

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

RODNEY MARCELO DO NASCIMENTO

**FENÔMENOS INTERFACIAIS RESULTANTES DE MODIFICAÇÕES
FÍSICO-QUÍMICAS EM SUPERFÍCIES METÁLICAS PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

2011

RODNEY MARCELO DO NASCIMENTO

**FENÔMENOS INTERFACIAIS RESULTANTES DE MODIFICAÇÕES
FÍSICO-QUÍMICAS EM SUPERFÍCIES METÁLICAS PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciência e
Tecnologia de Materiais da UNESP, como
requisito para obtenção do título de Doutor**

Orientação: Prof. Dr. Nilson Cruz

Prof. Dr Ariovaldo de Oliveira Florentino (em memória)

2011

Nascimento, Rodney Marcelo.

Fenômenos interfaciais resultantes de modificações físico-químicas em superfícies metálicas para aplicações biomédicas / Rodney Marcelo do Nascimento, 2011

120 f. : il.

Orientador: Nilson Cristino Cruz

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2011

1. Interfaces. 2. Rugosidade. 3. Energia Superficial Livre. 4. Molhabilidade. 5. Bioatividade. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE RODNEY MARCELO DO NASCIMENTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 13 dias do mês de outubro do ano de 2011, às 14:00 horas, no(a) UNESP / Campus Experimental de Sorocaba, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. NILSON CRISTINO DA CRUZ do(a) UNESP / Campus Experimental de Sorocaba, Profa. Dra. CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA do(a) Faculdade de Engenharia Mecânica / UNICAMP, Profa. Dra. SANDRA GIACOMIN SCHNEIDER do(a) Escola de Engenharia de Lorena - Departamento de Materiais / Universidade de São Paulo, Profa. Dra. ELIANA APARECIDA DE REZENDE DUEK do(a) Departamento de Ciências Fisiológicas / Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Prof. Dr. JOHNNY VILCARROMERO LOPEZ do(a) Campus de Sorocaba / Universidade Federal de São Carlos, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de RODNEY MARCELO DO NASCIMENTO, intitulado "FENOMENOS INTERFACIAIS RESULTANTES DE MODIFICAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS EM SUPERFÍCIES METÁLICAS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. NILSON CRISTINO DA CRUZ


Profa. Dra. CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA


Profa. Dra. SANDRA GIACOMIN SCHNEIDER


Profa. Dra. ELIANA APARECIDA DE REZENDE DUEK


Prof. Dr. JOHNNY VILCARROMERO LOPEZ

À Família, aos Amigos e a todos os profissionais que estiveram comigo nesta saga.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar toda gratidão às pessoas que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho, que apoiaram e que estiveram do meu lado durante o tempo em que me dediquei no projeto.

Em memória, ao orientador professor Ariovaldo, por ter aceitado o desafio de realizar um projeto de pesquisa com características, até então, não tão triviais do ponto de vista de alguns profissionais da Universidade. A continuidade dos trabalhos científicos na forma de uma rede de pesquisa foi muito influenciado por suas idéias.

Ao orientador professor Nilson que aceitou assumir a orientação no momento mais difícil do doutorado cuidando e zelando não somente pela correção do texto, mas também de todos os aspectos burocráticos para a reta final do trabalho.

A professora Elisabete, ao amigo Douglas e todos os profissionais da USP de Ribeirão Preto que permitiram que grande parte do projeto fosse desenvolvida no campus. A parceria e o trabalho em colaboração proporcionaram excelentes discussões e conhecimentos adquiridos.

A doutoranda Juliana Ferreira, pela parceria, amizade e constantes troca de conhecimentos na busca das convergências entre a Física e a Biologia.

A bióloga Vanessa Carvalho, pela sua simpatia, amizade e eficiência no laboratório.

Aos profissionais Paulo César, Tomaz, Renata, Juliana e Marcelo Carbonari das indústrias e empresas que abriram suas portas para uma experimentação única com a interação de diferentes áreas do conhecimento. Espero continuar esta interação de saberes com todos.

Aos professores Ramon, Lígia e Terezinha pela colaboração com os testes de biocompatibilidade.

Aos professores Humberto Silva e Antônio Carlos, suas disciplinas ministradas foram fundamentais nas discussões teóricas da tese.

Aos alunos de iniciação científica Gustavo, Vanessa Camila e Tâmara.

Aos colegas professores do departamento de Física e Biofísica, Zé Ricardo, Marcos Rezende e Ivan Guerrini pela oportunidade, confiança e incentivo para que se colocasse em prática uma extensão universitária resultado desta tese.

Aos colegas cientistas Rafael, Vânia, Luciano Monteiro, Murilo, Emanuel e Ivana pelo conhecimento compartilhado e pelo companheirismo nos momentos de concentração e descontração.

As secretárias Sílvia do departamento de biofísica, Maria do departamento de bioquímica e Andressa do POSMAT pela prestação de serviços durante esse tempo.

Aos grandes amigos Sidney e Jomilson. Juntos, iniciamos a jornada da pós-graduação, passando por momentos tortuosos nos grupos de estudo e que agora, ao termino de um ciclo, tenham certeza de que a amizade permanecerá para sempre seja lá onde cada um estiver.

A professora Sandra Giacomini Schneider da USP de Lorena pela colaboração no fornecimento de amostras produzidas no Departamento de Engenharia de Materiais - DEMAR.

As agências de fomento à pesquisa pelo suporte financeiro e mais especificamente a CAPES.

A todas as instituições que cederam o espaço físico para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus alunos por entenderem meu afastamento das aulas, e que enquanto estávamos juntos, a troca de conhecimento foi uma poderosa fonte de inspiração para meu aprofundamento nos estudos.

Aos amigos Celso, Marcos, João Carlos, Carlos Eduardo e Matheus pelas estimulantes discussões em balcões de bares e que mesmo distantes, estavam de prontidão nos momentos difíceis.

Aos companheiros da banda Doctor Rock, Caíque, Alan, Lucas e Edvaldo pelos momentos de puro rock n roll nas noites. Momentos esses que foram um refúgio e permitiam o relaxamento e a recuperação para a retomada do projeto.

Aos meus tios Ermelinda e Robinson por estarem sempre juntos nesta caminhada. Obrigado pelos almoços de domingo.

À Thais que, depois de muitas voltas, cruzou novamente meu caminho e que, próximo à defesa da tese, se tornou a fonte de inspiração que faltava para conclusão do doutorado.

Finalmente a todos que de forma indireta contribuíram para o resultado final. Seriam muitos a se destacar aqui e quero expressar os meus mais sinceros agradecimentos.

“É verdade que jamais chegaremos ao verdadeiro conhecimento, encontrar a grande pedra filosofal. Mas é bom que a procuremos, pois no decorrer do caminho podemos encontrar preciosidades que não estávamos procurando”

Adaptado do livro “O sucesso não ocorre por acaso” de Lair Ribeiro

RESUMO

A perda de parte do corpo é uma constante preocupação do ser humano desde os tempos mais remotos. Na busca pelo tratamento ou substituição de partes do corpo, se desenvolvem atualmente diferentes materiais bioativos que possam promover uma melhor conexão óssea (osseointegração) através de uma ligação físico-química entre o implante e o osso. Apesar dos avanços significativos na área da ciência e tecnologia de biomateriais, informações a respeito da natureza química e dimensões espaciais (rugosidade e topografia) dos materiais ainda precisam ser mais bem esclarecidas para verificar suas influências relacionadas à energia da superfície e aos estágios da osseointegração. Diante disto, este trabalho teve como objetivo mostrar os efeitos de modificações físico-químicas realizadas em superfícies de materiais metálicos para aplicações como implantes osseointegráveis. Como consequência, melhorar a compreensão dos fenômenos relacionados à regeneração tecidual, em especial nos primeiros estágios do processo de osseointegração. Os resultados experimentais obtidos através de técnicas de microscopias eletrônicas, tensiometria, goniometria e ensaios de biocompatibilidade mostram uma importante relação entre a dinâmica de molhabilidade do fluido corporal simulado e as diferentes interfaces. As modificações nas superfícies promovem a difusão iônica de espécies como o sódio e o cálcio. O revestimento final, testado no Ti cp e nas ligas Ti6Al4V e Ti13Nb13Zr, apresentou bioatividade e alta adesão interfacial.

Palavras-chave: interfaces, rugosidade, energia superficial livre, molhabilidade, bioatividade

ABSTRACT

The loss of a body part is a constant concern of the humanity since ancient times. There has been a continuous search for materials for treatment, enhancement or replacement of tissues, organs and body functions. That has led to the development of several bioactive materials that can promote a better connection with the bone (osseointegration) through a physical-chemical bond between implant and bone. Although the significant advances in science and technology of biomaterials, information about the chemical nature and spatial dimensions (roughness and topography) of the materials is still needed to enable one to have a better understanding of their influence, especially in the first stages of tissue regeneration. The macroscopic evaluation of the surface energy at the interfaces and the simulation of the dynamic processes of interaction between the material and the biological environment may be the key for the development of bioactive materials with high interfacial adhesion. Owing to that, the present work is aimed at the study of the interactions occurring at the contact between the human body and metallic biomaterials after modifications in the surfaces of the materials. The study was carried out through simulations with experimental techniques of electron microscopy, tensiometry, goniometry and biocompatibility tests, which provided a better understanding of the physical, chemical and biological events occurring at the interfaces between the human body and the biomaterials.

Key Words: interfaces, roughness, Free Energy Surface, wettability, bioactivity

Lista de Figuras

1 - Fotografia de prótese do dedão de pé dobrável encontrado em múmia.....	18
2 - Imagem ilustrando as interações entre o meio biológico e um implante.....	24
3 - Interfaces de um biomaterial mostrando as diferentes fases.....	25
4 - Representação dos estágios de osseointegração propostos por Branemark.....	30
5 - Representação de diferentes mecanismos interfaciais para a adesão.....	32
6 - Modelos de estruturas cristalinas em multicamadas para revestimentos.....	33
7 - Espectros de difração de raios x dos pós de hidroxiapatitas calcinados em diferentes temperaturas e comparados com Hidroxiapatita comercial.....	40
8 - Micrografia Eletrônica (MEV) e (b) Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) dos pós de Hidroxiapatita.....	41
9 - Sistematização da pesquisa.....	42
10 - Diagrama do compartimento onde as amostras são colocadas para análise térmica.....	43
11 - Esquemática interna do microscópio eletrônico utilizado.....	45
12 - Diferentes texturas de uma superfície.....	46
13 - Definição da rugosidade média.....	46
14 - Diferentes perfis de superfícies com a mesma rugosidade média.....	47
15 - Cálculo da rugosidade máxima R_z	47
16 - Diversas formas de rugosidade para o mesmo valor de R_y	48
17 - Definição da rugosidade R_t	48
18 - Definições da rugosidade parcial Z_i e R_z	49
19 - Métodos para testar adesão interfacial, (a) teste <i>pull-off</i> , (b) teste por adesivos (c) testes por raspagem ou indentação.....	50
20 - Interações entre átomos ou moléculas no interior e na superfície de um material.....	51
21 - Representação das tensões agindo em uma gota de um líquido em uma superfície.....	52
22 - Fotografia da gota de SBF antes e após o contato com a superfície das amostras.....	56

23 - Imagem da tela do programa usado na medida dos ângulos de contato.....	58
24 - Fotografia do meio de cultura de osteoblastos obtida com microscopia ótica (1ª observação 3º dia).....	60
25 - Meio Fotografia do meio de cultura celular obtida com microscopia ótica (2ª observação – 6º dia).....	61
26 - Imagem obtida por MEV da amostra de titânio como recebida.....	64
27 - Imagem obtida por MEV da amostra de titânio após lixamento.....	65
28 - Imagem obtida por MEV da amostra de titânio após tratamento ácido.....	65
29 - Imagem obtida por MEV da amostra de titânio após tratamento alcalino.....	66
30 - Cálculo efetuado pelo programa usado na determinação da energia da superfície em termos de componentes de energia dispersiva e polar.....	68
31 - Análises térmicas para caracterização da titânia utilizada nos revestimentos.....	72
32 - Análise térmica para caracterização da hidroxiapatita utilizada nos revestimentos.....	72
33 - Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento ácido e revestido com TiO ₂	74
34 – Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento alcalino e revestida com TiO ₂	74
35 - Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento ácido, revestido com TiO ₂ e HA.....	75
36 - Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento alcalino, revestida com TiO ₂ e HA.....	76
37 - Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento ácido e revestida com cálcio....	77
38 - Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento alcalino e revestida com cálcio.....	77
39 - Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento alcalino e revestido com cálcio e HA.....	78
40 - Imagens obtidas por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+HCl por AFM.....	81
41 - Imagens obtidas por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+NaOH.....	82
42 - Imagens obtidas por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+NaOH+TiO ₂	83

43 - Imagens obtidas por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+NaOH+TiO ₂ +HA.....	84
44 - Imagem obtida por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+NaOH+CaTiO ₃	85
45 - Imagem obtida por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+NaOH+CaTiO ₃ +HA.....	86
46 - Rugosidade e energia superficial de amostras com interfaces de tratamento intermediário alcalino.....	89
47 - Medidas das variações do ângulo de contato em função do tempo para o estudo de todas as interfaces desenvolvidas.....	91
48 - Variação do ângulo de contato em função do tempo para a amostra com interface TiNaOHCaTiO ₃	92
49 - Variação do ângulo de contato nos primeiros dez segundos de interação com diferentes superfícies.....	94
50 - Molhabilidade do Fluido Corporal Simulado no revestimento testado no titânio e suas ligas.....	96
51 - Cinética de molhabilidade medida na amostra TiNaOHCaTiO ₃	99
52 - Energia superficial e variação do ângulo de contato em função do tempo para diferentes interfaces.....	100
53 - Imagens obtidas por MEV com 250 x de aumento das interfaces (a) células e superfície Ti+HCl e (b) células e superfície Ti+NaOH.....	101
54 - Imagens obtidas por MEV com 1000 x de aumento das superfícies (a) células e superfície Ti+HCl e (b) células e superfície Ti+NaOH.....	102
55 - Imagens obtidas por MEV com 5000 x de aumento das superfícies (a) células e superfície com tratamento ácido e (b) células e superfície com tratamento alcalino....	102

Lista de Tabelas

1 - Comparação das ligas Ti6Al4V e da liga Ti13Nb13Zr.....	21
2 - Características dos materiais metálicos mais utilizados para implantes ortopédicos.....	22
3 - Classificação dos diferentes tipos superfícies de materiais e possíveis interações interfaciais no processo de regeneração.....	27
4 - Nomenclatura das interfaces obtidas a partir das modificações das superfícies.....	41
5 - Concentrações iônicas (em mM) do fluido corporal simulado e do plasma sanguíneo humano.....	55
6 - Energia da Superfície medida em mJ/m^2 para substratos metálicos após as primeiras modificações nas superfícies.....	70
7 - Ativação das superfícies para diferentes interfaces.....	79
8 - Energia de superfície e variação do ângulo de contato das superfícies para cada interface criada.....	95
9 - Valores médios de Densidade Ótica correspondentes ao crescimento de células L929 em diferentes tempos de cultura.....	97
10 - Valores médios de Densidade Ótica correspondentes ao crescimento de diferentes volumes de células L929 e tempos de cultura.....	97
11 - Valores médios de Densidade Ótica correspondentes ao crescimento de diferentes volumes de células L929 em 72h de cultura.....	98
12 - Valores médios de Densidade Ótica correspondentes ao crescimento de células L929 em diferentes tempos de cultura.....	98
13 - Resultado dos testes de adesão, medida em MPa, de todas as interfaces criadas para o Ti cp.....	103
14 - Adesão medida em MPa de todas as interfaces criadas para a liga Ti6Al4V.....	104

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO	17
I.1 Contextualização.....	17
I.2 Osseointegração	23
I.3 Interfaces	24
I.4 O problema da adesão	30
I.5 O problema da toxicidade.....	34
I.6 Motivações científica e tecnológica	35
II. OBJETIVOS E META.....	36
III - METODOLOGIAS E EXPERIMENTOS.....	37
III.1 Amostras Metálicas	37
III.2 Ativação das superfícies e criação das interfaces	37
III.3 Caracterizações, testes e ensaios	42
III.3.1 Análises Térmicas e Estruturais	43
III.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	44
III.3.3 Microscopia de Força Atômica.....	45
III.3.4 Adesão do Revestimento Bioativo	49
III.3.5 Tensiometria e Goniometria.....	51
III.3.6 Cinética de Molhabilidade do Fluido Corporal Simulado	54
III.3.7 Biocompatibilidade	59
IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
V - CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICES.....	116

I. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO

I.1 Contextualização

A perda de parte do corpo é uma constante preocupação do ser humano desde os tempos mais remotos. Sejam por acidentes traumáticos ou doenças ósseas, as limitações promovidas pela perda de um braço, perna ou dente, quase sempre resultam em limitações, impossibilidades e mudança comportamental. Na idade média e durante o império romano, as batalhas campais promovidas pela natureza humana, culminavam com grande número de mortos, assim como de sobreviventes amputados. Nos dias de hoje, acidentes no trânsito, aumento na expectativa de vida e ritmo de vida imposta pela sociedade, são algumas das causas de traumas e doenças ósseas que comprometem a vida social e profissional. Na busca pelo tratamento, aumento ou substituição de tecidos, órgãos e funções do corpo, surgiram os biomateriais.

O primeiro material, ou, a primeira “prótese” da história, segundo artigo publicado pela Scientific American em agosto de 2007, foi encontrado por cientistas da University of Manchester no pé de uma múmia egípcia feminina de 2400 anos A.C. O dedão do pé dobrável, feito em madeira e couro, foi colocado em substituição a um dedo que foi amputado. Há outros registros de materiais implantados no corpo humano desde 4000 A.C. como placas metálicas para lesões cranianas e membros artificiais¹.



Figura 1 – Fotografia de prótese do dedão de pé dobrável encontrado em múmia².

O primeiro autotransplante documentado foi realizado na Idade do Bronze. Teria sido realizado por meio de uma trepanação para aliviar a pressão intracraniana aumentada, através da retirada de um fragmento circular de osso do crânio, posteriormente recolocado em sua posição para reparar o defeito. Escritos chineses e egípcios descrevem tentativas de transplantar membros perdidos. O transplante moderno começou muito tempo depois, no início do século 20.

No decorrer da história, foram desenvolvidos e aperfeiçoados diversos materiais para serem aplicados em sistemas biológicos, mesmo sem uma efetiva conceituação científica relativo a infecções, reações e materiais adequados. Mas foi no período da segunda guerra mundial que ocorreram avanços científicos importantes na biologia e na ciência de materiais. Com o estudo da estrutura da matéria, foi possível desenvolver metais e ligas metálicas como cromo-cobalto-molibidênio, tântalo e titânio que pudessem promover uma compatibilidade entre o material e o corpo humano.

Atualmente, com a interação de pesquisadores das áreas da física, química, biologia, medicina, engenharias e informática, se desenvolvem diferentes materiais bioativos e superfícies inteligentes destinados a desempenhar funções mecânicas, promovendo uma melhor conexão óssea (osseointegração) através de uma ligação físico-química entre o “implante” e o osso².

Compostos de origem natural ou sintética que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo, os biomateriais podem ser metais, ligas metálicas, cerâmicas, polímeros ou compósitos. Esses materiais devem apresentar além de resistência a corrosão e propriedades mecânicas adequadas, três outras propriedades fundamentais^{3,4}. São elas: a biocompatibilidade, que é a capacidade do material responder apropriadamente ao hospedeiro ou receptor, em uma aplicação específica; a biofuncionalidade, que é a capacidade de desempenhar uma função, semelhante ao material que está substituindo e a bioadesão, que é a propriedade que permite a união entre o implante e o tecido.

A área de biomateriais agrupa diversos produtos dentro das áreas da saúde que incluem odontologia, ortopedia e cardiologia. Com tanta diversidade de produtos, a ANVISA começou a identificar cada material/produto considerando gastos públicos, privados e variações de preços dentro de certo período. Os gastos do SUS com ortopedia, por exemplo, crescem a uma taxa constante, cujas variáveis econômicas incluem internações, aquisição de próteses, cirurgias e afastamentos trabalhistas. Acrescenta-se nessas análises também, o aumento da expectativa de vida média dos seres humanos, que somado aos outros fatores, implica na necessidade da ampliação na oferta de produtos e serviços que sejam oriundos das tecnologias de materiais⁵. Essa necessidade implica em um aumento significativo nas pesquisas científicas para o desenvolvimento de novos biomateriais.

No que se refere às terapias regenerativas, a perspectiva é de que fraturas e rompimentos de tecidos resultantes de traumas violentos possam, em um curto período de tempo, ser recuperadas de forma mais eficaz possível. Para que as terapias de

regeneração sejam otimizadas⁶, é importante que o material implantado tenha qualidades peculiares, em especial no que se refere às propriedades bioativas.

Dentre os biomateriais utilizados na área da saúde humana, os materiais metálicos são usados em casos onde as propriedades mecânicas são requisitos fundamentais para aplicação. São utilizados na artroplastia, na reparação de juntas do joelho, no tratamento das fraturas crânio-maxilo-faciais e nos implantes odontológicos.

O titânio e suas ligas são amplamente empregados nas indústrias de implantes, pois resultados de experiências clínicas mostram que esses materiais apresentam excelente biocompatibilidade. Descoberto na Inglaterra em 1791 pelo mineralogista Willian Justin Gregor, o titânio foi obtido a partir do mineral FeTiO_3 sendo redescoberto mais tarde por Martin Klaproth a partir do rutilo TiO_2 . Mesmo não sendo encontrado livre na natureza, é o nono elemento mais abundante na crosta terrestre e o Brasil é o detentor da maior reserva de titânio concentrados nos estados de Minas Gerais e Goiás⁷.

Através da adição de elementos químicos e de tratamentos térmicos é possível criar ligas de titânio com a finalidade desejada com características mecânicas apropriadas e funcionais semelhantes ao osso.

O ano de 1940 marca o início do desenvolvimento do titânio para utilização comercial e, quase que simultaneamente, a sua evolução como material para implante cirúrgico. Os primeiros experimentos utilizando o titânio como material de implante em animais foram realizados por Bothe, Leventhal e colaboradores, com resultados de compatibilidade com o tecido bastante favoráveis⁸. Em 1950 foi utilizado nos EUA como material de fixação em pequenas fraturas, de forma pouco expressiva. Enquanto que na Inglaterra, em 1960, as ligas de titânio foram empregadas, mais extensivamente, como material de implante⁹.

O uso do titânio e suas ligas para aplicações como implantes começou a ser difundido no início de 1970¹⁰. O Ti comercialmente puro (Ti cp) e a liga foram desenvolvidas originalmente como materiais estruturais para aplicação na indústria aeroespacial, mas passaram a serem os principais materiais para aplicações como implantes cirúrgicos.

A liga Ti13Nb13Zr desenvolvida por J. David faz parte da nova geração de ligas biocompatíveis para aplicação como dispositivo médico. É uma liga quase β que consiste de martensita HC (α) na condição de tempera em água. Com um envelhecimento subsequente, a liga vai consistir de uma fase HC (α) e precipitados submicroscópicos β de CCC (α). Esses precipitados β dispersos endurecem o material e aumentam sua resistência¹¹. A tabela 1 mostra algumas diferenças entre as ligas Ti6Al4V e Ti13Nb13Zr no que se refere às propriedades mecânicas.

Tabela 1 – Comparação das ligas Ti6Al4V e da liga Ti13Nb13Zr¹¹

Propriedades	Ti6Al4V (recozida)	Ti13Nb13Zr (temperado em água/envelhecido)	Ti13Nb13Zr (trabalhado a frio)
Limite de Resistência (MPa)	985	1030	1050-1100
Limite de Escoamento (MPa)	860	900	950-1050
Módulo de elasticidade (GPa)	115	79	45-50
Alongamento (%)	12	15	10-15

O número de procedimentos cirúrgicos, envolvendo próteses, continua aumentando consideravelmente visando restaurar as funções originais e promover o alívio da dor. Os materiais metálicos de uso comum, além do titânio e suas ligas, englobam também o aço inoxidável austenítico, onde o baixo teor de carbono confere maior resistência à corrosão e as ligas a base de cobalto, com menor módulo de elasticidade, resistência à corrosão e ao desgaste que o aço inoxidável. No entanto, é o titânio e suas ligas que apresentam as melhores combinações de propriedades mecânicas, resistência a corrosão e biocompatibilidade, condições necessárias para aplicação como próteses e implantes. A tabela 2 mostra algumas características dos materiais metálicos mais utilizados.

Tabela 2 - Características dos materiais metálicos mais utilizados para implantes ortopédicos¹²

	Aço Inoxidável	Ligas de Co	Ti e Ligas de Ti
Denominação	ASTM F-138 (316 LDVM)	ASTM F-75 ASTM F-779 ASTM F-1537 (fundido e trabalhado)	ASTM F-67 (ISO 5832/II) ASTM F-136 (ISSO 5832/II) ASTM F-1295 (fundido e trabalhado)
Principais elementos de liga (% em peso)	Fe (bal.) Cr (17-20) Ni (12-14) Mo (2-4)	Co (bal.) Cr (19-30) Mo (0-10) Ni (0-37)	Ti (bal.) Al (6) V (4) ou Nb (7)
Vantagens	- custo - disponibilidade - beneficiamento	- resistência ao desgaste - resistência à corrosão - resistência à fadiga	- biocompatibilidade - resistência à corrosão - resistência à fadiga - menor módulo de elasticidade
Desvantagens	- comportamento durante longo tempo de aplicação - alto módulo de Elasticidade	- alto módulo de elasticidade - problemas de biocompatibilidade	- baixa resistência ao desgaste - baixa resistência ao cisalhamento
Utilizações	Dispositivos temporários (placas, parafusos e pinos)	Fundições dentais e próteses externas	Dispositivos de longo tempo ou permanentes como hastes femoral, marca passos e pinos

I.2 Osseointegração

O processo de osseointegração pode ser interpretado como um sistema dinâmico regido por interações que ocorrem na ausência de uma camada fibrosa em torno do osso estrutural e funcional, entre osso ordenado e vivo e entre superfície de um implante, resultado de ligações físico-químicas entre o material e o osso. Na literatura, alguns pesquisadores esclarecem a importância dos estágios iniciais dos fenômenos relacionados à regeneração tecidual^{13,14}.

A energia superficial e as dimensões espaciais (topografia e a rugosidade) da superfície de um material são consideradas de extrema importância para a osseointegração. A rugosidade da superfície em particular tem influência direta no ancoramento das células ósseas e conseqüentemente na sua proliferação no material. A largura, a profundidade e a quantidade de sulcos são consideradas fatores determinantes para uma reação positiva e orientação das células no substrato¹⁵. Células ósseas aderem-se mais facilmente a superfícies rugosas e aparecem de maneira diferenciada quando comparadas com a morfologia de uma matriz extracelular¹⁶, no entanto, o nível ideal de rugosidade ainda não é totalmente compreendido no âmbito científico quando nos referimos aos processos.

A Figura 2 ilustra as interações entre o meio biológico e um implante. Em vermelho, observam-se glóbulos sanguíneos, em amarelo, células ósseas e em cinza, a superfície do material. No que se refere aos estágios iniciais do processo, o primeiro contato da superfície é com o sangue (plasmas corporal), cujo volume envolvendo o material vai variar em função da geometria do implante e do sítio cirúrgico¹⁷. O coágulo sofrerá uma série de eventos biológicos que terminarão na formação de tecido ósseo ao redor do material. O implante entrará em contato com percentagens variáveis de osso cortical, osso trabecular e medula óssea. Algumas áreas estarão comprimindo o tecido ósseo enquanto outras estarão em contato com sangue e uma variedade de células^{18, 14}. Essa característica aponta para a possibilidade da existência de diversas interfaces com o implante.

Para entender melhor o processo de osseointegração é preciso relacioná-lo com as características das superfícies dos materiais durante os primeiros estágios da vascularização do tecido, que se forma em torno do implante imediatamente após a cirurgia. Ela é responsável pelos parâmetros de migração, alinhamento, orientação, adesão, crescimento das proteínas e das funções celulares^{17, 18}, o que nos remete a encontrar métodos e técnicas que possam simular esses eventos iniciais de interações.

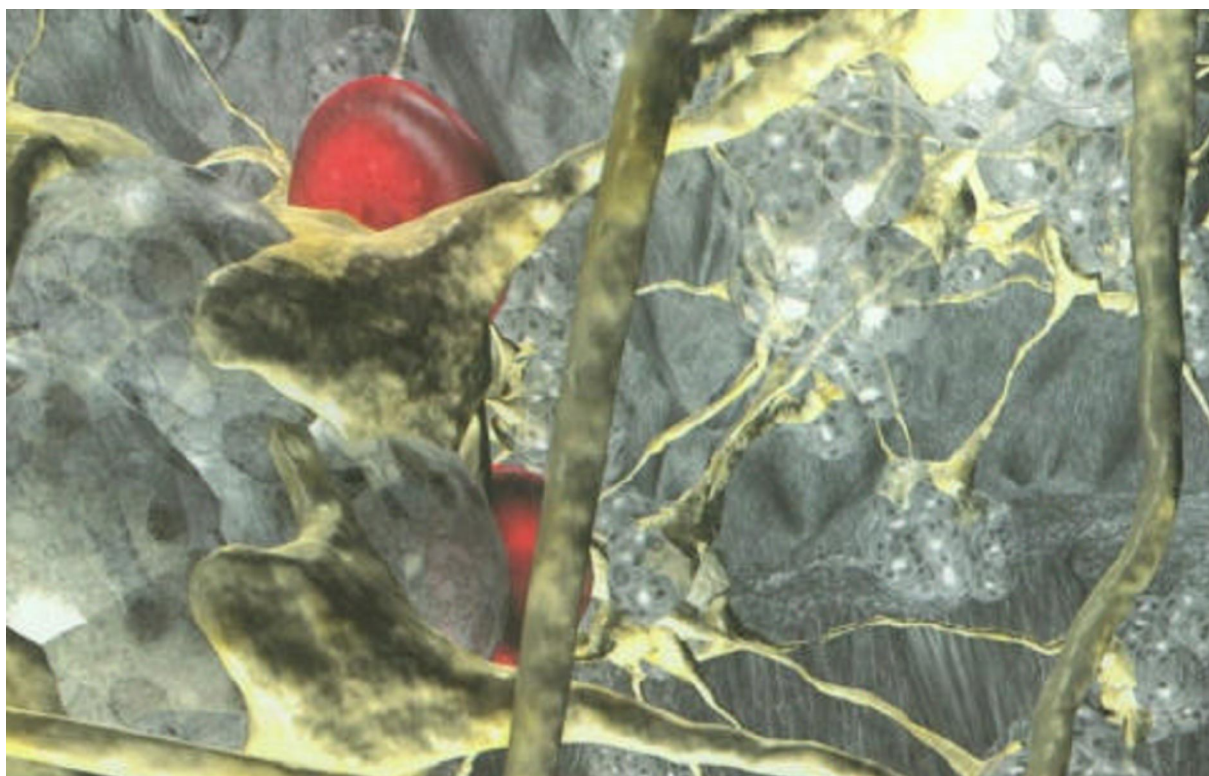


Figura 2 – Imagem ilustrando as interações entre o meio biológico e um implante¹⁷

I.3 Interfaces

Para um estudo de fenômenos ocorridos na superfície dos materiais deve ser levada em consideração a natureza da superfície e o meio externo no qual a superfície está em contato. Ao analisar duas fases em contato, sempre existirá uma interface, através da qual, propriedades do sistema se intercambiam de uma fase para outra, como por exemplo, num sistema formado por um sólido e um líquido. Para que tal limite

seja estável, é imperativa a existência de uma energia livre interfacial, semelhante ao trabalho que deverá ser feito para estender ou diminuir o limite desta interface. Em nosso caso, as interfaces envolvem as superfícies dos materiais como o titânio e as ligas, as camadas de óxidos, os revestimentos com titânias e hidroxiapatitas e o fluido corporal do meio biológico. A figura 3 ilustra o modelo de interfaces em questão.

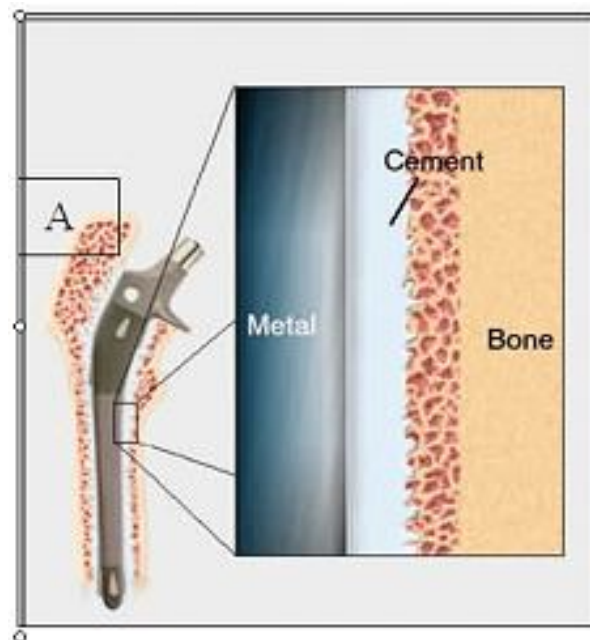


Figura 3 – Interfaces de um biomaterial mostrando as diferentes fases¹⁹.

A busca pela condição ideal para a regeneração do osso implica nas condições favoráveis da superfície dos materiais ao interagir com o meio biológico, no caso sangue, proteínas e células. O modo como as interações interfaciais irão ocorrer dependerão dos tipos de superfícies e que podem ser classificadas como inerte, tolerável, reativa ou ativa. Todas energeticamente distintas.




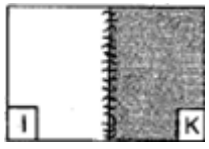
As superfícies bioinertes não induzem resposta local do sistema imunológico, mas tendem a ser envolvidos por uma cápsula fibrosa isolando-se do meio biológico. São materiais inertes nos tecidos, ou seja, a película de óxido em contato com o tecido é praticamente insolúvel^{19,20}. São quimicamente muito estáveis e, portanto, muito pouco prováveis de ter uma resposta biológica adversa. .

As superfícies bioreativas em contato com o ar, a água ou qualquer outro eletrólito forma uma camada de óxido espontaneamente na sua superfície. A biocompatibilidade dos metais e ligas é baseada na formação de uma camada fina e aderente de óxido estável. Cada classe de metal deve ter sua composição química bem controlada a fim de que não haja degradação da camada de óxido nem das propriedades mecânicas do metal ou liga metálica. Os metais classificados como bioreativos ficam no limite entre os materiais bioinertes e os bioativos. Esses metais adquirem bioatividade após um tratamento de ativação de superfície do seu óxido. São eles, o titânio, o nióbio e o tântalo^{20,21}.

Para os propósitos deste trabalho, o termo bioatividade pode ser compreendido como sendo a propriedade de formar tecido sobre a superfície de um material estabelecendo uma interface capaz de suportar cargas funcionais. Materiais bioativos são aqueles que induzem uma resposta específica na interface implante-tecido, permitindo uma melhor ligação físico-química entre o material e o tecido vivo²². Os fenômenos interfaciais devem ocorrer com a ausência de camadas fibrosas, ou seja, é interessante que a superfície forneça condições apropriadas, em termos de energia, para aumentar a interação entre as fases e conseqüentemente a velocidade do plasma sanguíneo e dos precursores de células específicas. Esses precursores devem se diferenciar em células osteoblásticas, que são fundamentais para assegurar a ancoragem mecânica dos tecidos e promover a osseointegração.

Quando estão em contato com o tecido ósseo, os materiais bioativos formam uma camada de apatita biologicamente ativa sobre sua superfície, e ligam-se ao tecido através desta camada. Este é o principal mecanismo de ligação entre um material bioativo e o tecido ósseo. A tabela 3 mostra as diferentes superfícies de biomateriais e as ocorrências nas interfaces.

Tabela 3 – Classificação dos diferentes tipos superfícies de materiais e possíveis interações interfaciais no processo de regeneração²²

Material	Implante / Tecido	Aparência histológica na interface	Tipo de Osteogênese
Biotolerável (aço inoxidável, liga de ouro)		Cápsula de tecido conjuntivo (cicatriz fibrosa), possível osteóide ou contato condróide	Distante
Bioinerte Titânio, alumina, zircônia		Contato entre osso e superfície do implante	De contato
Bioreativos (óxidos formados espontaneamente nas superfícies metálicas)		União química	De união
Bioativos Fosfato de Ca, apatitas e titânio com superfícies modificadas		União físico-química	Verdadeira

Dentre os revestimentos cerâmicos bioativos disponíveis para implantes, a hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ é o material que mais promove a formação óssea. Desempenha um papel importante no processo de biomineralização, pois é o principal componente da fase mineral óssea^{23, 24}. Dessa forma, o uso dos recobrimentos à base de hidroxiapatita sobre implantes metálicos associa a resposta biológica favorável destes materiais às excelentes propriedades mecânicas dos metais. Sua função vital em aplicações ortopédicas e odontológicas é atribuída à favorável osseocondutividade e outras propriedades bioativas, que aceleram a formação do osso novo ao redor do

implante, reduzindo o tempo de cicatrização, e conseqüentemente, o tempo total de tratamento²⁵.

A hidroxiapatita atua como um substrato fonte de fosfato e cálcio. Acelera os processos de diferenciação celular, deposição de colágeno e precipitação de cálcio e fosfato. O aumento nas concentrações locais desses elementos causa intensa calcificação e estabelece um gradiente de proliferação celular²⁶. Por causa desta vantajosa propriedade bioativa, as próteses recobertas com hidroxiapatita previnem micro movimentos na interface e conseqüentemente preveni falhas interfaciais do dispositivo protético, aumentando os limites de tolerância cirúrgica^{27,28}.

A conectividade entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo tem se mostrada satisfatória em prazos longos. Segundo Branemark e Hensch, essa conectividade é atribuída à formação de uma ligação físico-química entre o tecido e o material, como conseqüência da bioatividade e reabsortividade das apatitas²². Para assegurar a ancoragem mecânica do osso na superfície do implante (bioadesão), a estrutura superficial micromorfológica (rugosidade e porosidade) do material é fundamental, pois permite uma resposta biológica específica do tecido vivo^{20, 22,23}.

Estudos realizados em ossos circunvizinhos ao implante recoberto por hidroxiapatita mostraram o aumento da capacidade biomecânica. No entanto, observaram que apesar deste recobrimento atenuar a corrosão do substrato metálico e sua dissolução, a hidroxiapatita não se constitui como barreira de difusão de íons metálicos ao organismo, o que levou a pesquisa de utilização de uma intercamada de titânia (TiO₂) rugosa e não porosa^{29,30,31}.

A tecnologia para produção de revestimentos cristalinos de titânia encontra-se estabelecida devido a sua aplicação em vários campos da engenharia química e de materiais como purificação fotocatalítica de águas residuais, conversão de energia solar, circuitos integrados, sensores de gases e indústrias de tintas^{32,33,34}.

A titânia apresenta propriedades atrativas que incluem elevada dureza, alta constante dielétrica e grande estabilidade química. Estudos sobre a modificação da superfície do titânio comercialmente puro ou de ligas pela deposição de filmes finos de titânia mostram melhoras nas propriedades do biomaterial, mesmo sem a utilização de hidroxiapatita³⁵.

Há também que considerar maior fixação do osso e melhor osseointegração promovidas pelo aumento da área superficial^{36, 37}. Desse modo, torna-se possível aumentar a adesão entre o substrato e o revestimento de hidroxiapatita, utilizando uma camada intermediária de titânia que atuará, além de tudo, como protetor eficaz contra a corrosão do substrato^{20,21}.

Nessa linha de pensamento, a proposta foi que, ao invés de simplesmente depositar camadas bioativas de hidroxiapatita, a superfície fosse construída camada por camada criando diversas interfaces até o revestimento final com altas propriedades bioativas.

Para avaliar os efeitos das modificações propostas na tese, é importante levar em consideração a verificação da ativação da superfície e como ela se relaciona com o meio. Essa avaliação se dá através da determinação da energia da superfície.

No que se refere à adesão dos revestimentos, a disponibilidade energética da superfície pode fortalecer a interface entre o metal e o filme, melhorando a adesão. Em contato com o meio biológico, diferentes níveis de energia podem influenciar na adesão e proliferação de células. Os modelos físicos utilizados neste trabalho para avaliar as energias nas interfaces são fundamentados no princípio da energia livre superficial.

Ao aplicar o biomaterial no corpo humano, os primeiros estágios do processo de osseointegração começam a ocorrer influenciados diretamente pela disponibilidade energética da superfície. A figura 4 mostra o processo de osseointegração dividido em estágios onde o hematoma (2) formado ao redor do implante (1) se transforma em osso

novo no segundo estágio do processo (5) e o osso danificado (3) começa a ser cicatrizado por um processo de desmineralização e remineralização (6) até se transformar em um novo osso saudável (7) igual ao anterior (4).

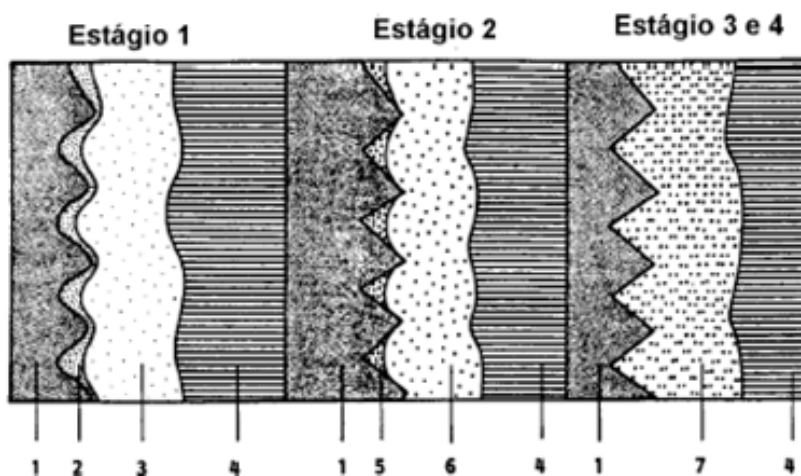


Figura 4 – Representação dos estágios de osseointegração propostos por Branemark¹³

I.4 O problema da Adesão

Adesão é certamente o primeiro requisito que um filme precisa ter antes de qualquer outra propriedade. É importante que, ao avaliar a adesão de interfaces, seja considerado a natureza das ligações química e como a superfície é caracterizada em termos de energia superficial. Em princípio, podemos pensar nos efeitos da adesão de um revestimento através da qualidade, durabilidade e estabilidade das interfaces. Ao medir a força ou energia necessária para separar um revestimento de um substrato, o que se mede é a energia das ligações atômicas³⁸.

Termodinamicamente, o trabalho (W) requerido para separar uma unidade de área de duas fases formadas em uma interface é expresso por:

$$W = \gamma_f + \gamma_s - \gamma_{fs} \quad (1)$$

Onde γ_f e γ_s são as energias específicas do filme e do substrato e γ_{fs} é a energia da interface. Um trabalho positivo denota atração (adesão) enquanto o negativo implica em repulsão. O trabalho de adesão (W_a) possui alto valor e forte adesão quando materiais com alta energia superficial entram em contato como a maioria dos metais. Em contrapartida, W_a é pequeno e a adesão é fraca quando a energia superficial é baixa como nos polímeros. Quando γ_f e γ_s são idênticos, então forma-se os contornos de grãos nas interfaces onde γ_f e $\gamma_s > \gamma_{fs}$ ³⁸.

Sob um olhar microscópico, a teoria de adsorção atômica e molecular é geralmente aceita quando existir um íntimo contato entre um revestimento e substrato. Acredita-se que a grande contribuição da energia de adesão é devida a processos de fisissorção (forças de Van der Waals) que resultam em forças com energia em torno de 0,1 eV por pares de átomos. Além das forças de Van der Waals, interações químicas (quimissorção) também contribuem para a adesão e envolve principalmente ligações iônicas e covalente variando de 1 a 10 eV^{38,39}.

Ao menos quatro tipos de interfaces podem ser distinguidas durante processos de deposição ou revestimento. Uma delas é a interface abrupta que é caracterizada pela mudança repentina do filme para o substrato com um espaçamento atômico entre 1 a 3 Angstroms. Esse tipo de interface normalmente apresenta pouca adesão em especial devido à baixa taxa de difusão entre o filme e o substrato. A interface composta é caracterizada por estrutura de multicamadas e normalmente a adesão é boa se o revestimento é fino, porém fraca se o filme possuir uma espessura maior. A interface por difusão é caracterizada pela gradual mudança na composição entre o filme e o substrato. Através da interdifusão, normalmente é promovida uma boa adesão. Esse tipo de interface é encontrado em sistemas poliméricos usados como adesivos. A interface mecânica é caracterizada pela ancoragem na rugosidade da superfície do substrato durante a deposição. Neste caso, as forças de atração dependem em princípio, das propriedades mecânicas do filme e do substrato assim como da geometria. O maior interesse científico e tecnológico está na busca de interfaces do tipo

3 e 4 conforme a figura 5, que mostra os diferentes mecanismos na adesão de interfaces criadas em uma deposição de filmes³⁸.

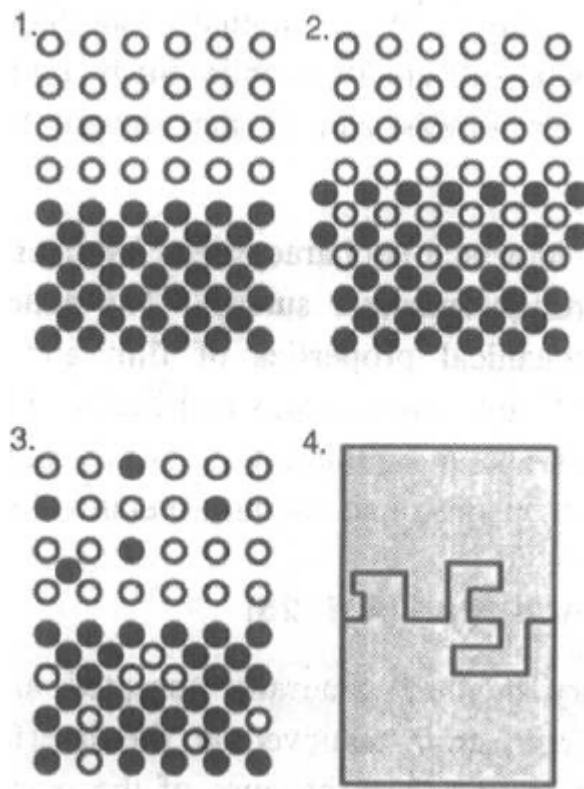


Figura 5 – Representação de diferentes mecanismos interfaciais para a adesão: (1) Interface abrupta; (2) interface composta; (3) interface por difusão; (4) interface por ancoragem mecânica³⁸

O tipo de região interfacial formado durante o revestimento de um substrato não irá depender apenas do trabalho de adesão (W_a), mas também da morfologia da superfície, interações químicas, taxas de difusão e processos de nucleação. Soma-se a isso o fato de que as interfaces entre metal-óxidos são diferentes de interfaces metal-metal quando nos referimos à orientação cristalográfica, variável que pode promover maior tensão interfacial diminuindo a adesão³⁸.

Em condições de aplicação biomédica, as diferentes estruturas atômicas que constituem as interfaces possuem distintas funções. No caso do metal, responsável pelas propriedades mecânicas requeridas para aplicação em próteses e implantes, este deve possuir camadas oxidadas com dupla característica. A primeira é a capacidade de aumentar a aderência do revestimento bioativo através de uma orientação cristalográfica preferencial. Para isso é necessário um conhecimento prévio sobre estruturas cristalinas considerando as interfaces como multicamadas, conforme ilustrado na figura 6, de tal forma que, durante a criação das interfaces até o revestimento final, não ocorra o desajuste fracional entre as células unitárias. A outra característica é servir como uma barreira protetora anti-corrosão especialmente para evitar a lixiviação de elementos como o Alumínio e o Vanádio presentes nas ligas de titânio.

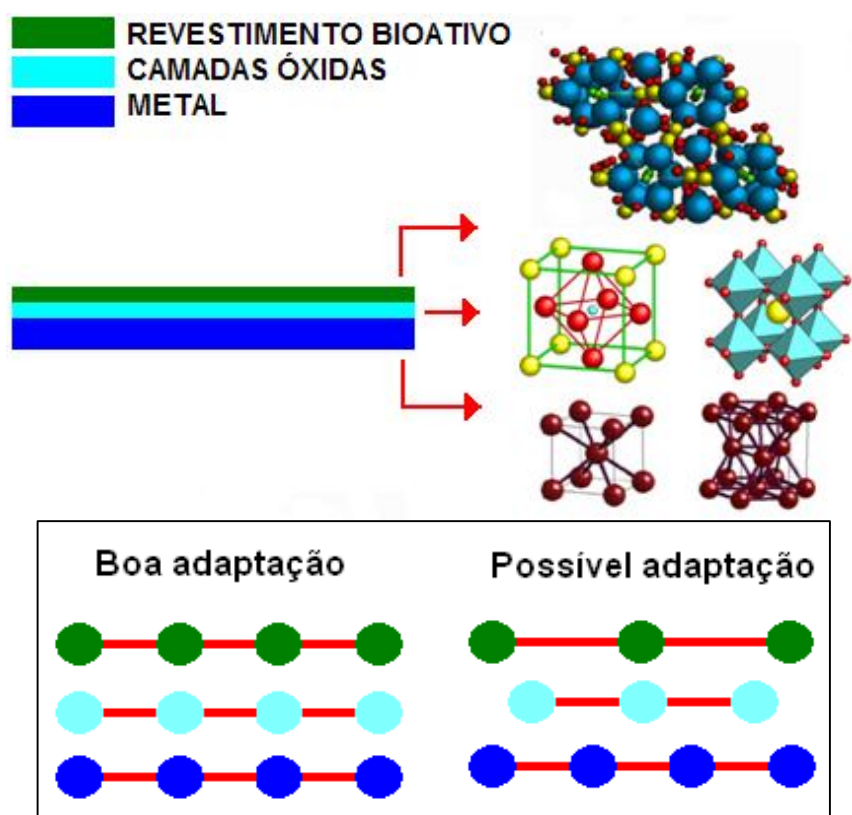


Figura 6 – Modelos de estruturas cristalinas em multicamadas para revestimentos.

I.5 O problema da toxicidade

Das ligas metálicas a base de titânio, a Ti-6Al-4V é a mais utilizadas devido a sua boa biocompatibilidade e resistência mecânica⁴⁰, apesar de apresentar alto módulo de elasticidade⁴¹. Contudo, as ligas de titânio contendo vanádio e alumínio, apresentam efeitos tóxicos devido à liberação destes íons no organismo. Estudos realizados com pacientes que têm implantes de Ti-6Al-4V nas articulações mostraram a presença de íons alumínio e vanádio em seus tecidos. Elevadas concentrações de íons alumínio e vanádio nos tecidos provocam uma reação histológica e produz leucócitos polinucleares (células gigantes), causando sintomas similares aos das reações alérgicas e inflamatórias⁴².

A preocupação com a toxicidade dos elementos alumínio e vanádio levou pesquisadores a desenvolver ligas sem a presença desses íons em sua composição. Estudos mostraram que os elementos Nb, Zr, Ta, Pt e Ti não produzem reações adversas nos tecidos^{43,44}. Os exames histológicos e análise de imagem em implantes de animais mostraram que os metais Ti, Nb, Ta, Hf e Re potencializam a compatibilidade e a osteogênese. Isso se deve a maior resistência à corrosão levando a não dissolução metálica em tecidos moles e duros^{45,46}. Dentre as ligas, destaca-se a liga Ti-13Nb-13Zr, promissora para aplicação em implante ósseo e objeto de pesquisa nesta tese.

A utilização de recobrimentos cerâmicos bioativos faz com que o organismo deposite uma camada de fosfato de cálcio sobre a superfície original do biomaterial quando utilizada *in vivo*. Os componentes do fosfato de cálcio podem variar na composição, porém, é importante que os íons cálcio, fosfato e magnésio sejam lentamente liberados para obter boa resposta tecidual⁴⁷, no entanto, os fenômenos interfaciais não podem promover a liberação de elementos como o Alumínio e o Vanádio das ligas metálicas. Assim, a condição ideal de uma superfície metálica é que seja bioativa, com alta adesão e estabilidade do revestimento e funcione como uma

barreira no substrato metálico. Em conjunto, todos esses requisitos devem promover uma melhor osseointegração.

I.6 Motivações Científica e Tecnológica

Esta tese foi desenvolvida a partir de algumas motivações pontuais. Uma delas é, através dos conhecimentos da área de ciência e tecnologia de materiais, diante da possibilidade de resolver um problema tecnológico e industrial relacionado à adesão de revestimentos bioativos em superfícies metálicas

Outra motivação está relacionada à investigação de fenômenos interfaciais resultantes do contato entre um biomaterial e o meio, de forma que, com este estudo, seja possível investigar os fenômenos da osseointegração, em especial, nos primeiros estágios do processo. Como hipóteses, algumas questões foram abordadas na procura por regularidades e interpretações de um sistema dinâmico em função da natureza das partículas envolvidas nas interações das interfaces, das condições energéticas da superfície para estimular a regeneração de tecidos e as dimensões espaciais da superfície que favorecem o preenchimento de fluidos e células.

Por envolver um estudo de aspectos dinâmicos através da simulação de processos da osseointegração, a expectativa é de que os resultados possam contribuir para o desenvolvimento de novos materiais auto-organizáveis que permitam a liberação controlada de grupos funcionais em camadas oxidas para estimular a regeneração tecidual. A criação de sistemas de materiais auto-organizáveis é o caminho para a nova ciência de biomateriais. Suas aplicações permitem uma melhor regeneração, restauração e reabilitação se utilizados como próteses inteligentes.

Assim, com os devidos cuidados para uma interpretação reducionista, o desenvolvimento do trabalho explora as relações entre matéria, energia, espaço e tempo de acordo com quatro questões fundamentadas que relacionassem essas variáveis.

II. OBJETIVOS E META

O objetivo central da tese é mostrar os efeitos de modificações físico-químicas realizadas em superfícies de materiais metálicos para aplicações como implantes osseointegráveis. Como consequência, melhorar a compreensão dos fenômenos relacionados à regeneração tecidual, em especial nos primeiros estágios do processo de osseointegração.

Especificamente, este trabalho busca responder quatro questões fundamentais. São elas: (1) Qual a natureza das partículas envolvidas nas interações das interfaces? (2) Quais as dimensões da superfície do material que podem favorecer um crescimento celular específico? (3) Quais as condições energéticas da superfície para estimular a regeneração dos tecidos? (4) Como se dão os processos dinâmicos nas interfaces? Todas as modificações físico-químicas nas superfícies propostas, assim como os experimentos realizados foram fundamentados na busca de respostas para as quatro questões.

Como meta, a criação das interfaces deve promover o aumento da adesão e da estabilidade de revestimentos bioativos nas superfícies metálicas visando à aplicação na biomedicina.

III. METODOLOGIAS E EXPERIMENTOS

Toda pesquisa empírica que envolveu a escolha de experimentos, rotas de sínteses, materiais e equipamentos, foi desenvolvida em função das quatro questões fundamentais da tese.

III.1 Amostras metálicas

Inicialmente foi utilizado como substrato metálico o titânio comercialmente puro (Ti cp) ASTM F67 grau 2 fornecido pela empresa Realum Indústria e Comércio de Metais Puros e Ligas Ltda. Após obtenção dos primeiros resultados que nos indicou algumas regularidades sobre os fenômenos ocorridos nas interfaces do titânio cp, as modificações das superfícies foram realizadas também na liga Ti6Al4V ASTM F136 ELI (exta Low intersticial) fornecida pela mesma Indústria e na liga Ti13Nb13Zr.

A liga Ti13Nb13Zr, fornecida pela professora Sandra Giacomim Schneider da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), foi obtida por fusão a arco com tratamento térmico de 1000°C por uma hora, resfriada em água e laminada a frio com o objetivo de obter um material com estrutura HC, matriz β com α' .

III.2 Ativação das superfícies e criação das interfaces

A ativação das superfícies para a criação de diferentes interfaces se deu através de modificações pré-estabelecidas, de forma a buscar informações para atender a primeira das quatro questões fundamentais da tese, referente à influência das partículas envolvidas nas interações das interfaces. Para tanto, foi necessário escolher uma técnica capaz de variar consideravelmente a natureza química das superfícies.

Existem diversas técnicas para se modificar uma superfície metálica, inclusive com aplicações industriais de revestimentos e deposição de filmes cerâmicos. Entre alguns deles, podemos destacar a deposição química de vapor (CVD)⁴⁸, processo “íon

beam assisted” (IBAD)⁴⁹, processo “ion beam enhanced” (IBED)^{40,51}, deposição “filtered arc” (FAD)⁵², deposição eletrostática sol-spray (EESD) e processo plasma spray^{53,54}, entre outros. Contudo, há certa complexidade para depositar camadas uniformes de filmes de TiO₂ em substrato com diferentes geometrias utilizando estes métodos. Além disso, para ser aplicável, é interessante que o processo ou técnica seja economicamente viável. A técnica desenvolvida para este propósito é através de recobrimento por imersão em solução sol gel^{55, 56,57}. Esta técnica, associada às modificações termos-estruturais, além de simples e barata, permite recobrir superfícies com geometrias irregulares, como é o caso da maioria dos implantes metálicos^{55, 56,57}.

A preparação dos precursores dos revestimentos foi realizada utilizando o método sol gel. Esse método permitiu a preparação de materiais altamente homogêneos, com um controle simultâneo das propriedades estruturais, texturais e morfológicas^{58, 59}. Devido a essa homogeneidade a nível atômico, as temperaturas de calcinação e sinterização para obtenção de fases cristalinas desejadas são inferiores àquelas obtidas por métodos cerâmicos convencionais⁶⁰, de modo que a formação de fases indesejadas possa ser controlada, assim como a porosidade e tamanho de grão^{61,62}, condições analisadas levando em conta a estrutura laboratorial.

O método consistiu na condensação de precursores químicos até a obtenção de uma estrutura rígida de partículas coloidais, antes dispersas e estáveis em fluido. Dentre as partículas, destacam-se o Ca, o P e o Na. A viscosidade das soluções, o tempo e a velocidade de submersão das placas foram variadas com o objetivo de criar filmes finos com diferentes características. As amostras foram cortadas em placas com diversas dimensões para análises, mas em especial, as medidas 1,0 X 1,0 cm² e 5,0 X 5,0 cm² foram as mais utilizadas. Posteriormente as amostras passaram por três processos de polimento com lixas d’água mesh 280, 400 e 1200.

Para criação das primeiras interfaces, as amostras passaram por tratamentos ácidos (HCl) e alcalinos (NaOH) com diferentes concentrações e posteriormente lavadas com água deionizada por 10 minutos em banho ultra-sônico. Ao final destes

tratamentos, a superfície dos substratos foi lavada com água destilada, secada e esterilizada em estufa a 100° C por 24 h. Esses primeiros tratamentos tiveram como objetivos ativar energeticamente as superfícies através da modificação da área superficial pela natureza química das soluções, o resultado desta etapa é a criação de diferentes óxidos Ti-O na superfície. Após a criação dessas primeiras interfaces, as superfícies foram avaliadas conforme as caracterizações descritas nos capítulos seguintes.

As interfaces seguintes foram obtidas nas amostras já tratadas, limpas e secas através da submersão em soluções, utilizando o sistema de submersão dip coating e aplicando o método sol gel. Os precursores da solução para o filme de titânia foram obtidos pela mistura de ácido acético, álcool isopropílico, ácido nítrico, água destilada e isopropóxi titânio em proporções previamente estudadas até a obtenção de uma rota que efetivamente pudesse ser testada. A dificuldade encontrada nesta etapa foi o estabelecimento de uma rota em que a atmosfera (em termos de temperatura e ambiente) não influenciasse. Outro cuidado importante se refere à agitação dos reagentes, pois a energia cinética da suspensão necessita de um controle preciso de forma a evitar a hidrolisação. A reação é exotérmica. As amostras foram submersas nos fluidos sempre com as mesmas velocidades e número de submersões. Posteriormente, foi realizado o primeiro tratamento térmico a 400° C por 8 h. Após este revestimento, as interfaces criadas foram caracterizadas e analisadas.

Outras interfaces foram criadas a partir da deposição de uma solução rica em cálcio com o objetivo de formar uma camada de titanato de cálcio (CaTiO₃). Para isso, os precursores da titânia, estabelecidos na rota anterior foram misturados com nitrato de cálcio hidratado e álcool isopropílico. Após esta etapa de revestimento, as interfaces criadas foram caracterizadas e analisadas.

A última classe de interfaces criadas foi através da deposição de Hidroxiapatita. Para a síntese, foi utilizado nitrato de cálcio [Ca(NO₃)₂], ácido fosfórico (H₃PO₄), etilenoglicérol (C₂H₆O₂) e metanol. O protocolo utilizado para a síntese de hidroxiapatita

foi o mesmo desenvolvido pelo professor Dr. Ariovaldo de Oliveira Florentino⁶³ onde as figuras 7 e 8 mostram as fases obtidas por DRX, a imagem de MEV do pó e os íons cálcio e fósforo no espectro de EDS.

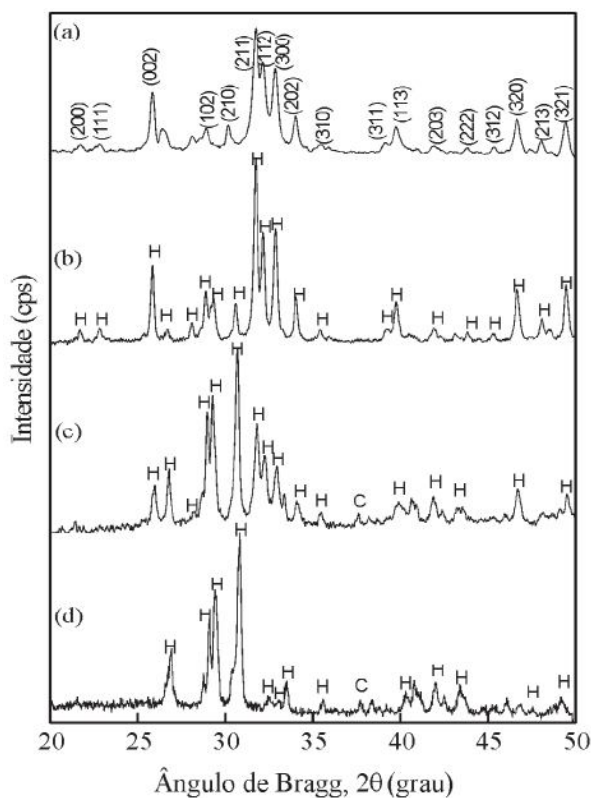


Figura 7 – Espectros de difração de raios x dos pós de hidroxiapatitas calcinados em diferentes temperaturas e comparados com Hidroxiapatita comercial⁶³ (a) comercial, (b) 700° C, (c) 500° C, (d) 300° C. (H) HA, (C) CO. JCPDS fichas catalográficas números 04-0777 e 73-1731

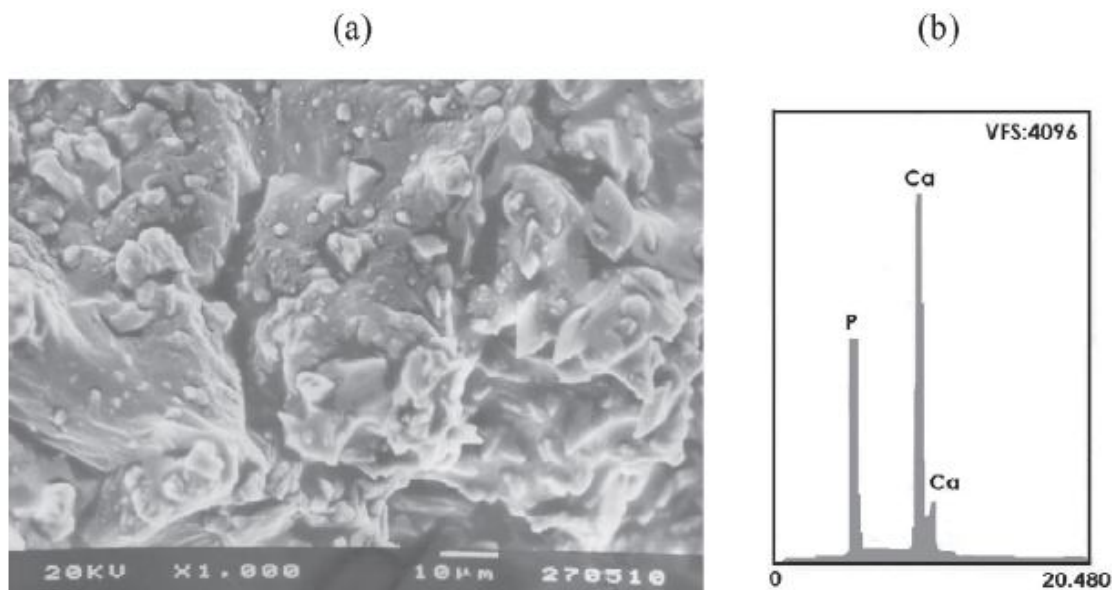


Figura 8 – (a) Micrografia Eletrônica (MEV) e (b) Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) dos pós de Hidroxiapatita⁶³.

As interfaces criadas para cada amostra foram nomeadas, conforme tabela 4.

Tabela 4 – Nomenclatura das interfaces obtidas a partir das modificações das superfícies

Ti polida	Amostra de titânio apenas com lixamento
Ti+HCl	Com tratamento ácido
Ti+NaOH	Com tratamento alcalino
Ti+HCl+TiO ₂	Com tratamento ácido e revestida com titânia
Ti+NaOH+TiO ₂	Com tratamento alcalino e revestida com titânia
Ti+HCl+TiO ₂ +HÁ	Com tratamento ácido revestida com titânia e hidroxiapatita
Ti+NaOH+TiO ₂ +HÁ	Com tratamento alcalino e revestida com titânia e hidroxiapatita
Ti+HCl+TiO ₂ +CatiO ₃	Com tratamento ácido e revestida com titânia e solução de cálcio
Ti+NaOH+TiO ₂ +CatiO ₃	Com tratamento alcalino e revestida com titânia e solução de cálcio
Ti+HCl+TiO ₂ +CatiO ₃ +HA	Com tratamento ácido e revestida com titânia, solução de cálcio e hidroxiapatita
Ti+NaOH+TiO ₂ +CatiO ₃ +HA	Com tratamento alcalino e revestida com titânia, solução e cálcio e hidroxiapatita

Esta etapa do trabalho foi realizada no laboratório de eletroquímica e química de superfícies do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu e contou com a colaboração dos alunos Gustavo, Vanessa e da profa. Margarida.

A figura 9 resume as etapas de desenvolvimento do projeto.



Figura 9 – Sistematização da pesquisa

III.3 Caracterizações, testes e ensaios

Para caracterizar as interfaces foram selecionadas diversas técnicas experimentais de forma a relacionar a natureza das superfícies criadas com as três questões fundamentais relacionadas à energia, espaço e tempo. As técnicas também foram direcionadas de forma a testar os materiais quanto ao seu potencial tecnológico para aplicação na biomedicina.

III.3.1 – Análises Térmicas e Estruturais

A caracterização térmica/estrutural foi realizada aplicando as técnicas de termogravimetria (TG) e análise diferencial térmica (DTA) ⁶⁴. A figura 13 mostra o diagrama do compartimento de DTA com os cadinhos no qual as amostras dos revestimentos foram colocadas. Os cadinhos da amostra a ser analisada e do material de referência foram conectados a dois sensores em um sistema aquecido por apenas uma fonte de calor.

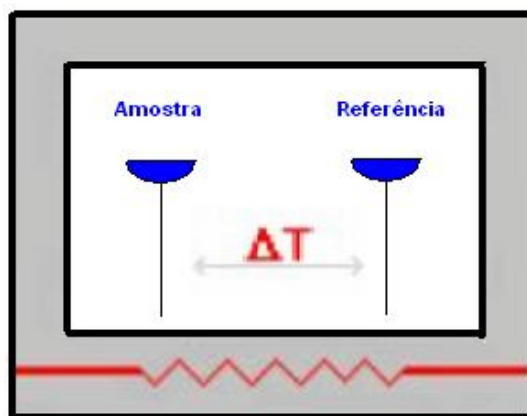


Figura 10 - Diagrama do compartimento onde as amostras são colocadas para análise térmica⁶⁵.

A amostra e o material de referência foram submetidos à mesma programação de aquecimento monitorada pelos sensores de temperatura. A referência usada foi o cadinho vazio.

Foram avaliadas as variações das temperaturas de amostra dos materiais utilizados como revestimento e da referência em função de alterações físicas ao longo do programa de aquecimento. Quando ocorreram transformações exotérmicas, as amostras liberaram calor, ficando por um curto período de tempo, com uma temperatura maior que a referência. Do mesmo modo, a análise foi feita para transformações endotérmicas onde a temperatura da amostra ficava temporariamente menor que a referência.

Esta análise teve como principal objetivo estabelecer os tratamentos térmicos adequados para verificar mudanças estruturais e estabelecer as rotas de síntese durante a criação das interfaces. As análises foram realizadas na Central de Laboratórios da UNESP, Campus de Bauru com a colaboração da professora Dayse utilizando um equipamento de Termo-Análise Simultâneo da Netzsch, com varredura de 50 a 800 Kelvin, com taxa de aquecimento de 10 K/min.

III.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Com o objetivo de avaliar o potencial das modificações nas superfícies propostas no trabalho e na busca de dados que pudessem atender a segunda questão fundamental da tese, as amostras foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pelo método de observação direta da morfologia da superfície através do impacto de feixes de elétrons com as superfícies das amostras⁶⁶. A variedade de emissões de fótons e elétrons nos experimentos foi detectada e amplificada. A imagem que aparece na tela representa as características da superfície da amostra. A figura 11 mostra o esquema funcional do microscópio utilizado. A sigla ERE representa os elétrons retro espalhados decorrentes da alta energia com alto poder de penetração e EP representa os elétrons primários decorrentes da ionização das camadas externas do átomo⁶⁷. Neste trabalho, a caracterização ocorreu em duas etapas: a primeira somente com as superfícies modificadas e a segunda com células. Neste segundo caso, as superfícies foram eletricamente carregadas por processo de metalização com ouro.

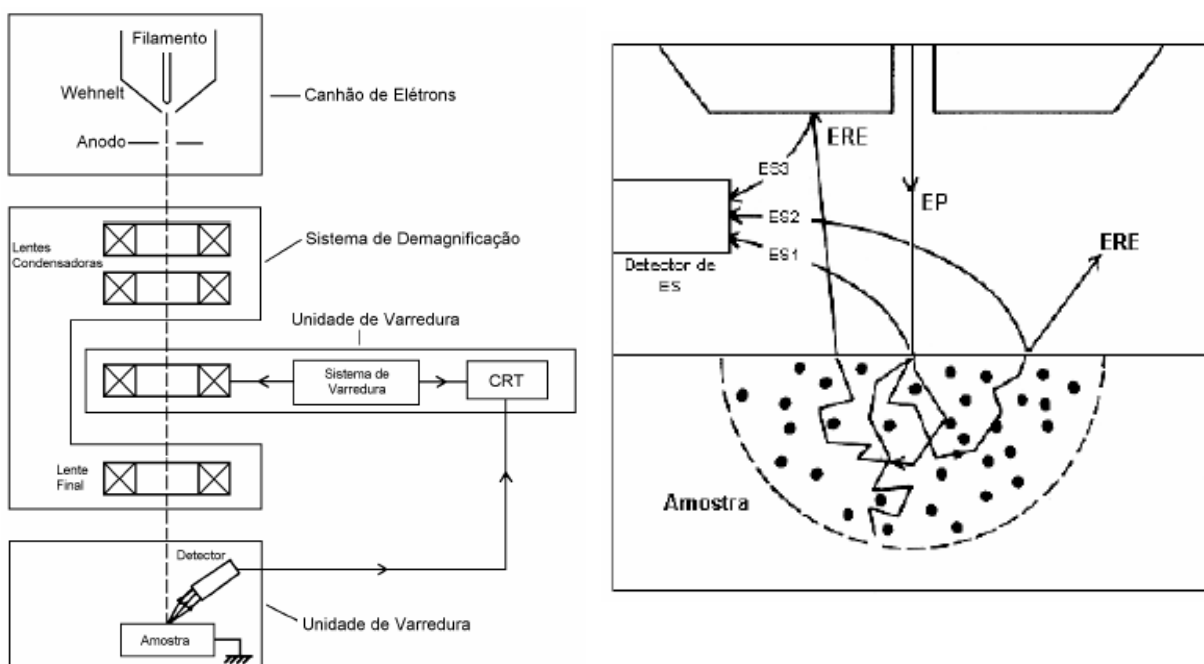


Figura 11 – Esquematização interna do microscópio eletrônico utilizado⁶⁶.

O equipamento utilizado para nos experimentos é da marca S.E.M. 515 da Philips do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu e contou com a colaboração da profa Margarida Saeki.

III.3.3 Microscopia de força atômica

As superfícies modificadas foram analisadas por Microscopia de Força Atômica onde uma importante propriedade no que tange os fenômenos superficiais foi avaliada para responder a segunda questão fundamental da tese: a rugosidade, propriedade esta que possibilita o aumento da área superficial, afeta o coeficiente de atrito e proporciona a retenção mecânica de materiais estranhos. Considerando uma pequena área de uma superfície real, sua composição inclui rugosidade, ondulação e erro de forma^{68,69} conforme representação na figura 12.

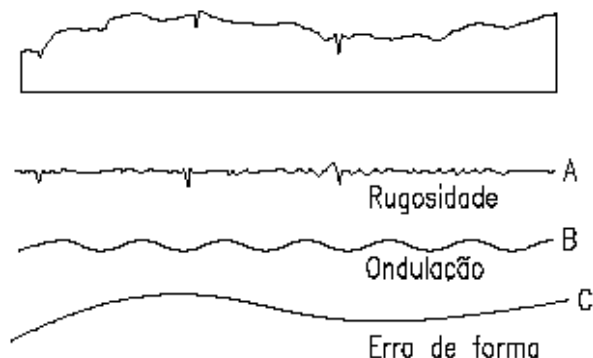


Figura 12 – Diferentes texturas de uma superfície.

Os parâmetros de rugosidade são diversos e a escolha de um deles depende do objetivo da pesquisa^{68, 69}. Neste estudo, foi avaliada, especialmente a Rugosidade média. Este parâmetro quantitativo é dado pela média aritmética de valores absolutos das ordenadas de afastamento (y_i) e dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média, dentro do percurso de medida (l_m), como na figura 13.

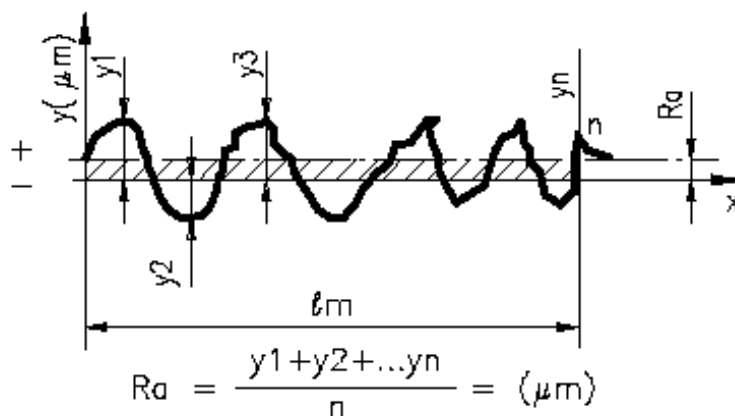


Figura 13 – Definição da rugosidade média

Somente o parâmetro rugosidade média (R_a) não é capaz de descrever integralmente uma superfície. A figura 14 mostra diferentes superfícies que possuem o mesmo valor de R_a , por isso, nesta tese, optou-se por calcular todos os parâmetros.

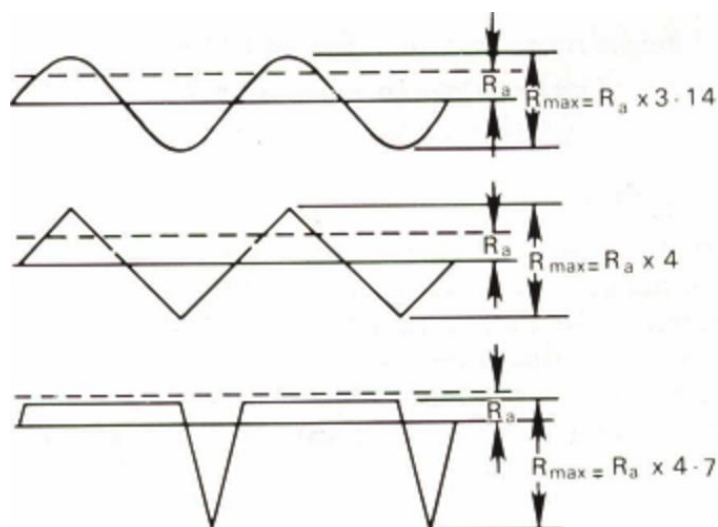


Figura 14 – Diferentes perfis de superfícies com a mesma rugosidade média

Outro parâmetro passível de medição é a rugosidade máxima (R_z) que é definido como o maior valor das rugosidades parciais (Z_i) que se apresenta no percurso de medição (l_m). As medidas foram realizadas conforme a figura 15 onde Z_3 apresenta-se como o maior valor parcial localizado no 3º comprimento de amostragem e que corresponde à rugosidade R_z .

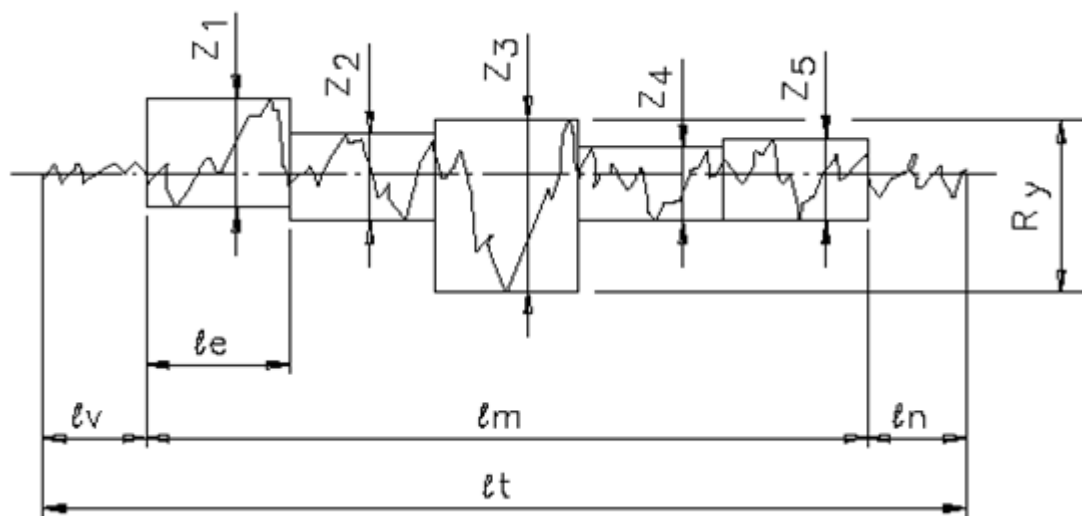


Figura 15 – Cálculo da rugosidade máxima R_z

O valor de R_z , individualmente, não nos informa com boa precisão a natureza espacial da superfície. A figura 16 ilustra esta idéia em que diversas formas de rugosidade podem ter o mesmo valor para R_z .

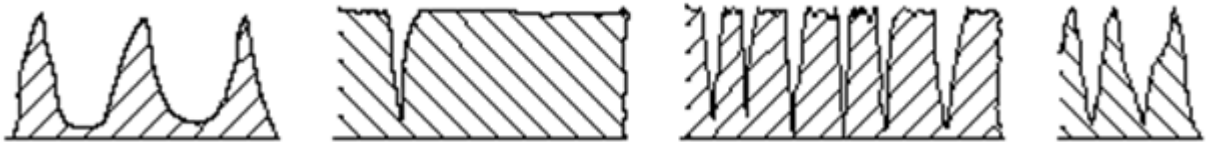


Figura 16 – Diversas formas de rugosidade para o mesmo valor de R_y

A rugosidade total (R_t), também calculada nesta etapa dos estudos, corresponde à distância vertical localizada entre o pico mais alto e o vale mais profundo e isto independe dos valores de rugosidade parcial (Z_i).

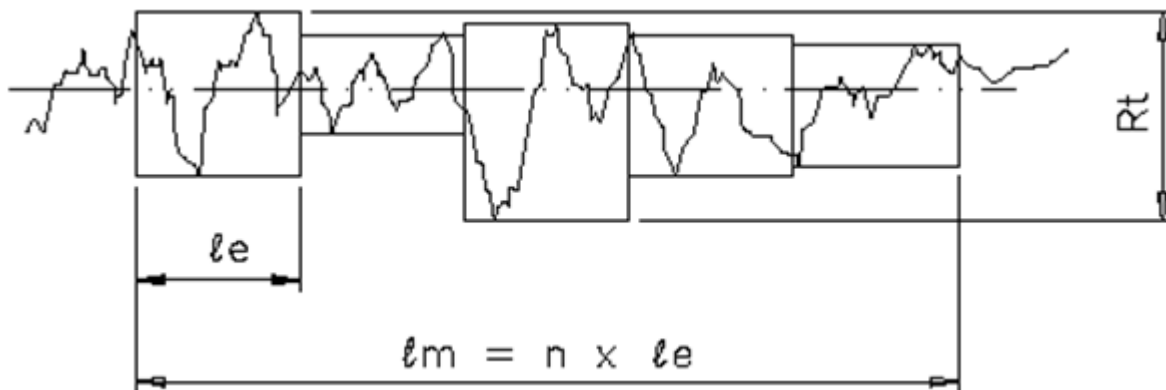


Figura 17 – Definição da rugosidade R_t .

A rugosidade total (R_t) corresponde à média aritmética dos cinco valores de rugosidade parcial (Z_i). Sua medida provém da altura entre os pontos máximo e mínimo do perfil, conforme a figura 18.

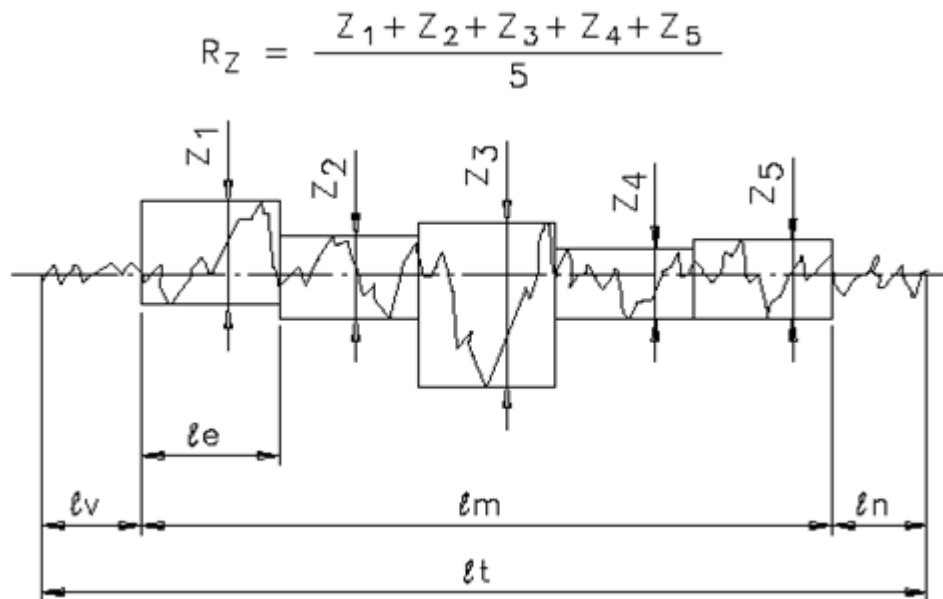


Figura 18 – Definições da rugosidade parcial Z_i e R_z

Embora os trabalhos com superfícies de biomateriais levem em consideração a rugosidade média, neste trabalho todos os possíveis parâmetros de rugosidade foram quantificados, não somente para relacionar com as outras variáveis estudadas, mas também para que esses dados possam ser utilizados em trabalhos futuros no que se refere a estudos de condições espaciais da superfície no processo de osseointegração. Para isso, foi utilizado o Microscópio de Força Atômica Shimadzu SPM versão 2.0 do centro de Microscopias da faculdade de Filosofia e Letras USP Ribeirão Preto com a colaboração da Dra. Ivana.

III.3.4 Adesão do Revestimento Bioativo

Para comprovar o efeito das modificações nas superfícies dos materiais metálicos no que se refere à adesão do revestimento bioativo, as análises foram realizadas através de uma pré-avaliação por processo de atrito mecânico e posteriormente por uma técnica industrial desenvolvida pela Indústria Braseq LTDA.

É possível medir indiretamente a ligação atômica interfacial através de diferentes métodos de testes de adesão³⁸. A figura 19 mostra alguns destes testes utilizados.

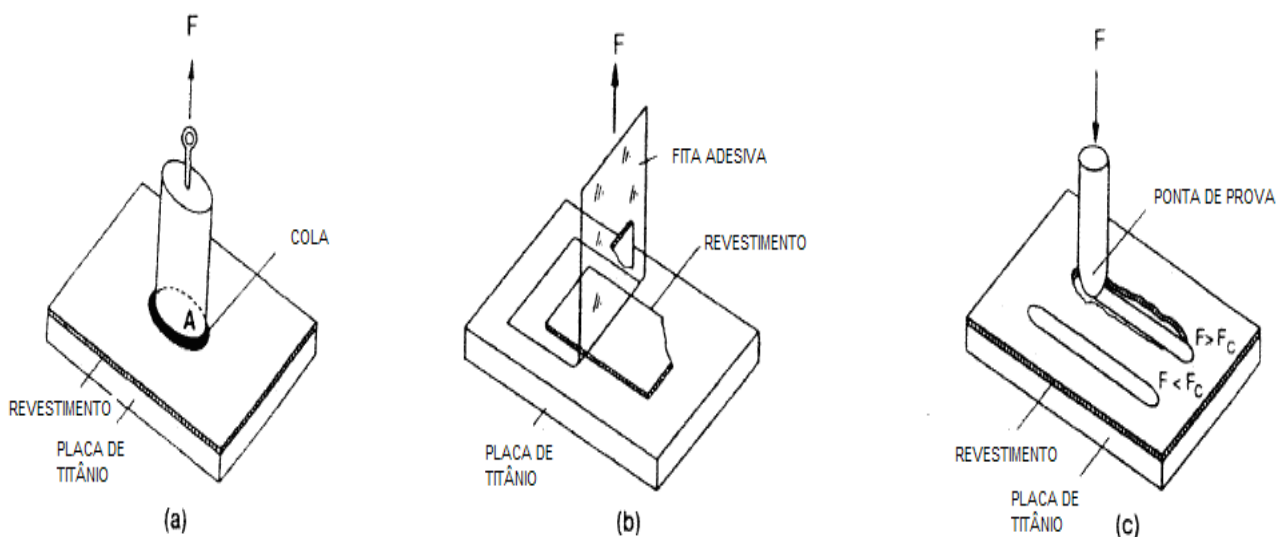


Figura 19 - Métodos para testar adesão interfacial, (a) teste *pull-off*, (b) teste por adesivos (c) testes por raspagem ou indentação.

Para os propósitos deste trabalho, a caracterização da superfície para determinar a adesão foi interpretada pela densidade de energia absorvida por unidade de área. O teste do tipo *pull off*, conforme a figura 19 (a) é utilizado pela indústria especialmente para caracterizar recobrimentos em substratos metálicos. Nos experimentos utilizou-se a metodologia de teste de medição direta da força aplicada para desgrudar os filmes e o substrato, ligados por um sistema de tração através de um dinamômetro e uma bomba hidráulica, estes conectados por um cone de sucção por meio de uma coluna, que exerce vácuo e o display digital quantifica a pressão em unidades MPa. O equipamento utilizado para determinar a adesão em cada interface criada é um PosiTest AT-D DeFelsko. Inicialmente utilizaram-se as colas Araldite Hobby, Araldite 2011 e Super Bonder para determinar qual aderiria melhor ao substrato. Após os testes preliminares, optou-se pela cola Araldite 2011 e Araldite Hobby. O preparo do corpo de prova (amostras com todas as diferentes interfaces) consistiu-se em aplicar uma fina camada de cola nas amostras. Esta etapa do trabalho foi realizada junto à indústria BrasEq LTDA.

III.3.5 Tensiometria e Goniometria

As técnicas tensiométricas e goniométricas combinadas são excelentes ferramentas para investigar fenômenos interfaciais e superfícies de materiais. A natureza da superfície, consequência de sua composição química e das dimensões espaciais, pode ser evidenciada mediante a avaliação da energia superficial livre que envolve uma determinada superfície e o meio externo.

A natureza tende sempre a buscar um estado de menor energia dos sistemas obedecendo ao princípio da minimização de energia. Desta forma, átomos e moléculas tentam ocupar uma posição de menor energia potencial onde as forças (atrativas e repulsivas) sejam equilibradas. Porém, átomos e partículas na superfície do material, experimentam forças dirigidas sempre para dentro do líquido (Fig. 20), o que torna as superfícies regiões energeticamente maior. Assim, as superfícies são sempre regiões de maior energia. A diferença energética é conhecida como energia de superfície ou tensão interfacial⁷⁰.

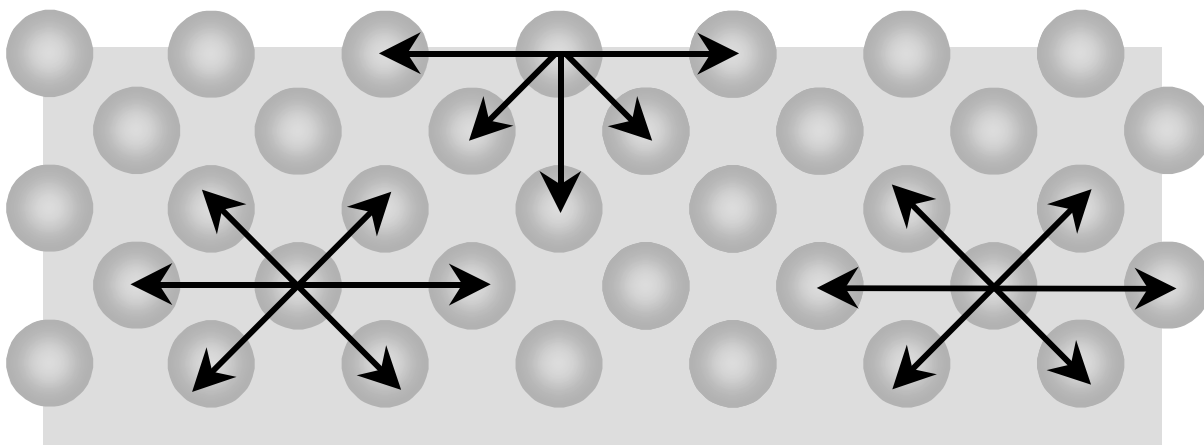


Figura 20 – Interações entre átomos ou moléculas no interior e na superfície de um material⁷¹.

Para cada interface sólido-vapor A_{SV} e interface líquido-vapor A_{LV} , estão associadas as energias γ_{SV} e γ_{LV} . Quando uma gota toca a fase sólida conforme ilustrado na figura abaixo, a área individual sólido e líquida desaparece, dando lugar a uma nova área sólido-líquido A_{SL} e a sua respectiva energia interfacial γ_{SL} conforme mostra a figura 21.

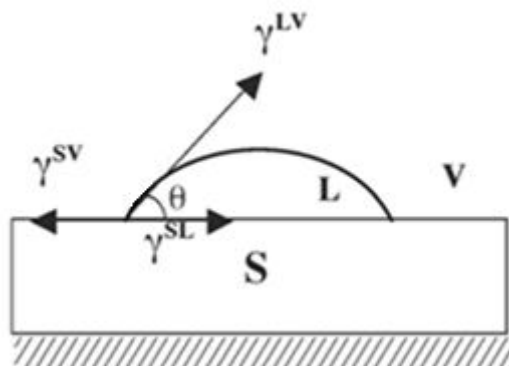


Figura 21 – Representação das tensões agindo em uma gota de um líquido em uma superfície⁷²

Quando o trabalho de adesão entre o líquido e o sólido se igualam, ou há superação do trabalho de coesão do líquido, o ângulo de contato igual tende a zero⁷³. Então, quando $\theta = 180^\circ$, tem-se $\cos \theta = -1$ e o trabalho de adesão entre o líquido e o sólido. Com a ressalva de que a gota da Fig. 24 esteja em equilíbrio, temos:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (2)$$

Essa equação é uma forma de interpretar a teoria de adesão interfacial que, em termos de trabalho, é conhecida como equação de Young-Dupré⁷³:

$$W_a = \gamma_{LV} (\cos \theta + 1) \quad (3)$$

Fundamentado nos conceitos sobre trabalho de adesão e equilíbrio interfacial, Fowkes⁷⁴ atribuiu à energia de superfície o somatório de contribuições de interações dispersivas (γ^d) e polares, γ^p ⁷⁴:

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p \quad (4)$$

$$\gamma_{LV}(1 + \cos\theta) = 2(\gamma_s^d \gamma_{LV}^d)^{1/2} \quad (5)$$

Assim, a equação descreve uma forma de estimar fornece um método para γ_s^d e não energia total γ_s .

A equação de Fowkes pode ser estendida de outras formas como a proposta por Owens, Wendt⁷⁵ e Kaelble⁷⁶:

$$\gamma_{LV}(1 + \cos\theta) = 2(\gamma_s^d \gamma_{LV}^d)^{1/2} + 2(\gamma_s^p \gamma_{LV}^p)^{1/2} \quad (6)$$

Utilizando líquidos com γ_{LV}^d e γ_{LV}^p conhecidos, e medindo o ângulo de contato é possível determinar γ_s^d e γ_s^p .

Além destes modelos destacados, existem outros na literatura e para este trabalho, a investigação da energia superficial foi realizada adotando o modelo de Owens e Wendt e Kaelble, pela possibilidade em avaliar a energia superficial total em termos de componentes de energia a partir do modelo teórico. O ângulo de contato θ foi determinado por um tensiometro/goniômetro automatizado OCA 100 que, através de uma câmera CCD, capturou a imagem da gota depositada sobre o material. Com a ajuda de um software, foi possível delimitar as fronteiras das interfaces entre a gota e a superfície. Ao realizar o tratamento de imagens para determinar o perfil desta gota, foi possível calcular o ângulo de contato. Medindo-se θ com um líquido polar, como a água ($\gamma_{LV}^p = 51 \text{ mJ/m}^2$ e $\gamma_{LV}^d = 21,8 \text{ mJ/m}^2$) e com dimetil sulfoxido ($\gamma_{LV}^p = 8,68 \text{ mJ/m}^2$ e $\gamma_{LV}^d = 34,83 \text{ mJ/m}^2$), o programa permitiu que se determinasse o trabalho de adesão e a energia de superfície do material, neste caso pelo método geométrico.

III.3.6 Cinética de molhabilidade do Fluido Corporal Simulado

A avaliação da biocompatibilidade de um material, especialmente quando este material já apresenta um alto potencial de aplicação tecnológica, envolve certo grau de dificuldade devido à necessidade de se envolver sacrifício de animais para os testes *in vitro* e *in vivo*. Sendo assim, há a necessidade de se encontrar métodos e técnicas que possam realizar uma pré-avaliação dos materiais antes de realizar alguns destes testes. Seguindo essa linha de pensamento e com o objetivo de estudar as variáveis físicas nos primeiros contatos de interação entre um biomaterial e o meio biológico, uma simulação experimental foi idealizada para investigar as etapas iniciais dos processos de osseointegração. Essas simulações foram realizadas adaptando a técnica de goniometria que mede a molhabilidade de fluidos em sólidos. A técnica consiste em determinar a cinética de molhabilidade entre o fluido corporal simulado e as superfícies modificadas abordando aspectos onde não é possível considerar o equilíbrio termodinâmico.

A investigação dos eventos iniciais de um processo dinâmico envolve uma gama de conhecimentos teóricos e experimentais a cerca da matéria, energia, espaço e tempo. No caso dos modelos teóricos, a previsibilidade proposta pela ciência pode funcionar até uma determinada quantidade de variáveis do sistema durante um processo físico. No caso do estudo em questão, é necessário considerar novas variáveis uma vez que envolve sistemas biológicos. Sendo assim, a idéia foi avaliar experimentalmente a dinâmica dos processos nos instantes iniciais a partir do momento em que o fluido corporal simulado e a superfície do material são colocados em contato. Então, os dados obtidos nestes experimentos são confrontados com os dados das componentes de energia superficial livre utilizando os modelos teóricos propostos na tese, assim como com os testes de biocompatibilidade.

A dinâmica do processo foi investigada a partir da observação macroscópica da modificação da gota do fluido na superfície. Essa modificação é medida em termos da variação da forma geométrica da gota, ou ainda, em termos da variação do ângulo de

contato, em função do tempo. A variação temporal em termos de instantes iniciais e finais depende da capacidade do equipamento (tensiômetro e goniômetro acoplados) e no número de contagens possíveis feita por este.

O fluido corporal simulado foi obtido conforme protocolo de Kokubo⁷⁷ através da mistura de 0,2 g KCl, 8,0 g NaCl, 0,2 g CaCl₂.2 H₂O, 0,05 g NaH₂PO₄, 1,0 g NaHCO₃, 0,1 g MgCl₂.6H₂O e 1,0 g de glicose para 1000 mL de água evitando a precipitação e com o monitoramento constante do pH = 7. A solução foi obtida de forma que as concentrações das espécies envolvidas fosse a mesma do plasma corporal humano. A tabela 5 compara as concentrações iônicas da solução e do plasma sanguíneo.

Tabela 5 – Concentrações iônicas (em mM) do fluido corporal simulado e do plasma sanguíneo humano⁷⁷.

Íons	Plasma Sanguíneo	SBF (Kokubo)
Na ⁺	142	142
K ⁺	5	5
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	1030	147,8
HCO ₃ ⁻	27	4,2
HPO ₄ ²⁻	1	1
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

A simulação da interação entre o material e plasma humano foi realizada utilizando a câmera do goniômetro e o software para desenhar o formato da gota na superfície. Na técnica, foi possível monitorar com relativa precisão os ângulos da direita e da esquerda do fluido, medidos simultaneamente a cada 0,1 segundos. A variação destes parâmetros permite identificar o efeito macroscópico da interação na interface, e verificar se eles são devidos a efeitos de histerese ou não. Com a adaptação da técnica

de goniometria e a partir de medidas preliminares realizadas, uma importante questão é colocada em discussão. A heterogeneidade química, em função de diversas interfaces criadas na superfície dos biomateriais metálicos, pode produzir efeitos mais acentuados do que a rugosidade da superfície? Essa é uma das questões fundamentais da tese. A figura 22 mostra a imagem registrada pela câmera e enviada para o software antes e após a gota entrar em contato com a superfície.



Figura 22 – Fotografia da gota de SBF antes e após o contato com a superfície das amostras.

O volume da gota, a temperatura e a atmosfera da câmara de teste foram mantidos constantes em cada experimento para não interferir no resultado e a partir da detecção do ângulo de contato, foi medida a sua variação na forma geométrica em função do tempo durante vários intervalos.

A realização de experimentos precisos e reprodutíveis para esta finalidade envolve várias dificuldades inerentes à preparação adequada das superfícies como obter superfícies suficientemente planas e homogêneas, evitar efeitos de histerese, utilizar geometrias simples e procurar condições necessárias para evitar ou minimizar efeitos inerciais e gravitacionais para que a dinâmica possa ser observada detalhadamente. Nos experimentos, procurou-se evitar todas as variáveis que implicassem em problemas para a interpretação dos dados, no entanto, outras

considerações devem ser colocadas para que a técnica proposta possa ser aperfeiçoada e utilizada como um processo tecnológico para aplicação comercial. Dentre essas considerações, no desenvolvimento da técnica foi importante distinguir ângulo de contato real e aparente.

O ângulo de contato obtido sobre uma superfície sólida ideal, ou seja, lisa, homogênea, não-reativa, rígida e impermeável, é conhecido como ângulo de contato real ou intrínseco. O ângulo real é igual ao ângulo de contato definido através da relação de Young-Dupré^{72, 78}. Este é representativo das propriedades materiais do sistema líquido-sólido-sólido envolvido e caracteriza, através de uma superfície sólida ideal, a análoga real de mesma composição química. Porém, não é de fácil obtenção experimental, o que limita o entendimento completo de fenômenos capilares em situações reais, uma vez que geralmente somente o ângulo de contato aparente é acessível experimentalmente⁷⁸.

O método baseado em observações óticas ou extrapolações matemáticas de interfaces macroscópicas fornecem o ângulo de contato aparente, pois é determinado com base na linha tangente à superfície sólida total, a qual, devido à baixa ampliação, aparenta ser lisa e plana. Desse modo, o ângulo de contato aparente é uma aproximação do ângulo real devido tanto às características morfológicas da superfície sólida quanto as características químicas. Uma das questões-chaves para se entender melhor os problemas que envolvem a molhabilidade é determinar a relação entre o ângulo de contato real e o aparente, uma vez que o último é o parâmetro mensurável⁷⁵. Todas essas questões foram discutidas no desenvolvimento da técnica.

Além da distinção entre o ângulo real e o aparente, é importante considerar também a histerese de ângulo de contato⁷⁹, isto é, das diferentes configurações que a linha de contato foi submetida nos estágios anteriores do observado. É o fenômeno no qual o ângulo de contato de avanço difere do ângulo de contato de recuo. Devido à presença da histerese, a interpretação das características de determinado sistema passa a ser dependente das condições que tal configuração foi obtida, de modo que o

sistema não é mais descrito somente por um estado de equilíbrio, como em nosso caso. A figura 23 mostra uma leitura preliminar registrada a partir da filmagem da gota.

As medidas de energia superficial quanto o desenvolvimento da metodologia para determinar a cinética de molhabilidade do SBF contaram com as colaborações do doutorando Douglas Monteiro e da professora Elisabete Zaniquelli do laboratório de Físico-Química de Superfícies da Faculdade de Filosofia e Letras da USP campus Ribeirão Preto.

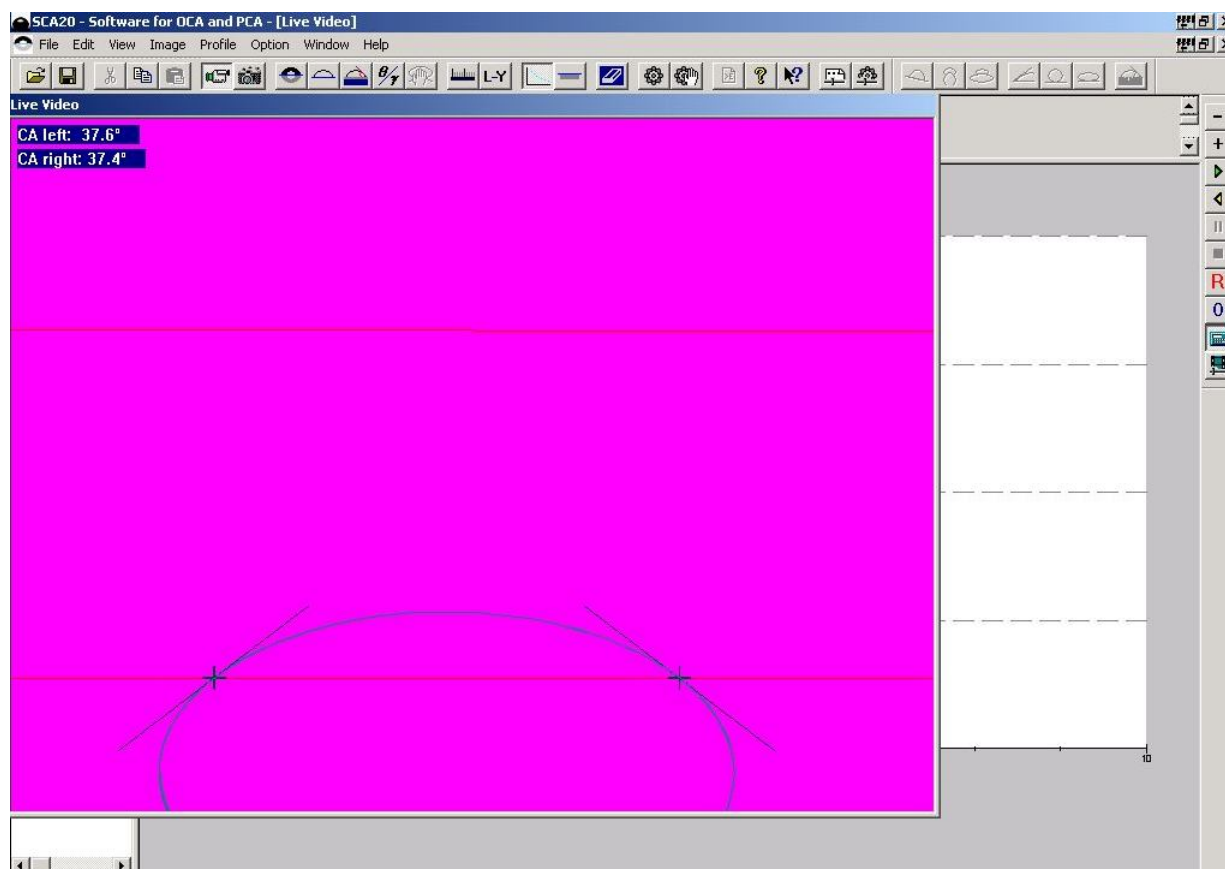


Figura 23 – Imagem da tela do programa usado na medida dos ângulos de contato.

III.3.7 Biocompatibilidade

III.3.7.1 Adesão e proliferação celular

Com a finalidade de avaliar a biocompatibilidade dos materiais com as superfícies modificadas, diferentes testes *in vitro* com cultura de células foram realizados. Para a avaliação da adesão e proliferação celular foram utilizadas células ósseas coletadas do fêmur de coelhos machos adultos da raça Grupo Genético Botucatu (consangüíneo derivado de três raças, nova Zelândia branco, Norfolk, e Califórnia), adultos e peso entre 4 e 5 kg, porte médio. O protocolo empregado para o cultivo pré-estabelecido no Laboratório de Citogenética Animal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências - UNESP, campus de Botucatu segue as normas ISO 10993⁸⁰⁻⁸³.

O animal foi sacrificado com dose letal de propofol, após a morte constatada foi removido a pata traseira de onde foi retirado o fêmur. Este foi aberto com o auxílio de um osteotómo e dentro da epífise foi coletado o osso esponjoso com uma cureta.

Na cultura celular, o material coletado foi colocado em frascos de cultura juntamente com 3,0 ml do meio HAM F12-DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium) na proporção 1:1, suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina sendo incubados em estufa a 38° C, 95% de umidade e 5% de CO₂. As culturas permaneceram em estufa a 38° C, em repouso, objetivando uma melhor aderência das células à superfície inferior dos frascos. Foram realizadas trocas de meio de cultivo a cada três dias e sempre no mesmo período do dia tentando promover um sincronismo fisiológico na divisão celular. As culturas foram periodicamente observadas em microscópio invertido para serem colhidas em momento adequado, ou seja, quando estivessem com um alto índice mitótico demonstrando uma grande proliferação celular, mas também visando evitar uma superpopulação celular em um período mais longo de cultura "*in vitro*". As figuras 24 e 25 mostram imagens das

culturas de células obtidas por microscopia ótica. Durante as trocas foram também avaliados os níveis do pH no meio, mantendo-os sempre em torno 7,0.

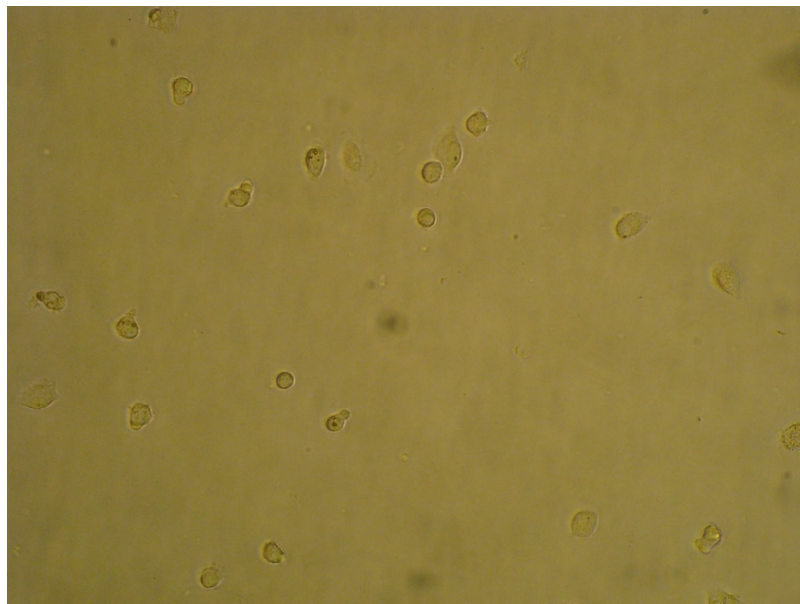


Figura 24 – Fotografia do meio de cultura de osteoblastos obtida com microscopia ótica (1ª observação 3º dia)

Ao serem observados crescimentos celulares intensos, as células foram desprendidas por meio de tratamento com tripsina (Solução Tripsina –Versene – Instituto Adolfo Lutz). O meio previamente separado deste frasco foi utilizado para neutralizar e formar uma suspensão com as células. A suspensão celular obtida foi transferida para um tubo de centrífuga e centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foi adicionado ao “pellet celular” 2 ml de meio de cultura, previamente aquecido a 38° C.

Para a contagem de células foi removido todo o meio de cultura dos frascos. As células descoladas do frasco foram centrifugadas e diluídas em 1ml de meio Tripsina. Desta solução foi retirado 20 µl e adicionado 20 µl da coloração azul de Trypan, que cora células mortas. A coloração foi colocada na câmara de Neubauer e feita a leitura de 4 quadrantes presentes na câmara. As células marcadas foram descartadas e o total

de células foi dividido por 4 e multiplicado por 20.000 que é o fator de diluição. A partir deste resultado obtivemos um número de $0,8 \times 10^{15}$.

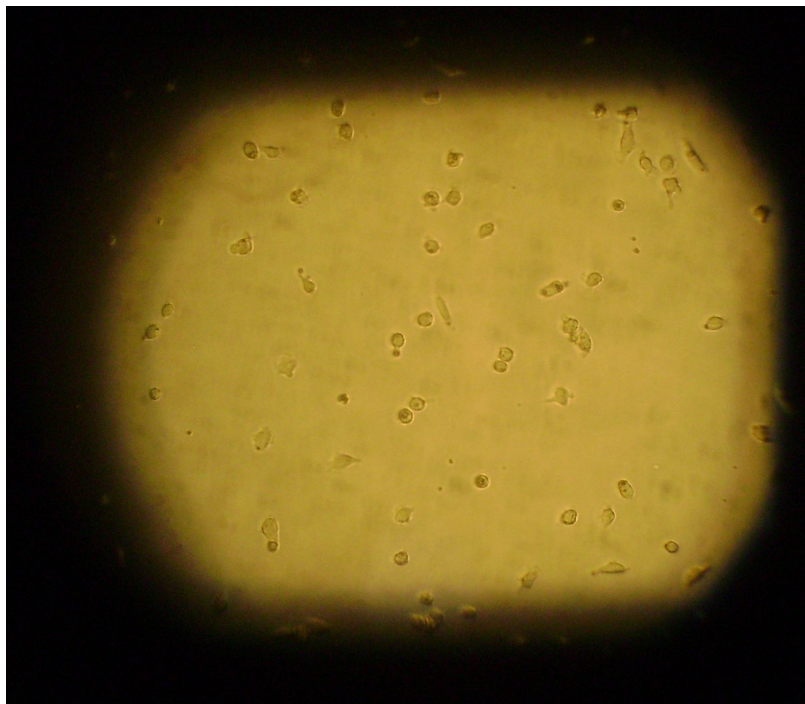


Figura 25 – Fotografia do meio de cultura celular obtida com microscopia ótica (2ª observação – 6º dia)

Após verificação do crescimento celular nas culturas e executado o procedimento de centrifugação, as células foram depositadas sobre as amostras dentro dos poços da placa de cultura, permanecendo em repouso por um período de 2 h. Posteriormente, foi adicionado meio de cultura, soro e antibiótico onde permaneceram por 48 h em estufa. Após este período, foram retiradas e acondicionadas em frascos estéreis para posterior análise com microscopia eletrônica de varredura.

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% por 24 h. Após a fixação inicial, o material foi lavado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 (três trocas de 5 min), sendo pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão (30 min). A desidratação foi realizada com seqüência crescente de álcool etílico, para posterior secagem do material através do ponto crítico em CPD 020 (Balzer Union), com CO₂ líquido. Os

espécimes foram colados em suporte adequado e recobertos com ouro, em aparelho MED 010 (Balzer Union), com camada de 20 nm. O material foi então, examinado e fotografado em Microscópio Eletrônico de Varredura. Esta etapa do trabalho foi realizada com a colaboração da doutoranda Juliana Ferreira e da prof. Dra. Lígia Mota do Laboratório de Citogenética Animal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências - UNESP, campus de Botucatu.

III.3.7.2 Estudo de viabilidade celular L929

Diferente da coleta de células, para o protocolo de estudo de viabilidade e citotoxicidade foram utilizadas células L929 cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal, 2 mM de L-glutamina, 20 mM de tampão Hepes e 0,2% de bicarbonato de sódio. Esta solução é referida como meio RPMI completo. O protocolo também seguiu as normas ISO 10993⁸⁰⁻⁸³.

Para o estudo da viabilidade as células foram ressuspensas em meio RPMI completo na concentração de 2×10^4 células/mL. Um volume de 100 μ L foi adicionado a placas de 96 orifícios e fundo plano e o crescimento celular foi avaliado em diferentes períodos de cultivo: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h pela adição de 0,2% de corante vital cristal violeta em 20% de etanol. A placa foi incubada por 10 min à temperatura ambiente. A seguir o corante foi desprezado e a placa lavada delicadamente com água destilada para remoção do corante. Após a secagem da placa em estufa a 37° C, as células coradas foram solubilizadas por adição de 200 μ L de detergente duodecil sulfato de sódio a 1% e a Densidade Óptica (D.O.) de cada orifício foi determinada em leitor de ELISA com filtro de 492 nm.

III.3.7.3 Ensaio de citotoxicidade com MTT

O ensaio com MTT é baseado na capacidade das células viáveis em converter o corante amarelo, solúvel em água, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) em cristais de cor violeta e insolúveis. Células L929 na concentração de

2×10^5 células/mL foram adicionadas em volumes de 30 μ L, 50 μ L e 100 μ L por orifício em placas de cultura de 24 orifícios, conforme descrito anteriormente. Após 72 h de cultivo, o sobrenadante das células foi retirado e 200 μ L de MTT na concentração de 1 mg/mL em meio RPMI completo foi adicionado à cultura. As células foram incubadas por 3 h a 37° C e 5% CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e as células foram solubilizadas pela adição de 200 μ L de dimetil sulfoxido (DMSO). A D.O de cada orifício foi avaliada em leitor de ELISA, a 540 nm.

Na placa de 24 orifícios foram colocados as amostras com os revestimentos em um volume de 30 μ L de células L929 na concentração de 2×10^5 células/mL. foi adicionado no centro dessas placas de titânio. Como cultura controle, uma gota de células foi adicionada em orifício não contendo placas de titânio. A placa foi incubada por 2 h para aderência das células por 2 h a 37° C e 5% CO₂. Após esse período adicionou-se 500 μ L de meio RPMI completo em cada orifício e a placa foi incubada a 37° C e 5% CO₂ por 72 h. A avaliação da viabilidade das células submetidas aos diferentes tratamentos foi realizada por adição de MTT, conforme descrito anteriormente.

Os testes para avaliar a biocompatibilidade envolveram uma relativa complexidade, não somente pelo fato da utilização de animais, mas também em função da adequação das normas ISO 10993 aos protocolos pré-estabelecidos nos laboratórios do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu. Esta etapa do trabalho contou com a colaboração da aluna do curso de Ciências Biológicas Vanessa Carvalho e dos professores Ramon Kaneno e Tereza Peraçoli do laboratório Morfologia e Microbiologia.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES

As modificações da natureza material das superfícies das amostras proporcionaram interfaces com diferentes camadas oxidadas e conseqüentemente variados pontos isoelétricos superficiais (IEP), parâmetros relacionados à primeira questão fundamental da tese. Também como conseqüência das modificações propostas, profundas mudanças referentes às variações das dimensões superficiais foram previstas como resultante da natureza das interfaces criadas com alterações topográficas e morfológicas e de forma quantitativa, a rugosidade. Parâmetros que serviram de análises voltadas para a segunda questão fundamental do trabalho. As imagens das figuras 26, 27, 28 e 29 mostram os primeiros resultados das modificações realizadas nas superfícies dos materiais.

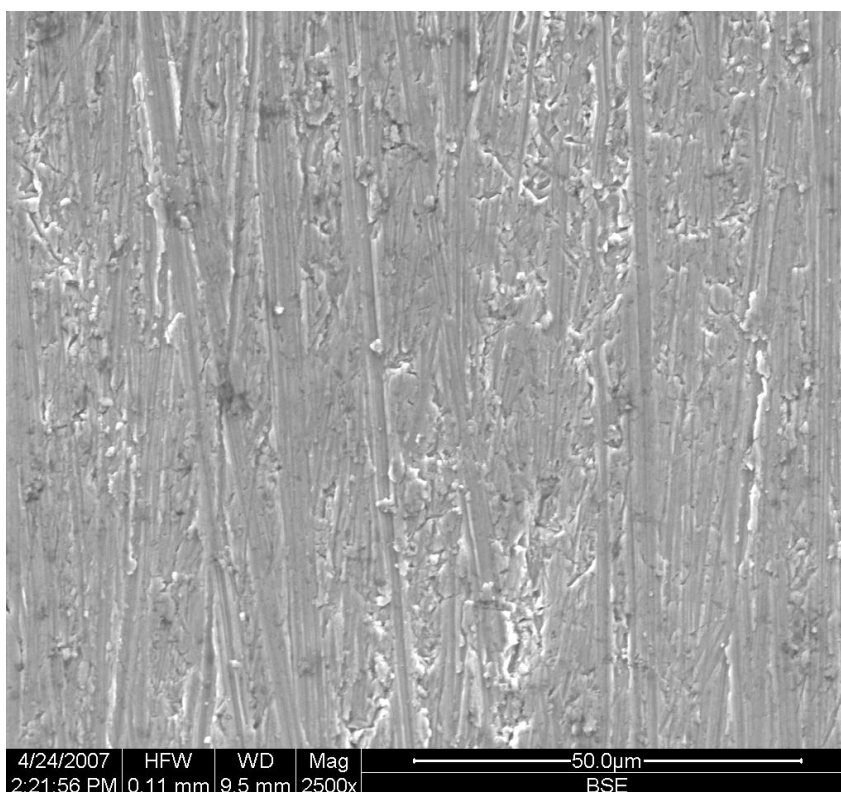


Figura 26- Imagem obtida por MEV da amostra de titânio como recebida

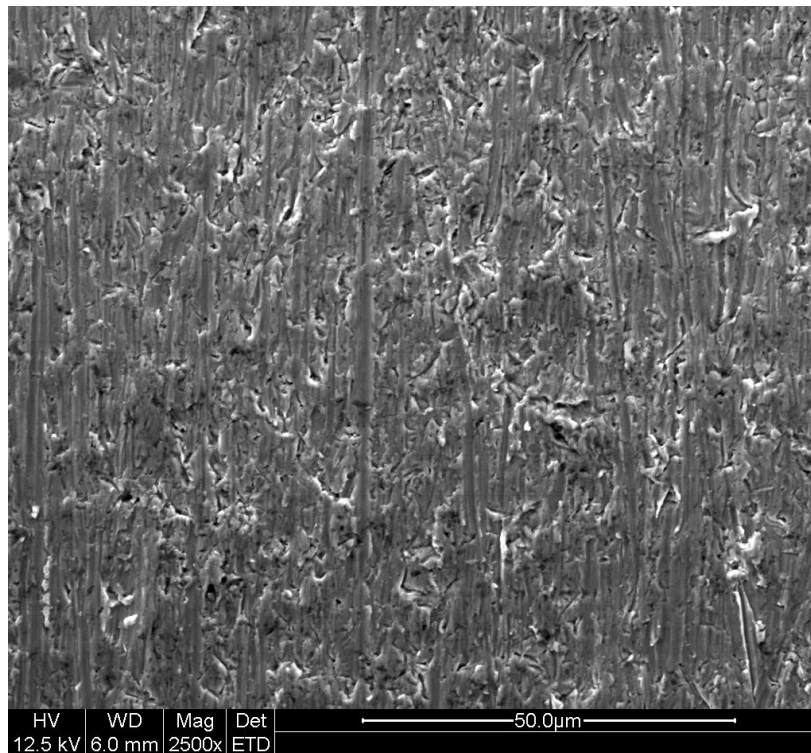


Figura 27 – Imagem obtida por MEV da amostra de titânio após lixamento

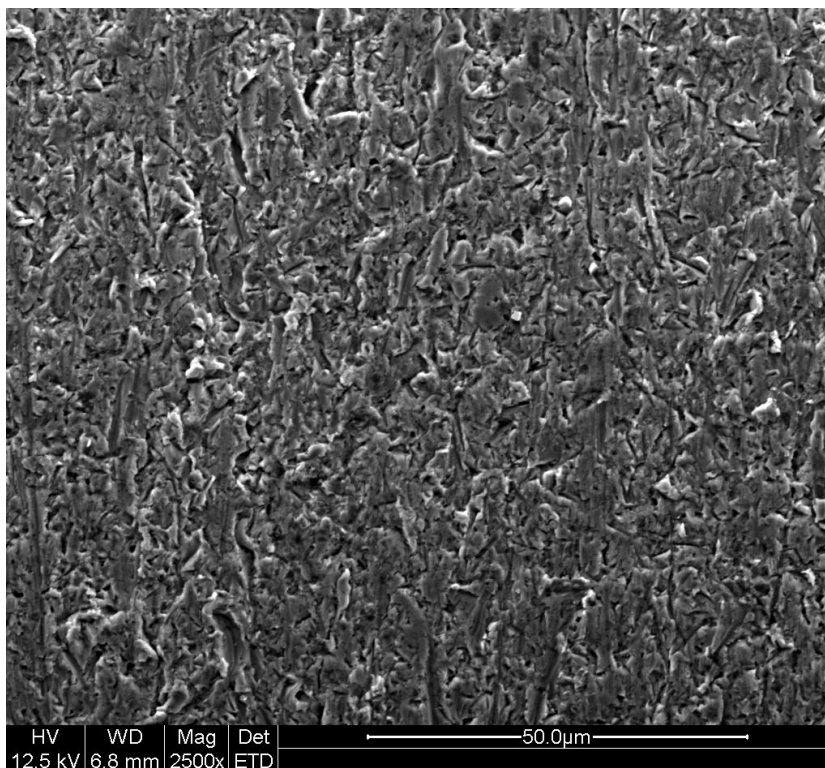


Figura 28 – Imagem obtida por MEV da amostra de titânio após tratamento ácido

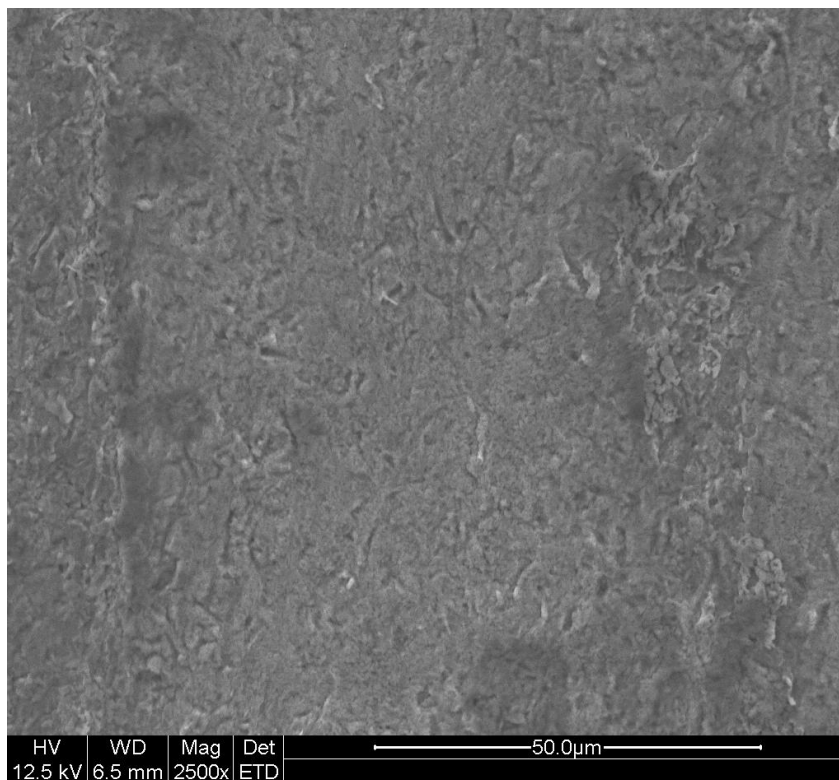


Figura 29 – Imagem obtida por MEV da amostra de titânio após tratamento alcalino.

É possível observar mudanças nas superfícies com diferentes topografias em cada tratamento superficial realizado, sendo que, com os tratamentos ácido/alcalino, as superfícies apresentam formas menos organizadas caracterizadas por fossas, sulcos e depressões irregulares com uma camada morfológica diferente da superfície onde foi realizado apenas o lixamento.

Observa-se também uma variação na porosidade das superfícies. Esse é um importante parâmetro no que se refere aos objetivos finais desta pesquisa, pois ao se implantar um biomaterial, os diferentes níveis de porosidade nas superfícies exercem influência no estágio da osseointegração uma vez que a presença de poros facilita o fluxo sanguíneo, conforme discutidos em estudos anteriores^{14,17,18}. O tamanho do poro metálico pode ser determinado pelo número das micro esferas com diferentes variações e estas, podem permitir o crescimento de tecido fibroso preferencialmente ao crescimento ósseo, o que não é desejável. Se os poros forem muito grandes, a resistência da fixação pode diminuir acentuadamente. Além disso, a presença de

pequenos fragmentos superficiais permite uma maior superfície exposta, o que pode contribuir com a molhabilidade de fluidos na superfície, facilitando a irrigação sangüínea. Esses argumentos, em conformidade com outros estudos^{14,17,18} corroboram a importância da avaliação das dimensões superficiais de um material para identificar a condição ideal para rápida fixação e resistência mecânica dos tecidos junto à superfície quando implantado.

A terceira questão fundamental da tese avaliou os efeitos da variação da natureza das interfaces em termos da Energia da Superfície. Nesta etapa foi necessário um estudo para a escolha dos modelos teóricos e da técnica (discutidos no capítulo III.3.5) apropriados. A figura 30 mostra os dados obtidos pelo software do tensiometro referentes aos líquidos utilizados, aos valores de componentes de energia superficial e à reta da equação.

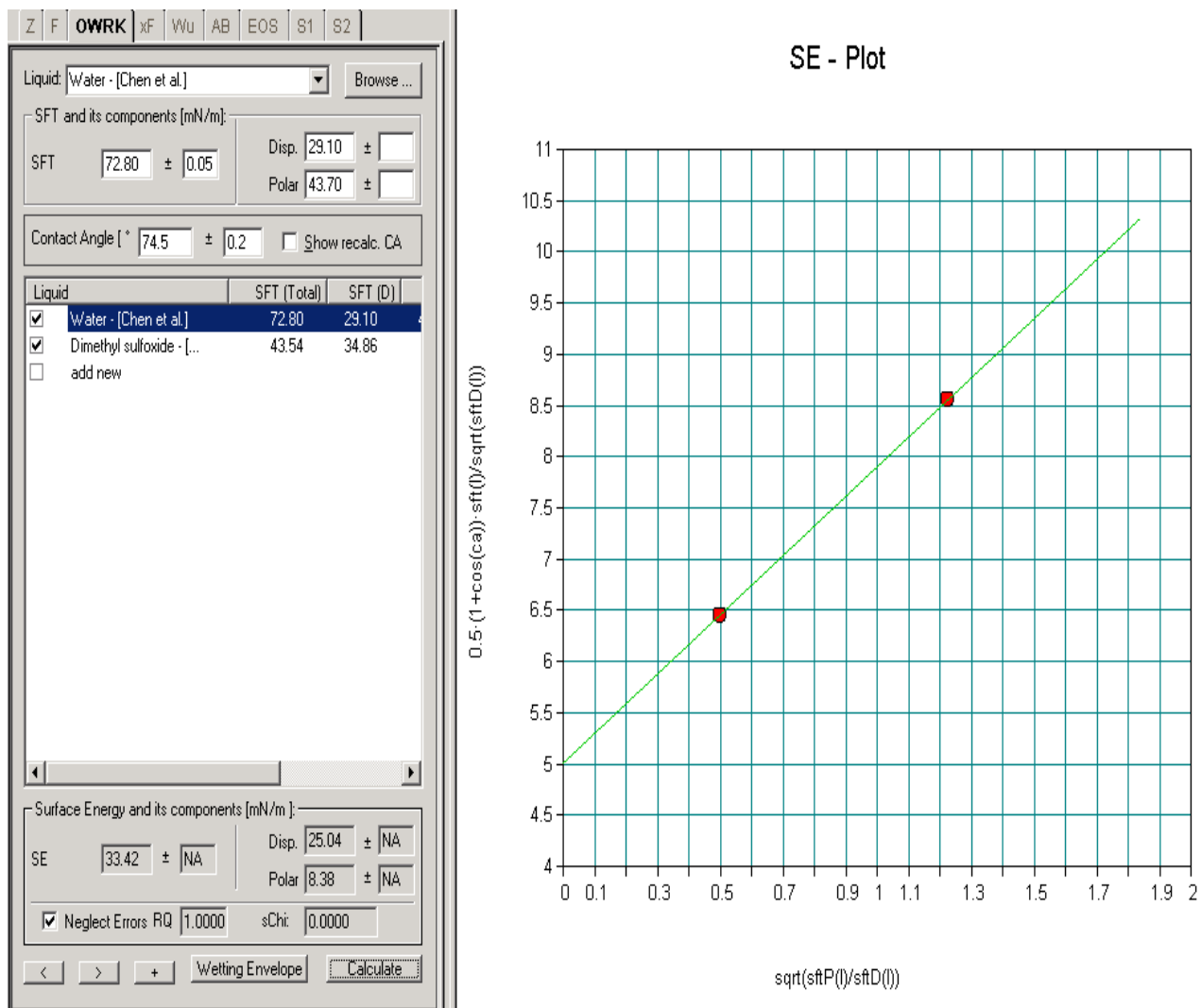


Figura 30 – Cálculo efetuado pelo programa usado na determinação da energia da superfície em termos de componentes de energia dispersiva e polar.

Com a medida do ângulo de contato entre a superfície do titânio e os líquidos (água e dimetil sulfóxido), a energia foi calculada a partir da soma das componentes de energia dispersiva e polar utilizando os modelos teóricos descritos na metodologia. O valor encontrado foi de 33,42 mJ/m² valor próximo do encontrado por Wang⁸⁴ e colaboradores que determinaram 33,3 mJ/m² para o titânio cp apenas com tratamento de revelação da superfície. Isso mostra que os modelos teóricos utilizados aqui são adequados para tal proposta.

Os modelos permitiram verificar também que a energia superficial do titânio é muito mais influenciada pela componente de energia dispersiva com valor de 25,04 mJ/m² do que da componente polar com valor de 8,38 mJ/m². Partindo desta metodologia de análise experimental todas as amostras foram analisadas e estudadas em termos de que tipo de interações que as diferentes naturezas das superfícies proporcionavam.

Nos experimentos, as variações nas componentes de energia superficial se originam das interações físicas nas interfaces, movidas por aspectos microscópicos relacionados à constituição dos meios interagentes. Deste modo, essas propriedades foram interpretadas como o resultado coletivo de interações entre partículas. A modelagem correta para o estudo das interações interfaciais presume a consideração de aspectos essenciais de tais interações para que o comportamento macroscópico seja recuperado consistentemente. A inclusão destes aspectos, independentemente do modelo a ser utilizado, leva em consideração a atuação das forças intermoleculares que para este propósito, é possível evidenciá-las em termos das componentes de energia superficial.

A verificação das interações intermoleculares utilizando tais experimentos é uma evidência dos efeitos associados às modificações físico-químicas propostas podendo ser resultante de forças atrativas de longo alcance e/ou forças repulsivas de curto alcance. As forças de curto alcance são aquelas originadas da superposição das nuvens eletrônicas, quando a distância entre os centros moleculares é da ordem ou menor que 3Å⁸⁵. As forças atrativas podem vir a aproximar moléculas afastadas, se a configuração de cargas for favorável, até o ponto no qual as forças repulsivas predominem e evitem o colapso. Embora estas forças sejam consideradas de curto alcance sob o ponto vista macroscópico, é reconhecido que elas podem levar a efeitos macroscópicos nos colocando diante das seguintes questões: até que dimensões moleculares haveria interações proporcionadas por partículas específicas? Haveria contribuições dessas forças em interações com macromoléculas? Em que proporções?

Tratamentos ácidos em superfícies metálicas influenciam na camada de passivação (óxidos) que se formam naturalmente. Neste sentido, a possibilidade de ligação do H^+ com o Ti metálico que sobra na superfície pode ser a causa da variação (diminuição) dos grupos $(OH)^-$ disponíveis na superfície e responsáveis pelas interações com momentos dipolares permanentes. Tal evidência pode ser corroborada com a diminuição quantitativa da componente de energia polar calculada. No entanto, as flutuações de cargas em função das forças intermoleculares de longa distância aumentaram, conforme é observado no valor da componente de energia dispersiva. Esse aumento é esperado e necessário para que o sistema se torne termodinamicamente estável.

Já o tratamento alcalino provocou um efeito contrário, pois resultou na diminuição da componente de energia dispersiva, polarizando a superfície em comparação com sua condição controle (após a superfície revelada). Esse efeito foi atribuído ao aumento dos grupos $(OH)^-$ disponíveis na superfície. Neste caso, a suspeita é de que o sódio possa estar interagindo com a rede cristalina, difundindo-se, em forma de vacâncias, nas camadas oxidadas. A tabela 6 contempla os valores de energia superficial calculados para as amostras de Ti cp, a liga Ti6Al4V e a liga Ti13Nb13Zr utilizando o mesmo protocolo de tratamento superficial para a criação das primeiras interfaces.

Tabela 6 – Energia da Superfície medida em mJ/m^2 para substratos metálicos após as primeiras modificações nas superfícies

<i>Amostras</i>	<i>Lixamento</i>	<i>Trat. ácido</i>	<i>Trat. alcalino</i>
Ti cp	33,42	41,01	36,67
Ti6Al4V	68,64	48,57	80,48
Ti13Nb13Zr	47,34	35,09	64,62

O estudo destes fenômenos foram conduzidos pela compreensão das forças de Van der Waals⁸⁵ e consistiu na interpretação da variação das componentes de energia superficial pelas interações entre moléculas polares, como as forças resultantes que induzem uma determinada polarização em moléculas vizinhas apolares (sem dipolo permanente), resultando força de atração. Outros fenômenos interfaciais estão associados às forças de dispersão. Esse tipo de força está sempre presentes mesmo entre partículas totalmente neutras e possuem origem quântica podendo ser interpretadas com movimento característico dos elétrons numa molécula neutra, o qual pode gerar regiões temporariamente negativas e positivas. Como resultado, o centro de carga negativa não coincide com o centro das cargas positivas, gerando dipolos elétricos instantâneos no tempo. Esses dipolos temporariamente induzidos geram um campo elétrico que induz a polarização de moléculas vizinhas. A interação resultante entre os dipolos induzidos gera uma força instantânea, a qual na média temporal é não-nula, embora essas moléculas, em média, apresentem polarização nula.

Desta forma, a análise em termos de componentes de energia como a que é proposta aqui, pode contribuir na avaliação de como estas forças interagem a partir das modificações nas superfícies, polarizando, induzindo ou orientando. A natureza das superfícies nestas primeiras interfaces envolveu especialmente dos grupos OH⁻, NaOH, HCl, Ti-OH e, como resultados das interações destas, os diferentes níveis de energia superficial livre foram observados.

As interfaces seguintes, criadas a partir da modificação superficial com titânia e hidroxiapatita nas superfícies antecessoras (ácida e alcalina), foram então estudadas. Para certificar-se da obtenção da fase desejada a partir dos métodos utilizados, assim como, certificar-se de que as temperaturas de calcinação não alterariam a estrutura cristalina, foi feita uma varredura termogravimétrica para avaliar as transições de fases. As figuras 31 e 32 mostram as curvas de análise térmica realizadas no revestimentos onde o sentido endotérmico é voltado para baixo.

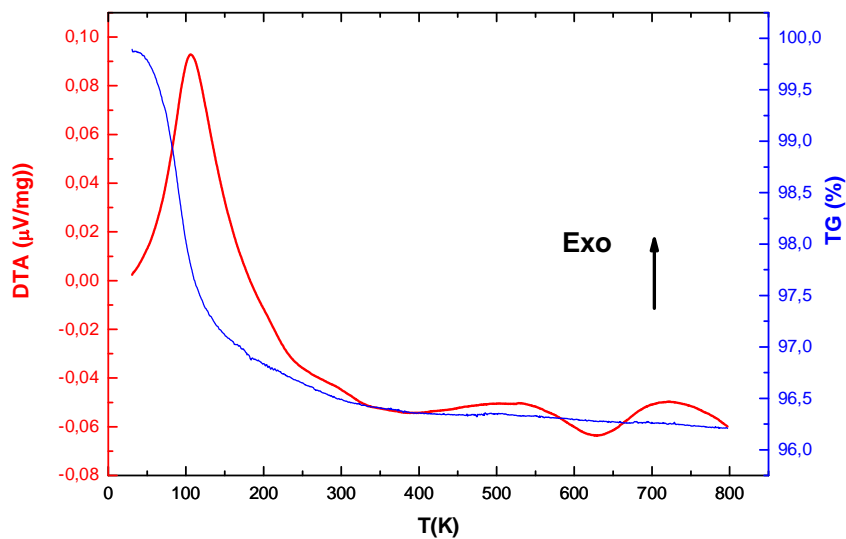


Figura 31 – Análises térmicas para caracterização da titânia utilizada nos revestimentos.

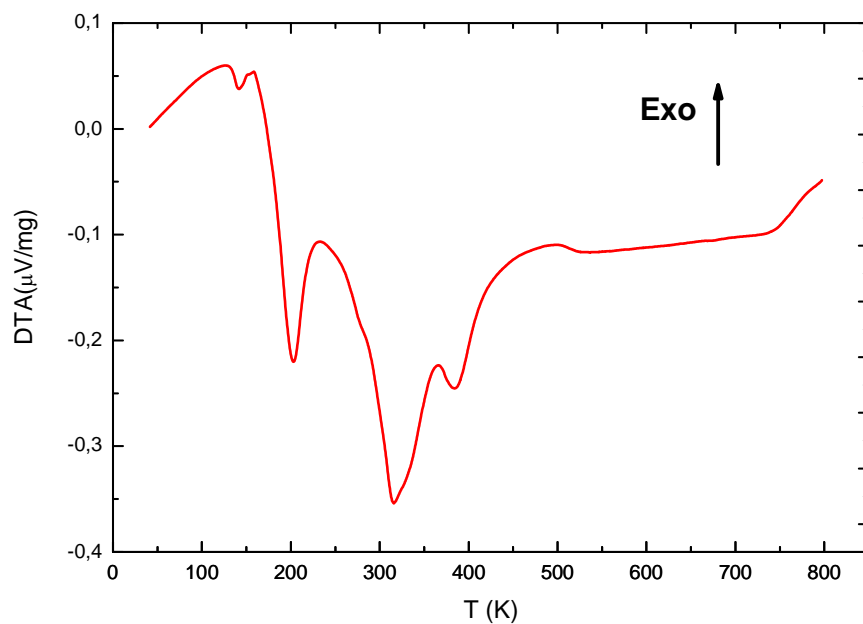


Figura 32 – Análise térmica para caracterização da hidroxiapatita utilizada nos revestimentos.

No caso do revestimento a base de titânia, é possível observar um processo exotérmico acompanhado da perda de massa próximo dos 100° C, onde provavelmente a fase líquida presente no material, após sua obtenção, se transforma. Entre 600° C e 700° C ocorre a mudança de fase desejada sem a variação de massa. Para a etapa em que envolveu o revestimento da titânia, estabeleceu-se um tratamento térmico de 400° C para calcinação por 8 horas para evitar, em princípio, a mudança de fase requerida, posteriormente, com a criação da nova interface com a modificação com hidroxiapatita, o protocolo foi alterado. Com relação ao experimento com a hidroxiapatita, no momento do aquecimento da amostra, esta ainda se encontrava, em boa quantidade, na fase líquida, próximo de uma pasta. Pode ser observado também os picos exotérmicos e endotérmicos abruptos de 100 a 300 graus Celsius em que os processos foram salientados nas análises devido ao alto grau de liberdade das partículas proporcionado pelo estado líquido assim como da fase desejada entre 500 e 700 graus Celsius.

As figuras 33 e 34 mostram as morfologias das superfícies do titânio após a criação de duas novas interfaces com titânia em que, com o tratamento térmico, os diferentes coeficientes de expansão térmica entre os materiais nas interfaces resultaram em rachaduras como os observados na forma de sulcos e lamelas dos revestimentos. Como efeito, pode haver um aumento na tensão interfacial prejudicando a adesão e a estabilidade do revestimento. Justifica-se então, a realização dos testes de adesão interfacial como o proposto neste trabalho.

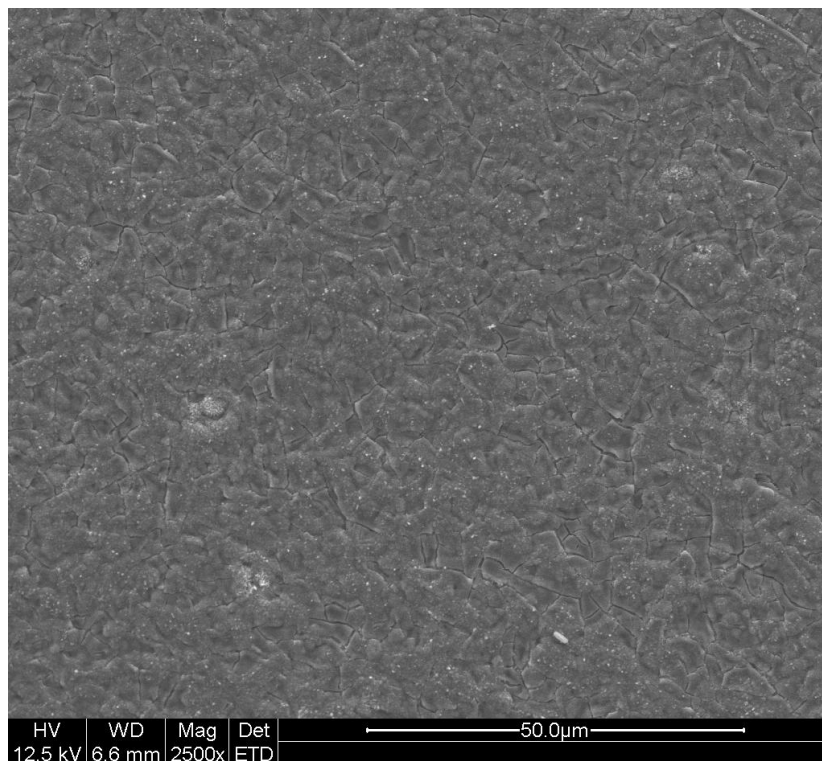


Figura 33 – Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento ácido e revestido com TiO₂.

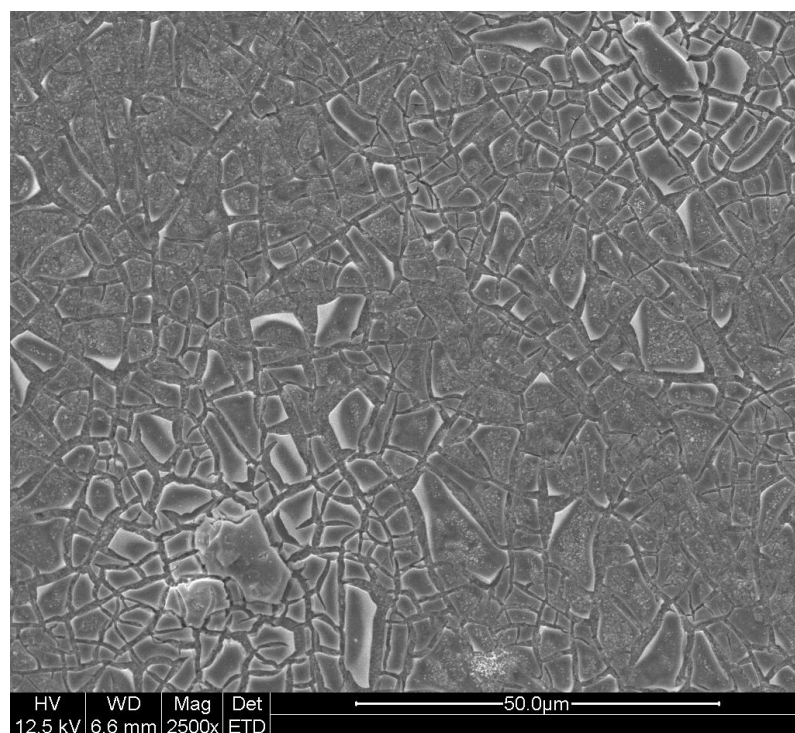


Figura 34 – Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento alcalino e revestida com TiO₂.

O óxido de titânio se apresenta em estequiometrias variadas, como Ti_3O , Ti_2O , Ti_3O_2 , TiO , Ti_2O_3 e Ti_3O_5 , sendo o mais estável TiO_2 ²². À temperatura ambiente, não é afetado por substâncias ácidas ou alcalinas, sendo assim ideal para aplicações como implantes no corpo humano. No entanto, ainda não se tem uma precisão sobre qual tipo de óxido de titânio é o mais favorável para iniciar de forma mais rápida a osseointegração. Propõe-se aqui que a camada de titânia possa servir como barreira corrosiva e principalmente que promova uma melhor adesão nos revestimentos seguintes à base de fosfatos de cálcio. As figuras 35 e 36 mostram, respectivamente, a superfície das amostras com tratamentos ácidos e alcalinos revestida com titânia e hidroxiapatita.

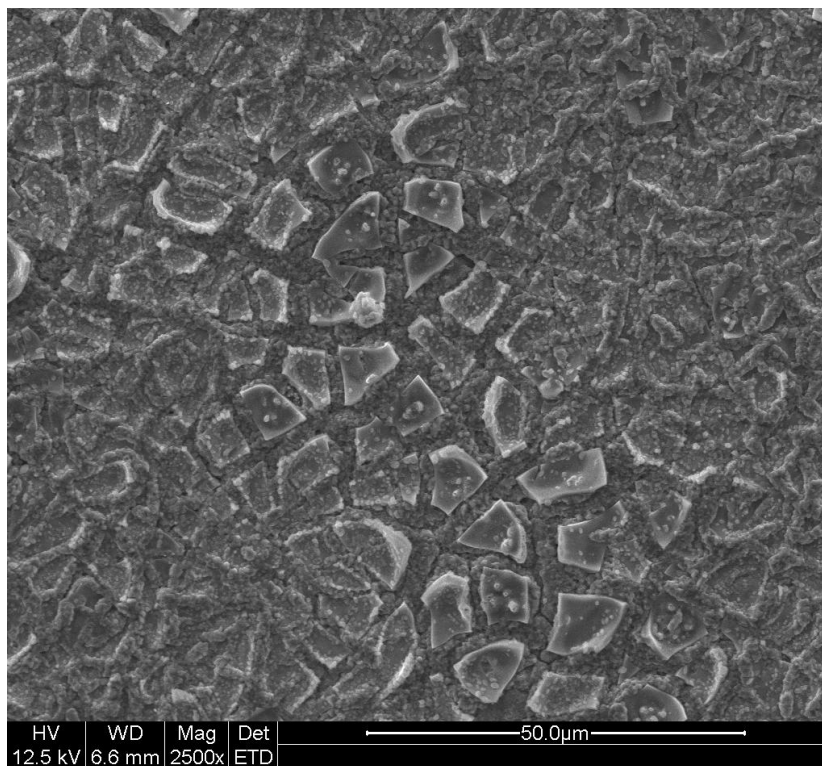


Figura 35 – Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento ácido, revestido com TiO_2 e HA.

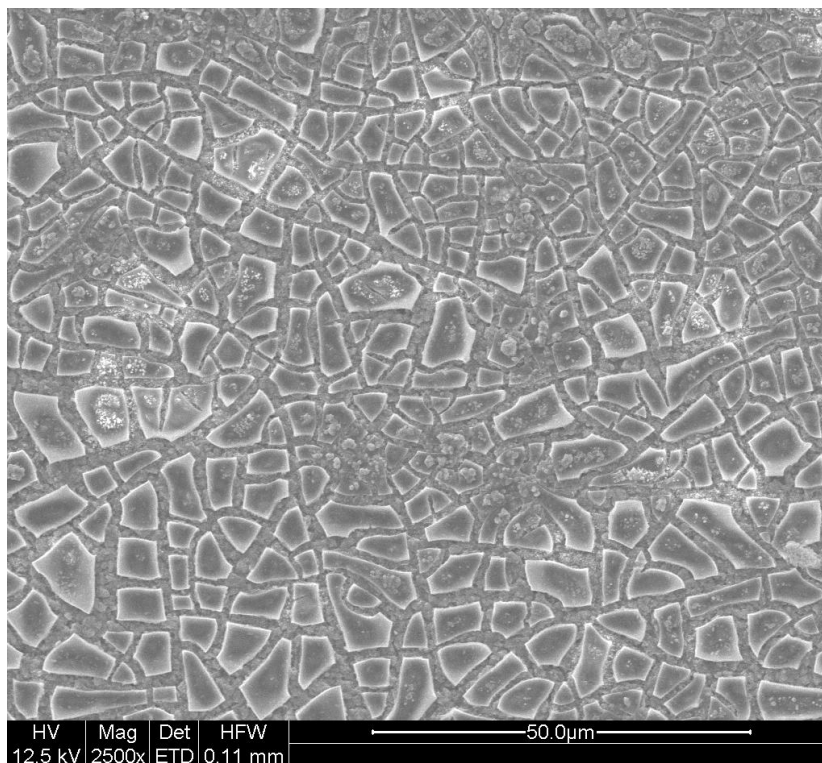


Figura 36 – Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento alcalino, revestida com TiO_2 e HA

É possível observar cristais sobre o revestimento de TiO_2 onde núcleos se formaram, tanto nos contornos, como sobre as lamelas de titânia. Esses núcleos podem ser regiões concentradas de HA, regiões bioativas favoráveis que podem tornar a superfície energeticamente atrativa para partículas que constituem o meio biológico. Estas considerações corroboram com indícios da biocompatibilidade^{13, 36,37}.

As imagens das figuras 37 e 38 mostram revestimentos obtidos com a solução de cálcio para a criação de uma interface de titanato de cálcio. É possível observar a alteração morfológica ao se comparar com as interfaces anteriores com um filme na superfície do titânio. Essa constatação é mais evidente na interface com o tratamento intermediário alcalino. A figura 39 mostra a superfície após o revestimento com HA.

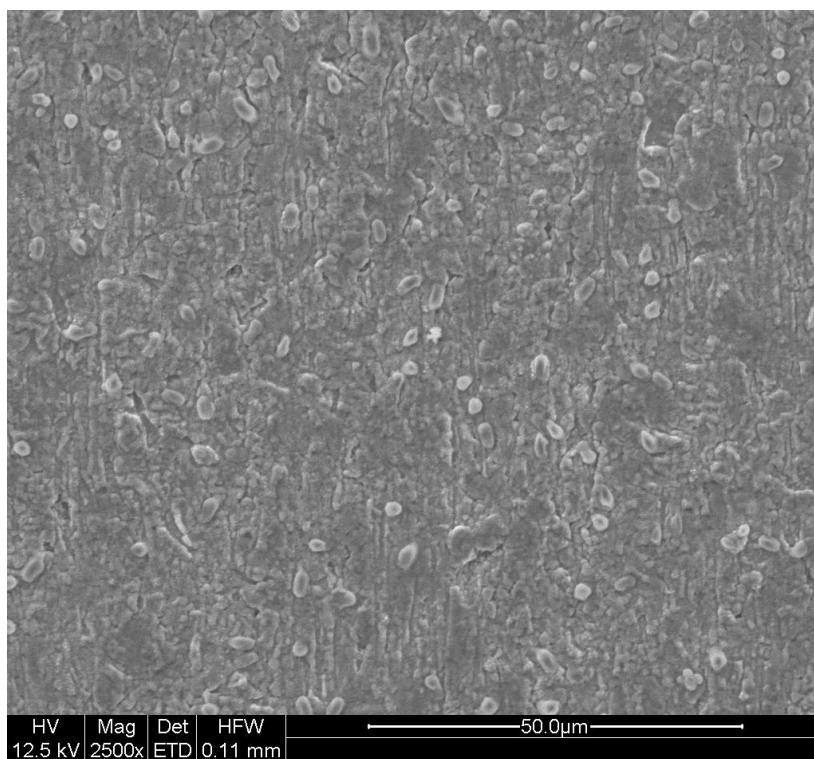


Figura 37 –Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento ácido e revestida com cálcio.

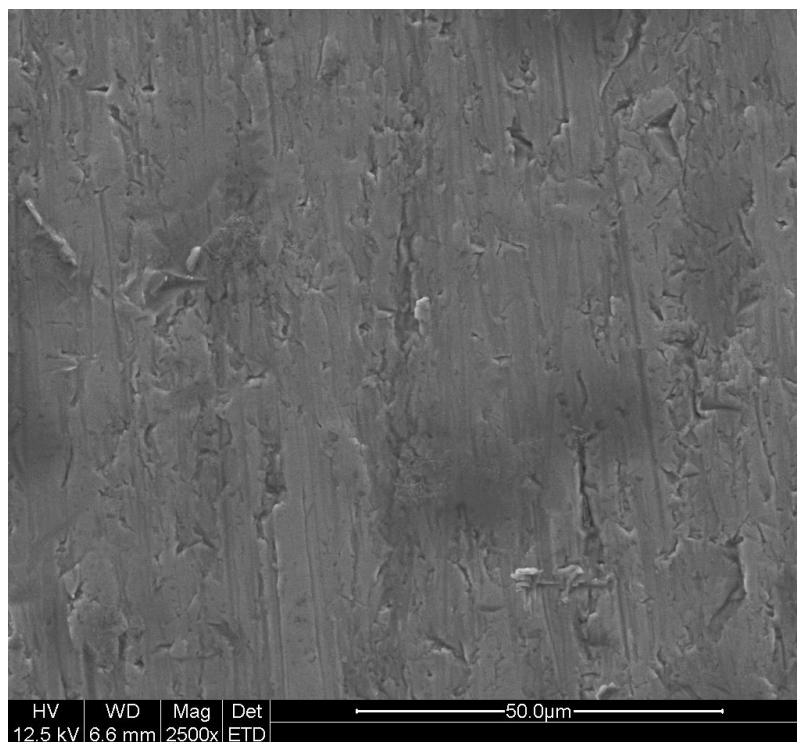


Figura 38 –Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento alcalino e revestida com cálcio.

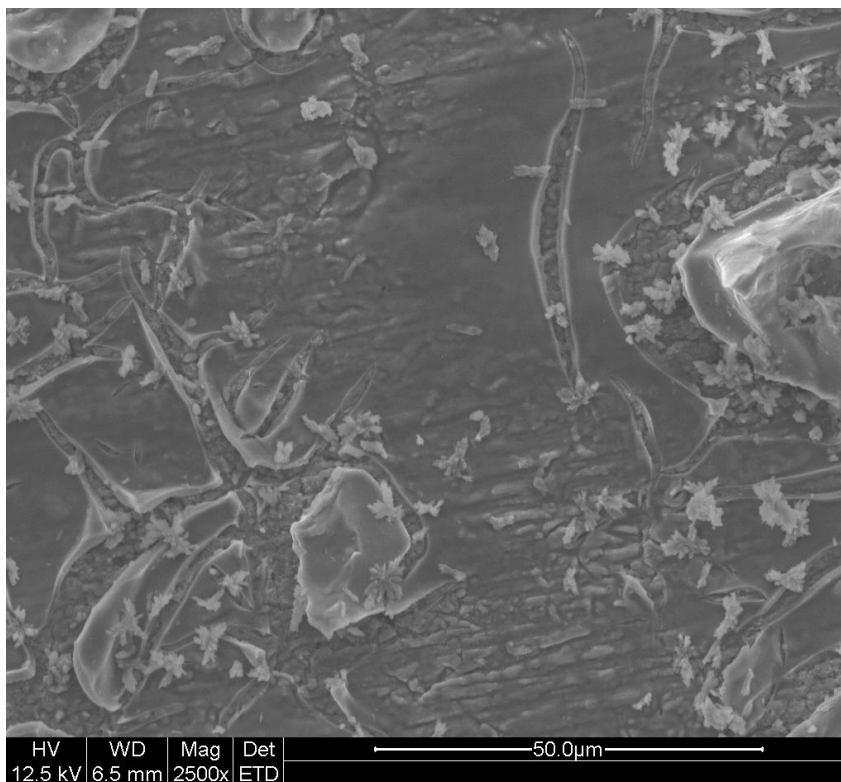


Figura 39 – Imagem obtida por MEV do Ti cp com tratamento alcalino e revestido com cálcio e HA.

Ao avaliar a última imagem é possível verificar a formação de núcleos sob a forma de cristais, obtidos com o revestimento com HA na superfície, assim como o observado anteriormente. Esta interpretação sugere que a formação de apatitas seja oriunda de processos de nucleação, a partir de uma condição energeticamente favorável para partículas do fluido corporal, o qual é supersaturado em relação à apatita em condições normais. Quando a superfície de um material tem um grupo funcional que pode ser um local efetivo de nucleação, neste caso as apatitas, ela poderá favorecer ou promover a nucleação, que crescem espontaneamente a partir do consumo de íons de cálcio e fosfatos presentes no fluido corpóreo. Algumas discussões sobre essas argumentações mais específicas, sobretudo com relação aos aspectos bioquímicos, podem ser encontradas em trabalhos de pesquisadores como Mau, Gan e Kokubo^{24,31,77}. Estas são características de um material bioativo o que implica na formação de uma camada de apatita biologicamente ativa para as etapas seguintes do

processo de osseointegração com a formação de tecidos sobre e através as camadas. Este é o principal mecanismo de ligação do material bioativo e o tecido ósseo.

Os resultados mostrados na tabela 7 contemplam todos os cálculos da energia da superfície comprovando o potencial da técnica empregada para modificar e ativar as superfícies metálicas do Titânio cp.

Tabela 7 – Ativação das superfícies para diferentes interfaces

<i>Interfaces ácidas</i>	<i>Energia Superficial (mJ/m²)</i>	<i>Interfaces alcalinas</i>	<i>Energia Superficial (mJ/m²)</i>
Ti lixado	33,42	Ti lixado	33,42
Ti+ HCl	41,01	Ti + NaOH	36,07
Ti+HCl+TiO ₂	60,21	Ti+NaOH+TiO ₂	60,30
Ti+HCl+TiO ₂ +HA	60,45	Ti+NaOH+TiO ₂ +HA	59,26
Ti+HCl+CaTiO ₃	68,96	Ti+NaOH+CaTiO ₃	77,41
Ti+HCl+CaTiO ₃ +HA	76,45	Ti+NaOH+CaTiO ₃ +HA	82,54

A troca interatômica que o oxigênio do revestimento de titânia faz com o hidrogênio, tanto nos sítios cristalinos da interface ácida (HCl) quanto na interface alcalina (NaOH), resultam na variação dos grupos OH⁻. Esses grupos funcionais são capazes de polarizar uma superfície.

A mudança do ponto isoelétrico superficial (IEP) pela criação de diferentes camadas de óxidos em contato com um eletrólito com pH maior que o ponto isoelétrico (IEP) do óxido de titânio, o grupo Ti-OH ácido passa a dominar a superfície causando um excesso de cargas positivas com a formação de Ti-O modificando o ponto de pH no qual a superfície tem carga neutra. O IEP do óxido do titânio está entre 5 e 6 e os diferentes estados no ponto de zero carga entre as fases rutilo e anatase constituem uma relação de causa e efeito.

Essas idéias podem ser conduzidas sob a hipótese de que para ativação da superfície metálica, cujo objetivo seja produzir um revestimento final de alta adesão, é necessário que as interfaces sejam construídas por ligações químicas específicas, como as que correspondem à formação do grupo funcional OH⁻. As ligações químicas específicas, em conjunto com uma orientação cristalográfica preferencial, podem resultar em camadas oxidadas com diferentes tensões interfaciais e forças de adesão.

As imagens das figuras 40 a 45 mostram as variações da área superficial das amostras com os diferentes parâmetros de rugosidade calculados a partir das imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica. Esses parâmetros permitiram estabelecer uma relação direta com os fenômenos relacionados à bioatividade e adesão conforme objetivos propostos nesta tese.

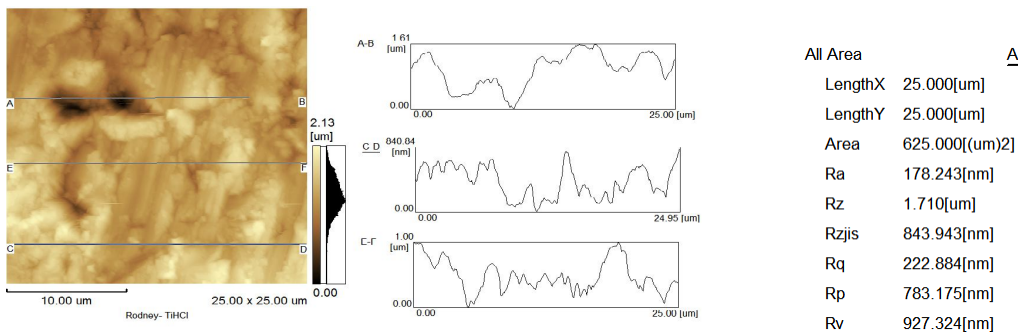
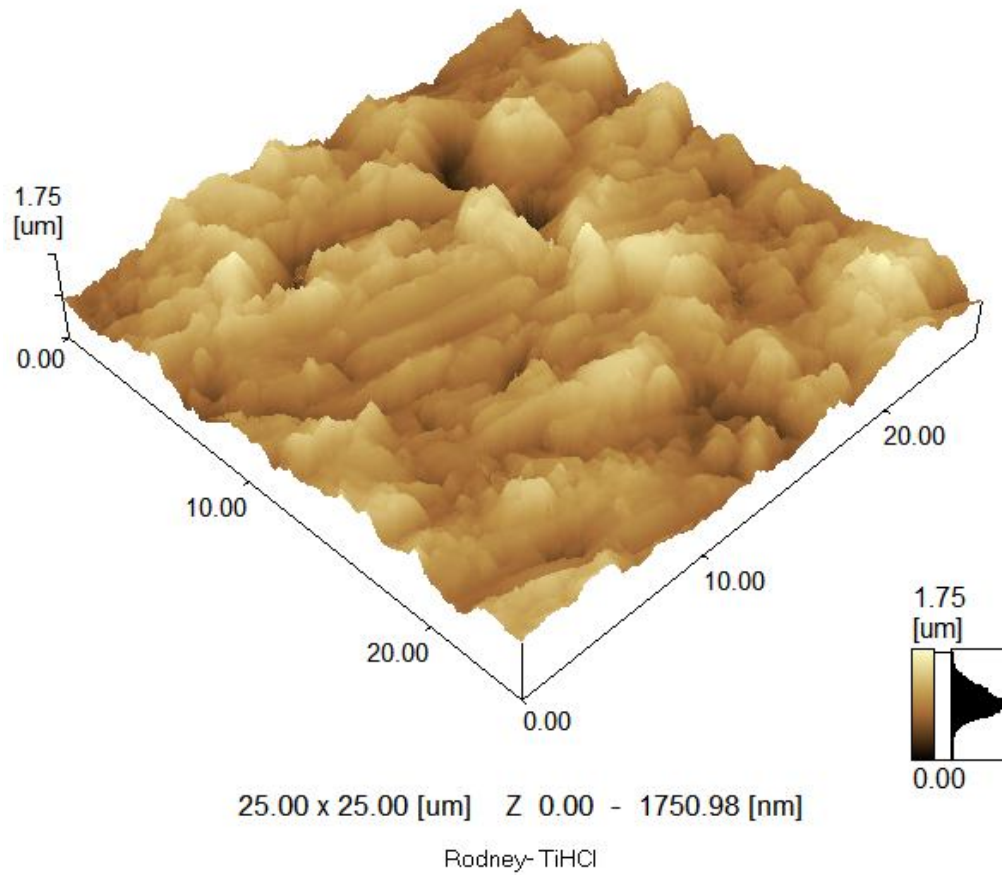


Figura 40 - Imagens obtidas por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+HCl por AFM.

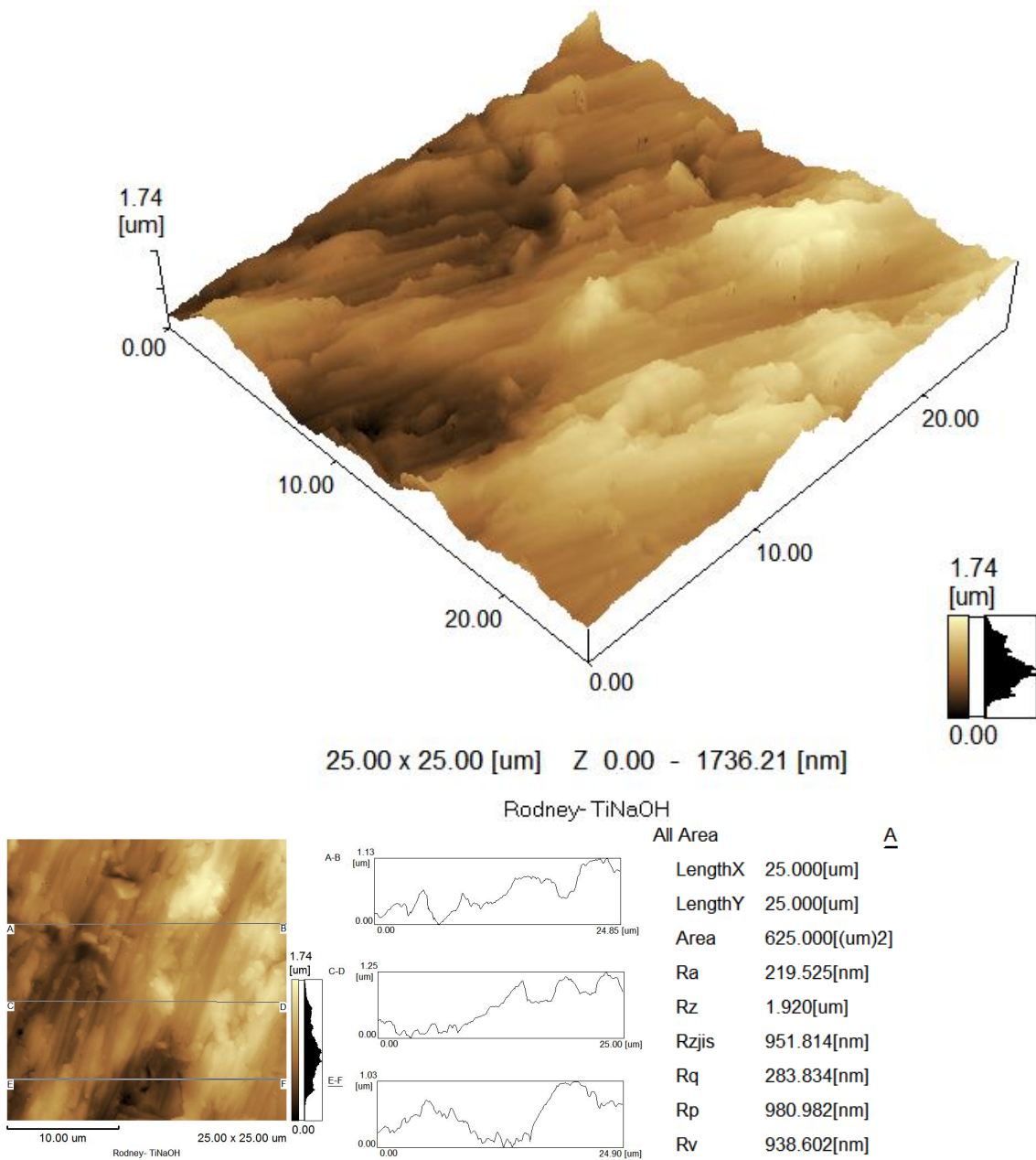


Figura 41 - Imagens obtidas por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+NaOH

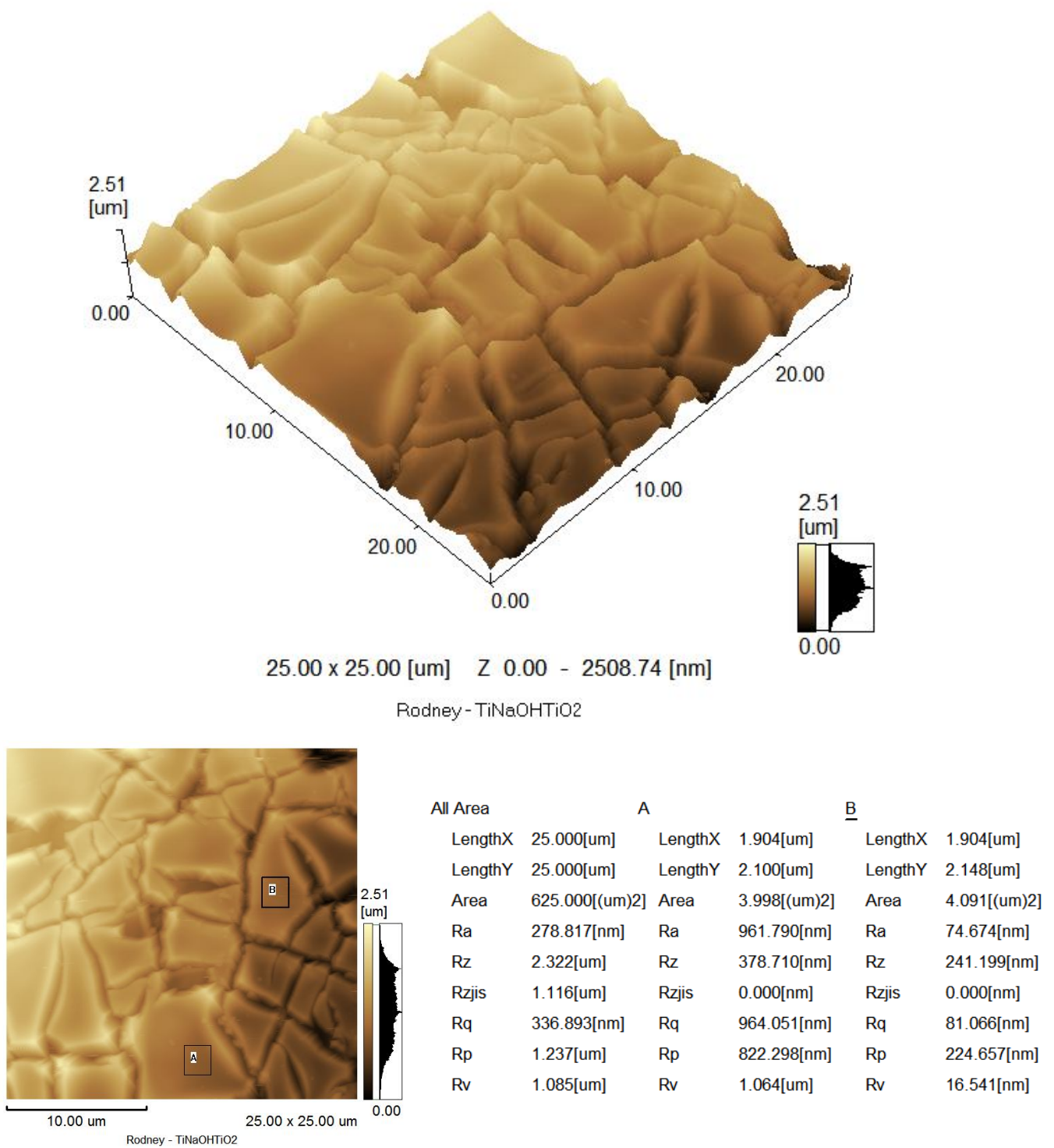


Figura 42 – Imagens obtidas por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+NaOH+TiO₂

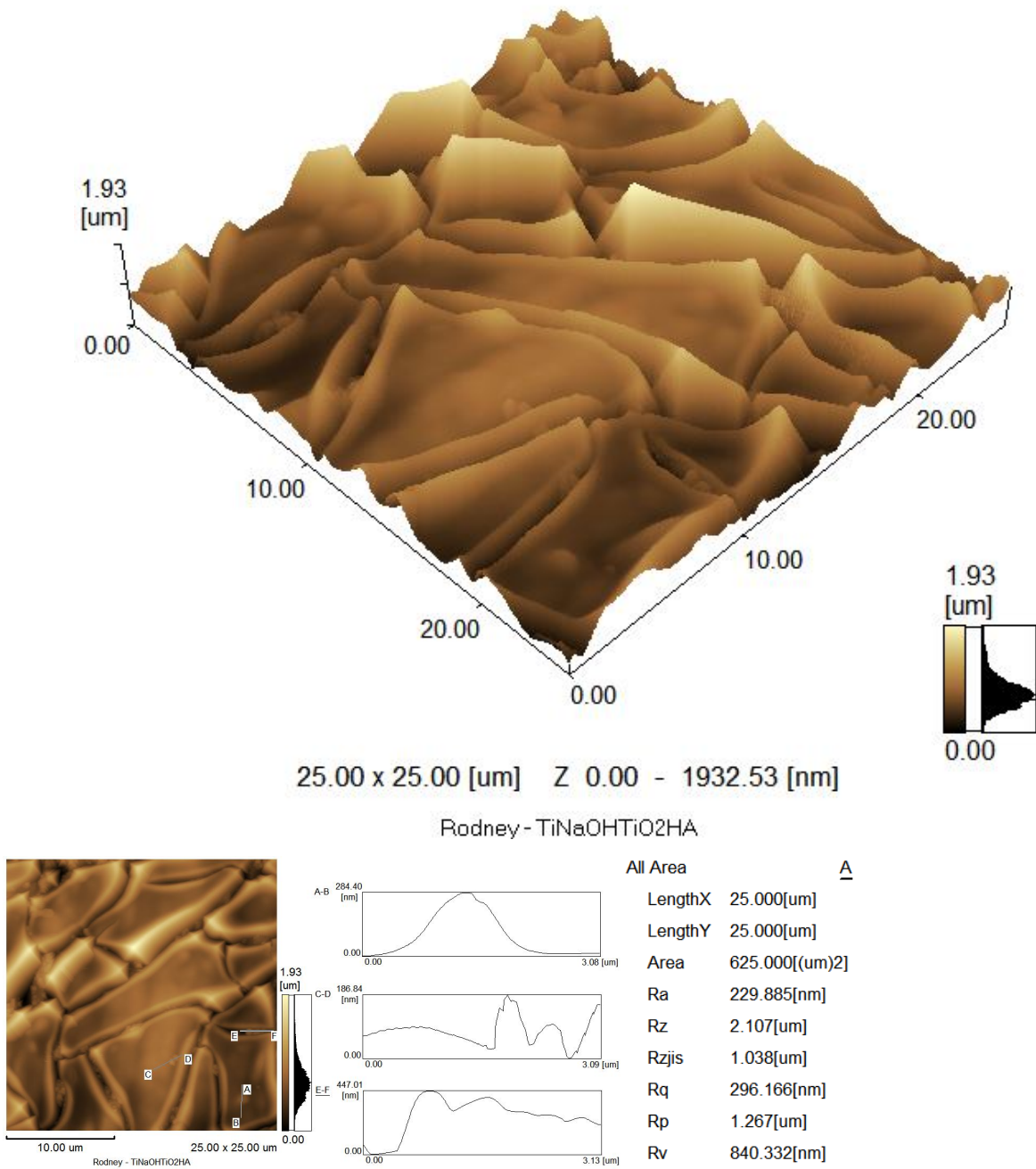
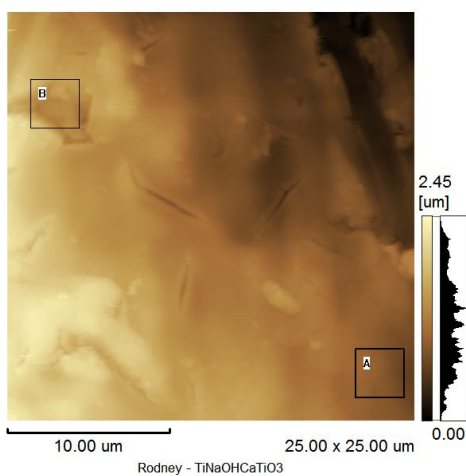
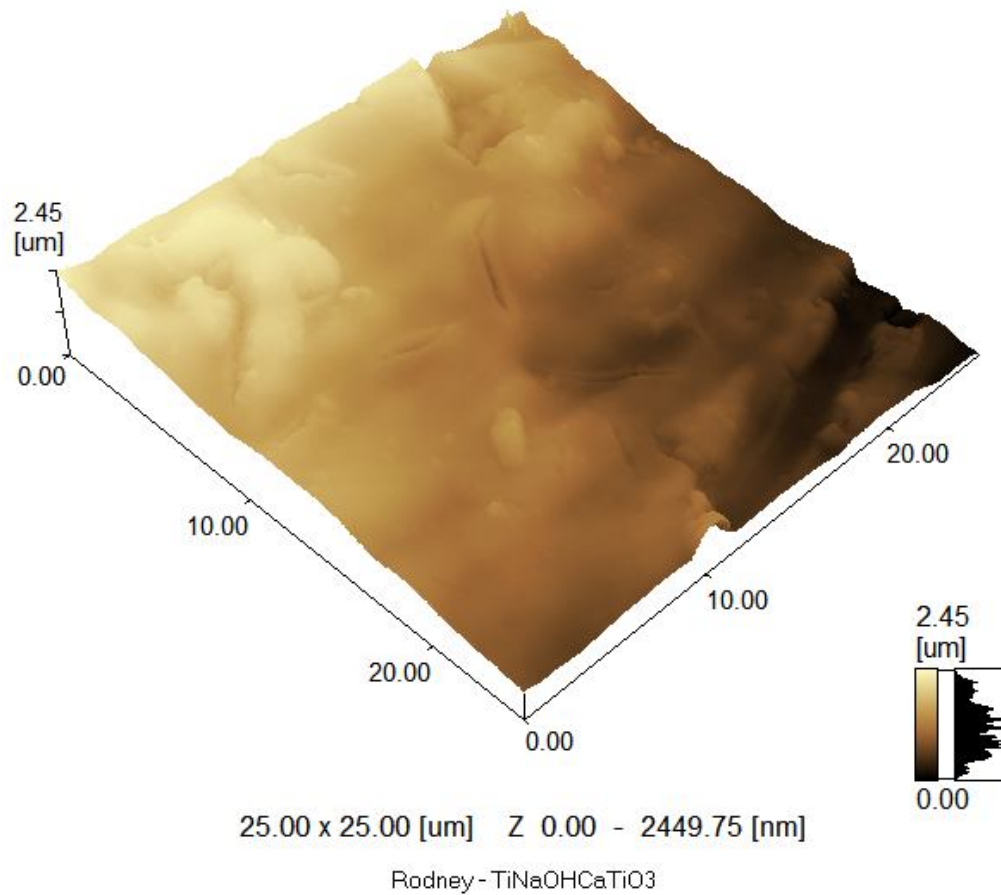


Figura 43 – Imagens obtidas por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+NaOH+TiO₂+HA



All Area		<u>A</u>		B	
LengthX	25.000[um]	LengthX	3.000[um]	LengthX	3.000[um]
LengthY	25.000[um]	LengthY	3.000[um]	LengthY	3.000[um]
Area	625.000[(um)2]	Area	9.000[(um)2]	Area	9.000[(um)2]
Ra	470.576[nm]	Ra	28.697[nm]	Ra	837.817[nm]
Rz	2.277[um]	Rz	136.250[nm]	Rz	756.684[nm]
Rzjis	1.120[um]	Rzjis	59.561[nm]	Rzjis	0.000[nm]
Rq	538.613[nm]	Rq	34.965[nm]	Rq	857.358[nm]
Rp	1.040[um]	Rp	35.828[nm]	Rp	1.245[um]
Rv	1.237[um]	Rv	100.423[nm]	Rv	488.682[nm]

Figura 44 – Imagem obtida por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+NaOH+CaTiO_3

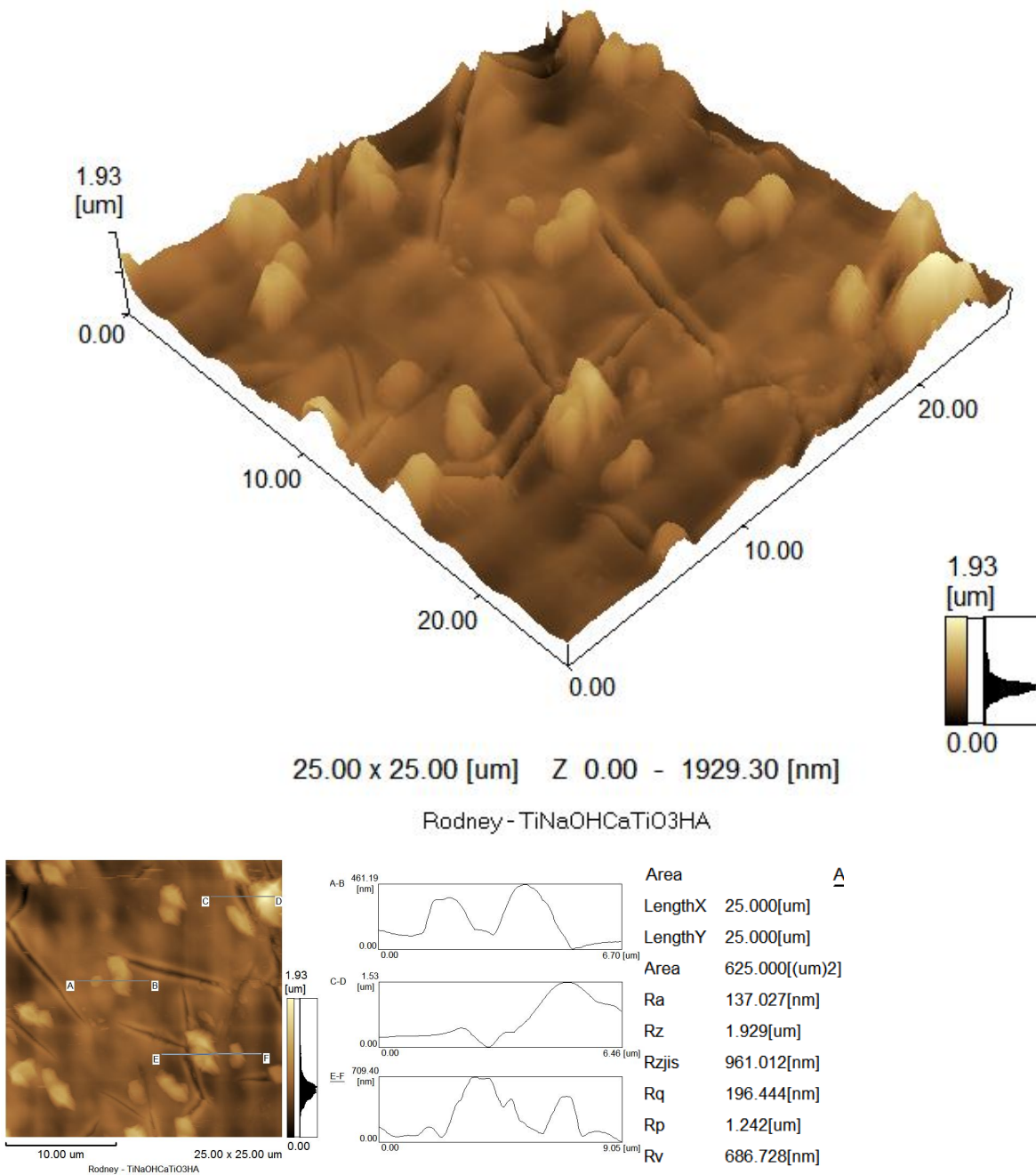


Figura 45 – Imagem obtida por AFM e parâmetros de rugosidade da amostra Ti+NaOH+CaTiO₃+HA

Calculando o parâmetro rugosidade média observa-se que a variação da área superficial com o tratamento alcalino (220 nm) difere quantitativamente da variação da área superficial com o tratamento ácido (178 nm). O aumento da rugosidade potencializa a característica hidrofílica ou hidrofóbica de uma superfície. Assim, o ângulo de contato aparente em superfícies hidrofílicas, serão tão menores quanto mais rugosas forem as superfícies. Inversamente, a energia de superfície será tão maior quanto mais rugosa for a superfície.

Os parâmetros de rugosidade são importantes propriedades no que tange aos fenômenos interfaciais, pois além de modificar a área superficial, afeta também o coeficiente de atrito e proporciona a retenção mecânica de materiais estranhos. Para as nossas propostas, a rugosidade na superfície de um implante pode favorecer a distribuição de tensões, a retenção do crescimento ósseo e a resposta celular. Corroborando com essas argumentações, o aumento na resposta óssea e na resistência da interface implante-osso foi relacionado ao crescimento do trabeculado ósseo perpendicular a superfície rugosa de implantes com superfícies hidrofílicas. Desta hidrofília, resulta-se diferentes níveis de adsorção de macromoléculas⁸⁶.

Levando-se em consideração que a interação das células com a superfície de um implante é afetada pela topografia da superfície, espera-se que a variação da área superficial possa contribuir no aumento de sítios energeticamente favoráveis para ligarem, facilitando o crescimento dos tecidos e aumente a estabilidade mecânica. Assim, o controle preciso do nível de rugosidade durante um tratamento superficial de metais se faz necessário para que, ao ser aplicado, células encontrem pontos de ancoragem na superfície do implante para iniciar a proliferação e garantir a biofixação. Se a superfície possui rugosidade muito menor que o tamanho das células, poderá ocorrer ausência destes sítios com a ressalva de que se o implante possuir grandes números de picos ou vales, mas, estes possuem superfícies lisas, as células, igualmente, não poderão se fixar. Até o momento, não existe um consenso, dentro da comunidade científica, sobre quanto ao melhor tratamento superficial e nível ideal de rugosidade.

No caso das imagens obtidas para as interfaces com os revestimentos, é possível observar a formação sítios e núcleos corroborando com as imagens observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Embora seja de praxe que o aumento da rugosidade de superfícies de implantes promova maior ancoragem, a resistência da interface implante-osso não pode ser atribuída exclusivamente a este parâmetro conforme hipóteses testadas nesta tese. Ao compararmos os resultados de rugosidade com a energia superficial para amostras com o tratamento intermediário alcalino da figura 46, é possível perceber que o revestimento com HA diminui a rugosidade média através da formação de um filme com os núcleos observados por MEV como na figura 39. Esses resultados indicam que a natureza química da superfície, em alguns casos, pode contribuir de forma mais significativa na energia do que outros fatores ora discutidos neste trabalho, contestando assim o que Gennes⁸⁷ e Hardy⁸⁸ propõem em seus trabalhos. Analogamente, é possível interpretar que a área da superfície (rugosidade) não seja o principal requisito para favorecer os fenômenos interfaciais durante os estágios iniciais de interação entre o material e o meio biológico que, para este caso, a natureza das partículas envolvidas nas modificações propostas como o Ca, P e Na parece exercer maior influência na energia superficial e conseqüentemente na molhabilidade, independente das condições morfológicas.

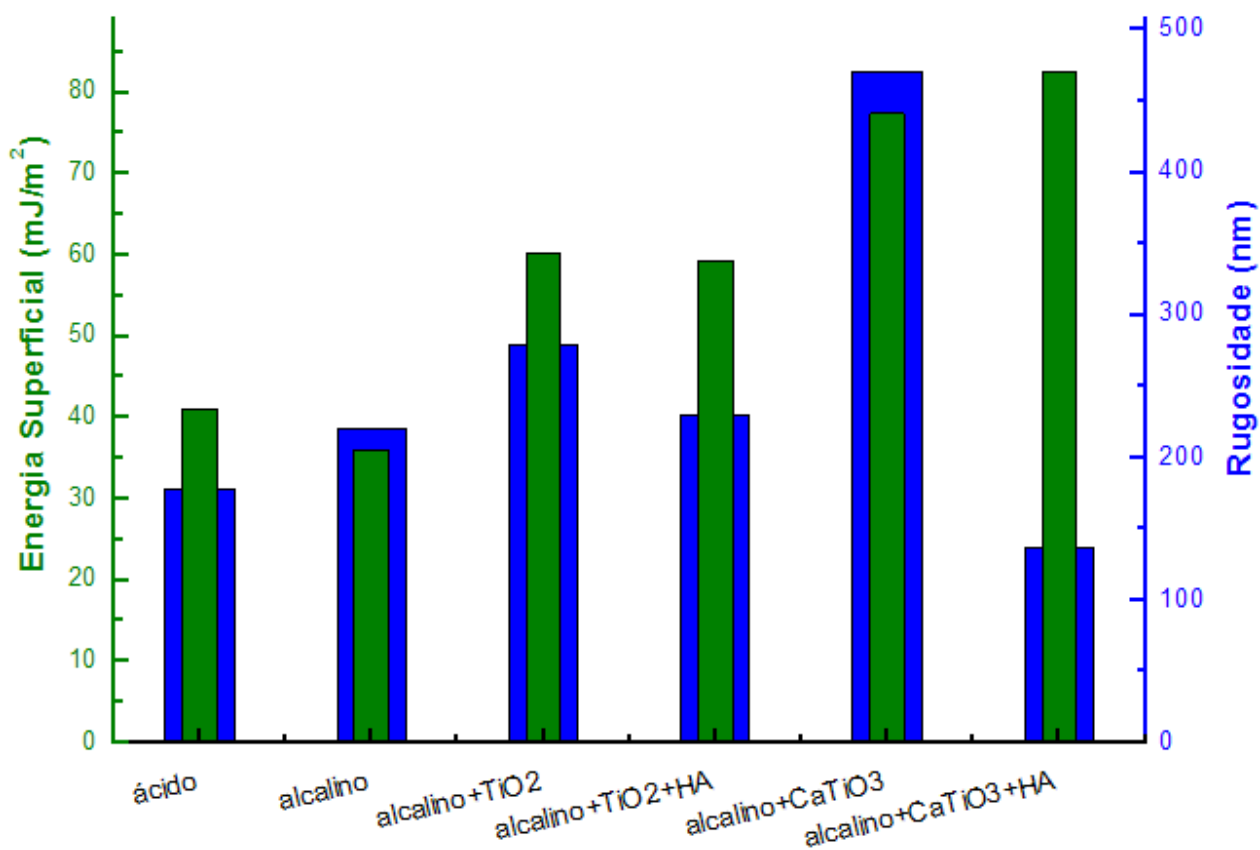


Figura 46 – Rugosidade e energia superficial de amostras com interfaces de tratamento intermediário alcalino.

A dificuldade em encontrar um modelo teórico para a compreensão dos fenômenos interfaciais durante a osseointegração impossibilita o desenvolvimento de materiais que possam desempenhar uma melhor conectividade óssea. A idéia em simular os estágios iniciais do contato entre o implante e o osso humano adaptando a técnica de goniometria consistiu em avaliar cineticamente a interação entre o fluido corporal e a natureza da superfície de forma a entender a dinâmica do processo em termos da natureza dos elementos químicos, neste caso, através das componentes de energia da superfície.

A idéia central desta etapa dos estudos está em relacionar o grau de molhabilidade de uma superfície como um parâmetro para se avaliar a biocompatibilidade de um material e então, obter informações que pudessem ajudar a

responder à quarta questão fundamental da tese. Assim foram realizados os experimentos de cinética de molhabilidade através da medida da variação do ângulo de contato que o líquido forma sobre a superfície do material. Este experimento tem por objetivo evidenciar a influência direta da superfície no meio, neste caso, o fluido corporal simulado.

Por ser uma tentativa inédita ainda sem parâmetros para comparação, optou-se por uma variação temporal média de 10 minutos para cada amostragem. É possível observar a diferença de hidrofiliabilidade (agora utilizando um fluido simulado em laboratório) entre as superfícies através dos ângulos de contatos. Ambos os resultados estão coerentes com os resultados da variação da energia das superfícies proporcionados pelos tratamentos iniciais. Neste ponto destaca-se também o aumento da componente de energia polar atribuída à natureza dos grupos OH^- onde a hipótese da influência destes grupos nas partículas oriundas do fluido se dá através das interações intermoleculares. Esta ainda não seria a hipótese final, mas evidencia o fato de que os tratamentos alcalinos realizados nas superfícies podem formar uma camada de titanato de sódio. O sódio, ao se difundir nas camadas oxidadas, disponibiliza uma maior energia superficial em termos de polarização da superfície, este talvez seja o fenômeno que possa explicar o decaimento no início da curva.

A figura 47 mostra a variação do ângulo de contato da gota do fluido em função do tempo para todas as interfaces obtidas com os revestimentos. Os diferentes ângulos de contatos para cada superfície são resultado das modificações físico-químicas dos revestimentos.

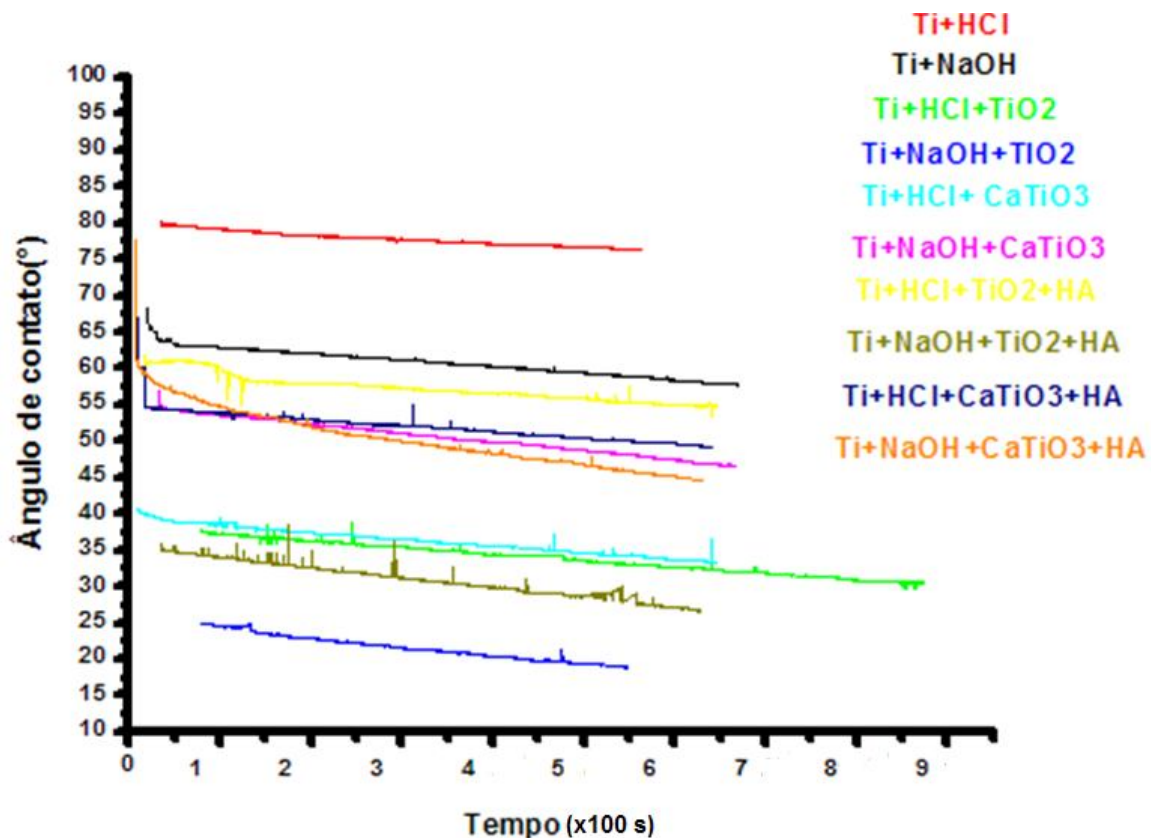


Figura 47 – Medidas das variações do ângulo de contato em função do tempo para o estudo de todas as interfaces desenvolvidas.

São duas observações que chamam a atenção ao comparar todos os experimentos de molhabilidade. A primeira delas refere-se ao conjunto de pontos que formam a curva de molhabilidade do fluido na superfície Ti+NaOH+CaTiO₃+HA e o segunda questão refere-se aos pontos iniciais de cada curva obtidos logo nos primeiros contatos da gota do fluido nas superfícies. Em conjunto, essas duas observações experimentais serviram de motivação para que, a partir de então, fossem avaliadas as interações do fluido com todas as interfaces obtidas pelas modificações superficiais. A figura 48 mostra a cinética de molhabilidade medida para a interface Ti+NaOH+CaTiO₃.

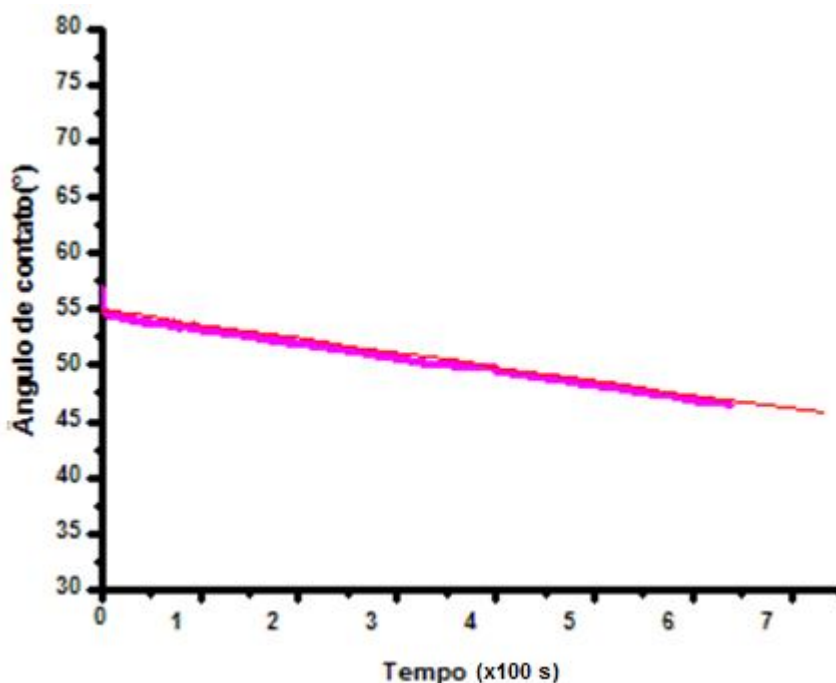


Figura 48 – Variação do ângulo de contato em função do tempo para a amostra com interface TiNaOHCaTiO_3

O fenômeno de molhabilidade em condições dinâmicas é um dos efeitos atribuídos às modificações nas superfícies onde o espalhamento espontâneo de gotas sobre superfícies está relacionado à variação da área de contato entre o líquido e o sólido e o ângulo de contato em função do tempo, após o rápido transiente que ocorre nos primeiros estágios seguidos ao contato. Uma visão geral sobre a fundamentação na aplicação do estudo de molhabilidade que foca no processo dinâmico como o proposto nesta etapa da tese, é dada tanto por Marmur quanto Mejia^{75,90}.

É relevante estabelecer uma relação dos resultados de molhabilidade com os dados das componentes de energia dispersiva e polar, avaliados como contribuição das forças intermoleculares assim como a natureza dos óxidos formados durante as etapas de revestimentos. O principal mecanismo para o crescimento da camada de óxido é a difusão do átomo metálico para a superfície do óxido, e a difusão do oxigênio iônico da superfície do óxido para a interface metal/óxido. A camada também pode crescer pela

participação dos átomos de hidrogênio (prótons), pela formação dos grupos (OH^-) e pela inclusão de íons minerais como o cálcio, o fósforo e o magnésio. Assim, tanto a heterogeneidade química do fluido quanto da superfície podem influenciar no fenômeno da molhabilidade.

Em conjunto com a avaliação da energia da superfície, a cinética de molhabilidade demonstra ser um parâmetro integral de avaliação de modificações realizadas em superfícies quando se tem uma idéia da natureza química das superfícies, em especial, para este propósito onde existe a heterogeneidade química.

As leis de proporcionalidade dadas pelas relações discutidas nos modelos teóricos sobre molhabilidade e energia superficial livre aparentam apresentar uma característica universal da dinâmica de espalhamento de líquidos onde o espalhamento de uma gota sobre uma superfície sólida parece ser independente da natureza da superfície, pelo menos em condições de molhabilidade total. No entanto, ao compararmos a relação entre energia superficial e molhabilidade do fluido com os resultados de rugosidade os resultados contradizem em partes, o que é proposto por alguns autores na literatura.

Fundamentado nessa hipótese, foi realizada uma avaliação da evolução da gota do fluido nas condições iniciais da interação. A cinética de molhabilidade foi avaliada em diferentes instantes nos intervalos de 0 a 1 segundo, de 0 a 10 segundos e de 0 a 100 segundos. A figura 49 mostra a variação do ângulo de contato em função do tempo de espalhamento do fluido na superfície do titânio apenas com a revelação da superfície e para a superfície com revestimento.

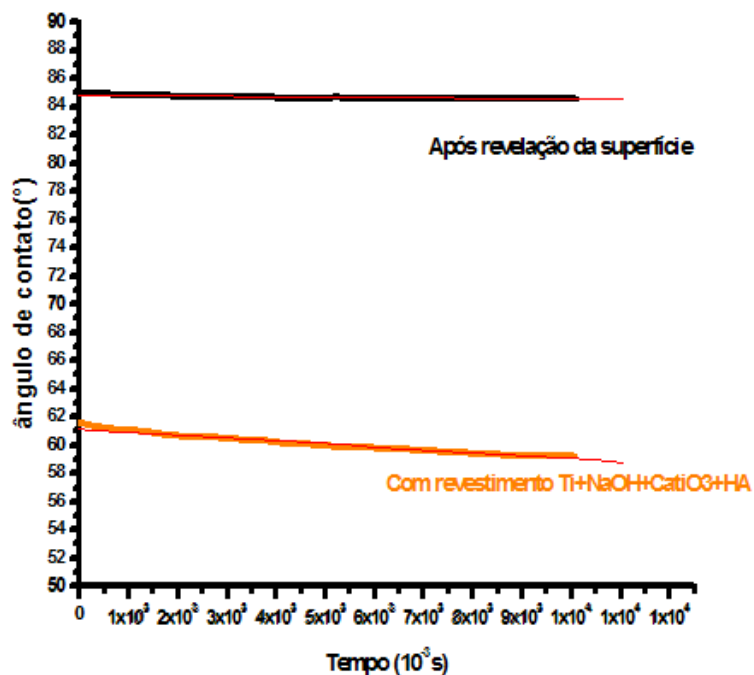


Figura 49 – Variação do ângulo de contato nos primeiros dez segundos de interação com diferentes superfícies.

Ao comparar as velocidades de espalhamento do fluido na superfície do titânio sem tratamento e na superfície do titânio com o revestimento é possível avaliar a diferença de molhabilidade entre as superfícies apenas com uma regressão linear. Convertidos em radianos por segundo, os dados mostram que nos primeiros 6 minutos de interação do fluido a diferença de velocidade de molhabilidade é 0,085 rad/s. Já nos primeiros 10 segundos de interação a diferença de velocidade passa a ser de 0,306 rad/s e no primeiro segundo a diferença é de 0,919 rad/s. Esse resultado indica a importância de se considerar os estágios iniciais de interação das interfaces, pois a partir das evidências apontadas aqui, a hipótese é que íons como o Ca e P, que compõem tanto o fluido quanto as interfaces, podem ter influenciado em uma maior interação por grupos $(OH)^-$ disponíveis na superfície, contribuindo, na velocidade no espalhamento do fluido. De maneira análoga, a natureza das partículas na superfície de um implante pode exercer um papel importante nos primeiros estágios do processo de regeneração tecidual uma vez que o primeiro contato é através do hematoma (plasma corporal).

A tabela 8 contempla todos os resultados fundamentados na busca pelas regularidades no estudo dos fenômenos das interfaces de acordo com três das quatro questões propostas na Tese. É possível observar que, para o revestimento final, a melhor ativação ocorreu com o tratamento intermediário alcalino.

Tabela 8 – Energia de superfície e variação do ângulo de contato das superfícies para cada interface criada

<i>Interfaces</i>	<i>Energia Superficial (mJ/m²)</i>	<i>Variação do ângulo de contato (x10⁻³ rad/s)</i>
Ti	33,42	0,061
Ti+ HCl	41,01	0,112
Ti+ NaOH	36,07	0,153
Ti+HCl+TiO ₂	60,21	0,153
Ti+NaOH+TiO ₂	60,30	0,221
Ti+HCl+TiO ₂ +HA	60,45	0,125
Ti+NaOH+TiO ₂ +HA	59,26	0,238
Ti+HCl+CaTiO ₃	68,96	0,170
Ti+NaOH+CaTiO ₃	77,41	0,212
Ti+HCl+CaTiO ₃ +HA	76,45	0,148
Ti+NaOH+CaTiO ₃ +HA	82,54	0,391

Em função dos resultados apresentados referentes à ativação de superfícies, o revestimento final Ti+NaOH+CaTiO₃+HÁ foi testado também nas ligas Ti6Al4V e Ti13Nb13Zr e os resultados de molhabilidade com o fluido corporal mostram o mesmo comportamento conforme pode ser observado na figura 50.

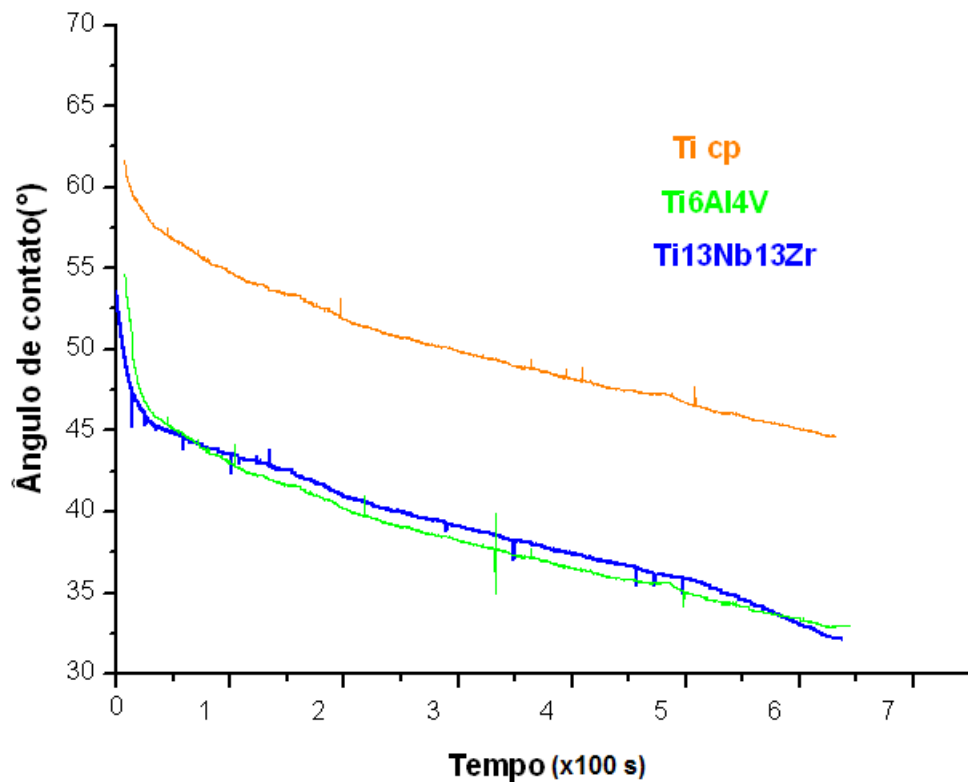


Figura 50 - Molhabilidade do Fluido Corporal Simulado no revestimento testado no titânio e suas ligas

A seguir foram realizados testes de viabilidade celular para algumas das interfaces criadas com o objetivo de relacionar com os dados de energia superficial e cinética de molhabilidade e verificar a potencialidade da técnica assim como avaliar quantitativamente a biocompatibilidade das superfícies. Na tabela 9 estão representados os valores de Densidade Óptica (D.O.) obtidos das culturas de células L929 em diferentes períodos, os valores em negrito representam a média e o desvio padrão dos respectivos resultados.

Tabela 9. Valores médios de Densidade Ótica correspondentes ao crescimento de células L929 em diferentes tempos de cultura.

24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
0,127 ±	0,172 ±	0,424 ±	0,441 ±	0,528 ±	0,514 ±
0,011	0,013	0,052	0,13	0,17	0,20

Os resultados mostram que houve aumento do crescimento das células em função do tempo de cultivo. Esse crescimento pode ser observado nos períodos de 24 a 72 h. No período de 72 h verificou-se, por análise microscópica, que a monocamada das células L929 atingiu a confluência. A partir de 96 h observou-se uma sobreposição das células em crescimento. Após a fixação e coloração, quando a placa foi lavada, a camada de células sobrepostas se desprendia da placa, alterando o valor da Densidade Ótica. Em vista desses resultados, optou-se por calcular a melhor concentração de células, necessária para se determinar o crescimento nesses diferentes períodos. Na Tabela 10 estão expressos os resultados desse experimento realizado nos períodos de 24, 48 e 72 h.

Tabela 10. Valores médios de Densidade Ótica correspondentes ao crescimento de diferentes volumes de células L929 e tempos de cultura.

	24 h			48 h			72 h		
Volume (µL)	30	50	100	30	50	100	30	50	100
				0,154	0,179	0,229	0,265	0,365	0,492
	0,068	0,105	0,144	±	±	±	±	±	±
	±	±	±	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,17
	0,01	0,02	0,01						

Considerando que os estudos de citotoxicidade com as amostra sobre as células L929 necessitam da adição das células sobre placas com 1 cm², optou-se por calcular o volume da gota de suspensão celular suficiente para o crescimento, exclusivamente sobre a placa. A placa foi desenhada com quadrados de 1cm² e gotas da suspensão celular nos volumes de 30, 50 e 100 µL foram adicionadas sobre os mesmos. A tabela 11 mostra os resultados da viabilidade das células L929 nas diferentes concentrações analisadas.

Tabela 11. Valores médios de Densidade Ótica correspondentes ao crescimento de diferentes volumes de células L929 em 72h de cultura.

30 µL	50 µL	100 µL
0,266 ± 0,03	0,369 ± 0,03	0,612 ± 0,13

Os resultados mostraram que o volume de 30 µL de células coradas por MTT foi semelhante aos obtidos com a coloração com cristal violeta e foi adequado para o ensaio. A seguir avaliou-se a viabilidade das células L929 em diferentes períodos de cultivo, variando de 24 h a 144 h, utilizando-se o volume padronizado de 30 µL por orifício da placa de cultura e coradas por MTT. (Tabela 12).

Tabela 12. Valores médios de Densidade Ótica correspondentes ao crescimento de células L929 em diferentes tempos de cultura.

24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
0,080 ± 0,01	0,168 ± 0,01	0,270 ± 0,01	0,361 ± 0,03	0,558 ± 0,02	0,603 ± 0,14

A partir desses resultados optou-se por empregar esse volume celular no estudo de citotoxicidade das células L929 frente ao titânio submetido a diferentes tratamentos. A figura 51 mostra a média dos resultados individuais da porcentagem de

crescimento das células L929 em 4 experimentos independentes cultivadas sobre placas de titânio submetidas a diferentes tratamentos, em comparação com as células controle, não cultivadas com titânio. Os resultados são expressos em média \pm SD da porcentagem de crescimento das células em relação a culturas controle não-cultivadas com titânio, em quatro experimentos independentes

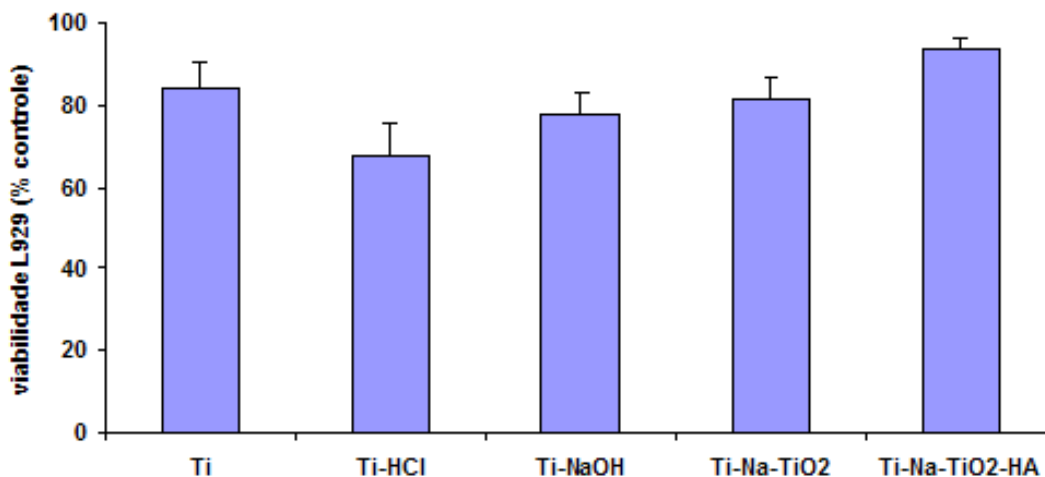


Figura 51 - Viabilidade das células L929 cultivadas na presença de placas de titânio submetidas a diferentes tratamentos..

Em conjunto os resultados mostram que o tratamento intermediário ácido apresenta efeito tóxico sobre as células L929 e que as interfaces obtidas com a amostra Ti+Na+TiO₂+HA indicaram a bioatividade da superfície. Além disso, os resultados de energia superficial e cinética de molhabilidade apontaram para a influência do tratamento alcalino no potencial para a viabilidade do desenvolvimento de células nas superfícies.

Estabelecendo uma relação dos testes *in vitro* com os dados de molhabilidade do fluido corporal simulado e da energia superficial livre, conforme figura 52, observa-se uma coerência em que os melhores resultados indicaram as interfaces que possuem o revestimento bioativo a base de hidroxiapatitas.

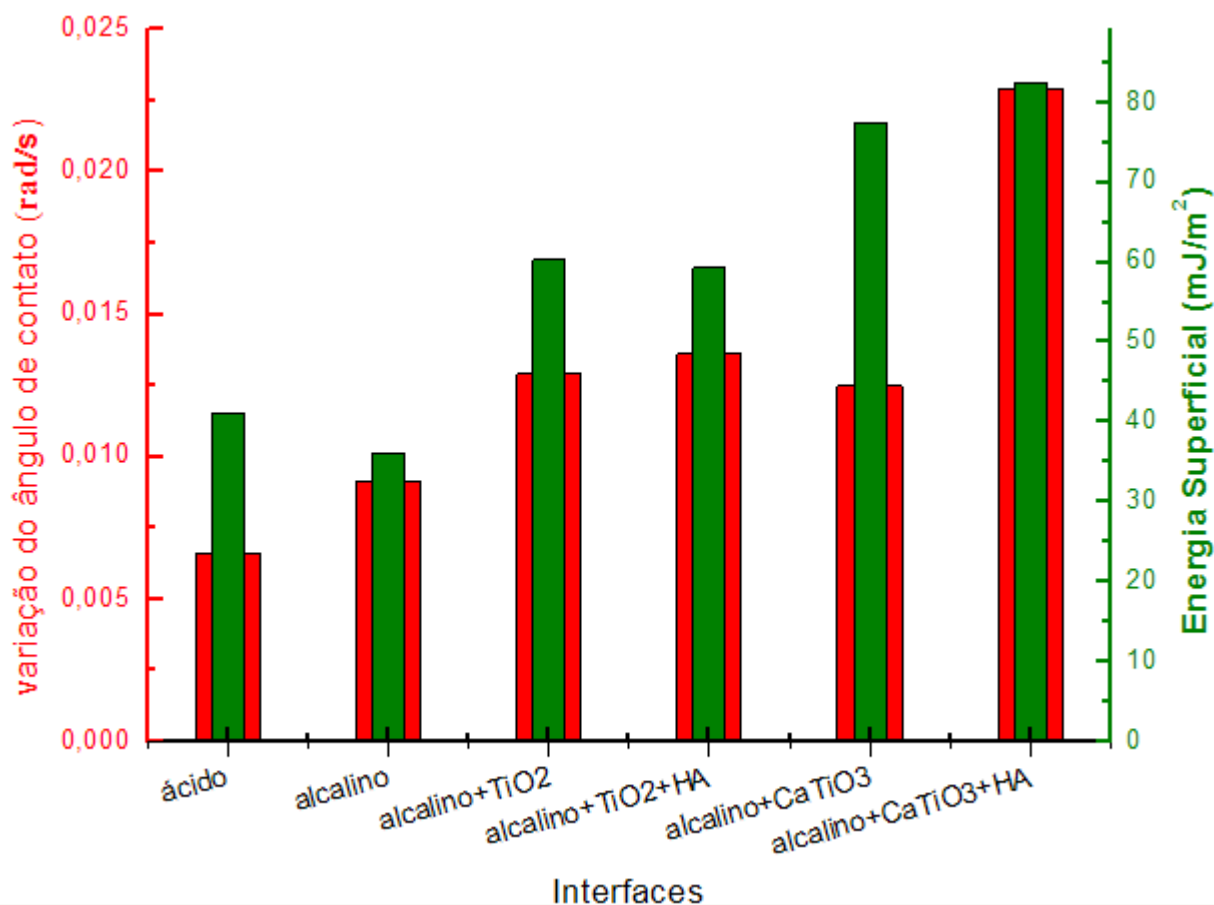


Figura 52 – Energia superficial e variação do ângulo de contato em função do tempo para diferentes interfaces.

Ao estabelecer as relações é importante destacar que os componentes do fosfato de cálcio podem variar na composição, porém, é importante que os íons cálcio, fosfato e magnésio sejam lentamente liberados para obter boa resposta biológica^{89,90}. A presença de íons cálcio e fosfato nas proximidades da área de um implante favorecem o processo de diferenciação celular através do processo de mineralização e remineralização, o que pode promover uma rápida formação óssea quando comparada às cerâmicas inertes e superfícies metálicas⁹¹. Essas espécies podem exercer uma relativa influência nas interfaces durante os estágios iniciais do processo de osseointegração.

A modificação da energia da superfície em função de sua natureza aumentou a molhabilidade para o fluido corporal simulado, que é constituído pelos mesmos íons que

constituem as interfaces criadas e os resultados de biocompatibilidade apontam para essa importante relação entre material e meio biológico.

Com as imagens das figuras 53, 54 e 55, é possível observar a adesão e a proliferação das células sobre as superfícies modificadas com os diferentes tratamentos. Para ocorrer a adesão, as células liberam uma matriz para o substrato por onde ela se adere à superfície dos materiais. Este é um dos fenômenos que ocorrem na interface entre um biomaterial e o corpo humano.

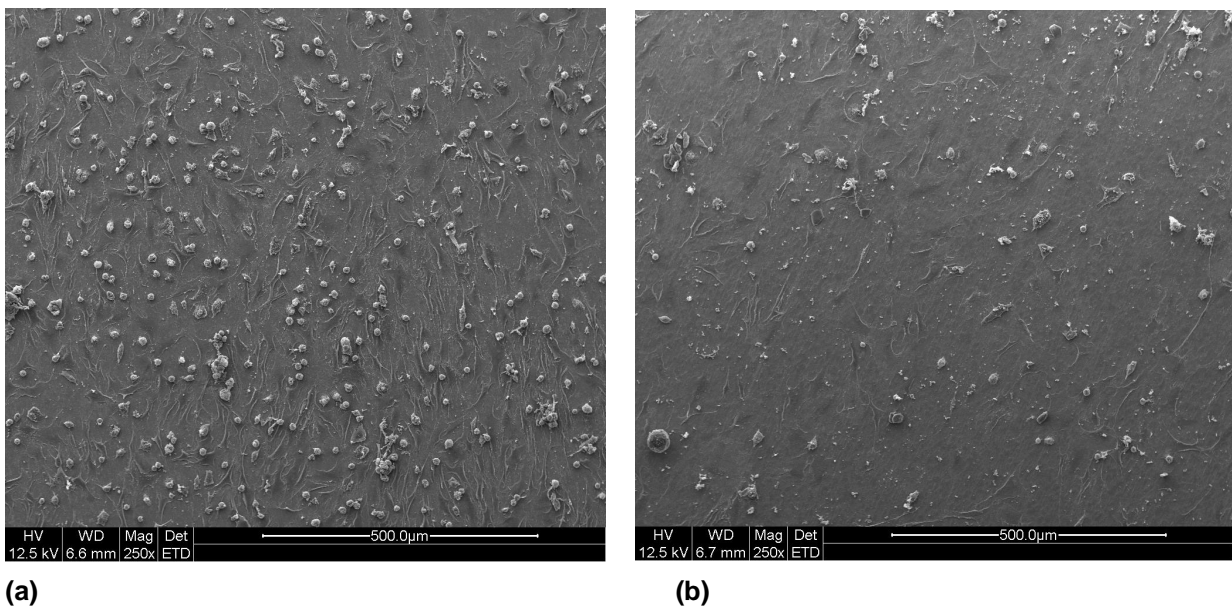


Figura 53 –Imagens obtidas por MEV com 250 x de aumento das interfaces (a) células e superfície Ti+HCl e (b) células e superfície Ti+NaOH

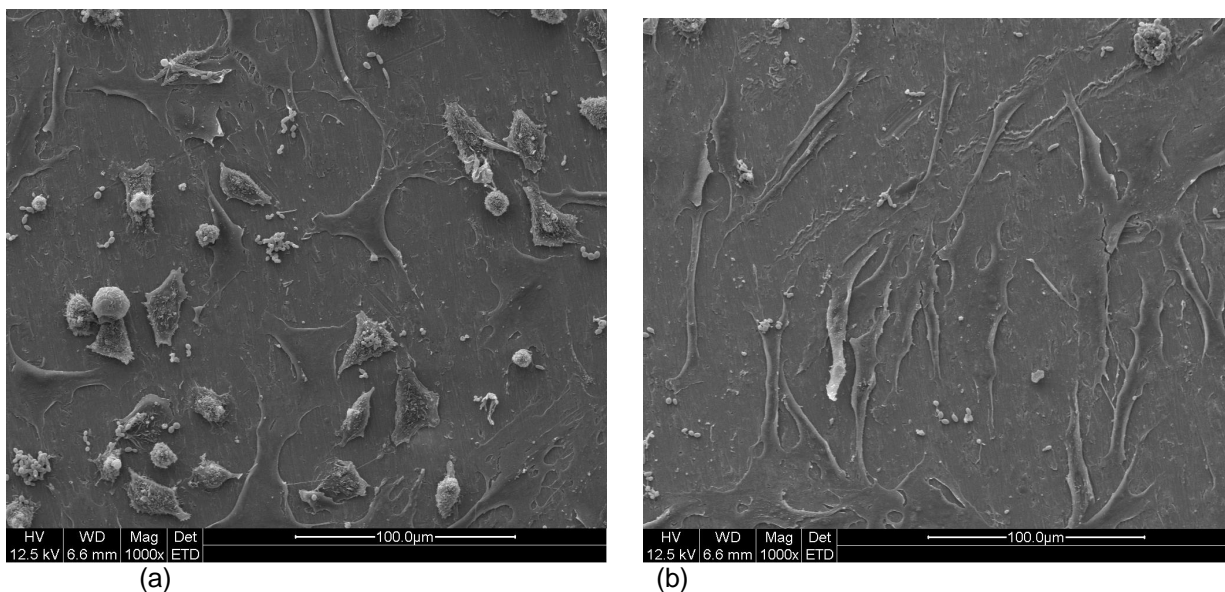


Figura 54 – Imagens obtidas por MEV com 1000 x de aumento das superfícies (a) células e superfície Ti+HCl e (b) células e superfície Ti+NaOH

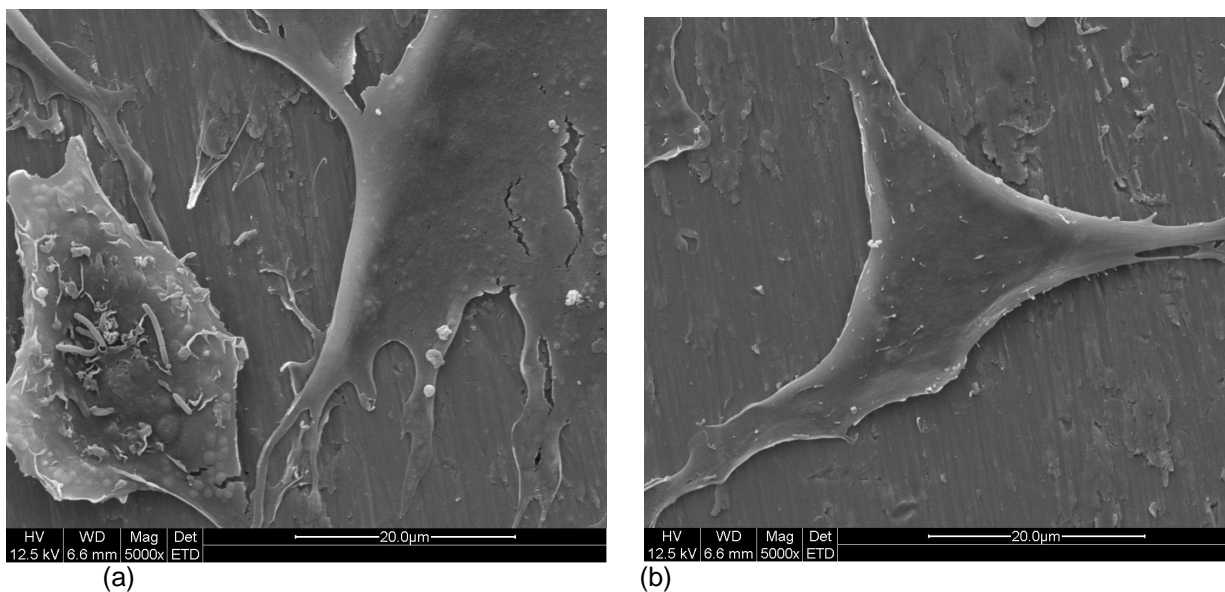


Figura 55 - Imagens obtidas por MEV com 5000 x de aumento das superfícies (a) células e superfície com tratamento ácido e (b) células e superfície com tratamento alcalino.

De acordo com as imagens, as células apresentaram uma aparência de célula mesenquimal que são semelhantes aos fibroblastos. Esses tipos de células são

importantes durante processos de cicatrização pois podem formar outros tipos de células como os osteoblastos, que é o interesse de aplicação. Essas imagens são compatíveis com os dados de citotoxicidade e viabilidade celular indicando a bioatividade das superfícies.

Uma vez apresentando evidências de bioatividade e visando a aplicação em materiais para implantes e implantes, a adesão dos revestimentos foi então avaliada. Os resultados experimentais da aderência dos revestimentos do Ti cp são resumidos nas tabelas 13

Tabela 13 – Resultado dos testes de adesão, medida em MPa, de todas as interfaces criadas para o Ti cp.

Amostras	Teste 1 (A.2011)	Teste 2 (A. 2011)	Teste 3 (A.Hobby)	Teste 4 (A.Hobby)	Média
Ti+ HCl	8,15	14,28	5,84	7,55	8,955
Ti+HCl+TiO ₂	7,06	7,91	9,59	6,45	7,75
Ti+HCl+TiO ₂ +HA	15,74	11,16	6,23	4,71	9,46
Ti+HCl+ CaTiO ₃	8,57	9,76	7,22	5,59	7,785
Ti+HCl+ CaTiO ₃ +HA	11,52*	6,67	16*	5,24	9,857
Ti + NaOH	8,77	7,17	21,73	5,87	10,88
Ti+ NaOH+TiO ₂	8,35	12,24	7,83	7,19	8,9
Ti+NaOH+ TiO ₂ +HA	11,96	12,49	9,04	8,06	10,38
Ti+ NaOH+CaTiO ₃	10,28	7,72	5,65	8,41	8,015
Ti+NaOH+CaTiO ₃ +HA	10,75	10,25	6,94	17,73	11,417

Os testes mostraram que os tratamentos propiciaram uma forte adesão dos revestimentos, pois, com exceção da interface Ti+HCl+CaTiO₃+HA, representado por * na tabela, todas as interfaces excederam a resistência das colas que ligavam a ponta de teste do equipamento ao revestimento no substrato. Esses resultados indicam que

as estruturas das interfaces dos revestimentos a partir de uma orientação cristalográfica preferencial, promoveram uma maior estabilidade. Pode-se observar também que a força de adesão é maior para amostras com camadas de óxidos intermediárias criadas a partir do tratamento alcalino. Interface esta que apresentou também melhor qualidade nos outros quesitos analisados. A tabela 14 mostra os resultados de adesão dos revestimentos aplicados na liga Ti6Al4V.

Tabela 14 - Adesão medida em MPa de todas as interfaces criadas para a liga Ti6Al4V

Amostras	Teste 1 (A.2011)	Teste 2 (A.2011)	Teste 3 (A.Hobby)	Teste 4 (A.Hobby)	Média
Ti6Al4Va+ HCl	20,9	15,66	10,25	5,48	13,07
Ti6Al4Va+HCl+TiO2	7,39	5,79	7,74	11,91	8,21
Ti6Al4Va+HCl+TiO2+HA	4,44*	6,23*	18,58*	10,14	9,85
Ti6Al4Va+HCl+ CaTiO3	3,25	5,12	5,7	5,57	4,91
Ti6Al4Va+HCl+ CaTiO3+HA	4,38**	6,39	6,83*	3,03*	5,16
Ti6Al4Va + NaOH	7,77	-	8,41	7,11	7,76
Ti6Al4Va + NaOH+TiO2	8,3	4,05	4,3	9,98	6,66
Ti6Al4Va+NaOH+ TiO2+HA	4,96	6,12	3,75	5,48	5,08
Ti6Al4Va+ NaOH+CaTiO3	4,41	2,89	11,16*	6,01	6,11
Ti+NaOH+CaTiO3+HA	16,43	16,74	14,01	10,7	14,47

V - CONCLUSÕES

O estudo dos fenômenos interfaciais a partir de modificações físico-químicas nas superfícies metálicas permitiu a obtenção de informações inerentes às quatro questões fundamentais propostas neste trabalho. As discussões apresentadas referem-se à busca por melhor compreensão da relação entre matéria, energia, área superficial e processos dinâmicos ocorridos na interface entre um biomaterial metálico (metal e revestimentos) e o meio biológico.

A variação das dimensões superficiais de cada interface foi caracterizada por técnicas de microscopias e investigada qualitativamente e quantitativamente. Os resultados mostram que os níveis de rugosidade podem não ser os únicos parâmetros responsáveis pela variação das componentes de energia da superfície e de fenômenos relacionados à molhabilidade e capilaridade, considerando como exemplos nestes estudos, a heterogeneidade da superfície nos revestimentos com titanatos de sódio e cálcio e com Hidroxiapatita. De maneira análoga, a rugosidade pode também não ser o único fator a influenciar nos processos de adsorção de macromoléculas durante o processo de osseointegração uma vez que depende de como se dão as interações nos estágios iniciais do processo.

A energia superficial livre das interfaces, caracterizada pela técnica de tensiometria, evidenciou a ativação das superfícies onde se destaca a variação das componentes de energia superficial livre, resultado de diferentes interações. A partir disso, foi evidenciado o fato de que é importante considerar a natureza das entidades presentes nas superfícies e suas implicações nos estágios iniciais do processo de osseointegração e não somente a qualidade da área superficial (rugosidade), como considera alguns autores.

Os processos dinâmicos foram investigados pela variação temporal do ângulo de contato do fluido corporal simulado com as superfícies das amostras

A natureza química das superfícies foi alterada por uma metodologia experimental que resultou em um revestimento final com alta adesão, alta estabilidade estrutural e bioatividade, que foi evidenciada pelos resultados das análises de biocompatibilidade realizados seguindo dois protocolos distintos.

Utilizando amostras de Ti cp, liga Ti6Al4V e Ti13Nb13Zr constatou-se que o tratamento alcalino é o mais eficiente tratamento intermediário devido ao tipo de óxido formado com estruturas cristalográficas capazes de permitir uma melhor adesão do revestimento bioativo.

Com as modificações físico-químicas nas superfícies metálicas, as diferentes interações de origem dispersivas e polares contribuíram para o aumento energia superficial livre. Estas interações foram atribuídas a fenômenos de difusão do sódio na primeira interface óxida e à difusão do cálcio nas interfaces óxidas seguintes, provavelmente formando titanatos e alterando a disponibilidade dos grupos (OH)⁻ nas superfícies através das trocas iônicas.

Os testes de biocompatibilidade mostraram também uma importante relação entre a molhabilidade do fluido corporal simulado e a viabilidade celular nas superfícies modificadas. Constatou-se que as velocidades de espalhamento do fluido corporal na superfície das amostras foram maiores nas amostras com maiores afinidades para adesão e proliferação celular, como no caso do revestimento a base de Hidroxiapatita (HA).

No que se refere à tecnologia desenvolvida para melhorar a qualidade de revestimentos, foi possível mostrar que os tratamentos intermediários com titânia são relevantes para construção das interfaces a fim de se obter uma superfície bioativa de alta resistência e estabilidade. Isto resolve, em parte, um dos problemas enfrentados pela indústria na produção de filmes bioativos. Apresentou-se ao final, o potencial dos revestimentos para aplicação em próteses e implantes na ortopedia e ortodontia

conforme verificado, em especial, com os resultados da superfície metálica construída a partir da interface $Ti+NaOH+CaTiO_3+HA$.

Diante da busca para as respostas do desafio científico fundamentado nas quatro questões propostas neste trabalho e na tentativa de quantificar os fenômenos e reações ocorridas entre um implante e os tecidos durante os primeiros estágios de osseointegração, verificou-se que o estudo da velocidade de espalhamento do fluido corporal simulado, acompanhado de uma análise das componentes de energia superficial livre, é eficaz como teste que antecede experimentos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- [1] SILVER, F. DOILLON C. (1989) Biocompatibility, Interactions and Implantable materials 1 VCR New York.
- [2] Disponível em http://www2.uol.com.br/sciam/noticias/a_primeira_protese_.html
Acesso em 23 dez 2009
- [3] WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester. Progress in biomedical engineering. Elsevier, Amsterdam. 1987.
- [4] KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. Química Nova, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.
- [5] SOARES, G. A. Fórum de Biotecnologia e Biomateriais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- [6] STEVENS, M. M. Biomaterials for Tissue Engineering. Materials Today. v. 11, n.5, 2008
- [7] LIDE, D.R. Handbook of Chemistry and Physics. 80ª Ed. CRC Press Florida (1999)
- [8] WANG, K. The use of titanium for medical applications in the USA. *Materials Science and Engineering*, v. A213, p.134-137, 1996.
- [9] COLLINGS, E.W. *The physical metallurgy of titanium alloys*. Metals Park, OH: American Society For Metals, 1984. (ASM Series in Metal Processing Gegel, H. L. , editor)
- [10] MISCH, C. Implantes Dentários Contemporâneos. 1a Edição, Cap. 20-23, 2000
- [[11] SCHNEIDER, S. G. Tese de doutorado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear. IPEN 2001.
- [12] LONG, H. J. R. M. Review titanium alloys in total joint replacement - a Materials science perspective. *Biomaterials*, v. 19, p. 1621 - 1639, 1998.
- [13] BRANEMARK, P. I.; ZARB, G. A.; ALBREKTSSON, T. Prótesis tejido – integradas: la oseointegración en la odontología clínica. Berlin: Quintessenz Verlags-Gmbh, 1987. 350 p.

-
- [14] GIAVARESI, G.; FINI, M.; CIGADA, A.; CHIESA, R.; RONDELLI, G.; RIMONDINI, L.; TORRICELLI, P.; ALDINI, N.N.; GIARDINO, R. "Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone." *Biomaterials* v. 24, p. 1583 – 1594 (2003); 29.
- [15] LIN, C. -W., JU, C. -P., LIN, J. -H. C. A comparison of the fatigue behavior of cast Ti-7.5Mo with c.p. titanium, Ti-6Al-4V and Ti-13Nb-13Zr alloys. *Biomaterials*, v. 26, p. 2899-2907, 2005.
- [16].P. LANCHETTA, J. GUEZENNEC, *Colloids Surfaces, B. Biointerfaces* 301 – 307 (2001);
- [17] 3. BROWNER *et al* "Skeletal Trauma: basic science, management and reconstruction". 3. ed. v.1. New York: Saunders, p. 195 – 249. (2003);
- [18].BOYAN, B.D., HUMMERT, T.W., DEAN D.D., SCHWARTZET, Z. "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response". *Biomaterials* 137 – 146 (1996);
- [19] ANA PAULA VAZ. Dissertação de mestrado em Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Paraná. 2007
- [20].CASTNER, D.G., RATNER, B.D., "Biomedical surface science: foundations to frontiers", *Surface Science*, v.500, pp. 28-60. (2002);
- [21] BOTHA, S.T.; "Surface Properties and Bio-Acceptability of TiO₃ Surfaces." *Materials Science Engineering* (1998);
- [22] BENTO, C.A.S.; "Estudo da Interface Ti 6Al 4V / TiO₂ por Microscopia Eletrônica de Varredura" Dissertação de Mestrado USP- São Carlos – SP (2000);
- [23] HENCH, L. L. *Biomaterials: a forecast for the future*. *Biomaterials*, v. 19, n. 16, p. 1419-1423, 1998.
- [24] MAO, C.; LI, H.; CUI, F.; MA, C.; FENG, Q. Oriented growth of phosphates on polycrystalline titanium in a process mimicking biomineralization. *Journal of Crystal Growth*, v. 206, n. 4, p. 308-321, 1999.
- [25] METIKOS-HUKOVIC, M.; TKALCEC, E.; KWOKAL, A.; PILJAC, J. An in vitro study of Ti and Ti-alloys coated with sol-gel derived hydroxyapatite. *Surface & Coatings Technology*, v. 165, n. 1-3, p. 40-50, 2003.
- [26] BROWNE, M.; GREGSO, P. J. Effect of mechanical surface pretreatment on metal ion release. *Biomaterials*, v. 21, n. 4, p. 385-392, 2000.

-
- [27] CHAI, C. S.; BEN-NISSAN, B. Bioactive nanocrystalline sol-gel hydroxyapatite coatings. *Journal of Materials Science: materials in medicine*, v. 10, n. 8, p. 465-499, 1999.
- [28] VALLET-REGÍ, M.; CALBET-GONZÁLEZ, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in solid state chemistry*, v. 32, n. 1-2, p. 1-31, 2004.
- [29] BERMÚDEZ, J. P. G.; BOZZO, J. G. O. Preparación del recubrimiento de HAp sobre un substrato de titanio poroso. 2002. 9p. Disponível em: <http://iq.coord.usb.ve/pdf/miniproyecto/abr_jul2002/gomez_orellana.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2007.
- [30] BLOCK, M. S.; FINGER, I. M.; FONTENOT, M. G. Loaded hydroxyapatite coated and grit blasted titanium implants in dogs. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, Carol Stream, v. 4, p. 219-225, 1989.
- [31] GAN, L.; PILLIAR, R. Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part I: Synthesis and characterization. *Biomaterials*, v. 25, n. 22, p. 5303-5312, 2004.
- [32] RIZZO, A.; MIRENGHI, L.; QUIRINI, A.; SCAGLIONE, S. Synthesis of stoichiometric titania films by oxygen ion assistance of growing titanium. *Surface & Coatings Technology*, v. 91, n. 3, p. 153-157, 1997.
- [33] ZHU, Y. C.; DING, C. X. Plasma spraying of porous nanostructured TiO₂ film. *Nanostructured Materials*, v. 11, n. 3, p. 319-323, 1999.
- [34] BENDAVID, A.; MARTIN, P. J.; TAKIKAWA, H. Deposition and modification of titanium dioxide thin films by filtered arc deposition. *Thin Solid Films*, v. 360, n. 1-2, p. 241-240, 2000.
- [35] CHEN, C. H.; KELDER, E. M.; SCHOONMAN, J. Electrostatic sol-spray deposition (ESSD) and characterization of nanostructured TiO₂ thin films. *Thin Solid Films*, v. 342, n. 1-2, p. 35-41, 1999.
- [36] CASALETTO, M. P.; INGO, G. M.; KACIULIS, S.; MATTOGNO, G.; PANDOLFI, L.; SCAVIA, G. Surface studies of in vitro biocompatibility of titanium oxide coatings. *Applied Surface Science*, v. 172, n. 1-2, p. 167-177, 2001.

-
- [37] DEMRI, B.; HAGE-ALI, M.; MORITZ, M.; MUSTER, D. X-ray photoemission study of the calcium/titanium dioxide interface. *Applied Surface Science*, v. 108, n. 2, p. 245-249, 1997.
- [38] OHRING M. *Materials Science of thin film. Deposition and Structure*. 2nd Ed. 1992
- [39] P. A. STEINMAN AND H. E. HINTERMANN, *Coatings tribology: properties, mechanisms and techniques*. *J. Vac. Sci. Technol. A7*, 2267 (1989).
- [40] MISCH, C. *Implantes Dentários Contemporâneos*. 1a Edição, Cap. 20-23, 2000
- [41] LIN, C. -W., JU, C. -P., LIN, J. -H. C. A comparison of the fatigue behavior of cast Ti-7.5Mo with c.p. titanium, Ti-6Al-4V and Ti-13Nb-13Zr alloys. *Biomaterials*, v. 26, p. 2899-2907, 2005
- [42] AGINS, H. J.; ALOCK, N. W.; BANSAL, M.; SALVATI, E. A.; WILSON, P. D.; PELLICI, J.; BULLONUGH, P. G. Metallic wear in failed titanium alloy total hip replacements – a histological and quantitative analysis. *Journal of Bone and Joint Surgery A*, v. 70, n. 3, p. 347-356, 1988.
- [43] SONG, Y.; XU, D. S.; YANG, R.; LI, D.; WU, W. T.; GUO, Z. X. Theoretical study of the effects of alloying elements on the strength and modulus of β -type bio-titanium alloys. *Materials Science and Engineering A*, v. 260, p. 269-274, 1999.
- [44] GEETHA, M.; SINGH, A. K.; MURALEEDHARAN, K.; GOGIA, A. K.; ASOKAMANI, R. Effect of thermomechanical processing on microstructure of a Ti-13Nb-13Zr alloy. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 329, p. 264-271, 2001.
- [45] MATSUNO, H.; YOKOYAMA, A.; WATARI, F.; UO, M.; KAWASAKI, T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants: titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials*, v. 22, n. 11, p. 1253-1262, 2001.
- [46] NIEMEYER, T. C.; GRANDINI, C. R.; FLORÊNCIO, O.; SCHNEIDER, S. G. Atrito interno em baixa temperatura para amostras da liga Ti-13Nb-13Zr usadas como biomaterial. *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo*, v. 25, n. 2, 89-91, 2006.
- [47] AOKI, H. *Science and medical applications of hydroxyapatite*. Tokyo: Takayama Press System Center, 1991. 214 p.
- [48] CASALETTO, M. P.; INGO, G. M.; KACIULIS, S.; MATTOGNO, G.; PANDOLFI, L.; SCAVIA, G. Surface studies of in vitro biocompatibility of titanium oxide coatings. *Applied Surface Science*, v. 172, n. 1-2, p. 167-177, 2001.

-
- [49] LI, C.; ZHENG, Z.; ZHANG, F.; LIU, X. TiO_{2-x} films prepared by ion assisted deposition. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, v. 169, n. 1-4, p. 21-25, 2000.
- [50] WANG, X.; ZHANG, F.; ZHENG, Z.; CHEN, L.; WANG, H.; LI, C.; LUI, X. Chemical composition and structure of titanium oxide films deposited on LTI-carbon by IBED. Thin Solid Films, v. 365, n. 1, p. 94-98, 2000.
- [51] ZHANG, F.; JIN, S.; MAO, Y.; ZHENG, Z.; CHEN, Y.; LIU, X. Surface characterization of titanium dioxide synthesized by ion beam enhanced deposition. Thin Solid Films, v. 310, n. 1-2, p. 29-33, 1997.
- [52] BENDAVID, A.; MARTIN, P. J.; TAKIKAWA, H. Deposition and modification of titanium dioxide thin films by filtered arc deposition. Thin Solid Films, v. 360, n. 1-2, p. 241-240, 2000.
- [53] LEE, C.; CHOI, H.; LEE, C.; KIM, H. Photocatalytic properties of nano-structured TiO₂ plasma sprayed coating. Surface & Coatings Technology, v. 173, n. 2-3, p. 192-200, 2003.
- [54] STORZ, O.; GAUSTHUBER, H.; WOYDT, M. Tribological properties of thermal-sprayed Magnéli-type coatings with different stoichiometries (Ti_nO_{2n-1}). Surface & Coating Technology, v. 140, n. 2, p. 76-81, 2001
- [55] HWANG, K.; LIM, Y. Chemical and structural changes of hydroxyapatite films by using a sol-gel method. Surface & Coatings Technology, v. 115, n. 2-3, p. 172-175, 1999.
- [56] HWANG, K.; SONG, J.; KANG, B.; PARK, Y. Sol-gel derived hydroxyapatite films by using a sol-gel method. Surface & Coatings Technology, v. 123, n. 2-3, p. 252-255, 2000.
- [57] MAVIS, B.; TAS, C. Dip coating of calcium hydroxyapatite on Ti-6Al-4V substrates. Journal of the American Ceramic Society, v. 83, n. 4, p. 989-991, 2000.
- [58] ATTIA, S. M.; WANG, J.; WU, G.; SHEN, J.; MA, J. Review on sol-gel derived coatings: process, techniques and optical applications. Journal Materials Science Technology, v. 18, n. 3, p. 211-218, 2002.

- [59] BALAMURUGAN, A.; KANNAN, S.; RAJESWARI, S. Bioactive sol-gel hydroxyapatite surface for biomedical applications – in vitro study. Trends Biomaterials Artificial Organs, v. 16, n. 1, p. 18-20, 2002.
- [60] BRINKER, J. C.; SCHERER, G. W. Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. Boston: Academic Press, 1990. 881 p.
- [61] LIU, D. M.; YANG, Q.; TROCZYNSKI, T. Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates. Biomaterials, v. 23, n. 3, p. 691-698, 2002.
- [62] LIU, D. M.; YANG, Q.; TROCZYNSKI, T.; TSENG, W. Structural evolution of sol-gel derived hydroxyapatite. Biomaterials, v. 23, n. 7, p. 1679-1687, 2002a.
- [63] FLORENTINO A.O., SANTOS M. L., SAEKI, M. J, APARECIDA A. H., LIA FOOK M. V., GUASTALDI A. C. Síntese de Hidroxiapatita pelo método sol-gel usando como precursores: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. Eclética Química, vol. 30 p. 29-35. 2005.
- [64] IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, Padrões e Apresentação dos Resultados em Análise Térmica, 1997, Apostila Didática, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- [65] NASCIMENTO, R.M.; “Mobilidade De Oxigênio Intersticial em $\text{SmBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-\delta}$ medida através de Espectroscopia Mecânica” Dissertação de Mestrado UNESP- Bauru-SP (2006);
- [66] GOLDSTEIN, J.I.; NEWBURY, D.E.; ECHLIN, P.; JOY, D.C.; Jr. ROMIG, A.D.; LYMAN, C.E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Edition Second, Plenum Press, New York and London, 1992
- [67] KESTENBACH, H-J; BOTTA FILHO, W.J. Microscopia Eletrônica: Transmissão e Varredura, Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais, Brasil, 1994.
- [68] MEYER, E., H. HEINZELMANN, P. GRUTTER, T. JUNG, H.-R. HIDBER, H. RUDIN, AND H.-J. GUNTHERODT. 1989. Atomic force microscopy for the study of tribology and adhesion. Thin Solid Films. 181:527-544.
- [69] WEISENHORN, A. L., P. K. HANSMA, T. R. ALBRECHT, AND C. F. QUATE. 1989. Forces in atomic force microscopy in air and water. Appl. Phys. Lett. 54:2651-2653.
- [70] T. RABOCKAI em *Físico-Química de Superfícies*, Departamento de Assuntos Científicos da Secretaria-Geral da Organização dos Estados Americanos, cap. 3, 1979X
- [71] Disponível em

<http://www.sorocaba.unesp.br/gpm/angulo%20cont%20energia%20superf.htm>. Acesso em 15/02/2010

[72] F. V. Motta, R. M. Balestra, S. Ribeiro, S. P. Taguchi, "Wetting behaviour of SiC ceramics. Part I E₂O₃/Al₂O₃ additive system", *Mater. Lett.* **58** (2004) 2805-2809.

[73] P.J. SELL, A. W. NEUMANN, *Angew. Chem.* **78**(6), 321 (1966).

[74] F. M. FOWKES, *Ind. Eng. Chem.* **56**, 40 (1964).

[75] D. K. OWENS, R. C. WENDT, *J. Appl. Polym. Sci.* **13**, 1741 (1969).

[76] D. H. KAELBLE, *J. Adhes.* **2**, 50 (1970).

[77] KOKUBO, T., Bioactive glass-ceramics: properties and applications, *Biomaterials*, v. 12, pp. 155-163 (1991);

[78] A. MARMUR. Wetting on real surfaces. *Journal of Imaging Science and Technology*, 44(5):406_409, 2000.

[79] J. LYKLEMA. *Fundamentals of Interface and Colloid Science: Liquid-Fluid Interfaces*, volume III. 2000.

[80] ISO 10993 – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO-TC194-WG1. *Systematic Approach to Biological Evaluation International Standard*.1990.

[81] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993.

Biological evaluation of medical devices. Part 1: Guidance on selection of tests. 1993.

[82] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10 993-5.

Biological evaluation of medical devices. Part.5: Tests for Citotoxicity: in vitro methods. 1993.

[83] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-6.

Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation. 1993.

[84]. WANG, X.J.; LI, Y.C.; HODGSON, P.D.; WEN, C.E. *Materials and Fibre Innovation*, VIC 3217, Austrlia. 2008.

[85] J. N. ISRAELACHVILI. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press Inc., San Diego, CA, second edition, 1992

[86] LAMPIN, M.; WAROCQUIER-CLEROUT, R.; LEGRIS, C.; DEGRANGE, M.; SIGOT-LUIZARD, M.F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion and cell migration. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.36, n.1, p.99-108, 1997.

[87] P. G. DE GENNES. Wetting: Statics and dynamics. *Review of Modern Physics*, 57(3):827_863, 1985.

[88] W. HARDY. The spreading of fluids on glass. *Philosophical Magazine*, 38:49, 1919.

[89] X.J. WANG, Y.C. LI, J.G. LIN, P.D. HODGSON, AND C.E. WENA. Apatite-inducing ability of titanium oxide layer on titanium surface: The effect of surface energy. *J. Mater. Res.*, Vol. 23, No. 6, Jun 2008.

[90] R. E. JOHNSON and R. H. DETTRE. *Wettability - Wetting of low-energy surfaces*, chapter 1, pages 1_73. Marcel Dekker, 1993.

[91] MEJÍA, P. A. Tratamientos superficiales y recubrimientos. In: *Memorias "Taller de trabajo sobre recubrimientos anticorrosivos para aplicaciones odontológicas y traumatológicas"*. Cuaderno: Cerámicos & Vítreos, n. 8, 1999.

APÊNDICE 1 : Continuidade, possibilidades e perspectivas

Como continuidade desta obra, destaca-se um estudo a partir da criação de novas interfaces variando a natureza química da superfície através da obtenção de camadas óxidas de titanato de magnésio, pois este elemento também pode estar associado aos processos de osseointegração.

É importante que os revestimentos finais obtidos pelas modificações nas superfícies com as camadas intermediárias de óxidos, formem uma barreira anti-corrosiva para evitar problemas de lixiviação de íons, em especial quando aplicado em ligas de titânio conforme destacado no capítulo 1. Assim, um estudo dos mecanismos de transporte de massa entre as interfaces para investigar a dinâmica das partículas químicas envolvidas nas interações, seja interessante. Para tanto, a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica parece ser a mais adequada devido a possibilidade de se obter respostas sobre os processos corrosivos e informações sobre a dupla camada elétrica formada nas interações.

Por apresentar potencial tecnológico, os revestimentos de alta adesão necessitam ser testados em laboratório credenciados pela ANVISA para o complemento dos protocolos relacionados aos ensaios de biocompatibilidade conforme as normas ISO 10993.

A técnica desenvolvida para a simulação dos estágios iniciais de osseointegração pode ser aperfeiçoada adaptando um tensiômetro de medidas dinâmicas a uma câmara com atmosfera controladamente próxima das condições reais, em termos de temperatura e pressão, assim como na calibração de uma câmera para captar imagens a uma taxa menor que 0,1 segundo.

APÊNDICE 2 – Informações Complementares

De acordo com o documento de área da CAPES discutido na segunda reunião técnica realizado pelo POSMAT em 2009, um importante quesito referente a inserção social nas dissertações e teses será avaliada no contexto do impacto regional/nacional do programa, assim como as atividades de solidariedade com outras instituições e visibilidade no contexto nacional. Então, uma extensão universitária resultante de uma tese de doutorado na área, aprovada e altamente avaliada pela reitoria da universidade traz contribuições significativas para o programa.

Se, de um lado tem-se a carência de profissionais com perfil empreendedor e com visão transdisciplinar na universidade, do outro se tem a abertura do governo, em termos de políticas públicas, estimulando a parceria de pesquisadores e empresários. Soma-se a estes fatores a necessidade em se aplicar a interdisciplinaridade que envolve a ciências da natureza e suas tecnologias no ensino em todos os níveis, justificando assim, a necessidade de se buscar a aproximação entre universidade e sociedade. O modelo de avaliação dos potenciais de valores gerados, aplicados nos trabalhos científicos em biomateriais foram apresentados no Encontro da SBPMAT em 2008 e mostrou ser uma ferramenta que pode ser usada em pesquisas científicas na forma de teses e projetos.

Em função das diversas variáveis envolvidas neste trabalho sob a perspectiva adotada e após avaliação dos potenciais de valores gerados, destaca-se a maneira como todos os resultados se interligaram como fundamental e mais importante do que os resultados individuais e a soma dos mesmos.



unesp

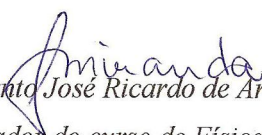
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu




DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins que o prof. Me Rodney Marcelo do Nascimento irá coordenar o projeto de extensão CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE BIOMATERIAIS: AÇÕES MULTIDISCIPLINARES E PERSPECTIVAS TRANSDISCIPLINARES PARA GERAÇÃO DE VALORES durante o ano de 2009 no Instituto de Biociências da UNESP do Campus de Botucatu como resultado da sua tese de doutorado no programa de pós graduação em ciências e tecnologia de materiais da POSMAT da UNESP.

Depto de Física e Biofísica do IBB, dois de março de 2009


Professor Adjunto José Ricardo de Arruda Miranda
Coordenador do curso de Física Médica.
Instituto de Biociências – UNESP - Botucatu

Instituto de Biociências – Departamento de Física e Biofísica
Distrito de Rubião Junior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel/fax 14 3811 6254/6356 biofisica@ibb.unesp.br





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Decl. 248/2009-VD/IBB
MDC/mlnrr

DECLARAÇÃO

DECLARO para os devidos fins que o **Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda e Rodney Marcelo do Nascimento** foram Coordenadores do Projeto de Extensão Universitária "Ciência e Tecnologia de Biomateriais. Geração de potenciais de valores e oportunidades a partir de parcerias inter-institucionais" (Processo nº 1420/2008-IBB), durante o ano de 2009, com aprovação da Pró-Reitoria de Extensão Universitária, tendo como bolsistas ERIC FRANCISCO SCOLASTICI e TAMARA HARAMETA, no período de 01 de março a 31 de dezembro de 2009, junto ao Departamento de Física e Biofísica deste Instituto.

Por ser verdade, dato e firmo a presente.

Vice-Diretoria do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu, em dezembro de 2009.



Prof. Dr. Maria Dalva Cesario

Vice-Diretora

Instituto de Biociências – Gabinete da Vice-Diretoria
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6009 Fax 14 3815 2838 vice-diretor@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Decl. 071/2010-VD/IBB
MDC/mlnrr

DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, que o **Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda e Rodney Marcelo do Nascimento** coordenaram o Projeto de Extensão Universitária "Ciência e tecnologia de biomateriais. Geração de potenciais de valores e oportunidades a partir de parcerias interinstitucionais" (Processo nº 1420/2008-IBB), desenvolvido no ano de 2010, com aprovação da Pró-Reitoria de Extensão Universitária.

Por ser verdade, dato e firmo a presente.

Vice-Diretoria do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu,
dezembro de 2010.



Prof. Dra. Maria Dalva Cesario

Vice-Diretora