

PRODUÇÃO DE FILMES DE ÓXIDO DE TITÂNIO POR OXIDAÇÃO ANÓDICA
A MICROARCO

Amanda dos Santos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Prof. Carlos Alberto Achete, D.Sc.

Prof^a. Renata Antoun Simão, D.Sc.

Prof. José Mauro Granjeiro, D.Sc.

Dr^a. Lídia Ágata de Sena, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JUNHO DE 2008

SANTOS, AMANDA DOS

Produção de Filmes de Óxido de Titânio
por Oxidação Anódica a Microarco [Rio de
Janeiro] 2008

XI, 94 p. 29,7cm (COPPE/UFRJ,M.Sc.,
Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2008)

Dissertação – Universidade Federal do
Rio de Janeiro, COPPE

1. Biomateriais
2. Implantes
3. Óxido de Titânio

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

À minha mãe Conceição, mulher forte e guerreira, que com seu amor incondicional nunca deixou de acreditar no meu sucesso, me incentivando nos momentos mais difíceis da minha vida. Sem você presente, jamais conseguiria chegar até aqui. Sem você tudo isso seria impossível!

Ao meu pai Amaury, por sua valentia em não desistir de lutar pela vida e sua determinação em assistir a mais esta conquista, que serviram de incentivo e exemplo para mim. Pai, muito obrigada por tudo que sou e serei, pois sem seu apoio e compreensão este sonho não se realizaria.

“ Tente outra vez....
E não diga que a vitória está perdida,
se é de batalhas que se vive a vida...
Tente outra vez.”
(Raul Seixas)

"Dai-me, Senhor; a perseverança das ondas do mar,
que fazem de cada recuo um ponto de partida
para um novo avanço."
(Cecília Meireles)

"E sem saber que era impossível, ele foi lá e fez"
(Jean Cocteau)

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, que me concedeu força e perseverança, para continuar caminhando sempre em busca dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Carlos Alberto Achete, por ter me acolhido de forma tão especial. Sua disponibilidade e boa vontade são qualidades essenciais em um orientador. Agradeço por jamais desistir de mim e ter me incentivado a percorrer este caminho árduo e, por vezes doloroso. Obrigada pelo respeito com que lapidou minhas idéias e pela confiança em mim depositada: **respeito** e **confiança**, características que nortearam esses anos de convivência. Não poderia deixar de mencionar que no momento mais difícil da minha vida compreendeu e deu-me subsídios para que eu pudesse terminar essa jornada. Muito obrigada, professor.

Professora Renata: gostaria de agradecer de uma maneira especial por sempre acreditar e me fazer crer que sou capaz, além da constante força e estímulo. Nos momentos precisos suas intervenções me colocaram ou mantiveram no rumo, incentivando-me para que não ficasse no meio do caminho. Muito obrigada!

À amiga Lídia pelas palavras de incentivo, pela paciência, pela compreensão e, principalmente, pelas observações e orientações precisas ao longo da formulação desta dissertação. Com toda certeza, sem a sua participação, este trabalho não teria nem a forma nem a consistência que apresenta. Lídia, você é ímpar!

Ao amigo Jailton, que teve a generosidade de ampliar seu repertório de orientação para abrigar esta dissertação, ensinando-me os primeiros passos de como se faz uma pesquisa. Poucos são os privilegiados como eu por ter tido a sorte de conviver com uma pessoa tão generosa, dedicada, eficiente, objetiva e paciente como você. A você, Jailton, meu muito obrigada.

Ao Prof. José Mauro Granjeiro pelas oportunidades oferecidas para meu desenvolvimento científico e pelo exemplo de dinamismo e entusiasmo que sempre demonstrou nessa caminhada.

A minha irmã Andréa, ao meu cunhado Luiz Ricardo e aos meus sobrinhos Rian e Iago pelo apoio, incentivo, companheirismo e pela alegria de todos os momentos. Amo vocês!

Ao meu grande amigo Rodrigo Gaya que teve imensa contribuição na minha formação, principalmente durante os momentos em que fizemos matérias juntos e até mesmo quando não éramos da mesma disciplina, em que, por telefone me auxiliava com seus conhecimentos e com a calma que lhe é peculiar. A partir de então, nos tornamos grandes amigos e pretendo tê-lo sempre assim. Valeu, amigo!

Ao funcionário da secretaria da COPPE/UFRJ Francisco de Assis, no qual eu denomino carinhosamente de: "Meu Anjinho", pois sempre esteve disponível para atender aos meus chamados, sempre tirando dúvidas sobre prazos e datas, sempre cordial e tentando resolver meus problemas, que não foram poucos... Fran, você é demais!

Aos estagiários do Inmetro Leandro R. Lidízio e Talita S. Cruz, que muito me ajudaram no preparo e realização dos experimentos, além das análises dos resultados. Com esse companheirismo, nos tornamos amigos dentro e fora do Inmetro.

À Cecília, que, apesar de eu ter deixado as amostras de AFM por último, ela abraçou a causa e, com muito carinho e dedicação me ajudou a complementar os resultados desta dissertação, contribuindo grandemente para o término da pesquisa, além de sempre ter uma palavra amiga. Valeu Ciça!

Aos funcionários do Inmetro que me acolheram de forma carinhosa e que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento e realização da minha pesquisa. Me sinto como parte integrante dessa família. Muito obrigada.

Finalmente, faço questão de agradecer de coração a todas as pessoas que torceram ou intercederam por mim, mesmo que de forma anônima ou discreta. É como disse Vinícius de Moares: **“Você não faz amigos, você os reconhece”**.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

PRODUÇÃO DE FILMES DE ÓXIDO DE TITÂNIO POR OXIDAÇÃO ANÓDICA
A MICROARCO

Amanda dos Santos

Junho/2008

Orientador: Carlos Alberto Achete

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

As características topográficas e composicionais de superfícies de implantes biomédicos estão diretamente relacionadas com a sua capacidade de osseointegração. Por este motivo, o tratamento e/ou modificação superficial do titânio (material utilizado em implantes) têm sido amplamente estudados. Neste trabalho foram produzidos e caracterizados filmes de óxido de titânio sobre substrato de titânio puro por meio da técnica de oxidação anódica a microarco. Parâmetros como composição do eletrólito, tempo de deposição e voltagem aplicada foram avaliados com o objetivo de otimizar as propriedades dos filmes. As superfícies produzidas apresentaram morfologia bem definida, com poros homogeneamente distribuídos. A utilização de betaglicerofosfato de sódio na composição dos eletrólitos permitiu a obtenção de superfícies contendo íons cálcio e fósforo, elementos precursores da mineralização óssea. A avaliação celular *in vitro* com células osteoblásticas apresentou resultados semelhantes para as amostras avaliadas quanto à adesão, proliferação e diferenciação celular.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

PRODUCTION OF TITANIUM OXIDE FILMS BY MICRO-ARC ANODIC
OXIDATION

Amanda dos Santos

June/2008

Advisor: Carlos Alberto Achete

Department: Metallurgy and Materials Engineering

Topographic and compositional characteristics of biomedical implants are straightly connected with their osseointegration capability. For this reason, titanium (material used for implants) surface modification and/or treatment have been extensively studied. In this work, titanium oxide coatings were produced onto pure titanium substrates by the micro-arc oxidation technique and characterized. Parameters such as electrolyte composition, processing time and applied voltage were analyzed in order to optimize film properties. Obtained surfaces showed a well defined morphology, with homogeneously distributed pores. Surfaces containing calcium and phosphorous ions were obtained by the use of electrolytes containing sodium betaglycerophosphate. These elements are precursors for the bone mineralization. The *in vitro* cell culture studies (adhesion, proliferation and differentiation) using osteoblastic cells showed similar results for the selected samples.

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO | 01 |
| CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS | 15 |
| 3.1 – Preparo dos eletrólitos | 16 |
| 3.2 – Anodização a microarco | 16 |
| 3.3 – Caracterização dos filmes de óxido de titânio | 20 |
| 3.4 – Caracterização da atividade celular | 22 |
| 3.4.1 – Ensaio de adesão 04 e 24 horas | 22 |
| 3.4.2 – Diferenciação sobre o material 14 e 21 dias | 23 |
| 3.5 – Análise estatística dos resultados | 24 |
| CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 4.1 – Acetato de cálcio 0,5M e Fosfato de sódio 0,1M | 26 |
| 4.1.1 – Acetato de cálcio 0,5M | 26 |
| 4.1.1.1 – Rugosidade | 26 |
| 4.1.1.2 – Espessura | 27 |
| 4.1.1.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 28 |
| 4.1.1.4 – Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS) | 31 |
| 4.1.1.5 – Difração de Raios X (DRX) | 32 |
| 4.1.2 – Fosfato de sódio 0,1M | 34 |
| 4.1.2.1 – Rugosidade | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.2.2 – Espessura | 36 |
| 4.1.2.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 37 |
| 4.1.2.4 – Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS) | 39 |
| 4.1.2.5 – Difração de Raios X | 40 |
| 4.2 – Acetato de cálcio 0,5M e Betaglicerofosfato de sódio | 42 |
| (0,02M; 0,04M; 0,06M) em 30 segundos e 60 segundos a 150V | |
| 4.2.1 – Rugosidade | 42 |
| 4.2.2 – Espessura | 46 |
| 4.2.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 50 |
| 4.2.4 – Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS) | 54 |
| 4.2.5 – Difração de Raios X (DRX) | 60 |
| 4.3 – Acetato de cálcio 0,5M e Acetato de cálcio 0,5M + Bgf | 63 |
| sódio 0,02M (05, 15, 30, 45 e 60 segundos) a 150V | |
| 4.3.1 – Rugosidade | 63 |
| 4.3.2 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 67 |
| 4.4 – Análises de AFM (Microscopia de Força Atômica) | 70 |
| 4.5 – Difração de Raios X | 73 |
| 4.6 – Atividade Celular | 78 |
| 4.5.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 79 |
| | |
| CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES | 86 |
| | |
| CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS | 88 |
| FUTUROS | |
| | |
| CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 89 |

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A perda de um órgão ou de uma parte do corpo gera, além da perda da função, transtornos sociais e psicológicos. Os avanços alcançados na engenharia de materiais e na área médica (Medicina e Odontologia), têm possibilitado o desenvolvimento de materiais e o aprimoramento de técnicas que geram bem-estar físico, funcional e psicológico ao paciente.

Com o desenvolvimento da Implantodontia, a pesquisa no campo da ciência dos materiais, mais especificamente, dos biomateriais, tem sido exaustivamente incentivada e aprimorada com o objetivo de desenvolver técnicas que proporcionem uma melhor qualidade de vida ao paciente e, portanto, predizendo e controlando as reações que ocorrem na interface tecido-implante.

Dentre os biomateriais utilizados em implantes odontológicos e ortopédicos, o titânio e suas ligas são os materiais que têm grande destaque à ampla aplicação, principalmente por suas propriedades desejáveis, tais como: baixo módulo de elasticidade, alta resistência à corrosão, conformabilidade, usinabilidade e biocompatibilidade (LIU,X., *et al.*,2004) .

Com o objetivo de melhorar as suas propriedades biológicas, químicas e mecânicas, são realizadas modificações na superfície do titânio para aumentar o grau de biocompatibilidade implante-osso, para que haja uma excelente osseointegração .

A superfície do biomaterial é mencionada como a principal responsável pela resposta dos tecidos subjacentes aos dispositivos médicos artificiais. Com o objetivo de melhorar as suas propriedades biológicas, químicas e mecânicas desta superfície, modificações composicionais e/ou topográficas são realizadas a fim de aumentar o grau de biocompatibilidade da interface implante-osso, promovendo uma maximização da osseointegração (LIU,X., *et al.*,2004).

No titânio, a camada de óxidos existente após o processo de usinagem do titânio não é a ideal para utilização devido a presença de contaminantes e da heterogeneidade da camada produzida. Torna-se, desta maneira, difícil obter adesão química entre o implante e o osso e nova formação óssea quando essa camada de óxidos está presente. Para isso, é necessária a realização da modificação da superfície dos implantes de titânio (SCHRECKENBACH, J.P., *et al.*, 1999).

A biocompatibilidade do titânio está diretamente relacionada com as propriedades da camada de óxido superficial, que naturalmente tem de 2 a 10 nm de espessura. Diversos procedimentos têm sido empregados a fim de modificar a estrutura química da superfície do titânio através de recobrimentos, como por exemplo recobrimentos com filmes de óxido de titânio (SCHRECKENBACH, J.P., *et al.*, 1999).

O tratamento das superfícies dos implantes, um recurso relativamente recente, desenvolvido pela moderna ciência tecnológica aplicada à Implantologia, vem proporcionando resultados cada vez mais favoráveis e com uma alta previsibilidade. Desta forma, as pesquisas que nessa área há tempos se iniciaram, com certeza continuarão, complementando as já realizadas e deixando, de alguma forma, novas informações e experiências clínicas e/ou laboratoriais, implementando o atendimento ao paciente que deseja ser reabilitado.

Várias técnicas de avaliação da adequação de materiais para aplicações biomédicas têm sido desenvolvidas numa tentativa de simular o desempenho do material após sua inserção no corpo humano. Essas técnicas compreendem testes *in vitro* e *in vivo*. Para testes *in vitro*, são utilizados testes de bioatividade em líquido corporal simulado e estudos em culturas de células. Os estudos em cultura de células compreendem testes de citotoxicidade, medições bioquímicas de atividade celular, avaliação da proliferação, crescimento e morfologia celular (ZHU, X., *et al.*, 2004).

Apesar de toda esta evolução no material, projeto e indicações para a colocação dos implantes, os estudos continuam na busca de melhor eficiência no sistema e características do implante utilizado. O próprio período de tempo em que o paciente deve esperar até ser reabilitado proteticamente vem diminuindo de maneira gradativa, até mesmo, já se pesquisando reabilitação imediata à colocação dos implantes.

O futuro da Implantologia deveria focar no desenvolvimento de superfícies com topografia e composição química controlados e standardizados. Essa linha de pesquisa será o melhor caminho para entender as interações entre proteínas, células e tecidos com as superfícies de implantes. O local de estimulação óssea ou drogas de reabsorção na região periimplantar também podem responder como dificultadoras em situações clínicas com pobre quantidade e qualidade óssea. Essas estratégias terapêuticas poderiam ajudar no processo de osseointegração de implantes dentários e ortopédicos para seu imediato uso e sucesso a longo prazo.

No presente estudo foi realizada a produção de filmes de óxido de titânio sobre substrato de titânio puro através da técnica eletroquímica de oxidação anódica a microarco. Este é um método de produção de filmes protetores sobre metais bem estabelecido por ser uma técnica simples, reproduzível, de baixo custo, que proporciona melhora na resistência à corrosão e produz filmes uniformes. A formação de filmes porosos e uniformes foi alcançada pelo controle dos parâmetros do processo, como: voltagem, tempo, composição e concentração do eletrólito, temperatura e intensidade de corrente. A incorporação de íons cálcio e fósforo foi analisada em função da modificação dos eletrólitos empregados na anodização. A resposta celular foi avaliada pelo estudo do comportamento de células osteoblásticas em contato com as superfícies produzidas em tempos de 4 h e 24 h para adesão celular e 14 e 21 dias para diferenciação celular, através de testes *in vitro* da bioatividade celular.

Para caracterização dos filmes obtidos foram realizadas análises com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM); Perfilometria para avaliação da rugosidade e determinação da espessura da camada de óxido; Difração de Raios X (DRX) para avaliação cristalográfica das fases presentes; Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS) e Espectroscopia Raman para avaliação elementar e química.

Espera-se então com este trabalho estabelecer uma correlação entre as propriedades morfológicas, composicionais e biológicas da superfície tratada de titânio e os diferentes eletrólitos / concentrações utilizadas. Questões como a correlação entre a concentração de betaglicerofosfato de sódio usada nos eletrólitos e a presença de íons de cálcio e fósforo na superfície do filme produzido, além de um estudo das características morfológicas de crescimento do óxido de titânio em diferentes tempos de anodização ainda são pendentes na literatura, portanto também foi um dos objetivos de nosso estudo.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento de novos materiais face às necessidades dos diversos desafios enfrentados pela Implantologia tem sido uma prática constante da idade contemporânea. Com o avanço e desenvolvimento do estudo sobre os biomateriais, é crescente o interesse em se obter um material que substitua um órgão do corpo humano minimizando qualquer tipo de reação tóxica, inflamatória e patológica, uma vez que a implantologia vem tornando-se mais presente nos nossos dias. Em outras palavras, que seja o mais biocompatível possível, que seja bem tolerado pelos tecidos adjacentes e que, se possível, promova formação óssea (CHEN, J., 2005). Através destas adversidades, a pesquisa na área de materiais teve um grande desenvolvimento, sobretudo na área de implantes biomédicos, dentre estes, destacam-se os odontológicos e ortopédicos.

Os implantes metálicos foram utilizados efetivamente a partir da década de 30, e alguns fatos responsáveis pelo desenvolvimento desses biomateriais foram a descoberta da penicilina por Alexander Fleming na segunda década do século XX e o surgimento do conceito de cirurgia asséptica por Joseph Lister em 1865. Antes, portanto, não era possível assegurar ao paciente a recuperação de qualquer tipo de procedimento cirúrgico por causa dos elevados riscos de infecção a que o paciente estava exposto (WILLIAMS, 1987).

Biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação de substâncias, que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, podendo ser utilizadas por qualquer período de tempo, aumentando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com a finalidade de manter e/ou alterar a qualidade de vida do paciente (REVISTA METALURGICA & MATERIAIS, 2003).

Na década de 50, o sueco Per-Ingvar Brånemark interessado em estudar reparo e regeneração óssea, procurou observar o mecanismo do osso medular in vivo, processo denominado de microscopia vital. Utilizava, para isso, um dispositivo metálico que era inserido na tíbia do coelho, possibilitando a visualização microscópica de todo processo. Porém, Brånemark utilizava normalmente como material o tântalo e, impossibilitado de obtê-lo facilmente naquela ocasião, utilizou, em sua substituição, o titânio. Quando terminou seu estudo após alguns meses e tentou remover tal dispositivo para reutilizá-lo, observou que não conseguia mais removê-lo. Sua descoberta teve significado maior apenas na década de 60, quando entrou para a Universidade de Gothenburg, e fez novamente o estudo, só que desta vez, em voluntários humanos. Inseriu uma câmara de titânio no antebraço e realizou um estudo observando a reação das células sanguíneas humanas no local de contato com o material. Observou, então, que o titânio foi compatível com tecido mole, sem provocar reação imunológica adversa (CORTEZ, A.L.V.,2001).

Em 1965, Brånemark e sua equipe realizaram seu primeiro caso, colocando quatro implantes na mandíbula de um paciente com deformidade. Após 5 meses, apoiou uma base fixa de dentes artificiais sobre os implantes, relatando sucesso com os mesmos.

Inicialmente utilizavam-se materiais inertes como os aços inoxidáveis e a alumina. Nos anos 70, PerIngvar Brånemark introduziu o conceito de osseointegração como sendo a ligação direta e funcional entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais, isto é, o implante substituindo um órgão que é constantemente submetido a cargas externas, que ocorrem durante o seu funcionamento natural (BRÅNEMARK, P.I., *et al.*, 1985). Com a introdução desse conceito, as pesquisas passaram a se concentrar em materiais e projetos, visando acelerar a osseointegração, diminuindo assim o tempo necessário para aposição óssea.

THOMAS & COOK (1985) procuraram avaliar os fatores que influenciavam na deposição óssea direta sobre diferentes materiais biocompatíveis. Estudaram o módulo de elasticidade dos materiais, composição da superfície e a sua textura, alternando combinações, com o objetivo de identificar a melhor interface osso/material. Entre os materiais avaliados se encontrava o titânio comercialmente puro, com superfícies polidas e rugosas. Os resultados mostraram que a textura superficial foi o que mais influenciou na deposição óssea direta, portanto, os implantes com superfície rugosa foram os que apresentaram maior resistência à remoção e contato com tecido ósseo, enquanto a superfície polida apresentava graus variados de formação tecidual fibrosa.

A superfície porosa dos implantes é um fator que beneficia o crescimento de tecido ósseo e facilita o ancoramento do implante ao osso (TANG,G.X., *et al.*, 2004).

Variações nos tamanhos dos poros afetam diretamente na qualidade e quantidade do novo osso a ser formado. A porosidade do filme de óxidos aumenta a força de atrito entre o implante e os tecidos adjacentes. Excessivos micro movimentos no sítio junto ao implante influenciam na formação de tecido fibroso junto ao implante, o que não é desejável, uma vez que o objetivo de formação tecidual é a de tecido ósseo e não tecido fibroso (ZHU,X. *et al.*, 2001).

O titânio e suas ligas têm sido amplamente utilizados na área biomédica, especialmente na reposição de tecidos duros e na reposição de válvulas cardiovasculares, uma vez que esse metal possui propriedades desejáveis como baixo módulo de elasticidade, boa resistência à fadiga, resistência à corrosão e excelente biocompatibilidade. As aplicações do titânio e suas ligas na área biomédica incluem desde bombas e dispositivos artificiais para uso cardiovascular a aplicações mais estruturais como parafusos e pinos para implantes odontológicos e próteses ósseas para braços, pernas e juntas (LIU, X. *et al.*, 2004).

O titânio foi descoberto em 1791 na Inglaterra, porém só começou a ser utilizado praticamente em 1948, quando sua produção comercial foi iniciada nos Estados Unidos. É classificado em duas categorias: titânio comercialmente puro (Ti – cp) e as ligas de titânio, dentre as mais conhecidas estão o Ti4Al6V. O titânio comercialmente puro pode ser classificado em 4 graus, de acordo com o conteúdo de oxigênio, onde o grau 1 tem 0,18% de oxigênio e o grau 4 tem 0,4% de oxigênio (CHEN, J., 2005).

O titânio também é um metal bastante reativo e quando em contato com oxigênio ou água forma *óxido de titânio* que pode estar nas seguintes estruturas: TiO, Ti₂O₃ ou TiO₂, sendo que este último é o mais comum. O TiO₂ pode apresentar diferentes estruturas cristalográficas, as mais estáveis são o rutilo e o anatásio, além disso, pode ser amorfo (KASEMO, B., *et al.*, 1986). O rutilo é a única fase estável, enquanto o anatásio é metaestável, isto é, se converte em rutilo a altas temperaturas, acompanhando o crescimento de grão. Comparado ao rutilo, o anatásio possui propriedades únicas e vantagens para aplicações biomédicas, como por exemplo, absorver mais OH⁻ e PO₄³⁻ que o rutilo no fluido corporal, o que favorece a deposição óssea de apatita. Em implantes biomédicos, a fase anatásio mostra uma melhor habilidade em induzir apatita quando comparado ao rutilo. Para isso, é importante que os parâmetros do sistema de formação do óxido de titânio sejam bem controlados, para a obtenção da superfície mais favorável para aplicações biomédicas (TANG, G. X., *et al.*, 2004).

Uma grande contribuição para a biocompatibilidade do titânio é a excelente resistência à corrosão conferida por seu óxido. Quando exposto ao ar, o titânio forma espontaneamente uma película contínua e aderente de aproximadamente 2 a 10nm de espessura. Sua excepcional biocompatibilidade é atribuída à interação dessa camada estável de óxidos com os fluidos biológicos (CHEN, J., 2005). Tanto espessura quanto composição química da camada de óxido de titânio exibem importante papel na

adsorção de proteínas provenientes dos fluidos biológicos e na atração de células à sua superfície, porém a camada de óxidos que se forma espontaneamente sobre a superfície do titânio não é a ideal porque é heterogênea e pouco espessa, dificultando desta forma a adesão química do implante ao osso.

O processo de osseointegração pode sofrer interferências que resultam na perda do implante. As reações existentes na interface osso-implante são influenciadas pela técnica cirúrgica, pelo estado de saúde do leito ósseo receptor, a biocompatibilidade do metal, desenho e o tipo de superfície do implante, bem como as condições de aplicação de cargas transmitidas ao implante. A estabilidade inicial do implante e um período de reparo livre de cargas são fundamentais neste processo (ALBREKTSSON, T. *et al.*, 1981; BRÅNEMARK, P.I., *et al.*, 1985; SATOMI, K., *et al.*, 1988; KOHN, D. H., 1992).

Segundo KOKUBO *et al.* (2004), um dos pré-requisitos para um material ligar-se ao osso é a formação de uma camada de apatita biologicamente ativa na interface material/osso. Tal camada de apatita é similar à fase mineralizada do tecido ósseo, em composição e estrutura. Acredita-se que ela atua como sinalizadora de proteínas e células para iniciar a cascata de eventos que resulta na formação da estrutura óssea. Ou seja, os osteoblastos, células ósseas responsáveis pela produção do tecido ósseo, proliferam preferencialmente e se diferenciam produzindo apatita e colágeno sobre a camada de apatita formada anteriormente, o que favorece a união do implante com o osso. Quando isso ocorre, uma ligação química é formada entre o osso e a camada de apatita, reduzindo a energia interfacial entre elas (KOKUBO, T., *et al.*, 2004).

ZHU *et al.* (2001) avaliaram a resposta osteoblástica em função da topografia e composição da camada de óxidos sobre o titânio e concluíram que a proteção e estabilidade dessa camada favorecem grandemente a osseointegração, e sua estabilidade

depende principalmente da composição, estrutura e espessura do filme de óxidos, e como consequência obtém-se grandes benefícios na resposta biológica, como por exemplo, o comportamento celular, adesão, mudanças morfológicas, alterações funcionais, proliferação e diferenciação.

Boa osseointegração pode ser obtida na interface implante e leito ósseo durante a cicatrização, após a cirurgia de implante. As propriedades da superfície do implante podem exibir grande importância nas reações imediatas após sua exposição aos tecidos subjacentes e influenciar o processo de osseointegração, o que é altamente importante para o sucesso e longevidade do implante (CHEN, J., 2005).

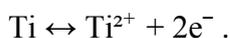
A taxa de osseointegração de implantes dentários de titânio pode estar relacionada à composição e rugosidade da superfície. Implantes com superfície rugosa favorecem tanto o ancoramento ósseo quanto a estabilidade bioquímica. Para os autores, a rugosidade do filme produzido é extremamente importante para a taxa de osseointegração do implante ao osso. Para a obtenção de superfícies rugosas, algumas técnicas de modificação superficial são citadas com o intuito de promover a superfície mais ideal possível, incluindo uma superfície que facilite a absorção de proteínas, absorção osteoblástica e crescimento de tecido ósseo na região peri-implantar, dentre elas eles chamam atenção para a oxidação anódica a microarco (GUÉHENNEC, L. L., *et al*, 2007).

Oxidação anódica a microarco compreende reações de eletrodos em combinação com campo elétrico entre metal e difusão iônica com oxigênio levando à formação de um filme de óxidos sobre a superfície do anodo (LIU, X., *et al*, 2005). É um método bem estabelecido de produção de diferentes tipos de filmes de óxidos sobre metais. A principal vantagem tecnológica do processo de anodização do titânio é melhorar as propriedades de adesão e ancoragem do titânio ao osso para a obtenção de uma

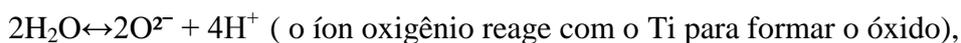
superfície rugosa e porosa (HUANG, P., *et al.*, 2005). Como eletrólitos são utilizados diferentes soluções diluídas de ácidos, bases e sais, como acetato de cálcio, ácido acético, fosfato de sódio, betaglicerofosfato de sódio, dentre outros. Nesse processo, o ao do representado pelo titânio, é imerso na solução aquosa e uma voltagem alternada é aplicada entre o anodo e o catodo. O catodo é representado por um fio de platina (LIU, X., *et al.*, 2005).

Reações envolvidas no processo (LIU, X., *et al.*, 2005):

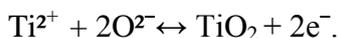
Na interface Ti/ óxido de titânio:



Na interface óxido de Ti/eletrólito:



Em ambas superfícies:



Íons de titânio e íons de oxigênio formados nas reações de redox levam a formação de óxidos pelo campo elétrico externo aplicado, resultando na formação do filme de óxidos sobre o substrato de titânio. O óxido de titânio formado apresenta alta resistividade relativa em relação ao eletrólito e às partes metálicas do circuito elétrico. A presença do filme de óxido no anodo não permite que a diferença de potencial seja aplicada. Enquanto o campo elétrico aplicado for suficientemente forte para manter o direcionamento dos íons, o fluxo de corrente elétrica se manterá e o óxido continuará crescendo. A espessura final do filme de óxidos é linearmente dependente: da voltagem aplicada, do tempo de anodização, do tipo de eletrólito e da corrente aplicada. Em altas

voltagens o processo de anodização leva a um aumento da evolução do gás e, devido à interrupção da corrente elétrica causada pelo crescimento da camada de óxidos, ocorrerão descargas elétricas. Este tipo de anodização é conhecido por oxidação anódica a microarco e forma filme muito porosos (LIU, X., *et al.*, 2005).

Os métodos de preparo da superfície com diferentes componentes químicos requerem eficientes processos de descontaminação da superfície. Com este propósito, Takeuchi e colaboradores avaliaram a efetividade dos vários métodos de limpeza da superfície de titânio como pré-tratamento para modificação da superfície, através da análise de interações químicas de três soluções: Na₂S₂O₈ (persulfato de sódio), H₂SO₄ (ácido sulfúrico) e HCl (ácido clorídrico), seguidos de enxágüe com acetona ou água ultrapura. Eles concluíram que o método envolvendo 10N de HCl e acetona foi o mais efetivo de todos os métodos investigados, sendo portanto, um excelente método de descontaminação para o preparo do processo de modificação da superfície do titânio. Como procedimento para descontaminação foi utilizado: tratamento em banho em ultra-som com HCl 10N por 30 minutos, seguido de acetona PA em ultra-som por 30 minutos, e água bidestilada ou deionizada e para limpeza residual (TAKEUCHI *et al.*, 2002).

A oxidação anódica a microarco permite a obtenção de recobrimentos de alta qualidade, alta microdureza, excelente adesão, resistência mecânica e resistência à corrosão. A qualidade do recobrimento produzido pela oxidação a microarco é determinada por parâmetros como composição do eletrólito, temperatura do eletrólito, composição da liga, voltagem, densidade de corrente, tempo, etc (OH, H.J., *et al.*, 2005).

HAN *et al.* (2003) realizaram experimentos com quatro diferentes eletrólitos a voltagens de 200 a 500V. Os eletrólitos usados foram o carbonato de sódio (Na₃PO₄), acetato monoidratado e acetato de cálcio com betaglicerofosfato de sódio, com frequência de

900Hz e tempo de 05 minutos. Foram obtidos filmes porosos nanocristalinos, sem interface aparente ao substrato de titânio. A fase predominante varia do anatásio para o rutilo com o aumento da voltagem aplicada.

LI *et al.* (2004), realizaram experimentos com discos de titânio e usaram como eletrólito 0,15M de acetato de cálcio monoidratado com 0,02M de betaglicerofosfato de sódio em água deionizada. Aplicaram DC pulsado entre 190 e 660V em, no máximo, 03 minutos para avaliarem os diferentes graus de rugosidade e espessura. Observaram que uma camada porosa foi formada sobre a superfície do titânio após o tratamento de oxidação. Com o aumento da voltagem, a rugosidade e a espessura do filme aumentaram e a fase de TiO₂ mudou de anatásio para rutilo. Durante o tratamento, íons de cálcio e fósforo foram incorporados à camada de óxidos.

No estudo realizado por ISHIZAWA *et al* (1995), onde foram utilizados como eletrólitos acetato de cálcio e betaglicerofosfato de sódio. Foi observado que esses eletrólitos são importantes para formação de filmes de óxido de titânio com incorporação de íons de cálcio e fósforo, e que a composição dos filmes muda de acordo com a concentração de betaglicerofosfato de sódio e acetato de cálcio e da voltagem aplicadas.

WANG *et al.* (2006) realizaram um estudo de caracterização dos recobrimentos produzidos por oxidação anódica a microarco com eletrólito de fosfato de sódio onde os filmes produzidos foram compostos principalmente das fases anatásio e rutilo e enriquecidos com íons de Na e P. Após 30 dias de avaliação em SBF (simulated body fluid), observaram a formação de hidroxiapatita carbonada sobre a superfície dos filmes, e concluíram que a oxidação anódica a microarco utilizando eletrólito de fosfato de sódio em substrato de titânio puro teve resposta biológica positiva. (WANG, Y., *et al.*, 2006).

SCHRECKENBACH *et al.* (1999) avaliaram a morfologia da superfície, microestrutura e composição química de superfícies de titânio tratadas por oxidação anódica a microarco, utilizando soluções de fosfato de cálcio ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) como eletrólito. Foram obtidos filmes com alta resistência à abrasão, excelente resistência à corrosão e biocompatibilidade.

SON *et al.* (2003) investigaram a resposta óssea ao titânio anodizado seguido de tratamento hidrotérmico *in vivo* e utilizaram titânio não anodizado como controle. A resistência ao torque foi maior em implantes anodizados do que os implantes não anodizados, após 06 semanas de implantação em coelhos, embora não tenha havido nenhuma diferença significativa com relação ao contato ósseo em todos os implantes.

No estudo de LI *et al.* (2004), a resposta celular *in vitro* das amostras foi dependente das condições de oxidação. Com o aumento da voltagem, a atividade de fosfatase alcalina aumentou, enquanto que a taxa de proliferação celular diminuiu. Em testes *in vivo* em coelhos das amostras tratadas por oxidação anódica a microarco foi verificada uma melhora considerável na capacidade de osseointegração das superfícies oxidadas quando comparado ao implante de titânio puro não tratado.

Em outro estudo sobre o mesmo tema, foi observado que a adesão e proliferação celular foram facilitadas pela camada de óxidos produzida por oxidação anódica a microarco. A adesão celular aumentou proporcionalmente de acordo com o aumento da voltagem de anodização, aumento da espessura da camada de óxidos, aumento do número e tamanho de microporos e aumento da aspereza da superfície (ZHU, X., *et al.*, 2004). Da mesma forma, CHEN (2005) observou a resposta *in vitro* dos osteoblastos sobre óxido de titânio realizado pela técnica a microarco utilizando eletrólitos de acetato de cálcio e de betaglicerofosfato de cálcio e concluiu que a proliferação celular foi facilitada nas superfícies anodizadas onde a voltagem de anodização utilizada foi mais alta.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho teve como finalidade dar continuidade ao trabalho iniciado por TROTA FILHO (2007) na Coppe/Inmetro, com objetivo de otimizar o sistema para garantir reprodutibilidade e imparcialidade nos resultados obtidos.

Nos experimentos foram utilizadas amostras de titânio comercialmente puro (Grau 2) na forma de discos de 12 mm de diâmetro e chapas de 05x03cm.

No procedimento de preparo das amostras (tab. 3.1), foram utilizadas lixas de SiC (carbeto de silício) com granulações de 180, 400, 600 e 1200. Para cada lixa, as amostras ficavam aproximadamente 05 minutos em posição perpendicular ao sentido de rotação da politriz. A lixa 1200 só foi utilizada no dia em que as amostras foram anodizadas, com o objetivo de minimizar a presença da camada natural de óxidos que cresce sobre o titânio quando em contato com o oxigênio. Posteriormente, foi realizada a limpeza superficial das amostras conforme procedimento recomendado por Takeuchi *et al* 2003. As amostras foram imersas em HCl (ácido clorídrico) 10N por 30 minutos em banho de ultra-som, então foram lavadas em água destilada ou mili-Q. Em seguida as amostras foram imersas em acetona PA por mais 30 minutos em ultra-som e então lavadas em água destilada ou milli-Q.

Tab. 3.1 – Resumo dos procedimentos de pré-anodização e limpeza superficial realizados em todas as amostras

| Pré-anodização (Amostras CONTROLE) | |
|--|--------------------------------|
| - | Lixa 1 (180) |
| - | Lixa 2 (400) |
| - | Lixa 3 (600) |
| - | Lixa 4 (1200) |
| Limpeza Superficial | |
| - | 30 min em HCl em ultra-som |
| - | Lavagem com água destilada |
| - | 30 min em Acetona em ultra-som |
| - | Lavagem com água destilada |

3.1 Preparo dos eletrólitos

Os eletrólitos utilizados para a realização deste trabalho foram: Acetato de cálcio 0,5M; Acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M; Acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,04M; Acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,06M; e Fosfato de sódio 0,1M.

Para obtenção da solução de Acetato de cálcio 0,5M foi realizado o seguinte procedimento: pesagem de 44,04g de acetato de cálcio e dissolução, aos poucos, em 500ml de água destilada sob agitação magnética.

Para o acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M foi realizado o mesmo procedimento para o acetato de cálcio 0,5M, sendo adicionado à solução 3,06g de betaglicerofosfato de sódio. Para o acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,04 foi adicionado à solução de acetato de cálcio 0,5M: 6,12g de betaglicerofosfato de sódio, e para o eletrólito acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,06M foi sendo adicionado à solução de acetato de cálcio 0,5M: 9,18g de betaglicerofosfato de sódio, respectivamente.

Para a preparação da solução de fosfato de sódio 0,1M foi levado a 500ml de água destilada 7,09g de fosfato de sódio e então misturada por agitação magnética.

3.2 Anodização a Microarco

Para a realização do processo de oxidação anódica a microarco foi utilizada uma fonte AC/DC (Agilent modelo 6812 B). Um fio de platina foi utilizado como contra-eletrodo (neutro), ou seja, o catodo. As amostras de titânio foram conectadas à fase da fonte. A distância entre o contra-eletrodo de platina e a amostra de titânio foi de aproximadamente de 02cm. Utilizou-se um becker encamisado com capacidade para 500ml, e a circulação de água da torneira teve como finalidade manter a temperatura da

solução estável no momento do processo. As amostras foram fixadas através de um suporte com duas garras, onde em uma era fixado o fio de platina e na outra era fixada a amostra de titânio, que foi previamente soldada (por solda-ponto) a uma haste de titânio com o objetivo de evitar possíveis contaminações durante o processo. Uma pequena garra metálica segura a haste de titânio efetuando então o contato elétrico entre a amostra e a fonte. Com este aparato, a superfície do titânio fica exposta à solução eletroquímica e possibilita o crescimento do óxido na superfície do titânio. Após as anodizações, os discos e as chapas foram devidamente lavados com água destilada e secos com ar quente.

Os parâmetros avaliados neste estudo para foram o *tempo*, a *voltagem*, *tipo do eletrólito* e a *concentração do eletrólito* como apresentado nas tabelas 3.2, 3.3 e 3.4. Os parâmetros mantidos constantes foram: corrente AC/DC: 2A, Offset 200V, Frequência: 60Hz. Na figura 3.1 apresenta o aparato utilizado para a realização do processo de oxidação anódica a microarco. Em (a) é apresentada a fonte utilizada e em (b) o becker encamisado, com entrada e saída de água para manutenção da temperatura do eletrólito, com a amostra de titânio, o eletrólito e o fio de platina.



Fig. 3.1 - Ilustração do aparato utilizado para realização do processo de oxidação anódica a microarco.

Este estudo foi realizado em 04 etapas de análise e caracterização. Na primeira, foram utilizados os eletrólitos acetato de cálcio 0,5M e fosfato de sódio 0,1M. Os parâmetros

avaliados foram: voltagem igual (150V) e tempo de deposição (30 e 60 seg) para o acetato de cálcio; e voltagem (100V e 150V), com tempos iguais de deposição (60 seg) para o fosfato de sódio, conforme indicado na tabela 3.2. A escolha das condições foi baseada nos resultados encontrados por TROTA FILHO (2007). Neste estudo foi verificado que o tempo e a voltagem influenciavam a produção dos filmes quando utilizado o eletrólito acetato de cálcio e fosfato de sódio, respectivamente.

Tab. 3.2 – Condições para preparação dos filmes de óxido de titânio pelo processo de microarco.

| Eletrólito | Concentração (M) | Voltagem (V) | Tempo (s) |
|-------------------|-------------------------|---------------------|------------------|
| Acetato de cálcio | 0,5 | 150 | 30 |
| Acetato de cálcio | 0,5 | 150 | 60 |
| Fosfato de sódio | 0,1 | 100 | 60 |
| Fosfato de sódio | 0,1 | 150 | 60 |

Na segunda etapa, foram realizados experimentos com acetato de cálcio 0,5M e acetato de cálcio 0,5M com concentrações variadas de betaglicerofosfato de sódio (0,02M, 0,04M, 0,06M), tempos de deposição (30 e 60 seg). A voltagem permaneceu igual (150V), conforme apresentado na tabela 3.3. Esta etapa teve como objetivo verificar a incorporação adicional de fósforo na camada de óxido de titânio, além da incorporação de íons cálcio.

Tab.3.3 – Avaliação da influência do tempo de deposição para produção de filmes de óxido de titânio utilizando acetato de cálcio e betaglicerofosfato de sódio como eletrólitos e voltagem de 150V.

| Concentração de eletrólitos (M) | | Voltagem (V) | Tempo (s) |
|--|-------------------------------------|---------------------|------------------|
| Acetato de Cálcio | Beta-glicerofosfato de sódio | | |
| 0,5 | 0 | 150 | 30 |
| 0,5 | 0,02 | 150 | 30 |
| 0,5 | 0,04 | 150 | 30 |
| 0,5 | 0,06 | 150 | 30 |
| 0,5 | 0 | 150 | 60 |
| 0,5 | 0,02 | 150 | 60 |
| 0,5 | 0,04 | 150 | 60 |
| 0,5 | 0,06 | 150 | 60 |

Na terceira etapa, conforme podemos observar na tabela 3.4, foram realizados experimentos com acetato de cálcio 0,5M e acetato de cálcio 0,5M +beta-glicerofosfato de sódio 0,02M, onde a mudança foi o tempo (05, 15, 30, 45 e 60 seg.). A voltagem foi a mesma para todos (150V). Esta etapa teve como objetivo verificar como ocorre a evolução da formação dos filmes.

Tab.3.4 – Eletrólitos utilizados acetato de cálcio 0,5M e acetato de cálcio 0,5M com beta-glicerofosfato de sódio 0,02M, onde o tempo foi a variável. Amostras realizadas em duplicatas.

| Concentração de eletrólitos (M) | | Tempo (s) |
|---------------------------------|------------------------|-----------|
| Acetato de | Beta-glicerofosfato de | |
| 0,5 | 0 | 5 |
| 0,5 | 0 | 15 |
| 0,5 | 0 | 30 |
| 0,5 | 0 | 45 |
| 0,5 | 0 | 60 |
| 0,5 | 0,02 | 5 |
| 0,5 | 0,02 | 15 |
| 0,5 | 0,02 | 30 |
| 0,5 | 0,02 | 45 |
| 0,5 | 0,02 | 60 |

Na quarta etapa, foram realizados experimentos para avaliação da atividade celular. Foram avaliadas 4 condições : acetato de cálcio 0,5M/ 150V/ 60 segundos, fosfato de sódio 0,1M/ 100V/ 60 segundos, acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02/ 150V/ 20 segundos e acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,06M,/ 150V/ 20 segundos, conforme apresentado na tabela 3.5. A escolha das condições foi baseada na morfologia (obtenção de recobrimento poroso e homogêneo) e composição (principalmente no que se refere a incorporação de cálcio e fósforo à camada de óxido de titânio e a presença de fases cristalinas, anatásio e rutilo).

Tab.3.5 -Condições realizadas para a avaliação da Atividade celular. Amostras realizadas em 48 replicatas. Bgf* Betaglicerofosfato de sódio.

| Concentração de eletrólitos (M) | | | Voltagem (V) | Tempo (s) |
|---------------------------------|---------------|------------------|--------------|-----------|
| Acetato de Cálcio | Bgf* de sódio | Fosfato de Sódio | | |
| 0 | 0 | 0,1 | 100 | 60 |
| 0,5 | 0 | 0 | 150 | 60 |
| 0,5 | 0,02 | 0 | 150 | 20 |
| 0,5 | 0,06 | 0 | 150 | 20 |

Os experimentos realizados com chapas de titânio foram feitos em duplicatas. Nos experimentos realizados em discos de titânio, empregados na avaliação celular, foram preparadas 48 replicatas para cada tipo de condição eletrolítica.

3.3 Caracterização dos filmes de óxido de titânio

Para caracterização dos filmes obtidos foram realizadas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV – FEI modelo: Quanta 200) com o objetivo de analisar as morfologias e topografias das superfícies oxidadas, tais análises foram realizadas em alto vácuo por serem amostras condutoras. Espectroscopia por Dispersão de Energia foi empregada para avaliação química elementar, ou seja, quais elementos estavam presentes e se estavam de forma homogênea ou localizada. Para isso, foram escolhidas aleatoriamente 04 regiões. A caracterização topográfica de alta resolução foi realizada por Microscopia de Força Atômica (AFM – marca JPK Instruments, modelo Nanowizard®). As imagens de topografia foram adquiridas em modo contato, utilizando ponteiros fabricadas pela Nanoworld® cont-20 de frequência de ressonância 13 KHz e constante de força 0,2N/m. Foram obtidas imagens em 1 região em 3 áreas correspondentes (100µm X 100µm, 50 µm X 50 µm e 10 µm X 10 µm). A estimativa da espessura (tabela 3.6) e avaliação da rugosidade (tabela 3.7) da camada de óxido foi

realizada por Perfilometria (modelo: DEKTAK 6M), na qual uma ponteira percorre a superfície da amostra em análise, detectando pequenas variações de relevo. Para a avaliação da espessura foi utilizada uma distância de varredura de 8mm, onde iniciava-se na camada sem óxidos e terminava na camada com óxidos. Desta forma, era observado um degrau na diferença entre a camada sem óxidos e a camada com óxidos, e a partir daí era medida a espessura da camada superficial de óxidos. Essa corrida era realizada em 04 linhas em regiões diferentes na mesma amostra. A média aritmética dos valores obtidos foi determinada.

Tab. 3.6 - Parâmetros utilizados para a realização das medidas de espessura das amostras.

| Parâmetros Espessura | |
|----------------------|---------------|
| Ponta | 0,7 μ m |
| Extensão | 8 mm |
| Tempo | 30s |
| Força | 3mg |
| Tipo | Hills&valleys |

Para medir a rugosidade das amostras (tabela 3.7) no perfilômetro, a varredura foi realizada somente na área oxidada, com uma distância total de 2mm. Dessa forma, escolhia-se 03 áreas diferentes na mesma amostra. A média aritmética dos valores obtidos foi determinada.

Tab. 3.7 – Parâmetros utilizados para a realização das medidas de rugosidade das amostras.

| Parâmetros Rugosidade | |
|-----------------------|---------------|
| Ponta | 0,7 μ m |
| Extensão | 2 mm |
| Tempo | 30s |
| Força | 3mg |
| Tipo | Hills&valleys |

Para a caracterização cristalográfica das fases presentes foi utilizado um Difratorômetro de Raios X (DRX – Bruker modelo: D8 Discover). Para a aquisição dos dados obtidos foi utilizado os programas EVA versão 10.1, para a identificação das fases presentes, e TOPAS versão 3.0, para quantificação das fases pelo método de Ritveld.

3.4 Caracterização da atividade celular

A resposta biológica das superfícies produzidas foi avaliada pelo ensaio com células de osteoblastos por ensaio de adesão em tempos de 04 e 24h e ensaio de diferenciação celular por 14 e 21 dias, conforme descrito a seguir

3.4.1. Ensaio de adesão 04 e 24 horas

Para o experimento utilizaram-se placas de 6 poços (TPP, Suíça) com uma fina camada de Agar 3% (Merck, Alemanha) em Meio Eagle modificado por Dulbeco (DMEM, Cultilab, Brasil) ao fundo para que as células não chegassem até o fundo da placa, permanecendo viáveis somente aquelas que estavam em contato com o material.

Em cada poço colocaram-se três discos do titânio com o mesmo tipo de tratamento, sem contato entre elas, sendo avaliados 4 grupos com diferentes tratamentos (A – acetato de cálcio 0,5M, 60 seg., 150V; B – acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M, 20 seg., 150V; C – acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,06M, 20 seg., 150V; D – fosfato de sódio 0,1 M, 60 seg., 100V) e um controle (Titânio pré-anodizado).

Osteoblastos FOST na densidade de 5×10^4 células foram plaqueados sobre os discos de titânio previamente esterilizados e cultivados em atmosfera úmida a 37 °C e 5% CO₂, com meio DMEM suplementado com 10% Soro fetal bovino (SFB, Gibco, Brasil) durante 04 e 24 horas. Ao final dos tempos experimentais as amostras foram removidas

para uma placa de 24 poços (TPP, Suíça) onde foram lavadas com solução salina livre de cálcio e magnésio, tripsinizadas (tripsina 0,1 %, Sigma, USA) e fixadas em formaldeído 3,7% tamponado (Isofar, Brasil), para posterior contagem das células em câmara de Newbauer.

Todo o experimento foi realizado em triplicata e repetido paralelamente.

3.4.2. Diferenciação sobre o material 14 e 21 dias

Para o experimento utilizaram-se placas de 24 poços (TPP, Suíça) com uma fina camada de Agar 3% (Merck, Alemanha) em DMEM (Cultilab Brasil) ao fundo para que as células não chegassem até o fundo da placa, permanecendo viáveis somente aquelas que estavam em contato com o material.

Em cada poço colocou-se um disco do titânio a ser testado, sendo avaliados 4 grupos com diferentes tratamentos (A – acetato de cálcio 0,5 M, 60 seg., 150 V; B – acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M, 20 seg., 150V; C – acetato de cálcio 0,5 M + Bgf 0,06M, 20 seg., 150 V; D – fosfato de sódio 0,1 M, 60 seg., 100 V) e um controle.

Para o experimento foram semeadas a densidade de 3×10^4 células da linhagem Fost sobre cada material e completado o volume a 1 mL com DMEM 10% SFB. Após 48 horas de cultivo em úmida a 37 °C e 5% CO₂, o meio foi substituído por um de meio DMEM suplementado com 10% SFB, 10mM beta-glicerofosfato (Sigma, USA) e 50µg/mL ácido ascórbico (Sigma, USA), que formam o meio de osteoindução.

No final de 14 e 21 dias os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados em eppendorfs, depois foram devidamente congelados para futura dosagem de fosfatase alcalina (Labtest, Brasil - Ensaio cinético colorimétrico ref.: 79-4/30).

As amostras foram removidas para outra placa de 24 poços e pré-fixadas em solução de glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,05M pH 7,0 para futuro processamento para a microscopia eletrônica de varredura.

3.5 Análise estatística dos resultados

Análises estatísticas foram conduzidas nos dados obtidos nos experimentos das Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 utilizando o aplicativo estatístico GraphPad InStat® (versão 3.0.1). Inicialmente foi verificado se os dados passam no teste de normalidade. Em seguida, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Em todas as avaliações foi necessária a análise não-paramétrica, uma vez que a distribuição entre os dados não era normal. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Na avaliação de atividade celular, a existência de correlação entre as medidas de rugosidade e adesão celular nos tempos de 4 e 24 horas foi avaliada utilizando o programa GraphPad Prism (versão 5.0).

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de recobrimentos bioativos, como produção de filmes de hidroxiapatita, biovidros e óxido de titânio, têm sido amplamente recomendada por especialistas em implantologia com o objetivo de melhorar a biocompatibilidade dos implantes e acelerar o processo de remodelação óssea na interface implante-tecido ósseo (JACKSON & AHMED, 2007). As características superficiais são reconhecidas como fatores determinantes no sucesso do desempenho de implantes. Parâmetros como composição, topografia e rugosidade superficial têm sido apontados como mais importantes na alteração da atividade celular (OSHIDA, 2006).

Neste trabalho, filmes de óxido de titânio foram produzidos pelo processo de oxidação anódica a microarco, conforme descrito no Capítulo III. A seguir são apresentados resultados da caracterização dos filmes quanto à morfologia, composição, determinação de fases cristalinas presentes, espessura e biocompatibilidade.

A Figura 4.1 apresenta a morfologia das superfícies dos discos de titânio puro após a realização do tratamento de pré-anodização, conforme procedimento apresentado na tabela 3.1. Observa-se que a superfície apresenta-se heterogênea e rugosa causada pelo ataque químico realizado durante a limpeza superficial com HCl (ácido clorídrico). É possível observar que os contornos dos grãos que compõem a superfície foram revelados pelo tratamento. TAKEUCHI *et al.* (2003) propõem o tratamento combinado da solução 10N HCl, seguido por lavagem em ultra-som com acetona ou água destilada, como o método mais eficaz para eliminação da camada de TiO₂. Neste processo, ocorre a formação de um complexo Ti-Cl, como cloreto de titânio, muito solúvel em água, e não há enfraquecimento da superfície.

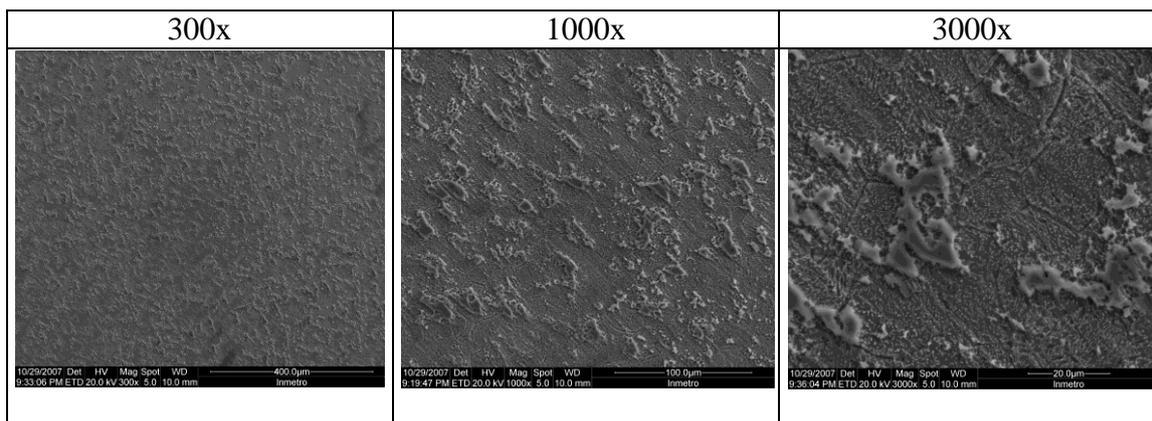


Fig. 4.1- Micrografia de MEV das superfícies dos discos de titânio após a limpeza superficial, com ampliações de 300x, 1000x e 3000x.

4.1 - Acetato de cálcio 0,5M e Fosfato de sódio 0,1M

De acordo com a tabela 3.2 do capítulo Materiais e Métodos, nesta etapa foram utilizados acetato de cálcio 0,5M, 150V em 30 segundos e 60 segundos e fosfato de cálcio 0,1M, 100V e 150V , 60 segundos Os resultados de rugosidade, espessura, MEV, EDS e Difração de Raios X serão agora apresentados.

4.1.1- Acetato de cálcio 0,5M

4.1.1.1 - Rugosidade

Na tabela 4.1 são apresentados os resultados de rugosidade para os filmes obtidos nos experimentos apresentados na tabela 3.1. Podemos observar que não existe diferença significativa para medidas de rugosidade para os filmes obtidos com o eletrólito acetato de cálcio 0,5M, tanto para 30 segundos quanto para 60 segundos. Importante salientar que para cada condição foram realizadas duas réplicas motivo pelo qual se tem na tabela 4.1 valores de média 1 e média 2. Neste caso, portanto, o tempo de anodização não

influenciou na rugosidade da camada de óxidos quando se utiliza estas condições de anodização.

Tab. 4.1 - Valores de médias de rugosidade e desvio padrão da camada de óxido formada com solução de Acetato de cálcio 0,5M e 150V nos períodos de anodização de 30 e 60 segundos.

| Acetato de Cálcio 0,5M - 30seg | | Acetato de Cálcio 0,5M – 60 Seg | |
|---------------------------------------|-----------------|--|-----------------|
| | Rugosidade (nm) | | Rugosidade (nm) |
| média 1 | 239,2 | média 1 | 277,9 |
| média 2 | 337,1 | média 2 | 336,8 |
| Média geral | 288 | Média geral | 307 |
| | | | |
| desvio padrão 1 | 18,3 | desvio padrão 1 | 56,4 |
| desvio padrão 2 | 25,1 | desvio padrão 2 | 17,3 |
| Desvio padrão geral | 5 | Desvio geral | 28 |

4.1.1.2 – Espessura

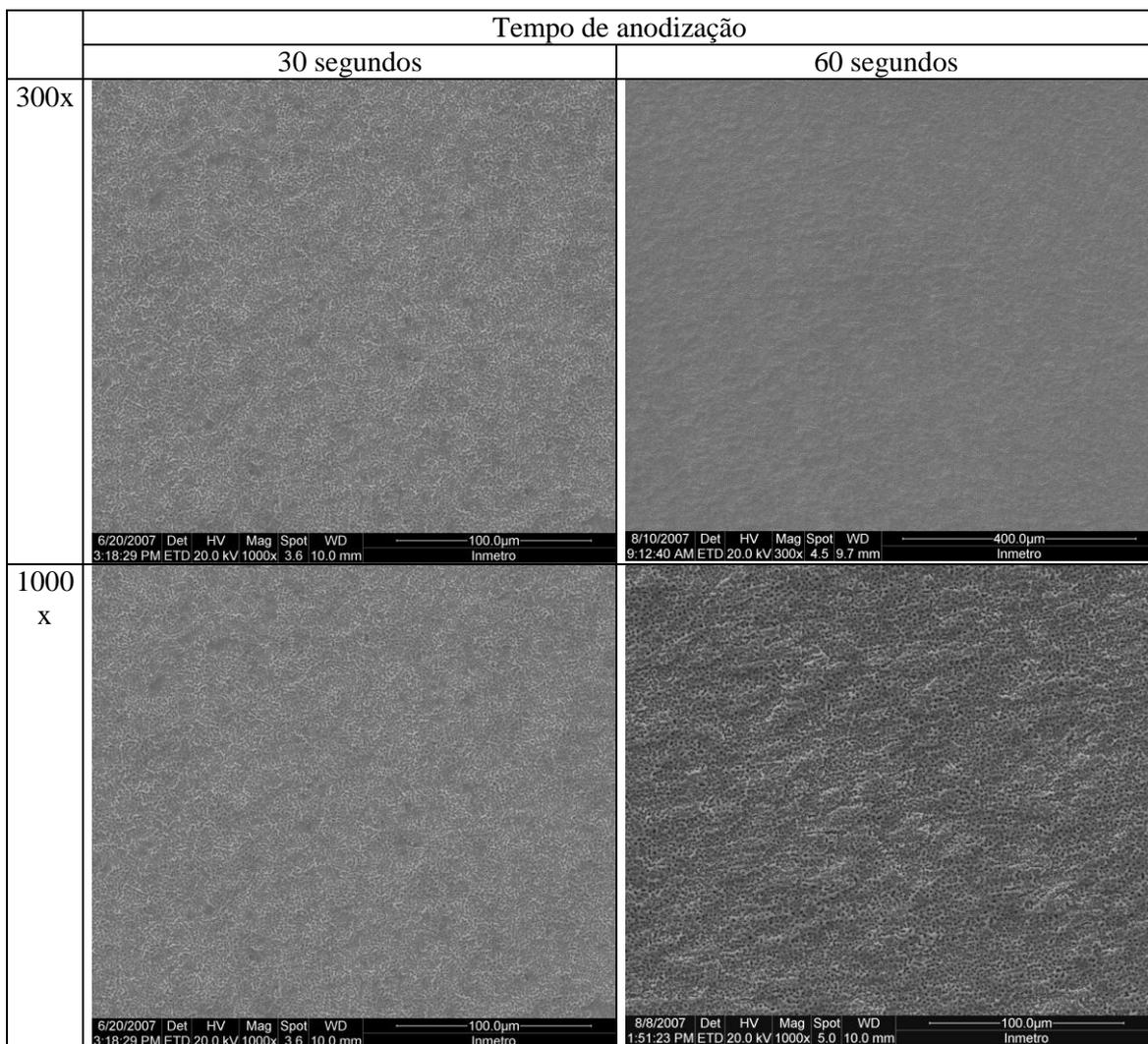
Na tabela 4.2 são apresentados os resultados de rugosidade para os filmes obtidos nos experimentos apresentados na tabela 3.1. Observamos que a taxa de deposição dobra no tempo de 60 segundos (837nm) em relação ao tempo de 30 segundos (400 nm), demonstrando que o tempo é um fator que contribui na taxa de deposição do óxido de titânio, utilizando-se estas condições de anodização.

Tab. 4.2 - Valores de estimativa de espessura da camada de óxido formada com solução de Acetato de cálcio 0,5M e 150V nos períodos de anodização de 30 e 60 segundos.

| Acetato de Cálcio 0,5M - 30seg | | Acetato de Cálcio 0,5M – 60 Seg | |
|---------------------------------------|----------------|--|----------------|
| | Espessura (nm) | | Espessura (nm) |
| média 1 | 273 | média 1 | 843 |
| média 2 | 527 | média 2 | 831 |
| Média geral | 400 | Média geral | 837 |
| | | | |
| desvio padrão 1 | 83 | desvio padrão 1 | 187 |
| desvio padrão 2 | 366 | desvio padrão 2 | 198 |
| Desvio padrão geral | 281 | Desvio geral | 178 |

4.1.1.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na figura 4.2 são apresentadas as micrografias dos filmes obtidos com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M nos tempos de anodização de 30 e 60 segundos, respectivamente. Para 30 minutos de reação (Figura 4.2, coluna esquerda), em baixo aumento (300x e 1000x) a camada de óxido é constituída de poros distribuídos por toda a superfície. Na magnificação de 3000x, observa-se a presença de defeitos na superfície, ou seja, regiões que não foram recobertas com a camada de óxidos, ou que foram pobremente recobertas. Tais defeitos, indicados pelas setas são mais evidentes quando observamos



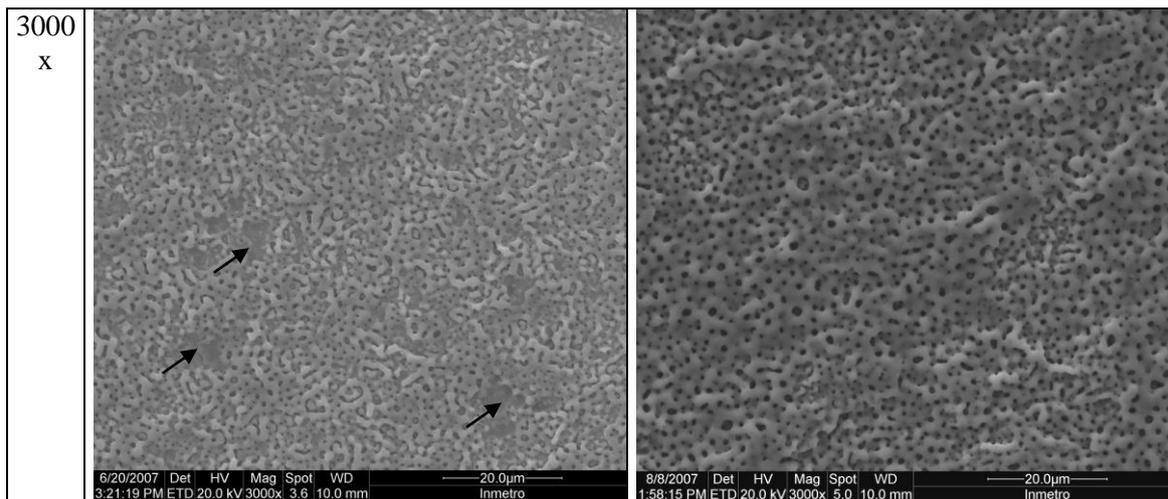


Fig.4.2 - Micrografias das superfícies anodizadas com solução de acetato de cálcio 0,5M a 150V em 30 segundos (coluna esquerda) e 60 segundos (coluna direita) nas magnificações 300x, 1000x e 3000x.

magnificações de 8000x (Figura 4.3). Os poros são irregulares e incompletos, isto é, alguns poucos têm sua circunferência fechada. Neste caso, o tempo de reação foi insuficiente para formar uma camada de óxidos porosa por toda a superfície. Em função da heterogeneidade superficial esta superfície foi considerada incompatível para realização de experimentos de atividade celular. As topografias das amostras produzidas em 60 segundos são mais porosas e homogêneas que as de 30 segundos, o que, para implantes odontológicos e ortopédicos é uma característica essencialmente importante no que diz respeito ao ancoramento ósseo e embricamento mecânico do implante (CORTEZ, A.L.V.,2002).

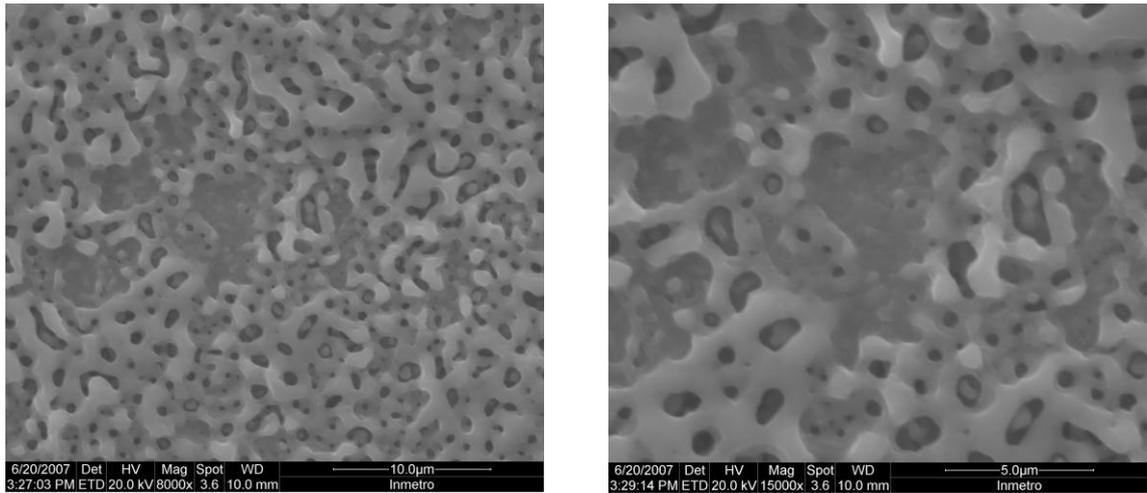


Fig. 4.3 - Detalhe da superfície do recobrimento obtido pela anodização utilizando solução de acetato de cálcio 0,5M a 150V e 30 segundos, com magnificações de 8000X (esquerda) e 15000X (direita). As setas indicam defeitos na superfície oxidada.

Para 60 segundos de reação podemos observar que ao dobrar o tempo de reação a superfície do recobrimento torna-se mais porosa e homogênea. Os poros são mais regulares, de forma circular e ligeiramente ovais, alguns, levemente alongados, porém mais numerosos (detalhe Figura 4.4). A espessura é, em média, duas vezes maior que a espessura do filme produzido com tempo de anodização de 30 segundos, conforme mostrado nos resultados na tabela 4.2.

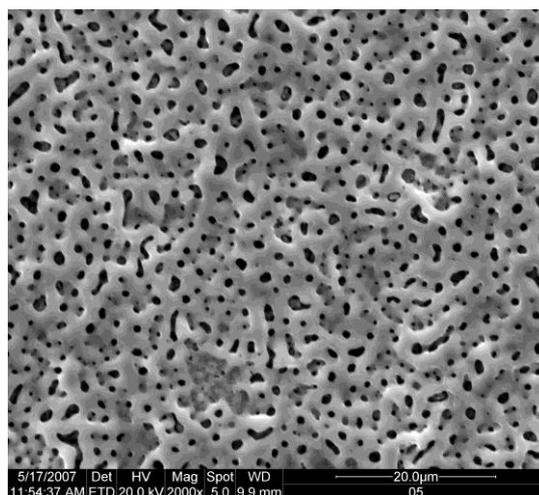


Fig. 4.4- - Detalhe da superfície do recobrimento obtido pela anodização utilizando solução de acetato de cálcio 0,5M a 150V e 60 segundos, com magnificação de 4000X

4.1.1.4 - Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS)

Na tabela 4.3 são apresentados os resultados de composição elementar (% atômico) dos filmes produzidos com eletrólito acetato de cálcio 0,5M a 150V nos tempos de anodização de 30 e 60 segundos.

Pela tabela 4.3, podemos observar pelas médias que temos a concentração de íons cálcio dobra no filme formado quando o tempo de reação passa de 30 para 60 segundos quando utilizamos o eletrólito de acetato de cálcio 0,5M a 150V. O cálcio é um dos principais componentes da fase mineral óssea. Estudo realizado por PARK *et al.* (2007) mostra um aumento significativo na viabilidade celular, na força de torque de remoção e na área de interface osso-implante em amostras de Ti6Al4V com íons cálcio incorporados pelo processo hidrotérmico quando comparado com Ti6Al4V não tratados.

Tab. 4.3 - Valores da composição elementar (% atômico) por EDS para os filmes produzidos com eletrólito Acetato de cálcio 0,5M no tempo de oxidação de 30 e 60 segundos. * a e b são as duplicatas. Foram realizadas 4 medições em cada amostra.

| Acetato de Cálcio 0,5M/150V/30 seg | | | | Acetato de Cálcio 0,5M/150V/60 seg | | | |
|---------------------------------------|-------------|--------------|--------------|---------------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| | Cálcio | Titânio | Oxigênio | | Cálcio | Titânio | Oxigênio |
| 1a | 1,23 | 40,9 | 57,76 | 1a | 4,13 | 36 | 59,75 |
| 2a | 1,11 | 41,88 | 56,89 | 2a | 4,57 | 35,02 | 60,17 |
| 3a | 1,47 | 40,75 | 58,07 | 3a | 4,19 | 35,51 | 60,18 |
| 4a | 1,47 | 40,14 | 58,32 | 4a | 4,81 | 34,84 | 60,3 |
| 1b | 1,96 | 40,32 | 57,6 | 1b | 5,19 | 34,58 | 60,21 |
| 2b | 2,77 | 38,46 | 58,65 | 2b | 5,28 | 34,92 | 59,8 |
| 3b | 2,93 | 37,12 | 59,86 | 3b | 5,73 | 34,55 | 59,59 |
| 4b | 3,03 | 38,04 | 58,83 | 4b | 5,24 | 34,44 | 60,13 |
| média | 2,00 | 39,70 | 58,25 | média | 4,89 | 34,98 | 60,02 |
| desvio | 0,80 | 1,64 | 0,90 | desvio | 0,57 | 0,53 | 0,26 |

A reprodutibilidade do ensaio pode ser verificada na tabela 4.4, onde são apresentados os resultados da composição (% atômico) para filmes produzidos em dias diferentes.

Tab. 4.4 - Valores da composição elementar (% atômico) por EDS para os filmes produzidos com eletrólito Acetato de cálcio 0,5M no tempo de oxidação de 30 e 60.

| Acetato de Cálcio 0,5M - 30seg | | | | Acetato de Cálcio 0,5M - 60seg | | | |
|--------------------------------|--------|---------|----------|--------------------------------|--------|---------|----------|
| | Cálcio | Titânio | Oxigênio | | Cálcio | Titânio | Oxigênio |
| média | | | | média | | | |
| Dia 1 | 2,00 | 39,70 | 58,25 | Dia 1 | 4,89 | 34,98 | 60,02 |
| média | | | | média | | | |
| Dia 2 | 2,09 | 39,68 | 58,09 | Dia 2 | 4,08 | 35,89 | 59,90 |

4.1.1.5 – Difração de Raios X (DRX)

No difratograma da figura 4.5 pode-se observar que as fases anatásio, rutilo estão presentes como fases cristalinas dos recobrimentos de óxido de titânio quando o eletrólito de acetato de cálcio 0,5M a 150V foi utilizado no tempo de deposição de 30 segundos. Picos referentes ao substrato titânio ainda estão presentes com alta intensidade, indicando que o recobrimento obtido é pouco espesso.

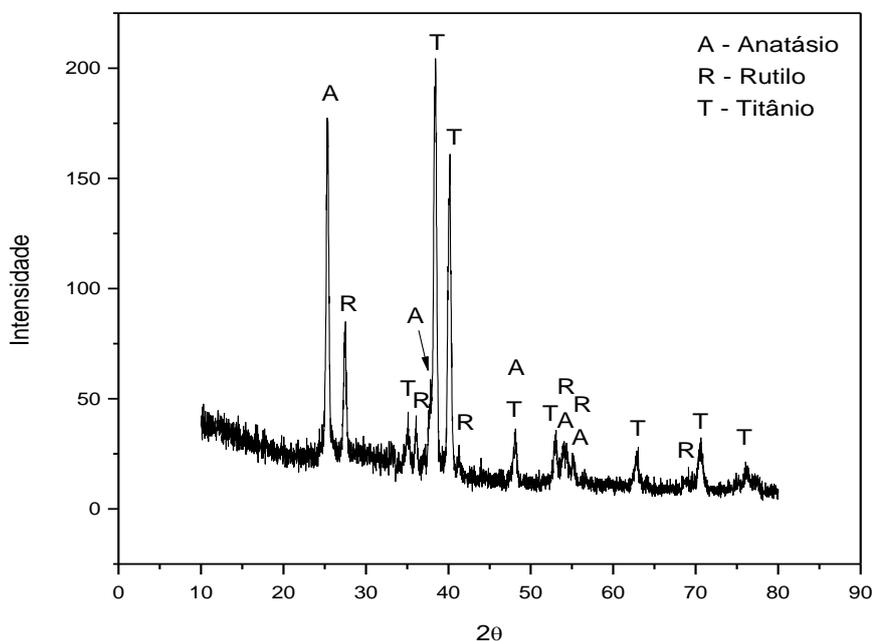


Fig. 4.5 - Difratograma do recobrimento de óxido de titânio com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M a 150V e 30 segundos de deposição.

No difratogramado filme obtido em 60 segundos de deposição (figura 4.6), as fases anatásio e rutilo foram detectadas. É possível observar que há um aumento de intensidade dos picos de anatásio e rutilo em relação ao de titânio, podendo indicar um aumento na espessura do filme produzido. Este resultado é confirmado pelos valores de espessura apresentados na tabela 4.2 .

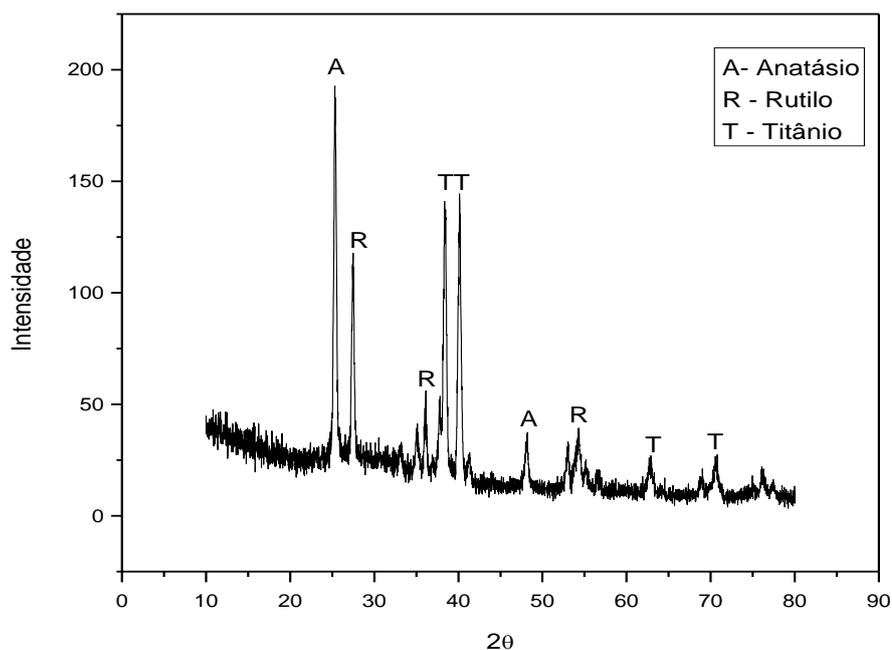


Fig. 4.6 - Difratograma do recobrimento de óxido de titânio com eletrólito de acetato de cálcio 0, a 150V e 60 segundos de deposição.

Considerações: Com os experimentos realizados com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M, a voltagem permaneceu a mesma, 150V, porém o tempo de anodização foi modificado em 30 segundos e 60 segundos, podemos observar através dos resultados de rugosidade, espessura, topografia, composição e presença de fases cristalinas que:

- 1) não houve diferença significativa nos valores de rugosidade quando o tempo de deposição passa de 30 para 60 segundos, como pode ser observado na tabela 4.1.
- 2) a espessura apresentou-se maior quando realizado o período de anodização de 60 segundos, como está apresentado na tabela 4.2. Isso demonstra que o *tempo de anodização* influencia na taxa de deposição do filme quando utilizado eletrólito de

acetato de cálcio em concentração de 0,5M e voltagem 150V sobre substrato de titânio puro.

3) a topografia das superfícies anodizadas em 30 segundos apresentou-se através da análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) que há defeitos em sua superfície, apresentando-se porosa, porém heterogênea e com falhas, como se pode observar na figura 4.2, o que inviabiliza a sua utilização para produção de superfícies de implantes biomédicos.

4) quanto à composição química e elementar dos filmes produzidos, observa-se que o uso de acetato de cálcio permite a incorporação de íons cálcio na camada de óxido de titânio formada, esta é composta de uma mistura de anatásio e rutilo. 5) quanto à presença de fases cristalinas, ambos difratogramas das figuras 4.5 e 4.6 exibem as duas fases cristalinas, anatásio e rutilo, além do titânio.

Com estes resultados observa-se que os filmes produzidos por anodização a microarco utilizando eletrólito acetato de cálcio 0,5M a 150V tempo de anodização foi de 60 segundos apresentaram melhores resultados, e por este motivo, foi uma das condições escolhidas para o experimento de atividade celular.

4.1.2 - Fosfato de sódio 0,1M

4.1.2.1 - Rugosidade

Na tabela 4.5 são apresentados os resultados de rugosidade para os filmes obtidos nos experimentos apresentados na tabela 3.2. Na figura 4.7, podemos observar que à medida que a voltagem é aumentada, a rugosidade também aumenta, de forma que os valores médios quase dobram para aquelas amostras cujas voltagens foram de 150V.. Com estes resultados podemos observar que a voltagem é um parâmetro importante no aumento da

rugosidade quando se utiliza eletrólito de fosfato de sódio 0,1M. Resultado semelhante foi encontrado por WANG *et al.* (2006).

Tab. 4.5 - Valores de médias de rugosidade e desvio padrão das camadas de óxidos para voltagens de 100 e 150.

| Fosfato de sódio 0,1M | 100V | 100V | 150V | 150V |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 295 | 365 | 889 | 572 |
| 2 | 339 | 399 | 898 | 533 |
| 3 | 309 | 393 | 744 | 539 |
| Média | 314 | 386 | 844 | 548 |
| Desvio Padrão | 23 | 18 | 87 | 21 |
| Media geral | 350 | | 696 | |
| Desv. Pad. geral | 43 | | 171 | |

No gráfico da figura 4.7 podemos correlacionar as rugosidades dos diferentes tipos de eletrólitos avaliados nesta etapa e as condições avaliadas. Para o acetato de cálcio 0,5M em condições de 150V e tempos de deposição de 30 segundos e 60 segundos, podemos observar que não houve diferença significativa de rugosidade. Já com o eletrólito fosfato de sódio 0,1M podemos observar que houve um aumento substancial na rugosidade quando, em mesmo período de tempo, aumentou-se a voltagem de 100V para 150V. A rugosidade da camada superficial de óxidos dobrou, em relação à rugosidade obtida em 100V.

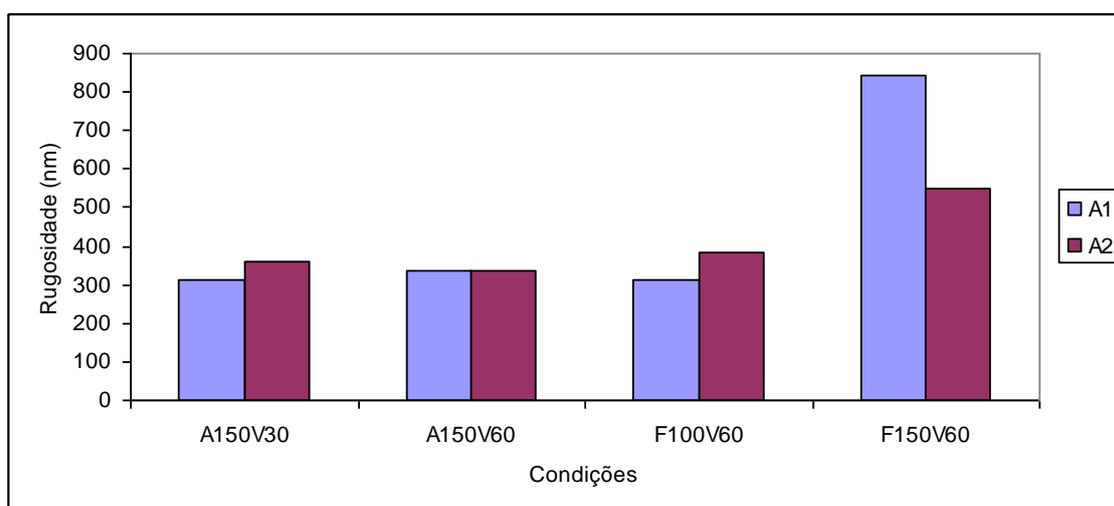


Fig. 4.7 - Gráfico comparativo das condições de anodização X rugosidade (Å), para os eletrólitos acetato de cálcio 0,5M e fosfato de sódio 0,1M. Legenda: A1- amostra 1; A2- amostra 2; A – Acetato de cálcio 0,5M; F- Fosfato de sódio 0,1M.

4.1.2.2 – Espessura

Na tabela 4.6 são apresentados os resultados de espessura para os filmes obtidos nos experimentos apresentados na tabela 3.2. Na figura 4.8, podemos observar que a *voltagem* promove grande influência nos valores de taxa de deposição dos recobrimentos, uma vez que ao mudar de 100V para 150V, o valor médio da espessura aumenta em três vezes o seu valor. WANG *et al.* (2006) observaram em seus estudos que com o aumento da voltagem de anodização, houve também o aumento da espessura do filme depositado . Com estes resultados pode-se observar que a voltagem também é um parâmetro fundamental para o aumento da espessura da camada de óxidos, da mesma forma que para a rugosidade, com já visto na sessão anterior.

Tab. 4.6- Valores de estimativa de espessura (nm) das camadas de óxidos para voltagens de 100 e 150V.

| Fosfato de sódio 0,1M | 100V | 100V | 150V | 150V |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 624 | 686 | 5986 | 2820 |
| 2 | 813 | 1195 | 7784 | 1383 |
| 3 | 732 | 948 | 3612 | 1923 |
| 4 | 1975 | 1867 | 4575 | 1679 |
| Média | 1036 | 1174 | 5489 | 1951 |
| Desvio Padrão | 631 | 507 | 1814 | 620 |
| Media geral | 1105 | | 3720 | |
| Desv. Pad. geral | 535 | | 2270 | |

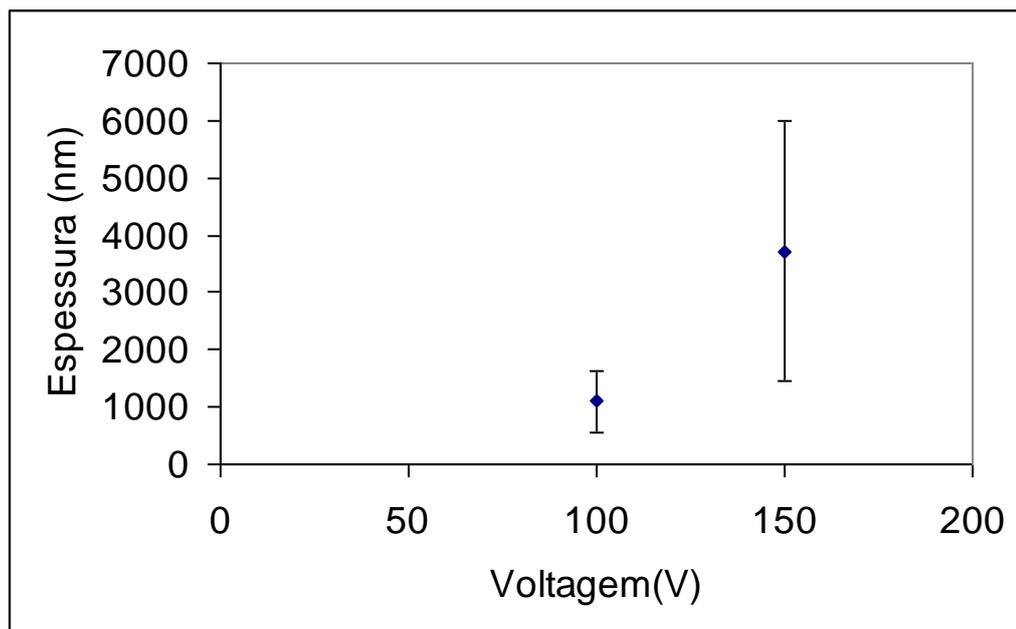


Fig. 4.8 - Gráfico Espessura X Voltagem para eletrólito de fosfato de sódio 0,1M.

4.1.2.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na figura 4.9 estão apresentadas as micrografias dos recobrimentos produzidos com eletrólitos de fosfato de sódio 0,1M em 100V e em 150V. As superfícies obtidas apresentam a formação de poros mais arredondados em relação aos obtidos com eletrólito acetato de cálcio (figura 4.2). Observa-se uma maior densidade de poros na superfície do recobrimento obtido com voltagem de 100V do que em 150V. Na superfície obtida a 150V, a 3000X de ampliação, observa-se também a união dos poros, estes apresentam forma “vulcânica” na superfície o que não ocorre no mesmo aumento para a voltagem de 100V.

Segundo Liu e colaboradores (2006), o tamanho do microporo aumenta com o aumento da voltagem de oxidação do microarco. A superfície porosa pode ser originada devido à alta temperatura nos canais de descarga durante o processo. Através destes canais de descarga há a formação de microporos circulares distribuídos por toda a superfície do filme, justificando assim a aparência “vulcânica” dos microporos quando utilizada a voltagem de 150V. Nesta condição, os canais de descarga são facilmente identificados, conforme indicado por setas da figura 4.9 na magnificação de 3000x.

Fosfato de sódio 0,1M

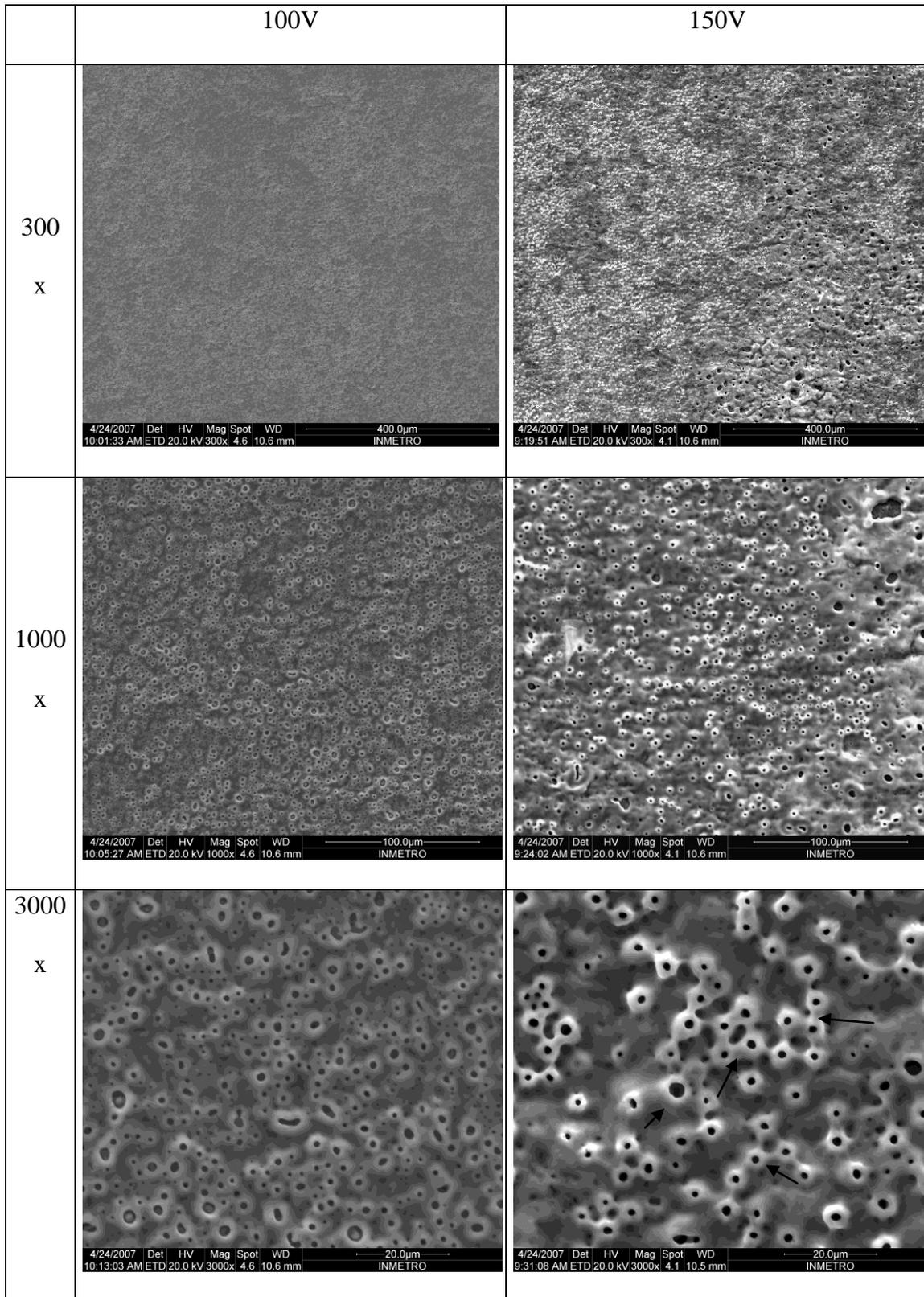


Fig. 4.9 - Micrografias das superfícies anodizadas com eletrólito fosfato de sódio 0,1M, 60 segundos, nas voltagens 100V e 150V. As setas indicam os canais de descarga, levando a formação dos microporos

4.1.2.4 - Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS)

Nas tabelas 4.7, 4.8 e 4.9 são apresentados os valores de composição química, suas médias e desvios padrões, nos filmes produzidos utilizando o eletrólito de fosfato de sódio 0,1M nas diferentes voltagens utilizadas identificados por EDS.

Tab. 4.7 - Composição química dos filmes produzidos com eletrólito de fosfato de sódio nas voltagens de 100V e 150V.

| | Sódio | Fósforo | Oxigênio | Titânio |
|------|-------|---------|----------|---------|
| 100V | 0,74 | 7,86 | 62,5 | 28,91 |
| 100V | 0,2 | 8,07 | 62,29 | 29,44 |
| 150V | 0,55 | 8,58 | 64,42 | 26,45 |
| 150V | 0,53 | 7,49 | 64,56 | 27,41 |

Tab. 4.8 - Médias e desvios padrões dos valores de EDS para o fosfato de sódio 0,1M 100V.

| 100V | | | | |
|----------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| | Sódio | Fósforo | Oxigênio | Titânio |
| Média | 0,47 | 7,97 | 62,40 | 29,18 |
| Desv pad | 0,38 | 0,15 | 0,15 | 0,37 |

Tab. 4.9 - Médias e desvios padrões dos valores de EDS para o fosfato de sódio 0,1M 150V.

| 150V | | | | |
|----------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| | Sódio | Fósforo | Oxigênio | Titânio |
| Média | 0,54 | 8,04 | 64,49 | 26,93 |
| Desv pad | 0,01 | 0,77 | 0,10 | 0,68 |

A figura 4.10 mostra o gráfico comparativo da concentração dos elementos presentes nos recobrimentos realizados com eletrólitos de fosfato de sódio 0,1M em 100 e 150V. Observa-se que a diferença na voltagem não influencia fortemente no percentual dos elementos, pois não houve diferença significativa de seus valores.

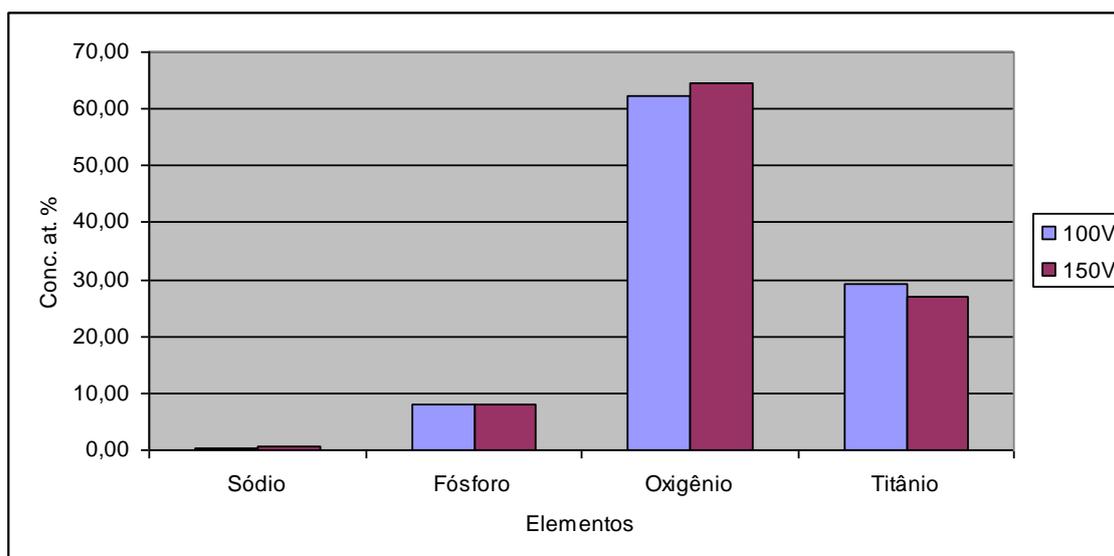


Fig. 4.10 - Gráfico representativo do percentual médio dos elementos presentes por EDS, nos recobrimentos dos eletrólitos de fosfato de sódio 0,1M 100V e 150V.

Observa-se que não há diferença significativa na composição elementar dos filmes produzidos com eletrólitos de fosfato de sódio 0,1M nas voltagens de 100V e 150V. Os valores das médias são bem próximos e o desvio padrão também é bem pequeno. Além do fósforo, foi detectada a incorporação de uma pequena quantidade de sódio. O efeito da incorporação de íons fósforo na superfície de titânio pela técnica de implantação iônica foi avaliado por KRUPA *et al.*, (2003). Resultados da análise eletroquímica mostraram um aumento na resistência à corrosão em longo prazo.

4.1.2.5 - Difração de Raios X (DRX)

A figura 4.11 apresenta os difratogramas dos filmes obtidos com eletrólitos de fosfato de sódio 0,1M a 100V e 150V. Podemos observar que apenas a fase anatásio está presente, além do titânio. A presença de um pico largo em torno de 25 graus na amostra

de 100V indica a presença de uma fase amorfa de anatásio. O filme obtido na potência de 150V é bem espesso, uma vez que quase não é possível visualizar os picos referentes ao substrato titânio. Nos experimentos realizados por WANG *et al.* (2006) o eletrólito fosfato de sódio foi utilizado. O filme obtido era composto pelas fases anatásio e rutilo, porém a voltagem de anodização foi em torno de 350V e 450V, muito mais altas do que as voltagens aqui utilizadas.

Fig. 4.11– Difratogramas dos recobrimentos de fosfato de sódio 0,1M 100V (a) e 150V (b).

Considerações: Com os experimentos realizados com eletrólito fosfato de sódio em que o tempo de anodização foi de 60 segundos, a variável foi a voltagem de 100V e 150V podemos observar através dos resultados de rugosidade, espessura, topografia, composição e presença de fases cristalinas que: 1) a rugosidade da camada superficial de óxidos produzida com este eletrólito e 100V teve média de 350 nm, como apresentado na tabela 4.8. Já para a voltagem 150V a média de rugosidade foi de 696 nm, valor duas vezes maior quando do aumento da voltagem.

2) a espessura dos filmes produzidos também foi maior quando a voltagem foi maior (150V);

3) quando analisamos as micrografias de MEV apresentadas nas figuras 4.8 e 4.9, podemos observar que apesar dos resultados de rugosidade e espessura serem maiores quando utilizada a voltagem de 150V, a topografia da superfície não apresentou-se

satisfatória, uma vez que houve a presença de poros de forma vulcânica (ou em gargalo), menor quantidade de poros, porém de tamanho maior, o que pode explicar os altos valores de espessura e rugosidade obtidos nas amostras. A superfície obtida com voltagem de anodização de 100V apresentou-se mais homogênea e porosa, motivo pelo qual foi selecionada como uma das condições para realização da avaliação da atividade celular realizada neste trabalho.

4) nos difratogramas de raios x observa-se a presença apenas da fase anatásio tanto para voltagem 100V quanto para 150V.

4.2 - Acetato de cálcio 0,5M e Betaglicerofosfato de sódio (0,02M; 0,04M; 0,06M) em 30 segundos e 60 segundos a 150V

4.2.1 - Rugosidade

A seguir são apresentados os valores de rugosidades dos recobrimentos produzidos com eletrólito acetato de cálcio 0,5M e misturas de acetato de cálcio 0,5M e betaglicerofosfato de sódio em diferentes concentrações (0,02M, 0,04M, 0,06M) em tempos de deposição de 30 e 60 segundos, respectivamente.

Tempo: 30 segundos

Na tabela 4.10 observa-se que a média de rugosidade da camada de óxido formada no tempo de deposição de 30 segundos com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M puro é na faixa de 239,1 nm. Quando betaglicerofosfato de sódio 0,02M é adicionado à solução, a rugosidade média vai aumenta progressivamente de forma linear, alcançando o valor de 875,9 nm com a adição de betaglicerofosfato de sódio 0,06M. A figura 4.12 apresenta a distribuição da média e desvio padrão das medidas de rugosidade para os diferentes recobrimentos obtidos.

Resultados semelhantes foram encontrados por ISHIZAWA & OGINO (1995) em estudos com eletrólitos de acetato de cálcio e betaglicerofosfato de sódio onde foi observado um aumento da rugosidade dos filmes com o aumento da concentração do eletrólito (ISHIZAWA & OGINO, 1995).

Tab. 4.10 - Valores de rugosidades para tempos de deposição de 30 segundos, expressos em nanômetros (nm).

| Conc.Bgf | 1 | 2 | 3 | Média | Desvio Padrão |
|-------------|-------|--------|-------|-------|---------------|
| 0 | 250,3 | 229,9 | 261,3 | 239,1 | 18,3 |
| 0 | 242,3 | 243,0 | 208,2 | | |
| 0,02 | 479,3 | 427,6 | 549,8 | 479,2 | 39,87 |
| 0,02 | 462,3 | 475,5 | 481,0 | | |
| 0,04 | 457,6 | 681,7 | 615,9 | 694,6 | 142,1 |
| 0,04 | 803,5 | 769,2 | 839,6 | | |
| 0,06 | 811,5 | 1014,8 | 814,0 | 875,9 | 90,5 |
| 0,06 | 957,1 | 792,3 | 865,6 | | |

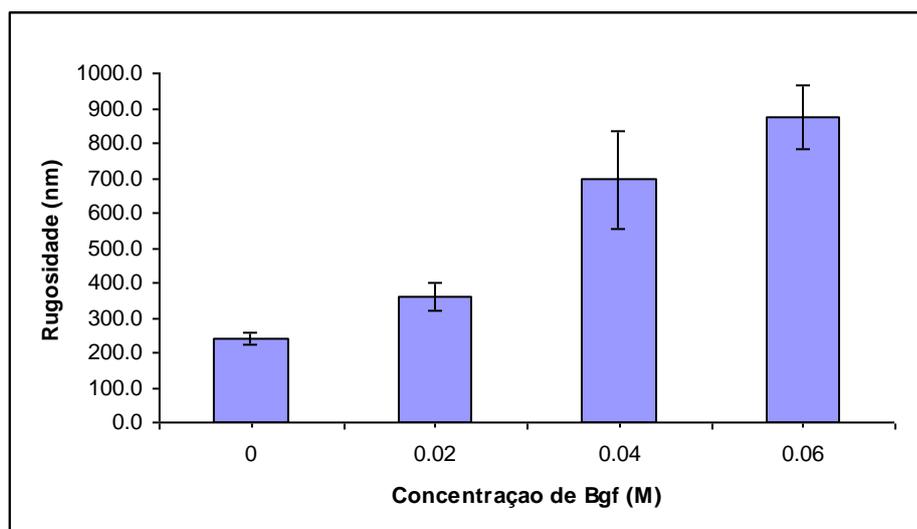


Fig. 4.12 - Gráfico do efeito da adição de Bgf à solução de Acetato de cálcio 0,5M na rugosidade dos revestimentos produzidos no período de 30 segundos.

A análise estatística das medidas de rugosidade, apresentada na Tabela 4.11, permite dizer que somente existe diferença significativa entre as medidas de rugosidade dos recobrimentos para o tempo de deposição de 30 segundos quando se compara as medidas de rugosidade da solução de Acetato de cálcio 0,5M com os valores encontrados para misturas de Acetato de cálcio 0,5M com Bgf 0,04M ($P < 0,05$) e Bgf 0,06M ($P < 0,001$).

Tabela 4.11 – Resultado final da análise estatística dos resultados de rugosidade para a os filmes obtidos com a solução de Acetato de cálcio 0,5M e misturas de acetato de cálcio 0,5M e betaglicerofosfato de sódio em diferentes concentrações (0,02M, 0,04M, 0,06M) em 30 s de deposição.

| Comparação | Nível de Significância | |
|-----------------------|------------------------|-------------|
| 0 Bgf vs. 0,02 Bgf | ns | $P > 0,05$ |
| 0 Bgf vs. 0,04 Bgf | * | $P < 0,05$ |
| 0 Bgf vs. 0,06 Bgf | *** | $P < 0,001$ |
| 0,02 Bgf vs. 0,04 Bgf | ns | $P > 0,05$ |
| 0,02 Bgf vs. 0,06 Bgf | ns | $P < 0,05$ |
| 0,04 Bgf vs. 0,06 Bgf | ns | $P > 0,05$ |

ns - não existe diferença significativa

Tempo: 60 segundos

Na tabela 4.12 são apresentadas as médias de rugosidade para os recobrimentos produzidos com acetato de cálcio 0,5M puro e com as misturas de acetato de cálcio 0,5M e betaglicerofosfato de sódio (0,02M; 0,04M e 0,06M) para o período de anodização de 60 segundos. Também é verificado um aumento na rugosidade da camada de óxido formada com o aumento da concentração de Bgf na solução eletrolítica. A figura 4.13 apresenta a distribuição da média e desvio padrão das medidas de rugosidade para os diferentes recobrimentos obtidos.

Tab. 4.12 - Valores de rugosidades para tempos de deposição de 60 segundos, expressos em nanômetros (nm).

| Conc.Bgf | 1 | 2 | 3 | Média | Desvio Padrão |
|-------------|--------|--------|--------|--------|---------------|
| 0 | 188 | 270 | 239,8 | 277,9 | 56,4 |
| 0 | 325,4 | 331,3 | 312,6 | | |
| 0,02 | 575,2 | 632,6 | 459,9 | 575,8 | 78,5 |
| 0,02 | 687,5 | 537 | 562,3 | | |
| 0,04 | 997,9 | 1527,1 | 647,4 | 1076,1 | 298,4 |
| 0,04 | 950,2 | 1265,9 | 1068,2 | | |
| 0,06 | 850,3 | 1586 | 890,5 | 1397,8 | 424,7 |
| 0,06 | 1599,6 | 1884,7 | 1575,8 | | |

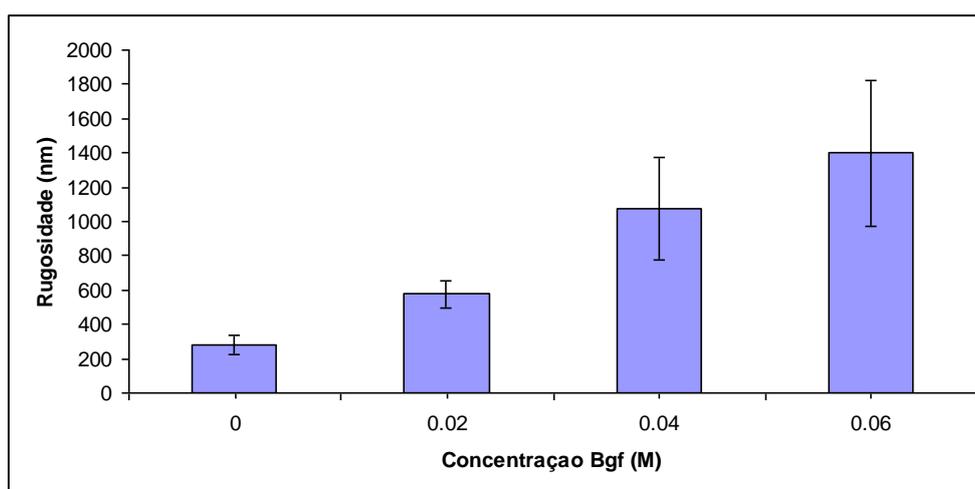


Fig. 4.13 - Gráfico do efeito da adição de Bgf adicionado à solução de Acetato de cálcio 0,5M na rugosidade dos revestimentos produzidos no período de 60 segundos.

A análise estatística das medidas de rugosidade, apresentada na tabela 4.13, permite dizer que somente existe diferença significativa entre as medidas de rugosidade dos recobrimentos para o tempo de deposição de 60 segundos quando se compara as medidas de rugosidade da solução de Acetato de cálcio 0,5M com os valores encontrados para misturas de Acetato de cálcio 0,5M com Bgf 0,04M ($P < 0.05$) e Bgf 0,06M ($P < 0.001$).

Tabela 4.13 – Resultado final da análise estatística dos resultados de rugosidade para a os filmes obtidos com a acetato de cálcio 0,5M e misturas de acetato de cálcio 0,5M e betaglicerofosfato de sódio em diferentes concentrações (0,02M, 0,04M, 0,06M) em 60 s de deposição.

| Comparação | Nível de Significância | |
|-----------------------|------------------------|-------------|
| 0 Bgf vs. 0,02 Bgf | ns | $P > 0.05$ |
| 0 Bgf vs. 0,04 Bgf | ** | $P < 0.01$ |
| 0 Bgf vs. 0,06 Bgf | *** | $P < 0.001$ |
| 0,02 Bgf vs. 0,04 Bgf | ns | $P > 0.05$ |
| 0,02 Bgf vs. 0,06 Bgf | ns | $P < 0.05$ |
| 0,04 Bgf vs. 0,06 Bgf | ns | $P > 0.05$ |

ns - não existe diferença significativa

No gráfico da figura 4.14 é feita uma comparação entre os valores de rugosidade obtida em função dos eletrólitos e tempos de anodização utilizados. Podemos observar que quando adicionamos 0,02M de betaglicerofosfato de sódio, tanto em 30 segundos quanto em 60 segundos, a diferença na rugosidade não é tão significativa quanto a partir de betaglicerofosfato de sódio 0,04M no tempo de 60 segundos para o de 30 segundos. A partir de acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,04M em 60 segundos, temos valores bem maiores que os de 30 segundos, da mesma forma que os valores não se tornam tão lineares quanto os de 30 segundos.

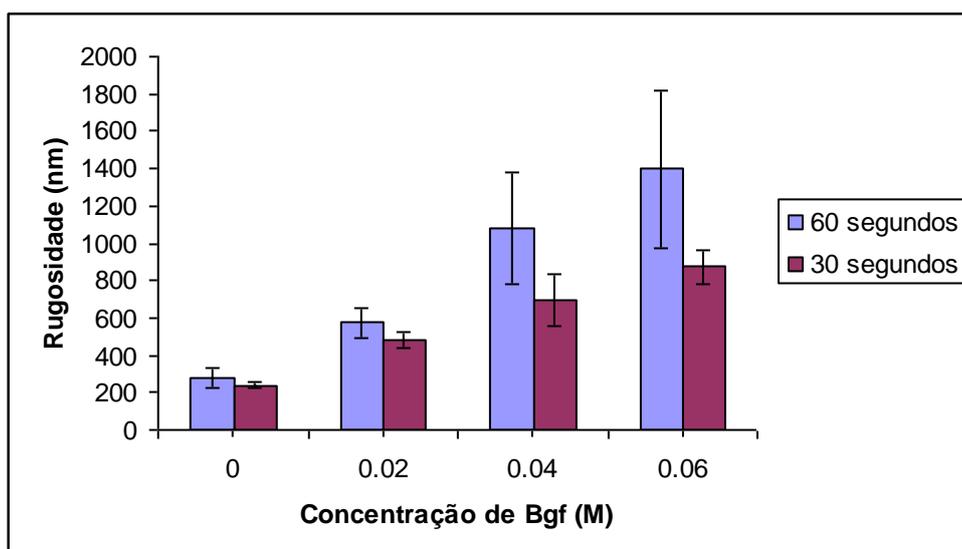


Fig. 4.14- Gráfico comparativo entre as médias de rugosidade dos filmes de oxido de titânio obtidos com eletrólitos com diferentes concentrações de betaglicerofosfato em tempos de anodização de 30 e 60 segundos.

4.2.2 – Espessura

A seguir estão expressos os valores de espessura dos recobrimentos produzidos com os eletrólito de acetato de cálcio 0,5M e mistura de acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio em diferentes concentrações (0,02M, 0,04M, 0,06M) em tempos deposição de 30 segundos e 60 segundos, respectivamente.

Tempo: Nas tabelas 4.14 são apresentados os valores de espessura dos recobrimentos produzidos utilizando solução de acetato de cálcio 0,5M e misturas contendo acetato de cálcio 0,5M e diferentes concentrações de betaglicerofosfato de sódio. Verifica-se que, à medida que se adiciona betaglicerofosfato de sódio à solução eletrolítica, a camada superficial de óxidos torna-se muito mais espessa em comparação com as equivalentes obtidas com o acetato de cálcio 0,5M. Da mesma forma, Zhu e colaboradores realizaram experimentos com acetato de cálcio e betaglicerofosfato de sódio e observaram que a

espessura e rugosidade dos filmes aumentaram quando houve a adição de betaglicerofosfato à solução eletrolítica (ZHU *et al*, 2001).

A figura 4.15 apresenta a distribuição da média e desvio padrão das medidas de espessura para os diferentes recobrimentos obtidos em 30 segundos.

Tab. 4.14 - Medidas de espessura das amostras (em duplicata) obtidas com pela anodização utilizando solução de acetato de cálcio 0,5M e as diferentes misturas contendo acetato de cálcio e Bgf para o tempo de 30 segundos de deposição, expressos em nanômetros (nm).

| Medida | Acet. Cálcio 0,5M | | Acet.Cálcio 0,5M + Bgf 0,02M | | Acet.Cálcio 0,5M + Bgf 0,04M | | Acet.Cálcio 0,5M + Bgf 0,06M | |
|----------------------|-------------------|-----|------------------------------|------|------------------------------|------|------------------------------|------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 1 | 226 | 735 | 1126 | 1759 | 4575 | 1211 | 4967 | 476 |
| 2 | 258 | 226 | 1532 | 2237 | 4878 | 2014 | 4766 | 347 |
| 3 | 231 | 937 | 1465 | 892 | 4128 | 1492 | 6776 | 5613 |
| 4 | 208 | 211 | 1447 | 134 | 2204 | 231 | 5446 | 3191 |
| Média | 379 | | 1475 | | 2852 | | 4874 | |
| Desvio padrão | 288 | | 405 | | 1447 | | 1154 | |

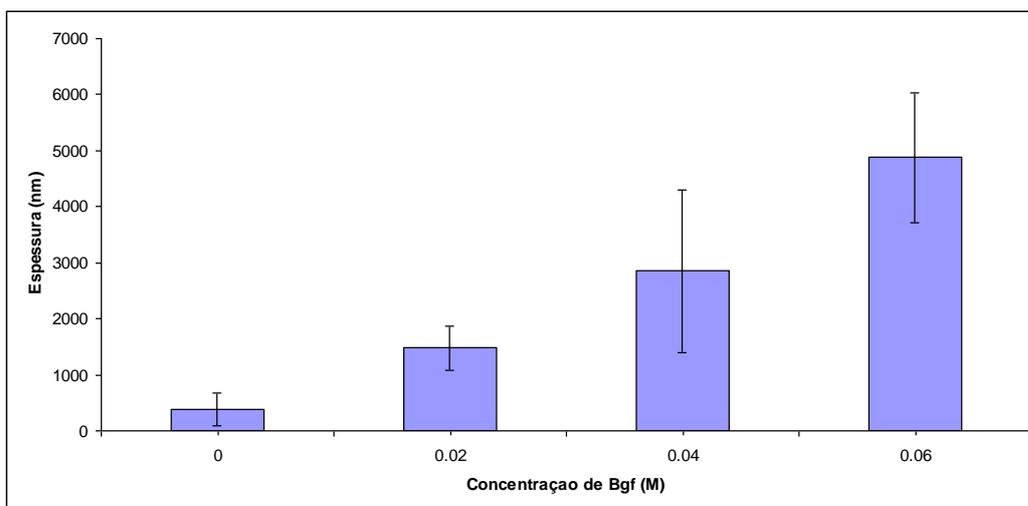


Fig. 4.15 - Gráfico da Espessura dos recobrimentos (nm) X acetato de cálcio 0,5M e as misturas contendo acetato de cálcio 0,5M e diferentes concentrações de Bgf, em 30 segundos de deposição (nm).

A análise estatística das medidas de espessura, apresentada na tabela 4.15, permite dizer que existe diferença significativa entre as medidas de espessura dos recobrimentos para o tempo de deposição de 30 segundos quando se compara as medidas de espessura da solução de Acetato de cálcio 0,5M com os valores encontrados para misturas de Acetato

de cálcio 0,5M com Bgf 0,04M ($P < 0.05$) e Bgf 0,06M ($P < 0.001$) e entre as medidas de espessura dos recobrimentos obtidos entre as misturas de Acetato de cálcio 0,5M com Bgf 0,02 e Bgf 0,06M ($p < 0.05$).

Tabela 4.15 – Resultado final da análise estatística dos resultados de espessura para a os filmes obtidos com a acetato de cálcio 0,5M e misturas de acetato de cálcio 0,5M e betaglicerofosfato de sódio em diferentes concentrações (0,02M, 0,04M, 0,06M) em 30 s de deposição.

| Comparação | Nível de Significância | |
|-----------------------|------------------------|-------------|
| 0 Bgf vs. 0,02 Bgf | ns | $P > 0.05$ |
| 0 Bgf vs. 0,04 Bgf | ** | $P < 0.01$ |
| 0 Bgf vs. 0,06 Bgf | *** | $P < 0.001$ |
| 0,02 Bgf vs. 0,04 Bgf | ns | $P > 0.05$ |
| 0,02 Bgf vs. 0,06 Bgf | * | $P < 0.05$ |
| 0,04 Bgf vs. 0,06 Bgf | ns | $P > 0.05$ |

ns - não existe diferença significativa

A tabela 4.16 apresentada os valores de espessura dos recobrimentos produzidos em 60 segundos de deposição. Verifica-se que partir da concentração de betaglicerofosfato de sódio 0,04M observa-se que a taxa de deposição média é reduzida, em seguida ocorrendo sua estabilização.

Tab. 4.16 - Medidas de espessura das amostras (em duplicata) obtidas com pela anodização utilizando solução de acetato de cálcio 0,5M e as diferentes misturas contendo acetado de cálcio e Bgf para o tempo de 60 segundos de deposição, expressos em nanômetros (nm).

| Medida | Acet. Cálcio 0,5M | | Acet.Cálcio 0,5M + Bgf 0,02M | | Acet.Cálcio 0,5M + Bgf 0,04M | | Acet.Cálcio 0,5M + Bgf 0,06M | |
|----------------------|-------------------|------|------------------------------|------|------------------------------|------|------------------------------|------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 1 | 826 | 1043 | 3307 | 2562 | 2892 | 3978 | 3474 | 2779 |
| 2 | 878 | 942 | 2705 | 1676 | 5823 | 3327 | 2385 | 5518 |
| 3 | 606 | 730 | 3339 | 2231 | 4472 | 3179 | 4293 | 4113 |
| 4 | 1060 | 608 | 4139 | 1889 | 4774 | 2940 | 4036 | 3805 |
| Média | 837 | | 2731 | | 3923 | | 3800 | |
| Desvio padrão | 178 | | 827 | | 1040 | | 964 | |

A figura 4.16 apresenta a distribuição da média e desvio padrão das medidas de espessura para os diferentes recobrimentos obtidos em 60 segundos.

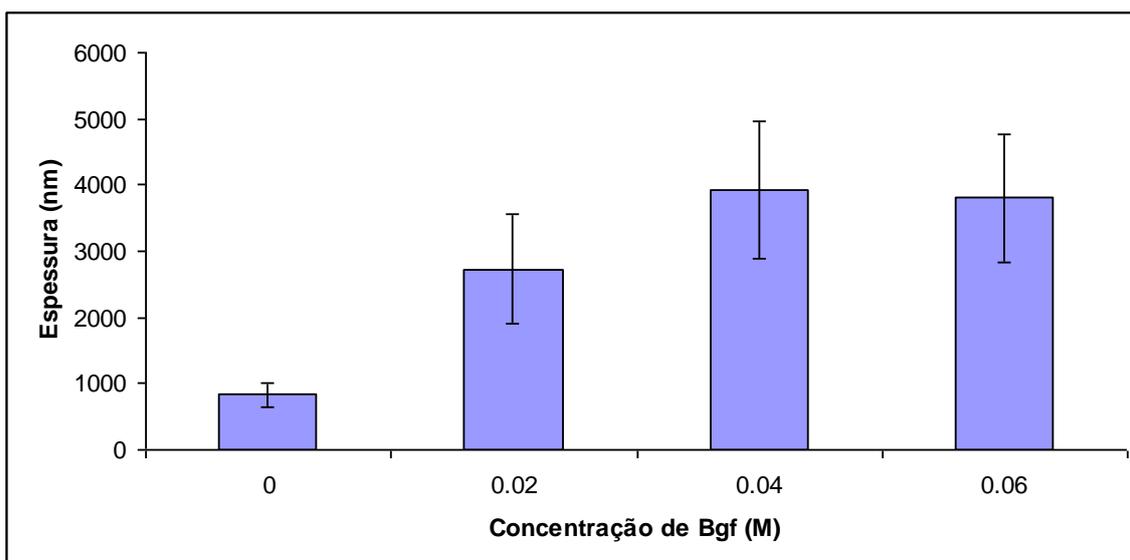


Fig. 4.16 - Gráfico da Espessura dos recobrimentos (nm) X acetato de cálcio 0,5M e as misturas contendo acetato de cálcio 0,5M e diferentes concentrações de Bgf, em 60 segundos de deposição (nm).

A análise estatística das medidas de espessura, apresentada na tabela 4.17, permite dizer que existe diferença significativa entre as medidas de espessura dos recobrimentos para o tempo de deposição de 60 segundos quando se compara as medidas de espessura da solução de Acetato de cálcio 0,5M com os valores encontrados para misturas de Acetato de cálcio 0,5M com Bgf 0,04M ($P < 0.001$) e Bgf 0,06M ($P < 0.001$).

Tabela 4.17 – Resultado final da análise estatística dos resultados de espessura para a os filmes obtidos com a acetato de cálcio 0,5M e misturas de acetato de cálcio 0,5M e betaglicerofosfato de sódio em diferentes concentrações (0,02M, 0,04M, 0,06M) em 60 s de deposição.

| Comparação | Nível de Significância | |
|-----------------------|------------------------|-------------|
| 0 Bgf vs. 0,02 Bgf | ns | $P > 0.05$ |
| 0 Bgf vs. 0,04 Bgf | *** | $P < 0.001$ |
| 0 Bgf vs. 0,06 Bgf | *** | $P < 0.001$ |
| 0,02 Bgf vs. 0,04 Bgf | ns | $P > 0.05$ |
| 0,02 Bgf vs. 0,06 Bgf | ns | $P > 0.05$ |
| 0,04 Bgf vs. 0,06 Bgf | ns | $P > 0.05$ |

ns - não existe diferença significativa

No gráfico da figura 4.17 é feita uma comparação entre os valores de espessura obtida em função dos eletrólitos e tempos de anodização utilizados. Podemos observar que quando adicionamos betaglicerofosfato de sódio, tanto em 30 segundos quanto em 60

segundos, os valores de espessura tendem a aumentar com o aumento da concentração de betaglicerofosfato de sódio, até a concentração de betaglicerofosfato de sódio 0,04M, onde temos seu valor maior em 60 segundos. Diferentemente de 30 segundos, a concentração de 0,06M de Bgf em 60 segundos, a espessura do filme produzido tende a não aumentar, podendo inclusive, ser um pouco menor que para a concentração de Bgf de 0,04M, levando a crer que há uma estagnação na taxa de deposição para este período de anodização com tal concentração.

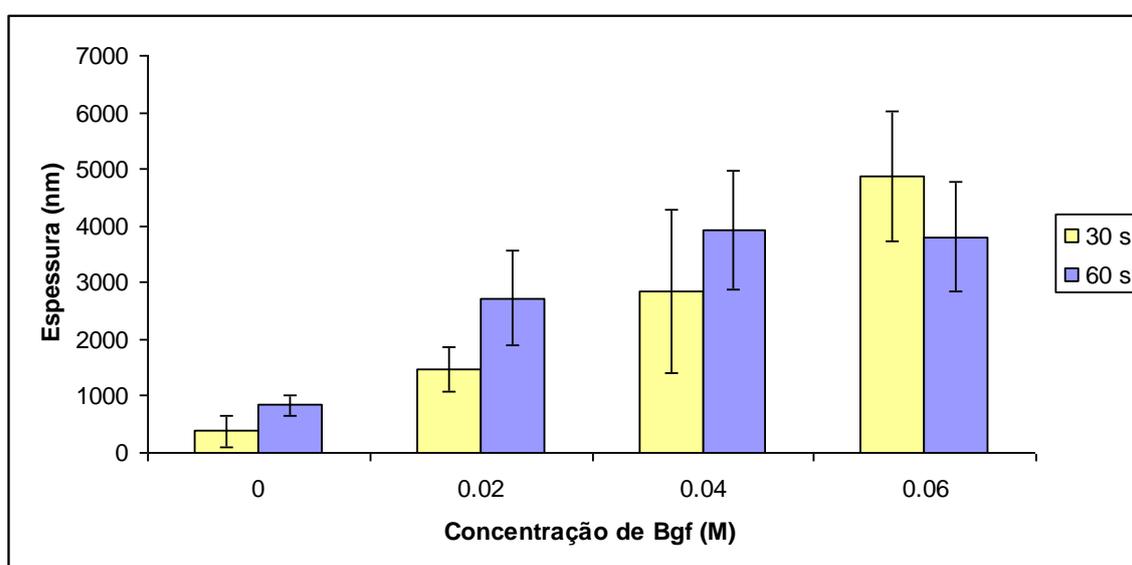
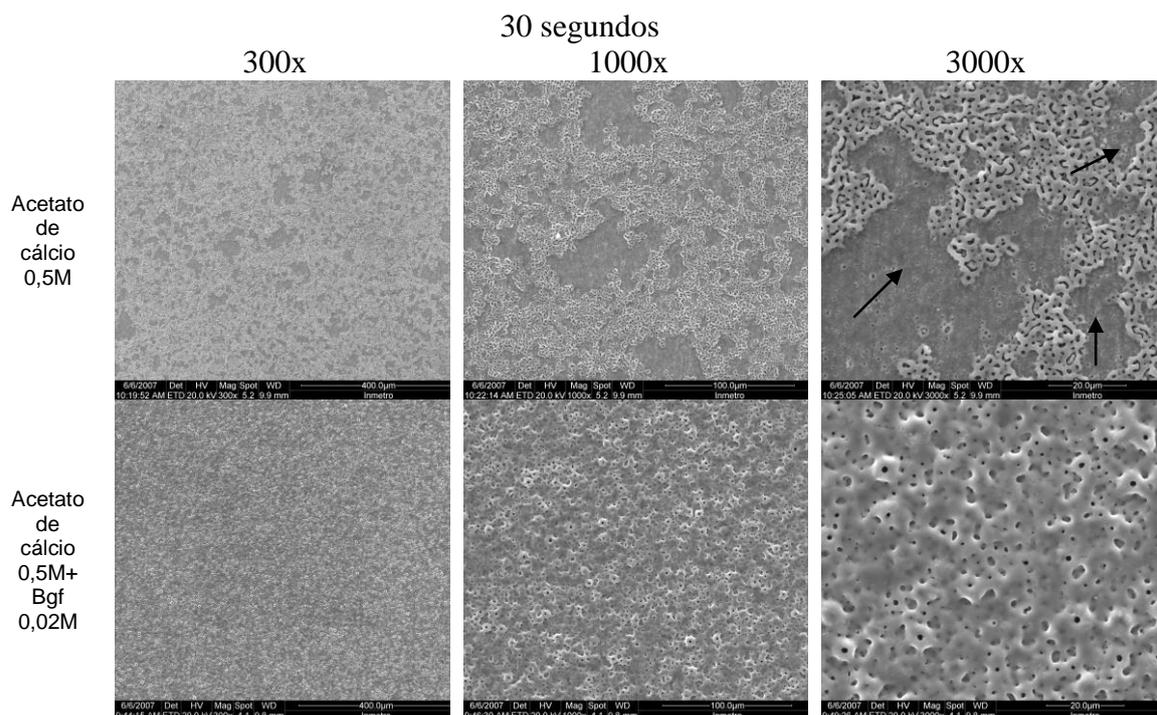


Fig. 4.17- Gráfico comparativo entre as médias de espessura dos filmes de óxido de titânio obtidos com eletrólitos com diferentes concentrações de betaglicerofosfato em tempos de anodização de 30 e 60 segundos.

4.2.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na figura 4.18 observamos que o acetato de cálcio 0,5M puro em 30 segundos de anodização não produz recobrimentos satisfatórios, uma vez que a superfície do substrato de titânio não foi completamente recoberta com a camada de óxidos conforme podemos ver através das setas na micrografia de aumento de 3000X, sendo então inviável sua utilização para recobrimentos de implantes de titânio. Com acetato de cálcio 0,5M adicionado betaglicerofosfato de sódio 0,02M observamos a superfície do substrato de titânio completamente recoberta com a camada de óxidos e esta apresenta

porosidade e homogeneidade da superfície satisfatórias. No recobrimento obtido com a mistura contendo 0,04M de betaglicerofosfato de sódio, observamos que há uma diminuição no número de poros, porém há um aumento no tamanho dos mesmos, ou seja, a porosidade diminui, porém não são observadas microfaturas na superfície de óxidos (ISHIZAWA, H. & OGINO, M., 1995). Quando a mistura contém 0,06M de betaglicerofosfato de sódio observa-se que há presença de algumas microfaturas na camada superficial de óxidos formada, conforme indicado nas setas no aumento de 3000x, o que não é interessante para nossos recobrimentos devido a possibilidade de descolamento da camada (ZHU, X. *et al*, 2001). Houve um aumento no tamanho dos poros comparado com os filmes de óxidos produzidos com eletrólito contendo betaglicerofosfato de sódio 0,04M. Variações nos tamanhos dos poros afetam diretamente na qualidade e quantidade do novo osso a ser formado. A porosidade do filme de óxidos aumenta a força de atrito entre o implante e os tecidos adjacentes. Excessivos micro movimentos no sítio junto ao implante influenciam na formação de tecido fibroso junto ao implante, o que não é desejável (ZHU, X. *et al*, 2001).



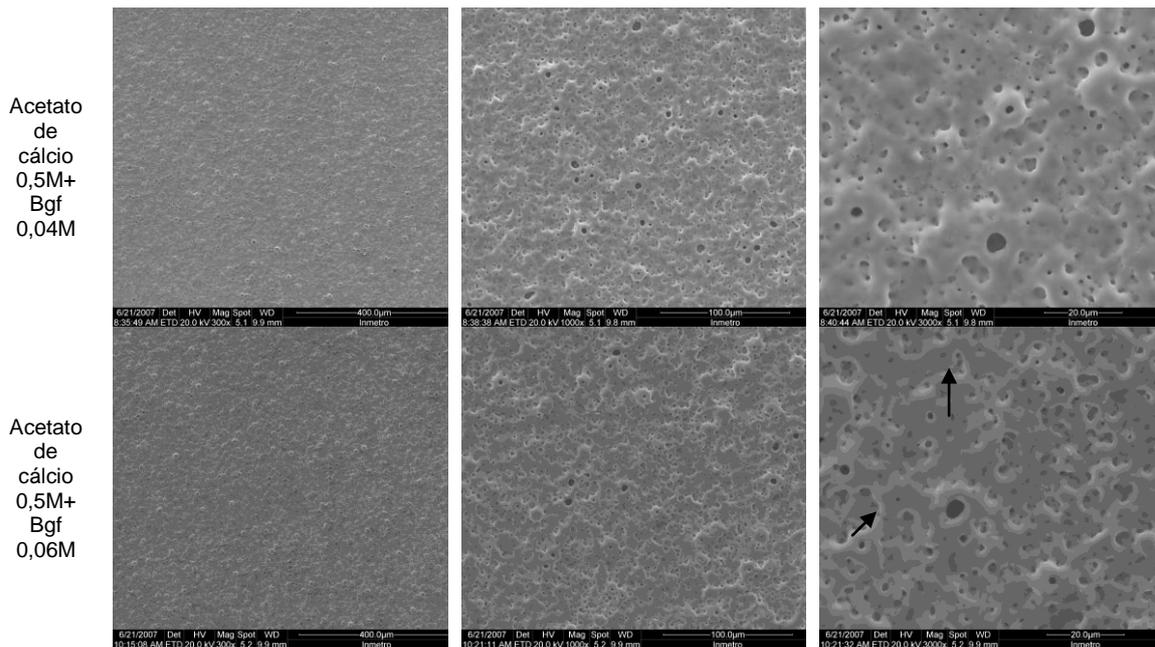


Fig. 4.18- Micrografias de MEV com magnificações de 300x, 1000x e 3000x para as superfícies obtidas com os diferentes eletrólitos no tempo de anodização de 30 segundos.

Nas micrografias da figura 4.19 observa-se as camadas de óxidos superficiais anodizadas com os eletrólitos: acetato de cálcio 0,5M, acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M, acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,04M e acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,06M, todos com período de anodização de 60 segundos. Todas as superfícies foram recobertas com a camada superficial de óxidos, como pode-se analisar pelas magnificações de 300x, onde não há presença de defeitos superficiais, nem tão pouco nas magnificações subseqüentes. A superfície que apresentou-se mais porosa, regular e homogênea, com presença de poros circulares e íntegros, foi a de eletrólito de acetato de cálcio 0,5M. Analisando as superfícies em que foi adicionado o betaglicerofosfato de sódio à solução eletrolítica nas concentrações 0,02M, 0,04M e 0,06M, podemos observar que as superfícies apresentam-se com menor número de poros, todas com microfaturas e muito heterogêneas. Conforme aumentou a concentração de betaglicerofosfato de sódio, o tamanho dos poros aumentou também, havendo um coalescimento dos poros, da mesma

forma a espessura dos filmes aumentou, como observado na figura 4.16. Isto deve-se aos efeitos dos íons de cálcio e fósforo no crescimento do filme de óxidos, que torna-os mais espessos e irregulares (ZHU, X. *et al.*,2001).

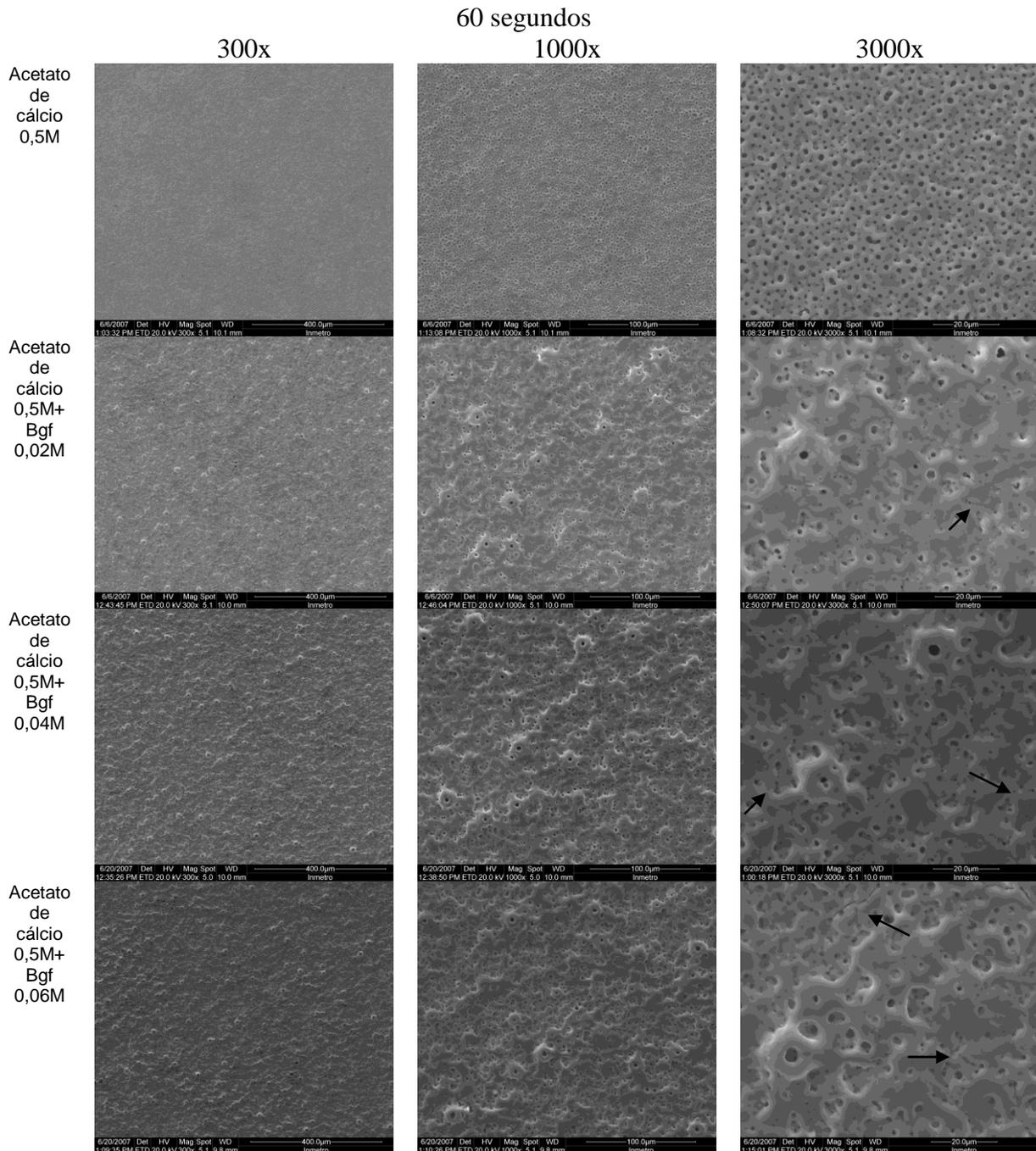


Fig. 4.19- Micrografias de MEV com magnificações de 300x, 1000x e 3000x para as superfícies obtidas com os diferentes eletrólitos no tempo de anodização de 60 segundos.

Com estas análises de MEV observa-se que o recobrimento obtido com eletrólito acetato de cálcio 0,5M puro foi o que se mostrou mais poroso e homogêneo em relação

aos demais quando realizada anodização em tempo de 60 segundos. O recobrimento de acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02 mostrou-se menos poroso e mais heterogêneo, com algumas microfraturas em sua superfície quando comparado ao de acetato de cálcio 0,5M puro. Da mesma forma aconteceu com os recobrimentos de betaglicerofosfato de sódio 0,04M e 0,06M. Neste último, as microfraturas são mais intensas e numerosas, o que não é uma boa característica para a finalidade do estudo em questão, que são recobrimentos porosos, homogêneos e sem qualquer tipo de microfraturas em suas superfícies, motivo pelo qual já foi citado anteriormente (ISHIZAWA & OGINO, 1995; ZHU, X. *et al*, 2001).

4.2.4 - Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS)

Nas tabelas 4.18 e 4.19 são apresentados os resultados de composição elementar (% atômico) dos filmes produzidos com eletrólitos de acetato de cálcio 0,5M e as misturas contendo acetato de cálcio 0,5M e betaglicerofosfato de sódio nas concentrações 0,02M, 0,04M e 0,06M, nos tempos de anodização de 30 e 60 segundos, respectivamente.

Tempo: 30 segundos

Com os resultados apresentados na tabela 4.18 observa-se que à medida que o betaglicerofosfato de sódio é adicionado à solução eletrolítica, os valores de cálcio e fósforo aumentam razoavelmente, o que tais incorporações de cálcio e fósforo ao filme podem facilitar e promover base para formação de fosfato de cálcio, que é a fase inorgânica do tecido ósseo, ajudando na biocompatibilidade do implante ao tecido ósseo (ZHU, X. *et al*, 2001). Vários estudos comprovam que a presença de íons de cálcio e fósforo incorporados ao filme de óxidos produzidos por oxidação anódica a microarco

facilita a osseointegração e biocompatibilidade dos implantes biomédicos, inclusive ajudando na resposta celular (ISHIZAWA & OGINO, 1995, WEN *et al.*, 1997, FINI *et al.*, 1999, SCHRECKENBACK *et al.*, 1999, ZHU *et al.*, 2001, ZHU *et al.*, 2003, LI *et al.*, 2004, HUANG *et al.*, 2005, CHEN 2005, GUÉHENNEC *et al.*, 2007). Na figura 4.20 estão representados graficamente os valores das concentrações atômicas dos elementos cálcio, fósforo, titânio e oxigênio de acordo com a concentração de betaglicerofosfato de sódio presente na solução eletrolítica, mostrando que os valores de cálcio são bem maiores que os dos demais elementos presentes nos recobrimentos. Na figura 4.21 estão representados apenas os valores das concentrações atômicas de cálcio e fósforo com relação às concentrações de betaglicerofosfato de sódio para facilitar a visualização e interpretação gráfica do leitor.

Tab. 4.18 - Valores de EDS para acetato de cálcio 0,5M e Bgf em diferentes concentrações, 30 segundos

| Conc. B-gf (At%) | | Cálcio | Fósforo | Titânio | Oxigênio |
|------------------|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 13 | 1 | 1,23 | 0,12 | 40,9 | 57,76 |
| | 2 | 1,11 | 0,11 | 41,88 | 56,89 |
| | 3 | 1,47 | 0,1 | 40,75 | 58,07 |
| | 4 | 1,47 | 0,06 | 40,14 | 58,32 |
| 14 | 1b | 1,96 | 0,12 | 40,32 | 57,6 |
| | 2b | 2,77 | 0,11 | 38,46 | 58,65 |
| | 3b | 2,93 | 0,08 | 37,12 | 59,86 |
| | 4b | 3,03 | 0,09 | 38,04 | 58,83 |
| 0 | média | 2,00 | 0,10 | 39,70 | 58,25 |
| 0 | desvio | 0,80 | 0,02 | 1,64 | 0,90 |
| 15 | 1 | 7,4 | 2,15 | 29,6 | 60,85 |
| | 2 | 7,49 | 2,18 | 30,17 | 60,16 |
| | 3 | 7,5 | 2,07 | 29,95 | 60,47 |
| | 4 | 7,29 | 2,22 | 30,35 | 60,14 |
| 16 | 1b | 7,45 | 2,22 | 30,36 | 59,98 |
| | 2b | 7,51 | 2,15 | 30,01 | 60,33 |
| | 3b | 7,25 | 2,15 | 29,65 | 60,96 |
| | 4b | 7,49 | 2,12 | 30,36 | 60,04 |
| 0,02 | média | 7,42 | 2,16 | 30,06 | 60,37 |
| 0,02 | desvio | 0,10 | 0,05 | 0,31 | 0,37 |
| Conc. B-gf (At%) | | Cálcio | Fósforo | Titânio | Oxigênio |
| 17 | 1 | 9,2 | 3,46 | 26,85 | 60,49 |
| | 2 | 9,38 | 3,58 | 27,27 | 59,77 |
| | 3 | 9,55 | 3,33 | 26,4 | 60,72 |
| | 4 | 9,38 | 3,58 | 27,2 | 59,85 |
| 18 | 1b | 9,29 | 3,54 | 26,79 | 60,37 |
| | 2b | 8,6 | 3,54 | 26,82 | 61,03 |

| | | | | | |
|-------------|---------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| | 3b | 8,83 | 3,46 | 27,15 | 60,55 |
| | 4b | 9,95 | 4,03 | 29,21 | 56,8 |
| 0,04 | média | 9,27 | 3,57 | 27,21 | 59,95 |
| 0,04 | desvio | 0,42 | 0,21 | 0,86 | 1,34 |
| | 1 | 9,89 | 4,59 | 24,71 | 60,8 |
| | 2 | 9,93 | 4,62 | 24,8 | 60,65 |
| 19 | 3 | 10,57 | 4,88 | 23,83 | 60,72 |
| | 4 | 9,95 | 4,58 | 24,48 | 60,99 |
| | 1b | 10,62 | 4,93 | 22,12 | 62,33 |
| | 2b | 10,81 | 4,8 | 24,03 | 60,36 |
| 20 | 3b | 10,96 | 4,66 | 24,2 | 60,17 |
| | 4b | 10,94 | 4,72 | 25,21 | 59,13 |
| 0,06 | média | 10,46 | 4,72 | 24,17 | 60,64 |
| 0,06 | desvio | 0,46 | 0,13 | 0,94 | 0,89 |

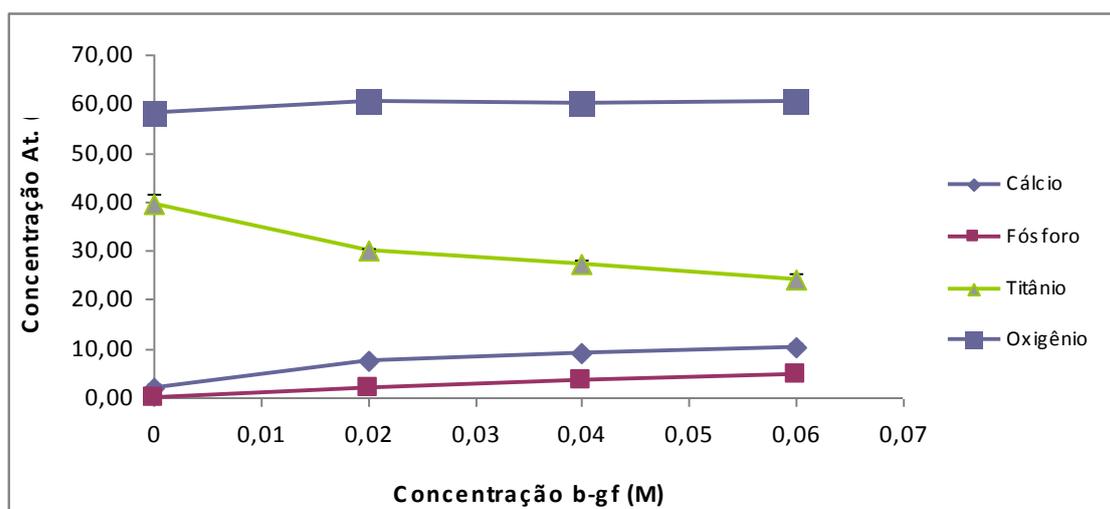


Fig. 4.20 - Gráfico de EDS das concentrações atômicas presentes nos diferentes eletrólitos de acetato de cálcio 0,5M e Bgf e suas concentrações em 30 segundos de anodização.

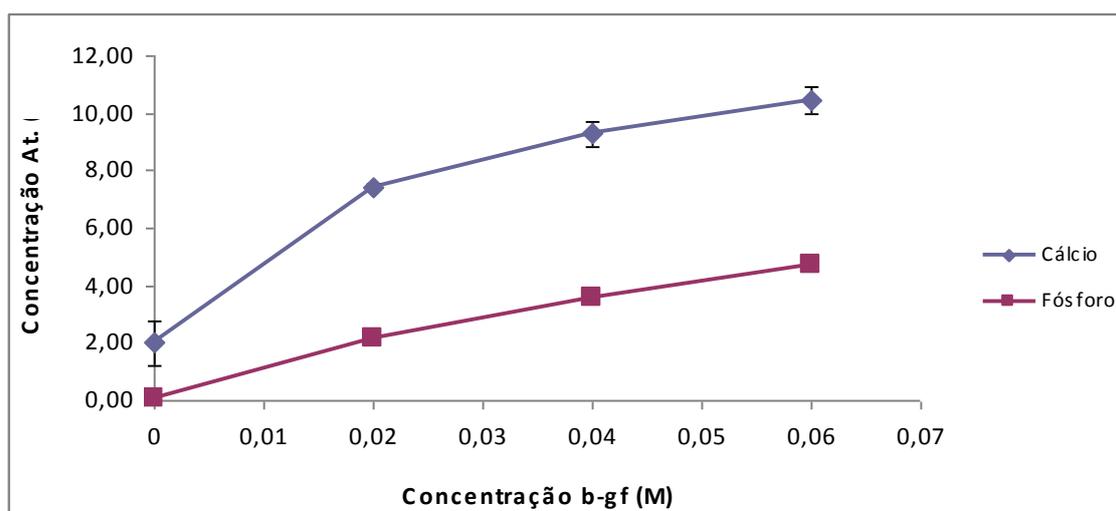


Fig. 4.21 - Comparativo entre valores de EDS das concentrações atômicas de cálcio e fósforo nas diferentes concentrações de Bgf em 30 segundos.

Tempo: 60 segundos

Nas tabela 4.19 são apresentados os valores das concentrações atômicas para os elementos cálcio, fósforo, titânio e oxigênio presentes nos recobrimentos realizados com eletrólitos de acetato de cálcio 0,5M e acetato de cálcio 0,5M adicionado 0,02, 0,04 e 0,06M de betaglicerofosfato de sódio, respectivamente, para o tempo de anodização de 60 segundos. Nas figuras 4.22 e 4.23 podemos observar que há um aumento significativo nas concentrações atômicas dos elementos cálcio e fósforo à medida que a concentração de betaglicerofosfato é aumentada. Isto significa dizer que o aumento da presença dos íons cálcio e fósforo nos recobrimentos realizados com betaglicerofosfato de sódio é diretamente proporcional ao aumento da concentração de betaglicerofosfato de sódio à solução eletrolítica, da mesma forma que na sessão anterior, porém aqui com valores mais altos, uma vez que a o tempo de anodização dobrou (ISHIZAWA, H., OGINO, M., 1995).

Tab. 4.19- Valores de EDS para Acetato de cálcio 0,5M e Bgf em diferentes concentrações, 60 segundos.

| Conc. B-gf (At%) | | Cálcio | Fósforo | Titânio | Oxigênio | |
|------------------|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------|
| | 1 | 4,13 | 0,12 | 36 | 59,75 | |
| | 2 | 4,57 | 0,24 | 35,02 | 60,17 | |
| | 5 | 3 | 4,19 | 0,12 | 35,51 | 60,18 |
| | | 4 | 4,81 | 0,05 | 34,84 | 60,3 |
| | 1b | 5,19 | 0,03 | 34,58 | 60,21 | |
| | 2b | 5,28 | 0 | 34,92 | 59,8 | |
| | 6 | 3b | 5,73 | 0,13 | 34,55 | 59,59 |
| | | 4b | 5,24 | 0,13 | 34,44 | 60,13 |
| 0 | média | 4,89 | 0,10 | 34,98 | 60,02 | |
| 0 | desvio | 0,57 | 0,08 | 0,53 | 0,26 | |
| Conc. B-gf (At%) | | Cálcio | Fósforo | Titânio | Oxigênio | |
| | 1 | 9,4 | 2,26 | 29,25 | 59,09 | |
| | 2 | 9,16 | 2,34 | 29,33 | 59,18 | |
| | 7 | 3 | 8,99 | 2,18 | 28,78 | 60,05 |
| | | 4 | 8,99 | 2,31 | 28,81 | 59,9 |
| | 1b | 8,75 | 2,23 | 28,25 | 60,77 | |
| | 2b | 8,9 | 2,24 | 27,43 | 61,43 | |
| | 8 | 3b | 9,29 | 2,4 | 28,62 | 59,69 |
| | | 4b | 9,24 | 2,31 | 28,39 | 60,06 |
| 0,02 | média | 9,09 | 2,28 | 28,61 | 60,02 | |
| 0,02 | desvio | 0,22 | 0,07 | 0,61 | 0,78 | |

| | | | | | |
|-------------|---------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| | 1 | 10,36 | 3,69 | 25,22 | 60,74 |
| | 2 | 10,97 | 3,58 | 25,2 | 60,24 |
| 9 | 3 | 10,19 | 3,46 | 26,45 | 59,9 |
| | 4 | 10,07 | 3,58 | 26,66 | 59,69 |
| | 1b | 10,64 | 3,68 | 24,69 | 60,99 |
| | 2b | 10,67 | 3,59 | 25,48 | 60,25 |
| 10 | 3b | 10,18 | 3,47 | 24,48 | 61,87 |
| | 4b | 10,08 | 3,67 | 25,28 | 60,97 |
| 0,04 | média | 10,40 | 3,59 | 25,43 | 60,58 |
| 0,04 | desvio | 0,33 | 0,09 | 0,77 | 0,71 |
| | 1 | 11,5 | 4,86 | 22,45 | 61,18 |
| | 2 | 11,9 | 4,89 | 22,17 | 61,04 |
| 11 | 3 | 10,99 | 5,03 | 23,3 | 60,67 |
| | 4 | 11,21 | 5,33 | 22,63 | 60,83 |
| | 1b | 11,12 | 4,85 | 22,81 | 61,22 |
| | 2b | 11,13 | 4,49 | 23,68 | 60,7 |
| 12 | 3b | 12,34 | 4,82 | 22,28 | 60,56 |
| | 4b | 11,43 | 4,84 | 22,7 | 61,03 |
| 0,06 | média | 11,45 | 4,89 | 22,75 | 60,90 |
| 0,06 | desvio | 0,46 | 0,23 | 0,51 | 0,25 |

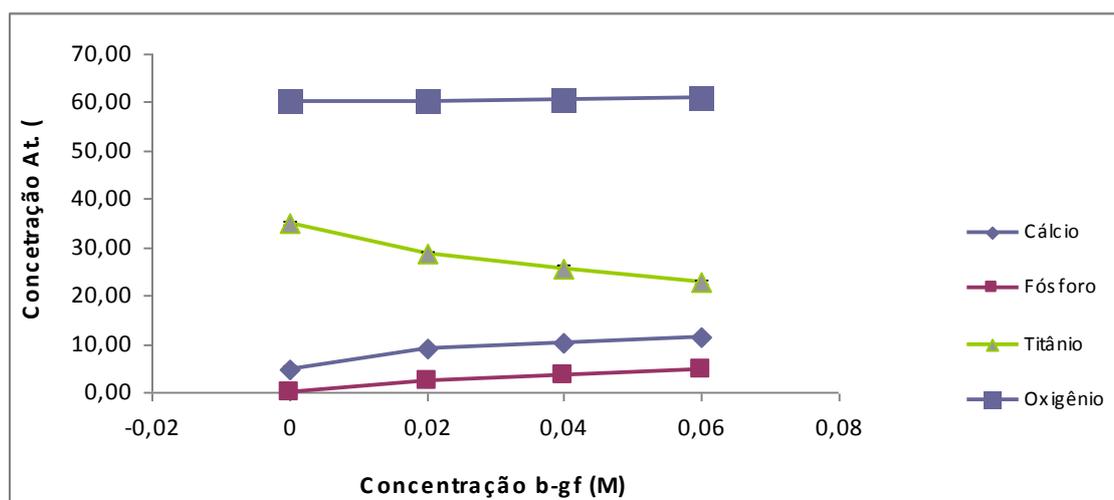


Fig. 4.22- Gráfico de EDS das concentrações atômicas presentes nos diferentes eletrólitos de Acetato de cálcio 0,5M e Bgf e suas concentrações em 60 segundos de anodização.

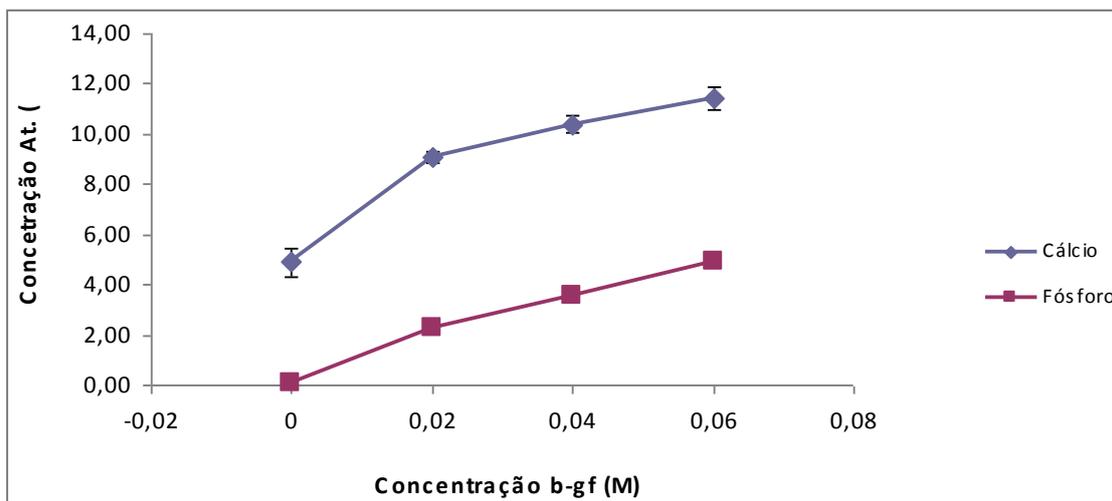


Fig. 4.23- Comparativo entre valores de EDS das concentrações atômicas de cálcio e fósforo nas diferentes concentrações de Bgf em 60 segundos.

Na figura 4.24 é apresentado um gráfico comparativo dos valores de EDS para os elementos cálcio e fósforo encontrados nos filmes produzidos nos diferentes períodos de anodização de 30 e 60 segundos. Observa-se que a tendência é de aumentar tais elementos de acordo com o aumento da concentração de betaglicerofosfato de sódio, para ambos os períodos de anodização.

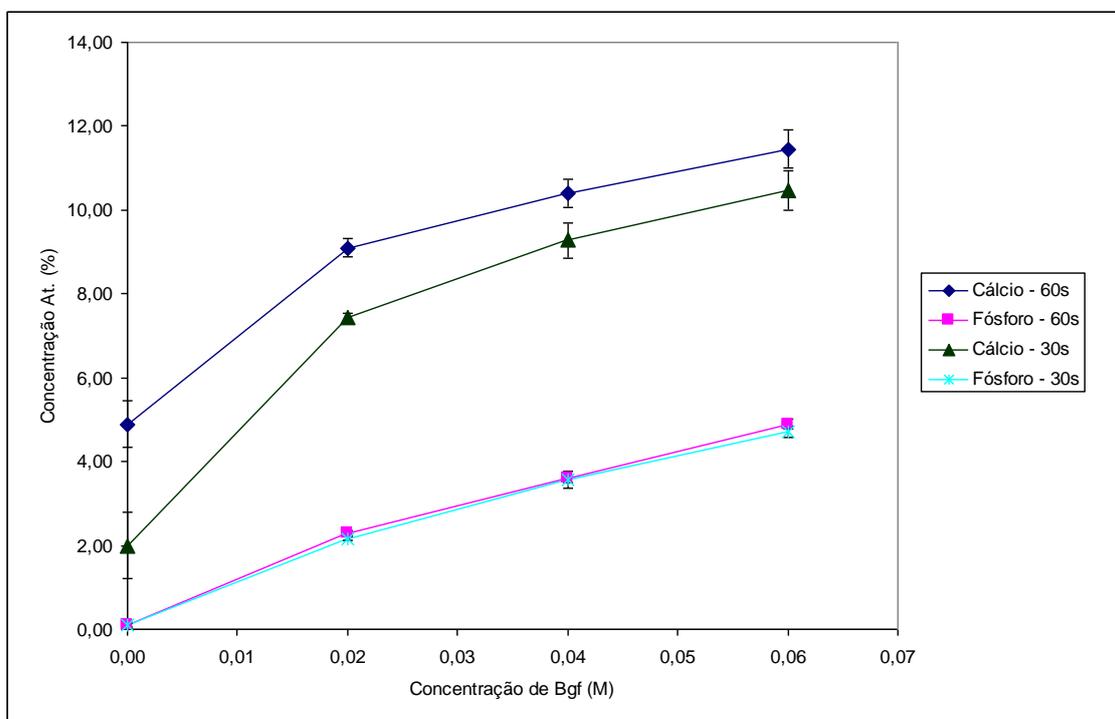


Fig. 4.24- Gráfico comparativo de EDS para concentrações atômicas de cálcio e fósforo em 30 e 60 segundos nas diferentes concentrações de betaglicerofosfato de sódio.

4.2.5 - Difração de Raios X (DRX)

Tempo: 30 segundos

Na figura 4.25 são apresentados difratogramas dos recobrimentos realizados com eletrólitos de acetato de cálcio 0,5M (c) e com acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M (d). Em ambos os difratogramas estão presentes: anatásio, rutilo e titânio, sendo que o rutilo aparece de forma mais discreta que o anatásio e o titânio. Isto é observado pela maior intensidade dos picos de anatásio em relação ao pico de rutilo.

Acetato de cálcio 0,5M e Acetato de cálcio + Bgf 0,02M

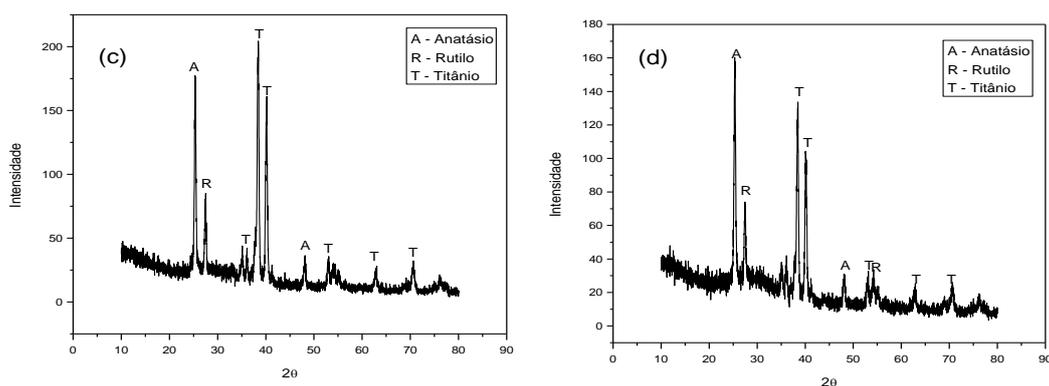


Fig. 4.25- Difratogramas dos recobrimentos de óxido de titânio obtidos com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M (c) e do acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M (d) em 30 segundos.

Na figura 4.26 são apresentados difratogramas dos recobrimentos realizados com eletrólitos de acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,04M (e) e com acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,06M (f). Em ambos os difratogramas estão presentes : anatásio, rutilo e titânio

Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,04M e Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,06M

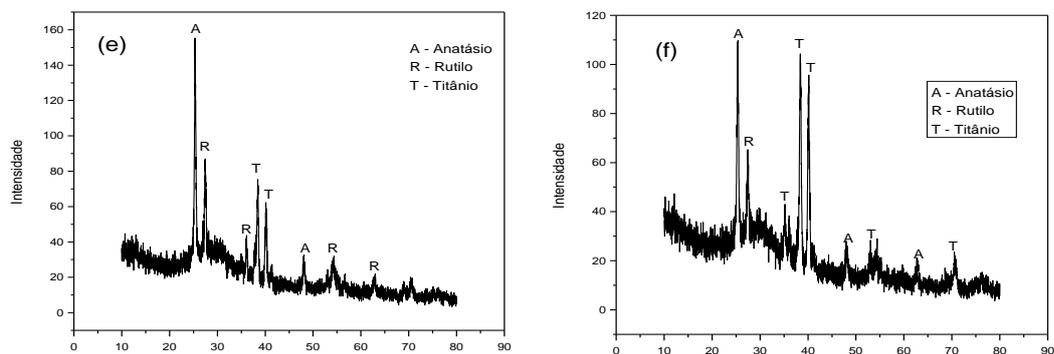


Fig. 4.26- Difrato²grama do recobrimento de óxido de titânio com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M+ Bgf 0,04M (e) e do acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,06M (f) em 30 segundos.

Tempo: 60 segundos

Acetato de cálcio 0,5M e Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M

Através dos difratogramas de Raio X dos recobrimentos de óxido de titânio com eletrólitos de acetato de cálcio 0,5M e acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M em 60 segundos apresentados na figura 4.27, podemos observar que estão presentes: o anatásio, o rutilo e o titânio, em proporções parecidas. Em comparação com os recobrimentos realizados com os mesmos eletrólitos, porém com tempo de anodização de 30 segundos observa-se que o recobrimento de acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M apresenta pico de rutilo bem mais intenso que o de anatásio para o período de 60 segundos, conforme observa-se na figura 4.25 (d).

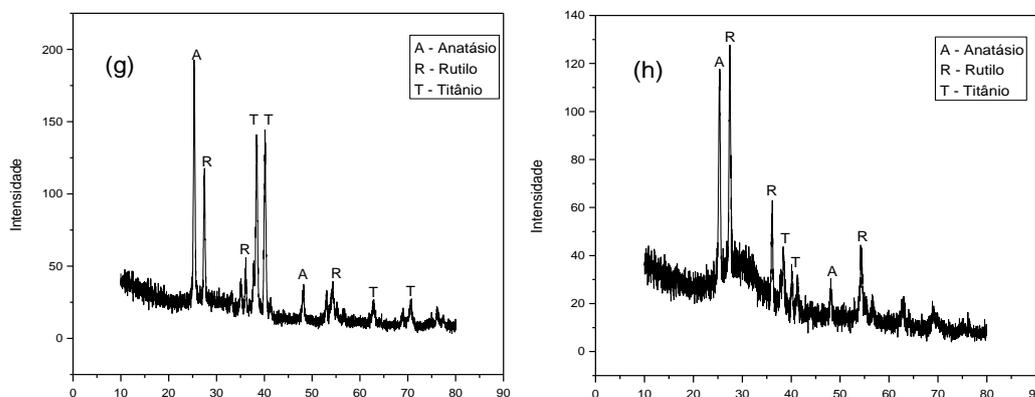


Fig. 4.27- Difrato²grama do recobrimento de óxido de titânio com eletrólito de Acetato de cálcio 0,5M (g) e Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M (h) em 60 segundos.

Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,04M e Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,06M

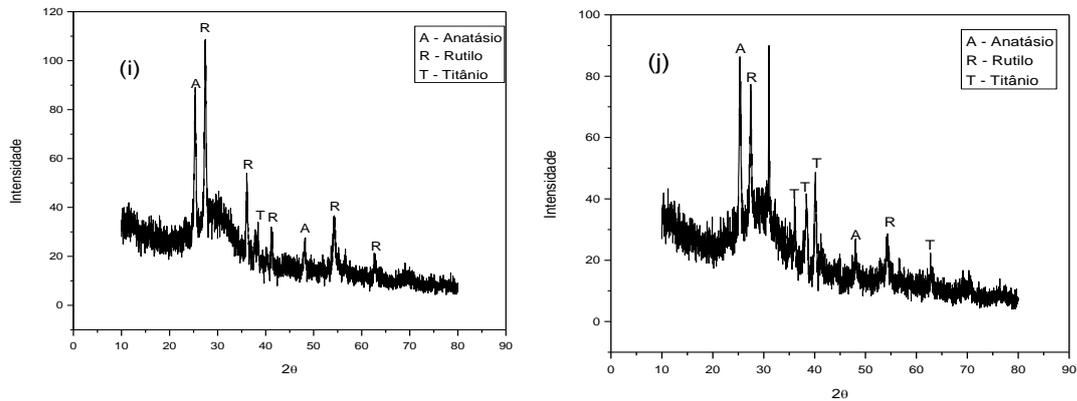


Fig. 4.28 - Difratoograma do recobrimento de óxido de titânio com eletrólito de Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,04M (i) e Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,06M (j) em 60 segundos.

Da mesma forma que os demais recobrimentos realizados com acetato de cálcio 0,5M adicionados com betaglicerofosfato de sódio, no difratogramas da figura 4.28 observa-se a presença de: anatásio, rutilo e titânio, também em proporções parecidas. Comparando com os recobrimentos realizados com os mesmos eletrólitos, porém com 30 segundos de anodização, apresentados na figura 4.26, observa-se que os picos de rutilo tornam-se mais intensos em período de anodização de 60 segundos.

4.3 - Acetato de cálcio 0,5M e mistura Acetato de cálcio 0,5M e betaglicerofosfato de sódio 0,02M a 150V – Efeito do tempo (05, 15, 30, 45 e 60 segundos)

Nesses ensaios foram produzidas amostras com eletrólitos de acetato de cálcio 0,5M puro e mistura acetato de cálcio 0,5M e betaglicerofosfato de sódio 0,02M. Esta etapa teve como objetivo avaliar a influência da composição do eletrólito e tempo de anodização topografia e composição dos recobrimentos. Os tempos escolhidos foram: 05, 15, 30, 45 e 60 segundos.

4.3.1 – Rugosidade

Acetato de cálcio 0,5M

Na tabela 4.20 são apresentados os valores da rugosidade das amostras anodizadas com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M em diferentes tempos de anodização, com as médias dos valores e seus desvios padrões.

O que podemos observar na tabela 4.20, assim como na figura 4.29, os valores obtidos destas amostras é que apesar de no tempo de 05 segundos termos valores altos de rugosidade, isto não corresponde à realidade da camada superficial de óxidos, mas sim um resultado da pré-anodização realizada, o que de certa forma, ataca a superfície do substrato de titânio unido ao curto período de anodização, o que impossibilita que a superfície seja toda recoberta por óxidos, nos mostrando valores altos de rugosidade para um período de tempo tão curto, como é o de 05 segundos (TAKEUCHI *et al*, 2003). Para os demais tempos de anodização, a rugosidade permaneceu estável, sem alterações para os diferentes tempos de anodização, indicando que o tempo, neste caso,

não influencia grandemente na rugosidade da camada superficial de óxidos quando utilizado eletrólito de acetato de cálcio 0,5M.

Tab. 4.20-Valores de rugosidade para os recobrimentos realizados com acetato de cálcio 0,5M nos diferentes tempos de anodização. Valores expressos em nanômetros.

| Tempo | 1 | 2 | 3 | Média | Desvio padrão |
|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| 5 | 801,4 | 846,5 | 872,9 | 599,4 | 265,1 |
| 5 | 346,1 | 349,8 | 379,9 | | |
| 15 | 331,8 | 344,6 | 339,2 | 339,5 | 10,9 |
| 15 | 331,4 | 331,0 | 358,7 | | |
| 30 | 331,9 | 300,4 | 305,0 | 337,1 | 25,1 |
| 30 | 320,2 | 366,3 | 303,5 | | |
| 45 | 343,3 | 356,2 | 385,7 | 327,9 | 51,6 |
| 45 | 256,4 | 271,7 | 353,9 | | |
| 60 | 333,6 | 362,9 | 311,9 | 336,8 | 17,3 |
| 60 | 345,7 | 339,5 | 326,9 | | |

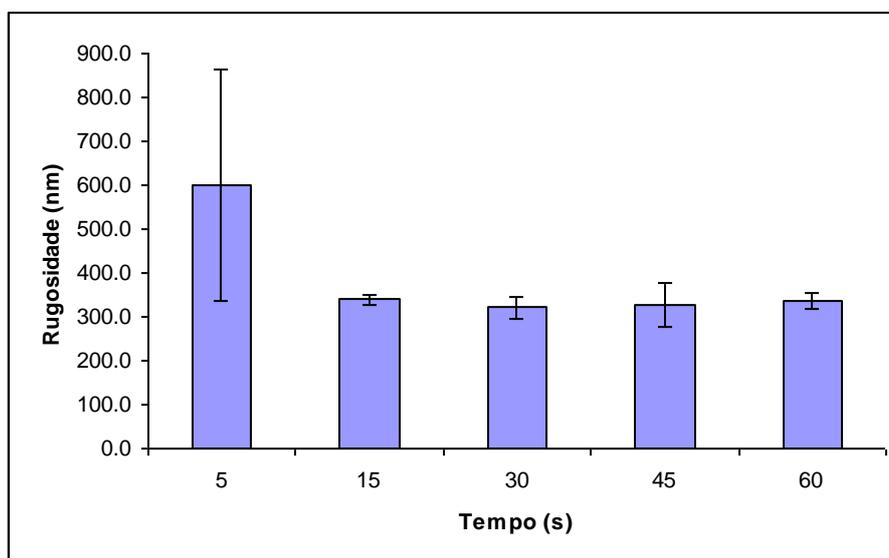


Fig. 4.29- Gráfico para as médias de rugosidade dos recobrimentos de acetato de cálcio 0,5M nos diferentes tempos de anodização.

Acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M

Na tabela 4.21 são apresentados os valores da rugosidade das amostras anodizadas com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M em diferentes tempos de anodização, com as médias dos valores e seus desvios padrões.

Na tabela 4.21 podemos observar que com o eletrólito de acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M em tempos diferentes, há um aumento na rugosidade da camada superficial de óxidos à medida que vamos aumentando o tempo de

anodização. Da mesma forma que quando utilizado acetato de cálcio 0,5M puro em 05 segundos, há uma rugosidade alta, pois é um período de anodização muito curto para recobrir a superfície toda, tornando-a altamente heterogênea e rugosa (TAKEUCHI *et al.*, 2003). Conforme representado na figura 4.30, observamos que para os outros períodos de anodização quando é adicionado 0,02M de betaglicerofosfato de sódio à solução eletrolítica, há um aumento razoável na rugosidade da camada superficial de óxidos, igualmente observado por ZHU *et al.* (2001), ISHIZAWA & OGINO (2003), LIU *et al.*(2004), dentre outros citados anteriormente.

Tab. 4.21-Valores de rugosidade para os recobrimentos realizados com acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M nos diferentes tempos de anodização. Valores expressos em nanômetros.

| Tempo | 1 | 2 | 3 | Média | Desvio padrão |
|--------------|----------|----------|----------|--------------|----------------------|
| 5 | 314,5 | 342,8 | 346,8 | 415,7 | 93,3 |
| 5 | 473,7 | 545,5 | 470,7 | | |
| 15 | 386,6 | 451,6 | 388,2 | 376,6 | 43,1 |
| 15 | 352,8 | 329,7 | 350,7 | | |
| 30 | 516,9 | 459,7 | 477,6 | 473,1 | 27,3 |
| 30 | 483,3 | 465,9 | 435,0 | | |
| 45 | 643,4 | 615,7 | 584,9 | 608,5 | 24,6 |
| 45 | 576,1 | 620,4 | 610,2 | | |
| 60 | 575,0 | 602,3 | 542,6 | 644,9 | 113,3 |
| 60 | 733,9 | 832,5 | 582,8 | | |

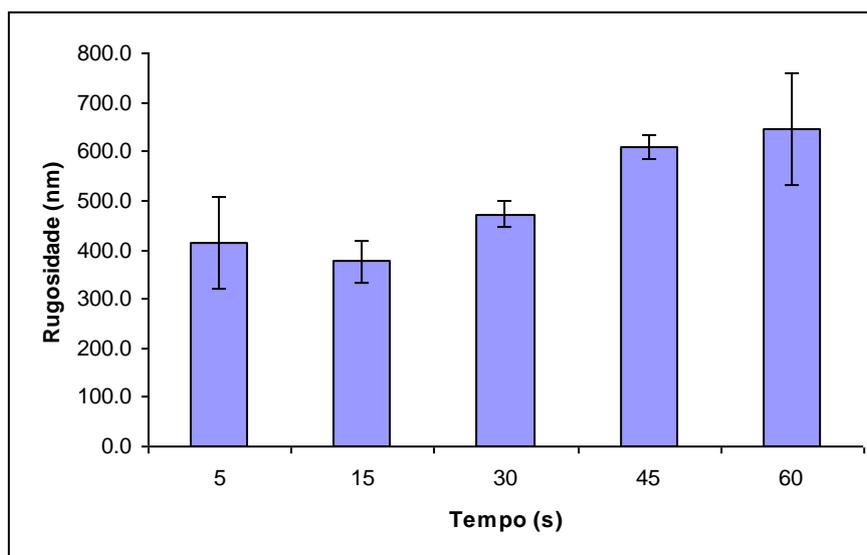


Fig. 4.30- Gráfico para as médias de rugosidade dos recobrimentos de acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M nos diferentes tempos de anodização.

Na tabela 4.22 são comparados os valores médios de rugosidade e seus desvios padrões dos recobrimentos realizados com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M puro com acetato de cálcio 0,5M adicionado 0,02M de betaglicerofosfato de sódio nos diferentes tempos de anodização. Quando confrontamos os eletrólitos acetato de cálcio 0,5M com acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M observamos que a rugosidade é maior em tempos iguais naquelas amostras que são realizadas com acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M. Na figura 4.31 está apresentado graficamente tais valores de rugosidade para ambos eletrólitos, confirmando que a adição de betaglicerofosfato de sódio à solução eletrolítica também colabora para o aumento da rugosidade da camada superficial de óxidos.

Tab. 4.22- Valores de rugosidade média e desvio padrão para acetato de cálcio 0,5M e acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M nos diferentes tempos de anodização

| Acetato de Cálcio 0,5M | | | | | |
|------------------------|------|------|------|------|------|
| Tempo (s) | 5 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| Médias (Å) | 5994 | 3395 | 3371 | 3279 | 3368 |
| Desvios (Å) | 2651 | 109 | 251 | 516 | 173 |

| Acetato de Cálcio 0,5M + BGF 0,02M | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------|------|------|
| Tempo (s) | 5 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| Médias (Å) | 4157 | 3766 | 4731 | 6085 | 6449 |
| Desvios (Å) | 933 | 431 | 273 | 246 | 1133 |

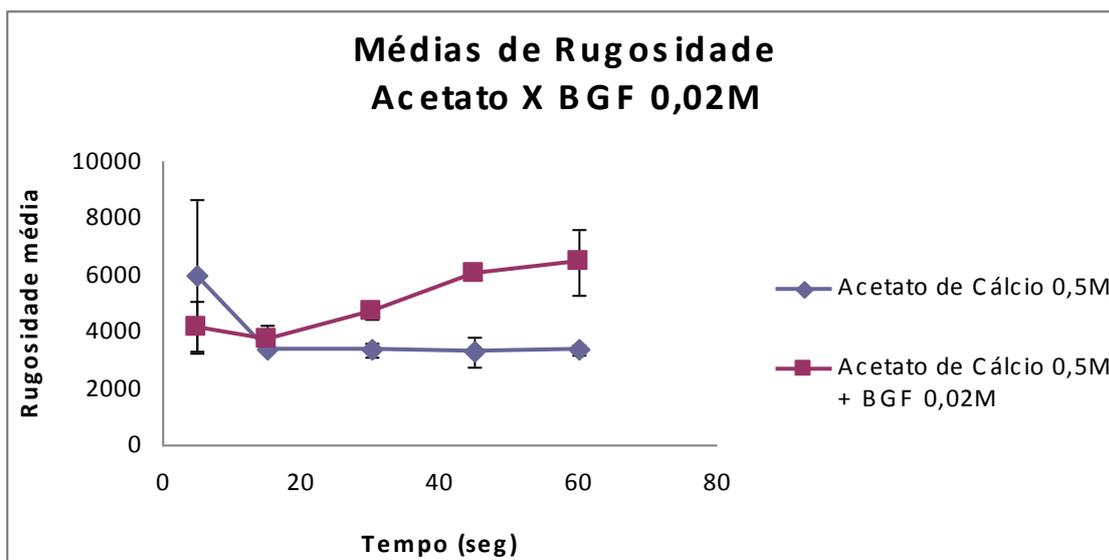


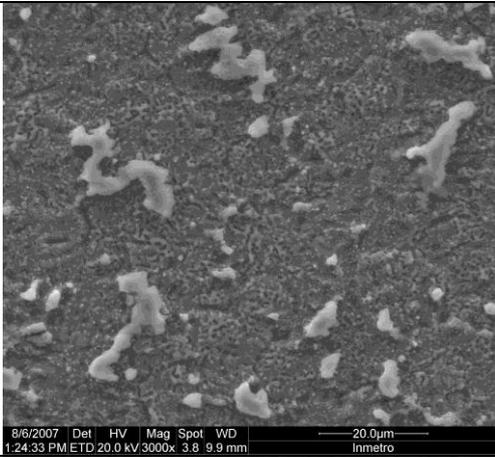
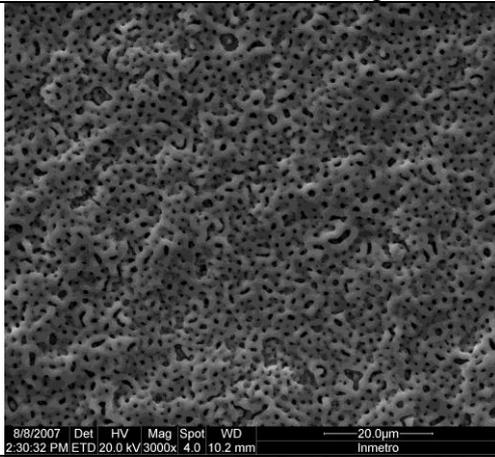
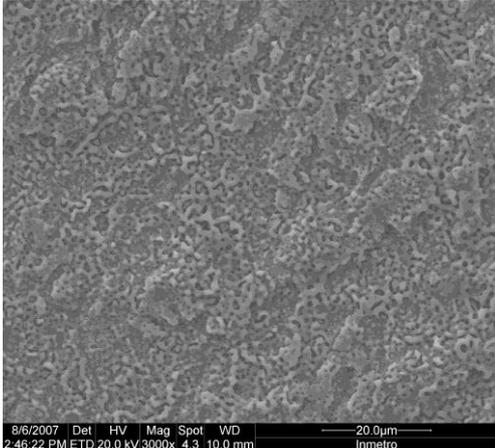
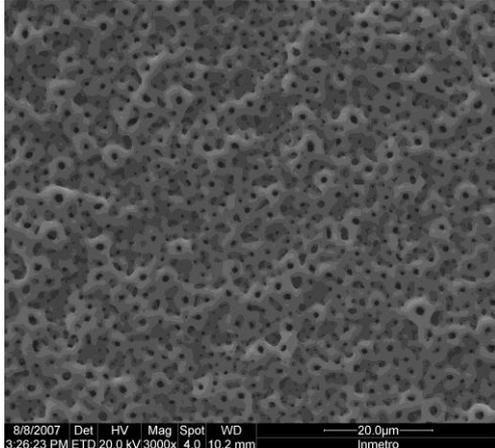
Fig. 4.31- Gráfico comparativo das médias de rugosidade para cetato de cálcio 0,5M e acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M nos diferentes tempos de anodização

4.3.2- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A seguir, na figura 4.32 são apresentadas imagens de MEV dos recobrimentos realizados com eletrólitos de acetato de cálcio 0,5M e acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M nos tempos de anodização de 05, 15, 30, 45 e 60 segundos, respectivamente. Com estas análises podemos observar como os recobrimentos se comportam frente aos diferentes tempos para cada tipo de eletrólito.

No período de 05 segundos de anodização observa-se que com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M a superfície apresenta-se pobremente recoberta, confirmando os altos valores de rugosidade analisados na sessão anterior para tal eletrólito. Com o eletrólito adicionado betaglicerofosfato de sódio 0,02M observa-se que a superfície apresenta-se recoberta, porém de distribuição bastante heterogênea e forma topográfica porosa. Para o período de anodização de 15 segundos no eletrólito abetato de cálcio 0,5M a superfície toda recoberta, porém de forma heterogênea, muito irregular e com presença de defeitos. Com o eletrólito adicionado betaglicerofosfato de sódio 0,02M observa-se uma superfície regular, rica em poros com suas formas circulares, sem defeitos ou microfraturas e de distribuição homogênea pela superfície. Em 30 segundos de anodização, para o acetato de cálcio 0,5M temos uma superfície totalmente recoberta, porém ainda irregular, heterogênea e com poros muito pequenos. Para o eletrólito adicionado betaglicerofosfato de sódio 0,02M, a superfície torna-se menos porosa e com tamanhos de poros maiores que os apresentados em 15 segundos, parecendo que há um coalescimento dos poros, confirmando os valores de espessura obtidos para esta condição observados na sessão 4.2. Em 45 segundos para o eletrólito acetato de cálcio 0,5M a superfície apresentou-se com muito porosa, recobrimento com distribuição homogênea pela superfície e de forma regular. Para o betaglicerofosfato de sódio 0,02M, poros com tamanhos bem maiores, começaram a aparecer microfraturas na

superfície, conforme indicado pelas setas, inviabilizando esse condição para a realização de recobrimentos para implantes biomédicos (ZHU, X., *et al.*, 2001). Em 60 segundos quando utilizado eletrólito acetato de cálcio 0,5M, observa-se grande porosidade, com poros de tamanhos regulares, recobrimento com distribuição pela superfície de forma homogênea. Esta condição mostra de forma próxima do ideal, uma vez que o recobrimento apresenta-se poroso e de forma homogênea sobre a superfície (GUÉHENNEC, L.L., *et al*, 2007). Para o eletrólito adicionado betaglicerofosfato de sódio 0,02M, o recobrimento apresentou-se em sua morfologia topográfica com inúmeras microfraturas, conforme indicado pelas setas, poucos poros, porém grandes, desta forma tal condição torna-se inviável para utilização como recobrimentos de superfícies de implantes odontológicos e ortopédicos (GUÉHENNEC, L.L., *et al*, 2007).

| | Acetato de cálcio 0,5M | Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M |
|--------|---|--|
| 05 seg |  |  |
| 15 seg |  |  |

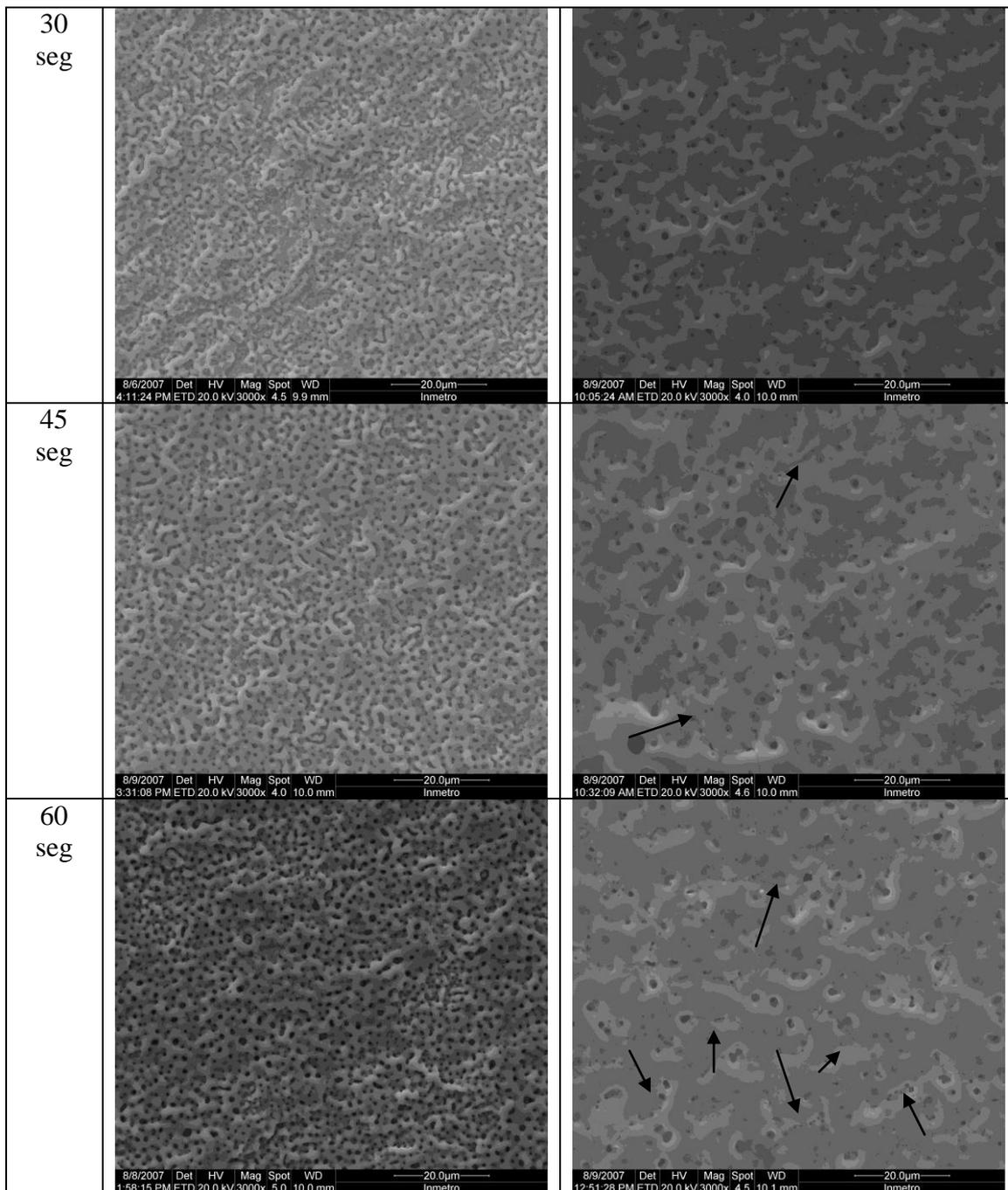


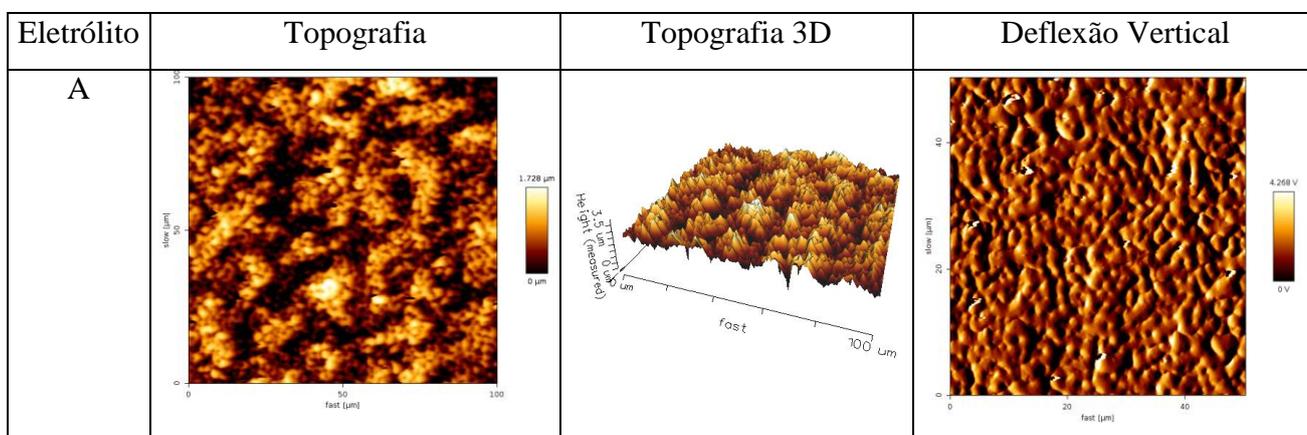
Fig. 4.32- Micrografias dos recobrimentos com eletrólitos acetato de cálcio 0,5M e acetato de cálcio + betaglicerofosfato de sódio 0,02M nos períodos de anodização 05, 15, 30, 45 e 60 segundos.

De acordo com tais análises, as condições que apresentaram mais favoráveis para utilização de recobrimentos de superfícies de implantes biomédicos foram a de acetato de cálcio 0,5M, 60 segundos e acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M, 15 a 30 segundos, portanto para realização dos nossos testes de atividade celular foi selecionado o período de 20 segundos, conforme veremos na sessão a seguir.

4.4 – Análises de AFM (Microscopia de Força Atômica)

A seguir, na figura 4.33 são apresentados resultados e imagens de análise de microscopia de força atômica realizados para os recobrimentos produzidos com os eletrólitos e condições selecionados para a avaliação da atividade celular.

A figura 4.33 mostra as características topográficas dos recobrimentos realizados em diferentes condições de anodização. A topografia referente ao recobrimento realizado com eletrólito A apresentou homogeneidade na distribuição de poros, porém com tamanhos menores quando comparados aos recobrimentos realizados com eletrólitos B e C, em que houve a adição de betaglicerofosfato de sódio nas concentrações de 0,02 e 0,06M, respectivamente. Nestas condições, o aumento da concentração de betaglicerofosfato de sódio resultou em poros de tamanhos maiores e, conseqüentemente, na diminuição do número dos mesmos. Além disso, para uma maior concentração, como é o caso do eletrólito C, pode-se observar um acentuado aumento da altura topográfica, sugerindo a acentuação dos canais de descarga, tornando o recobrimento mais heterogêneo que os demais. Para o eletrólito D, observa-se homogeneidade na distribuição de poros, porém não tão homogêneo como no eletrólito A, acentuado número de poros com tamanhos menores que os dos eletrólitos B e C.



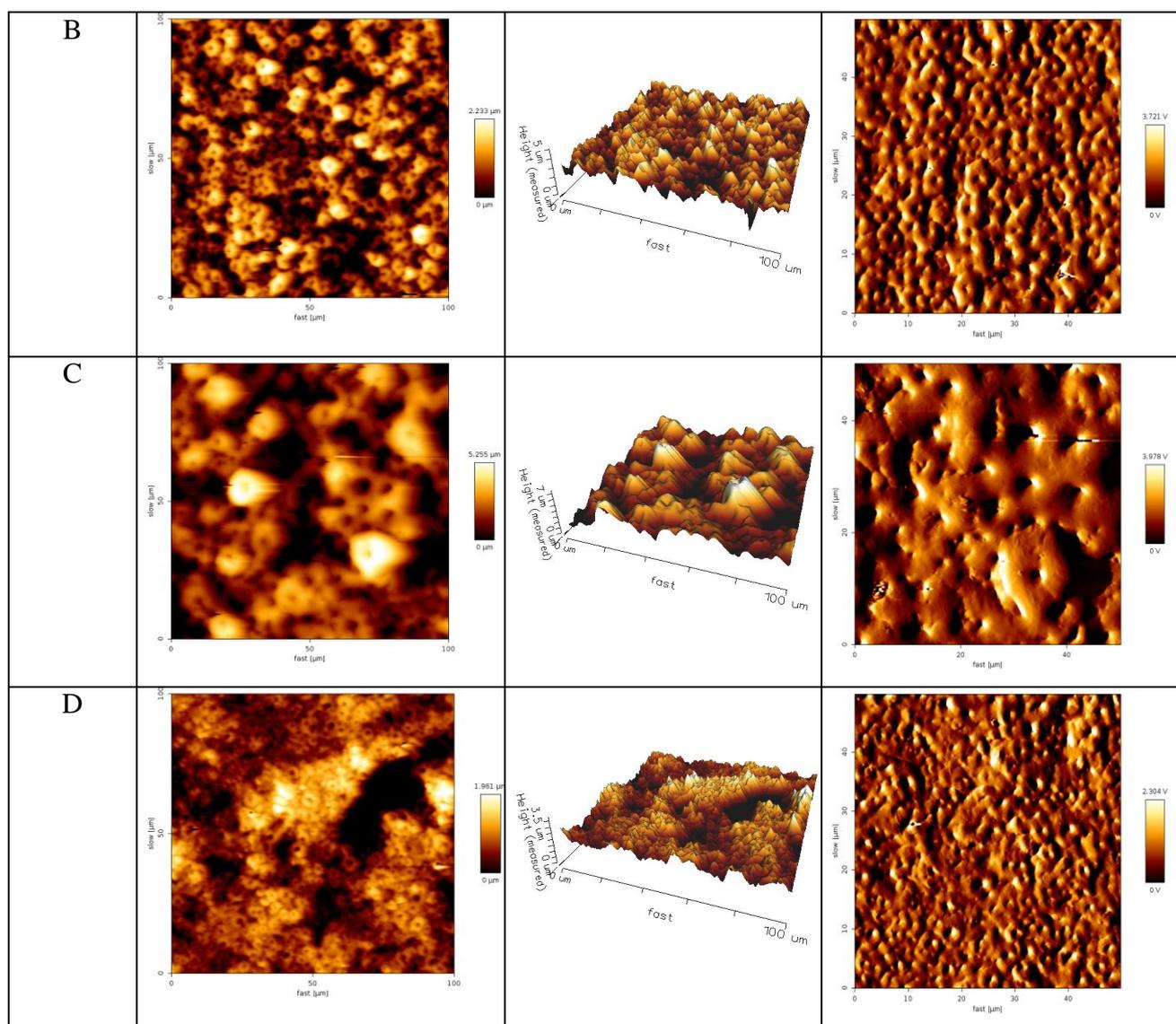


Fig.4.33-Imagens de AFM dos recobrimentos em diferentes eletrólitos: (A) acetato de cálcio 0,5 M, 60 segundos, 150V; (B) acetato de cálcio 0,5 M + β glicerofosfato de sódio 0,02M 20segundos, 150 V; (C) acetato de cálcio 0,5 M + β glicerofosfato de sódio 0,06M 20segundos, 150 V; (D) fosfato de sódio 0,1M, 60segundos,100V

Na tabela 4.23 são apresentados os valores de rugosidade dos recobrimentos obtidos pelas técnicas de análise por microscopia de força atômica (AFM) e por perfilometria. Observa-se que para o eletrólito de acetato de cálcio 0,5M a diferença de valores de rugosidade entre as técnicas foi bem pequena em comparação com as demais amostras, que também não houve diferenças muito grandes entre si. Com estes valores, confirmamos mais uma vez que os recobrimentos realizados com eletrólito de acetato de

cálcio + betaglicerofosfato de sódio 0,06M foram os que apresentaram maior rugosidade, tanto para técnica de AFM quanto para a de perfilometria.

Tab. 4.23- Tabela comparativa dos valores de rugosidade obtidos por análise de AFM e por perfilometria para amostras realizadas com diferentes eletrólitos em diferentes condições. Valores expressos em Ângstrons (Å).

| Amostras | Perfilometria | AFM |
|----------------------------|----------------------|------------|
| Acetato de cálcio 0,5M 60s | 2779Å | 2557Å |
| Acetato 0,5M+Bgf 0,02M 20s | 4793Å | 3245Å |
| Acetato 0,5M+Bgf 0,06M 20s | 8759Å | 10240Å |
| Fosfato de sódio 0,1M 60s | 2279Å | 3829Å |

4.5 –Difração de Raios X

Foram realizadas medidas de difração de raios x das amostras estudadas. Os espectros de difração obtidos foram ajustados pelo método de Rietveld (RIETVELD, H.M., 1969) com a finalidade de quantificar os percentuais relativos das fases cristalinas presentes nas amostras. As amostras selecionadas para avaliação celular foram: acetato de cálcio 0,5M – 60 segundos – 150 V; acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M – 20 segundos – 150 V; acetato de cálcio 0,5M + betaglicerofosfato de sódio 0,06M – 20 segundos – 150 V; fosfato de sódio 0,1M – 60 segundos – 100V. A seguir, são apresentados os espectros de raios x das superfícies analisadas.

Acetato de cálcio 0,5M – 60 segundos – 150 V

Na figura 4.34 estão apresentados o espectro de difração de raios x experimental (linha preta) da superfície em que foi realizada oxidação e o espectro de difração teórico (linha vermelha, ajuste pelo método de Rietveld). Três fases cristalinas, a saber, anatásio, rutilo e titânio que geram o espectro teórico estão identificados no espectro de difração pelas linhas coloridas (ruído de fundo é subtraído). Seus teores são: 47(1)% - anatásio; 38(1)% - rutilo; 15(1)% - titânio. A última fase provém do substrato provado por raios x junto com a camada estudada de dióxido de titânio.

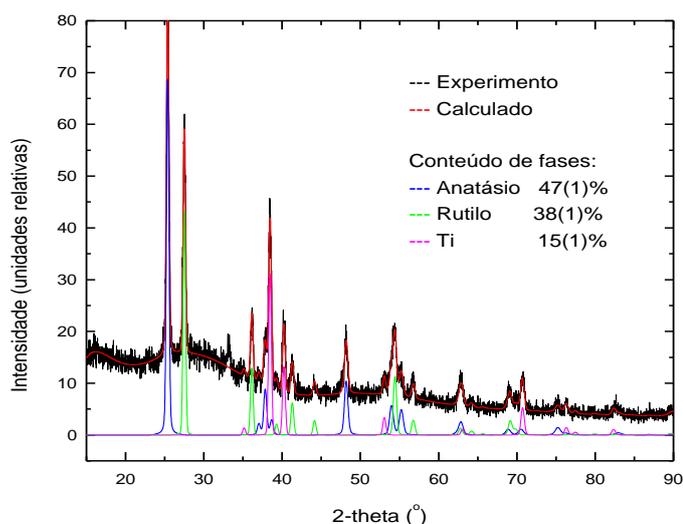


Fig. 4.34- Espectro de difração de raios x da superfície em que foi realizada oxidação anódica a microarco com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M – 60 segundos – 150V. O ajuste do espectro experimental pelo método de Rietveld (linhas coloridas) é usado para quantificar o teor relativo das fases cristalinas presentes na amostra (vide detalhes no texto).

Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M – 20 segundos – 150V

Figura 4.35 mostra o espectro de difração de raios x experimental da superfície da amostra junto com o ajuste respectivo pelo método de Rietveld. Observa-se a presença das fases anatásio, rutilo e titânio. Seus percentuais são 74(2)% de anatásio, 23(2)% de rutilo e 3(2)% de titânio.

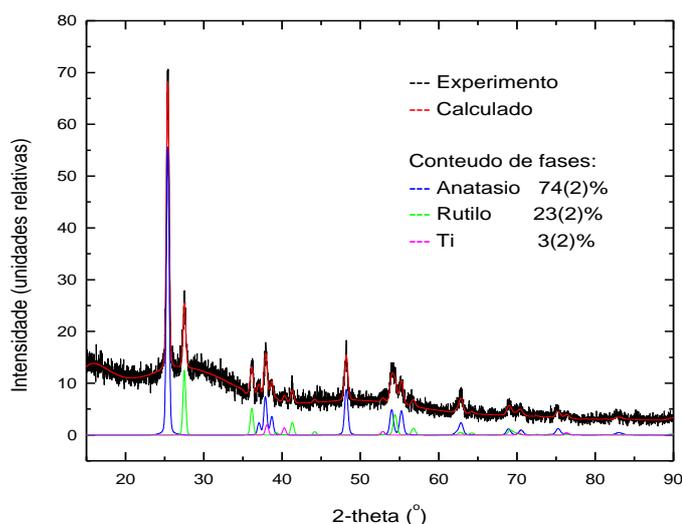


Fig. 4.35- Espectro de difração de raios x experimental (linha preta) da amostra em que foi realizada oxidação anódica a microarco com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M – 20 segundos – 150V. O espectro teórico (linha vermelha) é composto pela sobreposição dos espectros provenientes das fases anatásio (linha azul), rutilo (linha verde) e titânio (linha rosa).

Acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,06M – 20 segundos – 150V

O espectro de difração de raios x experimental da figura 4.36 revelou a presença das fases anatásio e rutilo em proporção de 71(2)% de anatásio e 29(2)% de rutilo. A fase titânio observada nos espectros anteriores não está presente, indicando que o filme de dióxido de titânio sintetizado nesta amostra é mais espesso que os anteriores de forma que os raios x não alcancaram o substrato.

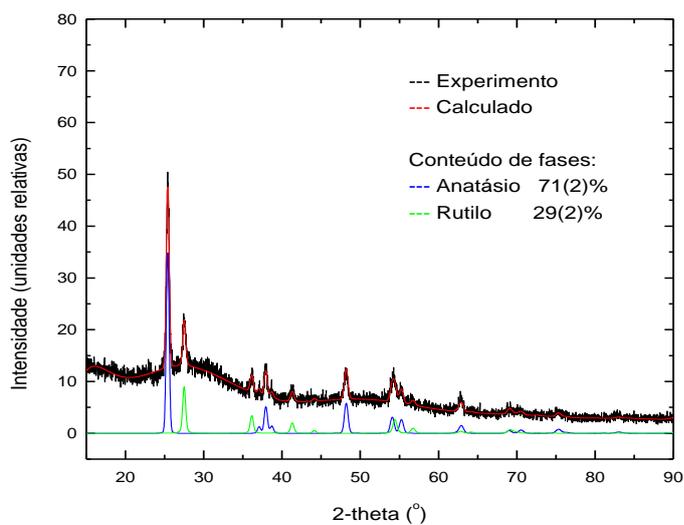


Fig. 4.36- Espectro de difração de raios x experimental (linha preta) da amostra em que foi realizada oxidação anódica a microarco com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,06M – 20 segundos – 150V. O espectro teórico (linha vermelha) é composto pelos espectros provenientes do anatásio (linha azul) e do rutilo (linha verde).

Fosfato de sódio 0,1M – 60 segundos - 100V

A oxidação anódica a microarco com eletrólito de fosfato de sódio leva à formação de uma só fase de dióxido de titânio, anatásio, como se pode conferir no espectro de raios x experimental da figura 4.37. A fase titânio observada no espectro é originada pelo substrato.

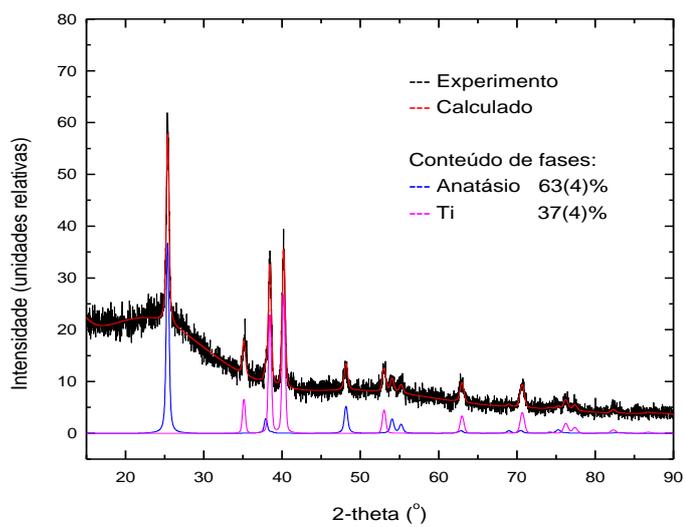


Fig. 4.37- Espectro de difração de raios x experimental (linha preta) da amostra em que foi realizada oxidação anódica a microarco com eletrólito de fosfato de sódio 0,1M – 60 segundos – 100V. O espectro teórico (linha vermelha) é composto pelos picos de difração do anatásio (linha azul) e do titânio (linha rosa)

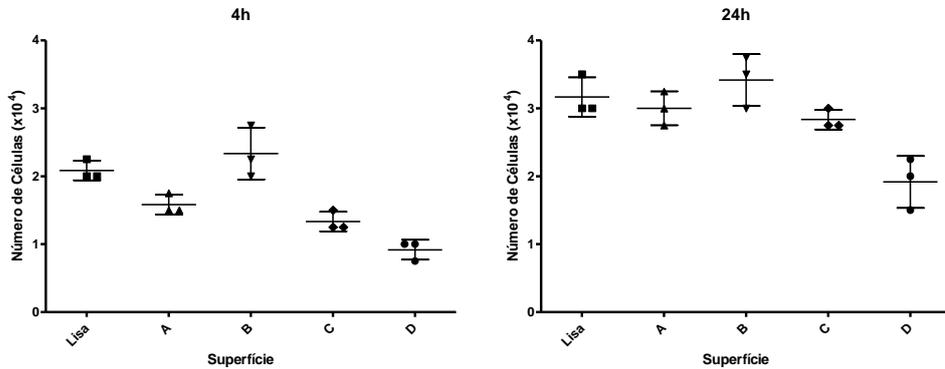
4.6 – Atividade Celular

Para os ensaios de atividade celular foram realizadas 48 replicatas de recobrimentos dos seguintes eletrólitos nas respectivas condições: acetato de cálcio 0,5M 60 seg. 150V; acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M 20 seg. 150V; acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,06M 20 seg. 150V; fosfato de sódio 0,1M 60 seg. 100V; e as amostras Controle.

Através destes gráficos da figura 4.38, pode-se observar que após 04 horas de início do teste, houve adesão celular em todas as superfícies, porém a superfície em que houve recobrimento de fosfato de sódio 0,1M foi a que teve menor número de células aderidas, inclusive menor até que da superfície controle. A superfície que se mostrou com maior número de células aderidas foi a de recobrimento em que foi utilizado o eletrólito de acetato de cálcio 0,5M + Betaglicerofosfato de sódio 0,02M. Em ordem decrescente de número de células aderidas sobre as superfícies testadas temos: 1) acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M; 2) superfície controle; 3) acetato de cálcio 0,5M; 4) acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,06M; e 5) fosfato de sódio 0,1M. Após 24 horas de início do teste, a atividade celular mostrou-se em ordem decrescente de número de células aderidas igual ao teste de 04 horas, porém com valores maiores para cada superfície.

Para os resultados de diferenciação celular em 14 e 21 dias podemos observar através dos gráficos da figura 4.38 que houve diferenciação celular em todas as superfícies e que com o passar dos dias de 14 para 21, os níveis de fosfatase alcalina tornaram-se semelhantes em todas as superfícies analisadas, mostrando que todas as superfícies são biocompatíveis no que diz respeito à possibilidade de osseointegração em tais superfícies. Inclusive levando a considerar que nossa superfície controle foi tão boa quanto todas as outras superfícies, nas quais houve tratamento para formação de filmes de óxido de titânio.

Adesão



Diferenciação

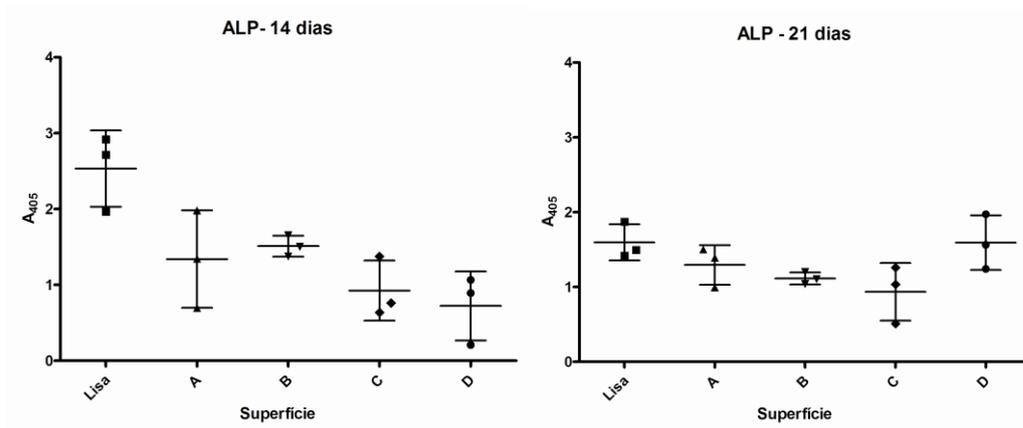


Fig. 4.38 – Gráficos da atividade celular dos testes *in vitro*. Adesão celular para 04 e 24 horas e diferenciação celular para 14 e 21 dias.

4.4.1- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Controle

Na figura 4.39 observamos a superfície controle sem atividade celular, em 14 dias após início do teste e em 21 dias após início do teste. Observa-se, à princípio que a superfície controle apresenta-se heterogênea, pelo fato de ter sido inicialmente atacada pela limpeza superficial com ácido clorídrico. Portanto, após 14 e 21 dias, tal superfície

apresenta-se completamente recoberta por células, mostrando que inclusive a superfície controle também facilitou a adesão e diferenciação celular.

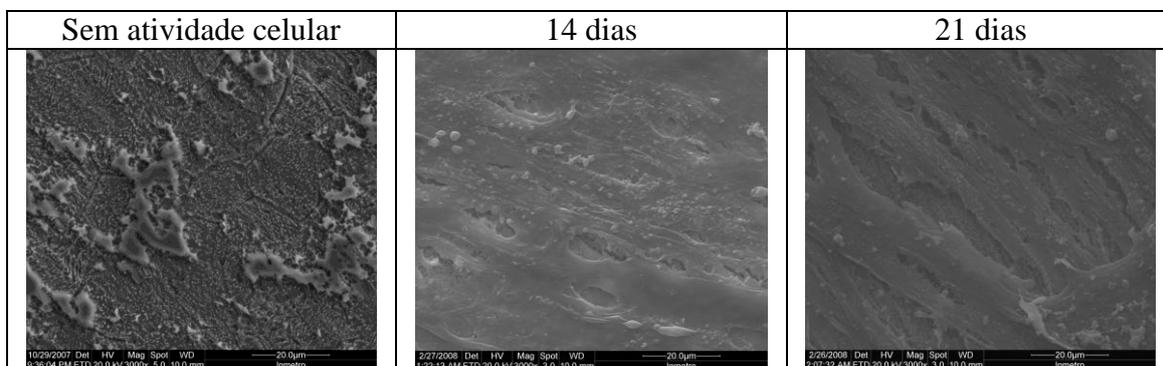


Fig. 4.39- Comparações da superfície controle sem atividade celular, para 14 dias e 21 dias em magnificação de 3000x.

Acetato de cálcio 0,5M - 60 segundos – 150V

Na figura 4.40 observamos a superfície produzida com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M a 150V em 60 segundos sem atividade celular, em 14 dias após início do teste e em 21 dias após início do teste. Observa-se, à princípio que tal superfície apresenta-se porosa, com rugosidade média inicial de 307nm, espessura média inicial de 837nm. Portanto, após 14 e 21 dias, tal superfície apresenta-se completamente recoberta por células, mostrando que adesão e diferenciação celular ocorreram de forma satisfatória.

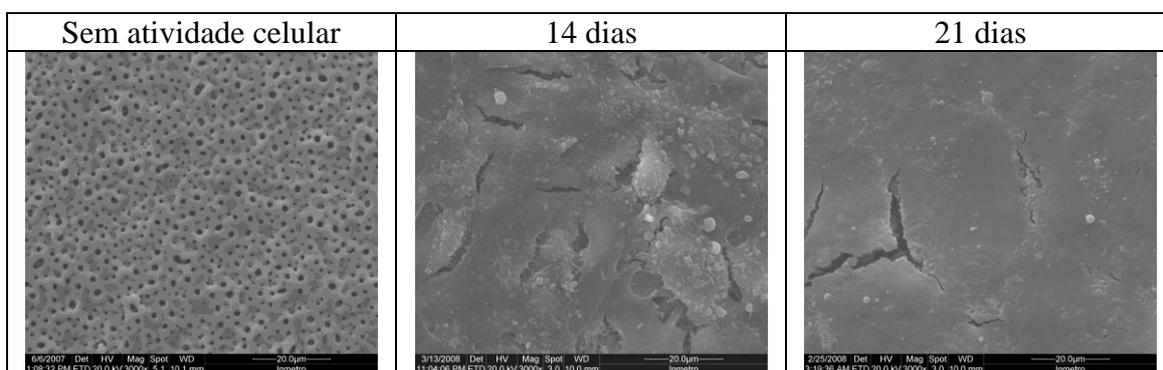


Fig. 4.40- Comparações da superfície anodizada com acetato de cálcio 0,5M 150V 60 segundos, sem atividade celular, para 14 dias e 21 dias em magnificação de 3000x.

Acetato de cálcio 0,5M + Betaglicerofosfato de sódio 0,02M - 20 segundos – 150V

Na figura 4.41 observamos a superfície produzida com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M + Betaglicerofosfato de sódio 0,02M a 150V em 20 segundos sem atividade celular, em 14 dias após início do teste e em 21 dias após início do teste. Observa-se, à princípio que tal superfície apresenta-se porosa e heterogênea. Após 14 dias de teste de atividade celular, ainda pode ser vista a superfície da camada de óxidos, conforme indicado pela seta. Portanto, após 21 dias, tal superfície apresenta-se completamente recoberta por células, mostrando que adesão e diferenciação celular ocorreram finalmente de forma satisfatória.

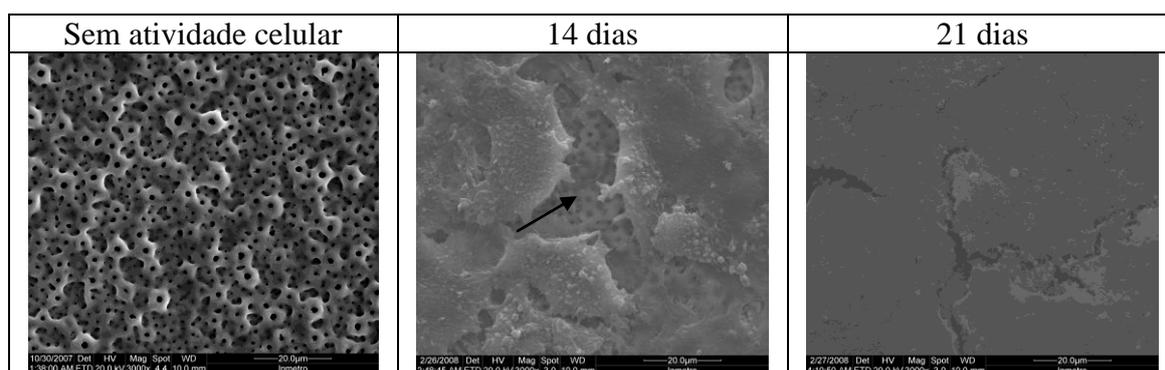


Fig. 4.41- Comparações da superfície anodizada com acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M 150V 20 segundos, sem atividade celular, para 14 dias e 21 dias em magnificação de 3000x.

Acetato de cálcio 0,5M + Betaglicerofosfato de sódio 0,06M - 20 segundos – 150V

Na figura 4.42 observamos a superfície produzida com eletrólito de acetato de cálcio 0,5M + Betaglicerofosfato de sódio 0,06M a 150V em 20 segundos sem atividade celular, em 14 dias após início do teste e em 21 dias após início do teste. Observa-se, à princípio que tal superfície apresenta-se porosa e heterogênea. Após 14 e 21 dias de teste de atividade tal superfície apresenta-se completamente recoberta por células, mostrando que adesão e diferenciação celular ocorreram de forma satisfatória.

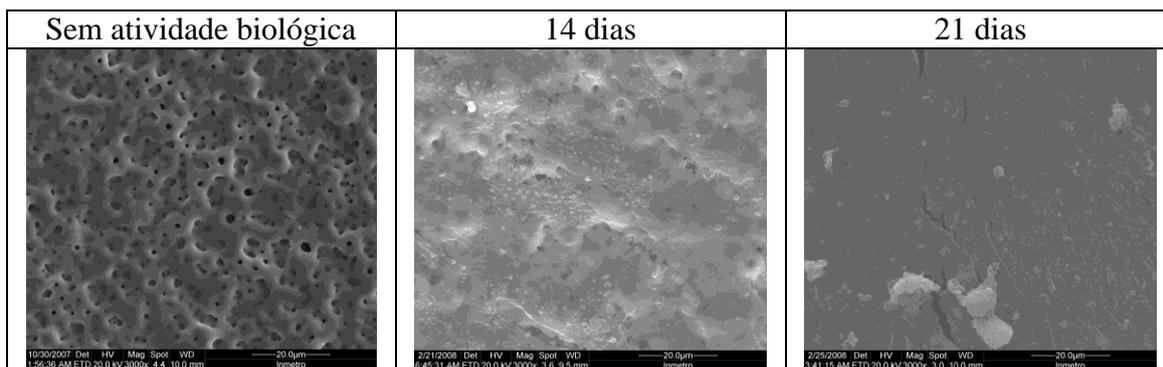


Fig. 4.42- Comparações da superfície anodizada com acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,06M 150V 20 segundos, sem atividade celular, para 14 dias e 21 dias em magnificação de 3000x.

Fosfato de sódio 0,1M – 60 segundos – 100V

Na figura 4.43 observamos a superfície produzida com eletrólito de fosfato de sódio 0,1M a 100V em 60 segundos sem atividade celular, em 14 dias após início do teste e em 21 dias após início do teste. Observa-se, à princípio que tal superfície apresenta-se porosa. Após 14 dias de teste, ainda é possível ver a superfície de óxidos sob a camada celular, conforme está indicado pela seta. Após 21 dias de teste de atividade tal superfície apresenta-se recoberta por células, porém com imagem semelhante a “esgarçamento” da superfície celular. Os resultados apresentados no gráfico da figura 4.31 mostram que, mesmo assim, a adesão e diferenciação celular ocorreram de forma satisfatória.

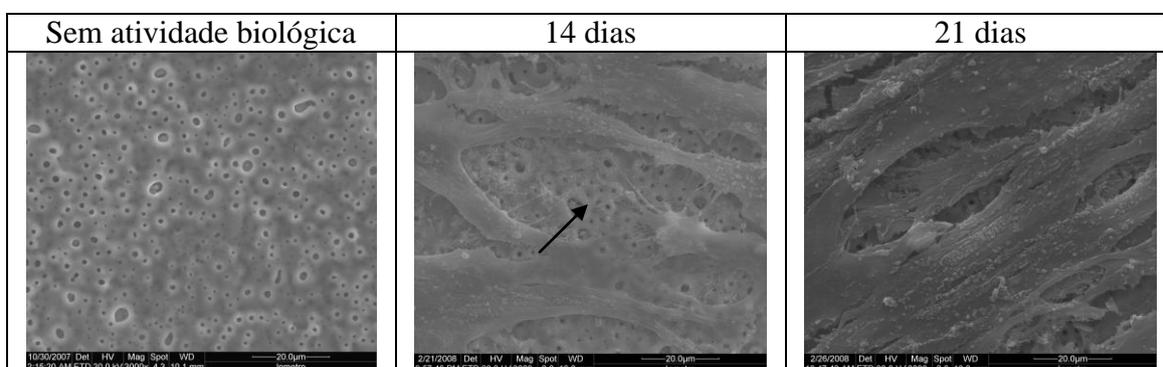


Fig. 4.43- Comparações da superfície anodizada com Fosfato de sódio 0,1M 100V 60 segundos, sem atividade celular, para 14 dias e 21 dias em magnificação de 3000x.

4.4.2 – Relação Rugosidade x Número de células

Na figura 4.44 é apresentado o gráfico que correlaciona o número de células em função da rugosidade para período de 4 horas de teste de adesão celular. Observa-se que em todas as superfícies houve adesão celular após 4 horas de teste, inclusive na superfície controle. Tanto a superfície menos rugosa (controle) quanto a superfície mais rugosa (D- fosfato de sódio 0,1M) permitiram adesão celular. A superfície que teve rugosidade mediana dentre as analisadas (B- acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M) foi a que teve maior número de células aderidas após 4 horas de teste.

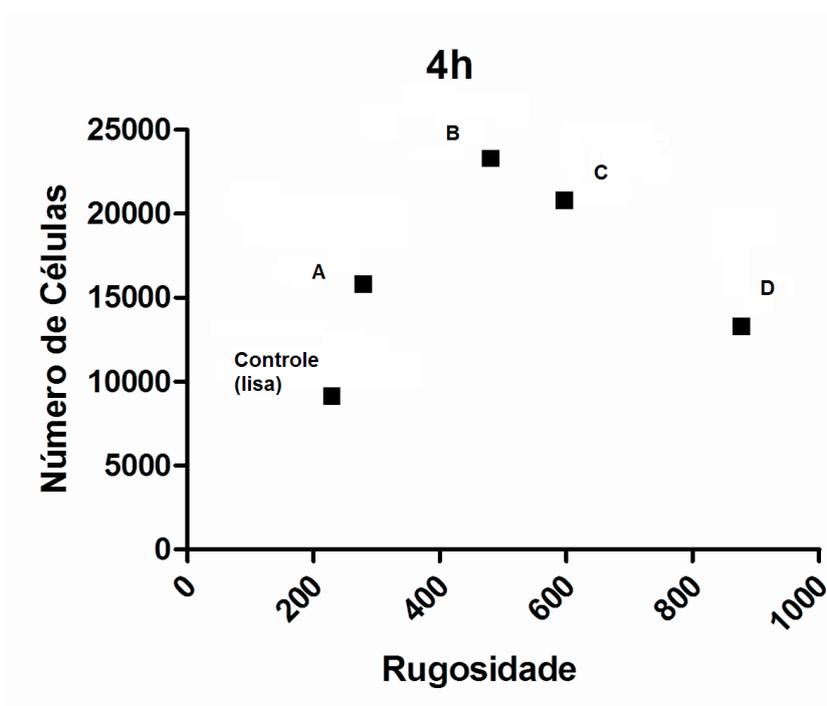


Fig. 4.44- Gráfico rugosidade x número de células para período de 4 horas de teste de adesão celular, nas diferentes superfícies selecionadas (controle/lisa; A; B; C e D)

Na figura 4.45 é apresentado o gráfico que correlaciona a rugosidade das superfícies selecionadas para o teste celular em função do número de células após 24 horas de teste. Observa-se que há adesão celular em todas as superfícies analisadas, mostrando que tais superfícies são citocompatíveis para adesão celular após 24 horas de teste. Inclusive a

superfície controle apresentou adesão celular após 4 e 24 horas de teste. Tanto a superfície menos rugosa (controle) quanto a superfície mais rugosa (D- fosfato de sódio 0,1M) permitiram adesão celular. A superfície que teve rugosidade mediana dentre as analisadas (B- acetato de cálcio 0,5M + Bgf 0,02M) foi a que teve maior número de células aderidas após 4 horas de teste.

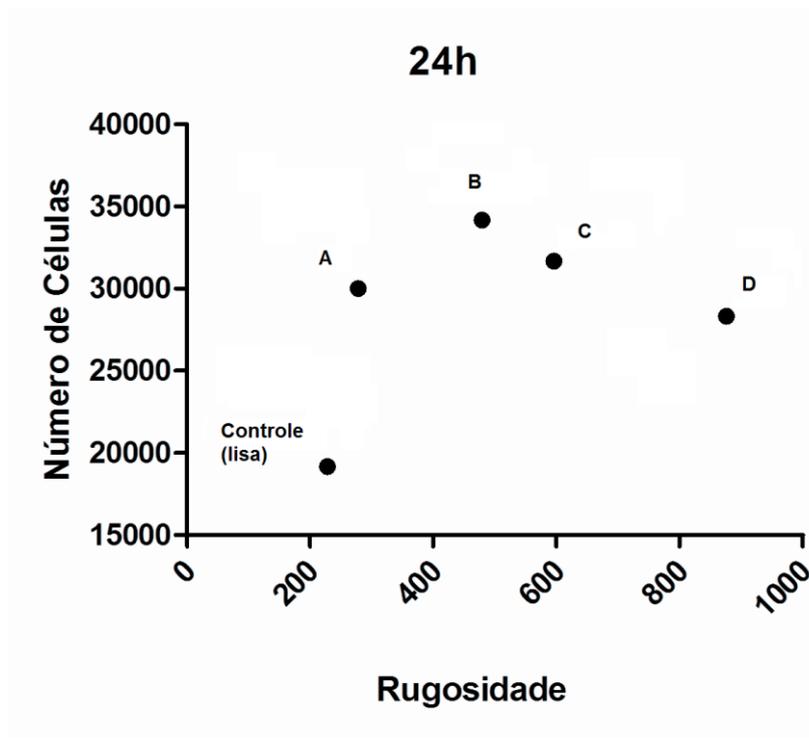


Fig. 4.45- Gráfico rugosidade x número de células para período de 24 horas de teste de adesão celular, nas diferentes superfícies selecionadas (controle/lisa; A; B; C e D)

Foi realizada análise estatística para os resultados dos testes de atividade celular, relacionando número de células em função da rugosidade, e foi constatado através dos resultados que a rugosidade não é um fator determinante para o número de células, ou seja, a rugosidade não influencia significativamente na adesão celular.

Considerações gerais: As superfícies são essencialmente muito semelhantes com relação à resposta celular, isto quer dizer que as superfícies são citocompatíveis e permitem a adesão e diferenciação celular após 21 dias de observação *in vitro*. Onde pode haver uma diferença maior é com relação ao embricamento com o osso, ou seja, como o osso será depositado em tais superfícies, porém esses dados nos remetem a estudos intra-ósseos, que não foram realizados neste trabalho. Observar como é a relação osso-implante, se tem íntimo contato, se tem fibra interposta. Tais observações só podem ser realizadas em estudos *in vivo*, que seria uma nova etapa deste trabalho.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos durante a realização deste trabalho pode-se afirmar que:

- A técnica de oxidação anódica a microarco é excelente para a produção de filmes de óxido de titânio produzidos sobre substrato de titânio puro, utilizando contraeletrodo de platina, por ser um método rápido, fácil, eficaz, e reproduzível.
- A limpeza superficial realizada com HCl e acetona ataca a superfície do substrato de titânio, tornando-o mais rugoso.
- Através de eletrólitos de acetato de cálcio 0,5M, fosfato de sódio 0,1M e acetato de cálcio 0,5M adicionado ao betaglicerofosfato de sódio em diferentes concentrações, há incorporação de íons cálcio e fósforo nos recobrimentos produzidos, o que indica a possibilidade de facilitação para a formação óssea junto ao implante.
- A voltagem foi um fator fundamental nos resultados de rugosidade dos recobrimentos realizados com eletrólito de fosfato de sódio 0,1M.
- As alterações no tempo de anodização refletiram mudanças na topografia dos recobrimentos produzidos.
- A anodização a microarco afeta a superfície dos recobrimentos produzidos com acetato de cálcio 0,5M, diminuindo quase pela metade sua rugosidade.
- Com a adição de betaglicerofosfato de sódio à solução eletrolítica ocorre um aumento na rugosidade e mudança na morfologia dos recobrimentos.
- Com o aumento da concentração de betaglicerofosfato de sódio à solução eletrolítica houve o aumento da espessura dos recobrimentos, diminuição no número de poros presentes no recobrimento produzido e aumento nos valores de concentração atômica de cálcio e fósforo.
- As fases presentes foram anatásio, rutilo e titânio, exceto nos recobrimentos onde o eletrólito utilizado foi o fosfato de sódio 0,1M, no qual o rutilo foi ausente.

- Em todas as superfícies testadas houve adesão celular após 04 e 24 horas de testes *in vitro* e houve diferenciação celular em todas as amostras, inclusive na amostras controle, após 14 e 21 dias de testes *in vitro*, indicando que após 21 dias, os resultados tendem a ficar semelhantes.
- As superfícies produzidas são citocompatíveis e permitem a adesão e diferenciação celular, ou seja, as superfícies testadas embora sejam diferentes, foram essencialmente muito semelhantes com relação à resposta celular, ou seja, não houve diferença significativa para a adesão e diferenciação celular.
- A rugosidade não é um fator que determina o número de células, podendo indicar que a morfologia da superfície e/ou a composição química da mesma sejam determinantes.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudos *in vivo* para avaliação intra-óssea da resposta do tecido ósseo ao implante de forma a entendermos como o tecido ósseo cresce na superfície do implante, se ocorre íntimo contato ou se apresenta tecido fibroso interposto.
- Através de estudos *in vivo* monitorar o tempo de osseointegração, de forma a inserir o implante e avaliar a osseointegração após 1 semana, 2 semanas, 4 semanas e 8 semanas, para verificar a velocidade de osseointegração osso-implante.

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBREKTSSON, T. *et al.*, 1981, “ Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man”, *Acta Orthop* , v. 52, n. 2, pp 155-70.

ASK, M., ROLANDER, U., LAUSMAA, J., *et al.*,1986, “Microstructure and morphology of surface oxide films on Ti-6Al-4V”, *Materials research society*, p: 1662-1667.

BRÅNEMARK, P. I., *et al.* , 1985 ,“Introduction to osseointegration”. In: *Tissue integrated prostheses. Osseointegration in clinical dentistry*, Chicago, Quintessence, p. 1-6.

CORTEZ, A. L. V., 2002, *Influência de diferentes superfícies de implantes endósseos de titânio sobre o processo de osseointegração. Análises histológica e histométrica em tibia de coelhos*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

FINI, M., CIGADA, A., RONDELLI, G, *et al.*, 1999, “In vitro and in vivo behaviour of Ca- and P-enriched anodized titanium”, *Biomaterials*, v.20, pp 1587-1594.

GUÉHENNEC, L. L., SOUEIDAN, A., LAYROLLE, P., *et al.*, 2007, “Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration”, *Dental Materials*, v.23, pp 844-854.

HAN, Y., HONG, S. H., XU, K., 2003, "Structure and in vitro bioactivity of titania-based films by micro-arc oxidation", *Surface and Coatings Technology*, v. 168, pp 249-258.

HUANG, P., XU, K. W., HAN, Y., 2005, "Preparation And apatite layer formation of plasma electrolytic oxidation film on titanium for biomedical application", *Materials Letters*, v. 59, pp 185-189.

ISHIZAWA, H., OGINO, M., 1995, "Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 29, pp 65-72.

ISHIZAWA, H., OGINO, M., 1999, "Hydrothermal precipitation of hydroxyapatite on anodic titanium oxide films containing Ca and P", *Journal of Materials Science*, v. 34, pp 5893-5898.

JACKSON, M. J., AHMED, W., 2007, "Anodization: A promising nano-modification technique of titanium-based implants for orthopedic applications". In: Jackson, M.J., Ahmed, W. (eds), *Surface Engineered Surgical Tools and Medical Devices*, chapter 2, USA.

KOHN, D.H., 1992, "Overview of factors important in implant design", *Journal of Oral Implantology*, Lawrence, v.18, p.204-219.

KOKUBO, T., KIM, H.M., KAWASHITA, M. *et al.* 2004, "Bioactive metals: preparation and properties", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 15, n. 2, pp. 99-107.

KRUPA, D., BASZKIEWICZ, J., SOBCZAK, *et al.*, 2003, "Influence of anodic oxidation on the bioactivity and corrosion resistance of phosphorous-ion implanted titanium", *Vaccum*, v. 70, pp 109-113.

LI, L. H., KONG, Y. M., KIM, H.W., *et al.*, 2004, "Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation", *Biomaterials*, v. 25, pp 2867-2875.

LIU, X., CHU, P. K., DING, C., 2004, "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications", *Materials Science and Engeneering*, v. 47, pp 49-121.

LIU, X., WANG, F., SHIMIZU, T., *et al.*, 2005, "Formation of hydroxyapatite on Ti-6Al-4V alloy by microarc oxidation and hydrothermal treatment", *Surface & Coatings Technology*, v. 199, pp 220-224.

OH, H. J., LEE, J. H., JEONG, Y., *et al.*, 2005, "Microstructural characterization of biomedical titanium oxide film fabricated by eletrochemical method", *Surface & Coatings Technology*, v. 198, pp 247-252.

OSHIDA, Y., 2006, “ Oxidation and oxides”. In: Oshida, Y., *Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials*, chapter 4, New York, USA.

PARK, J. W., PARK, K. B., SUH, Y. J., 2007, “Effects of calcium ion incorporation on bone healing of Ti6Al4V alloy implants rabbits tibiae”, *Biomaterials*, v. 28, pp 3306-3313.

RIETVELD, H. M., 1969, “ A profile refinement method for nuclear and magnetic structures”, *J. Appl. Cryst.*, v. 2, pp 65.

SATOMI, K., *et al.*, 1988, ”Bone-implant interface structures after non tapping and tapping insertion of screw-type titanium alloy endosseous implants”, *J Prosthet Dent.*, Saint Louis, v.59, p.339-342.

SCHRECKENBACH, J. P., MARX, G., SCHLOTTIG, F., *et al.*, 1999, “Characterization of anodic spark-converted titanium surfaces for biomedical applications”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 10, pp 453-457.

SILVA, M. H., 2007, “Apostila de Biomateriais” adquirida no sítio virtual mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf_p3/apostilabiomateriais.pdf no dia 24/04/2007.

SON, W. W., ZHU, X., SHIN, H. I., ONG, J. L., *et al.*, 2003, “In vivo histological response to anodized and anodized/hydrothermally treated titanium implants”, *Journal Biomedical Material Research*, Aug 15; 66B(2):520-5.

SONG, W. H., JUN, Y. K., HAN, Y., *et al.*, 2004, “ Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titânia”, *Biomaterials*, v. 25, pp 3341-3349.

SUN, J., HAN, Y., HUANG, X., 2007, “Hydroxyapatite coatings prepared by micro-arc oxidation in Ca- and P-containing electrolyte”, *Surface & Coatings Technology*, v. 201, pp 5655-5658.

TANG, G. X., ZHANG, R. J., YAN, Y. N., *et al.*, 2004, “ Preparation of porous anatase titania film”, *Materials Letters*, v. 58, pp 1857-1860.

TAKEUCHI, M., ABE, Y., YOSHIDA, Y., *et al.*, 2003, “Acid pretreatment of titanium implants”, *Biomaterials*, v. 24, pp 1821-1827.

THOMAS, K. A.; COOK, S. D., 1985, “An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition”, *Journal Biomedical Material Research.*, New York, v.19, n.8, pp.875-901.

TROTA FILHO, J., 2007, *Modificação superficial de titânio para produção de implantes*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, R.J., Brasil.

WANG, Y., NAN, K., CHEN, X., *et al.*, 2006, “ Characterization of bioactive ceramic coatings prepare don titanium implants by micro-arc oxidation”, *Rare Metals*, v. 25, 84-89.

WEN, H. B., WOLKE, J. G. C., WIJN, J. R., *et al.*, 1997, “Fast precipitation of calcium phosphate layers on titanium induced by simple chemical treatments”, *Biomaterials*, v. 18, pp 1471-1478.

WILLIAMS, D.F., 1987, *Definitions in biomaterials*. Elsevier ed. Amsterdam.

ZHU, X., KIM, K. H., JEONG, Y., 2001, “Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial”, *Biomaterials*, v. 22, pp 2199-2206.

ZHU, X., ONG, J. L., KIM, S., *et al.*, 2001, “Surface characteristics and structure of anodic oxide films containing Ca and P on a titanium implant material”, *Biomaterials*, v. 24, pp 3129-3134.

ZHU, X., CHEN, J., SCHELEIDER, L., *et al.*, 2004, “Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses”, *Biomaterials*, v. 25, pp 4087-4103.