

Estudo comparativo entre filmes microporosos e nanoporosos de TiO₂ produzidos pelo processo eletroquímico de anodização sobre a liga Ti6Al4V

Comparative study between microporous and nanoporous TiO₂ layer produced by the electrochemical anodization process on the Ti6Al4V alloy

Marcus Vinícius Marques Hott¹, Kátia Michelle Freitas¹,
Lorena de Azevedo Silva¹, Camila de Lima Cruz¹,
Sidney Nicodemos da Silva¹

¹ Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Materiais – POSMAT/CEFET-MG – Av. Amazonas, 5253, Bairro Nova Suíça, CEP: 30.421-169, Belo Horizonte, MG, Brasil.
e-mail: marcushott@yahoo.com.br, katia.katinhaunifal@gmail.com, lorenadeazevedo@gmail.com, camilalc98@hotmail.com, sidneynicodemos@yahoo.com.br

RESUMO

Nos últimos anos as técnicas voltadas para modificação superficial dos materiais utilizados para implantes na substituição e/ou reconstituição óssea têm se aprimorado cada vez mais com o intuito de potencializar suas propriedades osteoindutivas e osteocondutoras, melhorando sua osteointegração. 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 distintos de TiO₂, com características microporosas (MP) e nanoporosas (NP), a fim de serem avaliados morfológicamente e biologicamente. Os filmes MP foram obtidos a partir da anodização com eletrólito de H₃PO₄ (1,0 mol/L), aplicação de potencial de 174 V CC, durante 5 minutos; e os filmes NP foram produzidos a partir da anodização com eletrólito de C₆H₈O₇ (0,1 mol/L) + NaF (0,5 % p/p), aplicação de potencial 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 NPs alcançaram um valor médio de 73 nm em seu diâmetro, organizados como estruturas nanotubulares paralelas entre si. A camada de NP se mostrou mais rugosa que a MP. Ambos os filmes obtiveram características hidrofílicas na medição do ângulo de contato. 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 NPs 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 morfológicamente mais favorável sobre a superfície nanoporosa.

Palavras-chave: Filme de TiO₂, microporos, nanoporos, oxidação anódica, Ti6Al4V.

ABSTRACT

In recent years, techniques aimed at superficial modification of materials used for implants in bone replacement and/or reconstitution have been increasingly improved in order to enhance their osteoinductive and osteoconductive properties, improving their osteointegration. In this work, the surface of the Ti6Al4V 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 nanoporous (NP) characteristics, were produced in order to be evaluated morphologically 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 NP 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 morphological and chemical characterization was performed by Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive Spectroscopy (SEM / EDS), X Ray Diffraction (XRD) and X Ray Fluorescence (XRF). The MPs reached an approximately average diameter of 0.49 μm , randomly distributed on the substrate and the NPs got an average diameter of 73 nm, aligned like parallel nanotubular structures to each other. The NP layer showed to be rougher than the MP. Both films obtained hydrophilic characteristics when measuring the contact angle. 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 NPs 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 nanoporous surface.

Keywords: Anodic oxidation, microporous, nanoporous, Ti6Al4V, TiO₂ layer.

1. INTRODUÇÃO

A fina camada de dióxido de titânio (TiO₂), naturalmente passivada sobre a superfície do titânio e suas ligas, é um dos principais fatores que contribuem para que esse material se posicione no rol dos biomateriais aplicáveis a implantes ortopédicos e dentários. Essa camada confere à superfície do titânio características como estabilidade química e não toxicidade, ideais para esse tipo de aplicação [1]. Por outro lado, esse fino filme de óxido nativo não apresenta boas propriedades para proporcionar resposta celular (efeito da bioatividade) no sentido de auxiliar na formação natural de fosfato de cálcio (apatita) e por conseguinte garantir uma boa osteointegração [2].

O mecanismo de nucleação de hidroxiapatita sobre a superfície do titânio e suas ligas foi proposto por KOKUBO e YAMAGUCHI [3] em função do pH da solução utilizada para o tratamento superficial. Após se realizar o tratamento superficial de um substrato a base de titânio em uma solução ácida, a nova camada de óxido formada (TiO₂) fica adsorvida com radicais ácidos. Durante o ensaio de SBF, esses radicais irão se dissociar produzindo um ambiente ácido nessa camada. Os estudos de KOKUBO e YAMAGUCHI [3] constataram ainda, através da medição do potencial Zeta, que esse ambiente ácido proporciona uma carga superficial positiva no material. Durante o ensaio de SBF, essa carga positiva irá atrair, preferencialmente, os íons fosfato negativos (PO₄⁻³) 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 (Ca₃(PO₄)₂) que, posteriormente, se cristalizará em hidroxiapatita (Ca₅(PO₄)₃(OH)).

Caso o tratamento superficial do titânio e suas ligas ocorra em uma solução alcalina, a carga inicial resultante da superfície será negativa. Isso resultará, primeiramente, na atração dos íons cálcio positivos (Ca⁺²) antes dos íons fosfato negativos (PO₄⁻³), durante o ensaio de SBF. E em meios com pH próximo a 7 a carga superficial será neutra, resultando na formação de uma camada muito fina de fosfato de cálcio ao final do ensaio de SBF [3].

Uma osteointegração deficiente pode levar a problemas no pós-operatório, como por exemplo, o encapsulamento do implante por tecido fibroso, seguido de sua posterior soltura. Nesse sentido, tratamentos superficiais, como a oxidação anódica, têm sido amplamente estudados no intuito de se obter melhores condições para alcançar, em meio fisiológico, uma resposta celular eficaz e a almejada biofuncionalidade dos implantes a base de titânio [4]. O tratamento eletroquímico de anodização irá atuar diretamente sobre quatro fatores relacionados à interação entre o implante e o tecido ósseo: energia de superfície, composição da superfície, rugosidade e topografia superficiais [5].

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. Aliado a esses dois parâmetros, a composição química e a(s) fase(s) presente(s) em sua superfície também interferem diretamente na energia superficial por alterarem o potencial químico do filme formado. A relação entre esses parâmetros é dada pela Equação 1 a seguir [6, 7].

$$G_{T,P} = \gamma A + \sum \mu_i n_i \quad (1)$$

Onde, $G_{T,P}$ é a Energia Livre de Gibbs à temperatura e pressão constantes (J), γ é a tensão superficial (J/m²), A é a área superficial (m²), μ_i é o potencial químico da espécie i (J/kmol) e n_i é o número de moles da espécie i . A literatura comprova que o aumento da energia superficial melhora aspectos como a molhabilidade do material, tornando-o mais hidrofílico [8, 9]. 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 promo-

ver 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 [10, 11]. Essa adsorção proteica é responsável pela adesão celular (osteoblastos) logo nos primeiros instantes do implante em meio biológico [12].

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 [13]. Estudos revelam que um aumento na rugosidade melhora a ancoragem mecânica do implante [14, 15]. Contudo, rugosidades médias abaixo de 1 μm são mais favoráveis à adesão e proliferação de células [16, 17]. Há ainda investigações sugerindo que a proliferação celular não é afetada somente pelo fator rugosidade isoladamente [18].

ANSELME *et al.* [19], constatou em seu trabalho 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 seus estudos, topografias irregulares ou desorganizadas proporcionam um ambiente menos favorável para a célula estabelecer área de contato com a superfície.

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 [10]. Para que haja uma osteointegração robusta deve ser associado à topografia superficial do material tanto elementos em escala nanométrica, como elementos em escala micrométrica [20].

O presente trabalho tem como objetivo avaliar morfologicamente, estruturalmente e biologicamente filmes microporosos (MP) e nanoporosos (NP) de dióxido de titânio obtidos via tratamento eletroquímico de anodização sobre o substrato formado pela liga Ti6Al4V.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação do material

O material utilizado no desenvolvimento deste trabalho foi a liga Ti6Al4V ELI (*Extra Low Interstitial*) [21]. Os ensaios foram conduzidos utilizando-se dois tipos de amostras no formato circular: uma com diâmetro de 10 mm e espessura de 5 mm e a outra com diâmetro de 25 mm e espessura de 2 mm. Cada uma para finalidades específicas no trabalho.

Inicialmente, o material foi limpo com água e detergente. As amostras foram lixadas em lixas de carvão 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 de forma a possibilitar a visualização da face perpendicular à superfície anodizada. Na sequência da preparação elas foram lixadas nas mesmas granulometrias informadas anteriormente, seguidas de polimento em pasta de diamante nas granulometrias de 9, 3 e 1 μm . Para o ataque metalográfico foi utilizada solução de Kroll (HNO_3 6%; HF 3%; $\text{H}_2\text{O}_{\text{deionizada}}$ 91%). O tempo de ataque foi de 5 minutos.

2.2 Preparação do sistema de anodização do substrato

Para a cuba de anodização foi utilizado 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 na parte central entre as placas de cátodo. Foram utilizadas duas placas de aço inoxidável AISI 316 para a função de cátodo (Fig. 1). Para produção dos filmes nanoporosos de TiO_2 foi utilizada uma fonte retificadora (FCC-3005D, 0 – 30 V). Nos filmes microporosos foi também utilizada uma fonte retificadora, contudo de fabricação própria com capacidade de fornecimento de 174 V CC (Fig.2).

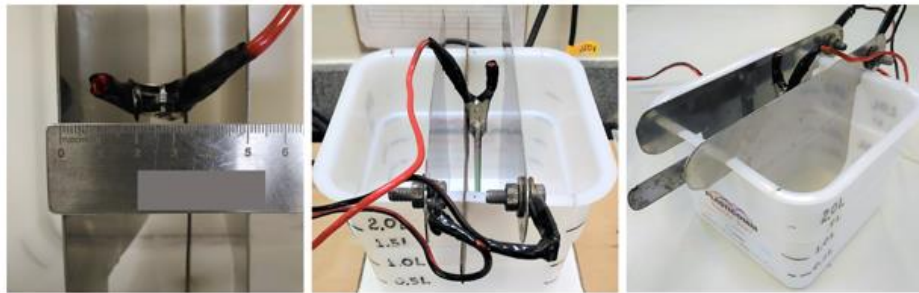


Figura 1: Esquema de montagem da cuba eletrolítica.

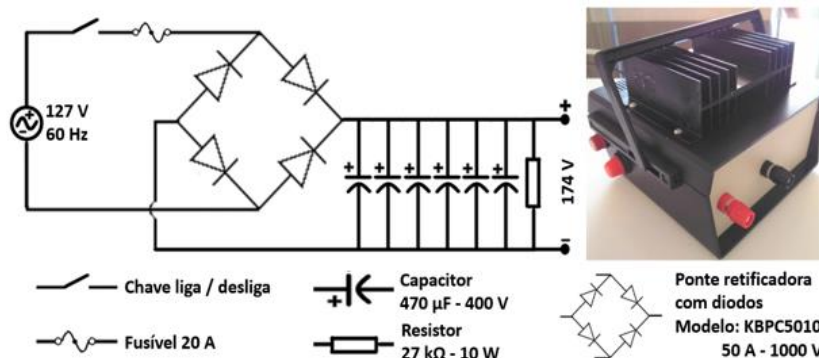


Figura 2: Esquema elétrico básico da fonte de fabricação própria.

2.3 Parâmetros de processamento dos 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 nanoporos (NP) se deu conforme MUNIRATHINAM e NEELAKANTAN [22] adaptado, utilizando-se uma solução de fluoreto de sódio (NaF – 0,5 %p/p) com ácido cítrico (C₆H₈O₇ – 0,1 mol/L). O tempo de processamento foi de 90 minutos sob diferença de potencial de 20 V (Tabela 1).

Na obtenção dos microporos (MP), seguiu-se a metodologia proposta por SILVA [23] 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 1).

Tabela 1: Parâmetros de anodização.

| RECOBRIMENTO | SOLUÇÃO ELETROLÍTICA | TEMPO | DIFERENÇA DE POTENCIAL |
|--------------|---|------------|------------------------|
| NP | NaF (0,5% p/p) + C ₆ H ₈ O ₇ (0,1 mol/L) | 90 minutos | 20 V |
| MP | H ₃ PO ₄ (1,0 mol/L) | 5 minutos | 174 V |

2.4 Caracterização físico-química, morfológica e estrutural dos filmes de TiO₂

Nas caracterizações físico-química, morfológica e estrutural foram utilizadas as amostras com 25 mm de diâmetro.

Caracterização química elementar e identificação das fases: para a confirmação da composição química da liga Ti6Al4V, antes do processo de anodização, foi utilizado o ensaio de Fluorescência de Raios X (FRX) (Shimadzu Corporation, EDX-720). A composição química dos filmes foi obtida por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS) (Bruker Nano GmbH, XFlash 410-M). A identificação das fases do substrato, bem como dos filmes de TiO₂, foi realizada através do ensaio de Difração de Raios X (DRX) (Shimadzu Corporation, XDR-7000). 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).

Caracterização morfológica: foi avaliada a forma, distribuição, tamanho e espessura tanto do filme microporoso, quanto da camada nanoporosa de TiO₂, 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*.

Avaliação da rugosidade: utilizou-se rugosímetro (Tesa Technology, Rugosurf / resolução: 0,001 μm), com 6 medidas por amostras, para comparativo entre a rugosidade média (Ra) do substrato, dos filmes nanoporosos e dos filmes microporosos.

Avaliação da molhabilidade: foi utilizado o goniômetro (Kruss, DAS-100) para a medição do ângulo de contato 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 Sésil com 6 medições por amostra. O método consiste em que uma gota é posta 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.

2.5 Ensaios e caracterizações biológicas dos filmes de TiO₂

Nos ensaios e caracterizações biológicas dos recobrimentos formados, foram utilizadas as amostras com 10 mm de diâmetro.

Ensaio em fluido corporal simulado (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. 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 [24].

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 [25]. 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).

Ensaio de 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 (2×10^7 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*. 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 [26]. Esse ensaio foi realizado em triplicata.

O ensaio de macrodiluição foi realizado conforme norma ANVISA M7-A6 [27]. As amostras foram submetidas ao ensaio de resazurina (Sigma-Aldrich®, USA) em cultura 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 a 5×10^5 UFC/ml. Esses tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 24 h. Posteriormente, 5 μl da solução de resazurina (280 $\mu\text{g/ml}$) foi adicionada em cada tubo e mantidos em estufa a 37 °C por 3h.

A resazurina 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 Espectrofo-

tômetro 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%).

Ensaio de adesão bacteriana: nesse ensaio 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 μ l 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 5×10^5 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).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização química do substrato da liga Ti6Al4V e dos filmes de TiO₂

O percentual de alumínio (Al) e vanádio (V) encontrado na liga Ti6Al4V a ser processada se apresentou dentro dos parâmetros especificados pela norma ASTM F136 [21] e pode ser confirmado através do resultado de FRX apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Composição química da liga Ti6Al4V.

| COMPOSIÇÃO (%m/m) | ALUMÍNIO | VANÁDIO | TITÂNIO |
|--------------------------|-----------|-----------|---------|
| Especificado (ASTM F136) | 5,5 a 6,5 | 3,5 a 4,5 | Balanço |
| Obtido por FRX | 5,6 | 4,0 | 90,4 |

Após o FRX realizou-se uma caracterização por DRX e foi possível confirmar que o substrato se trata de uma liga de titânio $\alpha + \beta$, o que é esperado para a liga Ti6Al4V (Fig. 3a). Esse resultado vai ao encontro do resultado obtido na caracterização elementar por FRX apresentado anteriormente. Ao se avaliar os filmes reproduzidos, constatou-se a presença de anatásio e um indício de rutilo, o que corrobora para a formação da camada de TiO₂ sobre o substrato da liga (Fig. 3b e 3c).

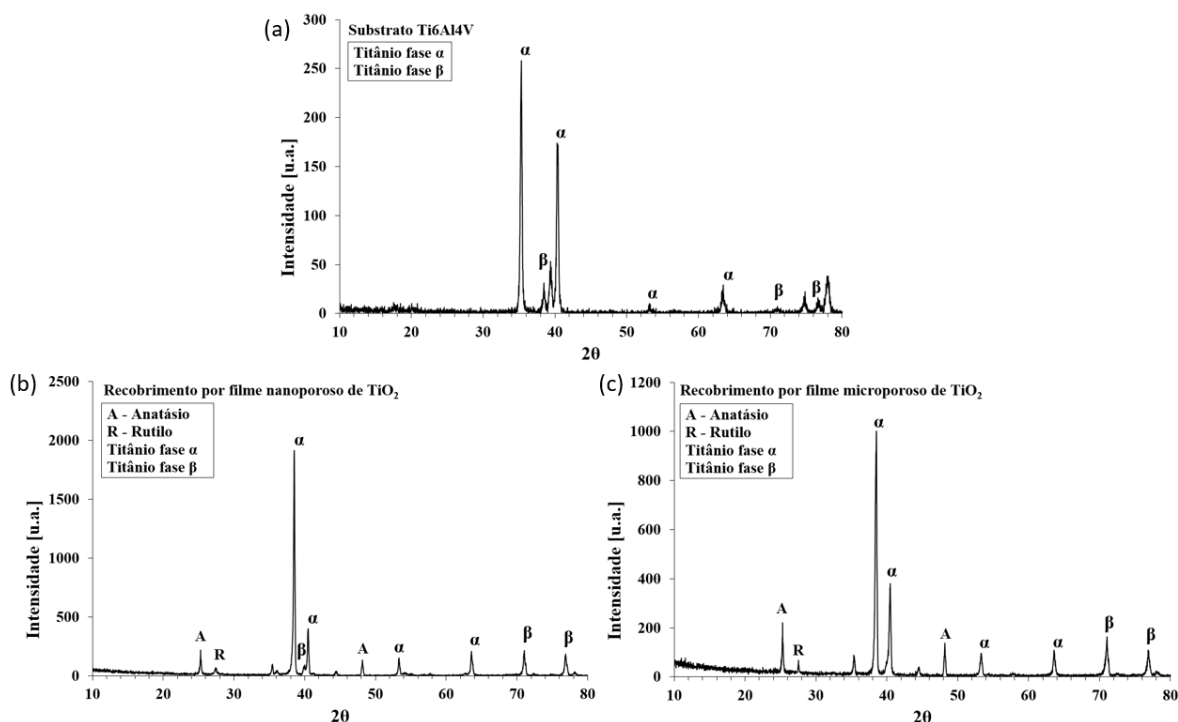


Figura 3: (a) difratograma do substrato da liga Ti6Al4V, (b) difratograma com recobrimento por filme nanoporoso de TiO₂, (c) difratograma com recobrimento por filme microporoso de TiO₂.

3.2 Morfologia dos recobrimentos por nanoporos e microporos TiO₂

Ao término do tratamento as amostras recobertas por nanoporos (NP) de TiO₂ ganharam um aspecto visual com uma tonalidade de cor entre rosa e verde (Fig. 4b). As amostras recobertas com microporos (MP), ficaram com um aspecto visual cinza escuro (Fig. 4c). Ambos os aspectos são um indicativo da espessura do filme de óxido formado e dependem do processo utilizado para anodização. De acordo com a literatura, tonalidades mais escuras tendem a apresentar filmes mais espessos [28, 29].

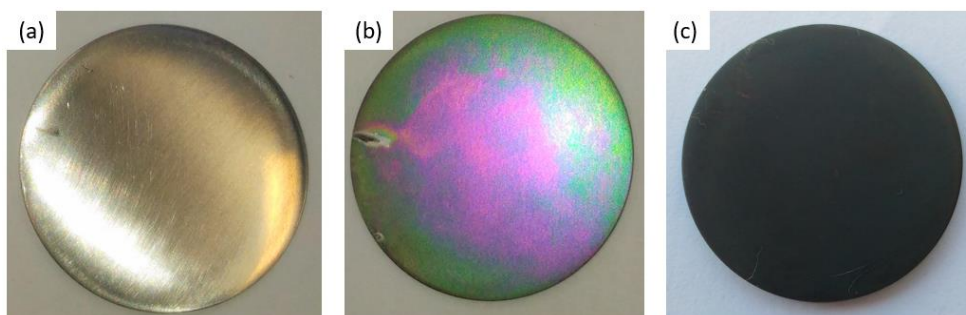


Figura 4: (a) substrato de Ti6Al4V sem tratamento, (b) disco depositado com NP, (c) disco depositado com MP.

A Figura 5a apresenta a amostra embutida na região central com anel metálico de contenção ao redor. A utilização desse anel externo se justifica para evitar o arredondamento das bordas da amostra durante o processo de lixamento e polimento, garantindo a visualização em perfil da camada anodizada ao microscópio. A espessura média das camadas nanoporosas (NP) 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. O valor médio da espessura dos filmes de NP foi de $0,74 \pm 0,10 \mu\text{m}$ e dos filmes de MP foi mais espessa, chegando a uma média de $3,01 \pm 0,58 \mu\text{m}$. A camada de TiO₂ formada por ambos tratamentos eletroquímicos pode ser identificada através da faixa de tonalidade mais clara indicada pelas setas nas Figuras 5b e 5c.

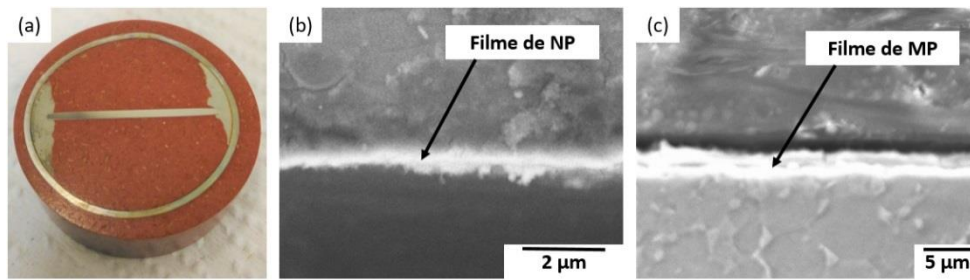


Figura 5: (a) amostra embutida, (b); (c) filme de óxido formado sobre o substrato de Ti6Al4V.

Com o auxílio do *software Image J* foram calculadas as densidades superficiais por área dos NPs e MPs, bem como o diâmetro médio dos mesmos. Os NPs apresentaram diâmetro médio de 73 ± 11 nm e sua quantidade por área foi de aproximadamente 115×10^6 poros/mm² (Fig. 6b). Esses valores estão similares aos encontrados nos trabalhos de RADTKE *et al.* [30]. Por sua vez, os MPs apresentaram um diâmetro maior que os NPs, sendo que em média obtiveram-se valores da ordem de $0,49 \pm 0,13$ µm com uma densidade por área aproximada de 327×10^3 poros/mm² (Fig. 6d). Uma ordem de grandeza semelhante foi encontrada nos trabalhos de KUROMOTO *et al.* [28] e SILVA [23]. Ambas as medições foram repetidas 6 vezes em regiões distintas de cada amostra.

A distribuição dos nanoporos se mostrou bastante auto-organizada e uniforme. Além disso, notou-se algumas impurezas superficiais semelhantes aos resultados obtidos por MUNIRATHINAM e NEELAKANTAN [22] (Fig. 6a). Essas impurezas podem ocorrer devido à camada inicial de TiO₂ que não sofreu dissolução química pelos íons de flúor durante a anodização [31]. Já os microporos apresentaram uma distribuição mais aleatória e espaçada entre si, também semelhante ao encontrado na literatura [23, 32, 33]. Não foi possível observar impurezas sobre o filme microporoso produzido (Fig. 6c).

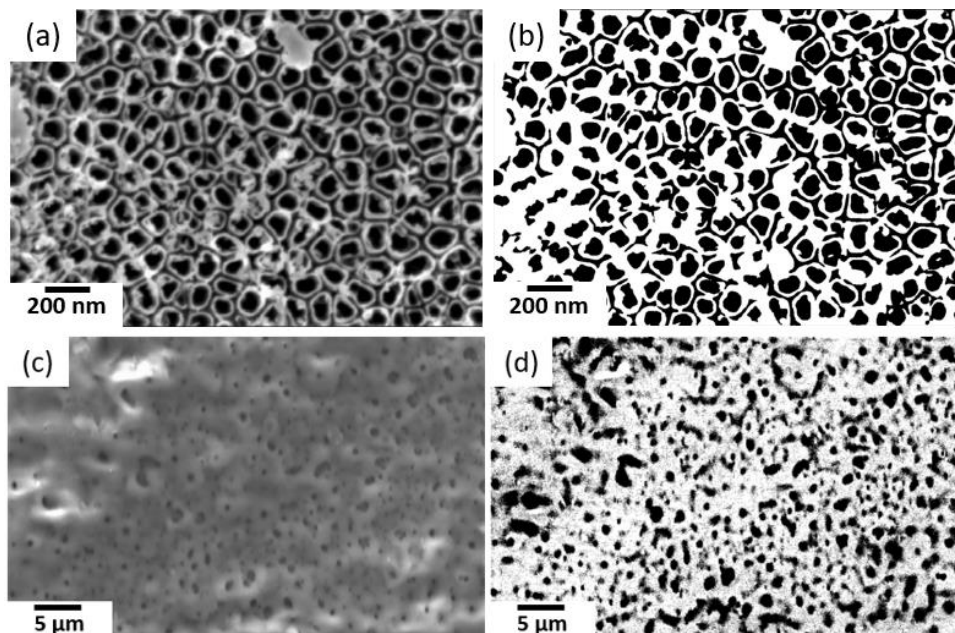


Figura 6: (a); (b) estrutura do filme nanoporoso (NP) em MEV e seu respectivo tratamento em Image J, (c); (d) estrutura do filme microporoso (MP) e seu respectivo tratamento em Image J.

Na avaliação por EDS verificou-se a presença de elevado percentual em massa de titânio (Ti) e oxigênio (O) na superfície dos materiais, corroborando para a 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 nanoporos (NP); 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, além da água utilizada na solução. O alumínio encontrado (Al) está presente na composição do substrato formado pela liga de titânio (Tabela 3).

Tabela 3: Elementos identificados por EDS nos filmes formados por anodização.

| | Ti | O | F | Na | Ca | Al |
|------------------|-------|-------|------|------|------|------|
| NP [%m/m] | 52,27 | 31,52 | 9,39 | 0,32 | 1,85 | 4,65 |
| | Ti | O | P | C | Al | |
| MP [%m/m] | 46,83 | 43,16 | 1,57 | 4,88 | 3,55 | |

3.3 Rugosidade do filme de TiO₂

A rugosidade média (Ra) apresentada pelo material antes e após o tratamento eletroquímico é apresentada na tabela 4 a seguir.

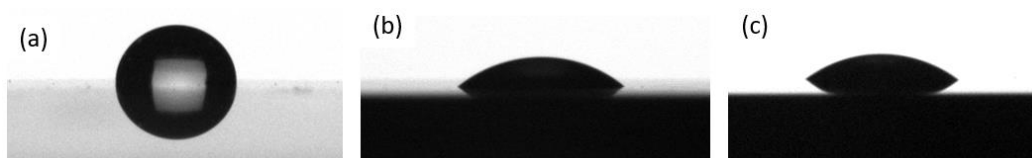
Tabela 4: Rugosidade do substrato e das amostras tratadas.

| Substrato Ti6Al4V | NP | MP |
|--|------------------|------------------|
| 0,070 ± 0,012 μm | 0,188 ± 0,030 μm | 0,159 ± 0,047 μm |
| valor- <i>p</i> = 0,029 (<i>p</i> < 0,05) | | |

Através da análise de variância (ANOVA / Tukey) a diferença entre as médias das rugosidades dos nanoporos 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.* [34], há uma tendência da rugosidade superficial diminuir com o aumento do diâmetro dos poros. Neste 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.

3.4 Molhabilidade das superfícies recobertas

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 com os filmes). A Figura 7 apresenta qualitativamente a diferença expressiva entre o ângulo de contato formado sobre o substrato da liga e os ângulos formados sobre os filmes de NP e MP. Pode-se perceber aparente semelhança na molhabilidade entre os dois filmes de NP e MP.


Figura 7: Ensaio de ângulo de contato: (a) substrato Ti6Al4V, (b) filme de NP, (c) filme de MP.

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 nanoporos (NP). 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), observou-se que a diferença entre as médias das amostras NP e MP não se mostrou estatisticamente significativa [14, 35] (Tabela 5).

Tabela 5: ângulo de contato do substrato e das amostras tratadas.

| Substrato Ti6Al4V | TNT | MP |
|--|-------------|-------------|
| 85,1 ± 1,1° | 38,9 ± 6,8° | 36,5 ± 8,1° |
| valor- <i>p</i> = 0,774 (<i>p</i> > 0,05) | | |

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 ele-

troquímico [36]. No caso dos NPs 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. Tanto o diâmetro dos microporos quanto o diâmetro dos nanoporos também influenciam de forma direta as características hidrofílicas da superfície do material [37], afetando também a adesão celular sobre o mesmo [16]. 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 [38, 9].

Ainda, de acordo com NARAYANAN *et al.* [16], há também 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 NP deste trabalho.

3.5 Ensaio de SBF *in vitro*

O presente estudo buscou identificar indícios da formação de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), precursor da hidroxiapatita, através da identificação de P e 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 (Fig. 8).

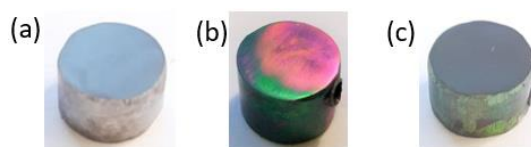


Figura 8: (a) substrato de Ti6Al4V sem tratamento, (b) amostra com NP, (c) amostra com MP.

O primeiro ponto a se considerar é que a deposição de P e Ca se mostrou maior sobre as amostras recobertas com TiO_2 do que sobre o substrato sem tratamento. 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 de NP, com 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 de 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 6).

Tabela 6: EDS com o percentual em massa da deposição de fósforo e cálcio durante o ensaio de SBF *in vitro*.

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

Outro ponto observado é que em 7 dias de SBF o percentual médio de fósforo ($1,31 \pm 0,28$ %) depositado sobre a superfície NP se apresentou significativamente menor que o percentual médio encontrado para superfície 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 (H_3PO_4). De acordo com a literatura, eletrólitos contendo P e Ca apresentam melhores condições para nucleação de hidroxiapatita que pode se iniciar durante o tratamento eletroquímico sobre o filme de TiO_2 formado [39, 40].

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 [22]. O substrato sem o tratamento de anodização não se mostra tão eficaz a essa deposição [41] como mostrado através da Figura 9.

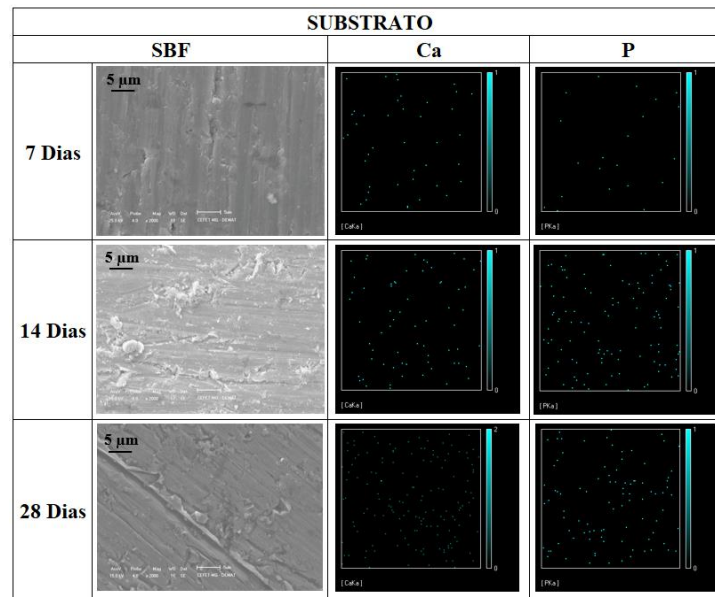


Figura 9: MEV/EDS com a evolução da deposição de Ca e P sobre as superfícies do substrato.

Os resultados mostram que ambos os filmes, NP ou MP, são favoráveis à deposição de P e Ca após a imersão em SBF e as imagens de ambos se mostraram bastante similares ao encontrado na literatura. Nas Figuras 10 e 11, com 14 dias e 28 dias respectivamente, é possível se perceber uma semelhança com a forma esférica, similar à formação de apatita [41-44].

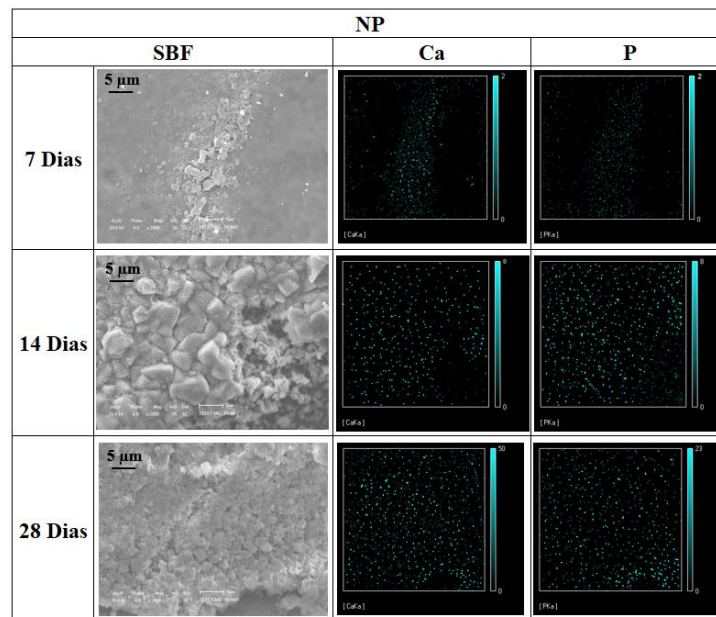


Figura 10: MEV/EDS com a evolução da deposição de Ca e P sobre as superfícies do NP.

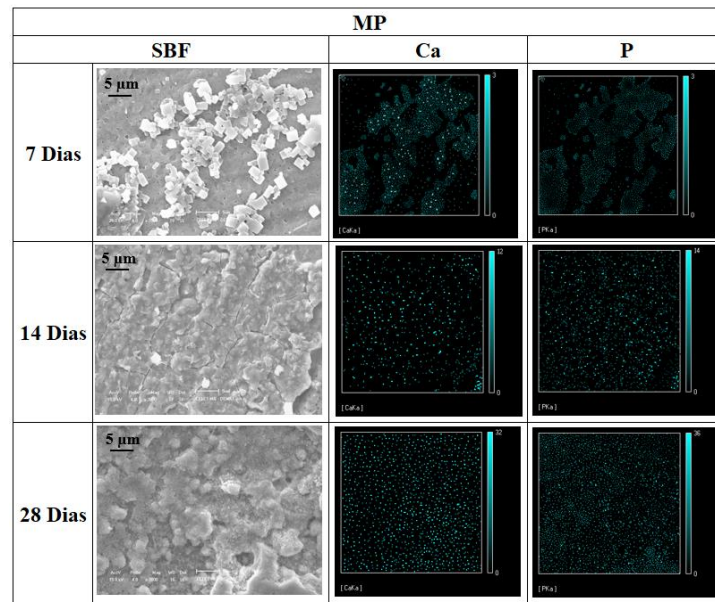


Figura 11: MEV/EDS com a evolução da deposição de Ca e P sobre as superfícies do MP.

3.6 Caracterização biológica dos filmes

Através da Figura 12 é possível constatar que não houve a formação do halo inibitório do crescimento bacteriano ao redor das amostras (substrato, NP e MP) para ambas as bactérias, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Esses dados indicam que o filme de TiO₂ não se difundiu para o ágar e, dessa forma, não foi possível observar ação sobre as culturas bacterianas como ocorreu nos controles positivos.

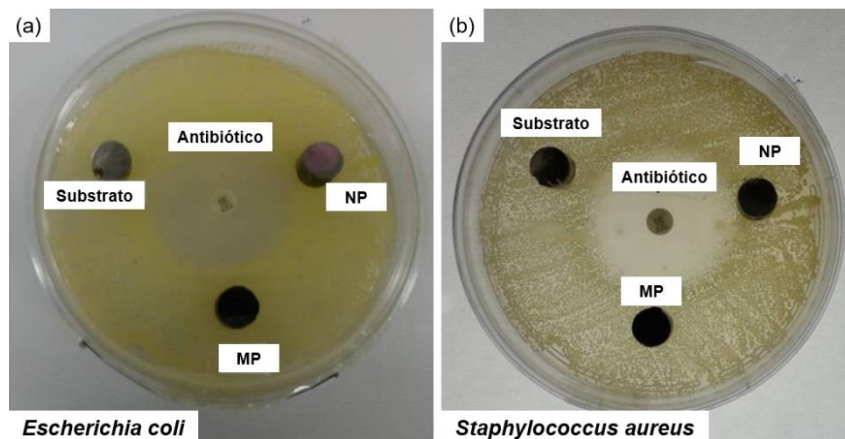


Figura 12: Ensaio de difusão em ágar: (a) *Escherichia coli* com antibiótico ampicilina, (b) *Staphylococcus áureos* com antibiótico tetraciclina.

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. 13). Dessa forma, tanto as superfícies microporosas, quanto as nanoporosas mantiveram 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 [14, 33, 45]. Os testes de citotoxicidade são os primeiros ensaios *in vitro* utilizados para prever a toxicidade de várias substâncias [46] e materiais. Assim, no presente estudo, os dados indicam que a anodização não apresentou efeito citotóxico sobre as células testadas.

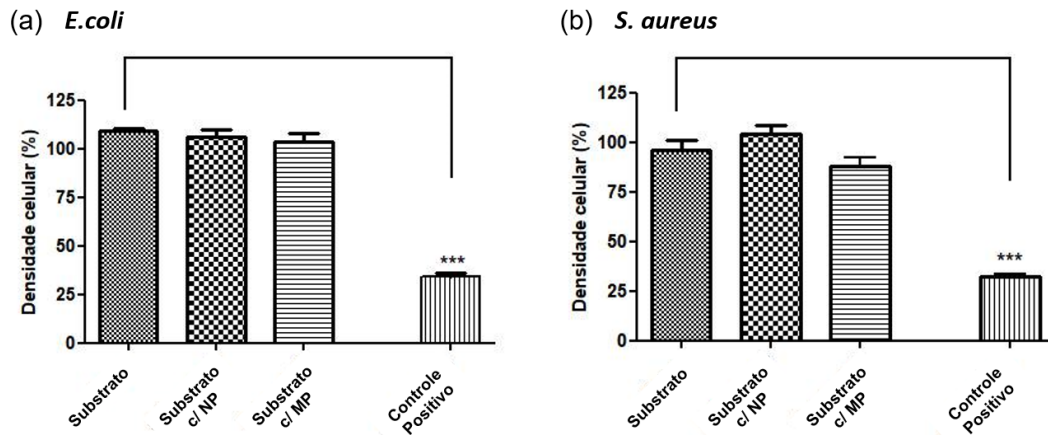


Figura 13: Comparativo da viabilidade celular entre as superfícies do material: (a) *Escherichia coli*, (b) *Staphylococcus aureus*.

3.7 Avaliação da adesão celular

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 [47]. Essa superfície é capaz de interagir diretamente com o microrganismo ou com macromoléculas provenientes do hospedeiro [34]. Sob esse aspecto, o estudo também avaliou a propriedade de adesão dos filmes tratados frente à bactéria *Escherichia coli*. Conforme a Figura 14, os substratos não tratados em contato com a suspensão bacteriana (Fig. 14a e 14b) não apresentaram células aderidas em sua superfície, enquanto que o processo de anodização favoreceu a adesão celular sobre os filmes de TiO₂. No entanto, as ligas microporosas (Fig. 14c) apresentaram células esparsas, com morfologia alongada quando comparadas às células aderidas sobre a superfície nanoporosa (Fig. 14d). Segundo os estudos conduzidos por PUCKETT *et al.* [48] e ANSELME *et al.* [19] a morfologia nanoporosa e/ou nanotubular, devido à sua auto-organização, favorece a adesão e colonização de células. Em vista disso, além dessa auto-organização estrutural, alguns estudos também relacionam a adesão da superfície nanoporosa ao aumento da área de contato e a melhor adaptação da bactéria às porosidades semelhantes ao seu tamanho [49].

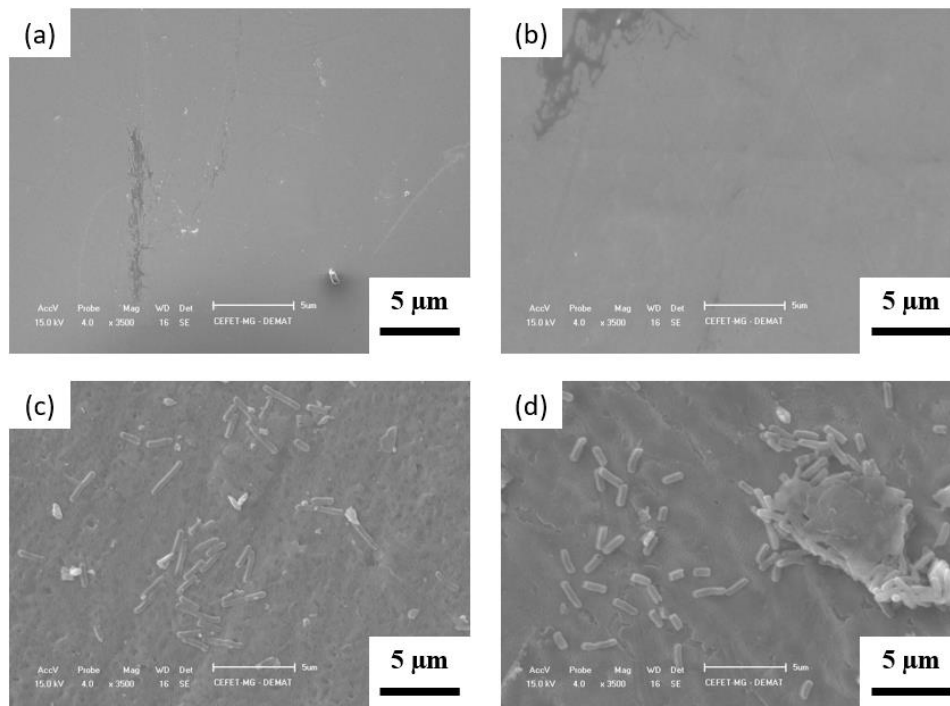


Figura 14: Adesão de células *Escherichia coli*: (a) substrato sem micro, (b) substrato com micro, (c) MP com micro, (d) NP com micro.

4. CONCLUSÕES

Ressalta-se como resultado experimental desse estudo a versatilidade do processo eletroquímico de anodização para controle da microestrutura dos filmes obtidos. Adotando o mesmo reator de processamento, salvo as diferenças nos parâmetros utilizados entre eles, é possível se obter duas superfícies completamente diferentes morfologicamente, porém quimicamente similares. De certa forma, isso contribui para novos estudos sobre a aplicabilidade desses materiais nas diversas áreas da bioengenharia.

No presente trabalho, a molhabilidade obteve resultado estatisticamente similar para ambos os filmes formados, mesmo com os microporos alcançando diâmetros quase 7 vezes maiores, em média, que os nanoporos. A possível explicação para tal fato pode estar talvez relacionada com a densidade por área da porosidade superficial. Nos microporos, foi encontrada uma densidade na ordem de 10^3 , bem menor quando comparada aos nanoporos, que se encontra na ordem de 10^6 .

Pelos resultados de molhabilidade, é possível afirmar que ambos os filmes possuem potencial para futuras aplicações em biomateriais, e que podem ser indicados como opção no tratamento superficial para implantes da liga Ti6Al4V. O baixo valor médio do ângulo de contato entre a superfície e a gota mostra que os filmes de TiO_2 produzidos podem aumentar a interação entre o fluido corporal e o biomaterial devido aos seus comportamentos mais hidrofílicos. Embora o substrato sem os filmes de TiO_2 seja utilizado atualmente como biomaterial, esse comportamento seria dificultado devido sua característica menos hidrofílica comprovada pelo valor médio mais alto do ângulo de contato.

O estudo também mostrou que, tanto o material tratado para obtenção de ambas as superfícies, quanto o substrato sem tratamento, apresentaram indicativo de não serem citotóxicos nos testes de difusão em ágar e macrodiluição realizados com bactérias. Esse resultado é reforçado por ensaios encontrados na literatura realizados com células indutoras da matriz óssea sobre o material do substrato (não tratado) e que também obtiveram respostas não citotóxicas.

Com relação à deposição de fósforo e cálcio verificou-se que eletrólitos contendo um dos dois elementos ou mesmo ambos, já podem favorecer suas deposições ainda na fase de produção dos filmes durante o tratamento eletroquímico. Isso pode contribuir para a formação mais acelerada de apatita na superfície do material do implante quando estiver no meio fisiológico após a implantação.

Por fim, na avaliação qualitativa da adesão celular, a superfície mais rugosa e auto-organizada encontrada na camada nanoporosa se mostrou mais apta à aderência das células bacterianas utilizadas no ensaio do que as superfícies do substrato e dos microporos. Dessa forma, os resultados apresentados nesse trabalho podem também contribuir para a continuação dos estudos de adesão celular sobre as superfícies desses materiais, porém com a utilização de células ósseas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e ao CEFET-MG pelo apoio no que diz respeito a toda estrutura laboratorial e bolsas de estudo para o desenvolvimento dessa pesquisa, bem como aos professores, funcionários e alunos de IC do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAT) pelo auxílio prestado, durante todo o trabalho.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] LOSIC, D., SINN, M., SANTOS, A., *et al.*, "Titania nanotube arrays for local drug delivery: recent advances and PubMed Commons", *Expert Opinion*, v. 12, n. 1, pp. 103-127, May. 2015.
- [2] COSTA, L.J., SOUSA, E.T., LUCENA, F.L., *et al.*, "Superfície de implantes de titânio e sua capacidade de estímulo na formação óssea: uma revisão de literatura", *Odontologia Clínico-Científica*, v. 14, n. 4, pp. 797-800, Dec. 2015.
- [3] KOKUBO, T., YAMAGUCHI, S., "Bioactive titanate layers formed on titanium and its alloys by simple chemical and heat treatments", *The Open Biomedical Engineering Journal*, v. 9, n. suppl 1-M2, pp. 29-41, 2015.
- [4] CHANG, C., HUANG, X., LIU, Y., *et al.*, "High-current anodization: A novel strategy to functionalize titanium-based biomaterials", *Electrochimica Acta*, v. 173, pp. 345-353, May. 2015.

- [5] GEETHA, M., SINGH, A.K., ASOKAMANI, R., *et al.*, "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review", *Progress in Materials Science*, v. 54, n. 3, pp. 397-425, Jan. 2009.
- [6] RABÓCZKAY, T., *Físico-química de interfaces*, 1 ed., São Paulo, Edusp, 2016.
- [7] CASTELLAN, G., *Fundamentos de físico-química*, 1 ed., Rio de Janeiro, LTC Editora S.A., 1995.
- [8] CHAVES, J.M., ESCADA, A.L.A., RODRIGUES, A.D., *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*, v. 370, pp. 76-82, Feb. 2016
- [9] XU, L., WU, C., LEI, X., *et al.*, "Effect of oxidation time on cytocompatibility of ultrafine-grained pure Ti in micro-arc oxidation treatment", *Surface and Coatings Technology*, v. 342, pp. 12-22, Feb. 2018.
- [10] NOVAES, A.B., SOUZA, S.L.S., BARROS, R.R.M., *et al.*, "Influence of implant surfaces on osseointegration", *Brazilian Dental Journal*, v. 21, n. 6, pp. 471-481, 2010.
- [11] CHAKRAVORTY, N., IVANOVSKI, S., PRASADAM, I., *et al.*, "The microRNA expression signature on modified titanium implant surfaces influences genetic mechanisms leading to osteogenic differentiation", *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 9, pp. 3516-3523, May. 2012.
- [12] WEBSTER, T.J., ERGUN, C., DOREMUS, R.H., *et al.*, "Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics". *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 51, n. 3, pp. 475-483, Jan. 2000.
- [13] JIMBO, R., IVARSSON, M., KOSKELA, A., *et al.*, "Protein adsorption to surface chemistry and crystal structure modification of titanium surfaces", *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, v. 1, n. 3, pp. 1-9, May. 2010.
- [14] WANG, Y., LOU, J., ZENG, L., *et al.*, "Osteogenic potential of a novel microarc oxidized coating formed on Ti6Al4V alloys", *Applied Surface Science*, v. 412, pp. 29-36, Mar. 2017.
- [15] ROSA, M.B., ALBREKTSSON, T., FRANCISCHONE, C.E., *et al.*, "The influence of surface treatment on the implant roughness pattern", *Journal of Applied Oral Science*, v. 20, n. 5, pp. 550-555, 2012.
- [16] 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*, v. 117, n. 2, pp. 460-464, Jun. 2009.
- [17] OLIVEIRA, D.P., PALMIERI, A., CARINCI, F., *et al.*, "Osteoblasts behavior on chemically treated commercially pure titanium surfaces", *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 102, n. 6, pp. 1816-1822, Jun. 2013.
- [18] KIM, K., LEE, B.A., PIAO, X.H., *et al.*, "Surface characteristics and bioactivity of an anodized titanium surface", *Journal of Periodontal and Implant Science*, v. 43, n. 4, pp. 198-205, Aug. 2013.
- [19] 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*, v. 224, n. 12, pp. 1487-1507, Aug. 2010.
- [20] MENDONÇA, G., MENDONÇA, D.B.S., ARAGÃO, F.J.L., *et al.*, "Advancing dental implant surface technology - From micron - to nanotopography", *Biomaterials*, v. 29, n. 28, pp. 3822-3835, Jul. 2008.
- [21] 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 (UNS R56401)", *Annual Book of ASTM Standards*, West Conshohocken, PA, USA, pp. 1-5, 2015.
- [22] MUNIRATHINAM, B., NEELAKANTAN, L., "Titania nanotubes from weak organic acid electrolyte: fabrication, characterization and oxide film properties", *Materials Science and Engineering C*, v. 49, pp. 567-578, Jan. 2015.
- [23] SILVA, L.A., *Obtenção e caracterização de filmes de TiO₂ por tratamento eletroquímico anódico sobre a liga Ti-6Al-4V*, Dissertação de M.Sc., CEFET-MG, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2017.
- [24] KOKUBO, T., TAKADAMA, H., "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?" *Biomaterials*, v. 27, n. 15, pp. 2907-2915, Jan. 2006.
- [25] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, "ISO 23317: Implants for surgery — in vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials", *ISO Standards*, Geneva, Swiss, pp. 1-

20, 2014.

[26] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, "M2-A8: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests", *NCCLS*, Wayne, PA, USA, pp. 1-58, 2003.

[27] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, "M7-A6: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically", *NCCLS*, Wayne, PA, USA, pp. 1-81, 2003.

[28] 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*, v. 58, n. 2, pp. 114-121, Jan. 2007.

[29] KARAMBAKHS, A., AFSHAR, A., GHAHRAMANI, S., *et al.*, "Pure commercial titanium color anodizing and corrosion resistance", *Journal of Materials Engineering and Performance*, v. 20, n. 9, pp. 1690-1696, Dec. 2011.

[30] RADTKE, A., TOPOLSKI, A., JEDRZEJEWSKI, T., *et al.*, "The bioactivity and photocatalytic properties of titania nanotube coatings produced with the use of the low-potential anodization of Ti6Al4V alloy surface", *Nanomaterials*, v. 7, n. 8, pp. 1-15, Jul. 2017.

[31] ARRUDA, P.M., *Membranas de nanotubos de TiO₂ visando aplicações na fabricação de sensores e células solares*, Tese de D.Sc., USP, São Paulo, SP, Brasil, 2018.

[32] SANTOS, A., *Produção de filmes de óxido de titânio por oxidação anódica a microarco*, Dissertação de M.Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2008.

[33] SANTOS, A., *Óxido de titânio produzido por oxidação anódica a microarco para superfície de implantes*, Tese de D.Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2013.

[34] 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*, v. 20, n. 5, pp. 1282-1290, Jul. 2017.

[35] SHIN, D.H., SHOKUH FAR, T., CHOI, C.K., *et al.*, "Wettability changes of TiO₂ nanotube surfaces", *Nanotechnology*, v. 22, n. 31, pp. 1-7, Jul. 2011.

[36] LUZ, A.P., PANDOLFELLI, V.C., RIBEIRO, S., "Artigo de revisão: uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários", *Cerâmica*, v. 54, n. 330, pp. 174-183, Jun. 2008.

[37] INDIRA, K., MUDALI, U.K., NISHIMURA, T., *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*, v. 1, n. 4, pp. 1-22, Oct. 2015.

[38] SHI, X.L., WANG, Q.L., WANG, F.S., *et al.*, "Effects of electrolytic concentration on properties of micro-arc film on Ti6Al4V alloy", *Mining Science and Technology*, v. 19, n. 2, pp. 220-224, Jul. 2009.

[39] SOUZA, G.B., *Caracterizações físicas, químicas e de bioatividade de superfícies de titânio modificadas para aplicação biomédica*, Tese de D.Sc., UFPR, Curitiba, PR, Brasil, 2010.

[40] WEBSTER, T.J., YAO, C., "Anodization: a promising nano modification technique of titanium-based implants for orthopedic applications", In: AHMED, W., JACKSON, M.J. (eds), *Surgical Tools and Medical Devices*, 2 ed., chapter 2, Providence, USA, Springer International Publishing, 2016.

[41] HSU, H.C., WU, S.C., HSU, S.K., *et al.*, "Fabrication of nanotube arrays on commercially pure titanium and their apatite-forming ability in a simulated body fluid", *Materials Characterization*, v. 100, pp. 170-177, Jan. 2015.

[42] ZHANG, P., ZHANG, Z., LI, W., *et al.*, "Effect of Ti-OH groups on microstructure and bioactivity of TiO₂ coating prepared by micro-arc oxidation", *Applied Surface Science*, v. 268, pp. 381-386, Jan. 2013.

[43] HILARIO, F., ROCHE, V., NOGUEIRA, R.P., *et al.*, "Influence of morphology and crystalline structure of TiO₂ nanotubes on their electrochemical properties and apatite-forming ability", *Electrochimica Acta*, v. 245, pp. 337-349, May. 2017.

[44] NASIRPOURI, F., YOUSEFI, I., MOSLEHIFARD, E., *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*, v. 315, pp. 163-171, Feb. 2017.

- [45] 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 de D.Sc., UNESP, Guaratinguetá, SP, Brasil, 2017.
- [46] ISTIFLI, E.S., HÜSUNET, M.T., ILA, H.B., "Cell division, cytotoxicity, and the assays used in the detection of cytotoxicity", In: ISTIFLI, E.S., ILA, H.B. (eds), *Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds*, 1 ed, chapter 6, London, UK, IntechOpen, 2019.
- [47] TRAINI, T., MURMURA, G., SINJARI, B., *et al.*, "The surface anodization of titanium dental implants improves blood clot formation followed by osseointegration", *Coatings*, v. 8, n. 7, pp. 1-14, Jul. 2018.
- [48] PUCKETT, S.D., TAYLOR, E., RAIMONDO, T., *et al.*, "The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment", *Biomaterials*, v. 31, n. 4, pp. 706-713, Oct. 2009.
- [49] EDWARDS, K.J., RUTENBERG, A.D., "Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution", *Chemical Geology*, v. 180, n. 1-4, pp. 19-32, Oct. 2001.

ORCID

| | |
|------------------------------|---|
| Marcus Vinícius Marques Hott | https://orcid.org/0000-0003-4934-3760 |
| Kátia Michelle Freitas | https://orcid.org/0000-0002-4025-879X |
| Lorena de Azevedo Silva | https://orcid.org/0000-0003-1125-173X |
| Camila de Lima Cruz | https://orcid.org/0000-0002-7836-6972 |
| Sidney Nicodemos da Silva | https://orcid.org/0000-0002-4431-6651 |