

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Washington Alves Eurídice

Obtenção de filmes a-C:H via técnica PECVD na liga  $Ti_6Al_4V$ : caracterização estrutural e morfológica, eletroquímica e biológica

UBERABA  
2019

Washington Alves Eurídice

Obtenção de filmes a-C:H via técnica PECVD na liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V: caracterização estrutural e morfológica, eletroquímica e biológica

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciência dos Materiais Aplicados à Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Jéferson Aparecido Moreto

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Natália Bueno Leite Slade

UBERABA  
2019

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

E88o Eurídice, Washington Alves  
Obtenção de filmes a:C-H via técnica PECVD na liga Ti6Al4V  
caracterização estrutural e morfológica, eletroquímica e biológica /  
Washington Alves Eurídice. -- 2019.  
89 f. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Biociências Aplicadas) --  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019  
Orientador: Prof. Dr. Jéferson Aparecido Moreto  
Coorientadora: Profa. Dra. Natália Bueno Leite Slade

1. Ligas de titânio. 2. Materiais Biocompatíveis. 3. Apoptose - Processo  
I. Moreto, Jéferson Aparecido. II. Universidade Federal do Triângulo Mi-  
neiro. III. Título.

CDU 669.295

WASHINGTON ALVES EURÍDICE

**Obtenção de filmes a-C:H via técnica PECVD na liga Ti6Al4V: caracterização  
estrutural e morfológica, eletroquímica e biológica**

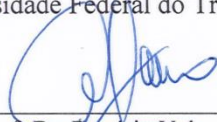
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração - Materiais Aplicados em Biociências, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

18 de outubro de 2019.

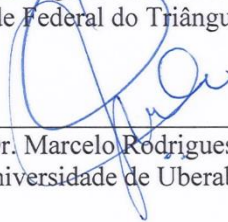
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Jéferson Aparecido Moreto  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof. Dr. Rogério Valentim Gelamo  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto  
Universidade de Uberaba

Dedico este trabalho aos meus pais, Raimunda Alves Eurídice e José Eurídice que dedicaram todos esforços para me permitir acreditar que era possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por todas as coisas que tenho.

Agradeço a minha família pelo apoio durante esse tempo de reclusão e aprendizagem.

Agradeço ao amigo e coordenador deste trabalho, Professor Dr. Jéferson Aparecido Moreto, pelo apoio e dedicação e por acreditar no meu potencial tornando tudo isso possível.

Agradeço os Professores Dr. Rogério Valentim Gelamo, Dra. Natália Bueno Leite Slade, Dra. Patricia Buranello, Dr. Marcos da Silva, Dr. Carlo Oliveira, Dr. Luis Fernando Condeles e Dr. Ricardo Souza Silva por contribuir positivamente na execução deste trabalho.

Agradeço aos amigos do Núcleo de Estudos de Eletroquímica Superfície e Corrosão (NEESC) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) pelo apoio durante este trabalho.

Agradeço à professora Dra. Luciana Sgarbi Rossino e a mestranda Larissa Almeida da Fatec-Sorocaba/UFSCar-Sorocaba pela doação da liga  $Ti_6Al_4V$  contendo o filme DLC para a realização deste trabalho de mestrado.

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram nesta caminhada. Em especial, minha namorada Simone Rocha pelo carinho, compreensão e companhia.

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes.”*

***Sir. Isaac Newton***

## RESUMO

Os tratamentos de superfície são frequentemente realizados com a proposta de melhorar as propriedades mecânicas, químicas e biológicas de um biomaterial. Este trabalho tem como objetivo investigar as respostas biológicas dos filmes a-C:H produzidos pela técnica PECVD sobre substrato da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V. Os filmes produzidos foram caracterizados morfologicamente e estruturalmente por microscopia óptica (OM), MEV, AFM, EDX, espectroscopia de infravermelho (FTIR), Raman (RS) e XPS. Posteriormente, foram realizados testes de biocompatibilidade e citotoxicidade em células osteoblásticas e em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) na liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V sem revestimento e com o filme a-C:H. Os resultados de Raman exibiram um valor de 0,71 para a razão I<sub>D</sub>/I<sub>G</sub>. Os espectros XPS deconvoluídos revelaram a presença de três componentes principais: C1 (284,4 eV) associado à ligações C=C em uma hibridação sp<sup>2</sup>, bem como C2 (285,2 eV) associado à hibridação sp<sup>3</sup>. Os resultados de impedância eletroquímica mostraram que o filme a-C:H atua como uma barreira protetora contra o processo de corrosão em saliva artificial. Os resultados biológicos mostraram que independentemente da população de células, quando a apoptose total de células osteoblásticas ou PBMCs foi avaliada, apenas células cultivadas na liga sem a-C:H apresentaram indução significativa do processo apoptótico. Além disso, apenas PBMCs cultivadas na liga sem a-C:H apresentaram indução significativa de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que caracterizam a ativação imune. Os resultados biológicos deste estudo sugerem que a estratégia de uso do filme a-C:H para cobrir a liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V promoveu desde a proteção do ambiente fisiológico até a melhoria da biocompatibilidade.

**Palavras-chave:** Filme a-C:H; Liga de titânio; Aplicação biomédica; Processo apoptótico.



## ABSTRACT

With the purpose of improving the mechanical, chemical and biological properties of the Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V alloy used as biomaterial, surface treatments are often performed. This work aims to investigate the biological responses of a-C:H films produced by PECVD technique onto substrate of Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V alloy. The films produced were characterized morphologically and structurally by optical microscope (OM), SEM, AFM, EDX, FTIR Raman Spectroscopy (RS) and XPS. Afterwards, biocompatibility and cytotoxicity tests on osteoblastic cells and/or Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were performed on the Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V alloy with coated and uncoated a-C:H film. The Raman results exhibited a value of 0.71 for I<sub>D</sub>/I<sub>G</sub> ratio. The deconvoluted XPS spectra of C 1s peaks disclose the presence of three main components: C1 (284.4 eV) associated to C=C bounds in one sp<sup>2</sup> hybridization as well as C2 (285.2 eV) associated to sp<sup>3</sup> hybridization. The impedance results showed that a-C:H film acts as a protective barrier against the corrosion process in artificial saliva medium. Regardless of the cell population, when the total apoptosis of osteoblastic cells or PBMCs was evaluated, only cells cultured on the alloy without a-C:H had significant induction of the apoptotic process. Moreover, only PBMCs cultured on the alloy without a-C:H had significant induction of inflammatory and anti-inflammatory cytokines that characterize immune activation. The biological results from this study suggest that the strategy of use a-C:H film to cover the Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V alloy promoted since its protection of the physiological environment to its biocompatibility improvement.

**Keywords:** a-C:H film; Titanium alloy; Biomedical application; Apoptotic process.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produtos primários de titânio metálico. ....	11
Figura 2: Comparação entre materiais metálicos em (a) densidade e em (b) resistência a tração específica em função da temperatura.....	12
Figura 3: Células unitárias atômicas das estruturas cristalinas do titânio em (a) arranjo estrutural do tipo $\alpha$ (rede cúbica cristalina Hexágonal Compacta – HC) em (b) arranjo estrutural do tipo $\beta$ (rede cúbica cristalina de corpo centrado – CCC).....	14
Figura 4: Tabela periódica com destaque em elementos estabilizadores de fase utilizados em ligas de titânio.....	15
Figura 5: Variação do diagrama de fases das ligas de titânio com a utilização de elementos estabilizadores. ....	16
Figura 6: Efeito causado estrutura cristalina das ligas de titânio devido a adição de elementos estabilizadores de liga.....	17
Figura 7: Diagrama ternário para filmes de carbono amorfo. ....	24
Figura 8: Imagem da liga $Ti_6Al_4V$ utilizada no presente trabalho. ....	28
Figura 9: (a) Representação do método de deposição de filme a-C:H via método PECVD, (b) superfície da liga $Ti_6Al_4V$ contendo o revestimento. ....	29
Figura 10: Equipamento utilizado na Microscopia de Força Atômica. ....	30
Figura 11: Equipamento utilizado na obtenção dos espectros de FTIR. ....	31
Figura 12: Equipamento utilizado na obtenção de Espectros Raman. ....	31
Figura 13: Preparação das amostras em no equipamento de ultra-som.....	33
Figura 14: Montagem experimental dos ensaios eletroquímicos. ....	34
Figura 15: Espectro Raman da liga $Ti_6Al_4V$ na ausência de a-C:H. Linhas tracejadas são diretrizes para os olhos. ....	36
Figura 16: Imagens de superfície obtidas por OM da liga $Ti_6Al_4V$ sem filme a-C:H.....	37
Figura 17: Imagens 2D e 3D da superfície da liga $Ti_6Al_4V$ não revestida, obtida pela técnica AFM, escala de $5 \times 5 \mu m$ .....	38
Figura 18: Imagens de MEV da superfície da liga $Ti_6Al_4V$ (a) elétrons retroespalhados, (b) elétrons secundários com ampliação de 1000X, (c) elétrons retroespalhados com ampliação de 1000X após tratamento usando o software ImageJ e (d) imagem com ampliação de 10000X. ....	39
Figura 19: (a) micrografia obtida via SEM e (b) mapas de composição química da liga $Ti_6Al_4V$ obtidos via EDX realizada em linha. ....	40
Figura 20: (a) imagem obtida via MEV e marcação de pontos para análise EDX (b) análise química qualitativa (% em peso) obtida usando a técnica EDX na liga $Ti_6Al_4V$ .....	41

Figura 21: Espectros Raman com curvas de ajuste D e G para o filme a-C:H, obtidos pela técnica PECVD na superfície da liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V. ....	43
Figura 22: Espectro de FTIR da liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V revestida com filme a-C:H. Linhas tracejadas são diretrizes para os olhos. ....	44
Figura 23: Espectro de FTIR da liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V revestida com filme a-C:H em (a) espectro entre 1200 e 1700 cm <sup>-1</sup> e (b) entre 2800 e 3050 cm <sup>-1</sup> . Linhas tracejadas são diretrizes para os olhos. ....	45
Figura 24: Imagens de superfície obtidas por MO da liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V contendo filme a-C:H. (a) superfície da liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V revestida com filme a-C:H, ampliação 1000X e (b) imagem tratada com o <i>software imageJ</i> para obter mais informações sobre os defeitos da superfície. ....	47
Figura 25: Imagens 2D e 3D da superfície da liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V contendo filme a-C:H, escala de 5x5µm. ....	47
Figura 26: Espectro XPS da liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V contendo filme a-C:H, em (a) as componentes C1s e em (b) a componente O1s. ....	48
Figura 27: Curvas de polarização potenciodinâmica obtidas na liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V exposta à solução de saliva artificial a 37 ± 2 °C. (linha vermelha - Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V revestido com filme a-C:H) e (linha preta - Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V sem revestimento). ....	50
Figura 28: Gráficos Bode dos espectros de impedância eletroquímica da liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V expostos à solução de saliva artificial a 37±2 °C. (linha vermelha - Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V revestido com filme a-C:H) e (linha preta - Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V sem revestimento). ....	51
Figura 29: Citometria de fluxo de células osteoblásticas. (a) Dot plot do controle positivo. (b) Dot plot de células tratadas com filme a-C:H. (c) <i>Dot plot</i> de células tratadas com Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V. ....	52
Figura 30: Ensaio de citotoxicidade por citometria de fluxo. Resultados expressos como média ± desvio padrão; *p<0,05 (One-way ANOVA seguido de teste Tukey) (n=5). ....	53
Figura 31: Representação esquemática da estratégia de restrição e determinação da porcentagem de células apoptóticas entre PBMCs, células T CD4 + e CD8 +. Apoptose total de PBMCs (b) controle, (c) liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V e (d) liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V contendo filme a-C:H. ....	55
Figura 32: PBMCs humanas cultivadas na liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V revestida com a-C:H não mostraram nenhum vestígio de apoptose. São apresentadas representações gráficas da apoptose total (b), precoce (c) e tardia (d) para PBMCs. Os gráficos (e), (f) e (g) demonstram apoptose total, precoce e tardia para linfócitos T CD8 +. Os gráficos (h), (i) e (j) demonstram apoptose total, precoce e tardia para linfócitos T CD4+ respectivamente. Para todos os gráficos, as células foram cultivadas por 24 h sem Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V ou na liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V contendo ou não filme a-C:H. As barras representam média ± erro padrão (SEM) em quintuplicados. ....	55
Figura 33: Efeito da liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V contendo ou não filme a-C:H na produção de citocinas de PBMCs. PBMCs humanas foram coletadas e cultivadas por 24 h na superfície da liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V contendo ou não filme a-C:H. PBMCs cultivadas na placa, mas na ausência de liga Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V foram usadas como controle. Após 24 h de cultura, o sobrenadante foi coletado e analisado para detectar TNF-α (a), IL-10 (b), IL-2 (c) e IL-5 (d) por matriz de esferas citométricas. As barras	

representam a média  $\pm$  erro padrão do nível de produção das citocinas de amostras em quintuplicada. \* P < 0,05 comparado com a liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V sem filme a-C:H.....57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais mineiras para extração do Titânio .....	9
Tabela 2: Propriedades do titânio .....	14
Tabela 3: Tipos de ligas de titânio aplicados na odontologia.....	20
Tabela 4: Resultados de perda de massa após teste de imersão estática de diferentes ligas metálicas utilizadas na odontologia.....	21
Tabela 5: Algumas propriedades mecânicas das principais ligas metálicas utilizadas na odontologia.....	23

## LISTA DE SIGLAS

ABIMO – Associação Brasileira da Indústria Médica Odontológica Hospitalar

a-C:H - Carbono Amorfo Hidrogenado

AFM - Atomic Force Microscope

ATCC - American Type Culture Collection

CBA - Citometric Bead Array

C-C – Ligações entre átomos de Carbono

CCC – Estrutura Cristalina Cúbica de Corpo Centrado

CE - Contra - Eletrodo

CVD - Deposição Química à Vapor (do inglês, Chemical Vapor Deposition)

C-X - Ligações entre átomos de carbonos e átomos de outros elementos

DLC – Diamante tipo Carbono (do inglês *Diamond Like Carbon*)

$E_{\text{corr}}$  - Potencial de Corrosão

EDX - Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X

EIE - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

ER - Eletrodo de Referência

ET - Eletrodo de Trabalho

FeTiO<sub>3</sub> - Ilmenita

FTIR - Infravermelho por Transformada de Fourier

GLC - Carbono como Grafite (do inglês Graphite Like Carbon)

GLCH – Carbono Hidrogenado como Grafite (do inglês *Hydrogenated Graphite Like Carbon*)

HC - Estrutura Cristalina Hexagonal Compacta

HDMSO - Hexametildisiloxano

$i_{\text{corr}}$  - corrente de corrosão

IRRAS - Espectroscopia de Reflexão e Absorção no Infravermelho

MO - Microscopia Ótica

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

RF – Rádio - frequência

RS - Espectroscopia Raman

PBMCs - células mononucleares de sangue periférico

PBS – Tampão Salina

PCA – Curvas de Potencial de Circuito Aberto

PECVD - Vapor Químico com Plasma Aprimorado (do inglês *Chemical enhanced by plasma Vapor Deposition*)

PI - Iodeto de Propídio

PLC - Carbono como Polímero (do inglês *Polymer Like Carbon*)

PVD – Deposição Física a Vapor (do inglês *Physical Vapor Deposition*)

PPc – Curva de Polarização Potenciodinâmica

Rutílo (TiO<sub>2</sub>) - Dióxido De Titânio

SiC - Carbetto de Silício

ta-C - DLC do tipo tetraedro

ta-C:H - DLC hidrogenado do tipo tetraedro

Ti c.p. - Titânio Metal Comercialmente Puro

XPS - Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios-X

## SUMÁRIO

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
<b>1.2.1 Biomateriais.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.2 Titânio .....</b>	<b>8</b>
1.2.2.1 <i>História da extração e utilização do titânio .....</i>	9
1.2.2.2 <i>Processos de produção e beneficiamentos do titânio metálico .....</i>	10
1.2.2.3 <i>Benefícios e aplicações do titânio metálico .....</i>	12
1.2.2.4 <i>Titânio metálico e suas ligas .....</i>	13
1.2.2.5 <i>A utilização das ligas de titânio na odontologia .....</i>	19
<b>1.2.3 Filmes Finos a-C:H .....</b>	<b>23</b>
1.2.3.1 <i>Métodos de deposição.....</i>	24
1.2.3.2 <i>A utilização de DLC como revestimento de biomateriais.....</i>	25
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1 MATERIAIS .....	28
3.2 MÉTODOS .....	28
3.2.1 <b>Preparação das amostras .....</b>	<b>28</b>
3.2.2 <b>Obtenção dos filmes a-C:H .....</b>	<b>29</b>
3.2.3 <b>Caracterização morfológica da liga Ti6Al4V sem e com revestimento de a-C:H .....</b>	<b>30</b>
3.2.4 <b>Caracterização estrutural do filme a-C:H.....</b>	<b>30</b>
3.2.5 <b>Análise de XPS .....</b>	<b>31</b>
3.2.6 <b>Testes eletroquímicos.....</b>	<b>32</b>
3.2.7 <b>Testes biológicos .....</b>	<b>34</b>
3.2.7.1 <i>Isolamento e cultura de células mononucleares do sangue periférico.....</i>	34
3.2.7.2 <i>Cultura de células MC3T3-E1 pré-osteoblásticas.....</i>	34
3.2.7.3 <i>Determinação da viabilidade celular .....</i>	35
3.2.7.4 <i>Quantificação de citocinas .....</i>	35
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>



4.1 CARACTERIZAÇÃO DA LIGA $Ti_6Al_4V$ .....	36
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA LIGA $Ti_6Al_4V$ CONTENDO FILME a-C:H.....	42
4.3 ENSAIOS ELETROQUÍMICOS .....	49
4.4 VIABILIDADE CELULAR E RESPOSTA IMUNE .....	51
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os números de casos de implantes dentários no Brasil têm aumentado significativamente nos últimos anos. De acordo com uma pesquisa divulgada pela Associação Brasileira da Indústria Médica Odontológica e Hospitalar (ABIMO), somente no ano de 2014 foram realizados aproximadamente 800 mil implantes dentários em nosso país, e a perspectiva era crescimento deste mercado a uma taxa de 15% ao ano (ABIMO, 2014). Essa ocorrência está relacionada a dois principais fatores: o envelhecimento da população mundial (NIINOMI, 2012) e ao progresso na medicina regenerativa (FAROKHI *et al.*, 2018).

No primeiro caso, o processo de envelhecimento causa o aumento de perda óssea devido ao enfraquecimento natural da estrutura óssea. Sendo assim, as pessoas idosas estão mais propensas a lidar com a osteoporose e outros tipos de desgaste. Além disso, pode-se citar também uma maior dificuldade para manusear as coisas e controlar as situações, um ponto que dificulta a higienização bucal. Em relação ao segundo caso, o avanço nas técnicas de implante bem como o desenvolvimento de materiais mais adequados para aplicações biomédicas proporcionam uma melhor interação entre o material e o meio biológico, resultando em uma melhor qualidade dos implantes, diminuindo o risco de intercorrências provenientes e contribuindo para melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Desta forma, os biomateriais metálicos são importantes para a reconstrução e substituição de tecidos ósseos (NIINOMI, 2012). Dentre os mais utilizados para esta finalidade, as ligas de titânio possuem propriedades vantajosas em relação aos concorrentes como as ligas de CoCr e aços inoxidáveis.

Conforme relatado por Pina *et al.* (2015) e Poursaei (2019), a utilização de titânio como biomaterial se deve à sua excelente resistência à corrosão em meio contendo íons agressivos, boa resistência mecânica, resistência ao desgaste, é compatível com sangue, não cancerígeno e não inflamatório (RAJAN; BENDAVID; SUBRAMANIAN, 2019). Com isso o titânio comercialmente puro (Ti c.p.) e também as ligas de titânio são materiais adequados para a produção de próteses e peças de implantes. Segundo Simsek *et al.* (2019), as ligas de titânio são divididas em quatro grupos: ligas *near- $\alpha$* ,  $\alpha$ ,  $\alpha+\beta$  e ligas  $\beta$ . Estes grupos são definidos de acordo com o arranjo dos átomos em sua estrutura cristalina. O arranjo do tipo  $\alpha$  possui uma rede cristalina do tipo Hexagonal Compacta (HC), já o arranjo  $\beta$  é do tipo cúbico de corpo centrado (CCC). Estes arranjos são definidos como fase e podem ser alterados com a utilização de elementos de liga e também por meio de tratamentos térmicos (PETERS; LEYENS, 2003). Isso permite obter diferentes propriedades como densidade, resistência a tração, elasticidade, resistência ao desgaste e à corrosão, dentre outros.

Uma liga de titânio que tem sido amplamente utilizada nas áreas odontológica e ortopédica é a  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ . Este material possui uma estrutura cristalina do tipo  $\alpha+\beta$  e foi projetado para ser usada na indústria aeronáutica e em aplicações militares, entretanto, devido as suas propriedades passou a ser aplicada na área médica (ARSLAN *et al.*, 2013). Uma das principais desvantagens observadas no uso de implantes desta liga é a falha prematura provocada por mecanismos de corrosão associados ao processo de desgaste, denominado tribocorrosão (HATEM *et al.*, 2017). Este processo ocorre devido às interações dos implantes com as células e fluidos corporais, que produzem um ambiente degradante aos metais (BAYÓN *et al.*, 2015). Os produtos gerados podem ter efeitos adversos, como danos celulares, infecções e coagulação sanguínea (KARIMI; NICKCHI; ALFANTAZI, 2012). Além disso, pode expor o corpo a elementos nocivos presentes na composição do metal implantado (HATEM *et al.*, 2017). No caso da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  pode acontecer liberação de íons, tais como: alumínio, vanádio, dentre outros que por sua vez acumulam-se nos órgãos e tecidos podendo gerar distúrbios neurológicos ao paciente (RAO *et al.*, 1996 apud MIOTTO *et al.*, 2016). Estudos mostraram que o alumínio está relacionado com a doença de Alzheimer, (PERL; MOALEM, 2006), e o vanádio relacionado ao mal de Parkinson (NGWA *et al.*, 2009), além de induzir disfunção do bulbo olfativo (NGWA *et al.*, 2014).

Para evitar a corrosão e melhorar a bioatividade do implante metálico, nos últimos anos diversas pesquisas foram direcionadas para o desenvolvimento de novos materiais e tecnologias de tratamento de superfície visando uma melhor interação entre um biomaterial e o ambiente biológico. No primeiro caso, quando se trata de novos materiais à base de titânio se busca novas ligas tipo  $\beta$  produzidas com a utilização de materiais não tóxicos, como o tântalo, nióbio e zircônio (MIOTTO *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2014; KIRMANIDOU *et al.*, 2014). Estas ligas possuem módulo de elasticidade inferiores em comparação a outros biomateriais metálicos (RIBEIRO *et al.*, 2009; CORDEIRO *et al.*, 2017), no entanto, os valores se aproximam ao do osso humano o que é eficaz na inibição da atrofia, levando a uma boa remodelação óssea. No segundo caso, se busca métodos de tratamento de superfície que proporcione interação adequada entre o material e o meio corporal. Busca-se com os tratamentos de superfície aumentar efetivamente a resistência corrosão, a dureza e a resistência ao desgaste, reduzindo assim o coeficiente de atrito e a transferência de íons da superfície do material para meio biológico.

Alguns métodos de tratamento de superfície são geralmente aplicados para alcançar estes objetivos (FOUZIYA *et al.*, 2016; KIRMANIDOU *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; KULKARNI *et al.*, 2014), tais como: métodos mecânicos, químicos, eletroquímicos e físicos.

Os métodos mecânicos como usinagem, retificação, polimento e jateamento, produzem morfologia de superfície específicas para melhorar a adesão. Os métodos químicos incluem tratamentos ácidos ou alcalinos, tratamento com peróxido de hidrogênio e sol-gel cujo o objetivo principal é melhorar a biocompatibilidade, a bioatividade ou a condutividade óssea. A deposição química a vapor é utilizada para melhorar a resistência ao desgaste e à corrosão assim como a compatibilidade sanguínea. Os métodos eletroquímicos incluem oxidação anódica, deposição catódica e oxidação eletrolítica em plasma e, geralmente são utilizados para melhorar a resistência à corrosão, biocompatibilidade, bioatividade e promover osseointegração. Os métodos físicos envolvem spray térmico, deposição física a vapor (PVD) e implantação iônica visando melhorar principalmente a resistência ao desgaste e à corrosão.

O revestimento de superfície via deposição e filmes finos são constantemente estudados visando uma melhor interação do material com o ambiente biológico. Um exemplo é o filme fino de carbono tipo diamante (do inglês, *Diamond Like Carbon* - DLC) que tem atraído a atenção nas últimas décadas para aplicações médicas (CHOUDHURY *et al.*, 2014). Os revestimento DLC é um termo genérico usado para nomear um conjunto de filmes de carbono amorfo, incluindo carbono amorfo (a:C) e carbono amorfo hidrogenado (a-C:H) (GAUR *et al.*, 2016). Estes materiais possuem excelentes propriedades mecânicas, tribológicas e biológicas (CHOU; LIN; WU, 2017). Conforme relatado por Liao *et al.*, (2017), filmes DLC com baixa proporção de ligações  $sp^2/sp^3$ , apresentam uma estrutura semelhante ao diamante, diminuindo as reações inflamatórias, osteogênicas e fibroblásticas, com maior viabilidade celular. Ademais, estudos realizados por Zhang *et al.*, (2017), mostram que a deposição de filmes DLC na superfície da liga CoCrMo melhorou a resistência ao processo de corrosão e micro-desgaste abrasivo.

Existem muitos estudos que acessam a biocompatibilidade de filmes DLC em uma variedade de ambientes de interesse terapêutico. No entanto, existem discrepâncias significativas, por exemplo, entre os resultados *in vivo* e *in vitro* na sua utilização como revestimento de implantes. Uma estratégia para reduzir essas inconsistências seria reproduzir esses testes por diferentes ensaios, com condições e revestimentos distintos para obter um desempenho preciso do revestimento, uma vez que as características materiais dos filmes DLC são capazes de influenciar a biocompatibilidade (LOVE *et al.*, 2013). Para citar, a comparação entre filmes de DLC que tendem a estruturas de fases de diamante *versus* outro tendendo a estruturas de fases de grafite mostraram que a estrutura ( $sp^2/sp^3$ ) é um fator importante na regulação da resposta biológica do DLC, como o comportamento celular (LIAO *et al.*, 2017). Além disso, revestimentos contendo altas quantidades de  $sp^2$  com poucas estruturas  $sp^3$ , ou seja,

a-C:H normalmente apresentam baixa tensão interna, contribuindo para reduzir a delaminação dos filmes, danos ou formação de produtos de corrosão (LIAO *et al.*, 2017). A literatura mostra que os revestimentos semelhantes a polímeros à base de carbono produzidos por deposição de vapor químico assistido por plasma (PECVD) possuem qualidades biológicas superiores às alternativas convencionais de revestimento (por exemplo, deposições de vapores químicos e físicos ou mesmo técnicas úmidas como imersão em solventes) (SANTOS; BILEK; WISE., 2015).

Como demonstrado anteriormente, as técnicas de tratamento de superfície aparecem muito promissoras para o melhoramento de propriedades corrosiva e mecânica de materiais metálicos utilizados na área biomédica. Os filmes DLC, por exemplo, quando depositados na superfície da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V (amplamente utilizada na área médica) promove o melhoramento destas propriedades. Todavia, verifica-se que todos os estudos apresentados na literatura estão preocupados somente com a deposição do filme DLC na superfície do material base e nas respostas biológicas, biocompatibilidade e citotoxicidade. Desta maneira, é de extrema importância a realização de estudos que permitam entender melhor o comportamento dos filmes DLC depositados na superfície da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V e suas respostas inflamatórias frente a um meio biológico. Neste trabalho, a liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V foi tratada superficialmente buscando formar um filme de carbono amorfo hidrogenado (a-C:H) biocompatível com boas propriedades mecânicas e corrosivas. Os filmes foram depositados no substrato via técnica PECVD, do inglês *Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition* usando gás metano como precursor. Os filmes produzidos foram caracterizados morfologicamente e estruturalmente por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman (RS) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS). Estes filmes foram ainda caracterizados via ensaios eletroquímicos, com o intuito de analisar a resistência ao processo de corrosão em meio de saliva artificial. Também foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* na liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V e com revestimento filme a-C:H para fornecer informações preliminares sobre a toxicidade dos materiais desenvolvidos, atuando assim, como um método de pré-seleção para identificar sua biocompatibilidade celular ou tecidual. As amostras também foram avaliadas quanto à sua capacidade de induzir a ativação de células imunes após 24 h.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Biomateriais

Os biomateriais fazem parte do conjunto de dispositivos utilizados na área da saúde com finalidades terapêuticas, bem como, de substituição ou aumento de tecidos e órgãos (HELMUS E TWEDEN, 1995; KIRADZHIYSKA; MANTCHEVA, 2019; PARK, 2007 apud PINEIZ, 2014). Como característica imprescindível, estes materiais devem atender aos requisitos de funcionalidade para os quais foram projetados. Assim, vem sendo utilizados em diferentes aplicações, tais como: próteses de implantes dentários, substituição óssea, lentes, implantes subdérmicos, partículas para liberação controlada de fármacos, curativos, desenvolvimento de órgãos artificiais como coração, rins, entre muitas outras aplicações.

O uso de materiais aplicados em meios biológicos na correção dos mais diversos tipos de problemas relacionados à saúde humana é uma prática comum desde a antiguidade (SAMPAIO; CARVALHO; CARNEIRO, 2018). Há registro, do uso de estruturas de linho e ouro no antigo Egito (2000 aC) e também referências ao uso de mel, graxa e fibra vegetal para melhorar a cicatrização de feridas de intestino de gatos, na Europa, durante a Idade Média, assim como de dentes artificiais feitos de conchas pelos Maias (600 aC), de ferro pelos franceses (200 aC) e de ouro e madeira pelos romanos, chineses e astecas (DAS; KASOJU; BORA, 2010 apud SAMPAIO; CARVALHO; CARNEIRO, 2018). Porém o uso empírico desses materiais além de gerar desconforto aos adeptos e necessitados da técnica, também ocasionava reações adversas graves ao organismo.

A partir do século passado, o uso destes materiais passou a ser estudado e iniciou-se a busca por componentes mais adequados às necessidades fisiológicas. Inicialmente, no ano de 1950, os estudos baseavam-se em materiais inertes, os quais não reagiriam com o organismo humano. Com a evolução das pesquisas, focou-se na bioatividade dos materiais, compostos que promovam a regeneração de fato do tecido ou órgão fraturado. Devido estes fatores, nos últimos anos o setor de biomateriais cresceu em número de produtos disponíveis, tendo impacto na medicina regenerativa, resultando na melhoria da durabilidade e qualidade de um material assim como aumento da qualidade de vida de um paciente. (PIRES; BIERHALS; MORAES, 2015).

Um material biocompatível deve possuir a habilidade de desempenhar sua função com resposta tecidual adequada em uma aplicação específica. (Williams, 1981 apud BRUNETTE *et al.*, 2001). O contato do material com o tecido vivo requer algumas propriedades físicas e químicas específicas ao meio biológico. Estas propriedades determinam não só a aplicabilidade,

como também a classe destes materiais. Sendo assim é necessário não apresentar resposta inflamatória ou tóxica que possam provocar alterações que modifiquem a função normal das células (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Além disso, o tempo de degradação do material deve permitir a ocorrência do processo de regeneração. O material deve apresentar propriedades mecânicas adequadas à aplicação para que foi indicado e qualquer variação das propriedades mecânicas decorrente da sua degradação *in vivo* seja compatível com o ambiente biológico (CAO; WANG, 2009 apud OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Uma das classificações mais utilizadas para os biomateriais relaciona-se à resposta biológica ocasionada por sua interação com o organismo. Estes materiais podem ser classificados como: bioinertes, bioativos, biodegradáveis. Os materiais bioinertes são aqueles que não causam reação no organismo, uma vez que possuem uma estabilidade química elevada. Os materiais bioativos são aqueles que interagem com o organismo, permitindo a formação de tecidos em sua superfície, sendo ideais para implantes permanentes pois estabelecem uma interface contínua capaz de suportar cargas funcionais. Os materiais biodegradáveis ou biorreabsorvíveis são materiais que se degradam no corpo enquanto são substituídos pela regeneração de tecidos naturais. Os subprodutos químicos dos materiais degradantes são absorvidos e liberados através de processos metabólicos do corpo (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

A seleção de um material biocompatível deve iniciar com a identificação das propriedades necessárias para a aplicação. Como essas propriedades são extremamente sensíveis a variações da estrutura do material, tanto em escala micro quanto nanométrica, é fundamental que se tenha um entendimento da correlação da microestrutura com as propriedades desejadas. O tipo de constituinte de um biomaterial é o que vai conferir a ele as propriedades físicas específicas. Nesse sentido, os biomateriais podem ter origem sintética, natural ou natural quimicamente modificada, desde que sejam isentos de desencadear qualquer resposta biológica adversa, seja ela local ou sistêmica (KIRADZHIYSKA; MANTCHEVA, 2019; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Eles podem ser classificados em diferentes tipos, tais como, materiais metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos.

Os biomateriais metálicos são caracterizados principalmente pela alta resistência mecânica à fadiga e à fratura. Também são atribuídos aos metais a boa condutividade elétrica, isso se deve a composição cristalina dos metais, em que os cátions são envolvidos em uma nuvem de elétrons proporcionando uma melhor maleabilidade dos átomos e conferindo outra característica importante dos metais, a alta plasticidade. Devido a estas características, os metais têm sido amplamente utilizados como componentes estruturais visando à substituição,

reforço ou estabilização de tecidos rígidos, os quais são constantemente submetidos a altas cargas de tração e compressão. Neste âmbito, as aplicações mais comuns incluem fios, parafusos e placas para fixação de fraturas, implantes dentários e próteses para substituição de articulações (POINERN, 2012 apud PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Os materiais cerâmicos incluem uma ampla gama de compostos que tiveram papel essencial no desenvolvimento dos biomateriais. Devido à propriedades como compatibilidade com tecidos rígidos, como ossos e inércia química com o meio fisiológico são amplamente utilizados. As aplicações englobam as mais diversas áreas, como instrumentos de diagnóstico, próteses ortopédicas, dispositivos para a reconstrução odontológica e maxilo-facial, válvulas cardíacas, traqueias artificiais e preenchimentos ósseos. As cerâmicas tendem a se comportar como materiais de baixa condutividade elétrica e térmica (DEE; PULEO; BIZIOS, 2002 apud PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015), são menos densas do que a maioria dos metais, apresentam boa estabilidade dimensional, são resistentes ao desgaste e à compressão e estáveis em ambientes ácidos. No entanto, as fortes ligações interatômicas formam estruturas cristalinas tridimensionais com alto grau de compactação, tornando-os duros, quebradiços e suscetíveis à fraturas, com pouca ou nenhuma deformação plástica (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Os compósitos são uma classe de materiais constituídos por uma fase contínua (matriz) e uma fase dispersa (componente de reforço ou modificador) separadas por interfaces, cujas características podem incorporar propriedades combinadas dos constituintes individuais. O material de reforço ou modificador pode ser utilizado na forma de fibras ou partículas e é adicionado com diversos objetivos, como, por exemplo, melhorar propriedades mecânicas, aumentar a taxa de degradação, melhorar a biocompatibilidade e bioatividade ou até mesmo, controlar o perfil de liberação de fármacos ou fatores de crescimento incorporados aos dispositivos (WANG, 2003 apud PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Os principais fatores que afetam as propriedades dos compósitos são as características dos materiais constituintes, o percentual, distribuição e orientação das fibras ou partículas na matriz e as interações interfaciais. A formação dos biomateriais compósitos pode se dar de diversas formas, sendo que as principais associações são do tipo polímero-cerâmica e metal-cerâmica.

Finalmente, os biomateriais poliméricos são aqueles constituídos por repetições de subunidades ao longo da cadeia principal. Eles podem ser classificados como polímeros naturais, quando extraídos por meio de organismos vivos, ou polímeros sintéticos, provenientes de reações de polimerização. Os polímeros naturais e sintéticos possuem formas de degradação distintas e essa característica deve ser levada em consideração na escolha entre eles para a utilização como biomateriais devido ao contato dos produtos de degradação com os fluidos



biológicos do paciente podendo levar a reações adversas. Contudo, os biomateriais poliméricos possuem ampla utilidade na área médica, por apresentarem boa biocompatibilidade e flexibilidade, além da variedade de formatos e formas de apresentação e baixo custo de produção. Portanto, podem ser empregados na engenharia tecidual para regeneração e/ou substituição de tecido e órgãos, sistemas de liberação controlada de drogas e adesivos médicos têxteis (SANTOS; MARINHO; MIGUEL, 2013; PIRES; BIERHALS; MORAES, 2015).

### 1.2.2 Titânio

O titânio está amplamente distribuído na Terra. Há uma estimativa de 0,6% da crosta ser composta por esse metal (HABASHI, 1997). É o nono elemento químico mais abundante do nosso planeta (DONACHIE Jr., 2000; FANG et. al, 2017). Entre os metais estruturais, só é menos abundante do que o alumínio, o ferro e o magnésio (FREESE; VOLAS; WOOD, 2001; PETERS; LEYENS, 2003). Existem 23 isótopos conhecidos de titânio variando de  $^{38}\text{Ti}$  a  $^{61}\text{Ti}$ , no entanto, apenas cinco destes são encontrados estáveis na natureza, sendo:  $^{46}\text{Ti} = 8,25\%$ ,  $^{47}\text{Ti} = 7,44\%$ ,  $^{48}\text{Ti} = 73,72\%$ ,  $^{49}\text{Ti} = 5,41\%$  e  $^{50}\text{Ti} = 5,18\%$  (KREBS, 2006).

Embora o titânio esteja amplamente espalhado sobre a crosta terrestre, minerais com altas concentrações deste elemento são escassos (DONACHIE Jr., 2000). Existem duas fontes principais de extração do titânio, sendo o rutílo ( $\text{TiO}_2$ ) e a ilmenita ( $\text{FeTiO}_3$ ). Todavia, pode-se destacar também as variações do rutílo, como a anatase e a broquita, outros como a titanita e a titanomagnetita em alguns minérios de ferro (vide Tabela 1) e posteriormente na escória resultante da produção de ferro metal (KREBS, 2006). Estes minerais são encontrados em todo o mundo em depósitos vulcânicos e aluviais (FREESE; VOLAS; WOOD, 2001; DONACHIE Jr., 2000). São extraídos principalmente na Austrália, Serra Leoa, e África do Sul. A ilmenita é encontrada principalmente na Austrália, Canadá, Noruega, África do Sul (DONACHIE Jr., 2000) e também no Brasil.

A partir da extração destes minerais com diversos graus de impureza, estes são reduzidos a dióxido de titânio puro por processos químicos e físicos. Na atualidade, graças ao avanço na tecnologia, a extração de minério, beneficiamento e processo químico possibilitam a fabricação de grande volume de  $\text{TiO}_2$  que será reduzido em titânio metálico. No entanto, apenas 5% do total de dióxido de titânio é utilizado para a produção de titânio metal grande parte de todo o minério são destinados para a produção corante devido sua cor branca brilhante e alta opacidade.

Tabela 1: Principais minerais para extração do Titânio

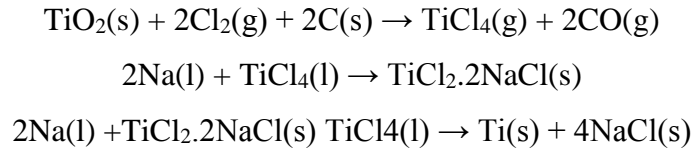
Mineral	Fórmula	TiO <sub>2</sub> (%)
Rutilo	TiO <sub>2</sub>	92-98
Anatase	TiO <sub>2</sub>	90-95
Broquita	TiO <sub>2</sub>	90-100
Ilmenita	FeTiO <sub>3</sub>	35-60
Leucoxena	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> TiO <sub>2</sub>	60-90
Perovisquíta	CaTiO <sub>3</sub>	40-60
Titanita	CaTiSiO <sub>3</sub>	30-42
Titanomagnetíta	Fe(Ti)Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	2-20

Fonte: HABASHI, 1997

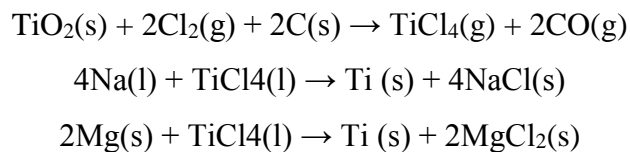
#### 1.2.2.1 História da extração e utilização do titânio

A extração e utilização do titânio são recentes em comparação a outros metais como ferro e alumínio. Os primeiros indícios da existência do titânio remontam ao ano de 1791, quando William Gregor examinava as propriedades magnéticas de um mineral do rio local em Cornwall, na Inglaterra. Ele isolou uma areia negra, agora conhecida como ilmenita (FeTiO<sub>3</sub>), após tratamento utilizando ácido clorídrico produziu o óxido impuro de um novo elemento (TiO<sub>2</sub>) (PETERS; LEYENS, 2003; CREMASCO, 2008; KREBS, 2006). Quatro anos mais tarde, o óxido desse metal foi identificado e isolado pelo químico alemão Martin Heinrich Klaproth, através de um mineral no qual denominou como “rutilo”, e o novo elemento de que era composto aquele mineral denominou “titânio” em referência a mitologia grega. (LÜTJERING, 2003; PETERS; LEYENS, 2003; KREBS, 2006).

A alta reatividade do titânio com hidrogênio, oxigênio e nitrogênio requer técnicas sofisticadas e dispendiosas de manuseio e processamento para extrair o titânio puro do minério (FREESE; VOLAS; WOOD, 2001). Devido a este fato, passaram mais de 100 anos após a sua descoberta, para se desenvolver uma técnica capaz de isolar o metal. Foi em 1910, que o Mineralogista Matthew Albert Hunter da Rensselaer Polytechnic Institute em Troy, Nova York, realizou tal feito. O processo desenvolvido por Hunter, usava como agente redutor o sódio metálico. Neste processo, o rutilo natural ou sintético é clorado na presença de carbono formando o TiCl<sub>4</sub> (HUNTER, 1940 apud BRAGA; FERREIRA, 2006). O tetracloreto de titânio obtido é purificado por destilação e tratamento químico sendo reduzido a titânio metálico como mostrado na reação:



No entanto Wilhelm Justin Kroll é reconhecido como o pai da indústria de titânio metálico, em 1932 ele produziu uma quantidade significativa utilizando  $\text{TiCl}_4$  com a utilização de cálcio como agente redutor, e em 1946 e no U.S. Bureau of Mines, demonstrou que titânio poderia ser extraído comercialmente por redução de  $\text{TiCl}_4$  e alterando o reagente de redução. Essa técnica é conhecida como processo Kroll, e ainda é o método mais utilizado para obtenção deste metal na atualidade (PETERS; LEYENS, 2003). O processo desenvolvido por Kroll, emprega a redução do  $\text{TiCl}_4$  a titânio metálico com magnésio metálico fundido como agente redutor. Os métodos desenvolvidos por Kroll e Hunter são quimicamente similares, em ambos os métodos é gerado o titânio metálico denominado esponja devido sua aparência porosa. As reações básicas dos dois processos são dadas a seguir:



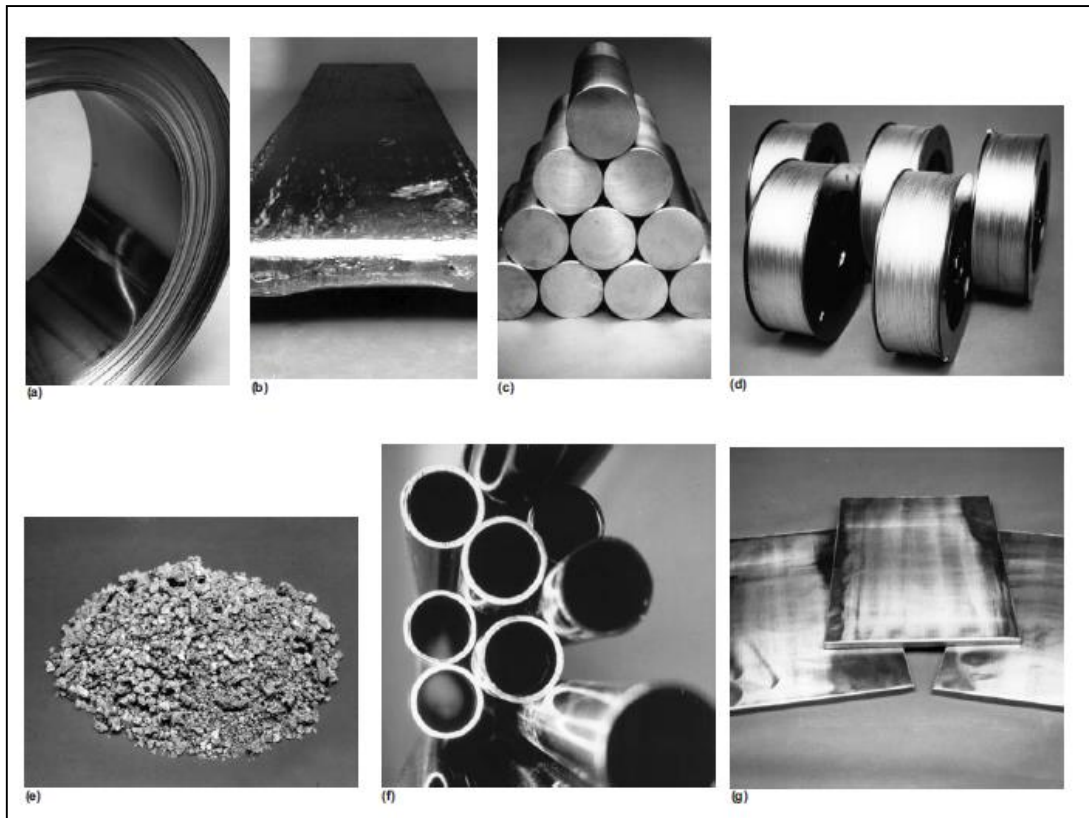
Desde os anos 1930 já se sabia do potencial de aplicabilidade deste material, sendo referido como o metal maravilha. Com isso, as ligas de titânio foram originalmente projetadas para utilização como materiais estruturais, e a partir da segunda guerra mundial, se tornaram materiais chave para engenharia aeronáutica, e posteriormente como biomaterial, na indústria química, automobilística dentre outros. No ano de 1948, a empresa DuPont Company (PETERS; LEYENS, 2003) em parceria com o governo americano foi a primeira a produzir titânio metal comercialmente puro (Ti c.p.) e algumas de suas ligas. Na década de 1960 ocorreu o primeiro implante utilizando o titânio como biomaterial. E a partir da década de 1990 houve uma consolidação no mercado de titânio, aumentando o número de empresas, havendo a disponibilidade de esponjas e lingotes para remontagem (DONACHIE Jr., 2000). Com isso houve muito estudo sobre esse material em diversos aspectos, o que possibilitou a produção de ligas nas quais possuem melhorias em determinadas propriedades, dependendo da aplicação.

#### *1.2.2.2 Processos de produção e beneficiamentos do titânio metálico*

A produção e fabricação tradicional de Titânio metálico segue os mesmos procedimentos gerais que o aço, incluindo a produção de metal primário, fusão e vazamento de lingotes de metal. Basicamente o processamento ocorre em quatro etapas: A redução do minério

de titânio em uma esponja; o aquecimento desta esponja pura, ou com elementos para formar uma liga; a produção dos lingotes; a transformação de um lingote em chapas, placas, barras, arames, tubos (Figura 1). E a partir destes são gerados diversos outros produtos.

Figura 1: Produtos primários de titânio metálico.



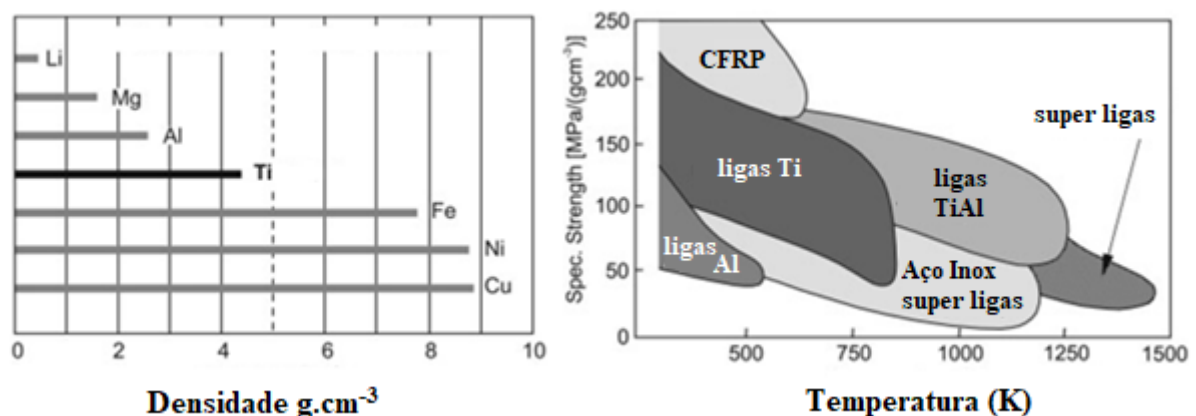
Fonte: Donachie jr., 2000.

No entanto, a principal limitação do titânio está na sua reatividade química com outros materiais a temperaturas elevadas. Essa propriedade exigiu o desenvolvimento de técnicas não convencionais de beneficiamento, fusão e fundição, consequentemente a obtenção do metal puro e também das ligas de titânio, o que torna o custo relativamente alto. Além do processo Kroll, muitos outros métodos foram criados com a intenção de redução de custo, porém isso ainda não foi possível. O metal pode ser também purificado pelo processo de van Arkel de Boer, que envolve a decomposição térmica de tetraiodeto de titânio. Pode ser processado por meio da metalurgia do pó, que pode oferecer melhorias na propriedade e no processamento. Em um método de fabricação mais recente, o processo FFC de Cambridge (CHEN, 2014), converte o pó de dióxido de titânio como um estoque para a produção de titânio metálico, sendo possível também fabricar ligas. Esse método carrega o benefício de trabalhar tanto com o pó de dióxido de titânio, quanto pó da esponja (DONACHIE Jr., 2000).

### 1.2.2.3 Benefícios e aplicações do titânio metálico

Alguns benefícios oferecidos pelas ligas de titânio ilustram a base para o uso generalizado deste metal. Pode se destacar o alto ponto de fusão, é superior a 1660 °C, embora a maioria das ligas comerciais opere a ou abaixo de 538 °C (PETERS; LEYENS, 2003). A densidade de titânio é relativamente baixa quanto ao ferro é apenas cerca de 60% da de superligas de aço ou base de níquel (DONACHIE Jr., 2000). A resistência à tração pode ser comparável à dos martensíticos de baixa resistência e é melhor que a dos austeníticos ou ferríticos. As ligas podem ter resistência final comparável às superligas de bases de ferro, como as ligas de base A286 ou cobalta. Seu coeficiente de expansão térmica é um pouco menor que o do aço e menos da metade do alumínio. O titânio é excepcionalmente resistente à corrosão. Muitas vezes, excede a resistência do aço inoxidável na maioria dos ambientes, e tem excelente resistência à corrosão no corpo humano. (DONACHIE Jr., 2000). A Figura 2 ilustra algumas dessas propriedades em comparação a outros materiais.

Figura 2: Comparação entre materiais metálicos em (a) densidade e em (b) resistência a tração específica em função da temperatura.



Fonte: Adaptado de PETERS e LEYENS, 2003

A indústria aeronáutica é o principal consumidor do titânio metal, assim como as suas ligas. A combinação de alta resistência, rigidez, boa tenacidade, baixa densidade e boa resistência à corrosão fornecido por várias ligas de titânio em diferentes faixas de temperaturas, permitem economia de peso em estruturas aeroespaciais e outras aplicações de alto desempenho (DONACHIE Jr., 2000). Com isso, esse metal vem sendo largamente utilizado principalmente como materiais de revestimentos de aeronaves e na fabricação das hélices de turbina.

O titânio tem a capacidade de passivar e, assim, exibir inércia química em ambientes contendo ácidos e cloretos minerais. Estes possibilitam a utilização deste metal em outros mercados consumidores como arquitetura, na indústria de processos químicos e de geração de

energia, em ambientes marinhos, na indústria automobilística, dentre outras (PETERS; LEYENS, 2003).

No entanto o campo de matérias biomédicas utilizando titânio é o que mais cresce na área de pesquisa de materiais (MOHAMMED *et al.*, 2012). Isso se deve pelo fato do titânio puro ser não tóxico, e assim como algumas ligas de titânio são biologicamente compatíveis com tecidos e ossos humanos. Além disso possuem excelente resistência à corrosão e baixo módulo de elasticidade, em comparação a outros biomateriais utilizados. Sendo assim o titânio e suas ligas vem sendo utilizado principalmente em implantes ortopédicos e odontológicos, estima-se que aproximadamente mil toneladas desse material seja implantados anualmente.

#### 1.2.2.4 Titânio metálico e suas ligas

O titânio e suas ligas são materiais relativamente novos em engenharia, no entanto sabe-se que eles possuem uma extraordinária combinação de propriedades. O metal puro tem densidade relativamente baixa, elevado ponto de fusão, extremamente resistente, além de serem dúcteis (CALLISTER Jr., 2002), e pode ser fortemente fortalecido pela liga e pelo processamento térmico (PETERS; LEYENS, 2003)..

O titânio é não magnético e possui boas propriedades de transferência de calor. Baixo coeficiente de expansão térmica, pontos de fusão elevado (DONACHIE Jr, 2000). Além disso, é um metal de transição com uma camada incompleta na estrutura eletrônica, podendo ser bi, tri ou tetravalente (íons  $Ti^{+2}$ ,  $Ti^{+3}$  ou  $Ti^{+4}$ ). Esse fator permite ao titânio formar uma solução sólida com a maior parte dos elementos, quando estes apresentarem uma diferença com o titânio em raio atômico de no máximo  $\pm 15\%$  segundo a regra de Hume-Rothery (MACÊDO, 2008). As propriedades características do titânio elementar são dadas na Tabela 2.

A resistência de corrosão do titânio nas temperaturas normais é muito alta. É virtualmente imune ao ar, a ambientes marinhos e uma variedade de ambientes industriais (CALLISTER Jr., 2002). Esta propriedade deve-se à formação de filmes óxidos finos, estes são densos, estáveis e aderentes na superfície do metal. Esses filmes não são permanentes, mas é possível regeneração após danos mecânicos se o oxigênio estiver presente no meio (HABASHI, 1997).

Semelhante a outros metais, o titânio pode cristalizar em várias estruturas a uma ampla gama de temperatura. A transformação completa de uma estrutura cristalina é chamada de transformação alotrópica, e a temperatura no qual ocorre esse processo é denominada temperatura transus (AHMED, 2014; PETERS; LEYENS, 2003; DONACHIE Jr., 2000).

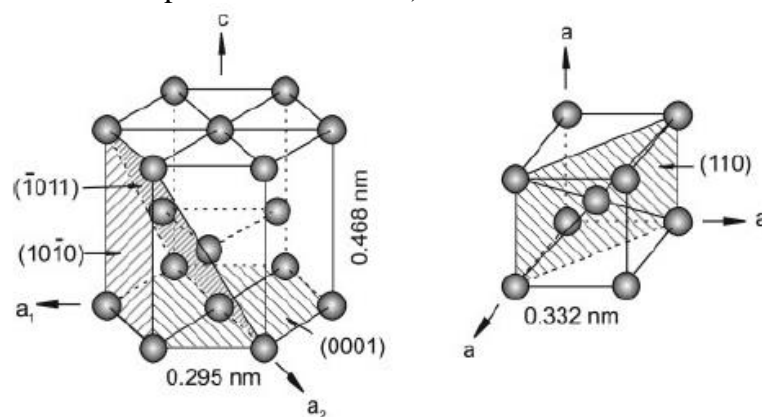
Tabela 2: Propriedades do titânio

Símbolo	Ti
Número atômico	22
Massa atômica (g/mol)	47,88
Raio atômico (nm)	0,148
Valência	+2, +3, +4
Eletronegatividade	1,54
Estrutura cristalina	$\alpha$ (HC) $\beta$ (CCC)
Temperatura de transição ( $\alpha/\beta$ )	$882 \pm 2$ °C
Densidade do sólido (g/cm <sup>3</sup> )	$\alpha$ (20 °C) 4,51 $\beta$ (885 °C) 4,35
Ponto de fusão (°C)	1670
Ponto de Ebulição (°C)	3260

Fonte: Donachie Jr., 2000

No equilíbrio, o titânio puro apresenta duas fases estáveis designadas por fases  $\alpha$  e  $\beta$ . A temperatura ambiente ocorre à fase  $\alpha$ , de estrutura cristalina hexagonal compacta (HC), pertencente ao grupo espacial P63/mmc e parâmetros de rede  $a = 0,295$  nm e  $c = 0,468$  nm. Apresentando transformação alotrópica a 882 °C, para estrutura cristalina cúbica de corpo centrado (CCC) denominada fase  $\beta$ , com grupo espacial Im3m e parâmetro de rede  $a = 0,330$  nm (ASM,1990 apud CREMASCO, 2012). As células unitárias atômicas das estruturas do titânio são mostradas esquematicamente na Figura 3.

Figura 3: Células unitárias atômicas das estruturas cristalinas do titânio em (a) arranjo estrutural do tipo  $\alpha$  (rede cúbica cristalina Hexagonal Compacta – HC) em (b) arranjo estrutural do tipo  $\beta$  (rede cúbica cristalina de corpo centrado – CCC).



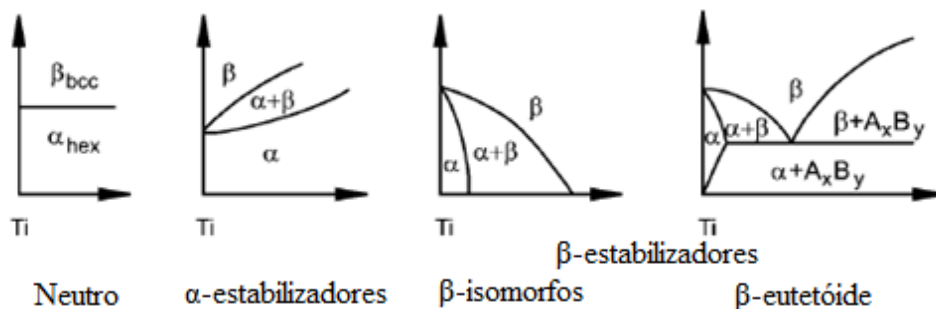
Fonte: Peters e Leyers, 2003.





Os elementos  $\beta$ -estabilizadores podem ser divididos em dois grupos: os  $\beta$ -eutetóides, como: manganês, cromo, ferro, silício, cobalto, níquel e cobre; e os  $\beta$ -isomorfos, como: tântalo, molibdênio, nióbio, e vanádio. Esses grupos se diferenciam pelo grau de solubilidade. Os elementos  $\beta$ -isomorfos possuem uma alta solubilidade, e os  $\beta$ -eutetóides possuem solubilidade restrita, com uma tendência a formar compostos intermetálicos, o que provoca degradação das propriedades mecânicas das ligas. (ANKEM, 1999; LIU, 2004). A Figura 5 apresenta os diferentes diagramas de fase para a liga de titânio, mostrando a influência dos elementos estabilizadores.

Figura 5: Variação do diagrama de fases das ligas de titânio com a utilização de elementos estabilizadores.



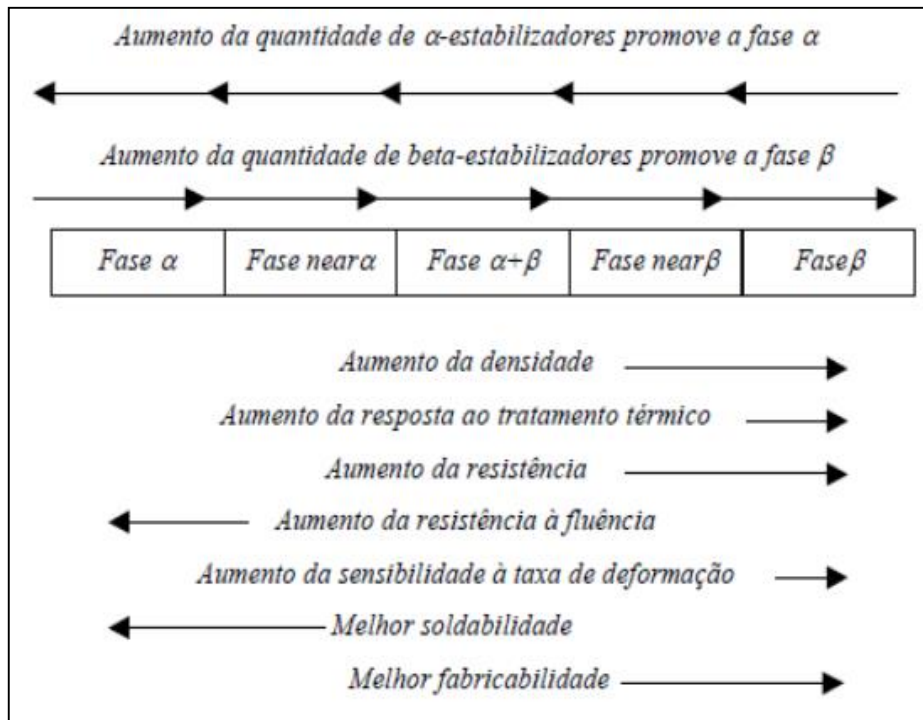
Fonte: Adaptado de Leyens e Peters, 2003

A estabilização de diferentes fases pode ocorrer ainda pela imposição de tratamentos térmicos e termomecânicos (ABDEL et. al, 2006; ZHOU et. al, 2004). Tratamento térmico pode ser definido como um conjunto de operações de aquecimento, estágio a uma determinada temperatura e resfriamento sobre condições controladas de tempo, atmosfera e velocidade de aquecimento e resfriamento, com o objetivo de alterar as propriedades do material, sendo que todo o processo ocorre no estado sólido (XAVIER, 2016). Estes métodos proporcionam mudanças na microestrutura e, conseqüentemente, nas propriedades mecânicas da liga. O resultado oriundo de tratamentos térmicos no titânio e em suas ligas, não depende apenas dos fatores supramencionados (temperatura, tempo, resfriamento, etc), também existe uma correlação com a composição da liga.

As estruturas  $\alpha$  e  $\beta$  são base para cinco categorias das ligas de titânio conforme a composição química e a microestrutura à temperatura ambiente, sendo classificadas como:  $\alpha$ , near- $\alpha$ ,  $\alpha+\beta$ , near- $\beta$  e  $\beta$  (CREMASCO, 2012; DONACHIE Jr., 2000; NIINOMI et. al, 2003; PETERS; LEYENS, 2003). A Figura 6 mostra esquematicamente alguns efeitos na estrutura das ligas de titânio devido a adição dos elementos estabilizadores. A Figura 6 também indica

os efeitos que as estruturas têm em algumas propriedades selecionadas. (DONACHIE Jr., 2000).

Figura 6: Efeito causado estrutura cristalina das ligas de titânio devido a adição de elementos estabilizadores de liga.



Fonte: Adaptado de Donachie Jr., 2000.

As ligas  $\alpha$  incluem o Ti c.p. nos diversos graus de pureza determinados pelos teores de oxigênio, nitrogênio e ferro. A variação da quantidade destes elementos acarreta em mudanças em sua microestrutura e consequentemente, diferentes propriedades mecânicas. As ligas desse tipo apresentam estrutura monofásicas à temperatura ambiente, não são tratáveis termicamente, apresentam boa resistência mecânica e tenacidade à fratura, bem como, alto módulo de elasticidade e resistência à corrosão (PETERS; LEYENS, 2003).

As ligas classificadas como near- $\alpha$  apresentam de 5 a 10% de fase  $\beta$  em temperatura ambiente (CREMASCO, 2012). Apesar da liga reter certa quantidade de fase  $\beta$ , ela consiste principalmente de fase  $\alpha$ , comportando-se mais convencionalmente como ligas do tipo  $\alpha$  do que as ligas do tipo  $\alpha+\beta$  (DONACHIE Jr., 2000; PETERS; LEYENS, 2003). As ligas near- $\alpha$  apresentam ótimo desempenho em altas temperaturas e são conhecidas por combinar propriedades de resistência à fluência das ligas  $\alpha$  com a resistência mecânica das ligas  $\alpha+\beta$  (PETERS; LEYENS, 2003).

As ligas do tipo  $\alpha+\beta$  possuem  $\beta$  estabilizador capaz de reter de 10% a 30% de fase beta (PETERS; LEYENS, 2003). Tais ligas são tratáveis termicamente, com nível de resistência

mecânica variando de média a alta e devem ser deformadas por conformação a quente. As ligas presentes nesse grupo devem apresentar propriedades como excelente resistência mecânica, baixa densidade, boa resistência à corrosão e boa ductilidade.

Uma das ligas de titânio mais comumente utilizadas é a  $Ti_6Al_4V$  uma liga alfa-beta contendo aproximadamente 6% de alumínio e 4% de vanádio, conhecida como liga de titânio grau 5 pela norma ASTM B265. Esta liga, foi desenvolvida inicialmente para ser empregada na indústria aeronáutica. é a mais comumente encontrada e usada devido às suas excelentes combinação de propriedades mecânicas (ASTM B265, ; LEYENS; PETERS, 2003; LÜTJERING; WILLIAMS, 2007). Apresenta uma excelente de resistência à corrosão, resistência mecânica e tenacidade. Os usos comuns incluem os dispositivos ou implantes médicos, aplicações aeroespaciais. No caso de aplicações médicas, as rigorosas especificações do usuário exigem microestruturas controladas.

O conjunto de propriedades mecânicas apresentado por essa liga se deve ao fato de o alumínio ser um estabilizador da fase  $\alpha$  e o vanádio um estabilizador da fase  $\beta$ , sendo assim, à temperatura ambiente a liga apresenta as duas fases (DONACHIE, 2000; LEYENS; PETERS, 2003; LÜTJERING; WILLIAMS, 2007) ao contrário do que ocorre com o titânio comercialmente puro. Essas fases podem fornecer vantagens mecânicas e químicas, normalmente intermediárias ou superiores, dentre aquelas associadas às ligas de titânio, com relativa facilidade de trabalhabilidade (LÜTJERING; WILLIAMS, 2007).

As ligas consideradas do sistema  $\beta$  são aquelas que apresentam elemento de liga  $\beta$ -estabilizadores suficientes em sua composição para a reter fase  $\beta$  à temperatura ambiente (DONACHIE Jr., 2000; PETERS; LEYENS, 2003). Estas ligas são conhecidas por apresentarem propriedades como elevada resistência mecânica específica, alta tenacidade à fratura, moderada resistência à fadiga, alta resistência à corrosão, alta dureza e baixos módulo de elasticidade quando comparadas à outras ligas. No entanto, podem ser mais densos e possuem custos de produção mais elevados (PETERS; LEYENS, 2003; DONACHIE Jr., 2000).

Estruturas beta geralmente devem ser chamadas de beta metaestável. Estas são ligas que retêm uma estrutura essencialmente beta no resfriamento à temperatura ambiente. (DONACHIE Jr., 2000). Fases secundárias podem estar presentes em ligas de titânio quando estas são processadas em determinada composição química e temperatura (BROSSIA, 2004). Dentre estas fases, as principais são as denominadas fases martensíticas. Esta fase é caracterizada pela formação de microestrutura com aparência de agulhas. As ligas que contém elementos estabilizadores de fase  $\beta$ , formam dois tipos de estruturas martensíticas.

Para pequenas quantidades de  $\beta$ -estabilizadores, forma-se estrutura martensítica  $\alpha'$  (estrutura hexagonal compacta) e quando a concentração de  $\beta$  estabilizadores é aumentada, forma-se a estrutura martensítica  $\alpha''$  (estrutura ortorrômbica) (ALEIXO, 2008). A estrutura ortorrômbica é considerada como um produto da transição entre as estruturas  $\alpha'$  e  $\beta$  e algumas características dessa liga são intermediárias em relação às ligas  $\alpha'$  e  $\beta$ , como a resistência ao desgaste (ligas de fase  $\beta$  apresentam o melhor desempenho) e intermediária também em relação ao módulo de elasticidade (ZHOU, 2004).

A adição de elementos  $\beta$ -estabilizadores, além de estabilizar a fase, pode interferir na distância de ligação entre os átomos da liga (LÜTJERING, 1998 apud PINEIZ, 2014). A partir do resfriamento rápido das ligas, e dependendo da quantidade de elemento utilizado, também pode ser formada a fase  $\omega$ . Essa fase ainda pode surgir pela variação na velocidade de aquecimento e deformação. A fase  $\omega$  possui estrutura cristalina hexagonal (TANE, 2013), e altera de maneira significativa as propriedades mecânicas das ligas, e é caracterizada por possuir um alto valor de módulo de elasticidade (NAKAI, 2011).

#### 1.2.2.5 A utilização das ligas de titânio na odontologia

Desde sua introdução como biomaterial nos anos 1960 o titânio é um dos materiais mais aceitos no campo de engenharia biomédica (MOHAMMED *et al.*, 2012), e tem sido utilizado em uma vasta gama de aplicações na área odontológica. O principal motivo, se deve ao fato do titânio e suas ligas serem resistentes à corrosão, biocompatíveis, além de apresentar propriedades mecânicas favoráveis. Com isso, desenvolvimento de materiais à base de titânio para aplicações biomédicas e dentárias é atualmente, uma área de pesquisa ativa no mundo todo. As ligas de titânio continuarão a serem utilizadas no futuro, uma vez que elas permitem a fabricação de próteses estéticas não apenas devido às suas características, mas também devido à sua eficiência de custos sem nenhum comprometimento funcional (LINDIGKEIT, 2003).

O primeiro trabalho com a utilização de titânio na odontologia, foi em implantologia dentária, realizado por Branemark em 1965 (BRANEMARK *et al.*, 1977 apud LINDIGKEIT, 2003). Com Branemark surgiu o termo osseointegração, no qual se tornou muito importante para implantologia com a utilização de um biomaterial. Segundo a definição de Branemark, osseointegração descreve a condição e processo para obtenção de um carregamento estável do implante em contato direto com o osso e refere-se a formação óssea ao redor do implante sem a formação de tecido fibroso (BRUNETTE *et al.*, 2001). Este termo está totalmente relacionado ao módulo de elasticidade e resistência à corrosão.

Para este trabalho foi necessário o desenvolvimento de uma tecnologia de fundição e fusão, adaptada ao laboratório dentário, pois os sistemas de fundição comumente usados não eram suficientes, devido ao alto ponto de fusão deste metal. Após o sucesso deste trabalho o titânio passou a ser considerado um material ideal para realização de implantes. A primeira máquina de fundição de titânio para o laboratório dentário foi introduzida 20 anos mais tarde em 1988 na Alemanha (Kitamura, 1988 apud LINDIGKEIT, 2003 ). Na atualidade, o titânio vem sendo largamente utilizado como biomaterial principalmente na área ortopédica e odontológica.

Atualmente diversos estudos tem ressaltado a elevada biocompatibilidade do titânio e suas ligas (LEE; JU; CHERN-LIN, 2002; WIRTH *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2008 apud CREMASCO, 2012). Devido esses fatores, existe um grande número de ligas utilizadas em odontologia, que são ao mesmo tempo altamente resistentes à corrosão, biocompatíveis e adequados para uma ampla gama de aplicações. Portanto, materiais à base de titânio são hoje utilizados em toda as áreas da odontologia como ortodontia, prótese e implantologia. A Tabela 3 fornece uma visão geral das principais ligas utilizadas em cada uma dessas áreas.

Tabela 3: Tipos de ligas de titânio aplicados na odontologia.

Liga	Fase	Ortodontia	Proteses	Implantes
Ti cp. grade 1	$\alpha$		X	
Ti cp. grade 2	$\alpha$	X	X	
Ti cp. grade 3	$\alpha$		X	
Ti cp. grade 4	$\alpha$	X		X
Ti <sub>11</sub> Mo <sub>6</sub> Zr <sub>4</sub> Sn	$\beta$	X		
Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V	$\alpha+\beta$	X		X

Fonte: Lindigkeit, 2003.

A Ortodontia lida com a correção da desorientação dentária com ferramentas e auxiliares mecânicos ou funcionais. Aparelhos removíveis consistem em placas de acrílico parceladas, fixadas nos dentes do paciente com elementos de arame. Parafusos de expansão, fusos com roscas levorrotatórias e dextrorrotatórias, são usados para aplicar forças aos dentes afastando as placas. Nestes casos o titânio puro é utilizado, devido ao seu menor peso e maior resistência à corrosão. Para elementos de molas de arame, as ligas de titânio também são de particular

importância porque exibem um módulo de elasticidade mais baixo do que o aço inoxidável e maior resistência que o titânio puro (Wirz *et al*, 1999 apud Lindigkeit, 2003). No entanto os aços inoxidáveis ainda são o material mais utilizado nos tratamentos ortodônticos para aparelhos fixos e removíveis. Comparado ao titânio, estes materiais são menos resistentes às condições da cavidade oral, visto pela relativa perda de massa por ataque corrosivo. Deste ponto de vista, a maioria das investigações aceitou a resistência à corrosão dos aços inoxidáveis como sendo suficiente (CHOUBEY, 2005 apud RIBEIRO 2013).

O teste de imersão estática, de acordo com a ISO 10271, é o método padronizado para testar a resistência à corrosão de materiais dentários metálicos (ISO, 2001 apud LINDIGKEIT, 2003). Neste teste, as amostras com uma condição de superfície definida são imersas em solução de ácido láctico e também em solução de cloreto de sódio por 7 dias. A perda de massa é medida após a imersão, e calculada como perda de massa relacionada à superfície, dada em g/cm<sup>2</sup>. Os resultados, comparados a outras ligas dentárias (Tabela 4), revelam que a reação de corrosão do titânio puro é da mesma ordem de grandeza que as ligas de ouro e as ligas CoCr e NiCr altamente resistentes à corrosão com alto teor de Cr e Mo conteúdos utilizados em próteses (LINDIGKEIT, 2003).

Tabela 4: Resultados de perda de massa após teste de imersão estática de diferentes ligas metálicas utilizadas na odontologia.

Material	Perda de massa ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )
Ti c.p.	1-2
Co 61 – Cr 25 – Mo 7 – W 5 – Si – Mn	0,65
Ni 61 – Cr 26 – Mo 11 – Si 1,5	0,3
Ni 68 – Cr 17.4 – Mn 5.5 – Mo 4.5 – Si – Cu – Be 0.5	850
Au 68 – Ag 12 – Pd 6 – Cu 6 – Zn 3 – Pt 1	1
Au 85.6 – Pt 12.7 – In – Ga – Zn	8,27
Cu 79.3 – Al 7.8 – Ni 4.3 – Fe – Zn	1528,32

Fonte: Lindigkeit, 2003

Na implantodontia odontológica são realizados tratamentos para substituição de dentes únicos, por meio de implantes de pinos para fixação de próteses permanentes ou estabilizar próteses removíveis. Neste caso o conceito de osteointegração merece total atenção. Pois após a inserção do implante, vários são os fatores que determinam a possibilidade de ocorrência deste processo, tais como fatores biológicos, físicos e químicos (CREMASCO, 2012), que podem comprometer o sucesso da implantação e o sucesso do tratamento em longo prazo.

Os fatores químicos são relacionados à resistência ao processo de corrosão e a toxicidade do material utilizado. Isso está intimamente ligado ao filme óxido formado na superfície do metal. Tão logo o material é inserido no corpo humano, ocorre à interação da superfície material implantado com os fluidos corpóreos ou plasma sanguíneo, de onde poderá ocorrer fluxo de íons e corrosão o que acarretará em inflamações sistêmicas ou agudas, hipersensibilidade e alergias (LEYENS; PETERS, 2003). Apesar da maioria dos implantes metálicos em odontologia e ortopedia serem utilizados em ossos, em um estágio pré-clínico, a biocompatibilidade dos implantes pode ser avaliada em tecidos subcutâneos (LEE *et al.*, 2008 apud CREMASCO, 2012).

As propriedades mecânicas também podem influenciar negativamente o processo de osseointegração, principalmente em casos onde o implante tem contato direto com o osso. A grande diferença no módulo de elasticidade entre o material do implante e o osso pode induzir a atrofia óssea, uma vez que a distribuição de tensões entre o dispositivo de implante e o osso não é homogênea, causando a reabsorção óssea, resultando em consequentemente falha do implante (SUMITOMO, 2010 apud PINEIZ 2014). A Tabela 5 apresenta algumas propriedades mecânicas das principais ligas utilizadas na odontologia.

Tabela 5: Algumas propriedades mecânicas das principais ligas metálicas utilizadas na odontologia.

	E (GPa)	LRT (MPa)	$\sigma_f$ (MPa)	%EL
Fe-Cr-Ni-Mo	210	450	250	40
Co-Cr	200	500	300	8
Co-Ni-Cr	220	850	500	20
Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V	105	900	550	13
Ti <sub>5</sub> Al <sub>2.5</sub> Fe	105	900	550	15
Ti c.p.	100	300	200	40
Ta c.p.	200	300	200	40
Nb c.p.	120	250	150	70

Fonte: Leyens e Peters, 2003

E = Módulo de Elasticidade ou Módulo de Young

LRT = Limite de Resistência à Tração

$\sigma_f$  = Limite de Fratura

%EL = Elongamento

### 1.2.3 Filmes Finos a-C:H

Os materiais da família do carbono têm chamado atenção nas últimas décadas devido à variedade de compostos naturais e sintéticos que possuem propriedades adequadas à diversas aplicações científicas e tecnológicas (TUCUREANU; MATEI; AVRAM, 2016). Átomos de carbono ligados entre si formam diferentes compostos naturais, sendo os dois principais: grafite e diamante. Há também aqueles que podem ser sintetizados artificialmente como o grafeno, os fulerenos e os nanotubos. Um outro composto formado é o carbono amorfo (a-C), que também pode ser obtido de forma sintética por meio de ligações entre átomos de carbono (C-C) ou com átomos de outros elementos (C-X), sendo que a forma mais comum é obtida com a incorporação de hidrogênio, conhecido como Carbono Amorfo Hidrogenado (a-C:H). A obtenção destes materiais pode ser feita por meio de crescimento de filmes finos sobre a superfície de um substrato (ROBERTSON, 2002).

Filmes finos de carbono têm sido objetos de estudos nas últimas décadas por suas diversas aplicações como no recobrimento de superfícies, em dispositivos para a microeletrônica, células solares, sensores ópticos e como revestimento de biomateriais metálicos (PARTICHELI, 2015). Estes materiais têm propriedades tais como alta dureza, baixa fricção, boa resistência ao desgaste, transparência óptica e alta inércia química (ROBERTSON, 2002). Podem ser isolantes, condutores ou semicondutores e têm como características a espessura reduzida, e alta densidade de compactação. Estas propriedades são totalmente dependentes do arranjo estrutural, da fração de hibridização  $sp^2$  e  $sp^3$  dos átomos de carbono e principalmente da quantidade de hidrogênio no sólido (PARTICHELI, 2015). É conhecido pelo menos cinco estruturas formadas de a-C. Sendo elas: Carbono como Grafite (GLC do inglês *Graphite Like Carbon*); Carbono como Polímero (PLC do inglês *Polymer Like Carbon*); Carbono como Diamante (DLC do inglês *Diamond Like Carbon*) DLC do tipo tetraedro ta-C e DLC ta-C:H.

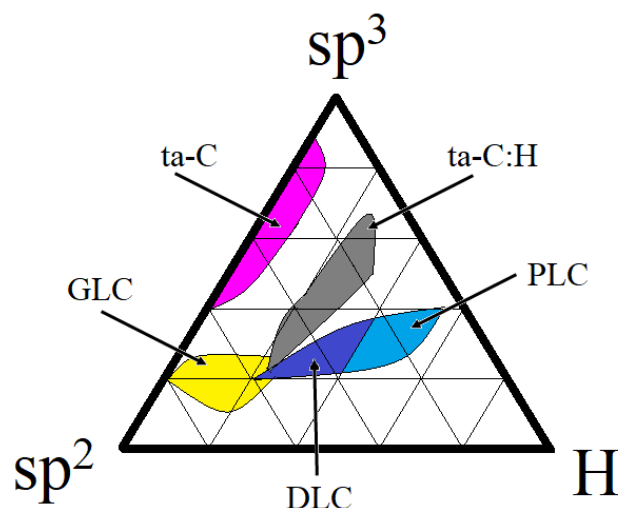
Os filmes finos do tipo GLC possuem propriedades similares ao grafite devido a microestrutura cristalina com alta proporção de ligações de carbono do tipo  $sp^2$  e um teor de hidrogênio inferior a 20% (CASIRAGHI; FERRARI; ROBERTSON, 2005; LOVE, 2013). Os filmes finos do tipo PLC possuem um teor de hidrogênio entre 40% e 60% e podem ter até 70% de ligações do tipo  $sp^3$ . No entanto, a maioria das ligações  $sp^3$  é terminada em hidrogênio e esse material é macio e possui baixa densidade (CASIRAGHI; FERRARI; ROBERTSON, 2005; LOVE, 2013). Os filmes finos do tipo DLC possuem propriedades similares ao diamante como a dureza, possuem um conteúdo intermediário de hidrogênio entre 20% e 40%, e podem conter menor fração  $sp^3/sp^2$ , no entanto possuem um maior teor de ligações  $sp^3$  entre os átomos de



carbono. Há ainda os filmes de carbono amorfo tetraédrico hidrogenado (ta-C: H), uma classe de DLC com maior conteúdo de  $sp^3$  70% e baixo teor de hidrogênio entre 25% e 30% (CASIRAGHI; FERRARI; ROBERTSON, 2005; LOVE, 2013).

Embora os filmes do tipo DLC e GLCH apresentem formação de pequenos aglomerados cristalinos com alta fração de hibridizações  $sp^3$  e  $sp^2$ , estes possuem dimensões insignificantes se comparado à estrutura do compósito como um todo (PARTICHELI, 2015). Estes materiais são considerados amorfos, pois apresentam desordem topológica e estrutural variável. A desordem estrutural está relacionada a imperfeições nos clusters  $sp^2$  e  $sp^3$ , que podem ser o alargamento de anéis grafíticos, distorção na formação da estrutura cúbica do diamante, diferentes ângulos de ligação entre os átomos e “comprimento” das distorções nas cadeias. A desordem topológica está relacionada ao tamanho, forma e distribuição dos clusters nos filmes. Se o tamanho, forma e distribuição são regulares, diminui o grau de desordem topológica. (ROBERTSON, 2002). Estes fatores proporcionam aos materiais diferentes características químicas, ópticas, elétricas, aderência ao substrato, tensão interna, densidade, rugosidade, espessura, entre outras. Todas essas propriedades podem ser alteradas por meio dos métodos de deposição e dos parâmetros impostos durante o regime. A Figura 7 apresenta o diagrama ternário das diferentes formas de filme de carbono amorfo.

Figura 7: Diagrama ternário para filmes de carbono amorfo.



Fonte: Adaptado Casiraghi; Ferrari; Robertson, 2005

### 1.2.3.1 Métodos de deposição

A deposição de filmes finos de carbono amorfo hidrogenado pode ser realizada via Deposição Física a Vapor (PVD do inglês *Physical Vapor Deposition*) (GWAM *et al.*, 2017) e

Deposição Química à Vapor (CVD do inglês *Chemical Vapor Deposition*). A escolha de um dos métodos é feita de acordo com a estrutura e as propriedades desejadas nos filmes.

No método PVD o material a ser depositado em fonte sólida é convertido a fase vapor por processos físicos em um ambiente de alto vácuo. Este material se deposita na superfície de um substrato na forma de filme fino. A forma como o material base é transformado para a fase vapor é o principal ponto de distinção dos processos PVD. Este método pode ser realizado por diferentes processos de evaporação como: por feixe de elétrons, arco catódico e magnetron sputtering (PARTICHELI, 2015). Os sistemas CVD mais utilizados são reatores de pressão atmosférica e reatores de baixa Pressão. O sistema de baixa pressão pode ser subdividido em reatores de Deposição Química de Vapor Assistida por Plasma e Deposição Química de Vapor com Plasma Remoto (PARTICHELI, 2015).

A técnica de Deposição Química a Vapor Assistido por plasma (PECVD do inglês *Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition*) é técnica conhecida como uma variação dos métodos químicos de deposição, no qual é possível introduzir diferentes gases percussores durante o tratamento (OLIVEIRA, 2012). Esta técnica consiste na deposição do filme utilizado o plasma denominado frio, devido ao fato da energia cinética dos elétrons serem muito maior que a dos íons. A câmara de deposição é formada por dois eletrodos, sendo um catodo que será conectado a uma fonte de rádio frequência e um anodo que é conectado ao substrato no qual será depositado o filme. O plasma é gerado entre os eletrodos devido a colisões dos elétrons acelerados por um campo elétrico, com os átomos e moléculas da atmosfera precursora, provocando novas ionizações por meio de diversas reações envolvendo elétrons, íons, moléculas e radicais neutros. Os elétrons na superfície do substrato aceleram os íons positivos, gerando o bombardeio na superfície do substrato para a formação e o crescimento do filme (OLIVEIRA, 2012).

#### *1.2.3.2 A utilização de DLC como revestimento de biomateriais*

O destino de um biomaterial é determinado por sua reação com o ambiente biológico. Devido a este fato o biomaterial deve proporcionar uma interação harmoniosa com o ambiente corporal, estes devem promover biocompatibilidade, ser resistentes principalmente à corrosão e ao desgaste. No caso específico dos biomateriais metálicos que são utilizados para substituição de tecido ósseo, estes devem uma atenção especial pois sofrem processo de corrosão em contato a meios agressivos como os fluidos corporais como o sangue. Com isso, diversos mecanismos de tratamento de superfície foram propostos para minimizar e/ou prevenir estes danos.

Os filmes finos de carbono do tipo DLC surgiram como um potencial material nos últimos anos devido à sua alta dureza, baixo coeficiente de atrito, alta resistência ao desgaste e à corrosão, inércia química e biocompatibilidade. (ROBERTSON, 2002; ROY; LEE, 2007; CHOU; LIN; WU, 2017). Todas estas propriedades favorecem a utilização deste revestimento em um biomaterial metálico. Devido a este fato, estes materiais já vêm sendo utilizados em aplicações médicas como *stents* arteriais, agulhas para cirurgia oftálmica, fios cirúrgicos e como revestimento de lentes de contatos (LOVE, 2013).

Os filmes finos de carbono do tipo DLC tem sido propostos como revestimentos de implantes metálicos. Estes filmes devem promover boa interação ao ambiente corporal, tendo viabilidade celular, não promover resposta além de possibilitar maior resistência ao desgaste e à corrosão a estes materiais. Neste caso, o filme deve atuar como uma barreira protetora impedindo a liberação de íons, prevenindo problemas de saúde como toxicidade, resposta alérgica e reações carcinogênicas (dos SANTOS *et al.*, 2014) Além disso, o revestimento deve prevenir danos na peça implantada, o que pode minimizar problemas ao paciente.

Devido este fato, diversos estudos tem sido propostos para verificar a resistência a corrosão, ao desgaste, a tribocorrosão e a biocompatibilidade destes materiais metálicos. A biocompatibilidade de um material é determinada por alguns testes *in vitro* e *in vivo*, envolvendo a interação dos material com células biológicas. A célula que desempenha um papel dominante na inflamação e interação com os materiais é o macrófago, que é uma célula importante para testar a biocompatibilidade de um material. Várias tentativas foram feitas para estudar o desgaste, a corrosão e a tribo corrosão com líquidos como soro bovino, água salina, solução de Ringer, Saliva artificial, dentre outros (WACHESK, et al., 2016; dos SANTOS, 2014; BAYÓN et al., 2015; HATEM et al, 2017; Zhang *et al* 2015).

Wachesk *et al.* (2016) verificou a viabilidade celular e realizou a caracterização eletroquímica em saliva artificial de filmes com DLC incorporado em dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) depositados sobre de aço inoxidável 304 usando o método PECVD. Foi observado que filmes promoveram viabilidade e mostrou um aumento na proteção contra a corrosão. Bayón *et al.* (2015) depositou filmes finos de carbono do tipo DLC na liga Ti6Al4V via método PVD e verificou que o revestimento promoveu excelente resposta à corrosão e tribocorrosão em fluido corporal artificial. Além disso, foi obtida uma redução significativa do atrito e do desgaste em comparação com o substrato. Dos Santos *et al.*, (2014) realizou um estudo de resistência à corrosão e viabilidade celular da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V nitretada revestida com filme de carbono. Os filmes depositados em ligas nuas melhoram significativamente a resistência à corrosão, enquanto os filmes depositados em liga nitretada apresentaram delaminação e fissuração.

Verificaram ainda que os filmes em substratos nitretados tendem a diminuir a viabilidade celular osteoblástica e alterações na rugosidade do filme não melhoram a viabilidade celular.

Hatem *et al.*, (2017) investigou o comportamento da tribocorrosão em salina tamponada com fosfato (PBS) da liga  $Ti_6Al_4V$  revestidas com DLC obtidos apenas pelas técnicas híbridas PIID e PEMS + PIID. Os testes de tribocorrosão demonstraram que os revestimentos melhorou o comportamento da tribocorrosão em implantes de liga  $Ti_6Al_4V$ , pois promoveu diminuição coeficiente de atrito e da taxa de desgaste em comparação com a amostra de liga sem revestimento. Zhang *et al.*, (2015) estudou a diferença da estrutura, propriedades de aderência, desgaste e a resistência a corrosão em PBS do revestimento DLC depositados em substrato de aço inoxidável, da liga CoCrMo e na liga de  $Ti_6Al_4V$ . Os resultados mostram que a estrutura do revestimento DLC nesses substratos é semelhante. O revestimento DLC na liga  $Ti_6Al_4V$  mostrou melhor adesão, maior resistência ao desgaste e tem melhor estabilidade do que no aço inoxidável 316L e da liga CoCrMo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter filmes de carbono amorfo hidrogenado a-C:H como revestimento da liga  $Ti_6Al_4V$  para aplicação odontológica e estudar os micro mecanismos de corrosão em meio agressivo e a viabilidade biológica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a deposição de filmes finos a-C:H via do método PECVD;
- Caracterizar os filmes depositados estruturalmente e morfologicamente via técnicas de microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia Raman, Espectroscopia de fotonelétrons excitados por raios-X (XPS);
- Verificar a estabilidade termodinâmica da liga  $Ti_6Al_4V$  contendo o filme a-C:H via curvas de potencial de circuito aberto (PCA) em meio contendo saliva artificial;
- Verificar a influência do filme DLC nos domínios anódico e catódico via curvas de polarização potenciodinâmica (PP) em meio de saliva artificial;
- Estudar a natureza do filme a-C:H e/ou de qualquer outro filme formado na superfície da liga  $Ti_6Al_4V$  via espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) em meio de saliva artificial;

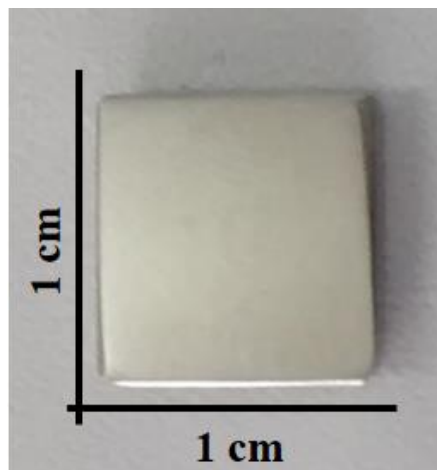
- Avaliar a citotoxicidade e biocompatibilidade dos filmes a-C:H na superfície da liga Ti6Al4V via o método de contato direto utilizando células pré-osteoblásticas (MC3T3-61).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

O material utilizado no presente trabalho foi a liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V doada pela Empresa Brasileira de Aeronaves (EMBRAER) e é apresentado na Figura 8.

Figura 8: Imagem da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V utilizada no presente trabalho.



Fonte: Do autor, 2019.

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Preparação das amostras

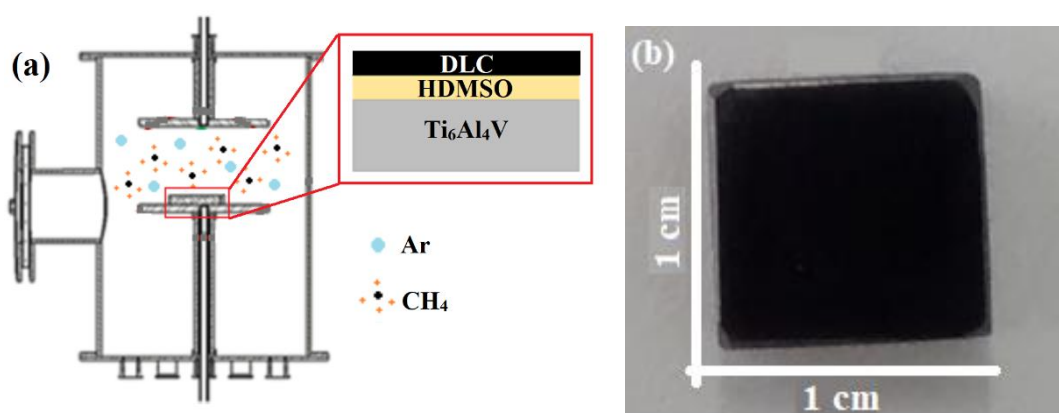
As amostras foram cortadas por eletroerosão nas dimensões de 1 cm x 1 cm e preparadas por polimento mecânico convencional. As amostras foram lixadas na sequência de 80, 220,

320, 400, 600, 1200 e 2000 *mesh* e posteriormente polidas com pasta de diamante na sequência de 3, 1 e 0,5  $\mu\text{m}$ . Todas as amostras foram lavadas em água destilada e passadas por ultrassom em álcool isopropílico por um período de 600 s.

### 3.2.2 Obtenção dos filmes a-C:H

Após a preparação das amostras, os filmes a-C:H foram depositados na superfície do  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  usando a técnica de deposição de vapor químico assistido por plasma (PECVD) no Laboratório de Tecnologia e Engenharia de Superfícies (LabTES) da Faculdade Tecnológica de Sorocaba, Sorocaba, Brasil. Para remover qualquer tipo de resíduos das superfícies das amostras, foi realizado um tratamento de ataque a plasma combinando Ar (50%) e  $\text{H}_2$  (50%) a 5 Pa utilizando uma fonte de rádio-frequência (RF) de 1800 Hz e 350 W, temperatura na faixa de 250 a 300 °C. O hidrogênio foi usado para aumentar a reação química com as espécies presentes na superfície da amostra (por exemplo, C, N, Cl, Na, O). Para melhorar a aderência do filme a-C:H na superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ , um filme fino de carbosiloxano foi depositado sobre o substrato usando mistura de hexametildisiloxano (HDMSO) (70%) como monômero e Ar (30%) totalizando uma pressão de 5 Pa, potência de 100 W por um período de 300 s. Para este procedimento utilizou-se uma temperatura de 100 °C. Após este processo foi depositado o filme fino de a-C:H sobre o substrato usando uma mistura de metano ( $\text{CH}_4$ ) (90%) e Ar (10%) com um fluxo de gases de 30 sccm utilizando uma fonte RF de 20 kHz, uma potência de 100W por um período de 3600s e temperatura de  $130 \pm 2$  °C. A Figura 9 apresenta um desenho esquemático de como os filmes foram obtidos via a técnica PECVD.

Figura 9: (a) Representação do método de deposição de filme a-C:H via método PECVD, (b) superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  contendo o revestimento.



Fonte: Do autor, 2019.

### 3.2.3 Caracterização morfológica da liga $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ sem e com revestimento de a-C:H

A topografia da superfície das amostras foi visualizada utilizando microscópio óptico (modelo Olympus) e microscópio eletrônico de varredura (FEG-SEM JEOL 7001F) do Departamento de Física da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil. A identificação dos elementos químicos foi realizada EDX. Para esse fim, utilizou-se um detector EDX acoplado ao SEM.

A morfologia da superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  sem revestimento e contendo os filmes a-C:H também foram caracterizadas via microscopia de força atômica (AFM) na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil. As análises de AFM foram realizadas usando um equipamento Shimadzu SPM 9700 usando o modo dinâmico. A Figura 10 apresenta o equipamento utilizado para a caracterização morfológica da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  com e sem filme a-C:H.

Figura 10: Equipamento utilizado na Microscopia de Força Atômica.



Fonte: Do autor, 2019.

### 3.2.4 Caracterização estrutural do filme a-C:H

Os espectros de FTIR foram obtidos utilizando um espectrômetro Agilent Cary 640 e um acessório IRRAS da Pike VeemaxII na faixa de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Como os filmes aqui estudados são extremamente finos ( $\sim 15\text{ nm}$ ), foi necessário realizar as medições utilizando a configuração IRRAS (espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho) na incidência de pastejo ( $70^\circ$ ) e usando a polarização p. Todas as análises foram realizadas na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil. O espectrofotômetro utilizado para a obtenção dos espectros de FTIR é apresentado na Figura 11.

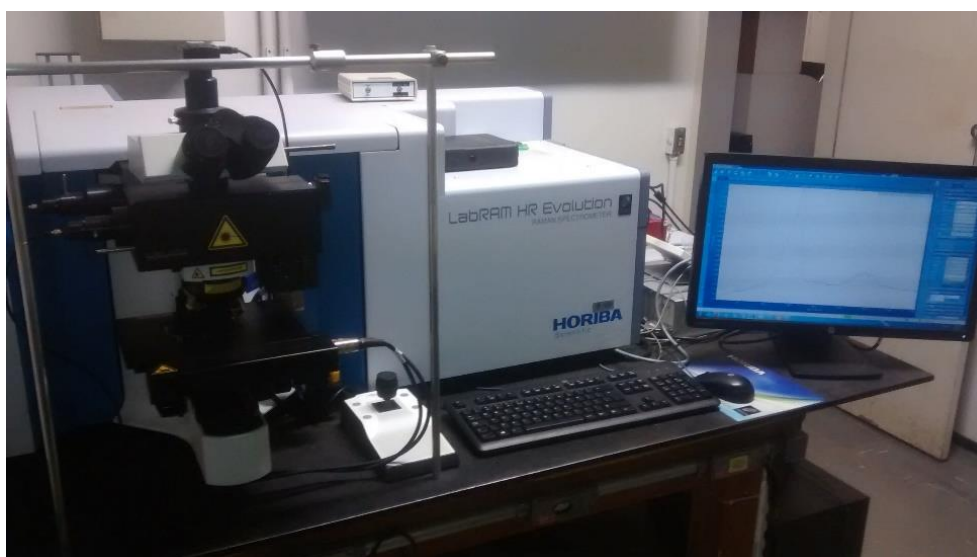
Figura 11: Equipamento utilizado na obtenção dos espectros de FTIR



Fonte: Do autor, 2019.

Os filmes a-C:H também foram caracterizados utilizando espectroscopia Raman. Para isso, utilizou-se um espectrômetro Raman (Horiba e LabRAM HR evolution Model) no intervalo de  $80\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , ativado por um laser  $\text{Ar}^+$  de  $532\text{ nm}$  do Departamento de Física (DF) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O equipamento utilizado pode ser verificado através da Figura 12.

Figura 12: Equipamento utilizado na obtenção de Espectros Raman.



Fonte: Do autor, 2019.

### 3.2.5 Análise de XPS

No presente trabalho, estudou-se a modificação da superfície do  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  usando a técnica PECVD. Sabe-se que a modificação da superfície é causada por interações químicas entre espécies com a superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  ocorrendo intensamente nas primeiras camadas



atômicas do substrato. Nesse caso, as concentrações atômicas de superfície foram determinadas por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS).

As medidas de XPS foi realizado usando um analisador hemisférico de alta resolução Omicron HA-125 com detecção de múltiplos channeltron e fonte de raios-X de Mg K $\alpha$ . O espectro da pesquisa indica apenas C e O como componentes principais do filme a-C:H. Os espectros XPS de alta resolução para C 1s e O 1s foram realizados com energia de passagem de 20 eV. Estes espectros foram ajustados de acordo com (DONIACH; SUNJIC, 1970), levando em consideração a vida útil finita do núcleo e pelo parâmetro de assimetria  $\alpha$  que descreve excitações de pares de elétrons e orifícios de baixa energia próximos ao Nível de Fermi. A contribuição inelástica do plano de fundo foi removida usando o plano de fundo do tipo Shirley (DONIACH; SUNJIC, 1970).

### 3.2.6 Testes eletroquímicos

Após a caracterização morfológica e estrutural da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V com e sem revestimento, verificou-se a resistência à corrosão por meio de curvas de polarização potenciodinâmica (PPc) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Todas as amostras sem filme foram polidas mecanicamente até 4000 *mesh* usando lixas de carbetto de silício (SiC). Em seguida, as amostras foram polidas com pasta de diamante na sequência de 3, 2 e 1  $\mu$ m, respectivamente. Antes dos testes eletroquímicos, as amostras revestidas e não revestidas com filmes de a-C:H foram limpas em por ultrassom utilizando propanol e depois secas com um jato de ar quente. A Figura 13 apresenta a preparação das amostras em ultra-som antes dos ensaios eletroquímicos.

Figura 13: Preparação das amostras em no equipamento de ultrassom.



Fonte: Do autor, 2019.

Antes dos testes de PPC, o potencial de corrosão ( $E_{\text{corr}}$ ) das amostras foi monitorado durante 1 h, a fim de verificar a estabilidade termodinâmica da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  sem revestimento e com filme a-C:H em meio de solução de saliva artificial. As curvas de PP foram obtidas usando uma taxa de varredura de  $0,5 \text{ mV s}^{-1}$  e uma janela de potencial de -1 a 2,5 V.

Os espectros EIE foram obtidos para a liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  sem revestimento e com filme a-C:H. Para isso utilizou-se uma faixa de frequência de 66 kHz a 10 MHz e amplitude de onda de 10 mV (rms). Todos os ensaios eletroquímicos foram realizados usando um potenciostato-galvanostato da marca Gamry Interface e modelo 1010E.

Os testes eletroquímicos foram realizados em uma célula composta de um compartimento de três eletrodos, a citar: eletrodo de trabalho (ET) composto da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  com e sem revestimento, contra - eletrodo (CE) de platina e eletrodo de referência (ER) de calomelano saturado  $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{KCl}_{\text{sat}}$ .

O eletrólito utilizado foi saliva artificial a  $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\text{pH} = 5,25$ ). A composição química ( $\text{g/L}^{-1}$ ) é semelhante à utilizada por Ribeiro *et al.* (2013), 0,4 NaCl, 0,4 KCl, 0,715  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,005  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 0,69  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 1 uréia. Os testes foram realizados em triplicata para garantir uma boa reprodutibilidade. A Figura 14 mostra de maneira esquemática a montagem experimental para a realização dos ensaios eletroquímicos.

Figura 14: Montagem experimental dos ensaios eletroquímicos.



Fonte: Do autor, 2019.

### 3.2.7 Testes biológicos

#### 3.2.7.1 Isolamento e cultura de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram obtidas de 2 indivíduos saudáveis. As PBMCs foram separadas do sangue total após a coleta por gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Após separadas, essas células foram centrifugadas a 400 XG por um período de 30 min e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (GE), suplementado com Hepes 50 mM (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), soro fetal bovino inativado a 5% (GIBCO), L-glutamina 2 mM (GIBCO), 40 µg/mL de gentamicina (Neoquímica, Anápolis, Brasil), 1 mL de 2β-mercaptoetanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), na concentração final de  $2 \times 10^6$ /mL. Primeiro, as amostras da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V, sem revestimento e com filme a-C:H, foram colocadas em placas de cultura celular de 6 poços e, em seguida, as células foram adicionadas para permanecerem exclusivamente no topo da superfície da amostra, com um volume final de 500 µL. Como controle negativo para o experimento, os PBMCs foram mantidos nas placas nas mesmas condições de cultura, mas na ausência da liga, tratada ou não com o filme a-C:H. As culturas foram mantidas por 24 h à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram analisadas quanto à porcentagem de morte celular e ao sobrenadante da cultura de células para medição da concentração de citocinas. A coleta de amostras de sangue de indivíduos saudáveis já havia sido aprovada em uma pesquisa do laboratório onde a pesquisa foi realizada (número do processo: 65821716.5.0000.5154) e o experimento deste estudo foi realizado com as células restantes quando a pesquisa foi realizada, com permissão de consentimento.

#### 3.2.7.2 Cultura de células MC3T3-E1 pré-osteoblásticas

As células pré-osteoblásticas (MC3T3-61) obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) foram cultivadas em meio alfa essencial mínimo (α-MEM) suplementado com soro

bovino fetal a 10%, ácido ascórbico 5 µg/mL e β-glicerofosfato 7mM e 10.000 U/mL de penicilina G e 10.000 µg/mL de estreptomicina por 7 dias, conforme descrito por Souza *et al.* (2018). Após diferenciadas em osteoblastos, essas células foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de  $4 \times 10^5$  células por poço em meio α-MEM. Após 24 h, seções estéreis da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V com ou sem a-C:H foram colocadas com as células por 24h. Após esse período, a viabilidade celular pela coloração das células com iodeto de propídio foi determinada por citometria de fluxo.

#### 3.2.7.3 Determinação da viabilidade celular

Após o cultivo das células nas superfícies da liga, tratadas ou não com o filme a-C:H, as PBMCs foram coletadas para avaliação da apoptose usando o kit de detecção de apoptose da anexina V/7-AAD FITC (BD Pharmigen™, San Jose, Califórnia, EUA). Resumidamente, as células cultivadas foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em tampão de anexina (BD PHARMIGEM) a uma concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Em seguida, foram adicionados 5 µL de Annexin-V FITC e 5 µL de 7-AAD e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente (25 °C) no escuro. As células foram então adquiridas no citômetro FacsCanto (BD PHARMIGEM) e analisadas para identificação de anexina-V FITC e 7-AAD por citometria de fluxo usando os programas Cellquest 5.1 e FlowJo 10. As células consideradas não apoptóticas foram negativas para a marcação com anexina-V FITC e/ou 7-AAD. As células osteoblásticas foram avaliadas usando a mesma plataforma citométrica; no entanto, essas células foram coradas apenas com iodeto de propídio que demonstram se as células são viáveis ou não.

#### 3.2.7.4 Quantificação de citocinas

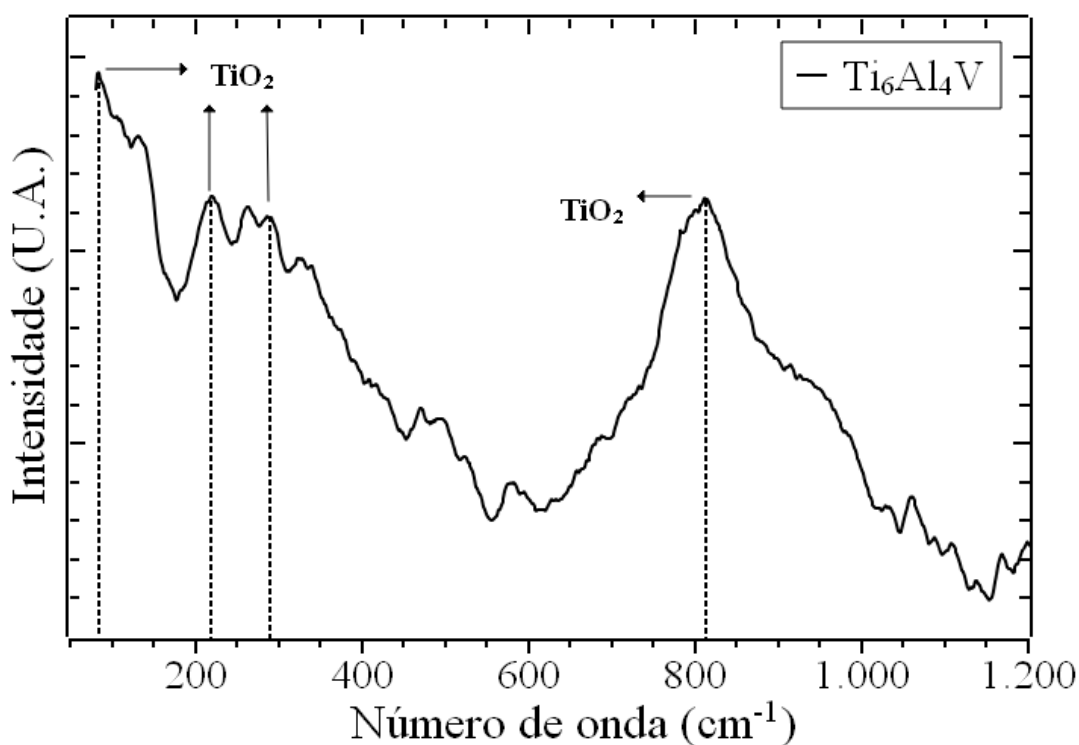
Além do efeito sobre a viabilidade celular (apoptose), as amostras também foram avaliadas quanto à capacidade de induzir a ativação imune das células após 24 h de cultura, algo que é facilmente visualizado através das citocinas produzidas pelos PBMCs e que são secretadas na cultura sobrenadante. Para isso, o sobrenadante da cultura celular foi coletado e as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias foram medidas. As citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e TNF-α foram quantificadas pelo método do *cytometric bead array* (CBA) de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA LIGA $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$

A espectroscopia Raman foi utilizada para caracterizar a natureza do filme passivo na superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  antes da deposição do filme a-C:H via PECVD. A Figura 15 apresenta o espectro resultante e as bandas de absorção na faixa de  $1200\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ . As bandas de absorção mais intensas estão localizadas em  $80\text{ cm}^{-1}$ ,  $220\text{-}290\text{ cm}^{-1}$  e  $820\text{ cm}^{-1}$ . De acordo com a literatura, essas bandas são características do  $\text{TiO}_2$  e estão relacionadas ao filme de óxido formado na superfície da amostra. Essa formação de filme ocorre espontaneamente em ligas de titânio mantidas em contato com ambientes contendo oxigênio, como o ar atmosférico, e atua como uma barreira protetora contra meios agressivos, um dos fatores que tornam o titânio e suas ligas resistentes ao processo de corrosão (DONIACH; SUNJIC, 1970; GUO; SHI; LIFENG, 2017).

Figura 15: Espectro Raman da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  na ausência de a-C:H. Linhas tracejadas são diretrizes para os olhos.

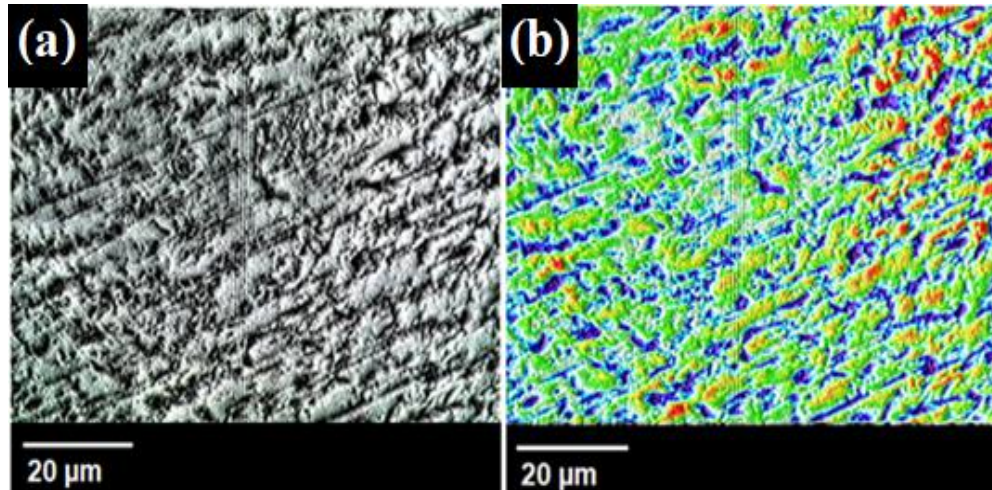


Fonte: Do autor, 2019.

As técnicas de microscopia ótica (MO), microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) também foram utilizadas para caracterizar a morfologia da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  sem revestimento. A partir dos resultados de MO (vide Figura 16 (a) e 16 (b)) é possível verificar irregularidades na superfície da amostra, provavelmente,

advindas do processo de polimento mecânico (SUGAHARA *et al.*, 2008). Estes resultados corroboram com os obtidos via AFM.

Figura 16: Imagens de superfície obtidas por OM da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  sem filme a-C:H.



Fonte: Do autor, 2019.

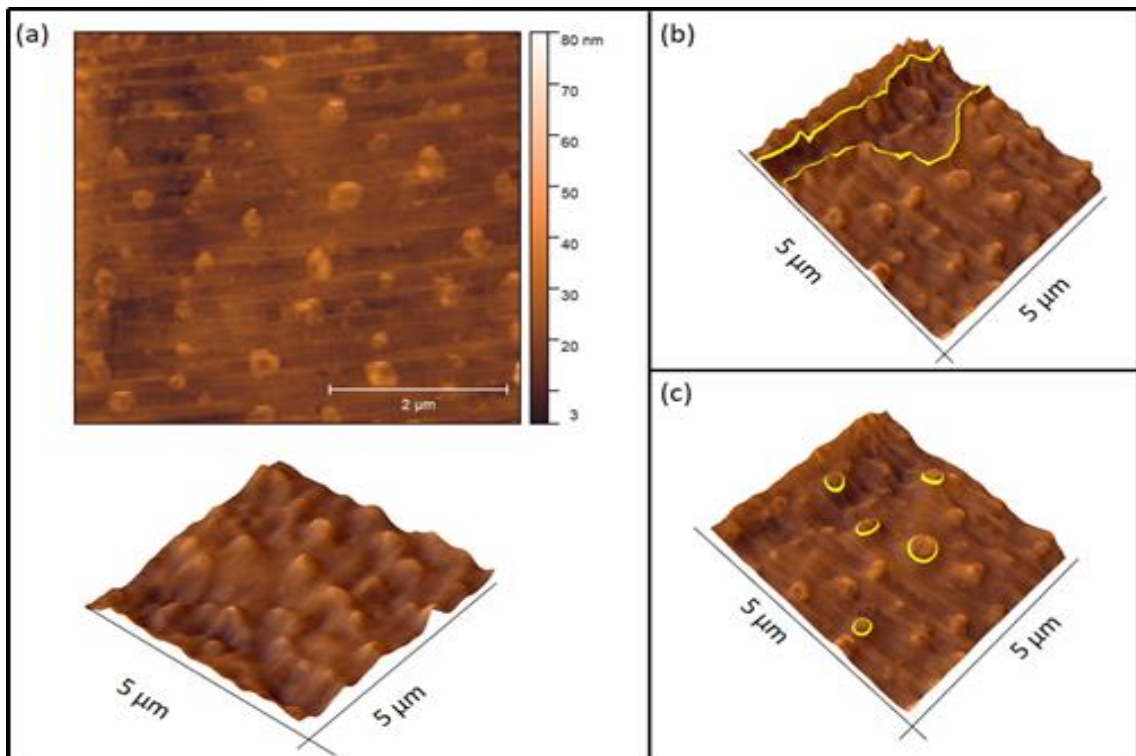
A Figura 17 (a) apresenta imagens 2D e 3D da superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  obtidas pela técnica AFM. É possível verificar que o material possui uma superfície levemente irregular, apresentando uma rugosidade  $R_{\text{ms}}$  de 4,15 nm. Os resultados obtidos neste estudo apresentam a mesma ordem de magnitude que os apresentados por Falcade (2015), dos Santos *et al.* (2014) e Santos *et al.* (2006). As Figuras 17 (b) e 17 (c) destacam o contorno das imperfeições na superfície da amostra, de onde é possível verificar um vale com  $6,0 \mu\text{m}^2$  de área aproximada, traçando a superfície na direção longitudinal (Figura 17 (b)). Como mencionado anteriormente, essas irregularidades podem ter sido causadas pelo processo de polimento. Na Figura 17 (c) é possível identificar imperfeições demonstradas por marcas de contorno arredondadas. Estas imperfeições estão concentradas em toda a superfície em análise, além de apresentarem tamanho e forma irregulares, com picos que podem atingir alturas máximas de aproximadamente 80 nm. Os contornos têm diâmetros variando de 0,26 a 0,44  $\mu\text{m}$ . As ranhuras podem ser visualizadas em qualquer área analisada, possivelmente causada pela orientação do crescimento de grãos.

A técnica de MEV permitiu obter imagens da superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  em ampliações de 1.000 e 10.000 X, respectivamente. As Figuras 18 (a) e 18 (b) mostram as imagens da superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  obtidas por elétrons retroespalhados e secundários, respectivamente, com aumento de 1.000 X. Nestas imagens, uma matriz homogênea contendo uma certa densidade de defeitos é verificada e corroboram com os resultados obtidos através da OM e AFM. A Figura 18 (c) mostra a imagem de elétrons retroespalhados com ampliação de 1.000 X



após o tratamento usando o *software ImageJ*. Este tratamento de imagem permitiu observar, de forma mais evidente, os defeitos de superfície. No centro da imagem é possível observar uma mancha escura que está diretamente relacionada ao desgaste devido ao processo de polimento. Pequenas falhas, e até sulcos longitudinais em diferentes posições, são mostradas em direções uniformes.

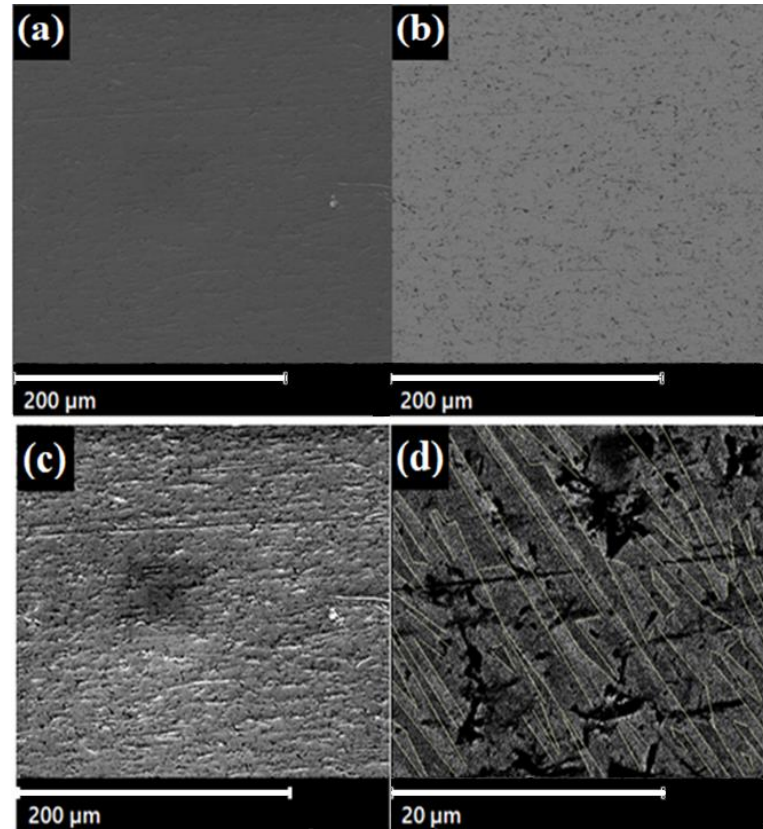
Figura 17: Imagens 2D e 3D da superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  não revestida, obtida pela técnica AFM, escala de  $5 \times 5 \mu\text{m}$ .



Fonte: Do autor, 2019.

A Figura 18(d) mostra uma ampliação de 10.000 X da imagem eletrônica secundária, onde é possível ver as imperfeições na superfície da amostra com mais clareza. Esse efeito também foi observado por Pawelec *et al.* (2018), que mostraram desgaste semelhante na superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  após o processo de polimento. Além disso, foram observadas áreas cinzas claras e escuras, que podem ser atribuídas às fases sólidas  $\alpha$  e  $\beta$ , que estão de acordo com o fato de que a liga de titânio  $\alpha + \beta$  é a adequada nos usos na indústria aeronáutica, militar e médica aplicações (ARSLAN *et al.*, 2013). Essas áreas foram contornadas para facilitar a diferenciação de tons. Estes últimos resultados foram associados às análises de EDX para determinar a composição química do substrato.

Figura 18: Imagens de MEV da superfície da liga Ti6Al4V (a) elétrons retroespalhados, (b) elétrons secundários com ampliação de 1.000 X, (c) elétrons retroespalhados com ampliação de 1.000 X após tratamento usando o *software ImageJ* e (d) imagem com ampliação de 10.000 X.

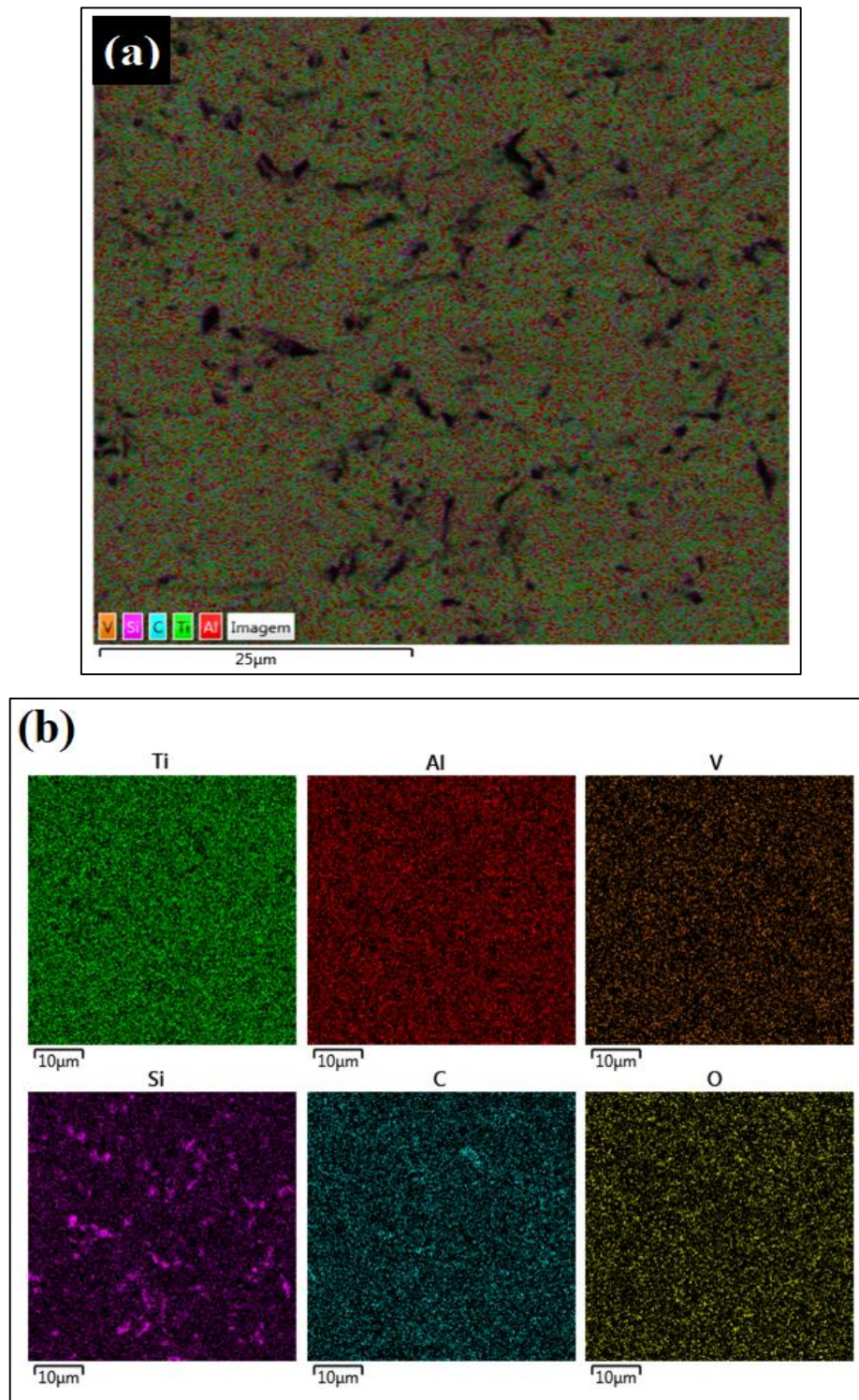


Fonte: Do autor, 2019.

A Figura 19 mostra uma micrografia que foi utilizada para mapear as concentrações dos elementos químicos (% em peso) presentes na liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V via EDX. Os resultados mostram que os elementos Ti, Al e V, específicos da liga estudada, possuem uma distribuição homogênea em toda a superfície, vide Figura 19 (a). O mapeamento individual dos principais elementos encontrados na superfície da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V é mostrado na Figura 19 (b). Também indica que outros elementos como Si, C e O estão presentes na superfície da amostra (provavelmente das lixas de SiC). Uma concentração mais alta de Si e C pode ser observada nas regiões escuras da superfície caracterizadas como falhas, indicando que o processo de polimento produziu agregação de uma pequena quantidade desses elementos. A presença de O pode ser explicada pela formação do filme de óxido na superfície do material.



Figura 19: (a) micrografia obtida via SEM e (b) mapas de composição química da liga  $Ti_6Al_4V$  obtidos via EDX realizada em linha.

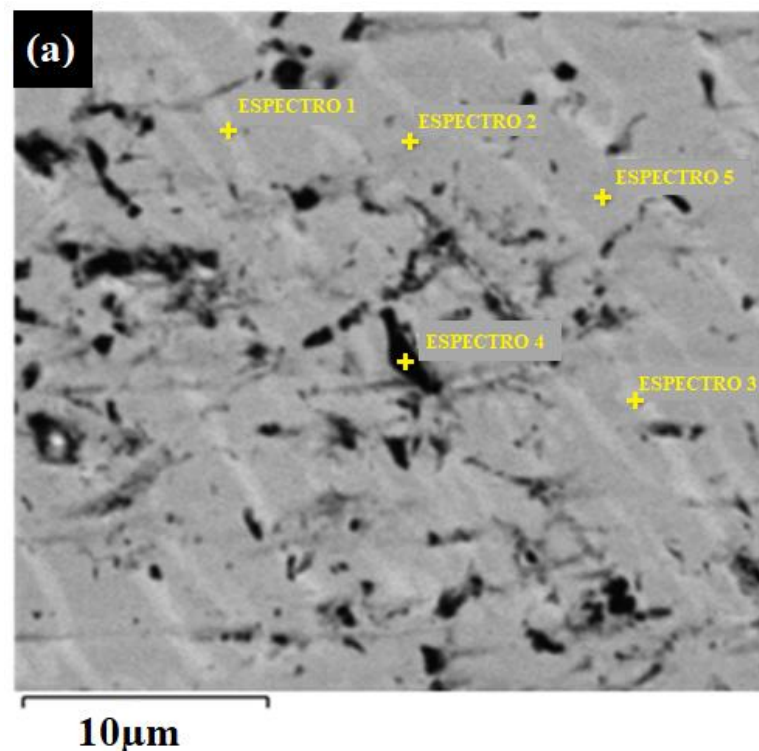


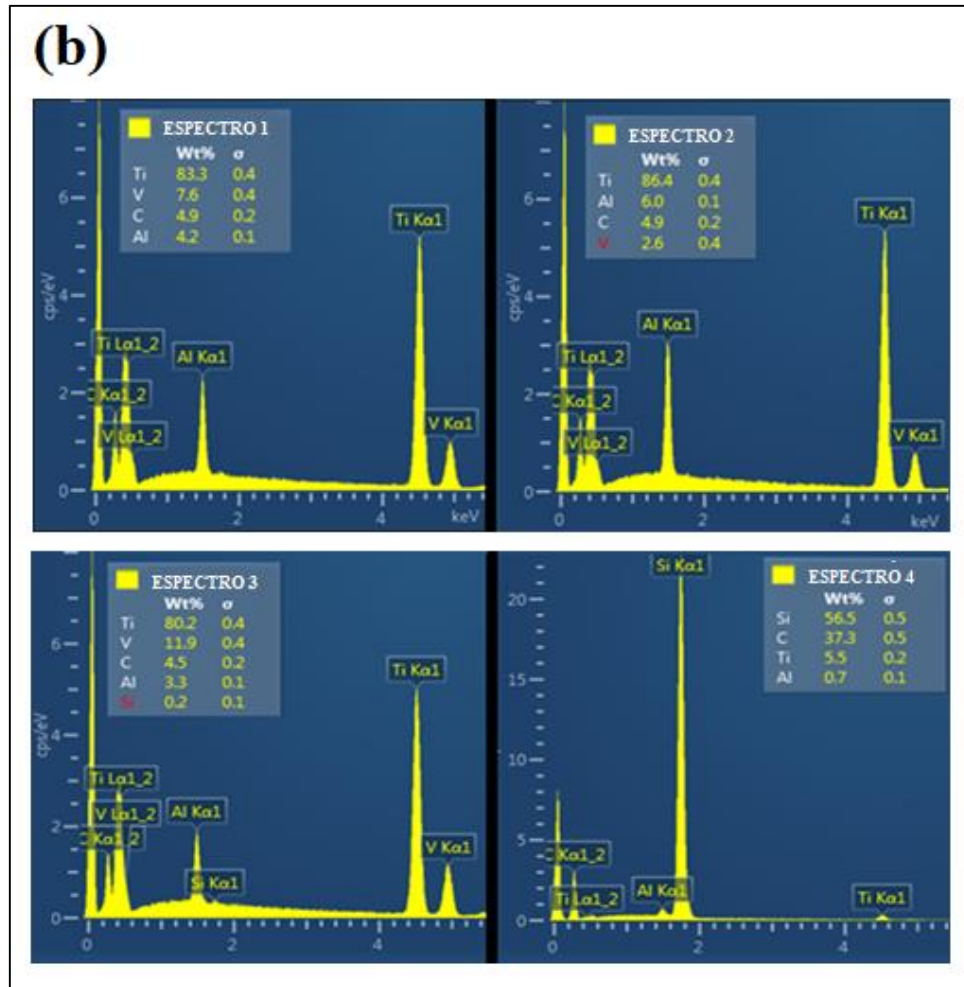
Fonte: Do autor, 2019.

A análise qualitativa desta amostra em diferentes posições foi realizada e os resultados são mostrados na Figura 20. Desta maneira, cinco pontos sobre a superfície da amostra foram

escolhidos para serem analisados em busca de identificar as espécies e suas quantidades em cada posição selecionada. A partir disso, os espectros são gerados para exibir os resultados obtidos de cada seleção. Para garantir a representatividade da superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  em nossos resultados, esses pontos foram posicionados em diferentes regiões (cinza claro - espectros 1 e 3) e (regiões escuras - espectros 2 e 5) e também em uma região de cor preta (espectro 4) caracterizada como falha (Figura 20 (b)). Essas análises espectrais permitiram verificar a variação da concentração dos elementos entre as regiões cinza claro e cinza escuro do mapa. Além disso, a coerência pode ser visualizada entre as concentrações dos elementos espectrais gerados nas mesmas regiões de coloração. Há uma concentração mais alta de Al nas regiões escuras do que nas regiões claras. O mesmo fato pode ser observado com a concentração de V, porém isso ocorre em maior escala nas regiões claras do que nas escuras. Devido ao Al ser um estabilizador  $\alpha$  e V um  $\beta$ -estabilizador, uma maior concentração desses elementos em diferentes regiões indica as diferentes fases sólidas formadas na liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ , onde as regiões claras são características da fase sólida  $\alpha$  e do escuro regiões fase sólida  $\beta$ .

Figura 20: (a) imagem obtida via MEV e marcação de pontos para análise EDX (b) análise química qualitativa (% em peso) obtida usando a técnica EDX na liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ .





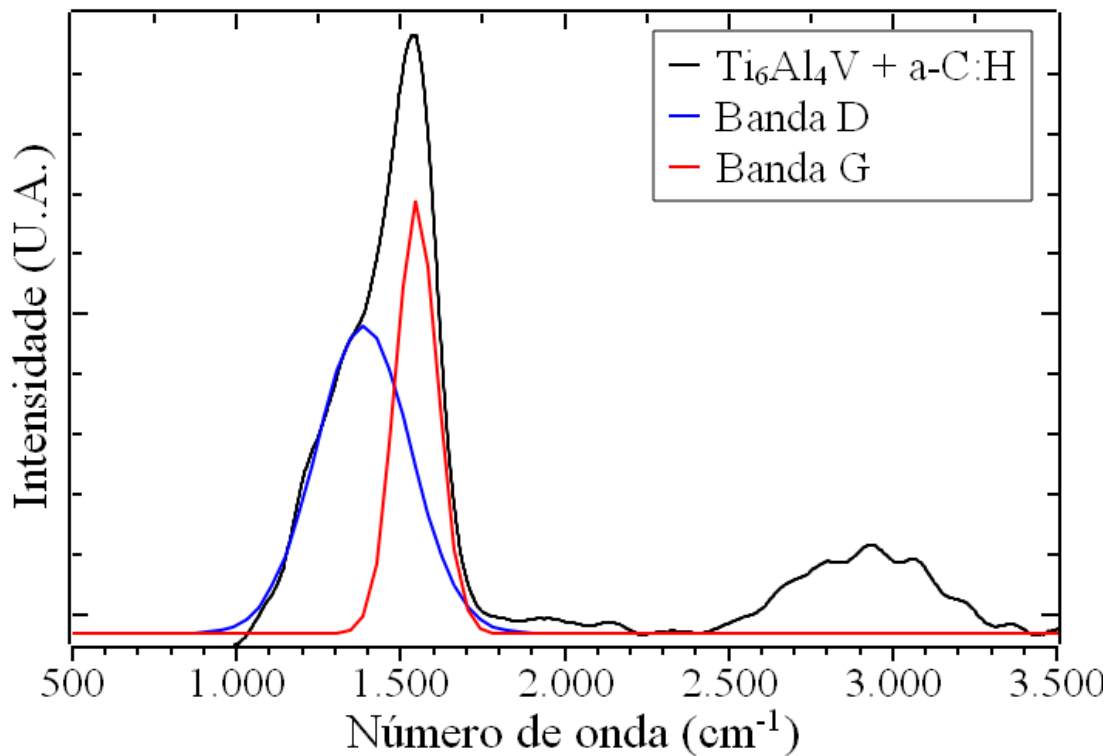
Fonte: Do autor, 2019.

A caracterização microestrutural da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  mostrou que este material possui propriedades atrativas para aplicações médicas. Além disso, as imperfeições observadas sob a superfície da amostra podem ser interessantes no uso deste material em sistemas biológicos. De maneira que os defeitos possam potencializar o acúmulo e o crescimento das células de interesse, melhorando a biocompatibilidade do material.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA LIGA $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ CONTENDO FILME a-C:H

O carbono amorfo hidrogenado (a-C:H) compreende uma ampla família de materiais com alto potencial para pesquisa e aplicações (STAN *et al.*, 2010) e foi depositado na liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  via técnica PECVD. Para caracterizar e validar o filme resultante desse processo, foram realizadas espectroscopias Raman e FTIR. Os espectros Raman com curvas de ajuste D e G para o filme a-C:H obtidos pela técnica PECVD na superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  são exibidos na Figura 21.

Figura 21: Espectros Raman com curvas de ajuste D e G para o filme a-C:H, obtidos pela técnica PECVD na superfície da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V.



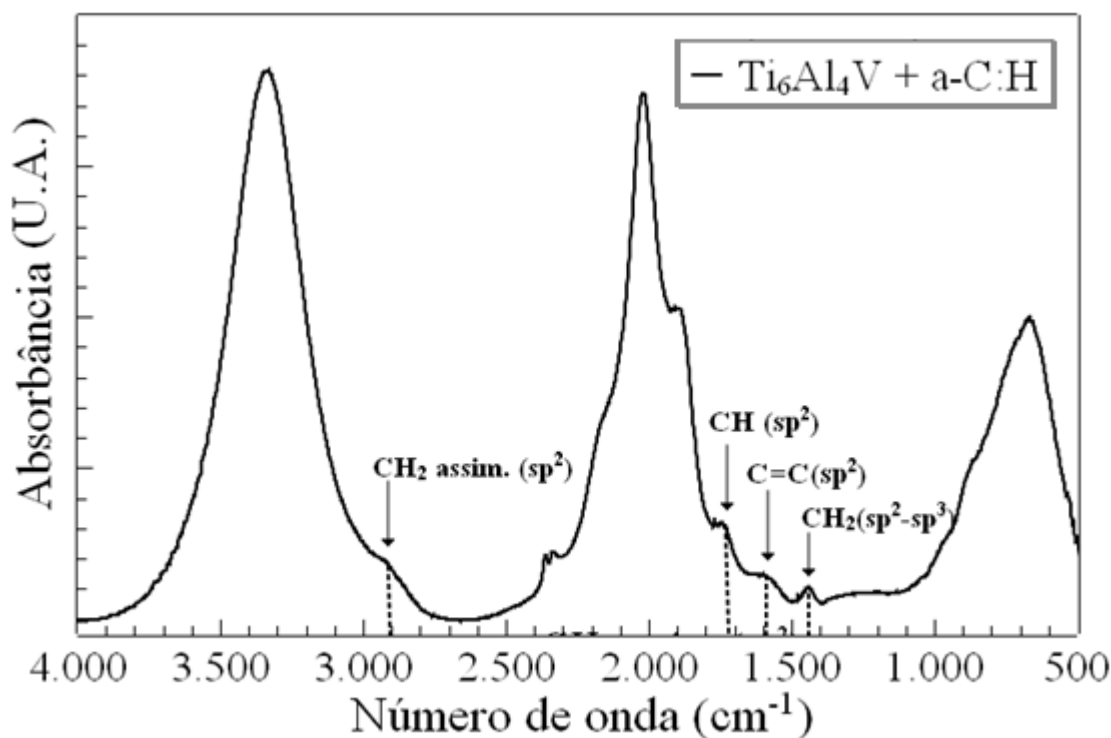
Fonte: Do autor, 2019.

O espectro revela duas bandas de absorção localizadas e centradas aproximadamente em  $1550\text{ cm}^{-1}$  e  $2900\text{ cm}^{-1}$ . A banda de maior intensidade é identificada como a união das bandas G e D. A banda G é atribuída a estruturas semelhantes a grafite, enquanto a banda D está associada ao modo de vibração desordenada dos anéis hexagonais da estrutura. A banda de menor intensidade é característica da banda de ressonância dupla 2D (SILVA *et al.*, 2018). O espectro foi deconvoluído na região de maior intensidade para obter informações mais detalhadas sobre esses dados. A partir disso, é possível verificar as bandas D e G posicionadas em  $1386\text{ cm}^{-1}$  e  $1548\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Esses resultados indicam similaridade com filmes DLC, estando de acordo com Hatem *et al.* (2017), Modabberasl *et al.* (2015) e Silva *et al.* (2018). A relação  $I_D/I_G$  é um parâmetro útil para indicar a estrutura química da amostra. É avaliado com as intensidades das bandas D e G (CORCUERA, 2016) e reflete a organização estrutural do sistema, uma vez que D está relacionado a distúrbios estruturais, enquanto G reflete o tamanho das ligações  $sp^2$  organizadas em anéis. Nossos resultados exibiram um valor de 0,71 para a razão  $I_D/I_G$ , sugerindo que a fração  $sp^2$  é maior que a fração das ligações  $sp^3$  e são chamados de carbono amorfo hidrogenado (PILLACA *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2015).

O espectro característico de FTIR do filme a-C:H apresenta bandas de absorção na faixa de  $4000$  a  $500\text{ cm}^{-1}$  nas quais podem estar relacionadas a diferentes formas de hibridação de

carbono (TUCUREANU; MATEI; AVRAM, 2016). A Figura 22 apresenta o espectro de FTIR da liga  $Ti_6Al_4V$  contendo o filme a-C:H.

Figura 22: Espectro de FTIR da liga  $Ti_6Al_4V$  revestida com filme a-C:H. Linhas tracejadas são diretrizes para os olhos.



Fonte: Do autor, 2019.

A Figura 23 (a) apresenta o espectro de FTIR da liga  $Ti_6Al_4V$  contendo o filme a-C:H, onde é possível verificar as bandas características das ligações C-C em 1300 e 1600  $cm^{-1}$  e as ligações C-H em 1400 e 1500  $cm^{-1}$ . Segundo os autores (CHU; LI 2006), a banda identificada a 1300  $cm^{-1}$  é característica das ligações C-C com hibridação  $sp^2$  e  $sp^3$ . Além disso, a banda em 1560  $cm^{-1}$  pode estar relacionada à ligação C=C e à hibridação  $sp^2$  (BONELLI *et al.*, 1999). Em relação às ligações C-H, há uma banda em 1370  $cm^{-1}$  e outra em 1390  $cm^{-1}$  relacionada à hibridação  $sp^3$  (CHU; LI, 2006; BONELLI *et al.*, 1999; VAGRHI *et al.*, 2011). A banda identificada em 1450  $cm^{-1}$  está relacionada à ligação CH do tipo  $CH_2$  com hibridação mista  $sp^2$ - $sp^3$  (VAGHRI *et al.*, 2011), e a banda em 1480  $cm^{-1}$  está relacionada à ligação  $CH_3$  e hibridação  $sp^3$  (CHU; LI 2006), enquanto as bandas entre 1600 e 1640  $cm^{-1}$  são picos característicos da hibridação C=C  $sp^2$  (JARIWALA; CIOBANU; AGARWAL, 2009).

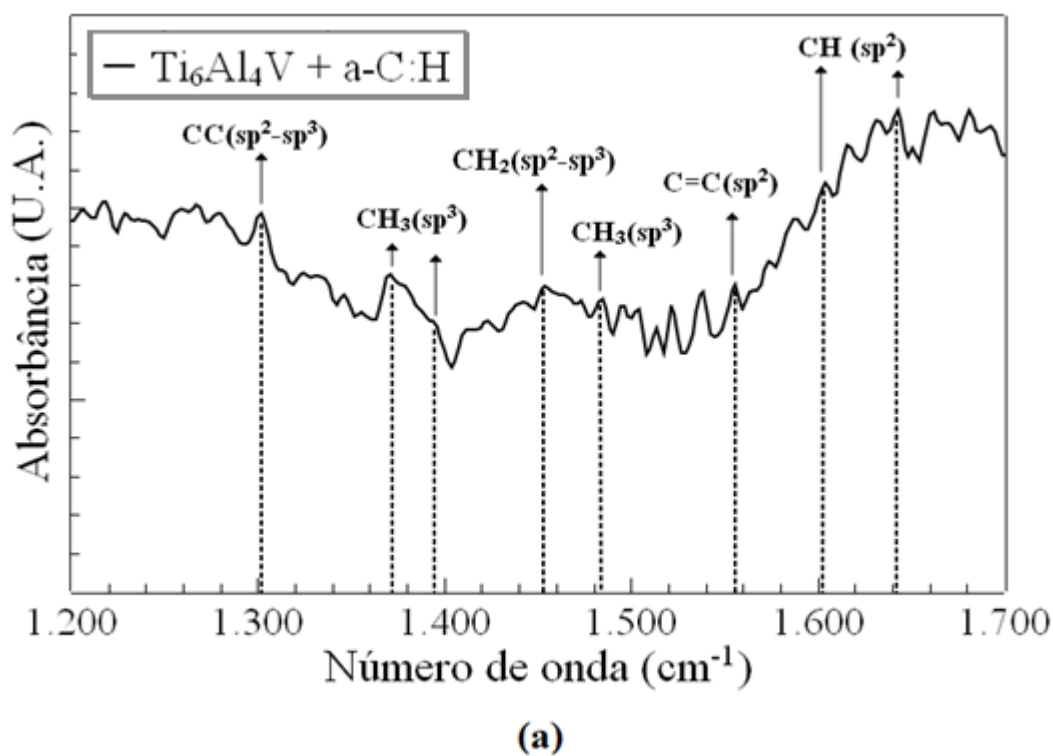
O espectro de FTIR da liga  $Ti_6Al_4V$  revestido com a-C:H é exibido na Figura 23 (b) e compreende uma faixa de 2800 a 3100  $cm^{-1}$ . De acordo com Vaghri *et al.* (2011), as bandas identificadas em 2850 e 2860  $cm^{-1}$  são características da vibração simétrica nas ligações

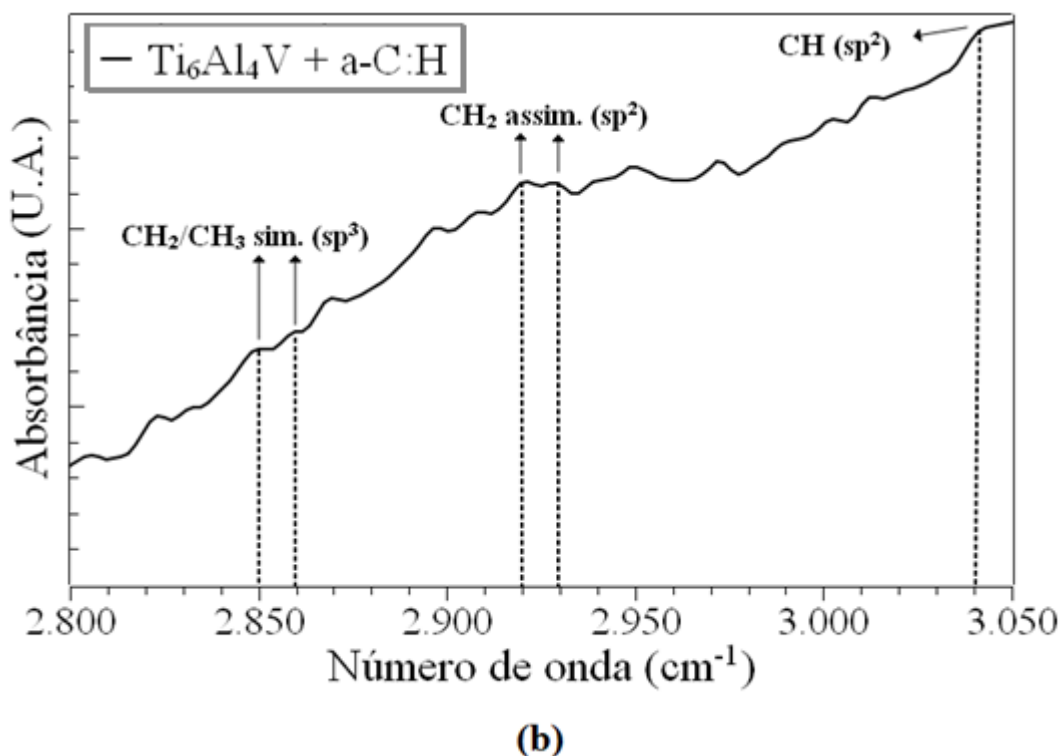


$\text{CH}_2/\text{CH}_3$  da hibridização  $\text{sp}^3$ , enquanto as encontradas em  $2920\text{ cm}^{-1}$  são relatadas por Stan *et al.* (2010) como vibrações do acoplamento assimétrico de  $\text{CH}_2$  se estende exibindo hibridização  $\text{sp}^3$ , enquanto que em  $2930\text{ cm}^{-1}$  com ligação de  $\text{CH}_2$  exibindo hibridização  $\text{sp}^2$  (VAGHRI *et al.*, 2011).

A banda verificada em  $3040\text{ cm}^{-1}$  é característica das ligações CH com hibridização  $\text{sp}^2$  (CHU; LI 2006). Essa região está relacionada às vibrações de estiramento e está associada apenas a átomos de carbono ligados a um ou mais átomos de hidrogênio, mas não revela nada sobre hidrogênio não ligado em uma rede a-C:H (STAN *et al.*, 2010). A falta dessas bandas de absorção indica que os filmes não possuem hidrogênio ou estão em concentrações muito baixas (VAGHRI *et al.*, 2011). Como característica geral, a intensidade da maior faixa de alongamento está relacionada à diminuição da fração  $\text{sp}^3$ . Quanto maior a concentração de fases  $\text{sp}^2$ , mais intensos são os modos vibracionais observados nos espectros de FTIR (STAN *et al.*, 2010). Portanto, os resultados obtidos através da espectroscopia Raman e FTIR corroboram para sugerir que a deposição de carbono amorfo hidrogenado (a-C:H) na liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  usando PECVD resultou na formação de filmes DLC.

Figura 23: Espectro de FTIR da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  revestida com filme a-C:H em (a) espectro entre  $1200$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  e (b) entre  $2800$  e  $3050\text{ cm}^{-1}$ . Linhas tracejadas são diretrizes para os olhos.

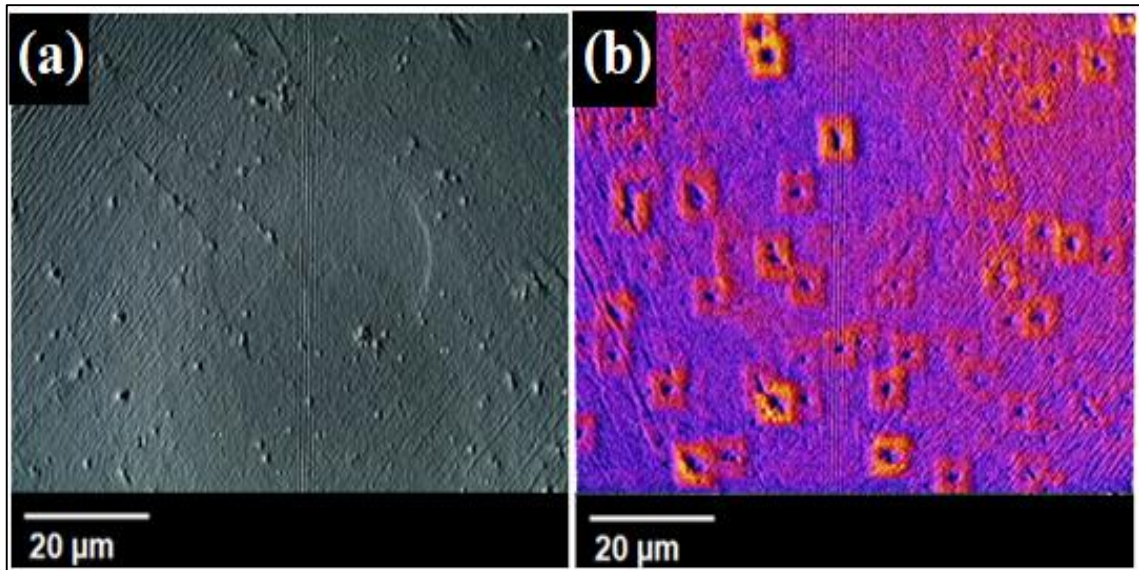




Fonte: Do autor, 2019.

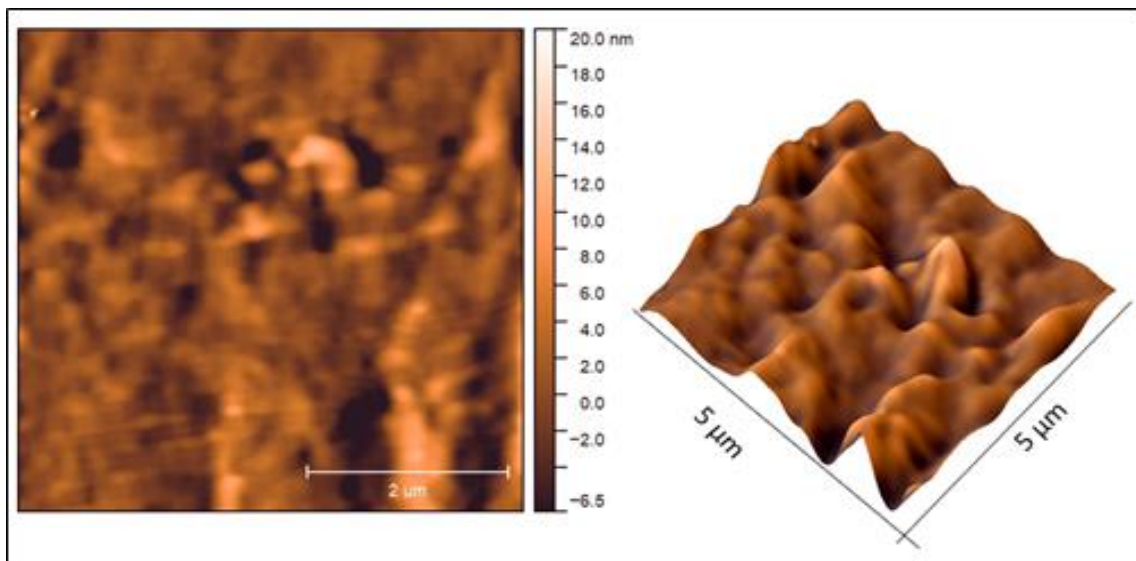
Em busca de caracterizar e explorar as diferenças entre o substrato e o filme depositado, as técnicas de AFM e MO também foram utilizadas. A partir da Figura 24, é possível verificar que a superfície do revestimento a-C:H na liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V apresenta uma matriz homogênea com aparência levemente irregular, demonstrando uma menor densidade de defeitos quando comparado ao material base. As principais irregularidades observadas são picos e poros espalhados pela área analisada. A Figura 25 apresenta as imagens em 2D e 3D da superfície da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V contendo o filme a-C:H. Os resultados de AFM corroboram com as análises de MO, mostrando que a deposição do filme fino sobrepôs as irregularidades características do material base, resultando em uma morfologia mais suave. Foi possível verificar também que o revestimento promoveu um aumento na rugosidade, Rms de aproximadamente 6,1 nm, na superfície do material. Este achado está de acordo com Falcade (2015) e Santos *et al.* (2006) que obtiveram valores de rugosidade da mesma ordem de grandeza em um sistema semelhante. Mais recentemente, um estudo desenvolvido por dos Santos *et al.* (2016) mostrou que o filme a-C:H depositado pela técnica PECVD causou um aumento de aproximadamente 3,5 vezes na rugosidade em comparação com o substrato.

Figura 24: Imagens de superfície obtidas por MO da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  contendo filme a-C:H. (a) superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  revestida com filme a-C:H, ampliação 1000X e (b) imagem tratada com o *software imageJ* para obter mais informações sobre os defeitos da superfície.



Fonte: Do autor, 2019.

Figura 25: Imagens 2D e 3D da superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  contendo filme a-C:H, escala de  $5 \times 5 \mu\text{m}$ .



Fonte: Do autor, 2019.

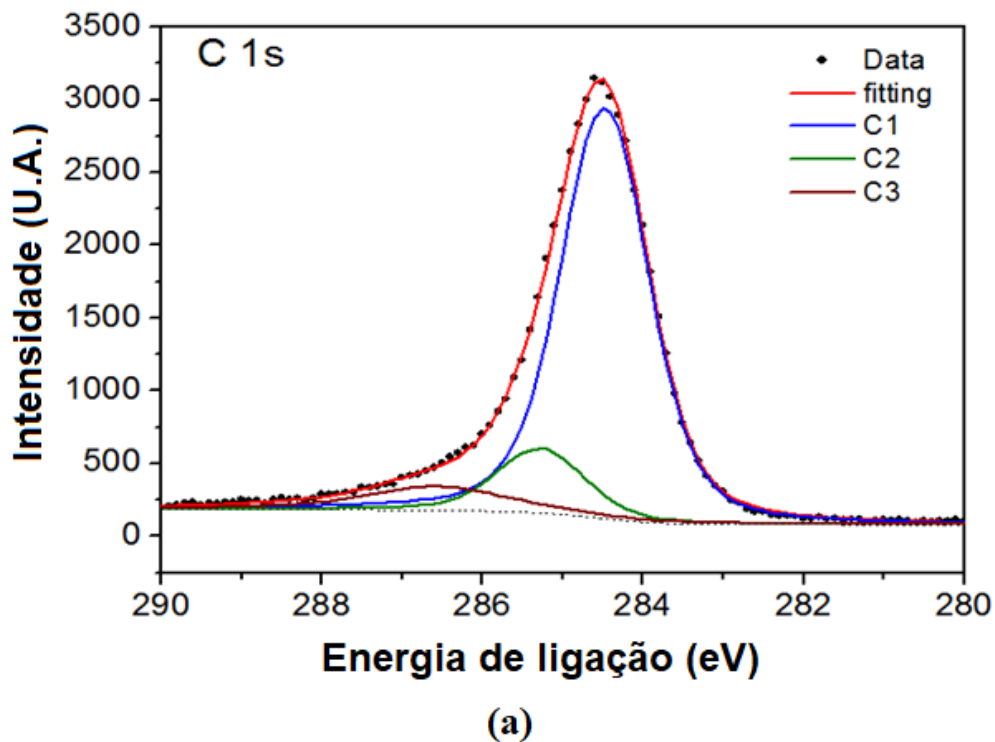
O aumento da rugosidade do filme a-C:H em relação ao substrato está possivelmente relacionado ao método PECVD que apresenta nucleação na fase vapor, com os núcleos sendo formados ainda enquanto não chegam ao substrato. Além disso, a rugosidade do filme também está relacionada às irregularidades do material base. Isso ocorre porque a superfície do substrato é exposta a um campo elétrico, que é mais intenso nas colinas do que nos vales devido à área de contato. Assim, o filme cresce mais rápido nas colinas porque o fluxo iônico segue a direção

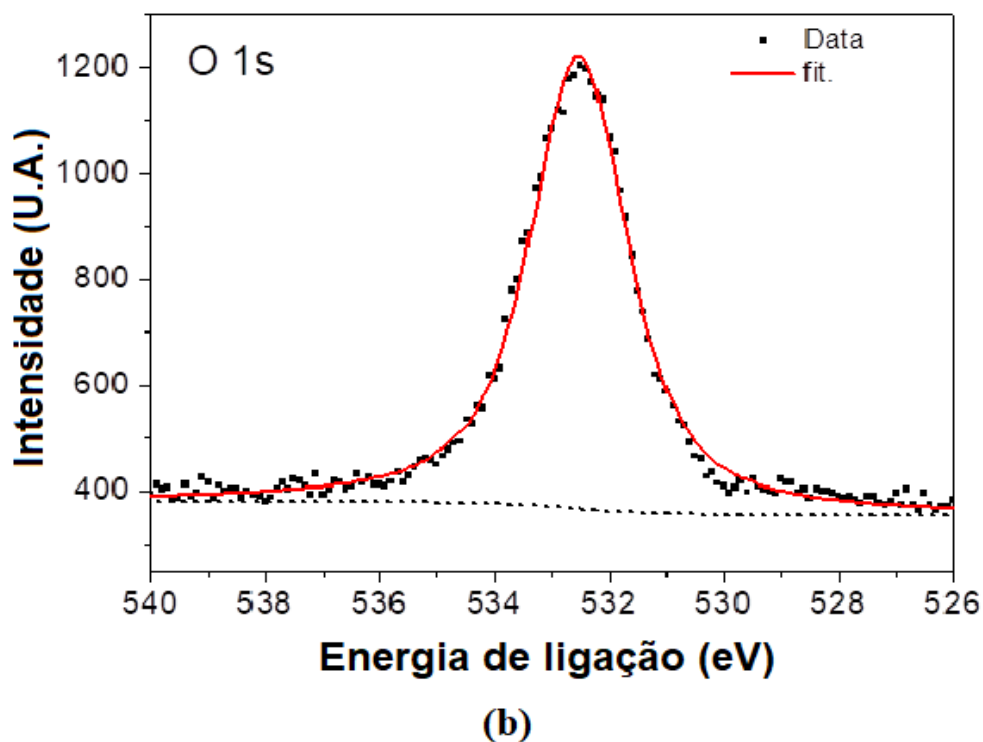


do campo elétrico. Além disso, o campo elétrico promove a ionização aumentando a densidade do plasma, onde o campo é mais forte. Isso explica taxas de deposição mais altas na colina do que nos vales, o que promove um consequente aumento de profundidade (dos SANTOS *et al.*, 2016).

Portanto, esses achados sugerem que as estratégias utilizadas neste trabalho culminaram na formação de filmes a-C:H sobre a liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ , um produto que herdou os defeitos de superfície do material base, o que pode ser bastante conveniente para aplicações em ambientes fisiológicos. Além disso, os filmes de a-C:H relacionados a baixas relações  $\text{sp}^2/\text{sp}^3$  demonstraram ser benéficos para a adesão celular e a gripe devido à exibição de adsorção de proteína (BSA) sem repulsão eletrostática (LIAO *et al.*, 2017). Isso promove o aumento de sua biocompatibilidade e reforça sua versatilidade, que encontra uma variedade de aplicações mecânicas e biomédicas, uma vez que fornece ao mesmo tempo robustez mecânica e compatibilidade de células. Este último foi identificado em estudos *in vivo* e *in vitro* e atribuído ao seu forte ambiente de ligação C-C (PAUL, 2017).

Figura 26: Espectro XPS da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  contendo filme a-C:H, em (a) as compontes C1s e em (b) a componete O1s.





Fonte: Do autor, 2019.

As concentrações atômicas da superfície do revestimento foram determinadas por XPS. Os resultados apresentam duas bandas principais, C 1s e O 1s que estão relacionados aos elementos C e O com uma concentração atômica de 84% e 16% respectivamente. Os espectros deconvoluídos da banda C 1s revelam a presença de três componentes principais: C1 (284,4 eV) associado às ligações do tipo C=C em uma hibridação  $sp^2$ ; C2 (285,2 eV) associado à hibridação  $sp^3$ , que estão em concordância com (MEREL *et al.*, 1998); C3 (286,5 eV) está associado à ligação C-O. A concentração relativa de C1 (79%) C2 (12,4%) C3 (8,5%). O espectro de XPS da liga  $Ti_6Al_4V$  contendo o filme a-C:H pode ser verificado na Figura 26.

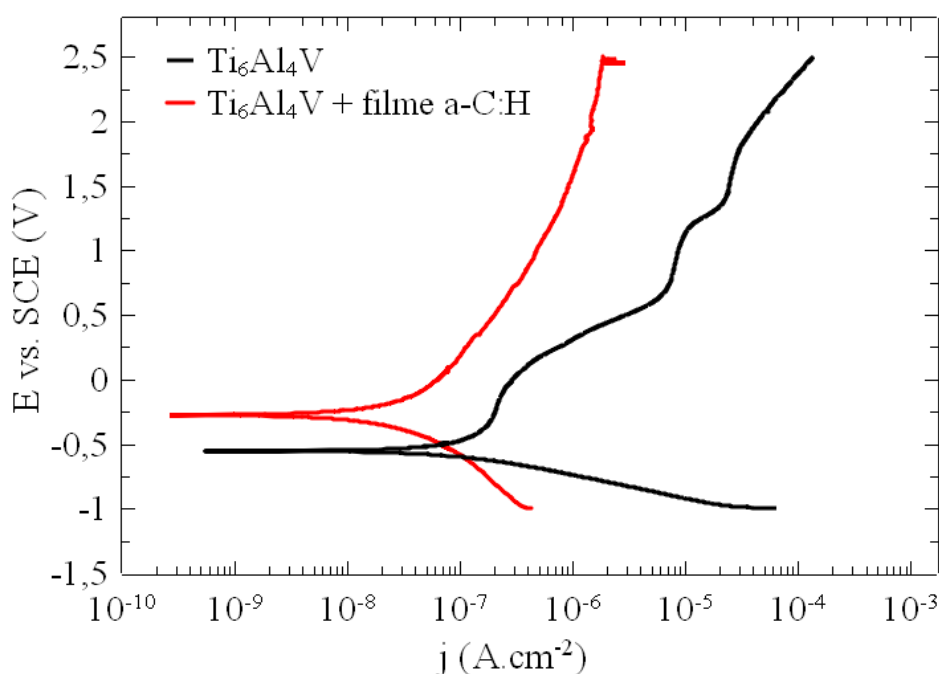
#### 4.3 ENSAIOS ELETROQUÍMICOS

A Figura 27 apresenta as curvas de polarização potenciodinâmica obtidas para a liga  $Ti_6Al_4V$  com e sem revestimento em solução de saliva artificial à temperatura de  $37 \pm 2$  °C. Os resultados obtidos revelam que o potencial de corrosão ( $E_{i=0}$ ) deslocou para valores menos negativos para a amostra contendo o filme a-C:H, evidenciando melhor resistência ao processo de corrosão. Conforme relatado por Souza *et al.* (2008), o deslocamento do potencial de corrosão ( $E_{corr}$ ) para valores menos negativos indica a tendência de uma diminuição da reatividade da liga com o tempo de imersão.

Os espectros de impedância para a liga  $Ti_6Al_4V$  com e sem revestimento em solução de saliva artificial à temperatura de  $37 \pm 2$  °C são mostrados na Figura 28. Comparando os espectros

de impedância do material com e sem revestimento é possível supor que eles tenham comportamentos elétricos distintos (SONGÜR *et al.*, 2009). Os resultados de impedância eletroquímica provaram que a incorporação de filmes a-C:H na superfície da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V são propícios a serem utilizados como revestimento protetor contra a corrosão na liga de titânio estudada. Ademais, os espectros indicam módulos de impedância mais altos para a amostra contendo o filme, evidenciando mais uma vez uma maior resistência ao processo de corrosão. Segundo de Assis *et al.* (2006), a liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V não revestida se comporta passivamente e a camada de TiO<sub>2</sub> produzida em sua superfície é estável no meio corrosivo. Essa camada é composta por um interior poroso e compacto, apresentando duas constantes de tempo, como mostrado nos espectros de impedância. De acordo com a literatura (OLIVEIRA; VIEIRA; MASSI, 2003), o circuito equivalente capaz de descrever a superfície de liga de Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V revestida com a-C:H pressupõe que o filme formado seja menos poroso que o TiO<sub>2</sub> formado no material base. Essas considerações são consistentes com os resultados de AFM, que mostram que o revestimento diminuiu a densidade do defeito em comparação com o material base.

Figura 27: Curvas de polarização potenciodinâmica obtidas na liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V exposta à solução de saliva artificial a  $37 \pm 2$  0C. (linha vermelha - Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V revestido com filme a-C:H) e (linha preta - Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V sem revestimento).

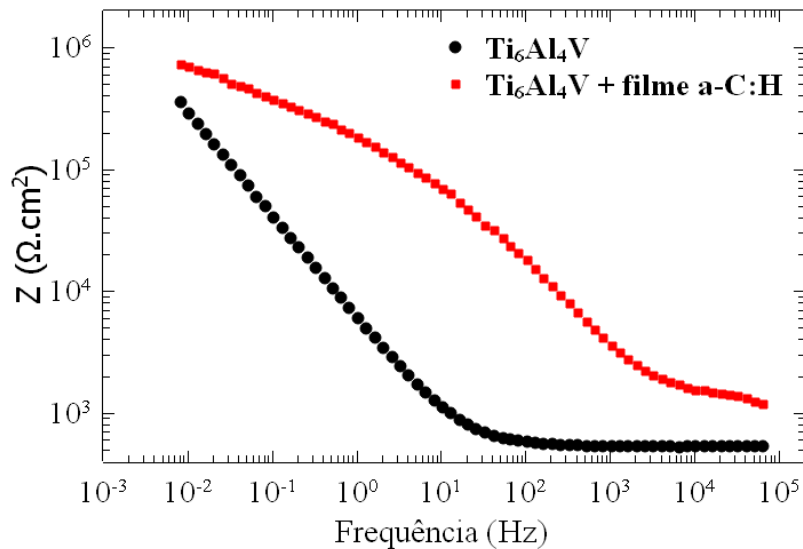


Fonte: Do autor, 2019.

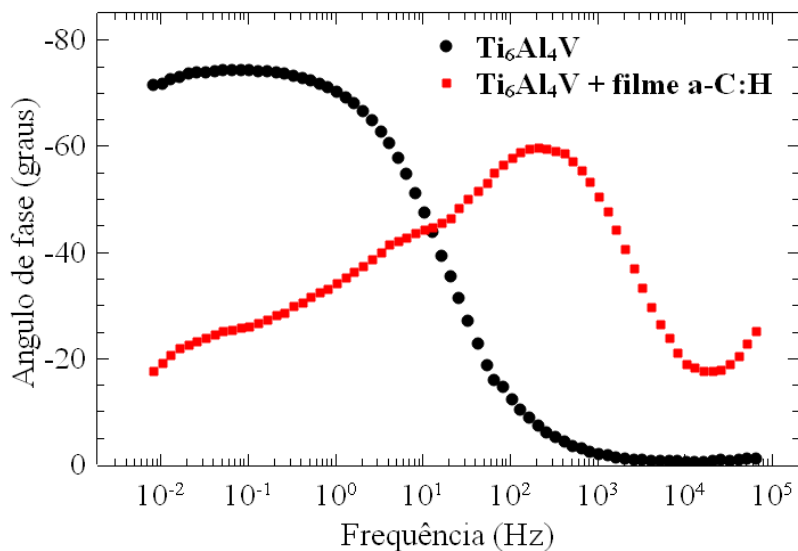
Com relação à densidade de corrente de corrosão ( $i_{\text{corr}}$ ), é possível verificar maiores valores para a liga sem revestimento. Esses resultados indicam que os filmes finos de a-C:H atuam como um sistema de bloqueio de espécies agressivas na superfície do metal, protegendo o substrato do processo de corrosão (RANGEL *et al.*, 2019). Em outras palavras, os filmes finos

de a-C:H depositados na superfície da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  foram capazes de inibir os defeitos presentes na camada de óxido e manter sua integridade e caráter natural de proteção contra o processo de corrosão no meio de saliva artificial.

Figura 28: Gráficos Bode dos espectros de impedância eletroquímica da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  expostos à solução de saliva artificial a  $37 \pm 2$  °C. (linha vermelha -  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  revestido com filme a-C:H) e (linha preta -  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  sem revestimento).



(a)



(b)

Fonte: Do autor, 2019.

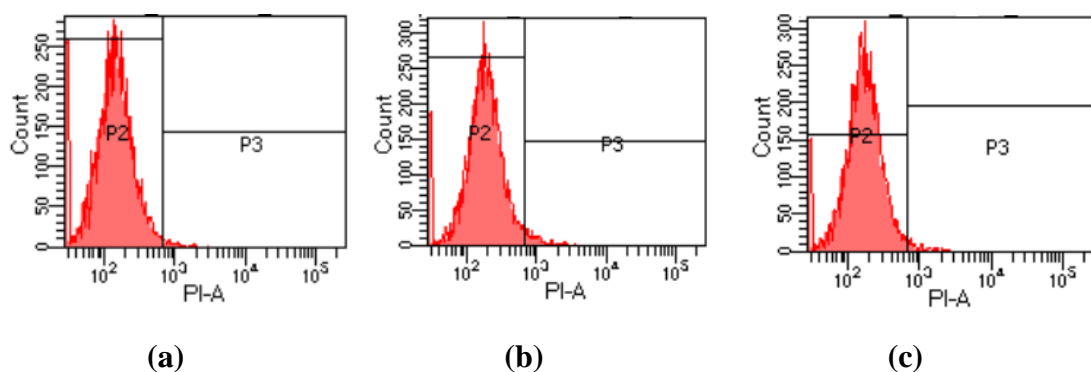
#### 4.4 VIABILIDADE CELULAR E RESPOSTA IMUNE

Os biomateriais precisam atender a muitos requisitos que visam garantir a segurança e a eficácia ao paciente. Entre esses requisitos, podemos citar a ausência de atividade citotóxica, irritação e indução da resposta imune e inflamatória pelo biomaterial. Neste estudo ensaios

biológicos foram utilizados para observar se a liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  revestida ou não com a-C:H preservam a viabilidade das células osteoblásticas MC3T3-E1 de camundongos murinos e das PBMCs humanas. É importante se fazer o estudo da interação do material com osteoblastos, uma vez que estes são comumente ativados em agressões que envolvem reparo ósseo, assim como a interação com células mononucleares do sangue periférico, uma vez que é distribuído pela corrente sanguínea a todas as partes do corpo humano e são essenciais para gerar inflamação e resposta imune independente do tecido danificado.

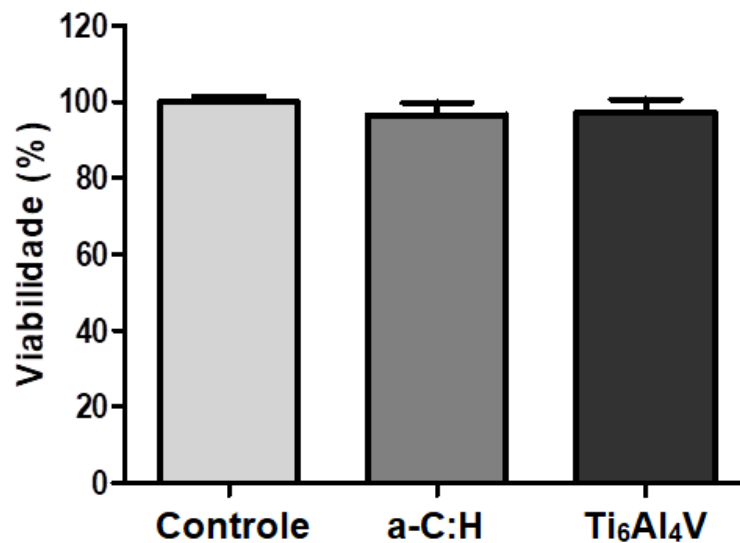
A citometria de fluxo foi utilizada para realizar a separação e contagem de células osteoblásticas MC3T3-E1 viáveis. A partir de um feixe de laser incidente, é feita a medição da dispersão e da fluorescência do feixe de laser refletido pela amostra celular. Biologicamente, as células viáveis apresentam membranas intactas, não sendo permeáveis a uma série de corantes, ao contrário do que ocorre com células não viáveis. O iodeto de propídio (PI) é um corante que se liga ao DNA, sendo possível sua ligação apenas em células não viáveis, já que elas não possuem a membrana intacta. Sendo assim, na Figura 29, temos no quadrante P2 células viáveis, não marcadas com iodeto de propídio, enquanto no quadrante P3 temos células não viáveis que foram marcadas com o corante. De acordo com a Figura 30 as amostras de  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  sem revestimento e com o filme a-C:H não apresentaram efeito citotóxico às células osteoblásticas, apresentando viabilidade celular de  $96,5 \pm 7,3$  e  $97,3 \pm 7,7$  %, respectivamente.

Figura 29: Citometria de fluxo de células osteoblásticas. (a) Dot plot do controle positivo. (b) Dot plot de células tratadas com filme a-C:H. (c) *Dot plot* de células tratadas com  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ .



Fonte: Do autor, 2019.

Figura 30: Ensaio de citotoxicidade por citometria de fluxo. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; \* $p < 0,05$  (One-way ANOVA seguido de teste Tukey) ( $n=5$ ).



Fonte: Do autor, 2019.

Os resultados de viabilidade celular do filme a-C:H em contato com osteoblastos e em PBMCs é particularmente interessante, uma vez que os implantes médicos, incluindo aqueles baseados em ligas de titânio, precisam ter biocompatibilidade e biocapacidade com o osso, e o osteoblasto é precisamente uma das células principais no contexto de renovação óssea e cicatrização de fraturas (DAPUNT *et al.*, 2016).

No caso das PBMCs, o kit de detecção de apoptose utilizado neste estudo permitiu a identificação, por citometria de fluxo, de células em apoptose recente, apoptose tardia e necrose. Foram realizadas duas repetições biológicas, uma em duplicata e outra em triplicata. A representação esquemática da estratégia de *gating* e a determinação da porcentagem de células apoptóticas entre todas as populações de PBMCs ou de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são demonstradas na Figura 31 (a) através dos três primeiros gráficos de pontos. Na Figura 32 (a) é verificado que quando avaliamos a apoptose total de PBMCs, independentemente da população celular, apenas células cultivadas na liga sem a-C:H teve indução significativa do processo apoptótico. As Figuras 32 (b) e 32 (c) demonstra que quando apoptose recente e apoptose tardia de PBMCs foram avaliadas separadamente, não houve diferença significativa em nenhum dos grupos testados. Quando os linfócitos T auxiliar (TCD4<sup>+</sup>) e citotóxico T (TCD8<sup>+</sup>) foram analisados individualmente, é verificado que a liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V sem a-C:H induziu apoptose total (Figura 32 (d)) e apoptose inicial (Figura 32 (e)) em Linfócitos T CD8<sup>+</sup>. A liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V sem a-C:H também induziu apoptose tardia para os linfócitos CD8<sup>+</sup> (Figura 32 (f)) e

CD4 + T (Figura 32 (i)). Como pode ser visto, as diferentes populações de células T CD4 + cultivadas na liga revestida com a-C:H não mostraram nenhum traço de apoptose total ou inicial (Figura 32 (g) (h)).

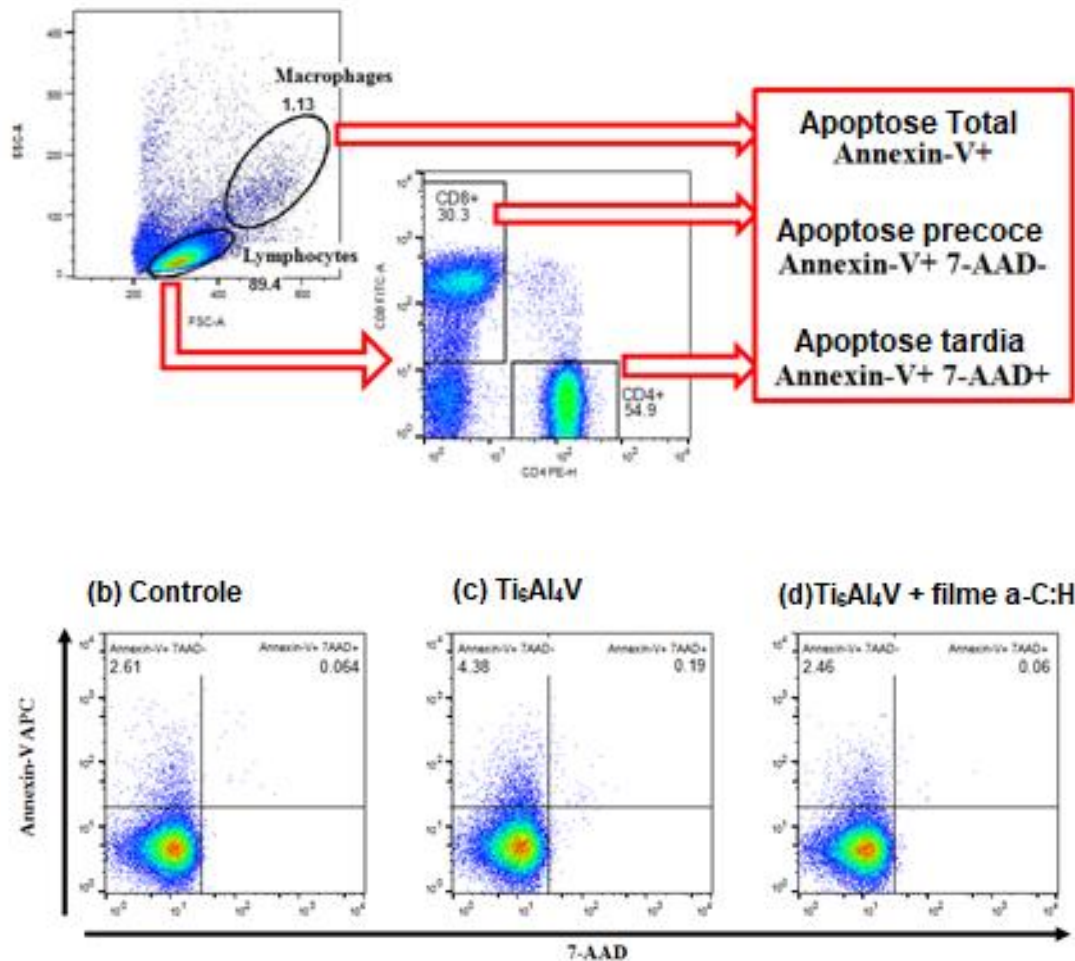
Além da viabilidade celular, outro ponto muito importante para investigar se um determinado composto ou estrutura tem atividade nas células de defesa é a produção de citocinas. As citocinas são os principais reguladores das respostas inflamatórias e imunológicas e sua produção é a principal característica da grande maioria das células ativadas (ALTAN-BONNET; MUKHERJEE, 2019). Sabe-se também que partículas metálicas podem induzir estresse e ser tóxico (NUNE *et al.*, 2016), o que leva à ativação de células com consequente produção de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6 (TRINDADE, 2001; VALLÉS *et al.*, 2006; NUNE *et al.*, 2016). Ainda, ligas de titânio em aplicações cirúrgicas podem causar complicações com consequentes sintomas alérgicos (NELSON; NAKASHIMA; SEAN, 1992), o que aponta para a necessidade de encontrar alternativas para inibir essa hipersensibilidade derivada do titânio.

Nesse sentido, procuramos verificar se PBMCs humanas cultivadas na superfície da liga cobertas ou não com a-C:H tiveram sua função celular alterada pela produção de citocinas. Nossos resultados mostraram que PBMCs humanas cultivadas na superfície da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V na ausência de a-C:H têm uma produção significativa de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10, moléculas pró e anti-inflamatórias, respectivamente (Figura 33 (a) e (b)). A produção de citocinas IL-2 e IL-5 não foi alterada por nenhuma das condições testadas (Figura 33 (c) e 33(d)). A produção de citocinas por PBMCs cultivadas na ausência de ligas ou filmes revestidos com a-C:H não mostrou diferença em nenhuma das citocinas avaliadas, sugerindo que essas superfícies são inertes e/ou pouco responsivas na presença de PBMCs. As citocinas IL-4 e IL-6 não foram detectadas no sobrenadante da cultura de nenhum dos grupos testados. Esses resultados são muito promissores, especialmente no caso das citocinas IL-4 e IL-5, pois são centrais na indução de processos alérgicos, independentemente do alérgeno que desencadeia esse processo inflamatório (SCHUH *et al.*, 2003; SCHMIDT-WEBER, 2012).

Além disso, a produção de citocinas IL-2, IL-4 e IL-5 é principalmente induzida por linfócitos T CD4 +, que em nosso estudo não mostraram indução de apoptose ou qualquer sinal de ativação quando os filmes foram revestidos com a-C:H. Assim, os resultados biológicos mostraram que a estratégia de uso do filme a-C:H para cobertura da liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V promoveu desde a proteção do ambiente fisiológico até a melhoria da biocompatibilidade. Além disso, os resultados também contribuíram para o avanço do emprego do Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V em aplicações médicas,

uma vez que foi possível adicionar propriedades intrínsecas a esta liga, as vantagens oferecidas pelo filme a-C:H

Figura 31: Representação esquemática da estratégia de restrição e determinação da porcentagem de células apoptóticas entre PBMCs, células T CD4 + e CD8 +. Apoptose total de PBMCs (b) controle, (c) liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V e (d) liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V contendo filme a-C:H.

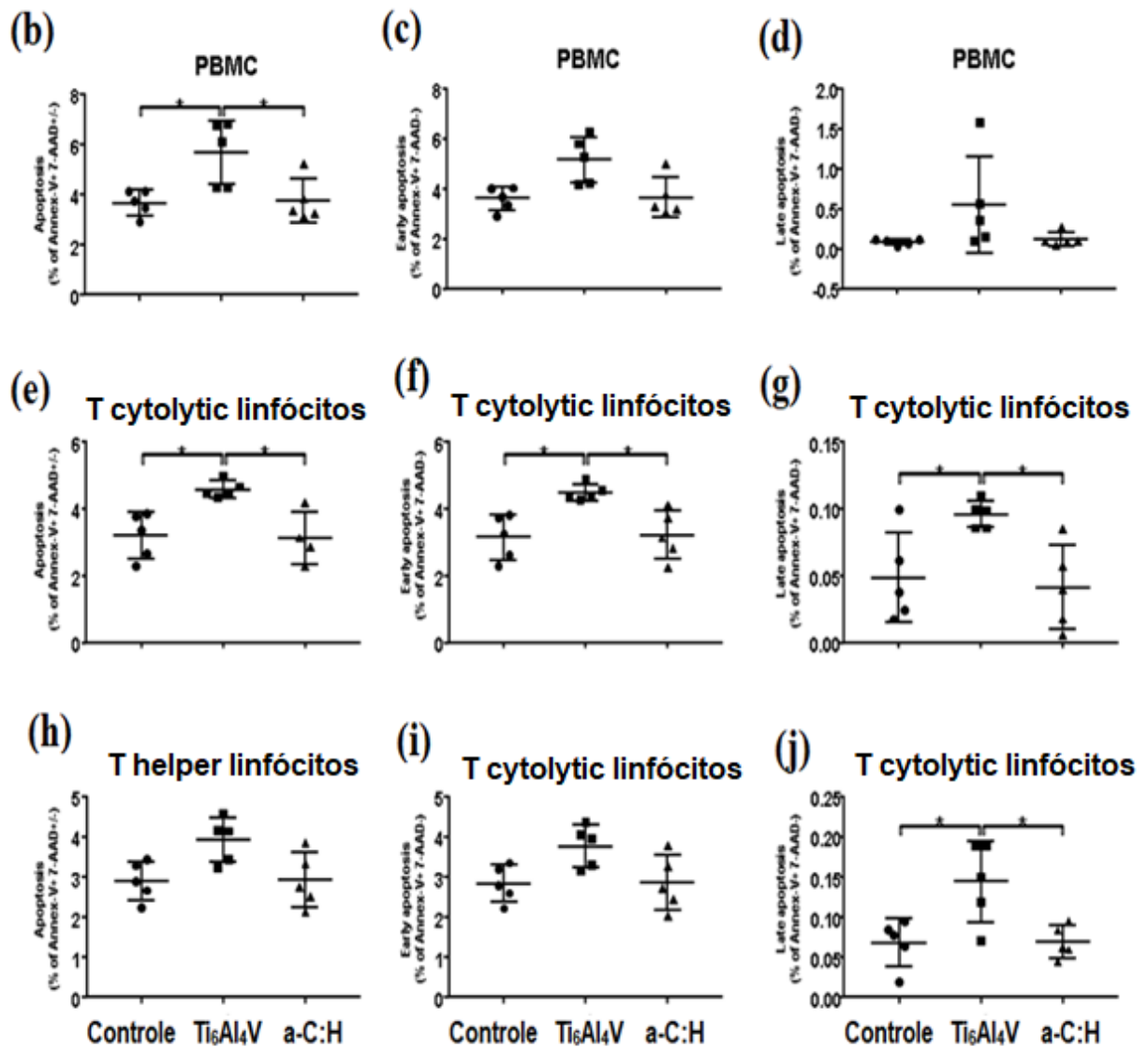


Fonte: Do autor, 2019.

Figura 32: PBMCs humanas cultivadas na liga Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V revestida com a-C:H não mostraram nenhum vestígio de apoptose. São apresentadas representações gráficas de apoptose total (b), precoce (c) e tardia (d) para PBMCs. Os gráficos (e), (f) e (g) demonstram apoptose total, precoce e tardia para linfócitos T CD8 +. Os gráficos (h), (i) e (j) demonstram apoptose total, precoce e tardia para linfócitos T CD4+ respectivamente. Para todos os gráficos, as células

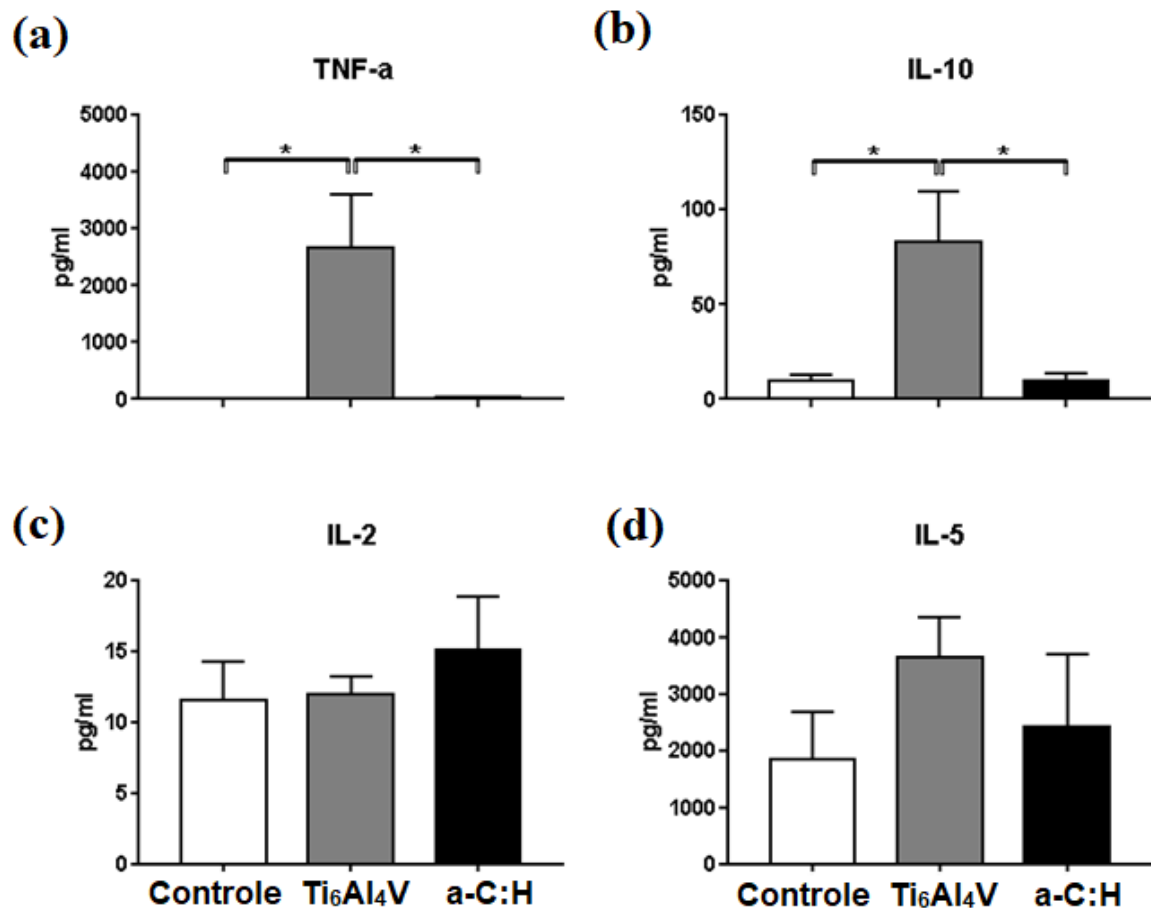


foram cultivadas por 24 h sem  $Ti_6Al_4V$  ou na liga  $Ti_6Al_4V$  contendo ou não filme a-C:H. As barras representam média  $\pm$  erro padrão (SEM) em quintuplicados.



Fonte: Do do autor, 2019.

Figura 33: Efeito da liga  $Ti_6Al_4V$  contendo ou não filme a-C:H na produção de citocinas de PBMCs. PBMCs humanas foram coletadas e cultivadas por 24 h na superfície da liga  $Ti_6Al_4V$  contendo ou não filme a-C:H. PBMCs cultivadas na placa, mas na ausência de liga  $Ti_6Al_4V$  foram usadas como controle. Após 24 h de cultura, o sobrenadante foi coletado e analisado para detectar TNF- $\alpha$  (a), IL-10 (b), IL-2 (c) e IL-5 (d) por matriz de esferas citométricas. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão do nível de produção das citocinas de amostras em quintuplicada. \*  $P < 0,05$  comparado com a liga  $Ti_6Al_4V$  sem filme a-C:H.



Fonte: Do autor, 2019.

## 5 CONCLUSÕES

Neste estudo, os filmes a-C:H produzidos pela técnica PECVD sobre substrato da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  foram preparados com sucesso e caracterizados morfologicamente e estruturalmente usando microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman (RS) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS).

Testes de polarização potenciodinâmica e espectroscopia de impedância eletroquímica também foram realizados a fim de verificar a resistência à corrosão da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  com e sem revestimento. Os resultados de impedância eletroquímica mostraram que o filme a-C:H atua como uma barreira protetora contra o processo de corrosão, impedindo a ação localizada de íons agressivos. Independentemente da população de células, quando a apoptose total de células osteoblásticas ou PBMCs foi avaliada, apenas células cultivadas na liga sem a-C:H apresentaram indução significativa do processo apoptótico.

Os resultados biológicos sugerem que o tratamento superficial da liga de titânio  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  promoveu desde a proteção do ambiente fisiológico até a melhoria da biocompatibilidade. Foi verificado que a liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  revestida com filme de a-C:H promoveu maior viabilidade em células mononucleares do sangue periférico em comparação ao substrato. Além disso, o material contendo revestimento não apresentou indução à resposta imune. Estes resultados também contribuíram para o avanço do emprego da liga  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  contendo o filme a-C:H em aplicações biomédicas, uma vez que foi possível adicionar propriedades intrínsecas ao material estudado.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HADY, Mohamed; HINOSHITA, Keita; MORINAGA, Masahiko. General approach to phase stability and elastic properties of  $\beta$ -type Ti-alloys using electronic parameters. **Scripta Materialia**, [s.l.], v. 55, n. 5, p.477-480, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scriptamat.2006.04.022>.
- ABIMO. Censo da odontologia. 2014. Disponível em: <<https://abimo.org.br/dados-do-setor/centro-da-odontologia/>>. Acesso em: 30 nov. 2018.
- AHMED, Yassin Mustafa *et al.* Titanium and its Alloy. **International Journal Of Science And Research**. p. 1351-1361. out. 2014.
- ALEIXO, Giorgia T. *et al.* Effects of Omega Phase on Elastic Modulus of Ti-Nb Alloys as a Function of Composition and Cooling Rate. **Solid State Phenomena**, [s.l.], v. 138, p.393-398, mar. 2008. Trans Tech Publications. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/ssp.138.393>.
- ALTAN-BONNET, Grégoire; MUKHERJEE, Ratnadeep. Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.205-217, 15 fev. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-019-0131-x>.
- ANKEM, S; GREENE, C.a. Recent developments in microstructure/property relationships of beta titanium alloys. **Materials Science And Engineering: A**, [s.l.], v. 263, n. 2, p.127-131, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0921-5093\(98\)01170-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0921-5093(98)01170-8). ASM. **Metals Handbook**. 10ed. Edition Metals Handbook, v.12, 1990, 857p.
- ARSLAN, Ersin *et al.* Wear and adhesion resistance of duplex coatings deposited on Ti6Al4V alloy using MAO and CFUBMS. **Surface And Coatings Technology**, [s.l.], v. 214, p.1-7, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2012.10.006>.
- de ASSIS, Sérgio Luiz; WOLYNEC, Stephan; COSTA, Isolda. Corrosion characterization of titanium alloys by electrochemical techniques. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 51, n. 8-9, p.1815-1819, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2005.02.121>
- BAYÓN, R. *et al.* Influence of the carbon content on the corrosion and tribocorrosion performance of Ti-DLC coatings for biomedical alloys. **Tribology International**, [s.l.], v. 88, p.115-125, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.triboint.2015.03.007>.
- BONELLI, M. *et al.* Structural and Mechanical Properties of Diamond-Like Carbon Films Prepared by Pulsed Laser Deposition With Varying Laser Intensity. **Mrs Proceedings**, [s.l.], v. 593, p.359-364, 1999. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1557/proc-593-359>.
- BRAGA, Neila de Almeida *et al.* OBTENÇÃO DE TITÂNIO METÁLICO COM POROSIDADE CONTROLADA POR METALURGIA DO PÓ. **Química Nova**, São José dos Campos, v. 30, n. 2, p.450-457, nov. 2006.
- BROSSIA, C.S.; CRAGNOLINO, G.A.. Effect of palladium on the corrosion behavior of titanium. **Corrosion Science**, [s.l.], v. 46, n. 7, p.1693-1711, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.corsci.2003.10.003>.

BRUNETTE, Donald M. *et al.* **Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications.** Berlim: Springer-verlag, 2001. 1029 p.

CALLISTER JR, William D.. **Ciência e engenharia dos materiais: uma introdução.** 5. ed. Rio de Janeiro: Ltc, 2002. 589 p.

CASIRAGHI, C.; FERRARI, A. C.; ROBERTSON, J.. Raman spectroscopy of hydrogenated amorphous carbons. **Physical Review B**, [s.l.], v. 72, n. 8, p.1-14, 1 ago. 2005. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/physrevb.72.085401>.

CHEN, G. Z.. The FFC Cambridge process and its relevance to valorisation of ilmenite and titanium-rich slag. **Mineral Processing And Extractive Metallurgy**, [s.l.], v. 124, n. 2, p.96-105, 19 nov. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1179/1743285514y.0000000073>.

CHOU, Chau-chang; LIN, Jyun-sin; WU, Rudder. Microstructures and mechanical properties of an a-C: N film as the interlayer and the outmost layer of a DLC-deposited Ti bio-alloy. **Ceramics International**, [s.l.], v. 43, p.776-783, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.05.196>.

CHOUDHURY, Dipankar *et al.* Fabrication and characterization of DLC coated microdimples on hip prosthesis heads. **Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [s.l.], v. 103, n. 5, p.1002-1012, 12 set. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.33274>.

CORCUERA, Valerie Cecile. **FILMES DE DLC COM NANOCRISTAIS DE DIAMANTE PARA APLICAÇÕES ESPACIAIS.** 2016. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia e Tecnologia Espaciais/ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2016

CORDEIRO, Jairo M. *et al.* Development of binary and ternary titanium alloys for dental implants. **Dental Materials**, [s.l.], v. 33, n. 11, p.1244-1257, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.013>.

CREMASCO, Alessandra. **Deformação Plástica a Frio, Transformação de Fases e Propriedades Mecânicas de Ligas Ti-Nb-Sn para Uso Biomédico.** 2012. 243 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Mecânica, Unicamp, Campinas, 2012.

CREMASCO, Alessandra. **Propriedades Mecânicas e Resistência à Corrosão de Ligas Ti-35Nb Aplicadas Como Biomaterial.** 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Mecânica, Engenharia dos Materiais, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CHU, Paul K.; LI, Liuhe. Characterization of amorphous and nanocrystalline carbon films. **Materials Chemistry And Physics**, [s.l.], v. 96, n. 2-3, p.253-277, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.07.048>.

DAPUNT, Ulrike *et al.* The osteoblast as an inflammatory cell: production of cytokines in response to bacteria and components of bacterial biofilms. **Bmc Musculoskeletal Disorders**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-9, 2 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12891-016-1091-y>.

DONACHIE Jr., Matthew J.. **Titanium: A Technical guide.** 2. ed. Ohio: Asm, 2000. 367 p.

DONIACH, S.; SUNJIC, M. Many-electron singularity in X-ray photoemission and X-ray line spectra from metals. **Journal of Physics C: Solid State Physics**, [s.l.], v.3, p. 285, 1970.

EISENBARTH, E. *et al.* Biocompatibility of  $\beta$ -stabilizing elements of titanium alloys. **Biomaterials**, [s.l.], v. 25, n. 26, p.5705-5713, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.021>.

FALCADE, T.. **Eletrodeposição De Filmes De Carbono Sobre A Liga De Titânio Ti6Al4V: Influência Da Adição Do Líquido Iônico Prótico Lactato De 2 Hidroxietanolamina ao Eletrólito de N,N-Dimetilformamida**. 2015. 199 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Minas, Metalurgia e Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

FANG, Zhigang Zak *et al.* Powder metallurgy of titanium: past, present, and future. **International Materials Reviews**, [s.l.], p.1-53, 28 ago. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09506608.2017.1366003>.

FAROKHI, Mehdi *et al.* Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.68-91, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.10.001>.

FREESE, Howard L.; VOLAS, Michael G.; WOOD, Randolph. Metallurgy and Technological Properties of Titanium and Titanium Alloys. In: BRUNETTE, Donald M. *et al* (Ed.). **Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications**. Berlim: Springer, 2001. Cap. 3. p. 25-51.

FOUZIYA, Begum *et al.* Surface modifications of titanium implants – The new, the old, and the never heard of options. **Journal Of Advanced Clinical & Research Insights**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.215-219, 2016. Incessant Nature Science Publishers Pvt Ltd.. <http://dx.doi.org/10.15713/ins.jcri.142>.

GAUR, Swati *et al.* Silane-Coated Magnesium Implants with Improved In-Vitro Corrosion Resistance and Biocompatibility. **Journal Of Materials Science & Surface Engineering**, [S.l.], v. 4, n. 5, p.415-424, 21 set. 2016.

GUO, X.; SHI, H.; LIFENG, X. Corrosion and Electrochemical Impedance Properties of Ti Alloys as Orthopaedic Trauma Implant Materials. **International Journal Of Electrochemical Science**, [s.l.], v. 12, p.9007-9016, 26 jul. 2017.

HABASHI, Fathi. **Handbook of Extractive Metallurgy: The Metal Industry Ferrous Metals**. Quebec: Wiley-vch, 1997.

HATEM, Andre *et al.* Tribocorrosion behavior of DLC-coated Ti-6Al-4V alloy deposited by PIID and PEMS + PIID techniques for biomedical applications. **Surface And Coatings Technology**, [s.l.], v. 332, p.223-232, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.07.004>.

JARIWALA, Bhavin N.; CIOBANU, Cristian V.; AGARWAL, Sumit. Atomic hydrogen interactions with amorphous carbon thin films. **Journal Of Applied Physics**, [s.l.], v. 106, n. 7, p.0-9, out. 2009. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.3238305>.

KARIMI, Shima; NICKCHI, Tirdad; ALFANTAZI, Akram M.. Long-term corrosion investigation of AISI 316L, Co-28Cr-6Mo, and Ti-6Al-4V alloys in simulated body solutions. **Applied Surface Science**, [s.l.], v. 258, n. 16, p.6087-6096, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.03.008>.

KIRADZHIYSKA, Denitsa D.; MANTCHEVA, Rositsa D.. Overview of Biocompatible Materials and Their Use in Medicine. *Folia Medica*, [s.l.], v. 61, n. 1, p.34-40, 1 mar. 2019. Pensoft Publishers. <http://dx.doi.org/10.2478/folmed-2018-0038>.

KIRMANIDOU, Yvoni *et al.* New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2016, p.1-21, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2908570>.

KREBS, Robert E.. **The History and Use of Our Earth's Chemical Elements**: Reference Guide. 2. ed. Londres: Greenwood Press, 2006. 422 p.

KULKARNI, Mukta *et al.* Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. In: SEIFALIAN, Alexander *et al* (Ed.). **Nanomedicine**. Us: One Central Press, 2014. p. 111-136.

LEE, C. M.; JU, C. P.; LIN, J. H. Chern. Structure-property relationship of cast Ti-Nb alloys. **Journal Of Oral Rehabilitation**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.314-322, abr. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2842.2002.00825.x>.

LEE, Yu Mi *et al.* In vivo and in vitro response to electrochemically anodized Ti-6Al-4V alloy. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.1851-1859, 4 out. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-007-3265-5>.

LI, Yuhua *et al.* New Developments of Ti-Based Alloys for Biomedical Applications. **Materials**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.1709-1800, 4 mar. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ma7031709>.

LIAO, T.t. *et al.* Biological responses of diamond-like carbon (DLC) films with different structures in biomedical application. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 69, p.751-759, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.064>.

LINDIGKEIT, J. *et al.* Titanium in Dentistry. In: LEYENS, C.; PETERS, M.. **Titanium and titanium alloys**: Fundamentals and Applications. [s.l.]: Wiley-vch, 2003. p. 453-466.

LIU, X; CHU, P; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science And Engineering: R**, [s.l.], v. 47, n. 3-4, p.49-121, 24 dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mser.2004.11.001>.

LOVE, C.A. *et al.* Diamond like carbon coatings for potential application in biological implants — a review. **Tribology International**, [s.l.], v. 63, p.141-150, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.triboint.2012.09.006>.

LÜTJERING, G., Williams, J.C. *Titanium*. Springer-Verlag, Germany, p. 378, 2003.

MACÊDO, Haroldo Reis Alves de. **Efeito do tratamento térmico do titânio sobre a proliferação de células Pré-Osteoblásticas**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Engenharia dos Materiais, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

MEREL, P *et al.* Direct evaluation of the sp<sup>3</sup> content in diamond-like-carbon films by XPS. **Applied Surface Science**, [s.i.], v. 1-2, n. 136, p.105-110, 1 out. 1998.

MIOTTO, Larissa N. *et al.* Surface properties of Ti-35Nb-7Zr-5Ta. **The Journal Of Prosthetic Dentistry**, [s.l.], v. 116, n. 1, p.102-111, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prosdent.2015.10.024>.

MODABBERASL, Ali *et al.* Fabrication of DLC thin films with improved diamond-like carbon character by the application of external magnetic field. **Carbon**, [s.l.], v. 94, p.485-493, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2015.06.081>.

MOHAMMED, Mohsin Talib *et al.* Titanium and its Alloys, the Imperative Materials for Biomedical Applications. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RECENT TRENDS IN ENGINEERING & TECHNOLOGY, 1., 2012, Mandya. **Proceedings**. [n.e]: Springer, 2012. p. 91 – 95.

NAKAI, Masaaki *et al.* Self-adjustment of Young's modulus in biomedical titanium alloys during orthopaedic operation. **Materials Letters**, [s.l.], v. 65, n. 4, p.688-690, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2010.11.006>.

NELSON, T.; NAKASHIMA, M.; SEAN, J.. How secure are Laparoscopically Placed Clips ?, **Arch Surg.**, [s.l.], v. 127, p. 718-720, 1992.

NGWA, Hilary Afeseh *et al.* Vanadium induces dopaminergic neurotoxicity via protein kinase Cdelta dependent oxidative signaling mechanisms: Relevance to etiopathogenesis of Parkinson's disease. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 240, n. 2, p.273-285, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.025>.

NGWA, Hilary Afeseh *et al.* Vanadium exposure induces olfactory dysfunction in an animal model of metal neurotoxicity. **Neurotoxicology**, [s.l.], v. 43, p.73-81, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2013.12.004>.

NIINOMI, Mitsuo. Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. **Science And Technology Of Advanced Materials**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.445-454, jan. 2003. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stam.2003.09.002>.

NIINOMI, Mitsuo; NAKAI, Masaaki; HIEDA, Junko. Development of new metallic alloys for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 8, n. 11, p.3888-3903, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.037>

NUNE, K. C. *et al.* Cellular response of osteoblasts to low modulus Ti-24Nb-4Zr-8Sn alloy mesh structure. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [s.l.], v. 105, n. 3, p.859-870, 25 nov. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.35963>.

OLIVEIRA, E. C.; CRUZ, S. A.; AGUIAR, P. H. L.. Effect of PECVD Deposition Parameters on the DLC/PLC Composition of a-C:H Thin Films. **Sociedade Brasileira de Química**, [s.l.], v. 23, n. 9, p.1657-1662, 2012.

OLIVEIRA, Luciana Soares de Andrade Freitas *et al.* Biomateriais com aplicação na regeneração óssea: método de análise e perspectivas futuras. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, [s.l.], v. 9, p.37-44, 2010.

OLIVEIRA, M.A.S; VIEIRA, A.K; MASSI, M. Electrochemical behavior of the Ti-6Al-4V alloy coated with a-C: H films. **Diamond And Related Materials**, [s.l.], v. 12, n. 12, p.2136-2146, dez. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0925-9635\(03\)00253-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0925-9635(03)00253-x).



PARTICHELI, Marcio JosÉ. **ESTRUTURA E MOLHABILIDADE DE FILMES FINOS DE CARBONO AMORFO HIDROGENADO EXPOSTOS A RADIAÇÃO**. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2015.

PAUL, Rajib. Diamond-Like-Carbon Coatings for Advanced Biomedical Applications. **Global Journal Of Nanomedicine**, [s.i.], v. 2, n. 5, p.1-5, 23 ago. 2017.

PAWELEC, Katarzyna *et al.* Influence of pH on the tribological properties of DLC-coated Ti-6Al-4V titanium alloy. **Aip Conference Proceedings**, [s.l.], p.200211-200216, 2018. Author(s). <http://dx.doi.org/10.1063/1.5056284>.

PETERS, Manfred; LEYENS, Christoph. Structure and Properties of Titanium and Titanium alloys. In: LEYENS, Christoph; PETERS, Manfred (Ed.). **Titanium and Titanium Alloys: Fundamentals an Applications**. Köln: Wiley-vch, 2003. Cap. 1. p. 1-36.

PERL, Daniel P.; MOALEM, Sharon. Aluminum, Alzheimer's Disease and the Geospatial Occurrence of Similar Disorders. **Mineralogical Society Of America**, Nova Iorque, v. 64, p.115-134, 2006.

PILLACA, E.j.d.m. *et al.* DLC deposition inside of a long tube by using the pulsed-DC PECVD process. **Surface And Coatings Technology**, [s.l.], v. 359, p.55-61, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.12.011>. E. J. D. M. Pillaca, M. A.

PINA, V. Guiñón *et al.* Tribocorrosion behavior of beta titanium biomedical alloys in phosphate buffer saline solution. **Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, [s.l.], v. 46, p.59-68, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.02.016>.

PINEIZ, Regiane Aparecida. **preparação e caracterização estrutural, mecânica e anelástica de ligas do sistema Ti-ta contendo oxigênio intersticial, para uso biomédico**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Materiais, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2014.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa C. K.; MORAES, Ângela M.. BIOMATERIALS: TYPES, APPLICATIONS, AND MARKET. *Química Nova*, [s.l.], p.957-971, 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.

POURSAEE, Amir. Corrosion of Ti 6Al 4V orthopaedic alloy under stress. **Materialia**, [s.l.], v. 6, p.100271-100288, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mtla.2019.100271>.

RAJAN, S. Thanka; BENDAVID, A.; SUBRAMANIAN, B.. Cytocompatibility assessment of Ti-Nb-Zr-Si thin film metallic glasses with enhanced osteoblast differentiation for biomedical applications. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 173, p.109-120, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.041>.

RANGEL, Uriel Darhê Oudinot Dias et al. Corrosion and Micro-abrasive Wear Behaviour of 2524-T3 Aluminium Alloy with PAni-NPs/PSS LbL Coating. **Materials Research**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.1-9, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2018-0593>.

RIBEIRO, Ana Lúcia Roselino *et al.* Mechanical, physical, and chemical characterization of Ti-35Nb-5Zr and Ti-35Nb-10Zr casting alloys. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 8, p.1629-1636, 1 abr. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-009-3737-x>.

RIBEIRO, Ana Lúcia Roselino et al. Are new TiNbZr alloys potential substitutes of the Ti6Al4V alloy for dental applications? An electrochemical corrosion study. **Biomedical Materials**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.065005-065016, 26 nov. 2013. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1748-6041/8/6/065005>.

ROBERTSON, J. Diamond-like amorphous carbon. **Materials Science And Engineering: R**, [s.l.], v. 37, n. 4-6, p.129-281, 24 maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0927-796x\(02\)00005-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0927-796x(02)00005-0).

ROY, Ritwik Kumar; LEE, Kwang-ryeol. Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: A review. **Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [s.l.], v. 83, n. 1, p.72-84, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.30768>.

SAMPAIO, Waneli Cristina; CARVALHO, Luna Alcântara Neres de; CARNEIRO, Marcela Lemos Brettas. AVANÇOS NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS VISANDO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS. **Revista Eletrônica do Programa de Mestrado em Direitos Humanoscidadania e Violência/ciência Política do Centro Universitário Unieuro**, Brasília, v. 25, p.70-105, 2018.

dos SANTOS, Adélia Moreira Marques et al. Corrosion and cell viability studies of graphite-like hydrogenated amorphous carbon films deposited on bare and nitrided titanium alloy. **Corrosion Science**, [s.l.], v. 82, p.297-303, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.corsci.2014.01.025>.

dos SANTOS, Everton Diniz *et al.* Macrophages adhesion rate on Ti-6Al-4V substrates: polishing and DLC coating effects. **Research On Biomedical Engineering**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.144-152, jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2446-4740.03616>.

SANTOS, George Gonçalves dos; MARINHO2, Sônia Maria Oliveira Cavalcanti; MIGUEL, Fúlvio Borges. Polymers as biomaterials for cartilaginous tissue. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v. 12, n. 3, p.367-373, dez. 2013.

SANTOS, Lúcia V. *et al.* DLC cold welding prevention films on a Ti6Al4V alloy for space applications. **Surface And Coatings Technology**, [s.l.], v. 200, n. 8, p.2587-2593, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2005.08.151>.

SANTOS, M.; BILEK, M.M.M.; WISE, S.G.. Plasma-synthesised carbon-based coatings for cardiovascular applications. **Biosurface And Biotribology**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.146-160, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.001>.

SCHMIDT-WEBER, Carsten B.. Anti-IL-4 as a New Strategy in Allergy. **New Trends In Allergy And Atopic Eczema**, [s.l.], p.120-125, 2012. KARGER. <http://dx.doi.org/10.1159/00033223>

SCHUH, Jane M *et al.* Chemokines and cytokines: axis and allies in asthma and allergy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.503-510, dez. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1359-6101\(03\)00057-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1359-6101(03)00057-1).

SILVA, Danilo Lopes Costa e *et al.* Evaluation of Carbon thin Films Using Raman Spectroscopy. **Materials Research**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.1-6, 7 jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2017-0787>.

SIMSEK, Ijlal; OZYUREK, Dursun. Investigation of the wear and corrosion behaviors of Ti5Al2.5Fe and Ti6Al4V alloys produced by mechanical alloying method in simulated body

fluid environment. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 94, p.357-363, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.047>.

SONGÜR, Murat *et al.* Electrochemical corrosion properties of metal alloys used in orthopaedic implants. **Journal Of Applied Electrochemistry**, [s.l.], v. 39, n. 8, p.1259-1265, 29 jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10800-009-9793-6>.

SOUZA, Maria E. P. *et al.* Effects of pH on the electrochemical behaviour of titanium alloys for implant applications. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.549-552, 6 nov. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-008-3623-y>.

SOUZA, Alann T.P. *et al.* Effect of bone morphogenetic protein 9 on osteoblast differentiation of cells grown on titanium with nanotopography. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 119, n. 10, p.8441-8449, 22 jun. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.27060>.

STAN, E. *et al.* Polymer-like and diamond-like carbon coatings prepared by rf-pecvd for biomedical applications. **Digest Journal Of Nanomaterials & Biostructures**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.705-718, jul. 2010.

SUGAHARA, Tarcila *et al.* Caracterização mecânica e microestrutural da liga Ti-6Al-4V tratada termicamente. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.195-199, 2008.

TANE, M. *et al.* Elastic properties of single-crystalline  $\omega$  phase in titanium. **Acta Materialia**, [s.l.], v. 61, n. 20, p.7543-7554, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actamat.2013.08.036>.

TRINDADE, M. In vitro reaction to orthopaedic biomaterials by macrophages and lymphocytes isolated from patients undergoing revision surgery. **Biomaterials**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.253-259, fev. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00181-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00181-2).

TUCUREANU, Vasilica; MATEI, Alina; AVRAM, Andrei Marius. FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study. **Critical Reviews In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 6, p.502-520, 3 mar. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408347.2016.1157013>.

VAGHRI, Elnaz *et al.* Characterization of Diamond: Like Carbon Films Synthesized by DC-Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition. **Journal Of Fusion Energy**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.447-452, 1 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10894-011-9406-3>.

VALLÉS, Gema *et al.* Differential inflammatory macrophage response to rutile and titanium particles. **Biomaterials**, [s.l.], v. 27, n. 30, p.5199-5211, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.045>.

XAVIER, Caio Castanho. **ESTUDO DE TRATAMENTOS TÉRMICOS DA LIGA Ti-15Zr-xMo**. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Materiais, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2016.

WACHESK, C. C. *et al.* The Influence of Titanium Dioxide on Diamond-Like Carbon Biocompatibility for Dental Applications. **Journal Of Nanomaterials**, [s.l.], v. 2016, p.1-7, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8194516>.

WIRTH, C. *et al.* Nitinol surface roughness modulates in vitro cell response: a comparison between fibroblasts and osteoblasts. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.51-60, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2004.06.001>.

ZHANG, T.F. *et al.* Wear and corrosion properties of diamond like carbon (DLC) coating on stainless steel, CoCrMo and Ti6Al4V substrates. **Surface And Coatings Technology**, [s.l.], v. 273, p.12-19, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.03.031>.

ZHANG, Renhui; ZHAO, Juan; YANG, Yingchang. A novel diamond-like carbon film. **Surfaces And Interfaces**, [s.l.], v. 7, p.1-5, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfin.2017.02.003>.

ZHOU, Kai *et al.* Microstructure and electrochemical properties of nitrogen-doped DLC films deposited by PECVD technique. **Applied Surface Science**, [s.l.], v. 329, p.281-286, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.12.162>.

ZHOU, Ying Long; NIINOMI, Mitsuo; AKAHORI, Toshikazu. Decomposition of martensite  $\alpha''$  during aging treatments and resulting mechanical properties of Ti-Ta alloys. **Materials Science And Engineering: A**, [s.l.], v. 384, n. 1-2, p.92-101, out. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msea.2004.05.084>.