



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**MARCELO GABRIEL DE OLIVEIRA**

**TRATAMENTO QUÍMICO E TÉRMICO EM Ti-CP VISANDO A  
FORMAÇÃO DE UMA SUPERFÍCIE BIOATIVA PARA  
OTIMIZAÇÃO DA OSSEOINTEGRAÇÃO**

2019

**MARCELO GABRIEL DE OLIVEIRA**

**TRATAMENTO QUÍMICO E TÉRMICO EM Ti-CP VISANDO A  
FORMAÇÃO DE UMA SUPERFÍCIE BIOATIVA PARA OTIMIZAÇÃO  
DA OSSEOINTEGRAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Programa em CIÊNCIA E TECNOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA.

Área: Inovação tecnológica multidisciplinar com ênfase em odontologia. Linha de pesquisa: Inovação tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Gonçalves dos Reis  
Coorientadora: Dra. Polyana Alves Radi Gonçalves

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Oliveira, Marcelo Gabriel de

Tratamento químico e térmico em Ti-cp visando a formação de uma superfície bioativa para otimização da osseointegração / Marcelo Gabriel de Oliveira. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.  
46 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.

Orientador: Adriano Gonçalves dos Reis

Coorientadora: Polyana Alves Radi Gonçalves

1. Titânio. 2. Tratamento alcalino e térmico. 3. Titanato de sódio. I. Reis, Adriano Gonçalves dos , orient. II. Gonçalves, Polyana Alves Radi, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Adriano Gonçalves dos Reis**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. Marcos Yutaka Shiino**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Margareth da Silva**

Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA)

Departamento de Materiais e Processos

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 04 de dezembro de 2019.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha esposa Isis Garcia por proporcionar este momento em minha vida cuidando de nossos filhos para que eu me dedicasse aos estudos. À minha princesa Laís que enche-me de emoção e saudades a cada telefonema e escutar papai estou com saudades. Ao meu filho recém-nascido Luigi que veio para nos encher de alegria e aos meus pais, Benedita e João, que sempre me incentivaram aos estudos e sem eles nada seria possível.

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa Isis e meus filhos Laís e Luigi pela compreensão pelos dias de distância.

Aos meus pais, Benedita e João, pelo o amor e ensinamentos.

Ao meu orientador Adriano Reis, pelo projeto elaborado, toda orientação, ensinamentos e dedicação ao trabalho.

À minha coorientadora Polyana Gonçalves, pela simplicidade, conhecimento, disposição e dedicação a cada fase do trabalho.

Ao INPE pelas análises de perfilometria, MEV-FEG com EDS e aderência por indentação.

Ao Tenente Vitor do IEAv pelas análises de nanoindentação.

Ao Prof. Walter Miyakawa pelas análises de AFM.

Ao ICT/UNIFESP pelas análises de DRX.

Ao Laboratório de Bioengenharia do ICT/Unesp pelas análises de molhabilidade. Ao Laboratório de Pesquisa de Materiais Dentários do Departamento de Materiais odontológicos e Prótese do ICT/UNESP, em especial à Dra. Thaís Cachuté Paradella, pelas análises de MEV/EDS.

Ao CNPQ (Projeto Universal 403070/2016-3) pelo suporte financeiro para realização deste projeto de pesquisa

Planejar é decidir de antemão qual é, e como será sua vitória.  
Rhandy di Stefano

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>8</b>
<b><i>ABSTRACT</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 ARTIGO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Artigo – Oliveira MG, Radi PA, Reis DAP, Reis AG. Formação de superfície bioativa no titânio via tratamentos alcalino e térmico para rápida osseointegração / <i>Titanium bioactive surface formation via alkali and heat treatments for rapid osseointegration</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>33</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
CDPs	Corpos de Prova
DRX	Difração de Raio X
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
ITA	Instituto Tecnológico de Aeronáutica
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
NaOH	Hidróxido de sódio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
SBF	Fluído Corporal Simulado
Ti-cp	Titânio comercialmente puro
TiO <sub>2</sub>	Óxido de Titânio
TQ	Tratamento químico
TQT600	Tratamento químico e térmico à 600°
TQT900	Tratamento químico e térmico à 900°
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UNESP	Universidade Estadual Paulista

Oliveira MG. Tratamento químico e térmico em Ti-cp visando a formação de uma superfície bioativa para otimização da osseointegração [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

## RESUMO

Embora o titânio e suas ligas sejam amplamente utilizados como materiais de implante, estudos para acelerar a osseointegração têm sido realizados. Uma das técnicas em estudo é o tratamento alcalino e térmico. Este trabalho tem como objetivo avaliar a formação de uma superfície bioativa em titânio comercialmente puro grau 4 após tratamento alcalino e térmico a 600 °C e 900 °C. Técnicas de caracterização via MEV, AFM, Raman, DRX, molhabilidade, nanoindentação e aderência à indentação foram realizadas para avaliar modificações superficiais e na seção transversal além disso, teste in vitro via imersão em SBF (fluido corporal simulado) para avaliar o crescimento de apatita. O tratamento alcalino formou hidrogenotitanato de sódio (1 µm de espessura) e o tratamento alcalino e térmico formou titanato de sódio (1 µm de espessura), enquanto o rutilo (TiO<sub>2</sub>) aumentou com o aumento da temperatura do tratamento, atingindo até 5 µm de espessura. A superfície passou de ligeiramente hidrofílica para totalmente hidrofílica. A rugosidade e a área de superfície aumentaram, especialmente em tratamento alcalino e térmico a 900 °C. A dureza da camada superficial aumentou significativamente com o tratamento térmico, e a aderência da indentação mostrou que o tratamento alcalino e térmico a 900 °C apresenta maior delaminação da superfície. Testes in vitro confirmaram que o tratamento alcalino e térmico acelera o crescimento da apatita, mas que o tratamento alcalino e térmico a 600 °C é o tratamento que possui a maior resistência mecânica e é mais adequado para acelerar a osseointegração.

Palavras-chave: Titânio. Tratamento alcalino e térmico. Titanato de sódio.

*Oliveira MG. Effect of chemical and thermal treatment on Ti-CP surface via chemical and thermal treatment at different temperatures [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.*

### **ABSTRACT**

*Although titanium and its alloys are widely used as implant materials, studies for rapid osseointegration have been performed. One of the techniques currently in study is the alkali and heat treatment. This work aims to evaluate the formation of a bioactive surface in titanium commercially pure grade 4 after alkali and heat treatment at 600 °C and 900 °C. Characterization techniques via SEM, AFM, Raman, XRD, wettability, nanoindentation and indentation adhesion were performed to evaluate surface and cross sectional modifications. In addition, in vitro test via SBF (simulated body fluid) soaking was performed to evaluate apatite growth. Alkaline treatment formed sodium hydrogen titanate (1 μm thick), and alkali and heat treatment formed sodium titanate (1 μm thick), while rutile TiO<sub>2</sub> increased with increasing treatment temperature, reaching up to 5 μm thick. The surface went from slightly hydrophilic to fully hydrophilic. Roughness and surface area increased, especially in alkali and heat treatment at 900 °C. The hardness of the surface layer was significantly increased by the heat treatment, and the indentation adhesion showed that the alkali and heat treatment at 900 °C presented higher surface delamination. In vitro tests have confirmed that alkali and heat treatment accelerate apatite growth, but that alkali and heat treatment at 600 °C is the treatment that has the highest mechanical strength and is best suited to accelerate osseointegration.*

*Keywords: Titanium. Alkali-heat treatment. Sodium titanate.*

# 1 INTRODUÇÃO

O termo osseointegração, que é definido como um processo de conexão direta estrutural e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante submetido a uma carga oclusal, tornou-se conhecido após o ano de 1977, quando o professor Per-Ingvar Brånemark observou que o titânio era o material mais indicado na confecção de implantes pelas suas propriedades físicas e biológicas (Brånemark et al., 1969; Brånemark et al., 1977). Este descobrimento é considerado uma das grandes revoluções da implantodontia. Desde a descoberta do processo de osseointegração iniciou-se uma constante busca na evolução destes resultados.

Adell et al. (1981) classificaram o processo de osseointegração como uma ligação direta e duradoura relacionando o osso e o implante. Em seu estudo foi avaliado todo o processo de osseointegração, desde seu contato primário até sua estabilidade após a instalação de sua respectiva prótese, e foi possível concluir que se faz necessário um processo de osseointegração eficaz para a reabilitação por próteses implanto suportadas.

Devido à necessidade de uma fixação biológica eficaz como pré-requisito para longevidade da reabilitação de próteses implanto suportadas, a alteração na superfície do implante ganhou panorama decisivo no âmbito dos estudos, sendo fato fundamental na evolução para o processo de osseointegração (Novaes et al., 2010).

A resposta biológica da superfície do implante está relacionada diretamente à suas composições químicas e físicas, sendo a topografia aplicada relacionada diretamente às respostas no processo de osseointegração (Brandão et al., 2010). A formação óssea sobre a superfície do implante está ligada diretamente a quatro características atribuídas: composição química; energia da superfície,

topografia e molhabilidade. A superfície rugosa se apresenta como influenciador direto para o processo de osseointegração melhorando o contato osso-implante (Barbosa, 2016).

O grande objetivo dos estudos sobre a osseointegração está relacionado diretamente em acelerar este processo. Por este motivo, os estudos avaliam diversas variáveis no processo de tratamento de superfície do titânio, desde mecânico à biológico, com o objetivo de avaliar sua eficácia em seus resultados. O tratamento de superfície é apresentado como agente fundamental para esta evolução com a finalidade de acelerar o processo de osseointegração, porém é destacado a necessidade de novas linhas de pesquisa para compreender melhor a confiabilidade e prognóstico para o processo (Avila et al., 2009), e este estudo vai ao encontro deste objetivo.

Baseado na importância da osseointegração no processo de reabilitação com utilização de implante dentário, o objetivo geral deste estudo é realizar uma alteração na superfície do Ti-cp grau IV via tratamento alcalino (NaOH 5M a 60 °C por 24h) e, posteriormente, térmico em duas temperaturas diferentes (600 °C / 1h e 900 °C / 1h) para formação de uma superfície bioativa no metal.

## 2 ARTIGO

### 2.1 Artigo – Oliveira MG, Radi PA, Reis DAP, Reis AG. Formação de superfície bioativa no titânio via tratamentos alcalino e térmico para rápida osseointegração / *Titanium bioactive surface formation via alkali and heat treatments for rapid osseointegration\**

#### RESUMO

Embora o titânio e suas ligas sejam amplamente utilizados como materiais de implante, estudos para acelerar a osseointegração têm sido realizados. Uma das técnicas atualmente em estudo é o tratamento alcalino e térmico. Este trabalho tem como objetivo avaliar a formação de uma superfície bioativa em titânio comercialmente puro grau 4 após tratamento alcalino e térmico a 600 °C e 900 °C. Técnicas de caracterização via MEV, AFM, Raman, DRX, molhabilidade, nanoindentação e aderência por indentação foram realizadas para avaliar modificações superficiais e na seção transversal além disso teste in vitro via imersão em SBF (fluido corporal simulado) para avaliar o crescimento de apatita. O tratamento alcalino formou hidrogenotitanato de sódio (1 µm de espessura) e o tratamento alcalino e térmico formou titanato de sódio (1 µm de espessura), enquanto o rutilo (TiO<sub>2</sub>) aumentou com o aumento da temperatura do tratamento, atingindo até 5 µm de espessura. A superfície passou de ligeiramente hidrofílica para totalmente hidrofílica. A rugosidade e a área de superfície aumentaram, especialmente em tratamento alcalino e térmico a 900 °C. A dureza da camada superficial aumentou significativamente com o tratamento térmico, e a aderência da indentação mostrou que o tratamento alcalino e térmico a 900 °C apresenta maior delaminação da superfície. Testes in vitro confirmaram que o tratamento térmico e alcalino aceleram o crescimento da apatita, mas que o tratamento térmico e alcalino a 600 °C foi o que apresentou a maior resistência mecânica sendo portanto o mais adequado para acelerar a osseointegração.

Palavras-chave: Titânio. Tratamento alcalino e térmico. Titanato de sódio

---

\* Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico *Applied Surface Science* (Print version ISSN 0169-4332). Submetido em: 01/11/2019.

## **ABSTRACT**

*Although titanium and its alloys are widely used as implant materials, studies for rapid osseointegration have been performed. One of the techniques currently in study is the alkali and heat treatment. This work aims to evaluate the formation of a bioactive surface in commercially pure titanium (cp-Ti) grade 4 after alkali (AT) and heat treatments at 600 °C (AHT600) and 900 °C (AHT900). Characterization techniques via SEM, AFM, Raman, TF-XRD, wettability, nanoindentation and indentation adhesion were performed to evaluate surface and cross-sectional modifications. In addition, vitro test via SBF (simulated body fluid) soaking was performed to evaluate apatite growth. AT samples formed sodium hydrogen titanate (1 μm thick), and AHT600 and AHT900 formed sodium titanate (1 μm thick), while rutile TiO<sub>2</sub> increased with increasing treatment temperature, reaching up to 5 μm thick. The surface changed from slightly hydrophilic to fully hydrophilic. Roughness and surface area increased, especially in AHT900. The hardness of the surface layer was significantly increased by the heat treatment, and the indentation adhesion showed that AHT900 presented extended delamination. In vitro tests have confirmed that alkali and heat treatment accelerate apatite growth, but AHT600 is the treatment that has the highest mechanical strength and is best suited to accelerate osseointegration.*

*Keywords: Titanium. Alkali-heat treatment. Sodium titanate.*

## **1. Introduction**

Commercially pure titanium (cp-Ti) and its alloys are widely used as dental implant biomaterials due to biocompatibility and good mechanical and corrosion resistance [1-2]. On the other hand, due to the bioinert properties of titanium, the bone formation rate (osseointegration) is very slow in the body. Properties such as surface chemistry, texture and wettability play a key role to accelerate osseointegration of dental implants. Hydrophilicity can alter cell adhesion, proliferation and differentiation properties. Increased surface roughness may induce strong bone-titanium interaction by increasing bone-

implant contact area. In addition, the chemical characteristics of the altered surface can induce bone binding and affinity by promoting hydroxyapatite precipitation from body fluid [3-4].

In recent decades, several surface treatments studies have been conducted to improve osseointegration, such as plasma-spraying, sand blasting and chemical treatments [5,6]. Among chemical treatments, alkali and heat treatments have been widely studied due to the simplicity of the method and ease of process control. Alkali and heat treatment consist of soaking the sample in a NaOH solution between 2 and 10 M and temperature between 60 and 100 °C for 24 hours to obtain a layer of sodium hydrogen titanate. Since this layer needs to be dehydrated and thickened, heat treatment is usually carried out in between 600 and 800 °C to obtain a mechanically stable layer of sodium titanate. Previous studies have reported that Ti metal undergoing the alkali and heat treatment process has the potential to spontaneously form a bone apatite layer on its surface when soaked in SBF (Simulated Body Fluid) [7-9].

There are no studies in the literature reporting alkali and heat treatment at 900 °C with an in-depth evaluation of the structural changes occurring on the surface and cross section of the material. In this context, the objective of this work is to evaluate the formation of a bioactive surface in cp-Ti grade 4 after alkali and heat treatment at 600 °C and 900 °C.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Alkali and heat treatments**

A cp-Ti grade 4 ingot was machined into disks (12.7 mm in diameter and 3 mm thick) and used as substrate without treatment (WT). The samples were cleaned with acetone in ultrasonic cleaner for a period of 20 min, and dried at

40°C. The samples were then soaked in an aqueous 5M NaOH solution at 60°C under agitation for a period of 24 h – alkali treatment (AT). After being removed from the solution, the samples were gently rinsed with demineralized water and dried at 40°C. The samples were subsequently heated to different conditions: 600 °C (AHT600) and 900°C (AHT900), at a heating rate of 5°C/min, kept at this temperature for an hour without atmosphere control and then let cool naturally in the furnace.

## 2.2 In vitro test

Treated (AT, AHT600 and AHT900) and untreated (WT) samples were soaked in 17 ml of SBF. The SBF preparation and sample soaking is according Kokubo and Takadama [10]. The SBF ion concentration is nearly equal to those of human blood plasma at 36.5 °C (Table 1). After soaking in the SBF for 30 days at 36,5°C, the samples were removed from the SBF, gently rinsed with demineralized water and dried at 40°C.

**Table 1.** SBF Ion concentration.

<b>Ion</b>	<b>Concentration (mM)</b>
Na <sup>+</sup>	142.0
K <sup>+</sup>	5.0
Mg <sup>2+</sup>	1.5
Ca <sup>2+</sup>	2.5
Cl <sup>-</sup>	147.8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4.2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5

## 2.3 Surface and cross section characterization

The surface of the samples were examined by using a scanning electron microscope (SEM-FEG) Tescan Mira 3 and a coupled Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS, X-MAX - Oxford).

Optical profiler Veeco Wyko NT1100 and Atomic force microscope (AFM) model SPM 9500 J3 from Shimadzu were used to analyze the topography of the samples.

Thin-film XRD (TF-XRD) by diffractometer Rigaku Ultima IV (Cu K  $\alpha$  radiation,  $\lambda = 0.15405$  nm) at 40 kV, 30 mA at a grazing incident angle of  $\omega = 0.5^\circ$  in the  $2\theta$  range of  $20^\circ$ – $50^\circ$  and Raman spectroscopy Horiba LabRam HR Evolution in the wavenumber of 100 to 1000  $\text{cm}^{-1}$  were used to analyze the composition and crystallinity of the sample surfaces.

The surface wettability was evaluated by contact angle measurements. The contact angles of the samples were assessed by dropping 10  $\mu\text{L}$  of distilled water on specimens and measured using an image-based goniometer (Theta Lite Biolin Scientific).

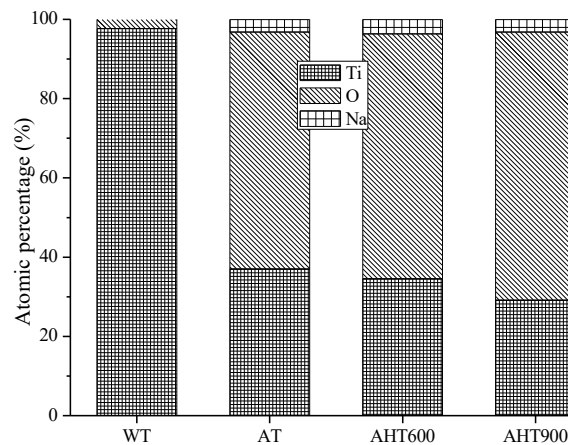
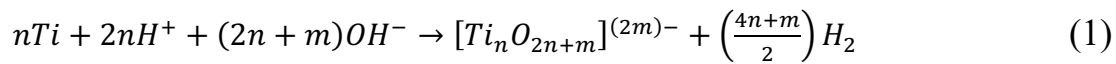
Surface and cross section hardness was measured by Nano Indentation Tester (NHT2) from Anton Paar with 10 mN of load during 10 seconds. The adherence of the formed layer was evaluated by using VDI3198 indentation test [11] that enables the evaluation of the film's adhesion, cohesion and brittleness. This test was performed using a Rockwell C diamond tip with a curvature radius of 200  $\mu\text{m}$  and 150 kg load. The cross section was evaluated using a field emission scanning electron microscopy (FEG-SEM, MIRA3 - TESCAN) and a coupled Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS, X-MAX - Oxford) to analyze the elements and its distribution.

### **3. Results and Discussion**

#### **3.1 Surface Chemistry**

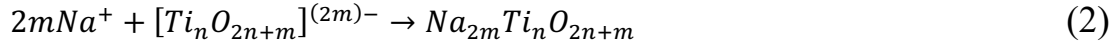
Fig. 1 shows the difference in surface chemical composition of Ti before and after treatments, and it can be observed that the treatments altered the surface chemistry. The major surface compound changed from titanium (98% in WT) to oxygen (60%, 62% and 68%, respectively for AT, AHT600 and AHT900). Moreover, in the treated samples the presence of approximately 3% sodium was observed.

These chemical changes on the surface are due to Ti reactions with NaOH. The mechanism of nanostructures formation in titanium can be considered a simultaneous process of dissolution and reprecipitation. At high NaOH concentrations, general titanium dissolution occurs and sodium titanate reprecipitation occurs. The general dissolution reaction of Ti in aqueous alkaline solution to form a titanate anion can be represented by Equation 1 [12]:

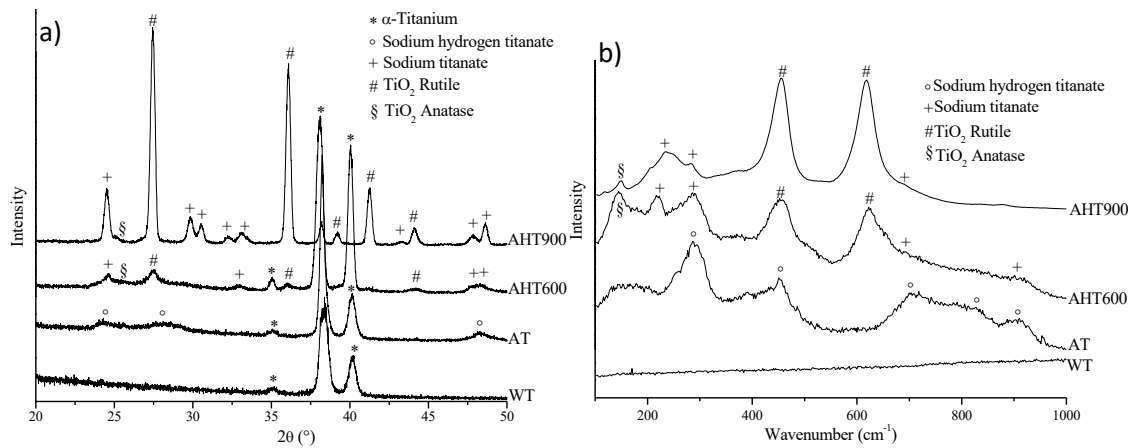


**Figure 1.** Weight percentages (wt%) of Ti, O, and Na as measured by energy-dispersive X-ray spectroscopy of the surface of WT, AT, AHT600 and AHT900.

The titanate anions produced on dissolution may react with  $\text{Na}^+$  cations in aqueous NaOH solution to produce sodium titanate. Equation 2 presents the general precipitation reaction of sodium titanate [12]:



Sodium titanate formation was confirmed by TF-XRD and Raman analysis. Figure 2a shows the TF-XRD and Figure 2b shows the surface Raman profiles of Ti metal control and treated samples. From Figure 2 it can be seen that sodium hydrogen titanate ( $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_3\text{O}_7$ ) was formed on the metal surface by NaOH treatment (AT), and then was transformed into sodium titanate ( $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$ ), rutile and anatase by subsequent heat treatments (AHT600 and AHT900). In the AHT900 group, very sharp rutile phase peaks are observed, as a consequence of the treatment temperature (900 °C), increasing the reaction kinetics and oxygen diffusion on the titanium surface.

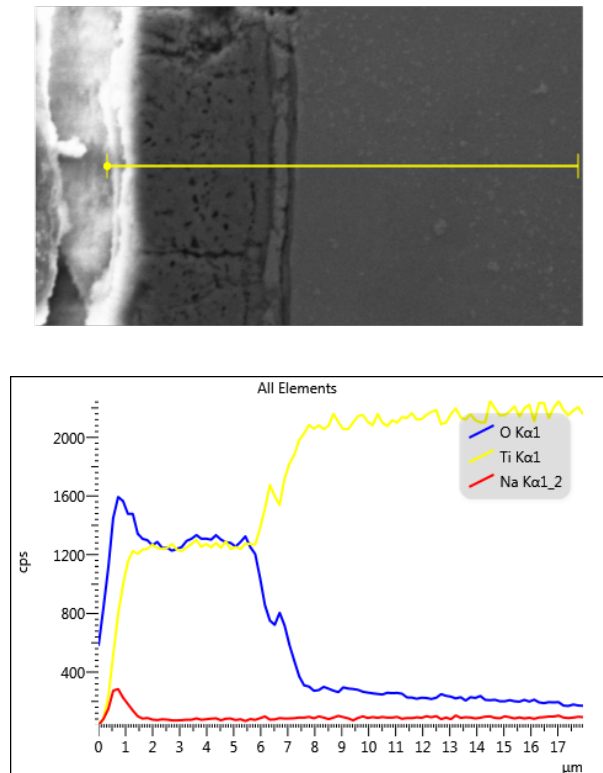


**Figure 2.** (a) TF-XRD and (b) Raman profiles of the surface of WT, AT, AHT600 and AHT900.

SEM images and EDX line profile of a cross section of the surface layer of treated samples showed that the sodium and oxygen content gradually

decreased, while Ti content increased near to a depth of 1  $\mu\text{m}$ . It means that sodium hydrogen titanate (AT) and sodium titanate (AHT600 and AHT900) have around 1  $\mu\text{m}$  depth.

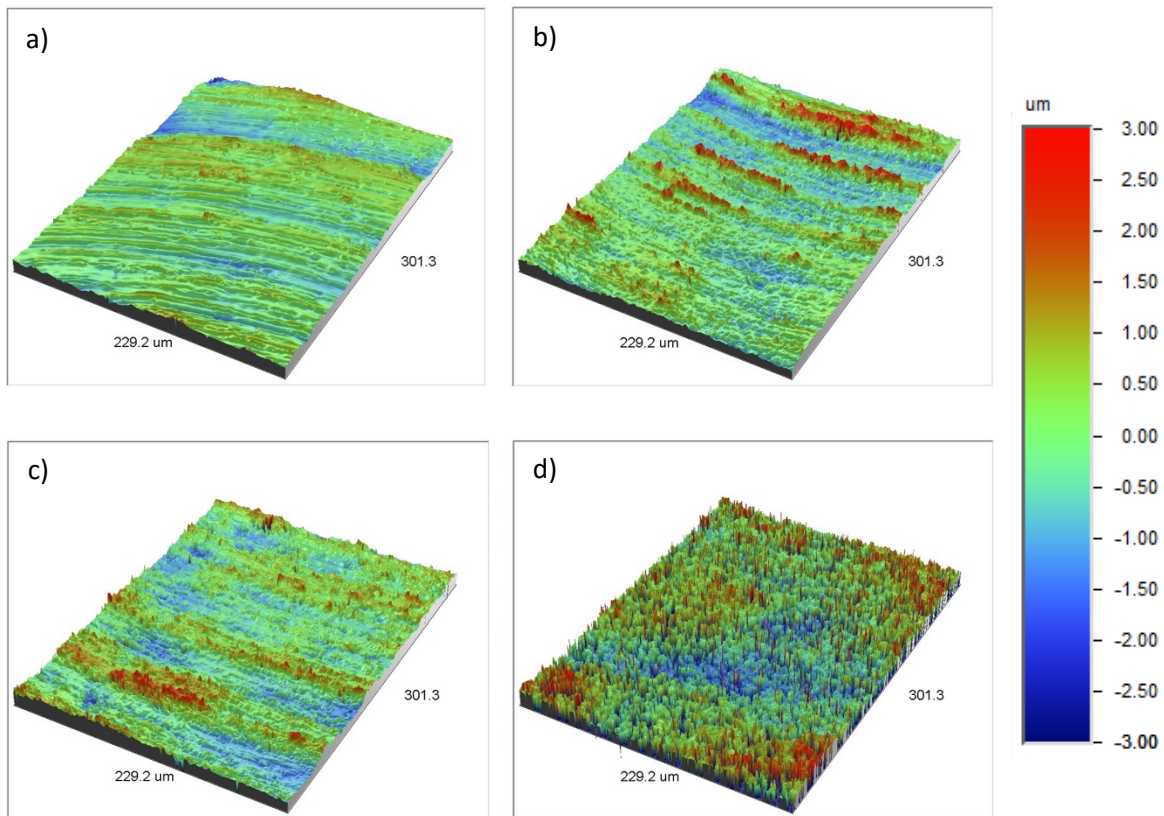
On the other hand, AHT900 showed a profile that oxygen content didn't decrease totally at 1  $\mu\text{m}$  depth, but it was kept as high as Ti until around 6  $\mu\text{m}$ , when then finally the oxygen content was reduced and Ti was increasing according to the substrate. The greater depth of oxygen content for AHT900 is due to its greater oxygen diffusion, which is proportional to the applied temperature. Fig. 3 shows an SEM image and EDX line profile of a cross section of the surface layer of AHT900.



**Figure 3.** SEM image and EDX line profile of a cross section of the surface layer of AHT900.

### 3.2 Surface topography and morphology

Figure 4 shows the changes in the surface topography of the Ti samples with respect to alkali and heat treatments. The control sample (Fig. 4a) showed machine marks and the treated samples showed peaks and valleys depending on variations in the treatment, being qualitatively more expressive in the AHT900 (Fig. 4d).

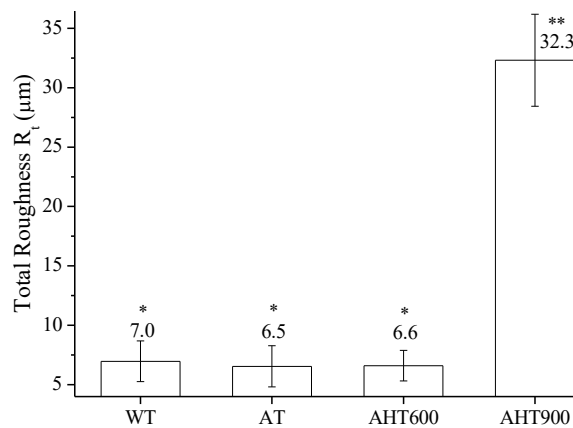


**Figure 4.** Profilometry topographies (area:  $229.2 \times 301.3 \mu\text{m}$ , scale:  $-3.0$  to  $+3.0 \mu\text{m}$ ) of machined Ti samples. (a) WT; (b) AT; (c) AHT600 and (d) AHT900.

A quantitative analysis of the surface roughness was also performed based on the topographies of Fig. 4. The average and standard deviations are shown in Fig. 5. The quantitative analysis in Fig. 5 corroborated with the qualitative analysis of Fig. 4: According to Fig. 5, there was a significant increase in total

roughness on the micro scale for AHT900 ( $32.3 \pm 3.9 \mu\text{m}$ ) compared to WT ( $7.0 \pm 1.7 \mu\text{m}$ ), AT ( $6.5 \pm 1.7 \mu\text{m}$ ) and AHT600 ( $6.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$ ).

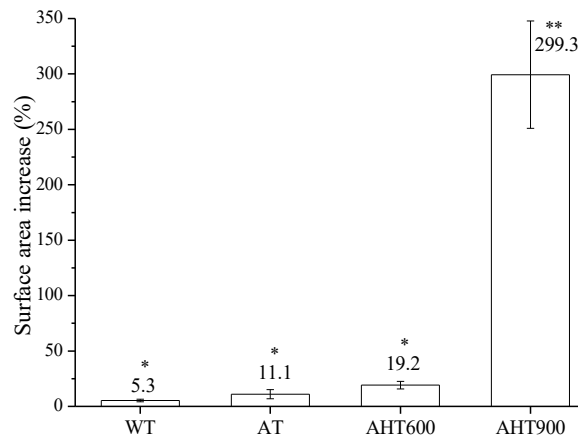
A one-way ANOVA and Tukey analysis revealed a significant difference ( $p < 0.05$ ) between TQT900\*\* and the other samples (WT\*, AT\* and AHT600\*), but without significant difference between WT\*, AT\* and AHT600\*. The literature also reported that the roughness didn't change, in similar conditions of treatment, when comparing WT with AHT600 [13-15].



**Figure 5.** Ti Total roughness changes as a function of chemical and thermal treatment. \*  $p < 0.05$  compared to AHT900\*\*.

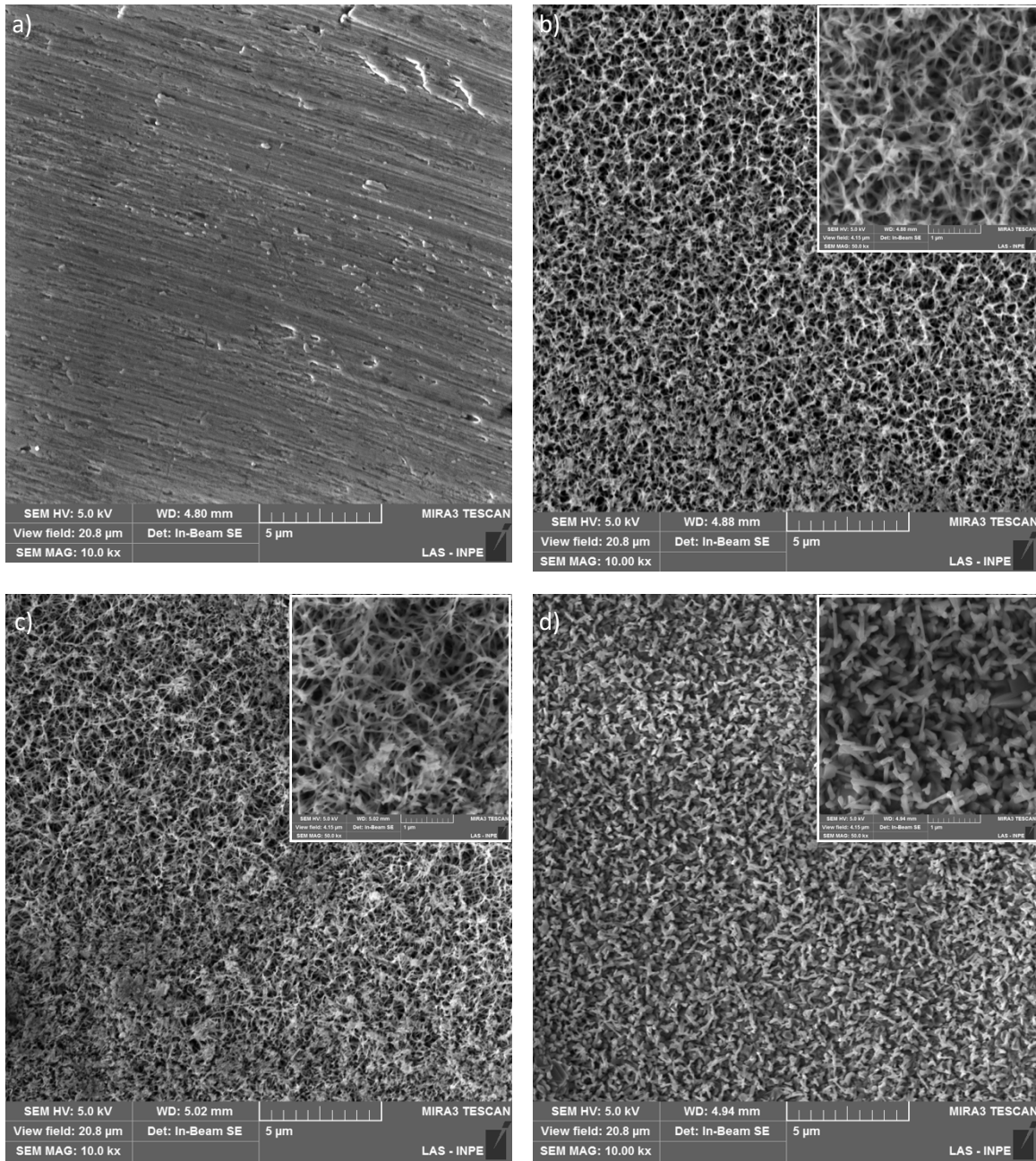
Fig. 6 shows the evolution of surface area after treatment. The same effect presented by roughness, could be observed in the increase of surface area. The peaks and valleys generated due to increased roughness provided a larger surface area than a completely flat surface. From Figure 6 it can be observed that there was a significant increase in surface area for AHT900 ( $299.3 \pm 48.4\%$ ) compared to WT ( $5.3 \pm 1.2\%$ ), AT ( $11.1 \pm 4.2\%$ ) and AHT600 ( $19.2 \pm 3.4\%$ ). One-way ANOVA and Tukey analysis revealed a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the AHT900\*\* and the other samples (WT\*, AT\* and AHT600\*). However, despite the trend of surface area growth presented in the results, difference between the WT\*, AT\* and AHT600\* was not considered

significant at a significance level of 0.05. By increasing the surface area, the contact area between the metal and bone cells was increased, improving the conditions for osseointegration [3-4].

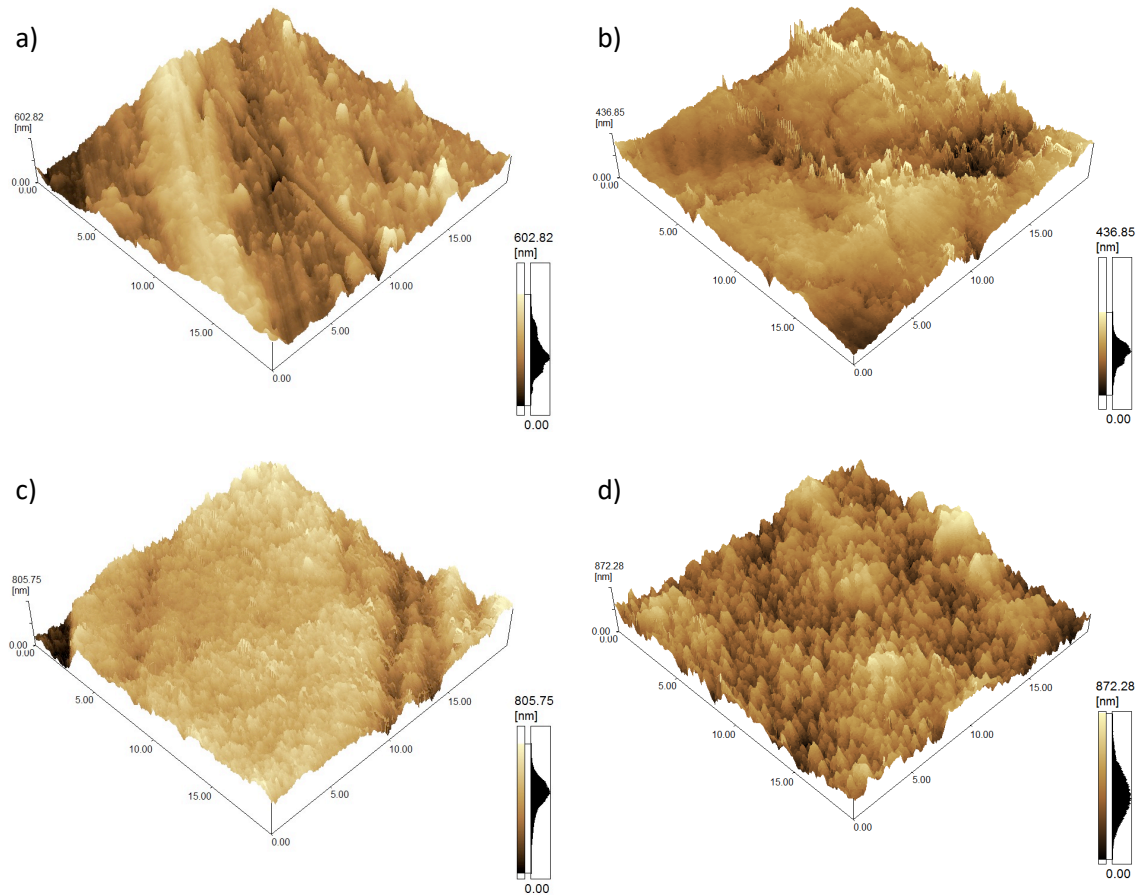


**Figure 6.** Ti surface area changes as a function of chemical and thermal treatment. \*  $p < 0.05$  compared to AHT900\*\*.

FEG-SEM and AFM analyzes were performed and it can be seen in Fig 7 and 8, respectively. From Fig. 7 and 8 it can be seen that the morphology of the formed surface is homogeneous and without the presence of microcracks. It is possible to realize that WT (Fig. 7a and 8a) has a relatively flat surface with the presence of machining marks. From Fig. 7b-d and 8b-d is observed the formation of a finer, porous nanoscale structure that formed on the surface of Ti after alkali treatment (Fig. 7b), and this microstructure basically did not change after heat treatment at 600 °C (Fig. 7c). However, after heat treatment at 900 °C (Fig. 7d) a distinct nanometric needle-like structure is observed, that is related to the TiO<sub>2</sub> rutile phase growing, resulting in increased surface area and roughness as reported in the Fig. 5 and 6.



**Figure 7.** SEM images (10 kx) of Ti samples surfaces: (a) WT; (b) AT; (c) AHT600 and (d) AHT900. Insets show high-resolution images of nanotextures in 50 kx.

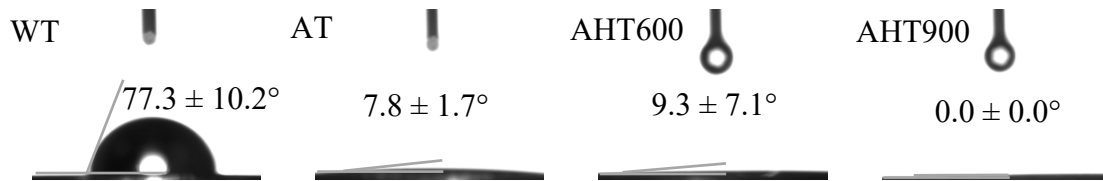


**Figure 8.** AFM topographies (area:  $20 \times 20 \mu\text{m}$ ) of machined Ti samples. (a) WT; (b) AT; (c) AHT600 and (d) AHT900.

### 3.3 Surface wettability

Figure 9 shows the contact angles of the samples before and after treatments, and the wettability of Ti was significantly changed from a partially hydrophilic surface in the WT group to a surface hydrophilic in the AT and AHT600 groups, and finally completely hydrophilic for the AHT900. This change is probably due to the modification in texture (greater roughness and surface area) and chemical surface modification after alkali and heat treatments. Surface wettability of a material is of vital importance for protein adsorption and cell adhesion. When an implant material is placed inside a human body, wetting of the implant material is among the first and most important events that occur by

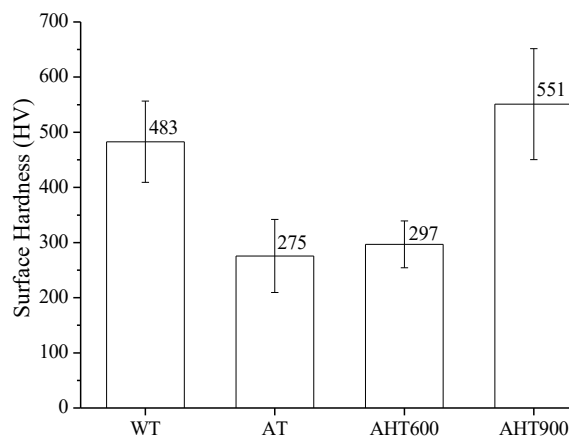
physiological fluids. This further controls protein adsorption, followed by cell attachment to the implant surface. Thus, surface wettability is considered an important criterion that may dictate implant osseointegration [16].



**Figure 9.** Contact angles of Ti without treatment and surface-treated samples.

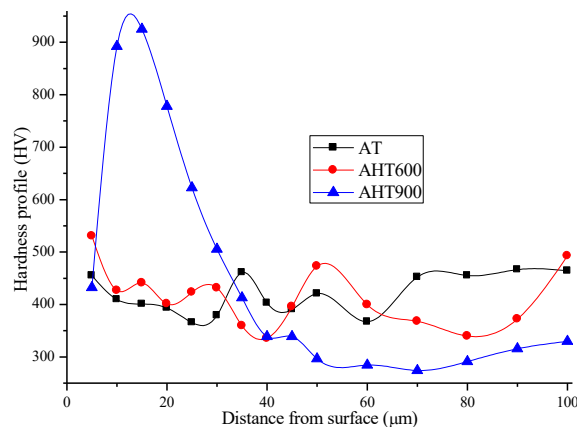
### 3.4 Surface and cross section hardness

Figure 10 shows the surface hardness from treated and untreated samples. The surface hardness reduced from  $483 \pm 74$  HV (WT) to  $276 \pm 66$  HV (AT), and its related to the porous surface created by the alkali treatment. A slight surface hardening recovery can be observed in the AHT600 sample ( $297 \pm 43$  HV), but the surface hardening increase is more evident in the AHT900 ( $551 \pm 101$  HV). The hardness increase is related to the  $\text{TiO}_2$  rutile phase formation, according to XRD and Raman analysis (Fig. 2).



**Figure 10.** Surface hardness of WT, AT, AHT600 and AHT900.

Fig. 11 shows the cross-section hardness profile. The analyses were made from 5 to 100  $\mu\text{m}$  from surface. AT sample didn't change the hardness profile from the surface. AHT600 shows a higher hardness value (530 HV) at 5  $\mu\text{m}$ , but after that the results are according to the substrate values. The higher hardness value at 5  $\mu\text{m}$  in AHT600 is probably related to oxygen diffusion. AHT900 shows a hardness peak at around 15  $\mu\text{m}$  (925 HV), and it's also related to oxygen diffusion that was more expressive when compared to AHT600, as showed by EDS profile from Fig. 3. However, substrate hardness of AHT900 (309 HV) was lower than AT (419 HV) and AHT600 (404HV). It is probably related to titanium annealing, reducing the hardness value.

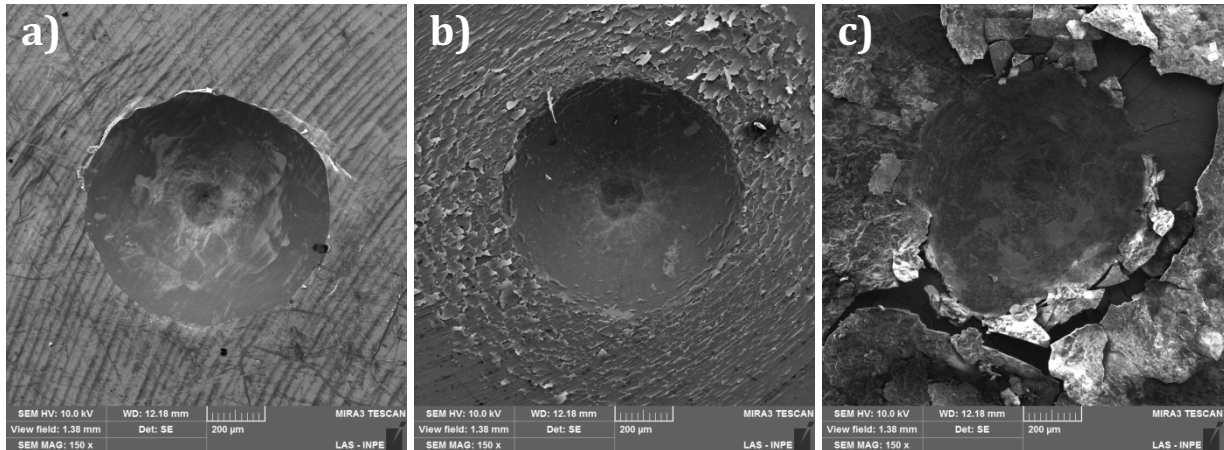


**Figure 11.** Cross section hardness profile of WT, AT, AHT600 and AHT900.

### 3.5 Surface brittleness and cohesion

Figure 12 shows the indentation marks obtained on adhesion indentation test VDI3198 on (a) AT, (b) AHT600 and (c) AHT900. Both AT (Fig. 12a) and AHT600 (Figure 12b) samples are classified as acceptable failure due to and adequate interfacial adhesion. From Figure 12b (AHT600) is possible to observe some cracks around the indentation indicating a strong adherence but a brittle material, where the substrate piles up, but there is no indication of delamination. On the other hand, the AHT900 sample (Fig. 12c) presented an unacceptable failure, where extended delamination at the vicinity of the imprint

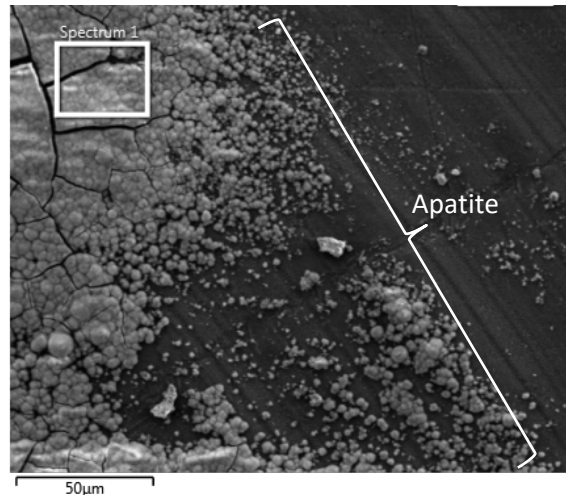
indicates a poor interfacial adhesion, indicating a strongly adherent coating but also brittle one. The higher surface hardness from AHT900 surface of 551 HV corroborate with this result.



**Figure 12.** FEG-SEM images showing the indentation mark performed on (a) AT, (b) AHT600 and (c) AHT900 samples, according to VDI 3198 [11].

### 3.6 In vitro test: apatite formation

Apatite formation was detected by SEM after being soaked in SBF for 30 days in the AT, AHT600 and AHT900 samples, but it was not detected in the WT sample. Fig. 13 shows the SEM image of the surface of AT sample, where it can be seen spherical particles that start to cover the entire surface. The apatite formation was more evident at AT sample.



**Figure 13.** Apatite surface of AT soaked in SBF for 30 days.

Fig. 14 shows the results from EDX analysis for WT, AT, AHT600 and AHT900 samples, regarding chemical composition of Na, P and Ca ions after soaking in SBF for 30 days. Na, P and Ca ions were chosen since it is an indication of apatite similar to bone mineral phase growing.

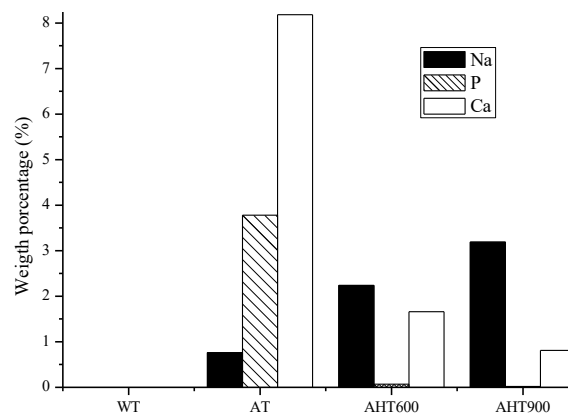
The WT sample did not show Na, since it was not exposed to the alkali treatment. In addition to that, Ca and P ions were not detected in the WT sample, confirming that apatite didn't growth after 30 days of SBF soaking, corroborating with the SEM images. On the other hand, Na, P and Ca ions were detected in the AT, AHT600 and AHT900 samples.

Ca and P ions were reduced with increasing temperature of heat treatment, and, at the same time, Na ions was increasing with the heat treatment. This is because during the immersion in SBF, Na ions release from sodium hydrogen titanate (AT) and from sodium titanate (AHT600 and AHT900) and react with hydroxyl group (negatively charged) in the SBF. Consequently, the surface attracts the positively charged Ca ion which can be defined as possible nucleation area for bone-like apatite formation. The calcium and phosphate ions are consumed since apatite nuclei are formed. The apatite growing on the substrates is directly affected by the heat treatment.

The apatite rate formation decreases with the heat treatment, especially at 900°C. It is associated with the Na ion release rate decrease from the densified sodium titanate after heat treatment (AHT600 and AHT900) [9, 17,18].

Although AT samples forms a dense apatite after being soaked into SBF when compared with AHT600 and AHT900, sodium hydrogen titanate is too unstable for practical use. The more stable sodium titanate layer formed by the heat treatment is preferred (AHT600 and AHT900), from a practical point of view [19].

According to in vivo tests reported in the literature, titanium alkali and heat-treated bonds directly to the bone, but titanium that is only alkali treated does not. The reason for that is the unstable reactive surface layer of alkali treated titanium [20].



**Figure 14.** EDX profiles of the surface after soaking in SBF for 30 days of: (a) WT; (b) AT; (c) AHT600 and (d) AHT900.

#### 4. Conclusions

Both alkali (AT) and alkaline heat treatment (AHT600 and AHT900) proved to be efficient to accelerate osseointegration due to the formation of sodium hydrogen titanate and sodium titanate, thus increasing wettability, roughness and surface area.

Alkali and heat treatments AHT600 and AHT900 showed a higher mechanical resistance on the surface, but AHT900 showed a high delamination when indented, besides reducing the mechanical resistance of the substrate due to annealing. Therefore, among the treatments tested, AHT600 proves to be the most suitable to accelerate the osseointegration of cp-Ti grade 4.

### **Acknowledgements**

This work was supported by CNPQ Universal [Grant number 403070/2016-3].

### **REFERENCES**

- [1] F.A. Shah, M. Trobos, P. Thomsen, A. Palmquist, Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants — Is one truly better than the other? *Mat. Sci. Eng. C* 62 (2016) 960–966.
- [2] M. Textor, C. Sittig, V. Frauchiger, S. Tosatti, D.M. Brunette, Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys, *Titanium in Medicine*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2001, pp. 171–230.
- [3] L. Le Guehenec, A. Soueidan, P. Layrolle, Y. Amouriq, Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, *Dent. Mater.* 23 (2007) 844–854.
- [4] A. Bagno, C. Di Bello, Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15 (2004) 935–949.
- [5] Y. Shibata, Y. Tanimoto, A review of improved fixation methods for dental implants. Part I: Surface optimization for rapid osseointegration, *J. Prosthodont. Res.* 20 (2015) 20 – 33.
- [6] C.J. Alberti, E. Saito, F.E. Freitas, D.A.P. Reis, J.P.B. Machado, A.G. Reis, Effect of etching temperature on surface properties of Ti6Al4V alloy for use in biomedical applications, *Mater. Res.* 22-1 (2019) e20180782.

- [7] S. Yamaguchi, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura, T. Kokubo, Cross-sectional analysis of the surface ceramic layer developed on Ti metal by NaOH-heat treatment and soaking SBF, *J. Ceram. Soc. Jpn.* 117-10 (2009) 1126-1130.
- [8] N. Li, W. Xu, J. Zhao, G. Xiao, Y. Lu, The significant influence of ionic concentrations and immersion temperatures on deposition behaviors of hydroxyapatite on alkali- and heat-treated titanium in simulated body fluid, *Thin Solid Films* 646 (2018) 163–172.
- [9] E. Butev, Z. Esena, S. Bor, In vitro bioactivity investigation of alkali treated Ti6Al7Nb alloy foams. *Appl. Surf. Sci.* 327 (2015) 437–443.
- [10] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27 (2006) 2907–2915.
- [11] N. Vidakis, A. Antoniadis, N. Bilalis, The VDI 3198 indentation test evaluation of a reliable qualitative control for layered compounds, *J. Mater. Process. Technol.* 143–144 (2003) 481–485.
- [12] V.V.D. Rani, K. Manzoor, D. Menon, N. Selvamurugan and S.V. Nair, The design of novel nanostructures on titanium by solution chemistry for an improved osteoblast response, *Nanotechnology* 20 (2009) 195101.
- [13] M. Kamo, M. Kyomoto, F. Miyaji, Time course of surface characteristics of alkali- and heat-treated titanium dental implants during vacuum storage, *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 105B (2017) 1453–1460.
- [14] S. Nishiguchi, S. Fujibayashi, H. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura, Biology of alkali- and heat-treated titanium implants, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 67-1 (2003) 26-35.
- [15] S. An, T. Matsumoto, H. Miyajima, J. Sasaki, R. Narayanan, K. Kim, Surface characterization of alkali-and heat-treated Ti with or without prior acid etching, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 4377–4382.
- [16] S.R. Paital, N.B. Dahotre, Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: materials, performance factors, and methodologies, *Mat. Sci. Eng. R* 66-1 (2009) 70.

[17] H. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, S. Nishiguchi and T. Nakamura, Graded surface structure of bioactive titanium prepared by chemical treatment, *J. Biomed. Mater. Res.* 45-2 (1999) 100-107.

[18] F. Liang, L. Zhou, K. Wang, Apatite formation on porous titanium by alkali and heat-treatment, *Surf. Coat. Tech.* 165 (2003) 133–139.

[19] H. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo and T. Nakamura, Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment, *J. Biomed. Mater. Res.* 32 (1996) 409-417.

[20] S. Nishiguchi, T. Nakamura, M. Kobayashi, H. Kim, F. Miyaji and T. Kokubo, The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium, *Biomaterials* 20 (1999) 491-500.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O sucesso do processo para reabilitação oral mediada por implantes está ligado diretamente ao sucesso da estabilidade do implante em relação ao osso. Ao longo dos últimos anos, incessantes estudos têm sido realizados na evolução do tratamento de superfície para melhorar o processo de osseointegração, que se trata do íntimo contato entre osso e implante, gerando uma estabilidade para ser realizada a reabilitação protética capaz de suportar as forças mastigatórias.

A proposta apresentada foi estabelecer uma nova superfície de implante, capaz de proporcionar uma melhora em suas propriedades de superfície, tornando-se mais eficaz no processo de osseointegração. O trabalho apresentou resultados promissores em relação à otimização da osseointegração. Como trabalhos futuros sugere-se uma avaliação detalhada da imersão das amostras tratadas em SBF, alterando-se o tempo de imersão, e uma avaliação *in vivo*. Espera-se com isso que os bons resultados físico-químicos sejam então corroborados com avaliações *in vitro* e *in vivo*.

## REFERÊNCIAS\*

Adell R. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*. 1981;10(6):387–416. doi: 10.1016/S0300-9785(81)80077-4. PMID: 6809663.

Avila G, Misch K, Galindo-Moreno P, Wang HL, Implant surface treatment using biomimetic agents. *Implant Dent*. 2009;18(1):17-26. doi: 10.1097/ID.0b013e318192cb7d. PMID: 19212234.

Barbosa TP. Características funcionais de implantes dentários: topografia superficial e molhabilidade [dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2016.

Brandão ML, Esposti TBD, Bisognin ED, Harari ND. Superfície dos implantes osseointegrados X resposta biológica. *Rev Implant*. 2010;7(1):95–101.

Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81-100. doi.org/10.3109/02844316909036699. PMID: 4924041.

Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw: experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977;16:1-132. PMID: 356184.

Novaes AB Jr, de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*. 2010;21(6):471-81. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402010000600001>. PMID: 21271036.

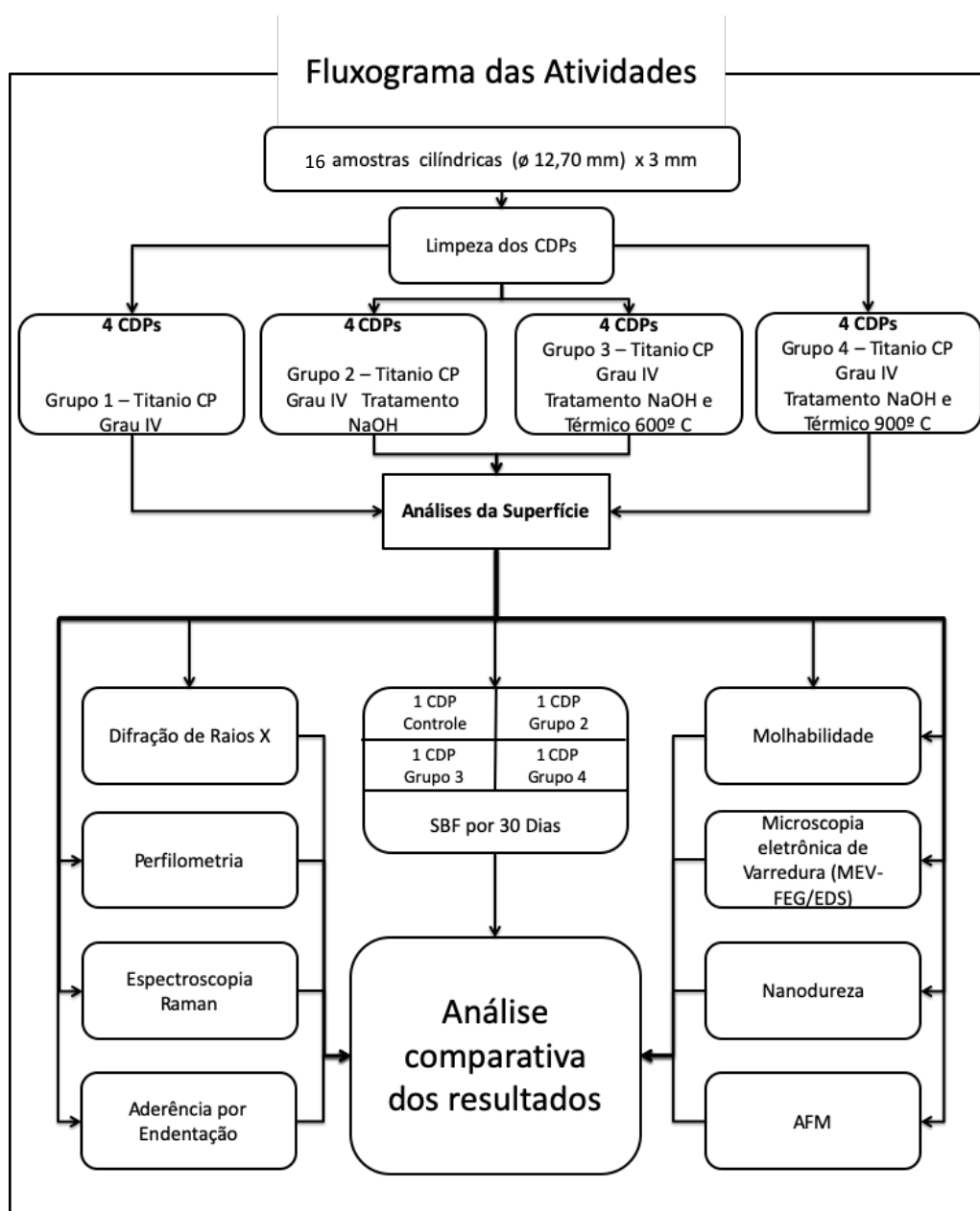
---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Nov 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

## APÊNDICE – Detalhamento da metodologia

A Figura 1 apresenta um fluxograma das etapas realizadas neste trabalho que serão detalhadas a seguir.

Figura 1 – Fluxograma das atividades desenvolvidas neste trabalho



Fonte: elaborada pelo autor

O grupo 1 foi chamado de Controle, o Grupo 2 de TQ, o Grupo 3 de TQT600 e o Grupo 4 de TQT900.

### Preparação dos CDPs

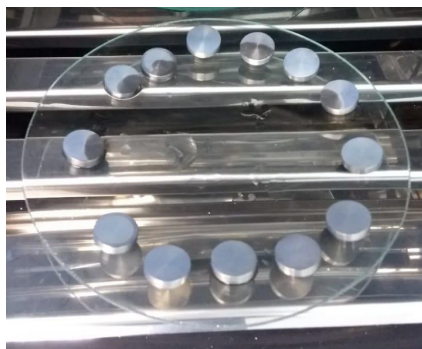
Para este estudo foram utilizadas amostras de titânio comercialmente puro (Ti-cp) grau IV como substrato. Uma barra cilíndrica ( $\varnothing$  12,70 mm) foi micro usinada na espessura de 3,0 mm. Os 16 CDPs passaram pelo processo de limpeza com acetona e água ultrapura em banho de ultrassom no Altsonic Clean por 30 min (Figura 2). Após este procedimento os CDPs foram secos na estufa SSDc 42L da SolidSteel à 40 °C por um período de 24 horas (Figura 3).

Figura 2 - Ultrassom usado na limpeza



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 3 - Secagem em forno a 40°C



Fonte: elaborada pelo autor.

### **Ataque químico com NaOH**

O tratamento químico com solução de NaOH foi realizado em 12 CDPs, sendo os mesmos inseridos simultaneamente em um Becker de teflon (resistente a temperatura e a solução de NaOH) suspensas por fios de teflon em uma solução de NaOH 5M. O ataque químico teve a duração de 24 horas a uma temperatura de 60 °C (medida por termômetro) com o uso de um agitador magnético DiagTech DT 3110H em baixa rotação com o objetivo de se manter o líquido circulante, como representado na Figura 4.

Figura 4 - CDPs de Ti-cp imersas em NaOH 5M à 60°C por 24h sob agitação de 50 rpm



Fonte: elaborada pelo autor.

### **Tratamento térmico**

Os grupos TQT600 e TQT900 foram submetidos ao tratamento térmico, sendo o grupo TQT600 à 600 °C e o grupo TQT900 à 900 °C, ambos por meio de um forno W-Three –EDG.

O aquecimento foi realizado sem atmosfera controlada, partindo da temperatura ambiente, com uma taxa de aquecimento de 5° C/min até atingir a temperatura de tratamento, sendo mantido em temperatura constante por 1 hora (Figura 5). Posteriormente foi realizado o resfriamento com os CDPs dentro do forno até atingir a temperatura ambiente. Após o tratamento térmico os CDPs foram armazenados num dessecador.

Figura 5 - Forno para realização de tratamento térmico



Fonte: elaborada pelo autor.

### **Preparação das amostras para análise da seção transversal**

As amostras foram cortadas transversalmente e embutidas à quente em resina baquelite. Após o embutimento as amostras foram lixadas com lixas mesh 600 a 1200 e depois polidas utilizando sílica coloidal com 0,25  $\mu\text{m}$ . As amostras foram analisadas quanto à sua composição utilizando MEV-EDS e quanto a sua dureza em função da profundidade utilizando a análise de nanodureza instrumentada.

## **Caracterização das propriedades da superfície**

Tanto as superfícies tratadas quanto o grupo controle foram avaliados quanto às suas propriedades pelas técnicas microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS), perfilometria óptica, molhabilidade, difração de raios-X (DRX) e Espectroscopia Raman.

### **- Microscopia eletrônica de Varredura (MEV-FEG/EDS)**

Foi realizada análise qualitativa da morfologia das superfícies dos CDPs tratados e não tratados a partir das imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), sendo avaliadas algumas características como textura, heterogeneidade e microfissuras. A identidade e a concentração dos elementos químicos presentes nos filmes obtidos foram analisadas pela técnica de EDS acoplado ao MEV. O equipamento utilizado foi o modelo Inspect S50 da marca FEI (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), disponibilizado pelo Laboratório de Pesquisa Materiais Odontológicos Prótese do Instituto de Ciência e Tecnologia – Unesp.

Com o objetivo de ser feita uma análise detalhada da nano textura formada e da seção transversal da amostra, foi feita análise no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), marca Tescan, modelo Mira 3, com canhão de emissão de campo (*Field Emission Gun*), pertencente ao Laboratório de Sensores e Materiais do Instituto de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE).

### **- Perfilometria**

Para avaliar o perfil de rugosidade dos CDPs foi usado um perfilômetro óptico Veeco, modelo NT9100, localizado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE). A análise foi realizada em temperatura ambiente e pressão atmosférica, com ampliação de 20,5 vezes (área analisada: 229,2 x 301,3  $\mu\text{m}$ ) no modo *Vertical Scanning Interferometry* (VSI).

### **-Difração de Raios X**

Para avaliar se o tratamento químico alterou a natureza amorfa da camada de óxido nativa, os CDPs foram analisados por DRX utilizando um difratômetro Rigaku modelo Ultima IV pertencente ao Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de São Paulo em São José dos Campos (UNIFESP/ICT), utilizando uma fonte de radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ). O intervalo angular em  $2\theta$  utilizado de  $20^\circ$  a  $50^\circ$  com velocidade de  $2^\circ$  por minuto e no modo de ângulo rasante na superfície do material, com ângulo de incidência de  $0,5^\circ$  e 40kV/30mA.

Os dados obtidos, em arquivos extensão “.xrdml” e “.raw”, foram tratados utilizando-se do programa X’Pert Highscore versão 3.0a fornecido pela PANalytical B.V. Este programa detecta, identifica e ajusta automaticamente os picos encontrados por DRX em relação a um banco de dados de fichas JCPDS.

### **- Molhabilidade**

O ângulo de contato das superfícies foi analisado por meio de um tensiômetro Óptico TL 1000 – Theta Lite, Attension, localizado no Laboratório de Bioengenharia do Instituto de Ciência e Tecnologia da Unesp, onde uma seringa de vidro do sistema (Gastight Syringes #1001 – 1 mL, Hamilton, Reno) deposita uma gota de água destilada sobre a superfície do CDP. Uma série de imagens foram gravadas pela câmera do equipamento pelo período de 30 segundos. O software *OneAttension* (Biolin Scientific) calculou os valores médios para cada CDP à partir das imagens obtidas.

#### **- Espectroscopia Raman**

A espectroscopia Raman foi realizada por meio de uma técnica de espectroscopia molecular que utiliza a interação da luz com a matéria para determinar a constituição ou composição de um material, por meio de ângulos rasantes, com a utilização Espectrômetro Raman Horiba, modelo LabRam HR Evolution com excitação no comprimento de onda 514,5 nm de 100 a 1000 *wavenumber/cm*, localizado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE).

#### **- Nanodureza**

Para avaliar a dureza das camadas formadas na superfície e próximo à superfície da amostra foram realizadas nanoindentação ao longo da seção transversal das amostras TQ, TQT600 e TQT900 utilizando o equipamento Nano Indentation Tester (NHT2) da Anton Paar localizado no Instituto de Estudos Avançados (IEAv/CTA). Foram realizadas 15 indentações com

distâncias de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 microns da superfície das amostras. A carga máxima utilizada foi de 10 mN, o tempo de carregamento foi de 30 segundos, permanecendo com carga constante por 10 segundos, seguido pelo descarregamento que foi realizado em 30 segundos.

#### **-Análise de aderência por indentação**

A aderência da camada formada na superfície das amostras foi avaliada utilizando a norma alemã VDI 3198. Foram realizadas três indentações por amostra em um durômetro BVR do fabricante Reichert, utilizando um penetrador cônico de diamante do tipo Rockwell C com ângulo de contato de 120°. Esse equipamento encontra-se instalado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LABAS/INPE).

#### **- Análise de microscopia de força atômica**

A análise de microscopia de força atômica (AFM) foi realizada no microscópio de força atômica modelo SPM 9500 J3 (Shimadzu Corp. Inc., Japan) do Laboratório de Caracterização de Superfícies, do Departamento de Física do ITA, em modo de contato. A área analisada foi de 20,0x20,0  $\mu\text{m}$ .

#### **- Análise in vitro (SBF)**

Foi preparada uma solução de SBF de acordo com o trabalho de Kokubo e Takadama (2006)<sup>1</sup>. Cada reagente foi precisamente pesado por uma balança analítica (Urano UA-420/0,001). Em seguida, com a utilização de um agitador Magnético DT 3120H, foram dispostos em um Becker em Vidro de 1L, onde foram adicionados 900 ml de água ultrapura com uma barra magnética e a solução foi mantida em uma temperatura entre 35°C e 38°C com a utilização de um termômetro analógico em contato com a solução.

Os reagentes foram adicionados em sua sequência de 1 à 7 conforme a Tabela 1 garantindo que não houvesse precipitação de cristais na solução. Foram adicionados em pequenas quantidades o reagente  $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$  e a *solução de* 1M-HCl mantendo o pH da solução estável entre 7,20 e 7,60, permanecendo assim até a dissolução total do  $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ . Ao final a solução foi estabilizada em 36,5°C e pH 7,40. Após a estabilização a solução foi transferida para balão volumétrico de 1L, e o seu volume completado com água ultrapura. A solução foi misturada por agitação manual do balão, e posteriormente foi resfriada em banho de gelo a uma temperatura de aproximadamente 20°C, para que fosse armazenada em ambiente refrigerado entre 6 e 10°C. Todo o processo foi realizado no Departamento de Engenharia Ambiental do Instituto de Ciência e Tecnologia da Unesp.

Uma amostra de cada grupo foi mantida a 36,5 °C por 30 dias. As amostras foram então rinsadas com água ultrapura, secas a 40 °C e então mantidas em dessecador até serem analisadas.

Tabela 1 – Solução SBF preparada para os ensaios in vitro

---

<sup>1</sup>Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006;27(15):2907–15. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017. PMID: 16448693.

Ordem de solubilizaçã o	Reagente	PM (g/mol)	Pureza mín (%)	Massa para 1000 mL
1	NaCl	58,4400	99,00	8,0753
2	NaHCO <sub>3</sub>	84,0100	98,00	0,3600
3	KCl	74,5500	99,58	0,2246
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	174,1800	98,00	0,1777
5	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	203,3000	99,80	0,3056
6	CaCl <sub>2</sub>	147,0100	99,00	0,3712
7	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142,0400	99,00	0,0717
8	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	121,1400	99,80	6.057
9	1M-HCl			40 ml

Fonte: Adaptada de Kokubo e Takadama (2006)<sup>2</sup>.

### -Análise Estatística

Os dados foram analisados, estatisticamente, por ANOVA com um fator e comparação múltipla de *Tukey*. O nível de significância adotado foi de 5%.

<sup>2</sup>Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006;27(15):2907–15. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017. PMID: 16448693.

## ANEXO A – Comprovante de submissão de artigo



Adriano Gonçalves dos Reis &lt;adriano.reis@unesp.br&gt;

---

**Thank you for your submission to Applied Surface Science**


---

Applied Surface Science &lt;eesserver@eesmail.elsevier.com&gt;

1 de novembro de 2019 17:35

Responder a: Applied Surface Science &lt;apsusc1@elsevier.com&gt;

Para: adriano.reis@unesp.br, adriano.g.reis@hotmail.com

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Dr. Reis,

Thank you for sending your manuscript Titanium bioactive surface formation via alkali and heat treatments for rapid osseointegration for consideration to Applied Surface Science. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for Applied Surface Science to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can viewed here: [http://journalinsights.elsevier.com/journals/0169-4332/review\\_speed](http://journalinsights.elsevier.com/journals/0169-4332/review_speed)

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Applied Surface Science, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/160/p/8045/](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/)

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/APSUSC>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: [adriano.reis@unesp.br](mailto:adriano.reis@unesp.br)

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/APSUSC/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/APSUSC/automail_query.asp)

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Applied Surface Science.

Kind regards,

Professor Henrik Rudolph

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone: <http://support.elsevier.com>