

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Escola de Engenharia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais-PPGEM

ESTUDO DE MODIFICAÇÕES SUPERFICIAIS PARA IMPLANTES DE TITÂNIO  
E  
AVALIAÇÃO SUPERFICIAL POR CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS

Ana Camila Santos dos Santos

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Engenharia

Porto Alegre  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Escola de Engenharia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais-PPGEM

ESTUDO DE MODIFICAÇÕES SUPERFICIAIS PARA IMPLANTES DE TITÂNIO  
E  
AVALIAÇÃO SUPERFICIAL POR CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS

Ana Camila Santos dos Santos  
Bacharel em Física

Trabalho realizado no Laboratório de Processos Eletroquímicos e Corrosão do Departamento de Metalurgia da Escola de Engenharia da UFRGS, dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGEM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Área de Concentração: Ciência dos Materiais.

Porto Alegre  
2008

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Engenharia, área de concentração em Ciência dos Materiais e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Luís Frederico Pinheiro Dick  
PPGEM-UFRGS

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Silvia Maria Leite Agostinho  
Instituto de Química - USP

Profa. Dra. Denise Schermann Azambuja  
Instituto de Química - UFRGS

Profa. Dra. Iduvirges Lourdes Muller  
Escola de Engenharia - UFRGS

Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann  
Coordenador do PPGEM

Dedico exclusivamente à Minha Boneca Vera.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à UFRGS pelo investimento na minha formação desde a Creche Francesca Zacaro Faraco, cursos de Extensão e Graduação até a Pós-Graduação.

O meu reconhecimento aos professores alfabetizadores e educadores da Escola Estadual de Ensino Fundamental Brigadeiro Silva Paes, Colégio Marista Assunção, Instituto de Física e Escola de Engenharia/PPGEMM/UFRGS, todos importantes no meu desenvolvimento.

Ao meu magnífico professor e orientador Prof. Dr. Luís Frederico Pinheiro Dick pelos estímulos acadêmicos e por ter despertado em mim o valor da Ciência.

Aos sempre solícitos Profa. Dra. Célia de Fraga Malfatti e Prof. Dr. Gerhard Hans Knornschild pelo auxílio e elucidação dos estudos realizados.

Aos meus estimados colegas e amigos do Eletro”*cuore*” Cristina R. Weber, Luciana Machado Rodrigues, Sabrina Neves da Silva e Pedro C. Hernandez Jr., a minha consideração pelo apoio recebido, principalmente nos momentos de desespero.

Aos meus saudosos ex-colegas Claudia Trindade Oliveira, Daniel Alves Dalla Corte, Ernesto G. Maffia, Marco Antônio Bottega, Sergio S. Kucera, Miguel Angelo Basso e Giovane Gonçalves, sempre essenciais.

À minha querida comadre *Claudinha* Trindade Oliveira, por *assistir* de perto o nascimento desta afilhada.

Aos parceiros do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética/UFRGS e do CME/UFRGS pelo apoio na realização e avaliação dos resultados desta dissertação.

Ao meu amigo prodígio Lucas Lima, pelos *ATENDIMENTOS DE EMERGÊNCIA 24h* aos meus pedidos de *S.O.S.*, relacionados a *backup*, recuperação e reinstalação de HDs.

Aos meus estimados amigos de longa data Sheila e *Lico* Bregão. Amizade fiel e duradoura, desde quando mal sabíamos ler.

À minha inesgotável amiga *Lili* e as famílias Gonçalves, Medeiros e Lima. Eterna gratidão pelo carinho constante.

Ao meu imprescindível amigo Alexandre (*Malão*). Toda a gratidão da sua amiga, *Pacote*.

Aos meus amados avós Diva e Alípio por me proporcionarem um mundo cor de rosa.

As minhas “*íssimas*” tias corujas Marli, Marlene, Vanda (*Tia Lôca*) e Mãe Isa pelos estímulos, incentivos, dedicação e carinho. Trago um pouco de cada uma de vocês em mim.

Aos queridos primos *Táta* e *Rudy*, sempre presentes, sempre próximos, apesar da distância.

Ao meu sempre prestativo irmão *Zico*, pelas infindáveis ajudas de A a Z.

À minha idolatrada mamãe Vera, por sempre acreditar e confiar que TUDO É POSSÍVEL!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
2.0 OBJETIVOS.....	3
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Biomateriais.....	4
3.2 Titânio (Ti).....	5
3.2.1 Propriedades do Ti.....	5
3.2.2 Ti como um Biomaterial.....	6
3.3 Osseointegração.....	8
3.4 Processo de corrosão eletroquímica por pite em superfícies de Ti.....	9
3.4.1 Tipos de corrosão por pites.....	9
3.4.2 Nucleação do pite.....	10
3.4.3 Influência dos ânions agressivos na corrosão por pites.....	11
3.4.4 Potencial de Pite ( $E_{\text{pite}}$ ).....	12
3.4.5 Potencial de repassivação ( $E_{\text{rep}}$ ).....	13
3.4.6 Ruptura do filme passivo.....	13
3.4.7 Pites metaestáveis e estáveis.....	14
3.4.8 Cinética de crescimento dos pites.....	15
3.4.9 Morfologia das bordas.....	15
3.4.10 Efeito da concentração de brometos sobre o potencial de pite.....	16
3.4.11 Efeitos da temperatura sobre a corrosão por pites.....	16
3.4.12 Efeito do pH da solução sobre a corrosão por pites.....	17
3.5 Processo de anodização eletroquímica em superfícies de Ti.....	18

3.5.1	Teorias do processo de formação de óxidos barreira.....	18
	Camada barreira em metais válvula.....	19
3.5.2	Estrutura dos óxidos.....	19
3.5.3	Composição dos óxidos.....	20
3.5.4	Espessura dos óxidos.....	21
3.5.5	Processo de anodização porosa de Ti após centelhamento.....	21
3.5.6	Processo de anodização porosa nanotubular do Ti.....	23
3.6	Osteoindução <i>versus</i> osteocondução.....	25
3.7	Camadas bioativas de fosfato de cálcio sobre Ti.....	25
3.7.1	Principais métodos de produção de fosfatos de cálcios.....	26
3.7.2	Principais métodos de recobrimento com fosfato de cálcio.....	27
3.7.3	Importância das cerâmicas bioativas na área médica e odontológica.....	29
3.7.4	Importância das cerâmicas bioativas na área farmacêutica.....	29
3.8	Cultura de Células-Tronco Mesenquimais.....	30
3.8.1	Cultura de Células-Tronco Mesenquimais associada ao uso de implantes.....	30
4.0	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	Modificações Superficiais Químicas e Eletroquímicas.....	32
4.1.1	Materiais.....	33
	Eletrodo de Trabalho.....	33
	Eletrólitos.....	34
	Equipamentos.....	35
4.1.2	Métodos.....	35
	Processo de corrosão por pites.....	35
	Processo de anodização porosa após centelhamento.....	35
	Processo de corrosão por pites e posterior anodização porosa após centelhamento....	36
	Processo de anodização porosa após centelhamento e posterior deposição química de fosfato de cálcio.....	36
4.2	Cultura de Células-Tronco Mesenquimais sobre placas de Ti.....	37
4.3	Análises e Medidas.....	39
4.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	39
4.3.2	Preparação de amostras biológicas para análise em MEV.....	39
4.3.3	Metalização.....	42
4.3.4	Programa de análises de imagens.....	42
4.4	Microcaracterização de TiO <sub>2</sub> nanotubular formado por anodização.....	43

5.0	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
5.1	Processo de corrosão por pites (polarização potenciostática).....	44
5.1.1	Transiente de corrente do Ti em 1M NaBr.....	44
5.1.2	Análise por MEV em Ti polarizado potenciostaticamente em 1M NaBr.....	46
5.2.	Processo de anodização porosa após centelhamento (polarização galvanostática).....	49
5.2.1	Transiente de potencial do Ti em 1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	49
5.2.2	Análise por MEV em Ti polarizado galvanostaticamente em 1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	51
5.3.	Processo de corrosão por pites e posterior anodização porosa após centelhamento....	61
5.3.2	Análise por MEV em Ti polarizado potenciostaticamente em 1M NaBr e posterior polarização galvanostática em 1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	63
5.4	Processo de anodização porosa após centelhamento e posterior deposição química de fosfatos de cálcio.....	73
5.4.1	Síntese do fosfato de cálcio.....	73
5.4.2	Deposição química de fosfatos de cálcio sobre a superfície anodizada de Ti.....	73
5.4.3	Análise por MEV em Ti polarizado galvanostaticamente em 1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> e posterior deposição química de fosfatos de cálcio.....	75
	Procedimento 1.....	75
	Procedimento 2.....	81
5.5	Cultura de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) sobre amostras de Ti .....	88
5.5.1	Cultura de 2x10 <sup>5</sup> CTMs/ml, por 96h, sobre amostras de Ti modificadas superficialmente.....	89
5.5.2	Culturas de 5x10 <sup>3</sup> , por 48h e 1x10 <sup>5</sup> CTMs/ml, por 3 e 48h, sobre amostras de Ti polidas até 1 µm.....	96
5.5.3	Cultura de 1X10 <sup>6</sup> CTMs/ml, por 48h, sobre amostras de Ti modificadas superficialmente.....	97
5.6	Processo de anodização nanotubular.....	104
5.6.1	Análise por MEV em Ti polarizado potenciostaticamente em Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , com a adição de pequenas quantidades de NaF .....	104
6.0	CONCLUSÃO.....	111
6.1	Modificações superficiais.....	111
6.2	Avaliações biológicas <i>in vitro</i> sobre amostras modificadas superficialmente.....	112
6.3	Análise estatística dos óxidos anódicos nanotubulares auto organizados.....	113
7.0	PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	114
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

## LISTA DE FIGURAS

4.1	Fotografias apresentando a) placa de 24 poços contendo as amostras de titânio de 24mm <sup>2</sup> com as CTMs. e b) Placa de 24 poços em estufa.....	37
5.1	Transiente de corrente do Ti em 1M NaBr, 1,87V [ENH] e temperatura de 80°C, durante cinco minutos.....	44
5.2	Micrografia, em vista de topo, apresentando a morfologia de um pite estável em Ti polarizado potenciostaticamente em 1M NaBr (MAFFIA, 2005).....	46
5.3	Esquema do pite formado conforme o “modelo hemisférico” côncavo.....	47
5.4	Micrografia, em secção transversal, apresentando um pite estável em Ti polarizado potenciostaticamente em 1M NaBr (MAFFIA, 2005).....	47
5.5	Transiente de potencial do Ti em 1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , temperatura ambiente e duração de 102s após o início do intenso centelhamento.....	49
5.6	Micrografia, em vista de topo, apresentando o óxido poroso formado pelo fenômeno de centelhamento em Ti, com poros maiores e mais abundantes na região central II do que na região I, perto da borda da amostra.....	51
5.7	Micrografia, em vista de topo, apresentando as diferentes morfologias do óxido anódico em Ti, com poros circulares ou em forma de trilhas.....	52
5.8	Micrografia, em vista de topo, apresentando a morfologia do óxido plano, resultante de um fraco centelhamento, formado sobre Ti.....	53
5.9	Micrografia, em vista de topo, salientando a erupção formada pela fusão do óxido, em uma região de forte centelhamento, formado sobre Ti.....	53
5.10	Micrografia, em vista de topo, apresentando as diferentes topografias formadas no óxido, sobre o Ti, durante o intenso centelhamento.....	54
5.11	Micrografia, em vista de topo, salientando uma erupção inicial do óxido sobre Ti, durante o intenso centelhamento.....	56
5.12	Micrografia, em vista de topo, apresentando a topografia sobre Ti formada por poros de tamanhos não homogêneos.....	57
5.13	Micrografia, em vista de topo, apresentando uma estrutura porosa interconectada, formada pelas sucessivas erupções no óxido anódico de Ti.....	59
5.14	Transiente de potencial de Ti em 1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , em condições de intenso centelhamento.....	61
5.15	Micrografia, em vista de topo, apresentando a anodização em condições de intenso centelhamento em uma superfície de Ti corroída por pites.....	63
5.16	Micrografia, em vista de topo, salientando dois pites circulares unidos por um caminho de corrosão, em Ti.....	64
5.17	Esquema representando a união de dois pites por um caminho de corrosão.....	65

5.18	Micrografia, em vista de topo, apresentando os diferentes óxidos formados na superfície do Ti e dentro do pite.....	66
5.19	Micrografia, em vista de topo, apresentando o óxido anódico dentro do pite, onde se observa um óxido compacto e/ou desagregado.....	67
5.20	Micrografias, em vista de topo, apresentando os óxidos anódicos dentro do pite, com a imagem focada a) na região ao fundo do pite, isto é, na base deste óxido e b) ao longo da espessura e na superfície do óxido.....	68
5.21	Micrografia, em vista de topo, salientando a borda do pite, onde a espessura do óxido anodizado foi medida em, aproximadamente, 20 $\mu$ m.....	69
5.22	Micrografia, em vista de topo, apresentando o fundo do pite, onde se observa um comportamento anômalo dos óxidos anódicos.....	70
5.23	Micrografias, em vista de topo, apresentando o óxido anódico dentro do pite, onde se observam a) poros muito pequenos, circulares e não interconectados e b) poros maiores, abertos, irregulares e interconectados.....	71
5.24	Micrografia, em vista de topo, apresentando as morfologias formadas pela deposição química de fosfato de cálcio, através de ciclos de imersão em solução de fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução com suspensão de Ca(OH) <sub>2</sub> , sobre Ti anodizado.....	75
5.25	Micrografia, em vista de topo, apresentando uma grande quantidade de deposição de fosfato de cálcio em torno de uma trilha do óxido anódico de Ti.....	77
5.26	Micrografias, em vista de topo, apresentando o Ti anodizado a) com recobrimento de fosfato de cálcio e b) sem recobrimento.....	78
5.27	Micrografias, em vista de topo, apresentando a não uniformidade da espessura e da quantidade de deposição de fosfato de cálcio sobre o óxido anódico.....	79
5.28	Micrografia, em vista de topo, apresentando as morfologias formadas pela deposição química de fosfatos de cálcio, através de ciclos de imersão em solução com fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução de Ca(OH) <sub>2</sub> filtrada, sobre Ti anodizado.....	81
5.29	Micrografia, em vista de topo, apresentando uma grande quantidade de deposição química de fosfato de cálcio em torno das regiões de forte centelhamento do óxido anódico de Ti.....	82
5.30	Micrografia, em vista de topo, apresentando o recobrimento não homogêneo de fosfato de cálcio, com fissuras e poros semiabertos, sobre o óxido anódico de Ti.....	83
5.31	Micrografia, em vista de topo, apresentando o Ti anodizado intacto sob um espesso recobrimento de fosfato de cálcio.....	84
5.32	Micrografias, em vista de topo, apresentando a não uniformidade da espessura e da quantidade de deposição de fosfato de cálcio sobre o óxido anódico.....	85
5.33	Micrografia, em vista de topo apresentando a cultura de CTMs sobre amostra de Ti submetida à corrosão por pites.....	89
5.34	Micrografias, em vista de topo, apresentando as CTMs na superfície não corroída (a) e na região dentro pite (d). As ampliações demarcadas nessas figuras mostram filamentos (b, f) e um rendilhado (b, e) cobrindo as células.....	90

5.35	Micrografia, em vista de topo, apresentando a falta de uniformidade na distribuição das CTMs sobre a superfície de Ti anodizada após centelhamento.....	91
5.36	Micrografias, em vista de topo, apresentando a cultura de CTMs sobre o óxido anódico de Ti, desde a borda da gota da cultura até a região central da amostra.....	92
5.37	Esquema apresentando o modelo da gota de CTMs sobre o substrato de Ti.....	93
5.38	Micrografias, em vista de topo, apresentando a cultura das CTMS sobre a amostra de Ti corroída por pites e posterior anodização após centelhamento.....	94
5.39	Micrografias, em vista de topo, apresentando a cultura de CTMs sobre amostra de Ti anodizada após centelhamento e posterior deposição química de fosfato de cálcio (através do procedimento 1: ciclos de imersão em solução com fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução com suspensão de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ).....	95
5.40	Micrografias, em vista de topo, apresentando a cultura de CTMs sobre a) a superfície não corroída b) dentro do pite em amostra e a descontinuidade da cultura c) fora e d) dentro do pite em amostra de Ti corroídas por pites.....	97
5.41	Micrografias, em vista de topo, apresentando o comportamento celular das CTMs dentro dos pites, formados pela corrosão por pites em Ti.....	98
5.42	Micrografias, em vista de topo, apresentando o provável desenvolvimento das extensões citoplasmáticas em a) pequeno, b) médio e c) alto grau unindo as CTMs cultivadas sobre Ti anodizado após centelhamento.....	99
5.43	Micrografias, em vista de topo, apresentando a cultura das CTMs sobre a) e c) região não pitada e b) e d) no interior do pite em amostras de Ti produzidas por corrosão por pites e anodizadas após centelhamento.....	100
5.44	Micrografia, em vista de topo, apresentando o desenvolvimento das CTMs sobre amostra de Ti anodizado recoberto com fosfato de cálcio.....	101
5.45	Micrografia, em vista de topo, apresentando o comportamento celular das CTMs sobre o Ti anodizado e recoberto com fosfato de cálcio.....	102
5.46	Micrografias, em vista de topo, apresentando o Ti anodizado em 1M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ com adições de a) 0,5 ou b) 1 ou c) 5% (em peso) NaF.....	105
5.47	Micrografia, em vista de topo, apresentando o Ti anodizado em 1M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ com adição de 1% (em peso) NaF.....	106
5.48	Micrografias, em seção transversal, apresentando o óxido poroso tubular, formado em soluções 1M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ com adição de a) 1 e b) 5% (em peso) de NaF.....	107
5.49	Micrografia, em seção transversal, apresentando o óxido poroso tubular, formado em soluções 1M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ com adição 1% (em peso) de NaF.....	108
5.50	Micrografia, em seção transversal, apresentando o óxido poroso tubular, formado em soluções 1M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ com adição 5% (em peso) de NaF.....	109

## LISTA DE TABELAS

3.1	Crescimento tecidual ósseo de acordo com o tamanho dos poros (PILLIAR, 1983)....	8
4.1	Composição química (% em peso) da chapa de Ti, fornecida pela CAMACAM.....	33
4.2	Eletrólitos utilizados nos processos eletroquímicos.....	34
4.3	Composição das soluções para deposição de fosfato de cálcio.....	34
4.4	Composição e concentração em volume do fixador.....	40
4.5	Composição da solução de limpeza 0,1M Tampão Fosfato.....	40
4.6	Concentração e tempo dos banhos de desidratação.....	41
5.1	Incorporação de fósforo durante a anodização do Ti em condições de intenso centelhamento. A porcentagem atômica dos elementos foi obtida por EDS.....	55
5.2	Parâmetros obtidos por imagens de MEV e análises do programa <i>Image Tool</i> <sup>®</sup> , da anodização em condições de intenso centelhamento.....	58
5.3	Parâmetros obtidos por Maffia (2005) em condições de anodização semelhantes à realizadas neste trabalho.....	58
5.4	Crescimento tecidual conforme o tamanho das fendas (CERRONI <i>et al.</i> , 2002).....	70
5.5	Análise química por EDS dos precipitados depositados na deposição química de fosfato de cálcio em Ti sem anodização.....	76
5.6	Parâmetros obtidos, por imagens MEV e análises do programa <i>Image Tool</i> <sup>®</sup> , da amostra anodizada e posterior deposição química de fosfato de cálcio.....	86
5.7	Modificações superficiais e suas respectivas culturas de CTMs.....	88
5.8	Avaliação da biocompatibilidade do Ti polido até 1µm, em função do tempo de cultura das CTMs.....	96
5.9	Avaliação da biocompatibilidade das modificações superficiais sobre amostras de Ti, de acordo com a cultura celular de 1x10 <sup>6</sup> CTMs/ml, por 48h.....	102
5.10	Parâmetros obtidos por de imagens MEV e análises do programa <i>Image Tool</i> <sup>®</sup> , da anodização porosa nanotubular.....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BMPs	Proteínas Ósseas Morfogenéticas
Cp	comercialmente puro
CTMs	Células-Tronco Mesenquimais
ConcA	<i>concanavalin A</i>
d	diâmetro do pite
E	potencial elétrico
E <sub>B</sub>	potencial de centelhamento
E <sub>corr</sub>	potencial de corrosão
E <sub>metal</sub>	potencial do metal
E <sub>pite</sub>	potencial de nucleação de pite
E <sub>rep</sub>	potencial de repassivação
EDS	<i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>
ENH	Eletrodo Normal de Hidrogênio
F 67	especificação de titânio puro para aplicações em implantes cirúrgicos
HA	Hidroxiapatita
hCTMs	Células-Tronco Mesenquimais humanas
HFM	Modelo de Alto Campo
I	corrente
i	densidade de corrente
i <sub>pite</sub>	densidade de corrente de pite
i <sub>fresta</sub>	densidade de corrente na região de dissolução ativa da fresta
K <sub>ps</sub>	produto de solubilidade
LKO	<i>Chair for Surface Science and Corrosion</i>
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PA	alto grau de pureza
PHA-E	<i>phaseolus erythroagglutinin</i>
ppm	partes por milhão
SBF	Fluído Corporal Simulado
SiC	Carbeto de silício
T <sub>c</sub>	Temperatura de ponto crítico

TCP	Temperatura crítica de pite
UNS	Sistema Unificado Normas
$T_c$	Temperatura de ponto crítico
w	profundidade do pite
$\gamma$	comprimento da lacuna entre óxido anódico dentro do pite
$\delta$	desvio padrão
$\lambda$	espessura do óxido anódico dentro do pite
$\partial E/\partial t$	taxa de anodização
$\Delta$	diâmetro do caminho que une os pites
$\varnothing$	diâmetro dos nanoporos
$\Phi$	espessura do óxido nanotubular
#	granulometria da lixa

## RESUMO

Ti e suas ligas são materiais metálicos que apresentam um completo sucesso quando usados em meio biológico. Estes materiais são amplamente usados em implantes ósseos devido às suas aplicações clínicas apropriadas. Estabilidade biomecânica e bioquímica, biocompatibilidade e uma eficiente osseointegração são os principais requisitos para selecionar um biomaterial para implantes cirúrgicos dentários ou ortopédicos.

Para melhorar a integração tecido+osso, várias técnicas tem sido usadas para aumentar a rugosidade e a bioatividade da superfície de titânio. Características topográficas num intervalo de micrômetros a nanômetros e recobrimentos de fosfatos de cálcio são relevantes nas respostas biológicas.

Neste trabalho, novas modificações superficiais em Ti para implantes são desenvolvidas e testadas. As modificações em Ti foram produzidas por corrosão por pites, anodização, deposição química de fosfatos de cálcio e a combinação desses processos. Células-Tronco Mesenquimais foram cultivadas sobre os substratos para avaliar a qualidade das modificações superficiais propostas para os implantes protéticos. Análises biológicas e análise de MEV foram feitas para caracterizar os nano e microporos nas superfícies, bem como a cultura de células-tronco sobre os substratos modificados superficialmente.

Adicionalmente, superfícies de titânio pré-polarizadas sob condições potencioestáticas foram investigadas por MEV. O propósito deste trabalho de pesquisa foi estudar os efeitos da composição do eletrólito na característica microestrutural e no alinhamento de  $TiO_2$ .

## ABSTRACT

Ti and its alloys are metals that show a complete success when used in biological environment. These metals are widely used in bone implants due to their appropriated clinical applications. Biomechanical and biochemical stability, biocompatibility and an efficient osseointegration are the principal requisites to select a biomaterial for using in orthopedics and dentals surgicals implants.

To improve bone-tissue integration, various techniques have been used as to increase the roughness and bioactivity of titanium surfaces. Topographic features on implants ranging from micrometers to nanometers and calcium-phosphate coatings are relevant to the biological response.

In this work, new surface modifications on Ti for prosthetic implants were developed and tested. Surface treatments of pure Ti were produced by pitting, anodization, chemical deposition of Ca-phosphates and the combination of these processes. Mesenchymal Stem Cells were cultured on the Ti substrates to evaluate the quality of the proposed surfaces modifications for prosthetic implants. Biological analysis and MEV analysis were carried out to characterize the nano and micropores on the surfaces as well as the growth and modification of stem cells.

Additionally, titanium surfaces previously polarized under potentiostatic conditions were investigated by SEM. The aim of this research work was to study the effects of electrolyte composition on microstructural feature and vertical alignment of TiO<sub>2</sub>.

## 1.0 INTRODUÇÃO

Ainda que o método de implantes osseointegráveis já tenha sido consagrado como uma possibilidade para a restauração das perdas dentais, a eventual confirmação de que determinadas superfícies melhoram o contato ósseo, quando em função, poderá certamente contribuir para a otimização do procedimento. O desenvolvimento de biomateriais, no que se refere à biocompatibilidade e à biofuncionalidade, se mostra fundamentalmente importante na melhoria da qualidade de vida, em virtude do aumento da expectativa de vida.

O valor tecnológico-metalúrgico do titânio (Ti), como biomaterial, se deve às suas propriedades mecânicas, tais como: baixo módulo de elasticidade, alta resistência mecânica e conformabilidade, baixa densidade, alta resistência à corrosão e boa estabilidade química e termodinâmica da camada de óxido passivo de  $TiO_2$ . Além disso, características como a biocompatibilidade, a biofuncionalidade e a ótima capacidade de osseointegração do Ti contribuem sinergeticamente.

Por suas características apropriadas, superfícies de Ti tornam-se alvo de muitos estudos na área médica (ou cirúrgica), uma vez que a resposta química e celular dos tecidos em torno do implante está fortemente ligada às condições superficiais deste. Devido às propriedades superficiais de óxido nativo, o Ti possui a habilidade de formar uma forte ligação com o osso. No caso de Ti para implantes dentários, essa superfície deve ser adequada, a fim de garantir uma excelente fixação química e física com o dente.

A modificação superficial, por meio de técnicas eletroquímicas, tem sido objeto de muitos estudos na bioengenharia, pois orifícios micrométricos produzidos pela corrosão eletroquímica por pites, topografias tridimensionais e poros micrométricos produzidos pela anodização após centelhamento ou nanotubular e modificações químicas proporcionadas por esses tratamentos, podem aperfeiçoar a qualidade superficial do implante. Tais modificações são capazes de aprimorar a ligação física e química, através do aumento da adesão com o tecido ósseo, além de diminuir o tempo da osseointegração, pela rápida indução óssea para o interior do implante.

Camadas bioativas que recobrem superfícies metálicas têm sido intensivamente investigadas em razão de seu superior potencial de biocompatibilidade e de osseointegração. A deposição de uma fina camada de fosfatos de cálcio, sobre a superfície de um implante modificada eletroquimicamente é capaz de aumentar a fixação do tecido ósseo natural e melhorar o tempo de vida do processo osteocondutivo. Outro benefício ressaltado pela camada bioativa sobre uma camada porosa é a capacidade de oferecer um fechamento total ou parcial desses poros, que podem eventualmente ocluir fármacos, e ajudar na ativação, no sentido e na taxa de liberação dos medicamentos.

A cultura de Células-Tronco Mesenquimais *in vitro* sobre as superfícies do Ti modificadas eletroquimicamente pode ajudar na avaliação das técnicas aplicadas. A biocompatibilidade das modificações superficiais pode influenciar na qualidade da cultura celular, pois, dependendo da característica físico-química resultante, a modificação superficial é capaz de, provavelmente, proporcionar uma melhor adesão e maior proliferação dessas células, através do desenvolvimento de extensões citoplasmáticas e de filópodes.

O trabalho tem aplicação na área da bioengenharia; na área clínica da odontologia, medicina e veterinária e na área farmacêutica. O desenvolvimento de superfícies pertinentes à produção de implantes dentários, a oclusão de medicamentos e a eventual cultura de Células-Tronco Mesenquimais podem ser tratamentos de excelência no processo de implantação *in vivo*.

## 2.0 OBJETIVOS

Este estudo foi desenvolvido com o intuito de obter diferentes superfícies em chapas de titânio comercialmente puro (Ti Cp), de tamanhos pré-definidos, compatíveis com prováveis testes *in vivo*. O desafio proposto foi produzir várias condições superficiais, que estudadas sozinhas ou somadas, proporcionem alguns requisitos básicos de um primoroso implante, tais como: biocompatibilidade, bioatividade, biofuncionalidade e osseointegração. O objetivo das modificações químicas e eletroquímicas e posterior cultura de Células-Tronco Mesenquimais são:

- Produzir superfícies porosas com tamanho de orifícios micrométricos, proporcionais aos necessários para formação óssea no interior do implante.
- Produzir superfícies com rugosidade nanotopográfica para proporcionar a adesão física com o osso.
- Produzir superfícies nanoporosas que possam servir de reservatório para fármacos.
- Produzir superfícies bioativas para proporcionar a adesão química com o osso e acelerar o tempo de osseointegração.
- Proporcionar o fechamento total ou parcial dos poros nanométricos.
- Caracterizar morfologicamente as modificações superficiais propostas.
- Produzir superfícies modificadas quimicamente, que sejam biocompatíveis com a cultura de Células-Tronco Mesenquimais.
- Qualificar a cultura de Células-Tronco Mesenquimais e assim, avaliar as modificações superficiais propostas.

Em um segundo momento, amostras de Ti Cp previamente tratadas eletroquimicamente foram analisadas microscopicamente. O objetivo deste estudo foi:

- Caracterizar morfologicamente as modificações superficiais propostas.
- Avaliar a influência das condições do eletrólito no resultado morfológico final.

### 3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biomateriais

O desenvolvimento de biomateriais tem se tornado cada vez mais importante na medicina e na odontologia. Biomateriais são dispositivos que, de modo contínuo ou intermitente, entram em contato com fluídos corpóreos, mesmo que estejam localizados fora do corpo (PARK, 1979). O material implantado deve ser compatível biologicamente para que a relação biomaterial+hospedeiro não desencadeie reações adversas ou incontroláveis no sistema biológico (SCHROEDER, 1994).

Ao selecionar biomateriais para serem usados como implantes, muitos aspectos devem ser levados em conta e, dependendo da aplicação, uma ou mais propriedades serão fatores de decisão na escolha do material. Segundo Mears (1977), quando implantados no corpo humano, todos os materiais estão sob dissolução química e eletroquímica e podem se alterar consideravelmente com o tempo.

Na odontologia os metais são aplicados nas obturações e nas estruturas corretivas, ficando em permanente contato com a saliva e, ocasionalmente, com alimentos e agentes de limpeza. A corrosão é uma das reações que um metal sofre em meio biológico. No entanto, deve-se também levar em conta a resposta biológica a um implante metálico, o que pode ocasionar a rejeição do implante. O emprego dos metais nesse campo é crítico e seu comportamento ante a corrosão faz com que seja altamente técnica sua especificação.

O titânio (Ti) é um dos metais que vem atendendo a essas solicitações e devido a isso, muito se tem estudado sobre a resposta biológica ao Ti no local de sua implantação. A finalidade é definir com maior precisão suas propriedades interfaciais, conhecendo o que ocorre na interface entre o metal e o tecido. Algumas características como a morfologia, a geometria da superfície, a imposição de forças estáticas ou dinâmicas nos tecidos e a resistência ao desgaste, podem limitar as funções promovidas pelos implantes, comprometendo o seu desempenho.

## 3.2 Titânio (Ti)

O titânio (Ti) e suas ligas são materiais promissores, pois possuem potencial de aplicação nas engenharias e numa ampla gama de diversos ramos da indústria. Por ser considerado fisiologicamente inerte, o metal é utilizado na engenharia biomédica, em implantes dentários, próteses ósseas e em equipamentos cirúrgicos. (McQUILLAN, 1956).

### 3.2.1 Propriedades do Ti

O Ti é dotado de alta resistência mecânica, que confere a esse metal uma alta resistência à fadiga (DONACHIE, 1989). O seu ponto de fusão é relativamente alto, fazendo com que ele seja usado como um metal refratário. Outras propriedades relevantes são: a baixa condutividade térmica e a alta condutividade elétrica.

O Ti no seu estado puro, em um ambiente livre de oxigênio, é dúctil e fácil de trabalhar, no entanto, quando exposto ao ar, forma-se uma camada passiva de óxido, que torna o metal difícil de trabalhar. Esse óxido lhe confere uma elevada resistência à corrosão, além de ser quimicamente estável, possuir alta tolerância a determinados ácidos e manter suas características inalteradas com o tempo.

Devido ao sinergismo de suas propriedades, o Ti e suas ligas são muito bem aceitos em aplicações biomédicas. Características como biocompatibilidade, leveza e alta resistência à corrosão, conduziram esses metais a uma larga e diversificada gama de aplicações bem sucedidas na área cirúrgica. Afora isso, o Ti é não magnético e não oferece, conseqüentemente, ameaça alguma de danos aos pequenos dispositivos eletrônicos implantados. A disponibilidade das diversas classes de ligas de Ti permite aos especialistas selecionar os materiais conforme as necessidades da aplicação.

### 3.2.2 Ti como um Biomaterial

Investigações no campo das respostas teciduais sugeriram uma adaptação atualizada do conceito de *material bioinerte*. Na realidade, nenhum material biocompatível é absolutamente inerte ao corpo humano, já que todos provocam reações adversas nos sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987). Contudo, o Ti não provoca qualquer reação adversa, sendo tolerado pelo corpo humano. A ausência de reações alérgicas e imunogênicas também auxiliam na biocompatibilidade do Ti.

Após a colocação do implante ocorre um processo de resposta tecidual (cicatrização), gerando uma grande mudança na estrutura química, fisiológica e mecânica em torno da região implantada do corpo humano. O Ti estimula a formação e o crescimento de um novo osso em torno do implante e permite que o osso cresça, até que todos os espaços entre osso e implante sejam preenchidos, sendo, portanto, adequado o seu uso.

O Ti e suas ligas oferecem um extenso domínio de propriedades mecânicas e suas aplicações em implantes cirúrgicos são amplas. A liga Ti-6Al-4V apresenta melhores propriedades mecânicas, em relação ao metal puro, e seu uso é preferencialmente indicado em situações onde as tensões são maiores, como os implantes em tecidos duros (quadril, juntas de joelho, fêmures, etc.) (WILLIAMS, 1972). Já o metal puro é preferencialmente usado em tecidos moles (implantes dentários), pois preenche os requisitos mecânicos necessários e gera uma fixação mais rígida.

Nos Estados Unidos da América a produção comercial do Ti é controlada pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM). A ASTM estabelece normas e especificações padrão que cobrem requisitos químicos, mecânicos e metalúrgicos para os quatro graus do Ti Cp, utilizados na fabricação de implantes (LEMONS, 2000). A designação ASTM F-67, grau 2 obedece a um rigoroso controle da composição química do Ti Cp, que confere uma alta pureza e superior propriedade mecânica desejadas na confecção do implante.

O Ti e suas ligas apresentam módulos de elasticidade próximos ao módulo de elasticidade do osso, oferecendo uma menor probabilidade de movimento relativo na interface tecido-implante. Havendo uma maior deformação elástica no implante, uma maior pressão é transferida ao osso, estimulando, assim, a formação de um novo osso. No entanto, por ser um elemento não essencial ao corpo humano, sua presença em excesso pode gerar reações toxicológicas ou cancerígenas (SILVA, 1992).

O sucesso dos implantes de Ti deve-se principalmente à sua estabilidade biológica e química. A sua superior resistência à corrosão é atribuída a uma fina camada de óxido  $TiO_2$  que se forma naturalmente na superfície do metal quando exposto ao ar ou umidade em temperatura ambiente. Na maioria dos meios aquosos o óxido que se forma é tipicamente  $TiO_2$ , entretanto, pode ocorrer uma mistura de outros óxidos como o  $Ti_2O_3$  e o  $TiO$ .

Esse filme óxido é estável, contínuo e altamente aderente na superfície do metal. Segundo Schreckenbach *et al.* (1999), esta camada protetora de óxido de espessura de 4-10nm e confere ao Ti uma excelente biocompatibilidade. É com esse óxido superficial que o tecido ósseo apresenta-se em contato direto, levando a crer que as propriedades desses óxidos podem explicar a boa resposta biológica dos implantes de Ti (KUROMOTO, 2007).

Através de cortes histológicos, Kasemo (1983), observou, em condições *in vivo*, a interação entre o óxido estável de  $TiO_2$ , em implantes de Ti e os fluídos corpóreos, com íons dissolvidos e biomoléculas (proteínas). O óxido  $TiO_2$  é resistente aos ácidos clorídrico e sulfúrico diluído, à maioria dos ácidos orgânicos e aos gases e soluções contendo cloro. Donachie (1989) afirmou que, em geral, os fluídos corpóreos são sais clorídricos (solução de 0,9% NaCl) com pH 7,4 até pH na faixa ácida, onde se encontram os ácidos orgânicos e outros componentes. Nessa faixa de pH, o Ti é completamente imune, isto é, não é susceptível a corrosão. Já em soluções neutras, o Ti praticamente não sofre corrosão, especialmente naquelas contendo íons cloreto, que ataca a maioria das ligas.

Kasemo (1983) afirma que o processo de corrosão do titânio existe, apesar de pouco intenso. Esse processo é aparentemente muito lento, devido à estabilidade da camada de óxido. No processo, ocorre a difusão dos átomos metálicos para a superfície do óxido e a difusão do oxigênio iônico da superfície do óxido para a interface metal-óxido. Segundo Kasemo, para a biocompatibilidade dos implantes de Ti, as propriedades e a espessura dos óxidos são tão importantes quanto as do metal.

Isso tem conduzido muitos estudos sobre a resposta biológica do Ti, no local de sua implantação. A finalidade é definir com maior precisão as propriedades interfaciais do metal e do tecido vivo. Na interface implante-corpo pode ocorrer uma série de reações, sendo as reações mais significativas, no caso do Ti: a produção de  $H_2O_2$  pelas células inflamadas e a reação de  $H_2O_2$  com íons metálicos, gerando radicais hidroxilas. O óxido nativo de Ti isola o tecido de uma descarga de elétrons e de um fluxo de íons provenientes do metal. Assim, os implantes de Ti que recebem um revestimento extra de  $TiO_2$  antes da implantação induzem a uma menor reação do tecido.

### 3.3 Osseointegração

O fenômeno da osseointegração foi observado pela primeira vez, por Brånemark em 1969, durante estudos clínicos experimentais *in situ* e *in vivo* sobre a regeneração de medula óssea em coelhos. Brånemark (1985) definiu o termo “osseointegração” como sendo a conexão direta, estrutural e funcional entre osso organizado e vivo e a superfície de um implante submetido a cargas funcionais.

A superfície do Ti é capaz de realizar uma ligação direta com o tecido ósseo, promovendo a firme fixação do implante com o osso. A interação implante-tecido depende em parte das características superficiais do implante, incluindo formato, rugosidade, composição, microestrutura, camada de óxidos e possíveis contaminantes (KASEMO, 1983). A fim de compreender o processo de ligação entre o implante e o tecido ósseo é muito importante que se conheçam as propriedades do filme óxido de titânio (KUROMOTO, 2007).

Visando o entendimento do processo de osseointegração, muitas investigações têm sido direcionadas para modificações da rugosidade superficial. Embora o percentual de contato entre o osso e implante, suficiente para uma estabilidade duradoura, ainda seja desconhecido, a noção de senso comum de que “quanto mais contato melhor” tem motivado os pesquisadores na busca de uma ancoragem dos implantes.

Martin *et al.* (1995), em estudos *in vivo*, mostraram que superfícies rugosas, em comparação com as lisas, proporcionam uma melhor fixação ao osso. Segundo Zhu (2001), superfícies porosas favorecem o crescimento de células do tecido ósseo para seu interior, melhorando a fixação do implante. Dessa forma, o crescimento ósseo está diretamente ligado ao tamanho dos poros na superfície do implante, conforme a Tabela 3.1 (PILLIAR, 1983).

Tabela 3.1 Crescimento tecidual ósseo de acordo com o tamanho dos poros (PILLIAR, 1983).

<b>tamanho de poros</b>	<b>crescimento tecidual ósseo</b>
diâmetro menor que 100µm	não há formação óssea dentro do poro
diâmetro menor que 150µm	pré-formação óssea dentro do poro
diâmetro até 300µm	crescimento mais rápido para dentro do poro
profundidade maior que 2000µm	não há crescimento ósseo efetivo ao longo do poro

O motivo para a utilização de implantes microporosos é possibilitar o crescimento ósseo no interior do implante e auxiliar na fixação biológica desse. Com relação à dimensão dos poros, Hulbert (1971) demonstrou que poros maiores que 100µm favorecem a vascularização e permitem o crescimento do osso através do material. Esse tamanho de poro está relacionado à necessidade de haver irrigação sanguínea e fornecer suprimento nutricional ao tecido conectivo em crescimento, além de servir de suporte para a fixação de células ósseas, capazes de induzir a restauração do osso.

Vários tratamentos físicos e químicos da superfície do Ti têm sido propostos com o objetivo de obter uma eficaz osseointegração em implantes ósseos (SUL, 2001). O interesse em desenvolver superfícies dentro do universo da micro e da nanoescala, tem incentivado a investigação de novas técnicas de modificação e de aprimoramento de recobrimentos superficiais. As técnicas que produzem porosidades, rugosidades e que formam camadas extras de TiO<sub>2</sub> na superfície são favoráveis no desempenho biológico dos implantes.

### 3.4 Processo de corrosão eletroquímica por pite em superfícies de Ti

Define-se corrosão por pites como uma forma de corrosão localizada que acontece em superfícies expostas de metais. O ataque por pite (*pitting*) ocorre basicamente em metais válvula, recobertos por óxidos protetores. Esse tipo de corrosão deve-se à presença de íons agressivos no meio e se inicia nas imperfeições ou inclusões de outros metais no óxido.

#### 3.4.1 Tipos de corrosão por pites

Galvele (1978) realizou uma pesquisa de revisão bibliográfica em relação ao processo de iniciação da corrosão por pite. Nesta revisão foram citados três tipos fundamentais de corrosão por pites, de morfologia similar, mas com mecanismos de formação diferentes:

- Depassivação eletroquímica.
- Depassivação química.
- Ataque químico metalográfico de determinados metais.

Nesse estudo foi concluído que a depassivação eletroquímica é a forma de corrosão por pites mais comum e a mais relevante. A depassivação eletroquímica geralmente aparece em metais passivos e acontece como resultado de uma acidificação localizada na interface metal-solução. As soluções podem ser tanto neutras quanto alcalinas, contendo ânions agressivos. Uma característica importante da depassivação eletroquímica é a existência de um potencial característico, chamado potencial de pite,  $E_{\text{pite}}$ , que representa uma medida da resistência à corrosão por pites.

### 3.4.2 Nucleação do pite

A corrosão por pites pode ocorrer quando o potencial do metal,  $E_{\text{metal}}$ , supera o potencial de pite  $E_{\text{pite}}$ , em um meio qualquer e numa ampla faixa de pH e de potenciais. Neste caso, o potencial aplicado deverá se encontrar na região passiva, de modo que a maior parte do metal permaneça passiva. Além disso, o potencial redox do par deverá ultrapassar um determinado valor de potencial para assim poder iniciar a corrosão por pites.

Em soluções quase-neutras, esse valor de potencial crítico é atingido através da presença de oxigênio dissolvido na solução. No entanto, a presença de cátions metálicos oxidantes (como por exemplo,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ) no eletrólito faz com que haja um desenvolvimento rápido do ataque localizado, em comparação ao desenvolvimento do ataque em soluções com oxigênio dissolvido. Nessas soluções o potencial redox do par é maior que o potencial crítico e, dessa forma, essas soluções são utilizadas para testar a resistência à corrosão por pites em ligas metálicas. O pite acontecerá de forma espontânea apenas quando o  $E_{\text{pite}} < E_{\text{corrosão}}$  (SHEIR, 1976).

Segundo Galvele (1978), o potencial de pite e o potencial de repassivação não dependem somente da cinética dos processos envolvidos, mas também, das características geométricas e superficiais das amostras. A corrosão por pites acontece apenas em metais que apresentem superfícies expostas a soluções com ânions denominados agressivos.

### 3.4.3 Influência dos ânions agressivos na corrosão por pites

A maioria das pesquisas afirma que a adsorção de ânions agressivos é o primeiro estágio da nucleação e crescimento dos pites e que, o conteúdo desses ânions na superfície do eletrodo aumenta quando o potencial aplicado aumenta (HUO, 1990), (PETIT, 1980). Galvele (1978) concluiu que em metais que formam óxidos altamente insolúveis (geralmente os metais válvula), só os ânions de ácidos fortes são agressivos, enquanto que, em metais que formam óxidos menos estáveis (zinco, manganês) apenas os ânions de ácidos fracos podem produzir a quebra da passividade. Dentre os íons denominados agressivos para o Ti, o mais comum é o cloreto, de ampla distribuição na natureza, no entanto, também são classificados como agressivos outros ânions, tais como, brometos, iodetos e fluoretos.

Com relação aos processos iniciais que conduzem à ruptura do filme passivo e, portanto, à interação dos ânions agressivos com o filme, sabe-se muito pouco. Tanto os processos que ocorrem na interface filme-solução, quanto àqueles que ocorrem dentro do filme, são dependentes da composição e da estrutura do filme passivo. Essas características estruturais, que são em grande parte as responsáveis pelo início da corrosão localizada, dependem da:

- Composição do material.
- Presença e distribuição de microdefeitos (vacâncias, vazios, etc.).
- Macrodefeitos (inclusões, tamanho e forma de partículas de segunda fase).
- Estrutura cristalina.
- Grau de não-cristalinidade do filme passivo.

Outros fatores que também influenciam na corrosão por pites são:

- Composição, concentração e pH do eletrólito.
- Potencial aplicado.
- Temperatura do teste.

#### 3.4.4 Potencial de Pite ( $E_{\text{pite}}$ )

A corrosão por pites apresenta dois potenciais característicos: potencial de pite ( $E_{\text{pite}}$ ) e potencial de repassivação ( $E_{\text{rep}}$ ). Para valores de potencial acima do  $E_{\text{pite}}$  acontece um rápido incremento da corrente ( $I$ ) devido à nucleação de pites sobre a superfície passiva.

Como o potencial de pite ( $E_{\text{pite}}$ ) envolve a nucleação de pites, este é um valor dependente das condições superficiais da amostra e da composição da solução. No entanto, testes realizados em Ti e ligas Ti-6Al-4V em 1M NaBr a 25°C indicam que o potencial de repassivação do pite ( $E_{\text{rep}}$ ) é independente da preparação da amostra e dependente da composição da solução nos pites (SCHEIVE, 1978).

Devido à presença de óxido protetor na superfície, o Ti, em soluções aquosas, apresenta um  $E_{\text{pite}}$  muito elevado ( $E_{\text{pite}} \gg 1\text{V}$ ), em comparação com a maioria dos metais válvula, assim o potencial de corrosão do Ti ( $E_{\text{corr}}$ ) apresenta um valor muito mais elevado. Portanto, em soluções de sulfatos e fosfatos os potenciais de pite excedem os +80V [ENH] e em presença de cloretos, encontram-se na faixa de +5 até +10V. Por essa razão, soluções fosfóricas ácidas e sulfúricas diluídas (e seus sais) são eletrólitos típicos para anodizar o Ti, gerando o crescimento de uma camada protetora de óxido. Já em soluções de sais de halogênios o Ti e suas ligas exibem um  $E_{\text{pite}}$  menor (SCHUTZ, 1990).

Raja (2005b) estudou o comportamento eletroquímico de Ti em solução de 0,5M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  com pequenas adições de ânions da família dos halogênios, em temperatura ambiente. A anodização de Ti, em 0,5M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  + 0,138M  $\text{F}^-$  (NaF ou HF) resultou num óxido de estrutura nanotubular auto-ordenada. No entanto, Raja observou que a adição de íons brometos e cloretos na solução 0,5M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  resulta em pites micrométricos e nenhum óxido de porosidade nanométrica é observado. Nesse estudo, o autor conclui que a adição de fluoreto é necessária para que se forme uma estrutura auto-ordenada, enquanto que em uma solução neutra de fluoreto não se observa a formação de uma camada de óxido com nanoporos.

### 3.4.5 Potencial de repassivação ( $E_{rep}$ )

Outro parâmetro característico no processo de corrosão por pite, é o chamado potencial de repassivação. O potencial de repassivação ( $E_{rep}$ ) é definido como o mínimo potencial no qual os pites já nucleados pode ser mantido (SCHEIVE, 1978).

Na corrosão por pites, os pites nucleiam em um determinado potencial, igual ao potencial de pite e crescem até potenciais maiores que esse. Os pites se manterão crescendo mesmo que o potencial diminua até valores menores que o potencial de pite, parando de crescer somente se o potencial for menor que um determinado valor, chamado de potencial de repassivação. Os valores do  $E_{rep}$  do Ti são também muito elevados com respeito ao  $E_{corr}$  desse metal, isso mostra que o Ti e suas ligas são altamente resistentes à corrosão localizada.

### 3.4.6 Ruptura do filme passivo

Existem diferentes modelos para explicar a ruptura de filmes passivos, alguns desses propõem que antes da nucleação há a penetração de íons agressivos no filme passivo, já em outras é sugerida a diminuição da espessura do filme até que o metal fique exposto à solução de íons agressivos. Em outros modelos é sugerida a ruptura mecânica do filme passivo.

Casillas *et al.* (1994) investigaram a ruptura em óxidos nativos e em óxidos anódicos crescidos sobre o Ti. Os autores observaram que existe uma correspondência direta entre a localização dos sítios eletroativos e a corrosão por pites, indicando que a ruptura do óxido está associada com sítios de alta condutividade elétrica.

Garfía-Mesias *et al.* (1998) conduziram a de corrosão por pites de Ti policristalino, em soluções de brometos, para identificar sítios ativos (precursores da corrosão por pites). Os resultados mostraram que a maioria dos pites nucleia nos locais das partículas pré-identificadas, apresentando produtos de corrosão oclusos dentro dos pites.

Dudagle (1964) obteve os potenciais de pites para o Ti ( $E_{pite}$  [ENH]), em soluções de halogênio, na seguinte ordem:  $Br^-$  (2,24) <  $I^-$  (3,74) <  $Cl^-$  (10,44) <  $F^-$  (50,24V) e as respectivas densidades de corrente na qual o pite nucleia ( $i_{pite}$ ):  $0,017 < 0,1 < 1,67 < 8mA/cm^2$ . Nesse estudo foi observado que o alto  $E_{pite}$  e a alta densidade de corrente obtida para o  $F^-$  sugere que a corrosão localizada é provavelmente acompanhada pela dissolução e centelhamento do óxido.

Rabboh (1971) apresentou valores de  $E_{\text{pite}}$  para o Ti, em soluções de íons agressivos, na seguinte ordem de agressividade:  $\text{Br}^- (1,4) < \text{I}^- (1,8) < \text{Cl}^- (9,6\text{V})$ . Os resultados mostraram que a corrosão por pites ocorre para potenciais significativamente menores em soluções de brometos comparadas com soluções de cloretos, sugerindo uma forte interação química entre  $\text{TiO}_2$  - brometos. O mecanismo de ruptura proposto nesse trabalho está baseado no fato de que o potencial depende da dissolução química em sítios microscópicos do óxido.

Huo *et al.* (1990) estudaram o processo de nucleação dos pites de Ti Cp em soluções de brometos e verificaram que, em potenciais aplicados acima do  $E_{\text{pite}}$ , a quantidade de brometos acumulados em um determinado local da superfície do eletrodo atinge um valor mínimo e necessário de concentração para formar núcleos de brometos. Dessa forma, os autores constataram que a nucleação dos pites deve-se aos íons brometos adsorvidos na superfície do filme de  $\text{TiO}_2$ , que reagem com o filme formando  $\text{TiBr}_4$  e destroem o filme passivo devido à hidrólise do  $\text{TiBr}_4$ .

#### 3.4.7 Pites metaestáveis e estáveis

A corrosão por pites inicia com a nucleação de pites metaestáveis, podendo esses pites, no decorrer se tornarem estáveis. Os pites metaestáveis são muito pequenos, mas crescem e se repassivam em poucos segundos. Segundo Frenkel *et al.* (1987), em potenciais abaixo do potencial de pite,  $E_{\text{pite}}$ , a corrente apresenta um rápido aumento quando um pite metaestável nucleia e começa a crescer. Forma-se, então, uma camada de produtos de corrosão dentro do pite e apenas quando essa cobertura é rompida o pite repassiva, com uma diminuição da corrente.

Smialowska (1999) reportou que a diferença entre o pite estável e o metaestável acontece no primeiro estágio do desenvolvimento do pite. O pite mostrará um crescimento estável apenas quando a camada de produtos de corrosão permanecer intacta durante um tempo suficiente para permitir que se precipite um filme de sal na sua superfície (FRENKEL *et al.*, 1987). No pite metaestável, apenas o primeiro estágio do desenvolvimento do pite ocorre, estando ausente o filme de sal.

### 3.4.8 Cinética de crescimento dos pites

Smialowska (1999) concluiu que o crescimento de pites é determinado por eventos que ocorrem na interface metal-solução no pite. As propriedades físicas e químicas do filme passivo têm forte influência na formação do pite e têm uma importância secundária durante o seu crescimento. Para manter um crescimento estável são necessárias altas concentrações de íons agressivos dentro do pite e um alto pH para produzir condições agressivas no interior desse, a fim de obstruir a repassivação. O autor sugere que durante os estágios iniciais, o crescimento do pite estável é desenvolvido sob “controle ôhmico”, como resultado da presença de bolhas de gás oxigênio e de um filme de sal de alta resistência. Após o crescimento sob “controle ôhmico”, a tendência do pite é crescer sob “controle por difusão”. A presença do filme de sal regula o transporte de íons através dos produtos de corrosão oclusos, limitando a solução dentro do pite e garantindo a repassivação do pite.

### 3.4.9 Morfologia das bordas

Yahalom (1973) analisou a presença de filmes finos os quais praticamente fecham a borda dos pites formados em aço Austenítico 304 e soluções de NaCl ou NaBr e observou que a região lateral dentro do pite é protegida. Esses estudos indicam que os filmes presentes no degrau da borda, que recobrem as cavidades formadas pelo processo de corrosão por pites, foram originalmente filmes passivos. A proteção é oferecida pelo filme passivo remanescente, que se prolonga no sentido do pite e atua como se fosse um toldo na borda da abertura. O crescimento lateral do pite é fundamentalmente uma sequência de eventos de enfraquecimento (crescimento lateral e repassivação), assemelhando-se, assim, ao crescimento de pites metaestáveis.

Ernst (2002) estudou o crescimento de pites em aço Inoxidável 304 sob diferentes condições de potencial e temperatura. O estudo demonstrou que o crescimento do pite em profundidade segue uma lei parabólica com o tempo e é independente do potencial, enquanto que o crescimento lateral é linear em relação ao tempo e depende desse potencial.

#### 3.4.10 Efeito da concentração de brometos sobre o potencial de pite

Observa-se, usualmente, que o potencial de incubação de um pite em um metal, diminui quando a concentração do íon agressivo aumenta. Guiñon *et al.* (1994) informaram que a corrente de corrosão é proporcional ao aumento da concentração de íons brometos seguindo uma lei parabólica para aço Temperado (UNS G41350), uma relação linear no caso de aço Inoxidável Austenítico (UNS S31603) e uma relação constante para liga de titânio Ti-6Al-4V (UNS R56400) em soluções de brometos.

Beck (1971) apresentou uma relação linear entre a densidade de corrente e a concentração de íons brometos, para concentrações de 0,06M até 4M e uma declividade de 0,27, quando é aplicado um potencial de +1,64V [ENH] sobre titânio puro. Para valores de concentrações menores que 0,02M não foram achados pites. O  $E_{\text{pite}}$  em estado estacionário diminui quando aumenta a concentração de íons Brometos, achando-se uma relação linear com a declividade de 0,13V [ENH] por década de concentração. Define-se como concentração mínima de íons agressivos aquela que não afeta a curva de polarização do metal em solução ácida (DUGDALE, 1964).

#### 3.4.11 Efeitos da temperatura sobre a corrosão por pites

Foram sugeridas muitas teorias que tentam explicar o comportamento eletroquímico do pite, em relação ao efeito da temperatura e do pH. No entanto, não há uma concordância geral nas teorias propostas, que elucidem a influência desses parâmetros, avaliados sozinhos ou concomitantemente, na corrosão por pite.

Beck (1971) avaliou  $E_{\text{pite}}$  para o Ti em soluções de brometos, cloretos e iodetos em função da temperatura. Os resultados mostraram que, em soluções de cloretos, o  $E_{\text{pite}}$  diminui drasticamente com o aumento da temperatura, tendendo assintoticamente, com a elevação da temperatura, a um valor de 1,24V [ENH], em 200°C. O  $E_{\text{pite}}$ , em brometo, apresentou um valor constante de 1,14V [ENH], entre 25°C e 180°C, e sofreu um rápido aumento para 2,04V [ENH], em temperaturas abaixo de 25°C. As soluções de iodetos apresentaram comportamentos mais complexos, com o aumento do  $E_{\text{pite}}$  de 1,48V [ENH], em 0°C até 2,24V [ENH], em 30°C e para valores maiores de temperaturas, não ocorreu a nucleação de pites.

Casillas *et al.* (1994) estudaram o comportamento do  $E_{\text{pite}}$ , para o Ti passivado por óxido nativos, em soluções de 1M KBr + 0,05M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 1,5, e temperatura de 0°C e de 22°C. Os autores encontraram, em concordância com Beck (1973), que o começo da corrosão por pites é deslocado para valores mais positivos, com valores de 2,24±1,24V [ENH], na medida em que a temperatura diminuía. As observações indicaram que o processo de pite é termicamente ativado.

Um outro parâmetro foi sugerido para avaliar a resistência à corrosão por pites, o qual é definido como temperatura crítica de pite (TCP). A determinação desse valor consiste na aplicação de um potencial anódico no material, em uma solução com íons agressivos e temperatura ambiente. Durante o experimento, a temperatura é incrementada lentamente e é registrada a respectiva resposta da corrente. Quando ocorre um aumento significativo da corrente, tem-se o começo da corrosão por pites, sendo esse o valor da TCP do material.

Levando-se em conta as condições críticas para a precipitação de uma camada de sal no interior do pite, Laycock (1998) definiu a TCP como a temperatura abaixo da qual a precipitação do sal dentro do pite estabiliza o processo de dissolução anódico e provoca a formação de um óxido anódico, ocasionando a passivação do pite.

#### 3.4.12 Efeito do pH da solução sobre a corrosão por pites

Guiñon *et al.* (1994) estudaram a corrosão entre distintos aços comerciais e a liga de titânio Ti-6Al-4V (UNS R56400), em soluções de LiBr. Utilizando medidas eletroquímicas, foram considerados os seguintes parâmetros: a concentração, o pH e a temperatura da solução. Os autores observaram que, em soluções ácidas ( $0,4 < \text{pH} < 2,1$ ) a velocidade de corrosão, tanto para os aços comerciais, quanto para a liga de titânio, depende fortemente do pH. Esse resultado deve-se ao fato de que nessa faixa de pH a reação catódica é a evolução de hidrogênio. Já em soluções com valores intermediários de pH ( $5 < \text{pH} < 9$ ), a corrosão não é dependente do pH e a redução de H<sup>+</sup> não é a reação mais importante. Finalmente, para valores de pH > 9, observaram que a densidade de corrente de corrosão diminui devido à formação de camadas passivas.

### 3.5 Processo de anodização eletroquímica em superfícies de Ti

Reações de transformação anódica apresentam um significativo desempenho na ciência e na tecnologia da síntese eletroquímica. A anodização, além de formar uma camada extra de TiO<sub>2</sub>, ainda pode transformar a topografia da superfície. Amarante (2001) estudou o comportamento da matriz extracelular em função da textura topográfica do implante no processo de osseointegração. Esse estudo mostrou que o osso se deposita indistintamente em superfícies rugosas ou lisas. A rugosidade, portanto, não é condição necessária para a deposição de tecido ósseo. Entretanto, as características texturizadas desempenham um papel preponderante no percentual de osso neoformado (SCHAEFFER, 2007) sobre a superfície do implante, promovendo maior contato osso-implante e favorecendo contatos mais rápidos.

#### 3.5.1 Teorias do processo de formação de óxidos barreira

As primeiras teorias sobre a anodização de Ti foram interpretadas com base no modelo de Cabrera e Mott (1948-1949). Os autores propuseram um detalhado modelo de crescimento de óxido em atmosfera de oxigênio ou em eletrólitos, assumindo que há difusão de cátions do metal até a interface óxido-eletrólito. Esse movimento catiônico deve-se a um mecanismo de saltos, auxiliado por um campo termicamente ativado. Para baixas intensidades de campo elétrico, a densidade de corrente é proporcional ao campo ou gradiente de potencial, isto é, um comportamento ôhmico. Nessas condições, o aumento da espessura do óxido é constante.

O Modelo de Alto Campo (*High Field Model* - HFM) é tido como a mais conveniente das teorias. O modelo descreve a formação de filmes não porosos e se aplica em muitos metais, especialmente a metais válvula, tais como o titânio, sob filmes finos (< 30nm). O HFM pressupõe que a intensidade do campo elétrico através do filme diminui com o aumento da espessura. Para altas intensidades de campo potencial, há mobilidade de íons somente em uma direção. Neste caso, o comportamento é ditado pela expressão, a seguir:

$$i = i_0 \cdot \exp(\beta E) \quad (1)$$

Onde:  $i$  = densidade de corrente de formação do óxido.  
 $i_0, \beta$  = coeficientes que dependem do material.  
 $E$  = intensidade de campo elétrico dentro do óxido.

Como não há equilíbrio no intercâmbio de íons, não há equilíbrio na interface metal/óxido. Cada íon que escapa através da interface metal-óxido migra através do filme e forma uma camada adicional na interface metal-eletrólito. O passo determinante nesse modelo é o escape de cátions desde o metal, conforme proposto por Cabrera e Mott (1948-1949).

### Camada barreira em metais válvula

Os metais válvula, de um modo geral, são cobertos por um filme de óxido passivo que protege o metal base contra corrosão. Em um eletrólito, o óxido funciona como uma barreira para o fluxo de íons e elétrons, reduzindo a razão de oxidação em valores muito baixos.

A anodização de metais válvula é um processo eletroquímico de aumento da espessura inicial de seus óxidos. Durante a anodização de Ti, em eletrólito conveniente, é observado um aumento da resistência elétrica devido à formação de uma camada de óxido barreira, de características isolantes, na superfície (LOHRENGEL, 1993).

As taxas de transferência dos elétrons dependem fortemente do par redox e das propriedades do filme (espessura, inclusões de impurezas, concentração e transporte de cargas). Os filmes óxidos crescidos anodicamente sobre Ti se comportam como semicondutores do tipo *n* e sua cinética de crescimento é normalmente explicada pelo HFM.

Smeltzer (1961) propôs um modelo para a oxidação de titânio, zircônio e háfnio, baseado no conceito de difusão de ânions através de caminhos de baixa resistência, tais como os limites de grãos e as discordâncias, concomitantemente com caminhos de alta resistência, como a difusão via intersticial.

### 3.5.2 Estrutura dos óxidos

Em uma atmosfera natural o óxido termodinamicamente estável é o TiO<sub>2</sub>, que pode existir em três estruturas cristalinas: anatásio e rutilo (estruturas tetragonais) e brookita (estrutura ortorrômbica). Já a estrutura cristalina e a estequiometria de filmes anódicos são influenciadas pelas condições de formação desse filme, durante a anodização de Ti.

Alguns estudos indicam que o filme passivo formado por anodização é amorfo (POUILLEAU *et al.*, 1997), (FINI *et al.*, 1999) e (SUL *et al.*, 2001). Outros estudos concluem que o filme anódico é uma mistura cristalina de anatásio e rutilo com espécies incorporadas do eletrólito. Segundo Zhu (2001), os filmes de óxidos formados eletroquimicamente na superfície do Ti podem ser amorfos ou cristalinos.

Ferdjani *et al.* (1990), em trabalhos realizados sobre anodização potencioestática do Ti em  $H_3PO_4$ , observaram a formação de muitos óxidos e sub-óxidos cristalizados em diferentes sistemas cristalinos. Desse estudo foi concluído que a oxidação anódica desse metal é um fenômeno complexo, com fase predominante  $TiO_2$ , nas três formas cristalográficas anatásio, rutilo e brookita.

Em geral, a estrutura anatásio é obtida através da oxidação anódica e a estrutura rutilo, através da oxidação anódica seguida por um tratamento térmico (KURUMOTO, 2007). Segundo Marino *et al.* (2001), diferentes óxidos, além do rutilo e anatásio ( $TiO_2$ ), os sub-óxidos  $TiO$ ,  $Ti_2O_3$  e  $Ti_2O_3-TiO_2$  (ortorrômbico) e  $Ti_3O_5$  (monoclínico) também podem estar presentes no filme óxido anódico, sendo o  $TiO_2$  o mais estável e o principal constituinte do filme.

### 3.5.3 Composição dos óxidos

A propriedade protetora dos filmes anódicos pode ser reforçada pela incorporação de elementos provenientes do banho eletrolítico. A presença de grandes quantidades de íons incorporados no filme anódico, durante a anodização, pode produzir alterações estruturais no óxido. Lausma *et al.* (1990) mostraram que a composição química do óxido  $TiO_2$  formado por anodização, pode ser modificada por adsorção e/ou incorporação de espécies iônicas, quando são utilizados  $H_3PO_4$  e  $H_2SO_4$  como eletrólitos.

Zhu (2001) realizou o crescimento de um filme de Ti anódico, poroso e cristalino, em um eletrólito de glicero-fosfato de cálcio e acetato de cálcio e obtiveram uma superfície com alto conteúdo de cálcio e fósforo. Essas incorporações produziram um filme de óxido com capacidade de oferecer uma maior resposta biológica em implantes de Ti.

#### 3.5.4 Espessura dos óxidos

A coloração do óxido anódico produzido é um indicativo da espessura do filme (KURUMOTO, 2007). Tanto o estado de oxidação do Ti no óxido, e conseqüentemente sua estequiometria, quanto a relação entre a cor e a espessura do óxido dependem fortemente do processo de anodização e da natureza do eletrólito utilizado.

Sul *et al.* (2001) observaram que a velocidade de formação do óxido de Ti é maior em eletrólitos ácidos, em comparação com eletrólitos alcalinos. Isso se deve ao fato de que, em eletrólitos ácidos, a velocidade de formação excede amplamente a velocidade de dissolução do óxido.

#### 3.5.5 Processo de anodização porosa de Ti após centelhamento

Para cada sistema metal+eletrólito há uma voltagem máxima que limita o crescimento do óxido. Se o potencial de formação do óxido anódico supera um determinado valor, um colapso elétrico ocorre e se observam algumas pequenas centelhas (*sparks*) em toda a superfície do ânodo. Este fenômeno é conhecido como quebra do dielétrico (*electrical breakdown*). O centelhamento (*sparking*) sucede quando o óxido é submetido a gradientes de potencial extremamente altos, ocasionando a ruptura do óxido anódico. Nessa etapa o óxido formado deixa de ser barreira e começa a se tornar poroso. Essas reações permitem a evolução de oxigênio gerando a incorporação de espécies do eletrólito no óxido. A anodização de metais válvula acima do potencial de quebra do dielétrico pode produzir finos recobrimentos com microns de espessura, dependendo das condições de anodização.

Durante a anodização, numerosos transientes de pequenos centelhamentos são produzidos até alcançar altas voltagens de anodização. Nesse processo, há o espessamento da fina camada, garantindo o crescimento de um novo recobrimento e alterando os sítios do centelhamento. A ruptura desse óxido pode estar associada à transformação da estrutura cristalina do óxido durante o aumento de potencial.

A formação do filme óxido anódico barreira em metais válvula é geralmente limitado pelo fenômeno de centelhamento. Para cada eletrólito utilizado durante o processo de anodização, existe uma voltagem máxima que limita o crescimento normal do óxido.

Segundo Albella (1987), o centelhamento está relacionado à falta de homogeneidade no filme, tal como fissuras e poros. Para Ikonopisov (1979), o centelhamento se deve ao alto potencial alcançado, provocando a injeção de elétrons dos centros de impurezas, ou por falhas do óxido até as bandas de condução, gerando uma avalanche de elétrons. Em uma outra interpretação, Montero (1985) propõe que os elétrons que produzem a avalanche provêm das espécies incorporadas no óxido durante a anodização.

O processo de centelhamento resulta em um filme cristalino e com elementos incorporados do eletrólito, devido à fusão localizada (SCHRECKENBACH *et al.*, 1999). Segundo Delplancke (1988), os íons incorporados no óxido anódico de Ti, em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, teriam relação direta com o centelhamento. Albella *et al.* (1985) afirmaram que as propriedades de ruptura do óxido na interface óxido-eletrólito seriam controladas pela habilidade das espécies componentes do eletrólito em se incorporarem no óxido durante a anodização.

Ferdjani *et al.* (1993) estudaram a cinética de oxidação e a incorporação de ânions, durante a anodização do Ti em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Os autores observaram que durante a ruptura do dielétrico há um aumento percentual de fósforo incorporado, devido à concentração do eletrólito. O filme formado nessa anodização é composto por uma mistura de: óxidos de titânio, de fosfatos e fosfetos de titânio. Maffia (2005) observou através do aumento da relação P/O, um aumento na incorporação de fósforo, relacionado a um grande aumento de potencial, que pode estar relacionado ao forte centelhamento no óxido de titânio em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

O fenômeno de ruptura do óxido de titânio é definido pela evolução de oxigênio e está associado à mudança na cristalinidade do óxido, em estrutura amorfa para cristalina durante a anodização. Schreckenbach *et al.* (1999) observaram que o estado tipo plasma produz gases, particularmente O<sub>2</sub>, e vapor os quais seriam os responsáveis pelos nanoporos.

Ohtsuka (1986) avaliou, através de espectroscopia Raman, os óxidos de titânio produzidos em soluções neutras de fosfatos e em soluções ácidas de sulfatos sob diferentes potenciais. As análises revelaram que os óxidos anódicos mudam de amorfo para cristalino assim que o potencial aplicado ultrapassa um determinado valor, sendo esta mudança de fase acompanhada por uma alteração na morfologia e na cristalinidade (para anatásio) da superfície.

Usando o mesmo tipo de análise, Maffia (2005) observou uma estrutura, inicialmente amorfa, transformando-se suavemente em rutilo. O aumento da fase rutilo ocorreu em função do aumento de potencial de 25V para 75V. Após esse valor houve um grande crescimento da fase anatásio, o que pode estar ligado ao forte centelhamento, em torno de 100V.

### 3.5.6 Processo de anodização porosa nanotubular do Ti

Na oxidação potencioestática de Ti, em eletrólito que tenha ação dissolvente sobre a camada de óxido, a densidade de corrente diminui rapidamente. Observa-se, então, a formação de uma camada de óxido contínua e compacta, chamada de camada barreira, que impede a passagem da corrente elétrica. A espessura final dessa camada representa a distância que um íon metálico pode alcançar através do óxido, sob a influência de um dado potencial.

A camada barreira formada é composta por células hexagonais sobrepostas, onde o centro de cada hexágono será formado de um óxido amorfo pouco resistente aos ácidos e na parte externa do hexágono se formará um de óxido cristalino, muito resistente aos ácidos. Aparece então na superfície da camada barreira, muitos pontos de ataque que são consequência do efeito da dissolução da camada pelo eletrólito. O princípio de formação dos pontos de ataque é produzido no centro das células do óxido de titânio. Esta nucleação de poros constitui o começo dos poros, formando assim uma camada porosa.

Cada ponto de ataque (poro) pode ser considerado como uma fonte de corrente, a partir da qual irá se desenvolver um campo de potencial. Os íons que se apresentam na interface óxido-eletrólito fornecem o oxigênio que transforma em óxido a porção reatacada. Simultaneamente a ação de dissolução do eletrólito continua se manifestando na base dos poros, tendendo a diminuir a espessura da camada barreira que se dissolve. Os poros se alongam, fazendo com que os íons penetrem mais facilmente. Durante este processo ocorre a liberação de calor, o que tende a favorecer a dissolução.

Broughton (1995) examinou, por microscopia eletrônica de varredura, micrografias de Al anodizado potencioestaticamente em ácido sulfúrico, ácido fosfórico e oxálico e observou que a superfície anódica tubular produzida possuía poros simétricos no topo. A partir da simetria existente nos células, o autor propôs um modelo baseado no fato de o raio das células, o raio do poro e a espessura da camada barreira eram proporcionais à voltagem.

Um dos mecanismos propostos para a formação de cavidades no filme óxido de titânio é aquele que envolve a condensação de cátions ou vacâncias do metal. Estes defeitos ocorrem na região abaixo da camada barreira, a qual se caracteriza por uma alta difusividade de vacâncias de cátions, devido ao alto grau de desordem da rede. A condensação das vacâncias causa decoesão local da camada barreira do substrato, e conseqüentemente, inibe o crescimento da camada barreira do substrato nessas regiões.

As cavidades formadas existem sobre protuberâncias do substrato dentro da camada barreira. Nessa fase não existe, nas cavidades, ânions incorporados da solução, demonstrando que a fase se forma diretamente da interface metal-óxido pelo transporte de oxigênio. O tamanho dessas cavidades aumenta com o aumento da voltagem no processo de anodização.

Berenek (2003) estudou o efeito de pequenas adições de HF em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na formação da camada nanotubular porosa de TiO<sub>2</sub>. O autor observou, no começo da anodização potencioestática, uma morfologia irregular no óxido. Isso indica que há uma competição entre a formação de poros oxidados e a sua dissolução. Esse equilíbrio dinâmico inicial controla o desenvolvimento da porosidade e a espessura da camada de óxido formada.

Um dos parâmetros importantes na anodização é a tensão aplicada durante o processo. A tensão aplicada determina a porosidade das camadas anódicas, sendo que baixas voltagens propiciam grande número de poros de tamanhos muito pequenos, enquanto que voltagens mais altas resultam em um número pequeno de poros de tamanhos maiores. Bayoum *et al.* (2006) observaram que o aumento do potencial e do tempo de anodização de (Ti-8 at.% Al), em 1M NaOH com pequenas quantidades de HF, resulta em nanotubos mais desenvolvidos. Nesse caso, a densidade e os diâmetros internos e externos dos poros são maiores.

A densidade de corrente também tem influência na anodização. Se esta for mantida constante durante a anodização, a espessura produzida é diretamente proporcional ao tempo. Caso a densidade de corrente diminua, em virtude da voltagem constante, o tempo de anodização aumentará e a espessura da camada anódica será reduzida. Contudo, a espessura é limitada pelo fato de que, enquanto a camada está sendo formada eletroquimicamente ocorre, ao mesmo tempo, uma dissolução química parcial da mesma.

O aumento da espessura resultará num aumento da área exposta à solução e, com isso, uma maior dissolução da camada. Portanto, a razão de formação eletroquímica e a razão de dissolução química da camada são iguais. Desse modo, se o tempo da anodização for prolongado não ocorrerá um aumento da camada de óxido. Porém a camada externa poderá se tornar pulverulenta, sem praticamente nenhum valor de proteção (OLIVEIRA, 2001).

Varghese *et al.* (2003) estudaram a transformação de fase em óxidos nanotubulares de titânio anodizados em meios seco e úmido de atmosfera de argônio e verificaram que tubos cristalizados em atmosfera de argônio permanecem na fase anatásio até 280°C na região dentro do tubo. Os cristalitos apresentaram a completa transformação para rutilo em 620°C em meio seco e em 570°C em meio úmido. Já em atmosfera úmida de argônio, a espessura da camada formada foi menor, em comparação à camada formada em atmosfera seca.

### 3.6 Osteoindução versus osteocondução

Infelizmente o Ti, osteoindutor, apresenta uma pobre característica osteocondutiva. Desta forma, um recobrimento bioativo sobre a superfície desse metal poderia melhorar o crescimento ósseo em direção ao implante. Segundo Najdoski (2001), um recobrimento bioativo apropriado pode aperfeiçoar a fixação ao tecido ósseo natural e melhorar o tempo do processo osteocondutivo.

### 3.7 Camadas bioativas de fosfato de cálcio sobre Ti

As características químicas da superfície do implante também são relevantes para o processo de ligação osso+implante. A natureza dessa ligação pode ser favorecida pela ligação química existente entre as hidroxilas do rutilo, presentes no óxido do implante de Ti, e os componentes orgânicos do osso. Os componentes bioativos na superfície do implante criam uma aproximação biomimética do tecido ósseo, pois imitam o processo de mineralização do osso. Esses componentes são conhecidos como fosfatos de cálcio (BIGI *et al.*, 2005), bioativos e osteocondutores, sendo a HA (hidroxiapatita), o principal componente mineral ósseo (95%) (HENCH, 1991).

Dentre os materiais bioativos destacam-se os fosfatos de cálcio, que possuem similaridades químicas, físicas e mecânicas com a fase mineral do tecido ósseo, por exemplo, a HA, que não apresenta toxicidade local ou sistêmica (biocompatibilidade). Tais características podem ser explicadas pela natureza química desses materiais, por serem formados basicamente por íons de cálcio e de fosfato, estão presentes no corpo humano sob a forma de componentes da fase mineral do tecido ósseo, dentina e esmalte dentário, além de algumas calcificações patológicas (ELIAS *et al.*, 2002).

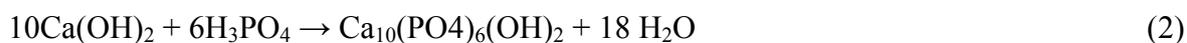
Para combinar a resistência mecânica dos materiais bioinertes com a bioatividade dos materiais bioativos existem duas possibilidades. A primeira consiste na preparação de materiais compostos (ou compósitos), nos quais o material bioativo está homogeneamente disperso em uma matriz resistente do material bioinerte. A segunda possibilidade consiste em recobrir o material bioinerte de boa resistência mecânica com uma camada bioativa, através da deposição de um material bioativo (DHERT, 1992).

### 3.7.1 Principais métodos de produção de fosfatos de cálcio

Para que uma cerâmica em pó tenha propriedades adequadas para ser utilizada como cerâmica biocompatível esta deve apresentar partículas muito finas e com composição homogênea. Abaixo estão apresentados os principais métodos utilizados para obter a hidroxiapatita (HA), a partir de diferentes pós, com diferentes morfologias e formas (de denso à extremamente poroso).

No Método Via Úmida, a mistura de reagentes, com os íons cálcio e fosfato,  $\text{pH} > 7$  e tempo de envelhecimento prolongado, converte a fase precursora formada (fosfatos de cálcio amorfo) (VAN KEMENADE, 1987), em hidroxiapatita. Para valores de pH entre 5 e 7 pode ocorrer também a formação de precursores como o octacálcico e o fosfato bicálcico, pois uma diminuição do pH pode produzir uma HA deficiente em cálcio (SANTOS *et al.*, 2005). Este método produz pós de HA com baixa cristalinidade e partículas menores que  $1\mu\text{m}$  (AOKI, 1991) ou menores que  $10\mu\text{m}$  (LE GEROS, 1991), conforme os tipos de reação, a seguir:

Reação ácido-base



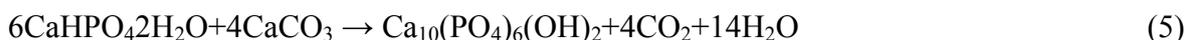
O produto formado é um pó de baixa cristalinidade e partículas menores que  $1\mu\text{m}$ .

Reação entre sais de fosfato e cálcio



O produto formado é um pó de baixa cristalinidade e partículas menores que  $10\mu\text{m}$ .

O Método Via Seca é usado para produzir uma HA em pó, com alta cristalinidade e tamanho de partículas muito finas (AOKI 1991), (LE GEROS, 1991).



O Método Hidrotermal é muito similar ao via úmida, porém emprega-se temperatura e pressão. A HA produzida pode ter a forma porosa ou de pó nano ou milimétrico, com partículas até  $10\text{nm}$  (AOKI, 1991), além disso, apresenta poucos defeitos na rede cristalina.

### 3.7.2 Principais métodos de recobrimento com fosfatos de cálcio

Existem diversos métodos comumente utilizados para a deposição de fosfatos de cálcio e HA na superfície de Ti. Abaixo estão apresentados alguns desses métodos.

O Método de recobrimento por Íon Sputtering consiste em bombardear o alvo do material a ser depositado com um feixe de íons positivos. O feixe iônico, por transferência de momento provoca o deslocamento de átomos neutros do alvo, que se condensam sobre o substrato na forma de um filme fino (FISHER, 1986).

O Método Plasma-Spray consiste na injeção de HA, em pó, em um gás transportador a altas temperaturas, alcançando o estado de plasma ao passar por um arco elétrico estabelecido entre dois eletrodos. A HA, em pó, é transportada em alta velocidade através do plasma, funde-se parcialmente e se ioniza. Em seguida o pó, neste estado, é projetado sobre o substrato metálico, onde sofre um rápido resfriamento (DHERT, 1992), (JARCHO, 1992). O recobrimento é produzido mediante a deposição de várias camadas de HA.

O Método Biomimético consiste em colocar o substrato durante sete dias, em uma solução denominada Fluido Corporal Simulado (*Simulated Body Fluid* - SBF), semelhante ao plasma sanguíneo. Neste método, há uma mimetização do processo biológico de formação dos tecidos duros (fenômeno espontâneo de formação de fosfato de cálcio na superfície do implante quando este se encontra no organismo do corpo) (BIGI *et al.*, 2005).

No Método Sol-Gel, materiais inorgânicos podem ser preparados a partir de soluções contendo compostos metálicos, tais como alcóxidos ou outros sais orgânicos ou inorgânicos como fontes de cátions; água como agente de hidrólise e álcoois como solventes. Como resultado da hidrólise dos precursores metálicos a solução se torna um sol. As reações continuam, e pouco a pouco interligam as partículas, solidificando a sol em um gel.

O Método Eletrolítico é empregado para depositar filmes com propriedades especiais sobre substratos metálicos, basendo-se na reação catódica da água:



Essa reação produz um aumento local do pH nas imediações do cátodo, onde é observada a precipitação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , presentes na solução eletrolítica, na forma de uma camada insolúvel e aderente de fosfato de cálcio sobre o cátodo.

BAN *et al.* (1997) descreveram a precipitação dos fosfatos de cálcio no cátodo no processo eletrolítico como a supersaturação do sal de fosfato de cálcio devido ao aumento do pH e à incorporação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Esse procedimento é, geralmente, empregado para recobrir substratos de Ti com uma camada de fosfato de cálcio, cuja estrutura cristalina assemelha-se à da apatita carbonatada ( $\text{CO}_3$ -HA).

Oh *et al.* (2005) estudaram o recobrimento biomimético da superfície nanotubular de Ti anodizado em NaOH e observaram a formação de uma HA de fase nanodimensional na superfície nanotubular de Ti. Em outro trabalho, Oh (2006) avaliou o comportamento biológico de superfícies bioativas em Ti com óxido nanotubular formado em NaOH e observou que a presença dos nanotubos acelerou a cinética de desenvolvimento da hidroxiapatita num fator 7. A adesão, o crescimento e a proliferação das células osteoblásticas foram melhoradas em função desse óxido. Além disso, os filópodes das células se desenvolveram para o interior, produzindo o fechamento dos poros.

Usando o método Sol-Gel, Tuantuan *et al.* (1996) obtiveram filmes de HA com espessura de 10 a 200 $\mu\text{m}$ . Nesse estudo foi verificado que a adesão entre o filme e a superfície de Ti foi muito pequena, contudo, a adesão entre o osso e o Ti recoberto com HA foi duas vezes maior que o valor encontrado para o Ti sem recobrimento.

Prado *et al.* (2001) estudaram o processo de recobrimento eletrolítico de Ti com  $\text{CaHPO}_4$  (monetita) e sua posterior conversão em HA e verificaram que o recobrimento final apresentou um HA pura e cristalina, com poucas trincas. A camada de HA forada mostrou-se homogênea e com grande disponibilidade de reação na interface tecido-implante.

Raja (2005a) estudou a eletrodeposição de fosfato de cálcio em superfícies de Ti anodizada em 0,5M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  + 0,138M  $\text{F}^-$ . Desse estudo foi constatado que as paredes internas dos poros apresentam ânions incorporados da solução, que era predominantemente composta por fosfato. Além disso, o autor observou uma camada de fosfato de cálcio sem falhas e bem aderida ao substrato nanotubular de Ti.

Uma variante indireta para a deposição de uma camada de HA sobre Ti consiste na anodização em solução acetato de cálcio e  $\beta$ -glicerofosfato de cálcio. Nessas condições forma-se um filme de óxido de titânio contendo Ca e P. Após tratamento em autoclave em presença de água precipita-se uma grande quantidade de cristais de HA. O resultado é uma camada anódica de óxido de titânio contendo Ca e P e sobre esta, outra camada de HA de elevada cristalinidade com espessuras na ordem de milímetros (ISHISAWA, 1995).

### 3.7.3 Importância das cerâmicas bioativas na área médica e odontológica

Os implantes de Ti do tipo endoósseos, recobertos com fosfatos de cálcio tem tido aplicação crescente na odontologia, pois estudos clínicos indicam que o tecido ósseo sadio responde positivamente às superfícies biocerâmicas. A hidroxiapatita (HA) é utilizada para recuperar a perda óssea após a restauração ou extração de um dente. Pinos de Ti revestidos com HA são usados no implante para a substituição da raiz do dente. Na ortopedia existe um particular interesse em usá-la como revestimento de próteses metálicas para promover a ligação interfacial estável entre o material implantado e o tecido vivo.

### 3.7.4 Importância das cerâmicas bioativas na área farmacêutica

A liberação controlada de reagentes ou de medicamentos por biocerâmicas bioativas é outro aspecto com potencial importância tecnológica, devido ao fato destas biocerâmicas serem biocompatíveis em mamíferos. As substâncias biologicamente ativas podem ser incorporadas durante a transição Sol-Gel, ou após a formação das biocerâmicas. A liberação de uma grande variedade de substâncias, incluindo esteróides, fármacos anti-cancerígenos, antibióticos, anticoagulantes, fatores de crescimento e proteínas, tem sido testada. Em geral, a velocidade de liberação das espécies aprisionadas está relacionada à dissolução da matriz, embora possa ocorrer, também, simples difusão da substância a partir do recobrimento biocerâmico. A velocidade de liberação das espécies pode ser regulada variando-se parâmetros como a concentração da espécie, a incorporação de aditivos, as condições de secagem e o pH do meio.

Cerâmicas porosas, à base de HA possuem grande potencial de aplicação na área de implantes ósseos, principalmente na reconstituição, reparos e preenchimento de cavidades ósseas decorrentes de processos inflamatórios, acidentes ou osteoporose (FABRI, 1995; RAVAGLIOLI, 1992; HENCH, 1998). No tratamento de tumores, esse biomaterial vem sendo usado como suporte de ação prolongada. A introdução de drogas anticancerígenas em blocos de HA porosa permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual da droga no organismo. Sob esse aspecto a técnica de recobrimento com uma camada bioativa é atrativa, pois combina o tratamento do tumor com a substituição do osso doente (MAVROPOULOS, 1999).

### 3.8 Cultura de Células-Tronco Mesenquimais

Células-tronco são células em um estágio inicial de desenvolvimento e que podem se transformar em qualquer tipo de célula, quando adultas. Essas células se diferem de outras células do organismo por apresentarem três características: são células indiferenciadas e não especializadas, são capazes de multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas e quando se multiplicam cada nova célula tem potencial para manter-se como célula-tronco ou, então, são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular.

Uma das mais interessantes propriedades das células-tronco é a capacidade de diferenciação em múltiplos tipos celulares quando são utilizados estímulos apropriados. As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) podem ser diferenciadas *in vitro*, em adipócitas (células gordurosas), condrócitos (células cartilaginosas), osteoblásticas (células ósseas) e miócitos (células musculares).

As CTMs *in vitro* são capazes de se diferenciar apenas se estiverem em condições adequadas de temperatura, atmosfera e pressão. Além disso, precisam ser cultivadas em um meio com proteínas, soro e fatores de crescimento específicos para a diferenciação requerida. As CTMs podem ser estimuladas por proteínas convenientes, como as Proteínas Ósseas Morfogenéticas (*Bone Morphogenetic Proteins* - BMPs). As BMPs são utilizadas em CTMs quando se deseja a sua diferenciação em células ósseas (FAVUS *et al.*, 1993).

Camargo (2004) estudou o comportamento de CTMs, condrócitos e osteoblastos expostos a fatores de crescimento ((PHA-E) ou (ConcA)). O estudo mostrou, através de testes *in vivo*, que as células aumentaram a sua capacidade de adesão em vários tipos de materiais, incluindo Ti puro. Segundo Nishimura *et al.* (2004), CTMs, com fatores de crescimento, apresentam um aumento na adesão e na resistência a estímulos mecânicos em próteses.

#### 3.8.1 Cultura de CTMs associada ao uso de implantes

Devido à capacidade de fácil obtenção e à ampla capacidade de diferenciação, as CTMs podem ser usadas na terapia celular e na engenharia de tecidos. Entretanto, o sucesso do uso depende da interação entre as células e o suporte. Idealmente, o sistema célula+suporte deve ser resistente a proteólises e a estímulos mecânicos, os quais causam inflamação ou instabilidade mecânica nos tecidos lesados (NISHIMURA *et al.*, 2004).

Frosch *et al.* (2006), de acordo com testes *in vivo*, avaliaram o comportamento de implantes de Ti recobertos com e sem cultura de CTMs. O estudo apresentou, em um significativo número de casos a regeneração superficial completa da cartilagem articular da junta do joelho das cobaias, em contraponto com implantes não tratados que apresentaram uma incompleta formação de cartilagem.

Wang *et al.* (2002) investigaram o comportamento das Células-Tronco Mesenquimais Humanas (hCTMs), diferenciadas em células osteoblásticas, quando expostas a partículas em ruína, derivadas de biomateriais ortopédicos. Os autores verificaram, em presença de partículas submicroscópicas de Ti Cp a apoptose das células, em virtude da inibição da matriz de mineralização. Esse comportamento sugere que a citotoxicidade gerada pelas partículas de Ti pode causar uma redução da formação óssea na interface osso-implante devido à baixa diferenciação osteoblástica.

Dalby *et al.* (2006) estudaram o comportamento das Células-Tronco Mesenquimais Humanas (hCTMs) em superfícies de Ti nanoestruturadas. Os autores observaram que as células formam grandes filamentos (filópodes), além de estabelecerem contatos bem definidos e organizados. Segundo os autores, o desempenho verificado indica que a superfície de Ti nanoestruturada pode ter influência na resposta celular e que escalas nanotopográficas são, possivelmente, responsáveis pelo aumento da adesão celular com o material.

Segundo Dekker *et al.* (2005), implantes de Ti que não possuem camada bioativa na sua superfície também possuem um grande potencial de induzir a formação óssea. Contudo, um recobrimento bioativo sobre implantes de Ti, sob uma cultura de células específicas, facilita a proliferação e diferenciação de células ósseas osteoprogenitoras, produzindo células osteogênicas. Gil (2002), usando o método proposto por Kokubo (1996) para induzir a formação de uma camada bioativa em Ti, demonstrou que adesão e a diferenciação de células de osteoblastos são muito melhores sobre camadas bioativas de Ti, em comparação com Ti sem recobrimento bioativo.

Sader *et al.* (2005) estudaram a interação Ti + células osteoblásticas, em razão da topografia do implante. Os autores observaram que a presença de filamentos e a aderência das células não são afetadas pela rugosidade da superfície. No entanto constataram que, em superfícies rugosas, as células apresentam um comportamento poligonal, com filamentos pouco desenvolvidos. Esse comportamento sugere uma diminuição na viabilidade celular e um atraso na atividade celular em células cultivadas sobre superfícies rugosas de Ti.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental deste trabalho foi dividido em três partes. A primeira parte foi realizada no Laboratório de Processos Eletroquímicos e Corrosão (ELETROCORR) do Departamento de Metalurgia/UFRGS. A segunda parte foi realizada no ELETROCORR e no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética/UFRGS e no Centro de Microscopia Eletrônica (CME)/UFRGS. A terceira parte foi um trabalho em conjunto com o *Chair for Surface Science and Corrosion* (LKO) do Departamento de Ciência dos Materiais da Universidade de Erlangen-Nürnberg, em Erlangen/Alemanha. As amostras foram produzidas no LKO e analisadas no ELETROCORR e no CME.

### Parte 1

#### 4.1 Modificações Superficiais Químicas e Eletroquímicas

Neste estudo foram propostos quatro diferentes tipos de tratamentos superficiais, produzindo, assim, quatro diferentes características físicas e químicas na superfície das amostras. Os tratamentos foram aplicados com a finalidade de produzir superfícies distintas em amostras de titânio (Ti). Com base nessas diferenças de superfície, pode-se verificar a qualidade das superfícies produzidas através das avaliações biológicas *in vitro*.

As dimensões das amostras foram previamente discutidas e estabelecidas juntamente com um grupo colaborador da Faculdade de Odontologia/UFRGS. Essas dimensões deveriam ser adequadas com futuros testes *in vivo* em cobaias. Assim, determinaram-se as dimensões de um implante de titânio, compatíveis com uma provável cirurgia na tíbia de ratos machos.

Os processos eletroquímicos utilizados foram: corrosão por pites e/ou a anodização após centelhamento. A escolha dos parâmetros experimentais utilizados foi baseada em trabalho anteriormente realizado (MAFFIA, 2005), no ELETROCORR. Nesse trabalho foi avaliada a influência do acabamento superficial na morfologia do pite formado e a influência da densidade de corrente aplicada e do tempo do teste sobre a morfologia do óxido crescido por Anodização. Baseando-se nisso, foram estabelecidas as condições dos processos eletroquímicos estudados como um parâmetro inicial para a realização do presente estudo.

Em algumas das amostras anodizadas foi feita deposição química de fosfato de cálcio, com a finalidade de se obter um recobrimento bioativo sobre as superfícies das amostras tratadas eletroquimicamente. Além disso, se deseja alcançar um fechamento total ou parcial dos poros obtidos por anodização. Esse procedimento tem grande importância na área bioquímica, pois óxidos porosos de titânio podem servir de veículo para medicamentos oclusos nos poros após fechamento. A selagem total ou parcial é capaz de funcionar como um vetor, ajudando na taxa de liberação de fármacos no interior dos poros.

Para a avaliação das técnicas utilizadas simulou-se o comportamento biológico junto às amostras produzidas. Com a colaboração do Laboratório de Imunogenética fez-se a cultura de Células-Tronco Mesenquimais sobre as superfícies tratadas das amostras de Ti.

Todas as diferentes topografias produzidas nas superfícies foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura. Por meio de imagens obtidas foi feito o estudo qualitativo e quantitativo dos processos utilizados.

#### 4.1.1 Materiais

##### Eletrodo de Trabalho

Uma chapa de titânio comercialmente puro (Ti Cp), ASTM F67, grau 2, com 0.8mm de espessura, foi adquirida junto à empresa CAMACAM (distribuidora autorizada em Ligas Especiais Villares Metals S/A). A composição química da chapa, apresentada pelo fornecedor está descrita na Tabela 4.1. Não foram realizadas análises adicionais para a comprovação da análise química fornecida pela empresa CAMACAM.

Tabela 4.1 Composição química (% em peso) da chapa de Ti, fornecida pela CAMACAM.

<b>C</b>	<b>Si</b>	<b>Mn</b>	<b>Cr</b>	<b>H</b>	<b>O</b>	<b>Mo</b>	<b>N</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>Ti</b>	<b>Co</b>	<b>Fe</b>
0,01	-	-	-	0,003	0,14	-	0,01	-	<0,005	Bal	-	0,11

As amostras foram cortadas, a partir da chapa de Ti, em placas com dimensões em torno de 4mmX6mm, aproximadamente. Estas amostras foram lixadas mecanicamente com lixas de SiC, desde #180 até #4000 e polidas com pasta de diamante de 3µm e de 1µm. Em seguida, foram lavadas em água destilada e limpas em ultrassom com acetona durante 10 minutos, após foram lavadas em álcool etílico e secadas com jato de ar frio.

O contato elétrico foi feito com um fio de cobre de 20cm de comprimento, sendo removido o óxido de cobre em ambas as pontas, e uma gota de cola prata unindo uma das extremidades desse fio e uma das faces da amostra. O contato e a respectiva face juntamente com as bordas foram isolados com laca cetônica isolante e não porosa. A área da face de trabalho foi mantida inalterada em 4mmX6mm, aproximadamente.

Após a secagem da laca, a face de trabalho foi desengraxada cuidadosamente, com o auxílio de algodão embebido em acetona. As amostras foram guardadas isoladamente em envelopes plásticos e mantidas em um dessecador até realização dos testes eletroquímicos.

### Eletrólitos

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau PA e água destilada, em um meio aerado e sem agitação. A Tabela 4.2 e a Tabela 4.3 exibem os eletrólitos utilizados nos processos eletroquímicos e a composição das soluções utilizadas na deposição química de fosfato de cálcio, respectivamente.

Tabela 4.2 Eletrólitos utilizados nos processos eletroquímicos.

<b>Corrosão por pites</b>	NaBr	1M	pH 6,
<b>Anodização após centelhamento</b>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1M	pH entre 1 e 1,5

Tabela 4.3 Composição das soluções para deposição de fosfato de cálcio.

<b>Solução 1</b>	1/4 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,3M	pH 1,5
	3/4 Ca(OH) <sub>2</sub>	0,2M	pH 12,6
<b>Solução 2</b>	Ca(OH) <sub>2</sub> em suspensão	0,2M	pH 12,6
<b>Solução 3</b>	Ca(OH) <sub>2</sub> filtrada	0,2M	pH 12,6

## Equipamentos

Os testes potenciostáticos foram realizados em um potenciostato AUTOLAB ECO-CHEMIE PGSTAT 30. Nas medidas em modo galvanostáticos foi utilizada uma fonte de corrente (0-300V / 0,2A) produzida na Oficina Eletrônica do Instituto de Física/UFRGS.

### 4.1.2 Métodos

#### Processo de corrosão por pites

O processo de corrosão por pites foi realizado potenciostaticamente em célula convencional de três eletrodos. O contra-eletrodo foi confeccionado a partir de uma grade de Pt, de  $1,77\text{cm}^2$  de área. Como eletrodo de referência utilizou-se um fio de Ag, previamente anodizado em 1M NaBr, pH 6, com uma densidade de corrente de  $1\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ , por 10 minutos, sendo este anodizado anteriormente a cada novo teste. A distância entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência foi de aproximadamente 1mm e entre o contra-eletrodo foi de 1cm.

As amostras foram polarizadas em um potencial constante de 1,87V [ENH] acima do potencial de pite, durante cinco minutos, conforme proposto por Maffia (2005). A solução utilizada foi 1M NaBr, pH 6, preparada com água destilada, arejada e sem agitação. A célula pirex contendo a amostra foi colocada dentro de um frasco de vidro termostatizado em  $80^\circ\text{C}$ . O potencial de eletrodo da amostra foi medido em relação ao eletrodo de referência Ag/AgBr.

#### Processo de anodização porosa após centelhamento

Para o processo de anodização a plasma foi montada uma célula convencional de dois eletrodos. A distância entre o eletrodo de trabalho e o de referência foi mantida constante, em aproximadamente 5mm e o contra-eletrodo utilizado foi de Pt, o mesmo do ensaio anterior.

A solução aquosa utilizada foi 1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , pH entre 1 e 1,5, preparada com água destilada. Em cada um dos testes foi aplicada uma densidade de corrente de  $40\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  com auxílio de uma fonte de corrente (0-300 / 0,2A), sendo que esses foram realizados em temperatura ambiente e teve a duração de 102 segundos após atingir o potencial de centelhamento ( $180\pm 10$ )V.

### Processo de corrosão por pites e posterior anodização porosa após centelhamento

O processo de anodização porosa após centelhamento também foi realizado em amostras previamente corroídas por pites. Todas as amostras submetidas aos processos eletroquímicos foram lavadas em água destilada, limpas em ultra-som e secadas com jato de ar quente.

### Processo de anodização porosa após centelhamento e posterior deposição química de fosfato de cálcio

Nesse tratamento foram utilizadas amostras submetidas ao tratamento de anodização porosa após centelhamento. Após, fez-se o recobrimento dos poros por deposição química de fosfato de cálcio.

Para o preparo da solução 1, foram adicionadas uma parte de 0,3M  $H_3PO_4$ , e três partes de 0,1M  $Ca(OH)_2$ , formando uma solução saturada em fosfatos de cálcio. Observou-se um aspecto turvo da solução, contendo uma grande quantidade de partículas brancas em suspensão. As soluções 2 e 3, consistem em uma solução de 0,2M  $Ca(OH)_2$  (em suspensão e filtrada, respectivamente). A deposição química, pelo procedimento 1, foi feita da seguinte maneira:

1. Imersão da amostra na solução 1, seguida de ligeira secagem.
2. Sem lavar a amostra, fez-se a imersão na solução 2 de 0,2M  $Ca(OH)_2$  (em suspensão), seguida de ligeira secagem. Cada uma das duas imersões teve a duração de 1 minuto.
3. Repetiram-se os dois processos anteriores por mais quatro ciclos.

A deposição química, pelo procedimento 2, ocorreu de maneira similar ao procedimento 1, sendo a segunda imersão em solução 3 de 0,2M  $Ca(OH)_2$  (filtrada).

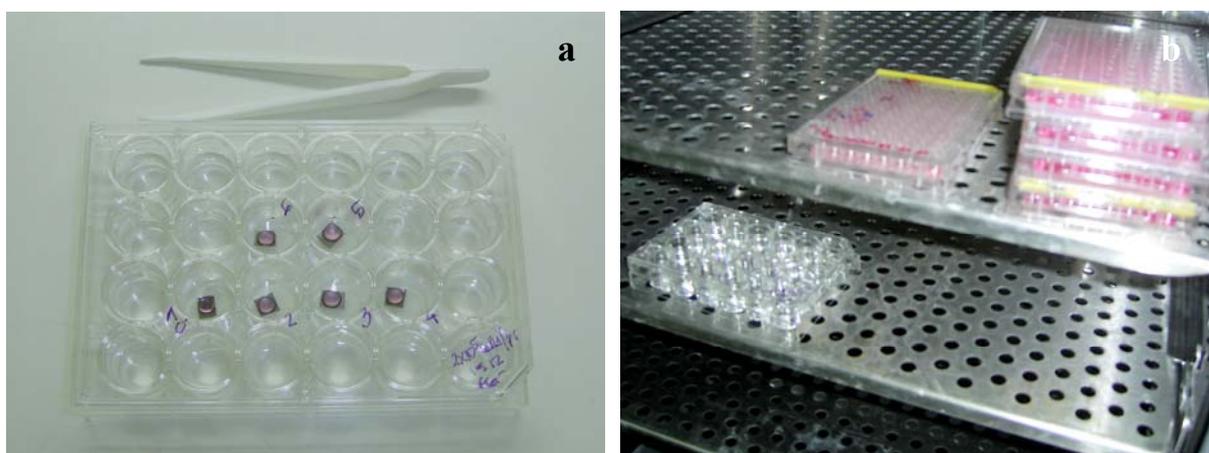
A secagem do recobrimento de fosfato de cálcio foi feito ao ar. Após, as amostras foram lavadas em água destilada, secadas com jato de ar quente e guardadas em um dessecador.

## Parte 2

### 4.2 Cultura de Células-Tronco Mesenquimais sobre placas de Ti

Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) foram cultivadas sobre as superfícies tratadas das amostras de titânio, junto ao Laboratório de Imunogenética/UFRGS. As células foram extraídas de ratos vivos, conforme o método reportado anteriormente por Meirelles (2003). Essa cultura de células responderá positiva ou negativamente em relação ao substrato, verificando assim qual ambiente superficial é o mais adequado para a sua proliferação. Espera-se com isso avaliar a qualidade das superfícies produzidas nos tratamentos eletroquímicos.

No primeiro conjunto de amostras, as placas de Ti foram recobertas com  $2 \times 10^5$  CTMs/ml, ressuspensas em  $30 \mu\text{L}$  de meio de cultura específico (HDEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino. A Figura 4.1.a apresenta as amostras de titânio recobertas com CTMs e ressuspensas em meio de cultura específico. As placas foram manipuladas com pinça adequada, para evitar danos ao material. Nesse conjunto as amostras ficaram quatro dias em estufa. A Figura 4.1.b apresenta a placa de 24 poços mantida em estufa umidificada ( $37^\circ\text{C}$ ; 5% de  $\text{CO}_2$ ) até o momento da análise.



Figuras 4.1 Fotografias apresentando a) placa de 24 poços contendo as amostras de titânio de  $24\text{mm}^2$  sob a cultura de CTMs e b) Placa de 24 poços em estufa.

No segundo conjunto, foram estabelecidos quatro grupos de cultura sobre as placas de titânio sem tratamento:  $5 \times 10^3$  CTMs/ml durante dois dias,  $1 \times 10^5$  CTMs/ml durante dois dias,  $1 \times 10^5$  CTMs/ml durante 3 horas e um controle negativo com meio de cultivo apenas. As células-tronco foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com a adição de solução tampão-salina Hepes (2,5-3,7g/l) e 10% de soro fetal bovino (HDMEM).

As culturas foram conduzidas pela adição de  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$  CTMs/ml e diluídas em 40 $\mu$ L de HDMEM, em cada amostra de titânio esterilizada. Essas concentrações foram mantidas sobre a superfície de Ti, em uma atmosfera úmida de 5% CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Após este período foi adicionado sobre a superfície 1,5ml de HDMEM. Em seguida, as amostras retornaram às mesmas condições de atmosfera e temperatura de 37°C, durante os tempos de cultura correspondentes às concentrações. Passado este período em incubação, as amostras foram lavadas em solução salina de Hank, livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (HB-CMF-HBSS), para garantir a remoção das células que não ficaram aderidas à superfície (MEIRELLES, 2003).

Nesse conjunto aplicou-se o método colorimétrico em amostras em triplicata. Essas medidas foram realizadas pelo Laboratório de Imunogenética/UFRGS e interpretadas no ELETROCORR/UFRGS. O objetivo desse conjunto foi verificar a biocompatibilidade das modificações superficiais e a proliferação celular das CTMs que estiveram em contato com as placas de Ti.

No terceiro conjunto foi cultivada uma concentração de  $1 \times 10^6$  CTMs/ml, durante dois dias, sobre os quatro tratamentos superficiais em amostras de Ti. O procedimento experimental dessa cultura celular foi o mesmo aplicado no segundo conjunto. A comparação da biocompatibilidade promovida pelas modificações superficiais em Ti foi avaliada através do método colorimétrico, no Laboratório de Imunogenética/UFRGS e interpretadas no ELETROCORR/UFRGS.

O objetivo do primeiro e do terceiro conjunto foi avaliar a cultura de CTMs de acordo com os tratamentos superficiais. Essa avaliação foi feita por análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

### 4.3 Análises e Medidas

#### 4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura teve como objetivo auxiliar nas investigações das características topográficas e químicas dos materiais estudados. A avaliação da micro e da nanoestrutura superficial é de grande importância na área de biomateriais, pois é a partir dela que se efetivará a biofuncionalidade do implante. O Microscópio Eletrônico de Varredura utilizado foi um equipamento da marca *JEOL*<sup>®</sup>, modelo JSM 6060, localizado no CME/UFRGS.

A caracterização química do recobrimento bioativo foi feita com o Microscópio Eletrônico de Varredura da marca *JEOL*<sup>®</sup>, modelo JSM 5800 do CME/UFRGS, através de espectroscopia de Raio-X (EDS - *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*). Essa análise possibilita a obtenção de informações quantitativas dos elementos presentes na superfície dos recobrimentos de fosfatos de cálcio.

As amostras foram analisadas em vista de topo, com a finalidade de se obter informações tridimensionais sobre as morfologias superficiais das amostras modificadas superficialmente. As imagens obtidas em MEV revelaram informações topográficas das amostras tratadas química e eletroquimicamente.

Esse equipamento também foi utilizado para avaliação da cultura de Células-Tronco Mesenquimais sobre as superfícies das amostras tratadas. Para isso foi adotado um protocolo padrão de preparação de amostras biológicas para análise em MEV.

#### 4.3.2 Preparação de amostras biológicas para análise em MEV

A fim de se obter imagens satisfatórias em MEV, aplicou-se, primeiramente, um protocolo (usado no CME) padrão de fixação, desidratação e dessecação das amostras biológicas. Tal protocolo foi rigorosamente obedecido para evitar danos à superfície das amostras, quando submetidas ao feixe de elétrons.

A primeira etapa e a mais importante é a fixação das amostras biológicas sobre substrato metálico. É na fixação que as amostras biológicas tornam-se mais rígidas, impedindo assim que haja distorções nas imagens que serão obtidas durante a interferência dos elétrons na superfície. A composição do fixador usado nas amostras é vista na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Composição e concentração em volume do fixador.

<b>solução</b>	<b>(% vol)</b>
Glutaraldeído 25%	10
Paraformaldeído 8%	25
0,2M Tampão Fosfato	50
H <sub>2</sub> O destilada	15

A fixação do material biológico foi feita após a coleta das amostras no Laboratório de Imunogenética. Na primeira etapa, as amostras, individualmente em tubos de ensaio, foram imersas em solução fixadora e mantidas sob refrigeração por uma semana.

Após uma semana a solução fixadora foi retirada do tubo de ensaio com o auxílio de uma pipeta. Na etapa de limpeza, foram feitas três imersões das amostras em solução 0,1M Tampão Fosfato. A composição da solução de limpeza esta na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 Composição da solução de limpeza 0,1M Tampão Fosfato.

<b>solução</b>	<b>(% vol)</b>
Tampão Fosfato 0,2M	50
H <sub>2</sub> O destilada	50

Nas duas imersões, o processo de limpeza teve a duração de 30 minutos cada. Na última imersão as amostras permaneceram em solução Tampão Fosfato e sob refrigeração por 24h. Após fez-se a retirada da solução de limpeza de dentro do tubo de ensaio. A solução de limpeza é responsável pela retirada do Glutaraldeído das células.

Na terceira etapa, a da desidratação, as amostras foram submetidas a banhos de acetona em concentrações e em tempos crescentes. A desidratação é responsável pela retirada lenta e gradual de água das amostras. Na Tabela 4.6 estão descritas as concentrações e tempos em que as amostras foram submetidas nos intervalos de desidratação.

Tabela 4.6 Concentração e tempo dos banhos de desidratação.

<b>Acetona (%vol)</b>	<b>H<sub>2</sub>O destilada (%vol)</b>	<b>tempo do banho (minutos)</b>
30	70	10
50	50	10
70	30	10
90	10	10
90	10	20
100	0	10
100	0	20

Baseando-se no roteiro mencionado anteriormente, procedeu-se a etapa de dessecação das amostras. Na quarta etapa, as amostras já fixadas e desidratadas foram fixadas sobre *stub* e levadas ao aparelho de ponto crítico. No aparelho, as amostras, então mergulhadas em solução desidratante (acetona absoluta), permaneceram numa câmara isolada.

Um pequeno volume de CO<sub>2</sub> líquido foi injetado na câmara, misturando-se à solução desidratante. Gradualmente, em várias substituições de CO<sub>2</sub> líquido por solução desidratante, fez-se a remoção total da solução da câmara. Após elevou-se a temperatura da câmara (até 40-45°C) acima da temperatura de ponto crítico (T<sub>c</sub> entre 31 e 32°C), conseqüentemente aumentando a sua pressão interna. Durante esse processo, o menisco de transição de fases desaparece e é feita a substituição da fase líquida pela fase gasosa de CO<sub>2</sub>.

Ao atingir as condições ideais de temperatura e pressão, a câmara foi despressurizada e as amostras foram retiradas com segurança. O aparelho de ponto crítico utilizado foi um CRITICAL POINT DRYER da marca *BALZERS*<sup>®</sup>, modelo CPD030 do CME/UFRGS.

#### 4.3.3 Metalização

Todas as superfícies das amostras, inclusive as citadas anteriormente, foram metalizadas com Au, via *sputtering*, para que se tornassem condutoras. O aparelho utilizado para a metalização foi um SPUTTER COATER da marca *BALZERS*<sup>®</sup>, modelo SCD05 do CME/UFRGS.

#### 4.3.4 Programa de análises de imagens

Análises estatísticas sobre a morfologia da superfície das amostras foram realizadas através do tratamento digital das imagens obtidas em MEV. As distribuições e tamanhos de micro e de nanoporos foram medidas utilizando o programa de análise de imagens *Image Tool*<sup>®</sup> 1.62. As medidas estatísticas foram calibradas de acordo com a escala de tamanho descrita na imagem em MEV.

Essas análises permitiram quantificar e caracterizar o diâmetro médio e a densidade dos poros, assim como avaliar a influência da deposição química de fosfato de cálcio no fechamento total ou parcial dos poros. Além disso, as imagens permitiram analisar o efeito químico e físico da topografia do substrato na resposta celular. Esse estudo permitiu a caracterização do crescimento e da modificação das Células-Tronco Mesenquimais.

### Parte 3

#### 4.4 Microcaracterização de TiO<sub>2</sub> nanotubular formado por anodização

As amostras, previamente tratadas, foram fornecidas pelo LKO/Universidade de Erlangen-Nürnberg. Este grupo investiga a estrutura auto-organizada do óxido poroso de titânio em solução de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> contendo pequenas quantidades de NaF.

O procedimento experimental realizado pelo LKO consistiu na anodização potencioestática de amostras de Ti (99,6% de pureza), com 0,1mm de espessura, fornecida pela Goodfellow. O eletrólito usado no experimento eletroquímico foi 1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com a adição de pequenas quantidades de NaF (0,5; 1 e 5% em peso). Na montagem experimental utilizou-se uma célula convencional de três eletrodos, tendo como contra-eletrodo uma grade de Pt e como eletrodo de referência um eletrodo Ag/AgCl (1M KCl). O procedimento eletroquímico consistiu na aplicação de um potencial de 20V por 6h, realizado em temperatura ambiente. Após a formação da estrutura porosa, as amostras foram lavadas com água destilada e secadas com um fluxo de nitrogênio.

Para a caracterização morfológica as amostras anodizadas foram observadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura da marca *JEOL*<sup>®</sup>, modelo JSM 5800 do CME/UFRGS. Uma fina camada de Au foi depositada via *sputtering*, usando o aparelho SPUTTER COATER da marca *BALZERS*<sup>®</sup>, modelo SCD05 do CME/UFRGS.

As amostras foram analisadas em vista de topo, para a caracterização quanto à morfologia topográfica do óxido. Algumas das amostras foram dobradas mecanicamente até que houvesse o descolamento do óxido em relação ao substrato e conseqüentemente a quebra do mesmo. Desta forma foi possível obter informações sobre a seção transversal e sobre a medida da espessura do óxido.

O programa da análise de imagens, *Image Tool*<sup>®</sup> 1.62, foi usado para analisar as imagens obtidas em MEV. Essas análises possibilitaram o cálculo do diâmetro médio, da densidade de poros, da porosidade e da espessura do óxido nanotubular auto organizado.

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Parte 1 (Modificações Superficiais em Ti)

#### 5.1 Processo de corrosão por pites (polarização potenciostática)

##### 5.1.1 Transiente de corrente do Ti em 1M NaBr

A corrosão por pites do Ti foi realizada em modo potenciostático em 1M NaBr, aplicando-se um potencial de 1,87V [ENH], em temperatura de 80°C, por cinco minutos. Em estudo desempenhado anteriormente no ELETROCORR, onde se realizou a corrosão por pites em Ti, nas mesmas condições utilizadas neste estudo, se verificou, através de curvas de voltametria, um potencial de pite em torno de 1,7V [ENH] (MAFFIA, 2005). Portanto, o potencial aplicado neste trabalho encontra-se acima do potencial de pite. A Figura 5.1 apresenta o transiente de corrente durante a polarização potenciostática.

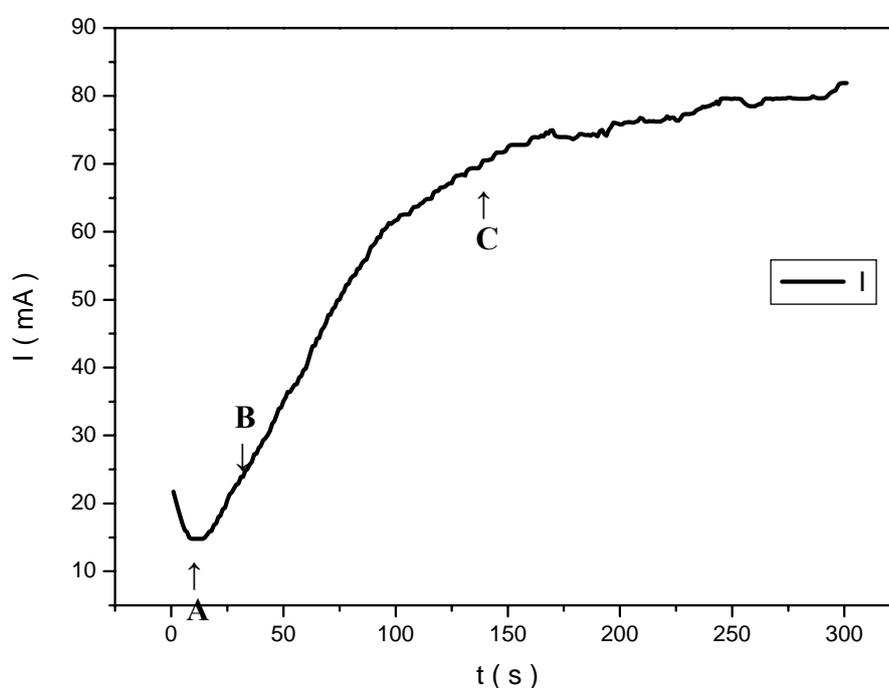


Figura 5.1 Transiente de corrente do Ti em 1M NaBr, 1,87V [ENH] e temperatura de 80°C, durante cinco minutos.

Nos primeiros segundos é possível observar, na figura anterior, uma diminuição da corrente inicial, a qual atinge um mínimo de aproximadamente 15mA. Durante esse intervalo de tempo (em torno dos 10 primeiros segundos) a corrente é muito pequena, o que significa que a velocidade de anodização é muito baixa. Esse comportamento indica que há um pequeno espessamento do óxido, antes do pite nuclear, que ocorre até a região A indicada na Figura 5.1.

Depois de atingir um valor mínimo de corrente, ocorre a quebra do filme passivo e nucleação de pites metaestáveis (em torno dos 15s). Como os pites metaestáveis são muito pequenos (chamados de micropites), estes crescem e se repassivam em poucos segundos. Durante esse processo, a corrente apresenta um rápido e gradativo aumento e o seu respectivo transiente apresenta uma grande declividade. Em virtude do intervalo de tempo estabelecido durante a aquisição não foi possível visualizar as oscilações de corrente, atribuídas à nucleação de pites metaestáveis. Essas oscilações, em correntes muito baixas, indicam que ocorre a nucleação e repassivação de pites, em um rápido intervalo de tempo. A metaestabilidade dos pites dura até, aproximadamente, a indicação B na Figura 5.1.

A partir da região B, a declividade positiva da curva diminui assintoticamente, apresentando um aumento mais lento de corrente. Nessa etapa, a declividade da curva não apresenta oscilações, característica do crescimento de pites estáveis. À medida que o pite estável cresce, as condições dentro do pite se tornam favoráveis para seu crescimento estável (indicado pela letra C). Na Figura 5.1 se observa uma diminuição gradual do aumento da corrente.

Experimentalmente, durante a nucleação do pite, foi observada a formação “aleatória” de bolhas de gás oxigênio na superfície do eletrodo de trabalho. No crescimento dos pites, essas bolhas se tornam mais intensas e recobrem toda a superfície.

### 5.1.2 Análise por MEV em Ti polarizado potenciostaticamente em 1M NaBr

Na Figura 5.2 está apresentada a micrografia, obtida em MEV, em modo de elétrons secundários (SEI), de uma amostra de Ti polarizada potenciostaticamente em 1M NaBr, obtida em estudo anteriormente realizado por Maffia (2005), no ELETROCORR. A micrografia, em vista de topo, mostra um pite, com perímetro aproximadamente circular.

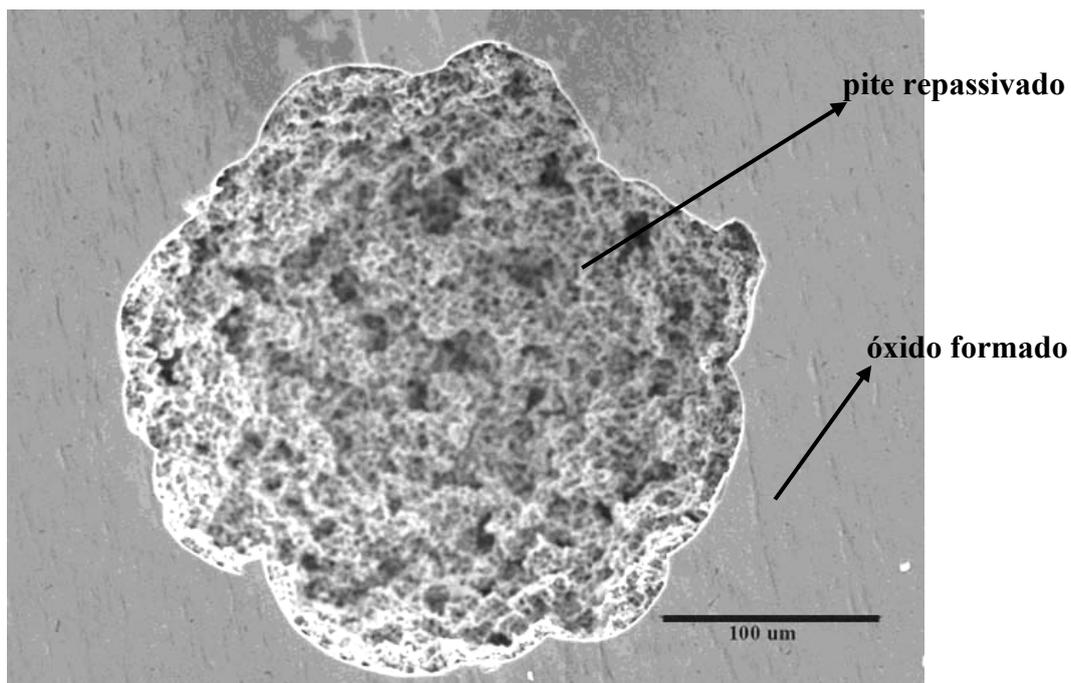


Figura 5.2 Micrografia, em vista de topo, apresentando a morfologia de um pite estável em Ti polarizado potenciostaticamente em 1M NaBr (MAFFIA, 2005).

Observou-se, durante o experimento, a formação de gotículas de líquido avermelhado no interior dos pites, indicando a formação de  $\text{Br}_2$  líquido durante o ataque. Como o óxido é mais fino no interior do pite, nesse local ocorrerá o enriquecimento de  $\text{Br}^-$ , o qual migra para dentro do pite para garantir a eletroneutralização dos cátions  $\text{Ti}^{3+}$ , liberados pela reação anódica dos hidrônios produzidos pela hidrólise de  $\text{Ti}^{3+}$  ( $\text{Ti}^{3+} + x\text{H}_2\text{O} = \text{Ti}(\text{OH})_x^{(1-x)+} + x\text{H}_{\text{aq}}^+$ ). Sendo o óxido no interior do pite mais recente e, portanto, mais fino, hidratado e condutivo, do que o óxido da superfície do Ti, haverá uma profundidade de pite com as melhores condições de concentração de  $\text{Br}^-$  e de resistência do óxido para a precipitação de  $\text{Br}_2$  líquido.

Essa análise demonstra que a reação de oxidação do Br irá competir com reação de oxidação do titânio e diminuir a velocidade de dissolução nos pites ativos, além de reduzir a concentração dos  $\text{Br}^-$  do eletrólito dentro da célula oclusa constituída pelo pite.

A corrosão por pites do titânio em soluções de halogenetos ocorre a potenciais bem acima do potencial do equilíbrio halogenetos/halogênio (DUGDALE, 1964). Desta forma, a corrosão por pites do titânio em soluções de brometo é observada em potenciais acima do potencial de equilíbrio  $\text{Br}^-/\text{Br}_2$ .

A morfologia interna dos pites repassivados, oclusos com produtos de corrosão, apresenta uma rugosidade fina. O pite formado apresenta um comportamento conforme o “modelo hemisférico côncavo”, na Figura 5.3. Na Figura 5.4, observa-se uma micrografia de MEV em seção transversal do titânio polarizado potenciostaticamente.

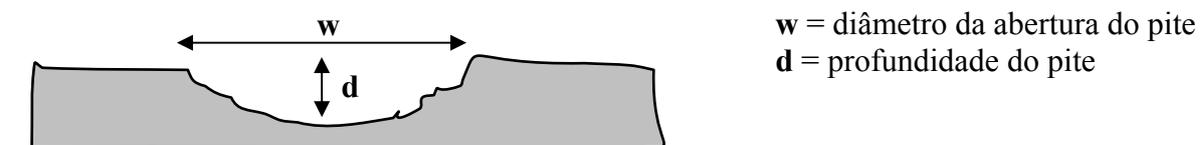


Figura 5.3 Esquema do pite formado conforme o “modelo hemisférico côncavo”.

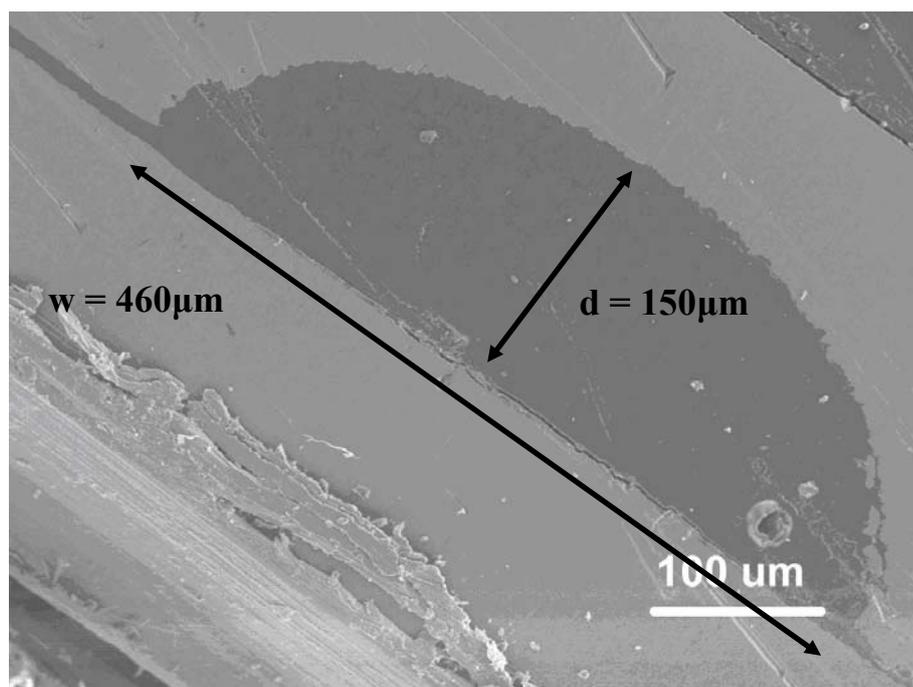


Figura 5.4 Micrografia, em seção transversal, apresentando um pite estável em Ti polarizado potenciostaticamente em 1M NaBr (MAFFIA, 2005).

Nessa figura, se observa um pite estável, com diâmetro de abertura igual a  $460\mu\text{m}$  e profundidade de  $150\mu\text{m}$ , medidas essas obtidas nas mesmas condições de potencial, concentração de eletrólito e temperatura do teste experimental aplicados neste trabalho. O diâmetro médio dos pites foi quantificado, neste trabalho, em  $314,25 (\pm 85,35)\mu\text{m}$  e a densidade em cerca de  $250\text{ pites.cm}^{-2}$ .

As análises quantitativas das superfícies produzidas mostraram uma grande densidade de pites e a formação destes com grande diâmetro de abertura e profundidade, quando comparados aos obtidos por Maffia (2005). Esta elevada nucleação e desenvolvimento dos pites podem estar associados à fraca anodização inicial durante a polarização potencioestática.

Como o tempo de anodização foi muito pequeno, houve a produção de um filme de óxido com espessura muito pequena sobre a superfície do titânio. O filme formado não é capaz de suportar a ação do brometo, aumentando, portanto, a possibilidade de nucleação de pites. Durante o fenômeno de corrosão localizada, o óxido se rompe em vários locais e de forma mais intensa, provocando um grande estrago na superfície do metal. Deve ser levado em conta que a alta temperatura do ensaio ( $T = 80^{\circ}\text{C}$ ), aumenta os eventos de corrosão, pois a temperatura tem um forte efeito na velocidade de corrosão, quando a velocidade do passo controlador é o processo de ativação.

A razão de aspecto (*aspect ratio*) média,  $w/d$  (onde  $w$  é o diâmetro e  $d$  é a profundidade do pite) dos pites foi calculada em  $2,89 \pm 0,72$ . Da mesma maneira se obteve a taxa de crescimento horizontal, em função do crescimento vertical do pite. Essa medida é calculada através de  $w/2.d$  e seu valor é  $1,445 \pm 0,38 > 1$ . Ou seja, a taxa de crescimento horizontal é maior que a taxa de crescimento vertical do pite, isso se explica pela grande deformação mecânica, incorporada durante o polimento mecânico, além dos macro e microdefeitos do material, a qual resulta em maior velocidade de dissolução.

Os resultados de diâmetro médio obtidos estão na ordem de grandeza necessária para favorecer o crescimento ósseo no interior do implante e assim melhorar sua ancoragem mecânica com o osso. A densidade de poros medida também é favorável para o processo de osseointegração, pois uma grande área superficial pode ajudar na estimulação óssea a favor do implante. Outro fator importante que deve ser levado em conta é a forma do poro obtida. Estudos (CHEHROUDI, 1989, 1990) mostram que ranhuras superficiais com componente horizontal são necessárias para acelerar a migração e garantir a orientação dos fibroblastos para dentro do implante. Portanto, a corrosão por pites se mostra um método eficaz na produção de poros micrométricos, capazes de melhorar o ancoramento físico dos implantes.

Embora os resultados obtidos se mostrem capazes de favorecer a fixação física durante a implantação, o desenvolvimento de topografias nanométricas sobre a superfície poderia ajudar na adesão de células ósseas sobre o implante. A anodização após centelhamento é capaz de produzir superfícies porosas de ordem nanométrica. As condições de anodização podem determinar a textura da topografia e influenciar na modificação da área superficial.

## 5.2. Processo de anodização porosa após centelhamento (polarização galvanostática)

### 5.2.1 Transiente de potencial do Ti em 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

A anodização de Ti, em temperatura ambiente, foi realizada em 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, aplicando-se uma densidade de corrente (*i*) de 40mA.cm<sup>-2</sup>. O teste teve a duração de 102 segundos após atingir o potencial de centelhamento (180±10V), garantindo-se carga constante acima do E<sub>B</sub>.

A Figura 5.5 reproduz o teste em modo galvanostático de uma amostra de Ti em 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. A sobreposição dos transientes de potencial e de corrente, em função do tempo, referentes ao ensaio pode ser observada nesta figura.

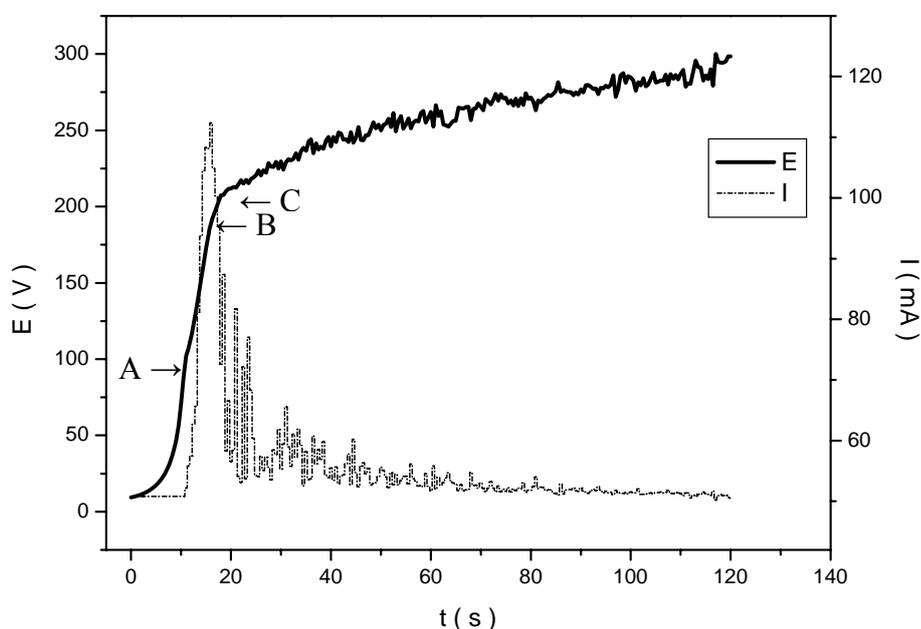


Figura 5.5 Transiente de potencial do Ti em 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, temperatura ambiente e duração de 102s após o início do intenso centelhamento.

Verifica-se na Figura 5.5, que o primeiro estágio de anodização é composto por duas taxas de anodização ( $\partial E/\partial t$ ). Nos primeiros segundos é possível notar as mudanças na declividade da curva de potencial, que estão relacionadas às diferentes etapas da anodização nas quais ocorre crescimento de óxidos com diferentes propriedades elétricas, sendo a taxa de anodização  $(\partial E/\partial t)_{1*} = 4,2V/s > 0$ . Durante esse intervalo de tempo (0-9s), observou-se, no experimento, a mudança acentuada na coloração do óxido, em tons de cores bem vivas, (BAUN, 1990), relacionada à variação de espessura do óxido.

Após, o óxido cresce a uma taxa de anodização  $(\partial E/\partial t)_1 = 27,6\text{V/s}$ , constante até atingir mais ou menos 100V. Esse aumento linear do potencial em função do tempo representa o começo do crescimento do óxido barreira. A densidade de corrente permanece constante durante esse primeiro estágio, apresentando um comportamento característico da formação de filme barreira, onde toda a corrente é utilizada para a formação do filme.

O início do fenômeno de ruptura do dielétrico (*electrical breakdown*) é indicado pelo primeiro degrau na curva de potencial. Observa-se na Figura 5.5 que o potencial de ruptura do dielétrico ocorre aproximadamente em 100V (indicação A). Nessa segunda etapa, ocorre um decréscimo na taxa de crescimento do potencial em função do tempo de anodização  $(\partial E/\partial t)_2 = 16,2\text{V/s}$ , linear e constante. Experimentalmente, foi constatada a variação em tons de cinza claro ao cinza escuro no óxido. No entanto, apesar da anodização ser realizada em modo galvanostático, verifica-se oscilações na curva de densidade de corrente que podem ser explicadas pela fonte não ser capaz de mantê-la constante durante o centelhamento.

O potencial de ruptura (ou de centelhamento) limita o crescimento normal do filme. Segundo Yahalom (1971), a mudança na inclinação na curva de potencial em função do tempo, durante a formação do óxido é devida a recuperação parcial dos defeitos no filme, produzidos quando inicia a ruptura do dielétrico.

A mudança gradual na declividade da curva de potencial indica o início de uma intensa ruptura do dielétrico (ou intenso centelhamento), que ocorre em  $180\pm 10\text{V}$  (indicação B). A partir desse momento, inicia-se uma suave diminuição na taxa de anodização  $(\partial E/\partial t)$  e, experimentalmente, pequenas centelhas são verificadas na amostra.

Logo após, uma redução abrupta na declividade da curva de potencial, é observada em torno de 200V (indicação C). A diminuição na taxa de anodização  $(\partial E/\partial t)_3 = 0,96\text{V/s}$  indica a ocorrência de um intenso centelhamento, juntamente com uma redução significativa na taxa de crescimento do óxido. Nessa terceira etapa começam a ser observadas oscilações na curva de potencial, sendo que esse quase na varia com o tempo de anodização, que estão relacionadas a eventos locais de centelhamento distribuídos uniformemente pela superfície do filme, ou seja, cada oscilação está relacionada a uma fusão localizada, com emissão de luz e som perceptíveis a “olho nu” e de calor (FERDJANI, 1993).

A duração do teste foi de 102s após o início do forte centelhamento e o potencial máximo foi pré-estabelecido em 300V. Valores esses foram definidos, anteriormente por Dick *et al.* (2004), quando se constatou que a anodização, durante 102s acima do potencial de 180V, produz um grande aumento do diâmetro médio dos poros e dos respectivos desvios padrão e, conseqüentemente, uma diminuição da densidade de poros por área.

### 5.2.2 Análise por MEV em Ti polarizado galvanostaticamente em 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Experimentalmente foi observado que o intenso centelhamento começa, com a emissão aleatória de luz e som fracos e em menor quantidade, na região central do ânodo (amostra de Ti). Rapidamente a emissão de luz aumenta a intensidade, seguindo em pontos ou em trilha até a região periférica da amostra. Os estalos também ficam mais fortes e mais frequentes, parecendo um som contínuo. O centelhamento segue, principalmente nessa região, diminuindo de intensidade até o final do experimento. A emissão de luz resulta da formação de plasma após a vaporização do óxido e, provavelmente, também do eletrólito. A Figura 5.6 representa o comportamento descrito, onde os poros produzidos pelo centelhamento são mais intensos no centro (região II) do que perto da borda da amostra (região I).

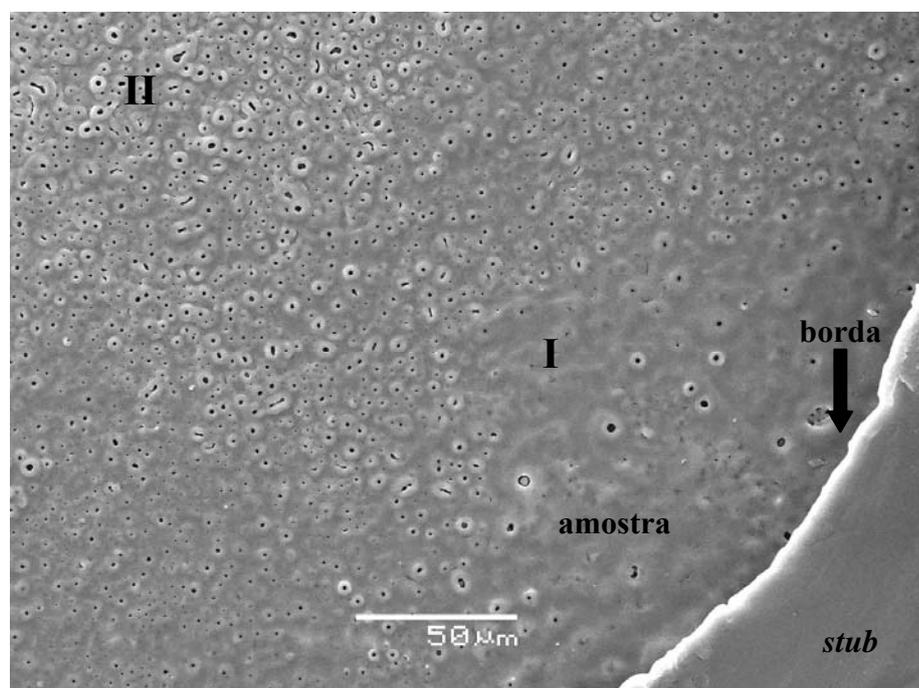


Figura 5.6 Micrografia, em vista de topo, apresentando o óxido poroso formado pelo fenômeno de centelhamento em Ti, com poros maiores e mais abundantes na região central II do que na região I, perto da borda da amostra.

No decorrer do experimento, o efeito luminoso intenso produz vários pontos de luz aleatórios e instantâneos na superfície na amostra. No entanto, também é observada uma sequência de pontos adjacentes ao longo de um curto período de tempo. A ocorrência de um centelhamento provavelmente é catalisada pelo centelhamento anterior, com frequência, aumentando o poro na direção de propagação da centelha.

O efeito descrito anteriormente pode ser observado na Figura 5.7, onde se nota a presença de comportamentos morfológicos diferentes. Na região I são mostrados poros circulares, provenientes dos “pontos de luz” produzidos durante o centelhamento, enquanto que região II é mostrada uma seqüência de poro alongado, em forma de trilha.

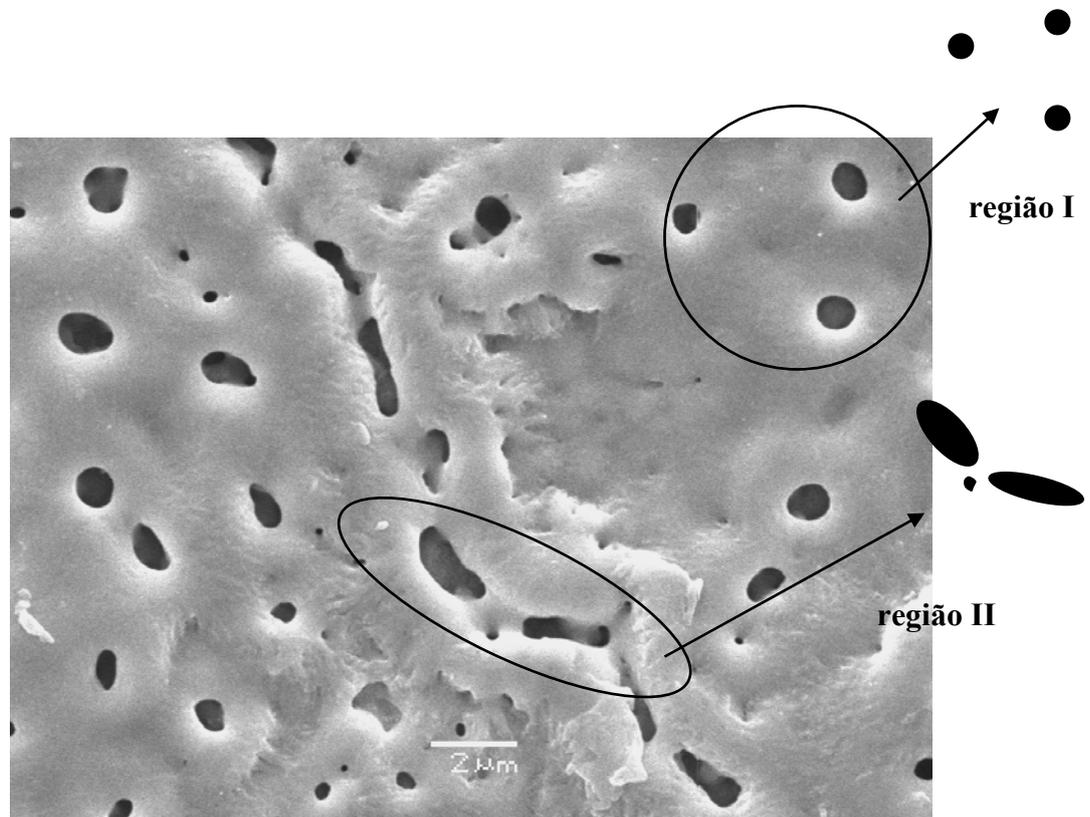


Figura 5.7 Micrografia, em vista de topo, apresentando as diferentes morfologias do óxido anódico em Ti, com poros circulares ou em forma de trilhas.

Nessa micrografia verifica-se o óxido anódico com comportamento topográfico não homogêneo. Em algumas regiões é observado um óxido plano e com poros circulares e em outras regiões é verificado um óxido volumoso em torno das trilhas. A irregularidade na textura do óxido pode ser explicada pela condição de intensidade do centelhamento.

Na Figura 5.8 apresenta-se a morfologia do óxido em uma região onde ocorre um centelhamento fraco. Observa-se que nesta região não ocorrem erupções em torno do poro. O óxido formado nesta região apresenta uma topografia plana e bordas de poros bem definidas. Nessa micrografia são indicados poros com diferentes tamanhos de aberturas e um poro superficial e raso no óxido, provavelmente, representando um precursor de poro.

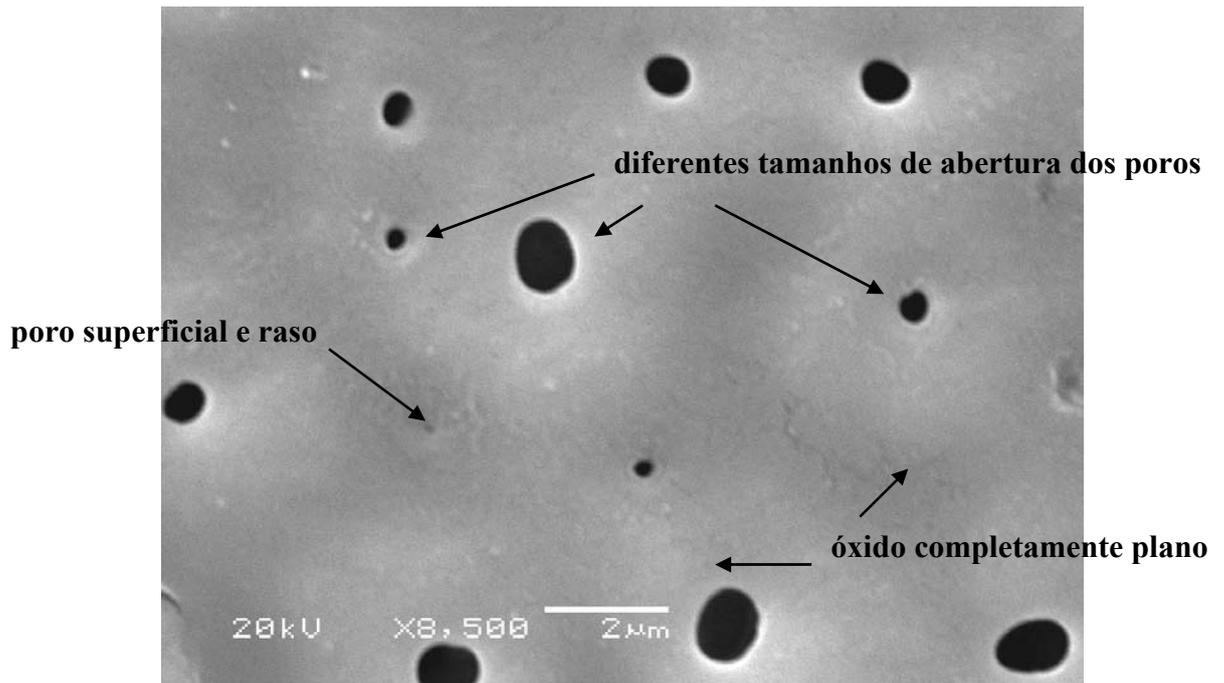


Figura 5.8 Micrografia, em vista de topo, apresentando a morfologia do óxido plano, resultante de um fraco centelhamento, formado sobre Ti.

A Figura 5.9 mostra a morfologia do óxido em torno de um poro em uma região de forte centelhamento. A cratera produzida apresenta um espessamento de óxido na região adjacente à sua abertura, que se deve à erupção causada no poro durante a fusão do óxido.

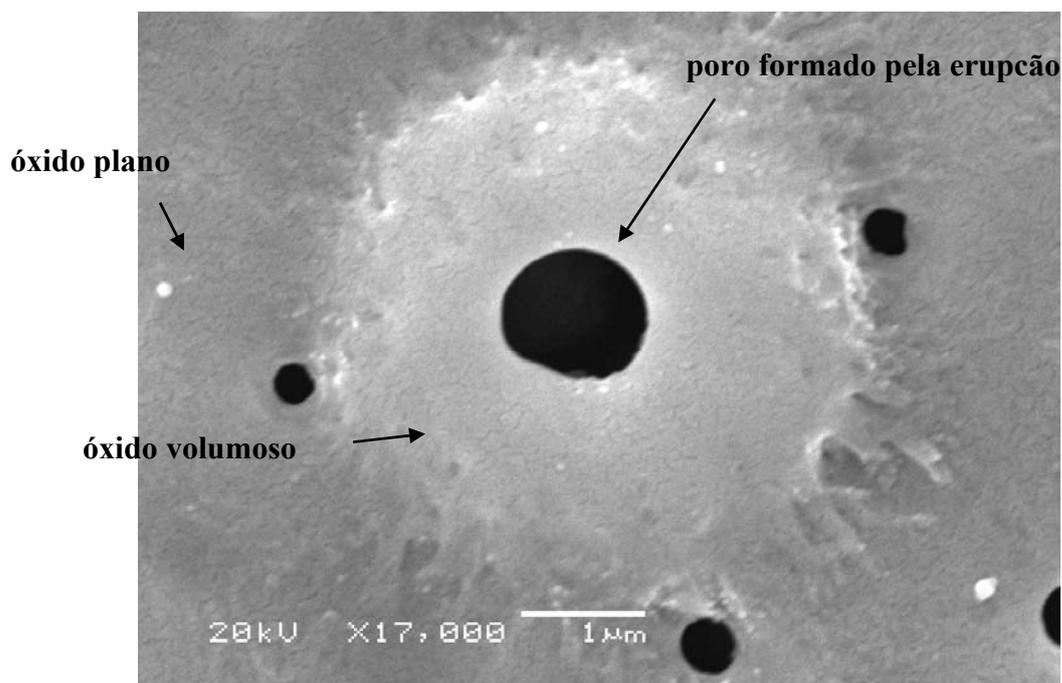


Figura 5.9 Micrografia, em vista de topo, salientando a erupção formada pela fusão do óxido, em uma região de forte centelhamento, formado sobre Ti.

Observa-se, na figura anterior, a presença de pequenos poros isolados em torno da base da erupção. Isso pode significar que os poros maiores crescem em função dos poros menores, produzindo poros maiores, com erupções ao longo das trilhas.

Esse comportamento induz à conclusão que o Ti anodizado a  $40\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ , durante 102s após o intenso centelhamento apresentará um aumento no diâmetro dos poros e uma leve tendência a diminuir a densidade de poros, quando comparado aos resultados obtidos por Maffia (2005), em densidades de correntes e tempos de anodização menores.

Na Figura 5.10 pode-se observar regiões com diferentes texturas e tamanhos de poros, conforme visto nas Figuras 5.8 e 5.9. A intensidade das anodização está representada nas regiões I, II e III, que indicam um fraco centelhamento, um centelhamento de intensidade média e um centelhamento forte, respectivamente.

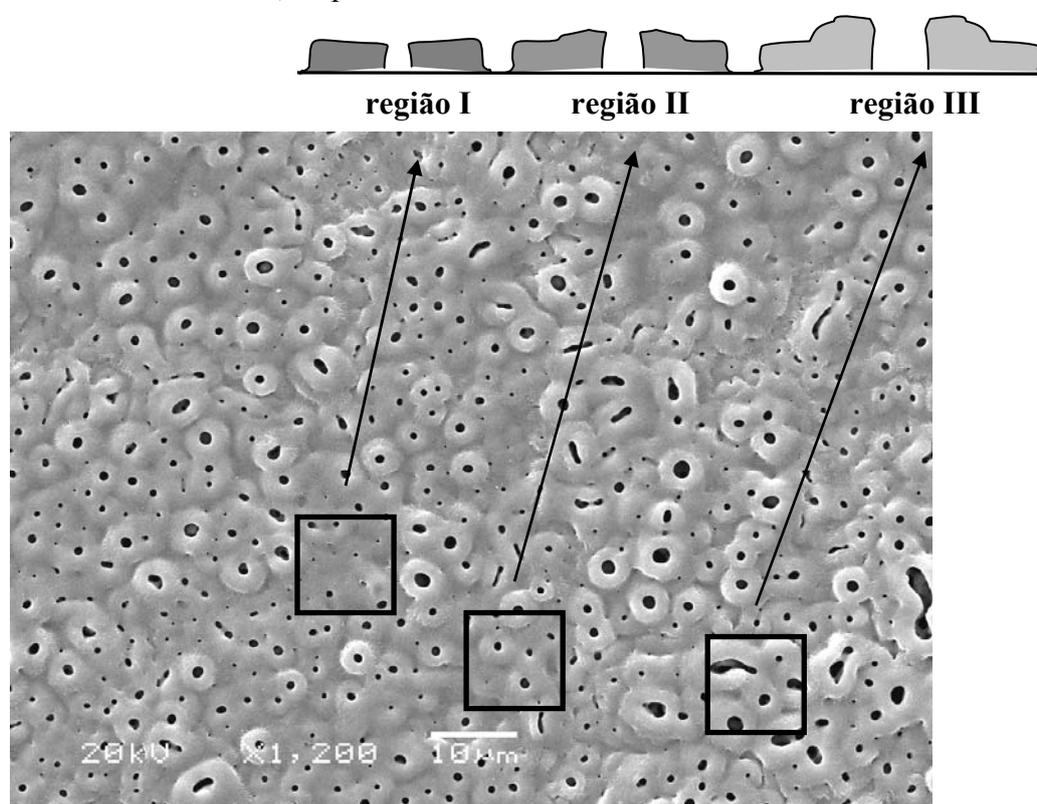


Figura 5.10 Micrografia, em vista de topo, apresentando as diferentes topografias formadas no óxido, sobre o Ti, durante o intenso centelhamento.

Para a caracterização química do óxido foi usada a técnica de EDS (*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*), com uma resolução lateral de cerca de  $1\mu\text{m}$ . A partir dessa técnica foram realizadas análises de elementos no óxido crescido por anodização após centelhamento, com o objetivo de verificar a incorporação de fósforo. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.1 e as regiões citadas nesta referem-se às regiões indicadas na Figura 5.10.

Tabela 5.1 Incorporação de fósforo durante a anodização do Ti em condições de intenso centelhamento. A porcentagem atômica dos elementos foi obtida por EDS.

<b>elementos</b>	<b>região I</b>	<b>região II</b>	<b>região III</b>
fósforo	3,0%	7,2%	9,3%
oxigênio	33,1%	34,2%	29,2%
titânio	63,9%	58,6%	61,5%
fósforo/oxigênio	0,09	0,21	0,32

Na anodização, após centelhamento, ocorre a incorporação de elementos do eletrólito no óxido TiO<sub>2</sub>, que apresenta tanto constituintes do substrato como espécies iônicas do eletrólito. De acordo com a tabela anterior verificou além da esperada presença de Ti e O (oxigênio), a presença do elemento P (fósforo), proveniente do H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Na região III foi detectada uma maior quantidade de P, em comparação à região I, que se referem as locais de forte e de fraco centelhamento, respectivamente. Esses resultados indicam que com a fusão do óxido, teores maiores de P são incorporados ao óxido. Além disso, sugerem que a incorporação inicia no momento da ruptura do dielétrico, desde a primeira camada de óxido anódico formada e aumenta à medida que o óxido cresce até a última camada formada no intenso centelhamento. Essas deduções são confirmadas pelos resultados obtidos por Lu *et al.* (2002), onde as camadas de óxido mais próximas ao substrato metálico são formadas pelo óxido puro, enquanto que as mais externas são formadas pelo óxido do metal com incorporação de íons do eletrólito.

Maffia (2005) observou por medidas de  $\mu$ -Raman, que, quando se aumenta o potencial final aplicado, ou seja, quando há uma intensificação do centelhamento, aumenta a razão anatásio/rutilo. Isso indica que o centelhamento está relacionado diretamente com o aumento da fase anatásio. Segundo Eppler (1969) os fosfatos são fortes catalisadores da formação da fase anatásio. Portanto, o fato de, presumidamente, ter sido encontrado fosfato incorporado do eletrólito durante a anodização, sugere que uma das fases ou a fase formada seja anatásio.

Na Figura 5.11, se verifica o comportamento de uma fusão. A erupção formada pela fusão apresenta-se num estágio anterior à formação do poro, durante a anodização.

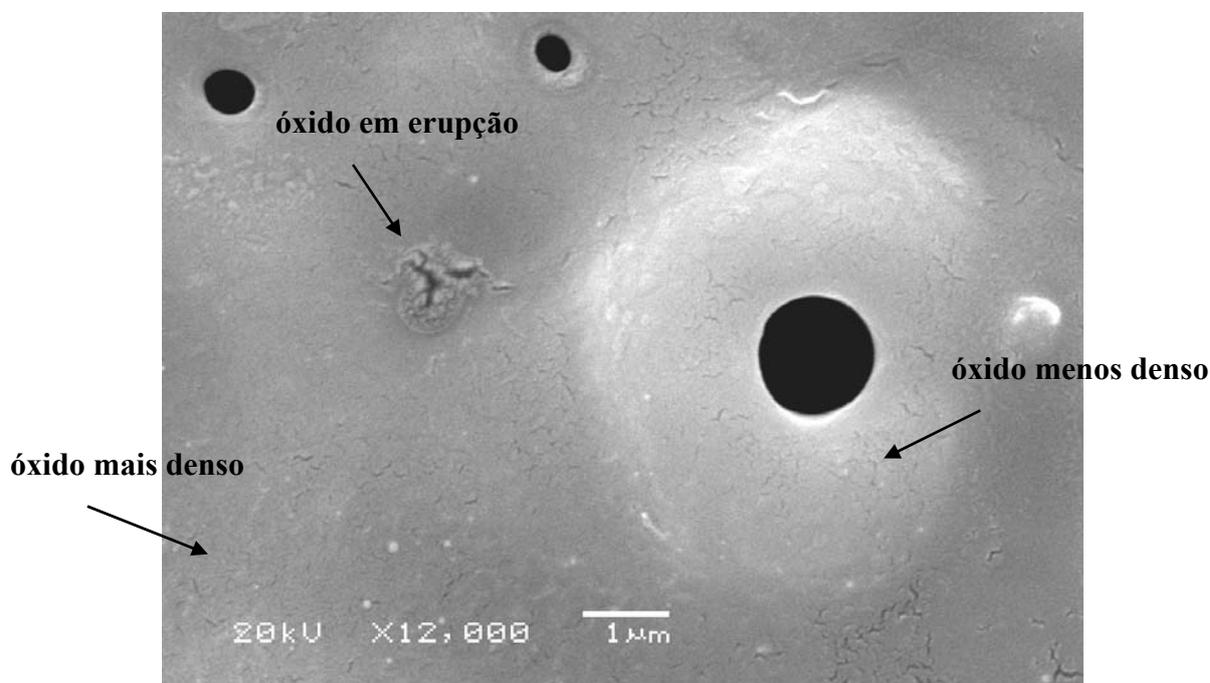


Figura 5.11 Micrografia, em vista de topo, salientando uma erupção inicial do óxido sobre Ti, durante o intenso centelhamento.

Em regiões de forte centelhamento houve um aumento do volume de óxido em torno da abertura do poro; em comparação ao óxido plano da base, formado sem fusão. Esse aumento de volume sugere que o óxido formado pela erupção é menos denso que o óxido da base (vide indicações na figura anterior). A menor densidade deduzida pode ser explicada tanto pela vaporização de óxido e formação de nanoporos e vacâncias, como pela formação da fase menos densa anatásio ( $\rho_{\text{anatásio}} = 3,90\text{g/cm}^3$ ) em detrimento da fase rutilo ( $\rho_{\text{rutilo}} = 4,25\text{g/cm}^3$ ). A ruptura do óxido pode estar associada à transformação da estrutura cristalina durante o aumento de potencial, levando a crer, como isso, que as fusões endotérmicas na superfície do óxido estão basicamente associadas à cristalização, sendo estas fusões as precursoras dos nanoporos.

Na Figura 5.12, observa-se em toda a extensão do óxido uma estrutura porosa crescida superficialmente. Essa estrutura contém uma grande variedade de poros distribuídos aleatoriamente, com tamanhos e formas distintas.

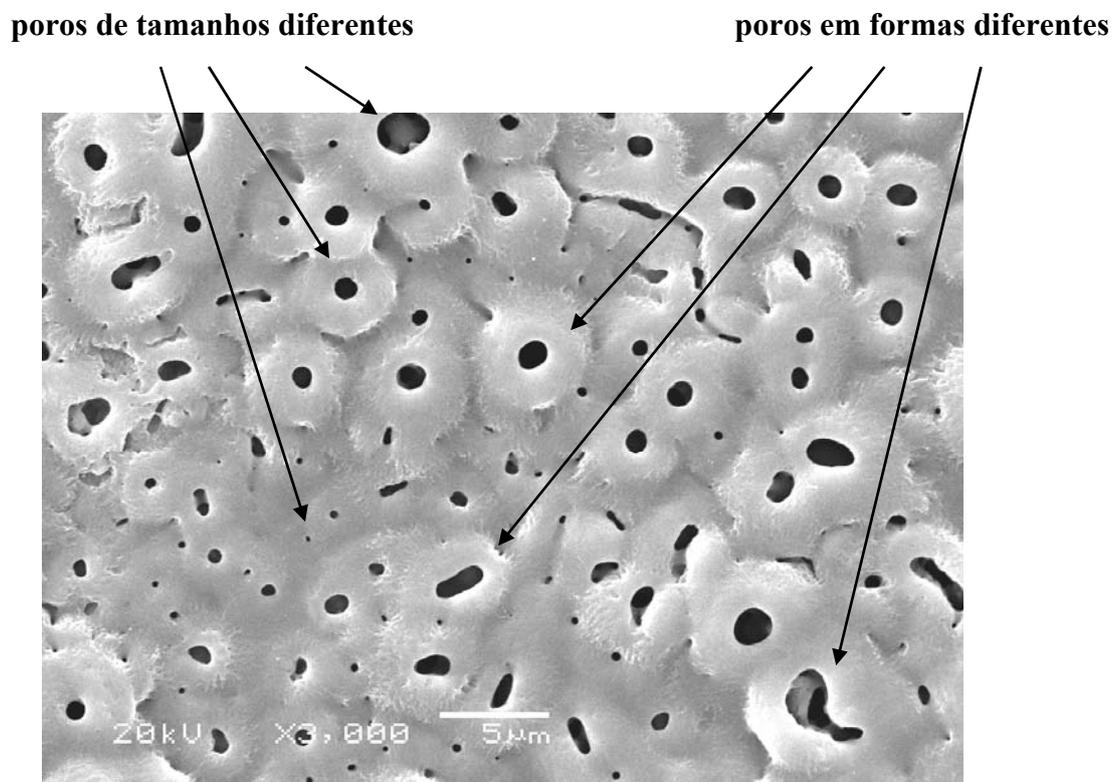


Figura 5.12 Micrografia, em vista de topo, apresentando a topografia sobre Ti formada por poros de tamanhos não homogêneos.

Análises estatísticas sobre a morfologia da superfície das amostras, obtidas em MEV, foram realizadas utilizando o programa *Image Tool*<sup>®</sup>. As distribuições e tamanhos dos poros foram medidas através da contagem digital de pixels de cada poro e conversão em suas respectivas normalizações através da devida calibração. Com isso deseja-se avaliar o efeito morfológico produzido no óxido de titânio, quando o potencial de anodização ultrapassa o potencial de centelhamento numa duração de 102s. Os resultados da anodização do titânio foram avaliados através de aspectos morfológicos tais como diâmetros médio ( $\varnothing_{\text{médio}}$ ), máximo ( $\varnothing_{\text{máximo}}$ ) e mínimo ( $\varnothing_{\text{mínimo}}$ ), assim como a densidade de poros em relação à área da amostra.

A Tabela 5.2 mostra o resultado do estudo morfológico do óxido, feito a partir do mapeamento e contagens dos poros obtidos na anodização acima do potencial de forte centelhamento. Os resultados a seguir foram apresentados por Dick *et al.* (2006).

Tabela 5.2 Parâmetros obtidos por imagens de MEV e análises do programa *Image Tool*<sup>®</sup>, da anodização em condições de intenso centelhamento.

$\varnothing_{\text{médio}}$ dos poros ( $\pm\delta$ )	$\varnothing_{\text{máximo}}$ dos poros	$\varnothing_{\text{mínimo}}$ dos poros	porosidade	densidade de poros
529 ( $\pm 462$ )nm	3922nm	113nm	4,2 %	$1,09 \times 10^7 \text{ cm}^{-2}$

A porosidade percentual da superfície foi medida através da razão entre área total dos poros e a área total da amostra. A densidade de poros foi estabelecida pela quantidade total de poros distribuídos na área superficial da amostra.

Os resultados obtidos foram comparados aos resultados obtidos em trabalho anterior (MAFFIA 2005), realizados nas mesmas condições do presente estudo. Os resultados obtidos por Maffia estão mostrados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 Parâmetros obtidos por Maffia (2005) em condições de anodização semelhantes à realizadas neste trabalho.

$\varnothing_{\text{médio}}$ dos poros ( $\pm\delta$ )	$\varnothing_{\text{máximo}}$ dos poros	$\varnothing_{\text{mínimo}}$ dos poros	densidade de poros
322 ( $\pm 199$ )nm	1189nm	$\approx 110$ nm	$2,42 \times 10^7 \text{ cm}^{-2}$

Confrontando os resultados apresentados nas Tabelas 5.2 e 5.3 se observa uma discrepância entre os respectivos valores. Levando-se em conta que não houve diferença entre os parâmetros experimentais, pode-se inferir que a diferença entre as condições foi agregada à amostra durante a sua preparação.

No procedimento experimental realizado por Maffia, as amostras foram lixadas sob grande pressão, em condições esporádicas de jato de água e sem sabão líquido. O acabamento final mostrava uma superfície de textura irregular e tonalidade esbranquiçada, que indicavam as regiões de deformação mecânica. Neste trabalho as amostras foram lixadas, aplicando-se uma baixa pressão durante o lixamento, em fluxo de água e com sabão líquido. O procedimento foi adotado para minimizar o atrito entre a amostra e a lixa e, assim, diminuir os defeitos mecânicos produzidos na superfície do Ti. A superfície produzida apresentou uma coloração cinza escuro e sem indícios de deformação mecânica.

Os valores de diâmetros médio, máximo e mínimo são maiores na Tabela 5.2, (referentes a este trabalho), em comparação à Tabela 5.3 (tese defendida por Maffia). No entanto, a segunda tabela apresentou uma densidade de poros maior, em relação à primeira.

A Figura 5.13 mostra um poro formado em uma região de forte centelhamento. A morfologia desse poro apresenta uma borda em relevo e alguns pequenos poros distribuídos em torno da base da erupção. A abertura desse poro possui uma forma irregular, provavelmente, formada pela junção dos diferentes formatos e tamanhos dos poros internos.

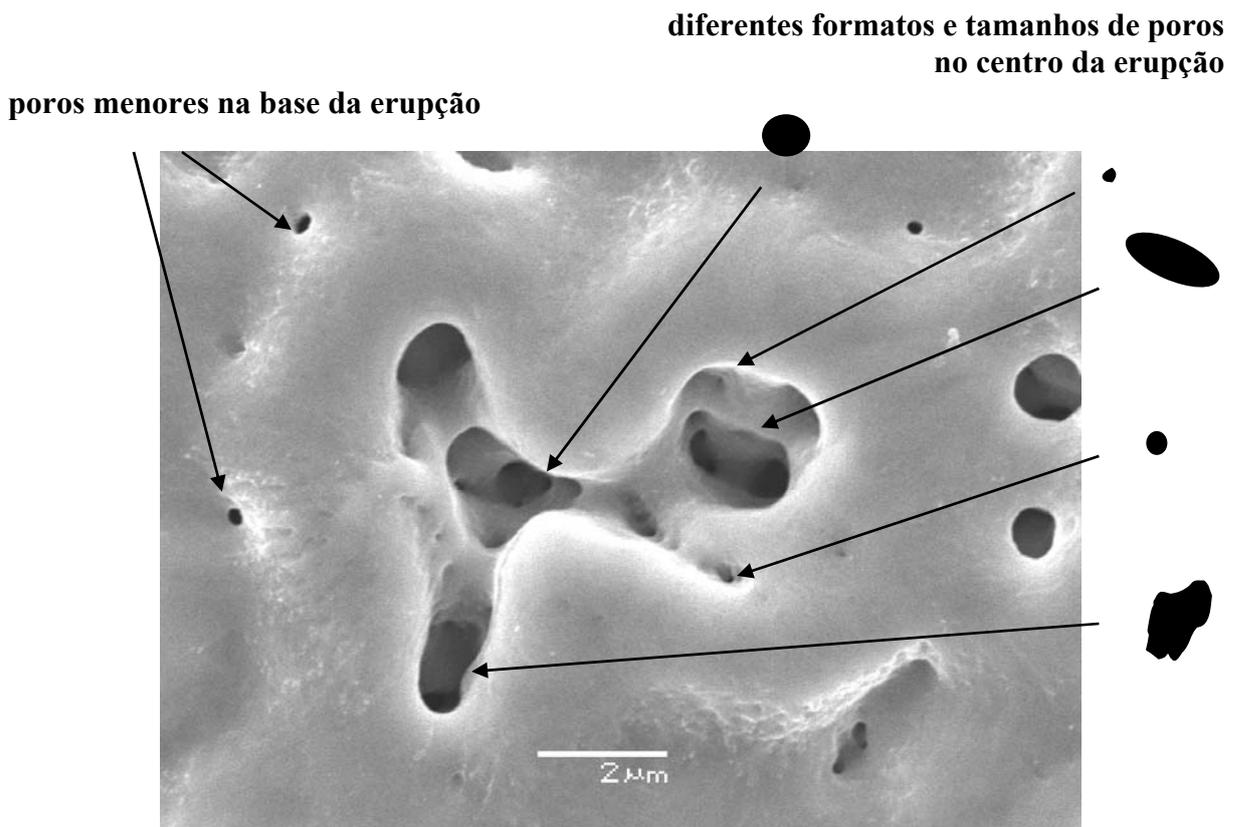


Figura 5.13 Micrografia, em vista de topo, apresentando uma estrutura porosa interconectada, formada pelas sucessivas erupções no óxido anódico de Ti.

Através da abertura desse poro, observa-se uma estrutura de óxido poroso e interconectado, tipo uma esponja, formado por vários poros menores, que estão distribuídos na espessura do óxido. Ao longo da profundidade, os poros menores e arredondados encontram-se numa região mais interna do óxido, enquanto que os poros mais abertos e de formatos irregulares acham-se mais superficialmente no óxido.

Na anodização, o espessamento do óxido ocorre devido às finas camadas de óxido que apresentam em sua extensão vários sítios de centelhamento. O espessamento e a porosidade do óxido estão relacionados com sítios de centelhamento da camada anterior, resultando em um óxido poroso com poros interconectados. A condição de forte centelhamento, ao longo do tempo, torna esses poros mais abertos, com formas irregulares e com erupções na borda.

Os resultados obtidos apresentaram o desenvolvimento de um método de porosificação em escala nanométrica do óxido de titânio crescido sobre Ti. Pela anodização porosa após intenso centelhamento se obteve um aumento da rugosidade, devido ao espessamento das camadas de óxido anódico. Tais modificações podem ser benéficas no processo de adesão de células sobre a superfície do implante de Ti e, além disso, a anodização porosa após centelhamento é capaz de produzir um óxido poroso com poros interconectados, que podem servir de reservatório de fármacos e ajudar em tratamentos médicos.

### 5.3. Processo de corrosão por pites e posterior anodização porosa após centelhamento

A anodização de Ti, previamente corroído por pites em 1M NaBr e potencial de 1,87V [ENH], foi realizada em modo galvanostático em 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e densidade de corrente (i) de 40mA.cm<sup>-2</sup>. Os testes foram realizados em temperatura ambiente, por 102s após atingir o potencial de centelhamento (180±10V). A Figura 5.14 representa o teste realizado, onde se observa a sobreposição dos transientes de potencial e de corrente.

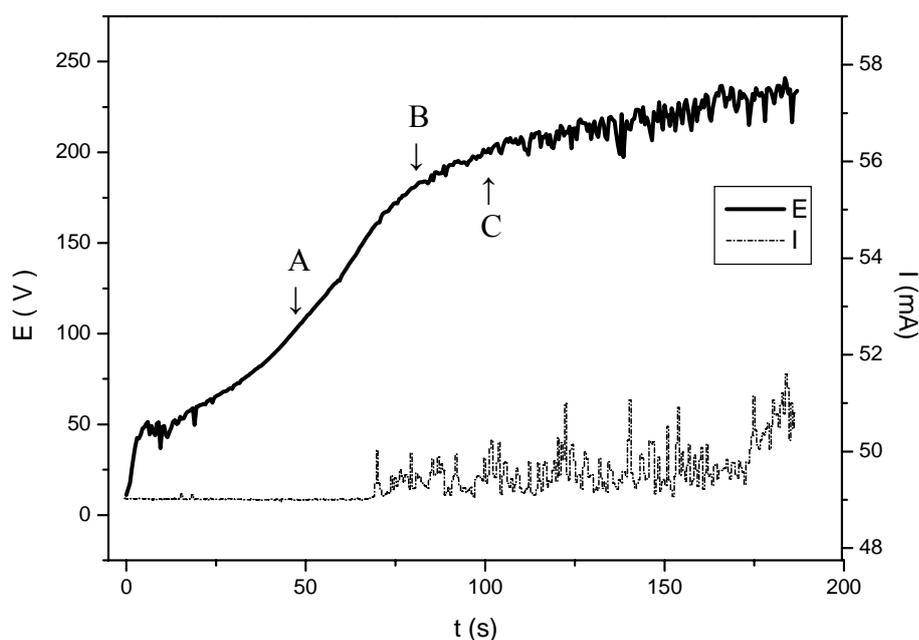


Figura 5.14 Transiente de potencial de Ti em 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, em condições de intenso centelhamento.

As condições de anodização utilizada nesse teste são idênticas às usadas no teste anterior. No entanto, se verifica um comportamento diferente daquele observado na amostra de Ti somente anodizada (vide Figura 5.5). Nos primeiros segundos, uma gradual mudança na declividade da curva de potencial que está relacionada aos diferentes estágios da anodização, sendo a taxa de anodização  $(\partial E/\partial t)_{1*} = 4,4V/s > 0$ . As oscilações de potencial, nos 10 primeiros segundos, pode ser consequência de uma anodização não convencional dentro do pite, onde os óxidos hidratados previamente e os hidróxidos formados durante a corrosão por pites são mais “frágeis” que o óxido presente na superfície não corroída da amostra.

Após, observa-se um aumento exponencial durante o crescimento do óxido barreira. A taxa de anodização nesse estágio foi medida em  $(\partial E/\partial t)_1 = 2,0V/s$ . A densidade de corrente permanece inalterada, em relação a corrente inicial aplicada, durante esse primeiro estágio.

O crescimento do óxido barreira ocorre até que o potencial do eletrodo atinja o nível de *breakdown* ou potencial de centelhamento ( $E_B$ ), em mais ou menos 100V (indicado pela letra A). Nessa etapa, o potencial cresce a uma taxa linear constante, sendo a taxa de anodização é  $(\partial E/\partial t)_2 = 2,1V/s$ . No decorrer, há uma diminuição do crescimento do óxido e um intenso centelhamento é observado a olho “nu” (que ocorre em  $180 \pm 10V$ , indicado pela letra B), em toda a extensão da superfície. Nota-se na curva uma suave diminuição no crescimento do potencial e, pequenas oscilações até atingir o potencial indicado pela letra C.

Na seqüência é verificada uma brusca diminuição no aumento e muitas oscilações do potencial até o final do experimento, sendo que esse quase não varia com o tempo de anodização. A taxa de anodização nessa etapa é de  $(\partial E/\partial t)_3 = 0,5V/s$ . Concomitantemente são observadas oscilações na curva de densidade de corrente, embora a anodização tenha sido realizada em modo galvanostático. Estas oscilações podem ser atribuídas à baixa eficiência da fonte de corrente durante o crescimento do óxido formado após centelhamento. Isto é, o aparelho não consegue responder com suficiente rapidez e/ou potência a uma variação muito rápida e/ou muito grande de resistência elétrica do sistema.

Através da comparação entre os transientes de potencial da anodização com e sem a prévia corrosão por pites (Figuras 5.14 e 5.5, respectivamente), se verifica uma diminuição na taxa de anodização de amostras com a prévia corrosão. Esse comportamento pode indicar um crescimento anormal do óxido anódico, sobre uma superfície previamente corroída e com produtos de corrosão no interior dos pites, pois, nessa superfície há a incorporação de  $Br^-$  no óxido, condição necessária á nucleação do pite. A anodização desse óxido contendo  $Br^-$  na sua estrutura é distinto da anodização de óxidos livres de halogenetos

Como a superfície apresenta muitos e enormes orifícios, a área superficial é maior do que a amostra sem corrosão. No entanto, a densidade de corrente estabelecida permanece a mesma estabelecida em  $40mA.cm^{-2}$ . A consequência disso é uma diminuição na corrente através do eletrodo previamente corroído. O resultado dessa anodização pode ser uma superfície com tamanho de poros menores (em comparação à amostra anodizada sem corrosão prévia, ou até mesmo semelhantes aos poros produzidos em regiões de fraco centelhamento).

Embora haja diferença na corrente, verifica-se que o potencial de centelhamento não é atingido pela condição superficial da amostra antes de ser anodizada. Segundo Ikonopisov (1977), o potencial de centelhamento  $E_B$  depende do metal anodizado, composição e resistividade do eletrólito. Outros fatores, como densidade de corrente, topografia da superfície e a formação do filme durante o polimento de Ti, quase não afetam  $E_B$ .

### 5.3.3 Análise de MEV em Ti polarizado potenciostaticamente em 1M NaBr e posterior polarização galvanostática em 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Na Figura 5.15 apresenta-se uma micrografia em MEV, feita em amostra de Ti anodizada sobre uma superfície com corroída por pites. A micrografia obtida em vista de topo mostra um pite de perímetro circular e uma frente de dissolução côncava, como vista no item 5.1, no entanto, a estrutura interna do poro apresenta-se modificada.

#### **óxido semi-aderido à parede interna do pite**

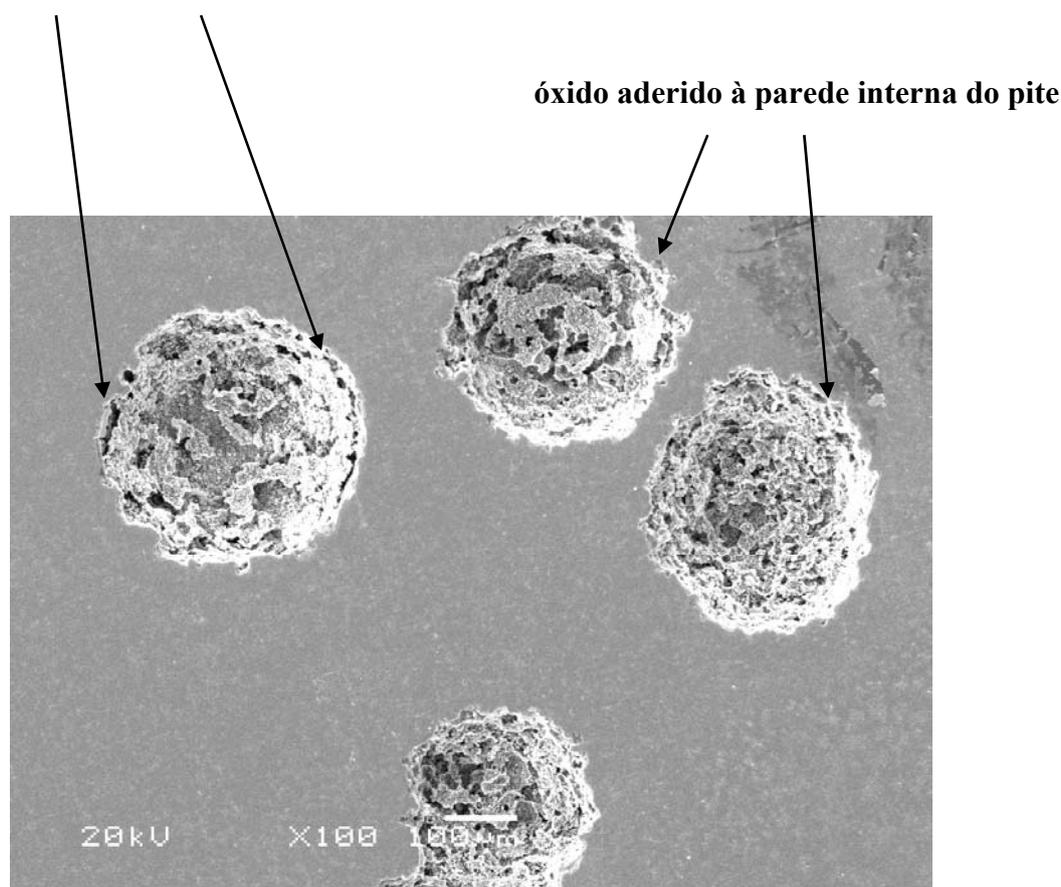


Figura 5.15 Micrografia, em vista de topo, apresentando a anodização em condições de intenso centelhamento em uma superfície de Ti corroída por pites.

O óxido interno crescido anodicamente, ora apresenta-se aderido à superfície, ora apresenta-se semi-descolado das paredes. O fato pode ser explicado pela precipitação de produtos de corrosão da dissolução de Ti, que se precipitam no interior do pite. Os produtos de corrosão remanescentes provavelmente, contribuem semi-adesão do óxido e na sua irregularidade morfológica, verificada dentro do pite.

Em toda a extensão da amostra encontram-se somente pites de forma arredondada, que podem estar unidos ou não. Na figura 5.16, pode-se observar a presença de dois pites bem definidos, unidos por um caminho de corrosão. Esse comportamento mostra que, nessa região houve a nucleação de pites menores, um perto do outro, em vez de ter nucleado um único pite maior. Apesar de não ser estabelecido, com consentimento geral, o real motivo pelo qual um pite nucleia e a efetiva influência de alguns parâmetros experimentais, é possível deduzir algumas explicações para esse comportamento.

Um dos motivos pode ter sido a ruptura mecânica do filme óxido passivo na região citada. Desse modo, a ruptura teria acontecido pelo enfraquecimento e pela incorporação de defeitos neste filme, em virtude do complicado polimento mecânico do titânio. A imperfeição agregada ao óxido durante polimento pode ter ocasionado uma maior velocidade de corrosão na região com maior grau de deformação plástica, possivelmente transferida para esse óxido.

#### **caminho de corrosão unindo dois pites**

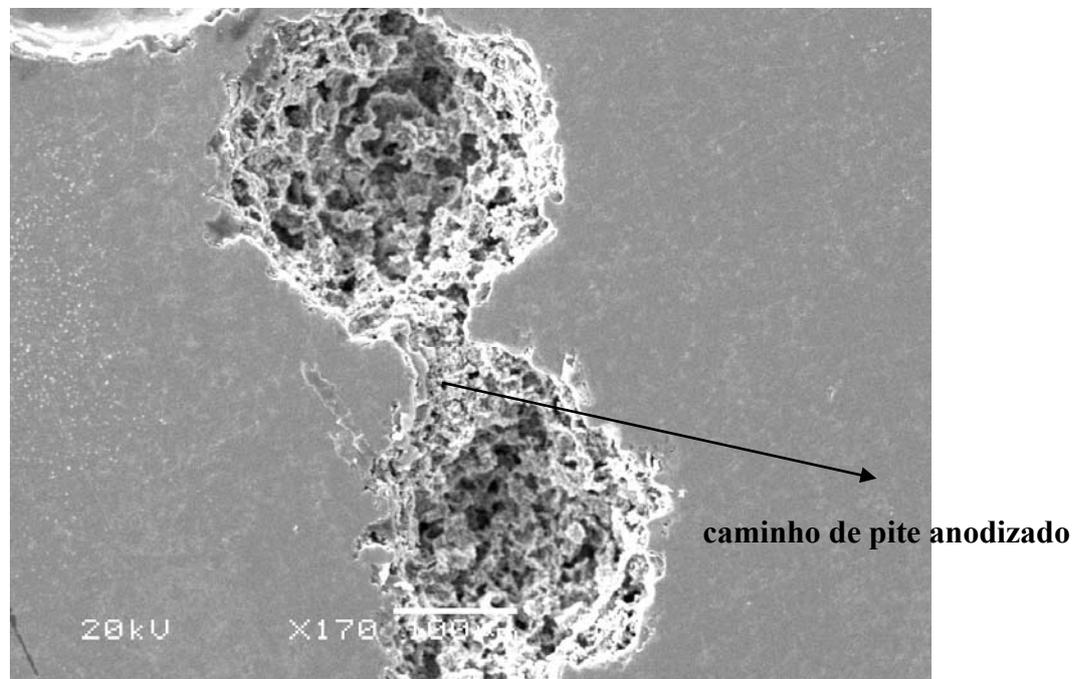
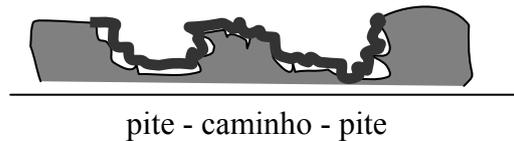


Figura 5.16 Micrografia, em vista de topo, salientando dois pites circulares unidos por um caminho de corrosão, em Ti.

O comportamento descrito anteriormente foi observado em outras regiões aleatórias da amostra, onde se verificam a existência de dois ou mais pites circulares unidos por um caminho. Esse caminho de pite pode apresentar largura ( $\Delta$ ) mais estreita ou mais larga, como se fosse a “cintura” do número 8. A Figura 5.17 descreve esse comportamento, interpretado como o “modelo da cintura do 8”, onde os pites 1 e 2 possuem formatos circulares.

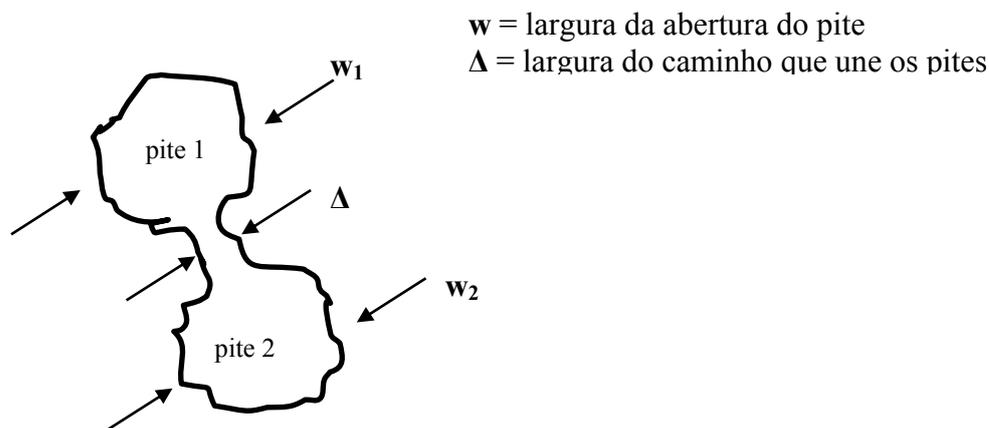


Figura 5.17 Esquema representando a união de dois pites por um caminho de corrosão.

A deformação mecânica adicionada ao óxido pode ter facilitado a dissolução horizontal do metal, ajudando na união dos dois pites, em detrimento da dissolução em profundidade, conforme discutido no item 5.1.2 deste capítulo. Somando-se a essa explicação, o caminho de corrosão é formado pela maior acidificação e concentração de  $\text{Br}^-$  que essa região sofre, devida ao somatório de zonas de maior  $[\text{HBr}]$  dos pites 1 e 2, alimentando o caminho de corrosão por ambos os lados.

O caminho de pite formado é mais superficial (ou seja, menos profundo) do que o pite circular, e sua largura é expressa pela letra grega  $\Delta$ . A formação desse caminho vem contribuir com um aumento da componente horizontal do buraco e da área superficial da amostra. Essas características podem auxiliar na deposição das células precursoras do osso, assim como ocorre em superfícies nanométricas produzidas pela oxidação anódica.

A Figura 5.18 apresenta o distinto comportamento dentro do pite e na superfície do metal próxima ao pite. Foram feitas duas ampliações (**a** e **b**) dessa superfície para que se pudesse verificar o aspecto do óxido anódico dentro e fora do pite.

As ampliações **a** e **b**, sobre a Figura 5.18 indicam um comportamento distinto dentro do pite em relação à superfície do metal. Apesar das micrografias não possuírem o mesmo aumento, é possível estabelecer a diferença física entres estas topografias.

óxido poroso e irregular dentro do pite

óxido plano e homogêneo na superfície

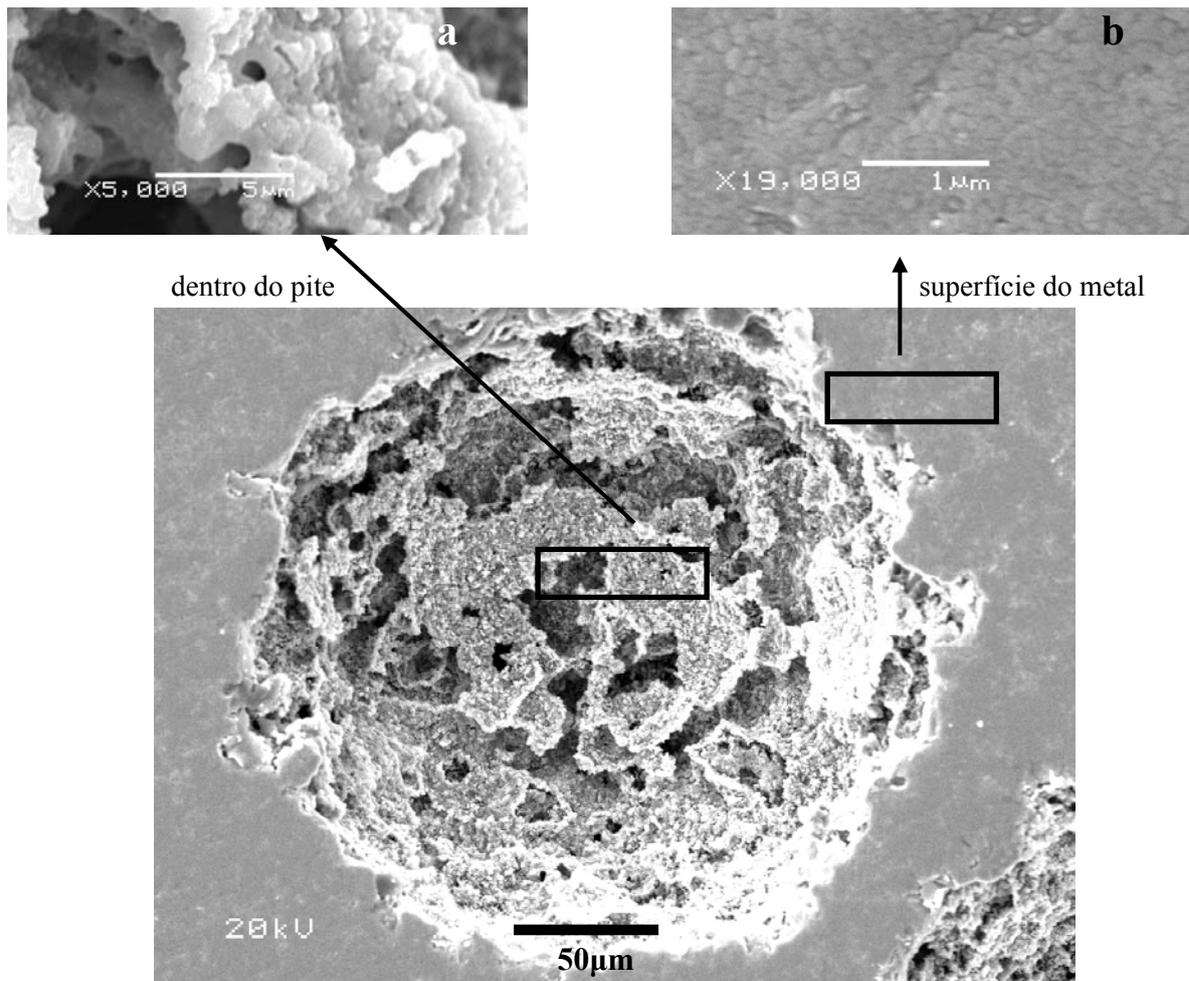


Figura 5.18 Micrografia, em vista de topo, apresentando os diferentes óxidos formados na superfície do Ti e dentro do pite.

Observa-se que o centelhamento ocorre com mais intensidade no interior do pite, indicando a presença de um óxido mais condutor e menos resistente à quebra do dielétrico. Esse óxido, que provavelmente se forma por precipitação dos produtos de corrosão, deve conter  $\text{Br}^-$  incorporado, o que explica a sua menor resistência ao centelhamento. Dentro do pite se nota a formação de um óxido anormal, não uniforme e pouco denso, com morfologia diferente à morfologia do óxido formado na região não corroída. É possível que esse comportamento se deva aos produtos de corrosão existentes no interior do pite, anterior à anodização.

A magnitude da anodização após centelhamento sobre uma amostra corroída por pites é fortemente influenciada pela magnitude da corrosão por pites. Como a corrosão por pites é um fenômeno completamente aleatório, no que se refere à quantidade de pites e a região corroída, não é possível garantir a reprodutibilidade desse processo.

A condição final da anodização galvanostática tem grande dependência com a densidade de corrente aplicada sobre a amostra. Isso indica que o centelhamento ocorrerá de forma mais branda, ou até mesmo com a quase ausência de poros, sobre amostras com grande quantidade de pites. Já em amostras com uma pequena quantidade de pites, a densidade de corrente é maior, provocando assim, um forte centelhamento da superfície.

As Figuras 5.19 - 5.23 apresentam micrografias da região interna dos pites. Nessas micrografias é possível observar a presença de um óxido poroso e não homogêneo. A porosidade, característica dos óxidos anodizados em condição de forte centelhamento, tem a sua morfologia modificada, em virtude dos produtos de corrosão precipitados anteriormente ao crescimento desses óxidos. Na Figura 5.19 é indicado um óxido anormal e desagregado.

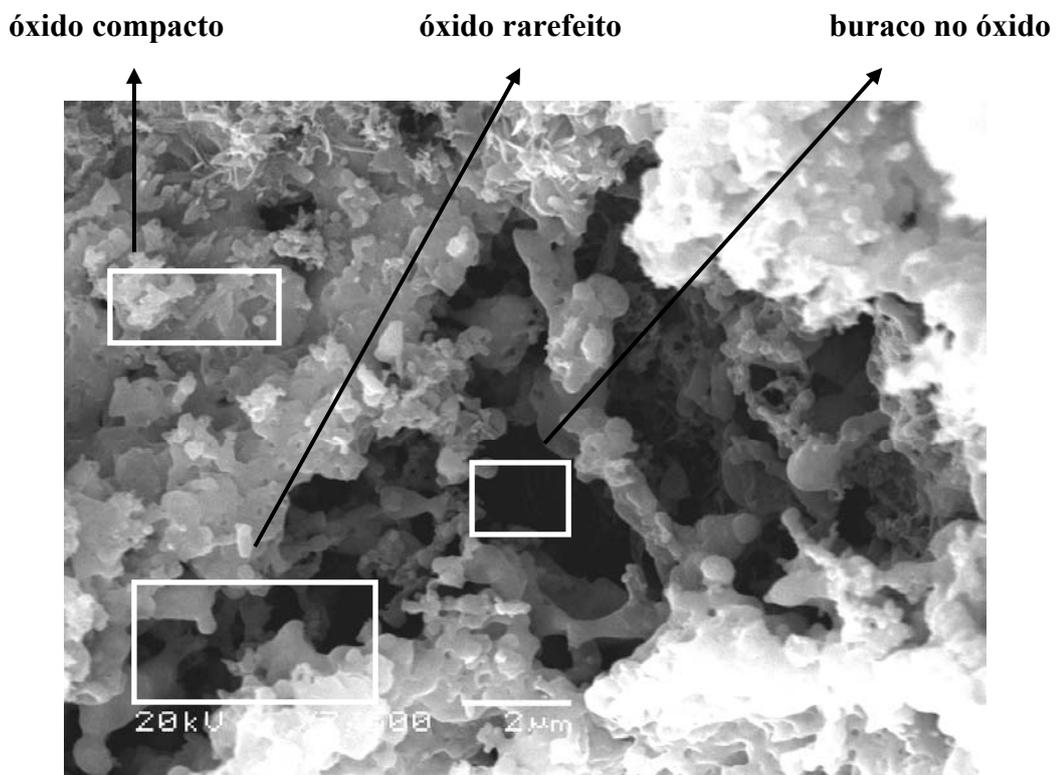


Figura 5.19 Micrografia, em vista de topo, apresentando o óxido anódico dentro do pite, onde se observa um óxido compacto e/ou desagregado.

Nessa micrografia se observam três comportamentos distintos. Um óxido denso e compacto, um óxido rarefeito e um óxido completamente desagregado e esburacado.

A existência de um óxido compacto adequado sobre a superfície metal é capaz de melhorar as características de resistência à corrosão ou de dureza desse metal. Todavia, um óxido poroso, com tamanho de poros específicos, pode ser de grande utilidade no processo de osseointegração.

Na Figura 5.20a é possível observar o fundo do pite, em foco, através da largura do buraco no óxido ( $\gamma$ ). Já na Figura 5.20b criou-se um volume de foco maior, ressaltando as informações sobre a espessura e a topografia do óxido anodizado.

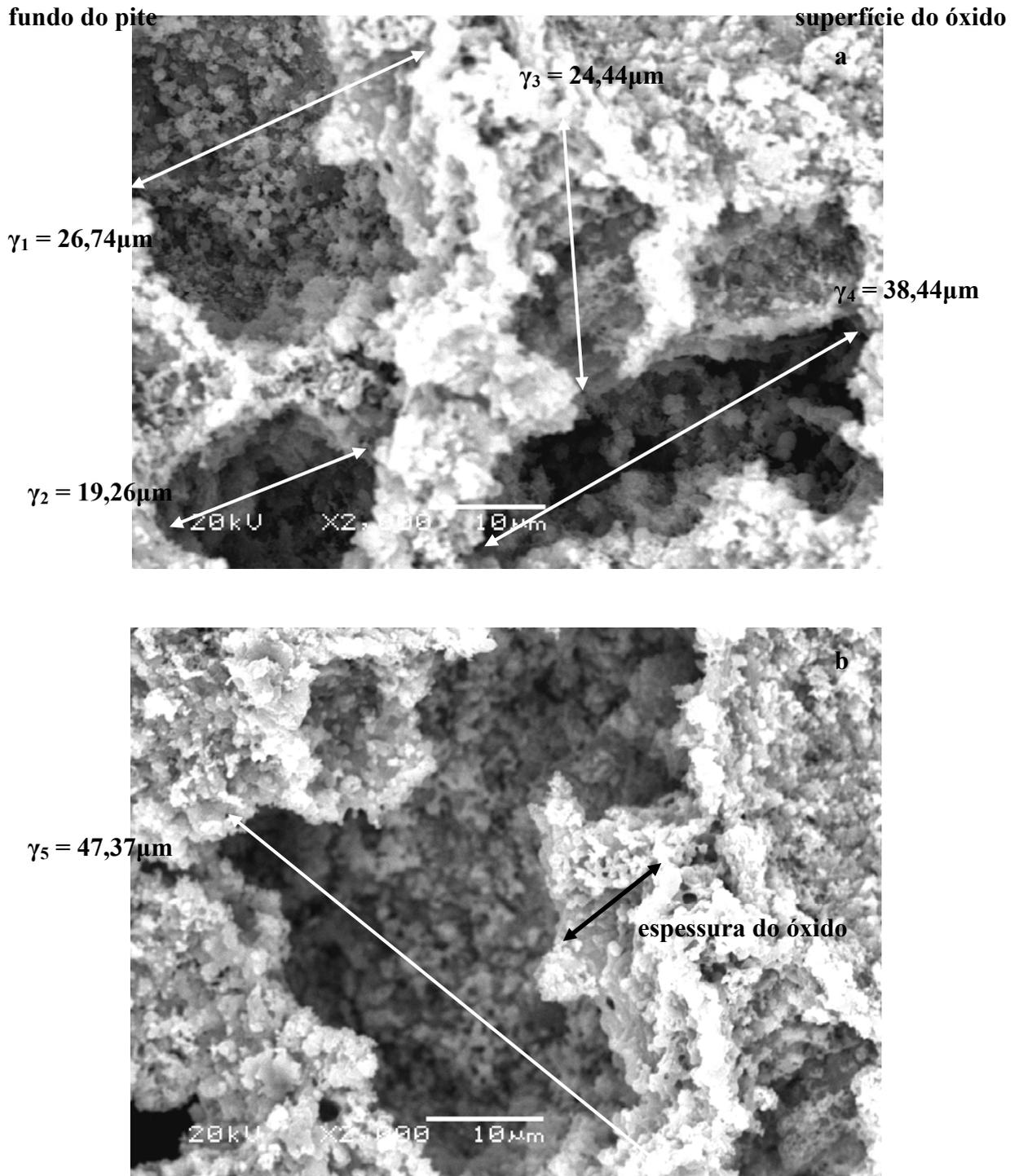


Figura 5.20 Micrografias, em vista de topo, apresentando os óxidos anódicos dentro do pite, com a imagem focada a) na região ao fundo do pite, isto é, na base deste óxido e b) ao longo da espessura e na superfície do óxido.

Conforme foi constatado anteriormente, o óxido poroso formado na região interna do pite apresenta um comportamento anormal e espessura irregular. Contudo, na Figura 5.21 é possível fazer uma estimativa da espessura desse óxido na região perto da borda do pite.

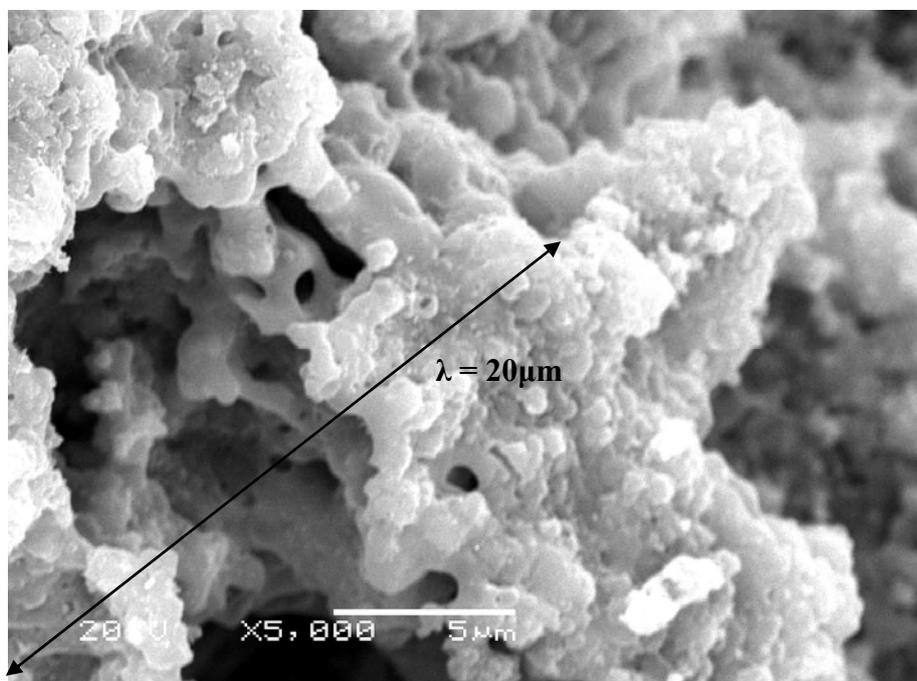


Figura 5.21 Micrografia, em vista de topo, salientando a borda do pite, onde a espessura do óxido anodizado foi medida em, aproximadamente,  $20\mu\text{m}$ .

Verifica-se nessa micrografia que o óxido formado possui uma alta porosidade volumétrica. E, que, além disso, apresenta uma semi-adesão com a superfície interna do pite.

A superfície desse óxido não apresenta um crescimento isomorfo à superfície base, isto é, a superfície do óxido formado não espelha a concavidade do pite. Isso se deve ao fato do óxido ser anormal e não possuir uma base plana, como as superfícies do item 5.2.2.

Porém, a morfologia deste óxido pode apresentar um papel preponderante no crescimento tecidual sobre a superfície modificada. A espessura estimada do óxido ( $\lambda$ ) e os tamanhos de buracos ( $\gamma$ ) verificados apresentam um tamanho na ordem de dezenas de microns. As dimensões dessas fendas são compatíveis com aquelas necessárias para favorecer o crescimento tecidual, em um estágio anterior à formação óssea (pré-osso ou osteóide), para dentro do implante. A Tabela 5.4 apresenta o crescimento tecidual de acordo com tamanho das fendas (CERRONI *et al.*, 2002).

Tabela 5.4 Crescimento tecidual conforme o tamanho das fendas (CERRONI *et al.*, 2002).

tamanho de fendas	crescimento tecidual
menor que 10 $\mu$ m	sem crescimento
entre 15 e 50 $\mu$ m	crescimento fibrovascular
entre 50 e 150 $\mu$ m	formação de osteóide
entre 150 $\mu$ m e 300 $\mu$ m	crescimento ósseo

Embora um tamanho de fenda menor que 100 $\mu$ m não apresente crescimento ósseo em seu interior, esse tamanho é necessário para que haja a formação de um tecido ósseo imaturo (ou primário). Tamanhos de fendas maiores que 15 $\mu$ m são importantes na proliferação de fibroblastos e na disposição de vasos sanguíneos e, conseqüentemente no crescimento, em fendas maiores, de um tecido ósseo primário.

A Figura 5.22 mostra um óxido anormal e muito poroso. Nesta micrografia, é possível verificar a presença de um óxido liso, misturado com um óxido crespo, de comportamentos contrastantes, como liso, texturizado, globular e poroso.

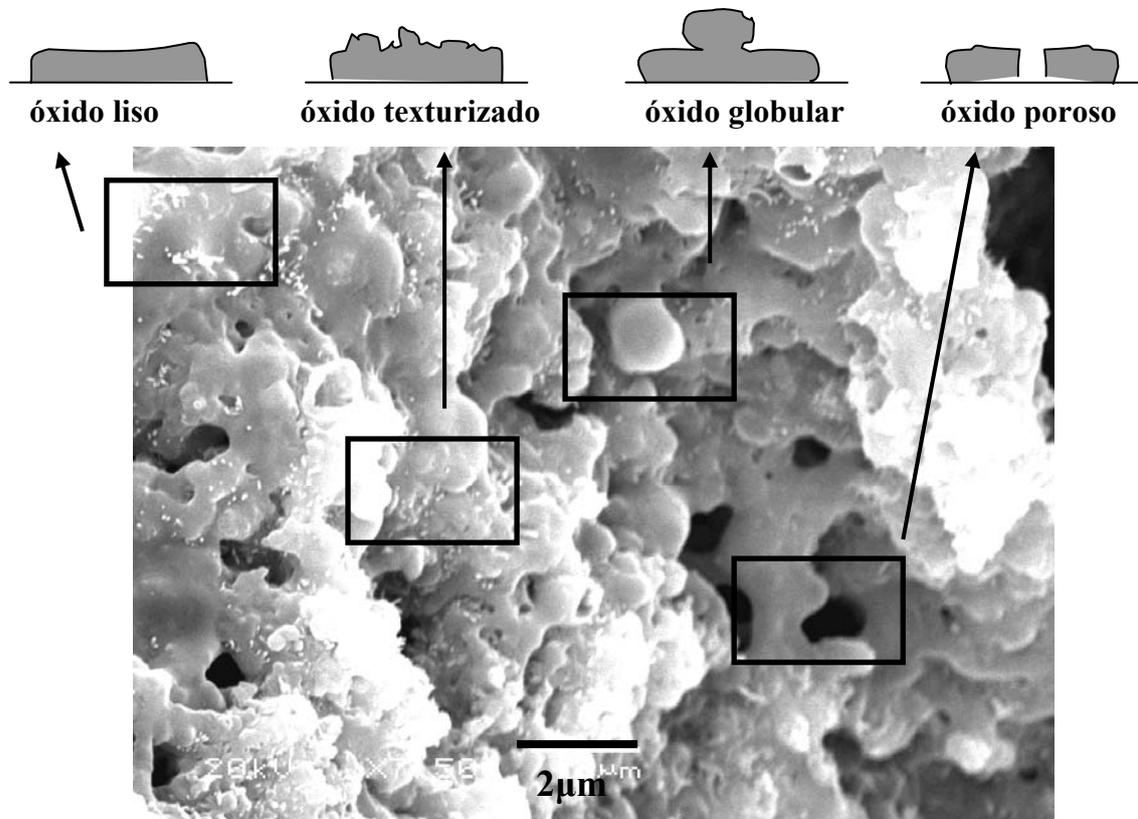


Figura 5.22 Micrografia, em vista de topo, apresentando o fundo do pite, onde se observa um comportamento anômalo dos óxidos anódicos.

A Figura 5.23a ressalta o óxido em uma região de fraco centelhamento, onde há poros pequenos, de formato circular bem definido e fechados na base. A Figura 5.23b apresenta regiões de forte centelhamento, com poros maiores e abertos, em formatos circular irregular ou em trilhas e interconectados ao longo do volume do óxido.

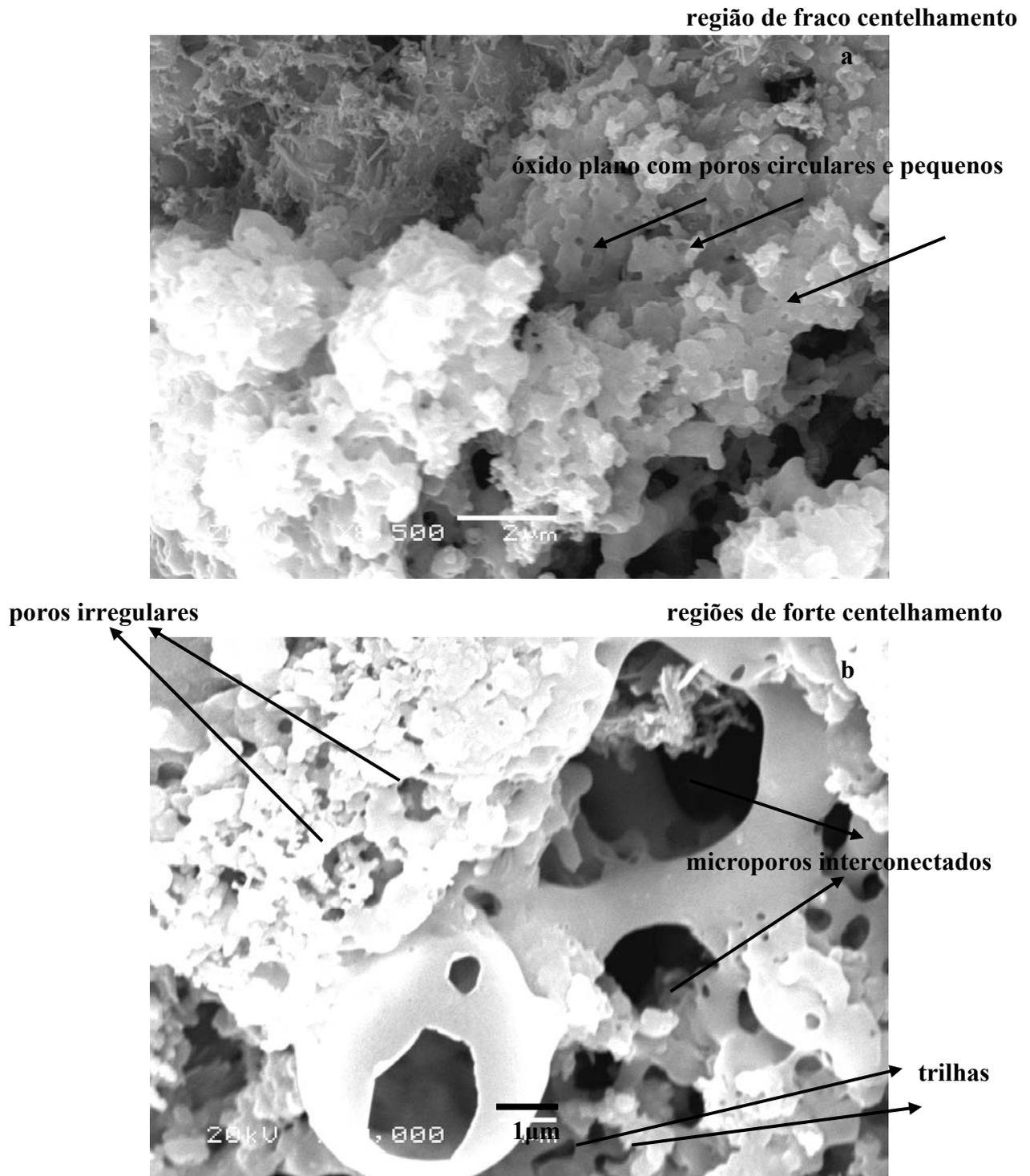


Figura 5.23 Micrografias, em vista de topo, apresentando o óxido anódico dentro do pite, onde se observam a) poros muito pequenos, circulares e não interconectados e b) poros maiores, abertos, irregulares e interconectados.

Os óxidos anódicos crescidos dentro do pite possuem distintos formatos de poros, textura alta e porosidade volumétrica maiores, em comparação aos óxidos anódicos crescidos em Ti sem a prévia corrosão por pites. Observa-se a formação de um óxido texturizado apenas dentro do pite, pois o óxido na superfície não corroída do metal é plano e homogêneo. Desse modo, os óxidos crescidos dentro dos pites apresentam uma topografia mais apropriada para a adesão de células precursoras do osso.

O fenômeno de osteoindução do titânio deve-se ao seu recobrimento de óxido  $\text{TiO}_2$  na superfície. Portanto, o crescimento anódico de óxidos  $\text{TiO}_2$  na superfície do titânio pode auxiliar na indução de osso a favor do implante. Entretanto, se a rugosidade do implante for muito intensa e o dano ao colocá-lo for muito grande, o osso não será capaz de se regenerar sozinho em torno do implante. Conseqüentemente, a produção de um novo osso precisa ser conduzida para o interior das profundas fendas do implante.

O uso de revestimentos de fosfato de cálcio na superfície de implantes de titânio, com o objetivo de torná-los mais bioativo, tem sido explorado em alguns estudos (SPOERKE, 2005). Takemoto *et al.*, (2006) mostraram que o Ti, mesmo sem conter um revestimento de fosfato de cálcio, pode ser osteoindutor. Acontece isto quando o Ti possui uma complexa estrutura porosa interconectada e uma superfície bioativa proveniente de específicos tratamentos térmicos e/ou químicos. Porém, o período de implantação requerido para a indução do crescimento do osso (osteocondução) nos poros desses implantes foi mais longo (12 meses) do que nos poros de biomateriais com base em fosfato de cálcio (45-90 dias).

Contudo, estudos mostram que as propriedades mecânicas dos tecidos; cartilagem, osso, ligamento e tendão são visivelmente diferentes entre si. Devido à diferença em suas naturezas, é sensato admitir que a implantação em um tecido específico deva levar em consideração a natureza dos tecidos adjacentes. Desta maneira, a substituição de um tecido específico irá requerer a construção de um implante com o uso de muitos materiais.

Superfícies tridimensionais de  $\text{TiO}_2$  formadas por anodização porosa podem favorecer a aderência física de fosfatos de cálcio, uma vez que estes se depositam sobre os nanoporos formados. Além disso, a deposição de cristais de fosfato de cálcio é extremamente aderente, em virtude das ligações químicas na interface.

#### 5.4 Processo de anodização porosa após centelhamento e posterior deposição química de fosfatos de cálcio

##### 5.4.1 Síntese do fosfato de cálcio

Os fosfatos de cálcio podem ser sintetizados por precipitação, através da mistura de reagentes com íons de cálcio e de fosfato sob condições alcalinas ou ácidas. Baseando-se nisso, o preparo da presente solução foi inspirado na reação ácido-base do Método Via Úmida de formação das hidroxiapatitas (HA), conforme o item 3.7.1 do capítulo 3.

A solução foi preparada através da adição de  $\text{Ca(OH)}_2$  a  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , até a saturação com a formação de cristais de fosfato de cálcio. A proporção dos volumes foi alcançada em, 75%  $0,2\text{M Ca(OH)}_2$  + 25%  $0,3\text{M H}_3\text{PO}_4$ , aproximadamente. Como resultado desta proporção se observou uma solução aquosa, de tonalidade leitosa, com a precipitação de cristais brancos no fundo do béquer, que garantem a saturação da solução.

Dentro dessa solução aquosa, cátions de cálcio e ânions de fosfato apresentam uma atração mútua muito forte, levando a uma superconcentração de fosfato de cálcio em pontos aleatórios da solução, procurando alcançar a supersaturação requerida para a nucleação homogênea. O movimento aleatório desses “potenciais núcleos” permitirá, eventualmente, se aproximar de alguma superfície onde seja possível minimizar a energia superficial requerida para a precipitação de um núcleo. Assim, mesmo que a supersaturação média da solução tenha um valor modesto, a viabilidade das supersaturações pontuais é um fato naturalmente esperado a partir da atração mútua de íons de cargas opostas (GOMES *et al.*, 2002).

##### 5.4.2 Deposição química de fosfatos de cálcio sobre a superfície anodizada de Ti

O método empregado na deposição química de fosfatos de cálcio sobre a superfície de Ti anodizado foi baseado no Método Eletrolítico, visto no item 3.7.2 do capítulo 3. A imersão na solução saturada em fosfatos de cálcio gera um aumento local do pH nas imediações da superfície da amostra e produz a precipitação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , provenientes da solução.

Posteriormente, a amostra é imersa em uma solução alcalina de  $\text{Ca(OH)}_2$  aquosa, assim a amostra carrega, em sua superfície, a solução ácida pra dentro da solução alcalina. A pré-acidificação da superfície favorece uma reação química com a solução alcalina e promove a deposição de íons  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a superfície.

O procedimento consiste na deposição de finas camadas de fosfato de cálcio através de ciclos de imersão das amostras em duas distintas soluções aquosas em temperatura ambiente (25°C). Foram adotados dois procedimentos diferentes, nos quais a forma de preparação da segunda solução foi modificada, conforme aparece a seguir.

Procedimento 1: { solução 1: Solução 0,2M Ca(OH)<sub>2</sub> + 0,3M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, com fosfatos de cálcio em suspensão.  
solução 2: Solução aquosa de 0,2M Ca(OH)<sub>2</sub>, **em suspensão**.

Procedimento 2: { solução 1: Solução 0,2M Ca(OH)<sub>2</sub> + 0,3M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, com fosfatos de cálcio em suspensão.  
solução 3: Solução aquosa de 0,2M Ca(OH)<sub>2</sub>, **filtrada**.

Para que a espessura final das camadas depositadas seja expressiva, uma maior quantidade de precipitação de fosfatos de cálcio deve ocorrer sobre a superfície anodizada. No entanto, a camada final não pode ser tão espessa, de modo que descaracterize a topografia original do óxido anódico. Assim, estabeleceu-se um padrão de cinco ciclos de imersões para que haja um espessamento significativo da camada de fosfato de cálcio na superfície do óxido. Cada ciclo consiste em: imersão na solução 1 e posterior imersão na solução 2, no procedimento 1, e imersão em solução 1 e posterior imersão na solução 3, no procedimento 2.

Na primeira imersão criou-se um filme fino de solução saturada em íons PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e Ca<sup>2+</sup> (fosfatos de cálcio) na superfície anodizada. Na segunda imersão, a amostra foi imersa em uma solução alcalina rica em íons Ca<sup>2+</sup>. No primeiro ciclo de imersões, pretendia-se precipitar rapidamente os fosfatos de cálcio nos poros superficiais.

No decorrer de cada ciclo de imersão, as camadas de fosfato de cálcio vão sendo sobrepostas sobre a superfície do óxido e nas paredes externas e internas dos poros. Após a secagem do último ciclo foram observados, em ambos os procedimentos, a deposição de uma camada densa e esbranquiçada sobre superfície das amostras.

### 5.4.3 Análise por MEV em Ti anodizado galvanostaticamente em 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e posterior deposição química de fosfatos de cálcio

Procedimento 1 (cada ciclo de imersão: imersão em solução com fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução com suspensão de Ca(OH)<sub>2</sub>)

As figuras deste item apresentam a deposição química de fosfatos de cálcio sobre o óxido produzido por anodização. A deposição química foi conduzida através do procedimento 1, com cinco ciclos de imersão, sendo cada um: imersão em solução com fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução com suspensão de Ca(OH)<sub>2</sub>.

Na Figura 5.24, é mostrada a topografia da superfície formada pela deposição química de fosfato de cálcio. Como resultados dessa deposição foram obtidos precipitados em duas morfologias distintas: um recobrimento fino e uniforme sobre superfície e lamelas pequenas e aglomeradas ou em forma grosseira.



Figura 5.24 Micrografia, em vista de topo, apresentando as morfologias formadas pela deposição química de fosfato de cálcio, através de ciclos de imersão em solução de fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução com suspensão de Ca(OH)<sub>2</sub>, sobre Ti anodizado.

Para a caracterização química da deposição foi usada a técnica de EDS (*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*). No entanto, o feixe de EDS verifica não só a presença dos elementos da deposição química de fosfato de cálcio, mas também os elementos presentes no óxido anódico e no substrato de titânio. Em virtude disso, a mesma deposição de fosfato de cálcio foi realizada em uma amostra de Ti sem anodização, garantindo assim que o resultado da análise de EDS sobre os fosfatos de cálcio, não fosse disfarçado pelo fósforo contido no óxido anódico. A análise química da deposição em Ti sem anodização foi realizada sobre as mesmas morfologias encontradas na deposição sobre óxidos anódicos. Nessa medida foi subtraída a informação do substrato (Ti) e avaliada só a informação da deposição química. O resultado obtido por EDS, em amostra sem processo de anodização, está apresentado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Análise química por EDS dos precipitados depositados na deposição química de fosfato de cálcio em Ti sem anodização.

<b>elemento</b>	<b>recobrimento fino e uniforme</b> (% atômica)	<b>recobrimento em forma de lamelas</b> (% atômica)
cálcio	24,9	92,1
fósforo	75,1	7,9

A morfologia uniformemente distribuída, em forma de recobrimento sobre o óxido possui uma proporção razoável entre os elementos de cálcio e fósforo para que esta morfologia possa ser caracterizada como um fosfato de cálcio. No entanto, a morfologia composta pelas lamelas, apresentou uma grande quantidade de cálcio em relação ao fósforo.

No processo de deposição química pode ocorrer a deposição de fosfatos de cálcio sobre a superfície, assim como a anexação de hidróxido cálcio. Isso ocorre em virtude da solução  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  apresentar partículas em suspensão que podem se assentar sobre a fino recobrimento de fosfatos de cálcio. A morfologia em lamelas, provavelmente seja formada por hidróxido de cálcio, contaminado com pequenas porcentagens de carbonato de cálcio. Os resultados da Tabela 5.5 corroboram esse argumento, pois mostram uma quantidade exacerbada de cálcio em relação à quantidade de fósforo presentes no recobrimento em forma de lamelas.

A Figura 5.25 mostra a deposição química de fosfato de cálcio sobre poros e trilhas no óxido, formadas em condições de intenso centelhamento. Na micrografia se observa uma maior deposição de fosfato de cálcio em regiões de forte centelhamento, em comparação com regiões de fraco centelhamento.

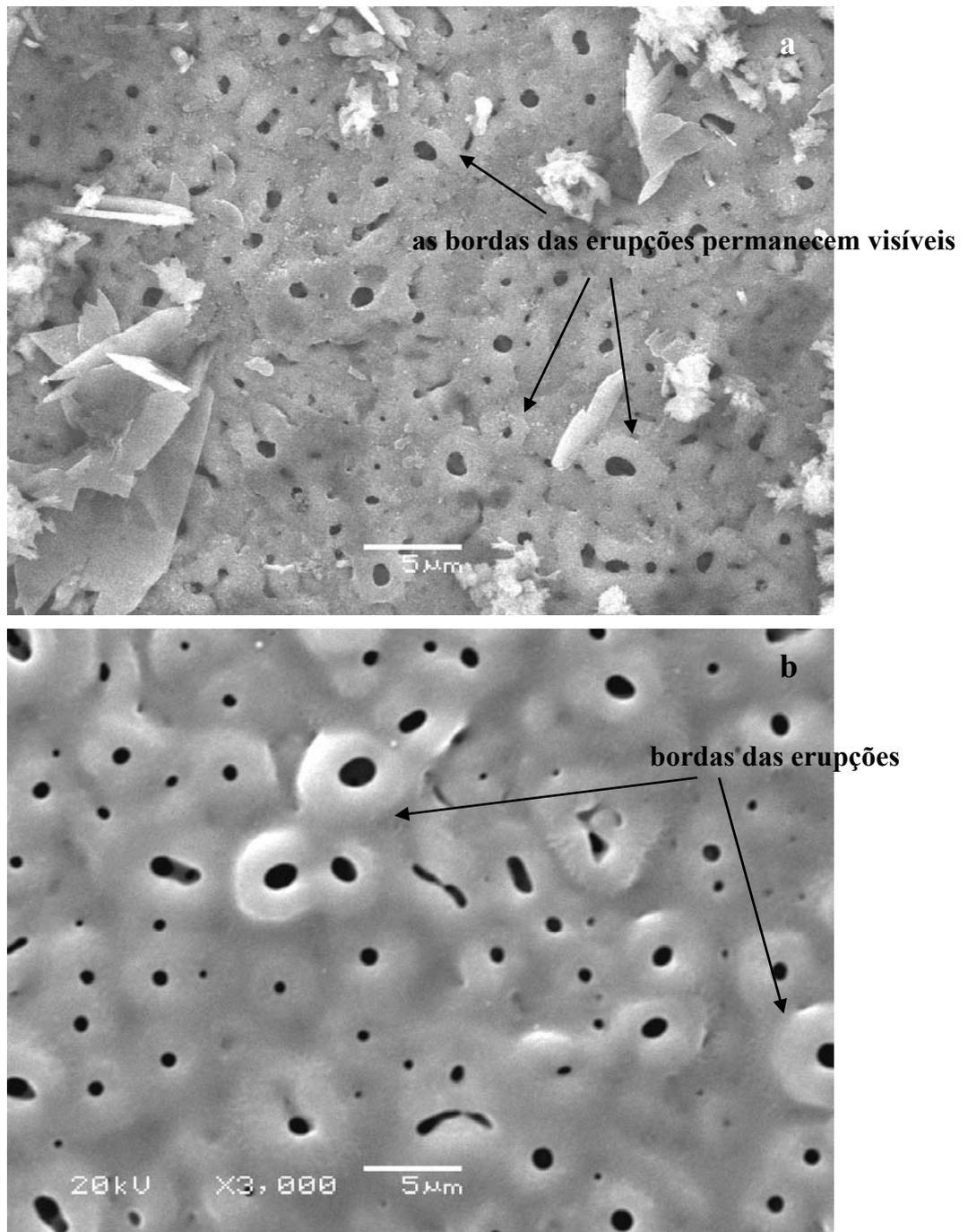


Figura 5.25 Micrografia, em vista de topo, apresentando uma grande quantidade de deposição de fosfatos de cálcio em torno de uma trilha do óxido anódico de Ti.

As regiões de forte centelhamento apresentam íons fosfatos incorporados do eletrólito, conforme foi constatado na seção 5.2. Dessa forma, o resultado da deposição química de fosfato de cálcio sobre o óxido anódico será uma camada de óxido de titânio contendo íons  $\text{PO}_4^{3-}$  e sobre esta, camadas de íons de cálcio e de fosfatos unidos ao óxido. A união ocorre devido à ligação química entre os íons do eletrólito anódico e os íons provenientes da deposição química, indicando que o P incorporado ao óxido durante o centelhamento pode ajudar na nucleação de fosfatos de cálcio sobre a superfície do óxido.

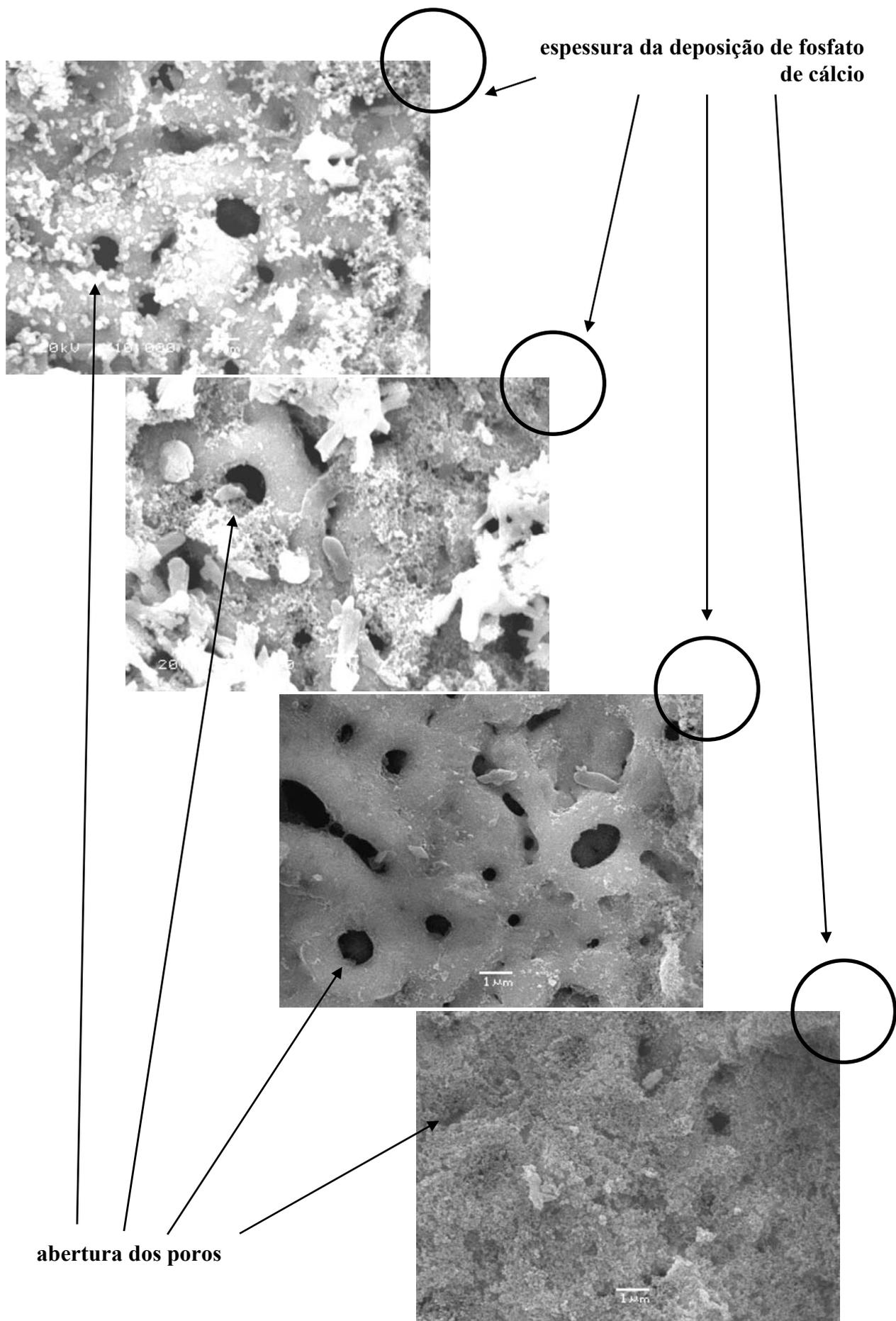
O processo de precipitação dos fosfatos de cálcio na superfície anódica é, possivelmente, induzido pela supersaturação do sal de fosfato de cálcio devido ao aumento do pH na região adjacente a superfície anódica e à incorporação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Provavelmente, esse aumento de pH seja maior na região de forte centelhamento, do que na região de fraco centelhamento. Desse modo há uma menor acidificação da solução em locais onde há maior concentração de íons  $\text{PO}_4^{3-}$  incorporados, em comparação com a outra região.

Na Figura 5.26a se observa um fino e uniforme recobrimento de fosfato de cálcio que atenua a topografia do óxido anodizado. Em comparação com a topografia apenas anodizada na Figura 5.26b, a Figura 5.26a apresenta uma ligeira diminuição do tamanho dos poros.



Figuras 5.26 Micrografias, em vista de topo, apresentando o Ti anodizado a) com recobrimento de fosfato de cálcio e b) sem recobrimento.

As Figuras 5.27 apresentam uma sequência do volume da deposição química de fosfatos de cálcio e do fechamento parcial dos poros do óxido anódico. Os tamanhos das setas indicam o aumento da espessura da deposição e o aumento da abertura dos poros.



Figuras 5.27 Micrografias, em vista de topo, apresentando a não uniformidade da espessura e da quantidade de deposição de fosfato de cálcio sobre o óxido anódico.

Através das figuras anteriores é possível concluir que a quantidade e a espessura da deposição não são uniformes ao longo da superfície. A sequência mostra que quanto maior a espessura da camada depositada, maior é o fechamento dos poros. No entanto, uma camada demasiadamente espessa não garante a nanotopografia do óxido anódico sob esta.

A deposição de fosfatos de cálcio através do procedimento 1 (ciclos de imersão em solução com fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução com suspensão de  $\text{Ca(OH)}_2$ ) teve como resultado a formação de duas morfologias distintas. Apenas o recobrimento fino e uniforme, diretamente precipitado e crescido sobre o óxido anódico apresentou características químicas de fosfatos de cálcio, como indica a alta porcentagem de P. As demais morfologias apresentaram-se, basicamente, compostas por Ca e podem ter as seguintes origens: lamelas grandes, formadas por precipitados de hidróxido ou de carbonato de cálcio, oriundos da solução 1 (fosfatos de cálcio em suspensão) ou pequenas lamelas, formadas por precipitados de hidróxido ou de carbonato de cálcio, provenientes da imersão na solução 2 (suspensão de  $\text{Ca(OH)}_2$ ). Embora o recobrimento fino apresente uma composição química plausível, esse está encoberto pela grande quantidade de lamelas de cálcio.

Além disso, esse recobrimento apresentou uma distribuição não uniforme e espessura irregular sobre o óxido. Em algumas regiões a deposição se mostrou rala ou muito fina e com poros totalmente abertos, enquanto que em outras regiões a deposição foi muito espessa, a ponto de descaracterizar a nanotopografia anódica sob essa deposição. A deposição homogênea e em espessura intermediária, que seria a ideal, não se mostrou eficiente no fechamento total dos poros, nem mesmo dos poros menores.

Observou-se, também, que a pré-oxidação anódica é muito significativa no processo de deposição química. Foi constatada uma maior nucleação de fosfatos de cálcio em regiões de forte centelhamento, atribuída à sua afinidade com os fosfatos presentes no óxido anódico.

Devido aos resultados pouco significativos do procedimento 1, não foi realizada a análise quantitativa do fechamento dos poros. Foram discutidas algumas metodologias para a preparação da solução de  $\text{Ca(OH)}_2$ , com a intenção de serem obtidas deposições mais proveitosas. A decantação das soluções pode ser um parâmetro importante para obtenção de recobrimentos finos e uniformes fundamental para reduzir a presença de lamelas grosseiras. No entanto, para que a solução de  $\text{Ca(OH)}_2$  seja preparada instantaneamente e os resultados sejam favoráveis, foi feita uma correção no procedimento 1. O procedimento 2 consiste na filtragem da solução de  $\text{Ca(OH)}_2$  (solução 3), com a finalidade de minimizar a deposição de lamelas de Ca e otimizar o recobrimento de fosfato de cálcio.

Procedimento 2 (cada ciclo de imersão: imersão em solução com fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução de  $\text{Ca(OH)}_2$  filtrada)

As figuras deste item apresentam a deposição química de fosfatos de cálcio sobre o óxido produzido por anodização. A deposição química foi conduzida através do procedimento 2, com cinco ciclos de imersão, sendo cada um: imersão em solução de fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução de  $\text{Ca(OH)}_2$  filtrada.

A Figura 5.28 apresenta a topografia da superfície formada pela deposição química de fosfato de cálcio. Como resultado dessa deposição obteve-se um recobrimento mais grosseiro, compacto ou rarefeito e precipitado mais fino e em menor quantidade, quando comparados a deposição pelo procedimento 1 (Figura 5.24).

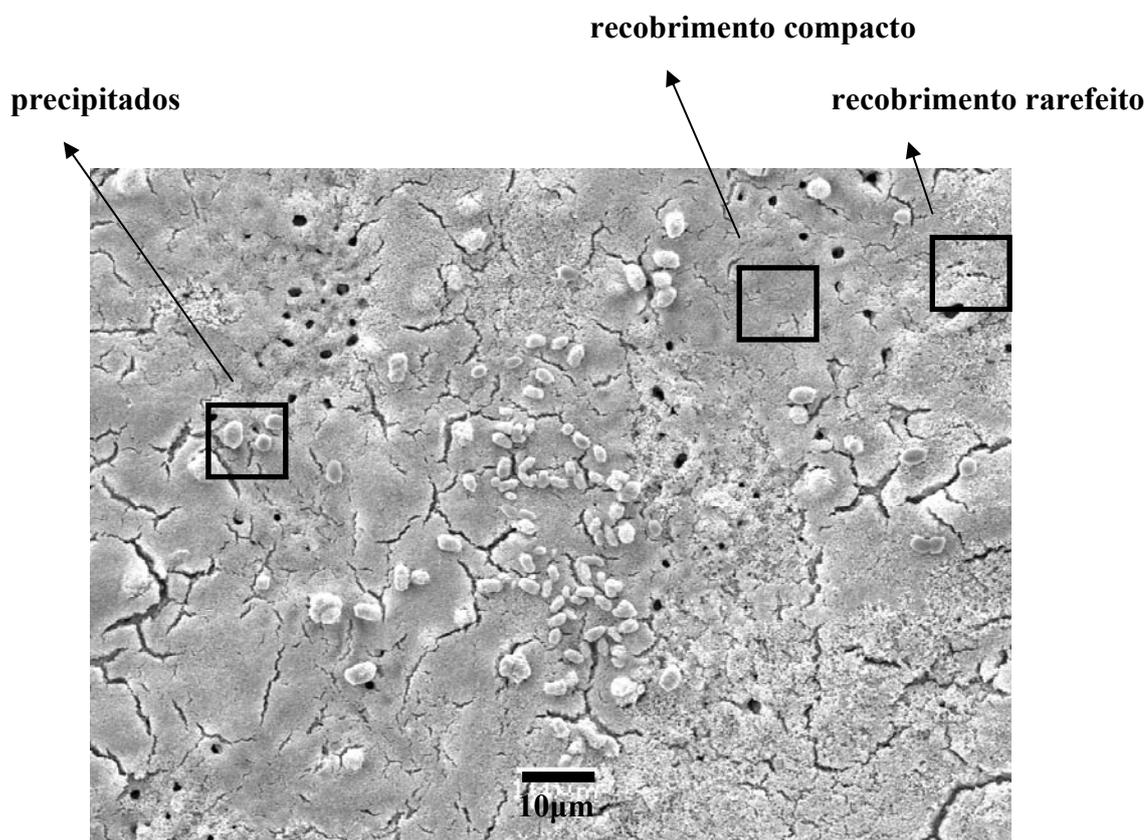


Figura 5.28 Micrografia, em vista de topo, apresentando as morfologias formadas pela deposição química de fosfatos de cálcio, através de ciclos de imersão em solução com fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução de  $\text{Ca(OH)}_2$  filtrada, sobre Ti anodizado.

Na Figura 5.29 é observada a falta de uniformidade do recobrimento de fosfato de cálcio ao longo da superfície oxidada. Essa não uniformidade pode estar relacionada à condição de centelhamento à qual as diferentes regiões são submetidas.

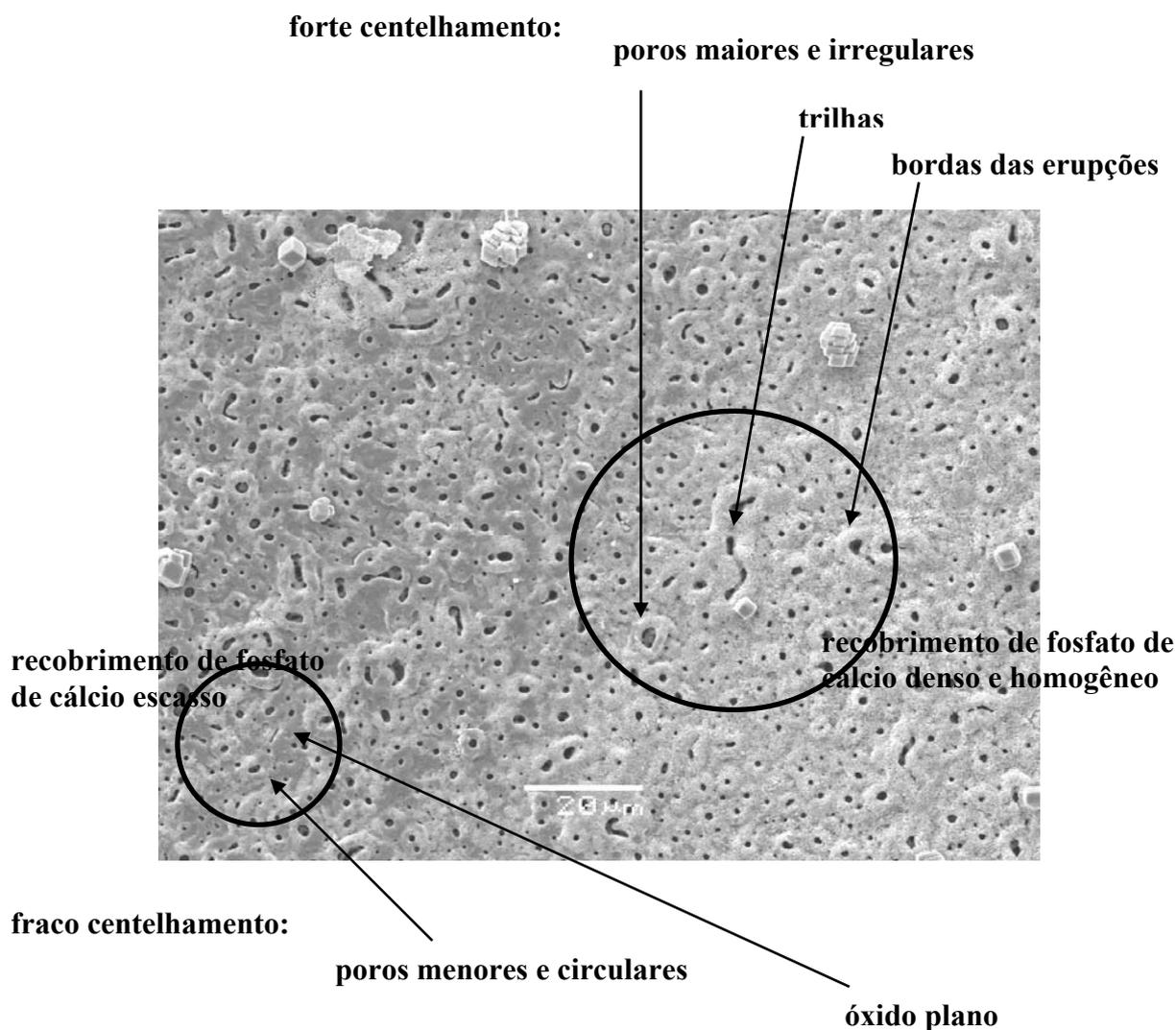


Figura 5.29 Micrografia, em vista de topo, apresentando uma grande quantidade de deposição química de fosfato de cálcio em torno das regiões de forte centelhamento do óxido anódico de Ti.

Através dessa micrografia se verifica que a deposição de fosfatos de cálcio pelo procedimento 2 também é mais intensa nas regiões de forte centelhamento, conforme verificado na Figura 5.25. Observa-se um volume maior de fosfatos de cálcio em torno dos poros maiores e irregulares e das trilhas, que são formatos de poros característicos de um forte centelhamento. Outra provável explicação é que a nanorrugosidade criada pelo forte centelhamento possui uma maior energia superficial, suficiente para promover uma ancoragem do fosfato de cálcio e, assim, criar uma união física com a superfície do óxido.

A Figura 5.30 apresenta a espessura não uniforme da deposição de fosfato de cálcio sobre a superfície anodizada. Algumas regiões apresentam um recobrimento fino, já em outras é observado um recobrimento espesso e compacto. Mesmo assim, em ambas as regiões o recobrimento apresentou fissuras e não se tornou eficiente no fechamento do total dos poros, nem mesmo dos poros menores.

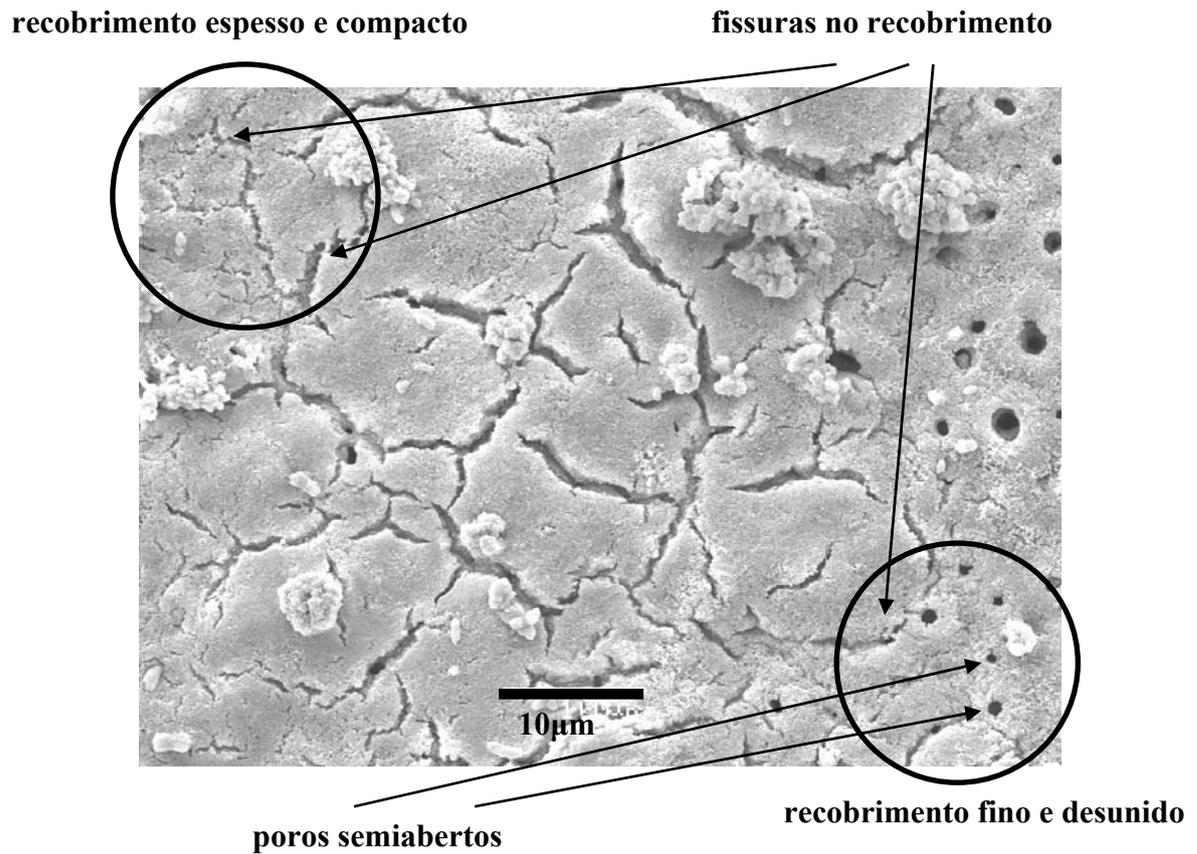


Figura 5.30 Micrografia, em vista de topo, apresentando o recobrimento não homogêneo de fosfato de cálcio, com fissuras e poros semiabertos, sobre o óxido anódico de Ti.

Apesar do recobrimento espesso e compacto garantir o fechamento de grande parte dos poros, infelizmente este apresenta fissuras ao longo da deposição (vide Figura 5.31). As fissuras presentes nesse recobrimento desvendam uma porção de óxido não recoberta pelo fosfato de cálcio. Esse óxido aparenta não ter reagido quimicamente com a deposição de fosfatos de cálcio, uma vez que apresenta intacta a sua topografia. Essa observação leva a crer que camadas muito espessas de deposição apenas se depositam sobre o óxido, e apresentam pouca ou quase nenhuma interação química com esse óxido.

#### **óxido anódico intacto**

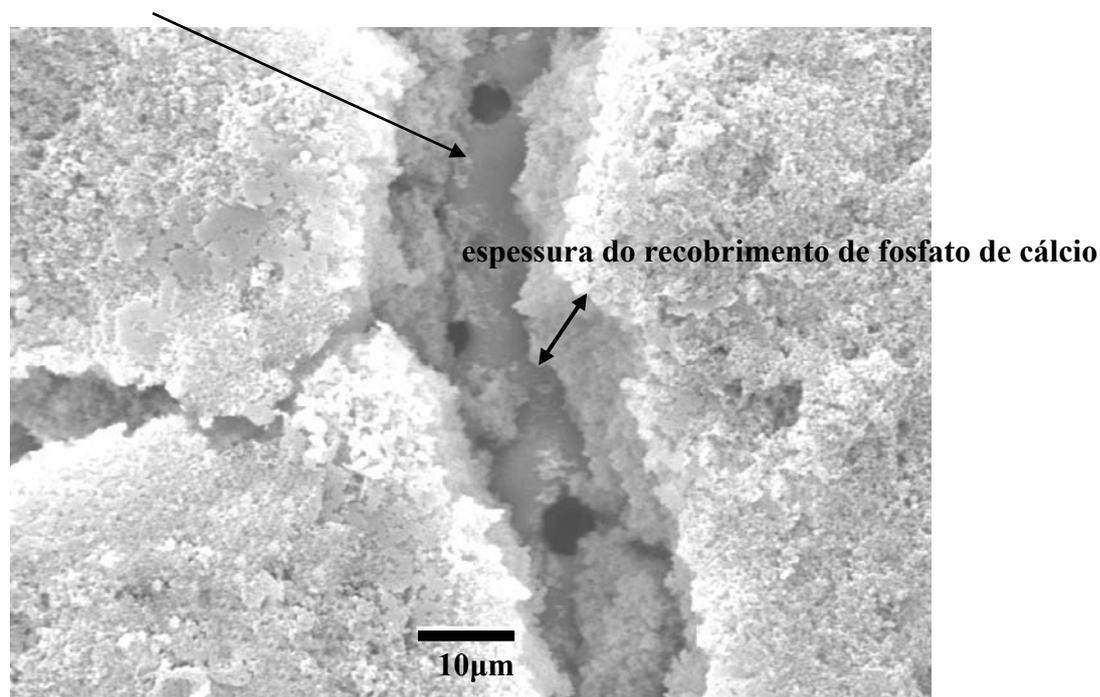
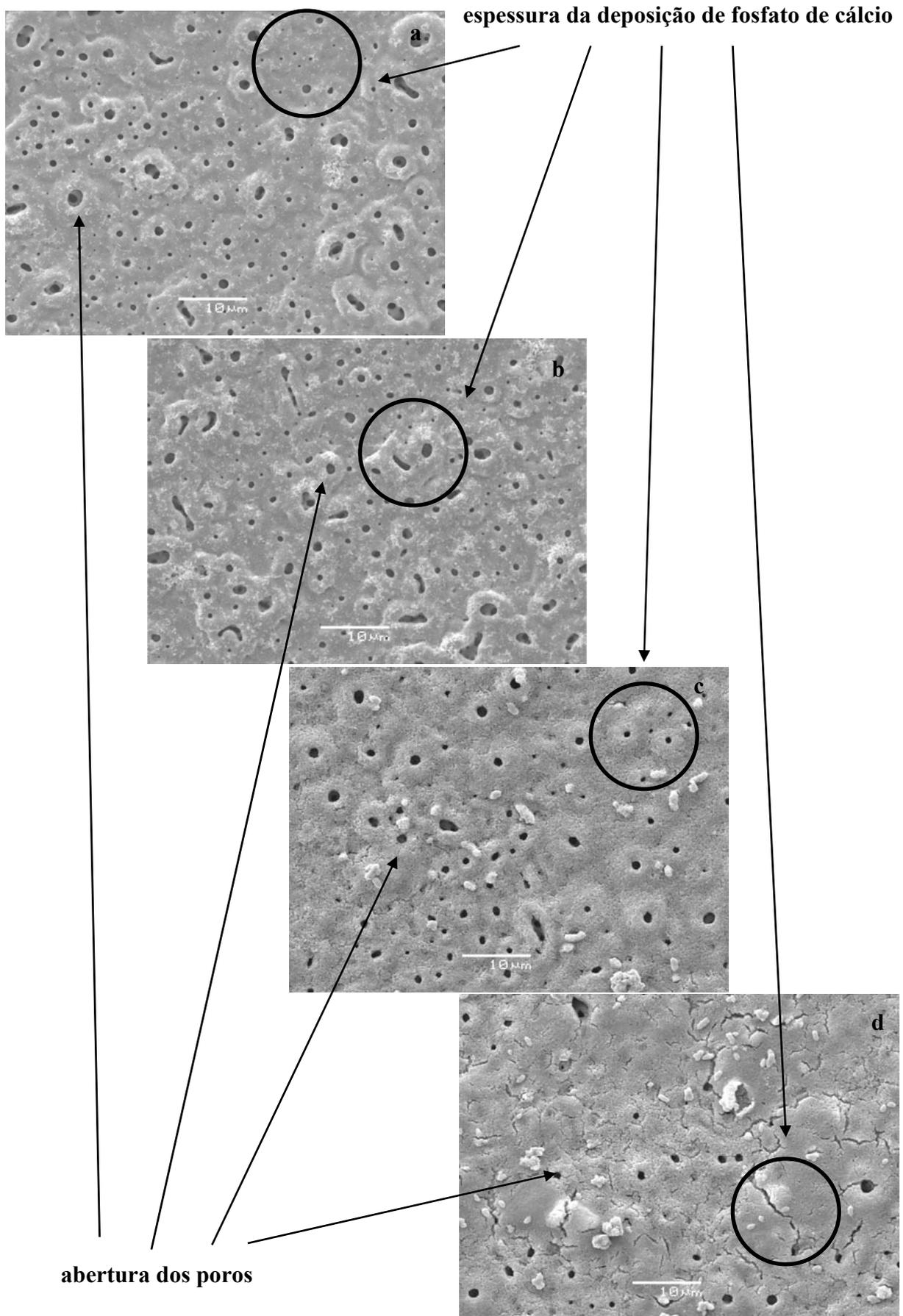


Figura 5.31 Micrografia, em vista de topo, apresentando o Ti anodizado intacto sob um espesso recobrimento de fosfato de cálcio.

A Figura 5.32 apresenta uma seqüência do volume da deposição de fosfatos de cálcio sobre o óxido anódico e do fechamento total e parcial dos poros. Essa seqüência mostra desde um escasso ou um intenso recobrimento nas regiões de fracos ou de fortes centelhamentos, até recobrimentos espessos ou muito espessos, com poros semiabertos ou espessuras compactas e com fissuras, respectivamente (Figuras 5.32a, 5.32b, 5.32c e 5.32d, na ordem mencionada). Os tamanhos das setas indicam o aumento da espessura da deposição de fosfato de cálcio e o aumento da abertura dos poros.



Figuras 5.32 Micrografias, em vista de topo, apresentando a não uniformidade da espessura e da quantidade de deposição de fosfato de cálcio sobre o óxido anódico.

A análise estatística sobre a morfologia da deposição química de fosfato de cálcio (procedimento 2), através de micrografias obtidas em MEV, foram realizadas utilizando o programa *Image Tool*<sup>®</sup>. A Tabela 5.6 apresenta esta análise através de parâmetros morfológicos, tais como: diâmetros médio ( $\varnothing_{\text{médio}}$ ), máximo ( $\varnothing_{\text{máximo}}$ ) e mínimo ( $\varnothing_{\text{mínimo}}$ ), assim como a densidade de poros em relação à área da amostra. Para fins de comparação, foram reportados os parâmetros morfológicos obtidos na anodização realizada após intenso centelhamento, na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Parâmetros obtidos por imagens de MEV e análises do programa *Image Tool*<sup>®</sup>, da anodização em condições de intenso centelhamento.

$\varnothing_{\text{médio}}$ dos poros ( $\pm\delta$ )	$\varnothing_{\text{máximo}}$ dos poros	$\varnothing_{\text{mínimo}}$ dos poros	Porosidade	Densidade de poros
529 ( $\pm$ 462)nm	3922nm	113nm	4,2 %	$1,1 \times 10^7 \text{ cm}^{-2}$

Tabela 5.6 Parâmetros obtidos, por imagens MEV e análises do programa *Image Tool*<sup>®</sup>, da amostra anodizada e posterior deposição química de fosfato de cálcio.

$\varnothing_{\text{médio}}$ dos poros ( $\pm\delta$ )	$\varnothing_{\text{máximo}}$ dos poros	$\varnothing_{\text{mínimo}}$ dos poros	Porosidade	Densidade de poros
576 ( $\pm$ 460)nm	3498nm	113nm	2,6 %	$6,1 \times 10^6 \text{ cm}^{-2}$

A deposição através do procedimento 2, apresentou como resultado tanto poros fechados ou parcialmente fechados como poros totalmente abertos. A comparação entre as tabelas mostrou uma ligeira diminuição do diâmetro médio e máximo dos poros e uma relevante diminuição da porosidade.

O  $\varnothing_{\text{médio}}$  e o  $\varnothing_{\text{máximo}}$  dos poros não apresentaram mudanças significativas, pois foi feita uma análise estatística global de superfícies aleatórias da amostra. Como foi visto anteriormente, a deposição química não é uniforme ao longo da superfície, no entanto, a metodologia empregada no levantamento estatístico nivela as regiões com pouco ou nenhum recobrimento e regiões com recobrimento muito intenso. Já o diâmetro  $\varnothing_{\text{mínimo}}$  não apresentou variação, pois está no limite inferior de aferição estabelecida no programa *Image Tool*<sup>®</sup>.

Contudo, ocorreu uma redução significativa no número de poros abertos, em relação à área total da amostra, evidenciado pela redução da porosidade e da densidade de poros. A porosidade da amostra recoberta com com fosfato de cálcio sobre intenso centelhamento, diminuiu 38,4% em relação à amostra sem recobrimento. A redução da porosidade da superfície é proveniente tanto dos poros fechados como dos parcialmente fechados.

O processo de fechamento de poros, produzidos por anodização na superfície de implantes ósseos de titânio, é um importante artifício no estudo da oclusão de medicamentos nestes poros, que servem como mecanismo de transporte de medicamentos nos implantes. Sob esse aspecto a técnica de recobrimento com uma camada bioativa é atrativa, pois combina o tratamento médico com a substituição do osso doente (MAVROPOULOS, 1999).

Entretanto, o recobrimento de fosfato de cálcio, através do procedimento 2, possivelmente apresenta pouca adesão com o óxido. O controle da espessura desse recobrimento é importante na medida em que a adesão aumenta com a diminuição da espessura do recobrimento, isto é, camadas mais finas apresentam melhor adesão ao substrato.

A espessura do recobrimento pode ser controlada pela relação entre o tempo de cada imersão e o número de ciclos das imersões. Essa adequada relação será suficiente para garantir a uniformidade da camada produzida e determinar a obtenção de uma fina e razoavelmente homogênea camada de fosfatos de cálcio. Além disso, a necessidade de um recobrimento muito aderido ao substrato pode ser solucionada com a aplicação de um tratamento térmico, que permitirá a difusão entre a camada depositada e o metal base.

Foi observado durante o experimento, principalmente na última secagem da amostra, que a precipitação macroscópica dos fosfatos de cálcio ocorria após a secagem da deposição, e que a concentração de precipitados estava relacionada ao gradiente do tempo de secagem. A primeira região a sofrer a secagem apresentou uma menor quantidade de precipitados, enquanto que as outras regiões permaneceram com maior quantidade de fosfatos de cálcio em suspensão (foi observada uma superfície densa e esbranquiçada). Esse resultado induz à conclusão de que a eliminação do eletrólito, através da secagem, tem papel importante na precipitação e na deposição de fosfato de cálcio na superfície anodizada.

Neste estudo é descrita uma nova metodologia para desenvolver camadas bioativas na superfície do Ti, que, consiste em recobrir quimicamente superfícies anodizadas de Ti com fosfatos de cálcio. Além disso, cultura de Células-Tronco Mesenquimais *in vitro* sobre essas amostras pode ajudar na avaliação das modificações aplicadas.

## Parte 2 (Avaliação Biológica das Modificações Superficiais em Ti)

### 5.5 Cultura de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) sobre amostras de Ti

A cultura de CTMs sobre amostras tratadas de Ti foram realizadas em três conjuntos ({1}, {2} e {3}), onde se variaram as concentrações iniciais das células [CTMs/ml] e o tempo de cultura. Estes dados estão apresentados na Tabela 5.7 e as notações usadas na indicação das modificações estão relacionadas na legenda logo abaixo da tabela.

Tabela 5.7 Modificações superficiais e suas respectivas culturas de CTMs.

{}	[CTMs/ml]	t (h)	Modificação Superficial				
			sem MS	Pite	Anod	Pite+Anod	Anod+P-Ca
1	$2 \times 10^5$	96	-	✓	✓	✓	✓
2	$5 \times 10^3$	48	✓	-	-	-	-
	$1 \times 10^5$	48	✓	-	-	-	-
	$1 \times 10^5$	3	✓	-	-	-	-
3	$1 \times 10^6$	48	-	✓	✓	✓	✓

- **sem MS** = sem modificação superficial em Ti.
- **Pite** = corrosão por pites sobre Ti.
- **Anod** = anodização após centelhamento em Ti.
- **Pite+Anod** = corrosão por pite e posterior anodização após centelhamento em Ti.
- **Anod+P-Ca** = anodização após centelhamento em Ti e posterior deposição de fosfato de cálcio.

Os (✓) indicam a modificação superficial aplicada. A nomenclatura “sem MS” indica a amostra de Ti sem modificação química ou eletroquímica na superfície. No segundo e no terceiro tratamento, as amostras foram avaliadas quanto à biocompatibilidade da superfície e a provável proliferação celular. No primeiro e no terceiro, novamente, as amostras foram caracterizadas morfológicamente através de micrografias obtidas por MEV.

Na Tabela 5.7, a variável (t) indica o tempo de corte na cultura das CTMs em estufa. Após as etapas de fixação, desidratação e dessecação das células vivas, o que se tem, sobre o substrato, é preservação da forma das células no exato momento do tempo de corte.

### 5.5.1 Cultura de $2 \times 10^5$ CTMs/ml, por 96h, sobre amostras de Ti modificadas superficialmente

No primeiro conjunto foi feita uma cultura em concentração de  $2 \times 10^5$  CTMs/ml por 96h sobre amostras de Ti modificadas superficialmente. O tempo máximo em estufa, tradicionalmente aplicado em uma cultura de CTMs é de 72h. Esse *dead-line* na cultura é estabelecido em virtude de uma provável apoptose (morte das células). No entanto, em virtude de percalços experimentais na preparação de amostras biológicas em MEV, as amostras foram retiradas da estufa após 96h de cultura.

A Figura 5.33 apresenta uma cultura de Células-Tronco Mesenquimais sobre uma amostra de Ti após corrosão por pites. Nesta micrografia pode se observar que a células apresentam-se uniformemente distribuídas em toda a superfície da amostra.

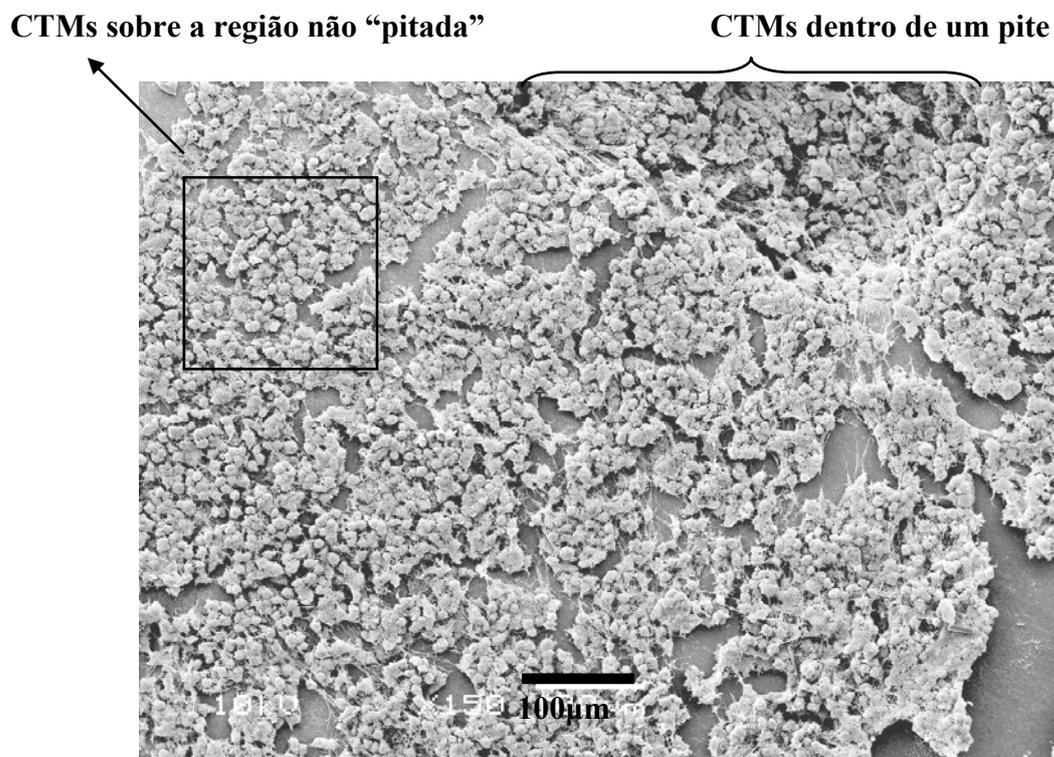
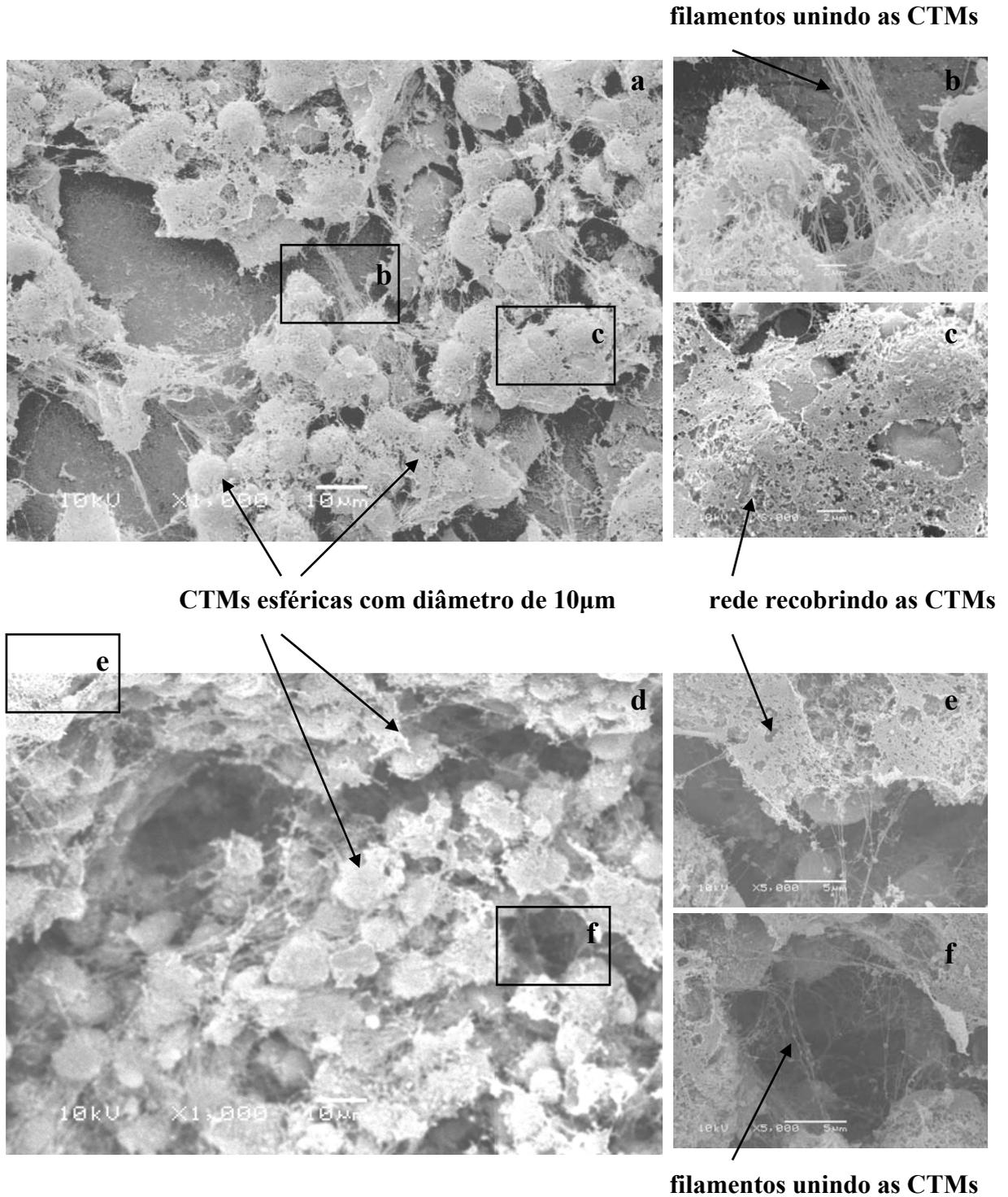


Figura 5.33 Micrografia, em vista de topo apresentando a cultura de CTMs sobre amostra de Ti submetida à corrosão por pites.

A região da amostra não corroída por pites apresenta uma baixa rugosidade (vide Figura 5.18). Apesar de não se conhecer a real influência da topografia no desenvolvimento celular, verifica-se uma grande proliferação celular. Além disso, supõe-se que a característica química desta superfície também tem papel importante no desenvolvimento das CTMs.

A Figura 5.34a mostra a superfície não corroída e as ampliações nas Figuras 5.34b e 5.34c, demarcadas nessa figura apresentam filamentos unindo e um rendilhado cobrindo as CTMs, respectivamente. Já a Figura 5.34d mostra a região dentro do pite, com ampliações nas Figuras 5.34e e 5.34f apresentando, também, rendilhados e filamentos, respectivamente.



Figuras 5.34 Micrografias, em vista de topo, apresentando as CTMs na superfície não corroída (a) e na região dentro do pite (d). As ampliações demarcadas nessas figuras mostram filamentos (b, f) e um rendilhado (c, e) cobrindo as células.

A Figura 5.35 apresenta três comportamentos distintos da cultura de CTMs, em relação à região da amostra. Na região perto da borda observa-se uma fraca cultura celular, em comparação com a região mais ao centro da amostra, conforme as indicações na figura.

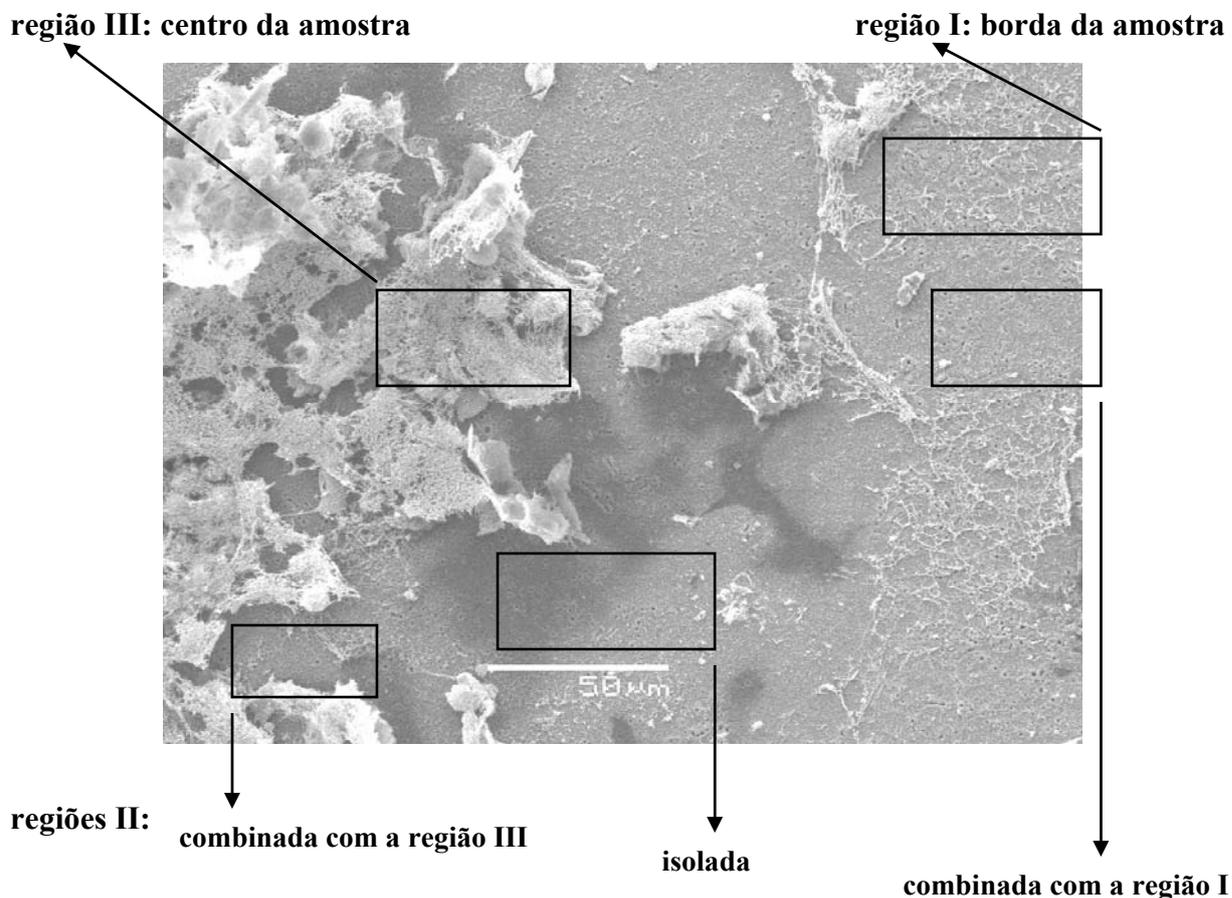


Figura 5.35 Micrografia, em vista de topo, apresentando a falta de uniformidade na distribuição das CTMs sobre a superfície de Ti anodizada após centelhamento.

Na região I, na borda da amostra, é verificada um fraco desenvolvimento celular, provavelmente, devido ao baixo relevo provocado pelo fraco centelhamento. Em contraponto, a região III, no centro da amostra, apresenta um expressivo desenvolvimento celular, combinando com a região de forte centelhamento. Esse comportamento pode indicar, não somente uma relação com a nanotopografia, mas também uma forte relação das CTMs com a fase cristalina ou com os íons fosfatos, incorporados durante o intenso centelhamento. Nas regiões II é constatada uma quase que ausente cultura de células, que pode ser verificada em forma isolada ou combinada com o comportamento das regiões I e III.

A Figura 5.36 mostra, de forma ampliada na região I, o comportamento descrito anteriormente. Na figura é verificado um aumento da proliferação celular (indicado pelo sentido da seta), desde a borda até o centro da gota da cultura das CTMs.

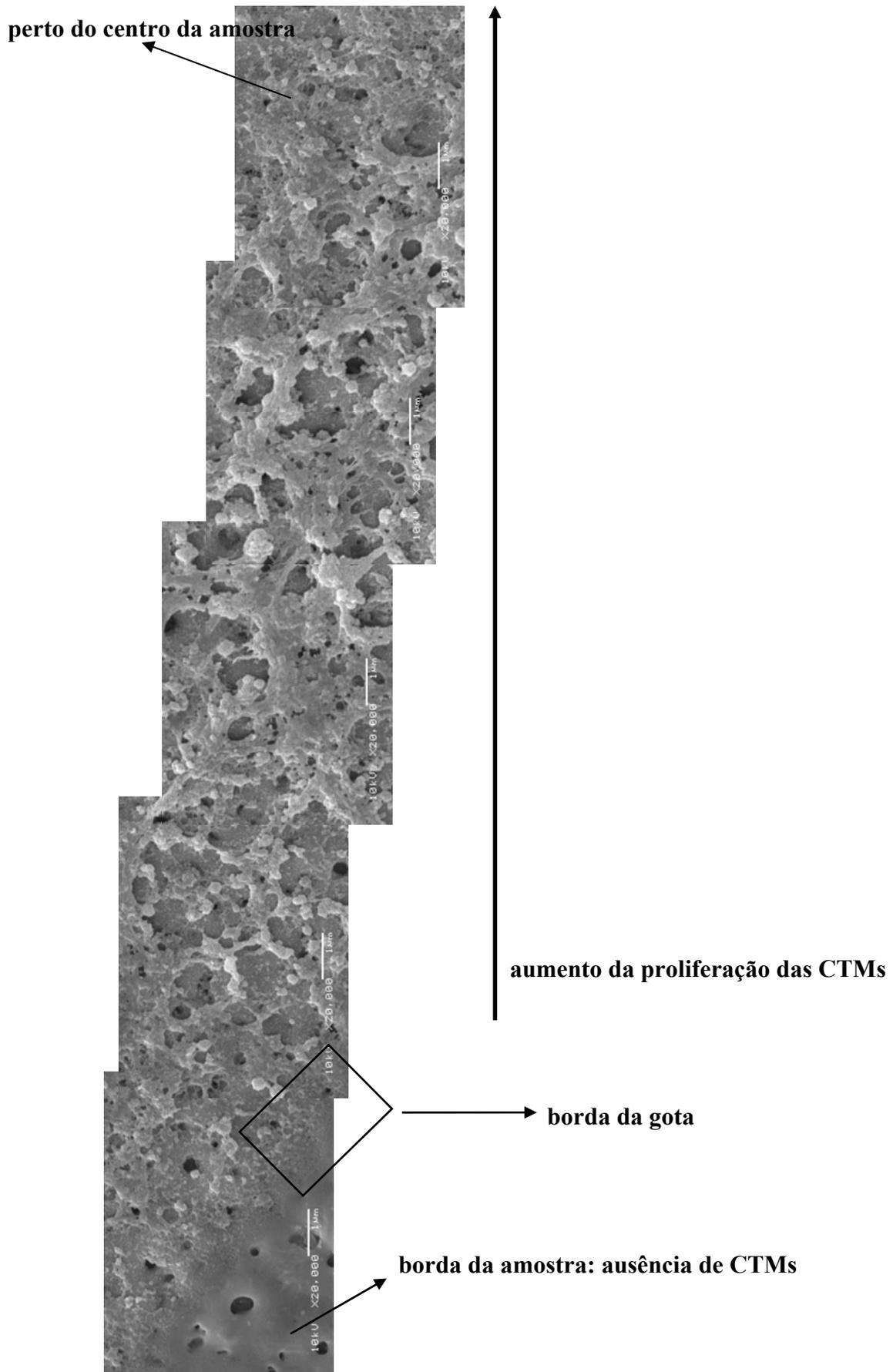


Figura 5.36 Micrografias, em vista de topo, apresentando a cultura de CTMs sobre o óxido anódico de Ti, desde a borda da gota da cultura até a região central da amostra.

Na Figura 5.35, a região III apresenta uma maior quantidade de células, quando comparada à região I. Esse comportamento pode ser explicado pelo gradiente na quantidade de células sobre o substrato, onde o centro da gota da cultura apresenta um maior volume de CTMs, enquanto que a região perto da borda apresenta um volume de células muito menor.

A cultura de CTMs em forma de gota, sobre um substrato, pode ser vista na Figura 4.1a do capítulo 4. A Figura 5.37 representa um modelo de comportamento, no que se refere aos diferentes volumes de acordo com a gota, onde a fatia transversal no centro da gota apresenta uma maior concentração de células, enquanto que e a fatia perto da borda apresenta uma concentração menor.

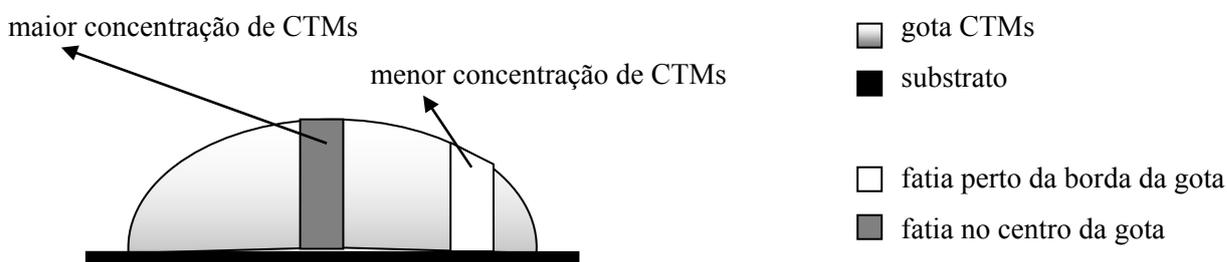


Figura 5.37 Esquema apresentando o modelo da gota de CTMs sobre o substrato de Ti.

As Figuras 5.35 e 5.36 apresentam a falta de uniformidade no desenvolvimento das CTMs sobre a superfície de Ti produzida após intenso centelhamento. Nessas figuras verifica-se que o desenvolvimento e proliferação celular são maiores em regiões mais centelhadas da superfície anodizada. Esse comportamento deve-se, provavelmente, ao aumento da rugosidade da superfície. O aumento da área superficial, em comparação com superfícies lisas, pode ser capaz de estimular no desenvolvimento de filamentos celulares sobre a topografia rugosa, assim melhorando e aumentando a adesão das células com o material. Os resultados confirmam os resultados obtidos por Oh (2006), onde se verificou que a proliferação celular é mais desenvolvida sobre superfícies modificadas de  $TiO_2$ , em comparação com a superfície de  $TiO_2$  nativo.

A Figura 5.38 mostra a cultura de CTMs sobre a superfície de Ti anodizada após centelhamento sobre a superfície previamente corroída por pites. Essa figura apresenta a cultura de CTMs sobre a superfície da região não corroída da amostra.

**distribuição não homogênea das CTMs**

**forte cultura de CTMs**

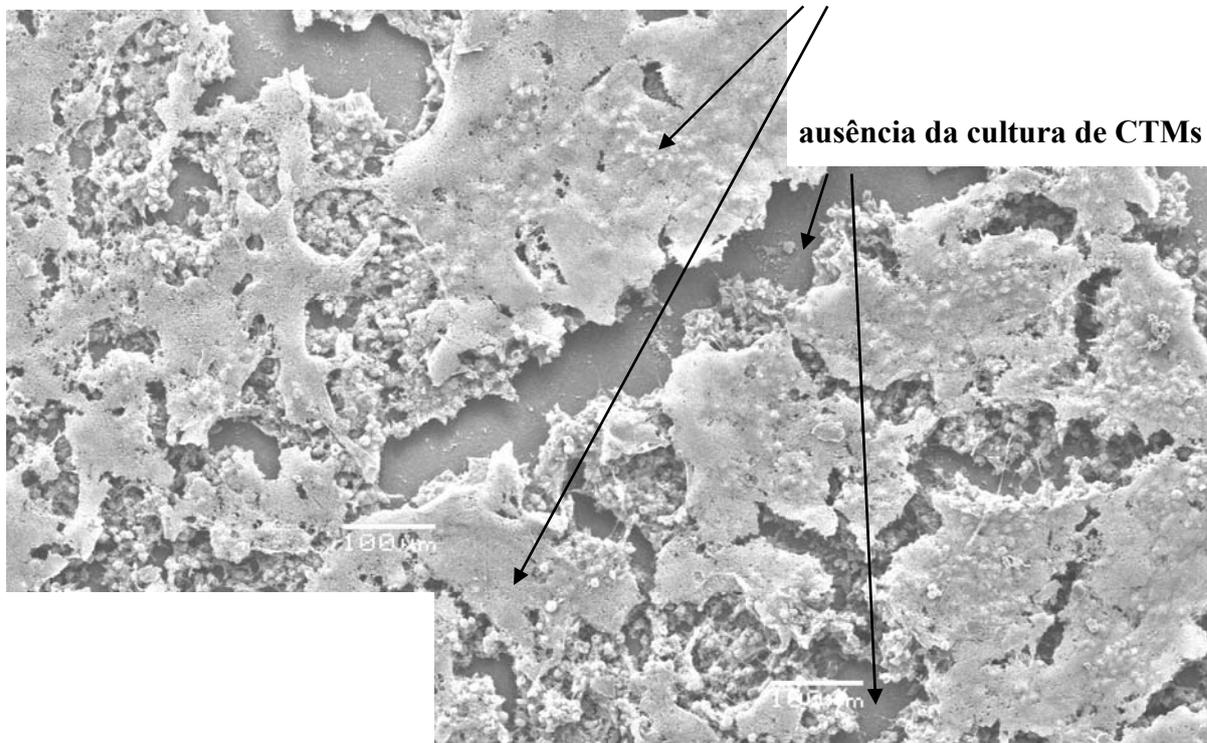


Figura 5.38 Micrografias, em vista de topo, apresentando a cultura das CTMs sobre a amostra de Ti corroída por pites e posterior anodização após centelhamento.

Nas micrografias acima se observam comportamentos semelhantes aos comportamentos vistos sobre as amostras modificadas superficialmente por corrosão por pite e por anodização após intenso centelhamento. Através dessas micrografias verificou-se uma distribuição não homogênea da cultura celular e até mesmo regiões com ausência de células.

A Figura 5.39 apresenta a cultura das CTMs sobre uma superfície anodizada após centelhamento e recoberta com fosfato de cálcio (através do procedimento 1: ciclos de imersão em solução com fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução com suspensão de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Nessas micrografias não se observa de forma explícita o comportamento celular, como se observa nas modificações anteriores.

#### superfície sem aparente cultura de CTMs

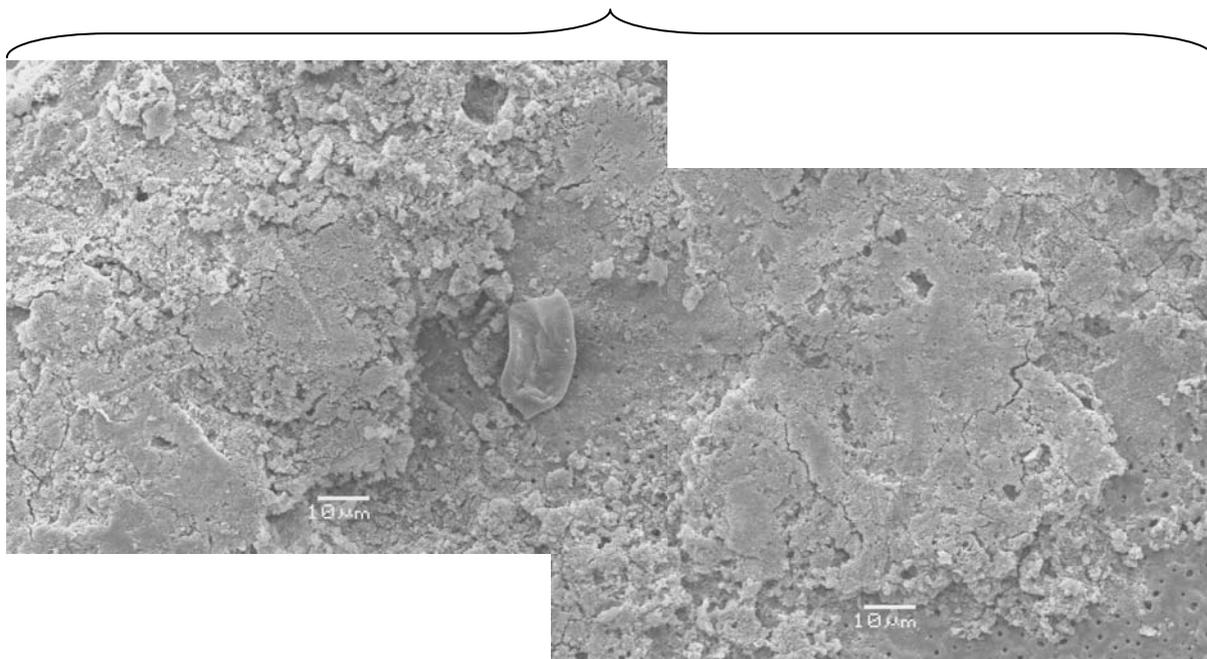


Figura 5.39 Micrografias, em vista de topo, apresentando a cultura de CTMs sobre amostra de Ti anodizada após centelhamento e posterior deposição química de fosfato de cálcio (através do procedimento 1: ciclos de imersão em solução com fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução com suspensão de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ).

Apesar da deposição de fosfato de cálcio produzir, em algumas regiões, uma rugosidade favorável à proliferação celular, não foi verificada a presença de filamentos em torno da nanotopografia oferecida pela camada bioativa. Este comportamento sugere que a modificação química (através do procedimento 1) causada na superfície anodizada é inadequada à cultura das CTMs, provavelmente indicando a morte celular.

### 5.5.2 Culturas de $5 \times 10^3$ , por 48h e $1 \times 10^5$ CTMs/ml, por 3 e 48h, sobre amostras de Ti polidas até $1 \mu\text{m}$

No segundo conjunto foram realizadas análises estatísticas para verificar a biocompatibilidade das amostras de Ti, sem modificação superficial, apenas lixadas e polidas até  $1 \mu\text{m}$ . A análise estatística foi realizada no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética/UFRGS, sendo os testes feitos em triplicata. O comportamento celular observado auxilia na avaliação biológica da cultura de CTMs, em relação à ‘concentração de células *versus* tempo de incubação’, de acordo com a qualidade superficial e o tipo de substrato.

Para verificar proliferação celular das CTMs, aplicou-se o método colorimétrico. Esse método é usado para avaliar a biocompatibilidade das amostras de Ti, através da reação do produto químico (MTT sal) em cultura, com componentes celulares. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 Avaliação da biocompatibilidade do Ti polido até  $1 \mu\text{m}$ , em função do tempo de cultura das CTMs.

[CTMs/ml]	t(h)	média	taxa de mortalidade
$5 \times 10^3$	48	$0,09 \times 10^3$	98%
$1 \times 10^5$	48	$0,11 \times 10^5$	90%
$1 \times 10^5$	3	$0,49 \times 10^5$	51%

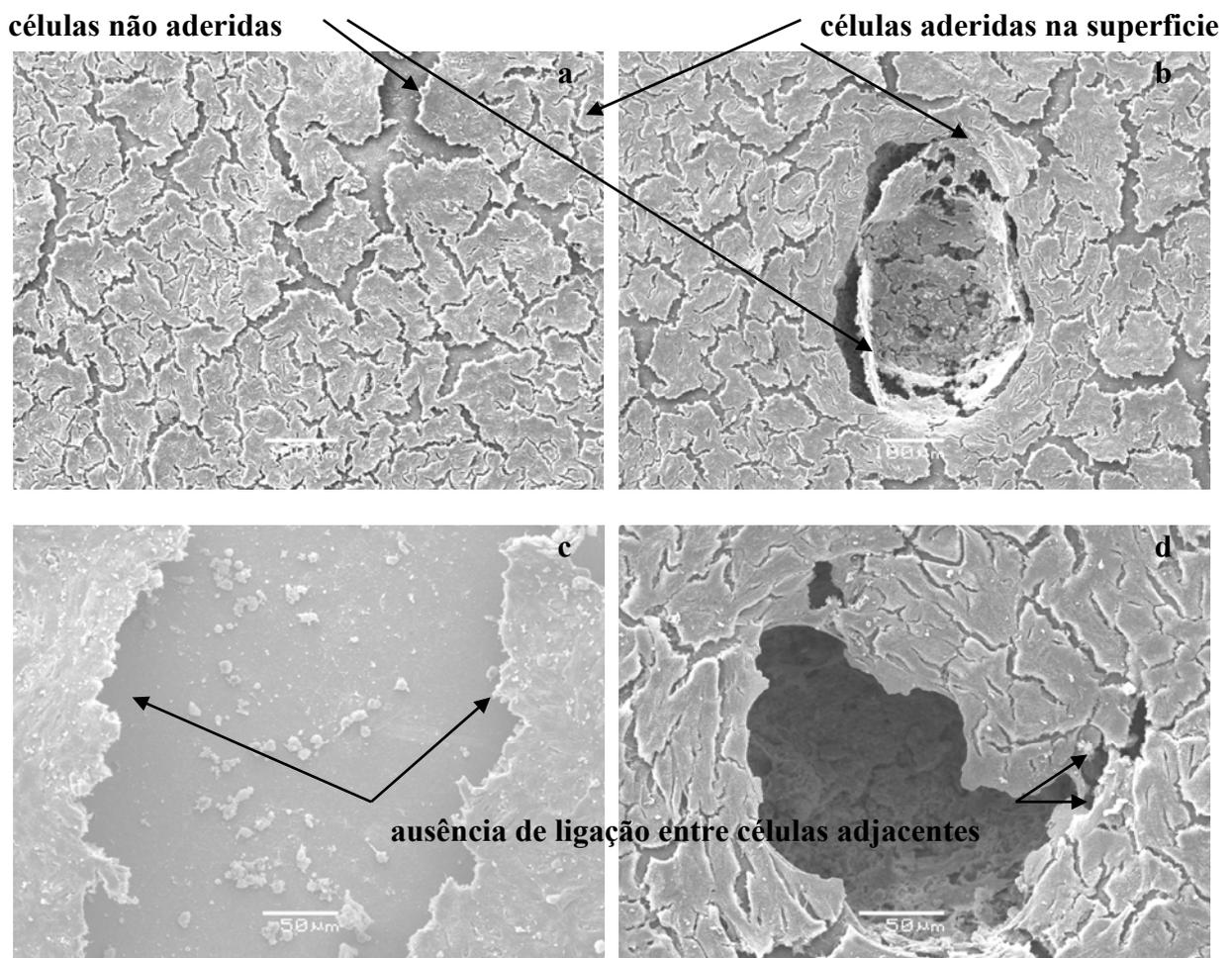
As contagens das células, observadas no método colorimétrico, foram aplicadas no teste T-STUDENT (*Student–Newman–Keuls* – SNK). A coluna **média** da tabela anterior apresenta a contagem de células, das respectivas culturas, ao final do tempo de incubação. Na tabela se verifica que, aproximadamente 50% das células morrem nas 3 primeiras horas e que só 10% de  $1 \times 10^5$  CTMs/ml estão vivas ao final de 48h.

A **taxa de mortalidade celular** apresenta um menor valor na cultura de  $1 \times 10^5$  CTMs/ml e tempo de incubação de 3h sobre amostras de Ti polido até  $1 \mu\text{m}$ . Os resultados mostram uma grande biocompatibilidade de amostras de Ti polidos apenas quando o tempo de cultura é muito pequeno.

### 5.5.3 Cultura de $1 \times 10^6$ CTMs/ml, por 48h, sobre amostras de Ti modificadas superficialmente

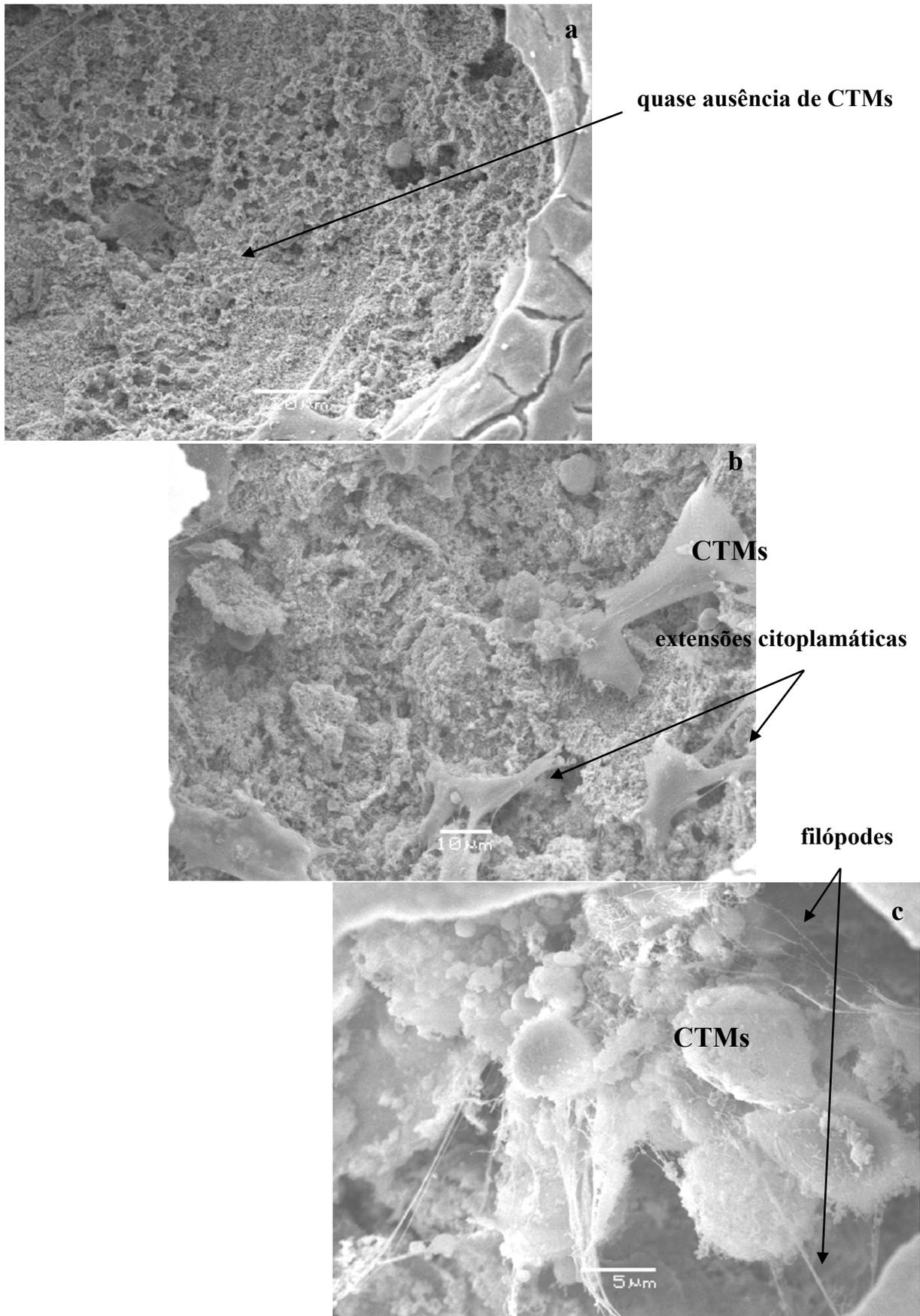
No terceiro conjunto foi feita a cultura de  $1 \times 10^6$  CTMs/ml por 48h sobre amostras modificadas superficialmente. Nesse conjunto se avaliou a morfologia do comportamento celular, por MEV e a biocompatibilidade das modificações propostas.

As Figuras 5.40 apresentam a cultura de CTMs sobre amostras de Ti submetidas à corrosão por pites. Nas Figuras 5.40a e 5.40b é mostrada a cultura sobre a superfície não corroída e dentro do pite, respectivamente. Já as Figuras 5.40c e 5.40d apresentam, na seqüência mencionada, a falta de ligação na cultura de células na superfície e dentro do pite.



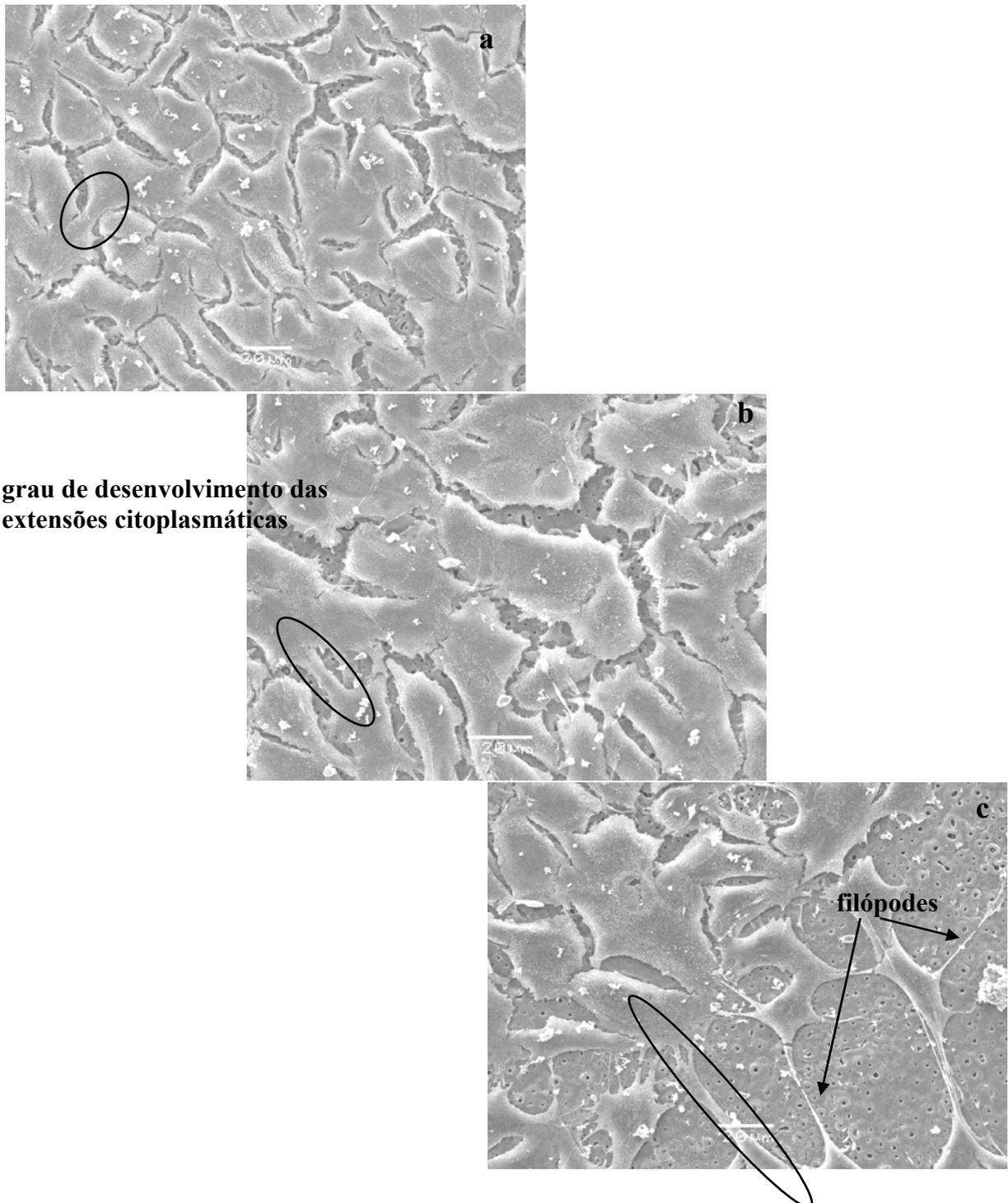
Figuras 5.40 Micrografias, em vista de topo, apresentando a cultura de CTMs sobre a) a superfície não corroída b) dentro do pite em amostra e a descontinuidade da cultura c) fora e d) dentro do pite em amostra de Ti corroídas por pites.

A Figura 5.41a mostra uma região com a quase ausência de CTMs, em comparação com a Figura 5.41b, que mostra uma região com células em formato estrelar e prováveis extensões citoplasmáticas, ou com a Figura 5.41c com células esféricas, com filópodes.



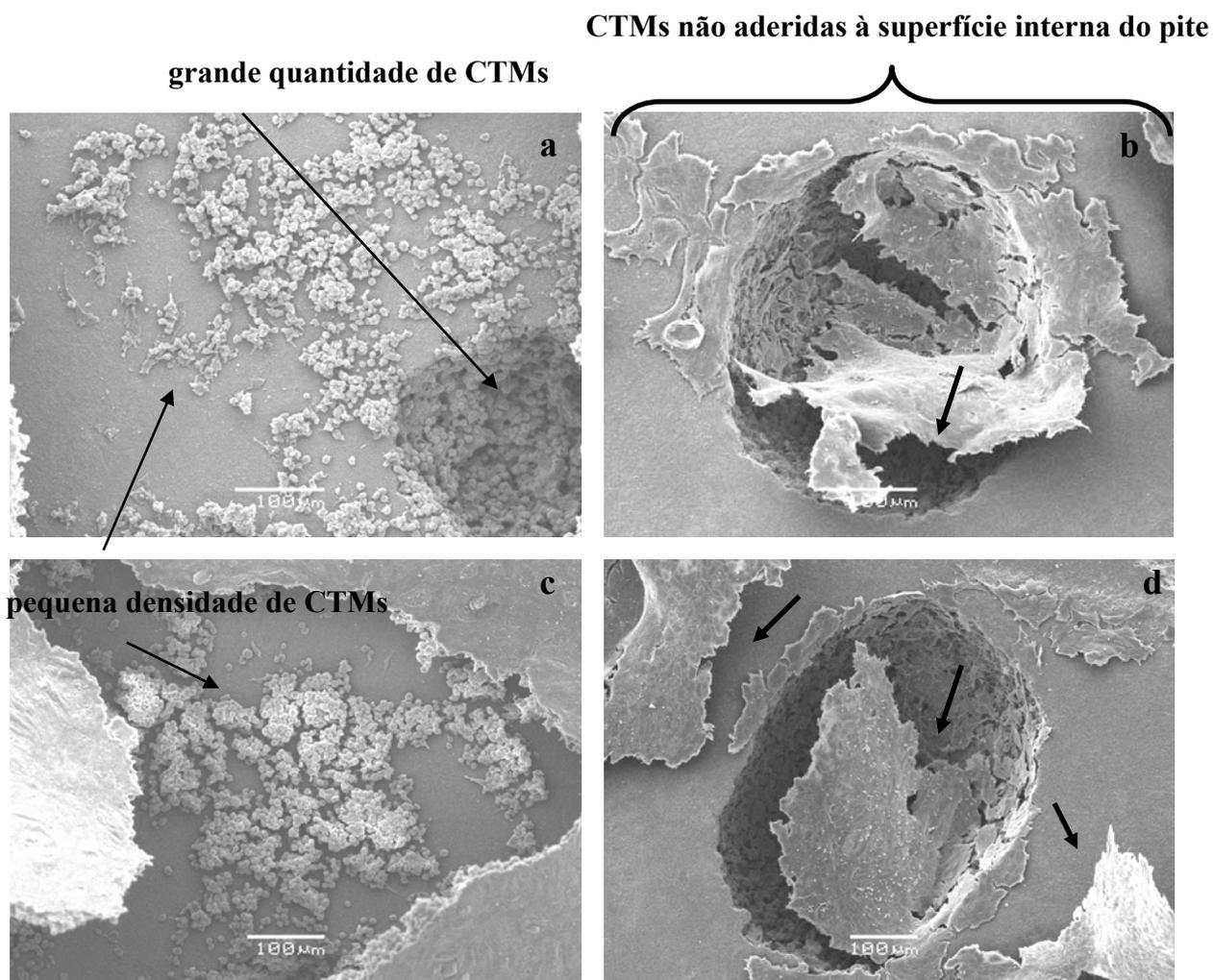
Figuras 5.41 Micrografias, em vista de topo, apresentando o comportamento celular das CTMs dentro dos pites, formados pela corrosão por pites em Ti.

As Figuras 5.42 apresentam a cultura de CTMs sobre a superfície de Ti anodizada após centelhamento. Observam-se, provavelmente, extensões citoplasmáticas em pequeno, médio e alto grau de desenvolvimento unindo as células (Figura 5.42a, 5.42b e 5.42c, respectivamente), sendo representado pelo tamanho das elipses. São observados também alguns filópodes aderidos à superfície.



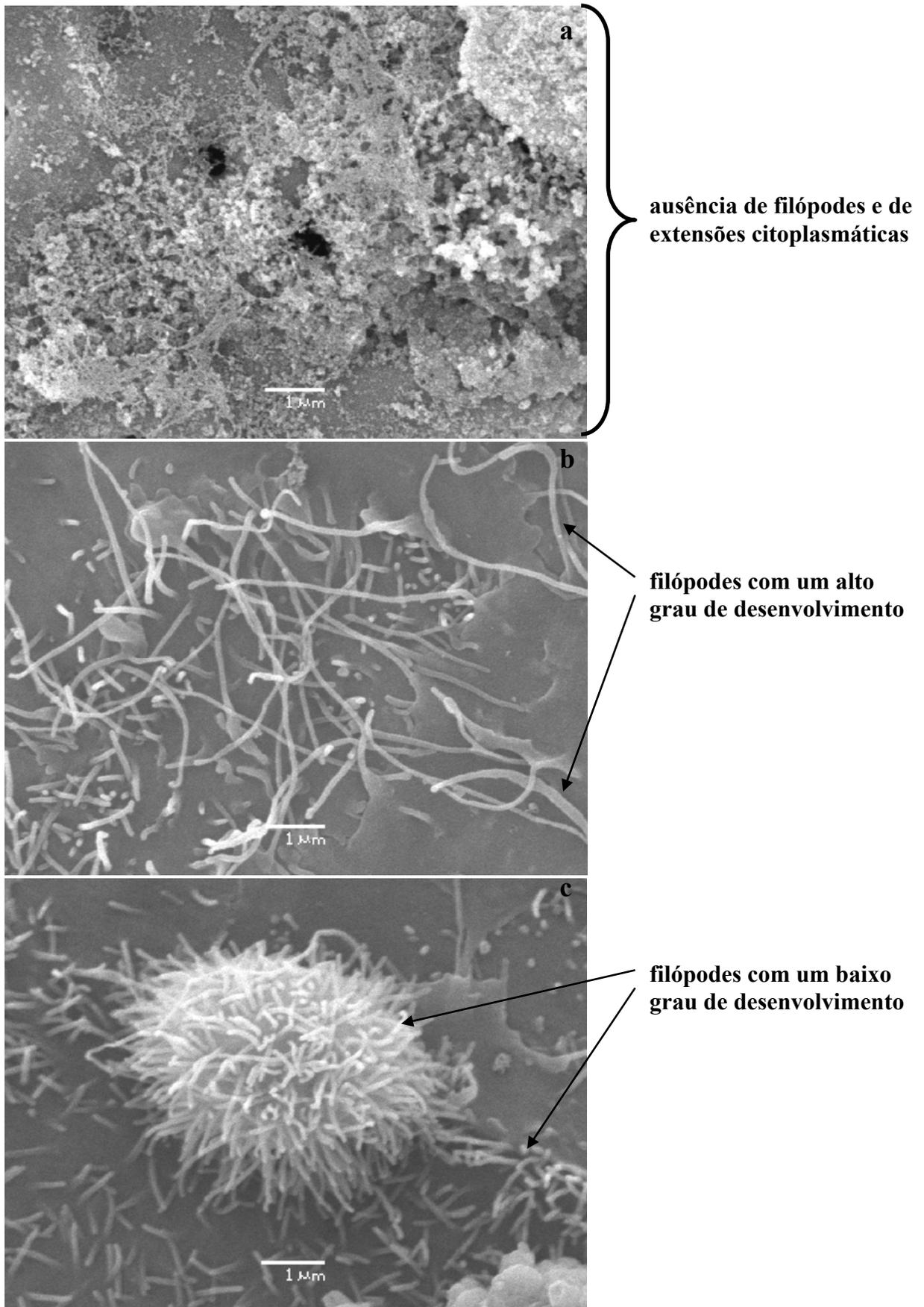
Figuras 5.42 Micrografias, em vista de topo, apresentando o provável desenvolvimento das extensões citoplasmáticas em a) pequeno, b) médio e c) alto grau, unindo as CTMs cultivadas sobre Ti anodizado após centelhamento.

As Figuras 5.43 apresentam a cultura de CTMs sobre a superfície de Ti modificada por corrosão por pites e anodização após centelhamento. As Figuras 5.43a e 5.43c apresentam a cultura sobre a superfície não corroída, enquanto que as Figuras 5.43b e 5.43d estão orientadas para a região interna do pite.



Figuras 5.43 Micrografias, em vista de topo, apresentando a cultura das CTMs sobre a) e c) região não pitada e b) e d) no interior do pite em amostras de Ti produzidas por corrosão por pites e anodizadas após centelhamento.

As Figuras 5.44 apresentam a cultura de CTMs sobre diferentes regiões da superfície anodizada e recoberta com fosfato de cálcio. Na Figura 5.44a não se observa o desenvolvimento celular das CTMs, enquanto que em outras regiões se observa um baixo (Figura 5.44c) ou um alto (Figura 5.44b) grau de desenvolvimento de filópodes.



Figuras 5.44 Micrografia, em vista de topo, apresentando o desenvolvimento das CTMs sobre amostra de Ti anodizado recoberto com fosfato de cálcio

A Figura 5.45 apresenta cultura de CTMs sobre a superfície anodizada e recoberta com fosfato de cálcio. Na micrografia observam-se prováveis extensões citoplasmáticas e filópodes pouco desenvolvidos.

**extensão citoplasmática pouco desenvolvida**

**pequenos filópodes**

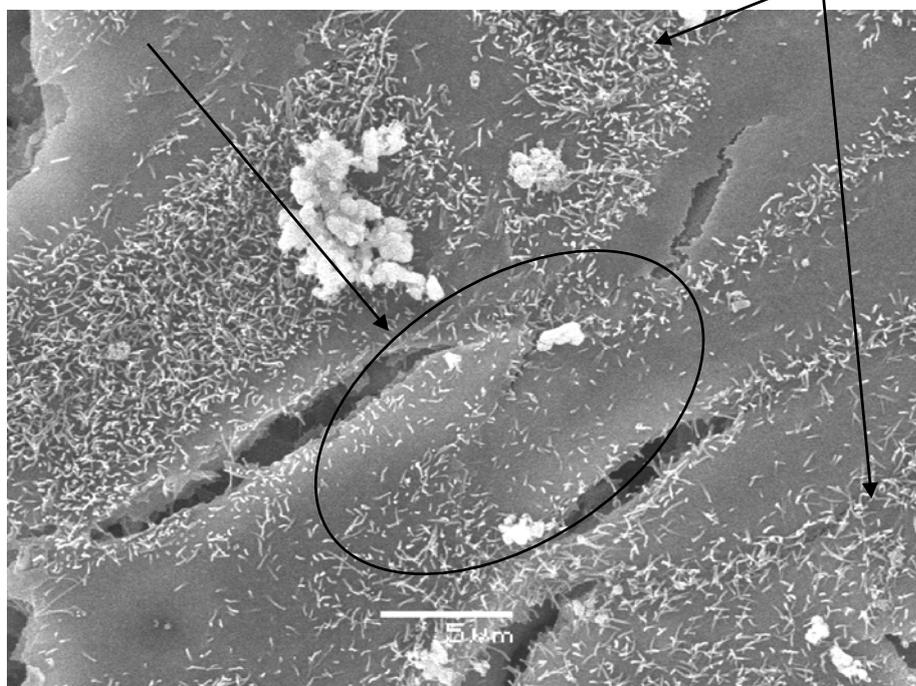


Figura 5.45 Micrografia, em vista de topo, apresentando o comportamento celular das CTMs sobre o Ti anodizado e recoberto com fosfato de cálcio.

As modificações superficiais propostas foram, também, avaliadas de acordo com a biocompatibilidade, em razão das CTMs cultivadas sobre essas. A avaliação estatística, através do teste ANOVA foi realizada em duplicata no Laboratório de Imunogenética/UFRGS e interpretada no ELETROCORR. Os resultados estão discutidos após a Tabela 5.9.

Tabela 5.9 Avaliação da biocompatibilidade das modificações superficiais sobre amostras de Ti, de acordo com a cultura celular de  $1 \times 10^6$  CTMs/ml, por 48h.

<b>Ti + modificação superficial</b>	<b>média</b>	<b>taxa de mortalidade</b>
Ti pite	$0,47 \times 10^6$	52%
Ti anodização	$0,46 \times 10^6$	54%
Ti pite + anodização	$0,53 \times 10^6$	47%
Ti anodização + fosfato de cálcio	$0,75 \times 10^6$	26%

Na tabela anterior se verifica a taxa de mortalidade celular, em função das modificações superficiais propostas. A avaliação mostra que a deposição química de fosfato de cálcio apresenta uma maior biocompatibilidade, em comparação as outras modificações superficiais, pois apresenta uma menor taxa de mortalidade.

O comportamento da cultura de CTMs no terceiro conjunto mostrou que as células cultivadas sobre amostras de Ti corroídas por pites apresentam um baixo desenvolvimento de filópodes. Isso pode justificar a ocorrência de células pouco aderidas ao substrato e, em algumas regiões a ausência de extensões citoplasmáticas. Além disso, foi observada uma proliferação celular descontínua no degrau da borda do pite e uma ausência de adesão com a parede lateral deste. Essas observações podem indicar uma dificuldade de atuação das células em regiões extremamente agudas e o baixo desempenho em degraus componente horizontal pequena.

Outro comportamento notado é que, em regiões corroídas por pites, as CTMs não desenvolvem extensões citoplasmáticas ou filópodes capazes de cobrir a abertura do pite. Isso sugere que as CTMs precisam de contato físico com a topografia do substrato ou de tamanho de abertura do orifício adequado para se desenvolverem.

Em geral, as CTMs apresentam-se em formato estrelar, poligonal e achatado ou em formato esférico. As amostras de Ti anodizadas, com a prévia corrosão por pites ou com a posterior deposição de fosfato de cálcio apresentam células com, prováveis extensões citoplasmáticas e filópodes em pequeno grau de desenvolvimento. Esse comportamento pode indicar uma superfície nociva, provavelmente atribuída à incorporação de P no óxido anódico ou à presença, mesmo que em pequenas quantidades, de precipitados de carbonato de cálcio no recobrimento químico.

Afora isso, a própria interpretação pode ser influenciada pela preparação das amostras para observação em MEV, pois essas podem alterar a morfologia original das células. Deste modo, a avaliação das CTMs por MEV só é possível se todas as amostras forem processadas em condições similares de preparação.

Os resultados obtidos por MEV e por avaliação da viabilidade celular indicam um melhor comportamento biológico em superfícies produzidas pela deposição química de fosfato de cálcio, quando comparadas com as superfícies corroídas por pite e anodizadas após centelhamento. Essas modificações superficiais apresentam um plausível desempenho frente à cultura de CTMs, no que se refere à citotoxicidade, à adesão e a proliferação celular.

### Parte 3 (Análise estatística em amostras de Ti com anodização nanotubular auto ordenada)

#### 5.6 Processo de anodização nanotubular

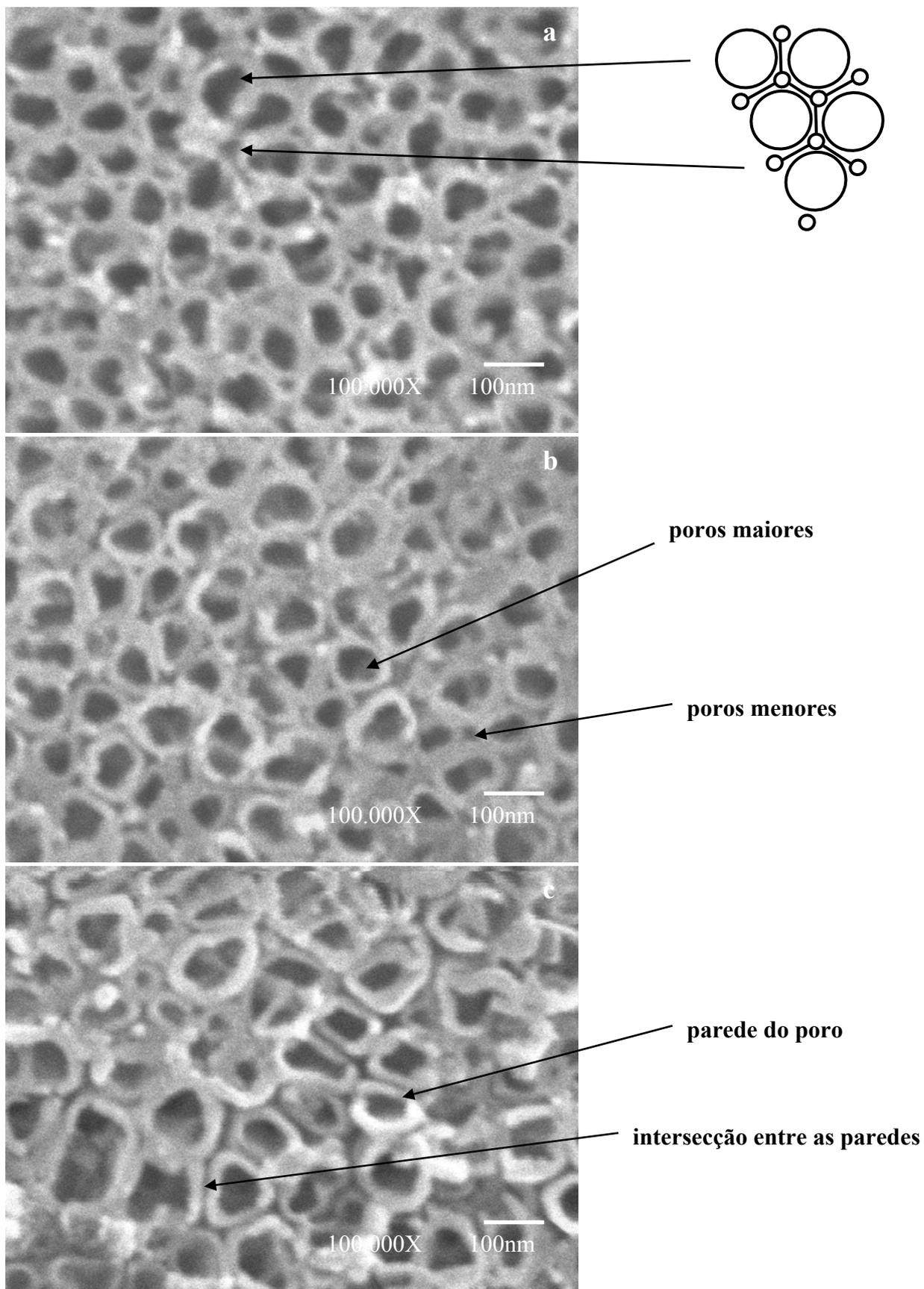
O procedimento experimental da anodização potencioestática em Ti (99,6% de pureza), foi completamente realizado no LKO/Universidade de Erlangen-Nurnberg. As amostras foram anodizadas durante 6h, sob potencial de 20V, em eletrólitos de 1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com adições de 0,5 ou 1 ou 5% (em peso) de NaF. O objetivo desse estudo foi investigar a possibilidade de formação de estruturas porosas de TiO<sub>2</sub> e de um provável crescimento dessas estruturas, devido à influência dos parâmetros experimentais aplicados. Os tamanhos de poros, e suas distribuições e a espessura dos óxidos formados, foram determinados pelas condições específicas de cada anodização.

Este estudo se propõe a caracterizar morfológicamente os resultados das oxidações anódicas obtidos pelo grupo colaborador. A caracterização morfológica das amostras foi realizada no ELETROCORR e no CME, ambos da UFRGS. Esse estudo teve por finalidade avaliar a influência da adição de pequenas concentrações de NaF nos eletrólitos da anodização potencioestática.

##### 5.6.1 Análise por MEV em Ti polarizado potencioestaticamente em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com a adição de pequenas quantidades de NaF.

As amostras foram analisadas em vista de topo, para a caracterização topográfica do óxido. Algumas das amostras foram dobradas mecanicamente e foram observadas em seção transversal. Este encurvamento ocasionou o descolamento do óxido em relação ao substrato, possibilitando a obtenção de informações sobre o óxido barreira.

As Figuras 5.46a, 5.46b e 5.46c mostram a vista de topo dos óxidos porosos formados em eletrólitos de 1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com adições de 0,5 ou 1 ou 5% (em peso) de NaF, respectivamente. As topografias desses óxidos mostram poros de formas não uniformes, desde círculos irregulares até formatos quase triangulares.



Figuras 5.46 Micrografias, em vista de topo, apresentando o Ti anodizado em 1M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  com adições de a) 0,5 ou b) 1 ou c) 5% (em peso) NaF.

Nas micrografias anteriores, se verifica o crescimento de óxidos tubulares porosos, com o limite das bordas dos poros bem definidos. A topografia superficial apresenta a existência de uma camada de óxido, com separados individualmente.

A Figura 5.47 apresenta a quebra do óxido poroso produzido na condição de 1% (em peso) de NaF. Na micrografia, se observa a camada interna do óxido poroso, com o comportamento idêntico ao comportamento à superfície deste óxido.

**quebra do óxido tubular**

**poros separados individualmente**

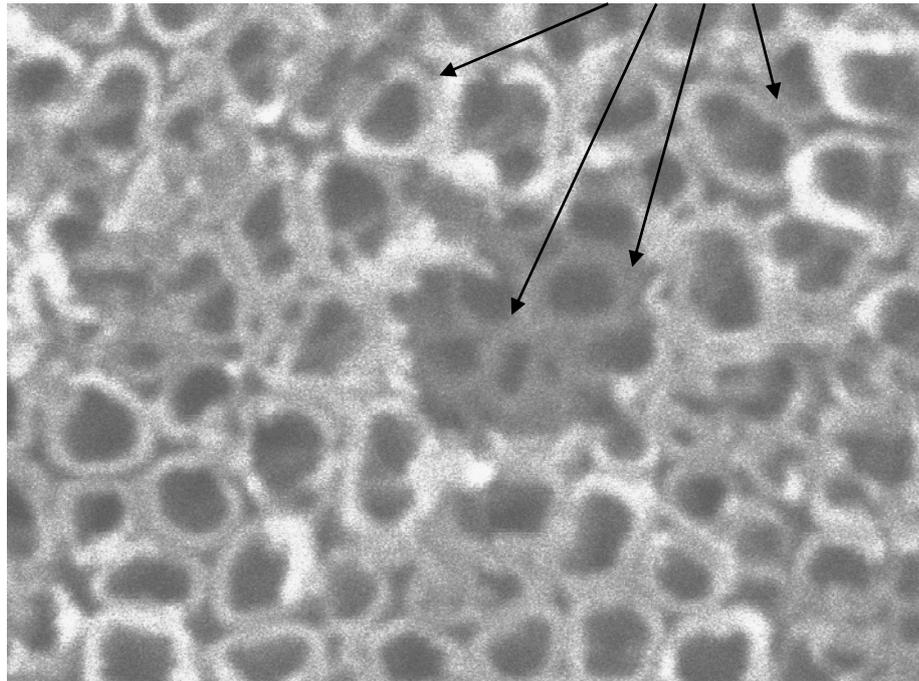
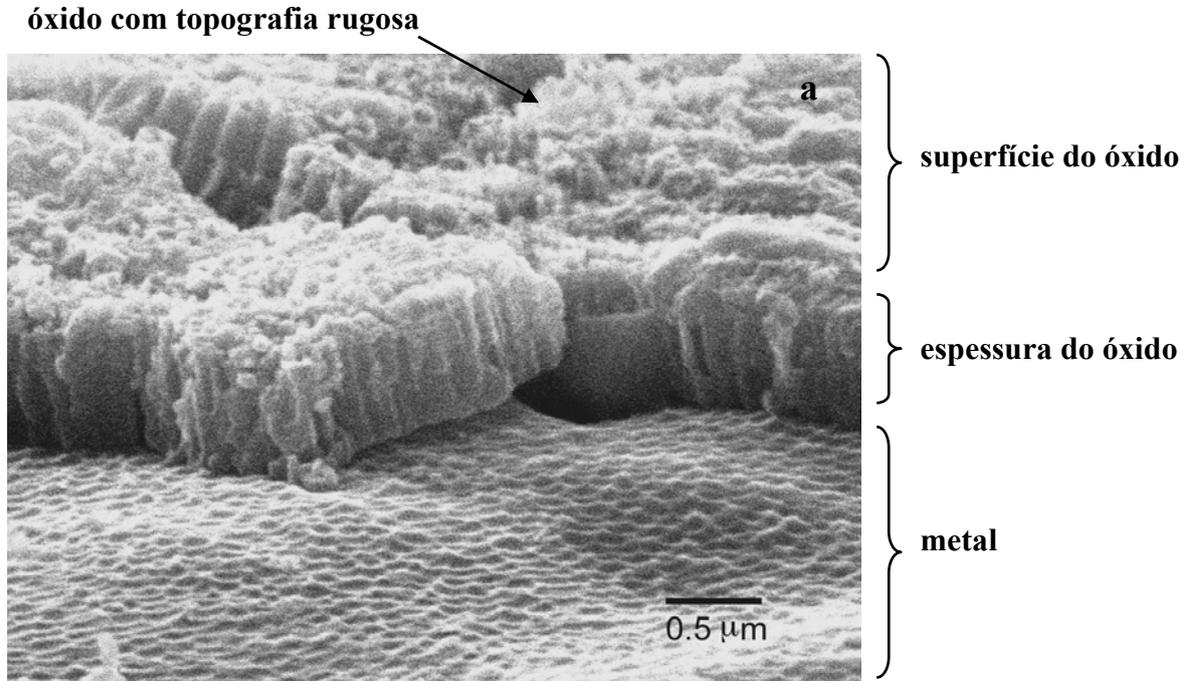


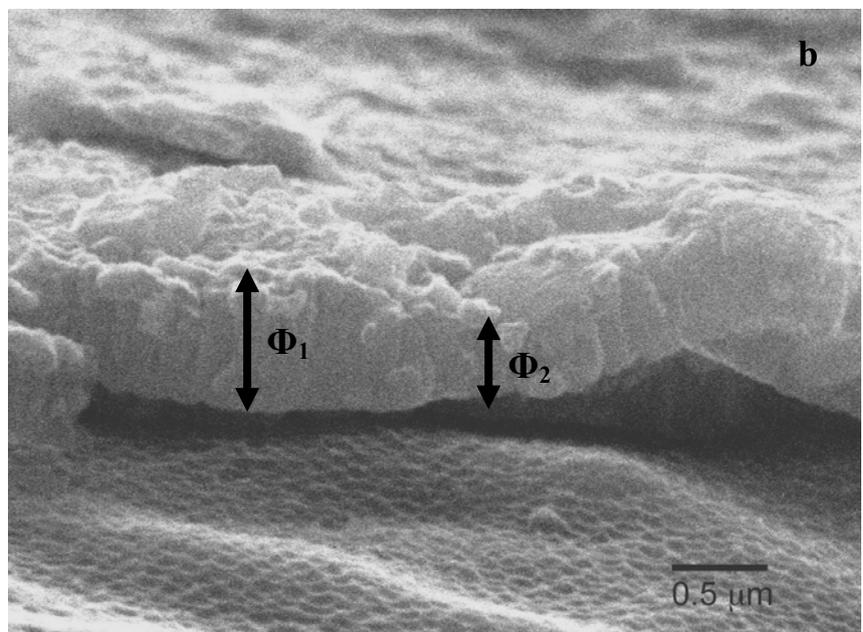
Figura 5.47 Micrografia, em vista de topo, apresentando o Ti anodizado em 1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com adição de 1% (em peso) NaF.

As Figuras 5.48a e 5.48b mostram duas micrografias em seção transversal (*cross section*) dos óxidos porosos formados em 1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com adição de 1 e 5% (em peso) de NaF, respectivamente. Nas micrografias se exemplificam a topografia rugosa (Figura 5.48a) e o espessamento não regular (Figura 5.48b), ao longo da camada de óxido.



**espessamento não regular do óxido**

Onde:  
 $\Phi$  = espessura do óxido



Figuras 5.48 Micrografias, em seção transversal, apresentando o óxido poroso tubular, formado em soluções 1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com adição de a) 1 e b) 5% (em peso) de NaF.

A Figura 5.49 mostra o descolamento de alguns poros tubulares, ao longo da camada de óxido. Nessa micrografia é possível observar que as paredes dos poros apresentam-se separadas individualmente em suas interseções, onde geralmente se encontram os poros menores, conforme o esquema da Figura 5.46.

**orifícios no óxido causados pela ausência de poros tubulares**

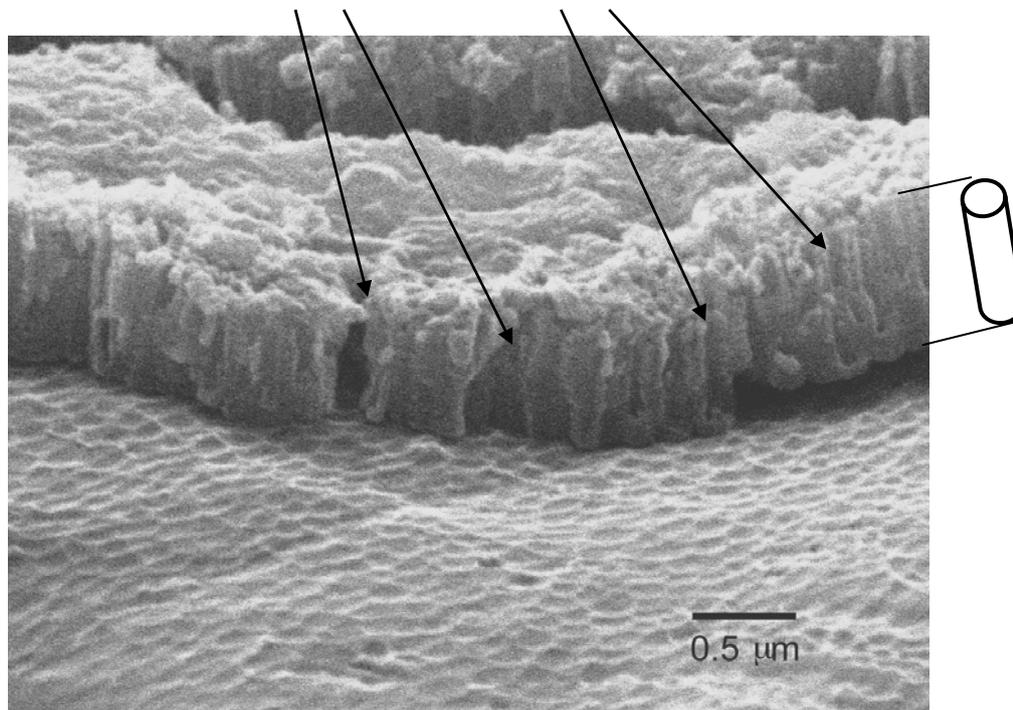


Figura 5.49 Micrografia, em seção transversal, apresentando o óxido poroso tubular, formado em soluções 1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com adição 1% (em peso) de NaF.

A relação entre as paredes dos poros e a presença de poros menores, em suas interseções torna-se mais desobstruída com aumento da concentração de NaF, estando associada ao aumento na solubilidade do óxido. Os poros menores são resultados da coalescência das vacâncias produzidas no Ti, em virtude do processo de oxidação. Outra razão para a presença da intersecção entre as paredes dos poros pode ser pelo surgimento de Ti remanescente dentro das paredes dos poros, ou pela alta concentração de átomos de Ti metálico nessa região. Esse excesso de Ti, em ambos os casos, pode, posteriormente, se situar no topo da parede dos poros e ser dissolvido na interface TiO<sub>2</sub>-eletrólito.

Na Figura 5.50, é apresentado um óxido poroso removido a partir da superfície do titânio. Na micrografia pode se observar a morfologia da interface TiO<sub>2</sub>-Ti. A topografia do metal titânio contém ondulações, em toda a sua extensão, que espelham a morfologia da base da camada anódica porosa.

A estrutura formada durante a anodização apresenta uma camada barreira com a base do poro em forma côncava e poros que crescem eretamente, desde a superfície externa do óxido  $\text{TiO}_2$  até a interface  $\text{TiO}_2\text{-Ti}$ . Deste modo, a superfície do titânio apresenta pequenas cavidades rasa que estão correlacionadas a cada poro da camada anódica.

**ondulação na base do óxido = ondulação na superfície do metal**

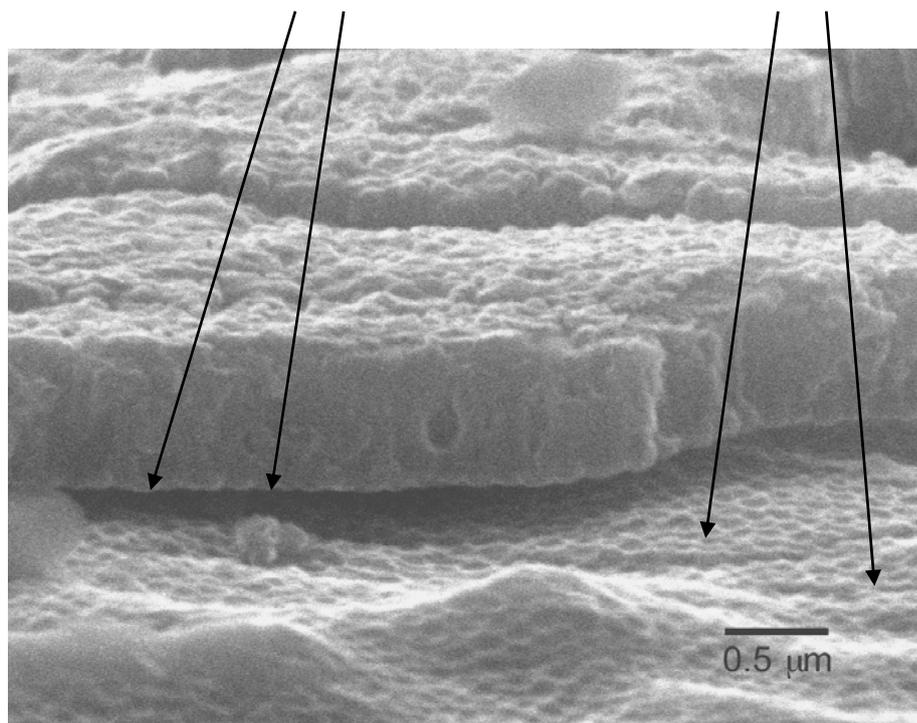


Figura 5.50 Micrografia, em seção transversal, apresentando o óxido poroso tubular, formado em soluções 1M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  com adição 5% (em peso) de NaF.

A evolução da anodização, nas três condições aplicadas, resultou na formação de estruturas relativamente homogêneas, uniformes e organizadas. Apesar de esses três tratamentos apresentarem comportamentos similares, é possível verificar algumas diferenças sutis entre os mesmos, como visto na Figura 5.46. À medida que a quantidade de NaF em solução aumenta, se observa um aumento da espessura da borda do poro, assim como um ligeiro aumento na intersecção entre as paredes de poros adjacentes.

Na avaliação morfológica do tamanho dos poros foram levados em conta tais aspectos como; o diâmetro médio ( $\varnothing_{\text{médio}}$ ) e espessura média da camada porosa, assim como a densidade de poros em relação à área da amostra. O procedimento foi idêntico ao utilizado na seção 5.2 deste capítulo. A Tabela 5.10 apresenta o resultado do estudo morfológico do óxido.

Tabela 5.10 Parâmetros obtidos por de imagens MEV e análises do programa *Image Tool*<sup>®</sup>, da anodização porosa nanotubular.

<b>1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> +</b>	<b>Ø<sub>médio dos poros</sub> (±δ)</b>	<b>espessura do óxido Φ</b>	<b>porosidade</b>	<b>densidade de poros</b>
<b>0,5% NaF</b>	68,4 (±36,5)nm	460-550nm	35,8 %	67,6µm <sup>-2</sup>
<b>1% NaF</b>	74,9 (±35,0)nm	570-630nm	35,5 %	76,6µm <sup>-2</sup>
<b>5% NaF</b>	70,0 (±35,4)nm	570-630nm	33,6 %	69,8µm <sup>-2</sup>

Os valores de porosidade obtidos são razoavelmente constantes, significando que a cinética da dissolução do óxido TiO<sub>2</sub> não é influenciada pelas concentrações 0,5; 1 e 5% (em peso) de NaF em 1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Já os valores de espessura do óxido apresentaram o seguinte comportamento:  $\Phi(1\% \text{ NaF}) = \Phi(5\% \text{ NaF}) > \Phi(0,5\% \text{ NaF})$  adicionados em 1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Isto significa que a dissolução do óxido é mais rápida em eletrólito mais diluído em NaF, resultando em uma camada de óxido mais fina ou , provavelmente, que a evolução de oxigênio seja mais forte em eletrólitos mais diluídos em fluoreto. A espessura da camada de óxido aumenta durante a anodização até certo limite de espessura, após alcançar esse limite uma morfologia irregular é obtida e desenvolvida até uma estrutura altamente regular. Esse comportamento indica que há uma competição entre a formação eletroquímica e a dissolução química do óxido.

Segundo Raja (2005b), na anodização nanotubular, os poros crescem de forma isolada, pois os íons Ti na base da camada barreira, entre dois poros adjacentes atuam como forças opostas. As componentes horizontais dessas forças se cancelam umas às outras, privando o poro de crescer lateralmente ou evitando a tendência de os poros se fundirem. No entanto, as componentes verticais das forças se reforçam umas às outras, obrigando os íons a se moverem apenas na vertical, conseqüentemente, aumentando o comprimento do poro.

Os valores de espessura em soluções contendo 1% NaF e 5% NaF apresentam-se idênticos. Isso pode demonstrar que nessas condições, a formação da camada porosa de TiO<sub>2</sub> apresenta uma condição de equilíbrio na competição de formação e de dissolução do óxido. Conclui-se então, que a concentração de NaF, em solução pode ser a chave no processo de dissolução do óxido, além de ser crucial para estabilizar o equilíbrio dinâmico do desenvolvimento da porosidade, do diâmetro médio e da espessura da camada de óxido.

## 6.0 CONCLUSÃO

Neste trabalho desenvolveu-se a metodologia para modificações superficiais em Ti, visando o aumento da biocompatibilidade e osseointegração. As modificações foram avaliadas, quanto a topografia e a biocompatibilidade, por Cultura de Células-Tronco Mesenquimais. Além disso, foi analisado estatisticamente o comportamento morfológico das superfícies produzidas em Ti. As conclusões estabelecidas a partir dos resultados são:

### 6.1 Modificações superficiais

A modificação superficial por corrosão por pites de Ti produziu pites em formato hemisférico côncavo com aspecto de forma  $w/2.d > 1$ . Os resultados podem ser justificados pela baixa deformação mecânica agregada à superfície durante o lixamento, favorecendo uma corrosão por pites no sentido longitudinal da amostra.

Na anodização após centelhamento de Ti foi observada uma nanotopografia porosa e rugosa. As regiões de forte centelhamento apresentaram poros grandes, de forma irregular ou trilha, circundados por erupções. Este comportamento, provavelmente se deve à incorporação de fósforo do eletrólito e à microfusões que ocorrem no óxido, em potenciais muito altos.

Na corrosão por pites e posterior anodização após centelhamento se verificou uma diminuição na taxa de anodização, em comparação com o Ti sem a prévia corrosão. Além disso, foi observado, dentro do pite, um óxido completamente rugoso e poroso. Esses resultados devem-se à presença de produtos de corrosão dentro do pite ou à incorporação de Br na superfície do Ti, durante a corrosão por pites e anterior ao processo de anodização.

A deposição química de fosfato de cálcio sobre a superfície anodizada de Ti apresentou um recobrimento fino de fosfato de cálcio e lamelas de, provavelmente, carbonato ou hidróxido de cálcio. A filtragem da solução de  $\text{Ca(OH)}_2$  se mostrou importante no sentido de minimizar a formação de lamelas, além de proporcionar o fechamento dos poros em aproximadamente 40%. Uma grande quantidade de recobrimento foi verificada sobre regiões de forte centelhamento, indicando uma afinidade dos fosfatos de cálcio com a topografia rugosa ou com o fósforo incorporado no óxido anódico durante o centelhamento.

## 6.2 Avaliações biológicas *in vitro* sobre amostras modificadas superficialmente

A cultura de Células-Tronco Mesenquimais sobre as modificações superficiais de Ti apresentou os seguintes comportamentos:

- Células em formato esférico, com diâmetro de 10 $\mu$ m, aproximadamente, em culturas com tempo de incubação maior que o tempo limite de sobrevivência das células.
- Células achatadas com formato estrelar, filópodes e extensões citoplasmáticas, em culturas com tempo de incubação maior que o tempo limite de sobrevivência das células.
- A baixa biocompatibilidade de superfícies de Ti sem modificação superficial (apenas polido até 1 $\mu$ m) durante grandes tempos de cultura.
- O baixo desenvolvimento de extensões citoplasmáticas ou filópodes dentro de orifício muito profundos ou em regiões agudas das superfícies, tais como as bordas dos pites.
- Grande desenvolvimento de extensões citoplasmáticas ou filópodes sobre a topografia do óxido anódico formado após centelhamento, indicando uma afinidade celular com a topografia formada.
- Uma maior biocompatibilidade de superfícies recobertas com fosfato de cálcio (pelo procedimento 2 – ciclos de imersão em solução com fosfatos de cálcio em suspensão e posterior imersão em solução de Ca(OH)<sub>2</sub> filtrada), indicada pela menor taxa de mortalidade celular das CTMs.

### 6.3 Análise estatística dos óxidos anódicos nanotubulares auto organizados

Na anodização nanotubular em Ti foi avaliado o efeito da concentração de íons fluoreto sobre a morfologia do óxido anódico formado. Neste estudo observou-se que:

- O aumento da concentração de NaF produz um aumento da espessura da borda do poro e da intersecção entre as paredes de poros adjacentes.
- A concentração de NaF não afeta a porosidade do óxido.
- As espessuras dos óxidos formados em 1% NaF e 5% NaF são idênticas, indicando uma condição de equilíbrio na competição de formação e de dissolução do óxido.
- A espessura do óxido formado em 0,5% NaF é menor que as espessuras dos óxidos formados em 1% NaF e 5% NaF, sugerindo que a dissolução do óxido é mais rápida em eletrólito mais diluído.

## 7.0 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Este estudo se apresenta como um excelente ensaio científico no que se refere à produção de implantes de Ti com precisão mecânica e características superficiais físico-químicas pertinentes. Neste trabalho foi desenvolvida uma nova metodologia para desenvolver modificações superficiais em Ti, no entanto ainda são necessários estudos complementares aos procedimentos descritos e o aperfeiçoamento das avaliações propostas. Como sequência deste estudo sugere-se os seguintes procedimentos:

- Realizar análises de caracterização química para avaliar a deposição química de fosfato de cálcio.
- Desenvolver o método utilizado para a obtenção de fosfatos de cálcio, a fim de obter uma solução pura.
- Avaliar o número de ciclos de imersão e/ou tempo na deposição química de fosfato de cálcio para alcançar em fino recobrimento.
- Aprimorar o fechamento total dos poros para que se possa relacionar a oclusão e a taxa de liberação de fármacos com a necessidade de cura do organismo.
- Estudar a diferenciação e a proliferação das Células-Tronco Mesenquimais.
- Realizar testes *in vivo* para avaliar a biocompatibilidade, o tempo de osseointegração, o percentual ósseo nos sulcos do implante ou realizar testes de tração no metal.

## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; KOKUBO, T. YAMAMURO, T. Apatite Coating on Ceramics, Metals and Polymers Utilizing Biological Process. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v. 1, p. 233-38, 1990.

ALBELLA, J. M.; MONTERO I.; FERNANDEZ, M; GOMEZ, A. C.; MARTINEZ, D. .J. M., Double Anodization Experiments in Tantalum. **Electrochimica Acta**, v. 30, n. 10, p. 1361-1364, 1985.

ALBELLA, J. M.; MONTERO, I.; MARTINEZ, D. .J. M. A Theory of Avalanche Breakdown during Anodic Oxidation. **Electrochimica Acta**, v. 32, n. 2, p. 255-258, 1987.

AMARANTE. E.S.; LIMA L.A. de. Otimização de Superfícies dos Implantes: Plasma de Titânio e Jateamento de Areia Condicionado por Ácido - estado atual. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 2, p. 166-173, 2001.

AOKI, H. **Science and Medical Applications of Hydroxiapatite**. 1ed, Tokyo, JAAS, 1991.

BAN, S.; MARUNO, S.; ARIMOTO N.; HANADA, A.; HASEGAWA, J. Effect of Electrochemically Deposited Apatite Coating on Bonding of Bone to HA-G-Ti Composite and Titanium. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 36, p. 9-15, 1997.

BAUN, W. L.. Fomation of Porous Films on Titanium Alloys by Anodization Surface Technology. **Surface Technology**, v. 11, p. 421-430, 1980.

BECK, T. R. A Review: Pitting Attack of Titanium Alloys. In: Conference on Localized Corrosion. **Williamsburg: NACE**, v. 1, p.644-652, 1971.

BECK, T. R. Pitting of Titanium. **Journal of Electrochemical Society**, v. 120, n. 10, p. 1310-1316, 1973.

BERENEK, R. HILDEBRAND H.; SCHMUKI, P. Self Organized Porous Titanium Oxide Prepared in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HF Electrolytes. **Electrochemical and Solid-State Letters**, v. 6, p. 212-B14, 2003.

BROUGHTON, J.; DAVIES, G. A. Porous Cellular Ceramics Membranes: A Stochastic Model to Describe the Structure of an Anodic Oxide Membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 106, p. 89-101, 1995.

BIGI, A.; BOANINI, E.; BRACCI, B.; FACCHINI, A.; PANZAVOLTA, S.; SEGATTI, F.; STURBA, L. Nanocrystalline Hydroxyapatite Coatings on Titanium: A New Fast Biomimetic Method. **Biomaterials**, v. 26, p. 4085-4089, 2005.

BRÅNEMARK, P.-I.; ZARB, G.A.; ALBREKTSSON, T. Tissue Integrated Prostheses. In: **Osseointegration in Clinical Dentristry**, Chicago: Quintessence Publ. Co. Inc 1985.

CABRERA, N.; MOTT, N. F. Theory of the Oxidations of Metals. **Rep. Progr. Phys**, v. 12, p. 163-184, 1948-49.

CALLISTER JR., W. D. **Materials Science and Engineering**; An Introduction. 5ed New York; John Willey & Sons, Inc., 871p, 2000.

CAMARGO FD, CHAMBERS SM, GOODELL MA. Stem Cell Plasticity; from Transdifferentiation to Macrophage Fusion. **Cell Prolif**, v. 37, p. 55-65, 2004.

CASILLAS, N.; CHARLEBOIS, S.; SMYRL, W.H.; WHITE H.S. Pitting Corrosion of Titanium. **Journal of Electrochemical Society**, v 141, n. 3, p. 636-642, 1994.

CERRONI, L.; FILOCAMO, R.; FABBRI, M.; PICONI C.; CAROPRESO, S.; CONDO, S.G. Growth of Osteoblast-like Cells on Porous Hydroxyapatite Ceramics: an *in vitro* Study. **Biomolecular Engineering**, v. 19, p. 119-124, 2002.

CHEHROUDI, B.; GOULD, T. R. L.; BRUNETTE, D. M. Titanium-Coated Micromachined Grooves of Different Dimensions Affect Epithelial and Connective-Tissue Cells Differently *in vivo*. **Journal of Biomedical Materials Research**, vol. 24, p. 1203-1219, 1990.

CHEHROUDI, B.; GOULD, T. R. L.; BRUNETTE, D. M. Effects of a Grooved Titanium-Coated Implant Surface on Epithelial Cell Behavior *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 23, p. 1067-1085, 1989.

DALBY, M. D.; MCCLOY, D.; ROBERTSON, M.; AGHELI, H.; SUTHERLAND, D.; AFFROSSMAN, S.; ORFEO, R. O. C. Osteoprogenitor Reponse to Semi-Ordered and Random Nanophotographies. **Biomaterials**, v. 27, p.2980-2987, 2006.

DEKKER, R. J.; BRUJIN, J. D. STIGTER, M.; BARRERE, F.; LAYROLLE P.; VAN BLITTERSWIJK C. A., Bone Tissue Engineering on Amorphous Carbonated Apatite and Crystalline Octacalcium Phosphate-Coated Titanium Discs. **Biomaterials**, v. 26 p. 5231-5239, 2005.

DELPLANCKE, J.L.; WINAND, R. Galvanostatic Anodization of Titanium-I. Structures and Compositions of the Anodic Films. **Electrochimica Acta**, v. 33, n. 11, p. 1539-1549, 1988.

DHERT, W. J. A. Plasma-Sprayed Coatings and Hard-Tissue Compatibility. A Comparative Study. In: **Fluorapatite, Magnesiumwhitlockite and Hydroxyapatite**. Ed.: B.U., Haveka. Offsetdrukkerij, Ablasserdam, p. 4-6, 1992.

DICK, L. F. P.; DIAS, G. P.; SANTOS, A. C. S.; SANTIN, K.; OBERDOERFER, D.; SILVA, F. H. da; NARDI, N.; B. Evaluation of Electrochemical Surface Treatments of Ti by using Mesenchymal Stem Cells Culture In: **210<sup>th</sup> ECS Meeting**, Cancun Mexico. Book of Abstracts, v. 3, 2006.

DICK, L. F. P.; MAFFIA, E. G.; SANTOS, A. C. S.; REAL, S. G. Porosification of Anodized Ti Surfaces by Sparking. In: **International Society of Electrochemical - 55<sup>th</sup> Annual Meeting**, Thessaloniki. Book of Abstracts 1-2, v. 2, p. 1276-1276, 2004.

DONACHIE, J.; M. Jr **Titanium, a Technical Guide 2<sup>nd</sup>**. ASM International, 1989.

DUGDALE, J.; COTTON, J. B. The Anodic Polarization of Titanium in Halide Solutions. **Corrosion Science**, v.4, 1964.

ELIAS, C. N., SOARES, G. A., GIBSON, I. R., LIMA, J. H. C., DA SILVA, M. H. Recobrimentos de Titânio com Fosfatos de Cálcio de Relevância Biológica pelo Processo de Deposição Eletrolítica. **Revista Matéria**, 2002.

EPPLER, R. A; SPENCER-STRONG. Role of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in TiO<sub>2</sub>-Opacified Porcelains Enamels. **Journal of American Ceramics Soc.** v. 52, n. 5 p. 263-268, 1969.

ERNST, P.; NEWMAN, R.C. Pit Growth Studies in Stainless Steel Foils .In: Introduction and Pit Growth Kinetics. **Corrosion Science**, v. 44, p. 927-941, 2002.

FERDJANI, S.; DAVID, D. BERANGER, G.; HUGOT-LE-GOFF, S.; HILD, S.; GARCIA, E. A Oxydation Anodique du Titane em Milieu Phosphorique. **Etude Analytique et Structurale de l'oxide Microscopy, Microanalysis, Microstructure**, v. 4, p. 275-287, 1990.

FERDJANI, S.; DAVID, D.; BERENGER, G. Anodic oxidation of Titanium in Phosphoric Acid Baths: Phosphorous Incorporation into the Oxide. **Journal of Alloys and Compound**, v. 200, p. 191-194, 1993.

FINI, M.; CIGADA, A.; RONDELLI, G.; CHIESA, R.; GIARDINO, R.; GIAVARESI, G.; ALDINI, N. N.; TORRICELLI, P.; VICENTINI, B. *In Vitro* and *in Vivo* Behaviour of Ca- and P-Enriched Anodized Titanium. **Biomaterials**, v. 20, p. 1587-1594, 1999.

FISHER G. Ceramic Coating Enhance Performance Engineering. **Ceram. Bull.**, v. 65, n. 2, p. 283-287, 1986.

FRANKEL, G. S.; STOCKERT, L.; HUNKELER, F.; BOEHNI, H. Metastable Pitting of Stainless Steel. **Corrosion - NACE**, v. 43, n. 7, p. 429-436, 1987.

FROSCH, K.-H.; DRENGK, D.; KRAUSE, P.; VIERECK, V.; MIOSGE, N.; VERNER, C.; SCHILD, D.; STÜRMER, E. K.; STÜRMER, K. M. Stem Cell-Coated Titanium Implants for the Partial Joint Resurfacing of the Knee. **Biomaterials**, v. 27, p. 2542-2549, 2006.

GALVELE, J. R. In **Passivity of Metals** Pennington: (Ed. R.P. Frenkenthal and J.Kruguer), Electrochemical Soc. Inc. New York, 285p., 1978.

GARFIA, M., L.F.; ALODAN, M.; JAMAES P.I.; SMYRL, W.H. Determination of Precursor Sites for Pitting Corrosion of Polycrystalline Titanium by Using Different Tecniques. **Journal of Electrochemical Society**, v. 145, n. 6, p. 2005-2010, 1998.

GIL, F. J.; PADRO´S, A.; MANERO, J. M.; APARICIO, C.; NILSSON, M.; PLANELL, J. A Growth of Bioactive Surfaces on Titanium and its Alloys for Orthopedic and Dental Implants **Materials Science and Engineering**, v. 22, p. 53-60, 2002.

GLEAVES, G.H.; DEARNALEY, G.; COLLINS, R.A. A Phenomenological Model for the Anodization of Titanium. **Thin Solids Films**, v.135, p. 5-8, 1986.

GOMES, A. L. S.; PINTO, V. B. B.; ANDRADE, M. C. DE, OGASAWARA, T; **Contribuição Termodinâmica à Nucleação Anódica de Hidroxiapatita em Titânio** Contribuição Técnica ao Sulmat 2002, em Joinville-SC, p. 1385-1394, 2002.

GUIÑON, J. L.; GARCIA-ANTON, J.; PEREZ-HERRANZ, V.; LACOSTE, G. Corrosion of Carbon steel, Stainless Steel, and Titanium in Aqueous Lithium Bromide Solution. **Corrosion Engineering**, v. 50, n. 3, p. 240-246, 1994.

HENCH, L. L. Ceramic Glasses and Glasses Ceramics. In: **Biomaterials Science: An Introductory Text**, Eds.: B.D. Ratner and A.S. Hoffman, Orlando: Academic Press, 1991.

HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of American Ceramic Society**, v. 81, n. 7, p. 1705, 1998.

HULBERT, S. F.; TALBERT, C. D.; KLAWITTER, J. J. Investigations of the Potential of Ceramics for Surgical Applications. In; BELMET JUNIOR, A. L. (Ed) **Biomaterials: Bioengineering Applied to Materials for Hard and Soft Tissue Replacement**. 1 ed. Washington: Battelle Seattle Research Center and the University of Washington Press, p. 3-77, 1971.

HUO, S.; MENG, X. The State of Bromide on Titanium Surface Prior to Pit Initiation. **Corrosion Science**, v. 31, p. 281-286. 1990.

ISHISAWA H. AND OGINO M. Characterization of Thin Hydroxyapatite Layers Formed on Anodic Titanium Oxide Films Containing Ca and P by Hydrothermal Treatment. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 29, p. 1071-1079, 1995.

IKEDA, E.; HIROSE, M.; KOTOBUKI, N.; SHIMAOKA, H.; TADOKORO, M.; MAEDA, M.; HAYASHI, KIRITA, T.; OHGUSHI, H. Osteogenic Differentiation of Human Dental Papilla Mesenchymal Cells. **Biomedical and Biophysical Research Communications**, v342, p. 1257-1262, 2006.

IKONOPISOV, S. Theory of Electrical Breakdown during Formation of Barrier Anodic Film. **Electrochimica Acta**, v. 22, p. 1077-1082, 1977.

IKONOPISOV, S.; GIRGINOV, A.; MACHKOVA, M. Electrical Breakdown of Barrier Anodic Films during their Formation. **Electrochimica Acta**, v. 24, p. 451-456, 1979.

JARCHO M. Retrospective Analysis of Hydroxyapatite Development for Oral Implant Applications, **Dent. Clin. North Am.**, v. 36, n. 1, p. 19-26, 1992.

KASEMO, B. Biocompatibility of Titanium Implants; Surface Science Aspects. **J. Prosthet. Dent.**, v. 49, n. 6, p. 832-837, 1982.

KOKUBO, T., MIYAJI, F.; KIM, H.-M. Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 79, p. 1127-1129, 1996.

KUROMOTO, N. K.; SIMÃO, R. A.; SOARES, G. A. Titanium Oxide Films Produced on Commercially Pure Titanium by Anodic Oxidation With Different Voltages. **Materials Characterization**, v. 58, p. 114-121, 2007.

LAUSMA, J.; KASEMO, B.; MATTSSON, H.; ODELIUS, H. Multiple-Technique Surface Characterization of Oxide Films on Electropolished and Anodically Oxidized Titanium. **Applies Surface Science**, v. 45 p. 189-200, 1990.

LAYCOCK, N.J.; MOAYED, M.H.; NEWMAN, R.C. Metastable Pitting and the Pitting Temperature. **Journal of Electrochemical Society**, v. 145, n. 8, p. 2622-2628, 1998.

LEMONS, J.; MISCH, F. D. Biomateriais Utilizados em Implantes Dentários. In: **Misch, C. E. Implantes Dentários Contemporâneos**. 2ed. São Paulo: Santos, cap. 20, p. 271-302, 2000.

LE GEROS, R. Z. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. In: **Monographs in Oral Science**, Eds.: H.M. Myers. Karger, Basel. v. 15, p. 108-129; 167-169, 1991.

LOHRENGEL. M. M.; Thin Anodic Oxide Layers on Aluminium and Other Valve Metals: High Field Regime. **Materials Science and Engineering**, v. 2, p. 243-294, 1993.

LI, F.; FENG, Q. L.; CUI, F. Z.; LI, H. D.; SCHUBERT, H. A Simple Biomimetic Method for Calcium Phosphate Coating. **Surface and Coatings Technology** v. 154, p. 88-93, 2002.

LIU, D. M. Porous Hydroxiapatite Bioceramics. In: Trans Tech Publications. (Ed) **Porous Ceramics Materials**. Switzerland; Trans Tech Pulications, 209p., 1996.

LU, Q; MATO, S; SKELDON, P; THOMPSON, G; MASHEDER, E.D; HABAZAHI, H; SHIMIZU, K. Anodic Film Growth on Tantalum in Dilute Phosphoric Acid Solutions at 20 and 85°C. **Electrochimica Acta**, v.47, p.2761-2767, 2002.

LU, H. L.; TANG, A.; OH, S. C.; SPALAZZI, J. P.; DIONÍSIO, K. Compositional Effects on the Formation of a Calcium Phosphate Layer and the Response of Osteoblast-like Cells on Polymer-Bioactive Glass Composites. **Biomaterials**, v. 26, p. 6323–6334, 2005.

MAFFIA, E. G. **Estudo da Corrosão e Anodização do Titânio para Aumento da Área Superficial de Implantes**. Porto Alegre, 114p., 2005 Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da UFRGS.

McQUILLAN, A. D.; McQUILLAN, M. K. Metallurgy of the Rarer Metals TITANIUM, v.4, Ed. **Butterworths Scientific Publications**, 1956.

MARINO, C. E. B., OLIVEIRA, E. M., ROCHA-FILHO, R. C., BIAGGIO, S. R. On the Stability of Thin-Anodic-Oxide Films of Titanium in Acid Phosphoric Media. **Corrosion Science**, v. 43, p. 1465-1476, 2001.

MARTIN, J. Y.; SCHWARTZ, Z.; HUMMERT, T. W.; SCHRAUB, D. M.; SIMPSON, J.; LANKFORD, J.; DEAN, D. D.; COCHRAN, D. L.; BOYAN, B. D. Effect of Titanium Surface Roughness on Proliferation, Differentiation, and Protein Synthesis of Human Osteoblast-Like Cells (MG63). **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 29, p.389-401, 1995.

MAVROPOULOS, E. **A Hidroxiapatita como Absorvedor de Metais**. (Dissertação de Mestrado) Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública 105p., 1999.

MEARS, D. C. Metals in Medicine and Surgery. **International Metals Reviews Review** 218, p 120-155, 1977.

MEIRELLES, L. S.; NARDY, N. B. Murine Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell: isolation *in Vitro* Expansion and Characterization. **British Journal of Haematology**, v. 123, p.702-711, 2003.

MONTERO, I.; ALBELLA, J.M.; MARTINEZ-DUART, J.M. Influence of Electrolyte Concentration on the Anodization and Breakdown Characteristics of Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Films. **Journal of Electrochemical Society**, v.132, n.4, p.814-818, 1985.

NAJDOSKI, M.Z.; MAJHI, P.; GROZDANOV, I.S. A Simple Chemical Method for Preparation of Hydroxyapatite Coatings on Ti6Al4V Substrate. **Journal of Materials Sci: Materials in Medicine**, v.12, p.479-483, 2001.

NISHIMURA, H.; NISHIMURA, M.; ODA, R.; YAMANAKA, K.; MATSUBARA, T.; OSAKA, Y.; SEKIYA, K.; HAMADA, T.; KATO, Y. Lectins Induce Resistance to Proteases and/or Mechanical Stimulus in all Examined Cells-including Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells-on various Scaffold. **Experimental Cell Research**, v. 295, p. 119-127, 2004.

OH, S.-H., FINÖNES, R. R.; DARAIO, C.; CHEN, L.-H. JIN, S. Growth of Nano-Scale Hydroxyapatite using Chemically Treated Titanium Oxide nanotubes. **Biomaterials**, v. 26, p. 4938-4943, 2005.

OH, S.-H.; JIN, S. Titanium Oxide Nanotubes with Controlled Morphology for Enhanced bone growth. **Materials Science Engineering C**, v.26, p. 1301-1306, 2006.

OHTSUKA, T.; GUO J.; SATO, N. Raman Spectra of the Anodic oxide Film on Titanium in Acid Sulfate and Neutral Phosphate Solutions. **Journal of Electrochemical Society**, v. 133, n. 12, p. 2473-2476, 1986.

OLIVEIRA, C. T. **Estudo Comparativo à Corrosão da Liga AA2024-T3 Anodizada em Complexo Amoniaco de Oxalato de Niobila e em Ácido Crômico**. Porto Alegre, p.72, 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da UFRGS.

PARK, J. B. Biomaterials, an Introduction. **Plenum Press**, New York, 1979.

PETIT, J.A.; KONDRO, B.; DABOSI, F. Ion Beam Analysis Investigation of Pit Nucleation on Titanium in Bromide Media. **Corrosion-NACE**, v.36, n.3, p.145-151, 1980.

PILLIAR R. M.; FILIAGGI M. J. New Calcium Phosphate Coating Methods. In **Bioceramics**, Eds.: Ducheyne and D. Christiansen, Philadelphia: Butterworth Heinemann, v. 6, p. 165-171, 1983.

PRADO, M. H.; DA SILVA, J.H.C. LIMA, G.A. SOARES, C.N. ELIAS, M.C. DE ANDRADE, S.M. BEST, I.R. GIBSON Transformation of Monetite to Hydroxyapatite in Bioactive Coatings on Titanium. **Surface and Coatings Technology**, v. 137, p. 270-276, 2001.

POUILLEAU, J.; DEVILLERS, D.; GARRIDO, F.; DURAND-VIDAL; MAHÉ, E. Structure and Composition of Passive Titanium Oxide Films. **Materials Sci. and Eng.**, v. 47, p. 235-243, 1997.

RABBOH, A. A. F.; BODEN, P. J. The Breakdown of Passivity of Titanium, Zirconium and Tantalum in Halide Media. In: **Conference on Localized Corrosion**, Williamsburg: NACE, v. 1, p. 653-660, 1971.

RAJA, K.S.; MISRA, T. M.; PARAMGURU, K. Deposition of Calcium Phosphate Coating on Nanotubular Anodized Titanium. **Materials Letters**, v. 59, p. 2137–2141, 2005a.

RAJA, K. S.; MISRA, M.; PARAMGURU, K. Formation of Self-Ordered Nano-Tubular Structure of Anodic Oxide Layer on Titanium. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 154–165, 2005b.

RATNER, B. D; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E.; An Introduction to Materials in Medicine. **Academic Press**, New York, 1996.

SADER, M. S.; BALDUINO, A.; SOARES, G. A.; BOROJEVIC, R.; Effect of Three Distinct Treatments of Titanium Surface on Osteoblast Attachment, Proliferation, and Differentiation. **Clin Oral Impl. Res.** v. 16, p. 667-675, 2005.

SANTOS, M. L., FLORENTINO, A. O., SAEKI, M. J., APARECIDA, A. H., FOOK, M. V. L., GUASTALDI, A. C. Síntese de Hidroxiapatita pelo Método Sol-Gel Utilizando Precursores Alternativos: Nitrato de Cálcio e Ácido Sulfúrico. **Eclética Química**, v. 30, n 3, 2005.

SCHAEFFER, A. **Protótipos de implantes dentários a base de titânio obtidos pelo processo de moldagem por injeção de pós metálicos: estudo *in vivo***. Porto Alegre, p.67, 2007 Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da UFRGS.

SHEIR, L.L. Metal: Environment Reactions **London, Boston: Newnes-Butterworths**, v. 1-2, 1976.

SCHEIVE, R. H. J. The Relationship between Repassivation Behavior and Pitting Corrosion for Ti and Ti6Al4V. **Corrosion**, v. 34, n. 12, p. 437-442, 1978.

SCHRECKENBACH, J. P.; MARX, G.; SCHLOTTIG, F.; TEXTOR, M.; Spencer, N.D. Characterization of Anodic Spark-Converted Titanium Surfaces for Biomedical Applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, p. 453-457, 1999.

SCHROEDER, A.; SUTTER, F.; KREKELER, G. **Implantodontia Dental**. Tradução de Terezinha Oppino. São Paulo: Panamericana, 1994.

SCHUTZ, R.W.; THOMAS, D.E. **Corrosion**, Metals Handbook, 9ed, v. 13, Metals Park, Ohio: ASME, 669p., 1990.

SILVA, E. P.; **Comparação de Diferentes Biomateriais Metálicos Utilizados em Implantes Cirgicos**. Porto Alegre, p.120, 1992 Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da UFRGS.

SMELTZER, W.W.; HAERING, R.R.; KIRKALDY J.S. Oxidation of Metals by Short Circuit and Lattice Diffusion of Oxygen. **Acta Metallurgica**, v. 9, p.880-885, 1961.

SMIALOWSKA, S. Z. Pitting Corrosion on Aluminium. **Corrosion Science**, v. 41, p. 1743-1767, 1999.

SPOERKE, E. D., STUPP, S. I. Synthesis of a Poly(L-lysine)-Calcium Phosphate Hybrid on Titanium Surfaces for Enhanced Bioactivity. **Biomaterials**, v. 26, p.5120-5129, 2005.

SUL, Y.-T.; JOHANSSON, C. B.; YONGSOO, J.; ALBREKTSSON, T. The Electrochemical Oxide Growth Behavior on Titanium in Acid and Alkaline Electrolytes. **Medical Eng. & Physics**, v. 23, p. 329-346, 2001.

TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; SUZUKI, J.; MATSUSHITA, T.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Osteoinductive Porous Titanium Implants: Effect of Sodium Removal by Dilute HCl Treatment. **Biomaterials**, v. 27, p. 2682-2691, 2006.

TUANTUAN L.; JUNHEE L.; KOBAYASHI T.; AOKI H. Hydroxyapatite Coating by Dipping Method, and Bone Bonding Strength. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v. 7, p. 355-357, 1996.

VAN KEMENEADE, M. J. J. M.; DE BRUYN, P. L. A Kinetic Study of Precipitation from Supersaturated Calcium Phosphate Solutions. **Journal of Colloidal Interface Science**, v. 118, p. 564-585, 1987.

VARGHESE, O. K.; GONG, D.; PAULOSE, M.; ONG, K.G.; GRIMES, A.; DICKEY, E. C. Crystallization and High-Temperature Structural Stability of Titanium Oxide Nanotube Arrays. **Journal of Materials Research**, v. 18, n. 1, p. 156-165, 2003.

WANG, M. L.; NESTI L. J.; TULI R.; LAZATIN R.; DANIELSON K. G.; SHARKEY P. F.; TUAN, R. S.; Titanium Particles Suppress Expression of osteoblastic Phenotype in Human Mesenchymal Stem Cells. In: **Journal Orthopedic Research**, v. 20, p 1175-1184, 2002.

WILLIAMS, D. F.; **Biocompatibility of Clinical Implant Materials**. London: CRC Press, v. 1, 1972.

WILLIAMS, D. F. Definitions in Biomaterials. In: **Progress in Biomedical Engineering**. [Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials], D.F. Williams Amsterdam: Elsevier; v. 4, cap. 6, p. 49-59, 1987.

ZHANG, Y.; FU, T.; HAN, Y.; WANG, Q.; ZHAO, Y. XU, K. *In vitro* and *in vivo* Tests of Hydrothermally Synthesised Hydroxyapatite Coating. **Biomolecular Engineering**, v.19 p. 57-61, 2002.

ZHU., X.; KIM, K.-H.; Y. J.; Anodic Oxide Films Contains Ca and P of Titanium Biomaterials. **Biomaterials**, v. 22, p. 2199-2206, 2001.

ZINGER, O.; ANSELME, K.; DENZER, A.; HABERSETZER, P.; WIELAND, M.; JEANFILS, J.; HARDOUIN, P.; LANDOLT, D. Time-Dependent Morphology and Adhesion of Osteoblastic Cells on Titanium Model Surfaces Featuring Scale-Resolved Topography. **Biomaterials**, v. 25 p. 2695–2711, 2004.

YAHALOM, J.; ZAHAVI, J. Experimental Evaluation of Some Electrolytic Breakdown Hypotheses. **Electrochimica Acta**, v.16, p. 603-607, 1971.

YAHALOM, J.; IVES, L.K.; KRUGER, J. On the Nature of films Over Corrosion Pits in Stainless Steel. **Journal of Electrochemical Society**, v. 120, n.3, p. 384-386, 1973.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)