

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA**

LUCIANA MENDES RIBEIRO DE SOUSA

**MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DA LIGA DE Ti6Al7Nb POR
NANOFILMES DE Al₂O₃ E REVESTIMENTO DE FOSFATO DE
CÁLCIO.**

São Paulo – SP

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

LUCIANA MENDES RIBEIRO DE SOUSA

**MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DA LIGA DE Ti6Al7Nb POR
NANOFILMES DE Al₂O₃ E REVESTIMENTO DE FOSFATO DE
CÁLCIO.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Prof(a). Dr(a). Anderson de Oliveira Lobo
Orientador(a)

Prof(a). Dr(a). Fernanda Roberta Marciano
Coorientador(a)

São Paulo – SP
2022

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).**

S697m SOUSA, Luciana Mendes Ribeiro de.

Modificação superficial da liga de Ti6Al7Nb por nanofilmes de Al₂O₃
e revestimento de fosfato de cálcio / Luciana Mendes Ribeiro de Sousa --
São Paulo: Universidade Brasil, 2022.

70 f.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do
Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo.

Coorientação: Profa. Dra. Fernanda Roberta Marciano.

1. Biomaterial. 2. Al₂O₃ por ALD. 3. Revestimento. 4. Apatita. 5. Liga
Ti-6Al-7N. I. Lobo, Anderson de Oliveira. II. Marciano, Fernanda Roberta.
III. Título.

CDD 610.28



UNIVERSIDADE
BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCIANA MENDES RIBEIRO DE SOUSA

"MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DA LIGA DE $Ti6Al7Nb$ POR NANOFILMES DE Al_2O_3 E REVESTIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr(a) Anderson de Oliveira Lobo (presidente-orientador)

Prof(a). Dr(a) Rodrigo Sávio Pessoa (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Thiago Domingues Stocco (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a). Antônio Francisco Machado Pereira (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ)

Prof(a). Dr(a). Ayrton de Sá Brandim (INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ)

São Paulo, 16 de dezembro de 2022.
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(e) Anderson de Oliveira Lobo

Houve alteração do Título: sim () não ():

Campus Itaquera
Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030
Central de Relacionamento com o Aluno - 08007807070
www.ub.edu.br



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DA LIGA DE Ti6Al7Nb POR NANOFILMES DE Al₂O₃ E REVESTIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO".

Autor(es):

Discente: **Luciana Mendes Ribeiro de Sousa**

Assinatura: *Luciana Mendes Ribeiro de Sousa*

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) ~~Arlierson de Oliveira Lobo~~

Assinatura: *[Assinatura]*

Coorientador(a): Prof.(a) Dr.(a)

Assinatura: _____

Houve alteração do Título: sim () não ():

Data: 16/12/2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amado esposo Emanuel Carlos Bento de Sousa.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, por permitir mais uma conquista profissional e superação de todos os obstáculos e desafios deste trabalho.

A minha família, pela admiração, respeito, incentivo e apoio.

Aos orientadores e professores: Dr. Anderson de Oliveira Lobo e Dr.^a Fernanda Roberta Marciano, que com muita paciência e gentileza contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica – PPGEb, em especial, ao professor: Prof. Dr. Drauzio E.N. Rangel. E, ao competente corpo docente do PPGEb pelos conhecimentos compartilhados ao longo dessa jornada.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica – PPGEb: Marcelo H. V. Mourão, Ilkilene, Oliveira Dênis e R. L. Furtado, pela convivência agradável durante as disciplinas e a troca de ideias e conhecimentos.

Ao Laboratório de Engenharia de Materiais do Instituto Federal do Piauí – IFPI, que contribuiu para análise e preparação de amostras realizadas em suas dependências.

Ao Laboratório de Tecnologia de Processos a Plasma do Instituto Tecnológico de Aeronáutica – ITA.

Aos Laboratórios da Universidade Federal do Piauí – UFPI, pelas análises realizadas em suas dependências.

Às agências financiadoras CNPq e CAPES.

“mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam.

(Isaías 40:31 Nova Versão Internacional – NVI)

RESUMO

Este trabalho estudou a modificação superficial da liga Ti6Al7Nb tratada por deposição de Al₂O₃ por Atomic Layer Deposition (ALD) e revestimento de apatita. Isso se deu com quatro grupos de amostras: amostras de substratos (grupo G1), amostras tratadas por deposição de Al₂O₃ por ALD (grupo G2), amostras com deposição de Al₂O₃ por ALD e revestidas com apatita por eletrodeposição (grupo G3) e amostras com deposição de Al₂O₃ por ALD e revestidas com apatita por imersão em solução de Simulated Body Fluid cinco vezes concentrada (SBF×5) (grupo G4). Esses grupos foram comparados, resultando na modificação microestrutural que proporcionou melhor resposta biológica, no caso, a produção de proteínas totais. Os grupos foram caracterizados por fluorescência de raios X (FRX), Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia Raman e Microscopia de Força Atômica (AFM). As caracterizações revelaram a composição química e cristalográfica da liga de titânio Ti6Al7Nb e após as modificações superficiais, confirmando a formação dos filmes alumínio-titânio (grupo G2) e alumínio-titânio-apatita (grupos G3 e G4). Os resultados revelaram cristais de apatitas laminares em forma de placas, e cristais irregulares, com aparência de flocos crescendo do centro para a borda e aparência de flores. Os tamanhos e índices de cristalinidades, assim como, a relação Ca/P mostraram valores dentro da faixa esperada para apatitas biológicas, sintética e não estequiométricas. Ensaio de citotoxicidade in vitro e quantificação de proteínas totais, relacionadas à calcificação da matriz extracelular foram realizados e mostraram que a liga sem tratamento apresentou maior afinidade celular, como pode ser visto no grupo G1, porém, as modificações da superfície Ti6Al7Nb por nanofilmes de Al₂O₃ por ALD e apatitas melhoraram a bioatividade e a produção de proteínas como mostrou os grupos experimentais G2, G3 e G4. A formação de microporosidade foi favorável à maior produção de proteínas totais, como observado no grupo G2. Além disso, influenciou na nucleação de apatitas em nanoescala, como mostra os grupos G3 e G4. Os resultados apresentados neste trabalho confirmaram a não citotoxicidade, sustentando fortemente a aplicação desses nanofilmes na engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Biomaterial, Al₂O₃, ALD, Revestimento, Apatita, Liga Ti6Al7Nb.

ABSTRACT

This work studied the surface modification of Ti6Al7Nb alloy treated by Al₂O₃ deposition by Atomic Layer Deposition (ALD) and apatite coating. This happened with four groups of samples: samples of substrates (group G1), samples treated by deposition of Al₂O₃ by ALD (group G2), samples with deposition of Al₂O₃ by ALD and coated with apatite by electroplating (group G3) and samples with deposition of Al₂O₃ by ALD and coated with apatite by immersion in a Simulated Body Fluid solution five times concentrated (SBF×5) (group G4). These groups were compared, resulting in the microstructural modification that provided a better biological response, in this case, the production of total proteins. The groups were characterized by X-ray fluorescence (FRX), Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS), Scanning Electron Microscopy (SEM), X-Ray Diffraction Spectroscopy (XRD), Raman Spectroscopy and Atomic Force Microscopy (AFM). The characterizations revealed the chemical and crystallographic composition of the titanium alloy Ti6Al7Nb and after surface modifications, confirming the formation of aluminum-titanium (group G2) and aluminum-titanium-apatite (groups G3 and G4) films. The results revealed laminar apatite crystals in the form of plates, and irregular crystals, with the appearance of flakes growing from the center to the edge and looking like flowers. The sizes and crystallinity indices, as well as the Ca/P ratio showed values within the expected range for biological, synthetic and non-stoichiometric apatites. In vitro cytotoxicity assays and quantification of total proteins related to calcification of the extracellular matrix were performed and showed that the untreated alloy had higher cellular affinity, as can be seen in the G1 group, however, the Ti6Al7Nb surface modifications by Al₂O₃ nanofilms by ALD and apatites improved bioactivity and protein production as shown by experimental groups G2, G3 and G4. The formation of microporosity was favorable to the greater production of total proteins, as observed in the G2 group. Furthermore, it influenced the nucleation of apatites at the nanoscale, as shown by the G3 and G4 groups. The results presented in this work confirmed the non-cytotoxicity, strongly supporting the application of these nanofilms in tissue engineering.

Keywords: Biomaterial, Al₂O₃, ALD, Coating, Apatite, Ti6Al7Nb Alloy.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Esse trabalho contribuiu para o estudo sobre a modificação da liga de titânio Ti6Al7Nb para aplicações na área de engenharia de biomédica. Os resultados revelaram que a liga sem tratamento (grupo G1) ao receber a deposição do nanofilmes alumínio-titânio (grupo G2) mostrou microporosidade melhor que a liga sem tratamento, pois apresentou a maior quantidade de produção de proteínas totais. Além disso, a microporosidade favoreceu a criação de núcleos responsáveis pela nucleação de apatita (grupos G3 e G4). Os resultados obtidos sustentam a capacidade de geração de células ósseas e a promissora aplicação em processos de osteossíntese e osteocondução. Além disso, os testes biológicos mostraram que as superfícies modificadas foram atóxicas, pois comprovaram ótima viabilidade celular dentro da norma ISO 10993.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração da interface metal/meio fisiológico a) titânio e meio fisiológico, b) interface titânio, c) camada de TiO ₂ e meio fisiológico	24
Figura 2	Semiciclos em ALD	26
Figura 3	Ilustração do ciclo ALD no sentido horário	26
Figura 4	Fluxograma das etapas de execução da metodologia.	25
Figura 5	Maquina de corte das amostras a) máquina de corte b) amostras de titânio	33
Figura 6	Insumos para preparação metalográfica das amostras	34
Figura 7	Lixamento e polimento das amostras utilizando politriz manual. a) politriz manual modelo Arotec b) lixamento com fluxo de água c) visualização do polimento em pano próprio e suspensão de alumina	34
Figura 8	Diagrama esquemático do reator térmico ALD e do ciclo ALD utilizados neste trabalho.	35
Figura 9	Materiais utilizados no sistema de eletrodeposição	36
Figura 10	Materiais utilizados no método biomimético com SBF	37
Figura 11	Resultados de caracterização por Espectro de EDS, MEV e Mapeamento por EDS das amostras antes e após o tratamento ALD e a eletrodeposição. (a) Grupos G1 (b) Grupo G2 (c) Grupo G3. Espectros EDS (a-1, b-1 e c-1). Imagem MEV da superfície (a-2, b-2 e c-2). Mapeamento de EDS (a-3, b-3 e c-3).	43
Figura 12	Difratogramas da liga Ti6Al7Nb sem e com o tratamento ALD e revestimento de apatitas revestidas por eletrodeposição e SBF. (a) Difratograma grupo G1. (b) Difratograma grupo G2. (c) Difratograma G3. (d) Difratograma grupo G4: (G4 200-7), 14 dias (G4 200-14) e 21 dias (G4 200-21). Espectro Raman dos grupos (e) G3 e (f) G4	45
Figura 13	Figura 1 – Imagens AFM em duas e três dimensões para uma área de varredura de 400 μ ² e 9 μ ² da liga polida e não tratada	46

- (a-1 e b-1) e da liga revestida com 200 nm Al_2O_3 por ALD (a-2 e b-dois)
- Figura 14 Grupo G4 com recobrimento de apatita depositado por SBF 5X 49
aos (a) 7 dias , (b) 14 dias e (c) 21 dias. Espectros EDS (a-1, b-1
e c-1). Imagem MEV (a-2, b-2c-2). Mapeamento EDS (a-3, b-3 e
c-3).
- Figura 15 Imagem SEM das superfícies da liga metálica não tratada (G1) 43
(a), com deposição de Al_2O_3 200 nm por ALD (G2) (b), revestida
com apatitas pelos métodos de eletrodeposição 70 °C por 4
horas (G3) (c) e revestidos pelo método biomimético SBFx5 por
(d) 7 dias (e) 14 dias e (f) 21 dias
- Figura 16 Resultados dos testes biológicos: a) citotoxicidade (ensaio 54
MTT), b) e análise de proteína total

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Característica da biocerâmica alumina.	28
Tabela 2	Composição química da liga de titânio, Ti6Al7Nb.	43
Tabela 3	Relação Ca/P, tamanho médio do cristalito e índice de cristalinidade dos grupos com revestimentos de apatita	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ap	Apatita
AFM	Microscopia de força atômica
ALD	Atomic Layer Deposition
ASTM	American Society for Testing and Materials
CCC	Cúbica de corpo centrado
COD	Crystallography Open Database
DRX	Difração de Raios – X
EDS	Espectroscopia de raios - X por Dispersão de Energia
FRX	Fluorescência de raios – X
HC	Hexagonal compacta
HAp	Hidroxiapatita
MEM-alpha	Meio de cultura MEM, com modificação alfa
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
OMS	Organização Mundial de Saúde
SBF	Simulated Body Fluid
TMA	Trimetilalumínio
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UFPI	Universidade Federal do Piauí
ISO	International standart organization
CEUA/ICTSJC	Comitê de ética do Instituto de ciências e tecnologia de São José dos Campos

LISTA DE SÍMBOLOS (Opcional)

°C	Graus Celsius
P.A	Puro para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
V	Voltagem
Ti	Elemento químico titânio
Al	Elemento químico alumínio
Nb	Elemento químico nióbio
V	Elemento químico vanádio
Ca	Elemento químico cálcio
P	Elemento químico fósforo
PO ₄	Íons fosfato
TiO ₂	Óxido de titânio
Ca ²⁺	Íon cálcio
PO ₄ ²⁻	Íon fosfato
Na ⁺	Íons sódio
Mg ²⁺	Íon magnésio
CO ₃ ²⁻	Íon carbonato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 LIGA DE TITÂNIO Ti6Al7Nb.....	23
3.2 DEPOSIÇÃO POR CAMADA ATÔMICA	25
3.3 ÓXIDOS DE ALUMÍNIO (Al ₂ O ₃).....	27
3.4 APATITAS PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA	29
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 OBTENÇÃO DA LIGA DE TITÂNIO Ti6Al7Nb	33
4.2 PREPARAÇÃO METALGRÁFICA DAS AMOSTRAS METÁLICAS	33
4.3 DEPOSIÇÃO DE Al ₂ O ₃ POR ALD	35
4.4 REVESTIMENTO DE APATITA POR ELETRODEPOSIÇÃO	35
4.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE METÁLICA	37
4.6.1 Espectrometria de fluorescência de raios-x.....	37
4.6.2 Difração de Raios X.....	38
4.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva	38
4.6.4 Microscopia de Força Atômica.....	39
4.6.5 Espectroscopia RAMAN	39
4.7 ENSAIOS IN VITRO	40
4.7.1 Isolamento celular	40
4.7.2 Ensaio de viabilidade celular	40
4.7.3 Quantificação de proteínas totais	41
4.7.4 Análise estatística	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 LIGA DE TITÂNIO Ti6Al7Nb ANTES E APÓS DEPOSIÇÃO DE Al ₂ O ₃ POR ALD.....	42
5.2 LIGA DE TITÂNIO Ti6Al7Nb APÓS OS REVESTIMENTOS DE APATITA.....	46
5.2 LIGA DE TITÂNIO Ti6Al7Nb APÓS OS REVESTIMENTOS DE APATITA.....	47
5.2 TESTES BIOLÓGICOS	54
6 CONCLUSÃO.....	57
Continuidade da pesquisa	58
Contribuição da pesquisa	58

REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO A – Obtenção da liga Ti6Al7Nb.....	69

1 INTRODUÇÃO

Acidentes de trânsito viraram um problema de saúde pública. De acordo com um relatório global sobre segurança no trânsito, publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em dezembro de 2018 [1], as lesões graves causadas por acidentes de trânsito são as principais causas de morte em todas as idades. A maioria dos traumas gera um impacto social significativo nos indivíduos lesados e, por isso, pesquisas de materiais biocompatíveis com o corpo humano estão sendo desenvolvidas a fim de acelerar o processo de osteossíntese e melhorar a osseointegração. [2], [3], [4], [5].

Os materiais mais estudados e utilizados como biomateriais são as ligas metálicas, que representam uma classe de biomateriais com composições químicas variadas e estruturas cristalinas complexas por serem formadas por elementos químicos de transição interna, segundo classificação da tabela periódica dos elementos químicos. A principal característica desses elementos metálicos é a formação espontânea de óxidos estáveis na superfície metálica [6], [7], [8], [9].

Os biomateriais metálicos são menos biocompatíveis do que outros tipos de biomateriais sintéticos, por serem menos toleráveis à resistência em um ambiente fisiológico, mesmo após utilizar estratégias para melhorar a resistência à corrosão [10], [11], [12], [13]. No entanto, estes materiais apresentam propriedades mecânicas superiores em relação a outros biomateriais sintéticos, como por exemplo, a capacidade de resistir a esforços sob tração mecânica, e certas ligas podem suportar altos valores de carga sem sofrer deformação, apresentando assim uma natureza dinâmica [6], [14], [15].

As ligas de titânio são conhecidas por serem materiais bioinertes ao processo de formação óssea por não ocorrer espontaneamente como se espera de um biomaterial. Então, para que esse estímulo aconteça, a superfície da liga em questão precisa ser modificada por técnicas que permitam a ativação dessa superfície, e assim, desencadear a produção de proteínas precursoras da divisão celular [38], [39].

A liga de titânio Ti6Al7Nb é uma das ligas metálicas mais estudadas para aplicação biomédica e tem se destacado devido à presença do elemento Nióbio (Nb) por ser considerado inerte no corpo humano. Assim, é uma liga metálica mais resistente às transformações físicas, químicas ou biológicas do corpo humano, assemelhando-se à propriedade do Nb puro. A liga Ti6Al7Nb apresenta melhor

comportamento mecânico, melhor resistência à corrosão [16], [17], [18], [19], menor teor de alumínio e maior biotolerância que a liga Ti6Al4V, opção amplamente aplicada em artroplastias, mas que teve seu uso restrito devido à toxicidade do vanádio (V) e foi substituído [4], [5].

Devido as suas propriedades mecânicas, resistência à corrosão e biocompatibilidade, a liga Ti6Al7Nb é utilizada em implantes osseointegrados, eliminando assim possíveis efeitos biológicos adversos entre as diferentes ligas metálicas utilizadas em diversas situações clínicas [4], [9], [20]. O seu baixo peso específico, o torna um material muito leve em comparação com outras ligas metálicas. A liga Ti6Al7Nb oferece a possibilidade de fabricar dispositivos de osseointegração leves e resistentes [12], [13]. A alta resistência à corrosão, aliada ao seu módulo de elasticidade mais próximo ao do osso humano, proporciona melhor distribuição de carga [3], [7], [9], [21], [22].

Os implantes ortodônticos feitos de titânio têm maior formação de tecido ósseo ao seu redor do que quaisquer implantes feitos de outros materiais metálicos, ou seja, a osseointegração reforça a ideia de que os implantes de titânio têm uma capacidade mais extraordinária de interagir com os tecidos biológicos do hospedeiro do que os implantes feitos de outros metais uma vez que evita possíveis efeitos biológicos adversos [16], [21], [22], [23].

Embora estudos tenham comprovado essas características na liga metálica Ti6Al7Nb, modificações ainda precisam ser feitas na sua superfície para o desenvolvimento de uma topografia de superfície que favoreça a proliferação celular, prevista a partir de uma rugosidade adequada, que permita uma melhor adsorção de proteínas e consequente viabilidade celular. [3], [9].

A biotolerância é influenciada pela existência de uma camada passiva nativa na superfície, permitindo menor interação com o ambiente fisiológico; embora seja de espessura nanométrica, permite a interação com o ambiente biológico [4], [23] [27], [27]. Por exemplo, Li, Guang-Zhong, et al. [25] mostraram que a camada de óxido nanoporoso poderia facilitar o desenvolvimento de nanobiomateriais à base de titânio. De acordo com um estudo de Michalska-Domańska, et al. [26], a camada de óxido mais espessa e estável no topo do implante é fundamental para a ativação biológica, desencadeando a formação óssea, o que favorece a osseointegração.

Nesse contexto, muito se tem investido nas técnicas de modificação de superfície da liga de titânio Ti6Al7Nb para potencializar as respostas biológicas entre o substrato e o tecido/órgão [4], [10], [16], [25] [26], [27], [28], [29]. As principais

aplicações da liga Ti6Al7Nb ocorrem em: implantes de contato com o sangue [10], implantes com propriedade bacteriana [17], próteses ortopédicas e odontológicas [18], [20], substituição total do quadril [36], [100], entre outras aplicações.

Entre as técnicas, a Deposição de Camada Atômica, do inglês Atomic Layer Deposition (ALD) se destaca por permitir o controle de espessura em nível nanométrico, controle da uniformidade de filmes finos em grandes áreas e excelente aderência em superfícies irregulares, incluindo poros, nanotubos, nanofios, ou seja, padrões 3D em geral [11], [12]. Essas métricas decorrem da natureza autolimitada da ALD, que não muda mesmo com o aumento dos tempos de exposição ao reagente e co-reagente, mantendo a mesma espessura dos filmes finos independentemente da forma do substrato [29], [30], [31].

É importante ressaltar que filmes com espessura e rugosidade uniformes em nível nanométrico conferem a melhoria das propriedades de resistência à fadiga, coeficiente de atrito e resistência ao desgaste, que são as principais características que se deseja melhorar em um biomaterial para esses fins [9], [25], [27], [26], [32].

Técnicas de modificação de superfície são os tratamentos termoquímicos aplicados para melhorar o revestimento de biocerâmicas, por exemplo, a hidroxiapatita (HAp), ideal para promover a osseointegração. Segundo as referências [33], [34], [35] o revestimento aumenta a capacidade de adesão ao osso na fase inicial do implante e oferece maior probabilidade de adesão celular, uma vez que o biomaterial à base de fosfato de cálcio tem composição química e mineralógica semelhante ao material ósseo; entretanto, para que isso ocorra, as condições ideais das superfícies e o carregamento dos implantes devem ser melhorados, visando o sucesso da interface implante/tecido ósseo [17], [18], [36], [37], [38], [39], [40], [41].

Portanto, este trabalho tem como objetivo obter uma superfície (filme) bioativa, que será feita com a modificação superficial da liga Ti6Al7Nb a partir da deposição de um filme de Al_2O_3 por ALD com espessura de 200 nm, e essa mesma superfície após a primeira modificação superficial, recebeu os revestimentos de apatita por dois métodos: eletrodeposição e fluido corporal simulado (SBF). Sendo que, a modificação superficial com o filme de alumínio-titânio mostrou maior bioatividade que a liga sem tratamento e revelou propriedade osteogênica favorável à calcificação da matriz extracelular com os revestimentos de apatita.

2 OBJETIVOS

Modificar a superfície da liga Ti6Al7Nb com a deposição de nanofilmes de óxido de alumínio (Al_2O_3) por ALD e crescimento de hidroxiapatita por métodos biomiméticos como eletrodeposição e SBF para potenciais aplicações em engenharia de tecidos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Depositar nanofilmes de óxido de alumínio (Al_2O_3) por ALD, visando o melhoramento da biocompatibilidade da liga e o crescimento de Apatita;
- Sintetizar apatidas biológicas a partir da aplicação de dois métodos biomiméticos com SBF e eletrodeposição.
- Avaliar o método que melhor contribuiu para a formação de fosfato de cálcio da liga metálica de titânio Ti6Al7Nb;
- Caracterizar morfológica e físicoquimicamente a superfície das amostras, antes e após as deposições dos filmes finos de ALD (Al_2O_3) e a formação de fosfato de cálcio;
- Analisar biologicamente in vitro as amostras para verificar a bioatividade da liga antes e após a modificação superficial.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LIGA DE TITÂNIO Ti6Al7Nb

A liga de titânio Ti6Al7Nb foi sintetizada em 1977 e pela primeira vez em 1986 foi utilizada em procedimentos cirúrgicos. A sua microestrutura cristalográfica é composta por duas fases alotrópicas: alfa e beta (α e β), que são desejáveis em implantes ortopédicos e odontólogos por suas propriedades mecânicas [42], [43].

Segundo Peters (2003) [42] e Donachie, (2000) [43] a fase alfa apresenta estrutura hexagonal compacta, frequente em temperatura ambiente, e que, acima de 888 °C ocorre a transformação para a fase beta de estrutura cristalina cúbica de corpo centrado e se mantém até 1673 °C. As duas fases presentes na liga Ti6Al7Nb oferecem variedade microestrutural e permite combinar suas propriedades com o tipo de aplicação final [29], [30], [31], [44], [45]. Conhecer o histórico de processamento e o tipo de tratamento de modificação de superfície é imprescindível para promover o melhoramento microestrutural e tribológico da liga Ti6Al7Nb.

A nomenclatura da liga de titânio Ti6Al7Nb significa 6% em peso de alumínio e 7% em peso de nióbio e o peso restante de titânio. Assim, o comportamento cristalográfico da liga Ti6Al7Nb se deve aos elementos denominados estabilizadores de fases como o nióbio (Nb) que estabiliza a fase β e promove maior biocompatibilidade e o alumínio (Al) estabilizador da fase α , que exibe excelente resistência ao calor e oxidação [42], [46], [47].

A liga Ti6Al7Nb é uma das ligas de titânio mais utilizadas na fabricação de implantes ortopédicos, justificada por suas propriedades mecânicas, por ser próxima ao do osso humano, como a alta resistência a corrosão e baixo módulo de elasticidade, além de sua baixa densidade e boa biocompatibilidade. A capacidade de osteossíntese está relacionada à formação espontânea de uma fina camada de óxido de titânio (TiO_2) sobre a superfície, permitindo a osseointegração que ocorre em interface implante e tecido ósseo [10], [17], [36], 48].

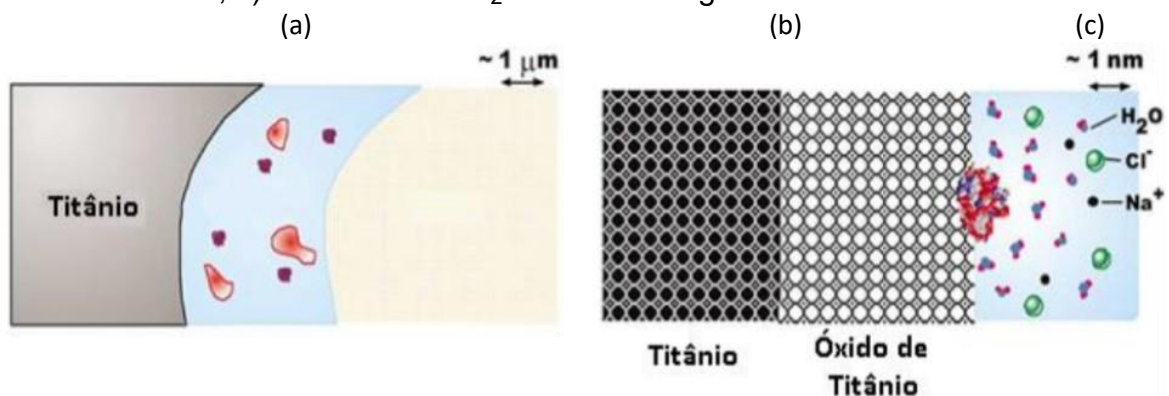
Sabe-se que corrosão é um fenômeno químico comum aos metais após reações de óxi-redução, resultando em formação de camadas de óxidos pela reação com oxigênio, umidade e ar [49]. Nesse caso específico, a oxidação espontânea que ocorre nas ligas de titânio resulta na formação do óxido de titânio, e essa corrosão é tolerável, pois o óxido formado contribui para a bioatividade da liga [26]. Segundo Yang, Fran, et al., 2019 [23], [50], essa camada interage com o meio biológico

estimulando a adesão celular. Por isso, estudos revelaram que a biotolerância [16], [25], [26], [51] da liga de titânio está relacionada à existência dessa camada ativa na superfície, que, além de proteger contra a corrosão, promove a interação com o meio fisiológico.

O esquema da Figura 1 simula o que acontece no meio fisiológico. O filme de óxido de titânio (TiO_2) é formado espontaneamente na superfície da liga, protegendo e prevenindo o contato do meio fisiológico diretamente com a superfície da liga metálica, fazendo da liga um excelente biomaterial [17], [52].

A camada fina de óxido de titânio (TiO_2) tem cerca de 2 a 10 nm de espessura, o que confere biocompatibilidade e resistência à corrosão [52], [53], porém, possui baixa resistência a fadiga. RADI, et al. (2018) [54] fez experimentos para aumentar a espessura de óxido de titânio (TiO_2), com pulverização catódica e obteve proteção relevante contra corrosão do meio fisiológico, obtendo melhor biocompatibilidade da liga Ti6Al7Nb.

Figura 2: Ilustração da interface metal/meio fisiológico a) titânio e meio fisiológico, b) interface titânio, c) camada de TiO_2 e meio fisiológico



Fonte: Adaptada de Kasemo et al. (2002) [23].

PIETRZYK, Bożena et al. 2020 [18] estudaram o comportamento de três óxidos TiO_2 , ZnO , Al_2O_3 , crescidos por imersão sol-gel na superfície de liga de titânio Ti6Al7Nb, para aumentar sua bioatividade e resistência a corrosão e constataram inércia química, impedimento da permeação dos elementos de liga para o meio fisiológico e a alumina apresentou a melhor propriedade de barreira, além de oferecer a propriedade de bioinércia, ao ser misturado com óxido de titânio, controlou sua porosidade e, também reforçou a microestrutura da matriz de hidroxiapatita melhorando a adesão do revestimento no substrato.

Os métodos mais utilizados para realizar o melhoramento superficial para aplicações biomédicas são as técnicas termoquímicas, realizadas por modo térmico,

como plasma [9], sputtering [22], micro arco-MAO [17], catodo oco [27], [55], PVD, CVD e métodos eletroquímicos. Neste trabalho, será aplicada a técnica de deposição por camada atômica para obter nanofilmes de óxido de alumínio (Al_2O_3) sobre a superfície da liga Ti6Al7Nb, visando melhor microestrutura para ser aplicada em engenharia de tecido ósseo.

Apesar da liga apresentar boas propriedades mecânicas e resistência à corrosão como vistas anteriormente devido a formação espontânea da camada de óxido de titânio, a modificação de superfícies, ainda é motivo de investigação para melhorar sua biocompatibilidade e propriedades mecânicas, visando ativar a superfície para o desenvolvimento de tecido ósseo e, principalmente a fixação e o vínculo permanente, evitando intervenções artroplásticas. A técnica de modificação superficial em escala nanométrica tem despertado interesse por promover uma melhor interação a nível celular e permitir melhor vínculo na interface do implante e tecido/osso.

3.2 DEPOSIÇÃO POR CAMADA ATÔMICA

O tratamento por Deposição de Camada Atômica, do inglês Atomic Layer Deposition – ALD é uma técnica aplicada para formação de filmes finos sobre a superfície de substratos de vidro, de cerâmicos, metálicos, poliméricos, formando nanocompósitos. Isso se deve a sofisticada reprodutibilidade, alta eficiência que se observa na estruturação de filmes do tipo nanocoating. O crescimento em espessuras nanométricas confere alta uniformidade, conformação, baixa porosidade e baixa densidade sobre as superfícies do material revestido [17], [18], [26], [28].

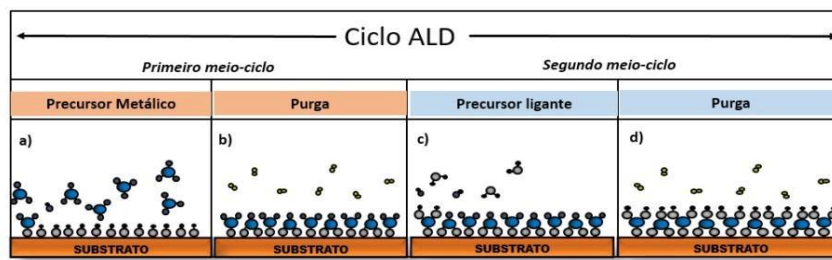
A Deposição por Camada Atômica se desenvolve num processo autocontrolado, em que se constrói nanofilme por passos autolimitados sobre o substrato. Nessa técnica, as substâncias participantes do processo são substâncias denominadas de precursores metálicos e não metálicos, gás de purga, gases inertes ao processo e são adicionadas por ciclos em pulsos predeterminados.

O processo acontece dentro de uma câmara a vácuo, onde, adiciona-se o precursor metálico, que reage fisicoquimicamente com a superfície do substrato, em seguida, adiciona-se o gás de purga, responsável por remover o excesso do precursor metálico em fase gasosa e outros reagentes fisissorvidos. O segundo pulso é do precursor não metálico, que reage com a superfície novamente, por reação de troca com o metal, formando uma película fina molecular e os reagentes

em excesso são removidos por gás purga. Esse processo se repete várias vezes, completando um ciclo a cada sequência de: precursor metálico → gás de purga → precursor não metálico → gás de purga e reinicia-se o processo nessa sequência.

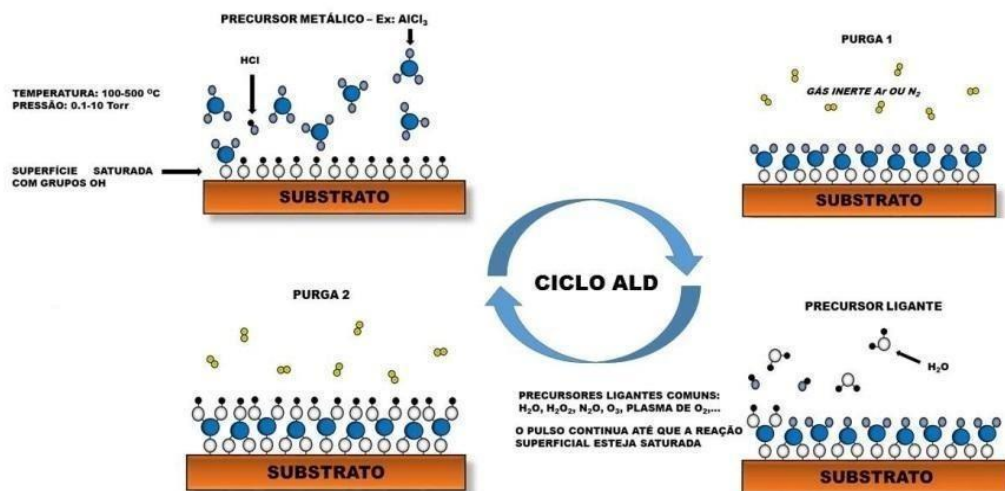
A técnica é caracterizada por ser uma deposição camada por camada atômica, porque os filmes formados são uniformes e de espessura a nível atômico (Ângstrom) [26], [27], [28]. A Figura 2 ilustra os semiciclos em que ocorrem as reações químicas, completando um ciclo ALD.

Figura 3 – Semiciclos em ALD.



Fonte: Maciel, 2016 [60] e Dias, 2017 [61].

Figura 4 – Ilustração do ciclo ALD no sentido horário.



Fonte: Maciel, 2016 [60] e Dias, 2017 [61].

A Figura 3 – Ilustra o ciclo ALD na formação do filme de Al_2O_3 a partir de precursores AlCl_3 e vapor de H_2O . O gás nitrogênio e argônio são gases de purga utilizados nesse tratamento por serem inertes ao processo. E nessa ilustração (Figura 3), observa-se a formação do ácido clorídrico (HCl), produto formado após a reação de troca com o precursor metálico com grupos hidroxilas.

No crescimento do filme de óxido de alumínio (Al_2O_3) por ALD, utiliza-se também um outro precursor metálico denominado trimetilalumínio (TMA) e precursor ligante (não metálico) vapor de água ou gás ozônio para a obtenção do oxigênio [26], [27], [28].

Esses precursores atendem aos requisitos como a volatilidade eficiente e estabilidade térmica, ou seja, durante o processo, a pressão de vapor do precursor precisa atender o patamar de temperatura estável, que permita a repetibilidade dos ciclos sem que ocorra a saturação precoce, durante o tempo de cada ciclo, possibilitando a ocorrência das reações autolimitadas que ocorrem com o substrato e o filme depositado, e isso deve ocorrer por tantos ciclos necessários até a formação da espessura nanométrica do filme desejado [26].

Atomic Layer Deposition – ALD contribui para formação de filmes finos do tipo nanocoating, que apresentam maior resistência à corrosão devido a formação em multicamadas, que, observada em meios fisiológicos, apresentou ligações de difusão entre as multicamadas formando barreiras quimicamente complexas e resistentes aos processos de corrosão no meio fisiológico [29].

PESSOA, R. S. et al. 2017 [57] utilizaram a técnica para crescimento de filmes finos de dióxido de titânio em substratos poliméricos obtendo a inativação de *Candida Albicans*, mostrando atividade antifúngica e fotocatalítica do TiO_2 revelando potencial aplicação como material antifúngico em dispositivos biomédicos. PESSOA, R. S. et al. 2015 [58] aplicou a técnica ALD em substrato de titânio de fase alfa, previamente polido para obter o crescimento de filme estequiométricos de óxido de titânio (TiO_2) de boa qualidade.

Shahmohammadi, Mina, et al. 2022 [59] mostrou em seu trabalho que os filmes $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2$ depositados por ALD em substratos de polimetilmetacrilato (PMMA) promovem a redução de adesão de bactérias e fungos e a formação de biofilmes, e melhora nas propriedades de superfície, mecânica e biológica do substrato PMMA, muito utilizado em vários setores da medicina e odontologia.

Nesta pesquisa, pretende-se observar a contribuição desta técnica de formação do nanofilme de óxido de alumínio, como revestimento na liga Ti6Al7Nb afim de contribuir para o melhoramento da produção de proteínas totais indispensáveis para proliferação celular.

3.3 ÓXIDOS DE ALUMÍNIO (Al_2O_3)

Assim como o óxido de titânio, o óxido de alumínio também é utilizado como proteção contra corrosão, podendo a espessura do filme aumentar a proteção contra corrosão, e ainda, reduzir o risco de surgimento de falhas [54]. A alumina ou óxido de alumínio é um material cerâmico e portanto naturalmente poroso e têm variada aplicabilidade utilizado em: catálise, filtros, estruturas leves, isolante térmico e implantes biomédicos [41], [62].

Zang, et al [63], relata que cerâmicas de alumina são utilizadas há décadas como suporte de implantes proteicos na área de artroplastia total do quadril, por apresentar propriedades inertes, duras e hidrofílicas e baixa deterioração na região de articulações em estudos observados tanto in vitro quanto in vivo.

Nas aplicações com alumina se utiliza a α - Al_2O_3 policristalina, a forma densa ou porosa e a forma monocristalina, denominada de safira, que apresenta resistência mecânica três vezes maior que a policristalina sendo bastante utilizada em aplicações odontológicas e implantes intraósseos [64]. A Tabela 1 apresenta características da alumina policristalina, segundo a norma ISO 6474.

Tabela 1 – Característica da biocerâmica alumina

Propriedades	Valor
% de Al_2O_3	$\geq 99,50$
% $\text{SiO}_2 + \text{Na}_2\text{O}$	$< 0,1$
Densidade (g/cm ³)	$\geq 3,90$
Tamanho médio de grãos (μm)	< 7
Dureza Vickers (HV)	> 2.000
Módulo de ruptura à flexão (MPa)	> 400

Fonte: Pereira et al, 2006 [64]

A substituição e a reparação de implantes causam traumas para os pacientes, além da lenta recuperação, principalmente em pessoas idosas. Para resolver esse problema, a alumina vem sendo utilizada como biomaterial, com o objetivo de prolongar o aparecimento de falhas nos implantes ortopédicos, que corriqueiramente precisam de intervenção cirúrgica. O sucesso desse revestimento deve-se à elevada energia superficial da alumina, que proporciona adsorção de proteínas fundamentais para regeneração de tecidos duros [41], [62], [64].

À alumina, deve-se a sua atuação como biomaterial, apresentando propriedades como resistência à fadiga e ao desgaste, alta dureza, baixa condutibilidade térmica, por ser um isolante e, além de ser estável em elevadas temperaturas e bioinerte [38], [63]. Zhang et al [63] comprovou esse comportamento ao observar o aumento significativo de osteogênese em tubos de alumina dopados com MnO_2 .

As ligas de titânio possuem propriedades notáveis como soldabilidade e biocompatibilidade, baixa densidade, alta relação resistência/peso, elevada tenacidade à fratura e resistência à fadiga. Mas, precisa melhorar as propriedades superficiais, principalmente o comportamento tribológico e reverter a passividade de sofrer corrosão em ambientes *in vitro* e *in vivo*, que podem dissolver alguns dos seus elementos de liga, causando o afrouxamento do implante e doenças como Alzheimer e câncer [37], [63], [65].

A espessura e a técnica para formação do nanofilme de óxidos de alumínio podem também influenciar significativamente o processo de osseointegração a partir do aumento de espessura do filme no substrato, favorecendo a bioatividade de liga de titânio [26].

Os filmes formados por ALD- Al_2O_3 , por ser uma técnica camada por camada atômica, pode ser uma excelente alternativa para inibir a liberação de elementos de liga. Segundo relatado por Pietrzyk, et al., 2020 [18] comprovou em testes com três tipos de revestimentos distintos a redução da permeação dos íons alumínio da liga Ti6Al7Nb, com o revestimento de Al_2O_3 , formados por sol-gel.

Segundo PIETRZYK, Bożena et al. (2020) a camada de óxido na liga de titânio pode limitar a permeação do alumínio, funcionando como propriedade de barreira e impedindo sua solubilização no meio fisiológico. Além disso, melhora a adesão e crescimento da HAp no substrato.

O óxido de alumínio pode promover a estabilidade mecânica da camada de óxido de titânio já que cresce espontaneamente sobre a liga de titânio, porém, é menos resistente a corrosão do meio fisiológico quando muito fina. [66], [67]. Com isso, resolve-se verificar a influência do nanofilme de óxido de alumínio (Al_2O_3) formado por ALD para melhorar a bioatividade da liga de titânio no meio fisiológico.

3.4 APATITAS PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA

A apatita biológica é um material a base de fosfato de cálcio que possui composição química e mineralógica semelhante ao material do osso. É um dos principais componentes dos ossos nos vertebrados presente na forma de nanocristal do tipo sólido inorgânico, e representa cerca de 65% da massa total óssea. Os ossos, em sua composição química apresentam colágeno, fibras e minerais de fosfato de cálcio e pequenas concentrações de íons Na^+ , Mg^{2+} e CO_3^{2-} e em menor quantidade K^+ , F^- e Cl^- . Os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} se depositam no colágeno por um processo denominado de biomineralização, em que, inúmeras proteínas atuam como inibidores e nucleadores para promover sua aderência a matriz de colágeno [64], [68].

O emprego de fosfato de cálcio na área biomédica, visa a regeneração e reposição do tecido ósseo e ultimamente tem sido utilizado para revestimento em superfícies de ligas de titânio objetivando o melhoramento da biocompatibilidade e a proliferação de proteínas percussoras da divisão celular. Por sua semelhança à fase mineral do osso, apresenta as características ideais para ser aplicado como biomaterial, dentre as características temos: a biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade que eleva o interesse em pesquisas, além da osteocondutividade que é uma das principais propriedades, pois, em superfícies metálicas indicam o caminho para o crescimento ósseo [41], [62], [65], [64], [68].

Os fosfatos de cálcio são classificados a partir da razão molar dos átomos de cálcio e fósforo (Ca/P), que varia, de 0,5 e 2,0. São sintetizados por precipitações de soluções que contenham íons cálcio Ca^{2+} e íons fosfato PO_4^{3-} [68] e, após, se define sua aplicação, de acordo com a estequiometria formada. Estudos comprovaram a utilização em superfícies metálicas a fim de promover a osseointegração óssea. A osseointegração significa a ligação interfacial que ocorre entre o implante e o tecido ósseo, para isso é necessário que ocorra modificações na superfície que promovam o carregamento de partículas na integração do implante ao tecido ósseo [69], [70], [71].

Dentro da família da Apatita se destacam β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e HAP ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) por serem bioativos no meio fisiológico e obtenção de respostas biológicas, como a proliferação de células do tecido ósseo [64], [68]. Apesar de semelhantes na composição química, apresentam estruturas cristalinas diferentes, logo, propriedades mecânicas, físicas, biológicas e mineralógicas diferentes, resultantes dos mecanismos de processamento.

Segundo o estudo de Hassan (2019) [39] e Pereira et al. (2006) [64], a hidroxiapatita faz parte da família “fosfato de cálcio”, CaP, formada por quatro categorias, descritas como hidroxiapatita (HAp) com razão de Ca/P igual a 1,67, hidroxiapatita com deficiência de cálcio do tipo moleculares: o fosfato de tetracálcio e o fosfato de octacálcio (CDHA) e o fosfato tricálcico (α ou β -TCP) e o fosfato de cálcio bifásico (BCP) com menor proporção de Ca/P.

SADAT-SHOJAI (2016) [40] em estudos com polímeros PHB, descreve a HAp como biocerâmica bioativa, pois confere estabilidade estrutural quando incorporada ao polímero, além de melhorar as propriedades mecânicas e aumentar a bioatividade, resultando na proliferação e diferenciação de osteoblastos.

BIEMOND, J. E. et al.(2013), [72] verificaram que amostras de ligas de titânio revestidas por hidroxiapatita obtiveram boa ligação interfacial implante/tecido ósseo após 15 semanas de implantados, confirmando que implantes osseointegrados com revestimento de HAp aumentam a formação e o crescimento de osso.

VIANA, J. R. et al 2020 [65] verificaram que hidroxiapatita é aplicada para promover o aditamento proteico e obter maior afinidade ao meio fisiológico, pois melhora os processos de osteointegração e osteossíntese. Outras pesquisas [17], [73] mostram que a utilização do revestimento de hidroxiapatita tem como finalidade promover principalmente a bioatividade de materiais bioinertes.

O revestimento da hidroxiapatita se tornou o mais utilizado sobre a liga Ti6Al7Nb, com a finalidade de promover o processo de osseointegração, pois aumenta a capacidade de se ligar ao osso, na fase inicial do implante e, conseqüentemente pode aumentar a probabilidade de adesão celular [73], [74].

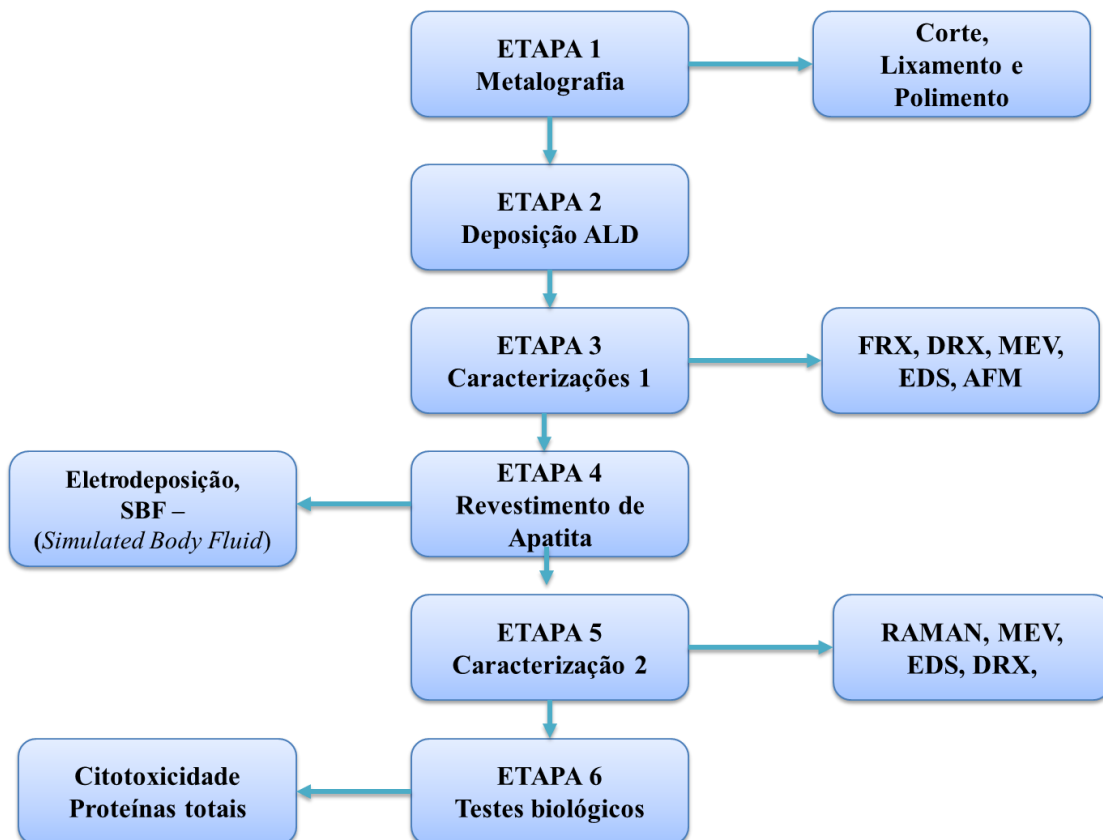
O crescimento de apatite biológica feito nesse trabalho, ocorreu por dois métodos de crescimento biomimético: eletrodeposição e imersão em fluido corporal simulado, comumente conhecido pela sigla em inglês SBF (*Simulated Body Fluid*) e, nesse experimento sua concentração foi cinco vezes mais concentrada que a solução padrão.

Após as modificações superficiais com revestimentos de apatitas, que será mostrado a seguir, foram também verificadas a biocompatibilidade e a bioatividade a partir dos testes in vitro de viabilidade celular e produção de proteínas totais. A formação de apatita biológica proporciona o ancoramento das células, por isso, é de fundamental importância essa avaliação biológica para posteriores testes biológicos que avaliem a adesão, proliferação e migração celular.

4 METODOLOGIA

A pesquisa foi desenvolvida em seis etapas. Na primeira etapa, houve a preparação metalográfica das amostras. Na segunda etapa, a deposição de óxido de alumínio Al_2O_3 por ALD nos substratos. Na terceira etapa, foram feitas as caracterizações das amostras antes e depois do tratamento de óxido de alumínio Al_2O_3 por ALD. A quarta etapa, seguida do tratamento anterior (terceira etapa) foi efetivado o crescimento de apatite, pelos métodos biomimético com SBF e eletrodeposição. Na quinta etapa foram realizadas as caracterizações nas superfícies para avaliar a formação da apatita. Na sexta etapa, foi realizado o teste *in vitro*, a fim de avaliar a biocompatibilidade e bioatividade após os tratamentos realizados. As células-tronco mesenquimais (MSCs) utilizadas nos teste biológicos foram obtidas do fêmur de nove ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) regularmente registrada no comitê de ética CEUA/ICTSJC 018/2010. A Figura 4 mostra um diagrama com as etapas da metodologia, como descrita anteriormente.

Figura 5 – Fluxograma das etapas de execução da metodologia



Fonte: Autoria própria.

4.1 OBTENÇÃO DA LIGA DE TITÂNIO Ti6Al7Nb

A liga de titânio Ti6Al7Nb foi adquirida comercialmente pela empresa Boaji Tian Xing Minor Metal Materials Co., Ltd, localizada no Parque industrial da Vila Mingxing, Maying, cidade Baoji, Estado Shaanxi, país China, como pode ser visto na Figura 5 Anexo 1. Foi realizado o pedido ao fornecedor de uma barra cilíndrica (tarugo) de 50 cm de comprimento e 10 mm de diâmetro da liga de titânio Ti6Al7Nb ASTM F1295.

4.2 PREPARAÇÃO METALOGRÁFICA DAS AMOSTRAS METÁLICAS

As amostras foram cortadas em discos, utilizando máquina de corte manual (Figura 5) no laboratório de usinagem da Universidade Federal do Piauí - UFPI.

Figura 6 – Máquina de corte das amostras a) máquina de corte b) amostras de titânio



Fonte: Autoria própria.

Os insumos utilizados na preparação metalográfica das amostras foram: pano de polimento, lixas 220, 400, 600, 1200 e 2000 mechs, fita adesiva dupla face, discos de corte de carbeto de silício e solução de alumina 1μ para o polimento, como mostra a Figura 6.

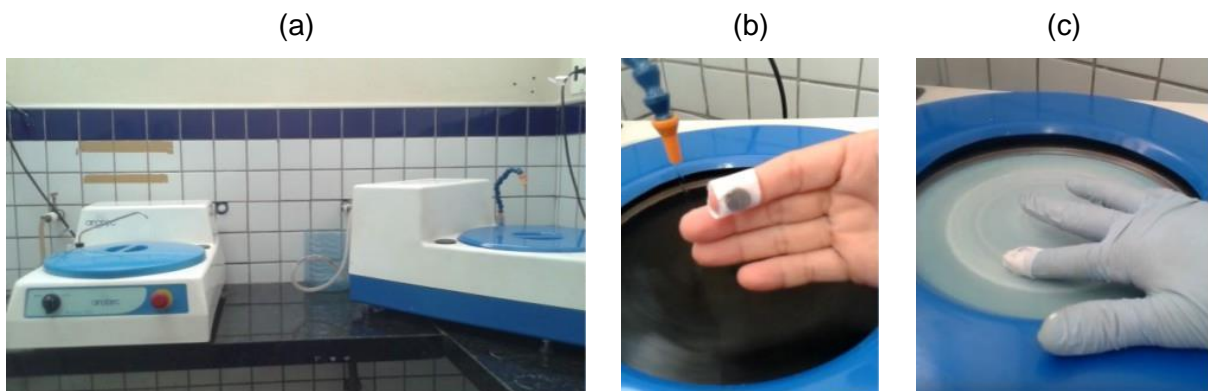
Figura 7 – Insumos para preparação metalográfica das amostras



Fonte: Autoria própria

A etapa um foi realizada no laboratório de engenharia de materiais do Instituto Federal do Piauí - IFPI. Utilizou-se lixas granulométricas, em ordem decrescente de granulometria, 200 a 2000 mechs, com água corrente numa politriz manual, modelo Arotec. O polimento foi realizado com pano apropriado para materiais não ferrosos e uma solução composta por ácido nítrico, água destilada e alumina 1 μ m, no mesmo equipamento, como pode ser visto nas imagens da Figura 7.

Figura 8 – Lixamento e polimento da amostras utilizando politriz manual. a) politriz manual modelo Arotec b) lixamento com fluxo de água c) visualização do polimento em pano próprio e suspensão de alumina.



Fonte: Autoria própria

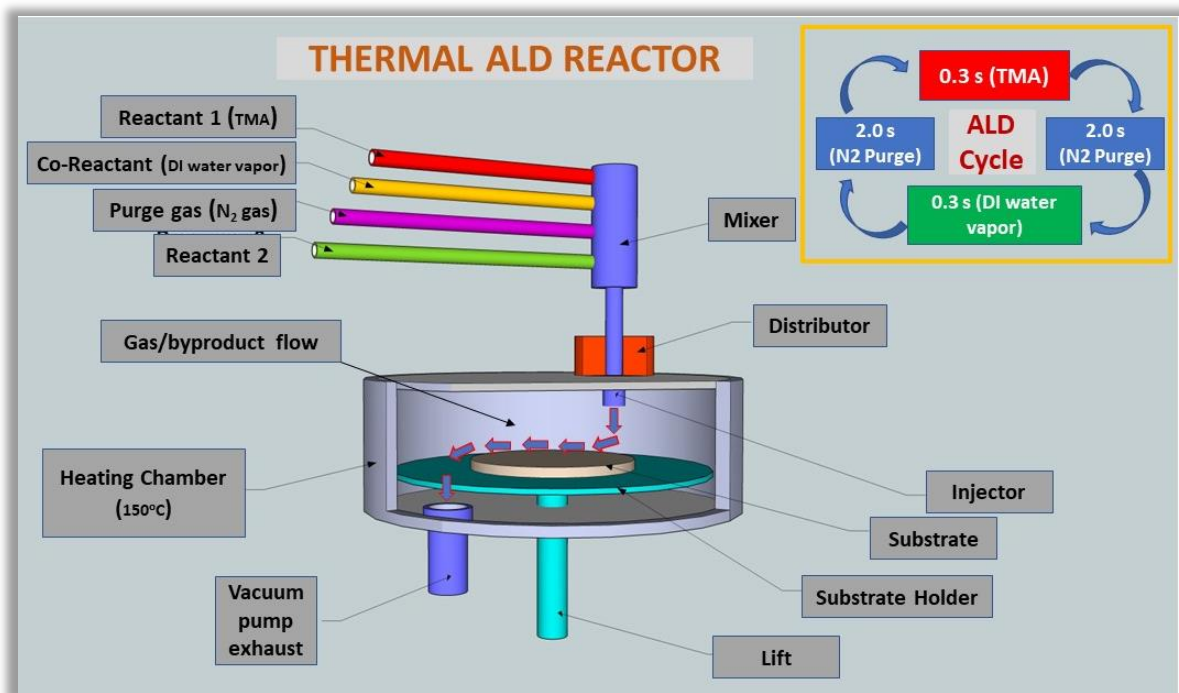
Após o polimento, as amostras foram divididas em quatro grupos. O primeiro conjunto de amostras, grupo G1, se refere a liga Ti6Al7Nb sem tratamento (grupo controle). O grupo amostral G2 representa a liga Ti6Al7Nb revestida com 200 nm Al₂O₃ por ALD. O grupo de amostras G3 representa a liga Ti6Al7Nb revestida com

200 nm Al_2O_3 , com apatita depositada por eletrodeposição. E o grupo G4, representa o grupo amostral da liga Ti6Al7Nb revestida com Al_2O_3 por ALD, com apatita depositada por SBF e subdividida em três amostras, denominadas G4 (200-7), G4 (200-14) e G4 (200-21), onde as variáveis 7, 14 e 21 representam os dias de agitação do precipitado.

4.3 DEPOSIÇÃO DE Al_2O_3 POR ALD

A deposição do filme de Al_2O_3 foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Processos a Plasma do Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA. O processo de deposição ocorreu no equipamento Beneq TFS 200, operando no modo térmico, na temperatura de 150 °C, e em condição de 2000 ciclos de processo e tempos de pulso de 0,3 s do precursor metálico de Trimetilalumínio (TMA), com pulsos de 2 s de purga N_2 , 0,3 s de água deionizada, e 2 s de purga novamente. O valor nominal da espessura do filme de 2000 ciclos ALD corresponde a 200 nm.

Figura 9 – Diagrama esquemático do reator térmico ALD e do ciclo ALD utilizados neste trabalho



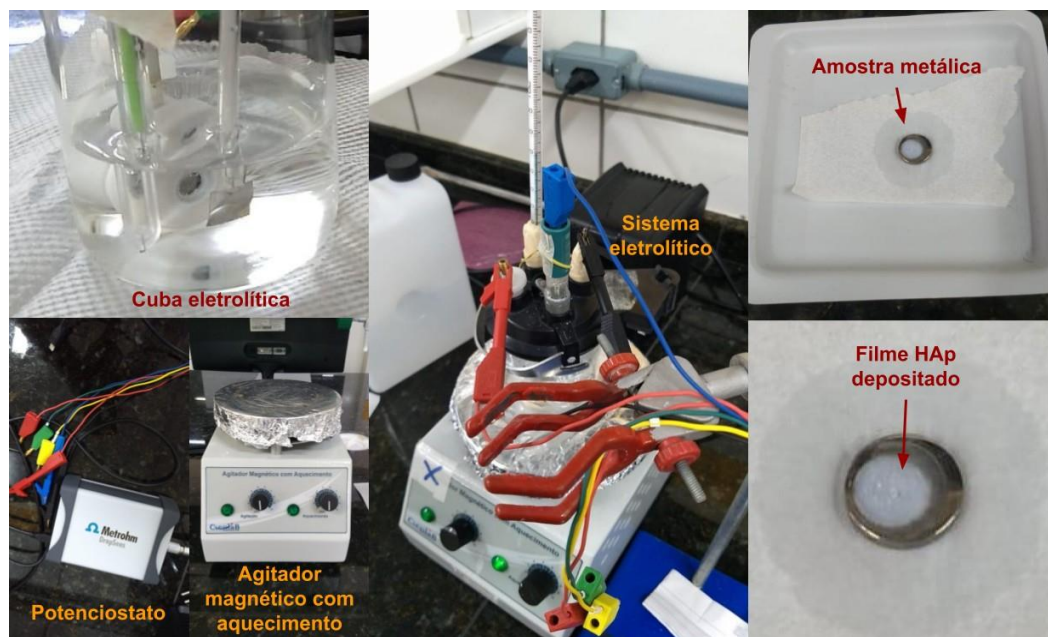
Fonte: Autoria própria

4.4 REVESTIMENTOS DE APATITA POR ELETRODEPOSIÇÃO

Para o crescimento de apatita pelo método de eletrodeposição, uma solução eletrolítica de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,06 g) e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,017 g) e 0,1L com água

destilada foi usado. Depois de ajustar o pH para 5, um potencial foi aplicado para medir a corrente resultante usando um potenciostato (Metrohm Dropsens). O experimento eletroquímico foi realizado em um tanque eletrolítico com três eletrodos imersos: um filme de platina de alta pureza como eletrodo auxiliar, um tubo de Ag/AgCl (3M KCl) como eletrodo de referência e o coletor de amostras como eletrodo de trabalho. O coletor de amostra tem a forma peculiar de um tubo com cabeça rosqueada, e uma abertura circular externa onde fica centralizada a superfície da amostra a ser eletrodepositada. A eletrodeposição foi aplicada para a formação de apatita nas amostras de substrato revestidas com o filme de 200 nm Al_2O_3 crescido por ALD. O processo ocorreu a 70°C e tensão de -2V [40], diferindo em 4 horas para cada amostra. Após a conclusão do processo, as amostras secaram espontaneamente.

Figura 10 – Materiais utilizados no sistema de eletrodeposição



Fonte: Autoria própria.

4.5 REVESTIMENTO DE APATITA POR SBF (SIMULATED BODY FLUID)

Para o crescimento de apatita pelo método de deposição de SBF, foi usado uma solução de SBF cinco vezes concentrada (SBF \times 5) [36]. Os reagentes utilizados para o preparo da solução eletrolítica foram: NaCl (42,8 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,52 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,83 g), Na_2HPO_4 (0,70 g) e NaHCO_3 (1,76 g). A solução foi preparada em béquer de polipropileno (PP) com 1L de água destilada e $\text{pH}=6$. As amostras revestidas com o filme Al_2O_3 de 200 nm crescido por ALD foram inseridas

em um béquer, e a síntese por precipitação ocorreu em incubadora de bancada refrigerada (Cientec CT-713) com agitação a 80 rpm e sob temperatura ambiente (36,5 °C) por 07, 14 e 21 dias [31], [40]. O pH foi monitorado diariamente durante o tempo de deposição, e a solução trocada a cada 48 horas. Ao final do processo, as amostras foram retiradas para secagem espontânea.

Figura 11 – Materiais utilizados no método biomimético com SBF



Fonte: Autoria própria.

4.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE METÁLICA

4.6.1 Espectrometria de Fluorescência de Raios-X

A espectroscopia de fluorescência de raios-X é uma análise multielementar baseada na medida de intensidade dos raios-X característicos, emitidos pelos elementos químicos que compõem uma amostra, por exemplo. Existem dois tipos de técnicas que utilizam a fluorescência de raios-X: a dispersão por comprimento de onda (*WD-XRF*, *abreviação de wavelength dispersive X-ray*), baseada na lei de Bragg e precisa de um movimento sincronizado e preciso entre o cristal difrator e o detector. A segunda técnica é a fluorescência de raios-X por dispersão de energia

(*ED-XRF, energy dispersive X-ray fluorescence*) que discrimina raios-X de energias próximas com instrumentação menos dispendiosa e mais prática [54], [55].

As amostras foram analisadas por fluorescência de raios-X por dispersão de energia no equipamento da PANalytical, modelo Epsilon 3 (Figura13), no Laboratório de Engenharia de Materiais do Instituto Federal do Piauí IFPI, com a finalidade de identificar qualitativamente os componentes da liga metálica.

4.6.2 Difração de Raios X

A difração de raios-X permite identificar as fases cristalinas presentes nas amostras, por meio de um difratograma gerado por equipamento específico de análise espectroscópica de raios-X. O preparo das amostras é imprescindível para obter bons resultados que ajudam a identificação cristalográfica do material. A técnica de ângulo rasante é uma das técnicas utilizadas por difração de raios – X para identificar a cristalografia de superfícies metálicas e filmes finos e possibilita sua caracterização, em colaboração com outras técnicas [56], [57]. As amostras foram analisadas por difração de raios-X modelo D8 Advance da Bruker com radiação Cu-K α ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$) e monocromador, na configuração de ângulo rasante. Os dados foram tratados no software HighScore Plus da PANalytical, onde foram gerados os difratogramas e, com o auxílio de fichas cristalográficas realizou-se a identificação química e mineralógica.

4.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva.

A microscopia eletrônica de varredura-MEV é usada principalmente na análise de topografia de superfície, com a finalidade de investigar a ocorrência de desgaste mecânico, corrosão superficial, tamanho de grão, entre outras aplicações [51].

Acoplada a esta técnica existe uma segunda técnica do MEV denominada Espectrômetro de Energia Dispersiva ou do inglês *Dispersive Energy Spectrometer EDS*, por meio da qual é possível fazer microanálise qualitativa de elementos químicos na superfície do material, além de caracterizar os materiais é possível gerar microimagens dessas superfícies [52]. Segundo Callister [75], o Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV, revelam imagens que variam entre 10 a 50.00 diâmetros, o que possibilita profundidades de campo muito grandes. A superfície de

amostras é analisada pela varredura de um feixe de elétrons, que geram feixes secundários e se obtém espectros característicos de cada elemento químico presente na superfície da amostra. As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram obtidas em um SEM, modelo TESCAN VEGA3, correspondente a um sistema de emissão termiônica de tungstênio, adequado para operações de alto e baixo vácuo e com um espectrômetro de raios X de dispersão de energia (EDS) acoplado, fabricado pela Oxford Instruments.

4.6.4 Microscopia de Força Atômica

Microscopia de força atômica ou do inglês Atomic Force Microscopy (AFM) é uma técnica que teve origem na Microscopia de Varredura por Sonda, permitindo visualizar e manipular em escala atômica por meio de uma agulha finíssima “tateia” e se deslocando em três eixos (x, y e z) na superfície, resultando em imagens 3D de alta resolução por meio do escaneamento a laser na ponta da sonda e o sistema fotoelétrico envia as informações para um computador que gera a imagem topográfica de superfícies de amostras analisadas. Com essa técnica, foi possível avaliar a rugosidade superficial nas amostras, em escala nanométrica e ainda determinar as forças intermoleculares e forças entre as superfícies, mas isso, a partir da metodologia de microscopia de força.

As imagens de AFM foram obtidas pelo microscópio de marca NTEGRA da NT-MDT e para cada amostra, 4 regiões diferentes foram escaneadas com uma frequência de escaneamento de 0,4 Hz no modo de contato intermitente. Duas áreas foram escaneadas: 400 μ^2 e 9 μ^2 . O software NOVA foi utilizado para a análise estatística das imagens.

4.6.5 Espectroscopia RAMAN

Os métodos espectroscópicos são muito importantes para elucidar estruturas moleculares, fazer determinações qualitativas e quantitativas de compostos orgânicos e inorgânicos e se baseiam na medida de quantidade produzida ou absorvida de radiação pelas moléculas ou espécies atômicas de interesse (SKOOG, et al, 2006). A técnica é capaz de examinar a composição molecular, permitindo identificar a natureza química a partir das estruturas vibracionais das ligações químicas nos compostos presentes nas amostras.

Assim, a espectroscopia Raman foi realizada no Bruker Senterra II Spectrometer System, com laser de 785 nm e faixa de medição de 50-3500 cm^{-1} , utilizando uma lente de 50X para focalização e coleta de sinal e um microscópio Olympus BX51 acoplado. Os índices de cristalinidade foram calculados pela equação $\text{CIRaman} = 4,9/\Gamma$, onde Γ são os valores de Full Width at Half Maximum (FWHM) após a deconvolução da banda de 961 cm^{-1} usando perfis padrão e do tipo Lorentz.

4.7 ENSAIOS IN VITRO

4.7.1 Isolamento celular

As células-tronco mesenquimais (MSCs) foram obtidas do fêmur de nove ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) registro do comitê de ética CEUA/ICTSJC 018/2010. Após a limpeza dos fêmures, em fluxo laminar, as células da medula óssea foram isoladas e inseridas em frascos de cultura celular de 250 mL e 75 cm^2 (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil) com meio de cultura alfa MEM essencial (Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (BFS) (LGC Technology, Campinas Brasil) e gentamicina (500 $\mu\text{g/mL}$) (Gibco). Foi incubado em estufa a 37 °C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO_2 . O meio de cultura foi trocado a cada três dias, e a progressão da cultura foi avaliada por microscopia de fase invertida (Microscope Carl Zeiss, Axiovert 40C, Alemanha). Após a confluência, as células foram liberadas enzimaticamente e plaqueadas na densidade de 2×10^4 células viáveis em cada poço da microplaca de 24 poços (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil). Previamente ao plaqueamento, o pó foi pesado e esterilizado em luz ultravioleta e colocado dentro dos poços. O meio de cultura osteogênico foi adicionado à placa e trocado a cada 48 horas. Após esses procedimentos, todas as placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO_2 e mantidas até o momento dos testes. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993-5 [72].

4.7.2 Ensaio da viabilidade celular

O teste de citotoxicidade celular, utilizando o corante MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio), avalia a viabilidade das células a partir da reação redox do brometo de tetrazólio e a metodologia utilizada é previamente

descrita [79]. A cultura celular ocorreu por três dias na placa de 24 poços e, posteriormente, 0,5 mg/ml de MTT foi adicionado, seguido de incubação em 5% CO₂ a 37 ° C por 1 hora. Dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma -Aldrich, St. Louis, MO) para dissolver os cristais de formazan, o produto resultante do MTT. Os dados foram medidos em absorbância no espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) e no comprimento de onda 570 nm.

4.7.3 Quantificação de proteínas totais

A análise para determinação das proteínas totais foi realizada pelo método modificado de Lowry. Resumidamente, células cultivadas por 7 dias foram usadas e, em seguida, detergente lauril sulfato de sódio foi adicionado, resultando em lise celular. Os dados foram medidos em absorbância no espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) no comprimento de onda 680 nm, e o teor de proteína foi calculado de acordo com a curva padrão da albumina bovina.

4.7.4 Análise estatística

Todas as análises estatísticas dos testes biológicos foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 6.00 para Windows (GraphPad Prism, Inc., San Diego, CA) e analisadas pela Análise de Variância (ANOVA), comparando grupos distribuídos em amostras independentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LIGA DE TITÂNIO Ti6Al7Nb ANTES E APÓS DEPOSIÇÃO DE Al₂O₃ POR ALD

O Grupo G1, analisado por FRX antes do procedimento metalográfico (Tabela 1), mostrou a composição típica da liga Ti6Al7Nb, com predominância de titânio, seguido de nióbio e alumínio. Esses valores corroboram com o espectro e mapeamento EDS-SEM (Figura 11-a, b e c), onde o pico mais proeminente é do titânio, seguido do nióbio e do alumínio. A ocorrência de oxidação foi confirmada com a presença de oxigênio, em percentual maior que nióbio e alumínio. Portanto, houve oxidação superficial da liga, predominantemente de fases espontâneas de óxido de titânio, TiO₂/TiO, denominado titanato.

Tabela 1 – Composição química da liga Ti6Al7Nb

Composição química (FRX)	Concentração (%)
Ti	90,5
Al	3,1
Nb	5,2
Outros	1,2

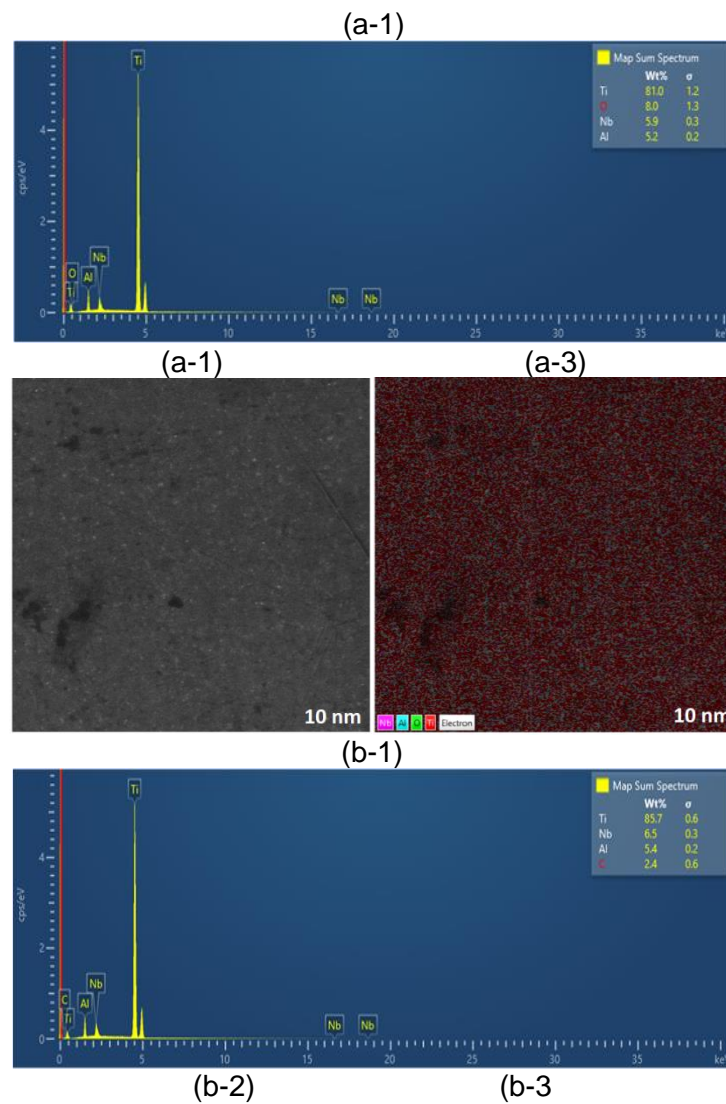
Fonte: Autoria própria

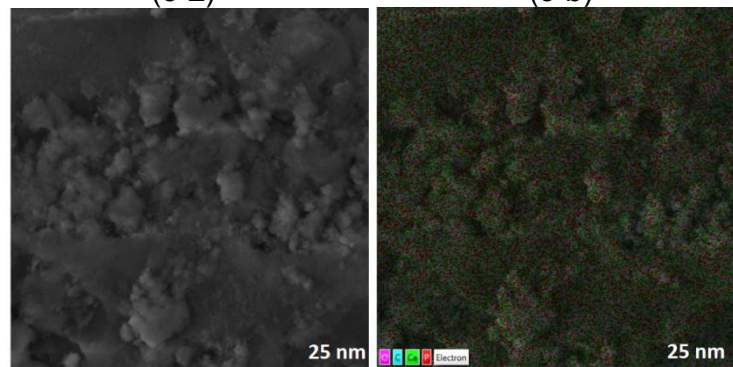
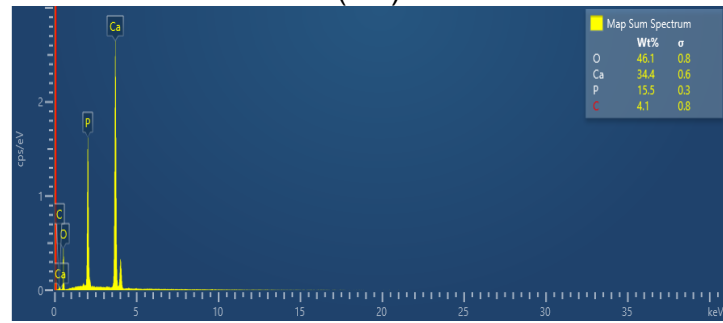
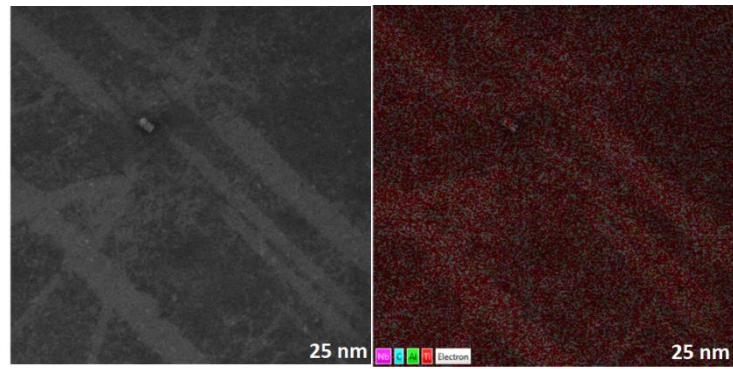
Os resultados de DRX (Figura 12-a) mostram os planos cristalográficos (100), (101), (102) e (110) correspondentes à estrutura cristalina do anatase (TiO₂), que é a estrutura mais estável do titânio à temperatura ambiente e apresenta predominância pelas fases $\alpha+\beta$ [28], [46.], [80], [81].

A análise EDS-SEM do grupo 2 mostrou que a adição de alumina depositada inferiu mudanças na composição química devido a um novo rearranjo em sua superfície, formando alumínio-titânio. Os resultados de EDS (Figura 11-b-1) e DRX (Figura 12-b) mostram que esta espessura não foi suficiente para impedir a identificação dos picos de difração característicos da fase $\alpha + \beta$. Os planos da fase β (102) e (201) desapareceram por serem menos estáveis durante o tratamento, deixando apenas o plano (120). A Figura 12-b mostra que o filme depositado influenciou na extensão dos picos 35°, 40° e 53°, nos planos (100), (101) e (102) correspondentes à fase de estímulo alfa, Ti α .

As reações químicas de superfícies possuem um mecanismo bastante complexo, mas as reações de oxidação-redução ocorridas promoveram a difusão do alumínio na superfície, estabilizando a fase α do titânio e promovendo o rearranjo cristalino. O mapeamento EDS-SEM (Figura 11-b-2, b-3.) mostrou que existem elementos químicos da liga, praticamente inalterados após o tratamento.

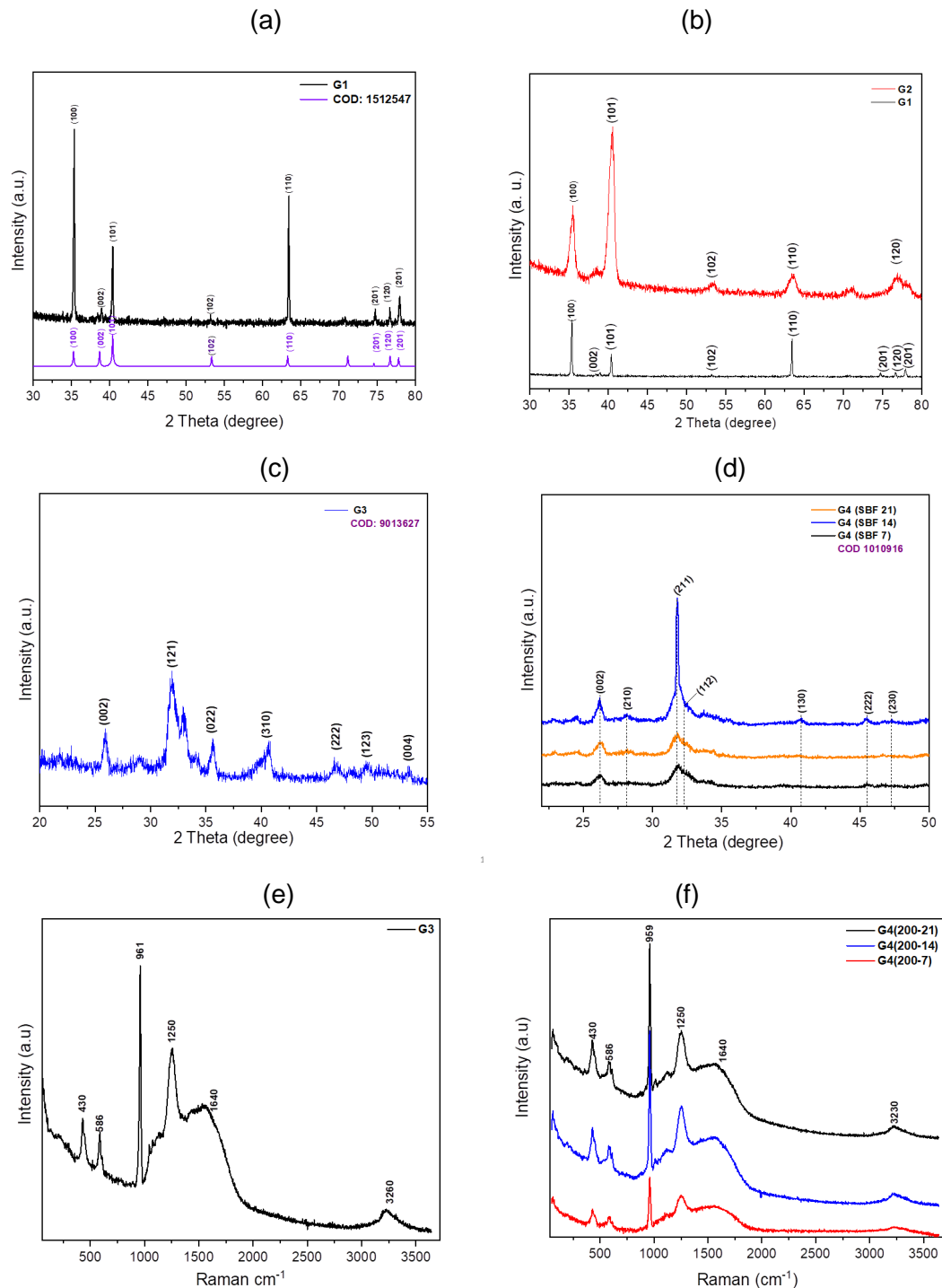
Figura 12 – Resultados de caracterização por Espectro de EDS, MEV e Mapeamento por EDS das amostras antes e após o tratamento ALD e a eletrodeposição. (a) Grupos G1 (b) Grupo G2 (c) Grupo G3. Espectros EDS (a-1, b-1 e c-1). Imagem MEV da superfície (a-2, b-2 e c-2). Mapeamento de EDS (a-3, b-3 e c-3).





Fonte: Autoria própria

Figura 13 – Difractogramas da liga Ti6Al7Nb sem e com o tramento ALD e revestimento de apatitas revestidas por eletrodeposição e SBF. (a) Difractograma grupo G1. (b) Difractograma grupo G2. (c) Difractograma G3. (d) Difractograma grupo G4: (G4 200-7), 14 dias (G4 200-14) e 21 dias (G4 200-21). Espectro Raman dos grupo (e) G3 e (f) G4



Fonte: Autoria própria.

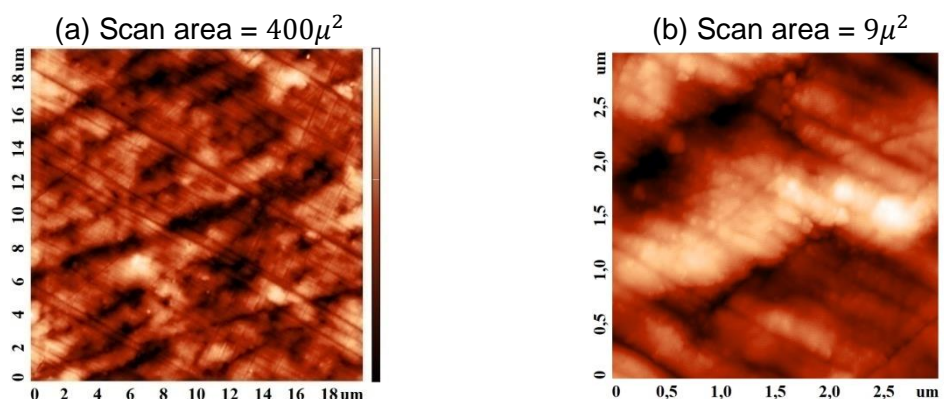
5.2 LIGA DE TITÂNIO Ti6Al7Nb APÓS REVESTIMENTOS DE APATITA

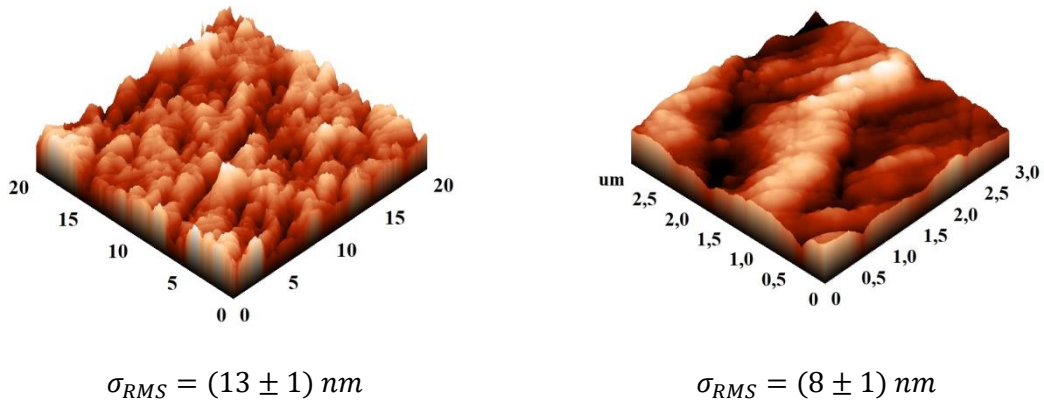
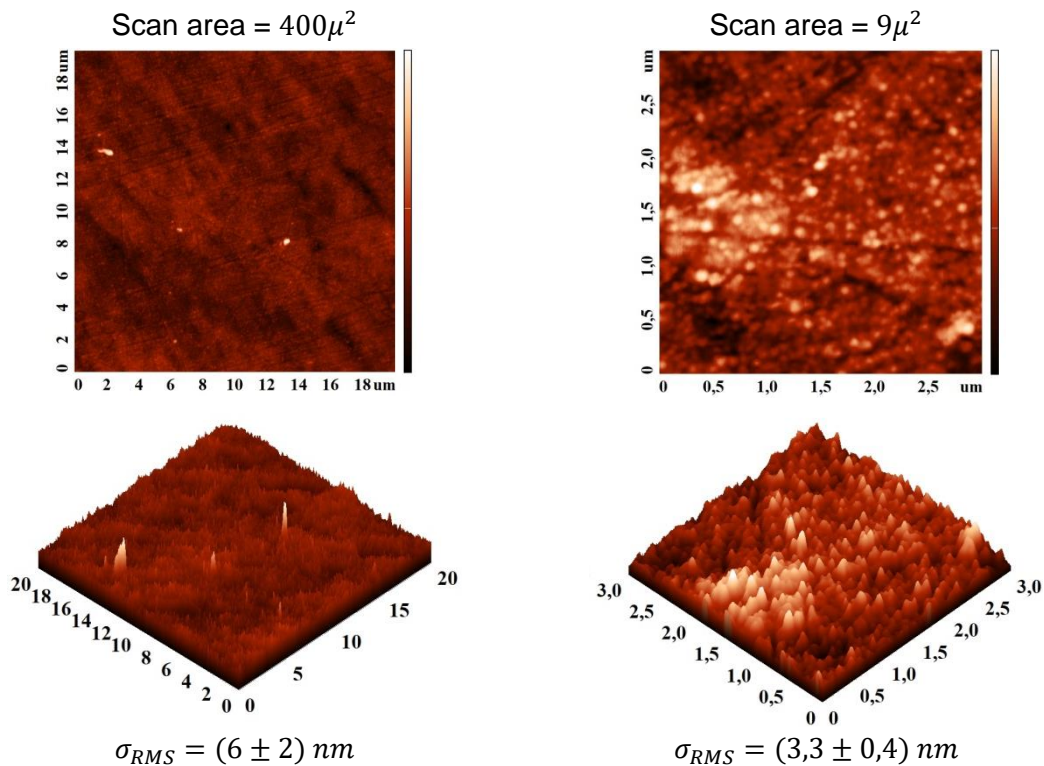
A Figura 13 mostra as imagens de AFM do grupo G1, superfície da liga polida, e do grupo G2, após o revestimento de 200 nm de Al_2O_3 por ALD, em dois e três dimensões. A imagem do grupo G1 mostra uma topografia com sulcos alternados de vales e picos (Fig. 13-a-1). No grupo G2, (Fig. 13-a-2) observa-se a redução do tamanho das ranhuras. A rugosidade média quadrática (σ_{RMS}) é um parâmetro que depende da escala, por isso, ao reduzir a área para uma mesma amostra observa-se uma redução do valor de (σ_{RMS}). Quando se comparam as duas superfícies analisadas, pode-se observar que uma das principais contribuições da deposição de alumina por ALD foi primeiramente, a diminuição da rugosidade superficial, e uma mudança na morfologia da superfície.

O grupo G1 apresentou riscos de abrasão (Figura 13-a) devido ao polimento manual, e após a deposição de Al_2O_3 por ALD (Figura 13-b), formou-se microporosidade na superfície tratada. De acordo com Liu, Fu et al. [82], superfícies modificadas por oxidação beneficiam a ancoragem, fixação e propagação celular, vinculando o implante ao osso humano. Além disso, a técnica ALD mostrou que o revestimento de alumina foi uniforme, evidenciado pelo preenchimento de imperfeições do substrato (Figura 13), e comprovou o crescimento de filmes nanocoating [11], [12], [29], [30], [31].

Figura 14 – Imagens AFM em duas e três dimensões para uma área de varredura de $400 \mu^2$ e $9 \mu^2$ da liga polida e não tratada (a-1 e b-1) e da liga revestida com 200 nm Al_2O_3 por ALD (a-2 e b-dois)

(a-1) Liga sem tratamentos



(b) Liga com deposição de Al_2O_3 ALD

Fonte: Autoria própria

5.2 LIGA DE TITÂNIO Ti6Al7Nb APÓS REVESTIMENTOS DE APATITA

O grupo G3 apresentou os elementos químicos: cálcio, fósforo e oxigênio da eletrodeposição. Nos subgrupos G4, resíduos de oxigênio, cálcio, fósforo, cloro e sódio foram observados em todos os tempos de tratamento com $\text{SBF} \times 5$. Os mapeamentos EDS (Figura 14) mostraram uma distribuição uniforme desses elementos químicos em toda a superfície, assumindo uma espessura de fosfato de cálcio suficiente para impedir a identificação dos elementos de liga em ambos os métodos de crescimento.

Os difratogramas da Figura 12-c, 12-d mostram os picos de difração dos grupos G3 e G4, identificados e comparados com os padrões de difração com Crystallography Open Database - COD códigos 1010916 e 9013627, e comparados com outras referências [83], [39]. Os planos mais importantes do espectro da apatita foram (002) e (211) [68], mostrando também outros planos (222), (004), (022), (310), (112) e (210) correspondentes a diferentes espécies de fases de fosfato de cálcio, confirmando a complexa mistura de apatita biológica.

A apatita formada por eletrodeposição resultou em picos de EDS (Figura 14-a-1) puramente de Ca, P e O, identificados pelos planos de raios X característicos (002) e (121), confirmando a presença de cristais de HAp. O mesmo resultado foi obtido por Lobo et al. [34], que sintetizou HAp em compósitos de nanotubos de carbono.

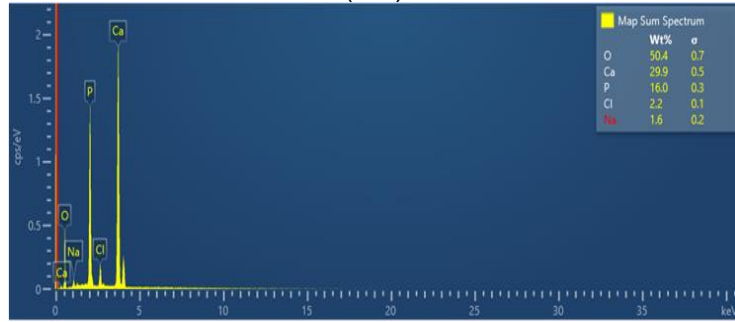
Os espectros de EDS (Figura 14-b, 14-c, 14-d) do método biomimético SBFx5 revelaram a composição química do Ca, P, O e Cl e, em conjunto com a identificação dos planos XRD (Figura 12-d), resultou nas fases mistas de apatita tipo HAp no plano (002) e fosfato de tetracálcio (TTCP) nos planos (210), (211).

O espectro Raman do grupo G3 (Figura 12-e) confirmou picos de fosfato de cálcio, configurando a formação de apatita. O pico em 590 cm^{-1} indicam o grupo PO_4 . O modo de alongamento P-O está presente no pico em 961 cm^{-1} [39], caracterizando a formação de HAp. Os picos em 1247 cm^{-1} e 3260 cm^{-1} referem-se à quantidade significativa de água combinada com apatita. [83].

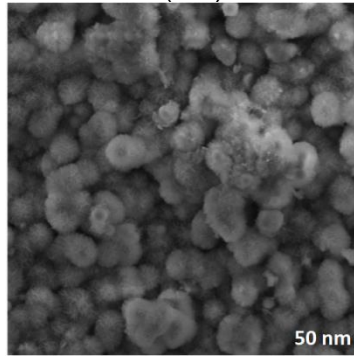
Em relação ao grupo G4, o espectro Raman (Figura 12-f) revelou o pico da banda em 959 cm^{-1} , que corresponde ao mineral fosfato, caracterizando as fases HAp carbonatadas [41], [62], [87]. As bandas 428 cm^{-1} e 584 cm^{-1} identificam o íon PO_4^{3-} [41], [62], [87] caracterizando estruturas de fosfato de cálcio, o que corrobora com os resultados de EDS e XRD apresentados. Uma banda larga em torno de 1640 cm^{-1} é atribuída ao modo de flexão da molécula de água em um arranjo composto, conforme referência [88].

Figura 15: Grupo G4 com recobrimento de apatita depositado por SBF 5X aos (a) 7 dias , (b) 14 dias e (c) 21 dias. Espectros EDS (a-1, b-1 e c-1). Imagem MEV (a-2, b-2c-2). Mapeamento EDS (a-3, b-3 e c-3)

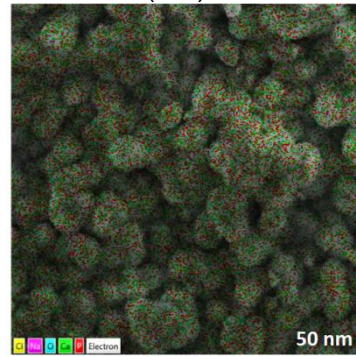
(a-1)



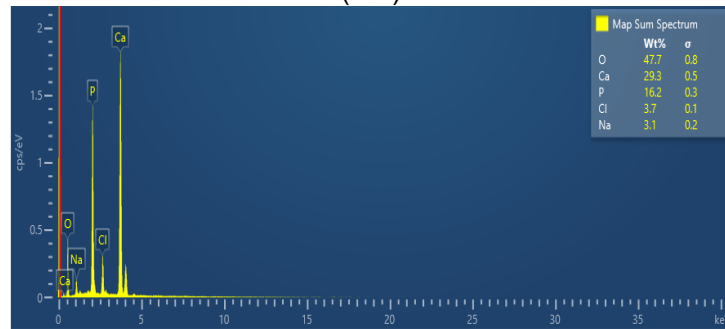
(a-2)



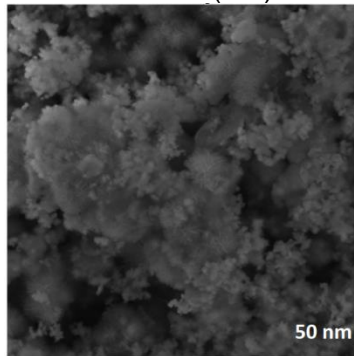
(a-3)



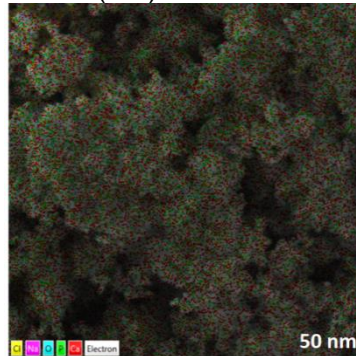
(b-1)



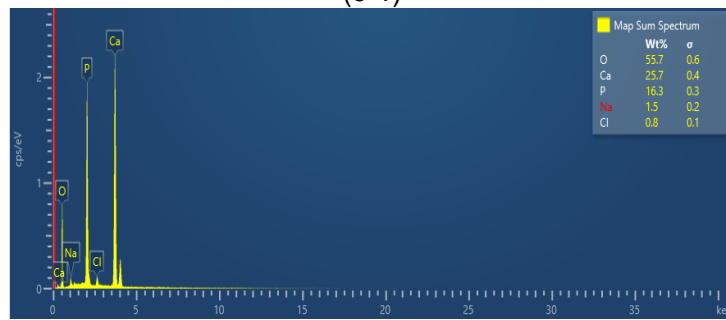
(b-2)



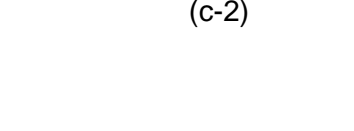
(b-3)



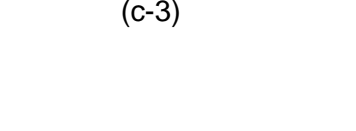
(c-1)

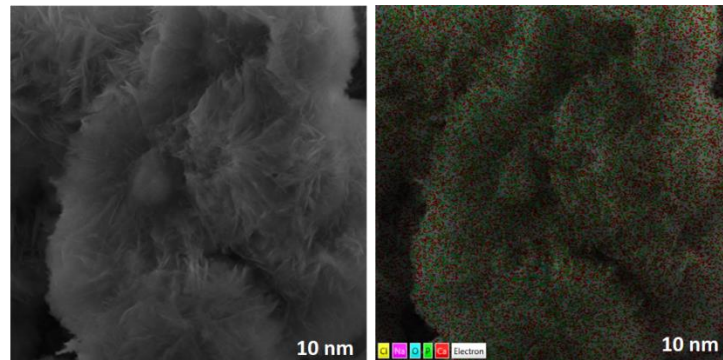


(c-2)



(c-3)





Fonte: Autoria própria

Os valores do tamanho médio dos cristalitos dos grupos G3 e G4 foram calculados a partir da equação de Scherrer, como consta na Tabela 2. Os valores médios do tamanho dos cristalitos mostraram que as apatitas formadas eram menores que as encontradas por Pang e Bao (2003) [84], que está entre 20,8 nm a 52,7 nm, correspondendo a HAp não calcinado e sintetizado a uma temperatura de 15 °C a 99 °C.

Os índices de cristalinidade mostraram cristalinidade dentro da faixa esperada para apatitas biológicas e sintéticas, como pode ser visto na Tabela 2. Os baixos índices de cristalinidade podem estar relacionados ao baixo percentual de fosfato de cálcio precipitado, como observado nos grupos G4. No entanto, no grupo G3, a relação Ca/P = 2,21 foi maior do que nos outros grupos.

Segundo Bouyer, Gitzhofer e Boulos (2000) [85], a temperatura a 70 °C corresponde à temperatura da energia de ativação da cristalinidade da HAp, conforme realizada por eletrodeposição neste estudo. No entanto, a alta cristalinidade nem sempre é regular nos tratamentos SBF×5, como no grupo G4 que resultou em baixas apatitas cristalinas. Ainda assim, o tempo de tratamento por SBF×5 não influencia na formação de novas fases de fosfato de cálcio, conforme Vranceanu et al. [86] relataram, pois, observaram uma diminuição na relação Ca/P = 1,47 aos 21 dias de tratamento com SBF×5.

Tabela 2. Relação Ca/P, tamanho médio do cristalito e índice de cristalinidade dos grupos com revestimentos de apatita

Grupos	Razão Ca/P	Tamanho médio do cristalito (nm)	CI _{Raman}
G3	2,21	16,51	0,36
G4 (200-7)	1,86	15,85	0,32
G4 (200-14)	1,81	72,66	0,33
G4 (200-21)	1,57	13,18	0,28

Fonte: Autoria própria

A Tabela 2 mostra a relação Ca/P feita a partir da composição química por EDS, onde a relação Ca/P no grupo G3 foi maior do que no grupo G4. Segundo outras investigações [35], [90], [91], a relação Ca/P = 1,67 corresponde à hidroxiapatita (Hap) estequiométrica encontrada no tecido ósseo. Porém, os valores encontrados no presente estudo revelaram apatitas não estequiométricas, típicos de apatitas sintéticas.

Lobo et al. [33], [34] desenvolveu o crescimento de apatita cristalina nanoestruturada por eletrodeposição, obtendo apatita biológica de razão Ca/P estequiométrica. A mesma metodologia de Lobo et al. [33], [34] foi aplicada no presente estudo, porém, com diferença no tempo de crescimento, que resultou em apatita não estequiométrica, conforme identificado pelo relação Ca/P = 2,21 (Tabela 2), inferindo que o maior tempo de eletrodeposição realizado neste estudo pode ter influenciado na relação estequimétrica de fosfato de cálcio, que foi acima do valor padrão, como mostra as referências [35], [90], [91].

Neste estudo, o maior tempo de tratamento, por SBF×5 [93], apresentou relação Ca/P = 1,57 após 21 dias, produzindo apatita não estequiométrica, assim como encontrado por Ozeki et al. [92], que também obtiveram diminuição da relação Ca/P com o aumento do tempo de tratamento. No entanto, em pH mais ácido, os autores obtiveram melhor precipitação de HAp estequiométrica.

Sete dias foram necessários para produzir um revestimento suficientemente espesso capaz de impedir a identificação dos elementos da liga Ti6Al7Nb. Como os grupos G4 (200-14) e G4 (200-21) apresentaram comportamento diferente quanto aos valores do tamanho médio dos cristalitos em relação ao grupo G3, para fins de comparação, o grupo G4 (200-7) foi escolhido para a realização dos testes biológicos.

As imagens SEM (Figura 15) observadas no mesmo campo de visão de 13,8 µm mostraram crescimento cristalino gradual, formando as camadas homogêneas de apatita e exibindo diferentes características e orientações cristalinas. O grupo G3 (Figura 14-b-2) revelou estruturas regulares com aspecto de flocos crescendo do centro para a borda. No grupo G4 (Figura 14: b-2, c-2 e d-2) no campo de visão de 50 nm e 10 nm, foram observados cristais laminares em forma de placa e crescimento com aspecto de flor, também do centro para a borda, aspecto mais presente nas amostras cultivadas por SBF×5.

A nucleação de apatitas por SBF×5 formou estruturas de maior diâmetro, como mostra (Figura 15-b, 15-c, 15-d), também encontrado nesse outro estudo [34]. No tempo de eletrodeposição (Figura 15-a), as partículas cresceram de forma mais compacta e com diâmetro menor. Essas diferenças estão relacionadas à presença do nanocompósito alumínio-titanato, que atua como núcleo de crescimento para os cristais de apatita, e também às condições de tratamento em cada método.

No grupo G4 (200-21) Figura 15-f, observa-se a diminuição da regularidade das placas devido à baixa cristalinidade verificada pelo menor tamanho do cristalito (13,18nm) e menor índice de cristalinidade, 0,28. Isso mostra que a imersão de 21 dias não influencia significativamente a criação de novos fosfatos de cálcio (Tabela 2), mesmo comportamento encontrado por outros estudos [86], [89]. Assim, os métodos de crescimento de fosfato de cálcio revelaram morfologias típicas de apatitas biológicas [34], [35], [90], [91].

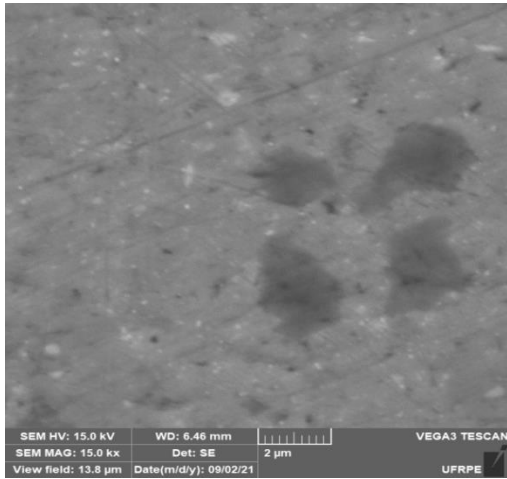
Superfícies biocerâmicas como óxido de alumínio, são mais amplamente utilizadas antes do revestimento biomimético [17], [38], [40], [23], [34], [91], [94]. Os resultados mostraram que o revestimento influencia no melhor desenvolvimento da nucleação da apatita, desde a formação de cargas negativas ativas até a superfície, permitindo a atração de íons em solução e formando a precipitação de fosfato de cálcio, capaz de oferecer ligação ao osso desde que não possua substâncias tóxicas ao organismo [37], [23], [95] e, resultando também na bioatividade de materiais bioinertes, como a liga de titânio.

Rambo et al. [96] prepararam esponjas de Al_2O_3 de alta porosidade e as submeteram a solução supersaturada de SBF×5, entretanto, não obtiveram formação de apatita tão boa quanto em revestimentos de alumina sobre liga de NiTi. De acordo com Liu et al., [82], o revestimento de alumina não induz a nucleação de apatita, mas contribui para formar microestruturas porosas por ligação com a estrutura anatase do titânio. Este revestimento forma um novo rearranjo alumínio-titânio e desenvolve resistência microestrutural e nucleação de apatita induzida por porosidade ideal quando submetido à eletrodeposição e solução SBF × 5 [93].

Figura 16: Imagem SEM das superfícies da liga metálica não tratada (G1) (a), com deposição de Al_2O_3 200 nm por ALD (G2) (b), revestida com apatitas pelos métodos de eletrodeposição 70 °C por 4 horas (G3) (c) e revestidos pelo método biomimético SBF×5 por (d) 7 dias (e) 14 dias e (f) 21 dias

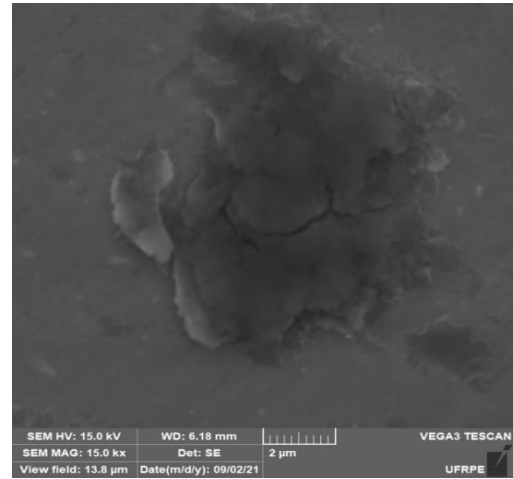
(a)

(b)



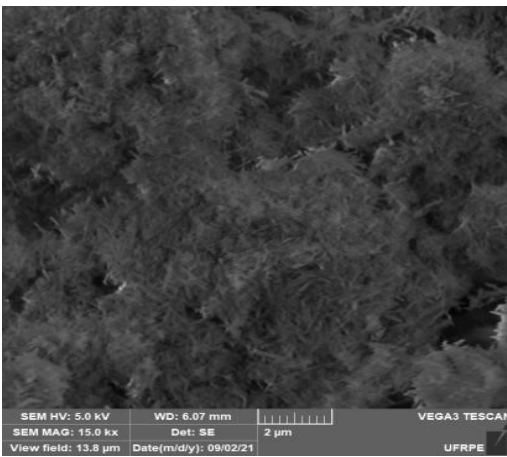
2μm

(c)



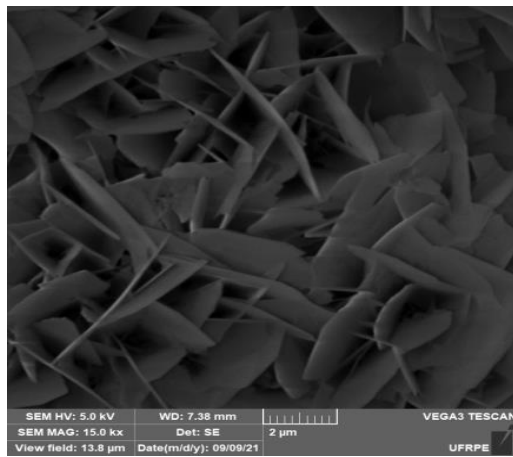
2μm

(d)



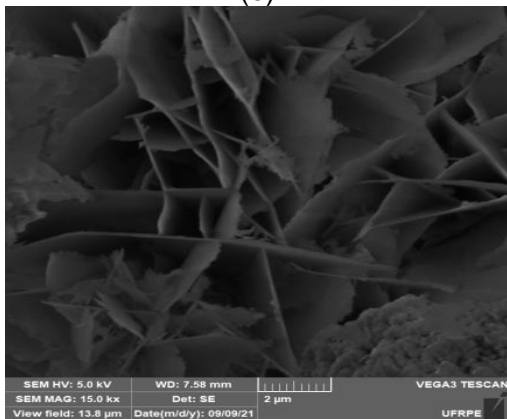
2μm

(e)

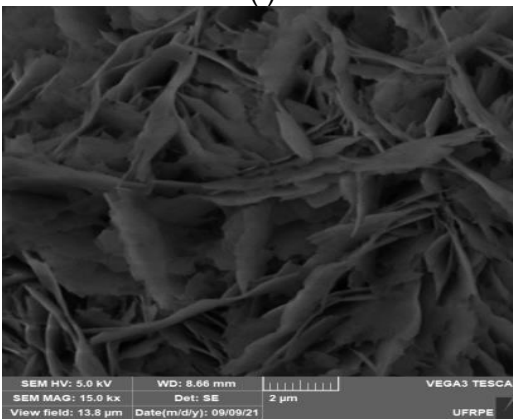


2μm

(f)



2μm



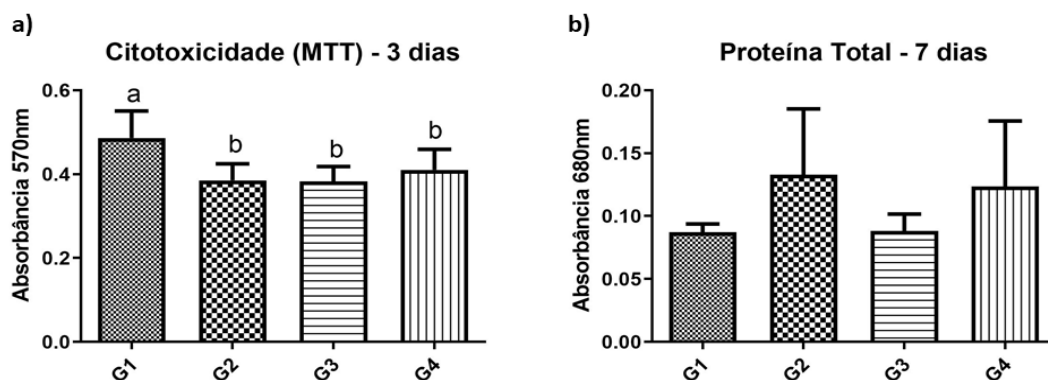
2μm

Fonte: Autoria própria

5.2 TESTES BIOLÓGICOS

A viabilidade celular foi medida por absorbância (570 nm) usando um ensaio MTT (Figura 16). Todos os grupos apresentaram percentagens de células viáveis após 3 dias de cultivo (ou 72 horas). O grupo G1 foi o que apresentou maior quantidade de células viáveis, com diferença estatística dos demais grupos ($p < 0,05$) com porcentagem de células adequada de acordo com o guia ISO 10993 [78].

Figura 17: Resultados dos testes biológicos: a) citotoxicidade (ensaio MTT), b) e análise de proteína total



Fonte: Autoria própria

Segundo Esposito et al. [97], a citotoxicidade é medida pelos índices de absorbância que indicam a afinidade celular pelo corante utilizado. O grupo G1 observou-se melhor viabilidade celular, pois apresentou maior índice de absorbância que os demais grupos experimentais conforme observado em estudos anteriores [97], [98], nos quais o grupo controle apresentou maior viabilidade celular do que os grupos experimentais, algumas vezes com diferença estatística.

Os demais resultados sustentaram fortemente a capacidade de diferenciação osteogênica, conforme também comprovado por Silva et al. (2020) [37] que utilizou revestimentos cerâmicos de alumina e apatita, mostrando a não citotoxicidade desses materiais, recomendando o uso no preenchimento de defeitos ósseos. O grupo controle (grupo G1) mostrou também que, mesmo o material sem qualquer modificação de superfície tem potencial para diferenciação celular, mas o aprimoramento bioativo impulsiona o desenvolvimento de células ósseas, importantes propriedades osteocondutoras e osteoindutoras [99], [100].

Por isso, a produção de proteínas na superfície do biomaterial é indispensável para a atividade celular, pois permite a adesão, migração e

proliferação celular, influenciando decisivamente a interação da interface tecido-implante [101]. Assim, todos os grupos apresentam porcentagens de proteínas totais após sete dias (Figura 16-b), que não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Quanto a isso, a quantidade de proteínas totais no grupo G1 foi a menor em relação a todos os grupos experimentais e o grupo G2 apresentou maior quantidade de produção de proteína total, se destacando dos grupos com fosfato de cálcio, (G3 e G4) e a liga metálica, como recebida (G1), como mostra os resultados in vitro na (Figura 16-b).

Assim, os principais resultados do grupo G2 como a formação do filmes de Al_2O_3 por ALD na espessura de 200 nm, a redução da rugosidade superficial liga Ti6Al7Nb e a formação do nanofilmes alumínio-titânio favoreceram a melhor bioatividade da liga, podendo se inferir com isso, melhores condições para o processo de osseointegração, como encontrado em outras referências [102], [103]. Esse achado também mostra que o revestimento de Al_2O_3 por ALD, apesar de ser um material bioinerte [25], [54], [83], ao revestir a liga Ti6Al7Nb tornou-a bioativa para processos de formação óssea, pois, houve crescimento de estruturas de fosfato de cálcio como mostrado os grupos G3 e G4, e esse crescimento também foi influenciado pela formação prévia de núcleos precursores à nucleação de apatita presentes nos filmes alumínio-titânio, que contribuíram para a formação do filme alumínio-titânio-apatita, como constatado nos grupos G3 e G4, inferindo-se com esses resultados, promissoras condições para formações osteogênicas.

Pesquisas anteriores [79], [18], [88], [104], [105] já demonstraram que o revestimento de fosfato de cálcio em ligas de titânio é usado para melhorar sua biocompatibilidade, obtendo a ativação da superfície para ancoramento celular, e assim, promovendo a osseointegração. Os grupos G3 e G4 apresentaram produção de proteína total significativa e, apesar da baixa viabilidade celular, confirmaram a ativação da superfície para um caminho promissor à divisão celular.

As diferenças morfológicas da apatita podem ter influenciado nos resultados dos testes biológicos, pois, comparando os grupos G3 e G4, embora não tenha se diferenciado estatisticamente ($p > 0,05$) (Figura 16-b) de acordo com a ISO 10993 [79], o grupo G4 apresentou maior quantidades de produção de proteínas totais que o grupo G3 (Figura 16-b), porém, esses dois grupos tiveram menor produção de proteínas totais quando comparado ao grupo G2, mostrando que a microporosidade da superfície filme alumínio-titânio possui maior capacidade de ancoramento protéico que os grupos de fosfato de cálcio, como mostrado nesses resultados.

De acordo com Vercik et al. [104], a solução SBFx5 influencia na produção de maior quantidade de fases de fosfato de cálcio, resultando em uma nucleação de apatita mais densa (Figura 15-d), embora o processo seja lento. Já, a nucleação de apatita por eletrodeposição favoreceu o crescimento controlado e orientado, formando partículas esféricas e uniformes (Figura 14-b), como encontrado no estudo anterior [89]. A partir desses achados, pode-se inferir que a superfície revestida com fosfato de cálcio se mostrou promissora na ancoragem/incremento proteico, mas a morfologia superficial do revestimento de apatite foi menos favorável a viabilidade celular, o que pode estar relacionado a apatitas de baixa cristalinidade, como revelaram os resultados anteriores. Assim, o estudo in vitro aqui realizado não é suficiente para esclarecer a baixa viabilidade celular, visto que, revestimentos de fosfatos de cálcio já são utilizados em liga de titânio para melhorar sua biocompatibilidade, promovendo a osseointegração.

6 CONCLUSÃO

As caracterizações revelaram que modificações feitas na liga Ti6Al7Nb com filme de alumina de 200 nm depositado por ALD, nunca antes feito nesta espessura, para aplicações biomédicas, formaram filmes nanométricos de alumínio-titânio (grupo G2) que conferiram rugosidade reduzida em relação à liga polida e se mostraram ideais para a produção de proteínas totais, precursoras da proliferação celular e, ainda, favoreceu a nucleação da apatita (grupo G3 e G4), que produziram cristalinidade típica de apatitas biológicas, sintéticas não carbonatadas e não estequiométricas.

O nanofilme de alumínio-titânio conferiu reforço e estabilidade para formar a microestrutura da matriz de apatita sintética, pois a redução da rugosidade superficial formou núcleos para o crescimento do cristal e possibilitou a adesão dos recobrimentos ao substrato observado a partir da nucleação da matriz de apatita, e evidenciando o melhoramento da bioatividade da liga Ti6Al7Nb em implantes ósseos.

O revestimento de estruturas porosas [96] e rugosas [80] desempenha um papel crítico na indução da nucleação da apatita nas superfícies da liga de titânio, tornando-a bioativa, como pode ser confirmado nos resultados biológicos, nos quais houve maior produção de proteínas totais em todos os grupos experimentais em comparação com o grupo controle.

Os testes biológicos mostraram que os tratamentos realizados são precursores da proliferação celular por serem atóxicos e possibilitar melhor resposta biológica, como comparado com as referências [3], [9]. Os grupos experimentais (grupos G2, G3 e G4) apresentaram maior produção de proteína total que o grupo controle (grupo G1). Mas, o grupo G2 foi quem mais se destacou, dada a melhoria da superfície à redução da rugosidade superficial, que formou microporosidade promissora ao ancoramento proteico e, conseqüentemente pode ser aplicado a divisão, migração, e proliferação celular.

Os resultados deste estudo mostraram que os grupos experimentais (G3 e G4) foram eficientes para o crescimento da apatita biológica e demonstraram potencial de diferenciação celular, potencializando o desenvolvimento para células ósseas, sendo importante continuar as pesquisas para investigar as propriedades osteocondutoras e osteoindutoras; e considerar ainda a tribologia necessária para avaliar como habilitá-la e aplicá-la a implantes ósseos.

CONTINUIDADE DA PESQUISA

- Avaliar a espessura dos filmes formados;
- Realizar testes de propriedades de barreira e resistência à corrosão;
- Realizar outros testes biológicos in vitro e in vivo para verificar propriedade osteoindutoras e osteocondutoras.

CONTRIBUIÇÃO DA PESQUISA

O estudo de modificação de liga Ti6Al7Nb obteve um nanofilme de alumina-titânio e alumina-titânio-apatita que pode ser aplicado na engenharia de tecido, pois comprovou ótima viabilidade celular e produção de proteínas, revelando a não toxicidade e superfície promissora ao desenvolvimento de osteogênese.

Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001. Agradecimento especial ao Instituto de Criminalística da Polícia Civil do Estado do Piauí pela utilização do equipamento Senterra II.

REFERÊNCIAS

1. Global status report on road safety 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Acesso: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565684> Publicação 17 de Junho de 2018.
2. SINHORETI, Mário Alexandre Coelho; VITTI, Rafael Pino; CORRER SOBRINHO, Lourenço. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas, v. 67, n. 4, p. 256-261, 2013.
3. RIVIS, Mircea et al. The Implications of Titanium Alloys Applied in Maxillofacial Osteosynthesis. Applied Sciences, v. 10, n. 9, p. 3203, 2020.
4. TRINCĂ, Lucia Carmen et al. New Ti-6Al-2Nb-2Ta-1Mo alloy as implant biomaterial: In vitro corrosion and in vivo osseointegration evaluations. Materials Chemistry and Physics, v. 240, p. 122229, 2020.
5. OKAZAKI, Yoshimitsu; GOTOH, Emiko; MORI, Jun. Correlação resistência-durabilidade de dispositivos de osteossíntese feitos por fabricação de camadas 3D. Materiais , v. 12, n. 3, pág. 436, 2019.
6. PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa CK; MORAES, Angela M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. Química nova , v. 38, p. 957-971, 2015.
7. LIU, Xuanyong; CHU, Paul K.; DING, Chuanxian. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. Materials Science and Engineering: R: Reports, v. 47, n. 3-4, p. 49-121, 2004.
8. ATKINS, Peter; JONES, Loretta. Princípios de Química, 5a edição. 2012.
9. TAVARES, Joana Cristina Medeiros et al. Effect of titanium surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro. Toxicology, v. 262, n. 2, p. 138-145, 2009.

10. WALKE, Witold et al. Influence of surface modification on physico-chemical properties of Ti6Al7Nb alloy Surface and Coatings Technology, v. 307, p. 753760, 2016.
11. CHIAPPIM, William et al. Effect of plasma-enhanced atomic layer deposition on oxygen overabundance and its influence on the morphological, optical, structural, and mechanical properties of Al-doped TiO₂ coating. Micromachines, v. 12, n. 6, p. 588, 2021.
12. CHIAPPIM, William et al. An experimental and theoretical study of the impact of the precursor pulse time on the growth per cycle and crystallinity quality of TiO₂ thin films grown by ALD and PEALD technique. Frontiers in Mechanical Engineering, v. 6, p. 551085, 2020.
13. TARNOWSKI, M. et al. Shaping the structure and properties of titanium and Ti6Al7Nb titanium alloy in low-temperature plasma nitriding processes. Journal of Alloys and Compounds, v. 864, p. 158896, 2021.
14. OKAZAKI, Yoshimitsu; GOTOH, Emiko; MORI, Jun. Correlação resistência-durabilidade de dispositivos de osteossíntese feitos por fabricação de camadas 3D. Materiais , v. 12, n. 3, pág. 436, 2019.
15. SÁ, J. C. et al. Influence of argon-ion bombardment of titanium surfaces on the cell behavior. Surface and Coatings Technology, v. 203, n. 13, p. 1765-1770, 2009.
16. LUZ, Aline R. et al. Characterization of themorphology, structure and wettability of phase dependent lamellar and nanotube oxides on anodized Ti-10Nb alloy. Applied Surface Science, v. 448, p. 30-40, 2018.
17. KARBOWNICZEK, Joanna et al. Influence of electrolyte composition on microstructure, adhesion and bioactivity of micro-arc oxidation coatings produced on biomedical Ti6Al7Nb alloy. Surface and Coatings Technology, v. 321, p. 97-107, 2017.

18. PIETRZYK, Bożena et al. Comparison of Mechanical and Barrier Properties of Al₂O₃/TiO₂/ZrO₂ Layers in Oxide–Hydroxyapatite Sandwich Composite Coatings Deposited by Sol–Gel Method on Ti6Al7Nb Alloy. *Materials*, v. 13, n. 3, p. 502, 2020.
19. ELLIOTT, James Cornelis. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Elsevier, 2013.
20. LAVOS-VALERETO, I. C. et al. A study of histological responses from Ti-6Al-7Nb alloy dental implants with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating in dogs. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 12, n. 3, p. 273-276, 2001.
21. WEBER, Florian et al. Characterization of the foreign body response of titanium implants modified with polyphenolic coatings. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 110, n. 7, p. 1341-1355, 2022.
22. FONTOURA, Cristian Padilha et al. Hollow cathode plasma nitriding of medical grade Ti6Al4V: A comprehensive study. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 35, n. 3, p. 353-370, 2020.
23. KASEMO, Bengt. Biological surface science. *Surface science*, v. 500, n. 13, p. 656-677, 2002.
24. MARTINELLI, N. M., Ribeiro, M. J. G., Ricci, R., Marques, M. A., Lobo, A.O., & Marciano, F. R. In vitro osteogenesis stimulation via nanohydroxyapatite/carbon nanotube thin films on biomedical stainless steel. *Materials*, v. 11, n. 9, p. 1555, 2018.
25. LI, Guang-zhong et al. Fabrication, characterization and biocompatibility of TiO₂ nanotubes via anodization of Ti6Al7Nb. *Composite Interfaces*, v. 23, n. 3, p. 223-230, 2016.
26. MICHALSKA-DOMAŃSKA, Marta et al. Self-organized anodic oxides on titanium alloys prepared from glycol-and glycerol-based electrolytes. *Materials*, v. 13, n. 21, p. 4743, 2020.
27. DE SOUSA, Romulo RM et al. Cathodic cage plasma deposition of TiN and TiO₂ thin films on silicon substrates. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, v. 33, n. 4, p. 041502, 2015.

28. AJEEL, Sami Abualnoun; ALZUBAYDI, Thair L.; SWADI, Abdulsalam K. Influence of heat treatment conditions on microstructure of Ti-6Al-7Nb alloy as used surgical implant materials. *Engineering and Technology*, v. 25, p. 431-42, 2007.
29. DIAS, V; Maciel, H; Fraga, M; Lobo, A; Pessoa, R; Marciano F. Materials Atomic Layer Deposited TiO₂ and Al₂O₃ Thin Films as Coatings for Aluminum Food Packaging Application. *Material*, v. 12, p. 682, ano 2019.
30. DIAS, V. M. et al. Atomic layer deposition of TiO₂ and Al₂O₃ thin films for the electrochemical study of corrosion protection in aluminum alloy cans used in beverage. *Materials Research Express*, v. 7, n. 7, p. 076408, 2020.
31. ABBASS, Muna Khethier; AJEEL, Sami Abualnoun; WADULLAH, Haitham Mohammed. Biocompatibility, bioactivity and corrosion resistance of stainless steel 316L nanocoated with TiO₂ and Al₂O₃ by atomic layer deposition method. In: *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, 2018. p. 012017.
32. YANG, Wei et al. Influence of electrolyte composition on microstructure and properties of coatings formed on pure Ti substrate by micro arc oxidation. *Surface and Coatings Technology*, v. 349, p. 522-528, 2018.
33. LOBO, A. O. et al. Rapid obtaining of nano-hydroxyapatite bioactive films on NiTi shape memory alloy by electrodeposition process. *Journal of materials engineer in and performance*, v. 20, n. 4, p. 793-797, 2011.
34. LOBO, Anderson O. et al. Fast preparation of hydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned multiwalled carbon nanotube composites for bioactive application. *Langmuir*, v. 26, n. 23, p. 18308-18314, 2010.
35. DAN, Pallavi et al. Evaluation of hydroxyapatite nanoparticles-induced in vivo toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Applied Surface Science*, v. 484, p. 568-577, 2019.
36. BEZERRA, Ewerton de Oliveira Teotônio et al. Avaliação de não conformidades de próteses de quadril fabricadas com ligas de titânio e aço inox. *Matéria (Rio de Janeiro)*, v. 22, n. 1, 2017.
37. SILVA, André DR; PALLONE, Eliria MJA; LOBO, Anderson O. Modification of surface of alumina-zirconia porous ceramics with Sr²⁺ after SBF. *Journal of the Australian Ceramic Society*, v. 56, n. 2, p. 517-524, 2020.
38. JABER, Hassanen; KOVACS, Tunde. Selective laser melting of Ti alloys and hydroxyapatite for tissue engineering: progress and challenges. *Materials Research Express*, v. 6, n. 8, p. 082003, 2019.

39. HASSAN, Mohamad Nageeb et al. Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes. *Ceramics International*, v. 42, n. 3, p. 3725-3744, 2016.
40. SADAT-SHOJAI, Mehdi. Electrospun poly hydroxybutyrate/hydroxyapatite nanohybrids: microstructure and bone cell response. *Journal of Materials Science & Technology*, v. 32, n. 10, p. 1013-1020, 2016.
41. STAMMEIER, Jessica A. et al. In-situ Raman spectroscopy of amorphous calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite transformation. *MethodsX*, v. 5, p. 1241-1250, 2018.
42. PETERS, M. et al. Structure and properties of titanium and titanium alloys. *Titanium and titanium alloys: fundamentals and applications*, p. 1-36, 2003.
43. DONACHIE, Matthew J. *Titanium: a technical guide*. ASM international, 2000.
44. BEZERRA, Ewerton de Oliveira Teotônio et al. Avaliação de não conformidades de próteses de quadril fabricadas com ligas de titânio e aço inox. *Matéria (Rio de Janeiro)*, v. 22, n. 1, 2017.
45. LEORDEAN, Dan; CIOBANU, Tatiana; RUSU, Mircea. Researches on the design of customized femoral implants. In: *MATEC Web of Conferences*. EDP Sciences, p. 03009. 2019.
46. LÜTJERING, G. E. R. D. Influence of processing on microstructure and mechanical properties of ($\alpha+\beta$) titanium alloys. *Materials Science and Engineering: A*, v. 243, n. 1-2, p. 32-45, 1998.
47. DONACHIE JR, M. J. *Titanium and its alloys*. *Titanium and Titanium Alloys*, Ed. MJ Donachie, Jr., Metals Park, OH: American Society for Metals, p. 15, 1982.
48. VALERETO, Ivone de CL et al. Caracterização de implantes dentais da liga Ti6Al7Nb revestidos por hidroxiapatita pela técnica plasma-spray. 1998.
49. ATKINS, Peter; JONES, Loretta. *Princípios de Química*, 5a edição. 2012.
50. YANG, Fan; CHANG, Run; WEBSTER, Thomas J. Atomic layer deposition coating of TiO₂ nano-thin films on magnesium-zinc alloys to enhance cytocompatibility for bioresorbable vascular stents. *International Journal of Nanomedicine*, v. 14, p. 9955, 2019.
51. GAO, Ang et al. Electrochemical surface engineering of titanium-based alloys for biomedical application. *Electrochimica Acta*, v. 271, p. 699-718, 2018.

52. DE LUCCA, Gustavo Dos Santos et al. Investigation of photofunctionalization applied to cranial implants produced by incremental sheet forming (ISF). *Journal of Materials Research and Technology*, v. 15, p. 2633-2645, 2021.
53. FLECK, Claudia; EIFLER, Dietmar. Corrosion, fatigue and corrosion fatigue behaviour of metal implant materials, especially titanium alloys. *International journal of fatigue*, v. 32, n. 6, p. 929-935, 2010.
54. RADY, Polyana Alves et al. Tribocorrosion behavior of TiO₂/Al₂O₃ nanolaminate, Al₂O₃, and TiO₂ thin films produced by atomic layer deposition. *Surface and Coatings Technology*, v. 349, p. 1077-1082, 2018.
55. MOURA, J. K. L. et al. Surface characterization of alloy Ti-6Al-7Nb treated plasma; Caracterizacao superficial de ligas de Ti-6Al-7Nb tratadas a plasma. 2014.
56. GEORGE, Steven M. Deposição da camada atômica: uma visão geral. *Chemical reviews*, v. 110, n. 1, pág. 111-131, 2010.
57. PESSOA, R. S. et al. TiO₂ coatings via atomic layer deposition on polyurethane and polydimethylsiloxane substrates: Properties and effects on *C. albicans* growth and inactivation process. *Applied Surface Science*, v. 422, p. 73-84, 2017.
58. PESSOA, R. S. et al. Effect of substrate type on structure of TiO₂ thin film deposited by atomic layer deposition technique. *Journal of Integrated Circuits and Systems*, v. 10, n. 1, p. 38-42, 2015.
59. Shahmohammadi, Mina, et al. "Atomic Layer Deposition of TiO₂, ZrO₂ and TiO₂/ZrO₂ Mixed Oxide Nanofilms on PMMA for Enhanced Biomaterial Functionalization." *Applied Surface Science*, vol. 578, no. C, 2022, p. 151891.
60. MACIEL, Homero Santiago. Deposição por camada atômica de TiO₂: estudo morfológico, estrutural, óptico e comparação entre os modos de deposição plasma e térmico. Tese de Doutorado. Instituto Tecnológico de Aeronáutica. 2016.
61. DIAS, Vanessa Messias. Avaliação da resistencia a coroção dos filmes de TiO₂ e Al₂O₃. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba Univap. 2017.
62. ANTONAKOS, Anastasios; LIAROKAPIS, Efthymios; LEVENTOURI, Theodora. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials*, v. 28, n. 19, p. 3043-3054, 2007
63. ZHANG, Xiaoyan et al. Laser cladding of manganese oxide doped aluminum oxide granules on titanium alloy for biomedical applications. *Applied Surface Science*, v. 520, p. 146304, 2020.

64. PEREIRA, M. M.; VASCONCELOS, W. L.; ZAVAGLIA, C. A. C. Materiais cerâmicos—ciência e aplicação como biomateriais. ORÉFICE, RL; PEREIRA, MM; MANSUR, HS Biomateriais—fundamentos e aplicações, v. 1, p. 61-81, 2006.
65. VIANA, Jailton Romão et al. Comparative analysis of solid state hydroxyapatite synthesis. *Matéria (Rio de Janeiro)*, v. 25, 2020.
66. UWAIS, Zahid A. et al. Surface modification of metallic biomaterials for better tribological properties: A review. *Arabian Journal for Science and Engineering*, v. 42, n. 11, p. 4493-4512, 2017.
67. ANIOŁEK, Krzysztof. Structure and properties of titanium and the Ti-6Al-7Nb alloy after isothermal oxidation. *Surface Engineering*, v. 36, n. 8, p. 847-858, 2020.
68. GUASTALDI, Antonio Carlos; APARECIDA, Anahi Herrera. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química nova*, v. 33, p. 1352-1358, 2010.
69. RAPHEL, Jordan et al. Engineered protein coatings to improve the osseointegration of dental and orthopaedic implants. *Biomaterials*, v. 83, p. 269-282, 2016.
70. NOVAES JR, Arthur Belém et al. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Brazilian dental journal*, v. 21, p. 471-481, 2010.
71. KENAR, Halime et al. Femtosecond laser treatment of 316L improves its surface nanoroughness and carbon content and promotes osseointegration: An in vitro evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 108, p. 305-312, 2013.
72. BIEMOND, J. E. et al. Bone ingrowth potential of electron beam and selective laser melting produced trabecular-like implant surfaces with and without a biomimetic coating. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 24, n. 3, p. 745-753, 2013.
73. ABDEL-SALAM, Mahmoud; EL-HADAD, Shima; KHALIFA, Waleed. Effects of microstructure and alloy composition on hydroxyapatite precipitation on alkaline treated α/β titanium alloys. *Materials Science and Engineering: C*, v. 104, p. 109974, 2019.
74. YIGIT, Oktay; DIKICI, Burak; OZDEMIR, Niyazi. Hydrothermal synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite–graphene nanosheet on Ti-6Al-7Nb: mechanical and in vitro corrosion performance. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 32, n. 4, p. 1-14, 2021.

75. MARIANI, F. Q., VILLALBA, J. C., ANAISSI, F. J. Caracterização estrutural de argilas utilizando DRX com luz síncrotron, MEV, FTIR e TG-DTG-DTA. Full paper orbital: The electronic journal of Chemistry, V. 5, n° 4 October-December, 2013.
76. PAISANI, J. C.; MARIANI, F. Q.; ANAISSI, F. J. PAISANI, S. D. L.; PEREIRA, J. S. Uso da microscopia eletrônica de varredura com análise química para caracterização morfológica e elemental de materiais colúvies do planalto de Palmas/ Água Doce (Sul do Brasil). Revista Geonorte, Edição Especial 4, V. 10, n° 4, 111-116p, 2014.
77. CALLISTER, Jr. W. D. Ciências e Engenharia dos Materiais uma Introdução. 7. Ed. Rio de Janeiro; Ed. LTC, 2008.
78. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, "Biological evaluation of medical devices". Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods", 3rd ed, ISO 10993-5, 2009.
79. DE CAMARGO REIS MELLO, Daphne et al. Biological and microbiological interactions of Ti-35Nb-7Zr alloy and its basic elements on bone marrow stromal cells: good prospects for bone tissue engineering. International Journal of Implant Dentistry, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2020.
80. ALBUQUERQUE, Anderson R.; SANTOS, Ieda MG; SAMBRANO, Julio R. Structural and electronic properties of anatase TiO₂ thin films: periodic B3LYP-D* calculations in 2D systems. Química Nova, v. 37, p. 1318-1323, 2014.
81. HASHIM, Mustafa Shakir; KHALEEL, Reem Saadi. The bioactivities of prepared Ti, Zn, TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles by rapid breakdown anodization technique. Surfaces and Interfaces, v. 20, p. 100640, 2020.
82. LIU, Fu et al. Biomimetic deposition of apatite coatings on micro-arc oxidation treated biomedical NiTi alloy. Surface and Coatings Technology, v. 204, n. 20, p. 3294-3299, 2010.
83. CARVALHO, Guilherme Antônio; LOPES, José Cláudio; VICENTE, Fábio Bossoi. Estudo da influência do tratamento térmico na microestrutura do Ti (Titânio) Grau 2. Revista Ciência e Tecnologia, v. 20, n. 36, 2017.
84. PANG, Y. X.; BAO, Xujin. Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. Journal of the European Ceramic Society, v. 23, n. 10, p. 1697-1704, 2003.
85. BOUYER, E.; GITZHOFER, F.; BOULOS, M. I. Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 11, n. 8, p. 523-531, 2000.

86. VRANCEANU, Diana M. et al. In vitro evaluation of Ag doped hydroxyapatite coatings in a cellular media. *Ceramics International*, v. 45, n. 8, p. 11050-11061, 2019.
87. PEZZOTTI, Giuseppe et al. Raman spectroscopic investigation on the molecular structure of apatite and collagen in osteoporotic cortical bone. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, v. 65, p. 264-273, 2017.
88. YIN, XinHua et al. Calcium alginate template-mineral substituted hydroxyapatite hydrogel coated titanium implant for tibia bone regeneration. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 582, p. 119303, 2020.
89. TOHIDI, Parinaz Mohammad Salahi et al. Pulsed electrodeposition of compact, corrosion resistant, and bioactive HAp coatings by application of optimized magnetic field. *Materials Chemistry and Physics*, v. 254, p. 123511, 2020.
90. Hidouri, Mustapha, et al. "Thermal Behavior, Sintering and Mechanical Characterization of Multiple Ion-Substituted Hydroxyapatite Bioceramics." *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, vol. 29, no. 1, 2019, pp. 87–100.
91. LOBO, Anderson O. et al. Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites. *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, 7, p. 4305-4312, 2013.
92. OZEKI, K.; AOKI, H.; FUKUI, Y. Effect of pH on crystallization of sputtered hydroxyapatite film under hydrothermal conditions at low temperature. *Journal of materials science*, v. 40, n. 11, p. 2837-2842, 2005.
93. BARRERE, F. et al. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx 5 solution. *Biomaterials*, v. 23, n. 9, p. 1921-1930, 2002.
94. DE OLIVEIRA LOBO, Anderson. Obtenção de super-hidrofilicidade em nanotubos de carbono alinhados e sua aplicação como nanobiomaterial. 2011. Tese de Doutorado. Instituto Tecnológico de Aeronáutica.
95. ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing biological process. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 1, n. 4, p. 233-238, 1990/11/01.
96. RAMBO, C. R. et al. Biomimetic apatite coating on biomorphous aluminascaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, v. 26, n. 1, p. 92-99, 2006.

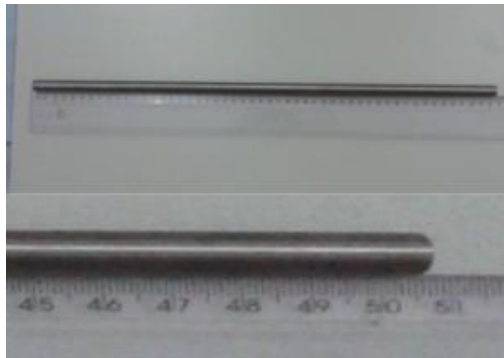
97. ESPOSITO, Andrea R. et al. Citocompatibilidade de blendas de poli (pdioxanona)/poli (hidroxibutirato) (PPD/PHB) para aplicações em engenharia de tecido cartilaginoso. *Polímeros*, v. 20, p. 383-388, 2010.
98. LUZ, G. M.; MANO, J. F. Mineralized structures in nature: examples and inspirations for the design of new composite materials and a biomaterial. *Composites Science and Technology*, v. 70, n. 13, p. 1777-1788, 2010.
99. KAZIMIERCZAK, Paulina; PRZEKORA, Agata. Osteoconductive and osteoinductive surface modifications of biomaterials for bone regeneration: A concise review. *Coatings*, v. 10, n. 10, p. 971, 2020.
100. BAPTISTA, Rolden; MORILLA, José Carlos. Utilização das Ligas de Titânio para Implantes de Substituição total de Quadril. *Unisantia Sci. Technol*, p. 36-39, 2013.
101. ALVES REZENDE, M. C. R. R.; WADA, C. M.; LOPES, M. R. A. N. E.; CAPALBO, L. C.; GONÇALVES, V. M.; VALENTE, A. D. B.; OLIVEIRA, J. A. G. de. O papel da adsorção de proteínas na osseointegração. *ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION*, [S.I.], v.4, n.3, 2015.
102. FUSCO, Michael A.; OLDHAM, Christopher J.; PARSONS, Gregory N. Investigation of the corrosion behavior of atomic layer deposited Al₂O₃/TiO₂ nanolaminate thin films on copper in 0.1 M NaCl. *Materials*, v. 12, n. 4, p. 672, 2019.
103. KOHAVI, D. et al. An in vivo method for measuring the adsorption of plasma proteins to titanium in humans. *Biofouling*, v. 29, n. 10, p. 1215-1224, 2013.
104. VERCIK, LC de O. et al. Recobrimento de apatitas" in vitro" sobre titânio: influência do tratamento térmico. *Eclética química*, v. 28, p. 25-31, 2003.
105. SANTOS, Flávio de Paula et al. Superficial modifications in TiO₂ and Al₂O₃ceramics. *Materials Research*, v. 6, p. 353-357, 2003.
106. INTERNATIONAL STANDARD ISO – 6474 Specifications for implants for surgery ceramic materials based on alumina.

ANEXO A – Obtenção da liga Ti6Al7Nb

Comprovante de aquisição da liga de Ti6Al7Nb em forma de barra cilíndrica de 50 cm e 10 mm de diâmetro.

Name	Grade	Standard	Sizes	QTY	FOB Price (USD/piece)	Amount (USD)
Titanium Bar	Ti6Al7Nb	ASTM F1295	Diameter:10mm Length:50cm	1 piece	45.00	45.00

a)



b)

Fonte: Autoria própria.