

UFMG / ICCEEx / DQ. 1086

D. 593

LUDMILA GONÇALVES DE OLIVEIRA XAVIER

TRATAMENTO DE SUPERFÍCIES EM PEÇAS DE TITÂNIO DE GRAU MEDICINAL

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Físico - química.

Belo Horizonte

2015

X3t
2015
D
Xavier, Ludmila Gonçalves de Oliveira
Tratamento de superfícies em peças de titânio de grau medicinal [manuscrito] / Ludmila Gonçalves de Oliveira Xavier. 2015.
[xiii], 88 f. : il.

Orientadora: Rosana Zacarias Domingues.
Coorientadora: Arilza de Oliveira Porto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Físico-química - Teses 2. Titânio - Teses 3. Fourier, Espectroscopia de infravermelho por transformada de - Teses 4. Ossos - Regeneração - Teses I. Domingues, Rosana Zacarias, Orientadora II. Porto, Arilza de Oliveira, Coorientadora III. Título.


CDU 043



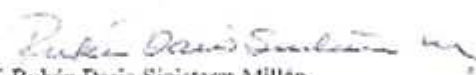
"Tratamento de Superfícies em Peças de Titânio de Grau Medicinal"

Ludmila Gonçalves de Oliveira Xavier

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Rosana Zacarias Domingues - Orientadora
UFMG


Prof. Arilda de Oliveira Porto - Coorientadora
UFMG


Prof. Rubén Darío Sistierra Millán
UFMG


Prof. Angela Leão Andrade
UFOP

Belo Horizonte, 26 de junho de 2015.

TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE EM PEÇAS
DE TITÂNIO DE GRAU MEDICINAL
Ludmila Gonçalves de Oliveira Xavier

Orientador (a): Dra. Rosana Zacarias Domingues
Co-orientador (a): Dra. Arilza de Oliveira Porto

Junho de 2015

*Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim
todos os sonhos do mundo.
(Álvaro de Campos, 1928).*

Agradeço:

A Deus e a interseção da Virgem Maria, que me acompanham, me guiam e me protegem em todos os momentos da minha vida;

Aos meus dois grandes amores Alan e Rafael, pelos sorrisos verdadeiros e grande amor que me dedicaram desde que entraram em minha vida;

Aos meus pais, Virma Rosa e Alri, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, mesmo que isso significasse abrir mão de qualquer coisa;

A meu irmão Davi e meus cunhados (as) que me proporcionaram momentos de alegria e apoio;

Aos meus sogros, que sempre estiveram dispostos a me ajudar;

Aos professores, Rosana Domingues, Arilza Porto e Tulio Matencio, pela dedicação, instrução e considerável paciência em me orientar e acolher durante todo o mestrado;

A todos meus amigos queridos do Lampac, pelo apoio e amizade;

Aos professores Clascídea, José Domingos, Fernando Lameiras e a todo seu grupo de pesquisa do CDTN, pelo apoio;

Ao professor Alfredo Goes e a Dra. Carolina Reis do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pelo apoio e auxílio em todos os testes biológicos.

As minhas queridas amigas “Químicas lindas”, que só Deus sabe como são importantes em minha vida;

As amigas, Ana Paula e Eufrasia, que estiveram ao meu lado, lutando juntas em alguns dos momentos desafiadores deste processo;

A CAPES pelo apoio financeiro;

Ao povo brasileiro que financia essa universidade.

RESUMO

Os recobrimentos de superfícies metálicas de implantes com materiais bioativos são uma alternativa na busca de materiais para regeneração óssea, com maior vida útil, de fixação rápida e menor rejeição. Nesse trabalho, peças de titânio puro comercial, grau 2, com tratamento de superfície similar ao comercial, são recobertos por biovidros do sistema $(\text{SiO}_2)_{0.80}(\text{P}_2\text{O}_5)_{0.04}(\text{CaO})_{0.16}$, a temperatura ambiente, e submetidos a dois diferentes tratamentos térmicos, 37°C, chamado de BGTi37, e 600°C, chamado de BGTi600, e comparados ao titânio comercial.

As análises químicas dos materiais foram realizadas por espectroscopia na região de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância difusa, difração de raios X, espectroscopia de raios X de energia dispersiva, espectroscopia fotoeletrônica de raios X e potencial zeta. Por meio delas, foi possível determinar a composição, os grupos funcionais importantes relacionados à bioatividade, a aderência dos materiais formados, características químicas superficiais, ponto isoelétrico e a morfologia das amostras. A aderência dos filmes ao substrato foi determinada pela norma ABNT MB 985, obtendo o GR 0 para os materiais formados. A morfologia, a espessura e a rugosidade foram determinadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica. Foram obtidos materiais porosos, com espessura e rugosidade adequada a sua aplicação. A interferência da formação de óxidos na morfologia e espessura também foi investigada.

A bioatividade dos materiais e do substrato, contendo apenas titânio sem recobrimento, foi determinada pela cinética de formação da apatita carbonatada em fluido biológico simulado, seguindo o método de KOKUBO, avaliado por espectroscopia na região de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância difusa, difração de raios X, e espectroscopia fotoeletrônica de raios X, com os quais foi possível detectar a presença de fosfatos de cálcio formados. Também foram avaliados a atividade da enzima fosfatase alcalina, a viabilidade celular e a colonização *in vitro* na superfície dos materiais. Os resultados obtidos mostraram a viabilidade de se utilizar os materiais de biovidro e titânio como implantes ósseos.

Palavras-chave: Biovidros, titânio, biomateriais, filmes e regeneração óssea.

ABSTRACT

The coatings of metal surfaces of implants with bioactive materials are an alternative in the search for materials for bone regeneration with long life useful, quickly fixation and lower bounce. In this research, parts of commercial pure titanium grade 2, with a treatment similar to the commercial surface, are covered by bioglasses system $(\text{SiO}_2)_{0.80}(\text{P}_2\text{O}_5)_{0.04}(\text{CaO})_{0.16}$ at room temperature, and subjected to two different thermal treatments, 37°C, called BGTi37 and 600°C, called BGTi600, and compared to commercial titanium.

Chemical analysis of the material was performed by spectroscopy in the infrared region for Fourier's Transform with diffuse reflectance, diffraction X rays spectroscopy, X rays energy dispersive, X rays photoelectron spectroscopy and zeta potential. It was possible to determine the composition, the important functional groups related to bioactivity, and adherence of the formed materials, surface chemical characteristics, isoelectric point and the morphology of the samples. The adherence of the film to the substrate was determined by ABNT MB 985, getting the GR 0 for formed materials. The morphology, thickness and roughness were determined by scanning electron microscopy and atomic force microscopy. They were obtained porous materials with a thickness and roughness appropriate to your application. The interference of the formation of oxides on the morphology and thickness was also investigated.

The bioactivity of the materials of the substrate, was determined by the kinetics of the formation of carbonated apatite in simulated body fluid, KOKUBO following the method reported by spectroscopy in the infrared region for Fourier's Transform with diffuse reflectance, diffraction X rays spectroscopy and X rays photoelectron spectroscopy, with which it was possible to determine the calcium phosphates formed; by cell viability; alkaline phosphatase; and colonization in vitro on the surface of the material. The results showed the feasibility of using the materials as bioglass and titanium bone implants.

Keywords: bioglasses, titanium, biomaterials, films and bone regeneration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

μm –Micrometros

Å–Angstroms

AC - Apatita carbonatada

ACP - Fosfato de cálcio amorfo

ANA–Anatásio

BCP - Fosfato de cálcio bifásico

BG–Biovidro

BGs–Biovidros

Ca/P–Razão molar de cálcio e fósforo

CDHA - Hidroxiapatita deficiente em cálcio

CDV - Deposição química de vapor

cm–Centímetro

CPC–Cerâmicas de fosfato de cálcio

DCPA - Fosfato dicálcio anidro

DCPD - Fosfato dicálcio di-hidratado

eV–Elétron-Voltz

FA–Fosfatase alcalina

g–Aceleração da gravidade

γ_{LV} - Tensão interfacial líquido-vapor

h–Espessura

HA–Hidroxiapatita

HAC–Hidroxiapatita carbonatada

mA–Miliampéres

MCPA - Fosfato monocálcio anidro

MCPM - Fosfato monocálcio monohidratado

min–Minuto

M.O.–Microscópio óptico

nm–Nanômetros

OCP - Fosfato octacálcio

PVD - Deposição física de vapor

RMS–Rugosidade média

RUT–Rutilo

SBF–Fluido biológico simulado

TCP - Fosfato tricálcio

TEOS–Tetraetilortosílicato

Ti–Titânio

TTCP - Fosfato tetracálcio

U - Velocidade de retirada do substrato

uL–Microlitros

α -TCP - α -Fosfato tricálcico

β -TCP - β -Fosfato tricálcico

η –Viscosidade

λ –Comprimento de onda

ρ –Densidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de fosfatos de cálcio por meio das razões entre o Ca/P.	13
Tabela 2 - Composição da solução de SBF	18
Tabela 3 - Espessuras dos filmes determinadas por MEV.....	49
Tabela 4 - Medidas de rugosidade (RMS) dos materiais e do substrato determinadas por AFM.....	51

LISTA DE LUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização do Bioglass 45S5® no diagrama de Hench que relaciona a composição com a bioatividade.	10
Figura 2 - Exemplo de aplicação biomédica do titânio, Radiografia (a) e representações esquemáticas (b-c) de implantes dentários de titânio.....	15
Figura 3 - Fase do TiO ₂ : Rutilo, Anatásio e Broquita.....	16
Figura 4 - Esquema da difração de Bragg.....	25
Figura 5 - Princípio da fotoemissão	27
Figura 6 - Desenho esquemático da coluna do MEV	29
Figura 7-Modo de operação do AFM.....	32
Figura 8 - Espectro de DRIFT do substrato, Titânio, na região de 4000-400 cm ⁻¹	36
Figura 9 - Espectro de DRIFT do material BGTi37, na região de 4000-400 cm ⁻¹	36
Figura 10 - Espectro de DRIFT do material BGTi600, na região de 4000-400 cm ⁻¹ ..	36
Figura 11 - Espectro de XPS do titânio.	38
Figura 12 - Espectro de XPS do BGTi37.....	39
Figura 13 - Espectro de XPS do BGTi600.....	40
Figura 14–Difratograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante para o substrato de titânio.	42
Figura 15–Difratograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante, para o BGTi37.....	43
Figura 16–Difratograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante, para o BGTi600.....	44
Figura 17 - Imagem de superfície dos materiais (a) BGTi37 e (b) BGTi600, obtidas por MEV. As setas indicam a presença de poros de tamanhos variados.....	45
Figura 18 - Imagem do mapeamento químico para o TiO ₂ presente na superfície dos materiais (a) BGTi37 e (b) BGTi600, obtidas por MEV/EDS.	46
Figura 19 - Espectro de EDS para o pó do biovidro a 37°C, similar ao presente no BGTi37.	47
Figura 20 - Espectro de EDS para o pó do biovidro a 600°C, similar ao presente no material BGTi600.	47
Figura 21 - Imagens das seções transversais dos filmes (a) BGTi37 e (b) BGTi600, obtidas por MEV.....	49

Figura 22 - Microscopias de AFM dos materiais: (a) BGTi37, (b) BGTi600 e (c) Titânio	50
Figura 23 - Imagem de MEV do ensaio de aderência do filme ao substrato de titânio nos materiais (a) BGTi37 e (b) BGTi600, seguida da análise de EDS para confirmação da composição.....	52
Figura 24 - Potencial Zeta correspondente aos filmes BGTi37 e BGTi600.....	54
Figura 25 - Espectro de transmitância de DRIFT, na região de 4000–400 cm ⁻¹ para os materiais BGTi600, BGTi37 e Titânio em SBF por 7 horas.	56
Figura 26 - Espectro de transmitância de DRIFT, na região de 4000–400 cm ⁻¹ para os materiais BGTi600, BGTi37 e Titânio em SBF por 24 horas.	57
Figura 27–Espectro de transmitância de DRIFT, na região de 4000–400 cm ⁻¹ para os materiais BGTi600, BGTi37 e Titânio em SBF por 160 horas.....	58
Figura 28–Cinética de formação da HCA em SBF medida como a razão(Ia/Ib).	59
Figura 29–Cinética de formação da HCA em SBF, medida como a razão (Ia/Ib).	59
Figura 30–Difratograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante, para o substrato titânio, imerso em SBF por 160 horas..	61
Figura 31 - Difratograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante, para o BGTi37.	62
Figura 32–Difratograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante, para o BGTi600.	63
Figura 33–Espectro de XPS do titânio após imersão em SBF por 160 horas.....	65
Figura 34–Espectro de XPS do BGTi37 após imersão em SBF por 160 horas.	66
Figura 35–Espectro de XPS do BGTi600 após imersão em SBF por 160 horas.	67
Figura 36 - Representação gráfica da proliferação celular avaliados pelo ensaio de MTT, onde CN= controle de viabilidade; CP= controle de morte; Ti= substrato puro e BGTi37 e BGTi600 são os respectivos materiais estudados.....	68
Figura 37 - Representação gráfica da atividade de fosfatase alcalina, onde CN= controle de viabilidade celular; CP= controle de morte; Ti= substrato puro e BGTi37 e BGTi600 são os respectivos materiais estudados.....	69
Figura 38 – Imagens da MEV do material BGT37. Presença de células aderidas a superfície (a); proliferação celular sobre as células já aderidas ao material; (b); proliferação de células dentro dos poros dos material (c); interconexão com outras células através dos prolongamentos citoplasmáticos (d).	71

Figura 39 - Imagens da MEV do material BGT600. Presença de células aderidas a superfície (a); proliferação celular sobre as células já aderidas ao material; (b); proliferação de células dentro dos poros dos material (c); interconexão com outras células através dos prolongamentos citoplasmáticos (d).	72
Figura 40 - Imagens da MEV do substrato de titânio, mostrando células pouco aderidas à superfície (a); apoptose celular (b).	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	4
3.1. FILMES FINOS.....	4
3.2. TIPOS DE RECOBRIMENTO.....	4
3.2.1. MÉTODO DE IMERSÃO	5
3.3. PROCESSO SOL-GEL.....	6
3.3.1. HISTÓRICO DO MÉTODO SOL-GEL	7
3.3.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO	7
3.4. BIOVIDROS	9
3.5. CERÂMICAS DE FOSFATOS DE CÁLCIO (CPC).....	12
3.6. TITÂNIO.....	14
3.7. ESTUDO DE BIOATIVIDADE.....	16
3.7.1.1. MÉTODO DE BIOATIVIDADE (MÉTODO DE KOKUBO)	17
4. PARTE EXPERIMENTAL	19
4.1. SUBSTRATO	19
4.2. DESENVOLVIMENTO DO SOL-GEL.....	19
4.3. REVESTIMENTO.....	19
4.4. ESTUDO DA CINÉTICA DA BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i>	20
4.5. AVALIAÇÃO EM CULTURA CELULAR.....	20
4.6. ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA	21
5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÕES	22
5.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DE REFLECTÂNCIA DIFUSA (DRIFT).....	23
5.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	24
5.3. ESPECTROSCOPIA FOTOELETRÔNICA DE RAIOS X (XPS)	26
5.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	28
5.5. ANÁLISE DE RAIOS X POR ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVADE RAIOS X (EDS)	30
5.6. MICROSCOPIA DE FORÇA ATOMICA (AFM).....	31
5.7. POTENCIAL ZETA.....	32
5.8. TESTE DE ADERÊNCIA (ABNT MB 985).....	34

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DE REFLECTÂNCIA DIFUSA (DRIFT)	34
6.2. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS DE RAIOS X	37
6.3. ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X.	41
6.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DISPERSIVA EM ENERGIA (EDS)	45
6.5. DETERMINAÇÃO DAS ESPESSURAS E RUGOSIDADES DOS FILMES...	48
6.6. ANÁLISE DA ADERÊNCIA DO FILME	51
6.7. ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA.....	53
6.8. BIOATIVIDADE	55
6.9. ESTUDO DA CINÉTICA DA BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i>	55
6.9.1. ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X	60
6.9.2. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS DE RAIOS X	64
6.9.3. AVALIAÇÃO EM CULTURA CELULAR.....	68
6.9.4. ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (FA).....	69
6.9.5. AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> NAS SUPERFÍCIES DOS MATERIAIS.....	70
7. CONCLUSÃO.....	74
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda de implantes dentários e ortopédicos tem despertado o interesse científico e tecnológico, em busca de materiais com maior vida útil, de fixação rápida e menor rejeição.

O recobrimento de superfícies de implantes metálicos e cerâmicos com materiais bioativos é de grande interesse na área de biomateriais (Hench e Wilson, 1993). O recobrimento de implantes metálicos com um material bioativo agrega conteúdos tecnológicos e inúmeras vantagens comerciais ao novo material, como a possibilidade da fixação em curto prazo, o que é de grande interesse em implantes dentários. A fixação permanente de próteses possibilita a substituição de próteses cimentadas, onde fraturas no cimento podem ocorrer diminuindo a vida útil do implante (Furlong e Osborn, 1991). As modificações na superfície dos materiais, para produção de materiais mais porosos e recobertos por biomateriais, permitem o crescimento do tecido de forma a obter uma fixação implante-osso eficiente (Dávid *et al.*, 1995). A ligação com o osso, nos biovidros (BGs) está associada com a formação de uma camada de hidroxiapatita (HA) na superfície do material bioativo. A fase HA formada possui estrutura e composição equivalente à fase mineral do osso, o que proporciona a ligação interfacial (Hench, 1991). O uso de BGs em implantes pode melhorar a angiogênese, que é um processo essencial para a reparação e regeneração de tecidos, e induzir a vascularização dos tecidos em construção (Vargas *et al.*, 2013). A biocompatibilidade de implantes dentários está diretamente associada às propriedades da superfície do implante (Whitters *et al.*, 1999). Dentre as diversas propriedades de superfície, a rugosidade desempenha um papel determinante na compatibilidade implante/tecido ósseo (Parra *et al.*, 2006).

Com o processo sol-gel é possível obter materiais vítreos com alta homogeneidade e pureza. Ele pode ser realizado a temperatura ambiente, o que é um facilitador para a incorporação de antibióticos e materiais orgânicos com atividade biológica junto ao BG (Andrade e Domingues, 2006).

Estudos recentes mostram que os biovidros são utilizados em diferentes formas a fim de criar e/ou melhorar a bioatividade de implantes ósseos metálicos. Por exemplo, utilizando técnicas de oxidação as superfícies de titânio foram modificadas com biovidros e apresentaram taxas de precipitação de apatitas

carbonatas, superiores as superfícies sem tratamento (Soares et al. 2012). Em outro trabalho, nanocompósitos de biovidro são utilizados para revestir implantes de titânio, com o objetivo de aumentar a taxa de precipitação de apatitas carbonatadas na superfície dos materiais (Durgalakshmi et al. 2015). Em outros estudos utilizando compósitos de titânio e biovidro (Kaczmarek et al., 2014) e biovidro e colágeno (Quinlan et al., 2015) apresentaram resultados interessantes em termos de alternativas promissoras aos implantes ósseos já comercialmente existentes.

A proposta deste trabalho está em basadano fato de que biovidros podem ser utilizados com sucesso para recobrimento de superfícies sólidas através do processo sol-gel. Tais recobrimentos, entretanto, devem ser otimizados para que possam ser viabilizados como tratamento de superfície de implantes ortopédicos e dentários (Andrade e Domingues, 2002).

Este projeto foi desenvolvido em parceria com a empresa Peclab®, especialista em implantes dentários de titânio, a qual nos doou as peças metálicas. O método sol-gel foi então usado para produzir o BG do sistema $(\text{SiO}_2)_{0.80}(\text{P}_2\text{O}_5)_{0.04}(\text{CaO})_{0.16}$ e recobrir peças de titânio grau 2 as quais sofreram tratamento superficial anterior baseado em procedimentos conhecidos e já aplicados na indústria. Nossa proposta é verificar se após o recobrimento, as peças teriam uma resposta de bioatividade, aderência e principalmente de crescimento celular superior a aquelas dadas pelas peças sem recobrimento de biovidro.

A síntese do BG pelo método sol-gel apresenta baixa complexidade, pode ser realizada a temperatura ambiente e possibilita uma futura incorporação de materiais orgânicos tais como uma larga gama de antibióticos e antiinflamatórios.

2. OBJETIVO

Este trabalho propõe a obtenção e caracterização de recobrimentos de biovidro (BG) em peças de Titânio, grau 2, pelo método sol-gel, com propriedades estruturais projetadas para sua estabilidade química e física a fim de melhorar a interação implante-osso. Este objetivo está vinculado aos objetivos específicos a seguir:

- Recobrir as peças de titânio utilizando a técnica de imersão controlada (dipcoating) em sol-gel;
- Obter filmes finos pertencentes ao sistema $(\text{SiO}_2)_{0,80}(\text{P}_2\text{O}_5)_{0,04}(\text{CaO})_{0,16}$, utilizando a rota sol-gel;
- Obter recobrimentos (filmes de vidro bioativo) que não sejam citotóxicos, ou seja, que permitam a adesão, crescimento e proliferação celular em meio fisiológico;
- Obter materiais com superfície projetada para aplicações biomédicas;
- Caracterizar os materiais formados, no que diz respeito à estrutura e suas propriedades físico-químicas;
- Avaliar a bioatividade e biocompatibilidade, *in vitro*, dos materiais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica tem o intuito de ressaltar os principais conceitos relacionados a esse trabalho, assim como sua abrangência e importância para a química, no que diz respeito aos implantes ósseos.

3.1. FILMES FINOS

O recobrimento de uma superfície com uma camada transparente possibilita alterar as propriedades do material formado, sem com isso alterar a composição do substrato.

Pode-se definir como filme fino uma camada em que a diferença do caminho de raios de radiação visível que a atravessa não exceda a 5λ , onde λ é o comprimento de onda da radiação. A equação abaixo relaciona o índice de refração de cada material com a espessura do filme:

$$2n_1h = 5\lambda \quad (3.1)$$

Onde n_1 é o índice de refração do filme e h sua espessura. Para um comprimento de onda igual a $0,6\ \mu\text{m}$ e sendo o índice de refração da sílica $\approx 1,5$, determina-se a espessura crítica para uma camada de sílica. Assim, foi determinado que para ser considerado um filme fino a espessura deve ser igual ou inferior a $1\ \mu\text{m}$ (1000nm) (Fanderlick, 1983).

As variadas aplicações dos filmes finos estão relacionadas às suas propriedades, tais como: reflexão/transmissão óptica, dureza, adesão, porosidade, dieletricidade, resistência a ambientes corrosivos, estabilidade com respeito à temperatura e a estequiometria. Tais propriedades estão diretamente ligadas ao método de deposição, material utilizado como substrato, temperatura do substrato, taxa de deposição e pressão do ambiente de deposição (George, 1992).

3.2. TIPOS DE RECOBRIMENTO

Existem diversas técnicas de recobrimento para formação de filmes que são escolhidas de acordo com as propriedades desejadas para o material

produzido. Dentre as várias técnicas a deposição química em fase vapor (CVD), a deposição física em fase vapor (PVD), o sol-gel e a imersão são muito utilizadas (George, 1992), (Brinker e Scherer, 1990), (Rickerby e Matthews, 1991).

3.2.1. MÉTODO DE IMERSÃO

O método de imersão é rápido, eficiente e não exige grandes investimentos em termos de equipamento, pelo fato de não ser necessária a utilização de vácuo durante a deposição, características que o diferencia dos demais. Normalmente, o substrato a ser revestido é imerso em um líquido e, em seguida, retirado do banho mantendo uma determinada velocidade sob condições controladas de atmosfera e temperatura (Brinker e Scherer, 1990), (Crook, 2001). Com a parte imersa na solução, as substâncias podem atingir a superfície do substrato através de mecanismos térmicos, mecânicos ou de transporte de massa (Alves, Ronconi e Galembeck, 2002), (Blohowiak, Osborne e Krienke, 1999). Os produtos da reação podem se difundir livremente através da superfície do substrato levando a um revestimento termodinamicamente mais estável. Nessa técnica o substrato é preso a um “cantilever” adaptado a um motor que o movimenta no sentido de abaixar e suspender ao longo de um eixo vertical. O limite do movimento vertical deve ser suficiente para abaixar completamente, mantendo o substrato completamente submerso na solução do revestimento e suspendê-lo do recipiente que contém a solução. O revestimento é depositado na superfície do substrato quando o “cantilever” é abaixado, empregando uma velocidade pré-determinada. Após um breve período em que o substrato fica submerso na solução do banho (suficiente para que ocorra a reação de hidrólise), o substrato revestido é retirado empregando uma velocidade constante e pré-determinada, conforme a espessura do revestimento desejada: quanto menor se deseja a espessura do filme, mais lenta deve ser a retirada do mesmo da solução (Chen, Thompson e Boccaccini, 2006), (Brinker e Scherer, 1990).

A obtenção de um revestimento fino depende, além da velocidade de retirada, de vários fatores entre eles, da tensão superficial entre a superfície e solução, a concentração e a viscosidade da solução e a força da gravidade. Quando a viscosidade do líquido (η) e a velocidade de retirada do substrato (U) são elevadas o bastante para reduzir a curvatura do menisco, então o filme depositado

apresentando uma espessura (h), é capaz de balancear a viscosidade (proporcional a $\eta U/\rho g$)^{1/2} e a força de gravidade (ρgh):

$$h = c_1(\eta U/\rho g)^{1/2} \quad (3.2)$$

Onde a constante de proporcionalidade, c_1 , apresenta um valor aproximado de 0,8 para líquidos Newtonianos (Brinker e Scherer, 1990). Quando, ao contrário, a velocidade de retirada do substrato e a viscosidade não são elevadas o bastante, esse balanço é regulado pela razão da viscosidade no momento da retirada do material da solução e a tensão superficial líquido-vapor (γ_{LV}) (Cerro, 2013):

$$h = 0,94(\eta U/\gamma_{LV})^{1/6}(\eta U/\rho g)^{1/2} \quad (3.3)$$

Outro fator bastante influente na estrutura do filme a ser depositado é o precursor utilizado. As espécies poliméricas diluídas constituem o banho de revestimento, concentram-se na superfície do substrato devido à drenagem gravitacional que é acompanhada pela evaporação e condensação. A concentração da solução é aumentada de um fator de 20 a 30 fazendo com que as partículas dos precursores se aproximem (Brinker e Scherer, 1990). Durante a formação do revestimento, ou seja, durante a etapa de evaporação do solvente, o vapor de água se difunde a partir da atmosfera em direção à camada depositada mantendo as condições para que as reações de hidrólise continuem ocorrendo. Ao mesmo tempo, as reações de policondensação prosseguem até que seja formada uma camada de óxido a elevada temperatura. Essa difusão controlada no processo sol-gel favorece a formação de camadas finas em detrimento de estruturas maciças.

3.3. PROCESSO SOL-GEL

A técnica sol-gel é baseada em reações de hidrólise e condensação, a baixas temperaturas, e com ela possível obter materiais com características mecânicas, ópticas e térmicas específicas, dentre outras (Betz e Hintze-Buning, 2002), (Pugh *et al.*, 2003), (Arfsten *et al.*, 2003). Esse método permite a utilização de rotas diferentes, alcoóxido ou coloidal, formação de um material com elevada

pureza. Proporciona o recobrimento de grandes superfícies por filmes com espessuras que podem variar de nanômetros a alguns milímetros, além dos baixos custos nas instalações (Hench, 1991), (Rigo *et al.*, 2004).

3.3.1. HISTÓRICO DO MÉTODO SOL-GEL

Os estudos sobre géis a base de sílica já são conhecidos desde 1845, onde se percebeu que a hidrólise do tetraetilortosilicato (TEOS), em meio ácido, produzia sílica sob a forma de um material vítreo (Brinker e Scherer, 1990). Entretanto, essa tecnologia só foi aplicada industrialmente em 1940, por meio da primeira concessão de patente, concedida a empresa alemã Jenaer Glaswer Schott &Gen, para a obtenção de filmes de silicato (Brinker e Scherer, 1990). Os primeiros espelhos e retrovisores revestidos pelo processo sol-gel surgiram nas décadas de 1950 e 1960. Na década seguinte, foram obtidas fibras ópticas utilizando a técnica (Hench e Wilson, 1993), (Brinker e Scherer, 1990).

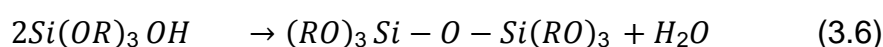
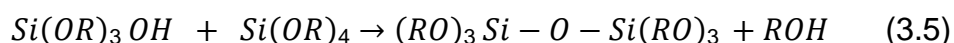
Nos anos 80, a obtenção de materiais híbridos, orgânico-inorgânicos, nos quais um polímero orgânico encontra-se covalentemente ligado à estrutura de um composto inorgânico (por exemplo, a sílica), fomentou ainda mais a utilização do método. Inicialmente, esse material recebeu o nome de Ormosils (organically modified sílicates) e, posteriormente, passou a ser conhecido por Ormocers (organically modified ceramics).

Na década de 1990 surgiram os biossensores, largamente aplicados, no campo da medicina, na identificação e quantificação de metabólitos de forma rápida e segura, mesmo em concentrações baixas (Alfaya e Kubota, 2002). A capacidade de, com esse método, produzir diferentes materiais, com diferentes formas, tendo controle do processo, além das baixas temperaturas aplicadas e o baixo custo, fizeram do processo sol-gel uma técnica amplamente utilizada, versátil e que vem sendo cada vez mais utilizada.

3.3.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

O processo sol-gel baseia-se na transformação de um sol, em um material poroso que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios, conhecido como gel. As reações de hidrólise e condensação fundamentam esse processo. E pode

ser esquematizado pela rota reacional descrita abaixo pelas reações de hidrólise (reação 3.4) e condensação (alcoólica, reação 3.5 e, aquosa, reação 3.6), onde, R representa um grupo alquila (C_nH_{2n+1}), geralmente CH_3 , C_2H_5 ou C_3H_7 , M representa um metal tal como silício, alumínio ou titânio e $M(OR)_z$ o alcoóxido metálico, utilizado como precursor, embora sais metálicos inorgânicos possam também ser usados (BRINKER, 1990; ALFAYA, 2002).



Durante a reação de hidrólise ocorre a substituição do grupo alcoóxido pelo grupamento hidroxila (OH), seguido das reações de condensação, que envolvendo o grupo silanol, produz ligações siloxanas (Si-O-Si), além do subproduto álcool (ROH) ou água (Brinker e Scherer, 1990), (Corriu e Leclercq, 1996). O sol é obtido a partir da mistura física dos precursores (alcoóxidos ou sais) como fonte de cátions, que em presença de água, são agentes de hidrólise; um catalisador (ácido ou básico); e, às vezes, na presença de solventes para a homogeneização no estágio inicial. Uma característica importante do sol é sua baixa viscosidade que permite que o mesmo seja vazado em moldes com a geometria do produto final (Hench, 1991), (Rigo *et al.*, 2004).

As variações nos parâmetros de síntese podem causar modificações na estrutura e nas propriedades dos géis formados. Pode-se destacar entre os parâmetros: o precursor, a razão molar $H_2O:Si$, o tipo e a concentração do catalisador, o solvente utilizado, a temperatura e a pressão (Brinker e Scherer, 1990). A hidrólise ocorre por meio de uma reação nucleofílica do átomo de oxigênio da água com o átomo de silício, produzindo um álcool e uma molécula hidrolisada do alcoóxido de silício, independente do catalisador utilizado.

Estudos de ressonância magnética nuclear do ^{29}Si têm demonstrado que são formados produtos como monômeros, dímeros, trímeros lineares, trímeros cíclicos, tetrâmeros cíclicos e outros anéis de ordens superiores (Brinker e Scherer, 1990).

3.4. BIOVIDROS

O termo bioativo é dado a um “material capaz de eliciar uma resposta específica na interface do material, resultando na formação de uma ligação entre este e o tecido circundante”. Esses materiais foram bastante estudados ao longo de décadas (De Aza *et al.*, 2007). A utilização de materiais cerâmicos para a ortodontia teve seu início na década de 1940 e foram de grande interesse devido as suas vantagens como resistência ao desgaste e compressão, isolamento térmico, entre outras (Hench, 1991). A necessidade de reconstruções dos tecidos ósseos permitiu o avanço e o aprimoramento técnico do estudo de biomateriais que pudessem substituir ou aperfeiçoar os processos tradicionais. Os biomateriais sintéticos, como os fosfatos de cálcio, apresentam propriedades físico-químicas controladas, sendo uma alternativa para a regeneração óssea. Estes materiais devem garantir a formação de ligações estáveis com o osso neoformado, ao longo do tempo. As hidroxiapatitas (HA), o trifosfato de cálcio e os biovidros são exemplos desta classe de materiais (Dorozhkin, Sergey V., 2010), (Ducheyne e Qiu, 1999). Inicialmente, na área da ortopedia e ortodontia eram utilizadas cerâmicas de hidroxiapatita [$\text{HA} - \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], o fosfato de cálcio bifásico (BCP) e o tricálcio de fosfato (TCP) (Ducheyne e Qiu, 1999), (Emadi, Roohani Esfahani e Tavangarian, 2010), (Nezafati *et al.*, 2011). Estes biomateriais detêm propriedades interessantes, tais como:

- Biocompatibilidade, uma vez que possuem uma elevada semelhança química e estrutural com o osso;
- Bioinertes;
- Formam estruturas porosas, facilitam as infiltrações de células favorecendo o crescimento do tecido ósseo.

No entanto, os mesmos possuem várias desvantagens que impossibilitavam a sua utilização designadamente: a fragilidade, a dificuldade de moldar (Xu *et al.*, 2006). Embora a HA seja muito semelhante à fase mineral do osso, é difícil controlar a degradação do material (Charrière, Lemaitre e Zysset, 2003). Com isto, foram necessários estudos para o desenvolvimento de um novo biomaterial com características mais apropriadas (Charrière, Lemaitre e Zysset, 2003), (Xu, Burguera e Carey, 2007), (Liu *et al.*, 2008).

No final da década de 1960, um novo material proporcionou mudanças significativas no conceito das aplicações das biocerâmicas, os vidros bioativos. Um dos exemplos é o Bioglass 45S5®, vidro quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, Figura 1, que tem despertado grande interesse devido às características que este acarreta na regeneração óssea.

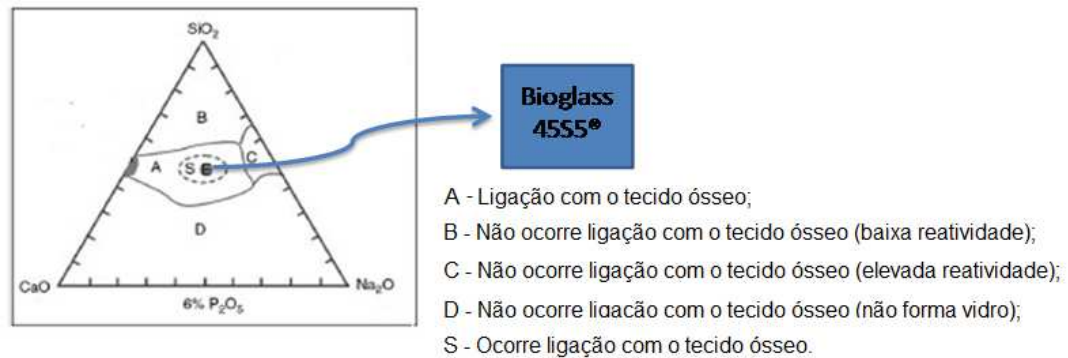


Figura 1 - Localização do Bioglass 45S5® no diagrama de Hench que relaciona a composição com a bioatividade.

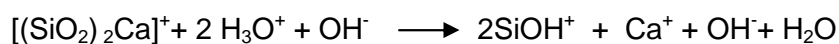
O tecido ósseo é constituído por dois tipos de estruturas ósseas: o osso trabecular, no qual reside um elevado número de células por volume na sua superfície, o que determina a atividade metabólica e que permite cerca de 80% para a sua remodelação, devido à sua elevada porosidade; e o osso cortical que não possui tanta atividade, mas oferece resistência ao osso de modo a reduzir o número de fraturas, uma vez que possui uma reduzida porosidade. Como o Bioglass 45S5® possui capacidade de promover uma ligação química com o tecido ósseo, apresenta algumas analogias com o osso trabecular. Com o seu desenvolvimento nasceu o conceito de bioatividade e acelerou-se toda a investigação no campo dos materiais para implantes ósseos (Chen, Thompson e Boccaccini, 2006), (Hench, 2006), (Cannillo e Sola, 2009), (Bellucci, Cannillo e Sola, 2010). Na superfície dos biovidros, quando expostos a fluidos corporais, ocorrem reações químicas originando uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC). São amplamente estudados devido a sua capacidade de osteointegração (Hench, 2006). A literatura (Oréfice, Hench e Brennan, 2000; Hench, 2006) esclarece que a base para a ligação entre o osso e o vidro bioativo é a reatividade química desse vidro na presença de fluidos fisiológicos. Esta reação promove a formação de uma camada superficial de

hidroxiapatita, a qual o osso se une. Esse processo ocorre de forma sequencial. O primeiro passo caracteriza-se pela liberação de elementos alcalinos ou alcalinos terrosos, pela troca catiônica com H_3O^+ . A troca iônica é relativamente simples uma vez que os cátions não fazem parte da estrutura vítrea, mas, modificam a estrutura pela formação de ligações de oxigênio não ligado. O segundo passo (dissolução) se passa por meio da quebra da ligação Si-O-Si devido à ação dos íons hidroxila (OH^-). Essa quebra de ligação libera a sílica para a solução sob a forma de ácido silícico $[Si(OH)_4]$, cuja taxa de dissolução é fortemente dependente da composição vítrea. A sílica hidratada formada na superfície do vidro se rearranja pela polimerização de grupos silanol, levando a formação de uma camada rica em sílica, posteriormente ocorre à precipitação. Durante a precipitação os íons de cálcio e fósforo liberados do vidro, além daqueles presentes na solução fisiológica, formam na superfície uma camada amorfa rica em cálcio-fosfato (α -CaP). Posteriormente, essa camada amorfa se cristaliza formando a estrutura da hidroxiapatita carbonatada (HCA) através da incorporação, no interior da fase amorfa (α -CaP), dos ânions carbonatos presentes na solução.

Desta forma é possível resumir a reatividade superficial do vidro bioativo, além das várias reações interfaciais que ocorrem entre o vidro bioativo e a superfície do tecido, em cinco estágios descritos abaixo (Gerhardt e Boccaccini, 2010), (Bellucci *et al.*, 2011), (Newby *et al.*, 2011)

1º estágio

Uma rápida troca iônica entre os íons Ca^+ (presentes no vidro) com H_3O^+ , presentes na solução do fluido:



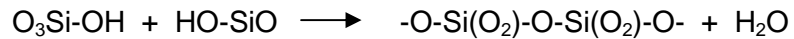
2º estágio

Perda da sílica solúvel sob a forma de $Si(OH)$ para a solução, devido a quebra da ligação Si-O-Si e formação de silanol ($SiOH$) na interface da solução vítrea.



3º estágio

Condensação e polimerização da camada rica em SiO₂ na superfície.



4º estágio

Migração dos grupos Ca²⁺ e PO₄³⁻, provenientes do biovidro, para a superfície, formando um filme rico em CaO-P₂O₅, seguido do crescimento do filme de fosfato de cálcio, oriundo dos íons Ca²⁺ e PO₄³⁻ presentes na solução.

5º estágio

Cristalização do filme amorfo de CaO-P₂O₅ pela incorporação dos ânions OH⁻ ou CO₃²⁻, presentes na solução, para formar uma camada mista de hidroxila e carbonato.

Há uma gama de composições de biovidros, vitrocerâmicas e cerâmicas da família dos fosfatos de cálcio bioativos (Kokubo, 2008). Dentre as quais, está o sistema (SiO₂)_{0.80}(P₂O₅)_{0.04}(CaO)_{0.16}. Sua síntese pode ser catalisada por ácido, e tendo como precursor majoritário o tetraetilortosilicato (TEOS), cujo processo de síntese é realizado à temperatura ambiente. Obtém-se um material com elevada porosidade, o que permite uma maior atividade metabólica (Andrade e Domingues, 2006).

3.5. CERÂMICAS DE FOSFATOS DE CÁLCIO (CPC)

As cerâmicas de fosfatos de cálcio se destacam entre as biocerâmicas por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações, e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro (Kawachi e Tamao, 2000). Essas características podem ser elucidadas pela natureza química desses materiais que, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, apresentam uma participação ativa no equilíbrio iônico entre o fluido e a cerâmica. Uma forma conveniente de classificar os vários fosfatos de cálcio é através de sua razão molar Ca/P, conforme mostrado pela Tabela 1. A HA é a forma termodinamicamente mais estável do fosfato de cálcio e é obtida a partir de

soluções supersaturadas. Entretanto, sua precipitação geralmente é precedida pela formação de pelo menos uma fase precursora. A ordem pela qual eles precipitam obedece a lei de Ostwald e suas quantidades e as etapas de reação são fortemente dependentes da temperatura, pH, supersaturação, a presença de sementes de cristais ou mesmo, inibidores (Dorozhkin, Sergey V., 2010). Ela é estável em presença de fluidos fisiológicos e apresenta uma grande bioatividade devido à sua facilidade de integração com osso. Além disso, apresenta uma estrutura cristalográfica definida, pertencendo ao sistema hexagonal, grupo espacial $P6_3/m$. Sua célula unitária ($a=b=9,42\text{\AA}$ e $c=6,88\text{\AA}$) contém a representação completa do cristal apatita, que consiste de grupos Ca, PO_4 e OH fortemente compactados. Ela pode ser sintetizada sob a forma densa ou porosa, com diâmetros de poros tão grandes quanto $500\text{ }\mu\text{m}$ (Oréfice, Hench e Brennan, 2000). A HA pode ser obtida variando-se a razão de Ca/P e apresenta vantagens e desvantagens em relação ao seu uso como biomaterial.

Tabela 1 - Classificação de fosfatos de cálcio por razões entre o Ca/P.

Nome	Sigla	Fórmula	Ca/P
Monocálciofosfato monohidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5
Monocálcio fosfato anidro	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5
Dicálcio fosfato di-hidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Dicálcio fosfato anidro	DCPA	CaHPO_4	1,0
Fosfato octacálcio	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
α -Fosfato tricálcico	α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
β -Fosfato tricálcico	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato de cálcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,2 a 2,2
Hidroxiapatita deficiente em cálcio	CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	1,5 a 2,0
Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato tetracálcio	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$	1,67
			2,0

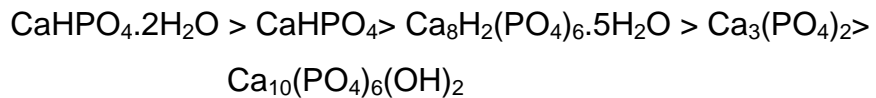
Fonte: Adaptado de (Dorozhkin, S. V., 2010)

Entre as vantagens de seu uso como biomaterial, diversos autores mencionam:

- Elevada porosidade, que aumenta a área superficial, resultando em uma significativa integração entre o tecido vivo e o implante;
- Poros interconectados, permitindo o crescimento do tecido no seu interior, levando a uma fixação segura do implante;
- Porosidade interconectada, permitindo a organização nos canais vasculares facilitando o suprimento de sangue e nutrição para o osso;
- Similaridade com o osso humano

Entre as principais desvantagens, são conhecidas:

- Baixa resistência à tração e à fadiga, razão pela qual, seu uso tem se restringido a implantes em locais onde a tensão mecânica é reduzida ou, onde apenas existe a tensão de compressão;
- Lenta biodegradação. A taxa de degradação das CPC, de forma genérica, segue a ordem de velocidade a seguir:



3.6. TITÂNIO

O titânio é um material bioinerte, ou seja, é indiferente às funções vitais do organismo e não é tóxico, o que faz dele um material biocompatível. Devido a seu módulo de elasticidade baixo (~100 GPa), é utilizado em implantes ósseos por promover uma melhor transferência mecânica, altos valores de resistência a fadiga, fácil usinagem e resistência à corrosão, características que fazem do titânio um importante, e muito utilizado, material para implantes dentários, ortopédicos e de articulações, Figura 2, (Popa *et al.*, 2010), (Lilja, 2011). Algumas destas propriedades podem ser melhoradas utilizando-se filmes de óxidos de Ti na superfície do Ti e suas ligas ou filmes de outros materiais, modificando-se a superfície do Ti por métodos físicos e químicos (Hanawa, 1999), (Sul, Johansson e Jeong, 2001). Tecnologias de modificação de superfície do Ti e suas ligas incluem tratamento mecânico, pulverização térmica, sol-gel, tratamento químico e eletroquímico, a implantação de íons, entre outros (Sul, Johansson e Jeong, 2001), (Grigal *et al.*, 2012).

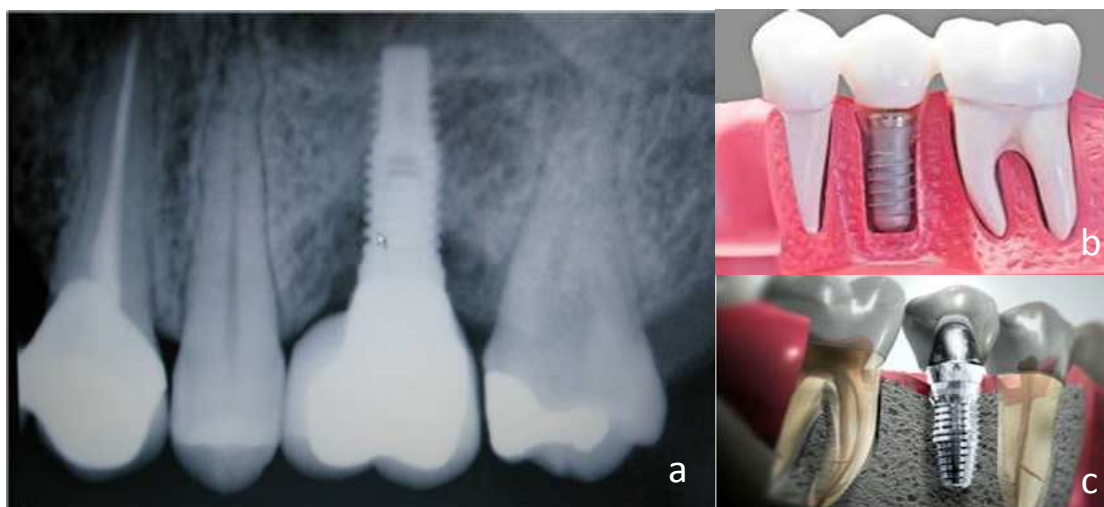


Figura 2 - Exemplo de aplicação biomédica do titânio, Radiografia (a) e representações esquemáticas (b-c) de implantes dentários de titânio.

O titânio possui duas formas cristalográficas, a temperatura ambiente, hexagonal compactada (hcp), que corresponde à estrutura cristalina da fase alfa (α), acima da temperatura de 883°C o titânio passa para forma cúbica de corpo centrado (ccc) conhecida como fase beta (β) (Callister, 2001). A biocompatibilidade do titânio está intimamente relacionada às propriedades da camada superficial de seu óxido, em termos da sua estrutura, morfologia e composição. O óxido de titânio TiO_2 existe em três fases alotrópicas naturais, Figura 3:

- Rutilo (tetragonal, grupo espacial D_{4h}^{14} (P_{42}/mnm));
- Broquita (ortorrômbica, grupo espacial D_{2h}^{15} ($Pbca$));
- Anatásio (tetragonal, grupo espacial D_{4h}^{19} (I_{41}/amd)).

A fase rutilo (RUT) é a única fase estável, enquanto as fases anatásio (ANA) e broquita (BRO) são metaestáveis em qualquer temperatura. O anatásio é cineticamente estável a temperaturas mais baixas, mas se converte em rutilo em temperaturas entre 600°C a 800°C (Balachandran e Eror, 1982), (Feltrin, 2013).

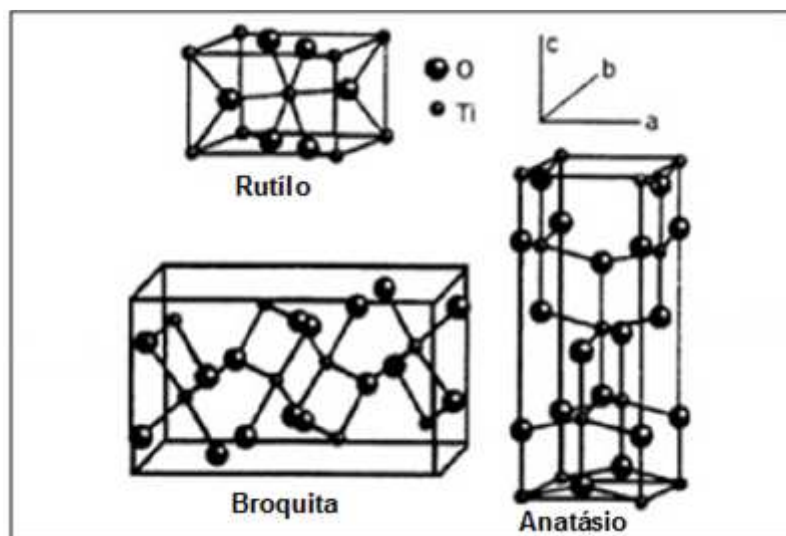


Figura 3 - Fase do TiO_2 : Rutilo, Anatásio e Broquita.

A razão para a resistência a corrosão do Ti é que quando exposto ao ar, ele é revestido por uma fina camada, da ordem de dezenas de nanômetros, de óxido de titânio amorfo e não estequiométrico. Esta camada tem se mostrado essencial para a resposta de corpo inerte, pois o óxido faz uma interface entre o sistema biológico e o material de implante (Lindberg *et al.*, 2008), (Born *et al.*, 1998), (Games *et al.*, 2012). A camada de óxido funciona como uma barreira impedindo que íons metálicos oriundos do interior do metal sejam liberados para o meio biológico e, sempre que danificada, a camada de óxido é reconstituída num intervalo de tempo muito curto (milissegundos) quando está em contato com um meio oxidante, como o fluido corpóreo (Velten, Eisenbarth e Schanne, 2004). Por causa disso, o tecido vivo em torno do implante fica sempre em contato com a superfície da camada de óxido e não com o substrato de Ti. Entretanto, ainda assim, existem vários pontos fracos na camada de óxido natural que permitem a entrada de íons corrosivos, o que provoca a degradação do material (Santos Jr., Kuromoto e Soares, 2007), (Minagar *et al.*, 2012).

3.7. ESTUDO DE BIOATIVIDADE

A bioatividade dos vidros é atribuída à formação de uma camada policristalina de aglomerados de HA na superfície do biovidro num ambiente fisiológico, sendo esta influenciada pela composição do biomaterial e pela sua área de superfície. HA é quimicamente e estruturalmente semelhante ao mineral fosfato

de cálcio presente no tecido ósseo humano, por conseguinte, os osteoblastos conseguem proliferar na camada de HA, propiciando a formação de um forte vínculo no osso circundante. A bioatividade é testada *in vitro* para investigar a capacidade do biomaterial de formar uma camada de HA quando embebida num fluido biológico simulado, do termo em inglês: “simulated blood fluid” (SBF) - solução acelular com concentração de íons inorgânicos semelhante ao plasma (Vitale-Brovarone *et al.*, 2008), (Saboori *et al.*, 2009), (Chen, Mohn e Stark, 2011), (Doostmohammadi *et al.*, 2011), (Vitale-Brovarone *et al.*, 2012).

Como cada material bioativo tem características particulares, é de se esperar que cada um tenha índices de bioatividade distintos. Contudo, sabe-se que a bioatividade é limitada pela composição (Rahaman *et al.*, 2011).

Cada íon, em determinadas concentrações e taxas de liberação, levam à concepção de vidros bioativos que podem exercer funções tanto na regulação óssea como no controle genético sobre o ciclo celular e impulsionar uma rápida expressão de genes que regulam a osteogênese, e a produção de fatores de crescimento (Gorustovich, Roether e al., 2009), (Vitale-Brovarone, 2011), (Hoppe, Guldal e Boccaccini, 2011).

Entretanto, é importante lembrar que a resposta celular não depende unicamente da composição química, mas também de outras características como a rugosidade da superfície, porosidade do filme (Vitale-Brovarone *et al.*, 2012).

3.7.1.1. MÉTODO DE BIOATIVIDADE (MÉTODO DE KOKUBO)

Kokubo *et al.* elaboraram uma solução tampão de concentração iônica muito semelhante ao plasma, designada de SBF, cuja composição está descrita na Tabela 2, que visa o estudo das propriedades bioativas dos biomateriais. O grau de bioatividade é classificado segundo o tempo necessário para que ocorra o aparecimento da camada de HCA. Assim, quanto maior for a bioatividade, menor será o tempo de interação entre a interface matriz/tecido ósseo, o que permitirá alcançar uma maior força de adesão entre esta e, por conseguinte, alcançar valores superiores de propriedades mecânicas (Vitale-Brovarone *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Composição da solução de SBF

Reagente		Quantidade / g/L
NaCl	Cloreto de sódio	8,035
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio	0,355
KCl	Cloreto de potássio	0,225
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	Potássio fosfato bibásico	0,231
MgCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de magnésio	0,311
HCl 1mol/L	Ácido clorídrico	1,424
CaCl ₂	Cloreto de cálcio	0,292
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio	0,072
C ₄ H ₁₁ NO ₃	Tris - (hidroximetil) amino metano	6,118

Fonte: (Kokubo e Tacadama, 2006).

Quando a amostra se encontra submersa em SBF, ocorrem os fenômenos de lixiviação de íons envolvendo a troca de cátions monovalentes, íons de sódio ou potássio a partir do biovidro com os íons H₃O⁺ da solução, conduzindo ao aumento do valor de pH. Sabe-se que os osteoblastos preferem um meio ligeiramente alcalino, mas também é conhecido, que variações drásticas no pH inibem a atividade dos osteoblastos, podendo originar necrose celular ou apoptose (Vitale-Brovarone *et al.*, 2007). Por isso, a escolha de biovidro, torna-se mais plausível, pois este material possui uma composição com baixo teor de óxidos monovalentes e um conteúdo elevado de pentóxido que nos permitirá manter valores de pH mais ou menos constantes na região alcalina (Kokubo e Takadama, 2006), (Varila *et al.*, 2012).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. SUBSTRATO

As peças de titânio, grau 2, de 8 e 4mm de diâmetro, foram tratadas pela empresa PecLab®, seguindo o mesmo procedimento dos materiais de titânio para implantes comercializados por esta. O processo cujo know how é da empresa, inclui o jateamento das peças com alumina e a limpeza com solução de ácido nítrico e ácido fluorídrico, seguindo a norma ASTM B600, a fim de chegar à rugosidade desejada. Após esse processo, as peças foram lavadas com água destilada dez vezes, para a remoção de resíduos, em seguida, lavadas cinco vezes com acetona.

4.2. DESENVOLVIMENTO DO SOL-GEL

O sistema $(\text{SiO}_2)_{0,80}(\text{P}_2\text{O}_5)_{0,04}(\text{CaO})_{0,16}$ foi sintetizado pela hidrólise do tetraetilortossilicato (TEOS), e trifetilfosfato (PACK) e do $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, catalisada por ácido, a temperatura entre 24 e 26°C e com umidade relativa inferior a 59%.

Para formação do biovidro, foram adicionados a uma solução alcoólica, catalisado por ácido, em pH 1,5, o TEOS, o PACK, o $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e, em intervalos de quinze minutos, em constante agitação. Após a completa solubilização do sal hidratado, a solução foi agitada por mais dez minutos segundo Domingues e col. (Domingues, 2001).

4.3. REVESTIMENTO

Todos os substratos foram revestidos com a solução obtida através da rota sol-gel, conforme definido anteriormente, utilizando a técnica de imersão. Foi utilizando o equipamento DIP-MMLQ, capaz de manter o ângulo constante entre as peças de titânio e o sol com velocidade constante.

A velocidade de retirada do substrato revestido da solução é importante na determinação da espessura do filme depositado. Quanto mais lenta ela for, mais tempo o material volátil presente nessa solução terá para evaporar e, por consequência, mais fino será o filme. Assim, quanto menor for a velocidade de imersão da amostra, mais fino será o filme e maior a probabilidade de se manter as

características morfológicas do substrato. Por esse motivo, foi empregada a velocidade de retirada do substrato do banho de imersão de $1,05 (\pm 0,02) \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$. O ângulo de imersão e retirada foi de 90° , de modo a obter um filme de espessura homogênea nas superfícies da amostra. Após o processo de imersão, as peças foram expostas ao ar por cerca de 30 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram separadas em dois grupos com diferentes tratamentos térmicos, sendo todos aerados. O primeiro grupo (BGTi37) foi seco a vácuo, à 37°C , por 10 dias. O segundo grupo (BGTi600) foi aquecido a 600°C por 5 horas. O processo de imersão foi realizado no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, CDTN, realizado sob orientação da professora Clascídea Aparecida Furtado.

4.4. ESTUDO DA CINÉTICA DA BIOATIVIDADE *in vitro*.

A cinética de bioatividade *in vitro* dos materiais, adaptado de Domingues e col., foi examinada em termos da camada de apatita carbonatada (AC) formada sobre superfície dos materiais imersos em uma solução de fluido biológico simulado (SBF) sendo os tempos de imersão em SBF de 7, 24 e 160 horas (Domingues, Clark e Brennan, 2001).

Os materiais e o substrato submetidos à análise de DRIFT, tendo assim obtidos, para cada um, em cada um dos tempos imersos em SBF, os respectivos espectros vibracionais, Figura 25.

A cinética de formação de AC em solução SBF foi avaliada através das representações gráficas semi-quantitativas da relação entre a intensidade (I_a) da banda de vibração em 560 cm^{-1} , correspondente a AC (P-O), e a intensidade (I_b) correspondente a sílica (Si-O) em 460 cm^{-1} , e entre a intensidade (I_a) e a (I_c) referente da banda de vibração Ti-O-Ti em 667 cm^{-1} , ambas em função do tempo. Os resultados são expressos com o valor: (média \pm o erro padrão da média da relação da intensidade I_a/I_b e I_a/I_c).

4.5. AVALIAÇÃO EM CULTURA CELULAR.

A viabilidade e proliferação das células, realizadas no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, foram mensuradas pelo ensaio de MTT, baseado em

um método colorimétrico que avalia a capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis, em converter o sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium, solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água (Mosmann, 1983). Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade óptica pode ser determinada pelo espectrofotômetro a $\lambda=595\text{nm}$. O número de células viáveis é diretamente proporcional a quantidade de cristais de formazan produzido.

As células, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB, foram semeadas em placas de 96 poços, em poços contendo os biomateriais em teste ou na sua ausência, como controle positivo e negativo, na densidade de 5×10^4 células/poço contendo 100 μL do meio de cultura basal. As células foram incubadas a 37°C , atmosfera úmida e 5% CO_2 por 72 horas.

Ao término do período de incubação, o meio de cultura foi retirado e descartado e 105 μL / poço do meio de cultura basal foram adicionados. Em seguida, foram acrescentados 85 μL / poço de solução de MTT (invitrogen) (5mg/mL) e a placa incubada em estufa a 37°C , atmosfera úmida e 5% CO_2 , por 2 horas. As células foram observadas ao microscópio óptico - OLYMPUS IX70 para visualização dos cristais de formazan. Depois estes foram solubilizados através da adição de 55 μL /poço de uma solução de SDS 10%-HCl (ácido clorídrico 0,01 M - 10% de dodecil sulfato de sódio em água) seguido de incubação em estufa à 37°C , atmosfera úmida e 5% CO_2 , por 18 horas.

Transferiu-se 100 μL de cada poço o para outra placa de 96 poços (fundo reto), em triplicata, e a densidade óptica foi mensurada no espectrofotômetro a 595nm. Durante o experimento, todos os passos envolvendo o reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni e expressos como média \pm EMP (Mosmann, 1983). Esse teste foi realizado no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob orientação do professor Alfredo Góes.

4.6. ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

A atividade da fosfatase, realizadas no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, alcalina foi avaliada através do ensaio de BCIP-NBT, da marca Gibco®. Este ensaio é baseado na reação cromogênica decorrente da clivagem de um

grupamento fosfato do BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina) pela fosfatase alcalina produzida pelas células. Essa reação produz um próton que reduz o NBT (nitro tetrazólio clorídrico), formando um precipitado insolúvel de cor púrpura (Valerio *et al.*, 2004).

As células, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB, foram semeadas em placas de 96 poços, contendo os biomateriais em teste ou na sua ausência, como controles de viabilidade e controle de morte, na densidade de 5×10^4 células/poço contendo 100 μ L do meio de cultura basal. Em seguida, foram incubadas à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 72 horas.

Ao término do período de incubação, o meio de cultura foi retirado e descartado, as células foram lavadas com PBS 0,15M, pH 7,4 e incubadas com 100 μ L/poço da solução de BCIP-NBT (preparada de acordo com as instruções do fabricante) à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas. Após o período de incubação observou-se a formação dos precipitados púrpura em microscópio óptico - OLYMPUS IX70. Em seguida, foram adicionados 55 μ L / poço de SDS 10% - HCl para a solubilização dos precipitados púrpura, e as placas foram incubadas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Transferiu-se 100 μ L de cada poço, em triplicata, para outra placa de 96 poços (fundo reto) e a densidade óptica foi medida no espectrofotômetro a 595 nm. Durante o experimento, todos os passos envolvendo os reagentes foram executados em condições de mínima luminosidade.

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste ANOVA one-way seguido pelo teste de Bonferroni e expressos como média \pm SD (Mosmann, 1983). Esses testes foram realizados no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob orientação do professor Alfredo Góes.

5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Após o processo de síntese, os materiais produzidos foram analisados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho por reflectância difusa (DRIFT), espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS), difração de raios X (DRX), medida de potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de força atômica (AFM) e análise de raios X por espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

5.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DE REFLECTÂNCIA DIFUSA (DRIFT)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier é uma técnica analítica bastante útil na identificação de grupos funcionais devido às análises das bandas de absorção química provocadas pela absorção da radiação pela amostra. Todavia, é importante esclarecer que para que ocorra a absorção da radiação na região do infravermelho, a molécula deve sofrer uma mudança no seu momento de dipolo, como resultado de suas frequências de vibração de ligações dos compostos orgânicos e minerais. As moléculas movimentação vibracional ou rotacional. Essa espectroscopia permite analisar as interagem com a radiação eletromagnética, especialmente na faixa do infravermelho, absorvendo a energia que por sua vez, é transformada em vibrações e/ou rotações molecular (Fuller e Griffiths, 1978).

Para a aplicação em superfícies sólidas, podem ser utilizadas três técnicas diferentes de espectroscopia: refletância especular, refletância difusa e espectroscopia refletância-absorção. A refletância especular é empregada em amostras planas, superfícies limpas e os espectros são rapidamente obtidos para amostras pequenas com ângulos de incidência de 15° a 75°. A refletância difusa é normalmente obtida a partir de superfícies rugosas ou a partir de superfícies formadas por material em pó. O espectro da reflectância, normalmente conhecido como espectro de refletância-absorção, é facilmente obtido a partir de superfícies revestidas com filmes finos da ordem de 0,2 a 20 μm .

Na refletância difusa, a luz incide em uma matriz descontínua, penetra na amostra (amostras do tipo pó, sólido, placa ou filme) e reflete trazendo informações espectrais. O caminho percorrido pela luz no interior da matriz pode ser considerado aleatório devido a múltiplas reflexões, desta forma, a luz refletida pode ser atenuada por absorção e o espectro resultante é similar ao obtido através da técnica no infravermelho por transmissão utilizando KBr. Uma importante diferença entre a transmissão e a refletância se dá devido ao diferente caminho óptico percorrido pela luz. Enquanto que na transmissão o caminho óptico é constante para todo número de onda, na refletância por sua vez, o caminho pode ser variável. Num experimento de refletância difusa será também observado a reflexão especular,

sendo mais importante àquela que ocorre na interface ar/superfície da matriz, mas também ocorrendo nas faces das partículas, mas cujo efeito pode ser minimizado pela redução do tamanho da partícula (Ferrão, 2001), (Olinger e Griffiths, 1993a.), (Pasikatan *et al.*, 2001).

Para esse trabalho, as medidas de espectroscopia de absorção na região de infravermelho por transformada de Fourier de reflectância difusa foram realizadas na região de 4000 - 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 128 scans, utilizando o equipamento com transformada de Fourier Bruker e acessório de reflectância difusa, disponível no Departamento de Química da UFMG.

5.2. DIFRAÇÃO DE RAIOSX

Materiais com estrutura cristalina definida possuem ordem de longo alcance, enquanto os amorfos não a possuem, sendo a ordem apenas de curto alcance. No entanto, o limite entre a fase cristalina e amorfa nem sempre é bem definido. A estrutura de um cristal é uma característica intrínseca do material, mas, também pode estar sujeita a influência das condições de crescimento cristalino (Mahan e Myers, 1995.).

Ao incidirem um material, os raios X podem ser espalhados elasticamente, pelos elétrons dos átomos que compõe a estrutura desse material. O fóton de raios X, após colidir com um elétron, muda sua trajetória mantendo, porém, a mesma fase e o comprimento de onda do fóton incidente. De acordo com a óptica física, pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida; assim, cada elétron atua como um centro de emissão de raios X. Se os átomos que geram este espalhamento estiverem arrançados de maneira ordenada, como em uma estrutura cristalina, apresentando entre eles distâncias próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente, os raios X espalhados podem interferir construtiva ou destrutivamente dando origem a um padrão de difração. Considerando-se dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as condições para que ocorra a difração de raios X irão depender da diferença de caminho percorrida pelos raios X e do comprimento da onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela Lei de Brag:

$$2d\text{sen}\theta = n\lambda \quad (4.1)$$

Onde $n = 1, 2, 3, \dots$, λ , é comprimento de onda dos raios X em Angstrom (\AA); d é distância interplanar; θ é o ângulo de incidência ou reflexão do feixe incidente.

A razão pela qual um único plano de átomos reflete a onda incidente de modo mais eficiente quando o ângulo de incidência é igual ao ângulo de reflexão, é uma consequência do espaçamento regular dos átomos no plano. A equação de Bragg, que mostra que o fato das reflexões vindas de planos paralelos das redes cristalinas reforçarem entre si resulta do espaçamento interplanar uniforme. Se o arranjo dos átomos nos planos ou o espaçamento entre planos paralelos torna-se irregular, não se observa padrões de difração bem definidos (Mahan e Myers, 1995). A profundidade de penetração do feixe de raios X, quando é utilizada a geometria de Bragg, que testa esquematizada na Figura 4, pode chegar a dezenas de micrômetros, para metais (de Souza, 2010).

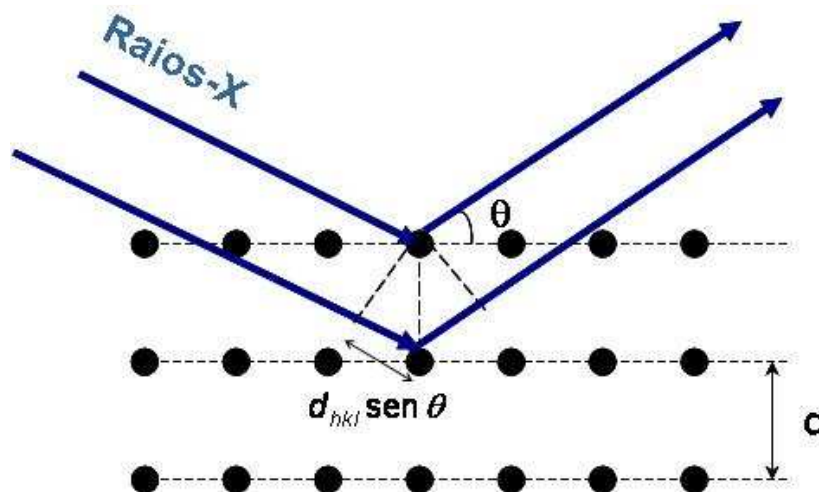


Figura 4 - Esquema da difração de Bragg

Portanto, esta geometria não é adequada para a análise de filmes finos, o que corresponde às amostras do presente trabalho. Para a realização de difração de raios X em filmes finos, é então adequada a utilização da geometria Seemann-Bohlin, na qual o ângulo de incidência rasante (θ) é fixo enquanto o detector faz uma varredura em 2θ . Esta técnica é denominada de difração de raios X em ângulo rasante e promove um significativo aumento no caminho ótico do feixe no interior do filme. A difração ocorre numa região mais próxima da superfície, permitindo a obtenção de difratogramas com mais informações sobre os compostos na superfície em relação às informações de substrato (Cullity, 1978).

As análises de difração de raios X foram realizadas utilizando um equipamento de DRX da Rigaku, modelo ULTIMA IV, com radiação $K\alpha$ do Cu ($\lambda = 1,5413$), na faixa de 10° a 90° , com ângulo rasante de 2° , tensão 40kV e corrente 30 mA, disponível no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, CDTN, realizado sob orientação do professor José Domingos Ardisson.

5.3. ESPECTROSCOPIA FOTOELETRÔNICA DE RAIOS X (XPS)

As análises de propriedades superficiais de um biomaterial são de suma importância, pois é pela superfície que ocorrerão as interações com os diversos meios biológicos nos quais o material é exposto. Neste trabalho a técnica foi utilizada para a identificação dos elementos químicos presentes nas amostras (Castle, 1984).

O XPS é uma técnica que se baseia na medida de energia cinética de elétrons emitidos, quando uma amostra é irradiada com raios X. O espectro consiste na relação entre o número de elétrons emitidos em função da energia desses elétrons, expressos em eV. Com esta técnica é possível identificar elementos presentes na superfície, bem como, determinar o estado de oxidação dos elementos presentes, com uma profundidade amostral de 3 a 10 nm.

O XPS começou a ser usado a partir da década de 1950, apesar dos estudos sobre fotoemissão terem sido iniciados no início do século. Esta técnica só passou a ser utilizada com o aperfeiçoamento dos sistemas de bombeamento de UHV (ultra alto vácuo). Mais tarde, foi descoberto que os fotoelétrons de energia mais baixa emergem das camadas mais superficiais dos materiais sólidos.

Para a análise de XPS, raios x monoenergéticos emitidos de uma fonte de raios X, em geral, são utilizadas as linhas $K\alpha$ do magnésio (1253,6 eV) ou do alumínio (1486,6 eV), atingem a amostra e interagem com os átomos na região da superfície, pelo efeito fotoelétrico, causando a emissão de elétrons. Esta emissão de elétrons tem a energia cinética dada pela fórmula:

$$KE = h\nu - EB - \phi_{sp} \quad (4.2)$$

KE= energia cinética; H = constante de Planck; ν = frequência; EB = energia de ligação; ϕ_{sp} = função de trabalho do espectrômetro.

A energia de ligação pode ser considerada como a energia de ionização do átomo. O XPS reproduz diretamente a estrutura a nível eletrônico, desde as camadas mais internas até a superfície atômica. Todos os elementos, desde o Lítio até o mais pesado, podem ser analisados, mesmo que os elementos sejam só uma parte de um composto químico. As energias cinéticas do fotoelétron e do elétron Auger são características de cada elemento, assim a distribuição de energia dos elétrons emitidos revela todos os elementos presentes na superfície com exceção do hidrogênio. Uma vez que o livre caminho médio desde sua origem até uma colisão inelástica é extremamente curto, os elétrons que escapam sem perda de energia se originam em uma camada muito fina, chamada profundidade de escape. Quando um elétron de valência é removido da ligação química, os elétrons que permanecem são atraídos mais firmemente pelo núcleo, isto leva a um incremento da EB das camadas mais internas. As medidas desta "variação química" permitem a determinação do estado de tal átomo.

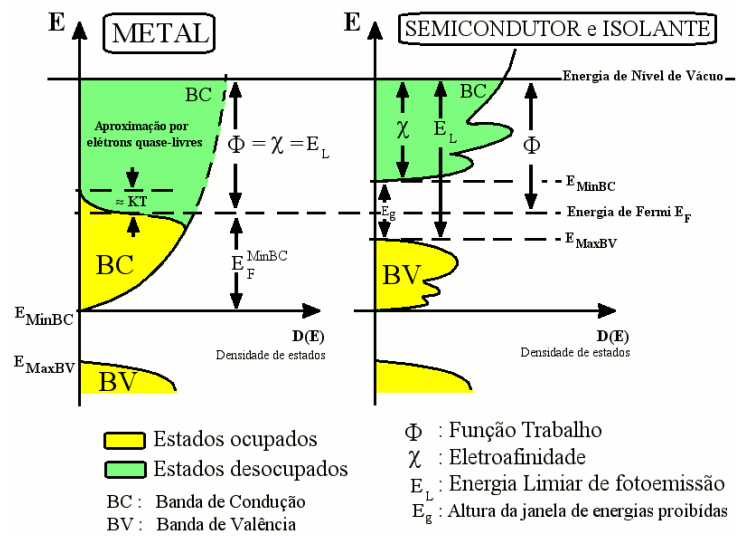


Figura 5 - Princípio da fotoemissão

Os fotoelétrons são emitidos no processo fotoelétrico e os elétrons Auger são emitidos devido ao relaxamento dos íons energéticos que sobram após a fotoemissão. Esta emissão do elétron Auger, ocorre aproximadamente 10 a 14 segundos após o evento de emissão de fotoelétrons. A emissão de um fóton de raios X fluorescente é um evento com baixa probabilidade, ocorrendo pelo menos de 1% em cada vez. No processo Auger, um elétron cai dentro da vaga orbital interna, e um segundo elétron é emitido, carregando o excesso de energia. O elétron Auger

possui energia cinética igual à diferença entre a energia do íon inicial e a dupla carga do íon final, e é independente do modo de ionização inicial. É certo que as energias dos elétrons emitidos não podem exceder a energia dos fótons ionizantes.

A faixa de energia cinética aproveitável dos fotoelétrons excitados por radiações características de anodos de raios X de magnésio e alumínio está entre cerca de 100 - 1400 eV (da mesma forma que a faixa de energia cinética mais útil de elétrons Auger está entre 50-2500 eV). Os elétrons nesta faixa de energia devem se originar próximo da superfície. Na faixa de energia de interesse o alcance da profundidade de escape é de uma a dez monocamadas. Entretanto, o espalhamento de elétrons depende da densidade de elétrons do material sólido, bem como da energia cinética.

O XPS foi realizado num sistema de análise de superfície equipado com um analisador de elétrons Phoibos 150. A radiação $K\alpha$ do alumínio (1486,6 eV) a uma potência de 350W foi utilizado para as análises. Foi realizado uma polarização a 0,1 uA para compensar o efeito de carga nas amostras e o sinal de 1s C (284,6 eV) foi utilizado como referência para a calibração das energias de ligação (BE) de diferentes elementos. O software CasaXPS foi utilizado para processar os dados de análise. As concentrações atômicas foram estimadas utilizando os fatores de sensibilidade instrumento para dimensionar as áreas de pico fotoelétrons calculados (Castle, 1984). A análise de XPS foi realizada no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, CDTN, realizado sob orientação do professor José Domingos Ardisson.

5.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica muito versátil e utilizada rotineiramente para a análise microestrutural e morfológica de superfícies de materiais. O funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) é baseado na utilização de um feixe de elétrons para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra sendo captado pelo detector e utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação.

A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o anodo. Em seguida, é focalizado sobre a amostra por uma série lentes com um spot menor que 4 nm. O feixe interagindo com a amostra produz elétrons e fótons que são coletados por detectores adequados e convertidas em um sinal de vídeo (Dedavid, Gomes e Machado, 2007). Na Figura 6 podem ser visualizados os principais componentes do microscópio. Na microscopia eletrônica de varredura, os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados.

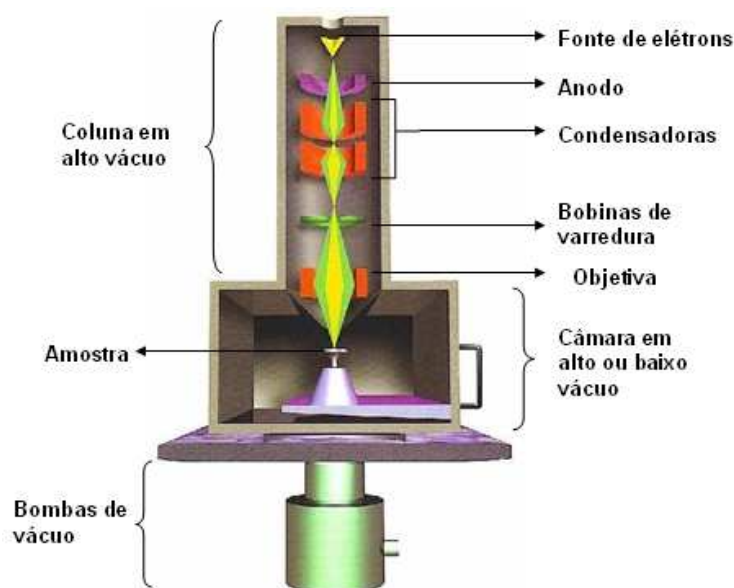


Figura 6 - Desenho esquemático da coluna do MEV

À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra, estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução. Já os elétrons retroespalhados fornecem imagens características de variação de composição permitindo a identificação de diferentes fases e orientações cristalinas (Dedavid, Gomes e Machado, 2007).

Para analisar a morfologia, porosidade e espessura do recobrimento neste trabalho, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com o microscópio FIB - Quanta FEG 3D FEI, disponível no Centro de Microscopia de UFMG.

5.5. ANÁLISE DE RAIOSX POR ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVADE RAIOS X (EDS)

A microanálise é um dos mais importantes instrumentos para a análise química de materiais orgânicos e inorgânicos. Através da identificação dos raios X emitidos pela amostra, quando da interação com o feixe eletrônico, é possível determinar a composição de regiões com até um μm de diâmetro. É uma técnica não destrutiva, permitindo determinar quantidades de até 2% dos elementos presentes na amostra (MALISKA, 2003). Para a microanálise podem ser acoplados dois detectores que captam raios X característicos: dispersão de energia (EDS) ou dispersão em comprimento de onda (WDS), que permitem coletar fótons produzidos pelo feixe de elétrons primários (Dedavid, Gomes e Machado, 2007).

A técnica de EDS baseia-se no princípio de que a energia de um fóton (E) está relacionada com a frequência eletromagnética (ν), pela relação:

$$E = \nu h \quad (4.3)$$

onde “ h ” é a constante de Planck.

Fótons com energias correspondentes ao espectro de raios X atingem um detector, o que permite analisar os comprimentos de onda de modo simultâneo. A interpretação dos espectros de EDS é facilitada por uma base de dados que contém, para cada elemento, as energias e a intensidade das raias que as produziu. É possível localizar, para cada energia do espectro, a lista dos elementos que possuem uma raia neste domínio energético. Cabe salientar que os elementos em quantidade inferior a 0,2% em massa não podem ser detectados. A identificação dos elementos é facilitada pela escolha adequada da tensão do feixe de elétrons.

Neste trabalho, foram realizadas as análises de EDS, utilizando o microscópio FIB - Quanta FEG 3D FEI, disponível no Centro de Microscopia de UFMG.

5.6. MICROSCOPIA DE FORÇA ATOMICA (AFM)

O princípio básico desta técnica é medir forças ou interações entre uma ponteira e a superfície da amostra. O AFM, ou microscópio de força atômica, ou ainda, SFM ("Scanning Force Microscope"), pode ser operado de diversos modos. Entretanto, seu princípio fundamental é a medida das deflexões de um suporte (de 100 a 200 μm de comprimento) em cuja extremidade livre está montada a sonda. Estas deflexões são causadas pelas forças que agem entre a sonda e a amostra. As diferentes técnicas fornecem diversas possibilidades para fazer imagens de diferentes tipos de amostras e para gerar uma ampla gama de informações. Os modos de fazer as imagens, também chamados modos de varredura ou de operação, referem-se fundamentalmente à distância mantida entre a sonda e a amostra, no momento da varredura, e às formas de movimentar a ponteira sobre a superfície a ser estudada. A detecção da superfície realiza-se visando à criação de uma imagem. Há diferentes modos possíveis de obter imagens, devido às diferentes interações em função da distância entre a ponteira e a amostra, assim como ao esquema de detecção utilizado.

Quando a ponteira se aproxima da amostra, é primeiramente atraída pela superfície, devido a uma ampla gama de forças atrativas existentes na região, como as forças de van der Waals. Esta atração aumenta até que, quando a ponteira aproxima-se muito da amostra, os átomos de ambas estão tão próximos que seus orbitais eletrônicos começam a se repelir. Esta repulsão eletrostática enfraquece a força atrativa à medida que a distância diminui. A força anula-se quando a distância entre os átomos é da ordem de alguns Angstroms. Quando as forças se tornam positivas, podemos dizer que os átomos da ponteira e da amostra estão em contato e as forças repulsivas acabam por dominar. Essa técnica é muito útil, pois permite estudar não apenas materiais condutores, mas também todo tipo de material isolante, já que o método não utiliza corrente de tunelamento para produção de imagens.

A técnica de AFM pode ser classificada em dois modos de força distintos: contato e não-contato.

Quando operado no modo de não-contato, a separação entre a ponta e superfície da amostra é da ordem de 10 a 100 nm, e as forças como Van der Waals, eletrostática, magnéticas, capilares e outras, podem ser medidas e fornecerem

informações sobre a superfície. Com separações menores, da ordem de Å, a ponta está em contato com a superfície da amostra. Neste modo, a força de repulsão iônica permite que a topografia da superfície seja mapeada com alta resolução. O AFM operado em modos distintos, os quais fornecem grande variedade de opções para a construção de imagens de diferentes tipos de amostras, gerando diferentes tipos de informação, dependendo das forças líquidas entre a ponteira e a amostra. Quando o aparelho é utilizado na região de forças atrativa, o método chama-se não-contato, Figura 7. Nesta região, a ponteira do AFM se enverga na direção da amostra.

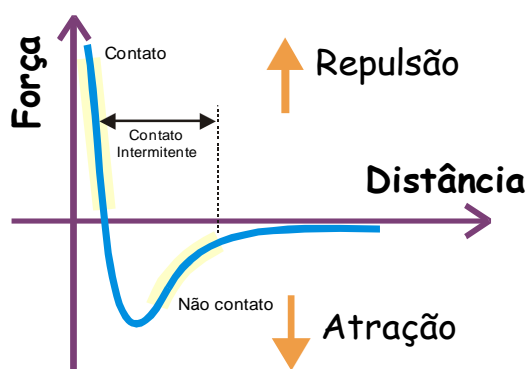


Figura 7-Modo de operação do AFM

A operação na região repulsiva chama-se contato e a ponteira se dobra, afastando-se da amostra. No modo de não-contato ele é atraído pelas forças de capilaridade da camada de contaminação ou pelas forças de van der Waals, quando a amostra é limpa. No modo de contato, vê-se como a deflexão da mola é na direção oposta à da amostra (Al, 1993).

As rugosidades dos filmes foram analisadas por microscopia de força atômica utilizando o microscópio MFP-3D-SA ASYLUM RESEARCH, com sonda AC160TS-R3 [$k = 26$ (11-54)N/m ($k =$ constante elástica), frequência de ressonância de 300 (200 - 400) kHz] e o modo de análise “tapping”, disponível no Centro de Microscopia da UFMG.

5.7. POTENCIAL ZETA

Em contato com um líquido, os materiais particulados ou macroscópicos adquirem uma carga elétrica em sua superfície. Esse fenômeno ocorre devido a vários possíveis fatores, como adsorção de íons da solução na

superfície ou dissociação de grupos superficiais dos materiais. A diferença de carga na superfície do material interfere na distribuição de carga dos íons em solução próximos a superfície, dando origem assim a uma dupla camada elétrica na interface do material e o líquido. Essa camada é dividida em duas regiões, uma região interna que inclui íons fortemente ligados à superfície e uma região exterior onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. Dessa forma, o potencial nessa região decai com o aumento da distância da superfície até, a uma distância suficientemente grande, atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionado como potencial zero. Quando aplicado um campo elétrico cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado potencial zeta.

Quando uma camada de macromoléculas é adsorvida na superfície da partícula ela move o plano de cisalhamento para longe da superfície e o potencial zeta é alterado. Dessa forma, o potencial zeta é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda.

Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, como ele reflete a carga efetiva nas partículas, ele se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão.

O potencial zeta não pode ser medido diretamente, sendo assim, usa-se algum tipo de medida indireta, a partir da qual o mesmo é calculado. A técnica mais usada e mais aceita é através da mobilidade eletroforética, introduz-se uma suspensão coloidal diluída em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à suspensão.

As partículas com carga elétrica líquida movem-se na direção do eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado (Sides *et al.*, 2006).

Para a medida de potencial Zeta das superfícies dos materiais, foi utilizado o equipamento Zeta Spin, disponível no Centro de desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, CDTN, realizado sob orientação do professor Fernando Soares Lameiras, e foi utilizado uma solução iônica de KCl, 0,01 mol.L⁻¹, como eletrólito.

5.8. TESTE DE ADERÊNCIA (ABNT MB 985)

O teste de aderência, um dos mais comuns (Yeh *et al.*, 2006) na avaliação da magnitude da adesão entre dois materiais, seguiu a norma ABNT MB 985.

Em linhas gerais, foram efetuados seis cortes cruzados em ângulo reto, utilizando um nanoidentador, com espaçamento de aproximadamente 1,0 mm, de forma a alcançar o substrato, formando-se uma grade com vinte e cinco quadrados. Em seguida, foi pressionada uma fita adesiva sobre a grade e, após um curto período de tempo a fita foi removida rapidamente obedecendo a um ângulo de 180°, aproximadamente. Após a remoção da fita, a amostra foi observada por uma lupa e analisada por MEV/EDS na área onde a fita foi pressionada e retirada para avaliar a quantidade de revestimento que foi destacado e então, classificar o grau da aderência encontrado. O grau de aderência recebe valores de zero a quatro. A classificação GR 0 é dada quando se é observado que nenhuma área da película foi destacada e a classificação GR 4, para situações onde cerca de 65% da película é destacada.

O teste de aderência seguiu a norma ABNT MB 985 e as imagens de microscopia para a análise do GR foram obtidas no microscópio FIB - Quanta FEG 3D FEI, disponível no Centro de Microscopia de UFMG.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os materiais produzidos e o substrato puro foram caracterizados quimicamente por DRIFT, XPS, DRX, Potencial Zeta, EDS e tiveram suas morfologias e espessuras analisadas dor MEV e AFM.

6.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DE REFLECTÂNCIA DIFUSA (DRIFT)

Dois materiais foram preparados com diferentes tratamentos térmicos, BGTi37 e BGTi600, de forma a obter filmes de biovidro sobre a superfície do titânio. As análises de DRIFT mostram que quando comparado ao espectro do substrato, Figura 8, com os dos materiais BGTi37, Figura 9, e BGTi600, Figura 10, é possível

perceber que ocorreram as deposições dos filmes. A presença de grupos OH, referente à água ainda presente no filme e aos grupos silanóis, é evidenciada pelas bandas nas regiões próximas a 3400 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} , estiramento simétrico e assimétrico respectivamente, (Mehdipour e Afshar, 2012). É possível observar que, após o aquecimento realizado no material BGTi600, a intensidade dessas bandas diminuem consideravelmente, devido à perda de água. Na região próxima a 2360 cm^{-1} , as bandas estão associadas à presença de CO_2 na superfície dos materiais. Os fosfatos absorvem na região entre $1400 - 400\text{ cm}^{-1}$, entretanto, sua identificação pode ser dificultada, pois há uma sobreposição de bandas referentes ao SiO_4 , ambos presentes no BG (Stan *et al.*, 2010). A banda localizada em 1051 cm^{-1} pode estar associada tanto à absorção dos grupos PO_4^{3-} , quanto ao grupo Si-O. A banda na região próxima a 1180 cm^{-1} é associada ao estiramento assimétrico do grupo Si-O-P e a banda próxima a 980 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento do Si-OH. A banda em 797 cm^{-1} é referente ao estiramento Ti-O-Si, sendo mais pronunciada no material BGTi600, provavelmente devido à maior formação do óxido de titânio com o aumento da temperatura, o que proporciona maiores possibilidades de formação dessas ligações, e por fim, a banda em 665 cm^{-1} é referente ao Ti-O-Ti e está presente em todos os espectros (Kamal *et al.*, 2011), (Brinker e Scherer, 1990), (Nasr-Esfahani *et al.*, 2011).

Em um implante ósseo revestido, a presença da sílica pode promover uma vantagem adicional para a mineralização (Dutoit, Schneider e Baiker, 1995). Neste caso, a mineralização é promovida nos filmes de BG, tanto pela sílica como pelos fosfatos no filme (Hench e Wilson, 1993), (Li *et al.*, 1993). A presença das cargas de superfície, também tem sido considerada para formação de apatitas sobre um BG (Li e Zhang, 1990). A presença do grupo Ti-O interfere na carga superficial, de forma a promover ainda mais a nucleação (Peltola *et al.*, 2000).

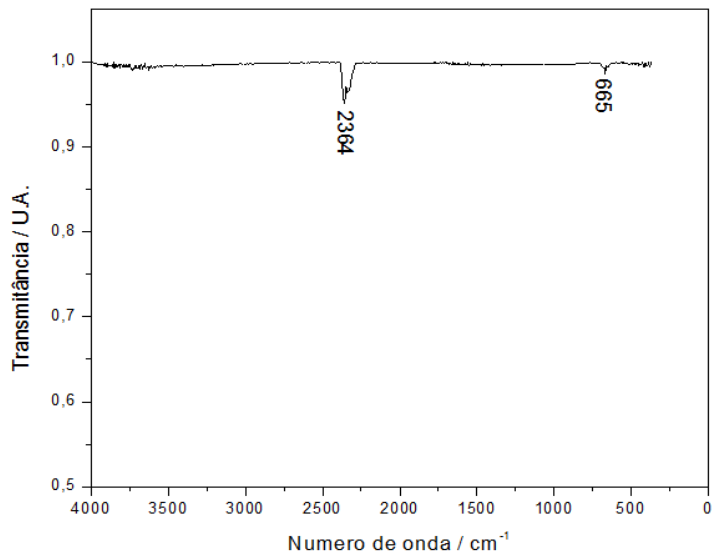


Figura 8 - Espectro de DRIFT do substrato, Titânio, na região de 4000-400 cm^{-1} .

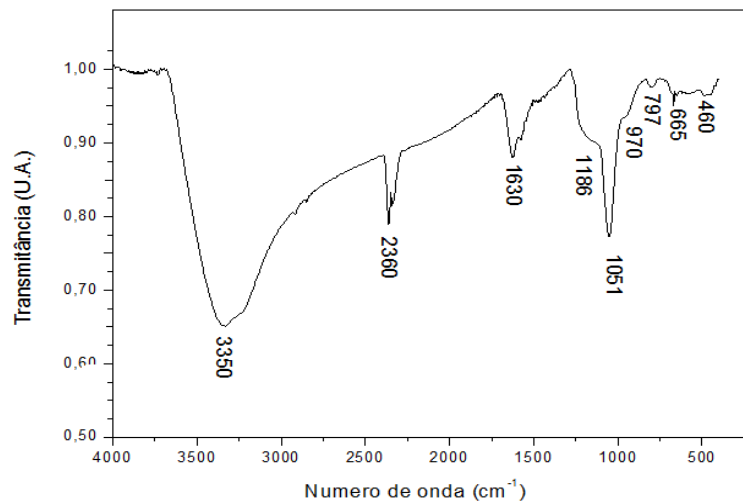


Figura 9 - Espectro de DRIFT do material BGTI37, na região de 4000-400 cm^{-1} .

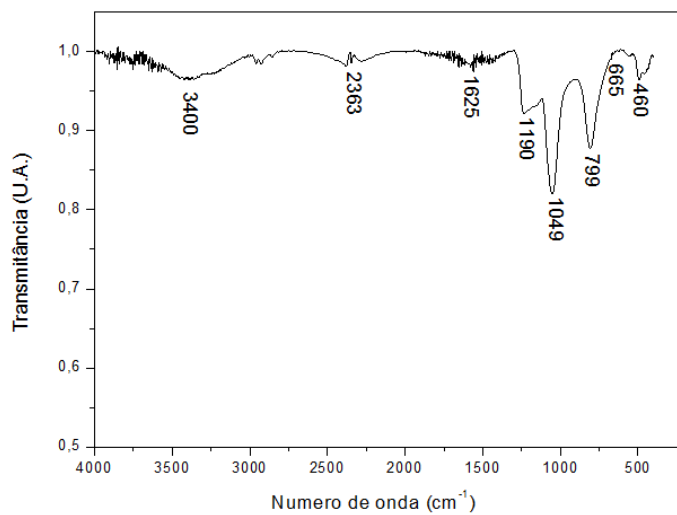


Figura 10 - Espectro de DRIFT do material BGTI600, na região de 4000-400 cm^{-1}

6.2. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS DE RAIOS X

O estudo de XPS dos materiais revelou a composição na superfície destes, Figuras 11 a 13. Em todas as amostras foi observada a presença de TiO_2 , sendo esta mais pronunciada na superfície do BGTi600, Figura 12, devido ao aquecimento em atmosfera de oxigênio, o que propicia a formação deste óxido. Nos materiais recobertos, BGTi37 e BGTi600, foram detectados os componentes do filme de BG, com exceção do fósforo, devido à baixa quantidade presente. Na superfície do material BGTi37, Figura 11, foi detectado a presença de Cl, provavelmente residual do processo de síntese. Foi possível verificar também que, o Ca está ligado à rede de sílica, através da energia do Ca $2p_{3/2}$ em 347,4 eV.

No BGTi600, duas espécies de cálcio foram encontradas, uma ligada a rede de sílica, como no BGTi37, e outra, ligada ao TiO_2 (Ca-TiO_2), com energia de ligação $\text{Ca}2p_{3/2}$ igual a 346.5 eV (Castle, 1984). A maior possibilidade de sítios de ligação do Ca modifica o material e pode promover uma resposta biológica diferenciada.

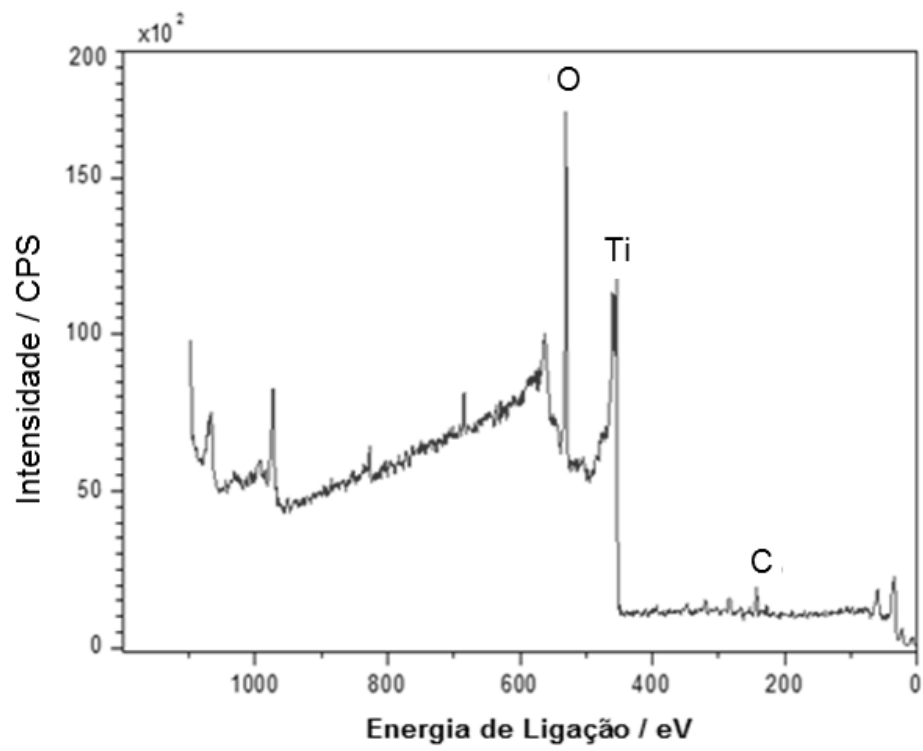


Figura 11 - Espectro de XPS do titânio.

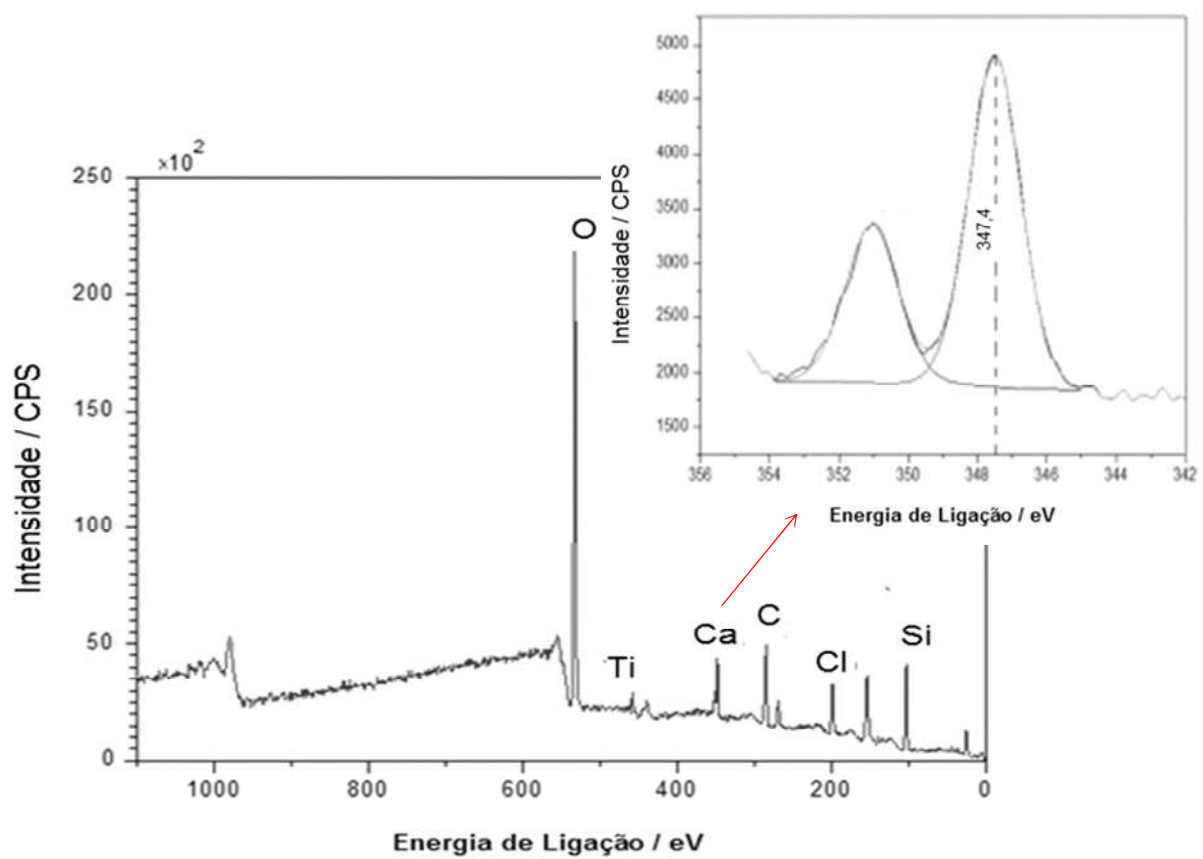


Figura 12 - Espectro de XPS do BGTi37.

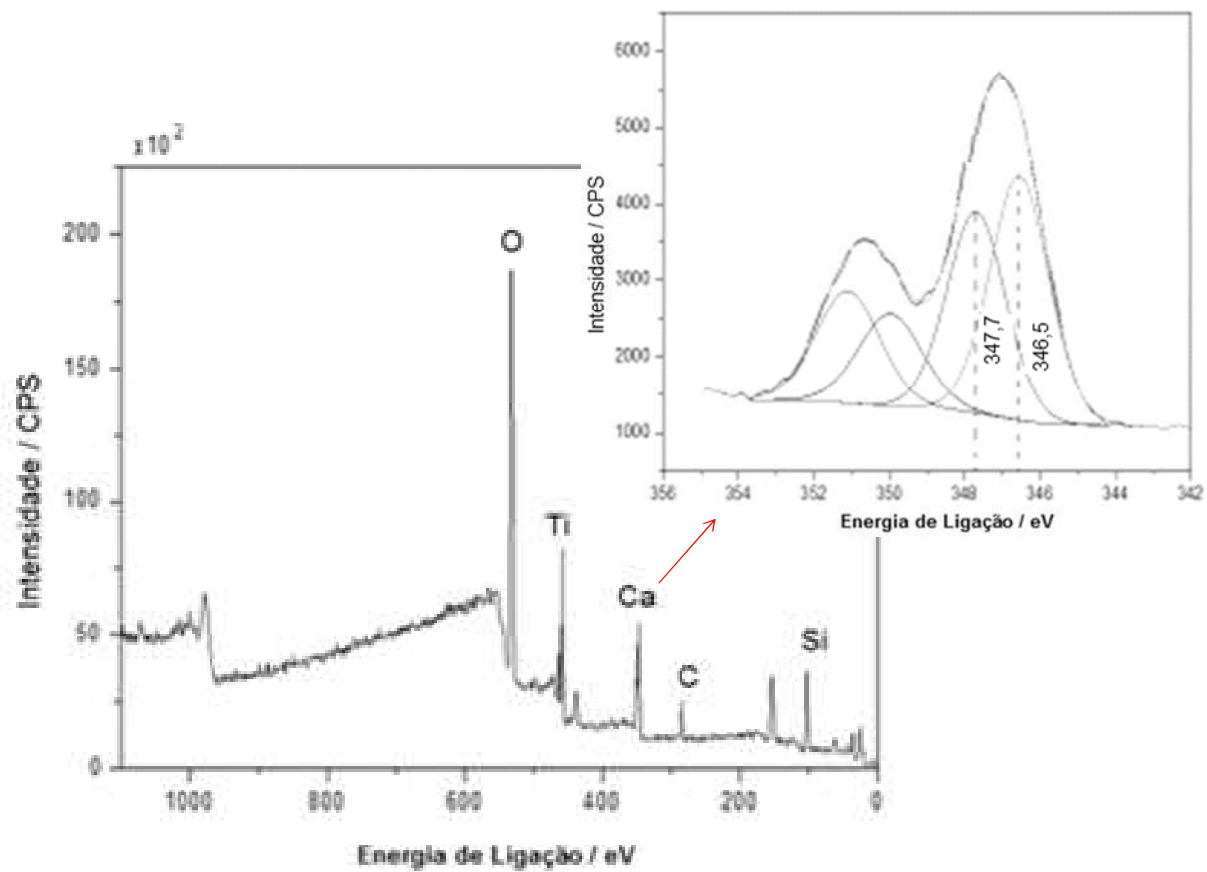


Figura 13 - Espectro de XPS do BGTi600.

6.3. ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X.

As Figuras 14 a 16 apresentam os difratogramas obtidos na geometria rasante para as amostras do substrato de titânio, Figura 14, do BGTi37, Figura 15, e do BGTi600, Figura 16. Os picos de difração estão em concordância com os arquivos de referência do programa *Crystallographica Search-Match Version 2, 0*. Copyright© 1996-1999, Oxford Cryosystems, seguindo os arquivos PDF 1-1197 Ti, PDF 2-387 TiO₂ (anatásio) e PDF 13-1122 TiO₂ (Rutilo). De acordo com os difratogramas, foi possível observar as fases cristalinas referentes ao titânio e seus óxidos anatásio em todos os materiais.

A 600°C, a fase mais estável dos óxidos de TiO₂ é o rutilo. Devido ao aquecimento sofrido pelo BGTi600, é provável que parte dos óxidos presentes na fase anatásio sejam convertidos em fase rutilo, o que é evidenciado na análise de raios X, Figura 16.

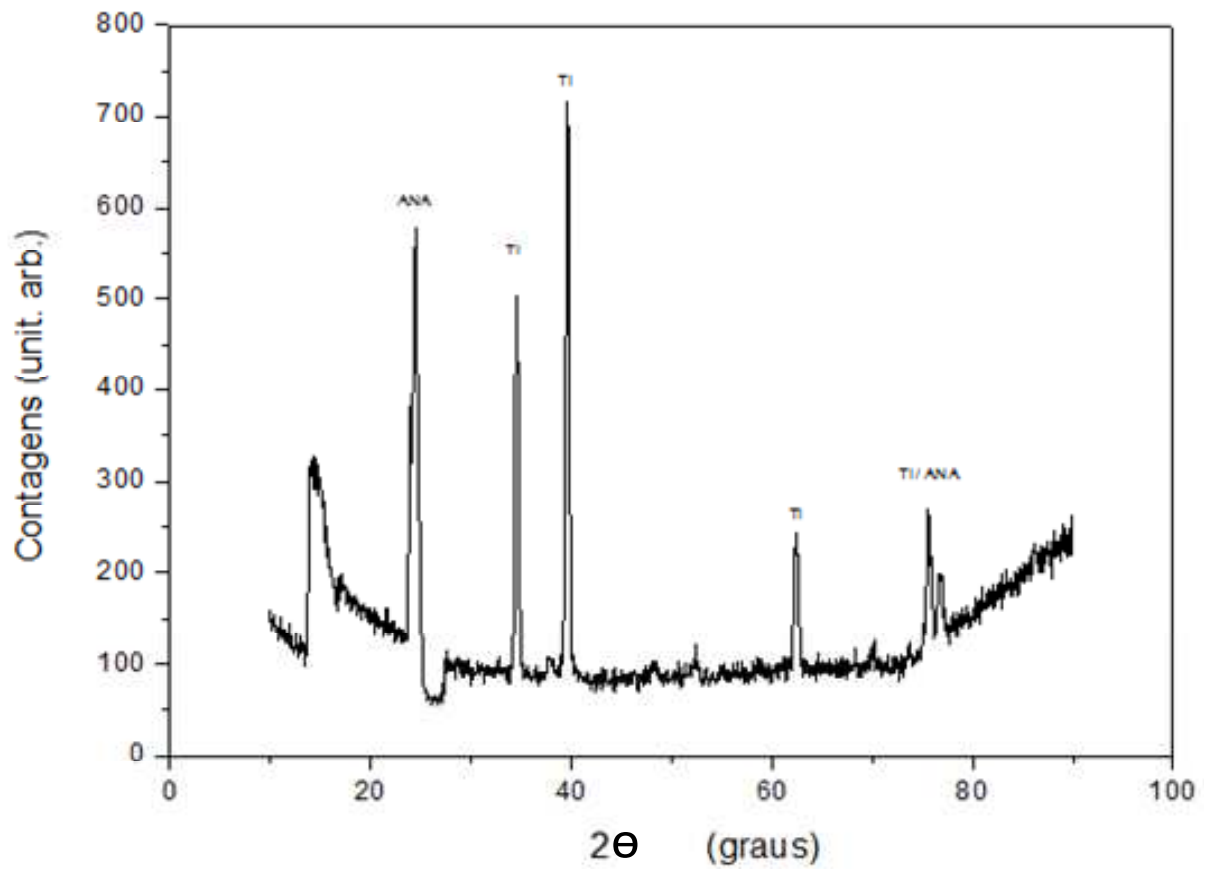


Figura 14– Difratoograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante ($\theta=1,5^\circ$), para o substrato de titânio. Onde Ti=titânio; ANA= anatásio.

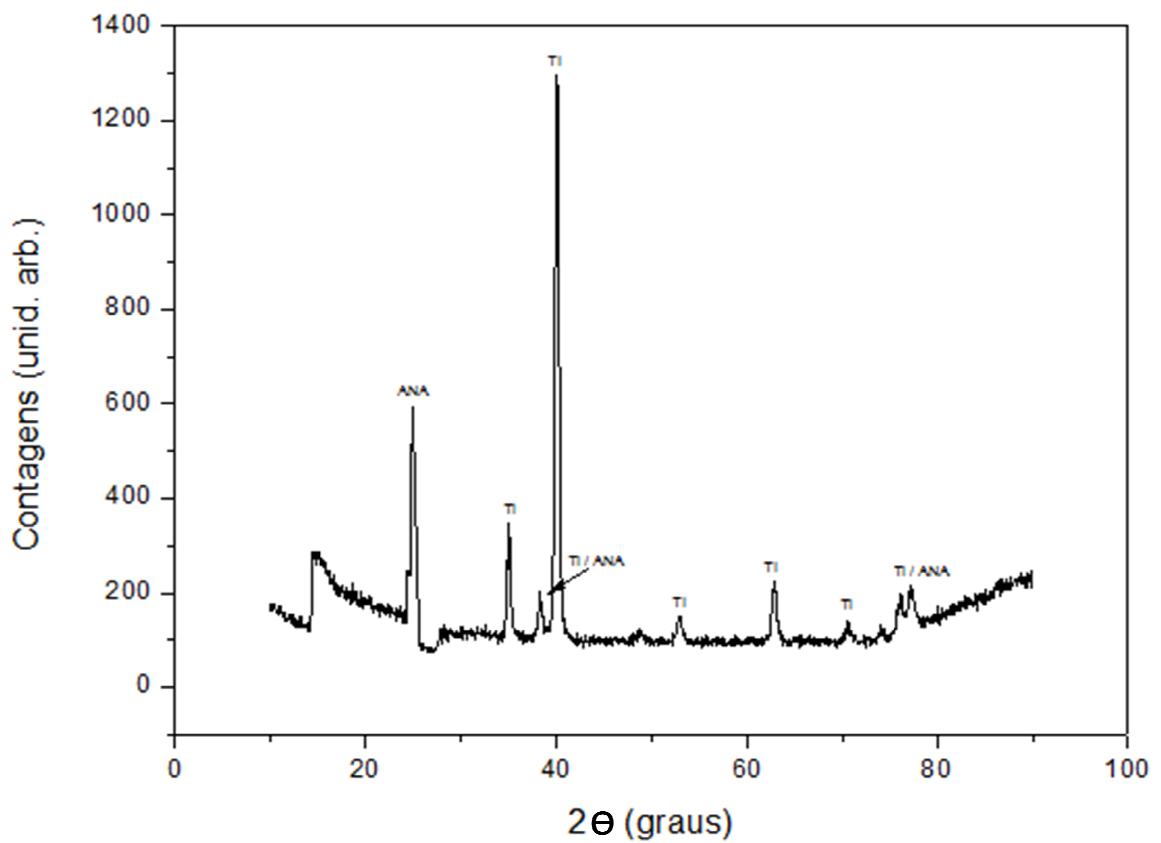


Figura 15–Difratograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante ($\theta=1,5^\circ$), para o BGTi37. Onde Ti=titânio; ANA= anatásio e RUT= rutilo.

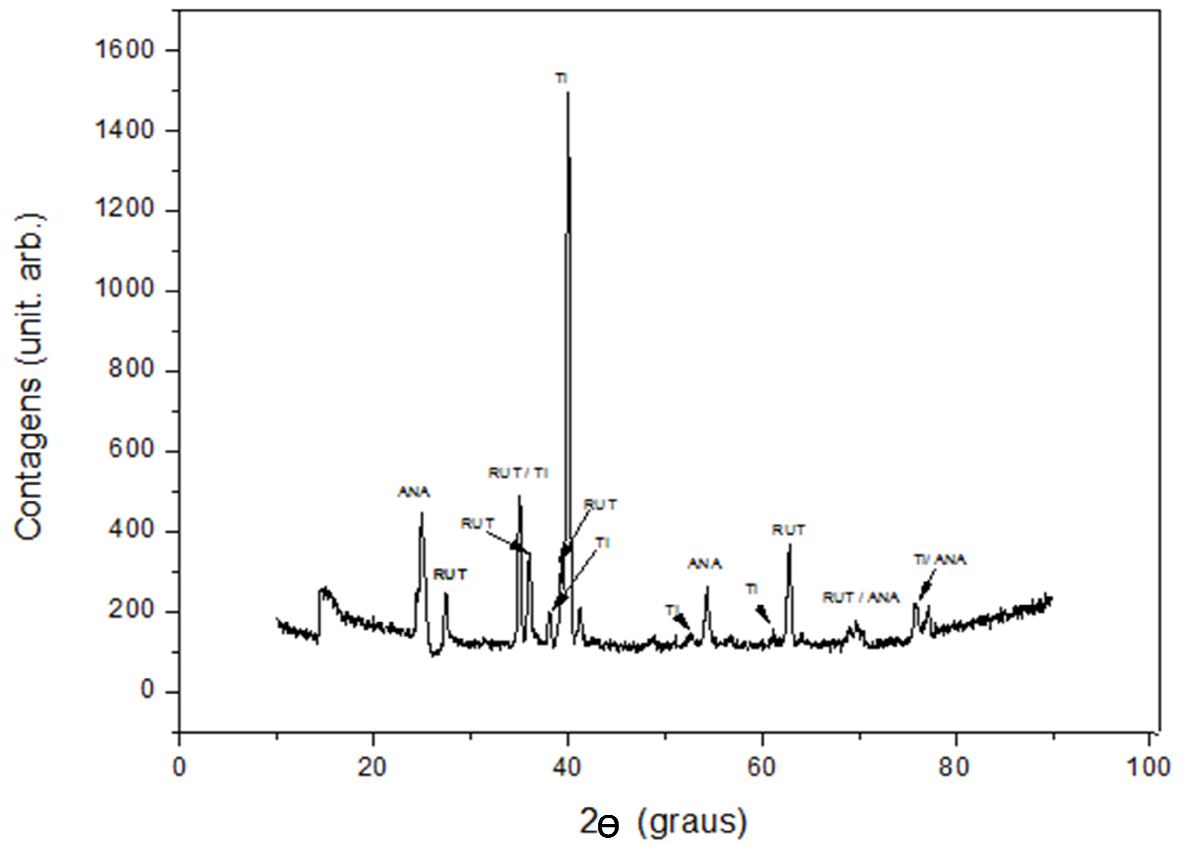


Figura 16–Difratograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante ($\theta=1,5^\circ$), para o BGTi600. Onde Ti=titânio; ANA= anatásio e RUT= rutilo.

6.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) e ESTECTROSCOPIA DISPERSIVA EM ENERGIA (EDS)

As superfícies dos materiais foram analisadas por meio da microscopia eletrônica de varredura, MEV, e foram observados poros de tamanhos variados distribuídos em toda a superfície, tanto no BGTi37, Figura 17(a), quanto no BGTi600, Figura 17(b).

No BGTi600 é observada uma superfície ainda mais irregular que no BGTi37, isso, provavelmente, devido a formação acentuada de óxidos de titânio, promovidos pelo aquecimento deste material em atmosfera aerada e que podem ser observados na superfície.

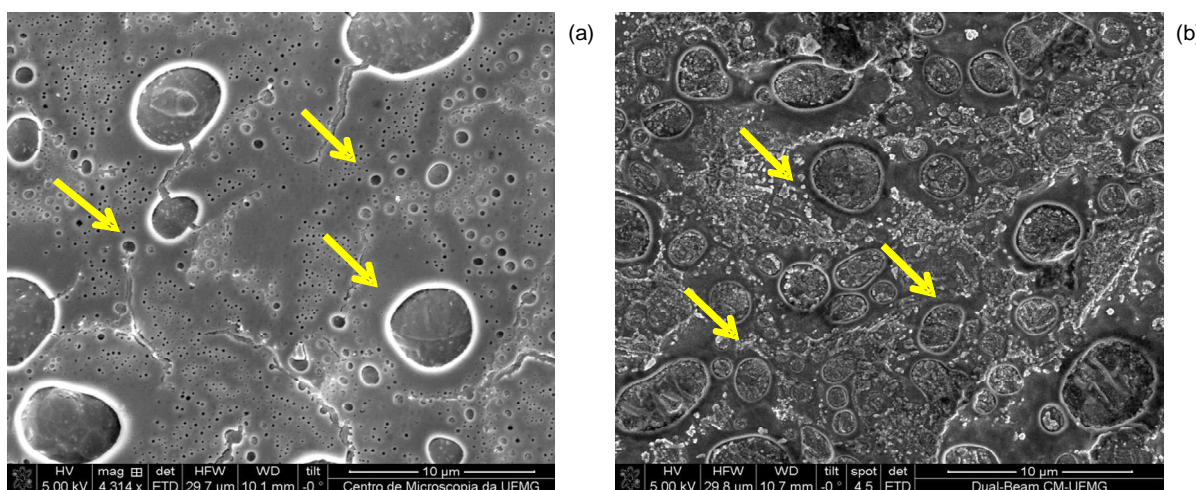


Figura 17 - Imagem de superfície dos materiais (a) BGTi37 e (b) BGTi600, obtidas por MEV. As setas indicam a presença de poros de tamanhos variados.

Os mapeamentos químicos dos materiais foram realizados com o intuito de observar a distribuição do óxido de titânio na superfície dos materiais, Figura 18. No material BGTi37, o TiO_2 é observado, está localizado dentro dos poros, indicando que houve a absorção de oxigênio nos poros. Já no material BGTi600, o óxido está em maior quantidade e distribuído por todo o filme, não apenas nas proximidades dos poros.

A presença de poros no interior dos filmes também é observada nas imagens transversais dos materiais e é evidenciado uma maior irregularidade no composto BGTi600, Figura 18.

Analisando os espectros de EDS obtidos não foi observada a presença do fósforo em nenhum dos materiais, isso porque a quantidade deste elemento no filme é muito baixa.

Para a comprovação da composição do biovidro, uma maior quantidade do pó deste material foi submetida a análise de EDS, Figuras 19 a 20. Com essa análise foi possível identificar os elementos presentes nos materiais.

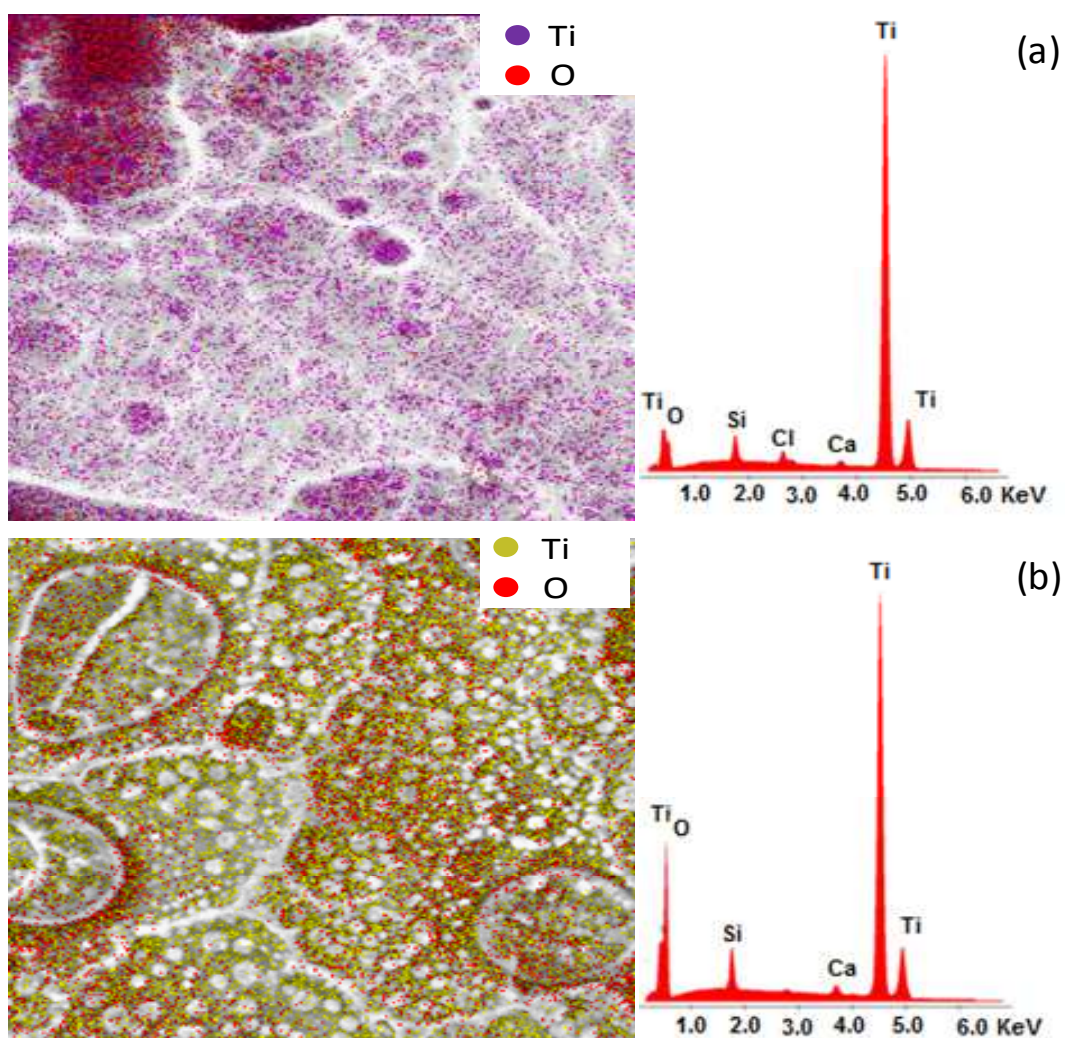


Figura 18 - Imagem do mapeamento químico para o TiO_2 presente na superfície dos materiais (a) BGTi37 e (b) BGTi600, obtidas por MEV/EDS.

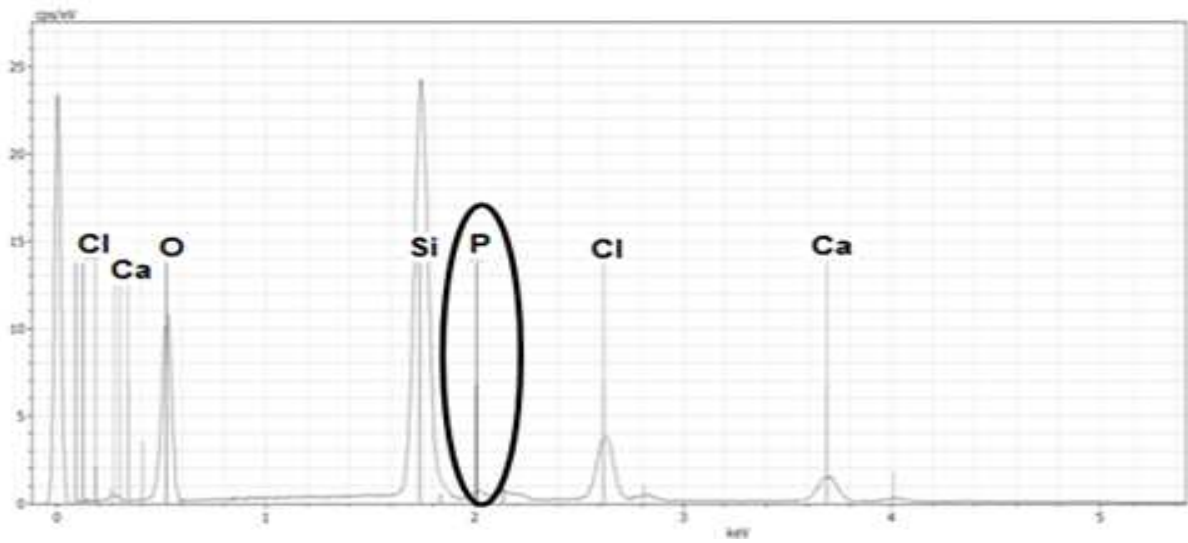


Figura 19 - Espectro de EDS para o pó do biovidro a 37°C, similar ao presente no BGTi37.

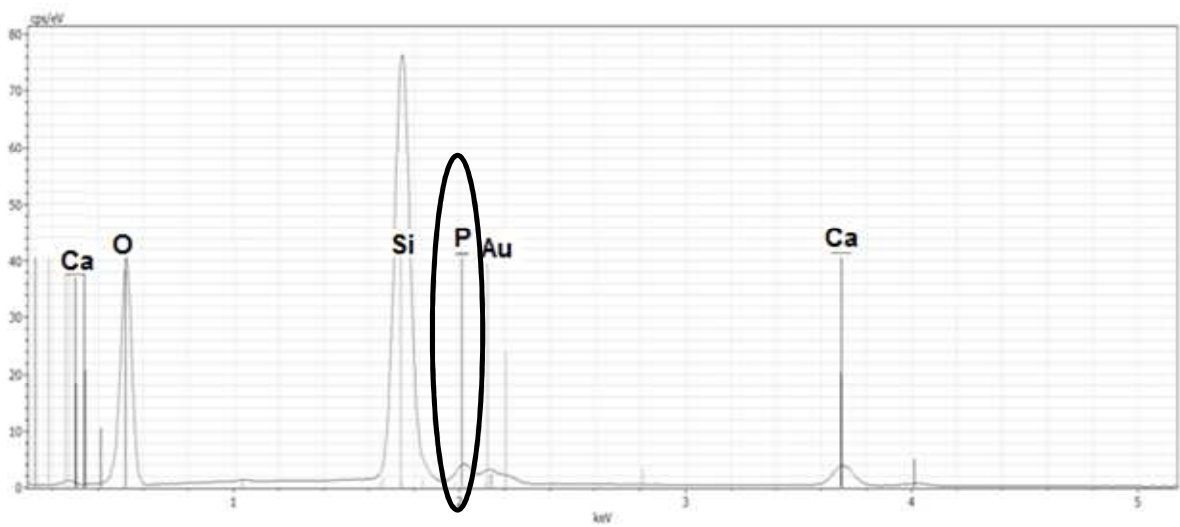


Figura 20 - Espectro de EDS para o pó do biovidro a 600°C, similar ao presente no material BGTi600.

6.5. DETERMINAÇÃO DAS ESPESSURAS E RUGOSIDADES DOS FILMES.

As espessuras dos filmes foram determinadas pela imagem da seção transversal, utilizando a diferença de contraste médio ao longo da seção. A diferença de contrastes entre o substrato, o filme e a proteção de carbono, Figura 21, permitiu detectar com clareza a área correspondente ao filme e, assim, quantificá-la, Tabela 3. O valor médio da espessura do filme no material BGTi600 é um pouco maior que no material BGTi37, devido a presença de uma camada maior do TiO_2 .

As imagens topográficas tridimensionais dos materiais produzidos e do substrato puro, Figura 22, foram obtidas por AFM, e através delas, foram determinadas as rugosidades destes materiais, Tabela 4.

No material BGTi37, a rugosidade quadrática média (RMS) que consiste na medida da rugosidade média para superfícies irregulares, diminui um pouco, quando comparado com a superfície do substrato puro, devido à deposição da camada de BG regular sobre a superfície do titânio. Entretanto, esta camada é fina o suficiente para que a rugosidade esteja próxima do material de partida, uma vez que este trabalho parte de um material com tratamento comercial, o substrato, e se deseja manter o mais próximo possível essa característica. Já para o material BGTi600, a RMS aumenta significativamente devido as irregularidades presentes na superfície.

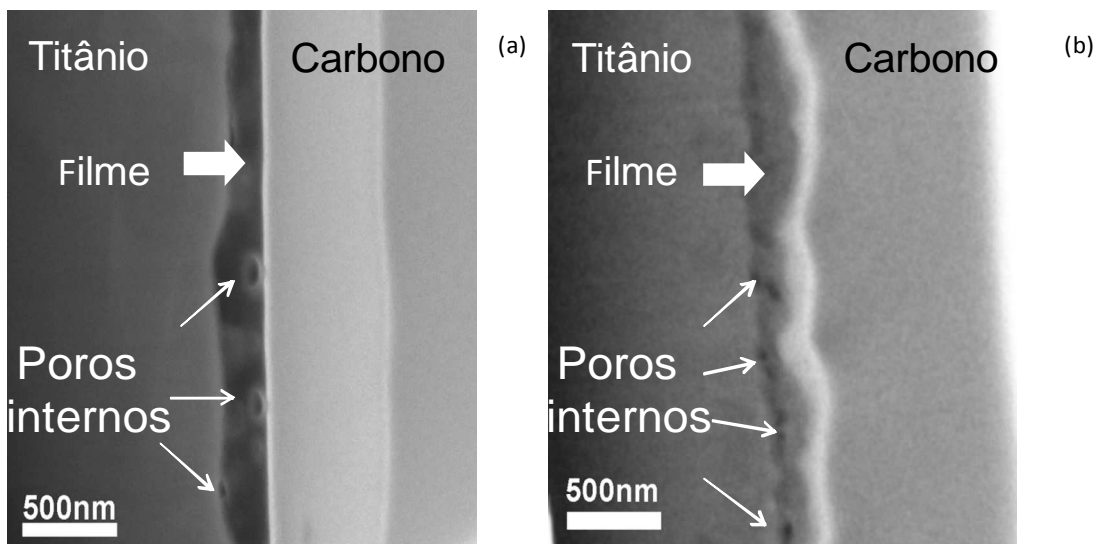


Figura 21 - Imagens das seções transversais dos filmes (a) BGTi37 e (b) BGTi600, obtidas por MEV.

Tabela 3 - Espessuras dos filmes determinadas por MEV.

Materiais	Espessuras / nm
BGTi37	336,21 ± 0,01
BGTi600	399,37 ± 0,01

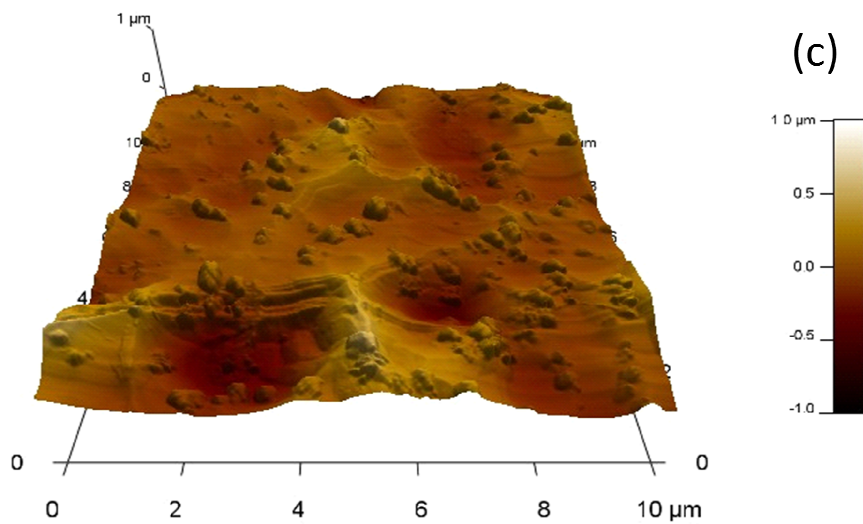
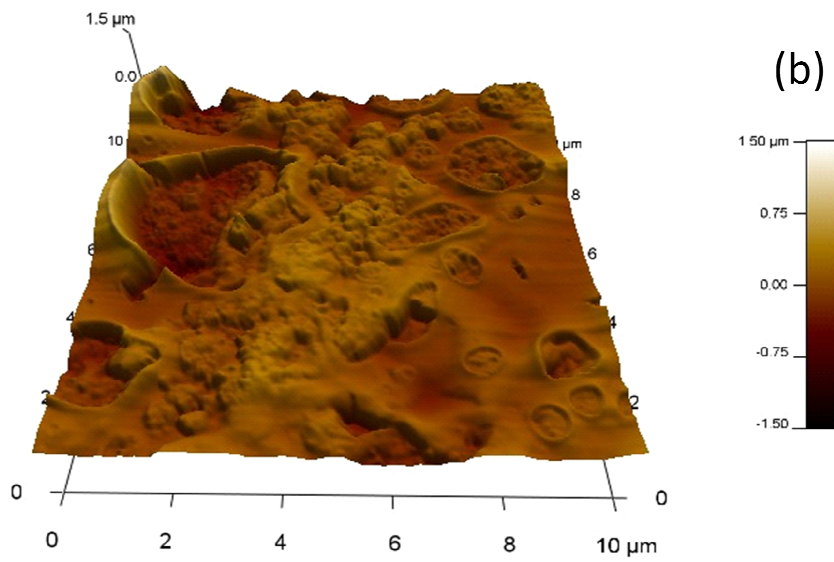
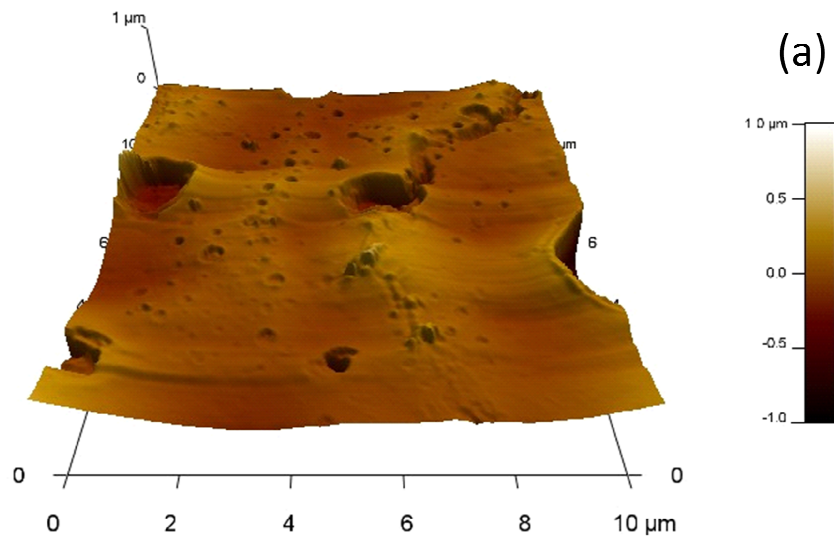


Figura 22 - Microscopias de AFM dos materiais: (a) BGTi37, (b) BGTi600 e (c) Titânio

Tabela 4 - Medidas de rugosidade (RMS) dos materiais e do substrato determinadas por AFM.

Materiais	RMS / nm
Titânio	148,7
BGTi37	137,9
BGTi600	186,3

6.6. ANÁLISE DA ADERÊNCIA DO FILME

O ensaio para a verificação da aderência entre a interface do filme e o substrato de titânio seguiu a norma ABNT MB 985. As situações encontradas para o BGTi37 e para o BGTi600, após a retirada da fita adesiva, foram observadas por MEV, Figura 23.

A aderência apresenta grau GR 0, o que significa ótima aderência ao substrato, ou seja, após a remoção da fita adesiva da área analisada não foi encontrado nenhum destacamento dos filmes. A análise de EDS também foi realizada para confirmar a presença do filme sobre o substrato.

Essa aderência é particularmente atribuída à ligação entre o grupo alcoóxido metálico presente na superfície do filme (Si) e a superfície metálica do substrato formando a ligação Si-O-Ti, já identificada nos espectros de infravermelho.

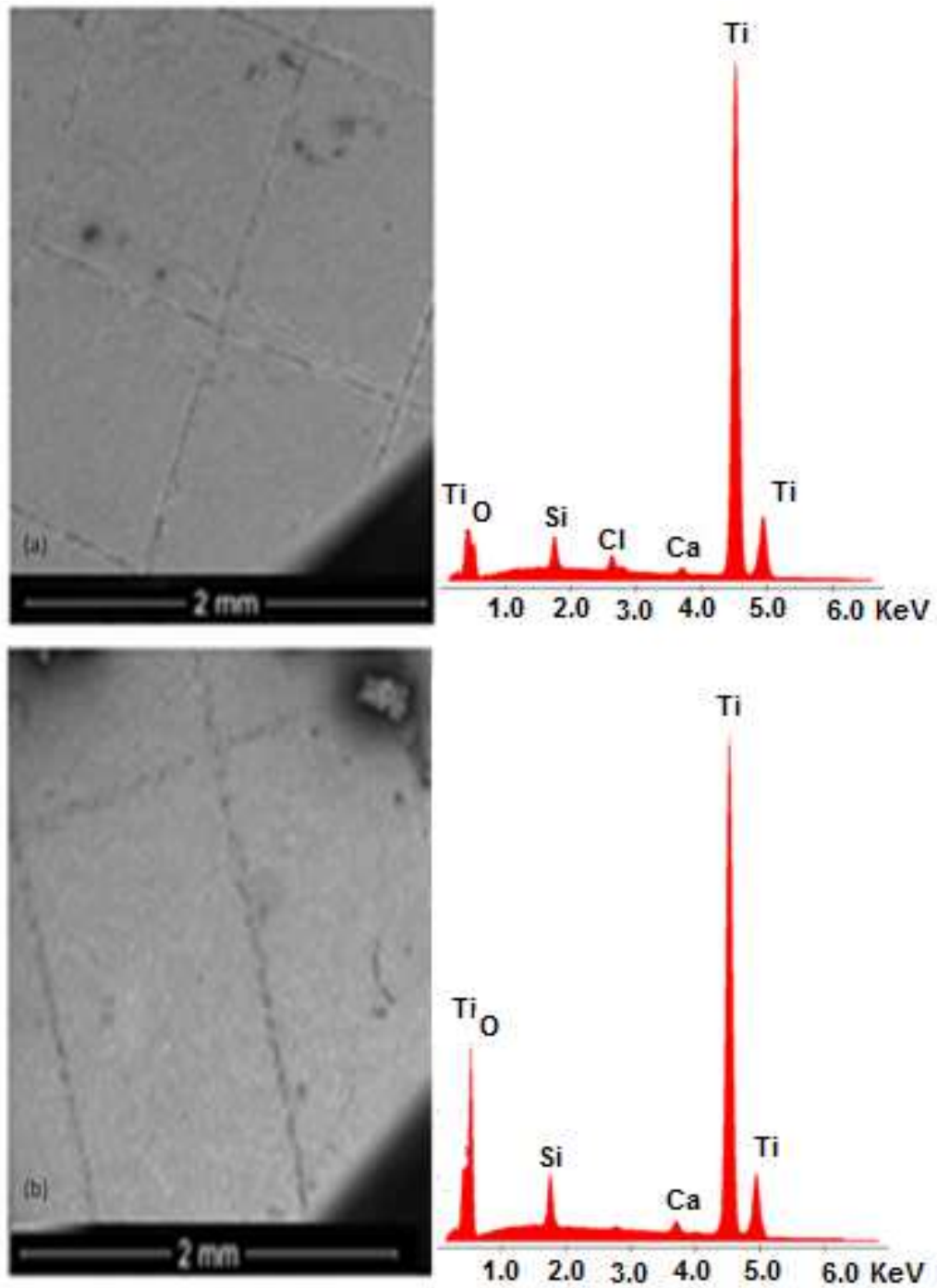


Figura 23 - Imagem de MEV do ensaio de aderência do filme ao substrato de titânio nos materiais (a) BGTi37 e (b) BGTi600, seguida da análise de EDS para confirmação da composição.

6.7. ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA

A medida do Potencial Zeta spin permitiu determinar o potencial isoelétrico dos materiais. Esse método permite determinar o ponto isoelétrico de filmes sólidos, com superfícies planas pouco condutoras. Por esse motivo, foi possível mensurar essa característica apenas para os materiais e não para o titânio puro. Devido à complexidade do material e as limitações da técnica, não foi possível determinar um ponto, mas sim uma faixa onde o ponto isoelétrico se encontra. Para o material BGTi37, o ponto isoelétrico encontra-se na faixa entre o pH 3,07 e 3,22, já para o material BGTi600, na faixa entre o pH 3,38 e 3,50, Figura 24. É sabido que, com uma pequena diferença no pH correspondente ao ponto isoelétrico do BG, medidos por Potencial Zeta, é evidenciado uma diferenciação significativa na bioatividade dos materiais (Andrade, Ferreira e Domingues, 2004).

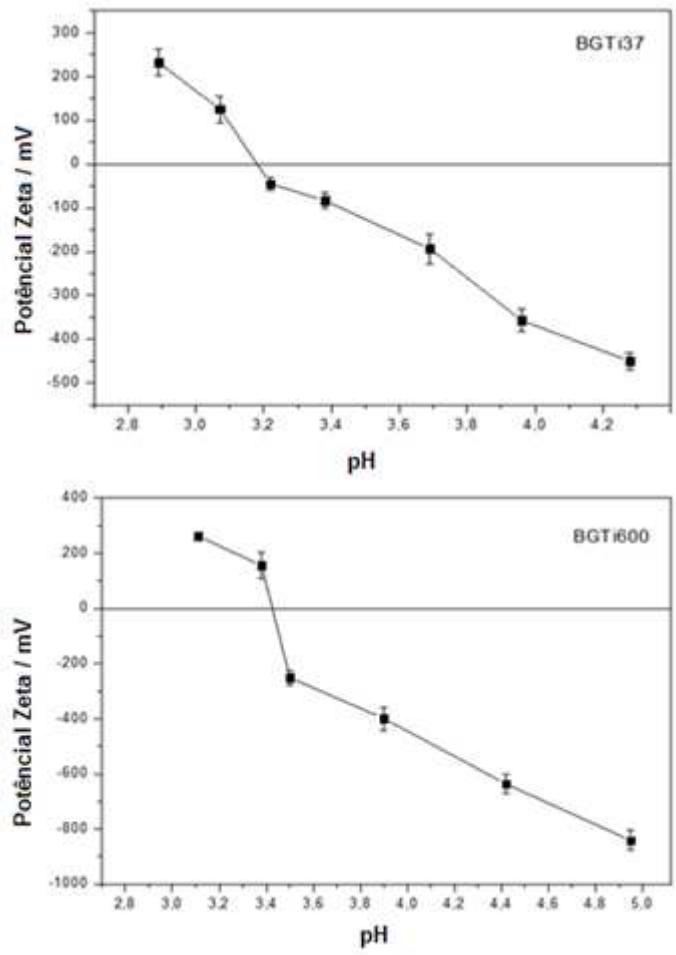


Figura 24 - Potencial Zeta correspondente aos filmes BGTi37 e BGTi600.

6.8. BIOATIVIDADE

A bioatividade dos materiais estudados foi analisada com relação à cinética de formação dos fosfatos de cálcio em SBF, viabilidade e colonização celular das amostras após serem expostas a cultura celular.

6.9. ESTUDO DA CINÉTICA DA BIOATIVIDADE *in vitro*.

A presença da banda de P-O (a), já nas primeiras 7 horas de imersão em SBF, é observada tanto para o material BGTi37 como para o titânio puro, mas é ausente no material BGTi600, Figura 25.

Ao longo do tempo de imersão, todas as amostras passam a apresentar a banda em 560 cm^{-1} , tendo sua intensidade aumentada, o que pode ser verificado nos espectros de DRIFT, Figuras 25 a 27, devido ao maior tempo de exposição ao fluido, o que permite a precipitação dos fosfatos de cálcio. Para melhor observação das bandas estudadas os espectros de DRIFT foram ampliados na região de $700\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$.

A cinética de formação e deposição da HCA, foi estudada pela razão das intensidades I_a/I_b , que correspondem as intensidades das bandas relacionadas a P-O (a) e Ti-O-Ti (b), Figura 28. Observa-se que, quando são comparados os materiais e o titânio, o BGTi37, tratado a temperatura ambiente, possui velocidade de deposição superior aos demais. Já o material BGTi600, apresenta uma velocidade de deposição inferior a todos.

A cinética de formação do fosfato foi avaliada utilizando-se a razão I_a/I_c , sendo I_c a intensidade da banda relacionada ao Si-O (c). Nota-se que os materiais BGTi37 e BGTi600, mantêm um comportamento similar ao observado anteriormente para a cinética de formação da HAC. Sendo, no material BGTi37 a formação do fosfato é mais acelerada que no material BGTi600, Figura 29.

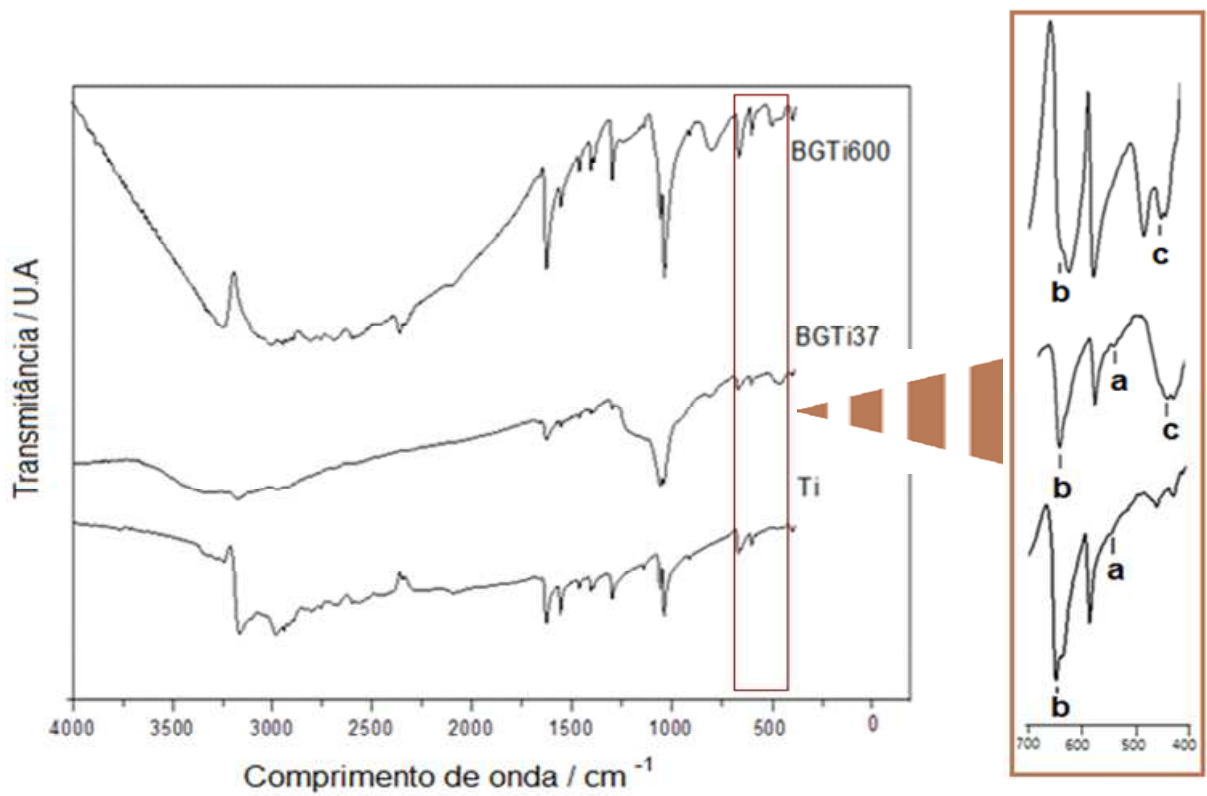


Figura 25 - Espectro de transmitância de DRIFT, na região de 4000 – 400 cm⁻¹ para os materiais BGTi600, BGTi37 e Titânio em SBF por 7 horas.

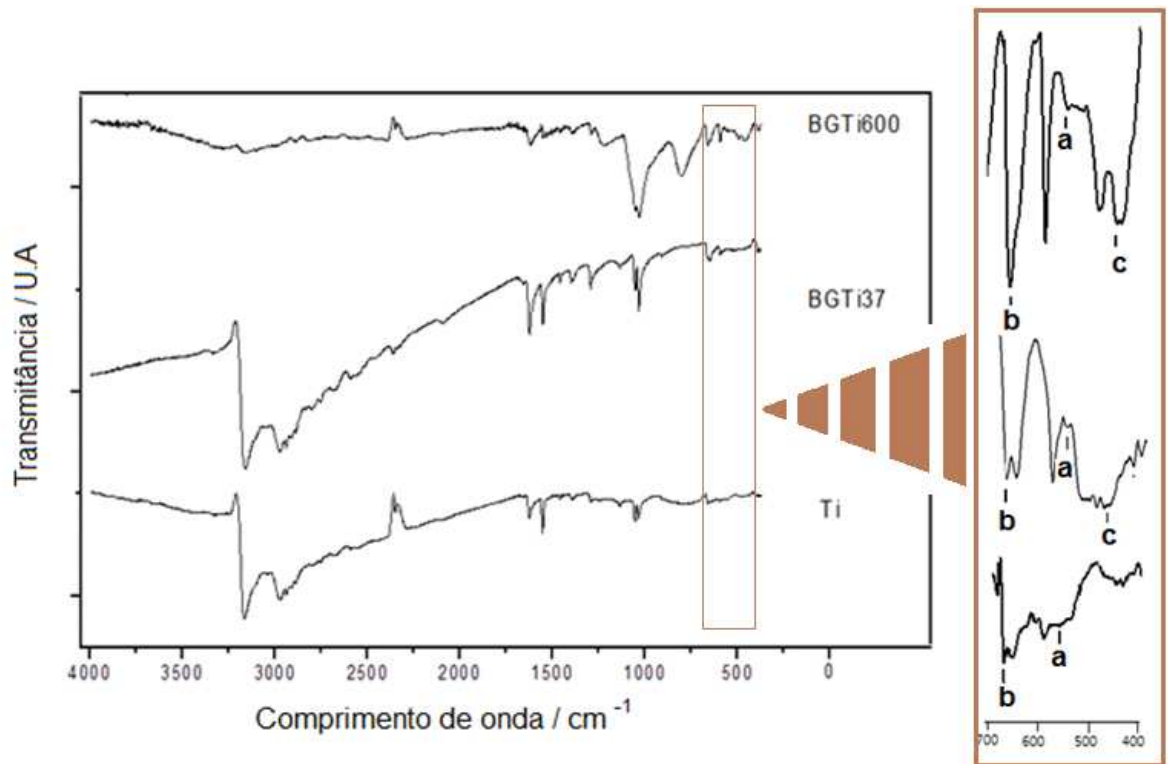


Figura 26 - Espectro de transmitância de DRIFT, na região de 4000 – 400 cm⁻¹ para os materiais BGTi600, BGTi37 e Titânio em SBF por 24 horas.

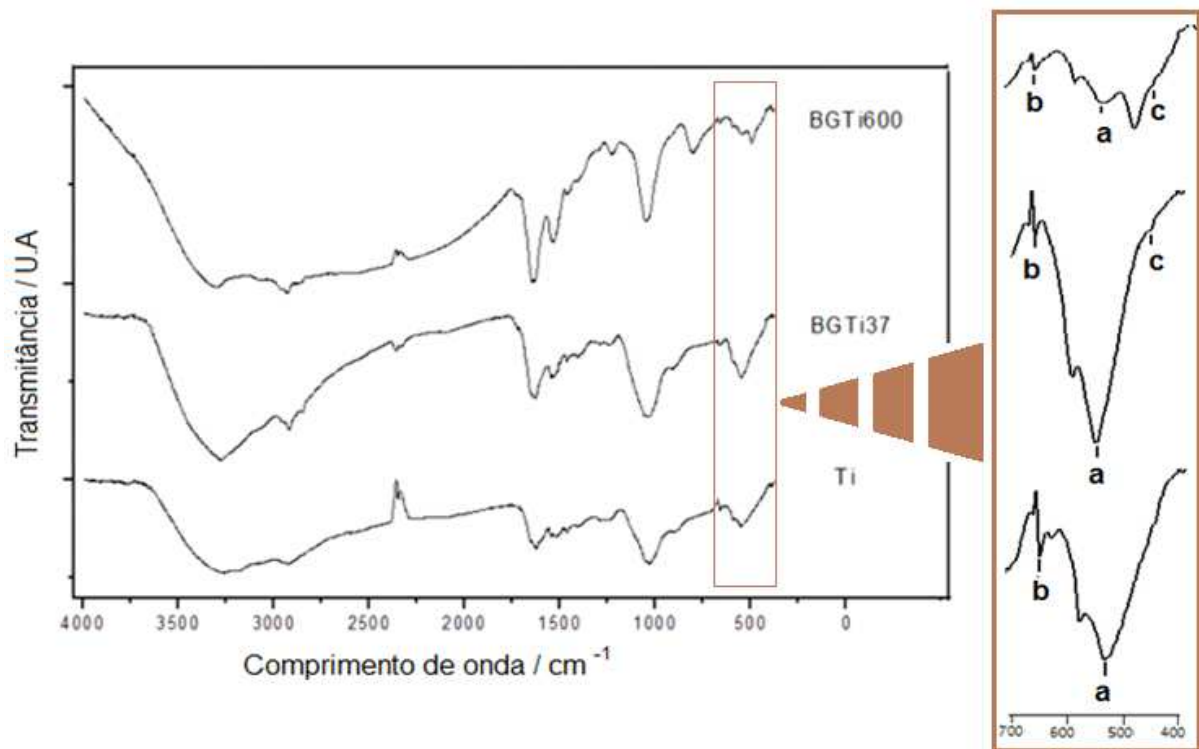


Figura 27 – Espectro de transmitância de DRIFT, na região de $4000 - 400\text{cm}^{-1}$ para os materiais BGTi600, BGTi37 e Titânio em SBF por 160 horas.

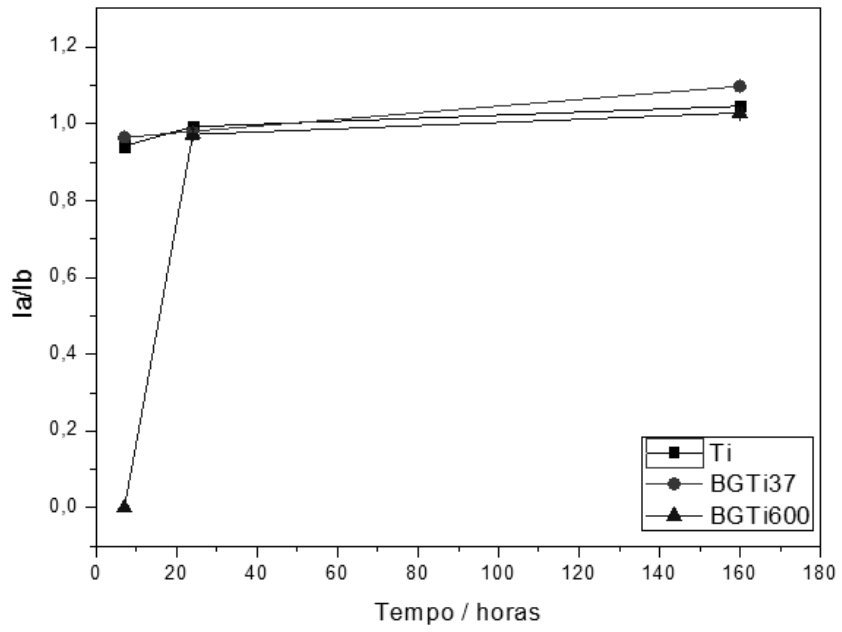


Figura 28 – Cinética de formação da HCA *in vitro*, medida como a razão Ia/Ib.

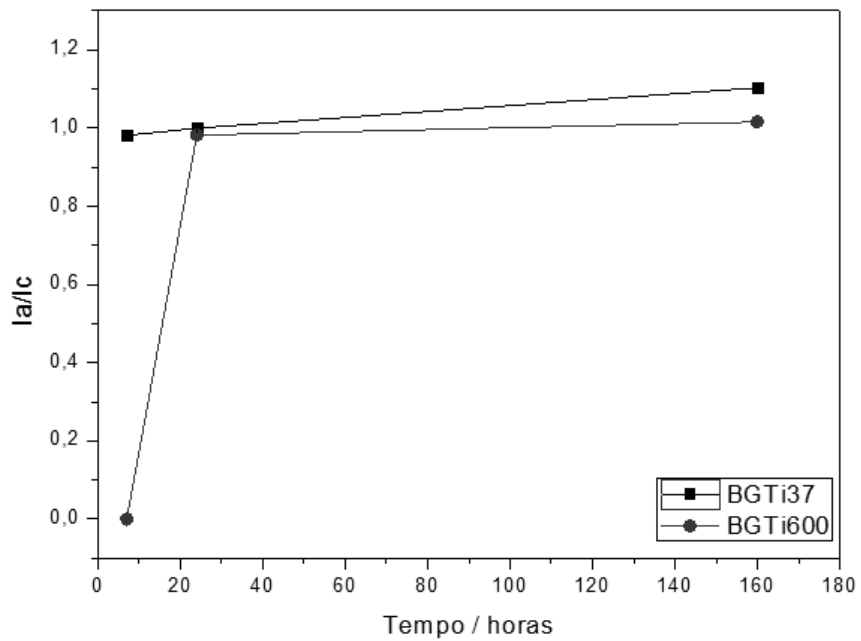


Figura 29 – Cinética de formação da HCA *in vitro*, medida como a razão Ia/Ic.

6.9.1. ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

As Figuras 30 A 32 apresentam os difratogramas obtidos com geometria rasante para as amostras do substrato de titânio, Figura 30, e dos materiais BGTi37, Figura 31, e BGTi600, Figura 32, após a imersão desses materiais em SBF por 160 horas. Os padrões de difração estão em concordância com os arquivos de referencia do programa *Crystallographica Search - Match Version 3,0 Copyright© 1996-1999, Oxford Cryosystems*, seguindo os arquivos PDF 1-1197 Ti, PDF 2-387 TiO₂ (Anatásio), PDF 13-1122 TiO₂ (Rutilo) e PDF18-303 Ca₃(PO₄)₂ xH₂O (ACP).

Os difratogramas evidenciaram que as amostras apresentam o mesmo comportamento com o que foi encontrado antes da imersão em SBF, com a presença tanto do titânio, como seus óxidos anatásio e rutilo. No material BGTi600, também é observado um pico referente ao fosfato de cálcio amorfo (ACP), evidenciando a atividade biológica dos materiais. A presença de fosfatos de cálcio é evidenciada em todos os materiais, nos espectros de infravermelho e XPS.

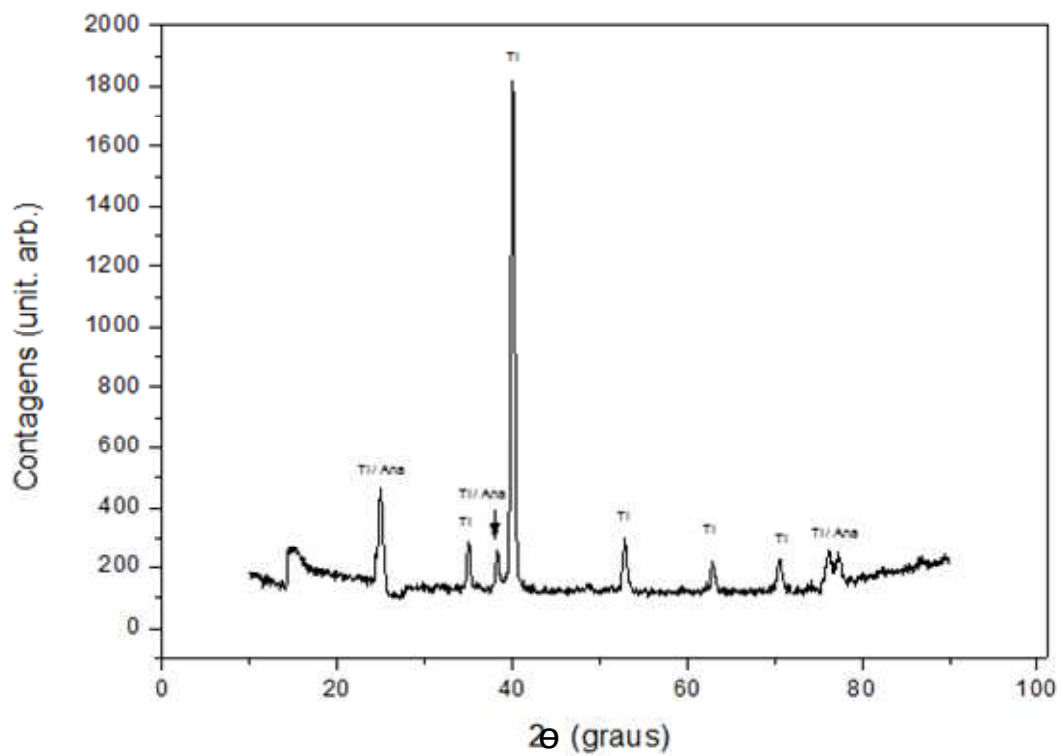


Figura 30–Difratograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante ($\theta = 1,5^\circ$), para o substrato titânio, imerso em SBF por 160 horas, onde Ti=titânio; ANA= anatásio.

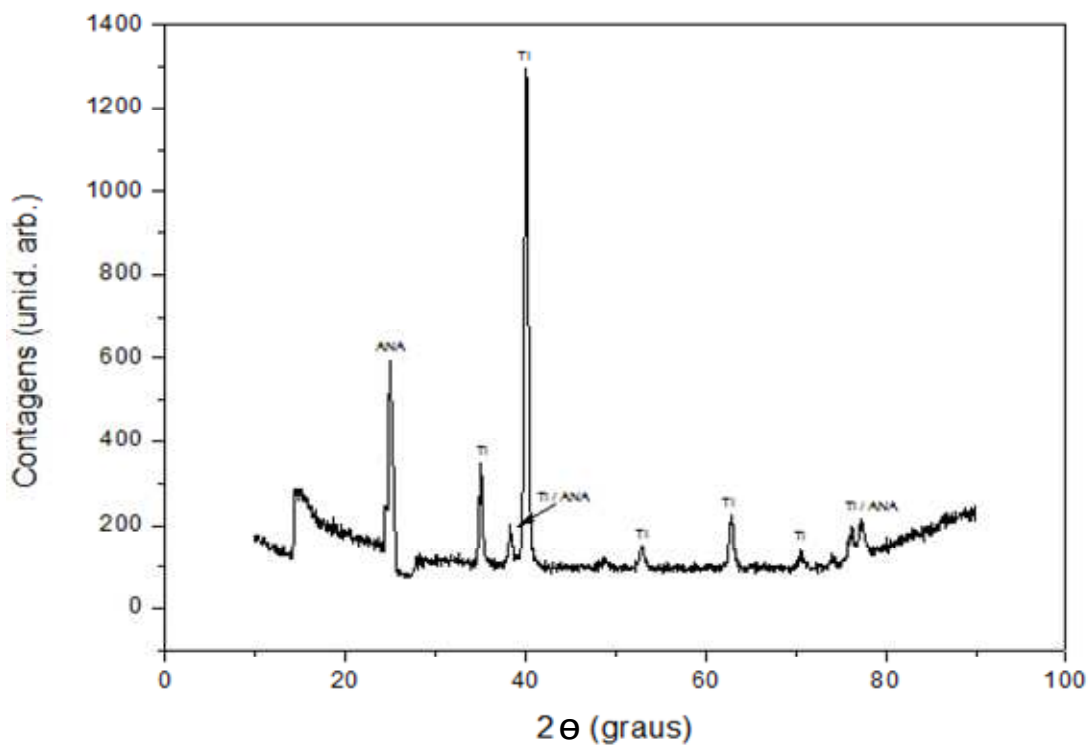


Figura 31 - Difratoograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante ($\theta=1,5^\circ$), para o BGTi37, onde Ti=titânio; ANA = anatásio e RUT = rutilo.

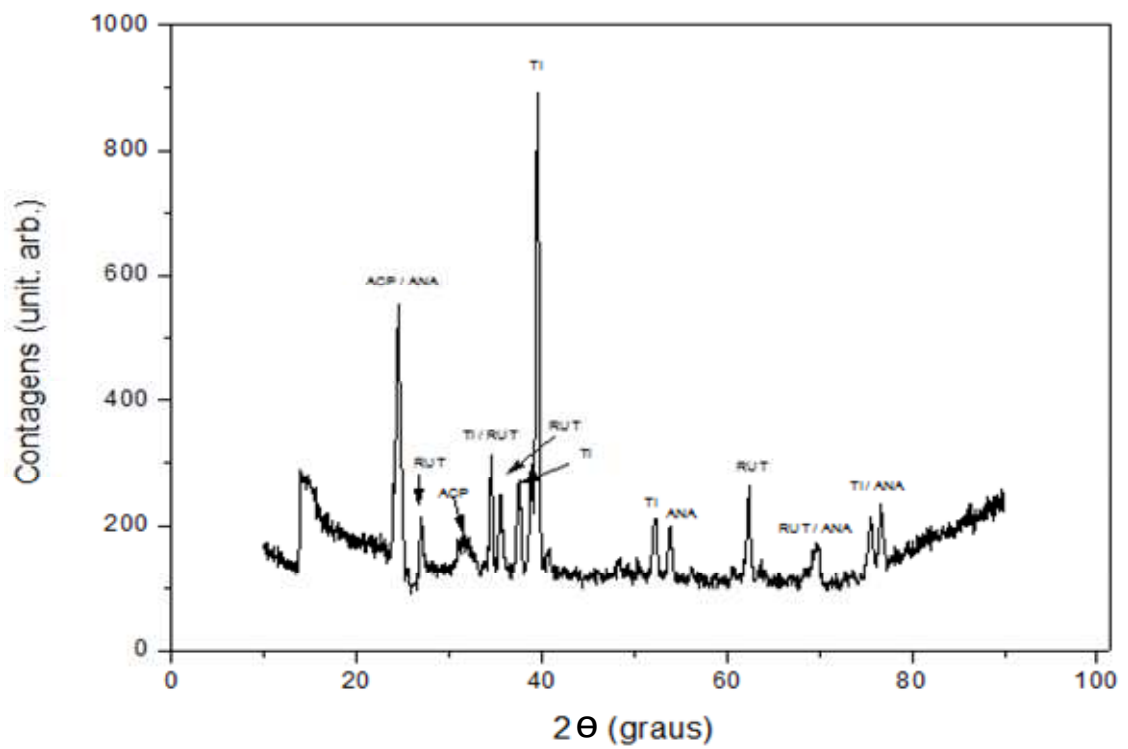


Figura 32–Difratograma de raios X obtido com geometria com ângulo rasante ($\theta=1,5^\circ$), para o BGTi600, onde Ti=titânio; ANA= anatásio, RUT= rutilo e ACP= fosfato de cálcio amorfo.

6.9.2. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS DE RAIOS X

Os espectros de XPS após a imersão em SBF mostraram a presença de fosfatos de cálcio precipitados na superfície dos materiais. No material BGTi37 e no substrato de titânio, foram encontrados cálcio em três formas: como cloreto de cálcio (a); fosfato de cálcio (b) e; carbonato de cálcio (c), Figuras 33 a 35. O cloreto de cálcio, assim como o nitrogênio são resíduos provavelmente da solução SBF. A quantidade de sílica detectada no BGTi37, neste caso, é muito baixa, menos de 1,5%, de forma que, é possível considerar que todo cálcio detectado é referente ao depositado na superfície. Desconsiderando a percentagem de cálcio, na forma de cloreto, a razão Ca/P foi, para o BGTi37 igual a 1,7, e para o titânio, 1,9, o que corresponde ao fosfato de cálcio amorfo carbonatato.

O material BGTi600, é mais complexo, no que se refere a razão do Ca/P. Dois picos referentes ao Ca foram encontrados e é provável que espécies formadas antes da precipitação em SBF podem ter sido detectadas. Isso porque a morfologia da superfície que faz com que os óxidos de titânio e os prováveis grupos Ca-TiO₂ e CaCO₃ estejam na superfície, sendo assim detectados juntamente aos precipitados como fosfatos de cálcio. A razão de Ca/P, para esse material, foi de 3,0, o que sugere que o cálcio presente não é apenas proveniente da precipitação em SBF.

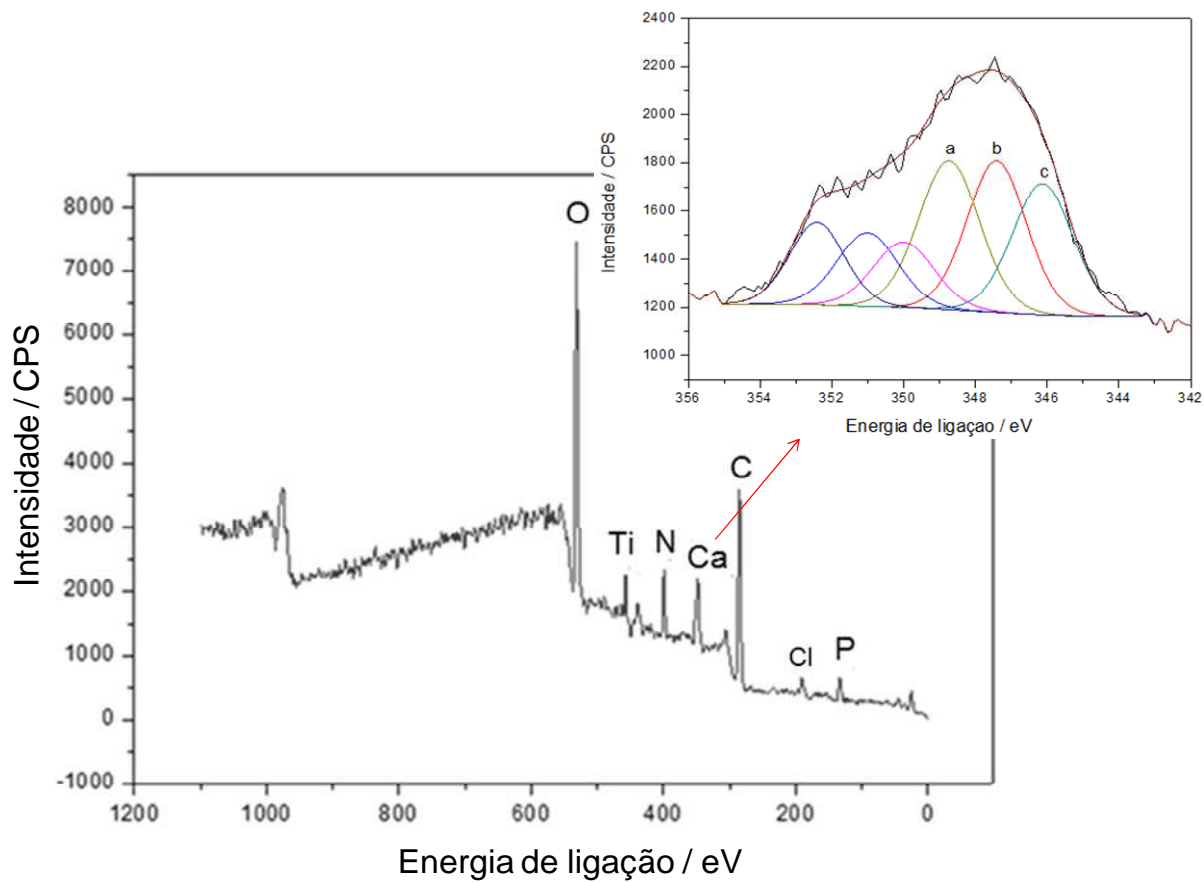


Figura 33—Espectro de XPS do titânio após imersão em SBF por 160 horas.

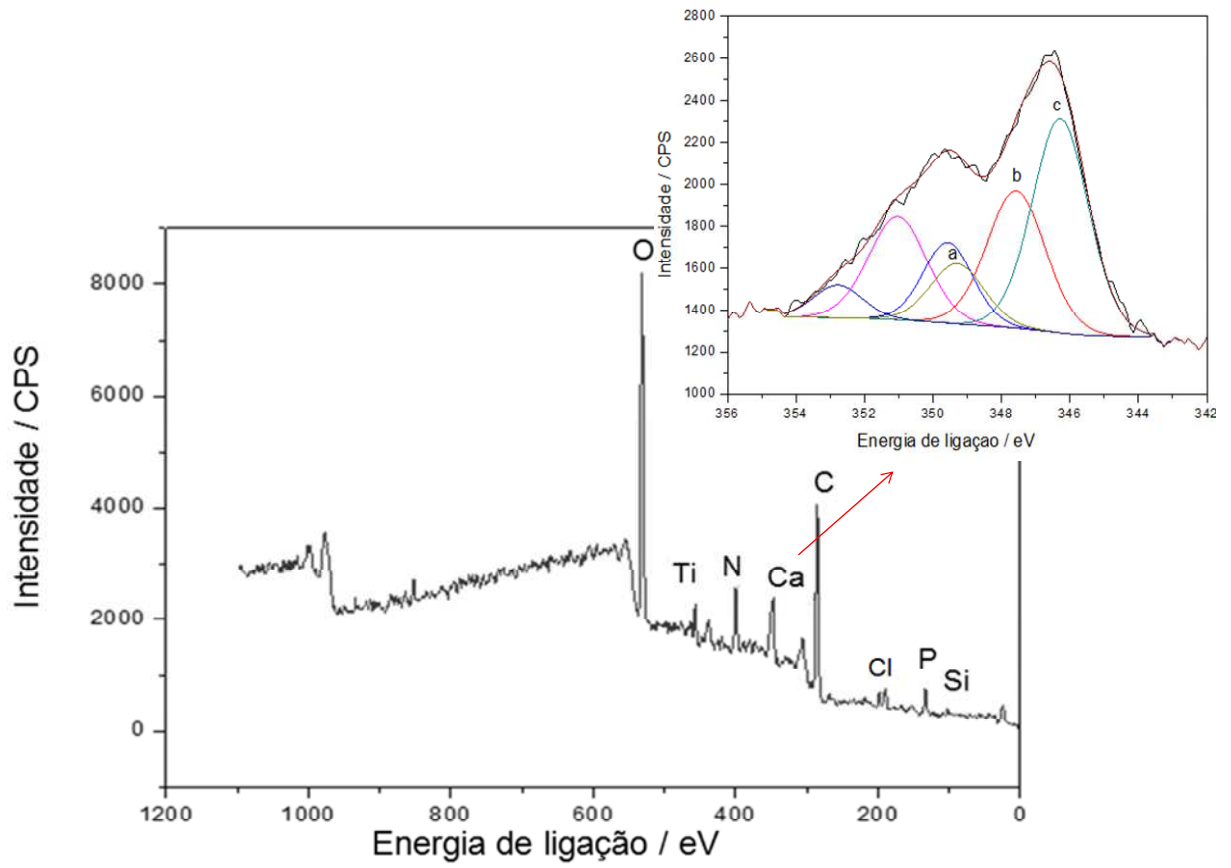


Figura 34—Espectro de XPS do BGTi37 após imersão em SBF por 160 horas.

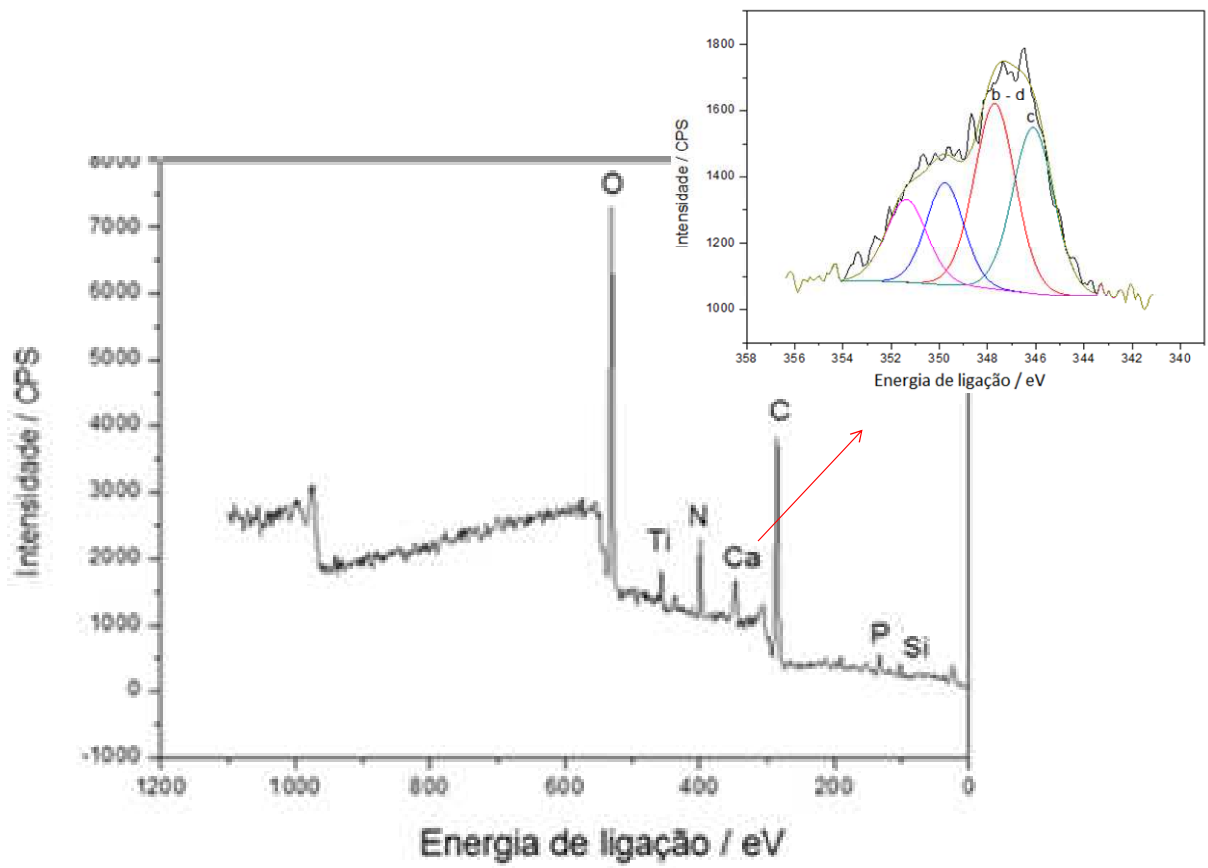


Figura 35 – Espectro de XPS do BGTi600 após imersão em SBF por 160 horas.

6.9.3. AVALIAÇÃO EM CULTURA CELULAR

O ensaio de MTT utilizado consiste na metabolização do substrato MTT por enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis, levando a formação de cristais de formazan. Estes cristais foram observados, por microscópio óptico na superfície dos materiais e do substrato puro. Após a formação dos cristais, esses foram solubilizados com SDS-10% HCl e realizada a leitura de absorbância a 595 nm. Na Figura 34 são apresentados os resultados obtidos. Observou-se que houve uma maior proliferação celular no material BGTi37, quando comparado ao controle. Um menor crescimento foi observado no material BGTi600, que apresentou uma diminuição da atividade mitocondrial em relação ao controle, esse comportamento pode ser devido a uma diferenciação celular que pode estar ocorrendo, para um tipo de célula com atividade mitocondrial menor do que as de partida. Já o substrato puro, por ser inerte, teve comportamento similar ao controle.

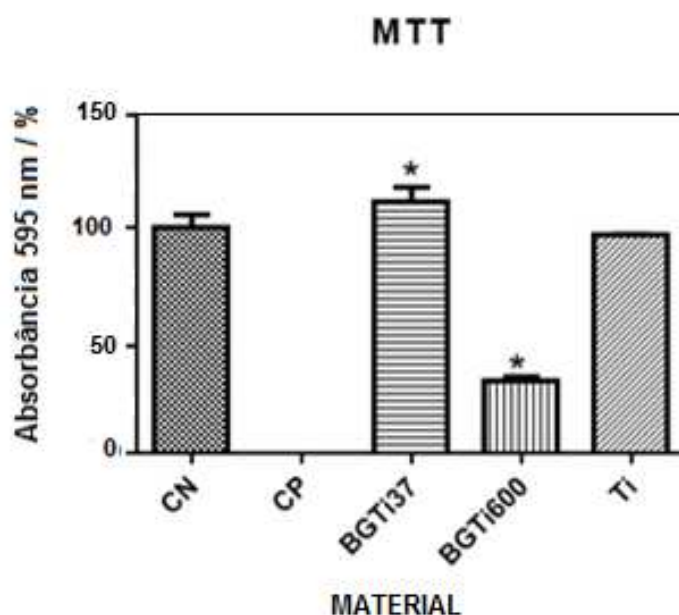


Figura 36 - Representação gráfica da proliferação celular avaliados pelo ensaio de MTT, onde CN= controle de viabilidade; CP= controle de morte; Ti= substrato puro e BGTi37 e BGTi600 são os respectivos materiais estudados.

6.9.4. ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (FA)

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada pelo ensaio de BCIP-NBT e os resultados estão expostos na Figura 35. Pode se observar que o material BGTi37 apresentou atividade ligeiramente superior ao controle, o substrato de titânio apresentou atividade semelhante ao controle. O material BGTi600 apresentou atividade inferior ao controle, esse comportamento pode ser devido a toxicidade deste material ou a uma diferenciação celular que pode estar ocorrendo, para um tipo de célula com atividade de fosfatase alcalina menor do que as de partida.

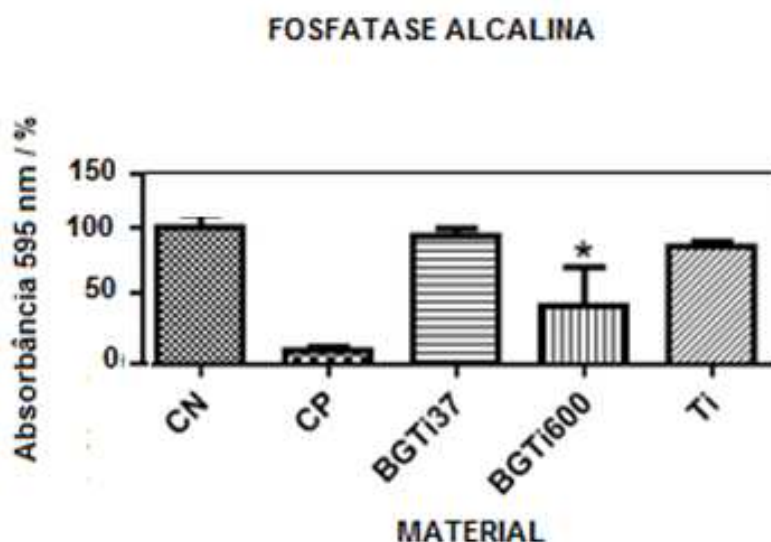


Figura 37 - Representação gráfica da atividade de fosfatase alcalina, onde CN= controle de viabilidade celular; CP= controle de morte; Ti= substrato puro e BGTi37 e BGTi600 são os respectivos materiais estudados.

6.9.5. AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO *in vitro* NAS SUPERFÍCIES DOS MATERIAIS

Os materiais, após 72 horas em cultura celular foram analisados por MEV. As imagens obtidas revelaram uma alta densidade celular presentes nos materiais estudados. As células apresentavam-se achatadas, em especial no material BGTi37, Figura 36, no qual a aderência celular foi muito pronunciada, com emissão de prolongamentos citoplasmáticos, aderidas a superfície, indicando a viabilidade deste material.

Esses resultados revelaram que as células foram capazes de aderir à superfície do material, estabelecer conexões entre elas, proliferar e penetrar até o interior das BGs. Portanto, a presença e o tamanho dos poros, e as rugosidades dos materiais foram adequados, permitindo a colonização. Esse mesmo comportamento é observado para o material BGTi600, Figura 37, o que indica que as células aderiram a esse material, mesmo ele apresentando uma leve toxicidade para a célula. Já no substrato puro, Figura 38, neste material, não foi evidenciada uma aderência tão efetiva das células, como para os materiais e é possível observar que, mesmo não apresentando toxicidade no teste de MTT, ocorreu apoptose celular, ou seja, morte celular, na superfície do material.

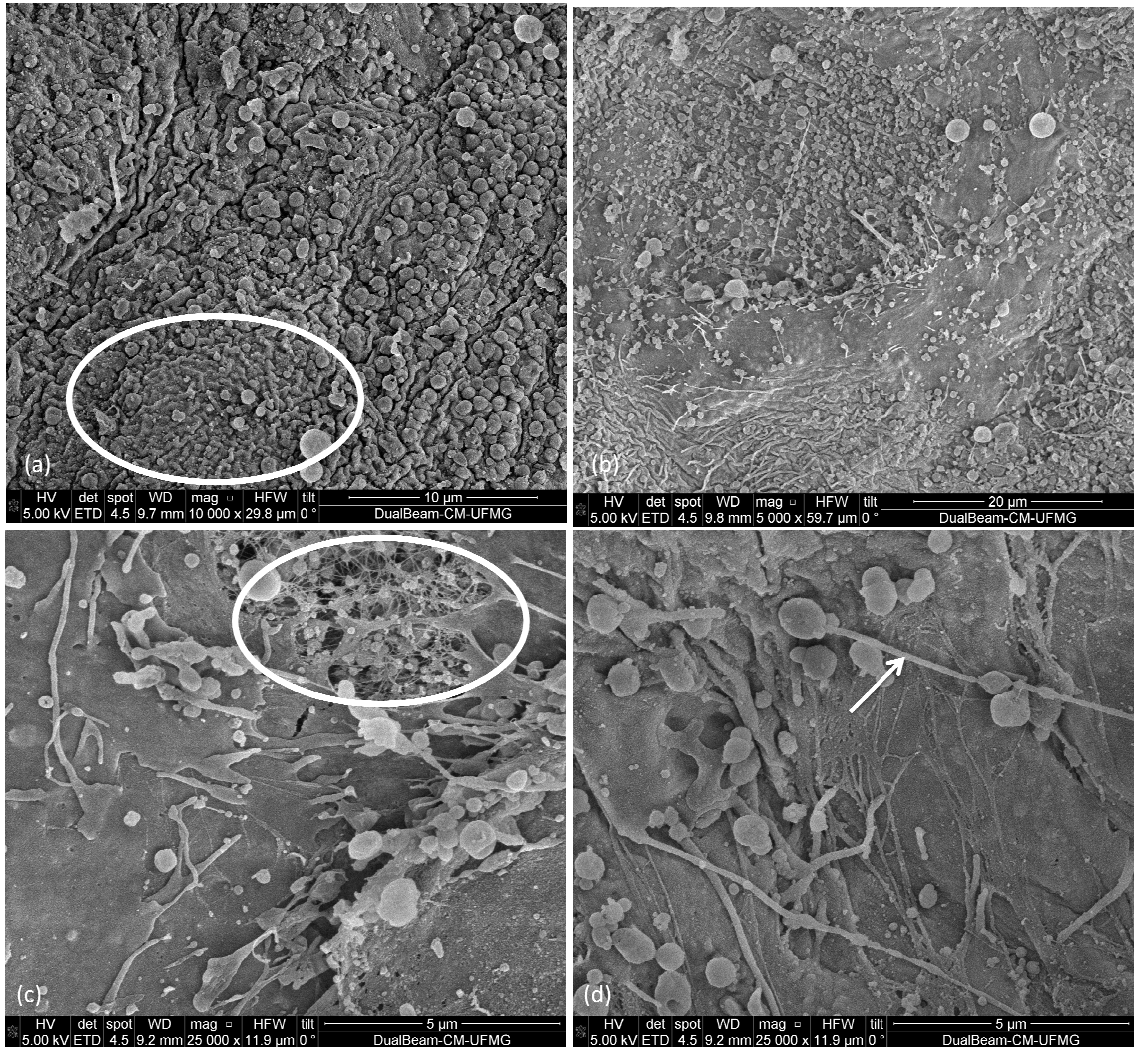


Figura 38—Imagens da MEV do material BGT37. Presença de células aderidas a superfície (a); proliferação celular sobre as células já aderidas ao material; (b); proliferação de células no interior dos poros dos materiais(c); interconexão com outras células através dos prolongamentos citoplasmáticos (d).

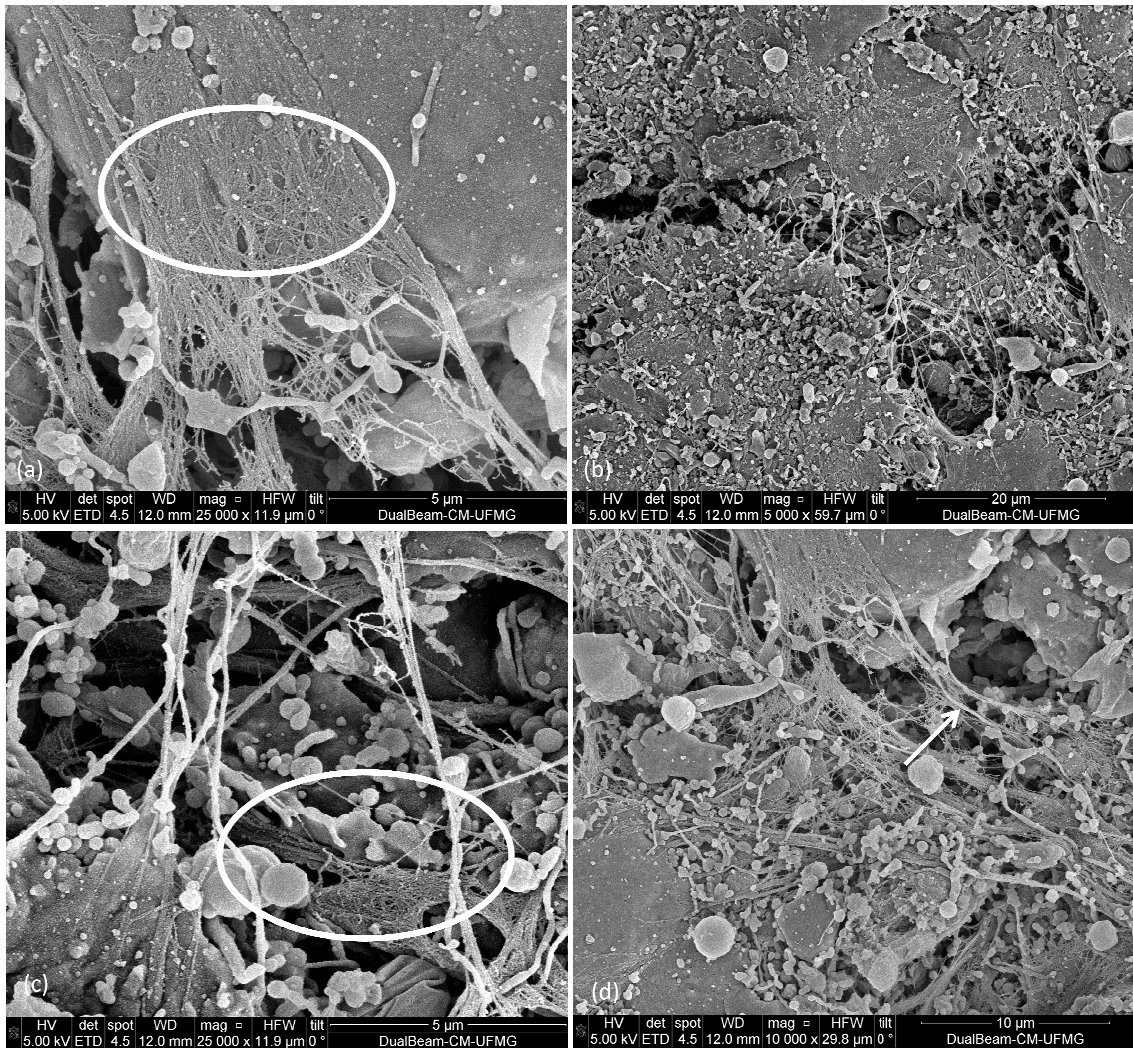


Figura 39 - Imagens da MEV do material BGT600. Presença de células aderidas a superfície (a); proliferação celular sobre as células já aderidas ao material; (b); proliferação de células no interior dos poros dos materiais (c); interconexão com outras células através dos prolongamentos citoplasmáticos (d).

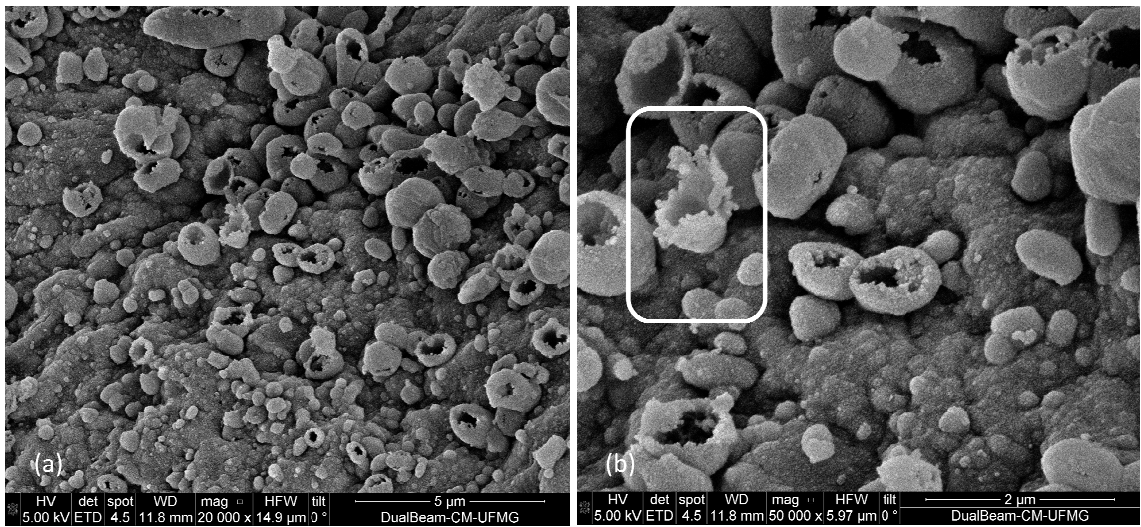


Figura 40 - Imagens da MEV do substrato de titânio, mostrando células pouco aderidas à superfície (a); apoptose celular (b).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou a formação de revestimentos de biovidros do sistema $(\text{SiO}_2)_{0,80}(\text{P}_2\text{O}_5)_{0,04}(\text{CaO})_{0,16}$ sobre implantes de titânio, grau 2, pela rota sol-gel, utilizando a técnica de “dip-coating”, com velocidade controlada.

Foram produzidos dois materiais variando apenas as condições de tratamento térmico após o processo de revestimento, sendo eles, o BGTi37 (temperatura ambiente), e BGTi600 (tratamento térmico à 600°C). Em ambos os casos foram produzidos filmes porosos de espessura na ordem de 300 e 400nm, para BGTi37 e BGTi600, respectivamente.

Quanto a morfologia, as análises AFM e MEV, mostraram que o material BGTi37 se apresentou mais uniforme, com rugosidade próxima a do substrato inicial. Já o material BGTi600, apresentou uma topografia irregular, com rugosidade mais elevada devido a presença de uma maior quantidade de óxido em sua superfície, proporcionado pelo aquecimento do mesmo em atmosfera aerada.

A aderência dos filmes ao substrato foi determinada segundo a norma ABNT MB 985 e foi relacionada ao grau GR 0, o que significa ótima aderência ao substrato, ou seja, após a remoção da fita adesiva da área analisada não foi encontrado nenhum destacamento dos filmes.

Com a espectroscopia de DRIFT foi possível evidenciar a formação dos materiais com revestimentos, quando comparados ao substrato. Já a análise de DRX com geometria rasante detectou óxidos pouco cristalinos, formados nas superfícies dos materiais, além do titânio, sendo o anatásio, no substrato e no material BGTi37 e o anatásio e o rutilo, no BGTi600. A fase rutilo é a fase mais estável e era esperado sua formação com o aquecimento no material BGTi600. A presença dos óxidos na superfície do substrato também foi evidenciada na análise de XPS.

As superfícies dos materiais foram analisadas por XPS, que revelou a presença dos componentes do BG e os óxidos de Ti. Os componentes dos materiais também foram determinados por EDS. Entretanto, em ambas as análises, não foi possível detectar o elemento fósforo nos filmes, devido à baixa quantidade presente. Para a confirmação da composição, foi realizada a análise de EDS em amostras em pó de biovidro, oriundo de síntese similar à dos filmes de biovidro presentes nos

materiais BGTi37 e BGTi600. Foi possível desta forma, confirmar a presença de Ca, Si, P e O.

Uma particularidade do material BGTi600, foi demonstrada pela análise de XPS, com relação ao cálcio presente. Duas espécies de cálcio foram detectadas: uma referente ao cálcio ligado à rede de sílica, $Ca_{2p_{3/2}}$ em 347,7 eV, outra relacionada ao $Ca_{2p_{3/2}}$, em 346.5 eV, referente ao cálcio ligado ao óxido de titânio.

Com relação à bioatividade dos materiais, o estudo da cinética de formação *in vitro* da apatita carbonatada em SBF, mostrou que no material BGTi37 a HAC se forma ligeiramente mais rápido do que nos demais, sendo que, no BGTi600, a velocidade é a menor. A análise de viabilidade celular, pelo método de MTT, também acompanhou o resultado obtido para a cinética de formação da HAC. Em 72 horas, o material BGTi37 apresentou uma resposta superior ao controle, ou seja, a viabilidade celular neste material é grande. O BGTi600 apresentou resposta inferior ao controle. O substrato, por ser inerte se manteve igual ao controle. Uma das explicações para esse comportamento pode estar relacionada à carga superficial dos materiais. Embora exista apenas a uma pequena diferença no pH correspondente ao ponto isoelétrico do BG é evidenciado uma diferenciação significativa na bioatividade dos materiais. E neste caso, o material BGTi600 apresentou ponto isoelétrico em pH superior ao BGTi37. Para a análise de fosfatase alcalina, o material BGTi37 e o substrato não apresentaram variações significativas, no tempo de 72 horas de análise, quando comparado ao controle. Para o BGTi600, a resposta foi inferior a do controle.

As amostras após a imersão em SBF, por 160 horas, foram analisadas por DRX e suas superfícies por XPS. Para o material BGTi37 e para o substrato, os DRX não apresentaram grandes variações do que havia sido encontrado antes da imersão das amostras em SBF. Já para o material BGTi600, além das fases rutilo e anatásio, foram observados picos com baixa cristalinidade, provavelmente referentes aos fosfatos de cálcio amorfos precipitados e/ou a presença de nanomateriais. A análise de XPS revelou presença de fosfatos de cálcio amorfos nos materiais, sendo a razão de Ca/P de 1,7 e 1,9 para o BGTi37 e para o substrato puro, respectivamente. No material BGTi600, devido ao fato das espécies de cálcio detectadas não serem apenas referentes apenas aos fosfatos de cálcio precipitados

em SBF, mas também de outras espécies, como o Ca-TiO₂, a razão Ca/P não foi possível afirmar qual fosfato estaria presente na amostra.

A avaliação da colonização *in vitro* na superfície dos materiais apresentou para todos os materiais alta densidade celular, células achatadas, em especial no material BGTi37, com emissão de prolongamentos citoplasmáticos, o que indica a aderência das células no material. Para o material BGTi600 a proliferação celular se mostrou menor, quando comparado ao BGTi37. No substrato foi observada baixa adesão celular, quando comparado aos materiais revestidos, o que mostra uma maior eficiência destes em relação ao titânio puro. A ocorrência de apoptose celular no titânio sem revestimento pode ter ocorrido devido à baixa aderência das células no substrato.

Sendo assim, considerando os testes *in vitro*, o material BGTi37 apresentou-se mais indicado para a utilização como implante ósseo, quando comparado com o titânio comercial e com o material BGTi600.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES

- Avaliar a capacidade de regeneração óssea promovida pelos materiais *in vivo*;
- Realizar o tratamento térmico em diferentes temperaturas e intervalos de tempo para avaliar a bioatividade nestas diferentes condições.
- Avaliar a capacidade de incorporação de fármacos aos materiais, assim como sua liberação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al, N. A. B. e. Nanotechnology - Jeffrey L. Hutter and John Bechhoefer, Rev. Sci. Instrum. 64 (7), (1993): Sci. Instrum. . 14: 1-6 p. 1993.

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. The utilization of materials obtained by the sol-gel process in biosensors construction. Química Nova v. 25, n. 1, p. 835-841, 2002.

Alves, O. L.; Ronconi, C. M.; Galembeck, A. etallo-organic decomposition: A chemical approach to thin film deposition. Química Nova, v. 25, n. 1, p. 69-77, 2002.

Andrade, A. L.; Ferreira, J. F.; Domingues, R. Z. Zeta potential measurement in bioactive collagen. Materials Research, v. 7, n. 4, p. 631-634, 2004.

Andrade, Â. L.; Andrade, S. P.; Domingues, R. Z. In vivo performance of a sol-gel glass-coated collagen. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, v. 79B, n. 1, p. 122-128, 2006. ISSN 1552-4981. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.30521>>.

Arfsten, N. J. et al. Method for making antireflection coatings form heat-treatable inorganic substrates . 2003.

Balachandran, U.; EROR, N. G. Raman Spectra of Titanium Dioxide. Journal of Solid State Chemistry, v. 42, p. 276-282, 1982.

Bellucci, D.; Cannillo, V.; Sola, A. Shell Scaffolds: A new approach towards high strength bioceramic scaffolds for bone regeneration. Materials Letters, v. 64, n. 2, p. 203-206, 1/31/ 2010. ISSN 0167-577X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X09008179>>.

Bellucci, D. et al. Macroporous Bioglass®-derived scaffolds for bone tissue regeneration. Ceramics International, v. 37, n. 5, p. 1575-1585, 7// 2011. ISSN 0272-8842. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884211000691>>.

Betz, P.; Hintze-Buning, H. Scratch-resistant sol-gel coating for clear powder- slurry lacquer 2002.

Blohowiak, K. Y.; Osborne, J. H.; Krienke, K. A. Sol-gel coated metal 1999.

Born, R. et al. Surface analysis of titanium based biomaterials. J Anal Chem, v. 361, p. 697-700, 1998.

Brinker, C.; Scherer, G. Sol-Gel Science, The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. Boston, San Diego, New York, London, Sydney, Tokyo, Toronto: 1990. 912 ISBN 978-0-12-134970-7.

Callister, W. D. Materials Science and Engineering: an introduction. New York: John Willey & Sons, 2001.

Cannillo, V.; Sola, A. Potassium-based composition for a bioactive glass. Ceramics International, v. 35, n. 8, p. 3389-3393, 12// 2009. ISSN 0272-8842. Disponible em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884209002508>.

Castle, J. E. Practical surface analysis by Auger and X-ray photoelectron spectroscopy. D. Briggs and M. P. Seah (Editors). John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1983, 533 pp., £44.50. Surface and Interface Analysis, v. 6, n. 6, p. 302-302, 1984. ISSN 1096-9918. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1002/sia.740060611>.

Charrière, E.; Lemaitre, J.; Zysset, P. Hydroxyapatite cement scaffolds with controlled macroporosity: fabrication protocol and mechanical properties. Biomaterials, v. 24, n. 5, p. 809-817, 2// 2003. ISSN 0142-9612. Disponible em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961202004064>.

Chen, Q.; Mohn, D.; Stark, W. J. Optimization of Bioglass® Scaffold Fabrication Process. Journal of the American Ceramic Society, v. 94, n. 12, p. 4184-4190, 2011. ISSN 1551-2916. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1551-2916.2011.04766.x>.

Chen, Q. Z.; Thompson, I. D.; Boccaccini, A. R. 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, n. 11, p. 2414-2425, 4// 2006. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961205010422>>.

Corriu, R. J. P.; Leclercq, D. Recent developments of molecular chemistry for sol-gel process. 35: 1420- 1436 p. 26 Jul.1996.

Crook, R. A. Mercaptofuncional silanes to deposit sol-gel coatings on metals 2001.

Cullity, B. D. *Elements of X-Ray Diffraction*. 2. 1978. 569p

Dávid, A. et al. Mechanical and histological evaluation of hydroxyapatite-coated, titanium-coated and grit-blasted surfaces under weight-bearing conditions. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v. 114, n. 2, p. 112-118, 1995/02/01 1995. ISSN 0936-8051. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00422838>>.

De Aza, P., N. et al. *Bol. Soc. Esp. Ceram.*, 2007.

de Souza, G. B. *Caracterizações Físicas, Químicas e de Bioatividade de Superfícies de Titânio Modificadas para Aplicação Biomédica*. . 2010. Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Paraná. , Curitiba.

Dedavid, B. A.; Gomes, C. I.; Machado, G. *Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. Porto Alegre 2007.

Domingues, R. Z.; Clark, A. E.; Brennan, A. B. A sol-gel derived bioactive fibrous mesh. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 55, n. 4, p. 468-474, 2001. ISSN 1097-4636. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/1097-4636\(20010615\)55:4<468::AID-JBM1038>3.0.CO](http://dx.doi.org/10.1002/1097-4636(20010615)55:4<468::AID-JBM1038>3.0.CO)>.

Domingues, R. Z. ; Andrade, A. L. . *Processo para obtenção de um revestimento bioativo de fosfato de cálcio sobre substratos sólidos*. 2002, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. PI02006987,06/02/2002, título: "Processo para obtenção de um revestimento bioativo de fosfato de cálcio sobre substratos sólidos" ,

Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
Instituição(ões) financiadora(s): UFMG.

Doostmohammadi, A. et al. A comparative physico-chemical study of bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite. *Ceramics International*, v. 37, n. 5, p. 1601-1607, 7// 2011. ISSN 0272-8842. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884211001209>>.

Dorozhkin, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, v. 31, n. 7, p. 1465-1485, 3// 2010. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961209012782>>.

Dorozhkin, S. V. Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art. *J. Funct. Biomater*, v. 1 n. 1, p. 22-107 2010.

Ducheyne, P.; Qiu, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, v. 20, n. 23-24, p. 2287-2303, 12// 1999. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961299001817>>.

Dutoit, D. C. M.; Schneider, M.; Baiker, A. Titania-Sílica Mixed Oxides: I. Influence of Sol-Gel and Drying Conditions on Structural Properties. *Journal of Catalysis*, v. 153, n. 1, p. 165-176, 4/15/ 1995. ISSN 0021-9517. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021951785711189>>.

Durgalakshmi, D ; Rakkesh, R. A.; Balakumar, S. "Stacked Bioglass/TiO₂ nanocoatings on titanium substrate for enhanced osseointegration and its electrochemical corrosion studies". *Applied Surface Science*, Sept 15, 2015, Vol.349, p.561(9).

Emadi, R.; Roohani Esfahani, S. I.; Tavangarian, F. A novel, low temperature method for the preparation of β -TCP/HAP biphasic nanostructured ceramic scaffold from natural cancellous bone. *Materials Letters*, v. 64, n. 8, p. 993-996, 4/30/ 2010. ISSN 0167-577X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X10001060>>.

Fanderlick, I. Optical properties of glass. United States: Elsevier Science Pub., New York, NY, 1983.

Feltrin, J. S., M.N.Hotza, A.Feltrin, A.M.De Noni Jr., D.De Noni Jr., J.A.Bernardin, J.A.Labrincha, J.A. Photocatalytic surfaces of titania on ceramic substrates. Part I: Synthesis, structure and photoactivity Superfícies fotocatalíticas de titânia em substratos cerâmicos. Parte I: Síntese, estrutura e fotoatividade. Ceramica, v. 59, n. 352, p. 620-632, 2013.

Ferrão, M. F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. Tecno-lóg. Santa Cruz do Sul. 5: 63-85 p. 2001.

Fuller, M. P. E.; Griffiths, P. R. Diffuse reflectance measurements by infrared fourier transform spectrometry. Washington. 50: 1906-1910, p. 1978.

Furlong, R. J.; Osborn, J. F. Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. Journal of Bone and Joint Surgery - Series B, v. 73, n. 5, p. 741-745, 1991. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025898856&partnerID=40&md5=b5d605587270d3e4e63eabd1a522b71d>>.

Gmes, L. A. et al. Chemical and mechanical properties of anodized cp-titanium in NH₄ H₂PO₄/NH₄F media for biomedical applications. Surface & Coatings Technology, v. 206, p. 4791-4798., 2012.

George, J. Preparation of Thin Films: Marcel Dekker Inc. 1992.

Gerhardt, L. C.; Boccaccini, A. R. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering., v. 3, n. 7, p. 3867-3910. , 2010.

Gorustovich, A. A.; Roether, J. A.; al., e. "Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. Tissue Engineering Part B: Reviews, v. 16, n. 2, p. 199-207, 2009.

Grigal, I. P. et al. Correlation between bioactivity and structural properties of titanium dioxide coatings grown by atomic layer deposition. Applied Surface Science, v. 258, p. 3415-3419, 2012.

Hanawa, T. In vivo metallic biomaterials and surface modification. Materials science & engineering A267, v. 267, n. 2, p. 260-266, 1999.

Hench, L. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 17, n. 11, p. 967-978, 2006/11/01 2006. ISSN 0957-4530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>>.

Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991. ISSN 1551-2916. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x>>.

Hench, L. L.; Wilson, J. e. *An Introduction to Bioceramics*. Singapore: 1993.

Hoppe, A.; Guldal, N. S.; Boccaccini, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, v. 32, n. 11, p. 2757-2774, 4// 2011. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211000056>>.

Kaczmarek, M.; Jurczyk, M. U.; Rubis, B.; Banaszak, A.; Kolecka, A.; Paszel, A.; Jurczyk, K.; Murias, M.; Sikora, J.; Jurczyk, M. "In vitro biocompatibility of Ti-45S5 bioglass nanocomposites and their scaffolds". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014, Vol.102(5), pp.1316-1324.

Kamal, M. et al. Structural and thermal properties of monolithic sílica-phosphate (SiO₂-P₂O₅) gel glasses prepared by sol-gel technique. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 58, n. 2, p. 507-517, 2011/05/01 2011. ISSN 0928-0707. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10971-011-2420-0>>.

Kawachi, A.; Tamao, K. Mixed reagent (aminosilyl)lithium/i-PrMgBr for the synthesis of functionalized oligosilanes. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 601, n. 2, p. 259-266, 4/28/ 2000. ISSN 0022-328X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022328X00000772>>.

Kokubo, T. *Bioceramics and their Clinical Applications*. Chubu University, Japan: 2008. 784 ISBN 978-1-84569-204-9.

Kokubo, T.; Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, v. 27, n. 15, p. 2907-2915, 5// 2006. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206000457>>.

Li, P. et al. Process of formation of bone-like apatite layer on sílica gel. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 4, n. 2, p. 127-131, 1993/03/01 1993. ISSN 0957-4530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00120381>>.

Li, P.; Zhang, F. The electrochemistry of a glass surface and its application to bioactive glass in solution. Journal of Non-Crystalline Solids, v. 119, n. 1, p. 112-118, 3// 1990. ISSN 0022-3093. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002230939090247J>>.

Lilja, M., A Astrand, M Stromme, M Enqvist, H. Influence of microstructure and chemical composition of sputter deposited TiO₂ thin films on in vitro bioactivity. Journal of materials science, v. 22, n. 12, p. 2727 -2734, 2011.

Lindberg, F. et al. Hydroxylapatite growth on single-crystal rutile substrates. Biomaterials, v. 29, p. 3317-3323, 2008.

Liu, X. et al. Bioactive calcium sílicate ceramics and coatings. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 62, n. 8, p. 526-529, 10// 2008. ISSN 0753-3322. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333220800231X>>.

Mahan, B. M.; Myers, R. J. Química : um curso universitário, tradução da 4ª edição americana. 1995. .

Maliska, A. M. Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise. Santa Catarina.: Universidade Federal de Santa Catarina: 97 p. 2003.

Mehdipour, M.; Afshar, A. A study of the electrophoretic deposition of bioactive glass-chitosan composite coating. Ceramics International, v. 38, n. 1, p. 471-476, 1// 2012. ISSN 0272-8842. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884211006687>>.

Minagar, S. et al. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. Acta Biomaterialia, v. 8, p. 2875-2888. , 2012.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 12/16/ 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034>>.

Nasr-Esfahani, M. et al. Bonding Strength, Hardness and Bioactivity of Nano Bioglass-Titania Nano Composite Coating Deposited on NiTi Nails. *Current Nanoscience*, v. 7, n. 4, p. 568-575, // 2011. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnano/2011/00000007/00000004/art00011>>. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/157341311796196844>>.

Newby, P. J. et al. Ag-doped 45S5 Bioglass®-based bone scaffolds by molten salt ion exchange: processing and characterisation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 22, n. 3, p. 557-569, 2011/03/01 2011. ISSN 0957-4530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10856-011-4240-8>>.

Nezafati, N. et al. Synergistically reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with bioactive glass fibers. *Ceramics International*, v. 37, n. 3, p. 927-934, 4// 2011. ISSN 0272-8842. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884210004566>>.

Olinger, J. M. E.; Griffiths, P. R. Effects of sample dilution and particle size/morphology on diffuse reflection spectra of carbohydrate systems in the near and mid-infrared. Part I: Single analytes. . *Baltimore: Appl. Spectrosc.* 47: 687-694 p. 1993a.

Oréface, R. L.; Hench, L. L.; Brennan, A. B. In vitro bioactivity of polymer matrices reinforced with a bioactive glass phase.: *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 11: 78-85 p. 2000.

Parra, B. S. et al. Rugosidade superficial de revestimentos cerâmicos. *Cerâmica Industrial*, v. 11, n. 2, p. 15-18, 2006.

Pasikatan, M. C. et al. Near infrared reflectance spectroscopy for online particle size analysis of powders and ground materials. . *J. Near Infrared Spectrosc.* Sussex. 9: 153-164, p. 2001.

Peltola, T. et al. Effect of aging time of sol on structure and in vitro calcium phosphate formation of sol-gel-derived titania films. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 51, n. 2, p. 200-208, 2000. ISSN 1097-4636. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200008\)51:2<200::AID-JBM8>3.0.CO](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200008)51:2<200::AID-JBM8>3.0.CO).

Popa, M. et al. Electrochemical deposition of bioactive coatings on Ti and Ti-6Al-4V surfaces. *Surface & Coatings Technology* v. 205, n. 20, p. 4776-4783, 2010.

Pugh, S. M. et al. Synthetic biomaterial compound of calcium phosphate phases particularly adapted for supporting bone cell activity . 2003.

Quinlan, E.; Partap, S.; Azevedo, M.; Jell, G.; Stevens, M. M.; O'Brien, F. J. "Hypoxia-mimicking bioactive glass/collagen glycosaminoglycan composite scaffolds to enhance angiogenesis and bone repair". *Biomaterials*, 2015, Vol.52, p.358(9).

Rahaman, M. N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 7, n. 6, p. 2355-2373, 6// 2011. ISSN 1742-7061. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706111001280>.

Rickerby, D. S.; Matthews, A. *Advanced Surface Coatings: a Handbook of Surface Engineering*: Blackie & Son Limited. 1991.

Rigo, E. C. S. et al. Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. *Materials Science and Engineering: C*, v. 24, n. 5, p. 647-651, 11/1/ 2004. ISSN 0928-4931. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493104000748>.

Saboori, A. et al. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO bioglass. *Materials Science and Engineering: C*, v. 29, n. 1, p. 335-340, 1/1/ 2009. ISSN 0928-4931. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493108001525>.

Santos Jr., E.; Kuromoto, N. K.; Soares, G. Mechanical properties of titania films used as biomaterials. *Materials Chemistry and Physics*, v. 102, p. 92-97, 2007.

Sides, P. J. et al. Calculation of the Streaming Potential near a Rotating Disk. *Langmuir*, v. 22, n. 23, p. 9765-9769, 2006/11/01 2006. ISSN 0743-7463. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/la061041x>>.

Soares, P.; Laurindo, C. A. H.; Torres, R. D.; Kuromoto, N. K.; Peitl, O; Zanott, E. D. "Effect of a bioactive glass-ceramic on the apatite nucleation on titanium surface modified by micro-arc oxidation." *Surface & Coatings Technology*, 2012, Vol.206 (22), pp.4601-4605.

Stan, G. E. et al. Bioactive glass thin films deposited by magnetron sputtering technique: The role of working pressure. *Applied Surface Science*, v. 256, n. 23, p. 7102-7110, 9/15/ 2010. ISSN 0169-4332. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433210007154>>.

Sul, Y.; Johansson, C. B.; Jeong, Y. e. a. Oxidized implants and their influence on the bone response. *J Mater Sci Mater Med*, v. 12:1025-31, 2001.

Valerio, P. et al. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, v. 25, n. 15, p. 2941-2948, 7// 2004. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203008536>>.

Vargas, G. et al. Effect of nano-sized bioactive glass particles on the angiogenic properties of collagen based composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 24, n. 5, p. 1261-1269, 2013/05/01 2013. ISSN 0957-4530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10856-013-4892-7>>.

Varila, L. et al. Surface reactions of bioactive glasses in buffered solutions. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 32, n. 11, p. 2757-2763, 8// 2012. ISSN 0955-2219. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955221912000398>>.

Velten, D.; Eisenbarth, E.; Schanne, N., et al. Biocompatible Nb₂O₅ thin films prepared by means of the sol-gel process. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 15, p. 457-461, 2004.

Vitale-Brovarone, C. et al. Foam-like scaffolds for bone tissue engineering based on a novel couple of silicate-phosphate specular glasses: synthesis and properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, n. 11, p. 2197-2205, 2009/11/01 2009. ISSN 0957-4530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10856-009-3788-z>>.

Vitale-Brovarone, C. et al. Bioactive glass-derived trabecular coating: a smart solution for enhancing osteointegration of prosthetic elements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 23, n. 10, p. 2369-2380, 2012/10/01 2012. ISSN 0957-4530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10856-012-4643-1>>.

Vitale-Brovarone, C., G Leonardi, EBaldini, NBretcanu, OVerne, EBaino, F. Resorbable Glass-Ceramic Phosphate-based Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Synthesis, Properties, and In vitro Effects on Human Marrow Stromal Cells. *Journal Of Biomaterials Applications*, v. 26, n. 4, p. 465-489, 2011.

Vitale-Brovarone, C. et al. Development of glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering: Characterisation, proliferation of human osteoblasts and nodule formation. *Acta Biomaterialia*, v. 3, n. 2, p. 199-208, 3// 2007. ISSN 1742-7061. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706106001000>>.

Vitale-Brovarone, C. et al. Biocompatible glass-ceramic materials for bone substitution. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, n. 1, p. 471-478, 2008/01/01 2008. ISSN 0957-4530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10856-006-0111-0>>.

Whitters, C. J. et al. Dental materials: 1997 literature review. *Journal of Dentistry*, v. 27, n. 6, p. 401-435, 8// 1999. ISSN 0300-5712. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030057129900007X>>.

Xu, H. H. K.; Burguera, E. F.; Carey, L. E. Strong, macroporous, and in situ-setting calcium phosphate cement-layered structures. *Biomaterials*, v. 28, n. 26, p. 3786-3796, 9// 2007. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961207004036>>.

Xu, H. H. K. et al. Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Biomaterials*, v. 27, n. 24, p. 4279-4287, 8// 2006. ISSN 0142-9612. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206002134>.

Yeh, J. M. et al. Anticorrosively enhanced PMMA-SiO₂ hybrid coatings prepared from the sol-gel approach with MSMA as the coupling agent. . *Surface & Coatings Technology* v. 201, p. 1788-1795, 2006.