

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

RITA DE CÁSSIA CIPRIANO RANGEL

EFEITO DA IMPLANTAÇÃO IÔNICA POR IMERSÃO EM PLASMAS SOBRE A
BIOATIVIDADE DE TITÂNIO

SOROCABA

2012

RITA DE CÁSSIA CIPRIANO RANGEL

EFEITO DA IMPLANTAÇÃO IÔNICA POR IMERSÃO EM PLASMAS SOBRE A
BIOATIVIDADE DE TITÂNIO

Tese apresentada como requisito à
obtenção do título de Doutora à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Materiais, área de concentração Ciência e
Engenharia de Interfaces

Orientador: Prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz

SOROCABA

2012

Rangel, Rita de Cássia Cipriano.

Efeito da implantação iônica por imersão em
plasmas sobre a bioatividade de titânio / Rita de
Cássia Cipriano Rangel, 2012

100 f. : il.

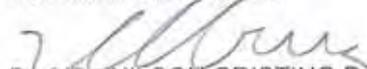
Orientador: Nilson Cristino da Cruz

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciência, Bauru, 2012

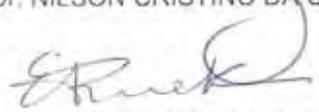
1. Titânio. 2. Bioatividade. 3. IIDIP. 4. Cálcio.
I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE RITA DE CÁSSIA CIPRIANO RANGEL, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 31 dias do mês de julho do ano de 2012, às 14:00 horas, no(a) Campus Experimental da UNESP / Sorocaba, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. NILSON CRISTINO DA CRUZ do(a) Campus Experimental da UNESP / Sorocaba, Profa. Dra. ELIANA APARECIDA DE REZENDE DUEK do(a) Departamento de Ciências Fisiológicas / PUC / Sorocaba, Profa. Dra. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO do(a) Departamento de Materiais e Tecnologia / Faculdade de Engenharia de Guaratingueta, Profa. Dra. CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA do(a) Faculdade de Engenharia Mecânica / Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. CLODOMIRO ALVES JUNIOR do(a) Departamento de Física Teórica e Experimental / Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de RITA DE CÁSSIA CIPRIANO RANGEL, intitulada "EFEITO DA IMPLANTAÇÃO IÔNICA POR IMERSÃO EM PLASMAS SOBRE A BIOATIVIDADE DE TITÂNIO". Após a exposição, a discente foi argüida 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.



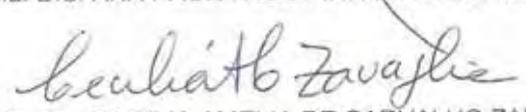
Prof. Dr. NILSON CRISTINO DA CRUZ



Profa. Dra. ELIANA APARECIDA DE REZENDE DUEK



Profa. Dra. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO



Profa. Dra. CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA



Prof. Dr. CLODOMIRO ALVES JUNIOR

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz pela orientação e conhecimento transmitido.

À prof^a. Dr^a. Elidiane C. Rangel pelo exemplo, incentivo e grande contribuição na realização e discussão do trabalho.

Ao prof. Dr. Rogério Moraes Oliveira e ao prof. Dr. Mário Ueda pela permissão de utilização do LAP e pela contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Alexandre Urbano pelas análises de difração de raio-x.

Ao prof. Dr. Wido H. Schreiner pelas análises de XPS.

Ao prof. Dr. Manfredo Tabacniks e Marcel Dupret pelas análises de PIXE.

À prof^a. Dr^a. Eliana Duek e André Messias pelas análises de crescimento celular.

Ao prof. Dr. José Roberto Bortoleto pelas análises de AFM.

Ao prof. Dr. Gelson Biscaia e Prof^a Dr^a Neide Kuromoto pelas instruções na preparação do SBF.

À prof^a. Dr^a. Célia Marina Freire e prof^a. Dr^a. Maria Eliziane Souza pelas análises de espectroscopia de impedância eletroquímica.

À Maria Lúcia Brison e Gilvan Silva pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

À Ana Paula Vaz, Bruno Chrcanovic e Luiz Carlos Trindade pela ajuda na preparação das amostras.

Aos amigos de laboratório: Thalita Benetello, Guilherme Nielsen, Thaís Matiello, César Augusto Antônio e Andressa Macedo Rosa pela amizade e ajuda em etapas deste trabalho.

A meus pais pelos incentivos e ensinamentos.

À minha irmã por toda motivação e ajuda. Sem ela esta realização não seria possível.

À minha amada sobrinha Lara que me distraia todo final de dia de trabalho e me dava forças para começar um novo dia.

Ao Davi que sempre esteve ao meu lado me incentivando nesta conquista.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho a técnica de Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma, IIDIP, foi utilizada para deposição de filmes contendo cálcio sobre a superfície de titânio. Os parâmetros de deposição foram variados buscando-se condições que tornassem o titânio o mais bioativo possível. Para a deposição dos filmes contendo cálcio foram utilizados, como precursores, vapor de nitrato de cálcio dissolvido em álcool isopropílico ou cálcio granulado. Para avaliar a bioatividade dos filmes as amostras foram imersas em solução corpórea simulada, SBF. Espectrometria de emissão de raios X induzida por partículas carregadas (PIXE), espectroscopia de reflexão/absorção no infravermelho (IRRAS), espectroscopia de fotoelétrons de raios-x (XPS), difração de raios X (DRX) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foram utilizadas para análises da composição química e estrutura molecular dos filmes depositados. A morfologia da superfície foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM). A espessura dos filmes foi medida por perfilometria, enquanto a energia de superfície e ângulo de contato foram obtidos pelo método da gota séssil em um goniômetro automatizado. Células osteoblásticas foram semeadas sobre amostras de titânio recobertas com o filme a plasma e controle e cultivadas para investigação da adesão e viabilidade celulares. Espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para avaliar modificações em algumas amostras de titânio após a deposição a plasma e a imersão em SBF. Os resultados mostraram melhora na bioatividade do material, sendo que a viabilidade de células osteoblásticas aumentou mais de 100% para uma amostra de titânio tratada por IIDIP a partir de vapor da solução de nitrato de cálcio. Esse aumento na viabilidade foi atribuído a elevados valores de rugosidade e energia de superfície. Para as amostras tratadas por IIDIP a partir de cálcio granulado, após a imersão em SBF, foram detectadas espécies como cálcio e fósforo sobre a superfície. Micrografias destas amostras mostram morfologias típicas de apatita, que foram confirmadas por XPS e DRX. Espectros de alta resolução de XPS revelaram picos de cálcio, fósforo e oxigênio ligados em apatita, e difratogramas de raios X mostraram picos de apatita cristalina. Tal estrutura foi observada em amostras de titânio com elevada rugosidade, baixo ângulo de contato e alta concentração de radicais OH.

Palavras-chave: Titânio, IIDIP, cálcio, bioatividade.

ABSTRACT

In this work Plasma Immersion Ion Implantation and Deposition, PIIID, technique was employed for deposition of calcium-containing films on titanium surfaces. The deposition parameters have been varied in search of conditions that would enhance the bioactivity of titanium surfaces as much as possible. Vapor of solution of calcium nitrate dissolved in isopropyl alcohol, or the sublimation of granulated metallic calcium were used as Ca precursors. The superficial modifications were investigated before and after soaking the samples in SBF. Particle-induced x-ray emission (PIXE), infrared reflectance/absorbance (IRRAS), x-ray photoelectron (XPS), x-ray diffraction (XRD) and energy-dispersive x-ray (EDS) spectroscopies were used to characterize the chemical composition and molecular structure of the films. The surface morphology was evaluated by scanning electron microscopy (MEV) and atomic force microscopy (AFM). The thickness of the films was measured by profilometry, while the surface energy and contact angle were assessed using the sessile drop method in an automated goniometer. Osteoblast cells was seeded on the coated titanium and controls and cultured to investigate cell adhesion and viability. Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS, was used to evaluate changes after plasma deposition and soaking in SBF. Osteoblast cells viability increased 100% in a titanium sample treated by PIIID from vapor of calcium nitrate solution. The increasing in cell viability has been ascribed to high values of roughness and surface energy. Calcium and phosphorous were detected in samples treated by PIIID from granulated calcium after soaking in SBF. Micrographs of those surfaces have revealed morphologies typical of apatite, which presence has been confirmed by XPS and XRD. High resolution XPS spectra have shown peaks of Ca, P and O in apatite, and XRD diffractograms have shown peaks of crystalline apatite. Such structure has grown on titanium samples with high roughness, low contact angle and high concentration of OH radicals.

Keywords: Titanium, PIIID, calcium, bioactivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Esquema ilustrando (a) hidroxilas e (b) os sítios positivamente carregados na superfície de titânio e titânio implantado com íons de cálcio	23
Figura 2.2 – Definição de ângulo de contato. Quando a gota está em equilíbrio, θ é dado por $\cos \theta = (\gamma_{sv} - \gamma_{sl}) / \gamma_{lv}$, onde γ_{lv} , γ_{sv} e γ_{sl} são as tensões superficiais nas interfaces líquido/vapor, sólido/vapor e sólido/líquido, respectivamente	29
Figura 2.3 – Tipos de interações entre um feixe de elétrons de um microscópio eletrônico e a amostra	31
Figura 3.1 – Fluxograma dos procedimentos experimentais	38
Figura 3.2 – Esquema ilustrativo da montagem experimental usada nos tratamentos por IIDIP a partir da vaporização de nitrato de cálcio dissolvido em álcool	40
Figura 3.3 – Esquema ilustrativo da montagem experimental usada na IIDIP a partir da sublimação de cálcio	41
Figura 3.4 – Imagem evidenciando a sublimação do cálcio em plasma de Ar	43
Figura 3.5 - Imagens ao microscópio invertido da cultura primária de células osteoblásticas após 4 dias. Ampliação de 200x.	49
Figura 4.1 – Espectro XPS do titânio sem tratamento	52
Figura 4.2 – Espectros XPS dos filmes depositados por IIDIP com $R_{Ca} = 70\%$, antes da imersão (a) e após (b) a imersão em SBF	53
Figura 4.3 – Micrografia eletrônica de varredura (a) superfície do titânio sem tratamento e titânio recoberto com o filme depositado com $R_{Ca} = 90\%$ antes (b) e após (c) imersão em SBF	55
Figura 4.4 – Espectros de EDS de (a) superfície do titânio sem tratamento e titânio recoberto com o filme a plasma com $R_{Ca} = 90\%$ antes (b) e após (c) imersão em SBF	55
Figura 4.5 – Espessura dos filmes depositados por IIDIP em função de R_{Ca}	56
Figure 4.6 - Espectros IRRAS dos filmes produzidos com diferentes R_{Ca} antes da imersão em SBF	57

Figura 4.7 – Diagramas de ângulo de fase e módulo de impedância de amostras de titânio sem tratamento por IIDIP antes (símbolos abertos) e após imersão em SBF por 14 dias (símbolos cheios)	58
Figura 4.8 – Diagramas de Ângulo de fase (a), (c) e (e) e Módulo de Impedância (b), (d) e (f) das amostras tratadas por IIDIP antes (representadas por quadrados) e após (representadas por estrela) a imersão em SBF	59
Figura 4.9 – Diagramas de Ângulo de Fase (a), (c) e (e) e Módulo de Impedância (b), (d) e (f) das amostras tratadas por IIDIP antes (representadas por quadrados) e após (representadas por estrela) a imersão em SBF	60
Figura 4.10 – Circuitos elétricos equivalentes usados para ajustar os resultados de impedância do titânio (a) sem tratamento a plasma e (b) tratados com diferentes RCa. RS: resistência do eletrólito; Cb: capacitância da camada barreira; Rb: resistência da camada barreira; Cp: capacitância da camada porosa; Rp: resistência da camada porosa	61
Figure 4.11 – Resistências da barreira (a) e dos poros (b) de amostras depositadas com diferentes RCa antes (quadrados) e após (círculos) a imersão em SBF	62
Figura 4.12 – Energia de superfície total e suas componentes polar e dispersiva antes (linha vermelha) e após (linha preta) a imersão em SBF de amostras recobertas com filmes depositados com diferentes RCa. Para o titânio como recebido as componentes polar, dispersiva e total são 6,3, 33,6 e 39,9 Dyn cm, respectivamente	64
Figura. 4.13 – Adesão de células osteoblásticas em superfícies de titânio modificadas por IIDIP em diferentes	64
Figura 4.14 – Viabilidade de células osteoblástica, após incubação por 24 horas, de amostras de titânio modificadas por IIDIP em diferentes RCa	65
Figura 4.15 – Viabilidade de células osteoblásticas em função da componente polar da energia de superfície	66
Figura 4.16 – Viabilidade de células osteoblásticas em função da rugosidade	66
Figura 4.17 – Espessura dos filmes depositados a partir da sublimação de cálcio granulado nas diferentes condições apresentadas na Tabela 1	68

Figura 4.18 – a) Imagem 3D de microscopia de força atômica e b) perfil topográfico da amostra de TiR2 tratada na condição D (Tabela 1)	69
Figura 4.19 – Espectros IRRAS dos filmes de cálcio depositados a partir da sublimação de cálcio granulado nas diferentes condições (Tab.1)	70
Figura 4.20 – Espectros IRRAS dos filmes de cálcio depositados a partir da sublimação de cálcio granulado nas condições a) C e b) D da Tabela 1.	71
Figura 4.21 – Espectros de XPS de alta resolução do a) Ca 2p, b) P 2p e c) O 1s da superfície do titânio recoberta com filme de cálcio por IIDIP após a imersão em SBF. Os pontos indicam os valores medidos, as curvas em verde representam as gaussianas usadas na deconvolução e as curvas em vermelho são as envoltórias das curvas de ajuste	72
Figura 4.22 – Porcentagens atômicas determinadas por XPS das superfícies de amostras de titânio com rugosidades R1 e R2 sem recobrimento e recobertas por IIDIP nas diferentes condições descritas na Tabela1 após a imersão em SBF	73
Figura 4.23– Porcentagens atômicas obtidas por EDS das superfícies de amostras de titânio com rugosidades R1 e R2 sem recobrimento e recobertas por IIDIP nas diferentes condições descritas na Tabela 1 antes da imersão em SBF	75
Figura 4.24 – Porcentagens atômicas obtidas por EDS das superfícies de amostras de titânio com rugosidades R1 e R2 sem recobrimento e recobertas por IIDIP nas diferentes condições descritas na Tabela 1 após a imersão em SBF	75
Figura 4.25 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) antes (coluna <i>a</i>) e após (coluna <i>b</i>) imersão em SBF	78
Figura 4.26 – Micrografias eletrônicas de varredura da amostra de titânio com rugosidade R2 modificada por IIDIP na condição A antes (<i>a</i>) e após (<i>b</i>) imersão em SBF	79

Figura 4.27 – Micrografias eletrônicas de varredura da amostra de titânio com rugosidade R2 modificada por IIDIP na condição B antes (<i>a</i>) e após (<i>b</i>) imersão em SBF	79
Figura 4.28 – Micrografia eletrônica de varredura de amostra de biovidro após imersão em SBF	80
Figura 4.29 – Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) modificadas por IIDIP na condição C antes (coluna <i>a</i>) e após (coluna <i>b</i>) imersão em SBF	81
Figura 4.30 – Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) modificadas por IIDIP na condição D antes (coluna <i>a</i>) e após (coluna <i>b</i>) imersão em SBF	82
Figura 4.31 - Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) modificada por IIDIP na condição E antes (coluna <i>a</i>) e após (coluna <i>b</i>) imersão em SBF	83
Figura 4.32 - Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 e R2 modificada por IIDIP na condição F antes e após imersão em SBF	84
Figura 4.33 - Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) modificada por IIDIP na condição G antes (coluna <i>a</i>) e após (coluna <i>b</i>) imersão em SBF	84
Figura 4.34 - Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) modificadas por IIDIP na condição H antes (coluna <i>a</i>) e após (coluna <i>b</i>) imersão em SBF	85
Figura 4.35 – Difratomogramas de DRX para amostras de titânio modificadas por IIDIP em diferentes condições (Tabela 1) após a imersão em SBF. Para comparação é apresentado o difratograma do titânio sem recobrimento e sem imersão em SBF	86

Figura 4.36 – Ângulo de contato das amostras de titânio com rugosidade R2 modificadas por IIDIP em diferentes condições (Tabela 1). Para comparação é apresentado o ângulo de contato do titânio como recebido

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de deposição dos filmes de cálcio sobre amostras de titânio	42
Tabela 2 – Composição química determinada com XPS antes e após a imersão das amostras em SBF	53

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

γ_{LV}	Tensão interfacial líquido/vapor
γ_{SL}	Tensão interfacial sólido/líquido
γ_{SV}	Tensão interfacial sólido/vapor
θ	Ângulo de contato/ângulo de espalhamento de DRX
ϕ	Ângulo de fase da EIE/função trabalho do espectrômetro de XPS
A	Condição de deposição – Tabela 1 (pag 42)
AFM	Microscopia de força atômica
Al	Alumínio
Al_2O_3	Óxido de alumínio
Ar	Argônio
B	Condição de deposição – Tabela 1 (pag 42)
C	Condição de deposição – Tabela 1 (pag 42)/Carbono
Ca	Cálcio
$CaCO_3$	Carbonato de cálcio
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Nitrato de cálcio tetrahidratado
$Ca_2(P_2O_7)$	Fosfato de cálcio
C_b	Capacitância da camada barreira
C_2H_2	Acetileno
CaO	Óxido de cálcio
CO_2	Dióxido de carbono
$Ca(OH)_2$	Hidróxido de cálcio
$CaTiO_3$	Titanato de cálcio
C_p	Capacitância da camada porosa
CPE	Elemento constante de fase
D	Condição de deposição – Tabela 1 (pag 42)/ Ciclo de trabalho do pulso de alta tensão
DMSO	Dimetil sulfóxido
DRX	Difração de raios X
E	Condição de deposição – Tabela 1 (pag 42)
E_b	Energia de ligação
E_c	Energia cinética

E_D	Componente dispersiva da energia de superfície
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
E_P	Componente polar da energia de superfície
E_S	Energia de superfície total
F	Condição de deposição – Tabela 1 (pag 42)
G	Condição de deposição – Tabela 1 (pag 42)
H	Condição de deposição – Tabela 1 (pag 42)
H_2O	Água
HPO_4^{2-}	Íon fosfato
HV	Condições do pulso de alta tensão
I_{DC}	Corrente para geração do plasma
I_{fil}	Corrente no filamento de tântalo
IIDIP	Implantação iônica e deposição por imersão em plasma
IIP	Implantação iônica por imersão em plasma
IRRAS	Espectroscopia de reflexão/absorção no infravermelho
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg	Magnésio
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio
N	Nitrogênio
Na	Sódio
O	Oxigênio
OH	Radical OH
P	Fósforo/pressão total
PECVD	Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition
pH	Medida de acidez e basicidade
PIID	Plasma Immersion Ion Implantation and Deposition
PIXE	Espectrometria de emissão de raios X induzida por partículas carregadas
p_f	Pressão de fundo
R1	Rugosidade de $0,8\mu m$
R2	Rugosidade de $6,5\mu m$
R_b	Resistência da camada barreira

R_{Ca}	Pressão parcial de vapor da solução de nitrato de cálcio dissolvido em álcool isopropílico
R_p	Resistência da camada porosa
R_s	Resistência do eletrólito
SBF	Solução corpórea simulada
SFB	Soro fetal bovino
Si	Sílicio
T	Temperatura do cadinho
t	Tempo de exposição ao plasma
Ti	Titânio
TiN	Nitreto de titânio
TiO ₂	Óxido de titânio
t _{off}	Intervalo entre pulsos
t _{on}	Tempo ligado dos pulsos
TiR1	Titânio com rugosidade de 0,8 μ m
TiR2	Titânio com rugosidade de 6,5 μ m
V _{DC}	Tensão para geração do plasma
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons de raios-x
Z	Impedância/ Número atômico

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	07
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	13
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Osteointegração/Bioatividade	20
2.2 Plasma	24
2.3 Tipos de Plasma	24
2.4 Implantação Iônica	25
2.5 Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma (IIDIP)	27
2.6 Técnicas de Caracterização	28
2.6.1 Energia de Superfície e Ângulo de Contato	28
2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva	30
2.6.3 Espectroscopia de Absorção/Reflexão no Infravermelho	32
2.6.4 Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X	33
2.6.5 Espectroscopia de Difração de raios X	33
2.6.6 Espectroscopia de Emissão de raios X Induzida por Partículas Carregadas	34
2.6.7 Impedância Eletroquímica	35
2.6.8 Perfilometria	36
2.6.9 Microscopia de Força Atômica	36
2.6.10 Adesão e Viabilidade Celulares	37
3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	38
3.1 Preparação das amostras	39
3.2 Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma a partir da vaporização de nitrato de cálcio dissolvido em álcool isopropílico	39
3.3 Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma a partir da sublimação de cálcio granulado	40
3.4 Preparação do Fluido Corpóreo Simulado, SBF	43
3.5 Caracterização dos Filmes	44

3.5.1	Ângulo de Contato e Energia de Superfície	44
3.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva	45
3.5.3	Espectroscopia de Reflexão/Absorção na Região do Infravermelho	46
3.5.4	Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X	46
3.5.5	Difração de raios X	46
3.5.6	Espectrometria de Emissão de raios X Induzida por Partículas Carregadas	47
3.5.7	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	47
3.5.8	Perfilometria	48
3.5.9	Microscopia de Força Atômica	48
3.5.10	Adesão e Viabilidade de Células Osteoblásticas	49
3.5.10.1.	Isolamento de Células Osteoblásticas	49
3.5.10.2.	Interação Célula Suporte	50
3.5.11.3.	Adesão e Viabilidade Celulares	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1	Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma a partir da vaporização de nitrato de cálcio dissolvido em álcool isopropílico	52
4.1.1	Composição Química: XPS	52
4.1.2	Morfologia e Composição Química: MEV e EDS	54
4.1.3	Composição Química: PIXE, IRRAS	56
4.1.4	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	57
4.1.5	Energia de Superfície	63
4.1.6	Cultura de Células Osteoblásticas	64
4.2.	Deposição a Plasma a partir da sublimação de cálcio granulado	67
4.2.1	Espessura: Perfilometria	67
4.2.2	Rugosidade e Topografia: perfilometria, AFM	68
4.2.3	Composição Química: IRRAS, XPS, EDS	69
4.2.4	Morfologia: MEV	77
4.2.5	Estrutura Cristalina: DRX	85
5	CONCLUSÕES	88
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

A perda de uma parte do corpo pode trazer além de prejuízos funcionais, traumas psicológicos e transtornos sociais. Hoje em dia o uso de próteses busca solucionar estes problemas, proporcionando uma melhor qualidade de vida. As próteses usadas na medicina e na odontologia devem apresentar boas propriedades físicas e químicas e não provocar a rejeição pelo organismo receptor. Após vários anos de estudo, o titânio e suas ligas se tornaram nos dias de hoje os materiais mais utilizados.

O titânio apresenta boas propriedades físicas e químicas, boa resistência a corrosão quando em contato com fluidos fisiológicos e é biocompatível. Apesar dessas excelentes propriedades, esse material não apresenta uma bioatividade ideal. Em outras palavras, o material não favorece o crescimento do osso diretamente ao seu redor, ou seja, ele é bioinerte. A capacidade do titânio nuclear e formar apatita, ou outros fosfatos de cálcio em contato direto ao osso espontaneamente em ambientes biológicos é praticamente desprezível (HANAWA; OTA, 1991; LIU et al., 2005; HANAWA, 1999). Para solucionar este problema, o titânio é comercialmente recoberto por uma camada bioativa de apatita pela técnica de plasma spray, entretanto a camada depositada apresenta baixa aderência ao metal (GARCIA-ALONSO et al., 2012; SERGO; SBAIZERO; CLARKE, 1997; GARCÍA-SANZ et al., 1997). Outra maneira de tornar o titânio mais bioativo é submetê-lo a tratamentos superficiais que sejam capazes de aumentar a taxa de produção espontânea de camadas de apatita quando ele é imerso em solução corpórea (SIOHANSI, 1987; RANGEL et al., 2011, HU et al., 2011). Neste sentido, a incorporação de cálcio na superfície do titânio tem apresentado bons resultados (HANAWA et al., 1997; °HANAWA et al., 1994; RANGEL et al., 2011; LIU et al., 2005; KIZUKI et al. 2010; KRUPA et al. 2007). Uma das técnicas utilizadas para a incorporação de cálcio é Implantação Iônica, que é uma técnica de alto custo e complicada, pois necessita que a amostra seja movimentada para que toda sua superfície seja tratada (ZIGLER, 1992). Além disso, mesmo com a movimentação, a homogeneidade não é garantida para amostras com geometrias complexas. Uma alternativa à implantação iônica convencional é a Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma (ANDERS, 2000), IIDIP, que também possibilita a incorporação de espécies como o cálcio, mas com algumas vantagens. Peças com geometrias complexas são tratadas em uma única etapa, desde que todas suas faces estejam expostas ao plasma. Portanto, tem-se uma diminuição no tempo de

tratamento e elimina-se a necessidade de manipulação da amostra. A instrumentação é mais simples do que a necessária para a implantação iônica convencional. Além disso, são produzidas camadas altamente aderentes ao substrato. O objetivo deste trabalho foi melhorar a bioatividade do titânio a partir do seu recobrimento com filmes de cálcio pela técnica de Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma.

A bioatividade foi investigada após a imersão das amostras durante 14 dias em um fluido corpóreo simulado, SBF (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). A morfologia da superfície antes e após imersão em SBF foi investigada por microscopia eletrônica de varredura, MEV e microscopia de força atômica, AFM. A espessura dos filmes depositados a plasma foi medida por perfilometria, enquanto a energia de superfície e ângulo de contato foram obtidos a partir do método da gota séssil em um goniômetro automático. A composição química dos filmes como depositados e dos filmes após imersão em SBF foram analisadas por espectroscopia de energia dispersiva, EDS, espectrometria de emissão de raios X induzida por partículas carregadas, PIXE, e espectroscopia de fotoelétrons de raios X, XPS, enquanto a estrutura química foi analisada por espectroscopia de absorção/reflexão no infravermelho, IRRAS, e difração de raios X, DRX. Foi avaliado também o efeito dos filmes depositados a plasma sobre o titânio no crescimento de células osteoblásticas. Espectroscopia de impedância eletroquímica, EIE, foi empregada para avaliar mudanças superficiais em um conjunto de amostras. Os resultados mostraram melhoras na bioatividade do titânio. Foi observado que após a imersão em solução corpórea simulada, houve a incorporação de espécies como cálcio, fósforo e oxigênio em algumas superfícies, que de acordo com as análises de XPS, MEV e DRX estão presentes na superfície formando espécies bioativas como apatita. Além disso, um dos tratamentos superficiais do titânio resultou em uma melhora de 100% na viabilidade de células osteoblásticas em comparação ao titânio sem tratamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta seção aborda resumidamente a história dos materiais metálicos aplicados em implantes e a busca das atuais modificações morfológicas e químicas da superfície do titânio para a melhora de sua bioatividade. Serão enfatizadas as técnicas a plasma utilizadas para a modificação de superfícies.

2.1 Osteointegração/Bioatividade

Existem relatos que desde a antiguidade a civilização já substituía partes do corpo perdidas, como dentes, por pedras preciosas, ouro e ossos de animais ou de cadáveres (RATNER et al., 1996; CESCHIN, 1984).

Com o passar dos séculos surgiram os implantes compostos de cromo, níquel e vanádio, óxido de alumínio e ligas de titânio. Entretanto muitos destes apresentam problemas quando implantados. Eles provocam danos significativos ao tecido, perda óssea e são de difícil remoção (ERIKSSON; ALBREKTSSON, 1983; MAHENDRA et al., 2009; WANG, OUYANG; POH, 2011).

Recentemente muitos estudos tem sido realizados em busca de materiais para implantes que apresentem uma boa interação com os tecidos ósseos estimulando sua integração ao organismo (LIU et al., 2005; SOUMYA et al, 2012; JOHN et al, 2002; UEDA et al., 2007). Esses materiais chamados de bioativos, ao contrário dos bioinertes como o titânio, interagem com os tecidos ósseos originando uma interface de apatita entre implante e osso. A camada de apatita promove uma conexão firme entre osso e implante. Esta conexão é chamada de osteointegração. Segundo estudos de Kokubo (1991) e Kokubo e Takadama (2006) o crescimento desta camada é primordial para que ocorra a osteointegração do material.

O termo “osteointegração” foi mencionado por Branemark et al. (1977) nos anos 70, embora nesta década ela não fosse bem aceita (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2005). Os dentistas acreditavam que um corpo estranho nunca seria bem ancorado pelo osso. Além disso, não se tinha bons resultados com as próteses implantadas. No começo dos anos 80 a

osteointegração começou a ser aceita. Em 1990, em trabalho de Albrektsson et al. (1990) foi demonstrado que os implantes ósseo-integrados não eram perdidos com o tempo e por isso sua remoção não era necessária como os implantes não ósseo-integrados.

A partir da década de 80 a escolha de um biomaterial começou a ser feita levando-se em consideração propriedades físicas e químicas como a composição do material, sua resistência à corrosão, resistência mecânica e biocompatibilidade, ou seja, o bom desempenho do material em uma determinada aplicação com uma resposta apropriada do organismo receptor (WILLIAMS, 1981; SOUZA et al., 2011; JURCZYK et al., 2011; DIAS et al., 2010).

A escolha do titânio para a maioria dos implantes ortopédicos e dentários é determinada por uma combinação altamente favorável dessas propriedades. Apesar das excelentes propriedades, a aplicação do titânio em próteses e implantes ainda é limitada. Embora biocompatível, ele não é um material ideal, do ponto de vista médico, por não ser capaz de se ligar diretamente a um tecido ósseo vivo. A capacidade do titânio nuclear e formar apatita (principal componente mineral do osso), ou outros fosfatos de cálcio, espontaneamente em ambientes biológicos é praticamente desprezível devido ser um material bioinerte (HANAWA; OTA, 1991; LIU et al., 2005; HANAWA, 1999). Quando implantado no organismo, ele é encapsulado por uma fina camada de tecidos fibrosos. Os tecidos ósseos crescem próximo ao metal, no entanto, a conexão direta entre osso e metal não acontece, existindo sempre a camada fibrosa entre osso e implante (Van NOORT, 1987; LIU; CHU; DING, 2004; KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

Na tentativa de solucionar este problema, existe atualmente uma intensa busca por modificações superficiais que resultem na melhora da bioatividade e consequente osteointegração do metal. Neste sentido, os procedimentos empregados podem ser divididos em duas classes: a) recobrimentos do metal com apatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e b) o aumento da taxa de produção espontânea de camadas de apatita, o principal componente mineral do osso, na superfície do metal após o processo de implantação no organismo. Este fosfato de cálcio apresenta biocompatibilidade e bioatividade superiores a qualquer outro material conhecido (HENCH; WILSON, 1993; GHOMI; FATHI; EDRIS, 2011).

As técnicas de deposição de apatita empregadas na primeira categoria incluem o “plasma spray” (YANG et al., 1997; ONG; CARNES; BESSHO, 2004; GARCIA-ALONSO et al., 2012; SINGH; SINGH; PRAKASH, 2011), laser e “magnetron *sputtering*” (WANG et al., 2000; BAGRATASHVILI et al., 1995; SURMENEV et al., 2011), sol-gel (LEE; AOKI, 1995; LI; GROOT; KOKUBO, 1996; CHOUDHURY; AGRAWAL, 2011; BUYUKSAGIS et

al., 2011), eletroforese (DUCHEYNE et al., 1986; ^bDUCHEYNE et al., 1990; ^aDUCHEYNE et al., 1990; ABDELTAWAB; SHOEIB; MOHAMED, 2011; WANG et al., 2002) e o chamado método biomimético (KOKUBO et al., 1991; PAZ et al., 2011; THAIR et al., 2011). Neste último caso, a apatita é precipitada a partir de uma solução com concentração iônica semelhante ao plasma sanguíneo e saturada com fosfato de cálcio.

Entre todas as técnicas de recobrimento com apatita, o “plasma spray” é a única utilizada comercialmente. Embora bons resultados clínicos tenham sido obtidos desta maneira, existem ainda vários problemas associados aos recobrimentos assim produzidos (KROON; FREEMAN, 1992; GEESINK; HOEFNAGELS, 1995; BLOEABAUM et al., 1994; OVERGAARD et al., 1995; GARCIA-ALONSO et al., 2012). De uma maneira geral, tais problemas são decorrentes do fato que a ligação entre a apatita e o metal é puramente mecânica, sem interação química entre os dois materiais. Consequentemente, os revestimentos se comportam como uma cerâmica frágil, apresentando baixa resistência à fadiga, delaminação e degradação em implantes por períodos prolongados (GARCÍA-SANZ et al., 1997; SERGO, SBAIZERO, CLARKE, 1999). As partículas liberadas no organismo podem causar problemas inflamatórios (NAGASE, NISHIYA, ABE, 1993). Além disso, o aquecimento (com temperaturas em torno de 1300° C) durante o processo de recobrimento decompõe a apatita, alterando sua bioatividade. Como os produtos desta decomposição são mais solúveis que a própria apatita, ocorre a dissolução e a biodegradação do recobrimento, expondo o metal ao fluido biológico e reduzindo a adesão entre a apatita e o metal. Esta adesão relativamente fraca tem restringido a aplicação em maior escala dos revestimentos (LIU et al., 2004). Por fim, foi observado que as mudanças que ocorrem no recobrimento quando imerso no fluido fisiológico são notavelmente aceleradas pela ação de esforços mecânicos cíclicos sobre o implante (REIS; MONTEIRO, 1996).

O processo de formação espontânea de fosfato de cálcio, quando o metal já está implantado no organismo, mencionado anteriormente como a segunda categoria, pode ser acelerado com um tratamento prévio do metal (KOKUBO; TAKADAMA, 2006; SOUZA et al., 2011; RANGEL et al. 2011; HU et al., 2011). Neste sentido, bons resultados têm sido obtidos com a implantação iônica. Alguns autores mostraram que a implantação de sódio ou cálcio em Ti puro acelera o processo de precipitação do fosfato sobre o metal mergulhado em solução fisiológica e que tal tratamento favoreceu o crescimento *in vivo* do tecido ósseo (MAITZ et al., 2002; ^cHANAWA et al., 1994; HANAWA; UKAI; MURAKAMI, 1993; HANAWA et al., 1995; ^dHANAWA; MURAKAMI; KIHARA, 1994; HANAWA et al.,

cálcio no fluido corpóreo próximo à superfície, aumentando o pH da solução e, consequentemente, a aceleração da precipitação de fosfato de cálcio sobre a superfície.

2.2 Plasma

O plasma é gerado quando energia em quantidade suficiente é fornecida a um gás ou vapor. Esta energia pode ser gerada de várias maneiras, como aumento de temperatura, compressão adiabática, feixes de partículas neutras e carregadas, etc. O método mais comumente usado é a aplicação de um campo elétrico (contínuo ou alternado) a um gás a baixa pressão. Elétrons e íons presentes no gás são acelerados pelo campo adquirindo altas energias cinéticas. Colisões inelásticas entre estas espécies e átomos e moléculas do gás dão origem a elétrons, íons positivos ou negativos e átomos e moléculas nos estados fundamental e excitados. A fase gasosa composta por estas espécies altamente reativas é chamada de plasma (YASUDA, 1985; CONRADS; SCHMIDT, 2000; FRIDMAN; KENNEDY, 2004).

Os estados excitados produzidos pela transferência de energia nas colisões são pouco estáveis e por isso os elétrons tendem a retornar aos estados iniciais, de menor energia, liberando a energia excedente na forma de luz (fótons). Por esta razão, o plasma é também chamado de descarga luminescente.

2.3 Tipos de Plasma

A modificação de materiais a plasmas pode ser usada para melhorar suas propriedades superficiais sem que suas propriedades volumétricas sejam alteradas. Existem diferentes processos a plasma que podem ser empregados para realizar tais modificações. Nesta seção serão descritos alguns deles: deposição a plasma, tratamento a plasma e ablação.

A deposição a plasma, comumente denominada PECVD (do inglês, *Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition*), ocorre quando se utiliza um gás orgânico na geração do plasma. Espécies reativas, geradas pela colisão de elétrons e íons com átomos e moléculas do gás, se recombinam entre si e com as superfícies expostas ao plasma originando um material sólido

que se deposita nas superfícies próximas ou em contato com a descarga (INAGAKI, 1996). Os materiais obtidos dessa maneira são conhecidos como polímeros a plasma. De maneira geral, os polímeros a plasma são altamente entrelaçados e ramificados (YASUDA, 1985) e os recobrimentos produzidos por este processo são utilizados, por exemplo, na fabricação de componentes eletrônicos, revestimentos antiaderentes e impermeabilizantes e na área biomédica em implantes e dispositivos para monitoramento médico (d'AGOSTINO, 1990; MARCIANO et al., 2010).

Quando a descarga elétrica é gerada em gases não polimerizáveis (inorgânicos), como por exemplo, hexafluoreto de enxofre, oxigênio, nitrogênio, amônia, vapor d'água ou uma combinação destes, ocorre apenas um tratamento superficial. Espécies energéticas do plasma interagem com a superfície criando sítios ativos ou radicais livres que podem se rearranjar entre si ou reagir quimicamente com espécies da atmosfera que envolve esta superfície (RANGEL; GADIOLI; CRUZ, 2004). O tratamento a plasma pode ser usado, por exemplo, na melhoria da biocompatibilidade de biomateriais (LUNA et al., 2011).

Quando ocorre a remoção de material de uma superfície exposta ao plasma, tem-se a ablação a plasma. A ablação pode acontecer através de processos químicos (“*etching*”) ou físicos (“*sputtering*”) (YASUDA, 1985). O “*sputtering*” acontece quando são usados gases inertes, como o argônio. Neste caso, a transferência de momento e energia, por impacto de íons pesados do gás, resulta na ejeção de átomos e fragmentos da superfície para a fase gasosa. Por outro lado, o “*etching*” ocorre quando reações químicas envolvendo espécies do plasma e da superfície resultam na formação de compostos voláteis.

As características físicas e químicas das modificações superficiais obtidas em um material submetido ao plasma dependem, além do tipo de gás utilizado, de parâmetros do processo como frequência e intensidade do sinal de excitação, fluxo e pressão dos gases e fatores geométricos do reator utilizado (YASUDA, 1985).

2.4 Implantação Iônica

A implantação iônica consiste na introdução de íons em camadas da superfície de um sólido pela exposição a íons energéticos. Esta introdução pode ser realizada pelas técnicas de implantação iônica convencional ou implantação iônica por imersão em plasma, IIP.

Na implantação iônica convencional, íons são selecionados por massa e energias iônicas, direcionados e bombardeados na amostra a ser tratada (ZIGLER, 1992). Esta técnica mostrou-se eficiente no aumento da bio-ativação da superfície do titânio pela implantação de espécies iônicas como Na, P e Ca (MAITZ et al., 2002; ^bPHAM et al., 2000; HANAWA et al., 1997). Entretanto este processo apresenta alguns problemas: o feixe iônico cobre uma área muito pequena do material, sendo preciso um sistema de varredura e manipulação para que todos os lados da amostra sejam bombardeados, mesmo com a manipulação, o bombardeamento pode não ser homogêneo. Além disso, em alguns casos é necessário um sistema de dissipação do calor gerado pela exposição ao feixe. Todas estas dificuldades tornam o processo de alto custo e demorado. Uma alternativa bastante conveniente em tais situações é a Implantação Iônica por Imersão em Plasma, IIIP.

Na IIIP, objetos com geometrias complexas podem ser tratados sem a necessidade de movimentação. O objeto a ser tratado é imerso em um plasma gerado a partir de gases inorgânicos como N₂, O₂, e Ar. Pulsos de alta tensão negativa, na faixa de 1 a 100 kV, são aplicados ao porta amostras. Os íons positivos do plasma são acelerados em direção à amostra e implantados. Esta técnica desperta mais interesse que a anterior para fins práticos devido à sua instrumentação mais simples, baixo custo e reduzido tempo de tratamento, sendo este independente do tamanho da peça. Na IIIP não existe a separação das massas e energias iônicas, permitindo que diferentes íons sejam implantados simultaneamente.

A IIIP é muito utilizada em indústrias de semicondutores para a introdução de átomos dopantes em materiais para alteração de seu comportamento elétrico (CONRAD, 2000). Ela também é utilizada para modificação de biomateriais. Estudos mostram que a implantação iônica de íons de nitrogênio em ligas de titânio é capaz de aumentar a resistência ao desgaste (CONRAD, 2000; SILVA et al., 2010; LIU; FU; CHU, 2008).

Tanto na implantação iônica convencional quanto na IIIP, dois eventos podem ocorrer quando os íons atingem o substrato. Um deles é a transferência de energia dos íons para espécies da amostra, causando modificações em sua estrutura química e, conseqüentemente, mudanças nas suas propriedades físicas e químicas. O segundo evento é a modificação na composição atômica do alvo devido ao alojamento do íon implantado no material, efeito este conhecido por dopagem.

2.5 Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma (IIDIP)

A Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma, IIDIP, é um processo que combina a IIP com a deposição a plasma. Neste processo ao invés de se utilizar um gás inorgânico como na IIP, é utilizado um composto orgânico ou o vapor de um metal.

Quando compostos orgânicos são utilizados no processo de IIDIP são produzidos filmes poliméricos como carbono amorfo hidrogenado e carbono tipo diamante, DLC. Estes filmes podem ter diversas aplicações: proteção contra corrosão (RANGEL et al., 2010), para melhorar propriedades antitrombogênicas de um material, aumentar a bioatividade e a biocompatibilidade de biomateriais (YANG et al., 2010; AMIN, 2012; LIU, 2011).

A introdução de um vapor metálico possibilita a deposição de multicamadas, como, por exemplo, camadas metálicas de Ti intercaladas com filmes poliméricos depositados a partir C_2H_2 e camadas de TiN (TIAN et al., 2001; ZENG; TIAN; CHU, 2003). Estas camadas são capazes de melhorar as propriedades mecânicas de metais e aumentar sua resistência à corrosão (OLIVEIRA et al., 2010; MELLO et al., 2010). A utilização de vapor de sódio e cálcio para incorporação destas espécies em titânio tem mostrado resultados interessantes com relação à bioatividade (MAITZ et al., 2002; LIU et al., 2005, CHU, 2007; RANGEL et al., 2011), entretanto poucas investigações foram realizadas neste sentido. Para a incorporação de cálcio, por exemplo, foi investigada somente a variação da tensão dos pulsos de alta tensão (LIU et al., 2005, CHU, 2007), mas nenhuma investigação foi feita em relação às variações das condições do plasma.

Na IIDIP durante a aplicação dos pulsos de alta tensão ao porta-amostras, espécies do plasma são implantadas da mesma maneira que na IIP. Todavia, no intervalo entre os pulsos um filme é depositado por PECVD. Desta maneira, a IIDIP modifica a camada sendo depositada e também a interface filme-substrato.

As propriedades dos filmes depositados por IIDIP dependerão das características do plasma (composição, pressão, potência, etc...) e do pulso de polarização. O ciclo de trabalho do pulso (ANDERS et al., 1995; ANDERS, 2000), D , é um importante parâmetro pois indica a contribuição das fases de implantação e deposição no processo IIDIP. Ele é definido como:

$$D = \frac{t_{on}}{(t_{on} + t_{off})} \quad (1)$$

sendo t_{on} o tempo ligado do pulso e t_{off} o intervalo entre os pulsos. Em amostras depositadas/bombardeadas com altos ciclos de trabalho, ou seja, com valores de t_{on} altos comparados a t_{off} , o processo de implantação será mais efetivo. Para baixos ciclos de trabalho, as propriedades do filme serão mais fortemente influenciadas pelas características do processo de deposição.

Além das vantagens já citadas acima da IIP, outro atrativo desta técnica é que ela modifica apenas as propriedades superficiais dos materiais, preservando suas características volumétricas. Além disso, ao contrário do recobrimento com apatita, não existe uma fronteira bem definida entre a região superficial modificada pelos íons e o corpo do material. Desta forma, são evitados problemas, como a delaminação e o descolamento, observados quando camadas são depositadas sobre a superfície com plasma spray, por exemplo.

2.6 Técnicas de Caracterização

2.6.1 Energia de Superfície e Ângulo de Contato

A energia de superfície ou tensão interfacial está relacionada a interações entre moléculas da superfície e moléculas do interior de um material. As moléculas do interior de um líquido, por exemplo, são ligadas a espécies vizinhas em todas as direções, resultando em um estado de menor energia potencial. Já as moléculas da superfície estão em contato com um gás ou sólido, mas não são ligadas, resultando em um estado de maior energia potencial. Em busca de um estado de menor energia, as moléculas da superfície são atraídas para o centro. Essa interação força as moléculas na superfície a se aproximarem, tornando a superfície mais densa. Esse efeito é conhecido como tensão interfacial de um líquido ou energia de superfície. Em um sólido as moléculas não tem mobilidade como no líquido. Logo para diminuir a tensão interfacial elas interagem com espécies do meio a sua volta. Quando deposita-se sobre a superfície de um material sólido um líquido consegue-se obter informações sobre sua molhabilidade através da interação sólido/líquido. Quanto maior a energia superficial do material, maior será sua interação com o líquido. Neste caso o líquido se espalha sobre a

superfície e o material é dito hidrofílico. Para baixas energias de superfície, a interação sólido/líquido é baixa e o material é hidrofóbico.

Fowkes (1964) propôs que a energia de superfície pode ser descrita como a soma de contribuições de interações dispersivas ou apolares (E_D) e não – dispersivas, também chamadas de polares, E_P (ARYEH, 1980). As componentes polares incluem todas as interações entre o sólido e o líquido, tais como dipolo - dipolo, dipolo induzido – dipolo, ligações de hidrogênio, etc.

Owens e Wendt (1969) e Kaelble (1970) estenderam a equação de Fowkes relacionando as componentes E_D e E_P através da média geométrica, possibilitando a estimativa da energia de superfície de um sólido.

A medida da molhabilidade de um material é determinada através do ângulo de contato, θ (ADAMSON; GAST, 1997). Este é definido como o ângulo entre o plano tangente a uma gota e a superfície que ela está depositada como ilustra a Figura 2.2.

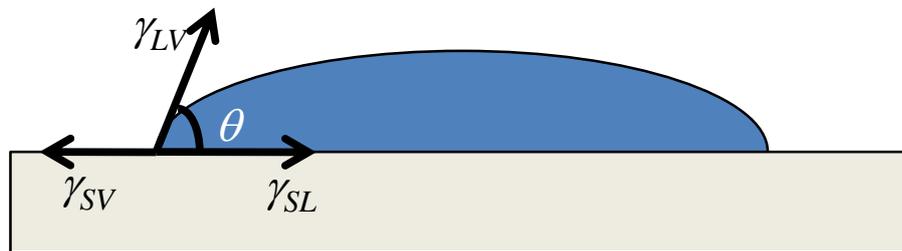


Figura 2.2 – Definição de ângulo de contato. Quando a gota está em equilíbrio, θ é dado por $\cos \theta = (\gamma_{sv} - \gamma_{sl}) / \gamma_{lv}$, onde γ_{lv} , γ_{sv} e γ_{sl} são as tensões superficiais nas interfaces líquido/vapor, sólido/vapor e sólido/líquido, respectivamente.

Quando se considera uma gota de um fluido em equilíbrio sobre um sólido, θ é definido pelas tensões superficiais resultantes das interações nas interfaces sólido-líquido, γ_{SL} , líquido-vapor, γ_{LV} , e sólido-vapor, γ_{SV} , como na Figura 2.2. O ângulo de contato é determinado a partir do balanço de forças devido a essas interações:

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

ou,

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (3)$$

que é conhecida como equação de Young.

O ângulo de contato é então dado por:

$$\theta = \cos^{-1} \frac{(\gamma_{SV} - \gamma_{SL})}{\gamma_{LV}} \quad (4)$$

As características de molhamento de uma superfície dependem do sólido e do líquido. θ é aproximadamente 0° para uma superfície que apresenta alta molhabilidade, $0 < \theta < \pi$ em superfícies com molhabilidade parcial e θ é igual a π em superfícies que não apresentam nenhuma molhabilidade.

2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva

Na microscopia eletrônica de varredura, MEV, um feixe de elétrons é acelerado em direção a superfície da amostra a ser analisada. Esses elétrons, altamente energéticos, interagem com átomos que compõe a amostra provocando a emissão de vários sinais, como ilustrados na Figura 2.3. Estes fornecem diferentes tipos de informações sobre a amostra (GOLDSTEIN et. al, 1992).

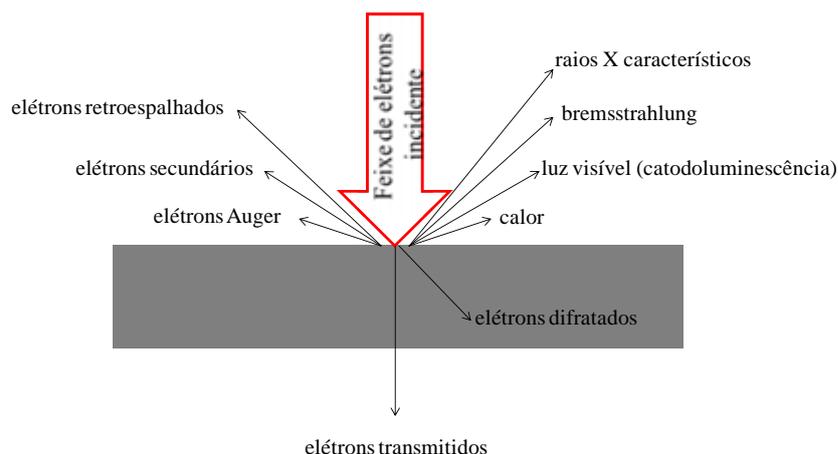


Figura 2.3 – Tipos de interações entre um feixe de elétrons de um microscópio eletrônico e a amostra

As imagens topográficas obtidas com MEV são produzidas através da emissão de elétrons secundários. A emissão desses elétrons da superfície de uma amostra depende do ângulo de incidência do feixe de elétrons. Ou seja, o sinal de elétrons secundários depende da ondulação da superfície da amostra. Tais elétrons são emitidos de uma fina camada da superfície devido às suas baixas energias. Deste modo, os sinais de elétrons secundários são considerados os mais adequados para se observar a topografia superficial.

A energia média dos elétrons retroespalhados é muito maior que a dos elétrons secundários e por isso eles carregam informações de camadas mais profundas da amostra. O número e a direção de espalhamento dos elétrons retroespalhados são determinados pela média do número atômico dos elementos que compõem o material e o ângulo de incidência do feixe. Deste modo, os diferentes contrastes nas imagens obtidas através da emissão de elétrons retroespalhados são resultado de diferentes elementos sobre a superfície.

Alguns microscópios eletrônicos de varredura dispõem de um espectrômetro por energia dispersiva para análise composicional.

A espectroscopia de energia dispersiva utiliza raios X para identificar os elementos presentes na superfície. Quando elétrons de alta energia incidem em uma amostra, diferentes interações podem ocorrer. Quando a energia do feixe é transmitida para a amostra, elétrons do átomo podem ser removidos de níveis de baixa energia e o átomo será ionizado. Para ocorrer a estabilização do átomo, um elétron de uma órbita de maior energia irá preencher o nível vazio e o excesso de energia será emitido como um fóton de raio X.

A identificação do átomo do qual o raio X foi emitido é feita a partir de uma relação simples entre o comprimento de onda λ dos raios X característicos emitidos por um elemento e seu número atômico Z (LIFSHIN, 1994):

$$Z \propto \lambda^{-1/2} \quad (5)$$

Deste modo, as energias (ou comprimentos de onda) podem ser utilizadas para identificar o elemento emissor da radiação.

2.6.3 Espectroscopia de Absorção/Reflexão no Infravermelho

A Espectroscopia de Absorção/Reflexão no Infravermelho, IRRAS, pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição química de uma amostra (PAIVA et al., 2010).

A região do infravermelho, de 200 a 12.500 cm^{-1} (50 a 0,8 μm), se situa no espectro eletromagnético entre as regiões das microondas e da luz visível, sendo que a faixa de 400 a 4.000 cm^{-1} (25 a 2,5 μm) abrange as frequências de vibração da maioria das ligações químicas. Por isso a IRRAS é uma técnica que possibilita a identificação da estrutura molecular de compostos.

As ligações químicas possuem frequências de vibração específicas correspondentes aos níveis de energia vibracionais. Tais frequências dependem da geometria molecular e das massas dos átomos. Uma amostra colocada em um espectrômetro infravermelho e exposta a diferentes comprimentos de onda absorve luz quando a frequência da radiação incidente corresponde à energia de vibração de uma dada ligação. Para que uma vibração apareça no espectro IRRAS, ou seja, para que ocorra a absorção da radiação, a molécula precisa sofrer uma variação no seu momento dipolar durante essa vibração. As frequências de ressonância podem ser relacionadas ao comprimento da ligação e às massas dos átomos em cada extremidade dela. Existem dois modos de vibração que envolve a variação nas distâncias interatômicas, o estiramento, e outro em que ocorre a modificação dos ângulos entre ligações ou entre ligações e um plano de referência. Este último caso é conhecido por deformação

angular. Na prática, a identificação das ligações moleculares é realizada a partir da comparação das frequências absorvidas com frequências tabeladas (SCHEINMANN, 1970).

2.6.4 Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X

A espectroscopia de fotoelétrons de raios X, XPS, também chamada de ESCA (*Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*), é uma técnica comumente usada em análises de superfícies. Ela fornece os elementos químicos presentes em camadas próximas à superfície e seus estados de ligação (CZANDERNA, 1989; NEFEDOV, 1988).

O princípio físico da XPS é baseado no efeito fotoelétrico (EISBERG, 1979). Um feixe de raios X com energia $h\nu$ conhecida irradia a amostra arrancando elétrons dos átomos de camadas próximas da superfície. Através da medida da energia cinética dos elétrons emitidos, E_c , a energia de ligação dos elétrons, E_b , pode então ser calculada pela equação:

$$E_b = h\nu - E_c - \phi \quad (6)$$

onde ϕ é a função trabalho do espectrômetro, um fator que corrige o ambiente eletrostático no qual o elétron é formado e medido. Como a energia de ligação é uma característica do orbital do qual o elétron foi emitido, sua determinação permite a identificação da espécie responsável pela emissão do elétron.

2.6.5 Espectroscopia de Difração de raios X

A difração de raio X, DRX, é uma técnica utilizada na investigação das fases cristalinas existentes em um material (CULLITY, 1956; CHUNG; SMITH, 2000). Nesta técnica um feixe de raios X, com comprimento de onda λ , incide na amostra e é espalhado por átomos de planos paralelos. Ocorre difração quando há interferência construtiva entre os raios espalhados. Esta condição será satisfeita quando a diferença do comprimento dos caminhos

entre raios X espalhados for igual a um número inteiro, n , de comprimento de onda, λ . A relação que demonstra esta condição é a equação de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin\theta \quad . \quad (7)$$

onde d é o espaço interplanar e θ é o ângulo de espalhamento.

O difratômetro é o equipamento usado para determinar o ângulo que a difração ocorre. A amostra é colocada sobre um eixo de rotação e é girada em relação ao feixe de raio X incidente. O feixe de raio X difratado é detectado por um detector que gira 2θ em relação ao ângulo do feixe incidente. Essa geometria é chamada de θ - 2θ . Outras configurações também podem ser usadas. Por exemplo, para análises de filmes finos comumente é fixado o ângulo do feixe incidente em pequenos ângulos ($<10^\circ$) e varia-se apenas o detector. Esta geometria é chamada de ângulo rasante. Colimados e filtros são incorporados nos difratômetros para produção de feixes bem definidos e focados.

A intensidade do feixe difratado é plotada em função do ângulo de difração, 2θ . Picos de alta intensidade são obtidos quando a condição de Bragg é satisfeita por algum conjunto de planos cristalográficos.

As fases cristalinas presentes em um difratograma são identificadas pela comparação dos espectros obtidos com fichas de padrões.

2.6.6 Espectroscopia de Emissão de raios X Induzida por Partículas Carregadas

Na análise de espectroscopia de emissão de raios X induzida por partículas carregadas, PIXE, a amostra a ser analisada é irradiada por íons energéticos, normalmente prótons, com energias de alguns MeV, derivados de aceleradores de alta voltagem. Quando estas espécies penetram no material, elas perdem sua energia gradualmente com a profundidade, até serem freadas. A perda de energia acontece principalmente através de colisões inelásticas com elétrons ligados, causando a excitação de elétrons de camadas mais internas de átomos do alvo. No processo de de-excitação, raios X característicos são emitido. Como os níveis de energia dos elétrons são quantizados e únicos, a medida da energia do raio X determina o

elemento. A intensidade do raio X de energia específica é proporcional a concentração de elemento correspondente na amostra.

2.6.7 Impedância Eletroquímica

A impedância é uma medida da habilidade de um circuito resistir a um fluxo de corrente elétrica (HALLIDAY, 1993). A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma técnica que permite a observação de alterações superficiais em um material após a deposição de um filme através de medidas de impedância. A superfície em que o filme é depositado é imersa em uma solução eletrolítica formando uma célula eletroquímica. A impedância eletroquímica é medida aplicando-se um potencial *ac* à célula eletroquímica e medindo-se a corrente através dela. Esta corrente pode ser analisada como uma soma de funções senoidais. A impedância é normalmente medida usando um pequeno sinal de excitação:

$$E_t = E_0 \text{sen}(wt) \quad (8)$$

onde E_t é o potencial no instante t , E_0 é a amplitude do sinal e $w=2\pi f$, sendo f a frequência de oscilação da corrente, normalmente medida em Hertz (Hz).

O sinal de resposta I_t tem uma diferença de fase (ϕ) e tem uma amplitude diferente, I_0 .

$$I_t = I_0 \text{sen}(wt + \phi) \quad (9)$$

Uma expressão análoga a lei de Ohm permite o cálculo da impedância do sistema:

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \text{sen}(wt)}{I_0 \text{sen}(wt + \phi)} = \frac{Z_0 \text{sen}(wt)}{\text{sen}(wt + \phi)} \quad (10)$$

A impedância é então expressa em termos de uma magnitude Z_0 , e uma fase ϕ .

Na maioria dos casos, para entender como a interface eletrodo/solução se comporta, a resposta *ac* da célula eletroquímica é descrita por gráficos, circuitos equivalentes ou por equações cinéticas que levam às funções de impedância (BOUKAMP, 1989).

As representações gráficas normalmente utilizadas para as análises são os diagramas de módulo de impedância e ângulo de fase que são plotados em função da frequência.

Quando se utiliza um circuito elétrico, uma vez escolhido o circuito que melhor descreve o processo, pode-se relacionar as propriedades físicas ou químicas do material com elementos do circuito e extrair valores numéricos de todos estes elementos através de simulações dos dados experimentais (BOUKAMP, 1989).

2.6.8 Perfilometria

Medidas de espessura de filmes são comumente realizadas em um equipamento denominado Perfilômetro. Neste equipamento uma ponta de diamante se desloca sobre a superfície de uma amostra, que deve conter um degrau, e ao encontrar a interface filme-substrato desloca-se verticalmente. Sinais elétricos correspondentes ao movimento da ponta são produzidos por um sensor acoplado a ela, proporcionalmente à mudança de posição. Este sinal analógico é convertido para um formato digital. O sinal digital resultante é analisado em um computador que fornece o valor da espessura.

2.6.9 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica, AFM, permite obter imagens reais da topografia de superfícies, em três dimensões, em escala atômica (BOWEN; HILAL, 2009).

Na AFM, uma sonda de dimensões atômicas é montada sobre um braço em movimento o qual percorre a amostra a ser analisada. À medida que a ponta se aproxima da superfície ocorrem deflexões do braço que são causadas pelas interações entre os átomos da sonda e da amostra. A sonda de AFM segue os contornos da superfície. Durante o deslocamento da ponta o computador analisa, em cada ponto, a força de interação entre a ponta e a amostra e traça o diagrama das alturas, construindo a topografia.

A técnica de AFM pode operar em dois modos de forças distintas: não-contato e contato. No modo de não-contato, a separação entre a ponta e a superfície da amostra é da

ordem de 10 a 100 nm. Com separações menores, da ordem de Å, a ponta está em contato com a superfície da amostra.

2.6.10 Adesão e Viabilidade Celulares

As análises de adesão e viabilidade celulares podem ser realizadas pelo método de oxidação metabólica do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio). O MTT é uma substância amarelada solúvel em água.

As mitocôndrias de células vivas aderidas sobre as amostras a serem analisadas, por meio da enzima succinato dehidrogenase, são capazes de reduzir o MTT convertendo-o em um composto insolúvel em água, o formazan, o qual é solubilizado pelo DMSO (dimetil sulfóxido) (IGNATIUS; CLAES, 1996). A quantidade de formazan produzida é medida por espectrofotometria e é diretamente proporcional a atividade metabólica e ao número de células vivas.

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A Figura 3.1 mostra o fluxograma dos procedimentos experimentais adotados.

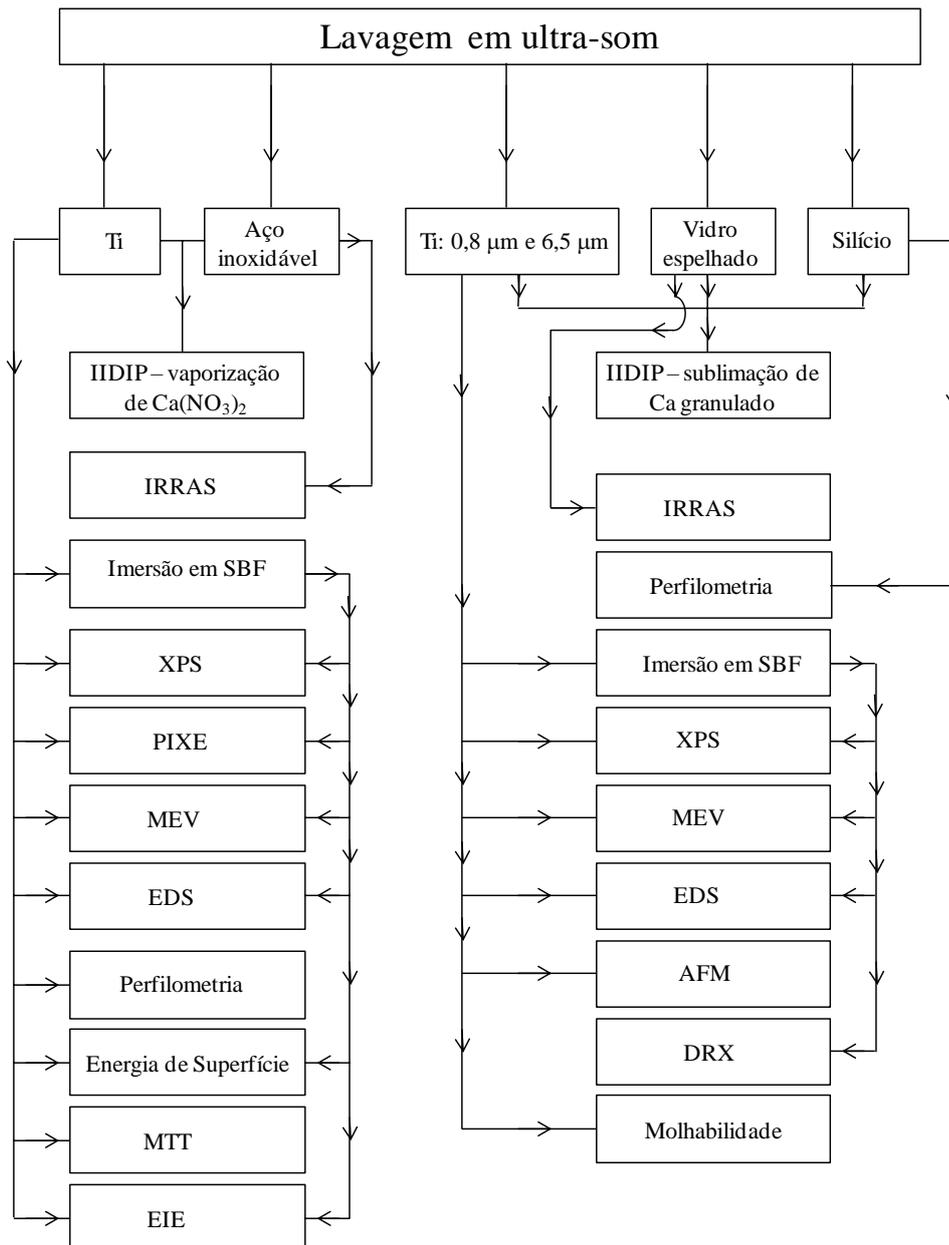


Figura 3.1 – Fluxograma dos procedimentos experimentais.

3.1 Preparação das amostras

Antes da realização da deposição dos filmes, as amostras de titânio comercial puro grau 2 (ASTM F67-Gr2 e ISO 5832-2) foram limpas em ultra-som com acetona, água e álcool e secadas em estufa a aproximadamente 60°C. Toda a manipulação das amostras foi realizada com luvas e máscara.

Foram utilizadas amostras de titânio polido e aço inox polido para a realização da IIDIP a partir da vaporização de nitrato de cálcio dissolvido em álcool isopropílico (Seção 3.2). As análises de IRRAS foram realizadas nas amostras de aço inox, enquanto as demais análises foram realizadas nas próprias amostras de titânio.

Para a IIDIP a partir da sublimação de cálcio granulado (Seção 3.3) foram utilizadas amostras de titânio com duas rugosidades diferentes. As rugosidades, $R1 = 0,80 \mu\text{m} \pm 0,08 \mu\text{m}$ e $R2 = 6,5 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$, foram obtidas pelo jateamento das amostras com pó de óxido de alumínio com granulometria média de 250 e 600 μm , respectivamente. Amostras de vidro espelhado e silício foram utilizadas para análise da estrutura química (IRRAS) e espessura (perfilometria), respectivamente. Para as demais análises foram utilizadas as amostras de titânio.

3.2 Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma a partir da vaporização de nitrato de cálcio dissolvido em álcool isopropílico

Nesta seção foi utilizado nitrato de cálcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, P.A. da ECIBRA para a deposição dos filmes.

Para a realização da IIDIP foi utilizado o sistema ilustrado na Figura 3.2 do Laboratório de Plasma Tecnológico da Unesp de Sorocaba. Ele é constituído por câmara de aço inoxidável, com formato cilíndrico, com dois eletrodos internos circulares também de aço inoxidável, dispostos paralelamente, sendo que o eletrodo inferior também é usado como porta amostras. A amostra foi exposta diretamente a um plasma estabelecido com a aplicação de radiofrequência (RF, 13,56 MHz, 100 W) ao eletrodo superior em atmosfera de argônio e vapor de uma solução de $1,27 \times 10^{-2}$ mol de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 10 ml de álcool isopropílico.

Pulsos negativos de 2400 V com frequência de 300 Hz e tempo ligado do pulso de 30 μ s foram aplicados ao porta amostras usando uma fonte de tensão GBS- Elektronik GmbH. A pressão parcial do vapor, R_{Ca} , na alimentação dos gases foi variada de 50 a 100% enquanto a proporção de argônio foi variada no sentido oposto para que a pressão total fosse mantida constante em 5,71 Pa. O tempo de deposição foi de 360 segundos em todos os experimentos. Estas condições foram selecionadas após testes preliminares.

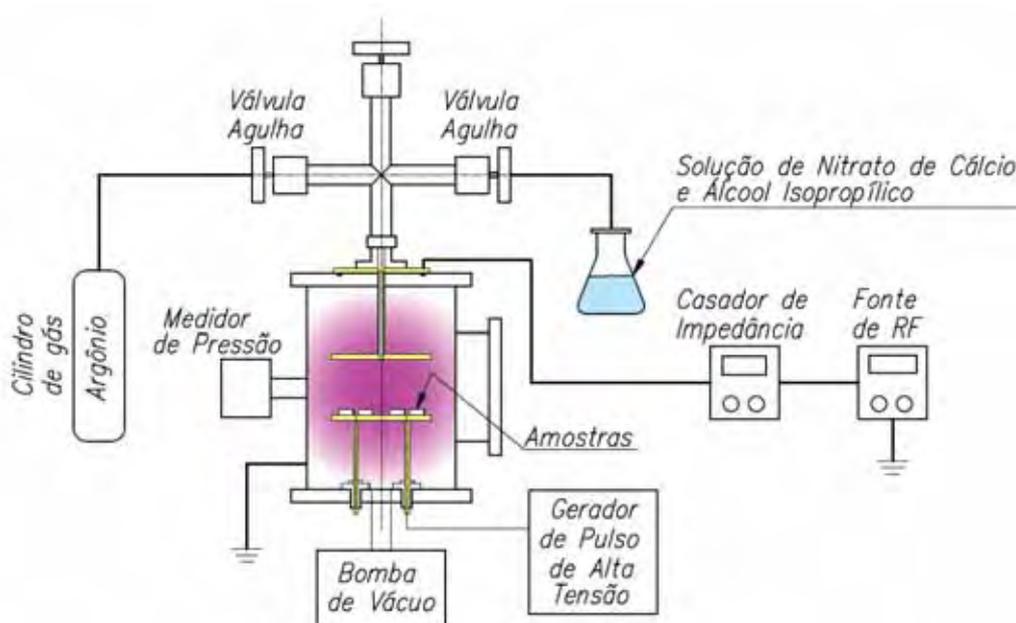


Figura 3.2 – Esquema ilustrativo da montagem experimental usada nos tratamentos por IIDIP a partir da vaporização de nitrato de cálcio dissolvido em álcool.

3.3 Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma a partir da sublimação de cálcio granulado

A IIDIP a partir da sublimação de cálcio foi realizada em colaboração com o Laboratório Associado de Plasma/INPE.

Foi utilizado cálcio granulado (Merck KGaA) com tamanho de partículas de 2 a 6 mm.

O esquema do sistema utilizado para a deposição dos filmes de cálcio é mostrado na Figura 3.3 (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2008). Ele é constituído de uma câmara de vácuo de aproximadamente 60 litros com um cadinho, onde é colocado o cálcio

granulado. Este cadinho é aquecido por elétrons emitidos por um filamento de tântalo, cuja corrente é controlada por um Variac. O porta amostras fica na parte superior da câmara e as amostras são montadas voltadas para baixo. O plasma é gerado em atmosfera de argônio e vapor de cálcio pela aplicação de uma diferença de potencial DC entre o cadinho e as paredes da câmara, que são refrigeradas a água. Pulsos de alta tensão negativa são aplicados no porta amostras. Desta maneira, durante o tempo ligado do pulso, íons positivos do plasma são implantados, enquanto no tempo desligado, a superfície é recoberta por um filme do metal.

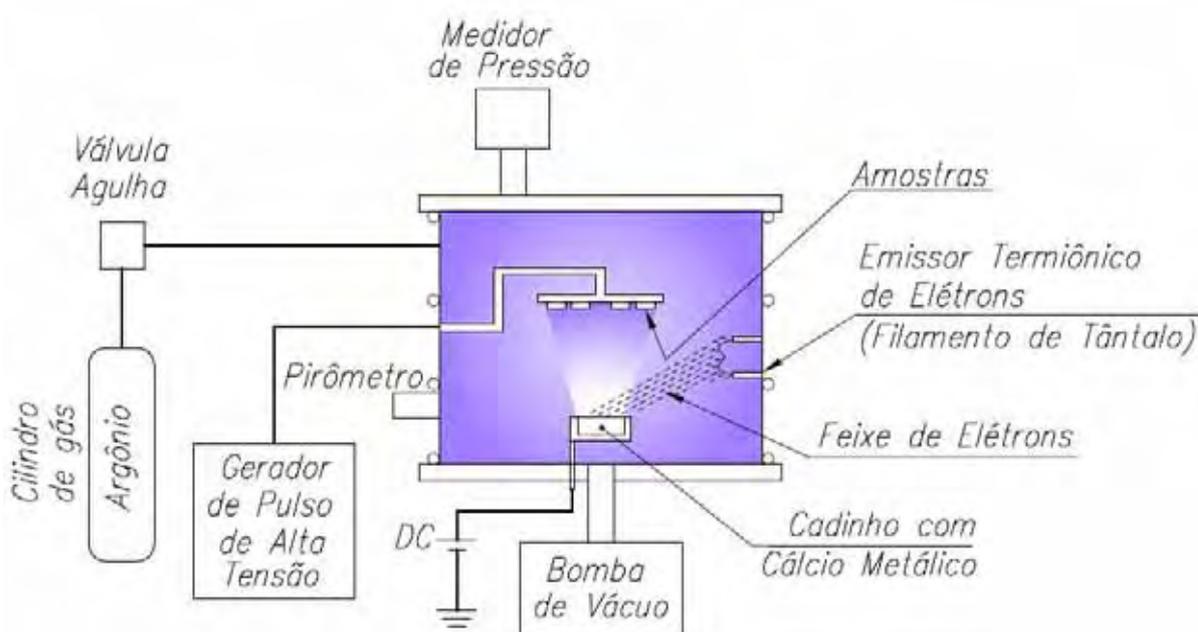


Figura 3.3 – Esquema ilustrativo da montagem experimental usada na IIDIP a partir da sublimação de cálcio.

A Tabela 1 mostra as diferentes condições de deposição para cada amostra. Nela, p_f é a pressão de fundo atingida antes da admissão de Ar e da sublimação do Ca; P é a pressão total durante a deposição; I_{fil} é a corrente no filamento de tântalo; V_{DC} e I_{DC} são a tensão e a corrente usadas para geração do plasma; T é a temperatura do cadinho; t é o tempo de exposição ao plasma, HV são as condições do pulso de alta tensão (tensão, ciclo de trabalho e frequência).

Tabela 1 – Condições de deposição dos filmes de cálcio sobre amostras de titânio

Deposição A – $p_f = 1,2 \times 10^{-2}$ Pa						
P ($\times 10^{-1}$ Pa)	I_{fil} (A)	V_{DC} (V)	I_{DC} (mA)	T (° C)	t (s)	HV (kV/ μ s/Hz)
3,3	9,6	80	280	718	120	desligado
3,3 a 2,1	9,6 a 9,9	80	280 a 1000	607 a 498	2280	5/20/250
Deposição B – $p_f = 3,3 \times 10^{-3}$ Pa						
1,7 a 1,2	10,4	160	400	605 a 480	2400	5/30/400
Deposição C – $p_f = 5,3 \times 10^{-3}$ Pa						
6,3 a 4,4	12,2 a 13,5	80	560	520 a 500	1500	4/30/400
4,1 a 4,0	13,6	80	560	499	900	5/30/400
Deposição D – $p_f = 5,3 \times 10^{-3}$ Pa						
2,0 a 2,1	16,3	120	320	600	1500	5/30/400
Deposição E – $p_f = 6,0 \times 10^{-3}$ Pa						
7,1	13 a 13,9	120	680 a 920	655 a 515	900	5/30/400
Deposição F – $p_f = 5,1 \times 10^{-3}$ Pa						
1,7 a 3,7	13,2	60	1440 a 1600	684 a 509	420	5/30/400
Deposição G – $p_f = 4,9 \times 10^{-3}$ Pa						
7,7	15,1	*X	*X	670	300	5/30/400
1,7 a 3,5	15,2	80	1040 a 1400	730 a 538	420	5/30/400
3,5	15,1	80	1400	538	60	desligado
Deposição H – $p_f = 1,7 \times 10^{-2}$ Pa						
1,6 a 1,0	10,1	240	160	561 a 454	1500	8/30/400

* X significa que variou continuamente durante o processo.

A primeira temperatura indicada na tabela 1 nas deposições A, B, C, D, E e F corresponde à temperatura na qual começou-se a observar a sublimação do cálcio como na situação ilustrada na Figura 3.4. Em alguns casos esta temperatura precisou ser diminuída para a estabilização do plasma.

Na deposição G, quando a temperatura atingiu 670° C a sublimação ainda não era visível e, mesmo assim, o pulsador foi ligado. Após 5 minutos, a sublimação tornou-se evidente. Transcorridos 12 minutos de deposição com pulso, o pulsador foi desligado e

somente a deposição foi mantida durante mais 1 minuto. Isto foi feito numa tentativa de estabilização do plasma.

Na deposição H todo o processo foi realizado sem visualizar a sublimação do Ca. Apenas esperou-se que a temperatura de 560° C fosse atingida para se ligar o pulsador. Esse procedimento foi adotado para verificar se existia vapor de cálcio mesmo quando a luz mais intensa não é observada.

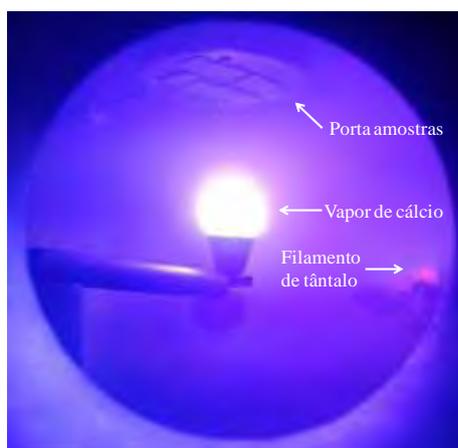


Figura 3.4 – Imagem evidenciando a sublimação do cálcio em plasma de Ar.

3.4 Preparação do Fluido Corpóreo Simulado, SBF

O fluido corpóreo simulado foi preparado segundo metodologia desenvolvida por Kokubo e Takadama (2006). Esta solução apresenta pH (7,2-7,4) e concentrações iônicas similar ao sangue. As espécies iônicas presentes no SBF são: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} .

As amostras imersas em SBF foram mantidas em estufa a 37° C durante 14 dias. Após este período, as amostras foram lavadas com água deionizada e colocadas para secar em um frasco hermético com sílica gel. As amostras permaneceram todos os dias na mesma solução conforme realizado em trabalho de Kokubo e Takadama (2006).

3.5 Caracterização dos Filmes

Após a retirada do reator e da imersão no fluido corpóreo simulado, as amostras eram armazenadas individualmente em sacos zip para serem submetidas posteriormente a processos de caracterização. As análises de ângulo de contato, energia de superfície, espessura, espectroscopia de absorção no infravermelho, IRRAS, e microscopia de força atômica, AFM, foram realizadas no próprio Laboratório de Plasmas Tecnológicos. A microscopia eletrônica de varredura, MEV, e análises da composição química por Espectroscopia de Energia Dispersiva, EDS, foram realizadas com a colaboração do Laboratório de Materiais do grupo Schaeffler e do grupo de IIP do Laboratório de Plasma/INPE. A análise de Espectrometria de Emissão de Raios-x Induzida por Partículas Carregadas, PIXE, foi realizada no Laboratório de Análises de Materiais por Feixes Iônicos, LAMFI, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo em colaboração com o professor Manfredo Tabacniks. A espectroscopia de Fotoelétrons de raios X, XPS, foi realizada com a colaboração do professor Wido H. Schreiner, do Laboratório de Superfícies e Interfaces, do Departamento de Física da Universidade Federal do Paraná. As análises de difração de raios X foram realizadas no Laboratório de Filmes Finos e Materiais da Universidade Estadual de Londrina em parceria com o professor Alexandre Urbano. Os testes de viabilidade e crescimento celular foram realizados no Laboratório de Biomateriais, da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, com a colaboração da professora Eliana Duek e de André Dutra Messias. As análises de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica foram realizadas com colaboração das professoras Eliziane de Souza e Célia Marina Freire do Laboratório de Engenharia de Corrosão do Departamento de Engenharia de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica – Unicamp.

3.5.1 Energia de Superfície e Ângulo de Contato

As medidas de ângulo de contato e energia de superfície apresentadas neste trabalho foram obtidas usando um Goniômetro Ramé-Hart 100-00. Este equipamento é constituído por uma plataforma móvel com parafusos de nivelamento onde a amostra é colocada, uma seringa

capaz de produzir gotas com volumes da ordem de 0,2 μl , um sistema de iluminação com fibra ótica, uma câmera CCD e um microcomputador que processa a imagem da gota captada pela câmera, através de um programa dedicado (RHI 2001 Imaging). Para a investigação da molhabilidade dos filmes é medido o ângulo de contato para água deionizada, enquanto para a determinação da energia de superfície, pelo método da média geométrica, os líquidos usados são água deionizada e diiodometano (ADAMSON; GAST, 1997; FOWKES, 1964; ARYEH, 1980; OWENS; WENDT, 1969; KAELBLE, 1970).

Os valores de ângulo de contato e da energia de superfície apresentados correspondem à média aritmética de 30 medidas. Foram analisadas três gotas para cada líquido em três diferentes regiões da superfície. Para cada gota foram realizadas 10 medidas.

Para a realização desta análise foram utilizadas amostras de titânio.

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva

Análises da microestrutura das amostras antes e após a imersão em SBF foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (GOLDSTEIN et al., 1992). Para os filmes depositados segundo as condições descritas da seção 3.2 esta análise foi realizada em um microscópio Oxford Instruments – INCA – X-SIGHT. Um espectrômetro de energia dispersiva, Oxford Instruments - EDS 6650, acoplado ao microscópio foi usado para análise composicional das amostras. A distância entre o detector e a amostra foi de 10 mm e a energia do feixe de elétrons de 20 keV. As micrografias foram obtidas através da emissão de elétrons retroespalhados e secundários, sendo que a energia do feixe de elétrons, HV, e a ampliação, mag, são dadas na parte inferior de cada micrografia.

Para as análises dos filmes depositados de acordo com a seção 3.3, foi utilizado o microscópio JEOL – JSM – 5310. A distância entre o detector e a amostra foi de 25 mm. A energia do feixe de elétrons usada para a análise de EDS foi de 5 kV. Foi utilizada uma ampliação de 100X, a qual corresponde uma área analisada de 1 mm^2 . As imagens foram obtidas a partir da emissão de elétrons secundários. A energia do feixe de elétrons incidente na amostra foi de 20 kV.

Para estas análises os filmes foram depositados sobre amostras de titânio.

3.5.3 Espectroscopia de Reflexão/Absorção no Infravermelho

A identificação de elementos químicos e da estrutura química das amostras foram realizadas por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (PAVIA et al., 2010), com um Espectrômetro Jasco FTIR-410.

Para esta análise, como as medidas eram realizadas usando-se um acessório de reflexão especular, os filmes foram depositados sobre amostras refletoras como aço inox polido, titânio polido ou espelho. Os espectros resultantes foram obtidos a partir da adição de 128 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} .

3.5.4 Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X

Para a realização das análises por XPS (NEFEDOV, 1988) foi utilizado o espectrômetro Microtech - ESCA 3000, constituído por uma câmara de vácuo, uma fonte de raios-x e um analisador de energia semi-hemisférico. Os experimentos foram conduzidos sobre uma pressão de base de 10^{-8} Pa usando radiação $\text{MgK}\alpha$ com aproximadamente 0,8 eV de resolução. Espectros de alta resolução foram calibrados em relação à energia do pico de carbono 1s em 284,6 eV e ajustados por Gaussianas. Foram analisados filmes depositados sobre titânio.

3.5.5. Difração de raios X

Neste trabalho, análises por DRX (CULLITY, 1956; CHUNG; SMITH, 2000) foram realizadas em um equipamento Panalytical – X'Pert PRO MPD, com tubo de cobre, monocromador de grafite e detector de ionização.

Foram usadas diferentes geometrias para a análise de cada amostra em busca de maiores informações de cada superfície. Os espectros apresentados foram obtidos a partir de

três geometrias distintas, as quais mostraram mais claramente a estrutura das superfícies. Em todas as situações as amostras permaneceram fixas e a fonte de raios-x operou em 40 kV e 50 mA.

Na primeira configuração foi utilizado o modo θ - 2θ , no qual a fonte de raios-x percorre uma faixa angular em torno da amostra. A velocidade do goniômetro foi de $0,05^\circ \text{ s}^{-1}$. Nesta configuração foi utilizado um monocromador de grafite. A amostra analisada nesta configuração foi a tratada na condição A (Tabela 1).

Na segunda e terceira configurações o ângulo de incidência de raios-x foi fixo (de 2° a 10° dependendo da amostra) e a velocidade do goniômetro foi de $0,006^\circ \text{ s}^{-1}$. Na segunda configuração (para as amostras tratadas nas condições B, E e G da Tabela 1) foi usado um monocromador de grafite enquanto na terceira (amostras da condição D, da Tabela 1) foi usado um filtro de níquel e um colimador de placas paralelas.

3.5.6 Espectrometria de Emissão de raios X Induzida por Partículas Carregadas

Para as análises de PIXE (JOHANSSON; CAMPBELL; MALMQVIST, 1995) as amostras foram irradiadas com feixe de He^+ com energia de 2,2 MeV. As amostras foram posicionadas com uma inclinação de 7° em relação ao feixe incidente. O detector de raios-x, tipo Si-Li, foi posicionado a 90° em relação ao feixe e detector de partículas. A carga acumulada em cada espectro foi de aproximadamente $10 \mu\text{C}$.

3.5.7 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Os experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) (MARCUS; MANSFELD, 2005) foram realizados usando um amplificador lock-in (Modelo 5210, EG & G Instrument) acoplado a um potenciostato/galvanostato (Modelo 273A, EG & G PAR), que foi conectado a uma célula eletroquímica de três eletrodos. As amostras de titânio da seção 3.2 tratadas por IIDIP, antes e após imersão em SBF, e não tratadas foram utilizadas como

eletrodo de trabalho, uma folha de platina foi usada como contra eletrodo e um eletrodo de calomelano foi usado como referência. Medidas de EIE foram obtidas em potencial de circuito aberto usando como eletrólito SBF. A frequência foi variada de 100 kHz a 10 mHz, com uma amplitude de sinal de 10 mV.

3.5.8 Perfilometria

As medidas de espessura dos filmes foram realizadas no perfilômetro Veeco Dektak 150. Antes da exposição ao plasma, uma fita adesiva de Kapton (5413, 3M) foi fixada em um dos lados do substrato. Após a deposição, a fita foi retirada criando um degrau na superfície. A ponta de diamante do equipamento se move em contato com a superfície da amostra e, ao encontrar o degrau, desloca-se verticalmente. O deslocamento vertical da ponta corresponde à espessura do filme.

Os valores de espessura apresentados correspondem à média aritmética de 9 medidas realizadas em diferentes posições da amostra.

Estas análises foram realizadas em amostras de titânio polido ou silício.

3.5.9 Microscopia de Força Atômica

A topografia da amostra de titânio com rugosidade R2 tratada a plasma na condição D (Tabela 1) foi avaliada por microscopia de força atômica (BOWEN; HILAL, 2009), AFM, em ar usando um microscópio XE-100 Park Systems. A imagem 3D foi adquirida no modo de não contato com 512 x 512 pixels. Uma ponta de silício de raio de 5 nm foi montada em uma alavanca com frequência de ressonância ≥ 200 kHz.

3.5.10 Adesão e Viabilidade de Células Osteoblásticas

3.5.10.1 Isolamento de Células Osteoblásticas

A Figura 3.5 mostra a imagem referente a cultura primária de células osteoblásticas que foi obtida a partir de digestão enzimática de calvárias de ratos Wistar com 20 dias de idade, de acordo com Bellows et al. (1986, 1988) e Oréfice, Pereira e Mansur (2006). Para isso, seis ratos foram sacrificados, sendo realizada a tricotomia da região cranial, na qual se fez uma incisão que permitiu a retirada das calotas cranianas. Estas foram imersas em meio de cultura DMEM com concentrações maiores de antibiótico e antimicótico, 150 µg/ml de gentamicina e 15 µg/ml de anfotericina B, respectivamente. O perióstio e tecidos moles adjacentes foram retirados. A calota foi fragmentada e submetida à digestão enzimática com 1 mg/ml de collagenase tipo IA em DMEM em três etapas de 2 horas cada a 37° C sob agitação. Ao término de cada etapa o meio com a suspensão celular foi pipetado e transferido a outro tubo que foi centrifugado e ressuspensionado três vezes por 10 minutos a 1.200 rpm. As células foram semeadas a uma concentração de 10⁵ cel/ml em DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os frascos de cultivo foram mantidos em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C. O meio de cultura foi trocado 3 vezes por semana e os subcultivos foram realizados com tripsina EDTA 0,25% quando os frascos atingiram cerca de 80% de confluência.



Figura 3.5 - Imagens ao microscópio invertido da cultura primária de células osteoblásticas após 4 dias. Ampliação de 200x.

3.5.10.2 Interação Célula-Suporte

Os experimentos para avaliar a interação entre as amostras e células osteoblásticas foram realizados em placas de cultura de poliestireno de 24 poços (TPP – Techno Plastic Products, Suíça). As amostras metálicas foram colocadas nos poços e imersas em meio de cultura DMEM e mantidas na estufa de cultura a 37° C por 24 horas antes da semeadura de acordo com as normas ISO (ISO 10993-5, 1992).

3.5.10.3 Adesão e Viabilidade Celulares

Para os testes de adesão e viabilidade celulares foi utilizado o método de oxidação metabólica do MTT (MOSMANN, 1983). Foram utilizadas seis amostras para cada teste. Uma concentração de 2×10^4 cel/ml foi semeada sobre as superfícies metálicas e controle (poliestireno da própria placa de cultivo) em DMEM com 10% de SFB. Sendo posteriormente incubadas. A incubação das amostras recobertas por IIDIP a partir da vaporização da solução de nitrato de cálcio foi durante 2 e 24 horas em estufa (5% de CO₂ a 37° C), para avaliar adesão e viabilidade celulares, respectivamente. Após o tempo de cultivo o meio foi retirado e os poços lavados 3 vezes com tampão PBS a 0,1M. Após a lavagem, foi adicionado a cada poço, 2 ml de DMEM contendo 0,2 ml de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio, MTT (5 mg/ml), seguindo-se um período de incubação de 4 horas a 37° C. Após esse tempo, o sobrenadante foi substituído por 2 ml de dimetil sulfóxido (DMSO). Em seguida, 1 ml das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa, e a absorbância mensurada em leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA), com filtro de 570 nm. As mitocôndrias de células vivas, por meio da enzima succinato desidrogenase, são capazes de reduzir a substância amarelada solúvel em água MTT convertendo-a em um composto insolúvel em água, o formazan, o qual é solubilizado pelo DMSO (IGNATIUS; CLAES, 1996). A quantidade de formazan produzida, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional à atividade metabólica e ao número de células vivas.

A fim de comparar as diferenças entre os tratamentos utilizou-se a análise de variância de um critério (ANOVA). Em caso de diferença significativa ($p < 0,05$) aplicou-se o teste de Tukey para comparação entre cada tratamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esta seção abordará os resultados obtidos para dois conjuntos de amostras. O primeiro deles está relacionado aos filmes depositados a partir da vaporização de nitrato de cálcio dissolvido em isopropílico (seção 4.1), enquanto o segundo aos filmes depositados a partir da sublimação de cálcio granulado (seção 4.2).

4.1 Implantação Iônica e Deposição por Imersão em Plasma a partir da vaporização de nitrato de cálcio dissolvido em álcool isopropílico

4.1.1 Composição Química: XPS

A Figura 4.1 mostra o espectro *survey* do titânio sem recobrimento e sem imersão em SBF. A presença de oxigênio pode ser atribuída ao óxido de titânio nativo ou ainda, assim como o carbono, à contaminação com o álcool e acetona usados na limpeza das amostras.

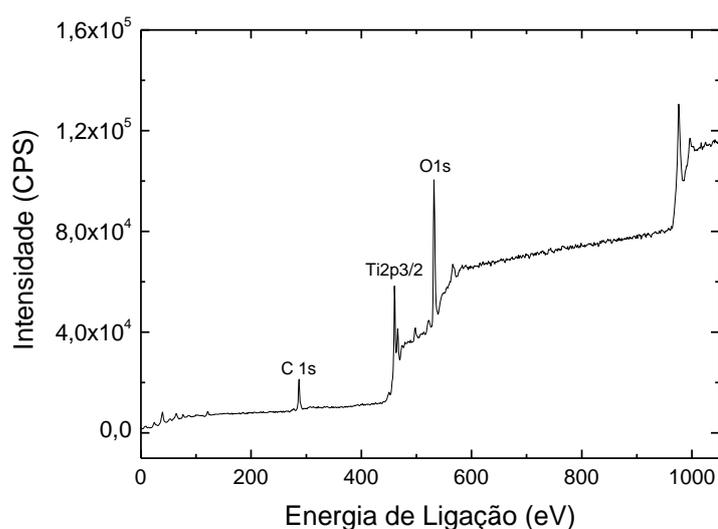


Figura 4.1 – Espectro XPS do titânio sem tratamento.

As Figuras 4.2 *a* e *b* mostram os espectros de XPS dos filmes depositados por IIDIP, com $R_{Ca} = 70\%$, antes e após a imersão em SBF, respectivamente. Os espectros das amostras obtidas em diferentes R_{Ca} (70, 85 e 95%) foram semelhantes e apresentaram os mesmos elementos. A Tabela 2 mostra as composições e concentrações atômicas de cada amostra antes e após a imersão em SBF. Carbono e oxigênio foram detectados em todas as amostras. Durante o processo de deposição, íons energéticos do plasma colidem com moléculas do álcool isopropílico (C_3H_8O) provocando sua quebra. Esses fragmentos se recombinaem entre si originando um filme de carbono que é depositado sobre a superfície. A concentração de carbono em todos os casos é aproximadamente a mesma, indicando a saturação da disponibilidade deste elemento no plasma.

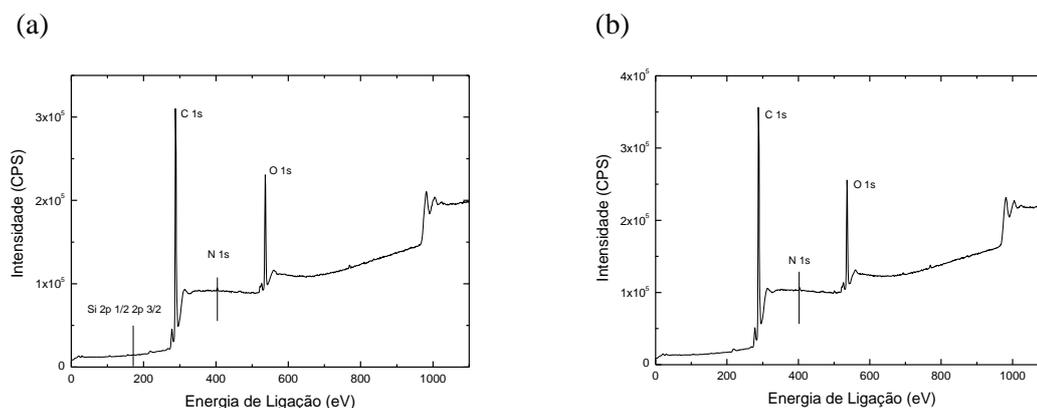


Figura 4.2 – Espectros XPS dos filmes depositados por IIDIP com $R_{Ca} = 70\%$, antes da imersão (a) e após (b) a imersão em SBF.

Tabela 2 - Composição química determinada com XPS antes e após a imersão das amostras em SBF.

R_{Ca} (%)	Antes				Após		
	Si (%)	C (%)	N (%)	O (%)	C (%)	N (%)	O (%)
70	0,3	85,5	0,4	13,7	86,2	0,6	13,1
85	0,3	85,7	0,2	13,7	86,5	0,3	13,1
95	0,0	84,1	0,4	15,4	84,2	0,5	15,2

A presença de oxigênio no filme pode ser explicada pela incorporação dessa espécie originada da quebra das moléculas de álcool e do nitrato de cálcio durante a deposição ou ainda pela formação de radicais livres no filme. O oxigênio residual no reator, ou seja, que não foi removido pelo sistema de vácuo, pode ligar-se quimicamente a esses radicais durante a deposição, ou essas ligações pendentes podem capturar espécies contendo oxigênio do meio ambiente quando as amostras são retiradas do reator (YASUDA, 1985). A concentração de oxigênio no filme depositado com $R_{CA} = 95\%$ foi ligeiramente maior que nos outros casos. Este filme foi aquele que apresentou também a menor proporção de carbono, reforçando a suposição da incorporação de oxigênio via reações com radicais livres.

A presença de uma pequena quantidade de silício em algumas amostras pode ser devida à contaminação pelas janelas de vidro do reator ou do talco das luvas usadas durante o manuseio das amostras. Algumas amostras apresentaram nitrogênio como uma consequência da quebra das moléculas de nitrato de cálcio e sua incorporação no filme. Entretanto, a presença de cálcio não foi observada em nenhuma amostra.

Analisando-se o espectro de XPS após a imersão em SBF verificou-se que não houve significativa alteração química em relação à amostra que não foi imersa. Esse resultado sugere que não houve a formação de fosfatos de cálcio sobre a superfície do titânio recoberto com este filme.

4.1.2 Morfologia e Composição Química: MEV e EDS

As superfícies do titânio sem recobrimento e recoberto a partir de IIDIP antes e após a imersão em SBF foram analisadas por MEV. As Figuras 4.3 a, b e c mostram as micrografias do titânio sem recobrimento e do titânio recoberto com o filme depositado com $R_{Ca} = 90\%$, antes e após a imersão em SBF, respectivamente. Tanto para os filmes depositados nesta condição como para os demais, existem apenas mudanças de acabamento superficial nas amostras. Comparando-se as Figuras 4.3 b e c, percebe-se que não ocorreu a formação de estruturas típicas de apatita (LIU et al., 2005; VANZILLOTA et al., 2006; SOUZA et al. 2010) após a imersão em SBF. Análises de EDS apresentadas na Figura 4.4, referentes às mesmas superfícies da Figura 4.3, mostram que, após o processo de IIDIP, um pico de carbono aparece no espectro, confirmando os resultados de XPS de deposição de um filme.

Esperava-se encontrar um pico referente ao cálcio. Entretanto, se a concentração dessa espécie for menor que 0,1% em peso, o equipamento não consegue detectá-la. O espectro de EDS da amostra mergulhada em SBF não apresentou nenhuma espécie diferente da amostra não imersa. Este resultado também confirma os resultados de XPS. Após imersão era esperado que houvesse a precipitação de fosfato de cálcio sobre a superfície, entretanto para que isso ocorresse um filme de cálcio deveria ter se formado na superfície, já que os íons de cálcio são os responsáveis pelas trocas iônicas entre a superfície e a solução corpórea simulada (^{a,b}HANAWA; ASAMI; ASAOKA, 1996).

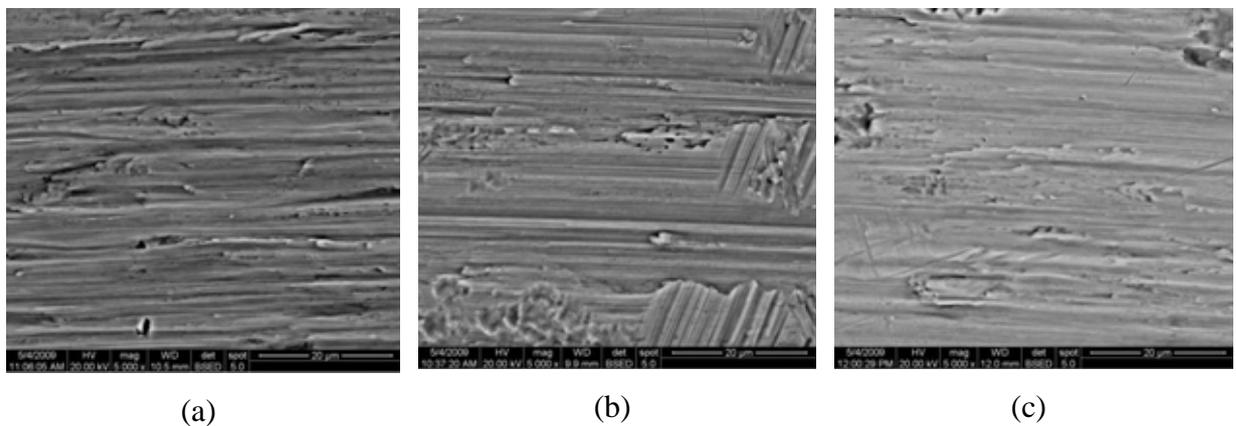


Figura 4.3 – Micrografia eletrônica de varredura (a) superfície do titânio sem tratamento e titânio recoberto com o filme depositado com $R_{Ca} = 90\%$ antes (b) e após (c) imersão em SBF.

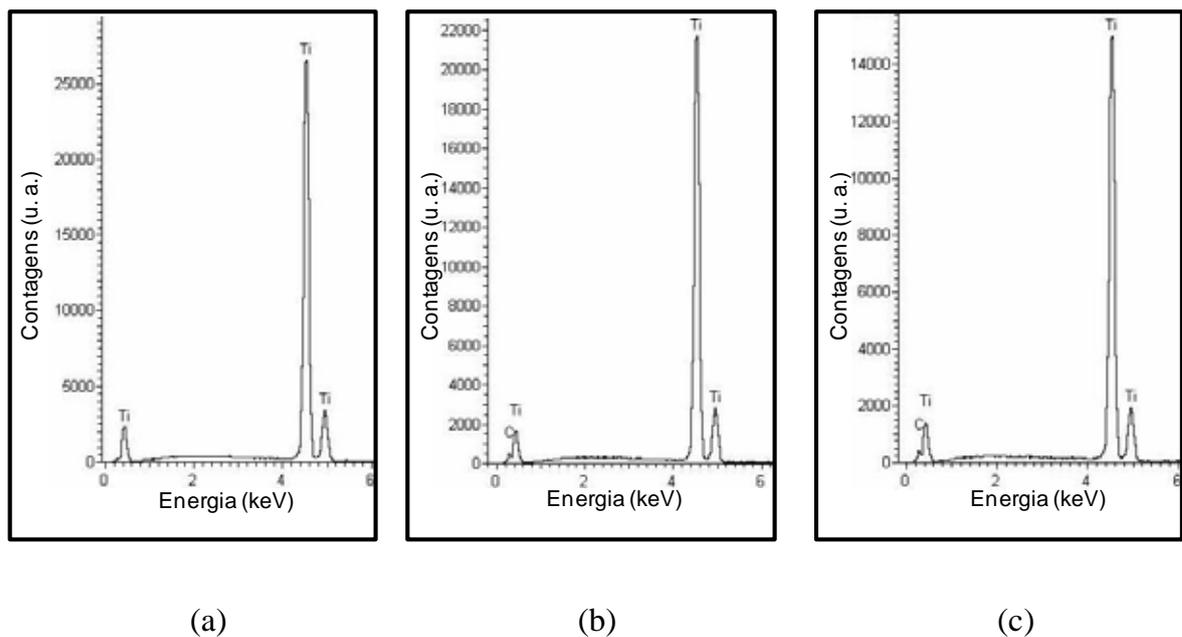


Figura 4.4 – Espectros de EDS de (a) superfície do titânio sem tratamento e titânio recoberto com o filme a plasma com $R_{Ca} = 90\%$ antes (b) e após (c) imersão em SBF.

A espessura dos filmes varia entre aproximadamente 155 e 265 Å como ilustra a Figura 4.5. Essas baixas espessuras dos filmes fazem com que a topografia da superfície do titânio não seja recoberta e por este motivo as micrografias da Figura 4.3 a e b não apresentam diferenças.

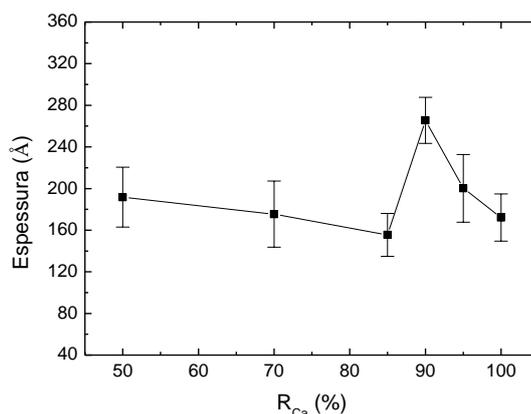


Figura 4.5 – Espessura dos filmes depositados por IIDIP em função de R_{Ca}.

4.1.3 Composição Química: PIXE e IRRAS

As análises de PIXE, que é uma técnica mais sensível do que XPS e EDS, mostraram a presença de cálcio na superfície de todas as amostras. As quantidades detectadas foram próximas ao limite de detecção do equipamento. Todavia, como eles são compatíveis com os resultados que seguem abaixo, optou-se por considerá-los. A baixa concentração de cálcio pode ser consequência de uma baixa inserção desta espécie no processo durante a deposição. Houve a vaporização do álcool, mas uma baixa quantidade de cálcio deve ter sido arrastada para dentro do reator.

A Figura 4.6 mostra o espectro de absorção no infravermelho dos filmes depositados em diferentes R_{Ca}. A banda em aproximadamente 878 cm⁻¹ pode ser atribuída à deformação angular fora do plano do CO₃ na calcita (CaCO₃ - sistema cristalino trigonal). A banda em 1070 cm⁻¹ pode ser relacionada ao estiramento simétrico de C-O na aragonita (CaCO₃ - sistema cristalino ortorrômbico) (BESSLER; RODRIGUES, 2008). Esses elementos podem ser originados da quebra e posterior recombinação do nitrato de cálcio e do álcool e ainda das

reações das espécies formadas com o oxigênio residual no plasma ou com espécies atmosféricas.

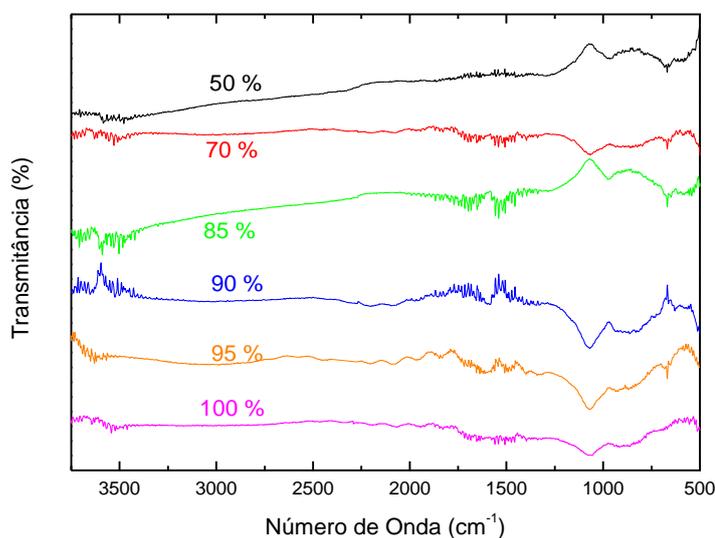


Figure 4.6 - Espectros IRRAS dos filmes produzidos com diferentes R_{Ca} antes da imersão em SBF.

As análises de PIXE revelaram fósforo após a imersão em SBF nos filmes depositados utilizando-se R_{Ca} de 70, 85 e 90%. Assim como para o cálcio, a concentração de fósforo detectada foi próxima ao limite de detecção do equipamento (3×10^{16} átomos/cm²).

4.1.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A Figura 4.7 mostra o resultado do ângulo de fase e do módulo de impedância para o titânio sem recobrimento antes e após a imersão em SBF. Como pode ser observado, para a amostra sem imersão em SBF, o ângulo de fase é de aproximadamente 90° para frequências baixas e intermediárias o que é uma característica de uma camada de óxido passiva e compacta (ROSCA *et al.*, 2005; SOUZA; BALLESTER; FREIRE, 2007; GONZALEZ; MIRZA-ROSCA, 1999). Analisando-se o comportamento da curva de ângulo de fase e módulo de impedância do titânio imerso em SBF percebe-se que não houve nenhuma modificação em relação ao titânio sem imersão. Nota-se apenas um pequeno aumento no

módulo de impedância. Este aumento pode ser atribuído à formação de óxido de titânio na superfície (ROSCA et al., 2005).

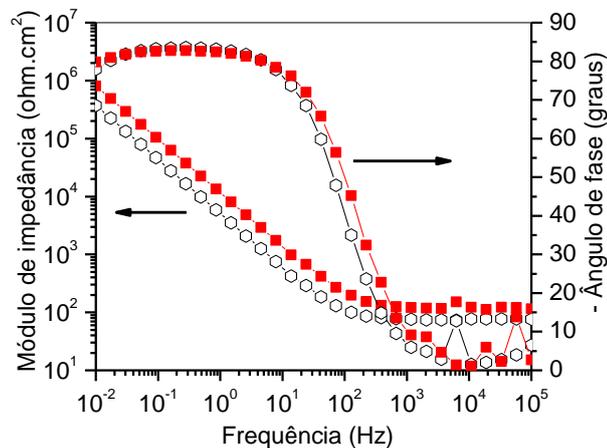


Figura 4.7 – Diagramas de ângulo de fase e módulo de impedância de amostras de titânio sem tratamento por IIDIP antes (símbolos abertos) e após imersão em SBF por 14 dias (símbolos cheios).

Os diagramas de ângulo de fase e módulo de impedância para as amostras de titânio tratadas por IIDIP antes e após a imersão por 14 dias em SBF são mostrados nas Figuras 4.8 e 4.9.

De uma maneira geral, as curvas de ângulo de fase apresentam duas concavidades indicando superfícies com duas camadas (MARCUS; MANSFELD, 2005). Percebe-se para todas as amostras que os diagramas ângulo de fase após a imersão em SBF (linhas vermelhas) apresentam diferenças em relação aos das amostras que não foram imersas. Isto indica que a imersão em SBF alterou a superfície. Para as amostras em que o filme foi depositado com $R_{ca} = 90, 95$ e 100% , as duas concavidades da curva são mais evidentes antes da imersão em SBF. Estas amostras apresentam alto ângulo de fase, próximo de 80° , em frequências intermediárias, o que indica uma camada compacta. Porém para frequências de 10^{-1} a 10^0 ocorre uma queda no ângulo de fase. Analisando o gráfico de módulo de impedância percebe-se que para essa região de frequência há uma curvatura na linha referente à amostra antes da imersão em SBF (linha preta), indicando a não uniformidade da superfície, podendo ser um indicativo de uma camada porosa. Essa suposição é confirmada após a análise da amostra imersa em SBF devido a dois fatores. O primeiro deles é o aumento no ângulo de fase para frequências de 10^{-1} a 10^0 em relação às amostras que não foram imersas, o que pode indicar o

preenchimento dos poros. O segundo fator é que se observa uma linearização nos diagramas de módulo de impedância ($R_{Ca} = 95$ e 100%) após a imersão em SBF, indicando uma superfície mais uniforme.

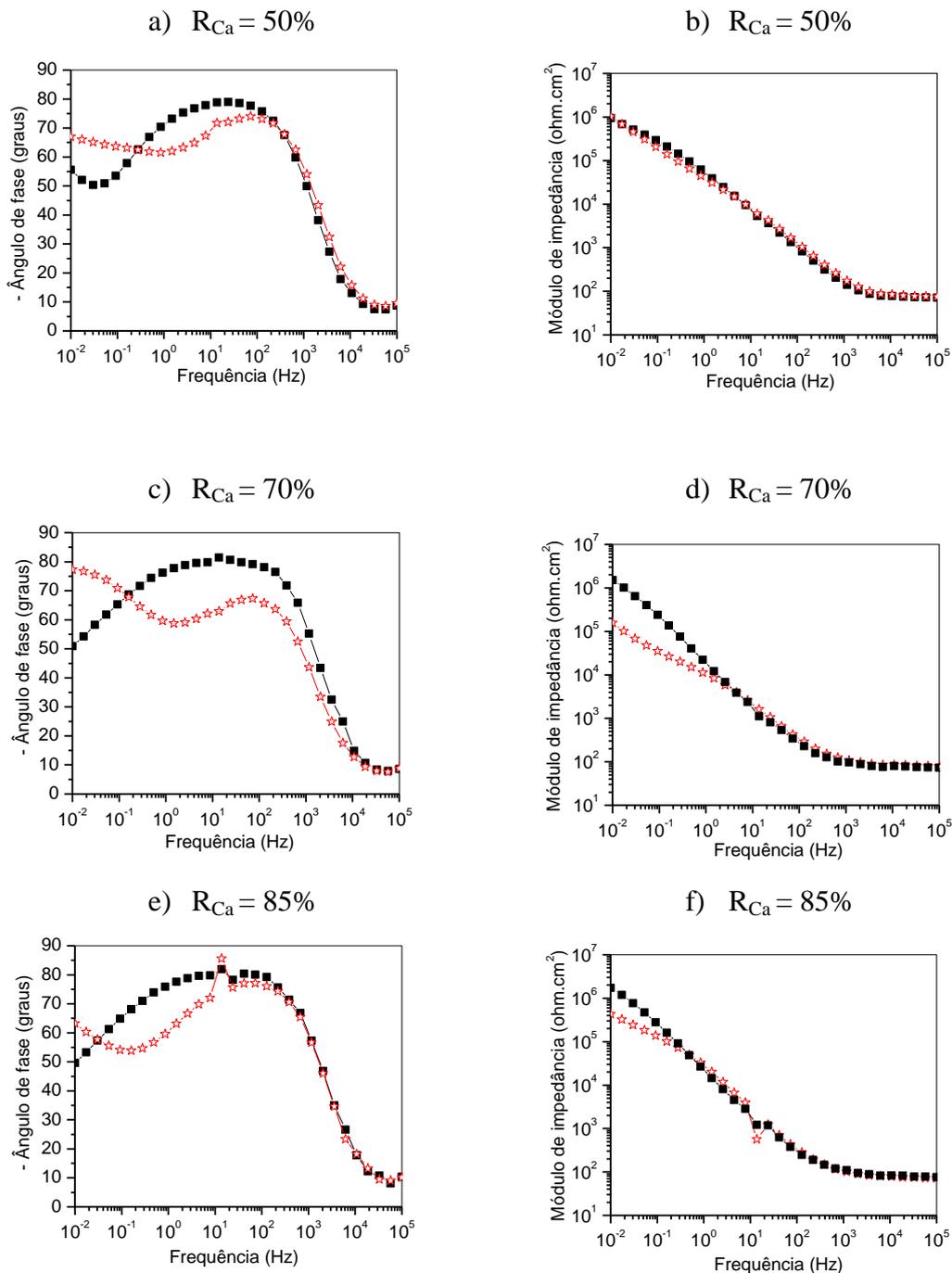


Figura 4.8 – Diagramas de Ângulo de fase (a), (c) e (e) e Módulo de Impedância (b), (d) e (f) das amostras tratadas por IIDIP antes (representadas por quadrados) e após (representadas por estrela) a imersão em SBF.

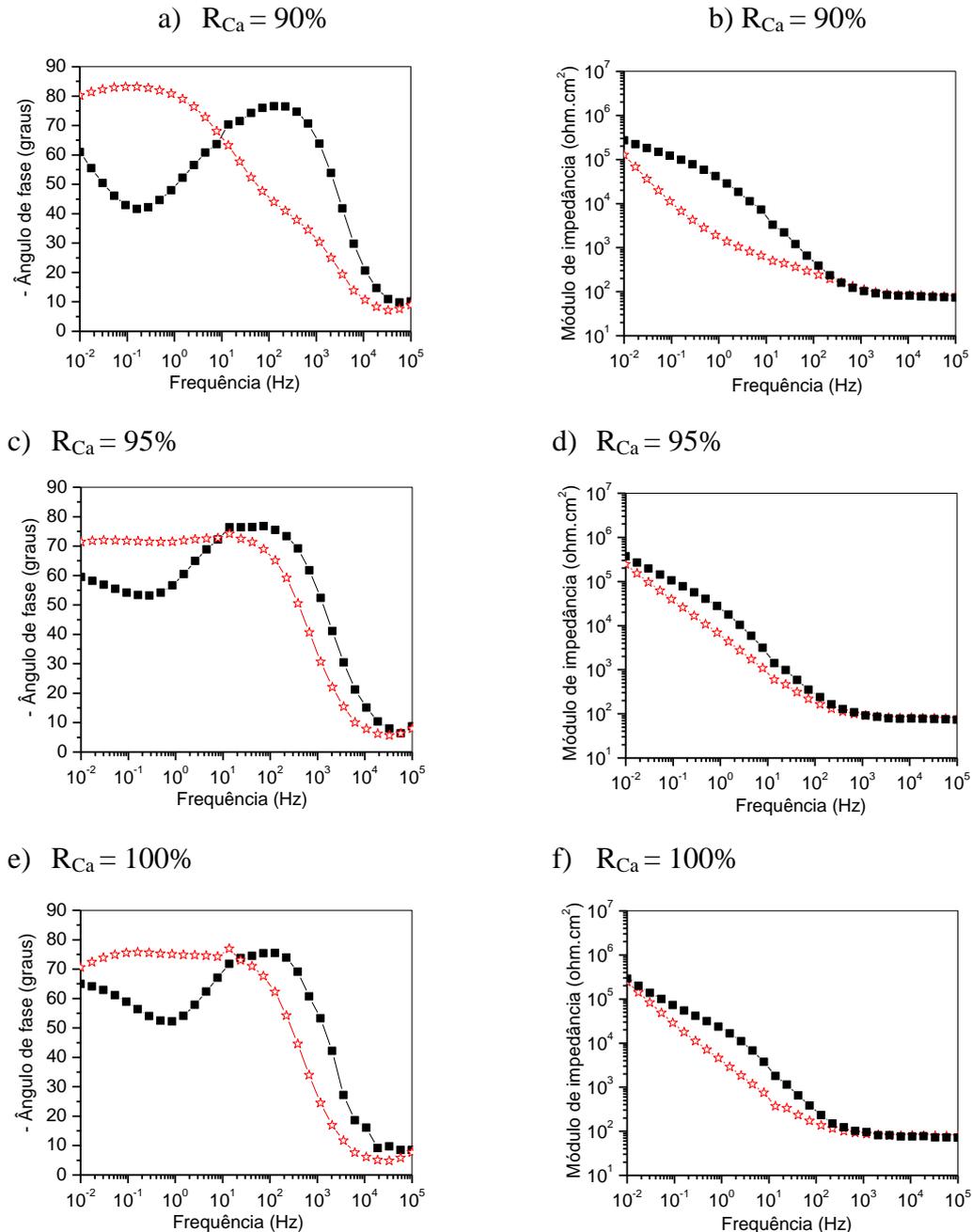


Figura 4.9 – Diagramas de Ângulo de Fase (a), (c) e (e) e Módulo de Impedância (b), (d) e (f) das amostras tratadas por IIDIP antes (representadas por quadrados) e após (representadas por estrela) a imersão em SBF.

Diferenças mais sutis são observadas para as demais amostras. Para a amostra em que o filme foi depositado com $R_{Ca} = 50\%$, embora as curvas de ângulo de fase, das amostras imersas e não imersas em SBF, apresentem diferenças, os gráficos de módulo de impedância são semelhantes. Logo para essa amostra pouca alteração ocorreu na superfície após a imersão em SBF. Para as outras amostras os diagramas de módulo de impedância mostram que ocorre

uma diminuição na impedância das amostras imersas em SBF em frequências baixas e intermediárias comparada com as amostras não imersas. Esta queda é mais pronunciada nas amostras com filmes depositados com R_{Ca} de 90, 95 e 100% (Figuras 4.9 b, d e f respectivamente).

Os valores do ângulo de fase e a forma das curvas de ângulo de fase e módulo de impedância das amostras tratadas a plasma diferem daquelas encontradas para o titânio sem recobrimento, Figura 4.7, que é um indicativo que a IIDIP altera a superfície do titânio, permitindo que ocorram reações na superfície quando em contato com o SBF.

Os resultados de impedância foram ajustados usando um circuito elétrico equivalente, com o programa Zview[®]. Os dois circuitos usados são apresentados na Figura 4.10. Estes circuitos possuem os seguintes elementos: R_S (resistência do eletrólito), C_b (capacitância da camada barreira), R_b (resistência da camada barreira), C_p (capacitância da camada porosa) e R_p (resistência da camada porosa). O comportamento dos diagramas de ângulo de fase e módulo de impedância foi considerado na escolha do modelo mais apropriado. Além disso, a validade destes circuitos foi confirmada por baixos valores de χ^2 ($\pm 10^{-3}$) e pela baixa porcentagem de erro entre os parâmetros ($< 15\%$) (MARCUS; MANSFELD, 2005).

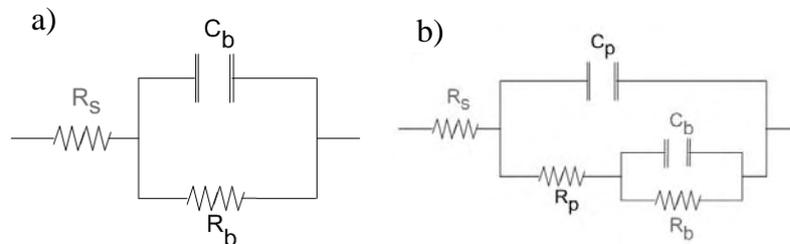


Figura 4.10 – Circuitos elétricos equivalentes usados para ajustar os resultados de impedância do titânio (a) sem tratamento a plasma e (b) tratados com diferentes R_{Ca} . R_S : resistência do eletrólito; C_b : capacitância da camada barreira; R_b : resistência da camada barreira; C_p : capacitância da camada porosa; R_p : resistência da camada porosa

Para ajustar os resultados do titânio sem IIDIP foi utilizado o circuito mostrado na Figura 4.10 a. Este circuito foi utilizado, pois estas amostras apresentam somente uma constante de tempo, com ângulo de fase próximo a 90° , indicando um filme compacto na superfície (SOUZA; BALLESTER; FREIRE, 2007; SHUKLA; BALASUBRAMANIAM; BHARGAVA, 2005). Já o circuito mostrado na Figura 4.10 b foi usado para representar a superfície das amostras que apresentaram duas constantes de tempo. Este circuito simula uma

estrutura com duas camadas na superfície, uma camada interna compacta (barreira) e uma camada porosa externa (PAN et al., 1998; SOUZA; BALLESTER; FREIRE, 2007), como suposto pelos resultados mostrados pelos diagramas de ângulo de fase e módulo de impedância (Figuras 4.8 e 4.9). É importante enfatizar que todos os elementos de capacitância foram ajustados usando o elemento constante de fase (CPE) ao invés de uma capacitância pura. O CPE é um elemento usado para corrigir à presença de não homogeneidade no sistema material-eletrodo (rugosidade) (SHUKLA, 2006).

As Figuras 4.11 *a* e 4.11 *b* mostram, respectivamente, as resistências da barreira e dos poros de amostras depositadas com diferentes valores de R_{Ca} antes e após a imersão em SBF. Como pode ser notado na Figura 4.11 *a*, R_b não apresentou grandes variações, indicando que a pressão parcial do vapor da solução durante a IIDIP não afetou a resistência da camada barreira. Os valores de R_b das amostras imersas em SBF, embora também não apresentem grandes variações, são maiores do que das amostras não imersas. É conhecido que camadas de apatita podem se formar espontaneamente sobre a superfície do titânio quando em contato com SBF (SERRO et al., 1997). Embora apatita não tenha sido observada nas análises realizadas anteriormente, o aumento em R_b pode ser atribuído a mudanças químicas ou ao crescimento de um filme sobre o titânio quando imerso em SBF.

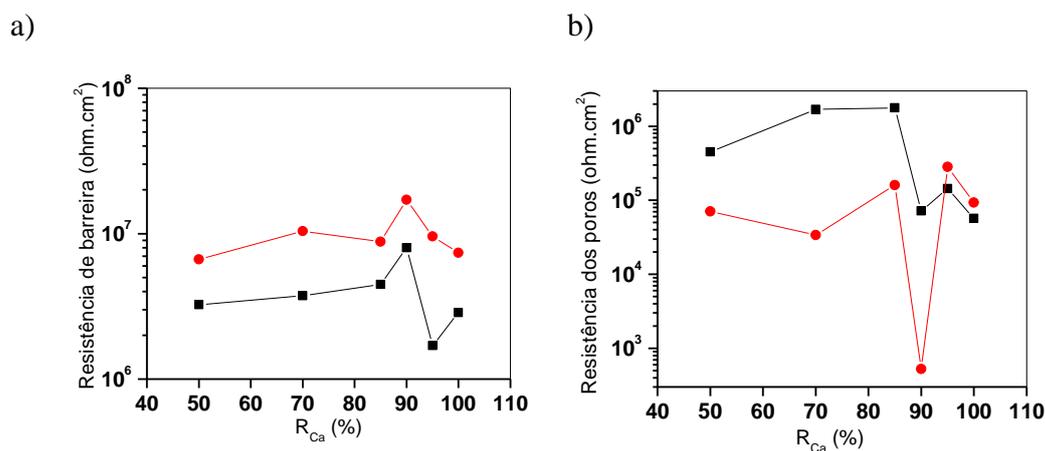


Figure 4.11 – Resistências da barreira (a) e dos poros (b) de amostras depositadas com diferentes R_{Ca} antes (quadrados) e após (círculos) a imersão em SBF.

Como pode ser observado na Figura 4.11 *b*, a resistência dos poros é mais influenciada por R_{Ca} do que a resistência da barreira. A maior pressão parcial do vapor resultou em menor

valor de R_p . Este resultado pode indicar que altas concentrações de vapor podem induzir a formação de uma superfície menos uniforme.

Conforme mostrado na Figura 4.11 *b*, R_p diminui após a imersão em SBF para a maioria das amostras. Alguns autores (KRUPA et al., 2005; ^aHANAWA; ASAMI; ASAOKA, 1996; ^bHANAWA; ASAMI; ASAOKA, 1996; HANAWA et al., 1998) relatam que durante a exposição a soluções fisiológicas simuladas, os íons de cálcio começam a migrar da camada implantada para a solução formando um filme de apatita. Deste modo, a redução observada em R_p pode ser atribuída a mudanças na composição química e na reconstrução da camada da superfície (SHUKLA; BALASUBRAMANIAM; BHARGAVA, 2006) pela migração de íons de cálcio ou outros íons presentes na superfície.

4. 1.5 Energia de Superfície

A Figura 4.12 mostra as componentes polar (E_p), dispersiva (E_D) e total (E_S) da energia de superfície, calculada a partir da média geométrica, em função de R_{Ca} antes e após a imersão das amostras em SBF. Pode-se perceber que na maioria das amostras a imersão em SBF causou uma leve diminuição nas componentes de E_S em relação às amostras antes da imersão. Radicais livres formados durante o processo de IIDIP podem ter se recombinado com espécies contidas no SBF tornando a superfície mais estável energeticamente. Nota-se que as maiores diferenças aconteceram nas amostras onde fósforo foi detectado ($R_{Ca} = 70, 85$ e 90%).

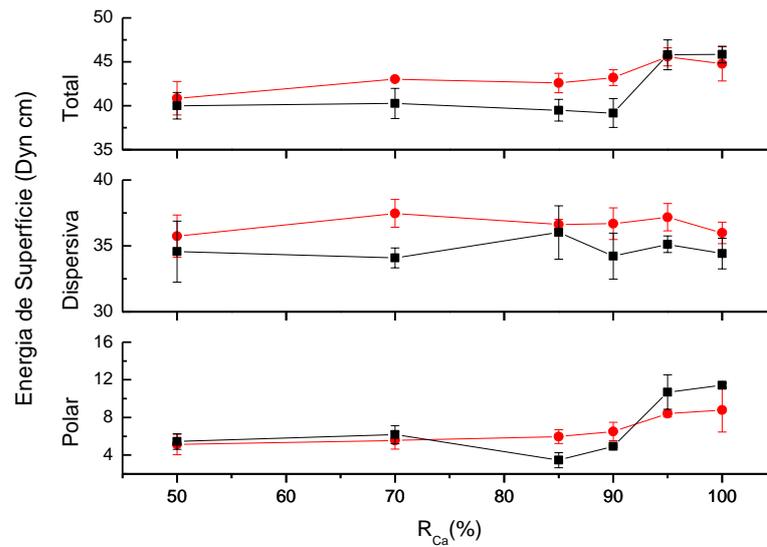


Figura 4.12 – Energia de superfície total e suas componentes polar e dispersiva antes (linha vermelha) e após (linha preta) a imersão em SBF de amostras recobertas com filmes depositados com diferentes R_{Ca} . Para o titânio como recebido as componentes polar, dispersiva e total são 6,3, 33,6 e 39,9 Dyn cm, respectivamente.

4.1.6 Cultura de Células Osteoblásticas

A Figura 4.13 mostra a adesão de células osteoblásticas nas amostras de titânio tratadas nas diferentes pressões parciais do vapor do composto na IIDIP. Como comparação a mesma figura apresenta a viabilidade celular no titânio sem tratamento e no controle (poliestireno da própria placa de cultura).

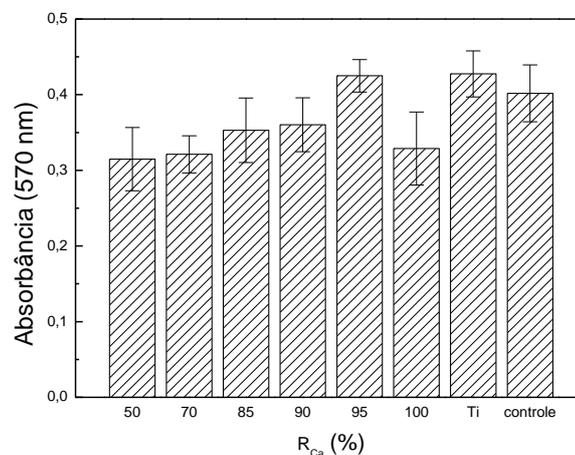


Figura. 4.13 – Adesão de células osteoblásticas em superfícies de titânio modificadas por IIDIP em diferentes R_{Ca} .

Como pode ser observado, o filme depositado com R_{Ca} de 95% permitiu adesão estatisticamente similar ao titânio sem tratamento e ao controle de poliestireno, após 2 horas de semeadura. As médias das absorvâncias das outras superfícies são semelhantes entre si e menores que as do titânio tratado com $R_{Ca} = 95\%$, do titânio puro e do controle de poliestireno ($p < 0,05$). Os tratamentos realizados com R_{Ca} diferente de 95% retardam o processo de adesão das células osteoblásticas em relação a média das três absorvâncias maiores ($R_{Ca} = 95\%$, titânio puro e poliestireno).

A Figura 4.14 mostra a viabilidade de células osteoblásticas após 24 horas de cultivo, nas amostras de titânio tratadas por IIDIP com diferentes R_{Ca} . Para comparação são também apresentados os resultados para o titânio sem tratamento e para o controle de poliestireno. Constatou-se que a maioria das amostras tratadas apresentam valores médios ligeiramente superiores à do titânio sem tratamento e à do controle de poliestireno, entretanto, não foi apresentando diferença estatisticamente significativa. Já o titânio tratado com $R_{Ca} = 95\%$, ao contrário, resultou numa viabilidade estatisticamente diferente e cerca de 100% maior que as médias de todas as outras amostras. Logo, esse tratamento favoreceu o crescimento de células osteoblásticas, melhorando a viabilidade celular após 24 horas em relação ao titânio sem tratamento e mesmo ao controle de poliestireno.

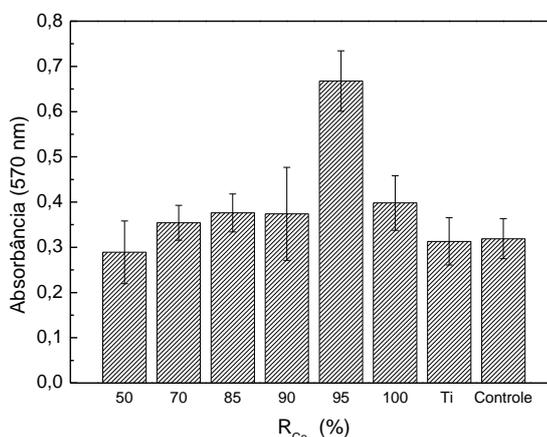


Figura 4.14 – Viabilidade de células osteoblástica, após incubação por 24 horas, de amostras de titânio modificadas por IIDIP em diferentes R_{Ca} .

O aumento da viabilidade celular pode estar relacionado com o aumento da componente polar da energia de superfície (Figura 4.12). A Figura 4.15 mostra a viabilidade celular em função da componente polar da energia de superfície. Para as amostras tratadas com baixos R_{Ca} (50, 70 e 85%), o aumento na componente polar produz um pequeno aumento

na viabilidade. Estudos anteriores mostraram que a adesão de camadas primarias ocorre através de forças eletrostáticas e por isso é influenciada pela presença de grupos polares na superfície sólida (VAN WEZEL, 1967). Devido à alta tensão interfacial, as células adsorvidas são ancoradas sobre a superfície do sólido e a ele aderidas para diminuir a tensão interfacial sólido/líquido (CHEN et al., 2004). Entretanto, a energia de superfície não é o único parâmetro que influencia a viabilidade, uma vez que, a amostra que apresentou a maior componente polar da energia de superfície (100%) não foi a que apresentou maior viabilidade. A rugosidade da superfície é também um fator relevante como notado no gráfico da Figura 4.16 (ROSALES-LEAL et al., 2010; APARICIO; GIL; PLANELL, 2002). A elevação de aproximadamente 100% na viabilidade da amostra tratada com 95% R_{Ca} é atribuída a associação de altos valores da componente polar da energia de superfície e rugosidade induzida nesta amostra pela IIDIP.

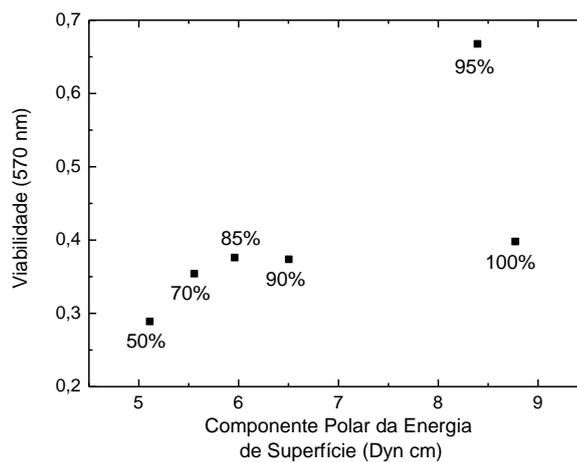


Figura 4.15 – Viabilidade de células osteoblásticas em função da componente polar da energia de superfície.

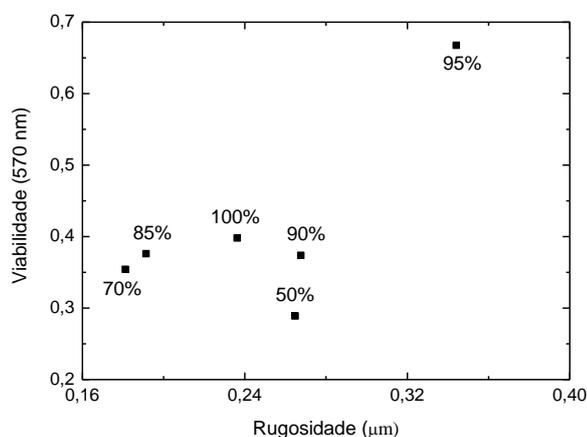


Figura 4.16 – Viabilidade de células osteoblásticas em função da rugosidade.

4.2 Deposição a Plasma a partir da sublimação de cálcio granulado

4.2.1 Espessura: Perfilometria

A Figura 4.17 mostra a espessura dos filmes depositados em diferentes condições (Tabela 1). Os filmes mais espessos, com espessuras de 23,6 e 17,8 μm , foram depositados nas condições A e B, respectivamente. Os filmes depositados nas condições E e G apresentaram espessura de 3,0 e 1,0 μm , respectivamente. Filmes com espessuras inferiores a 1 μm foram obtidos nas demais condições de deposição, sendo que o filme mais fino, com espessuras da ordem de 12 nm, foi depositado na condição H.

As maiores espessuras dos filmes depositados nas condições A e B são consequências das altas temperaturas utilizadas para a sublimação do cálcio e do longo período de exposição ao plasma (2400 s). Maiores temperaturas de sublimação implicam em maiores pressões parciais de cálcio, que é o precursor para a deposição do filme. Embora as temperaturas também tenham sido altas nas condições D, E, F e G, as espessuras foram menores em função dos menores tempos de deposição. As condições E e G resultaram em espessuras superiores a D devido ao elevado valor de I_{DC} . Isto acontece porque a proporção de espécies ionizadas no plasma deve aumentar com o aumento de I_{DC} . Embora a corrente também tenha sido elevada na condição F, o tempo de exposição ao plasma foi inferior ao das outras condições. Logo para este conjunto de amostras a variação da espessura está relacionada tanto com I_{DC} quanto com t.

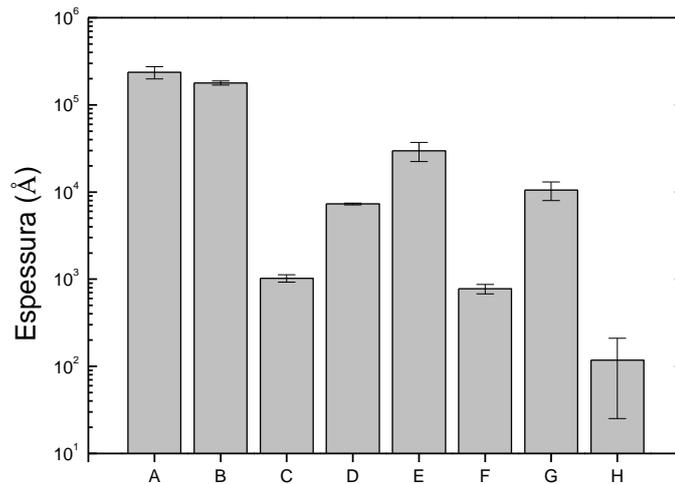


Figura 4.17 – Espessura dos filmes depositados a partir da sublimação de cálcio granulado nas diferentes condições apresentadas na Tabela 1.

A baixa espessura do filme depositado na condição C está relacionada à menor temperatura usada para a sublimação do cálcio (520 °C). Para a condição H a baixa espessura está relacionada ao fato do plasma ter sido estabelecido sem que a sublimação fosse visualmente observada como na Figura 3.4.

4.2.2 Rugosidade e Topografia: perfilometria, AFM

Análises de perfilometria não mostraram alterações na rugosidade das amostras após o recobrimento a plasma. A rugosidade das amostras de TiR1 e TiR2 submetidas a IIDIP foram em média 0,8 e 4,6 μm , respectivamente.

A Figura 4.18 *a* mostra uma imagem da topografia obtida por AFM da amostra de titânio com rugosidade R2 tratada na condição D. A superfície apresenta regiões muito profundas nas quais a ponta do equipamento não alcança. Devido a esta restrição, esta amostra foi a única possível de se selecionar uma região para obtenção da imagem. Através do perfil da região, Figura 4.18 *b*, observa-se a existência de cavidades com profundidade de até 10 μm e largura de até 20 μm . As outras regiões e as outras amostras provavelmente apresentam profundidades maiores do que esta. Esta diferença, embora possa ser pequena de uma amostra para a outra, pode influenciar no crescimento de células. Trabalhos anteriores mostram a importância de cavidades com dimensões acima de 10 μm para o crescimento

celular. As células se espalham e se proliferam (ANSELME et al., 2001). Além disso, cavidades mais profundas (ou descontinuidades) melhoram a adesão e proliferação de células osteoblásticas (ANSELME et al., 2001).

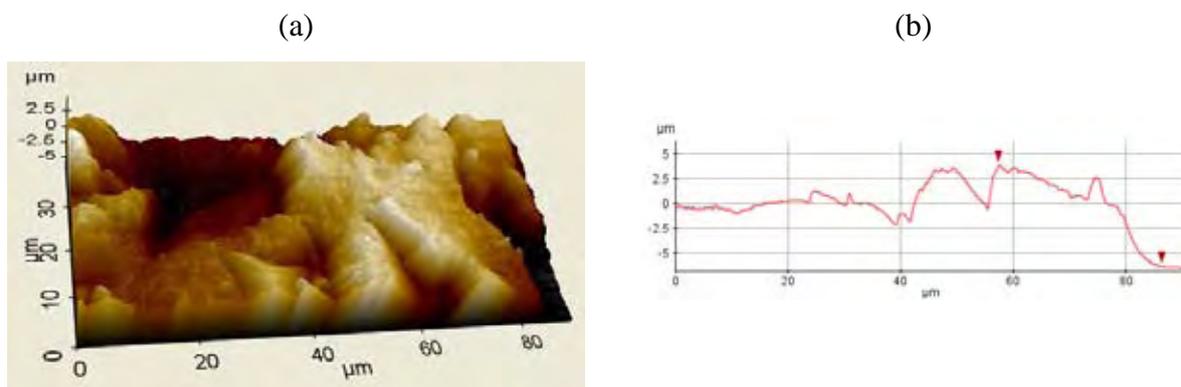


Figura 4.18 – a) Imagem 3D de microscopia de força atômica e b) perfil topográfico da amostra de TiR2 tratada na condição D (Tabela 1).

Percebe-se na Figura 4.18 *a* que a estrutura da superfície não é uniforme, ou seja, não há uma repetição estrutural. Este é outro fator que pode favorecer o crescimento celular. Segundo Curtis e Wilkinson (1997) e Walboomers et al. (1999) as células reagem a descontinuidades e nelas são condensadas e nucleadas.

4.2.3 Composição Química: IRRAS, XPS, EDS

A Figura 4.19 mostra os espectros de absorção no infravermelho dos filmes de cálcio depositados nas condições dadas na Tabela 1. Os picos de absorção em 3640 e 1640 cm^{-1} e a banda em 3380 cm^{-1} resultam do estiramento de ligações O-H, enquanto a banda entre 1500 e 1400 cm^{-1} é atribuída às ligações C-O e C=O no carbonato de cálcio (FARMER, 1974; GUNASEKARAN; ANBALAGAN; PANDI, 2006; ANDERSEN; BRECEVIC, 1991). A absorção centrada em 870 cm^{-1} é atribuída à deformação fora de plano do CO_3 (ANDERSEN; BRECEVIC, 1991). Para evidenciar a presença dessas absorções também nos espectros dos filmes depositados nas condições C e D as Figuras 4.20 *a* e *b*, mostram tais espectros com escalas reduzidas. A absorção em 1800 e 1070 cm^{-1} observada no espectro da amostra tratada

na condição E resulta do estiramento simétrico de C-O. Estas bandas surgem de reações pós-plasma do cálcio com espécies atmosféricas. O cálcio é muito reativo e por este motivo quando o filme é exposto ao ambiente ele reage com oxigênio formando CaO o qual reage com CO₂ originando o carbonato de cálcio, CaCO₃. Quando CaCO₃ adsorve H₂O é produzido CO₂ + Ca(OH)₂ (HANAWA, 1999; LIU et al.; 2005).

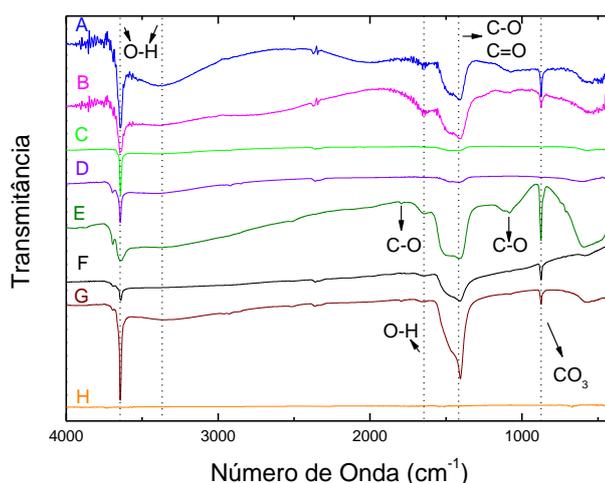


Figura 4.19 – Espectros IRRAS dos filmes de cálcio depositados a partir da sublimação de cálcio granulado nas diferentes condições dadas na Tabela 1.

Para as amostras tratadas nas condições A, B, C, D, E e F a banda de absorção na região de 1500 a 1400 cm⁻¹ é mais larga. Segundo alguns trabalhos (ANDERSEN; BRECEVIC, 1991; BRECEVIC; NIELSEN, 1989) esta banda mais larga é característica do carbonato de cálcio amorfo e da vaterita, que é o carbonato de cálcio cristalino com estrutura hexagonal. A presença de bandas mais estreitas nesta região, como observado no espectro da amostra tratada na condição G, é típico de aragonita e calcita, as quais são carbonatos de cálcio cristalinos com estrutura ortorrômbica e trigonal, respectivamente. Para o carbonato de cálcio amorfo, vaterita e a aragonita a banda na região entre 1500 e 1400 cm⁻¹ é formada por dois picos com máximos que se deslocam com a mudança da estrutura cristalina. Já a calcita apresenta apenas um pico em torno de 1420 cm⁻¹. Deste modo o espectro da amostra tratada na condição G se assemelha mais com o da aragonita, pois apresenta um ombro na região de 1490 cm⁻¹.

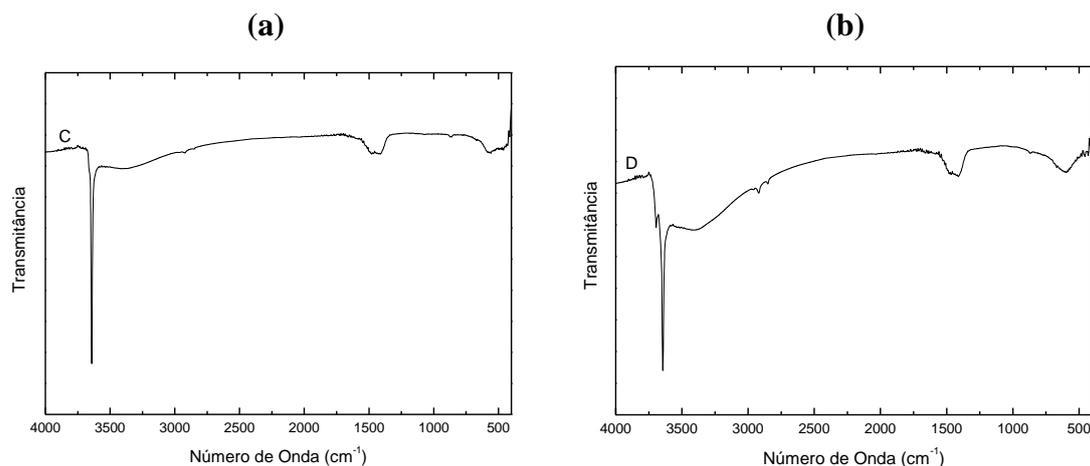


Figura 4.20 – Espectros IRRAS dos filmes de cálcio depositados a partir da sublimação de cálcio granulado nas condições a) C e b) D da Tabela 1.

Baseado no trabalho de Andersen e Brecevic (1991), a forma do pico em 870 cm^{-1} , em todos os espectros da Figura 4.19, é similar ao da calcita, da aragonita e do CaCO_3 amorfo. O espectro da vaterita apresenta um ombro na banda, o qual não é evidente em nenhum dos espectros obtidos neste trabalho. A mesma análise não pode ser feita para os espectros referentes aos filmes depositados nas condições C e D (Figura 4.20) devido à baixa intensidade desta banda.

De acordo com as discussões acima pode-se dizer que o filme obtido na condição G tem estrutura similar a da aragonita enquanto os filmes depositados nas condições A, B, E e F são semelhantes ao CaCO_3 amorfo. Por outro lado, a estrutura dos filmes depositados nas condições C e D são similares ao CaCO_3 amorfo ou vaterita.

O espectro do filme depositado na condição G apresenta bandas de absorção mais intensas em 3640 cm^{-1} , o que poderia ser um resultado de sua elevada espessura. Entretanto, filmes mais espessos, como os obtidos nas condições A, B e E apresentaram bandas menos pronunciadas. Neste caso, o crescimento na intensidade da banda não está relacionado somente com a espessura, mas também com a existência de diferenças nas relações entre as densidades de ligações OH e CaCO_3 em carbonatos de cálcio com diferentes estruturas (BRECEVIC; NIELSEN, 1989).

Os filmes depositados nas condições E e F apresentam as absorções associadas à vibração do CaCO_3 ($1500\text{-}1400$ e 870 cm^{-1}) mais intensas do que as do estiramento OH (3640 cm^{-1}). Isto sugere uma maior reação do filme de cálcio com CO_2 do que com H_2O .

atmosférico. O contrário é observado nos filmes depositados nas condições C e D. A banda em 3640 cm^{-1} é mais intensa do que as bandas em 1430 e 870 cm^{-1} .

Após a imersão em SBF, com exceção da amostra A, a qual não foi detectado fósforo, todas as amostras apresentaram espectros de XPS de alta resolução típicos do Ca 2p, P 2p, e O1s como mostrados na Figura 4.21. Como pode ser visto o espectro do cálcio é composto por dois picos centrados em aproximadamente $347,0\text{ eV}$ ($2p_{3/2}$), e $350,8\text{ eV}$ ($2p_{1/2}$). O primeiro pico pode ser deconvoluído usando três curvas Gaussianas centradas em $346,5$, $347,0$ e $347,6\text{ eV}$ relacionadas a CaTiO_3 , CaCO_3 e apatita, respectivamente (LIU et al., 2005; VANZILLOTA et al., 2006). A presença de apatita é reforçada pelo pico centrado em $133,2\text{ eV}$ do espectro do P 2p, o qual corresponde a energia de ligação do P na apatita (PHAM et al., 2000). Além disso, o pico em $531,7$ referente à deconvolução do espectro do O 1s ($531,9\text{ eV}$) é também um indicativo da presença de apatita (VANZILLOTA et al., 2006; LIU et al., 2005). As outras gaussianas centradas em $530,6$, $531,4$, $533,4\text{ eV}$ são atribuídas as ligações TiO_2 , CaCO_3 e TiOH , respectivamente (LIU et al., 2005; SOUZA et al., 2011).

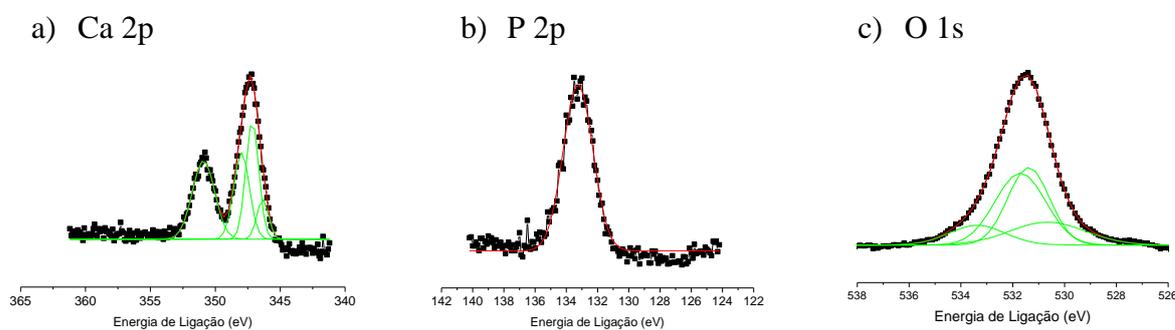


Figura 4.21 – Espectros de XPS de alta resolução do a) Ca 2p, b) P 2p e c) O 1s da superfície do titânio recoberta com filme de cálcio por IIDIP após a imersão em SBF. Os pontos indicam os valores medidos, as curvas em verde representam as gaussianas usadas na deconvolução e as curvas em vermelho são as envoltórias das curvas de ajuste.

A Figura 4.22 mostra as composições e porcentagens atômicas, obtidas por XPS, das superfícies de amostras de titânio com rugosidades de $0,8\ \mu\text{m}$ (R1) e $6,5\ \mu\text{m}$ (R2) sem recobrimento e recobertas por IIDIP nas diferentes condições descritas na Tabela 1, após a imersão em SBF. Cálcio e fósforo foram detectados em todas as amostras com exceção da tratada na condição A. Além destes elementos, cujas concentrações são fornecidas na Figura 4.22, em todas as amostras também foram detectados aproximadamente 50 % de oxigênio e

27% de carbono. Com exceção do alumínio e do carbono todos os outros elementos estão presentes na apatita e podem ter sido incorporados à superfície através de reações das amostras com o SBF. Cálcio e oxigênio também podem ter sido incorporados antes da imersão em SBF. Parte do cálcio detectado é do filme depositado por IIDIP utilizando cálcio granulado, enquanto o oxigênio e carbono são resultados de reações químicas envolvendo cálcio e espécies atmosféricas como vapor de água e dióxido de carbono quando a superfície é exposta ao ar.

As concentrações dos elementos nas amostras de titânio com diferentes rugosidades são diferentes. No titânio mais rugoso observam-se maiores concentrações de cálcio e fósforo. Como mostrado por outros autores (LIU et al., 2005; VANZILLOTA et al., 2006; ROSALES-LEAL et al., 2010), a formação de apatita não ocorre espontaneamente na superfície de titânio polido quando imerso em SBF, mas mudanças de rugosidade são capazes de provocar melhorias na sua bioatividade. Ainda segundo esses autores nucleação do fosfato de cálcio acontece preferencialmente nas reentrâncias da superfície.

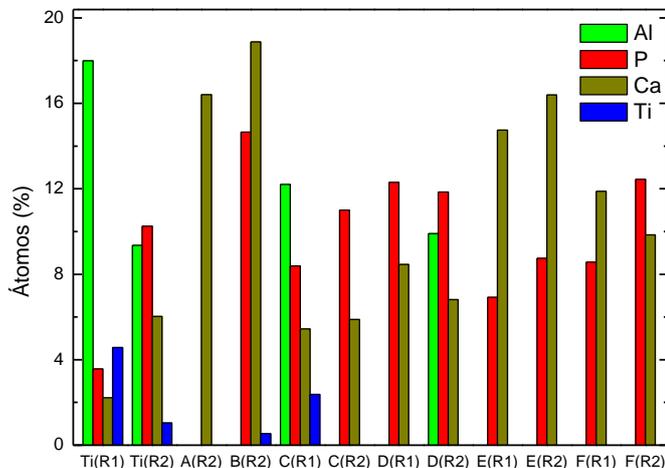


Figura 4.22 – Porcentagens atômicas determinadas por XPS das superfícies de amostras de titânio com rugosidades R1 e R2 sem recobrimento e recobertas por IIDIP nas diferentes condições descritas na Tabela 1 após a imersão em SBF.

Fósforo não foi detectado na amostra de titânio tratada na condição A. Todas as outras superfícies tratadas por IIDIP apresentaram maiores concentrações de cálcio e fósforo se comparadas ao titânio com rugosidade R1 sem tratamento. Logo, este resultado sugere melhora na precipitação de fosfato de cálcio em superfícies de titânio contendo cálcio quando

exposto à solução fisiológica. Entretanto, para algumas amostras, como a tratada na condição C, a concentração de P e Ca foi muito semelhante a do titânio com rugosidade R2 sem tratamento. A amostra tratada que apresentou maior concentração de Ca e P comparada ao titânio sem tratamento foi a tratada na condição B com rugosidade R2. Esta alta concentração pode estar relacionada à maior espessura do filme de cálcio depositado por IIDIP. Estudos realizados por Takadama et al. (2001) e Yamaguchi et al. (2009) indicam que a apatita inicia sua nucleação dentro da estrutura do filme bioativo, e portanto o aumento na espessura do filme significa aumento na bioatividade da superfície (SOUZA, 2010).

Íons de cálcio sobre a superfície iniciam o processo de crescimento de apatita semelhante à do osso (SVETINA et al., 2001). Esses íons de cálcio vão sendo liberados na solução corpórea com o tempo de imersão induzindo a precipitação de fosfato de cálcio (LIU; CHU, 2008; HANAWA, 1999).

Nas amostras tratadas nas condições B(R2), E(R2), E(R1) e F(R1), contrariamente às demais, a concentração de fósforo é menor do que a de cálcio. Para estas amostras a razão Ca/P é, respectivamente, 1,30, 1,87, 2,13 e 1,38. A razão Ca/P da hidroxiapatita do osso varia de 1,50 a 1,63 (BIGI et al., 1997). Entretanto neste trabalho esta relação não pode ser usada para afirmar se a camada de fosfato sobre a superfície está ou não na forma de hidroxiapatita porque o cálcio do filme depositado a plasma pode também estar sendo detectado juntamente com o filme de fosfato de cálcio obtido após a imersão em SBF. Mesmo que o filme de fosfato de cálcio não seja muito fino para possibilitar a detecção do cálcio de camadas mais profundas, ele pode apresentar poros ou trincas.

A presença de alumínio em algumas amostras pode ser atribuída a traços da alumina usada no jateamento do titânio.

As Figuras 4.23 e 4.24 mostram as porcentagens atômicas, obtidas por EDS, nas amostras de titânio com rugosidades R1 e R2 sem recobrimento a plasma e recobertas em diferentes condições antes e após a imersão em SBF, respectivamente. Antes da imersão em SBF, além das concentrações mostradas na Figura 4.23, todas as amostras apresentaram aproximadamente 60% de oxigênio e algumas delas apresentaram concentrações menores que 3%, 1%, 5% e 10% de Si, Na, Mg e C, respectivamente. A incorporação de Na, Mg e Si possivelmente é devido a contaminação pela alumina usada no jateamento ou pelo vidro da janela do reator; e C aparece devido a reações pós plasma do filme de Ca.

Como observado na Figura 4.23, após a exposição ao plasma, com exceção das amostras tratadas na condição H, todas as outras amostras apresentaram um filme de cálcio. É

interessante notar que baixas concentrações de titânio são observadas nas amostras que apresentam alta concentração de cálcio. Para os filmes depositados nas condições B, E e G, isto pode ser explicado pela elevada espessura do filme de cálcio formado, conforme apresentado na Figura 4.17. Para filmes mais espessos ocorre uma menor interação ou não interação do feixe de elétrons usado na análise, com o substrato e por isso titânio é detectado em baixa concentração ou não é detectado.

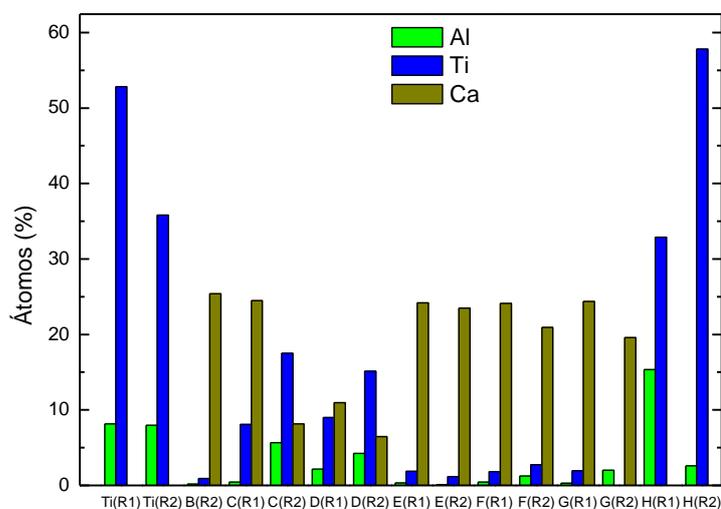


Figura 4.23– Porcentagens atômicas obtidas por EDS das superfícies de amostras de titânio com rugosidades R1 e R2 sem recobrimento e recobertas por IIDIP nas diferentes condições descritas na Tabela 1 antes da imersão em SBF.

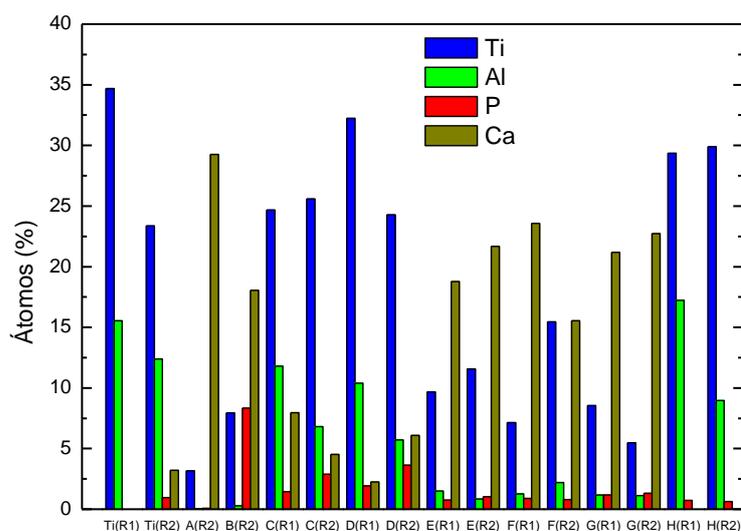


Figura 4.24 – Porcentagens atômicas obtidas por EDS das superfícies de amostras de titânio com rugosidades R1 e R2 sem recobrimento e recobertas por IIDIP nas diferentes condições descritas na Tabela 1 após a imersão em SBF.

A presença de oxigênio na superfície do titânio sem recobrimento é devida à incorporação de alumina usada no jateamento e também ao óxido de titânio nativo. Para as amostras recobertas, a presença de oxigênio é devida à formação de carbonato de cálcio, óxido de cálcio, hidróxido de cálcio e titanato de cálcio (LIU et al., 2005).

Alumínio foi detectado na superfície de algumas amostras e, como comentado anteriormente, sua presença é devida, provavelmente, ao processo de jateamento com esferas de Al_2O_3 . De uma forma geral, uma menor concentração de alumínio foi detectada nas amostras recobertas por filmes mais espessos. Entretanto, em alguns casos, como, por exemplo, para a amostra de titânio com rugosidade R2 tratada na condição G, mesmo a grande espessura do filme não foi suficiente para impedir a interação do feixe de elétrons com a alumina no substrato. Nestes casos, alumínio pode ter sido detectado em função da presença de trincas ou poros na região de análise.

Após a imersão em SBF, além dos elementos cujas concentrações são apresentadas na Figura 4.23, também foram detectados fósforo e cerca de 54% de oxigênio em todas as amostras. Foram também detectados em algumas amostras concentrações de até 4% de Si, 1% de Na, 1% de Mg e 10% de C em algumas situações.

Comparando-se as Figuras 4.23 e 4.24 observa-se alterações na concentração de cálcio e a incorporação de fósforo na maioria das amostras após a imersão em SBF. Isto é um indicativo da precipitação de fosfato de cálcio, já que alguns trabalhos mostram que o processo de precipitação de fosfato de cálcio acontece a partir da dissolução de íons de cálcio na solução corpórea (^{a,b}HANAWA; ASAMI; ASAOKA, 1996; KIZUKI et al., 2010).

Para as amostras de titânio com rugosidade R2, mesmo sem o recobrimento com cálcio houve a incorporação de Ca e P após a imersão em SBF, como também evidenciado pela análise de XPS. Para o titânio com rugosidade R1 estas mesmas espécies não foram detectadas por EDS embora tenham sido detectadas em baixa quantidade por XPS. A energia do feixe de elétrons usado para a análise de EDS deste trabalho foi de 5 keV, a qual permite a análise de uma camada de espessura de 400 a 700 nm, enquanto em XPS a camada analisada é da ordem de 10 a 50 Å. Logo, para esta amostra Ca e P devem estar em uma camada superficial muito fina. A maior concentração de outros elementos, por causa da profundidade atingida pelo feixe de elétrons do EDS, faz com que os sinais correspondentes a Ca e P, que estão presentes em menores concentrações, sejam diluídos, impossibilitando sua quantificação. Coerentemente com o trabalho de Liu et al. (2004), análises realizadas em

amostras de titânio polido após a imersão em SBF também não mostraram diferenças superficiais em comparação ao titânio sem imersão em SBF.

Comparando-se as amostras de titânio sem recobrimento, pode-se dizer a partir dos resultados acima que o mais rugoso (R2) apresentou uma melhor interação com o SBF. Isto acontece porque um dos parâmetros que influenciam a bioatividade de uma superfície é a sua topografia (WU et al., 2011; ROSALES-LEAL et al., 2010; APARICIO; GIL; PLANNEL, 2002).

Diferentemente do observado com XPS, em EDS a concentração de cálcio é sempre maior do que a de fósforo. Como a análise de EDS é realizada em camadas mais espessas, o cálcio detectado provém não somente da camada formada quando a amostra é imersa em SBF, mas também do filme depositado a plasma. As concentrações dos outros elementos obtidas por EDS também não correspondem às concentrações obtidas por XPS devido a esta diferença na espessura da camada analisada.

Assim como na análise de XPS, a maior concentração de fósforo foi obtida na amostra com rugosidade R2 tratada na condição B.

4.2.4 Morfologia:MEV

A Figura 4.25 mostra micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) antes (coluna *a*) e após (coluna *b*) a imersão em SBF.

Fazendo-se uma comparação da superfície do titânio com rugosidade R2 antes e após a imersão em SBF pode-se perceber, pela imagem com ampliação de $6\mu\text{m}$, uma alteração na topografia da superfície. A superfície do titânio antes da imersão em SBF apresenta mais irregularidades. As análises de EDS, Figuras 4.23 e 4.24 mostram que espécies como Ca e P que antes da imersão em SBF não eram detectadas na superfície, surgem após a imersão. Como visto pelas análises de XPS, estas espécies estão na superfície na forma de CaTiO_3 , CaCO_3 e apatita. Este filme formado pode ter recoberto as regiões mais profundas da superfície. Além desta diferença, observando-se as regiões mais planas das imagens obtidas antes e após a imersão em SBF, percebe-se que após a imersão essas regiões apresentam um aspecto mais rugoso. Na imagem com escala de $3\mu\text{m}$ nota-se uma estrutura ondulada sobre

esta superfície. Esta ondulação também pode ter sido causada pelo filme de fosfato de cálcio crescido sobre a superfície após a imersão em SBF.

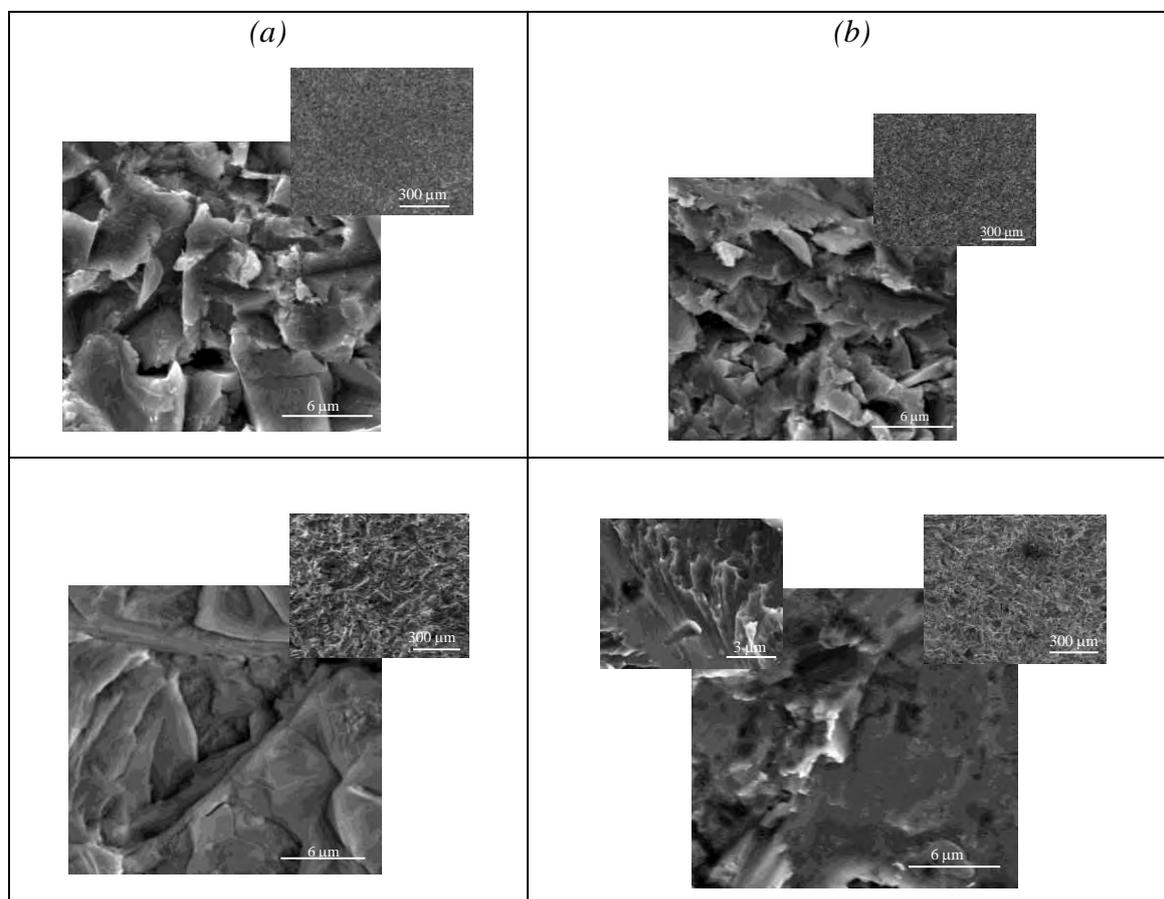


Figura 4.25 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) antes (coluna *a*) e após (coluna *b*) imersão em SBF.

Para o titânio com rugosidade R1 não é observada nenhuma alteração de topografia após a imersão em SBF, como pode ser constatado pela análise da Figura 4.25. Este resultado está de acordo com as análises de EDS, Figura 4.24, e de XPS, Figura 4.22. Com EDS não foi detectado Ca e P sobre a superfície após a imersão em SBF, e XPS revelou uma baixa concentração dessas espécies, sugerindo a formação de um filme de fosfato de cálcio muito fino e por isso incapaz de alterar a topografia superficial.

A Figura 4.26 mostra uma micrografia eletrônica de varredura da amostra de titânio com rugosidade R2 tratada na condição A antes (coluna *a*) e após (coluna *b*) a imersão em SBF. Comparando esta imagem com a imagem do titânio sem recobrimento, Figura 4.25, percebe-se uma grande mudança na topografia da superfície. Devido à grande espessura do

filme depositado por IIDIP sobre a superfície, as grandes amplitudes entre picos e vales existentes no titânio são recobertas. A superfície passa a ter a aparência de uma esponja após o recobrimento com o filme de cálcio. Após a imersão em SBF a superfície continuou com aspecto de esponja, entretanto com maiores dimensões. Pelas análises de XPS e EDS, após a imersão em SBF, esta amostra não apresentou o crescimento de fosfato de cálcio, logo a mudança de estrutura deve ter ocorrido pela absorção de água durante a imersão.

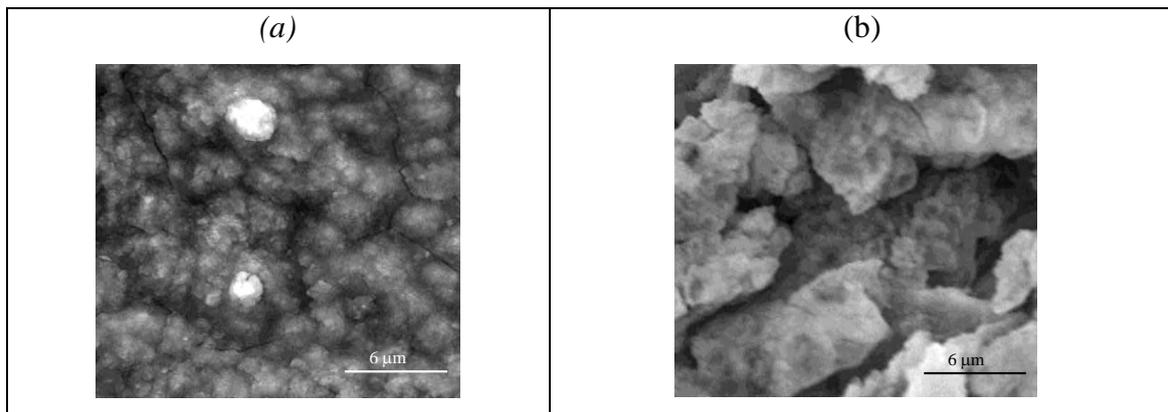


Figura 4.26 – Micrografias eletrônicas de varredura da amostra de titânio com rugosidade R2 modificada por IIDIP na condição A antes (a) e após (b) imersão em SBF.

A Figura 4.27 mostra micrografias eletrônicas de varredura do titânio com rugosidade R2 recoberto com filme de cálcio na condição B.

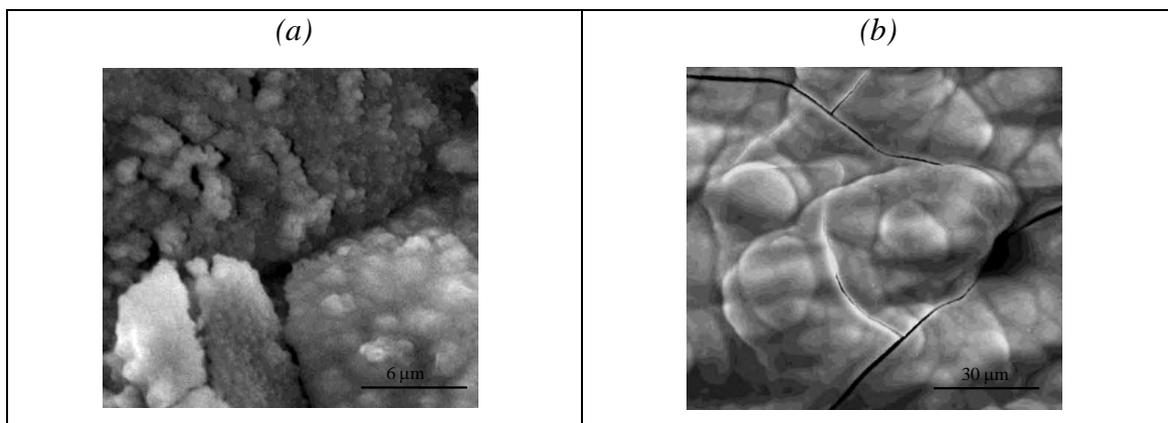


Figura 4.27 – Micrografias eletrônicas de varredura da amostra de titânio com rugosidade R2 modificada por IIDIP na condição B antes (a) e após (b) imersão em SBF.

Assim como o filme depositado na condição A, a grande espessura do filme de Ca depositado na condição B, Figura 4.27, alterou a topografia do titânio. É observada a formação de um filme com estruturas esféricas com dimensões menores que 1 μm , semelhante ao observado por Liu e Chu (2008). Este aspecto diferente é devido ao filme de cálcio depositado. Trabalhos mostram que os materiais usados para implantes precisam ter uma superfície nanoestruturada para induzir o crescimento ósseo (LIU; CHU, 2008; WEBSTER et al., 2000). A morfologia desta amostra tornou-se diferentes após a imersão em SBF. Comparando-se as imagens antes e após a imersão, percebe-se que a superfície após a imersão torna-se mais lisa e há o surgimento de uma estrutura em forma de bolhas, de maneira idêntica ao relatado na literatura (LIU et al., 2005; VANZILLOTA et al., 2006; SOUZA et al. 2010; STAN et al, 2011). De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.22, as maiores concentrações de cálcio e fósforo foram verificadas nesta amostra. Logo estas espécies juntamente com oxigênio podem estar na superfície na forma de CaTiO_3 , CaCO_3 e apatita. Este filme formado sobre a superfície é muito semelhante com o formado sobre biovidro, Figura 4.28, que é um material bioativo (CHEN et al, 2010; STAN et al, 2011). As trincas observadas nas imagens são devido à perda de água durante a aquisição das imagens (SOUZA et al., 2010).

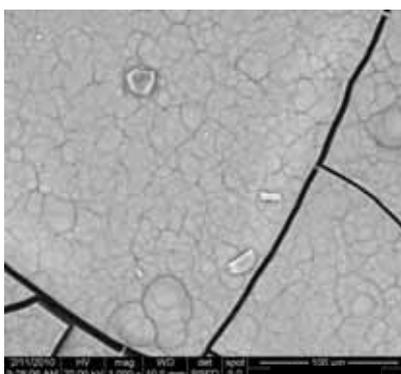


Figura 4.28 – Micrografia eletrônica de varredura de amostra de biovidro após imersão em SBF.

As Figuras 4.29 e 4.30 mostram as micrografias obtidas por MEV de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) recobertas nas condições C e D, respectivamente. As colunas *a* e *b* correspondem, respectivamente, às amostras antes e após a imersão em SBF. Como pode ser notado, a topografia das amostras recobertas com o filme de cálcio é alterada após a imersão em SBF. A amostra com rugosidade R2 tratada na

condição D apresentou estrutura em forma de bolhas, característica de apatita, como observado para a amostra recoberta na condição B (Figura 4.27). As superfícies das amostras tratadas nas condições C(R1) e C(R2) tornaram-se mais lisas após a imersão. Todavia, as estruturas em forma de bolhas não são evidentes, embora a composição química da superfície, como visto por EDS, tenha sido a mesma. Avaliando-se a concentração atômica obtida por EDS e XPS, percebe-se que as amostras de titânio B(R2) e D(R2) que apresentaram esta estrutura são as com maior concentração de fósforo. Logo nestas duas amostras o processo de nucleação de apatita pode ter sido mais acelerado do que nas demais e por isso o filme crescido tornou-se mais visível. Antes da imersão em SBF, a imagem da amostra de titânio com rugosidade R2 tratada na condição D, Figura 4.30, apresenta uma região (lado esquerdo da imagem) parecida com a amostra tratada na condição B, onde existe uma estrutura na forma de pequenas esferas. Logo esta estrutura parece influenciar fortemente o crescimento de apatita. A similaridade do filme de cálcio crescido sobre estas duas superfícies é devida à semelhança nas condições usadas durante a IIDIP. Tais condições diferiram apenas no tempo de deposição, que foi menor na condição D. Entretanto a variação no tempo de deposição tem uma maior influência na espessura do filme e por isso a estrutura é preservada.

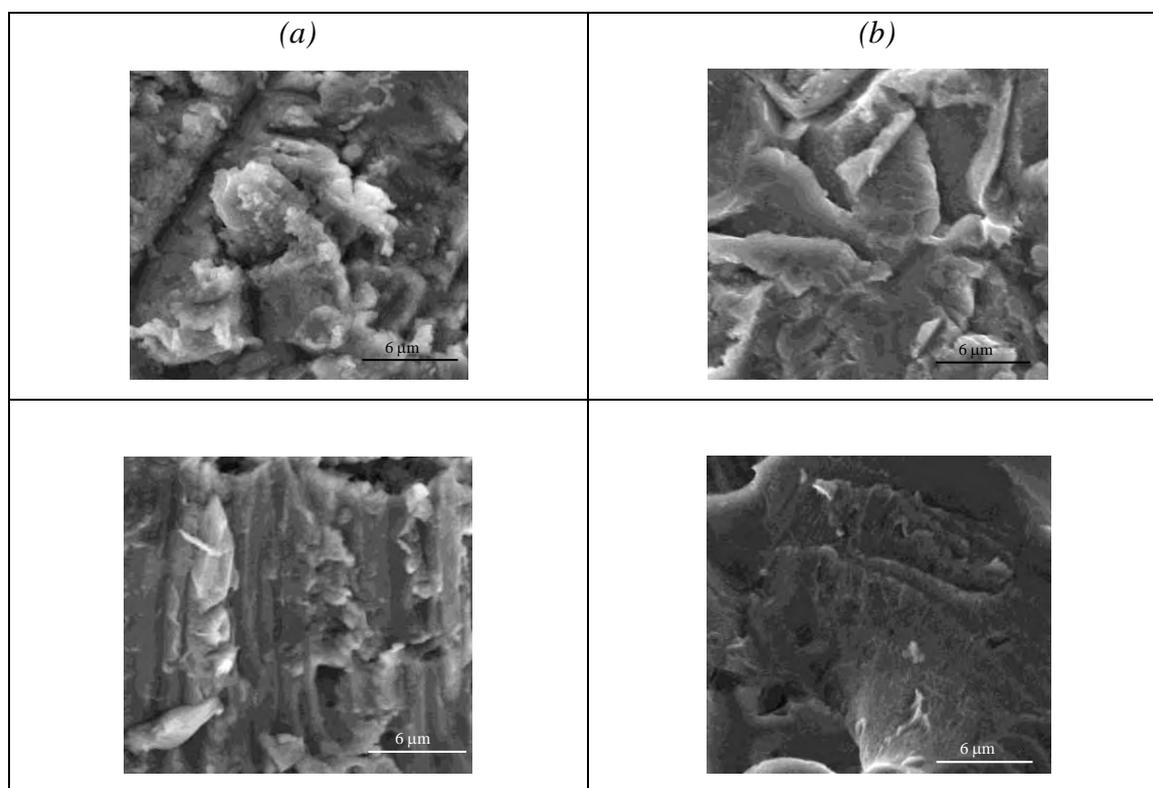


Figura 4.29 – Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) modificadas por IIDIP na condição C antes (coluna a) e após (coluna b) imersão em SBF.

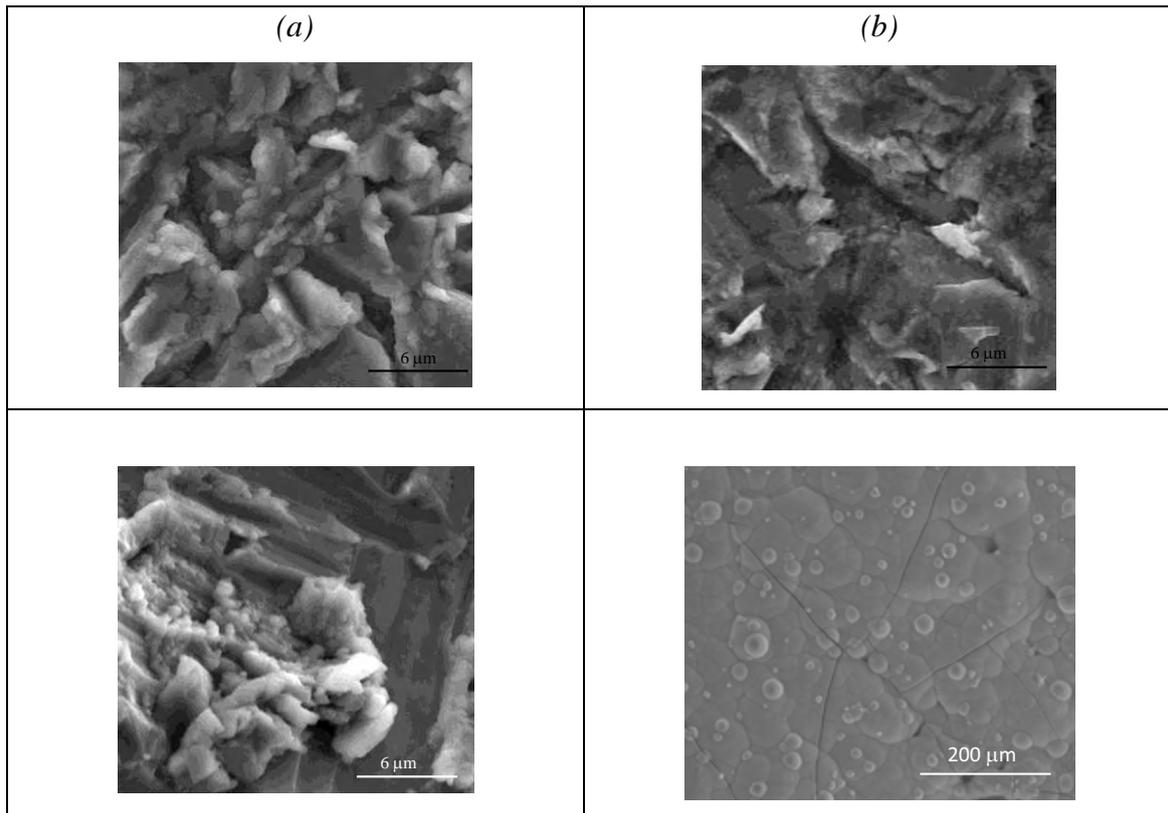


Figura 4.30 – Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) modificadas por IIDIP na condição D antes (coluna *a*) e após (coluna *b*) imersão em SBF.

As Figuras de 4.31 a 4.34 mostram as micrografias obtidas por MEV das amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) recobertas com filmes de Ca nas condições E, F, G e H, respectivamente. A coluna *a* e *b* correspondem, respectivamente, às amostras antes e após a imersão em SBF. Todas as superfícies apresentaram alterações topográficas após a imersão devido ao crescimento do filme de fosfato. Para a amostra com rugosidade R2 tratada na condição F, Figura 4.32, percebe-se, após a imersão a formação de uma superfície com aspecto de uma esponja. Este filme esponjiforme também foi observado em amostras de titânio com rugosidade R1 tratadas nas condições F e G, como mostrado nas Figuras 4.32 e 4.33. Esta estrutura é semelhante a núcleos de apatita obtidos em trabalho de Souza et al. (2010).

Após a imersão de amostras com rugosidade R2 tratadas na condição G, Figura 4.33, observa-se um filme característico de apatita, como visto anteriormente para as amostras tratadas na condição B e D.

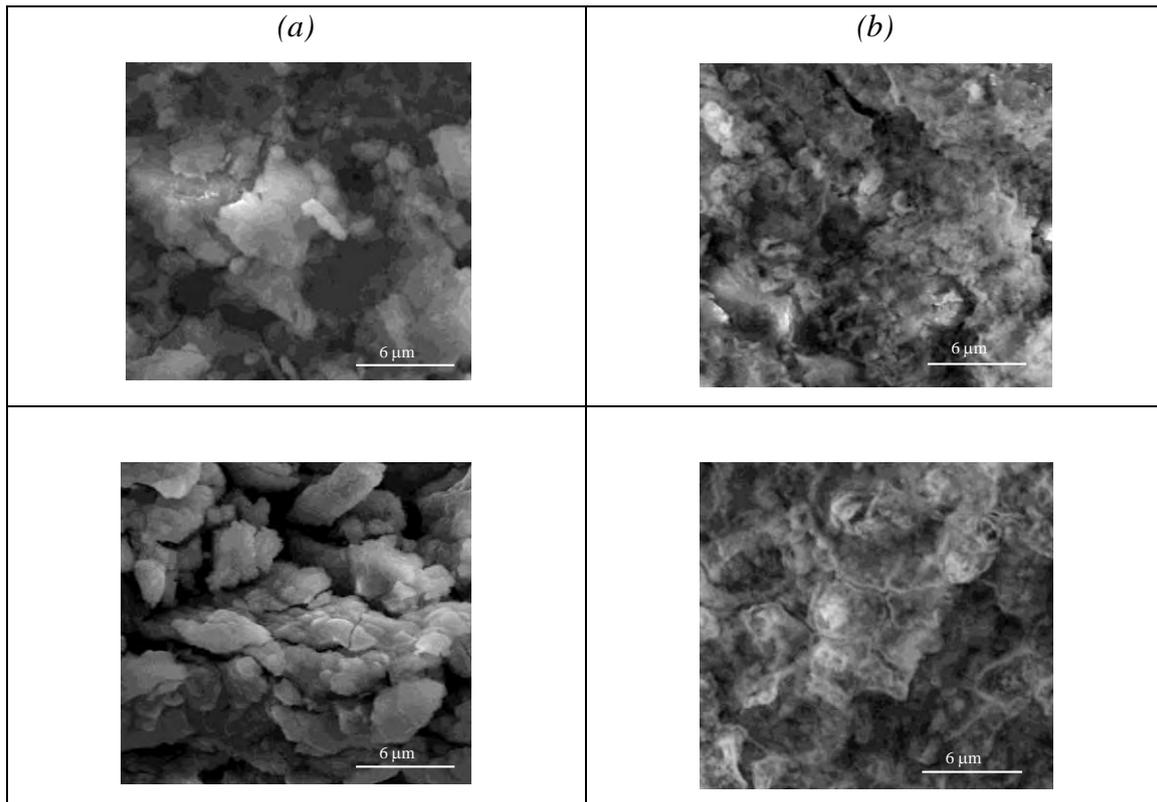


Figura 4.31 - Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) modificada por IIDIP na condição E antes (coluna *a*) e após (coluna *b*) imersão em SBF.

As imagens das amostras de titânio tratadas na condição H, Figura 4.34, mostram que antes da imersão em SBF a morfologia do titânio não se alterou comparada ao titânio sem tratamento, Figura 4.25. Este resultado está de acordo com as análises anteriores que sugeriram que o plasma não causou grandes alterações na superfície desta amostra. Deste modo esta superfície se assemelha ao titânio sem recobrimento e por este motivo apresentaram diferenças topográficas menos evidentes após a imersão.

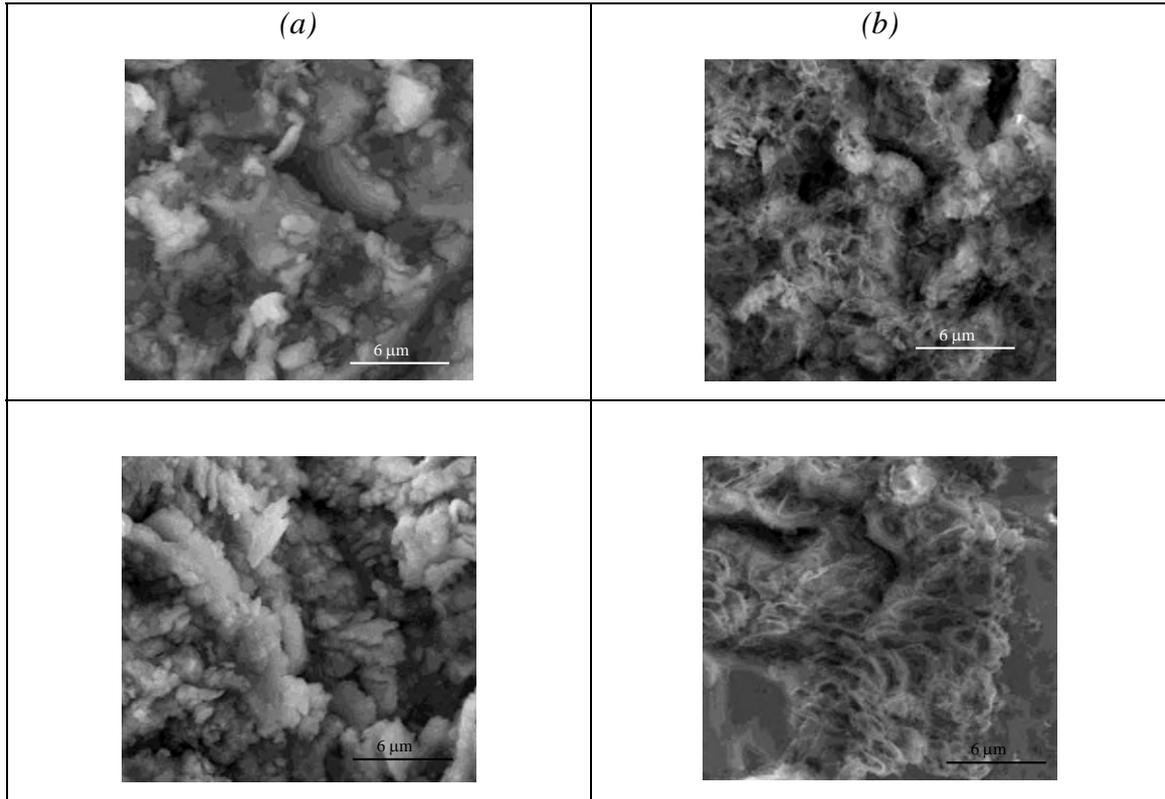


Figura 4.32 - Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 e R2 modificada por IIDIP na condição F antes e após imersão em SBF.

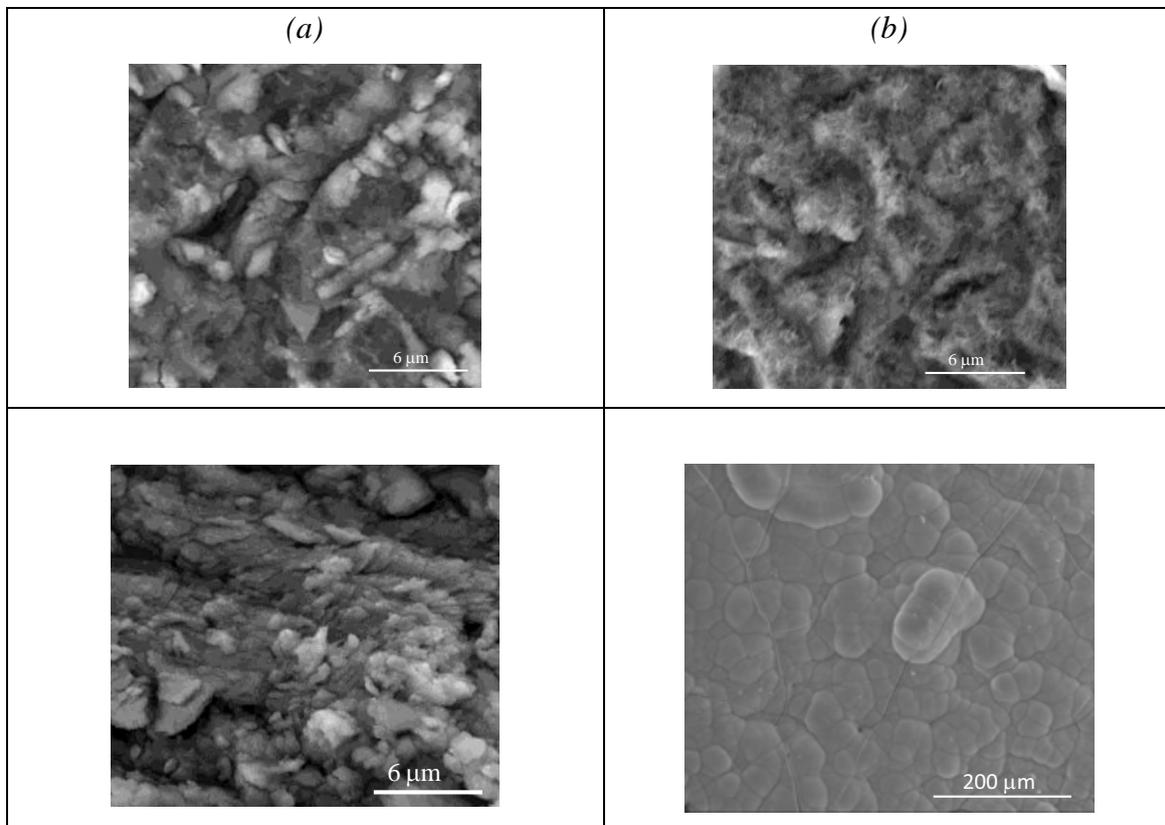


Figura 4.33 - Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) modificada por IIDIP na condição G antes (coluna a) e após (coluna b) imersão em SBF.

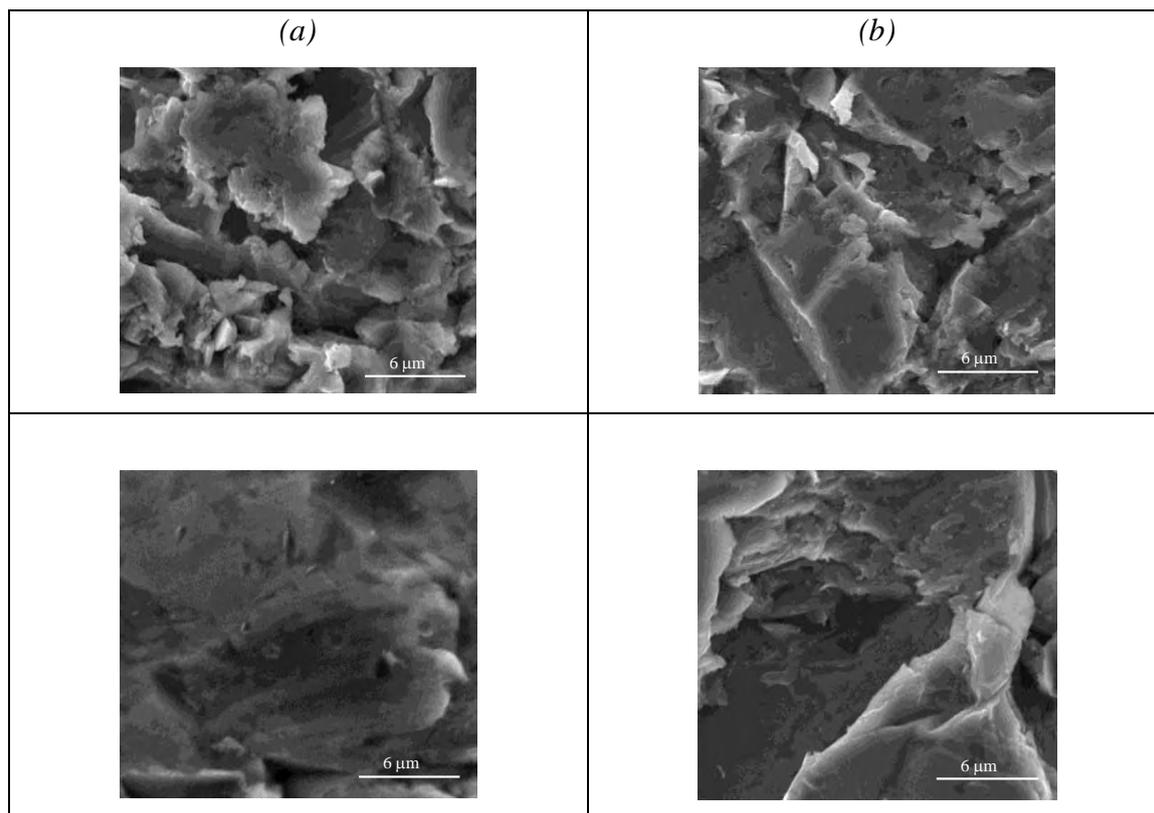


Figura 4.34 - Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de titânio com rugosidades R1 (primeira linha) e R2 (segunda linha) modificadas por IIDIP na condição H antes (coluna *a*) e após (coluna *b*) imersão em SBF.

4.2.5 Estrutura Cristalina: DRX

A Figura 4.35 mostra difratogramas de raios X de amostras de titânio tratadas nas condições A, B, D, E e G após a imersão em SBF. Para comparação é também mostrado o difratograma do titânio sem recobrimento e sem imersão. Os picos foram identificados de acordo com o padrão ICDD (International Centre for Diffraction Data - Fichas nº 86-0740, 89-6440, 81-2257, 72-1651, 46-1212). Observa-se que as amostras A(R2), E(R1) e E(R2) apresentam apenas um pico ($23,1^\circ$) referentes à apatita, e picos referente à $\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$ e CaCO_3 . Nestas três amostras e também na G(R2) o pico referente ao $\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$ é estreito, indicando um maior grau de cristalinidade. Já os picos referentes ao CaCO_3 são mais largos com exceção da amostra E(R1), indicando baixa cristalinidade. As amostras tratadas nas condições B(R2) D(R2) e G(R2) apresentaram picos mais intensos e bem definidos referentes à apatita confirmando os resultados de XPS e as imagens obtidas por MEV que sugeriam a formação deste filme.

A amostra tratada na condição A não apresentou fósforo na análise de XPS (Figura 4.22), entretanto em DRX aparece um pico referente à $\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$. Uma possível explicação para isto seria a presença de $\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$ em camadas mais profundas do que a atingida na análise de XPS.

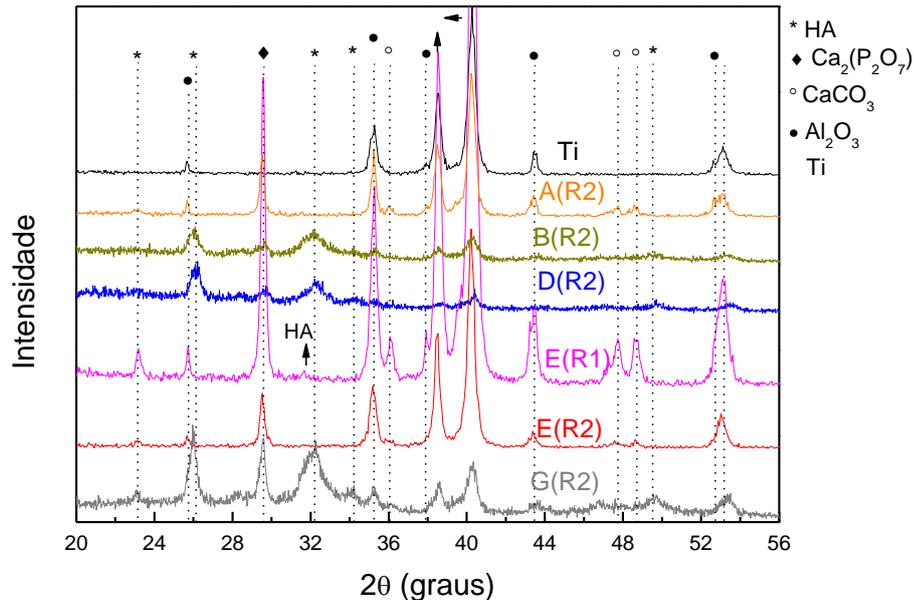


Figura 4.35 – Difratogramas de DRX para amostras de titânio modificadas por IIDIP em diferentes condições (Tabela 1) após a imersão em SBF. Para comparação é apresentado o difratograma do titânio sem recobrimento e sem imersão em SBF.

A amostra E(R2) apresentou apenas um pico pouco intenso em $23,1^\circ$ referente à apatita na análise de DRX. Os filmes depositados nas demais condições que não são apresentados no difratograma não apresentaram picos de apatita. Entretanto, os espectros XPS de alta resolução dessas amostras mostraram estes picos. Logo a apatita é amorfa ou com baixa fração de cristalinidade.

É interessante notar que amostras tratadas nas mesmas condições por IIDIP reagem diferentemente com o SBF quando apresentam diferentes rugosidades. A amostra E(R1) apresenta picos de CaCO_3 mais intensos e estreitos do que a E(R2). Além disso, as amostras menos rugosas (R1) tratadas nas condições D e G não apresentaram nenhuma cristalinidade no filme resultante, enquanto as amostras D(R2) e G(R2) apresentaram apatita cristalina. Assim, apatita cristalina cresceu nas amostras de titânio mais rugosas recobertas com os filmes de cálcio nas condições B, D e G.

As amostras também apresentaram picos referentes ao titânio do substrato e a alumina devido ao jateamento com Al_2O_3 .

A Figura 4.36 mostra o ângulo de contato das amostras de titânio com rugosidade R2 tratadas nas diferentes condições da Tabela 1. O crescimento do filme de apatita pode estar relacionado com este ângulo. Para as amostras tratadas nas condições B(R2) e D(R2), as quais apresentaram o crescimento do filme de apatita cristalina, θ foi nulo. Superfícies com baixos ângulos de contato têm uma maior interação com o SBF. Embora a amostra tratada na condição E também tenha apresentado ângulo de contato nulo, e na condição F próximo de zero ($\cong 5^\circ$), não houve o crescimento do filme de apatita cristalina. Isto pode ser explicado pelas baixas intensidades das bandas de OH observadas nos espectros de IRRAS destas amostras (Figura 4.19). Como os radicais OH são os responsáveis por iniciar a formação de apatita, uma baixa concentração desses radicais pode tornar o processo de crescimento ineficiente. Este fato é reforçado pela análise da amostra tratada na condição G. Embora essa amostra tenha apresentado ângulo de contato maior que do que a tratada na condição F ($\cong 20^\circ$), o espectro de IRRAS apresentou uma intensa banda de OH, explicando o crescimento do filme de apatita cristalina após a imersão em SBF. Embora a amostra tratada na condição C tenha apresentado uma banda OH relativamente intensa, o ângulo de contato, assim como medido na amostra tratada na condição H, foi muito superior aos demais. Nestes dois casos a interação da superfície com a solução é menor e por isso o processo de crescimento de apatita pode ser mais lento.

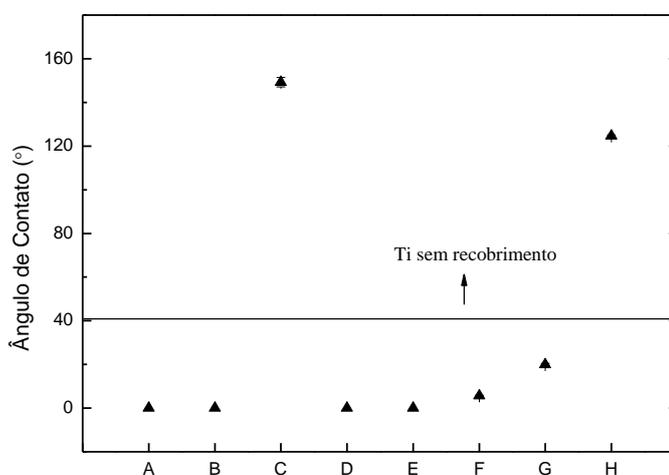


Figura 4.36 – Ângulo de contato das amostras de titânio com rugosidade R2 modificadas por IIDIP em diferentes condições (Tabela 1). Para comparação é apresentado o ângulo de contato do titânio como recebido.

5 CONCLUSÕES

Foi demonstrada a possibilidade de se depositar filmes a partir de plasmas gerados com vapor de solução de nitrato de cálcio dissolvido em álcool isopropílico. Todavia, as análises de composição química realizadas por PIXE, EDS e XPS não revelaram diferenças significativas entre os filmes obtidos com diferentes pressões parciais do vapor na alimentação da descarga, R_{Ca} . Após a imersão em SBF não foi possível verificar alterações nas superfícies pelas técnicas de EDS e XPS. No entanto, a técnica de PIXE detectou uma pequena concentração de fósforo nas amostras tratadas com R_{Ca} de 70, 85 e 90%. Alterações após a imersão em SBF foram confirmadas por EIE. Com esta técnica foi possível constatar modificações superficiais não reveladas por técnicas sofisticadas como XPS. Devido à baixa concentração de fósforo nas amostras não foi possível determinar se houve ou não a formação de apatita. A partir deste método de deposição foram obtidos resultados promissores de adesão e viabilidade de células osteoblásticas. A deposição com R_{Ca} de 95% favoreceu o crescimento de células osteoblásticas, aumentando em 100%, em relação ao titânio sem tratamento, a viabilidade celular após 24 horas de incubação.

Diferentemente do conjunto de amostras tratadas a partir da vaporização de solução de nitrato de cálcio, observou-se apreciáveis alterações morfológicas e composicionais nas amostras tratadas a partir da sublimação de cálcio granulado. Os filmes depositados apresentaram grande quantidade de cálcio e após a imersão em SBF a presença de fósforo foi evidenciada por todas as técnicas de análise utilizadas. As análises de XPS dessas amostras mostraram que os elementos Ca, P e O estão presentes na forma de apatita. Entretanto, as análises de DRX revelaram que nem todas as amostras apresentaram apatita cristalina. A partir dos resultados obtidos conclui-se que a formação de apatita cristalina está relacionada com a rugosidade da superfície, a interação da superfície com a solução, ou seja, o ângulo de contato e também com a concentração de radicais OH presentes na superfície. Apatita cristalina foi obtida nas amostras com elevada rugosidade, ângulos de contato nulo ou próximos a zero e alta concentração de radicais OH. Esse conjunto de propriedades possibilitou que uma grande quantidade de apatita fosse nucleada em um curto período de tempo (14 dias) nas amostras tratadas nas condições B, D e G.

A IIDIP mostrou-se eficiente na melhora da bioatividade do titânio.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo mais aprofundado em filmes depositados a partir da vaporização de nitrato de cálcio dissolvido em álcool isopropílico.
- Realizar a deposição do filme a partir da vaporização de nitrato de cálcio dissolvido em álcool isopropílico na condição de $R_{Ca}=95\%$ em amostras de titânio com rugosidade de $6,5 \mu\text{m}$ buscando a precipitação de apatita sobre esta superfície.
- Buscar um maior controle das condições de deposição dos filmes obtidos por IIDIP a partir da sublimação de cálcio granulado. Este controle pode ser conseguido com um sistema em que a geração do plasma seja realizada a partir de radiofrequência.

REFERÊNCIAS

- ABDELTAWAB, A. A.; SHOEIB, M. A.; MOHAMED, S. G. Electrophoretic deposition of hydroxyapatite coatings on titanium from dimethylformamide suspensions. **Surface & Coatings Technology**, v.206(1), p.43-50, 2011.
- ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical Chemistry of Surfaces**. New York: Wiley Intersc. Publ., 1997. Cap.5, 6, 10.
- ALBREKTSSON, T. et al. Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. **International Journal of Prosthodontics**, v.3 (1), p.30-41, 1990.
- ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. The Impact of Oral Implants -Past and Future, 1966–2042. **Journal of the Canadian Dental Association**, v.71 (5), p.327-327d, 2005.
- ANDERS, A. et al. Increasing the retained dose by plasma immersion ion-implantation and deposition. **Nuclear Instruments and Methods Section B**, v.102, p.132-135, 1995.
- AMIN, M.S. et al. Biomimetic apatite growth from simulated body fluid on various oxide containing DLC thin films. **Diamond and Related Materials**, v.21, p.42-49, 2012.
- ANDERSEN, F.A.; BRECEVIC, L. Infrared Spectra of Amorphous and Crystalline Calcium Carbonate. **Acta Chemica Scandinavica**, v.45, p.1018-1024, 1991.
- ANSELME, K. et al. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.60, p.529-540, 2002.
- APARICIO, C.; GIL, F.J.; PLANNEL, J.A. Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.13, p.1105-1111, 2002.
- ARYEH, Ben-Na'im. **Hydrophobic Interaction**. New York: Plenum Press, 1980.
- BAGRATASHVILI, V.N. et al. Macroparticle distribution and chemical composition of laser deposited apatite coatings. **Applied Physics Letter**, v.66, p.2451, 1995.
- BELLOWS, C. G. et al. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. **Calcified Tissue International**, v.38, n.3, p.143-154, 1986.
- BELLOWS, C. G.; CIACCIA, A.; HEERSCHE, J. N. Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. **Bone**, v.23, n.2, p.119-125, 1998.
- BESSLER, K. E.; RODRIGUES, L. C. Os polímeros de carbonato de cálcio – uma síntese fácil de aragonita. **Quimica Nova**, v.31, n^o.1, p.178-180, 2008
- BIGI, A. et al. Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. **J Inorg Biochem**, v.68, p.45-51, 1997.

BLOEABAUM, R. D. et al. Complications with hydroxyapatite particulate separation in total hip arthroplasty. **Clin Orthop Relat Res.**, v.298, p.19-26, 1994.

BOUKAMP, B. A. **Equivalent Circuit**. University of Twente, Netherlands, 1989.

BOWEN, W. R.; HILAL, N. **Atomic Force Microscopy in Process Engineering. An Introduction to AFM for Improved Processes and Products**. Oxford: Icheme, 2009. Disponível em: <http://books.google.com.br/>. Acesso:25/06/2012.

BRANEMARK, P. I. et al. **Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: experience from a 10-year period**. Stockolm: Almqvist & Wilsell International, 1977.

BRECEVIC, L.; NIELSEN, A.R. Solubility of Amorphous Calcium Carbonate. **Journal of Crystal Growth**, v.98, p.504-510, 1989.

BUYUKSAGIS, A. et al. The Examination of Corrosion Behaviors of HAP Coated Ti Implant Materials and 316L SS by Sol-Gel Method. **Protection of metals and physical chemistry of surfaces**, v.47(5), p.670-679, 2011.

CESCHIN, J. R. **O Implante na Reabilitação Oral**. São Paulo: Panamed, 1984.

CHEN, J. Y. et al. Behavior of cultured human umbilical vein endothelial cells on titanium oxide films fabricated by plasma immersion ion implantation and deposition. **Surface & Coatings Technology**, v.186, p.270–276, 2004.

CHEN, X. et al. Synthesis and characterization of novel multiphase bioactive glass-ceramics in the CaO-MgO-SiO₂ system. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B Applied Biomaterials**, v.93(1), p.194-202, 2010.

CHEN, X. et al. In vitro behaviour of human osteoblast-like cells (SaOS2) cultured on surface modified titanium and titanium-zirconium alloy. **Materials Science and Engineering C**, v.31, p.1545-1552, 2011.

CHOUDHURY, P.; AGRAWAL, D.C. Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrates. **Surface and Coatings Technology**, v.206(2-3), p.360-365, 2011.

CHU, P.K. Plasma surface treatment of artificial orthopedic and cardiovascular biomaterials. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, p. 5601-5606, 2007.

CONRAD, J.R. Introduction. In: ANDERS, A. (Ed.). **Handbook of Plasma Immersion Ion Implantation and Deposition**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2000. Cap.1, p.2-22.

CONRADS, H.; SCHMIDT, M. Plasma generation and plasma sources. **Plasma Sources Sci. Technol.**, v.9, p.441–454, 2000.

CULLITY, B.D. Elements of X-ray Diffraction. Massachusetts: Addison Wesley Publishing Company, Inc, 1956.

CURTIS, A.; WILKINSON, C. Topographical control of cells. **Biomaterials**, v.18, p.1573-1583, 1997.

CZANDERNA, A. W. **Methods of Surface Analysis**. Amsterdam: Elsevier, cap.4, 1989.

DIAS, G.J et al. Keratin-hydroxyapatite composites: Biocompatibility, osseointegration, and physical properties in an ovine model. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.95A(4), p.1084-1095, 2010.

^aDUCHEYNE, P. et al. Effect of calcium phosphate coating characteristics on early post-operative bone tissue ingrowth. **Biomaterials**, v.11(8), 531-540, 1990.

^bDUCHEYNE, P. et al. Calcium phosphate ceramic coatings on porous titanium: effect of structure and composition on electrophoretic deposition, vacuum sintering and in vitro dissolution. **Biomaterials**, v.11(4), p.244-254, 1990.

DUCHEYNE, P. et al. Structural analysis of hydroxyapatite coatings on titanium. **Biomaterials**, v.7, p.97-104, 1986.

EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas**. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1979.

ERIKSSON, A.R.; ALBREKTSSON, T. Temperature threshold levels for heat- induced bone tissue injury: a vital microscopic study the rabbit. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.50 (1), p.101-107, 1983.

FOWKES, F. M. Attractive forces at interfaces. **Ind. Eng. Chem.**, v. 56, p. 40-52, 1964.

FRIDMAN, A.; KENNEDY, L.A. Plasma Physics and Engineering. New York:Taylor & Francis, cap.2, 3 e 4, 2004.

GARCIA-ALONSO, D. et al. Low-Energy Plasma Spray (LEPS) Deposition of Hydroxyapatite/Poly-epsilon-Caprolactone Biocomposite Coatings. **Journal of Thermal Spray Technology**, v.21(1), p.132-143, 2012.

GARCÍA-SANZ, F. J. et al. Hydroxyapatite coatings: a comparative study between plasma-spray and pulsed laser deposition techniques. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.8, p.861-865, 1997.

GEESINK, R. G.; HOEFNAGELS, N. H. Six-year results of hydroxyapatite coated total hip replacement. **Journal of Bone and Joint Surgery British**, v.77-B, p.534-547, 1995.

GHOMI, H.; FATHI, M.H.; EDRIS, H. Preparation of nanostructure hydroxyapatite scaffold for tissue engineering applications. **J Sol-Gel Sci Technol**, v.58, p.642-650, 2011.

GÓES, A. M. et al. Teste in vitro com biomateriais e citotecnia. In: ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p.285-297.

GOLDSTEIN, J.I. et al. **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis**. New York and London: Plenum Press, 1992. Cap.4, 8 e 9.

GONZALEZ, J. E. G.; MIRZA-ROSCA, J. C. Study of the corrosion behavior of titanium and some of its alloys for biomedical and dental implant applications. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.471,p.109–115, 1999.

GUNASEKARAN, S.; ANBALAGAN, G.; PANDI, S. Raman and infrared spectra of carbonates of calcite structure. **J. Raman Spectrosc.**, v.37, p.892–899, 2006.

HALLIDAY, D; RESNICK, R; WALKER, J. **Fundamentos de Física-eletromagnetismo**. Rio de Janeiro: LTC, 1993.

HANAWA, T. In vivo metallic biomaterials and surface modification. **Materials Science and Engineering**, v.A267, p.260-266, 1999.

^aHANAWA, T.; ASAMI, K.; ASAOKA, K. Aes studies on the dissolution of surface oxide from calcium-ion-implanted titanium in nitric acid and buffer solutions. **Corrosion Science**, v.38, p.2061-2067, 1996.

^bHANAWA, T.; ASAMI, K.; ASAOKA, K. Microdissolution of calcium ions from calcium-ion-implanted titanium. **Corrosion Science**, v.38, p.1579-1594, 1996.

^cHANAWA, T. et al. Calcium phosphate precipitation on titanium electrolyte and its acceleration by calcium-ion-implantation. In: Symposium on compatibility of biomedical implants, 1994, San Francisco. **Proceedings of the Symposium on Compatibility of Biomedical Implants**. Pennington: The Electrochemical Society, Incorporated, v.94-15, p.126-137, 1994.

HANAWA, T. et al. Early bone formation around calcium-ion-implanted titanium inserted into rat tibia. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.36, p.131-136, 1997.

^dHANAWA, T.; MURAKAMI, K.; KIHARA, S. Characterization and Performance of Calcium Phosphate Coatings for Implants, ASTM STP 1196, Philadelphia, p.170, 1994.

^eHANAWA, T. et al. Compatibility of MC3T3-E1 cells with calcium-ion-implanted titanium. **Journal of Japanese Society for Biomaterials**, v.12, p.209-216, 1994.

HANAWA, T.; OTA, M. Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution. **Biomaterials**, v.12, n° 8, p.767-774, 1991.

HANAWA, T.; UKAI, H.; MURAKAMI, K. X-ray photoelectron spectroscopy of calcium-ion-implanted titanium. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v.63, p.347-354, 1993.

HANAWA, T. et al. Structure of surface-modified layers of calcium-ion-implanted Ti-6Al-4V and Ti-56Ni. **Mater. Trans. JIM**, v.36, p.438-444, 1995.

HANAWA, T. et al. Amount of hydroxyl radical on calcium ion-implanted titanium and point of zero charge of constituent oxide of the surface-modified layer. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.9, p.89-92, 1998.

HU, X. et al. Surface bioactivity modification of titanium by CO₂ plasma treatment and induction of hydroxyapatite: In vitro and in vivo studies. **Applied Surface Science**, v.257, p.1813-1823, 2011.

IGNATIUS, A. A.; CLAES, L. E. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v.17, p.831-839, 1996.

INAGAKI, N. **Plasma Surface Modification and Plasma Polymerization**. Pennsylvania: Technomic Publishing Company, 1996. Cap.2.

ISO 10993-5, 1992 (E) Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5 – Tests for cytotoxicity: In vitro Methods.

JINNO, T. et al. M. Effects of calcium ion implantation on osseointegration of surface blasted titanium alloy femoral implants in a canine total hip arthroplasty model. **Journal of Arthroplasty**, v.19, p.102–109, 2004.

JOHANSSON, S. A. E. Introduction to PIXE. In: JOHANSSON, S. A. E.; CAMPBELL, J. L.; MALMQVIST, K. G. N.Y (Ed.). **Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (PIXE) in Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Application**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995. Cap.1, p.1-17. Disponível em: <http://books.google.com.br>. Acesso em 06/10/2009.

JOHN, A. et al. Bone growth response with porous hydroxyapatite granules in a critical sized lapine tibial-defect model. **Bulletin of Materials Science**, v.25(2), p.141-154, 2002.

JURCZYK, K. et al. Titanium-10 wt% 45S5 Bioglass nanocomposite for biomedical applications. **Materials Chemistry and Physics**, v.131(1-2), p.540-546, 2011.

KAELBLE, D. H. A Reinterpretation of Organic Liquid-Polytetrafluoroethylene Surface Interactions. **J. Adhes.**, v.2, p.50-70, 1970.

KIZUKI, T. et al. Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment. **Acta Biomaterialia**, v.6, p.2836-2842, 2010.

KOKUBO T. et al. Apatite formation on ceramics, metals, and polymers induced by a CaO, SiO₂ based glass in a simulated body fluid. In: 4th International Symposium on Ceramics in Medicine, 1991, London. **Bioceramics: Proceedings of the 4th International Symposium on Ceramics in Medicine**. England: Oxford, 1991. v.4, p.113-120, T. In: BONFIELD, W.; HASTINGS, G. W.; TANNER, K. E. **Bioceramics**: Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p.113.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. **Biomaterials**, v.27, p.2907-2915, 2006.

KROON, P-O; FREEMAN, M. A. R. Hydroxyapatite coating on hip prostheses: effect on migration into the femur. **Journal of Bone and Joint Surgery British**, v.74-B, p.518-522, 1992.

KRUPA, D. et al. A. Effect of sodium-ion implantation on the corrosion resistance and bioactivity of titanium. **Vacuum**, v.78, p.161–166, 2005.

KRUPA, D. et al. Effect of calcium ion implantation on the corrosion resistance and bioactivity of the Ti6Al4V alloy. **Vacuum**, v.81, p.1310-1313, 2007.

LEE, J.; AOKI, H. Hydroxyapatite coating on titanium plate by a dipping method. **Bio-Medical Material Engineering**, v.5, p.49-58, 1995.

LEGEROS, R. Z.; LEGEROS, J. P. Dense Hydroxyapatite. In HENCH, L. L.; WILSON, J. (Ed.). **An Introduction to bioceramics**. Singapore: World Scientific, 1993. Cap.9, p.139-180. Disponível em <http://books.google.com.br>. Acesso em 27/10/2009.

LI, P.; DE GROOT, K.; KOKUBO, T. Bioactive $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{-TiO}_2$ composite coating prepared by sol-gel process. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v.7, p.27-34, 1996.

LIFSHIN, E. Materials Science and Technology. VCH Verlagsgesellschaft mbH, FRG p.356-421, 1994.

LIU, D.G. et al. Microstructure, corrosion resistance and biocompatibility of titanium incorporated amorphous carbon nitride films. **Surface and Coating Technology**, v.206, p.165-171, 2011.

LIU, X.; CHU, P.K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering**, v.R47, p.49-121, 2004.

LIU, X.; FU, R.K.Y.; CHU, P. K. Surface modification of biomaterials using plasma immersion ion implantation and deposition. In: LIU, X.; CHU, P. K (Ed). **Biomaterials fabrication and processing handbook**. CRC Press/Taylor & Francis, 2008. Cap.19, p.574-624. Disponível em: <http://www.crcnetbase.com/>. Acesso: 14/10/2011.

LIU, X. et al. Biomimetic growth of apatite on hydrogen-implanted silicon. **Biomaterials**, v.25, p.5575–5581, 2004.

LIU, X. et al. Structure and properties of Ca-plasma-implanted titanium. **Surface & Coatings Technology**, v.191, p.43– 48, 2005.

LUNA, S.M. et al. Cell Adhesion and Proliferation onto Chitosan-based Membranes Treated by Plasma Surface Modification. **Journal of Biomaterials Applications**, v.26, p.101-116, 2011.

MAHENDRA, G. et al. Necrotic and inflammatory changes in metal-on-metal resurfacing hip arthroplasties. **Acta Orthop**, v.80, p.653-659, 2009.

MAITZ, M.F. et al. Promoted calcium-phosphate precipitation from solution on titanium for improved biocompatibility by ion implantation. **Surface and Coating Technology**, v.158, p.151-156, 2002.

MARCIANO, F. R. et al. Antibacterial activity of fluorinated diamond-like carbon films produced by PECVD. **Surface & Coatings Technology**, v.204, p.2986-2990, 2010.

MANSFELD, F. Electrochemical Impedance Spectroscopy. In: MARCUS, P.; MANSFELD, F. (Ed.). **Analytical Methods in Corrosion Science and Engineering**. 2005. Cap.13, p.463-502. Disponível em: <http://www.crcnetbase.com/>. Acesso em: 09/11/2011.

MELLO, C. B. et al. A. Surface modification of SAE 1070 by chromium using plasma immersion ion implantation and deposition. **Surface & Coatings Technology**, v.204, p.2971-2975, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

NAGASE, M.; NISHIYA, H.; ABE, Y. The effect of crystallinity on hydroxyapatite induced production of reactive oxygen metabolites. **FEBS Lett**, v.325, p.247-250, 1993.

NEFEDOV, V. I. **X-ray Photoelectron Spectroscopy of Solid Surface**. Tokyo: VSP BV, 1988. Disponível em: <http://books.google.com.br/>. Acesso: 09/11/2011.

OLIVEIRA, R. M. et al. Plasma Immersion Ion Implantation With Lithium Atoms. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v.36, p.2572-2576, 2008.

OLIVEIRA, R.M. et al. S.C. Improved corrosion resistance of tool steel H13 by means of cadmium ion implantation and deposition. **Surface & Coatings Technology**, v.204, p.2981-2985, 2010.

ONG, J. L.; CARNES, D. L.; BESSHO, K. Evaluation of titanium plasma- sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. **Biomaterials**, v.25, p.4601, 2004.

OVERGAARD, S. et al. Resorption of hydroxyapatite and fluorapatite ceramic coatings on weight-bearing implants: A quantitative and morphological study in dogs. **J. Bone Jt. Surg. (Br)**, v.77-B (3), p.285, 1995.

OWENS, D. K.; WENDT, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. **Journal Applied Polymer Science**, v.13, p.1741-1747, 1969.

PAN, J. et al. J. Variation of oxide films on titanium induced by osteoblast-like cell culture and the influence of an H₂O₂ pretreatment. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.40, p.244-256, 1998.

PARK, J.-W.; SUH, J.-Y.; CHUNG, H.-J. Effects of calcium ion incorporation on osteoblast gene expression in MC3T3-E1 cells cultured on microstructured titanium surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v.86, p.117-126, 2008.

PAVIA, D.L. et al. Introdução a espectroscopia. Brasil: Cengage Learning, 2010. Cap.2.

PAZ, A. et al. Obtaining hydroxyapatite coatings on titanium by the biomimetic method. **Revista de Metalurgia**, v.47(2), p.138-145, 2011.

PHAM, M. T. et al. Surface induced reactivity for titanium by ion implantation. **J. Mater. Sci. Med.**, v.11 (6), p.383-391, 2000.

RANGEL, E. C.; GADIOLI, G. Z.; CRUZ, N. C. Investigations on the Stability of Plasma Modified Silicone Surfaces. **Plasmas and Polymers**, v.9 (1), p.35-48, 2004.

RANGEL, R. C. C. et al. Effect of the fluorination of DLC film on the corrosion protection of aluminum alloy (AA 5052). **Surface & Coatings Technology**, v.204, p.3022–3028, 2010.

RANGEL, R. C. C. et al. Study of superficial properties of titanium treated by PIID. **The European Physical Journal Applied Physics**, v.56, p.24022-p1–24022-p2, 2011.

RATNER, B.D.; CHILKOT, A.; LOPEZ, G.P. Plasma Deposition and Treatment for Biomaterial Applications. In: d' AGOSTINO, R. **Plasma Deposition, Treatment and Etching of Polymers**. N.Y: Academic Press, 1990. Cap.6, p.464-511.

RATNER, B.D. et al. **Biomaterial Science. An introduction to materials in medicine**. New York: Academic Press, 1996.

REIS, R. L.; MONTEIRO, F. J. Crystallinity and structural changes in HA plasma-sprayed coatings induced by cyclic loading in physiological media. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.7, p.407-411, 1996.

ROSALES-LEAL, J.I. et al. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.365, p.222–229, 2010.

ROSCA, J. C. M. et al. Characterization of anodic films formed on titanium and its alloys. **Materials and Corrosion**, v.56, p.692-696, 2005.

SERGO, V.; SBAIZERO, O.; CLARKE, D.R. Mechanical and chemical consequences of the residual stresses in plasma sprayed hydroxyapatite coatings. **Biomaterial**, v.18, p.477-482, 1997.

SERRO, A. P. et al. Apatite deposition on titanium surfaces — the role of albumin adsorption. **Biomaterials**, v.16, p.963-966, 1997.

SCHEINMANN, F. **An Introduction to Spectroscopy Methods for Identifications of Organic Compounds**. Oxford: Pergamon Press, 1970.

SHUKLA, A. K.; BALASUBRAMANIAM, R. Effect of surface treatment on electrochemical behavior of CP Ti, Ti–6Al–4V and Ti–13Nb–13Zr alloys in simulated human body fluid. **Corrosion Science**, v.48, p.1696–1720, 2006.

SHUKLA, A. K.; BALASUBRAMANIAM, R.; BHARGAVA, S. Effect of replacement of V by Fe and Nb on passive film behavior of Ti–6Al–4V in simulated body fluid conditions. **Journal of Alloys and Compounds**, v.389, p.144–152, 2005.

SILVA, G. et al. C. M. Improvements of the surface properties of Ti6Al4V by plasma based ion implantation at high temperatures. **Surface & Coatings Technology**, v.204, p.3018-3021, 2010.

SINGH, G.; SINGH, S.; PRAKASH, S. Surface characterization of plasma sprayed pure and reinforced hydroxyapatite coating on Ti6Al4V alloy. **Surface & Coatings Technology**, v.15, p.4814-4820, 2011.

SIOZHANSKI, P. Medical applications of ion beam processes. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v.19/20, p.204-208, 1987.

SOUMYA S. et al. Generation of a biomimetic 3D microporous nano-fibrous scaffold on titanium surfaces for better osteointegration of orthopedic implants. **Journal of Materials Chemistry**, v.22(5), p.1904-1915, 2012.

SOUZA, G.B. et al. Nanomechanical properties of bioactive films grown on low energy ion implantation. **Surface and Coatings Technology**, v.204, p.2944-2949, 2010.

SOUZA, G.B. **Caracterizações Físicas, Químicas e de Bioatividade de Superfícies de Titânio Modificadas para Aplicação Biomédica**. 2010. 242f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SOUZA, G.B. et al. Tribo-mechanical characterization of rough, porous and bioactive Ti anodic layers. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v.4, p.796-806, 2011.

SOUZA, M. E. P.; BALLESTER, M.; FREIRE, C. M. A. EIS characterization of Ti anodic oxide porous films formed using modulated potential. **Surface & Coatings Technology**, v.201, p.7775-7780, 2007.

STAN, G.E. et al. Highly adherent bioactive glass thin films synthesized by magnetron sputtering at low temperature. **Journal Materials Science: Materials in Medicine**, v.22, p.2693-2710, 2011.

SUH, J.-Y. et al. Effects of a novel calcium titanate coating on the osseointegration of blasted endosseous implants in rabbit tibiae. **Clinical Oral Implants Research**, v.18, p.362-369, 2007.

SUL, Y. T. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. **Biomaterials**, v.24, p.3893-3907, 2003.

SURMENEV, R. A. et al. The influence of the deposition parameters on the properties of an rf-magnetron-deposited nanostructured calcium phosphate coating and a possible growth mechanism. **Surface and Coatings Technology**, v.205(12), p.3600-3606, 2011.

SVETINA, M. et al. Deposition of calcium ions on rutile (110): a first-principles investigation. **Acta Materialia**, v.49, p.2169-2177, 2001.

- TAKADAMA, H. et al. TEM-EDX study of mechanism of bonelike apatite formation on bioactive titanium metal in simulated body fluid. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.57, p.441-448, 2001.
- THAIR, L. et al. Development of apatite coatings on Ti-6Al-7Nb dental implants by biomimetic process and EPD: in vivo studies. **Surface Engineering**, v.27(1), p.11-18, 2011.
- TIAN, X. et al. Dynamic nitrogen and titanium plasma ion implantation/deposition at different bias voltages. **Thin Solid Films**, v.30, p.139-144, 2001.
- UEDA, K. et al. Fabrication of calcium phosphate films for coating on titanium substrates heated up to 773 K by RF magnetron sputtering and their evaluations. **Biomed. Mater.**, v.2, p.S160-S166, 2007.
- Van NOORT, R. titanium: the implant materials of today. **Journal of Material Science**, v.22, p.3801-3811, 1987.
- VAN WEZEL, A. L. Growth of Cell-strains and Primary Cells on Micro-carriers in Homogeneous Culture. **Nature**, v.216, p.65, 1967.
- VANZILLOTTA, P. S. et al. A. Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments. **Dental Materials**, v.22, p.275-282, 2006.
- WALBOOMERS, X.F. et al. Attachment of fibroblasts on smooth and microgrooved polystyrene. **Journal Biomedical Materials Research**, v.46, p.212-220, 1999.
- WANG, C. et al. Structural characterization of ion beam sputter deposited calcium phosphate coatings **Surface and Coatings Technology**, v.130, p.39-45, 2000.
- WANG, C. et al. Thick hydroxyapatite coatings by electrophoretic deposition. **Materials Letters**, v.57(1), p.99-105, 2002.
- WANG W.; OUYANG Y.; POH C.K. Orthopaedic Implant Technology: Biomaterials from Past to Future. **Annals Academy of Medicine Singapore**, v.40(5), p.237-244, 2011.
- WEBSTER, T.J. et al. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. **Biomaterials**, v.21, p.1803-1810, 2000.
- WILLIAMS, D.F. **Fundamental aspects of biocompatibility**. Boca Raton: C.R.C, Press, 1981.
- WHITE, W.B. The carbonate minerals. In FARMER, V.C (Ed.). **The Infrared Spectra of Minerals**. London: Mineralogical Society of London Monograph 4, 1974. p.227-284.
- WONG-NG, W. In: CHUNG, H.C.; SMITH, D.K. **Industrial Application of X-ray Diffraction**. New York: Marcel Dekker, 2000. p.108-117.
- WU, Y. et al. Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. **Biomaterials**, v.32, p.951-960, 2011.

YAMAGUCHI, S. et al. Morphological study of apatite formation on NaOH- and heat-treated titanium metal. **Key Engineering Materials**, v.396-398, p.361-364, 2009.

YANG, C. et al. Intramedullary implant of plasma-sprayed hydroxyapatite coating: An interface study. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.36, p.39-48, 1997.

YANG, P. et al. Wettability and bloodcompatibility of a-C:N:H films deposited by PIII-D. **Surface & Coatings Technology**, v.204, p.3039-3042, 2010.

YASUDA, H. J. **Plasma Polymerization**. N. Y.: Academic Press, 1985. Cap.9.

ZENG, Z. M.; TIAN, X. B.; CHU, P. K. Ion enhanced deposition by dual titanium and acetylene plasma immersion ion implantation. **Journal Vacuum Science & Technology A**, v.21 (1), p.175-179, 2003.

ZIGLER, J. F. **Handbook of Ion Implantation Technology**. New York: Elsevier, 1992.