se mostrou homogênea sobre toda superfície da amostra, sendo realizadas 6 medidas por amostra. A camada de TiO₂ formada por

ambos tratamentos eletroquímicos pode ser identificada através da faixa de tonalidade mais clara indicada pelas setas nas Figuras 27a e 27b. O valor médio da espessura dos filmes de TNT foi de $(0,74 \pm 0,10)$ µm (Fig. 27a) e dos filmes de MP foi mais espessa, chegando a uma média de $(3,01 \pm 0,58)$ µm (Fig. 27b). Utilizando parâmetros de processamento similares, valores semelhantes de espessura foram encontrados nos trabalhos de Bauer *et al.* (2006) e Silva (2017), respectivamente.



Fonte: elaboração própria.

Com o auxílio do software Image J foram calculadas as densidades superficiais por área dos TNTs e MPs, bem como o diâmetro médio dos mesmos. Os TNTs apresentaram diâmetro médio de (73 ± 11) nm e sua quantidade por área foi de aproximadamente 115 x 10⁶ tubos/mm² (Fig. 28b). Esses valores estão similares aos encontrados nos trabalhos de Radtke et al. (2017) e Bauer et al. (2006). Alguns mostram que diâmetros nessa ordem de grandeza estudos de filmes nanoestruturados apresentam boa formação óssea graças ao estimulo de adesão celular e a indução de expressões osteogênicas (IZMIR; ERCAN, 2019). Por sua vez, os MPs apresentaram um diâmetro maior que os TNTs, sendo que em média obtiveram-se valores da ordem de (0.49 ± 0.13) µm com uma densidade por área aproximada de 327 x 10³ poros/mm² (Fig. 28d). Uma ordem de grandeza semelhante foi encontrada nos trabalhos de Kuromoto et al. (2007) e Silva (2017). Ambas as medições foram repetidas 6 vezes em regiões distintas de cada amostra. A Tabela 8 apresenta um resumo comparativo dos resultados obtidos com a literatura citada.

Amostras		Presente Estudo	Bauer <i>et al.</i> (2006)	Silva (2017)
Espessura TNT [µm]		0,74 ± 0,10 Ordem de 0,83		***
Espessura	a MP [µm]	3,01 ± 0,58 ***		4,5 ± 0,8
Diâmetro TNT [nm]		73 ± 11	Ordem de 80	***
Diâmetro MP [µm]		0,49 ± 0,13	***	Ordem de 0,60
	Tensão [V]:	20	20	
Parâmetros TNT	Tempo [min]:	90	60	***
	Eletrólito:	NaF (0,5% p/p) + $C_6H_8O_7$ (0,1 M)	H ₃ PO ₄ (1M) + HF (0,3% p/p)	
	Tensão [V]:	174		180
Parâmetros MP	Tempo [s]:	300	***	60
	Eletrólito:	H ₃ PO ₄ (1,0 M)		H ₃ PO ₄ (1,0 м)

Tabela 8: Resumo dos resultados de espessura do filme e diâmetro dos poros.

Fonte: elaboração própria.

A distribuição dos nanotubos se mostrou bastante auto-organizada e uniforme. Além disso, notou-se algumas impurezas superficiais semelhantes aos resultados obtidos por Munirathinam e Neelakantan (2015) (Fig. 28a). Essas impurezas podem ocorrer devido à camada de barreira inicial de TiO₂ que não sofreu dissolução química pelos íons de flúor durante a anodização (ARRUDA, 2018). Os microporos apresentaram uma distribuição mais aleatória e espaçada entre si, também semelhante ao encontrado na literatura (SILVA, 2017; DOS SANTOS, 2008; DOS SANTOS, 2013). Não foi possível observar impurezas sobre o filme microporoso produzido (Fig. 28c).

Figura 28: (a; b) filme nanotubular (TNT) em MEV e seu respectivo tratamento em *Image J*, (c; d) filme microporoso (MP) e seu respectivo tratamento em *Image J*.



Fonte: elaboração própria.

A Figuras 29 e 30 apresenta em escala maior a morfologia superficial dos filmes produzidos por ambos processos. É possível observar a uniformidade na espessura das paredes dos nanotubos, bem como encontram-se justapostos uns aos outros. É possível perceber também que não apresentam uma forma circunferencial perfeita (Fig. 29).

Figura 29: Morfologia dos nanotubos.



Fonte: elaboração própria.



Fonte: elaboração própria.

De acordo com Zhou *et al.*, (2014), o formato circular perfeito dos nanotubos será alcançado sob densidades de corrente mais elevadas, próximas ao regime de ruptura

dielétrica da camada de óxido. Com relação aos microporos observa-se a aleatoriedade na distribuição e tamanho dos poros. É possível notar também que a topografia superficial é ligeiramente mais irregular que a dos nanotubos (Fig. 30).

6.3. Rugosidade dos filmes de TiO₂

A rugosidade média (Ra) apresentada pelo material antes e após os tratamentos eletroquímicos é apresentada na Tabela 9 a seguir.

Tabela 9: Rugosidade do substrato e das amostras anodizadas.				
Substrato Ti6Al4V [µm]	TNT [μm]	MP [µm]		
0,070 ± 0,012	0,188 ± 0,030	0,159 ± 0,047		
valor- <i>p</i> = 0,029 (<i>p</i> < 0,05)				
Fonto: eleboração préprio				

Fonte: elaboração própria.

Através da análise de variância (ANOVA / Tukey) a diferença entre as médias das rugosidades dos nanotubos e dos microporos pode ser considerada estatisticamente significativa, uma vez que o valor-p obtido entre elas foi de 0,029 (p < 0,05). De acordo com estudos de Escada *et al.* (2017), há uma tendência da rugosidade superficial diminuir com o aumento do diâmetro dos poros. No entanto, no presente trabalho, a menor rugosidade foi encontrada na superfície microporosa (MP), com diâmetros de poros maiores e mais espaçados entre si, ou seja, o que possivelmente contribuiu para uma porosidade superficial menor.

6.4. Molhabilidade do substrato e dos filmes de TiO₂

A Figura 31 apresenta qualitativamente a diferença expressiva entre o ângulo de contato formado sobre o substrato da liga e os ângulos formados sobre os filmes nanotubular (TNT) e microporoso (MP). Pode-se perceber aparente semelhança na molhabilidade entre os dois filmes de TNT e MP. Os valores do ângulo de contato medidos sobre o substrato da liga Ti6Al4V, antes do tratamento eletroquímico, não chegam a caracterizar essa superfície como hidrofóbica. Contudo, o substrato

apresentou o comportamento menos hidrofílico quando comparado às amostras tratadas (elevação expressiva da molhabilidade após a formação de ambos os filmes).



Fonte: elaboração própria.

Ao se comparar quantitativamente as duas amostras recobertas (filmes de TiO₂), a camada formada por microporos (MP) se mostrou mais hidrofílica do que a camada formada por nanotubos (TNT). Porém, após se realizar uma análise estatística comparativa pelas médias (e desvios) através do teste de variância (ANOVA / Tukey), com nível de significância de 0,05, o valor-*p* obtido foi de 0,774 (*p* > 0,05), observouse que a diferença entre as médias das amostras TNT e MP não se mostrou estatisticamente significativa (Tabela 10).

Amostras	Presente Estudo	Wang <i>et al.</i> (2017)	Shin <i>et al.</i> (2011)	
Substrato Ti6Al4V	85,1 ± 1,1°	100,8°	85,5 ± 2,8°	
TNT	38,9 ± 6,8°	***	29,6 ± 2,3°	
МР	36,5 ± 8,1°	32,0°	***	

Tabela 10: Valores do ângulo de contato

Valor-p no presente estudo igual a 0,774 (p > 0,05).

Fonte: elaboração própria.

Um fator importante que contribui para o espalhamento do líquido e consequentemente o baixo ângulo de contato sobre os filmes de TiO₂ formados, é a porosidade adquirida pela superfície após o tratamento eletroquímico (LUZ *et al.* 2008). No caso dos TNTs esse fenômeno ocorre devido ao efeito da capilaridade provocado pelos mesmos, o que similarmente pode ser aplicado também aos MPs. A água depositada na superfície do material é rapidamente absorvida para dentro dos poros provocando a redução no ângulo de contato (INDIRA *et al.*, 2015). Ao se comparar o grupo TNT do presente estudo com a o trabalho de Shin *et al.* (2011),

observou-se que o segundo ((29,6 ± 2,3) graus) apresentou maior molhabilidade que o primeiro ((38,9 ± 6,8) graus) (Tabela 10). Essa diferença pode estar relacionada à espessura maior da camada de nanotubos obtida por Shin *et al.* (2011) (7 µm a 10 µm contra 0,74 µm do presente estudo), uma vez que seu diâmetro se encontra na mesma ordem de grandeza que o obtido no presente trabalho (70 nm). Os comprimentos maiores dos nanotubos de Shin *et al.* (2011) podem aumentar o efeito da capilaridade, absorvendo mais a água para dentro dos poros.

Analisando a estrutura microporosa (MP), a maior área superficial obtida por Wang *et al.*, (2017) pode ter influenciado na maior molhabilidade de seu filme (32,0°) quando comparado ao presente trabalho (36,5°) (Tabela 10). A Figura 32 apresenta de forma qualitativa a rugosidade entre os filmes microporosos (MPs) produzidos no presente trabalho (Fig. 32a) e no trabalho de Wang *et al.* (2017) (Fig. 32b). É possível visualizar a maior rugosidade aparente do filme de TiO₂ conseguido por Wang. O estudo de Xu *et al.*, (2018), mostrou que o aumento da rugosidade e ou área superficial diminuiu consideravelmente o ângulo de contato, aumentando a molhabilidade superficial de seu filme microporoso.



Figura 32: (a) filme MP do presente trabalho, (b) filme MP produzido por Wang.

Fonte: (a) elaboração própria, (b) adaptado de Wang et al. (2017).

Narayanan *et al.* (2009), também identificou uma tendência da molhabilidade aumentar com o aumento da rugosidade superficial, contudo isso não foi observado no presente estudo comparativo, uma vez que foi percebida diferença estatística entre os valores de rugosidade encontrados para o grupo de MP e TNT deste trabalho.

O diâmetro é outro fator que influencia de forma direta as características hidrofílicas da superfície do material (INDIRA *et al.*, 2015), afetando também a adesão celular sobre o mesmo (NARAYANAN *et al.* 2009). Porém, no presente estudo, não foi observada diferença na molhabilidade entre os TNTs e os MPs em função dos diâmetros obtidos, mesmo com o diâmetro desses se mostrando maiores que os diâmetros dos TNTs.

Outro item que afeta no aumento da molhabilidade do material, e a consequente diminuição do ângulo de contato, é o aumento da energia de superfície oriundo do tratamento eletroquímico (SHI *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2018). A energia de superfície é diretamente proporcional à área superficial do filme (RABÓCZKAY, 2016), que por sua vez, é influenciada de forma direta pela rugosidade e porosidade.

A explicação para o resultado estatisticamente similar na molhabilidade dos filmes produzidos pode estar talvez relacionada com a compensação entre a densidade por área da porosidade superficial e os diâmetros obtidos. Nos microporos (MPs), foi encontrada uma densidade na ordem de 10³, bem menor quando comparada aos nanotubos (TNTs), que alcançou uma ordem de 10⁶. Por sua vez, os diâmetros dos nanotubos se mostraram numa ordem de grandeza 7 vezes menor que os formados pelos microporos (MP).

6.5. Ensaio de SBF

O presente estudo buscou identificar indícios da formação de fosfato de cálcio (Ca₃(PO₄)₂), precursor da hidroxiapatita, através da identificação de fósforo (P) e cálcio (Ca) depositados na superfície do material durante o ensaio de SBF. Após o tratamento eletroquímico, os recobrimentos sobre as amostras com 10 mm de diâmetro, utilizadas para o SBF, também obtiveram aspecto visual semelhante ao das amostras com 25 mm de diâmetro utilizadas nos ensaios anteriores, verificando a reprodutibilidade do processo eletroquímico (Fig. 33).
Figura 33: Amostras: (a) substrato de Ti6Al4V, (b) amostra com TNT, (c) amostra com MP.



Fonte: elaboração própria.

O primeiro ponto a se considerar é que a deposição de fósforo (P) e cálcio (Ca) se mostrou maior sobre as amostras recobertas com TiO₂ do que sobre o substrato sem tratamento (Tabela 11). O percentual em massa desses elementos sobre o substrato não foi significativo na análise de SBF com 7 dias, chegando a no máximo cerca de 1,5 % com 28 dias de solução. Nas amostras com filme nanotubular (TNT), em 7 dias de ensaio, obteve-se um percentual inicial de P e Ca próximo de 1,5 % e com 28 dias o percentual de Ca chegou a 49 % e o P alcançou quase 23 %. Para as amostras com filme microporoso (MP), o percentual em massa, após 7 dias de SBF, foi cerca de 2 % para ambos elementos, alcançando valores entre 36 % e 30 % para o P e Ca respectivamente, após 28 dias de ensaio (Tabela 11).

SBF	SUBSTRATO		TNT		MP	
	% P	% Ca	% P	% Ca	% P	% Ca
7 Dias	0,015 ± 0,009	0,019 ± 0,009	1,31 ± 0,28	1,71 ± 0,25	2,07 ± 0,28	2,37 ± 0,39
14 Dias	0,90 ± 0,21	0,89 ± 0,22	7,30 ± 0,35	7,85 ± 0,54	13,70 ± 0,46	11,44 ± 0,50
28 Dias	1,58 ± 0,33	1,66 ± 0,32	22,85 ± 0,48	49,1 ± 1,1	35,87 ± 0,83	31,33 ± 0,74

Tabela 11: Percentual em massa da deposição de P e Ca durante ensaio de SBF.

Fonte: elaboração própria.

Outro ponto observado é que em 7 dias de SBF o percentual médio de fósforo (1,31 \pm 0,28) % depositado sobre a superfície nanotubular (TNT) se apresentou significativamente menor que o percentual médio encontrado para superfície microporosa (MP) (2,07 \pm 0,29) % (valor-*p* obtido < 0,001 no nível de significância de 0,05). Isso pode ser atribuído ao tipo de eletrólito utilizado no tratamento, que para a obtenção de MP foi o ácido fosfórico (H₃PO₄). De acordo com a literatura, eletrólitos contendo fósforo (P) e cálcio (Ca) apresentam melhores condições para nucleação de

hidroxiapatita que pode se iniciar durante o tratamento eletroquímico sobre o filme de TiO₂ formado (SOUZA, 2010; WEBSTER *et al.*, 2016) (Fig. 34).



De forma geral, a deposição de fósforo e cálcio sobre as superfícies são favorecidas pelas fases cristalinas de anatásio e rutilo formadas após o tratamento superficial. O anatásio irá promover a nucleação e o crescimento da apatita, enquanto que o rutilo melhorará sua resistência à dissolução devido à sua estrutura compacta (MUNIRATHINAM; NEELAKANTAN, 2015). O substrato sem o tratamento de anodização não se mostrou tão eficaz a essa deposição como apresentado no presente trabalho, bem como nos estudos de Hsu *et al.*, (2015) (Fig. 35).



Figura 35: Evolução da deposição de Ca e P sobre o substrato e os filmes de TNT e MP.

Fonte: elaboração própria.

Os resultados mostram que ambos os filmes, TNT ou MP, são favoráveis à deposição de fósforo (P) e cálcio (Ca) após a imersão em SBF e as imagens de ambos se mostraram bastante similares ao encontrado na literatura. Na Figura 35, com 14 dias e 28 dias respectivamente, é possível se perceber uma semelhança com a forma esférica, similar à formação de apatita (HSU *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2013b; HILARIO *et al.*, 2017; NASIRPOURI *et al.*, 2017).

6.6. Avaliação da citotoxicidade sobre o substrato e os filmes de TiO₂

No ensaio de disco-difusão em ágar constatou-se que não houve a formação do halo inibitório referente ao crescimento bacteriano ao redor das amostras (substrato, nanotubos - TNT e microporos - MP) para ambas as bactérias, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Esse resultado pode indicar que os filmes de TiO₂ das

amostras não se difundiram para o ágar e, dessa forma, não foi possível observar sua ação sobre as culturas bacterianas como ocorreu nos controles positivos (Fig. 36).

Figura 36: Ensaio disco-difusão em ágar: (a) *Escherichia coli* com antibiótico ampicilina, (b) *Staphylococcus aureus* com antibiótico tetraciclina.



Fonte: elaboração própria.

Em vista disso, avaliou-se a citotoxicidade dos filmes através do ensaio de macrodiluição e utilização da sonda resazurina como indicadora de viabilidade. As superfícies anodizadas não alteraram a densidade celular das bactérias *E. coli* e *S. aureus* quando comparadas com a superfície de amostras não tratadas (*p* > 0,05, ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*) (Fig. 37). Dessa forma, tanto as superfícies microporosas, quanto as nanoporosas não alteraram a viabilidade celular das bactérias após 24 horas de exposição. Similarmente, trabalhos publicados com superfície de titânio anodizada também mostraram compatibilidade celular desse material na presença de outras células, como fibroblastos (linhagem L929) e células pré-osteoblastos (linhagem MC3T3-E1) de camundongos (DOS SANTOS, 2013; WANG *et al.*, 2017; RANGEL, 2017). Os testes de citotoxicidade são os primeiros ensaios in vitro utilizados para prever a toxicidade de várias substâncias e materiais (ISTIFLI; HÜSUNET; ILA, 2019). Assim, no presente estudo, os dados indicam que a anodização não apresentou efeito citotóxico sobre as células testadas.



Figura 37: Viabilidade celular: (a) Escherichia coli, (b) Staphylococcus aureus. a) E.coli (b) S. aureus

6.7. Avaliação da adesão celular sobre o substrato e os filmes de TiO₂

A superfície das ligas de titânio anodizadas se caracterizam pelo aumento da rugosidade, energia livre de superfície e hidrofilicidade que contribuem para melhor molhabilidade e aderência do material implantado (TRAINI et al., 2018). Essa superfície é capaz de interagir diretamente com o microrganismo ou com macromoléculas provenientes do hospedeiro (ESCADA; NAKAZATO; CLARO, 2017). Sob esse aspecto, o estudo também avaliou a propriedade de adesão dos filmes tratados frente à bactéria Escherichia coli. Conforme a Figura 38, os substratos não tratados em contato com a suspensão bacteriana (Fig. 38a e 38b) não apresentaram células aderidas em sua superfície, enquanto que o processo de anodização favoreceu a adesão celular sobre os filmes de TiO₂. No entanto, a microporosa (MP) (Fig. 38c) apresentou células esparsas, quando comparadas às células aderidas sobre a superfície nanotubular (TNT) (Fig. 38d). Segundo os estudos conduzidos por Puckett et al. (2010) e Anselme et al. (2010), a morfologia nanotubular, devido à sua auto-organização, favorece a adesão e colonização de células. Além da autoorganização estrutural da superfície, alguns estudos precedentes também relacionavam a adesão à superfície nanotubular ao aumento da área de contato e a melhor adaptação da bactéria às porosidades semelhantes ao seu tamanho (EDWARDS; RUTENBERG, 2001).





Fonte: elaboração própria.

6.8. Ensaio de riscamento (scratch test) sobre os filmes de TiO2

O ensaio de riscamento realizado para verificação da aderência dos recobrimentos se faz importante para avaliar falhas como deformação plástica, delaminação e trincas no recobrimento. Durante seu transporte ou no procedimento cirúrgico, o implante pode estar sujeito a mecanismos de desgaste ou forças externas que podem levar ao destacamento do recobrimento, gerando resíduos indesejáveis e descaracterizando sua superfície biofuncional (DOS SANTOS, 2013).

Após o ensaio de riscamento, notou-se os primeiros defeitos com características de falhas coesivas em ambos filmes de TiO₂ produzidos (nanotubos – TNT e microporos – MP). Essas falhas são uma consequência da ação das cargas Lc₁ e apresentam

aspecto de trincas conformais. Usualmente, esses tipos de trincas se formam enquanto o revestimento tenta se adaptar ao sulco do risco durante o riscamento e ocorrem, normalmente, mais distantes do ponto inicial do ensaio. São originadas pela ação direta da deformação do revestimento pelo endentador de diamante e se apresentam na forma de trajetórias semicirculares paralelas à sua ponta e no mesmo sentido de seu movimento (ASTM-C1624, 2015). As trincas estão indicadas através das setas nas Figuras 39a e 39b e a direção do risco ocorreu da esquerda para direita das imagens.



Figura 39: Trincas conformais nos revestimentos de TiO₂: (a) nanotubular, (b) microporoso.

Fonte: elaboração própria.

Como referência ao presente estudo, a norma ASTM-C1624 (2015) apresenta um exemplo de trinca conformal resultante do teste de riscamento (Fig. 40).





Fonte: adaptado de ASTM-C1624 (2015).

Os resultados de EDS, realizados na região do sulco do risco, apresentaram elevados teores de titânio (Ti) e oxigênio (O), o que pode indicar que os filmes de TiO₂ nanotubulares (TNT) e microporosos (MP) não sofreram destacamento completo do substrato (Tabela 12).

Tabela 12: EDS no sulco do risco.

Elementos [% m/m]	Ti	0	
TNT	50,6 ± 1,9	37,9 ± 1,8	
Elementos [% m/m]	Ti	0	
МР	45,4 ± 1,7	43,6 ± 1,8	

Fonte: elaboração própria.

Através do cruzamento dos dados entre a carga normal aplicada, a força tangencial, distância e a imagem do risco através de MEV é possível determinar o momento em que se inicia a delaminação dos filmes sobre o substrato e a carga crítica em que isso ocorre. À medida em que se aumenta a força normal aplicada e a distância percorrida no teste, os eventos relacionados aos danos no revestimento ocorrem com maior frequência e severidade, podendo ser detectados pela alteração do comportamento da curva de carga normal por força tangencial obtida (ASTM-C1624, 2015).

A Figura 41 apresenta as curvas do ensaio de riscamento para as superfícies com filme nanotubular (TNT) e microporoso (MP) juntamente com seus respectivos deslocamentos praticados durante os testes. O filme de TNT inicia sua delaminação quando a carga normal atinge o valor médio de $(6,24 \pm 0,20)$ N (Fig. 41a) a uma distância aproximada de 6,2 mm do início do risco (Fig. 41c). Para o filme de MP, sua delaminação se inicia no instante em que a carga normal alcança o valor médio de $(8,34 \pm 0,20)$ N (Fig. 41b) a uma distância aproximada de 8,3 mm do início do risco (Fig. 41d). Esses pontos estão indicados por setas nas respectivas figuras.





Utilizando o Teste *t* para duas amostras, pôde-se concluir que a média das cargas Lc₁ do grupo TNT é significativamente menor que a média das cargas Lc₁ do grupo MP (valor-*p* obtido < 0,001 no nível de significância de 0,05). A explicação para que o filme TNT apresente uma carga Lc₁ mais baixa que o filme MP pode estar na espessura menor do primeiro filme em relação ao segundo e na presença de flúor no eletrólito para formação de TNT. Alencar (2002), apresenta em seus estudos que a força de adesão entre o revestimento de TiO₂ e o substrato de Ti6Al4V é diretamente

proporcional ao quadrado da espessura do revestimento ($F = -K\delta^2$ onde, K é um fator de proporcionalidade e δ é a espessura do revestimento). Além disso, eletrólitos fluorados promovem uma interface entre os TNTs e o substrato rica em flúor, o que deixa a adesão entre ambos mais enfraquecida (*YU et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2018). Os íons de flúor nessa região causam uma corrosão lenta formando defeitos estruturais na base dos nanotubos (ARRUDA, 2018).

A carga normal utilizada no presente estudo (0 a 10 N) não foi suficiente para alcançar as cargas críticas Lc₂ e Lc₃ responsáveis, respectivamente, pelo primeiro ponto de exposição do substrato; e pelo total destacamento do revestimento com exposição total do substrato (GONÇALVES, 2012).

Alguns trabalhos utilizados como referência apresentaram valores de cargas críticas bastante inferiores aos encontrados na presente pesquisa, tanto para o filme microporoso (MP), quanto para o filme nanotubular (TNT) (Tabela 13). No filme microporoso produzido por dos Santos (2013), o ensaio de riscamento foi também realizado até a carga crítica Lc₁, cujo valor encontrado foi de (279 ± 46) mN. Uma possível explicação para grande diferença em relação à presente pesquisa Lc₁ = (8,34 ± 0,20) N pode estar no tempo de anodização, que foi de 60 minutos,12 vezes maior que o utilizado no atual trabalho (5 minutos). Algumas pesquisas indicam que à medida que o tempo se prolonga, o filme produzido pode se tornar frágil delaminandose mais facilmente do substrato (SANTOS *et al.*, 2017).

A Tabela 13 compila os resultados encontrados neste estudo para as cargas críticas versus a espessura dos filmes, bem como os parâmetros de obtenção dos filmes, comparando com achados de outros autores. A comparação destes dados com a literatura, reforçam a premissa de uma sensível melhora da adesão prática para os filmes obtidos neste estudo.

Filme de TiO ₂ sobre substrato Ti6Al4V		Tensão [V]	Tempo [min]	Eletrólito	Espessura [µm]	Cargas Críticas Alcançadas
Presente Estudo	MP	174	5	H ₃ PO ₄ (1,0 mol/L)	3,01 ± 0,58	Lc ₁ : 8,34 ± 0,20 N
Santos (2013)	MP	280	60	H ₂ SO ₄ (0,25 mol/L) + H ₃ PO ₄ (0,25 mol/L)	3,80 ± 0,90	Lc1: 278,6 ± 45,6 mN
Presente Estudo	TNT	20	90	NaF (0,5% p/p) + C ₆ H ₈ O ₇ (0,1 mol/L)	0,74 ± 0,10	Lc ₁ : 6,24 ± 0,20 N
Santos (2014)	TNT	15	60	HF (0,3% p/p) + H₃PO₄ (1,0 mol/L)	0,37 ± 0,04	Lc₃: 9,6 mN

Tabela 13: Resumo comparativo com a literatura.

Fonte: elaboração própria.

No caso da camada nanotubular elaborada por Santos (2014), o resultado do ensaio de riscamento alcançou a carga crítica Lc₃, na ordem de 9,6 mN. Comparando-se com o presente estudo ($6,24 \pm 0,20$) N, o fator que mais chama a atenção para uma possível justificativa na diferença entre as cargas críticas alcançadas é a espessura dos revestimentos. A espessura obtida por Santos (2014) ($0,37 \pm 0,04$) µm é duas vezes menor que o conseguido na atual pesquisa ($0,74 \pm 0,10$) µm. Além de Alencar (2002), outros trabalhos mais recentes também mostram que o aumento na espessura do filme reflete na elevação da carga crítica (ALVES; NICODEMOS; ZAVAGLIA, 2012; HU *et al.*, 2019).

7. CONCLUSÕES

Como resultado do processamento dos filmes de TiO₂, conclui-se que os parâmetros investigados permitiram obter tanto filmes nanotubulares - TNT (C₆H₈O₇ 0,1 mol/L + NaF 0,5 % p/p; 20 V CC; 90 minutos), como filmes microporosos - MP (H₃PO₄ 1,0 mol/L; 174 V CC; 5 minutos) com razoável reprodutibilidade a partir de um mesmo reator construído para essa pesquisa, mostrando a versatilidade desse processamento.

A caracterização físico-química revelou a presença das fases $\alpha \in \beta$ no substrato, confirmando se tratar da liga Ti6Al4V (ASTM F136, Ti grau 5 / α + β). Já a formação dos filmes pôde ser confirmada pela presença de anatásio e rutilo na superfície do material.

A caracterização morfológica permitiu constatar a distribuição auto-organizada dos TNTs. Por sua vez, os MPs apresentaram uma formação porosa mais aleatória e espaçada. Identificou-se também que a espessura e diâmetro dos filmes produzidos se apresentaram similares à literatura.

Quanto à rugosidade média (Ra), foi possível constatar que os tratamentos superficiais são capazes de aumenta-la consideravelmente em relação ao valor inicial encontrado para o substrato.

Foi possível identificar que os tratamentos melhoraram significativamente a molhabilidade das superfícies (Ti6Al4V sem tratamento: 85°; TNT: 38,9°; MP: 36,5°), o que pode contribuir para a indução e melhoramento da bioatividade da liga Ti6Al4V.

O ensaio de *SBF* permitiu observar que ambos os filmes de TiO₂ são propícios à deposição de cálcio (Ca) e fósforo (P) em sua superfície após 28 dias de teste. A liga Ti6Al4V sem tratamento superficial obteve cerca de 1,6 % m/m de Ca e P. O grupo TNT alcançou aproximadamente 49 % m/m de Ca e 23 % m/m de P. E a superfície

MP atingiu cerca de 31 % m/m de Ca e 36 % m/m de P. Verificou-se também que o eletrólito contendo fósforo pode favorecer previamente sua deposição durante o tratamento eletroquímico para a formação dos filmes de TiO₂.

A avaliação de citotoxicidade realizada com bactérias através de disco-difusão em ágar e macrodiluição demonstrou que, tanto os filmes obtidos, quanto o substrato sem tratamento, apresentaram indicativos de não citotoxicidade. Ambos os filmes são propícios à adesão celular. Porém a organização topográfica dos TNTs é mais favorável nesse quesito.

O ensaio de riscamento permitiu verificar que os parâmetros de processamento como: tipo e concentração do eletrólito; e o tempo, podem afetar diretamente a adesão dos filmes, sejam eles MPs ou TNTs. Constatou-se ainda que a morfologia desses filmes também pode influenciar em sua adesão ao substrato. Foi possível constatar através das cargas alcançadas (TNT: $Lc_1 \approx 6 N e MP \approx 8 N$) que os filmes sofreram apenas falhas coesivas, apresentando trincas superficiais e demonstrando estarem fortemente aderidos ao substrato. Através da identificação de elevado percentual de titânio e oxigênio no sulco do risco, verificou-se que não houve destacamento dos filmes em relação à liga Ti6Al4V.

Dessa forma, os resultados experimentais apresentados nesse trabalho indicam haver potencial para a aplicação de ambos os filmes como futuras opções de seleção no tratamento superficial da liga Ti6Al4V para utilização como biomaterial, sobretudo em dispositivos implantáveis destinados ao reparo ósseo. A utilização de linhagens de células osteogênicas sobre essas superfícies (continuação dos estudos de adesão celular), podem possivelmente contribuir para otimizar o processo terapêutico de osteocondução, ou seja, de elevação da bioatividade dos implantes, ligados ao Estado da Arte na Engenharia de Reabilitação.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o perfil dos filmes produzidos através de caracterização realizada em Microscópio Eletrônica de Varredura (MEV) equipado com Feixe de Íon Focalizado (*Focused Ion Beam – FIB*);
- Avaliar quantitativamente a microtopografia e nanotopografia dos filmes através de caracterização realizada em Microscópio de Força Atômica (*Atomic Force Microscope – AFM*);
- Avaliar a dureza dos filmes através de ensaios para medir a microdureza e a nanodureza;
- Avaliar a resistência ao desgaste dos filmes através de ensaios para medir a microabrasão e a nanoabrasão;
- Avaliar a citotoxicidade e viabilidade celular *in vitro* com o uso de células préosteoblásticas;
- Avaliar a biocompatibilidade através do ensaio com a Membrana Cório-Alantoide (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane – HET-CAM);
- Avaliar a biocompatibilidade com ensaios in vivo;
- Realizar um estudo dos filmes após tratamento térmico de recozimento para verificar sua resistência ao desgaste, adesão ao substrato e biocompatibilidade.

REFERÊNCIAS

AFONSO, A. S. Interação entre Biomateriais e Tecido Ósseo. 1998. 213 p. Tese (Doutorado em Biomateriais Metálicos) - Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Porto, 1998.

ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Oral Implant Surfaces: Part 1 - review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. **International Journal of Prosthodontics**, Sweden, v. 17, n. 5, p. 536–543, sep./oct. 2004.

ALENCAR, A. Estudo das modificações na superfície do Ti cp titânio comercialmente puro e da liga Ti-6AI-4V usados como biomateriais utilizandose deposição por plasma spray. 2002. 71 p. Tese (Doutorado em Química) -Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2002.

ALVES, H. R. Avaliação da aderência de recobrimentos de biomateriais produzidos por aspersão térmica a plasma atmosférico em aço inoxidável AISI 316L utilizando-se ensaio de riscamento e ensaio de tração. 2010. 280 p. Teses (Doutorado em Engenharia de Materiais) - Rede Temática em Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, 2010.

ALVES, H. R.; NICODEMOS, S.; ZAVAGLIA, C. A. C. Avaliação da aderência em recobrimetos de fosfatos de cálcio produzidos por aspersão térmica a plasma atmosférico, utilizando-se o ensaio de tração e o ensaio de riscamento. *In*: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, 7., 2012, Natal. Anais [...] Belo Horizonte-MG: Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2012.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, Mulhouse, v. 21, n. 7, p. 667–681, apr. 2000.

ANSELME, K.; PONCHE, A.; BIGERELLE, M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: Biological aspects. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, Mulhouse, v. 224, n. 12, p. 1487–1507, aug. 2010.

ANTONINI, L. M. Avaliação do efeito de superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V na indução da osteogênese de células-tronco mensequimais derivadas de medula óssea murina. 2016. 136 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2016.

ANVISA - Agênca Nacional de Vigilância Sanitária. **M2-A8:** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Wayne: NCCLS, 2003. 58 p.

ANVISA - Agênca Nacional de Vigilância Sanitária. M7-A6: Methods for dilution

antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne: NCCLS, 2003. 55 p.

ARAÚJO, T. Controlo estatístico do processo de anodização, na empresa STA – Sociedade Transformadora de Alumínios, SA. 2012. 77 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, 2012.

ARRUDA, P. M. DE. Membranas de nanotubos de TiO₂ visando aplicações na fabricação de sensores e células solares. 2018. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

ASTM - American Society for Testing and Materials. **ASTM C1624-05**: standard test method for adhesion strength and mechanical failure modes of ceramic by quantitative single point sratch testing. West Conshohocken: ASTM International, 2015. 29 p.

ASTM - American Society for Testing and Materials. **ASTM F136-13**: standard specification for wrought Titanium-6Aluminum-4Vanadium ELI (Extra Low Interstitial) alloy for surgical implant applications. West Conshohocken: ASTM International, 2015. 5 p.

ASTM - American Society for Testing and Materials. **ASTM F67-13:** standard specification for unalloyed titanium, for surgical implant applications. West Conshohocken: ASTM International, 2017, 5 p.

BAUER, S.; KLEBER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes: Tailoring the geometry in H₃PO₄/HF electrolytes. **Electrochemistry Communications**, Erlangen, v. 8, n. 8, p. 1321–1325, jul. 2006.

BIGERELLE, M. *et al.* Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: A new process to increase in vitro human osteoblast response. **Biomaterials**, Lille, v. 23, n. 7, p. 1563–1577, jan. 2002.

BRÅNEMARK, R. *et al.* Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, Gothenburg, v. 38, n. 2, p. 175–181, mar./apr. 2001.

CAO, S. *et al.* On the interfacial adhesion between TiO₂ nanotube array layer and Ti substrate. **Langmuir**, Nanjing, v. 34, n. 46, p. 13888–13896, oct. 2018.

CASTELLAN, G. Fundamentos de Físico-Química. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora S.A., 1995. 552 p.

CHAKRAVORTY, N. *et al.* The microRNA expression signature on modified titanium implant surfaces influences genetic mechanisms leading to osteogenic differentiation. **Acta Biomaterialia**, Queensland, v. 8, n. 9, p. 3516–3523, may. 2012.

CHALLA, V. S. A.; MALI, S.; MISRA, R. D. K. Reduced toxicity and superior cellular response of preosteoblasts to Ti-6AI-7Nb alloy and comparison with Ti-6AI-4V.

Journal of Biomedical Materials Research - Part A, Louisiana, v. 101 A, n. 7, p. 2083–2089, jan. 2013.

CHAVES, J. M. *et al.* Characterization of the structure, thermal stability and wettability of the TiO₂ nanotubes growth on the Ti-7.5Mo alloy surface. **Applied Surface Science**, São Paulo, v. 370, p. 76–82, oct. 2016.

CHEN, S. *et al.* Morphology evolution of TiO₂ nanotubes by a slow anodization in mixed electrolytes. **Surface and Coatings Technology**, Nanjing, v. 231, p. 257–264, apr. 2017.

CUI, X. *et al.* Effect of hot water and heat treatment on the apatite-forming ability of titania films formed on titanium metal via anodic oxidation in acetic acid solutions. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Shenyang, v. 19, n. 4, p. 1767–1773, jan. 2008.

CUI, X. *et al.* Preparation of bioactive titania films on titanium metal via anodic oxidation. **Dental Materials**, Shenyang, v. 25, n. 1, p. 80–86, jan. 2009.

DE JONGE, L. T. *et al.* Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. **Pharmaceutical Research**, Nijmegen, v. 25, n. 10, p. 2357–2369, oct. 2008.

DE LIMA, G. G. *et al.* Mechanical properties of anodic titanium films containing ions of Ca and P submitted to heat and hydrothermal treatment. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Athlone, v. 64, p. 18–30, jul. 2016.

DELIGIANNI, D. D. *et al.* Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6AI-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. **Biomaterials**, Patras, v. 22, n. 11, p. 1241–1251, jan. 2001.

DOS SANTOS, A. **Produção de filmes de óxido de titânio por oxidação anódica a microarco**. 2008. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

DOS SANTOS, A. Óxido de titânio produzido por oxidação anódica a microarco para superfície de implantes. 2013. 100 p. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

EDWARDS, K. J.; RUTENBERG, A. D. Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. **Chemical Geology**, Massachusetts, v. 180, n. 1–4, p. 19–32, oct. 2001.

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

FERNANDES, F. A. P. Estudo do comportamento tribológico das ligas Ti-13Nb-13Zr e Ti-6AI-4V ELI para aplicação biomédica. 2007. 133 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Departamento de Engenharia de Materiais, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

FRANCATTO, P. Reatividade das nanopartículas de dióxido de titânio com a superfície modificada por grupos peróxo. 2016. 59 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

FROES, F. H. **Titanium: physical metallurgy, processing, and applications**. 1. ed. Ohio: ASM International, 2015, 404 p.

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

GOMES, L. S. M. Biomateriais em artroplastia de quadril: propriedades, estrutura e composição. *In*: GOMES, L. S. M. **O Quadril**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. cap 13, p. 121–143.

GONÇALVES, F. DE A. **Caracterização de revestimento de titânia aplicado por aspersão térmica a plasma em liga Ti-6AI-4V para aplicação em implantes**. 2012. 97 p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

GONZALEZ GALDOS, M. V. *et al.* Dual-surface modification of titanium alloy with anodizing treatment and bioceramic particles for enhancing prosthetic devices. **Journal of Materials Science**, Mar del Plata, v. 52, n. 15, p. 9151–9165, apr. 2017.

HANAWA, T. In vivo metallic biomaterials and surface modification. **Materials Science** and Engineering **C**, Tokyo, v. 267, n. 2, p. 260–266, jul. 1999.

HANAWA, T. Metal ion release from metal implants. **Materials Science and Engineering C**, Tokyo, v. 24, n. 6-8, p. 745–752, oct. 2004.

HILARIO, F. *et al.* Influence of morphology and crystalline structure of TiO₂ nanotubes on their electrochemical properties and apatite-forming ability. **Electrochimica Acta**, Grenoble, v. 245, p. 337–349, may. 2017.

HSU, H. C. *et al.* Fabrication of nanotube arrays on commercially pure titanium and their apatite-forming ability in a simulated body fluid. **Materials Characterization**, Taiwan, v. 100, p. 170–177, jan. 2015.

HU, N. *et al.* Homogeneous anodic TiO_2 nanotube layers on Ti-6AI-4V alloy with improved adhesion strength and corrosion resistance. **Advanced Materials Interfaces**, Shenzhen, v. 6, n. 12, p. 1–12, apr. 2019.

HUANG, Y. *et al.* A prospective material for orthopedic applications: Ti substrates coated with a composite coating of a titania-nanotubes layer and a silver-manganese-doped hydroxyapatite layer. **Ceramics International**, Zhangjiakou, v. 44, n. 5, p. 5528–5542, jan. 2018.

HWANG, K. S. *et al.* Effect of annealing titanium on in vitro bioactivity. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Gwangju, v. 14, n. 6, p. 521–529, jun. 2003.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE _ Agência de Notícias _ Em 2017, expectativa de vida era de 76 anos**. Disponível em: https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/23200-em-2017-expectativa-de-vida-era-de-76-anos. Acesso em: 11 jan. 2019.

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

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 23317:2014**. Implants for surgery: in vitro evaluation for apatite forming ability of implant materials. Geneva: ISO Standards, 2014. 13 p.

IOF - International Osteoporosis Foundation. **Facts and Statistics**. Disponível em: https://www.iofbonehealth.org/facts-statistics. Acesso em: 11 jan. 2019.

IZMIR, M.; ERCAN, B. Anodization of titanium alloys for orthopedic applications. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, Ankara, v. 13, n. 1, p. 28–45, jan. 2019.

JIMBO, R. *et al.* Protein adsorption to surface chemistry and crystal structure modification of titanium surfaces. **Journal of Oral and Maxillofacial Research**, Malmö, v. 1, n. 3, p. 1–9, sep. 2010.

KARAMBAKHSH, A. *et al.* Pure commercial titanium color anodizing and corrosion resistance. **Journal of Materials Engineering and Performance**, Tehran, v. 20, n. 9, p. 1690–1696, dec. 2011.

KIM, K. *et al.* Surface characteristics and bioactivity of an anodized titanium surface. **Journal of Periodontal and Implant Science**, Gwangju, v. 43, n. 4, p. 198–205, aug. 2013.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, Aichi, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, jan. 2006.

KOKUBO, T.; YAMAGUCHI, S. Bioactive titanate layers formed on titanium and its alloys by simple chemical and heat treatments. **The Open Biomedical Engineering Journal**, Aichi, v. 9, n. Suppl 1-M2, p. 29–41, feb. 2015.

KUROMOTO, N. K.; SIMÃO, R. A.; SOARES, G. A. Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages. **Materials Characterization**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 2, p. 114–121, jan. 2007.

LEWANDOWSKA, Ż. et al. The evaluation of the impact of titania nanotube covers morphology and crystal phase on their biological properties. Journal of Materials

Science: Materials in Medicine, Torun, v. 26, n. 4, p. 1–12, mar. 2015.

LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium allowys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering R: Reports**, Shanghai, v. 47, n. 3–4, p. 234–239, nov. 2004.

LÜTJERING, G.; WILLIAMS, J. C. **Engineering materials and processes: titanium**. 2. ed. Leipzig: Springer, 2007. 442 p.

LUZ, A. P.; PANDOLFELLI, V. C.; RIBEIRO, S. Review article: use of the wettability in the investigation of the corrosion behaviour of the refractory materials. **Ceramica**, São Carlos, v. 54, n. 330, p. 174–183, jun. 2008.

MÄNDL, S.; RAUSCHENBACH, B. Improving the biocompatibility of medical implants with plasma immersion ion implantation. **Surface and Coatings Technology**, Leipzig, v. 156, p. 276–283, jul. 2002.

MENDONÇA, G. *et al.* Advancing dental implant surface technology: from micron- to nanotopography. **Biomaterials**, Brasília, v. 29, n. 28, p. 3822–3835, oct. 2008.

MINISTÉRIO DA SAUDE. **Com obesidade em alta, pesquisa mostra brasileiros iniciando vida mais saudável**. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/43604-apesar-de-obesidadeem-alta-pesquisa-mostra-brasileiros-mais-saudaveis>. Acesso em: 17 jan. 2020.

MIZIARA, I. D. *et al.* Acidentes de motocicletas e sua relação com o trabalho: revisão da literatura. **Saúde, Ética & Justiça**, São Paulo, v. 19, n. 11, p. 52–59, dez. 2014.

MONNERAT, P.; LIMA, L. V. P. C.; ALIAGA, L. C. R. Estudo dos implantes metálicos para coluna vertebral. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 22., 2016, Natal. Anais [...]. Natal: CBECiMat, 2016. trabalho 308-005. Disponível em: http://www.metallum.com.br/22cbecimat/anais/PDF/308-005.pdf> Acesso em: 20 jan. 2019.

MUNIRATHINAM, B.; NEELAKANTAN, L. Titania nanotubes from weak organic acid electrolyte: fabrication, characterization and oxide film properties. **Materials Science and Engineering C**, Chennai, v. 49, p. 567–578, jan. 2015.

NARAYANAN, R.; KWON, T. Y.; KIM, K. H. TiO₂ nanotubes from stirred glycerol/NH₄F electrolyte: roughness, wetting behavior and adhesion for implant applications. **Materials Chemistry and Physics**, Daegu, v. 117, n. 2–3, p. 460–464, jun. 2009.

NASIRPOURI, F. *et al.* Tuning surface morphology and crystallinity of anodic TiO₂ nanotubes and their response to biomimetic bone growth for implant applications. **Surface and Coatings Technology**, Tabriz, v. 315, p. 163–171, feb. 2017.

NOVAES, A. B. *et al.* Influence of implant surfaces on osseointegration. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 6, p. 471–481, nov. 2010.

OLIVEIRA, D. P. et al. Osteoblasts behavior on chemically treated commercially pure

titanium surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, São Carlos, v. 102, n. 6, p. 1816–1822, jan. 2014.

ONU - Organização das Nações Unidas. **OMS: expectativa de vida sobe 5 anos de 2000 a 2015 no mundo, mas desigualdades persistem | ONU Brasil**. Disponível em: ">https://nacoesunidas.org/oms-expectativa-de-vida-sobe-5-anos-de-2000-a-2015-no-mundo-mas-desigualdades-persistem/>">https://nacoesunidas.org/oms-expectativa-de-vida-sobe-5-anos-de-2000-a-2015-no-mundo-mas-desigualdades-persistem/>">https://nacoesunidas.org/oms-expectativa-de-vida-sobe-5-anos-de-2000-a-2015-no-mundo-mas-desigualdades-persistem/>">https://nacoesunidas.org/oms-expectativa-de-vida-sobe-5-anos-de-2000-a-2015-no-mundo-mas-desigualdades-persistem/>">https://nacoesunidas.org/oms-expectativa-de-vida-sobe-5-anos-de-2000-a-2015-no-mundo-mas-desigualdades-persistem/

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Obesidade entre crianças e adolescentes aumentou dez vezes em quatro décadas, revela novo estudo do Imperia College London e da OMS**. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5527:ob esidade-entre-criancas-e-adolescentes-aumentou-dez-vezes-em-quatro-decadas-revela-novo-estudo-do-imperial-college-london-e-da-oms&Itemid=820>. Acesso em: 1 nov. 2019.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. DE M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais; fundamentos e aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538 p.

OSHIDA, Y. **Bioscience and bioengineering of titanium materials**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2007. 432 p.

PAHO - Pan American Health Organization. **Health in the americas+ - summary: regional outlook and country profiles**. Washington: Scientific and Technical Publication, 2017. n. 642, 244 p.

PATTANAYAK, D. K. *et al.* Apatite-forming ability of titanium in terms of pH of the exposed solution. **Journal of the Royal Society Interface**, Kasugai, v. 9, n. 74, p. 2145–2155, mar. 2012.

PISZCZEK, P. *et al.* Biocompatibility of titania nanotube coatings enriched with silver nanograins by chemical vapor deposition. **Nanomaterials**, Torun, v. 7, n. 9, p. 1–274, sep. 2017.

POURHASHEM, S.; AFSHAR, A. Double layer bioglass-silica coatings on 316L stainless steel by sol-gel method. **Ceramics International**, Tehran, v. 40, n. 1 PART A, p. 993–1000, jan. 2014.

PRADO, D. G. Estudo do comportamento do titânio recoberto com apatita e dopado com nanopartícula de prata e óleo essencial. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2019.

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

RABÓCZKAY, T. **Físico-química de interfaces**. 1. ed. São Paulo: Edusp, 2016, 208 p.

RADTKE, A. et al. Bioactivity studies on titania coatings and the estimation of their

usefulness in the modification of implant surfaces. **Nanomaterials**, Torun, v. 7, n. 4, p. 1–90, apr. 2017.

RANGEL, A. L. R. **Modificação da superfície da liga Ti15Mo após crescimento de nanotubos de TiO₂ a partir da formação de filmes de polímeros bioativos**. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2017.

ROSA, M. B. *et al.* The influence of surface treatment on the implant roughness pattern. **Journal of Applied Oral Science**, Campinas, v. 20, n. 5, p. 550–555, aug. 2012.

RUIZ, G. C. M. Formação biomimética de fosfatos de cálcio sobre superfície de titânio utilizando-se filmes de Langmuir-Blodgett: influência da incorporação de colágeno nas matrizes. Dissertação (Mestrado e Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Departamento de Químca, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

SÁENZ, J. A. O. Estudio biotribológico de implantes de cadera metal-metal modificados superficialmente. Tesis (Doctorado en Ingeniería de Materiales) - Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, 2013.

SALIH ISTIFLI, E.; TAHIR HÜSUNET, M.; BASRI ILA, H. Cell division, cytotoxicity, and the assays used in the detection of cytotoxicity. *In*: ISTIFLI SALIH, E.; ILA, B. H. **Cytotoxicity - definition, identification and cytotoxic compounds**. London: IntechOpen, 2019. cap 6, p. 1–19.

SANTOS, E. *et al.* Effect of anodizing time on the mechanical properties of porous titania coatings formed by micro-arc oxidation. **Surface and Coatings Technology**, Volta Redonda, v. 309, p. 203–211, jan. 2017.

SANTOS, L. S. Obtenção e caracterização morfológica, estrutural, mecânica e de molhabilidade de nanotubos de TiO₂ para aplicação em biomateriais. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SHI, X. LING *et al.* Effects of electrolytic concentration on properties of micro-arc film on Ti6Al4V alloy. **Mining Science and Technology**, Jiangsu, v. 19, n. 2, p. 220–224, jan. 2009.

SHIN, D. H. *et al.* Wettability changes of TiO₂ nanotube surfaces. **Nanotechnology**, Seoul, v. 22, n. 31, jul. 2011.

SILVA, P. F. DA. Introdução à corrosão e proteção das superfícies metálicas. 1. ed. Belo Horizonte: Imprensa Universitária da UFMG, 1981. 357 p.

SILVA, L. DE A. Obtenção e caracterização de filmes de TiO₂ por tratamento eletroquímico anódico sobre a liga Ti-6AI-4V. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Departamento de Engenharia de Materiais, Centro Federal

de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

SOUZA, G. B. DE. Caracterizações físicas, químicas e de bioatividade de superfícies de titânio modificadas para aplicação biomédica. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Setor de Tecnologia e Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SUL, Y. T. *et al.* The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. **Medical Engineering and Physics**, Göteborg, v. 23, n. 5, p. 329–346, apr. 2001.

SZAJNMAN, S. H. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1bisphosphonates derived from fatty acids against trypanosoma cruzi targeting farnesyl pyrophosphate synthase. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, Rohtak, v. 15, n. 21, p. 4685–4690, feb. 2018.

TADDEI, E. B. *et al.* Age-hardening of Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy for orthopaedic implants. **Materials Research**, São José dos Campos, v. 10, n. 3, p. 289–292, jun. 2007.

TOMASTIK, J. *et al.* On the importance of combined scratch/acoustic emission test evaluation: SiC and SiCN thin films case study. **Coatings**, Olomouc, v. 8, n. 5, p. 1–15, may. 2018.

TRAINI, T. *et al.* The surface anodization of titanium dental implants improves blood clot formation followed by osseointegration. **Coatings**, Chieti, v. 8, n. 7, p. 1–14, jul. 2018.

WANG, Y. *et al.* Osteogenic potential of a novel microarc oxidized coating formed on Ti6Al4V alloys. **Applied Surface Science**, Nanchang, v. 412, p. 29–36, mar. 2017.

WEBSTER, T. J. *et al.* Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. **Journal of Biomedical Materials Research**, Troy, v. 51, n. 3, p. 475–483, jan. 2000.

WEBSTER, T. J.; YAO, C. Anodization: a promising nano modification technique of titanium-based implants for orthopedic applications. *In*: AHMED, W.; JACKSON, M. J. **Surgical Tools and Medical Devices**. 2. ed. Providence: Springer International Publishing, 2016. cap. 2, p. 55–80.

WHO - World Health Organization. **Global plan for the Decade of Action for Road Safety 2011-2020**. 2018. Geneva: World Health Organization, Disponível em: https://nacoesunidas.org/campanha/seguranca-transito/. Acesso em: 14 jun. 2020.

WIGHTON, K. Average life expectancy set to increase by 2030. Disponível em: http://www3.imperial.ac.uk/newsandeventspggrp/imperialcollege/newssummary/news_21-2-2017-15-33-52>. Acesso em: 11 jan. 2019.

XIE, L. *et al.* A facile one-step anodization treatment to prepare multi-level porous titania layer on titanium. **Materials Letters**, Chengdu, v. 72, p. 141–144, jan. 2012.

XING, J. *et al.* Time dependence of growth and crystallization of anodic titanium oxide films in potentiostatic mode. **Corrosion Science**, Guangzhou, v. 75, n. 22, p. 212–219, jun. 2013.

XU, L. *et al.* Effect of oxidation time on cytocompatibility of ultrafine-grained pure Ti in micro-arc oxidation treatment. **Surface and Coatings Technology**, Zhenjiang, v. 342, n. February, p. 12–22, feb. 2018.

YANG, B. *et al.* Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. **Biomaterials**, Sichuan, v. 25, n. 6, p. 1003–1010, jan. 2004.

YU, D. *et al.* Facile method to enhance the adhesion of TiO₂ nanotube arrays to Ti substrate. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Nanjing, v. 6, n. 11, p. 8001–8005, may. 2014.

ZHANG, P. *et al.* Effect of Ti-OH groups on microstructure and bioactivity of TiO₂ coating prepared by micro-arc oxidation. **Applied Surface Science**, Guangzhou, v. 268, p. 381–386, jan. 2013.

ZHOU, X. *et al.* Anodic TiO₂ nanotube layers: Why does self-organized growth occur - A mini review. **Electrochemistry Communications**, Erlangen, v. 46, p. 157–162, jul. 2014.