

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES FINOS RECOBERTOS COM  
ALBUMINA E FIBRONECTINA**

Denise Aparecida Tallarico da Silva

São Carlos

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES FINOS RECOBERTOS COM  
ALBUMINA E FIBRONECTINA**

Denise Aparecida Tallarico da Silva

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência e Engenharia  
de Materiais como requisito parcial à  
obtenção do título de DOUTORA EM  
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientador: Dr. Pedro Augusto de Paula Nascente

Agência Financiadora: CAPES

São Carlos

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

T147pc

Tallarico-da-Silva, Denise Aparecida.

Produção e caracterização de filmes finos recobertos com albumina e fibronectina / Denise Aparecida Tallarico da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

116 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Titânio. 2. Biomateriais. 3. Filmes finos. 4. Proteínas. 5. Zircônio. 6. Nióbio. I. Título.

CDD: 620.189322 (20<sup>a</sup>)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido André e ao meu filho Matheus, motivos de minha busca infinita pelo crescimento moral, intelectual e profissional.

## VITAE DO CANDIDATO

Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (2008), Bacharel em Engenharia Física pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (2005).

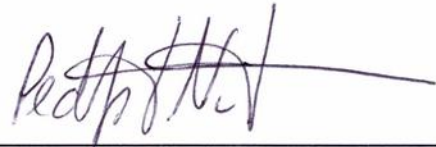


MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO  
DE

DENISE APARECIDA TALLARICO DA SILVA

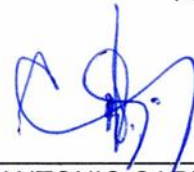
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE  
MATERIAIS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 28 DE JUNHO DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:



---

DR. PEDRO AUGUSTO DE PAULA NASCENTE  
ORIENTADOR  
PPG-CEM/UFSCar



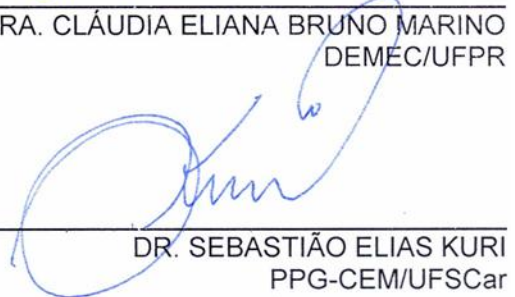
---

DR. ANTONIO CARLOS GUASTALDI  
DFQ/IQ/Unesp



---

DRA. CLÁUDIA ELIANA BRUNO MARINO  
DEMEC/UFPR



---

DR. SEBASTIÃO ELIAS KURI  
PPG-CEM/UFSCar



---

DR. ALBERTO MOREIRA JORGE JUNIOR  
PPG-CEM/UFSCar





## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Pedro Augusto de Paula Nascente por sua valiosa orientação e incentivo na realização deste trabalho, pela amizade, pela confiança e pela oportunidade proporcionada.

A Dra. Anouk Galtayries por ter me acolhido em seu laboratório e por todos os ensinamentos e amizade demonstrados.

Aos professores Dr. Sebastião Elias Kuri, Dr. Pedro Iris Paulin Filho, Dr. Alberto Moreira Jorge Junior e Dr. Antônio Carlos Guastaldi por toda a ajuda, paciência e simpatia demonstradas.

Ao Angelo Gobbi por toda a ajuda e pela deposição dos filmes finos.

A Ana Claudia Moretti Vieira pelas medidas de AFM.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais que me acolheram, ajudaram e ensinaram.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus pais Fernando e Bernadeth, que me possibilitaram todas as chances de crescer e me apoiaram em todas as escolhas.

Ao meu filho Matheus pela sua confiança e carinho, que me deram tanta força.

Ao meu marido André por toda a ajuda, incentivo, paciência e carinho, mesmo nos momentos mais difíceis.

A Deus acima de tudo.



## RESUMO

Propriedades relacionadas ao aumento da durabilidade dos implantes e respostas biológicas mais rápidas e confiáveis são comumente exploradas em pesquisa científica de diferentes áreas. Os fenômenos físico-químicos que ocorrem na superfície da interface osso/implante determinam as respostas biológicas subsequentes à implantação do biomaterial e, portanto, são decisivos para a efetividade do processo de osseointegração. Este trabalho envolveu o crescimento e a caracterização de filmes finos nanoestruturados produzidos por pulverização catódica (*sputtering*) de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e Zr/Ti/Nb sobre Si(111) e aço inoxidável, e seus posteriores recobrimentos com proteínas (albumina de soro bovino - BSA e fibronectina - Fn). As técnicas de caracterização empregadas foram: espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (*X-ray-photoelectron spectroscopy* - XPS), microscopia de força atômica (*atomic force microscopy* – AFM), espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (*time-of-flight secondary ion mass spectrometry* - ToF-SIMS), espectroscopia de energia dispersiva de raios X (*energy-dispersive X-ray spectroscopy* - EDS) e nanoindentação. Todos os filmes apresentaram baixa rugosidade, grãos nanoestruturados e baixos módulos de elasticidade. A análise de adsorção de proteínas demonstrou que o filme de Zr/Ti/Nb tratado termicamente e depositado sobre aço apresentou a melhor afinidade com a albumina e o filme de  $\text{TiO}_2$  obteve a maior afinidade com a fibronectina. Todos os filmes analisados revelaram-se apropriadas para o uso como recobrimento protetor para implantes ortopédicos metálicos.



## PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF THIN FILMS COATED WITH ALBUMIN AND FIBRONECTIN

### ABSTRACT

Properties related to the increase in the durability of the implants and reliable and faster biological responses are commonly exploited in different areas of scientific research. The physical and chemical phenomena that occur on the surface of the bone/implant interface determine the biological responses following the implantation of biomaterials and therefore are critical to the effectiveness of the process of osseointegration. This work involved the growth and characterization of nanostructured thin films produced by sputtering of  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , and  $\text{Zr/Ti/Nb}$  on  $\text{Si}(111)$  and stainless steel substrates, and their subsequent coating with proteins (bovine serum albumin - BSA and fibronectin - Fn). The characterization techniques employed were: X-ray-photoelectron spectroscopy - XPS, atomic force microscopy – AFM, time-of-flight secondary ion mass spectrometry - ToF-SIMS, energy-dispersive X-ray spectroscopy - EDS, and nanoindentation. All films showed low surface roughness, nanostructured's grains, and low elastic moduli. The protein adsorption analysis demonstrated that the  $\text{Zr/Ti/Nb}$  film deposited onto steel and heat-treated had the highest affinity for albumin and that  $\text{TiO}_2$  film had the highest affinity for fibronectin. All films demonstrated to be suitable for use as protective coating for metallic orthopedic implants.



## PUBLICAÇÕES

TALLARICO, D.A.; FERREIRA, M.J.; NASCENTE, P.A.P. Characterization of Ti-Zr-V non-evaporable getter films by AFM, SEM/EDS, and XPS. In: XXXI ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA, **Programa e Resumos (CD)**, 413-1. Águas de Lindóia - SP, Maio, 2008.

PANCOTTI, A.; CARAZOLLE, F.; SIERVO, A.; TALLARICO, D.A.; LANDERS, R.; KLEIMAN, G.G.; NASCENTE, P.A.P., Surface structure characterization of a 3 ML film of Pd deposited on Au(111), oral. In: XXXI ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA, **Programa e Resumos (CD)**, 413-2. Águas de Lindóia - SP, Maio, 2008.

FERREIRA, M.J.; TALLARICO, D.A.; NASCENTE, P.A.P., Preparation and Characterization of TiZrV Non Evaporable Getter Films to Be Used in Ultra High Vacuum, painel. In: 6<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON SYNCHROTRON RADIATION IN MATERIALS SCIENCE. **Conference proceedings**, v. 1092, p. 168-172. Campinas – SP. Julho, 2008.

PANCOTTI, A.; CARAZOLLE, M. F.; SIERVO, A.; TALLARICO, D.A.; NASCENTE, P.A.P.; LANDERS, R.; KLEIMAN, G.G., Surface structure characterization of ultra-thin films of Pd deposited on Au(111), oral. In: 9<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE STRUCTURE OF SURFACES. **Program and Abstracts**, p. 57. Salvador – BA. Agosto, 2008.

NASCENTE, P.A.P.; PANCOTTI, A.; CARAZOLLE, M.F.; SIERVO, A.; TALLARICO, D.A.; LANDERS, R.; KLEIMAN, G.G., Surface structural investigation of ultra-thin films of Pd deposited on Au(111), oral. In: AVS 55<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM & EXHIBITION, **Technical Program**, p. 66. **Abstract Book**, p. 9. Boston - Estados Unidos. Outubro, 2008.

TALLARICO DA SILVA, D.A.; FERREIRA, M.J.; NASCENTE, P.A.P., Preparação e caracterização de filmes finos de Ti-Zr-V usados como absorvedores não evaporáveis de gás em ultra-alto vácuo, painel. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS (CBECIMAT). **Anais**. Porto de Galinhas – PE. Novembro, 2008.

TALLARICO DA SILVA, D.A.; FERREIRA, M.J.; NASCENTE, P.A.P., Preparation and Characterization of Ti-Zr-V nonevaporable getter films, painel. In: XXII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROSCOPIA E MICROANÁLISE (SBMM). **Anais**. Belo Horizonte – MG. Outubro, 2009.

PANCOTTI, A.; CARAZOLLE, M.F.; TALLARICO, D.A.; SIERVO, A.; LANDERS, R.; KLEIMAN, G.G.; NASCENTE, P.A.P., Characterization of ultra-thin films of Au deposited on Pd(111), painel. In: 20<sup>a</sup> Reunião Anual de Usuários (RAU) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). **Resumos de Trabalhos Científicos**, p. 199. Campinas, SP. Fevereiro, 2010.

PANCOTTI, A.; CARAZOLLE, M.F.; LIMA, L.H.; TALLARICO, D.A.; SIERVO, A.; LANDERS, R.; KLEIMAN, G.G.; NASCENTE, P.A.P., Characterization of ultra-thin films of Au deposited on Pd(111) and Pd on Au(111), palestra convidada. In: FIFTH SAN LUIS SYMPOSIUM ON SURFACES, INTERFACES AND CATALYSIS. **Conference Schedule and Abstracts**, Tu-AM3. Águas de São Pedro – SP. Abril, 2010.

TALLARICO, D.A.; GOBBI, A.L.; GALTAYRIES A.; NASCENTE, P.A.P., XPS study of TiO<sub>x</sub> thin films prepared by magnetron sputtering. In: FIFTH SAN LUIS SYMPOSIUM ON SURFACES, INTERFACES AND CATALYSIS. **Conference Schedule and Abstracts**, P13. Águas de São Pedro – SP. Abril, 2010.

PANCOTTI, A.; NASCENTE, P.A.P.; SIERVO, A.; LIMA, L.H.; CARAZOLLE, M.F.; TALLARICO, D.A.; LANDERS, R.; KLEIMAN, G.G.; Ultra-thin films of Pd



on Au(111) studied by XPS, XAES, LEED, and XPD, oral. In: 18<sup>th</sup> INTERNATIONAL VACUUM CONGRESS. **Abstract, CD.** Beijing – China. Agosto, 2010.

TALLARICO, D.A.; A.L. GOBBI; GALTAYRIES; NASCENTE, P.A.P., Characterization by X-ray photoelectron spectroscopy of TiO<sub>x</sub> thin films prepared by magnetron sputtering, oral. In: IX ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS, SBPMat. **Proceedings, CD.** Ouro Preto – MG. Outubro de 2010.

PANCOTTI, A.; NASCENTE, P.A.P.; SIERVO, A.; LANDERS, R.; CARAZZOLLE, M. F.; TALLARICO, D. A; KLEIMAN, G. G., Characterization of Ultra-Thin Films of Pd Deposited on Au(111). Topics in Catalysis, v. 54, p. 70-76, 2011.

TALLARICO, D.A.; A.L. GOBBI; P.I.P. FILHO; A. GALTAYRIES; NASCENTE P.A.P., Characterization of TiO<sub>2</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ZrO<sub>2</sub>, and Ti<sub>x</sub>Nb<sub>y</sub>Zr<sub>z</sub> Thin Films deposited by Magnetron Sputtering, painel. In: XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE APLICAÇÃO DE VÁCUO NA INDÚSTRIA E CIÊNCIA, CBRAVIC. **Anais do Congresso, CD.** Itajubá – MG. Agosto de 2011.

TALLARICO, D.A.; A.L. GOBBI; P.I.P. FILHO; M.E.H.M. COSTA; GALTAYRIES; NASCENTE, P.A.P., The morphology, chemical composition, and mechanical properties of TiO<sub>2</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ZrO<sub>2</sub>, and Ti<sub>x</sub>Nb<sub>y</sub>Zr<sub>z</sub> thin films deposited by magnetron sputtering on Si (111), painel. In: X ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS. **Proceedings, CD.** Gramado - RS. Setembro, 2011.

TALLARICO, D.A.; A. L. GOBBI; P.I.P. FILHO; A. GALTAYRIES; NASCENTE P. A. P. Surface Characterization of Zr/Ti/Nb Tri-layered Films Deposited by Magnetron Sputtering on Si(111) and Stainless Steel Substrates, oral. In: AVS 58<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND EXHIBITION. **Abstract Book**, p. 25,

**Technical Program**, p. 82. Nashville, Tennessee - Estados Unidos. Outubro, 2011.

TALLARICO, D.A.; GOBBI, A.L.; PAULIN FILHO, P.I.; GALTAYRIES, A.; NASCENTE, P.A.P., Chemical and Morphological Characterization of Zr/Ti/Nb Tri-layered Films Deposited on Si(111) and Stainless Steel Substrates, painel. In: 22 REUNIÃO ANUAL DE USUÁRIOS (RAU) DO LNLS/CNPEM. **Resumos de Trabalhos Científicos**, p. 180. Campinas – SP. Fevereiro, 2012.

TALLARICO, D.A.; GOBBI, A.L.; PAULIN FILHO, P.E.; MAIA DA COSTA, M.E.H.; GALTAYRIES, A.; NASCENTE, P.A.P., Growth and Characterization of Thin Films of Titanium, Zirconium, and Niobium Oxides Deposited on Si(111), painel In: 22 REUNIÃO ANUAL DE USUÁRIOS (RAU) DO LNLS/CNPEM. **Resumos de Trabalhos Científicos**, p. 182. Campinas – SP. Fevereiro, 2012.

Denise A. Tallarico, Angelo L. Gobbi, Pedro I. Paulin Filho, Anouk Galtayries, and Pedro A. P. Nascente. Surface characterization of Zr/Ti/Nb tri-layered films deposited by magnetron sputtering on Si(111) and stainless steel substrates, *Journal of Vacuum Science and Technology A*, v. 30 (5), p. 051505 - 051513, 2012.

## ÍNDICE DE ASSUNTOS

	Pág.
BANCA EXAMINADORA .....	i
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
PUBLICAÇÕES.....	ix
ÍNDICE DE ASSUNTOS.....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxv
DEFINIÇÃO DE TERMOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	xxv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Biomateriais.....	5
2.2 Biocompatibilidade e Requisitos dos Biomateriais .....	5
2.3 O problema de materiais metálicos implantados no corpo humano.....	8
2.4 Biomateriais Metálicos.....	9
2.5 Ligas de titânio.....	11
2.6 Escolha de ligas TiNbZr.....	11
2.7 Nióbio .....	12
2.8 Zircônio .....	13
2.9 Proteínas.....	14
2.9.1 Estrutura geral de proteínas.....	14
2.9.2 Albumina de soro bovino (BSA) .....	16
2.9.3 Fibronectina .....	18
2.9.4 Interações proteína-superfície sólida .....	20
2.9.4.1 Cinética de adsorção .....	22
2.9.4.2 Quantidade adsorvida .....	22
2.9.4.3 Orientação e conformação das proteínas adsorvidas .....	22
TÓPICOS ESPECIAIS.....	24

2.10 Pulverização catódica ou <i>sputtering</i> .....	24
2.10.1 DC Magnetron <i>Sputtering</i> .....	26
2.10.2 <i>Sputtering</i> Reativo.....	26
2.10.3 Potencialidades e aplicações do <i>sputtering</i> .....	27
2.11 Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo – ToF-SIMS.....	29
2.11.1 Obtenção de imagens com ToF-SIMS (microscópio iônico).....	30
2.11.2 Perfis de composição em profundidade com ToF-SIMS.....	31
2.11.3 SIMS dinâmico e SIMS estático.....	31
2.11.4 Potencialidades e aplicações do ToF-SIMS.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1 Deposição dos filmes finos .....	35
3.2 Tratamento térmico .....	36
3.3 Análises dos filmes finos .....	37
3.3.1 Microscopia de Força Atômica .....	37
3.3.2 Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (ToF-SIMS) .....	38
3.3.3 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).....	38
3.3.4 Nanoindentação.....	39
3.3.5 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X.....	39
3.3.6 Adsorção de BSA e Fn sobre as superfícies dos filmes finos.....	40
4 Resultados e Discussão.....	43
4.1 Caracterização Morfológica dos filmes finos sem recobrimento de proteína.....	43
4.1.1 AFM.....	43
4.2 Caracterização química dos filmes finos sem recobrimento de proteína. ....	46
4.2.1 ToF-SIMS.....	46
4.2.2 XPS.....	52
4.3 Medidas da dureza e módulo elástico dos filmes.....	60
4.4 Análises da adsorção de proteínas .....	64
4.4.1 Adsorção de BSA sobre as superfícies dos filmes finos.....	64
4.4.1.1 Análise por ToF-SIMS.....	64
4.4.1.2 Análise por AFM.....	74

4.4.2 Adsorção de F <sub>n</sub> sobre as superfícies dos filmes finos.....	81
4.4.2.1 Análise por ToF-SIMS.....	81
4.4.2.2 Análise por XPS.....	85
4.5 Estudo de uma nova liga de TiNbZr.....	92
4.5.1 Caracterização morfológica dos filmes finos de TiNbZr por AFM.....	92
4.5.2 Caracterização química da superfície dos filmes finos de TiNbZr.....	94
5 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	99
6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	101
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103



## ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 2.1 - Distribuição dos aminoácidos na BSA e na Fn [70].....	20
Tabela 4.1 - Valores das rugosidades e tamanhos de grão para todos os filmes.....	45
Tabela 4.2 - Razões entre as composições atômicas obtidas por XPS para os filmes de Zr/Ti/Nb depositados sobre Si (111) e SS, como depositados, tratados termicamente e após bombardeamento iônico.....	59
Tabela 4.3 - Resultados obtidos por nanoindentação para todos os filmes finos.....	63
Tabela 4.4 - Correspondência entre os aminoácidos e os picos característicos de íons positivos mais intensos obtidos por ToF-SIMS [65].	65
Tabela 4.5 - Propriedades de carga-polaridade dos fragmentos de íons secundários obtidos por ToF-SIMS neste trabalho [101].....	66
Tabela 4.6 - Valores das rugosidades e tamanhos de grão para os filmes.	77
Tabela 4.7 - Taxas atômicas calculadas a partir das intensidades dos picos de alta resolução obtidos por XPS para o C 1s e N 1s para a Fn adsorvida sobre os filmes.....	91
Tabela 4.8 - Valores das rugosidades e tamanhos de grão para os filmes.	94
Tabela 4.9 - Composição (em % atômica) para as ligas de TiNbZr obtida por EDS .....	94
Tabela 4.10 - Razões atômicas (em % atômica) obtida por XPS para os filmes de TiNbZr depositados sobre Si(111) e aço inoxidável .....	97





## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 - Representação de um aminoácido genérico.....	15
Figura 2.2 - Representações dos aminoácidos: (a) glicina e (b) triptofano...	15
Figura 2.3 - Modelo da proteína BSA (a) com resíduos-básicos em preto, resíduos-ácidos em cinza escuro e resíduos-neutros em cinza claro e (b) com a representação dos domínios [adaptado de 62].....	17
Figura 2.4 - Representação esquemática dos módulos e áreas funcionais de um monômero de Fn [adaptado de 69].....	18
Figura 2.5 - Desenho esquemático mostrando as diferentes situações possíveis de ocorrer no alvo durante o processo de <i>sputtering</i> .....	25
Figura 2.6 - À esquerda: vista externa do aparelho de DC Magnetron sputtering utilizado neste trabalho. À direita: vista interna do ânodo do aparelho, onde é possível ver os diversos substratos onde os filmes serão depositados.....	27
Figura 2.7 À esquerda: vista externa do aparelho de ToF-SIMS utilizado neste trabalho. À direita: vista interna da câmara de análise.....	32
Figura 3.1 Filmes finos formados pelo método de sputtering neste trabalho. O primeiro filme é formado por TiO <sub>2</sub> , o segundo é o filme de Zr/Ti/Nb/Si e o terceiro é o filme de Zr/Ti/Nb/SS.....	36
Figura 3.2 - Diagrama do procedimento de tratamento térmico utilizado para os filmes finos de Zr/Ti/Nb/Si(111) e Zr/Ti/Nb/SS produzidos neste trabalho .....	37
Figura 3.3 - Modelo esperado para o recobrimento das superfícies com BSA e Fn.....	41
Figura 4.1 – Imagem 2D obtida no modo não contato para o filme de Ti (500 nm x 500 nm).....	43
Figura 4.2 - Imagem 2D obtida no modo não contato para o filme de Nb (500 nm x 500 nm).....	44
Figura 4.3 - Imagem 2D obtida no modo não contato para o filme de Zr (500 nm x 500 nm).....	44

Figura 4.4 - Imagem 2D obtida no modo não contato para o filme de Zr/Ti/Nb/Si(111) (500 nm x 500 nm).....	45
Figura 4.5 - Imagem 2D obtida no modo não contato para o filme de Zr/Ti/Nb/SS (500 nm x 500 nm).....	45
Figura 4.6 - Perfil de profundidade para os filmes finos de Ti, Nb e Zr depositados sobre Si(111).....	47
Figura 4.7 - Perfil de profundidade para o filme de Zr/Ti/Nb/Si(111): (a) como depositado, (b) após tratamento térmico de 1000°C por 1 h.....	48
Figura 4.8 - Perfil de profundidade para o filme de Zr/Ti/Nb/SS: (a) como depositado, (b) após tratamento térmico de 1000°C por 1 h.....	49
Figura 4.9 - Imagens obtidas por ToF-SIMS das superfícies dos filmes após tratamento térmico de (a) Zr/Ti/Nb/Si(111) e (b) Zr/Ti/Nb/SS.....	50
Figure 4.10 - Perfil de profundidade para o filme de Zr/Ti/Nb/Si(111) após tratamento térmico a 1000°C por 1 h: (a) área homogênea, (b) centro da área redonda mais clara (figura 4.9).....	51
Figura 4.11 - Espectro exploratório de XPS para os filmes finos de (a) Ti, (b) Nb e (c) Zr depositados sobre Si(111).....	52
Figura 4.12 - Espectros de XPS de alta resolução de (a) Ti 2p, (b) Nb 3d e (c) Zr 3d para os filmes de óxidos depositados sobre Si(111).....	53
Figura 4.13 - Espectros de XPS de alta resolução de (a) Zr 3d, (b) Ti 2p e (c) Nb 3d, do filme Zr/Ti/Nb/Si(111) como depositado, e (d) Zr 3d, (e) Ti 2p e (f) Nb 3d, do filme de Zr/Ti/Nb/Si(111) tratado termicamente.....	54
Figura 4.14 - Espectros de XPS de (a) Zr 3d, (b) Ti 2p e (c) Nb 3d, do filme de Zr/Ti/Nb/SS como depositado, e (d) Zr 3d, (e) Ti 2p e (f) Nb 3d, do filme de Zr/Ti/Nb/SS tratado termicamente .....	55
Figura 4.15 - Espectros de XPS de (a)C1s, (b)O1s, (c)Ti2p, (d)Nb3d e (e)Zr3d, para o filme fino de Zr/Ti/Nb/Si(111) tratado termicamente à 1000°C por 1h, antes e depois do bombardeamento iônico com Ar+.....	56
Figura 4.16 - Espectros de XPS de (a) C 1s, (b) O1s, (c) Ti 2p, (d) Nb 3d e (e) Zr 3d, para o filme fino de Zr/Ti/Nb/SS tratado termicamente à 1000°C por 1h, antes (em cima) e depois (em baixo) do bombardeamento iônico com Ar+.....	57
Figura 4.17 - (a) Módulo elástico e (b) dureza para os filmes finos de TiO <sub>2</sub> , Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e ZrO <sub>2</sub> .....	61

Figura 4.18 - (a) Módulo elástico e (b) dureza para os filmes finos de Zr/Ti/Nb depositados sobre silício e sobre aço inoxidável.....	62
Figura 4.19 - Espectros de íons positivos obtidos por ToF-SIMS para o filme fino de TiO <sub>2</sub> após a adsorção de: (a) 20 µg/ml de BSA e (b) 100 µg/ml de BSA .....	66
Figura 4.20 - Espectros de íons positivos obtidos por ToF-SIMS para o filme fino de Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> após a adsorção de: (a) 20 µg/ml e (b) 100 µg/ml de BSA.....	67
Figura 4.21 - Espectros de íons positivos obtidos por ToF-SIMS para o filme fino de ZrO <sub>2</sub> após a adsorção de: (a) 20 µg/ml e (b) 100 µg/ml de BSA .....	68
Figura 4.22 - Espectros de íons positivos obtidos por ToF-SIMS para o filme fino de TiNbZr/SS (tratado termicamente) após a adsorção de (a) 20 µg/ml e (b) 100 µg/ml de BSA .....	69
Figura 4.23 - Detalhe do espectro de íons positivos obtido por ToF-SIMS para o filme fino de TiNbZr/SS após a adsorção de 20 µg/ml de BSA, onde pode ser visto a área de separação entre as diferentes relações (massa atômica)/(carga do íon) detectadas .....	70
Figura 4.24 - Isoterma de adsorção de BSA para o filme fino de TiO <sub>2</sub> .....	71
Figura 4.25 - Isoterma de adsorção de BSA para o filme de Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .....	71
Figura 4.26 - Isoterma de adsorção de BSA pra o filme de ZrO <sub>2</sub> .....	72
Figura 4.27 - Isoterma de adsorção de BSA para o filme de TiNbZr/SS.....	72
Figura 4.28 - Isoterma de adsorção de BSA para todos os filmes analisados.....	73
Figura 4.29 - Micrografias obtidas por AFM no modo não contato da superfície do filme fino de TiO <sub>2</sub> (a) antes e (b) após a deposição de 100 µg/ml de BSA .....	74
Figura 4.30 Micrografias obtidas por AFM no modo não contato da superfície do filme fino de Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (a) antes e (b) depois da deposição de 100 µg/ml de BSA .....	75
Figura 4.31 - Micrografias obtidas por AFM no modo não contato da superfície do filme fino de ZrO <sub>2</sub> (a) antes e (b) depois da deposição de 100µg/ml de BSA .....	76

Figura 4.32 - Micrografias obtidas por AFM no modo não contato da superfície do filme fino de TiNbZr/SS (a) antes e (b) depois da deposição de 100 µg/ml de BSA .....	76
Figura 4.33 - (a) Imagem 2D obtida no modo não contato para a BSA adsorvida sobre o filme de TiO <sub>2</sub> (1 µm x 1 µm). (b) Ampliação da área A selecionada na imagem (a) onde moléculas de BSA podem ser distinguidas (c) imagem lateral de uma molécula de BSA (reta B).....	78
Figura 4.34 - (a) Imagem 2D obtida no modo não contato para a BSA adsorvida sobre o filme de Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (1 µm x 1 µm). (b) Ampliação da área A selecionada na imagem (a) onde moléculas de BSA podem ser distinguidas (c) imagem lateral de uma molécula de BSA (reta B).....	78
Figura 4.35 - Imagem 2D obtida no modo não contato para a BSA adsorvida sobre o filme de ZrO <sub>2</sub> (1 µm x 1 µm) mostrando a não uniformidade do filme de BSA adsorvido.....	79
Figuras 4.36 - (a) Imagem 2D obtida no modo não contato para a BSA adsorvida sobre o filme de ZrO <sub>2</sub> (1 µm x 1 µm). (b) Ampliação da área A selecionada na imagem (a) onde moléculas de BSA podem ser distinguidas (c) imagem lateral de uma molécula de BSA (reta B).....	80
Figura 4.37 - (a) Imagem 2D obtida no modo não contato para a BSA adsorvida sobre o filme de TiNbZr/SS (1 µm x 1 µm). (b) Ampliação da área A selecionada na imagem (a) onde moléculas de BSA podem ser distinguidas (c) imagem lateral de uma molécula de BSA (reta B).....	80
Figura 4.38 - Isoterma de adsorção de Fn para o filme de TiO <sub>2</sub> .....	82
Figura 4.39 - Isoterma de adsorção de Fn para o filme de Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .....	82
Figura 4.40- Isoterma de adsorção de Fn para o filme de ZrO <sub>2</sub> .....	83
Figura 4.41 - Isoterma de adsorção de Fn para o filme de TiNbZr/SS .....	83
Figura 4.42 - Isoterma de adsorção de Fn para todos os filmes analisados	83
Figura 4.43 - Espectro obtido por XPS de N1s para o filme de TiO <sub>2</sub> antes e após o recobrimento com Fn.....	85
Figura 4.44 - Espectro exploratório obtido por XPS do filme fino de TiO <sub>2</sub> após a adsorção de 50 µg/ml de fibronectina por 1h .....	86

Figura 4.45 - Espectro exploratório obtido por XPS do filme fino de Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> após a adsorção de 50 µg/ml de fibronectina por 1h .....	86
Figura 4.46 - Espectro exploratório obtido por XPS do filme fino de ZrO <sub>2</sub> após a adsorção de 50 µg/ml de fibronectina por 1h .....	87
Figura 4.47 - Espectro exploratório obtido por XPS do filme fino de Zr/Ti/Nb/SS após a adsorção de 50 µg/ml de fibronectina por 1h.....	87
Figura 4.48 - Espectros de N1s antes e após o recobrimento com Fn para o filme de ZrO <sub>2</sub> .....	88
Figura 4.49 - Espectros de O 1s do filme de TiO <sub>2</sub> (a) antes da adsorção de Fn, (b) depois da adsorção de 25 µg/ml de Fn e (c) depois da adsorção de 200 µg/ml de Fn.....	89
Figura 4.50 - Espectros de C 1s do filme de TiO <sub>2</sub> antes e após a adsorção de Fn.....	90
Figura 4.51 - Imagens obtidas no modo não contato para o filme de TiNbZr/Si(111) (500 nm x 500 nm) (a) 2D e (b) 3D.....	93
Figura 4.52 - Imagens obtidas no modo não contato para o filme de TiNbZr/SS (500 nm x 500 nm) (a) 2D e (b) 3D.....	93
Figura 4.53 - Espectro exploratório de XPS do filme de TiNbZr/Si(111) .....	95
Figura 4.54 - Espectros de XPS do filme de TiNbZr/Si(111): (a) Ti 2p, (b) Nb 3d e (c) Zr 3d .....	95
Figura 4.55 - Espectro exploratório de XPS do filme de TiNbZr/SS .....	96
Figura 4.56 - Espectros de XPS do filme de TiNbZr/SS: (a) Ti 2p, (b) Nb 3d e (c) Zr 3d .....	97



## LISTA DE ABREVIATURAS (ordem alfabética)

AFM – Microscopia de força atômica.

ToF-SIMS - Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo

XPS – Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X.

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva de raios X

BSA - Albumina de soro bovino

Fn - Fibronectina plasmática humana

MEC - Matriz Extracelular

PBS - Solução salina tamponada com fosfato (0,01M)

Ti cp - Titânio comercialmente puro

## DEFINIÇÃO DE TERMOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

*Citotoxicidade:* é a propriedade nociva de uma substância em relação às células.

*Osseointegração:* conceito introduzido nos anos 70 por Per-Ingvar Brånemark como sendo a ligação direta, estrutural e funcional entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais. Com a introdução desse conceito, as pesquisas passaram a se concentrar em materiais e projetos, visando acelerar a osseointegração, ou seja, diminuir o tempo necessário para a aposição óssea.





## 1 INTRODUÇÃO

De todos os materiais estudados e desenvolvidos para utilização em aplicações biomédicas, os metais continuam sendo os biomateriais mais apropriados para substituição do osso e da cartilagem devido, principalmente, às suas propriedades mecânicas.

Implantes cirúrgicos são normalmente feitos de três tipos de materiais: aços inoxidáveis austeníticos, ligas cobalto-cromo-molibdênio e titânio e suas ligas. A escolha desses metais é baseada em propriedades como estabilidade química e biológica e resistência mecânica.

Quando um biomaterial é implantado, as proteínas adsorvem imediatamente sobre a sua superfície. A resposta do tecido aos materiais implantados surge principalmente das diferenças na adsorção das proteínas que, por sua vez, dependem de parâmetros de superfície, composição química, rugosidade e carga de superfície, entre outras.

Os fenômenos físico-químicos que ocorrem na superfície da interface osso/implante determinam as respostas biológicas após a implantação dos biomateriais e, portanto, são fundamentais para a eficácia do processo de osseointegração. Entretanto, alguns biomateriais com propriedades adequadas (ductilidade, tenacidade à fratura, módulo elástico e resistência à tração, compressão, flexão, fadiga, torção e ao cisalhamento) não possuem um bom desempenho em algumas características de superfície importantes para aplicações clínicas como, por exemplo, a não citotoxicidade e a resistência à corrosão em meio fisiológico.

A resistência à corrosão é uma propriedade importante dos materiais metálicos utilizados em implantes ortopédicos e odontológicos, pois determina a vida útil do dispositivo, mas também é importante por causa da nocividade dos produtos de corrosão, que podem ser liberados e, em seguida, interagir com os organismos vivos.

Dentre os materiais que possuem propriedades adequadas utilizados atualmente, porém apresentam citotoxicidade, podemos citar: as ligas de cobalto-cromo, aços inoxidáveis e ligas titânio-alumínio-vanádio, que geram efeitos adversos no organismo do paciente devido à toxicidade dos íons

liberados. As ligas mais utilizadas atualmente são as de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) e o aço inoxidável AISI 316L, sendo que este último é o mais utilizado no Brasil.

A ampla utilização do aço AISI 316L é devido a uma combinação de facilidade de processamento, propriedades mecânicas adequadas e principalmente baixo custo quando comparado a outros implantes. O sistema único de saúde (SUS) é o maior responsável pela utilização de aço em implantes, pois, enquanto as próteses de aço são fabricadas no Brasil a um preço médio de 1200 reais, as de outros materiais são importadas a um preço médio de 9 mil reais. No entanto, testes comparativos entre o aço inoxidável e as outras ligas utilizadas para este fim, mostraram que a resistência contra a corrosão é menor no aço, sendo mais facilmente atacado pelos fluidos corpóreos, ricos em íons cloreto.

Como a produção e uso dos materiais citados anteriormente já estão bem consolidados, uma opção para a adequação destes materiais é a modificação de suas superfícies por meio da deposição de um filme fino metálico produzido com metais não citotóxicos e que possuam melhor resistência à corrosão em meio fisiológico. Estudos revelaram que existem cinco elementos não citotóxicos: nióbio, zircônio, tântalo, platina e titânio. Destes metais podemos destacar o titânio, nióbio, zircônio e a liga TiNbZr como potenciais candidatos devido à combinação de apropriada biocompatibilidade, propriedades mecânicas adequadas e ótima resistência à corrosão. O bom desempenho em experimentos *in vivo* demonstrado por estes materiais é devido, principalmente, à camada de óxido formada em ar ou em ambiente salino. Como consequência, esta camada de óxido diminui a taxa de corrosão, minimizando a liberação de íons metálicos para o meio biológico e facilitando a osseointegração, levando a uma ótima biocompatibilidade e baixa toxicidade.

Uma técnica de deposição de filmes finos que vem sendo estudada para uso em implantes é a pulverização catódica ou *sputtering*, um processo industrial utilizado com sucesso para estender o tempo de vida útil de componentes industriais e que parece promissor para a área biomédica.

Uma das grandes vantagens deste método é a possibilidade de produzir filmes finos nanoestruturados. Superfícies nanoestruturadas são desejáveis quando se trata da interface osso/implante porque as partículas geradas pelo desgaste natural de implantes nanoestruturados não são imunorreativas, sendo, portanto, menos prejudiciais no corpo humano que as partículas de desgaste de implantes convencionais.

Este trabalho teve como objetivo geral a produção e caracterização de filmes finos dos elementos titânio, nióbio e zircônio e a interação destes com as proteínas albumina de soro bovino (BSA) e fibronectina (Fn) a fim de determinar a viabilidade e potencialidades da aplicação destes filmes finos no recobrimento de implantes.

Objetivos específicos:

- a) Produção de filmes finos nanoestruturados de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$  e da liga TiNbZr, pelo método de *sputtering*,
- b) Avaliação das propriedades químicas, morfológicas e o módulo elástico e a dureza dos filmes produzidos;
- c) Analisar a adsorção da albumina de soro bovino (BSA) e da fibronectina (Fn) sobre as superfícies dos filmes finos.



## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Biomateriais**

Biomaterial é qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintéticas ou naturais, que possa ser utilizada por um período de tempo, completa ou parcialmente, como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo [1]. Os biomateriais devem ajudar a melhorar a qualidade de vida e a longevidade dos seres humanos e para tanto, devem ser isentos de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja: o material deve ser não tóxico, não carcinogênico, não antigênico e não mutagênico.

Quanto ao tipo de material constituinte, os biomateriais podem ser: polímeros, metais, cerâmicas, compósitos ou macromoléculas naturais. Os biomateriais têm uma longa história de mais de dois mil anos. Os primeiros materiais usados para substituir partes humanas perdidas foram feitos de madeira, conchas, ouro, prata, couro e cobre, sem qualquer noção de biocompatibilidade, um termo criado apenas há 50 anos. Desde então, os conceitos de biomaterial e biocompatibilidade têm evoluído continuamente com base no conhecimento e desempenho dos materiais.

### **2.2 Biocompatibilidade e requisitos dos biomateriais**

A biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material ter um desempenho satisfatório quando em contato com o organismo vivo, com resposta apropriada do tecido hospedeiro, numa dada aplicação. Ou seja, o termo biocompatibilidade envolve dois fenômenos associados: o material de implante não pode ser afetado pelo meio fisiológico e o organismo (órgãos e tecidos locais ou distantes) não pode sofrer danos pela presença desse material.

O comportamento funcional de um biomaterial é conhecido como biofuncionalidade e descreve o comportamento do material implantado no organismo. Biofuncionalidade é o conjunto de propriedades que dá a um determinado dispositivo a capacidade de desempenhar uma função desejada, pelo tempo necessário, que pode ser longo, em caso de implante permanente, ou curto, no caso de implante temporário. Ela está relacionada com as propriedades mecânicas, físicas, químicas e biológicas que permitem ao implante o desempenho de sua função. De acordo com a noção de biocompatibilidade, os biomateriais podem ser divididos em quatro classes:

- Os materiais biotoleráveis, que são aqueles materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através da formação de uma camada envoltória do tecido fibroso. Esta camada é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do metal implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formado, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais (caso dos aços inoxidáveis).

- Os materiais bioinertes, que são materiais também tolerados pelo organismo, mas em que a formação do envoltório fibroso é de espessura mínima. O material implantado libera quantidades mínimas de produtos químicos. Os materiais bioinertes mais utilizados são zircônia, alumina, titânio e suas ligas e carbono.

- Os materiais bioativos, que são aqueles materiais nos quais ocorrem ligações químicas entre material de implante e tecido ósseo (osseointegração). Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.

- Os materiais biodegradáveis ou reabsorvíveis, que são materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos biológicos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Seus produtos de degradação são não tóxicos e, portanto são eliminados pelo metabolismo normal do paciente. Esses materiais são bastante úteis em diversas aplicações clínicas, principalmente em implantes temporários, pois se

torna desnecessário uma nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos desses materiais são o fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) e os polímeros: poliácido láctico (PLA) e poliácido glicólico (PGA).

Os biomateriais são utilizados em diferentes aplicações médicas, tais como: implantes, equipamento cirúrgico, membranas de diálise e biosensores. Nestas aplicações, os requisitos mecânicos e de biocompatibilidade variam de aplicação para aplicação. A resistência à corrosão e ao desgaste, por exemplo, é mais importante nos dispositivos implantados por um longo período de tempo (ou para toda a vida) do que nas placas de fixação ortopédica provisória.

A biocompatibilidade, o desempenho dos biomateriais e a resposta dos tecidos vivos à presença de materiais estranhos são influenciados pelas características intrínsecas dos materiais, pelas condições do doente (idade, sexo, estado geral de saúde, estilo de vida, etc.) e pela qualidade das intervenções médicas.

O desempenho dos biomateriais depende, principalmente, das suas propriedades, que podem ser divididas em duas: as propriedades gerais do material e as que são superficiais. Todas elas dependem da composição química, da morfologia e da macro e microporosidade.

Dentre as propriedades importantes para biomateriais metálicos encontram-se: a resistência à tração e compressão e o módulo de elasticidade. O valor do módulo de elasticidade dos ossos varia entre 10 a 40 GPa e é inferior ao valor do módulo de elasticidade dos metais utilizados na produção de implantes. Para estes materiais encontramos valores que variam de 66 GPa (algumas ligas de titânio) a 248 GPa (algumas ligas de Co-Cr). A diferença nos valores dos módulos de elasticidade entre o osso e o material do implante leva a uma transferência incompleta de cargas entre estes, o que acarreta numa reabsorção óssea na área do implante e pode causar dores ou afrouxamento dos implantes, levando a inflamações locais e mesmo a cirurgias de revisão para a troca destes implantes. Por isso, materiais com módulos de elasticidade menores são desejáveis para a produção de implantes.

Quanto às propriedades superficiais mais relevantes, podemos citar a resistência ao desgaste, à corrosão e a não citotoxicidade. Do ponto de vista

do desgaste, é importante que a superfície do implante possua dureza elevada para evitar a liberação no organismo de resíduos de abrasão gerados durante os carregamentos funcionais, pois estes poderão causar inflamações e o afrouxamento do implante. Quanto às propriedades de resistência à corrosão e a não citotoxicidade, estas serão tratadas nas seções seguintes.

### **2.3 O problema de materiais metálicos implantados no corpo humano**

O corpo humano pode ser considerado um ambiente fisicamente e quimicamente pouco hospitaleiro para metais: 37°C, meio salino, altamente oxigenado, pH em torno de 7,4. Além disso, soluções contendo íons cloreto atacam e corroem os metais. A superfície de metal exposta pode sofrer dissolução eletroquímica como resultado do contato com fluidos biológicos (plasma, linfa, sangue, saliva), que contêm íons inorgânicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_n\text{PO}_4^{3-n}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) e compostos orgânicos ácidos ou básicos (aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos). O pH destes fluidos é ligeiramente alcalino, variando 7,15 à 7,4, mas pode cair para 5,2 em um processo inflamatório [2]. O teor de oxigênio que desempenha um papel no processo de corrosão metálica depende da parte do corpo: tomando a composição ambiente do ar como padrão, o teor de oxigênio no líquido intercelular é de 1,25 a 25% deste valor, enquanto nas artérias sanguíneas, chega a 67%.

Devido a estas condições físico-químicas e ao fato de que os implantes permanecem em contato prolongado com o tecido, a resposta do tecido ao implante nem sempre é favorável. Como qualquer metal sólido, um implante pode sofrer corrosão, que gera o desgaste do implante e a liberação de íons metálicos prejudiciais no organismo, o que poderá gerar inflamações. Além disso, a corrosão do implante poderá levá-lo à fratura, sendo então necessária uma cirurgia de revisão para a troca deste.



## 2.4 Biomateriais metálicos

Materiais metálicos são amplamente utilizados como dispositivos biomédicos em instrumentos cirúrgicos e implantes principalmente devido as suas propriedades mecânicas. As propriedades mecânicas mais importantes em biomateriais são as resistências mecânicas (à tração, à compressão, à flexão, à fadiga, à torção, ao cisalhamento), limite de elasticidade, ductilidade e tenacidade à fratura.

Os materiais usados atualmente para implantes incluem o aço inoxidável 316L, ligas cobalto-cromo-molibdênio e titânio e suas ligas. Podemos encontrar esses materiais empregados em instrumentos cirúrgicos, tais como bisturis, em implantes ortopédicos temporários, tais como: pregos, parafusos, porcas, pinos e placas, em implantes de longa duração como: próteses de quadril, joelho, ombro, espinha, cotovelo, pulso, em próteses dentárias e em aplicações cardiovasculares e cardíacas como: marca passos, válvulas cardíacas, comandos para estimuladores elétricos implantáveis, stents, arames guias e suportes para corações artificiais [3-5].

Os materiais metálicos são considerados os menos biocompatíveis de todos os materiais sintéticos, pois são mais susceptíveis a sofrer corrosão no meio fisiológico. Embora se utilizem como biomateriais aqueles metais mais resistentes à corrosão, ainda assim esses metais são corroídos. Outros fatores negativos das ligas metálicas são suas altas densidades e elevados módulos de elasticidade, quando comparados com o tecido ósseo. Porém, embora os metais tenham esses inconvenientes, eles possuem propriedades mecânicas superiores aos outros materiais, são de fácil processamento e relativamente baratos.

Apesar de serem amplamente utilizados na fabricação de implantes, tanto os aços inoxidáveis quanto as ligas de cobalto-cromo-molibdênio apresentam problemas que levaram a necessidade de se encontrar novos materiais para substituí-los. As principais limitações da utilização destas ligas são corrosão e troca iônica. Tanto os aços inoxidáveis quanto as ligas de cobalto-cromo-molibdênio sofrem corrosão *in vivo* e liberam íons do tipo

$\text{Ni}^{2+}$  (caso do aço),  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$ , que podem causar efeitos locais (irritação, inflamação nas áreas adjacentes à interface implante-tecido) e sistêmicos (efeito tóxico sobre o organismo) [6,7], além disso, vários estudos com animais mostraram o potencial carcinogênico da adição de Co [6,7].

O aço inoxidável apresenta um teor mínimo de 12% Cr. Este elemento é a fonte de sua resistência à corrosão. Para estes níveis de Cr, a camada passiva é composta de um filme protetor de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  na interface interna com a liga de metal. Inserido no corpo humano os implantes de aço inoxidável apresentam, no entanto, uma resistência intermediária à corrosão, principalmente por causa do efeito dos íons cloreto contidos nos fluidos biológicos [8]. Alguns estudos revelaram que os íons lixiviados durante a reação de corrosão podem induzir a morte celular [8,9]. É por isso que estes tipos de liga são principalmente utilizados na comunidade biomédica como um biomaterial temporário e não de longo prazo. Em adição, aços 316L e as ligas Co-Cr-Mo possuem um módulo de elasticidade muito mais elevado do que o do osso, com valores entre 200 a 230 GPa frente os 10 a 40 GPa dos ossos, o que implica em transferência insuficiente de esforço ao osso o que pode levar a fratura ou afrouxamento do implante e a sua perda após alguns anos de sua implantação [10].

O titânio tem um módulo de elasticidade intermediário entre o do aço e o do osso e o titânio comercialmente puro não é tão resistente à fadiga quanto certos aços e ligas de titânio. Porém, o titânio é um metal especial dentre os metais leves como alumínio e magnésio por sua elevada razão resistência/peso.

O titânio e suas ligas apresentam pouca interação com o fluido biológico devido à formação de uma camada estável de óxido (que pode ser  $\text{TiO}$ ,  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  ou  $\text{TiO}_2$ ) que cria uma barreira que impede a troca iônica entre o metal e o meio. Esta camada estável se deve a fatores como: alta passividade, espessura controlada, formação e reparação rápidas e resistência ao ataque químico [11]. É esta camada superficial de óxido, que é da ordem de alguns nanômetros de espessura e forma uma película contínua e aderente, que fornece a base de sua biocompatibilidade [3].

O titânio apresenta duas formas alotrópicas em condições de equilíbrio termodinâmico. Acima de 882°C o titânio é cúbico de corpo centrado (CCC), constituindo a fase matriz denominada de fase  $\beta$  e abaixo desta temperatura o titânio apresenta estrutura hexagonal compacta (HC), denominada de fase  $\alpha$ .

## 2.5 Ligas de titânio

As ligas de titânio podem ser classificadas de acordo com a microestrutura formada em temperatura ambiente, sendo estas: ligas do tipo  $\alpha$ , quase  $\alpha$ ,  $\alpha+\beta$ ,  $\beta$  metaestável e  $\beta$  estável. Dessa forma, os elementos de liga adicionados ao titânio podem ser classificados em três categorias [4,5]:

- estabilizadores da fase  $\alpha$ , como o alumínio, oxigênio, nitrogênio e carbono, os quais formam solução sólida intersticial com o titânio;
- estabilizadores da fase  $\beta$ , como o molibdênio, vanádio, cromo, cobalto, nióbio, tântalo, ferro e tungstênio;
- neutros, como o zircônio e o estanho. Embora alguns trabalhos indiquem que a adição de zircônio ajuda na estabilização da fase  $\beta$  na liga TiNbZr [12].

Dentre as ligas de Ti, a liga Ti-6Al-4V (do tipo  $\alpha+\beta$ ) tem sido a principal liga de titânio utilizada como biomaterial [13,14]. No entanto, estudos recentes associaram o vanádio a efeitos citotóxicos e reações adversas nos tecidos [6,12,15], o que favoreceu a realização de novas pesquisas visando novos tipos de ligas para aplicações biomédicas a fim de se obter ligas com características semelhantes (ou melhores) de resistência mecânica, menor módulo de elasticidade, resistência à corrosão, formabilidade e elementos não citotóxicos [15-18].

## 2.6 Escolha de ligas TiNbZr

O uso de elementos não citotóxicos é uma condição necessária para o desenvolvimento de novos materiais para aplicação biomédica. Estudos revelaram que existem cinco elementos não citotóxicos: Nb, Zr, Ta, Pt e Ti [19,20]. Ligas contendo os elementos Nb, Ta e Zr estão sendo cada vez mais estudadas por representarem as ligas mais promissoras. Estas ligas integram uma nova classe de ligas de Ti, sem Al e V e com valores do módulo de elasticidade baixos o suficiente para torná-las atraentes no emprego como biomateriais [18,21-23].

Dentre as novas ligas de titânio desenvolvidas com materiais não citotóxicos, as do tipo  $\beta$  apresentam menores módulos de elasticidade, elevada resistência à corrosão, maior relação resistência/peso e peso específico ligeiramente superior [4,5]. Dentre estas ligas podemos destacar as ligas de TiNbZr que têm recebido considerável atenção nos últimos anos, pois não apresentam citotoxicidade direta ou indireta para as células e apresentam uma boa biocompatibilidade *in vitro* [18].

Apesar de possuírem mais vantagens que desvantagens, as ligas de titânio  $\beta$  ainda têm uma participação inexpressiva no mercado de ligas de titânio, do qual a liga Ti-6Al-4V responde por 65%. As razões para isso são diversas, mas provavelmente inclui o custo relativamente mais elevado e a insuficiência de dados para projetos das ligas de titânio  $\beta$  [24].

## 2.7 Nióbio

Estudos recentes relataram o potencial do nióbio como material para a fabricação de dispositivos biomédicos [25-28]. Ele tem demonstrado possuir boa ductilidade e baixo módulo de elasticidade, além de formar uma camada passiva estável de óxido em meios muito agressivos, impedindo a sua corrosão [29,30].

Seu uso como material de implante tem sido testado tanto como substituto ao vanádio na liga Ti-6Al-4V, quanto sozinho ou associado ao oxigênio ou nitrogênio. Ramírez *et al.* [31] relataram que revestimentos de NbN

e  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  sobre substratos de aço inoxidável podem melhorar a dureza superficial, a resistência à corrosão, a resposta biológica e a biocompatibilidade dos implantes dentários de aço inoxidável. Matsuno *et al.* [32] investigaram a biocompatibilidade e osteogênese de implantes metálicos refratários em tecidos leves e pesados, os resultados demonstraram que a dissolução do Nb não foi detectada em ambos os tecidos e que o tecido em torno do implante estava recuperado após um período de quatro semanas.

Tamilselvi *et al.* [33] realizaram um estudo comparativo do comportamento à corrosão das ligas TiAlNb e TiAlV em soluções simuladas de fluidos corporais e demonstraram que o nióbio aumentou a resistência à corrosão. Okazaki *et al.* [34] compararam as concentrações de metal nos tecidos de tíbia de ratos para os materiais: aço inoxidável 316L, liga CoCrMo, liga TiAlV e a liga TiZrNbTa. Os resultados indicaram que a liga TiZrNbTa possui a menor liberação de íons metálicos sendo a liga mais vantajosa para a utilização de implantes permanentes. Várias outras ligas de Ti contendo Nb foram testadas e os resultados demonstraram que elas possuem boa biocompatibilidade e resistência à corrosão [35-38].

Estudos sobre a resposta biológica das células em contato com nióbio em ligas de TiNbx [39-41] tem demonstrado que o Nb apresenta excelente biocompatibilidade tanto a curto quanto a longo prazo, fornecendo também boa resistência mecânica para as ligas de Ti. Eisenbarth *et al.* [42] testaram amostras de Nb puro cristalino, (Nb cp), mostrando que a atividade de proliferação celular, mitocondrial e volume da célula foram semelhantes e superiores à de amostras de Ti e de aço inoxidável, respectivamente.

## 2.8 Zircônio

Alguns estudos sobre o comportamento biológico dos metais têm demonstrado que o zircônio é semelhante ao titânio tanto quanto a citotoxicidade quanto a biocompatibilidade [43,44]. O bom desempenho *in vivo* de Zr é devido principalmente à presença de uma camada protetora de 2 a

5 nm de óxido formada em ar ou em eletrólitos oxigenados [45,46]. Esta camada diminui a taxa de corrosão, minimizando a liberação de íons metálicos para o meio biológico e facilitando a osseointegração [47-49]. Zircônio e suas ligas também são conhecidos como excelentes biomateriais metálicos porque podem formar uma camada de osso como apatita em suas superfícies quando em meio fisiológico [50,51]. O Zr apresenta alta resistência mecânica, alta tenacidade à fratura e boa resistência à corrosão [45-53].

Evidências *in vivo* indicam que os implantes de Zr e  $ZrO_2$  possuem boa osseointegração [54,55] e estudos comparativos entre implantes de Ti e Zr mostraram que o grau de contato osso-implante é maior para o Zr [56,57]. Zircônio e suas ligas promovem a osseointegração e a sua citotoxicidade é muito baixa, sendo em alguns casos, inferior à relatada para ligas de Ti [49,50]. Yoshimitsu *et al.* [4] em estudo da medida de liberação de íons nas ligas Ti-15Zr-4Nb-4Ta, Ti-6Al-7Nb e Ti-6Al-4V determinaram que tanto a quantidade de (Zr+Nb+Ta) foi consideravelmente inferior à quantidade de (Al+Nb) ou (Al+V), quanto a quantidade de íons Ti liberados foi inferior para a liga Ti-15Zr-4Nb-4Ta [4].

## 2.9 Proteínas

### 2.9.1 Estrutura geral de proteínas

Nesta seção apresentamos algumas propriedades importantes das proteínas. Uma proteína é uma combinação de aminoácidos. Estes são compostos de três partes: um grupo amina ( $NH_2$ ), um grupo carboxila ( $COOH$ ) e um radical (R) (figura 2.1). A diferença entre a estrutura química destes aminoácidos está na sua cadeia lateral (R), como representado na figura 2.2, que varia de um átomo de hidrogênio para a glicina (figura 2.2(a)), às estruturas mais complexas como no triptofano (figura 2.2(b)). Existem vinte aminoácidos comuns, diferenciados pela sua cadeia lateral, que pode ser polar ou apolar e carregada positivamente, negativamente ou neutra.

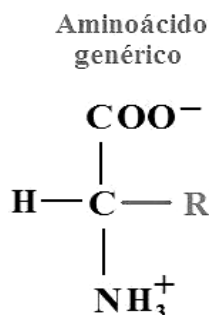


Figura 2.1 Representação de um aminoácido genérico.

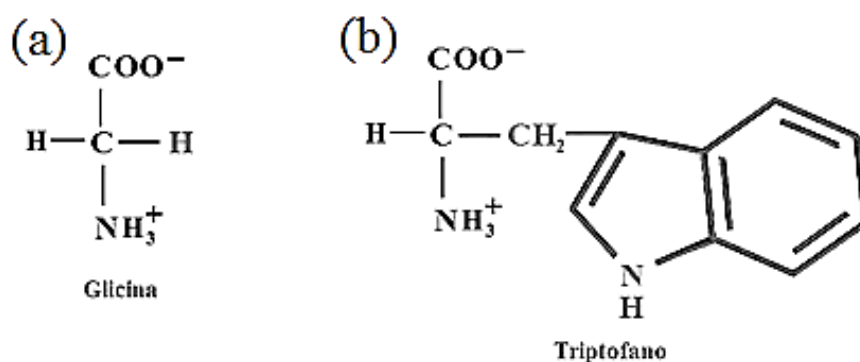


Figura 2.2 Representações dos aminoácidos: (a) glicina e (b) triptofano.

Falamos de proteína quando pelo menos 100 aminoácidos estão ligados entre si. Ao longo da estrutura da proteína os aminoácidos são dispostos em uma forma definida. Este conjunto, chamado de estrutura primária, é diferente para cada proteína. O peso molecular das proteínas varia entre poucos kilodaltons (kDa) a muitas centenas de kilodaltons.

O radical dos aminoácidos lhes dá diferentes propriedades físico-químicas, das quais podemos destacar: hidrofobicidade/hidrofilicidade e caráter ácido-base. O radical de certos aminoácidos também tem grupos cuja carga depende do pH. Estas propriedades dos aminoácidos permite que eles interajam uns com os outros levando as cadeias a se dobrarem para adotar uma estrutura tridimensional.

As proteínas são geralmente classificadas em dois grupos de acordo com a sua forma (o que depende de sua estrutura):

- proteínas globulares

Estas proteínas são compactas e esféricas. São geralmente solúveis em água e estão envolvidas em todos os processos celulares. Um exemplo deste tipo de proteína é a albumina.

- proteínas fibrosas

Essas proteínas têm uma forma estendida e são pouco solúveis em água. Elas possuem uma função biológica estrutural e/ou adesiva, fornecendo suporte mecânico para os tecidos e/ou permitindo a ligação entre a célula e componentes da matriz extracelular. Um exemplo deste tipo de proteína é a fibronectina (Fn).

### 2.9.2 Albumina de soro bovino (BSA)

A BSA possui uma sequência de aminoácidos próxima (estrutura primária 75% idêntica) ao da albumina humana (HSA) e alguns aminoácidos que diferem entre as duas proteínas têm propriedades (carga, hidrofobicidade/hidrofilicidade) semelhantes, o que sugere que essas duas proteínas adotam estruturas tridimensionais muito semelhantes [58]. Esta semelhança permite que se adote o uso da BSA para estudar o comportamento da HSA. Os parágrafos a seguir contêm a descrição da albumina humana e as propriedades consideradas comuns a ambas as proteínas.

A albumina de soro humana (HSA) é a proteína existente em maior quantidade no plasma sanguíneo numa concentração aproximada de 40 mg/mL [59]. Ela é produzida no fígado (entre 9 e 12 gramas diários) e tem como principais funções o transporte de materiais e a regulação da pressão osmótica sanguínea [60]. Além do plasma, a albumina encontra-se ainda nos tecidos musculares e na pele [60]. HSA é uma proteína globular constituída pela sequência de 585 aminoácidos, cujas proporções são apresentadas na Tabela 2.1, o que lhe confere um peso molecular próximo de 66,43 kDa [59,61].



A estrutura terciária da albumina, no estado sólido, é composta por três domínios estruturais homólogos (designados por I, II e III) com certo grau de liberdade de movimento entre si, e cada um destes está subdividido em dois subdomínios (figura 2.3(b)) [60]. O pH médio da carga global da proteína - o seu ponto isoelétrico em solução aquosa a 25°C - é entre 4,7 e 4,9. Em pHs neutros a albumina revela uma carga total negativa [61].

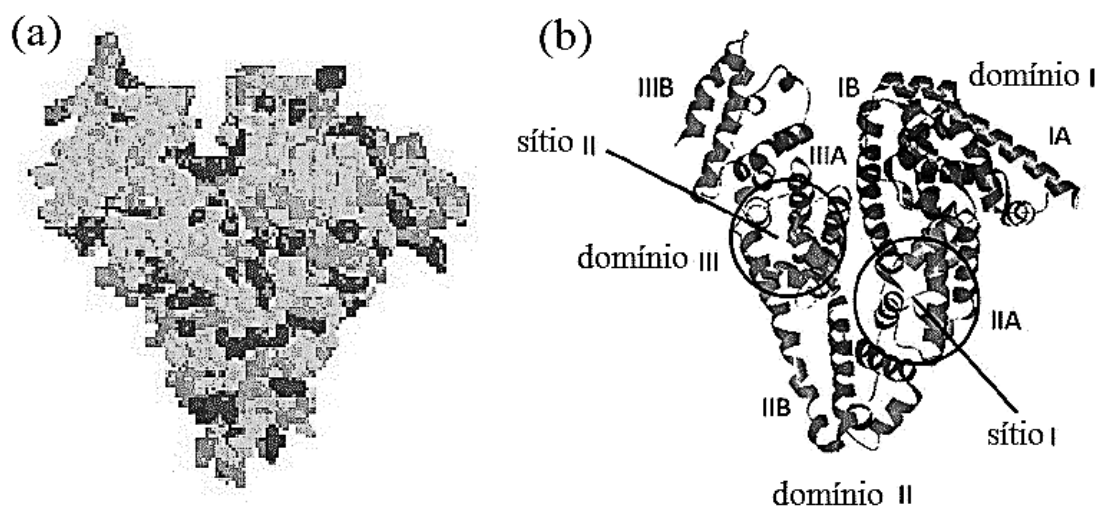


Figura 2.3 Modelo da proteína BSA (a) com resíduos básicos em preto, ácidos em cinza escuro e neutros em cinza claro e (b) com a representação dos domínios [adaptado de 62].

A imobilização desta proteína pode ser usada para minimizar a interação entre a superfície dos biomateriais e o tecido, reduzido as respostas inflamatórias ao material implantado [63,64]. Em testes *in vitro* a albumina demonstrou comportamento não trombogênico, tendo pouca afinidade com as plaquetas sanguíneas, evitando assim a formação de coágulos nas superfícies recobertas com esta proteína. Logo, um material metálico com alta afinidade com a albumina apresentará propriedades compatíveis com aplicações cardiovasculares, onde a interação com plaquetas não é desejável, como marca-passos, stents e válvulas cardíacas.

### 2.9.3 Fibronectina

A fibronectina é uma glicoproteína que existe em duas formas: abundante na forma globular no plasma sanguíneo (300 g/l), sendo produzida principalmente pelas células do fígado, ou transformada em uma forma fibrosa não solúvel na matriz extracelular (MEC) quando secretada por outras células (fibroblastos, condrócitos) [65-67]. A Fn é um dímero em forma de V de cerca de 440 kDa. Ambos os monômeros, quase idênticos, estão ligados covalentemente por duas pontes dissulfeto. Cada monômero, de 60 nm de comprimento e 2-3 nm de diâmetro, consiste em cerca de 2450 aminoácidos cujas proporções são apresentadas na Tabela 2.1. A densidade de Fn em solução aquosa é estimada em  $1,37 \text{ g/cm}^3$  [68]. O ponto isoelétrico, em solução aquosa a  $25^\circ\text{C}$ , da Fn é entre 5,5 e 6,3 [68]. Isto indica que, para valores de pH acima dessa faixa, a Fn terá uma carga global negativa. A fibronectina está envolvida em muitos processos celulares (adesão, migração, proliferação, diferenciação) e possui sítios de reconhecimento para as células (figura 2.4).

Um monômero de fibronectina aparece como uma haste que repete três tipos de aminoácidos homólogos, chamados de módulos (tipo I, II, III), tem uma estrutura bastante rígida e são conectados por sequências curtas flexíveis (Figura 2.4). Os módulos mantêm a sua conformação, mesmo quando isolados uns dos outros, mas a forma operacional da proteína dependerá da interação entre os módulos adjacentes. A Fn possui um sítio de ligação com a integrina (região RGD na figura 2.4) que são proteínas presentes nas membranas externas e internas das células e por isso podem conectar a Fn ao citoesqueleto das células. A fibronectina participa também da organização da matriz extracelular, pois apresenta sítios de fixação a outros componentes da MEC, como o colágeno e a heparina.

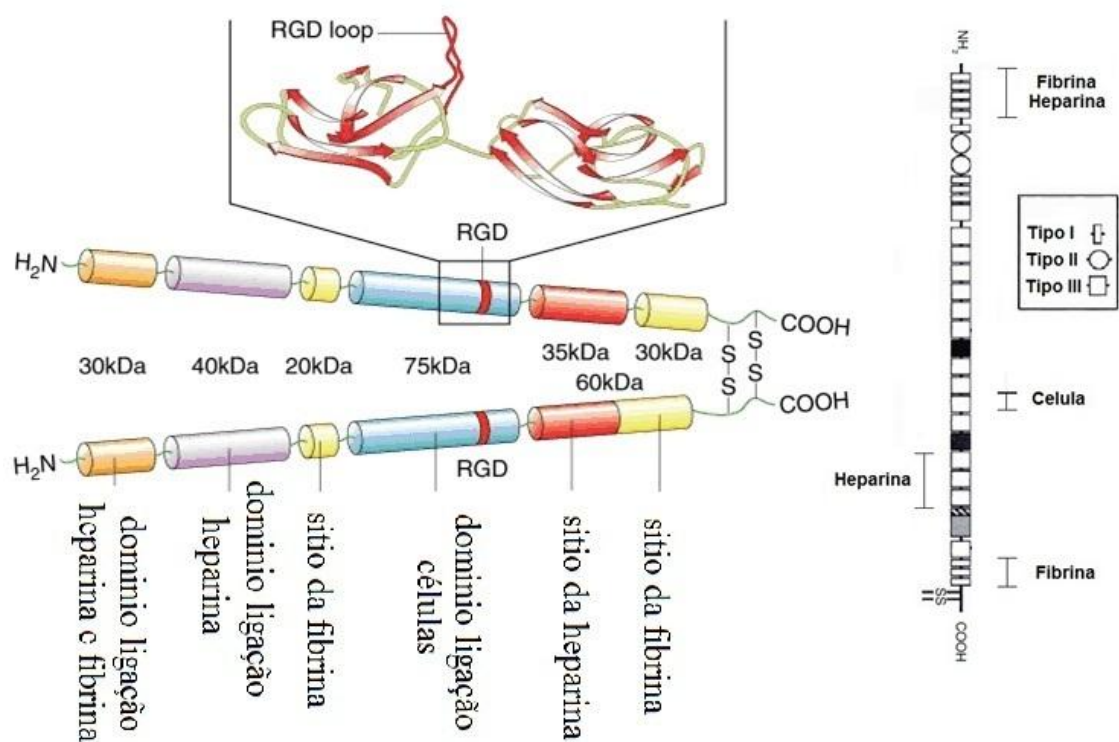


Figura 2.4 Representação esquemática dos módulos e áreas funcionais de um monômero de Fn [adaptado de 69].

Devido aos sítios de ligação que a fibronectina possui, em especial o sítio de ligação com as integrinas, a adesão da fibronectina sobre a superfície de um biomaterial pode promover a migração e adesão celular. Após esta etapa, as células aderidas irão se diferenciar em osteoblastos e formar tecido ósseo em contato com o implante, promovendo a osseointegração. Ou seja, a alta afinidade entre a superfície do implante e a Fn pode levar a osseointegração do implante, o que é muito desejável em aplicações ortopédicas e odontológicas.

Tabela 2.1 Distribuição dos aminoácidos na BSA e na Fn [70].

Aminoácidos	% aminoácidos	
	Fn	BSA
Alanina	4,15	7,91
Arginina	5,30	4,28
Aspargina	4,42	2,31
Acido aspártico	4,68	6,75
Cisteína	2,74	5,77
Glutamina	5,56	3,46
Acido glutâmico	5,96	9,55
Glicina	8,17	2,80
Histidina	2,03	2,63
Isoleucina	4,77	2,47
Leucina	5,39	10,71
Lisina	3,36	9,88
Metionina	1,06	0,82
Fenilalanina	2,03	4,94
Prolina	7,81	4,61
Serina	7,95	4,80
Teonina	10,68	5,27
Triptofano	1,68	0,49
Tirosina	4,15	3,46
Valina	8,12	6,26

#### 2.9.4 Interações proteína-superfície sólida

No contexto biomédico a adsorção de proteínas em uma superfície sólida é um fenômeno importante, notadamente para a biocompatibilidade dos implantes. Este evento ocorre logo após a inserção do material e determina a resposta celular. As células irão efetivamente interagir com esta camada de proteína em detrimento da superfície externa do implante. Conseqüentemente, o conhecimento dos mecanismos de adsorção de proteínas em superfícies sólidas é importante para se ter um melhor controle/previsão da resposta biológica ao implante.

As moléculas de proteínas são transportadas para a superfície por meio de mecanismos de transporte, como a difusão ou a convecção. A concentração na solução e o tamanho das moléculas de proteína são fatores que influenciam o transporte para a superfície. Uma vez presentes, as moléculas na interface líquido/sólido podem interagir com a superfície através de forças como as interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas ou de transferência de carga (transferência de elétron).

De acordo com Norde *et al.* [71], a adsorção de proteínas é controlada principalmente por três parâmetros:

- o estado de hidratação das proteínas e das superfícies,
- as mudanças na conformação da proteína e,
- a distribuição de cargas na interface proteína-superfície.

A água é um solvente polar e interage mais com as superfícies hidrofílicas do que com as superfícies hidrofóbicas. Assim, o movimento das moléculas de água sobre uma superfície hidrofílica é uma barreira de energia desfavorável à adsorção de proteínas [71].

Em solução, as cargas globais da proteína e da superfície são moduladas pelo pH. A superfície é carregada negativamente quando o pH é superior ao seu ponto isoelétrico e carregada positivamente quando o pH é inferior. A presença de íons em solução (por exemplo,  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ ) leva à formação de uma camada iônica sobre as moléculas de proteínas e sobre a superfície carregada. São as cargas globais da proteína e da superfície que parecem ter a maior influência sobre as interações eletrostáticas [72].

Uma proteína estável ("hard") passa por poucas mudanças estruturais e não é capaz de se adsorver sobre uma superfície hidrofílica na presença de atração eletrostática (cargas opostas). Uma proteína mais flexível ("soft"), como a BSA e a Fn, pode sofrer mudanças conformacionais e ser adsorvida. Uma redução de sua estrutura ordenada (estrutura secundária) pode levar a um ganho entrópico suficiente para permitir a sua adsorção sobre uma superfície hidrofílica, apesar de condições eletrostáticas desfavoráveis [72].

Após o seu contato com a superfície, as moléculas de proteína podem se estender (relaxamento) e assim criar outros sítios de ligação com a superfície. Porém, algumas proteínas não sofrem mudanças conformacionais e mantêm a forma adotada em solução (forma nativa).

#### 2.9.4.1 Cinética de adsorção

A cinética de adsorção de uma proteína é um indicativo da reatividade da proteína para a superfície. A adsorção da albumina e da fibronectina seguem duas fases: uma fase rápida, limitada pelo transporte das moléculas para a superfície, e uma fase mais lenta em que podem ocorrer rearranjos da camada de proteína [73].

#### 2.9.4.2 Quantidade adsorvida

As quantidades de albumina e de fibronectina adsorvidas dependem das condições experimentais (propriedades da superfície sólida, propriedade da solução de proteína) e também pode variar dependendo do método de medição utilizado [74,75]. Um aumento na concentração destas proteínas em solução geralmente induz a uma maior quantidade adsorvida [76-81]. Alguns autores têm demonstrado que a adsorção tanto de albumina quanto de Fn alcança um platô após certa concentração [82], porém, esta propriedade não tem sido sempre observada [80,82,83].

#### 2.9.4.3 Orientação e conformação das proteínas adsorvidas

A conformação é a forma adotada por uma proteína. Para uma dada conformação, a proteína pode se orientar diferentemente na superfície. A

espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (ToF-SIMS) pode ser usada para se obter informações sobre a direção e/ou conformação das proteínas adsorvidas. Esta técnica é adequada para a caracterização de filmes protéicos adsorvidos devido a sua especificidade química e sensibilidade à superfície. A ToF-SIMS analisa uma espessura entre 1 e 2 nm da superfície da amostra, este valor é geralmente inferior à dimensão da proteína (que pode chegar a 40 nm), mas permite a detecção de mudanças na orientação e/ou conformação.

A albumina e a fibronectina sofrem alterações estruturais durante a adsorção (ou tempo de imersão da superfície sólida na solução de proteína) [84,85]. Mudanças conformacionais de altura (mudança na direção perpendicular à superfície) têm sido relatadas [85]. A fibronectina adsorvida adota uma forma compacta em uma solução com concentração baixa de íons e uma forma mais alongada em concentrações mais altas. No entanto, um limiar de concentração de íons ainda não foi definido [74].

Norde *et. al.* [86], estudaram as alterações conformacionais na BSA provocadas pela adsorção e concluíram que em silício (superfície hidrofílica), ou após dessorção desta superfície, a proteína mantém a sua estrutura conformacional, enquanto que a adsorção em polietileno (superfície hidrofóbica) provoca alterações permanentes.

Geralmente considera-se que as proteínas globulares, como a BSA, apresentam maior afinidade para superfícies hidrofóbicas uma vez que a interação entre a parte hidrofóbica da proteína e da superfície é suficiente para expulsar as moléculas de água situadas junto da superfície. Numa superfície hidrofílica existe forte afinidade entre a superfície e a água adsorvida, dificultando a adsorção da proteína. No entanto, a adesão da BSA não depende apenas da hidrofobicidade da superfície como demonstrou Wang *et. al.* [87] no estudo em que obtiveram forças superiores de adesão da BSA a uma superfície hidrofílica, comparativamente a outras superfícies hidrofóbicas. Estes resultados comprovam que existem outras forças além da hidrofóbica, como a eletrostática e de Van der Waals, com influência no processo de adsorção.

## TÓPICOS ESPECIAIS

Esta seção apresentará de forma sucinta os princípios de funcionamento e as potencialidades e aplicações das técnicas de *sputtering* e ToF-SIMS utilizadas neste trabalho.

### 2.10 Pulverização catódica ou *sputtering*

A pulverização catódica consiste no processo de ejeção de elétrons de um alvo e sua deposição sobre um substrato. Dessa forma o filme formado é crescido átomo a átomo, permitindo a formação de filmes de espessuras e composições variáveis, que dependem dos parâmetros de deposição. Existem inúmeros modos de se obter o processo de pulverização catódica (*sputtering*) e o modelo mais simples é o da deposição por corrente direta (DC ou *sputtering* diódico ou catódico). Este método consiste em gerar um campo elétrico que será aplicado entre dois eletrodos. Nesse sistema, uma descarga é estabelecida em um gás inerte (argônio ou xenônio) a uma pressão de  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  Pa e uma voltagem de vários quilovolts. O material a sofrer *sputtering* (alvo) é usado como um cátodo e o substrato sobre o qual o filme irá se depositar é colocado sobre o ânodo do sistema.

Os íons positivos do gás, criados pela descarga, são acelerados na direção do alvo e chegam com aproximadamente a mesma velocidade que ganharam na região de saída do cátodo. Sob o bombardeamento dos íons, o material é removido do alvo principalmente na forma de átomos neutros e alguma parte na forma de íons (figura 2.5). Os componentes condensam-se sobre as áreas vizinhas e, conseqüentemente, sobre o substrato localizado no ânodo.

Durante este processo, os elétrons gerados irão colidir com átomos neutros, causando a ionização destes e a geração de íons e mais elétrons



livres. Esta reação em cadeia torna o sistema autossustentável e contínuo, o que acaba gerando o plasma.

A dimensão das partículas envolvidas é importante para garantir a eficiência desse processo, pois uma partícula muito pequena, como um elétron, por exemplo, não garantiria que o momento transferido aos átomos do material que constituem o alvo fosse suficiente para ocorrer o desbaste do alvo, e por consequência, a deposição do filme no substrato. Se a partícula incidente for muito grande, devido ao seu volume poderá fazer com que não ocorra a interação entre átomos ou moléculas da superfície que está sendo bombardeada. A dimensão ideal neste processo é a dimensão atômica e os gases envolvidos funcionam perfeitamente como partículas incidentes no alvo por terem o tamanho e dimensões adequados. Por ser uma técnica de colisões em nível atômico, o processo pode ser comparado a um jogo de bilhar atômico, uma vez que possui mecânica semelhante ao processo de espalhamento.

A utilização de um gás nobre ou inerte no processo se faz necessária para que não ocorram reações químicas entre as partículas incidentes no material que compõe o alvo. Normalmente, utiliza-se argônio como gás nobre devido à facilidade de encontrá-lo de forma pura na natureza.

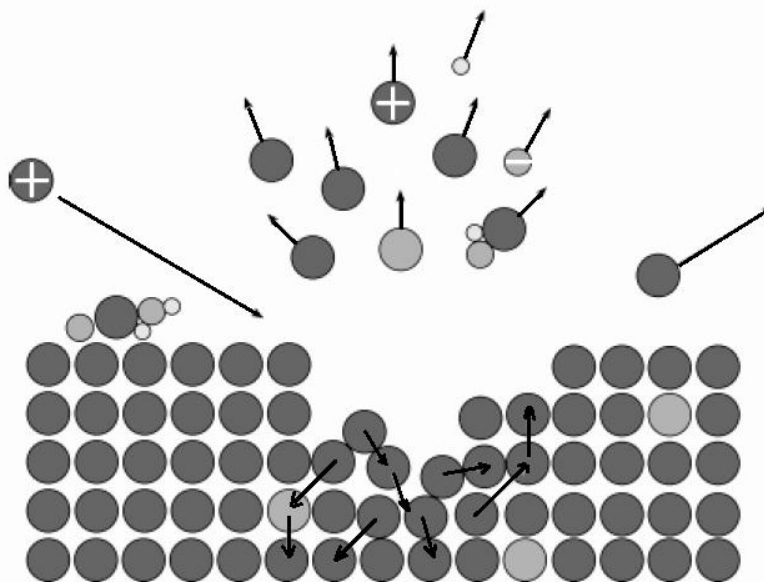


Figura 2.5 Desenho esquemático mostrando as diferentes possíveis situações que podem ocorrer no alvo durante o processo de *sputtering*.

### 2.10.1 DC Magnetron *Sputtering*

Este método utiliza ímãs para a criação de um campo magnético. Com o campo magnético gerado, o plasma sustenta-se com pressões mais baixas, aumentando o livre caminho médio dos íons do plasma. Com isso as partículas presentes no processo incidem com maior energia sobre o alvo, aumentando a taxa de *sputtering* e, por conseguinte, a taxa de deposição do átomo ejetado do alvo no substrato.

Este campo magnético ainda evita que os elétrons causem a neutralização dos íons incidentes no alvo e facilita a criação de íons através do impacto dos elétrons com átomos neutros que se localizavam perto do alvo. A presença do campo magnético permite ainda que se opere o sistema com diferenças de potenciais mais baixos tornando mais seguro o sistema de deposição.

O controle adequado dos parâmetros de deposição influencia diretamente nas propriedades dos filmes, proporcionando assim uma deposição de filmes homogêneos, reprodutíveis e livres de contaminantes, com boa adesão e com controle de espessura.

### 2.10.2 *Sputtering* Reativo

Pode-se descrever o processo de *sputtering* reativo como sendo a deposição de filmes finos formados pelo material do alvo e a mistura de gás reativo com gás inerte (usualmente argônio) presente na atmosfera da câmara de vácuo durante o processo de deposição.

Podem ser citados como exemplos de materiais formados a partir do processo de *sputtering* reativo, compostos como: óxidos, nitretos, carbetos, sulfetos, oxinitretos e oxicarbeto.

Para a formação de filmes de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e  $\text{ZrO}_2$  é necessário incorporar na atmosfera de trabalho o oxigênio. O oxigênio é um gás altamente reativo e a presença deste no plasma resulta na formação do óxido no alvo. A

figura 2.6 apresenta o sistema de *sputtering* utilizado neste trabalho para a deposição dos filmes finos. A descrição dos parâmetros utilizados está disponível na seção 3.1.



Figura 2.6 À esquerda: vista externa do aparelho de DC Magnetron *sputtering* utilizado neste trabalho. À direita: vista interna do ânodo do aparelho, onde é possível ver os diversos substratos de aço onde os filmes de TiNbZr foram posteriormente depositados.

### 2.10.3 Potencialidades e aplicações do *sputtering*

O método de *sputtering* possibilita a deposição de filmes com alta qualidade de praticamente qualquer tipo de material. Dentre as potencialidades deste método podemos citar:

- possibilita a modificação apenas da superfície dos materiais sem alterar suas propriedades de volume;

- a composição do filme crescido por *sputtering* corresponde com a composição do alvo, ou seja, nenhuma fração se perde durante a formação da camada;

- permite a obtenção de ligas ou compostos depositados sem mudança de composição, em grandes áreas, e com alta uniformidade de composição e espessura;

- permite alta densidade de nucleação (grãos de cristais de dimensões menores) e a obtenção de fases metaestáveis, não possíveis por outros métodos de deposição;

- permite a deposição de filmes de ligas metálicas a partir de alvos multicomponentes, com manutenção da composição;

- permite a deposição de multicamadas com a utilização de alvos múltiplos;

- permite uma deposição uniforme sobre grandes áreas pela utilização de alvos de diâmetro grande;

- permite o controle preciso da espessura pelo controle dos parâmetros do processo;

- permite o controle das propriedades dos filmes como cobertura de degrau e estrutura de grão.

Dentre as atuais utilizações do método de *sputtering* podemos citar a produção de: filmes para recobrimento ótico, filmes metálicos refletivos (Cr, Al, Ag, etc), filmes dielétricos anti-refletivos ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{MgO}$ , etc), filmes para gravações magnéticas (Fe-Al-Si, Co-Cr, Fe-Ni-Mo, etc), filmes metálicos condutores para mecanismos semicondutores (Ti/Au, Ti/Pt/Au, Cr/Au, Ni-Cr, etc), filmes condutores elétricos transparentes (In-Sn-O,  $\text{InO}_2$ ,  $\text{SnO}_2$ , etc), filmes para grades de difração (C/W), filmes para recobrimento de ferramentas resistentes a erosão e corrosão (TiN, CrN,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiB}_2$ , etc) e na produção de filmes decorativos (ligas de Cr, ligas de Cu, TiN, TiC, ZrN, etc).

## 2.11 Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo – ToF-SIMS

A espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo é uma técnica de análise de superfícies utilizada para obter informações químicas sobre superfícies (SIMS estático) ou ao longo de perfis de composição (SIMS dinâmico) bem como para detectar impurezas em concentrações da ordem de ppm em materiais, podendo detectar todos os elementos incluindo o hidrogênio e sendo capaz de discriminar entre isótopos do mesmo elemento.

Este aparelho separa íons pela razão massa/carga ( $m/z$ ) em uma região livre de campo após estes serem acelerados por uma voltagem. Ele utiliza o fato de que íons com a mesma energia translacional inicial e diferente  $m/z$  levam tempos diferentes para atravessar uma dada distância em uma região livre de campo para fazer a identificação de íons e isótopos.

O espectrômetro ToF-SIMS recorre a um feixe primário pulsado de íons para retirar e ionizar espécies químicas de uma superfície. Os íons secundários resultantes são acelerados para um espectrômetro de massa, no qual as suas massas são analisadas por meio da medição do tempo de voo entre a superfície e o detector. Estes sistemas permitem fundamentalmente três modos de trabalho analítico:

- A aquisição de espectros de massa para determinar as espécies elementares e moleculares da superfície (exemplo figura 4.19);

- A aquisição de imagens para visualizar a distribuição de espécie na superfície (é gerada uma imagem à medida que um feixe iônico finamente focado varre sequencialmente a superfície), neste trabalho temos como exemplo desta utilização a figura 4.9;

- A obtenção de perfis de composição para determinar as variações de composição química em função da distância da superfície (exemplo figura 4.6).

Dado que o aparelho ToF-SIMS recolhe o espectro em método de detecção paralela (análise simultânea de todos os íons emitidos), é recolhida a totalidade do espectro de massa para cada ponto da superfície examinada.

Assim podem ser utilizados o espectro de massa e a imagem de íons secundários (quando o equipamento dispõe do microscópio iônico) para determinar a composição química e distribuição dos vários constituintes de uma amostra.

A ToF-SIMS permite a caracterização da composição química, bem como a caracterização da distribuição espacial das várias espécies químicas (imagens de distribuição) e o perfil de distribuição para caracterização de superfícies, proteínas e filmes finos.

Neste método são analisadas uma ou duas monocamadas atômicas. A expulsão de material da superfície é causada pela cascata de colisões iniciada pelo impacto dos íons primários na superfície da amostra. Os íons secundários emitidos pela superfície bombardeada são capturados no analisador de tempo de voo devido a uma elevada diferença de potencial entre a amostra e o analisador.

Os íons secundários são gerados, utilizando uma fonte pulsada de íons primários com pulso  $< 1$  ns. Os íons secundários percorrem o analisador ToF a velocidades distintas, dependendo da respectiva relação massa e carga ( $E=mv^2/2$ ). Obtém-se assim um espectro medindo os tempos de chegada dos íons secundários ao detector e fazendo uma conversão simples de tempo para massa.

### **2.11.1 Obtenção de imagens com ToF-SIMS (microscópio iônico)**

As imagens “químicas” são geradas através da coleção dos espectros de massa em cada ponto da superfície (correspondente a cada pixel da imagem) à medida que o feixe primário efetua o varrimento da superfície da amostra. Estas imagens constituem um verdadeiro mapa da distribuição superficial de espécie química de interesse.

### 2.11.2 Perfis de composição em profundidade com ToF-SIMS

A ToF-SIMS permite também fazer perfis de composição (como na figura 4.6). Um canhão de íons (o aparelho utilizado neste trabalho utiliza o  $\text{Cs}^+$ ) operando em modo de feixe de intensidade constante remove material, e a mesma fonte de íons ou outra (o aparelho utilizado neste trabalho utiliza o  $\text{Bi}^+$ ) é utilizada para a fase de aquisição do espectro.

Este método de funcionamento permite adquirir a informação simultânea de todos os elementos, com elevada resolução de massa.

### 2.11.3 SIMS dinâmico e SIMS estático

Dado que os íons secundários são ou positivos ou negativos, há dois modos de operar com SIMS:  $\text{SIMS}^+$  e  $\text{SIMS}^-$ , que em geral são utilizados separadamente.

O D-SIMS (SIMS dinâmico) detecta vestígios de impurezas com uma sensibilidade superior a 1 ppb. A fonte de íons do SIMS permite obter um feixe focado de íons com diâmetro inferior a 1 micrometro. Em modo D-SIMS, o feixe varre sequencialmente a amostra, arrancando lentamente íons da superfície. Uma análise é feita simultaneamente no centro da área erodida reproduzindo os perfis de composição.

Se o feixe de íons primários for controlado de modo que seja reduzido o dano causado à superfície analisada, a técnica é considerada como não-destrutiva, ao contrário do que acontece com D-SIMS. Este modo de operação é designado por SIMS estático (S-SIMS).

A figura 2.7 mostra o aparelho de ToF-SIMS utilizado neste trabalho. A descrição dos parâmetros utilizados está disponível na seção 3.3.2.

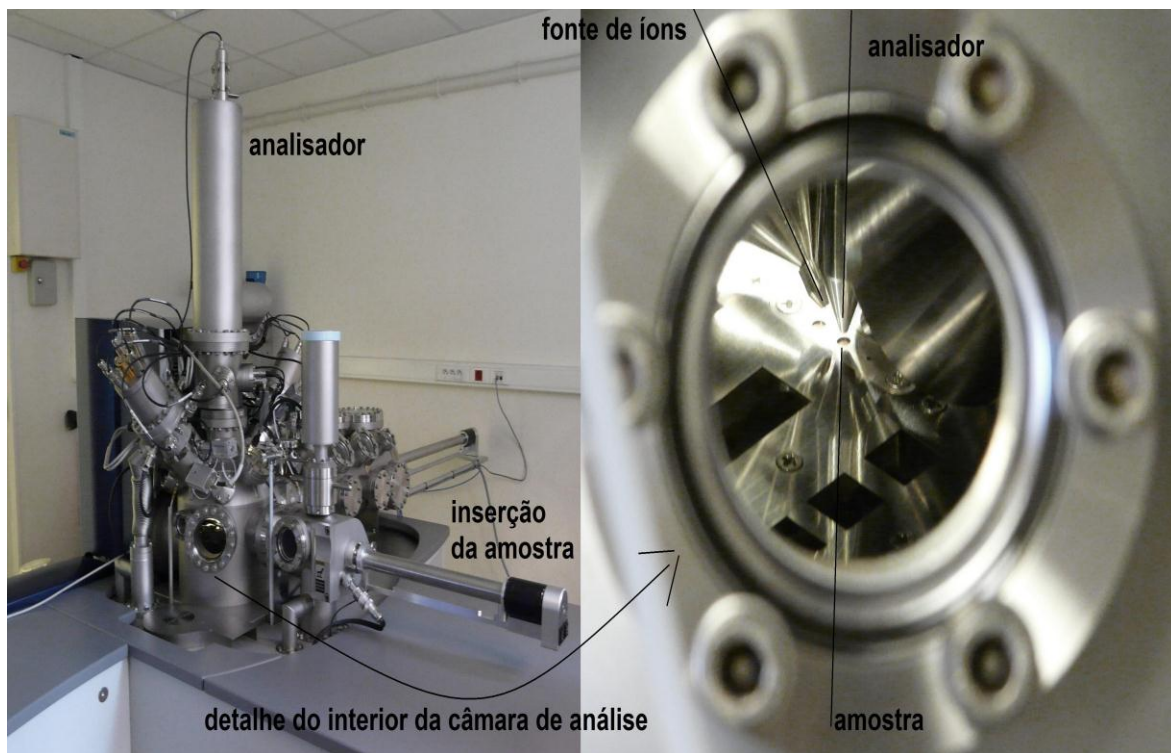


Figura 2.7 À esquerda: vista externa do aparelho de ToF-SIMS utilizado neste trabalho. À direita: vista interna da câmara de análise.

#### 2.11.4 Potencialidades e aplicações da ToF-SIMS

Esta técnica permite a análise de todos os elementos e isótopos deste  $Z=1$  até  $Z=103$ , bem como moléculas e fragmentos entre 2-300 u.m.a. Além de poder ser aplicada tanto em materiais condutores, quanto em materiais isolantes.

Ela utiliza analisadores com detectores de tempo de voo quadripolares que detectam íons positivos e negativos, até 300 u.m.a. e dispõe de uma fonte de íons primários com resolução lateral de feixe de  $\sim 1 \mu\text{m}$ .

A ToF-SIMS possui uma área de análise que pode ser da ordem de alguns  $\text{mm}^2$  até uma área substancialmente menor, apenas limitada pela resolução lateral fixada pelo diâmetro mínimo do feixe de íons. Além disso, a análise realizada por D-SIMS pode ser muito rápida: 30s/mapa.



Dentre os muitos exemplos de aplicação da análise por ToF-SIMS, podemos citar:

- Análise de contaminação superficial em metais;
- Análise de cadeias poliméricas na identificação de proteínas;
- Detecção de camadas de ligação débil em tintas e adesivos;
- Estudo de processos de limpeza e ataque de superfícies;
- Estudo de processos de produção de filmes por vaporização;
- Análise de segregações de superfície;
- Corrosão;
- Marcação com isótopos;
- Determinação da presença de dopantes em semicondutores;
- Análise da extensão de *crosslinking* em polímeros.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Deposição dos filmes finos

A deposição dos filmes por DC *magnetron sputtering* foi realizada no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas, Brasil.

Os filmes finos dos óxidos de Ti, Nb e Zr foram depositados sobre substratos de Si(111) por pulverização magnética catódica a partir de alvos dos elementos puros (pureza de 99,9%, diâmetro de 6 mm e espessura de 3 mm). Os substratos foram mecanicamente fixados ao cátodo do sistema convencional de *DC magnetron sputtering* (Balzers BA510) e uma mistura de 20% vol. de oxigênio e 80% vol. de argônio (99,999% de pureza) foi utilizada como gás de *sputtering*. A separação alvo-substrato foi de 0,26 m. Os filmes foram depositados nas condições de  $4 \times 10^{-5}$  Pa de base de pressão de vácuo e de 150 W de potência do catodo. A espessura dos filmes foi de 500 nm.

Para a produção dos filmes finos da liga TiNbZr foi utilizado o mesmo aparelho (figura 2.6) que depositou os filmes de óxidos. Como este aparelho não permite a deposição simultânea dos elementos da liga, a deposição foi feita em camadas e seguida de tratamento térmico para a homogeneização. Esses filmes foram depositados em substratos de Si(111) e de aço inoxidável 316L (SS) sobre as seguintes condições: os substratos foram mecanicamente fixados ao catodo do sistema convencional e gás argônio (99,999% de pureza) foi utilizado como gás de *sputtering*. A separação alvo-substrato foi de 0,260 m e os filmes foram depositados nas condições de 120 W de potência do catodo e de  $2 \times 10^{-5}$  Pa de pressão de base de vácuo.

A deposição dos filmes seguiu a seguinte sequência: uma camada de 100 nm de espessura de Nb foi depositada sobre o substrato (Si(111) ou SS) em seguida, uma camada de 200 nm de Ti foi depositada sobre o filme de Nb e por último uma camada de 50 nm de Zr foi depositada sobre Ti/Nb/substrato. A espessura final do filme tricamada foi de 350 nm em ambos os substratos. A determinação da espessura das camadas foi baseada na composição

esperada da liga: Ti30Nb15Zr % at. A ordem da deposição foi embasada por trabalhos que mostraram que o nióbio, quando aquecido, se difunde preferencialmente para a superfície e o zircônio se difunde preferencialmente para o volume [88,89], bem como em trabalhos que mostraram que entre o nióbio e o zircônio, este último possui maior afinidade com o silício e forma na interface filme/substrato, após tratamento térmico, o composto  $Zr_5Si_4$  [90,91].

A figura 3.1 mostra os filmes de  $TiO_2$ , Zr/Ti/Nb/Si e Zr/Ti/Nb/SS produzidos neste trabalho. Como pode ser observado na figura, o substrato de silício possui a dimensão de  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  e o de SS possui a de  $1 \times 1,5 \text{ cm}^2$ . A espessura de ambos os substratos é de 1mm.

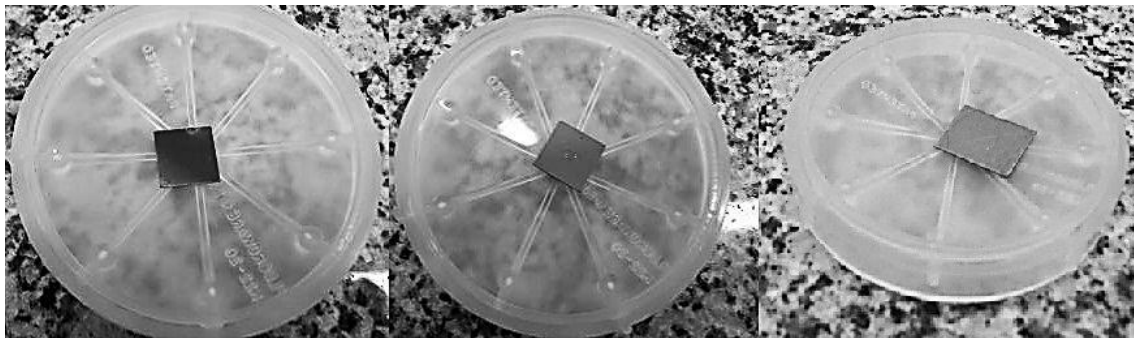


Figura 3.1 Filmes finos formados pelo método de *sputtering* neste trabalho. O primeiro filme é formado por  $TiO_2$ , o segundo é o filme de Zr/Ti/Nb/Si(111) e o terceiro é o filme de Zr/Ti/Nb/SS.

### 3.2 Tratamento térmico

A fim de causar uma difusão entre as camadas do filme de Zr/Ti/Nb as amostras destes filmes depositadas sobre Si(111) e sobre SS foram encapsuladas em ampolas de quartzo e fechada sob ar. Em seguida, foram tratadas a  $1000^\circ\text{C}$  (temperatura comumente utilizada para atingir a transformação de fase  $\beta$  na liga de titânio).

Para evitar qualquer choque térmico, as amostras foram colocadas em forno frio, o qual foi aquecido com rampa de aquecimento suficiente para atingir a temperatura desejada em 3h. As amostras foram mantidas a  $1000^\circ\text{C}$  por 1h

(figura 3.2) e após este período permaneceram no forno para que resfriassem até a temperatura ambiente. O resfriamento foi monitorado e durou cerca de 2,5 horas. As amostras foram removidas 10 horas após o término deste processo.

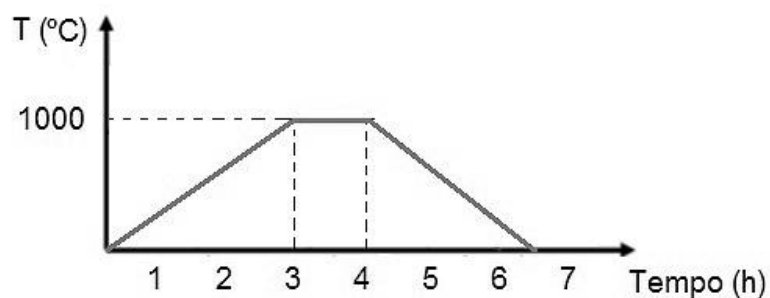


Figura 3.2 Diagrama do procedimento de tratamento térmico utilizado para os filmes finos de Zr/Ti/Nb/Si(111) e Zr/Ti/Nb/SS produzidos neste trabalho.

O tratamento térmico dos filmes foi realizado nos equipamentos instalados no Laboratório de Físico-Química de Superfícies da Escola Nacional Superior de Química de Paris (ENSCP) em Paris, França.

### 3.3 Análises dos filmes finos

#### 3.3.1 Microscopia de Força Atômica

A morfologia e a rugosidade das superfícies dos filmes finos foram determinadas utilizando um microscópio de força atômica comercial (MultiMode 8 Bruker AXS) instalado no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) no DEMa da UFSCar. O instrumento foi operado em modo de contato intermitente e foram obtidas imagens de áreas de  $500 \times 500 \text{ nm}^2$  e  $1 \times 1 \text{ }\mu\text{m}^2$ . Por meio do programa NanoScopeAnalysis foi possível obter os valores de tamanho de grão e da rugosidade média (Ra).

### 3.3.2 Espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (ToF-SIMS)

A composição química das superfícies e as distribuições químicas do perfil das amostras foram determinadas utilizando a técnica ToF-SIMS. As análises por ToF-SIMS foram realizadas no espectrômetro TOF-SIMS V (ION-TOF GmbH) instalado no Laboratório de Físico-Química de Superfícies da Escola Nacional Superior de Química de Paris (ENSCP) em Paris, França.

As análises foram realizadas com a seguinte configuração: a câmara de análise foi mantida em menos de  $5 \times 10^{-7}$  Pa em condições de operação, o fluxo de íons primária total foi inferior a  $10^{12}$  íons  $\times$   $\text{cm}^{-2}$  para garantir condições estáticas. Para o feixe de análise foi usado um feixe pulsado de íon primário de  $\text{Bi}^+$  (Ion Gun Liquid Metal, LMIG), com energia de 25 keV e corrente de cerca de 1 pA sobre uma área de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ . Os valores exatos da massa de pelo menos seis espécies conhecidas, a partir de  $\text{H}^-$ ,  $\text{C}^-$ ,  $\text{O}^-$ ,  $\text{C}^{2-}$ ,  $\text{C}^{3-}$  e  $\text{Cl}^-$ , foram utilizadas para a calibração dos dados adquiridos no modo de íons negativos. A erosão iônica foi realizada utilizando 2 keV de um feixe de íons de  $\text{Cs}^+$  com uma corrente de 90 nA sobre uma área de  $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ . A aquisição dos dados e as análises foram realizadas utilizando o programa comercial IonSpec ©.

### 3.3.3 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

As análises de XPS foram realizadas sob ultra-alto vácuo ( $10^{-7}$  Pa) empregando um espectrômetro Thermo Electron ESCALAB 250 com uma fonte monocromática de raios X de Al  $K\alpha$  ( $h\nu = 1486,6$  eV) instalado no Laboratório de Físico-Química de Superfícies da Escola Nacional Superior de Química de Paris (ENSCP) em Paris, França.

O espectrômetro foi calibrado com as energias de ligação de referência (BEs) das amostras de Cu (Cu  $2p_{3/2}$  a 932,6 eV), Ag (Ag  $3d_{5/2}$  a 368,2 eV) e Au (Au  $4f_{7/2}$  a 84,0 eV). A área analisada teve um diâmetro de cerca de 500  $\mu\text{m}$ .

Além do espectro exploratório, foram obtidos também os espectros de alta resolução de: C 1s, O 1s, Ti 2p, Nb 3d e Zr 3d com um ângulo de 90°. Os efeitos de carregamento eletrostático na superfície foram minimizados utilizando-se o pico de C 1s (do carbono adventício do ambiente rico em hidrocarbonetos) como padrão a uma energia de ligação de 285 eV. As análises dos dados foram realizadas empregando-se o programa CasaXPS ©. A erosão iônica realizada nas amostras com tratamento térmico foi feita com íons de argônio numa área de 2 x 2 mm<sup>2</sup> (pressão parcial de 8 x 10<sup>-5</sup> Pa).

#### 3.3.4 Nanoindentação

Os ensaios de nanoindentação foram feitos empregando-se um nanoindentador TriboIndenter (Hysitron, Inc.) instalado no Departamento de Física, no Laboratório de Revestimentos Protetores e Materiais Nanoestruturados da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio) no Rio de Janeiro, Brasil. Cada amostra foi testada em temperatura ambiente e as medições foram feitas em profundidades de penetração extremamente pequenas utilizando um penetrador triangular piramidal Berkovich de diamante. A análise estatística dos valores obtidos com a sequência de nanoindentações permitiu obter os valores da dureza (H) e do módulo elástico (E). Para eliminar qualquer influência do substrato nos valores obtidos para os filmes finos, a faixa de penetração do penetrador foi limitada a uma profundidade menor do que 0,3 d, onde d é a espessura do filme analisado.

#### 3.3.5 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

As medidas por EDS foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura de alta resolução, FEG XL30, Phillips, equipado com EDS (Oxford), marca Link, modelo ISIS, instalado no Laboratório de Caracterização Estrutural

(LCE) no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brasil. As amostras foram recobertas com ouro e análises químicas pontuais foram realizadas em três diferentes ângulos para cada amostra. Como todas se apresentaram uniformes independentemente do ângulo, um ângulo foi fixado e cinco áreas diferentes na superfície de cada amostra foram analisadas a fim de se obter um erro associado.

### 3.3.6 Adsorção de BSA e Fn sobre as superfícies dos filmes finos

A deposição das proteínas sobre as superfícies das amostras foi feita em condições próximas às fisiológicas (pH 7,4 e 37°C) e realizada nos equipamentos instalados no Laboratório de Físico-Química de Superfícies da Escola Nacional Superior de Química de Paris (ENSCP) em Paris, França. Para as deposições, duas proteínas foram utilizadas: a albumina de soro bovino e a fibronectina.

A BSA foi fornecida pela empresa Sigma-Aldrich. A proteína utilizada possui um peso molecular de 66 kg/mol (66 kDa) e pureza de 98%. Primeiramente ela foi dissolvida em água ultrapura (2 g/L) para a formação da solução estoque. Esta solução estoque foi então diluída para a obtenção de diferentes concentrações de BSA. A fim de se aproximar das condições fisiológicas, a solução estoque foi diluída em uma solução tampão fosfato-salino (PBS - phosphate buffered saline), constituída de 0,01 M de fosfato, de 0,0027 M de KCl e de 0,137 M de NaCl. Este tampão possui um pH de 7,4 e foi fornecido pela Sigma-Aldrich. Foram utilizadas neste trabalho as concentrações de 20 µg/ml e 100 µg/ml de BSA armazenadas a 4°C.

A fibronectina foi fornecida pela empresa Roche Diagnostics com um peso molecular de 440 kDa e uma pureza superior a 95%. Esta proteína foi primeiramente dissolvida em água ultrapura (1 g/l). Após 2 h sem agitação à temperatura ambiente a solução foi homogeneizada. Esta solução inicial foi armazenada a 4°C. As demais soluções foram obtidas pela diluição desta



solução em PBS. Foram obtidas as seguintes concentrações de Fn: 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  e 200  $\mu\text{g/ml}$ .

Para cada série de concentração foi repetido o mesmo procedimento: a superfície do filme fino foi completamente recoberta pela solução de proteína e levada a uma estufa de temperatura constante de 37°C por 1 h (para reprodução da temperatura corpórea humana). Após este tempo o filme fino foi retirado da estufa e verificou-se que o líquido sobre o filme tinha evaporado. Este filme foi então colocado à temperatura ambiente e sua superfície recebeu uma quantidade de PBS suficiente para recobrir todo o filme fino (a fim de remover a proteína não adsorvida) que ficou em contato com a superfície por 10 min. Em seguida, todo o líquido foi retirado com a ajuda de uma pipeta. Então, nova solução de PBS foi adicionada à superfície e deixada em contato por 10 min. Este procedimento foi realizado três vezes para cada filme fino analisado. As amostras secas foram guardadas ao abrigo da luz e em temperatura ambiente controlada (27°C).

A figura 3.3 representa o modelo esperado do filme de  $\text{TiO}_2$  (a) antes e (b) após o recobrimento com uma proteína. Este modelo é o esperado para todos os filmes finos produzidos neste trabalho e para as duas proteínas depositadas.

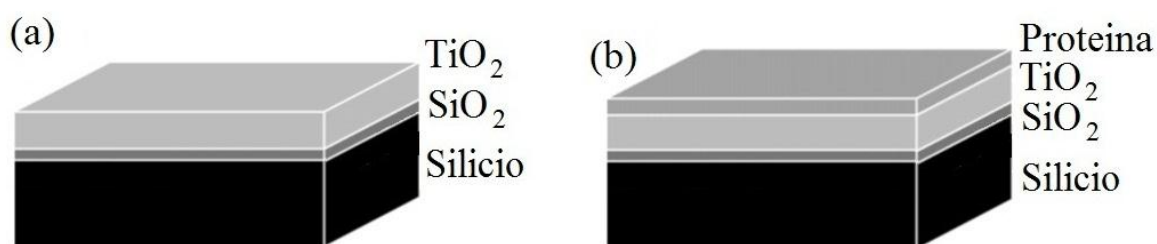


Figura 3.3. Modelo esperado para o recobrimento das superfícies com BSA e Fn.



## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Caracterização Morfológica dos filmes finos sem recobrimento com proteína

#### 4.1.1 AFM

A morfologia das superfícies dos filmes de Ti, Nb e Zr e dos filmes de Zr/Ti/Nb depositados sobre os substratos de Si(111) e de SS foram caracterizadas por AFM e as imagens podem ser vistas nas figuras 4.1 a 4.5 respectivamente. Nessas figuras é possível observar a baixa rugosidade e os tamanhos nanométricos dos grãos. A análise das imagens por meio de um programa específico forneceu os valores da rugosidade (Ra) e do tamanho de grão dos filmes. Estes dados estão apresentados na tabela 4.1.

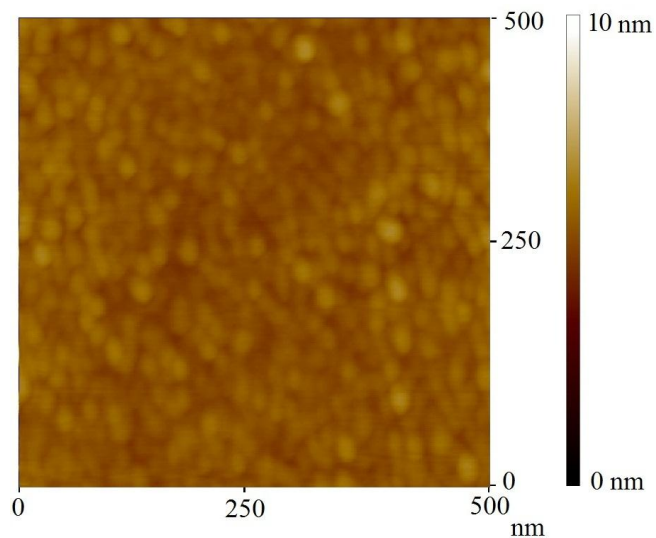


Figura 4.1 Imagem 2D obtida no modo não contato para o filme de Ti (500 nm x 500 nm).

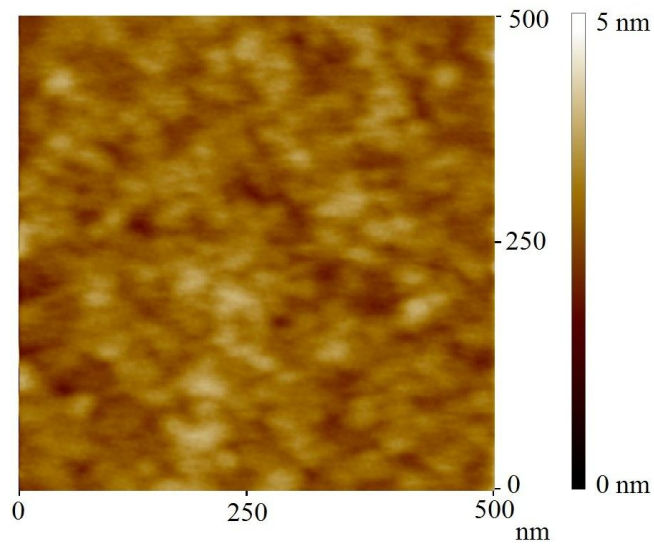


Figura 4.2 Imagem 2D obtida no modo não contato para o filme de Nb (500 nm x 500 nm).

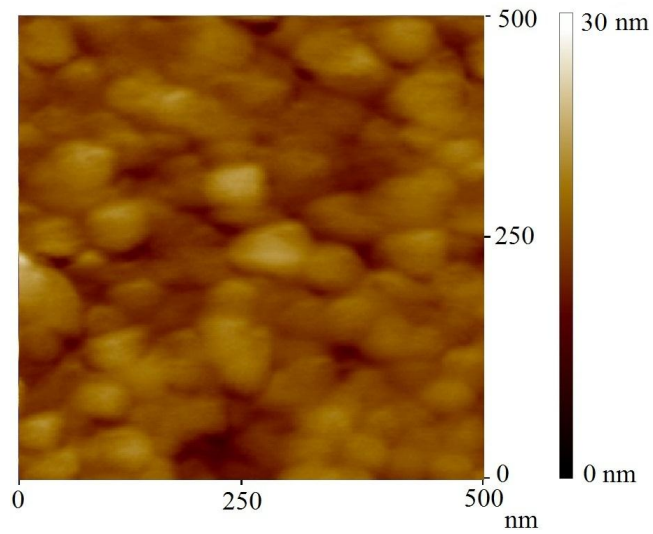


Figura 4.3 Imagem 2D obtida no modo não contato para o filme de Zr (500 nm x 500 nm).

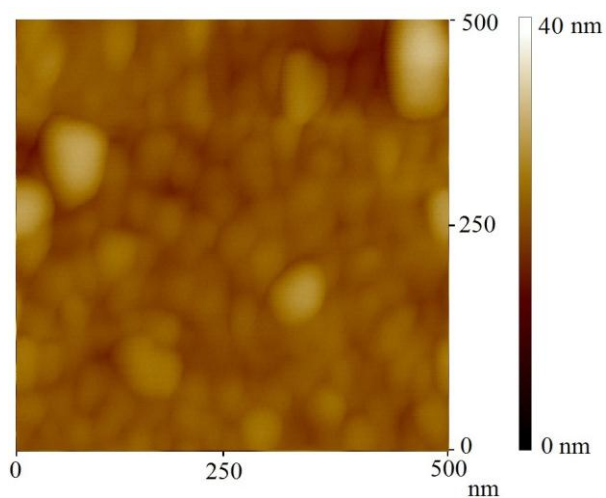


Figura 4.4 Imagem 2D obtida no modo não contato para o filme de Zr/Ti/Nb/Si(111) (500 nm x 500 nm).

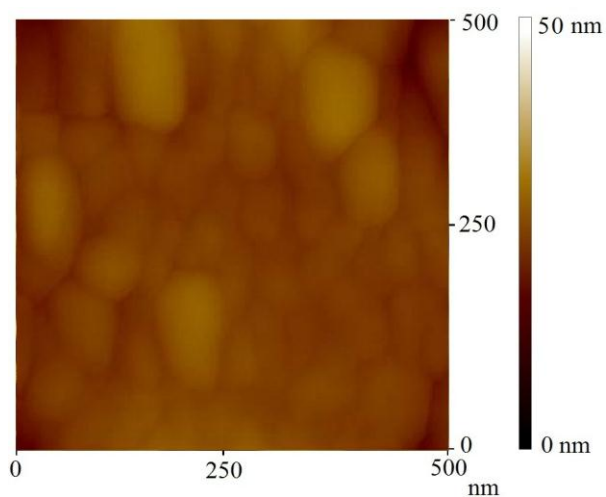


Figura 4.5 Imagem 2D obtida no modo não contato para o filme de Zr/Ti/Nb/SS (500 nm x 500 nm).

Tabela 4.1 Valores das rugosidades e tamanhos de grão para todos os filmes.

Filme fino	Rugosidade - Ra (nm)	Tamanho de grão (nm)
Ti	$0,21 \pm 0,01$	$17 \pm 1$
Nb	$0,17 \pm 0,04$	$13 \pm 2$
Zr	$1,10 \pm 0,02$	$35 \pm 3$
Zr/Ti/Nb/Si	$1,5 \pm 0,1$	$28 \pm 1$
Zr/Ti/Nb/SS	$3,8 \pm 0,2$	$31 \pm 5$

A diferença observada nos valores da rugosidade para as ligas de Zr/Ti/Nb (linhas 4 e 5 da tabela 4.1) é devida a influência do substrato. A rugosidade inicial do substrato de SS (7,6 nm) era maior do que a rugosidade do Si (0,6 nm) e por isso os filmes apresentaram rugosidade diferentes, mesmo tendo sido depositados sobre as mesmas condições.

De acordo com os valores observados na tabela 4.1, todos os filmes apresentaram tamanhos de grão nanoestruturados. O filme de Zr/Ti/Nb depositado sobre aço foi o filme que apresentou a maior rugosidade e tamanho de grão similar ao do filme de ZrO<sub>2</sub>. Existem poucos dados na literatura para rugosidades e tamanhos de grão tão pequenos a fim de que possamos fazer uma comparação, no entanto, alguns estudos tem demonstrado que materiais nanoestruturados feitos a partir de Ti cp, Ti-6Al-4V, Co-Cr e biomateriais cerâmicos, como alumina, titânia e hidroxiapatita, apresentam aumento de adesão de células quando comparados a materiais convencionais [92,93]. Nesses materiais cerâmicos, quando o tamanho de grão foi reduzido de 167 nm para 24 nm, a adesão dos osteoblastos aumentou 51% e a adesão de fibroblastos responsáveis pelo encapsulamento foi reduzido em 235%.

Para aplicações ortopédicas, estudos demonstraram que superfícies nanoestruturadas possuem maior afinidade com os osteoblastos, favorecendo a formação dos ossos a partir das células em contato com os implantes [94,95].

## **4.2 Caracterização química dos filmes finos sem recobrimento de proteína**

### **4.2.1 ToF-SIMS**

A figura 4.6 apresenta o perfil de profundidade de íons negativos para os filmes finos de (a) Ti, (b) Nb e (c) Zr. Todos os filmes estão completamente oxidados e duas regiões principais podem ser identificadas. A primeira, correspondente ao filme de óxido formado, e a segunda corresponde ao substrato de Si(111). No perfil de profundidade para o filme de titânio, figura 4.6(a), é possível identificar dois óxidos principais: TiO<sup>-</sup> e TiO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Para a área

superficial, o que corresponde aos primeiros 15 segundos no eixo horizontal do gráfico, houve uma predominância de  $\text{TiO}_2$ . Esta foi a área analisada por XPS. Os segundos seguintes (até 1500 s aproximadamente) descrevem o volume do filme, onde o sinal para o  $\text{TiO}^-$  foi aproximadamente 67% maior do que para o  $\text{TiO}_2^-$ . A figura 4.6(b) mostra o perfil de profundidade do filme de Nb, onde é possível identificar dois óxidos principais:  $\text{NbO}_2^-$  e  $\text{NbO}^-$ . O sinal para o  $\text{NbO}^-$  representa apenas 11% do sinal total para o filme de Nb.

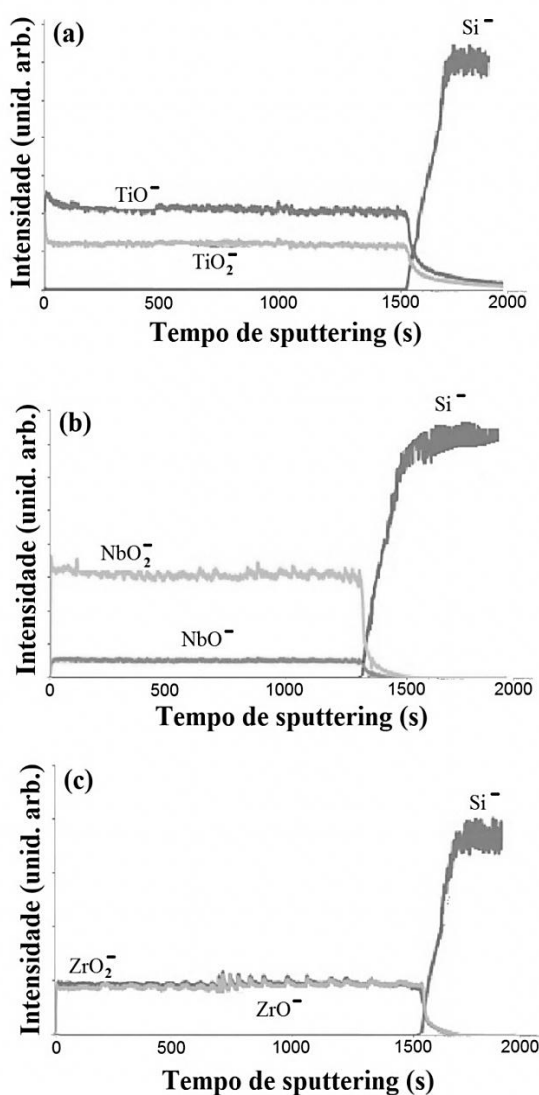


Figura 4.6 Perfil de profundidade para os filmes finos de Ti, Nb e Zr depositados sobre Si(111).

O perfil de profundidade para o filme de zircônio, figura 4.6(c), apresentou-se muito uniforme, com a mesma intensidade de sinal para os

óxidos  $ZrO^-$  e  $ZrO_2^-$ . A predominância do óxido  $ZrO_2^-$  foi observada somente na superfície (primeiros 15 segundos iniciais na área do gráfico), área esta analisada também por XPS.

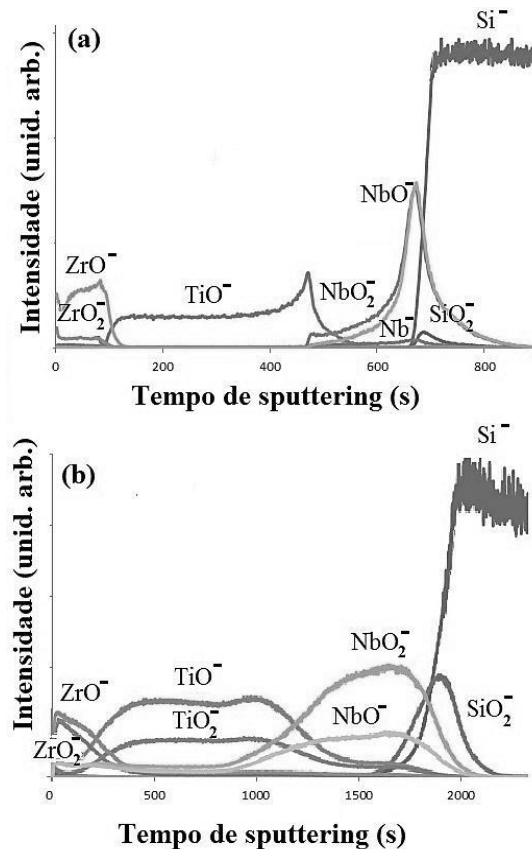


Figura 4.7 Perfil de profundidade para o filme de Zr/Ti/Nb/Si(111): (a) como depositado, (b) após tratamento térmico de 1000°C por 1 h.

A figura 4.7(a) apresenta o perfil de profundidade obtido por ToF-SIMS no modo negativo para o filme fino de Zr/Ti/Nb sobre Si(111). Três principais regiões podem ser identificadas: uma primeira região rica em  $ZrO^-$  e  $ZrO_2^-$ , seguida por uma região rica em  $TiO^-$  e uma terceira região formada por  $NbO_2^-$ ,  $NbO^-$  e  $Nb^-$  metálico. O filme formado sobre o silício apresentou três camadas distintas seguindo a sequência de deposição. Apenas uma pequena sobreposição de elementos pode ser observada nas interfaces entre os metais e entre o Nb e o substrato.



A figura 4.7(b) apresenta o perfil de profundidade para o filme Zr/Ti/Nb/Si(111) após o tratamento térmico. Como esperado, o tratamento térmico causou algumas mudanças na composição das camadas: predominantemente metálicas antes do tratamento, as camadas estão agora realmente oxidadas: os sinais de  $ZrO^-$  e  $ZrO_2^-$  possuem a mesma intensidade, descrevendo toda a camada inicial.  $TiO^-$  e  $TiO_2^-$  descrevem a camada intermediária dominada por titânio e os sinais de  $NbO^-$  e  $NbO_2^-$  descrevem a camada dominada por nióbio. Uma maior sobreposição de elementos entre as camadas de Zr/Ti/Nb pode ser observada.

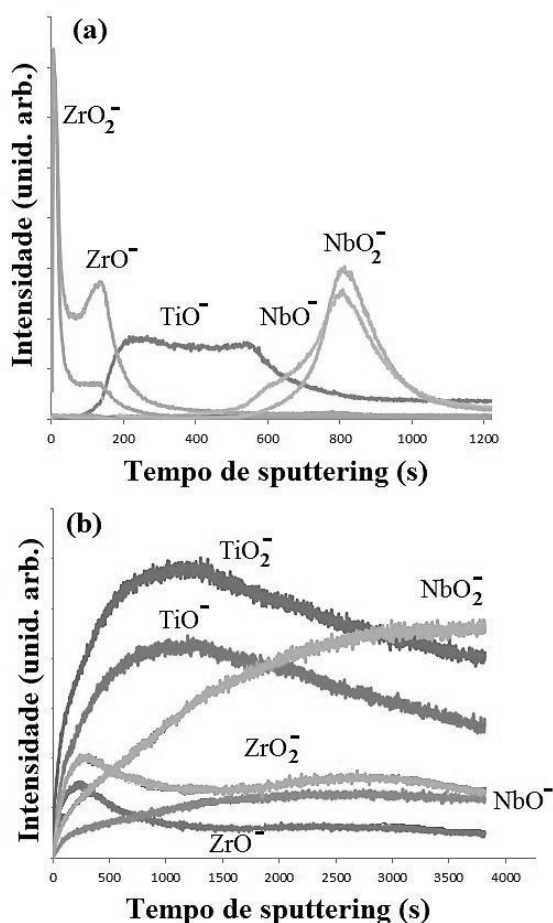


Figura 4.8 Perfil de profundidade para o filme de Zr/Ti/Nb/SS: (a) como depositado, (b) após tratamento térmico de 1000°C por 1 h.

A figura 4.8(a) apresenta o perfil de profundidade obtido por ToF-SIMS no modo negativo para o filme de Zr/Ti/Nb sobre substrato de aço inoxidável

como depositado. Semelhantemente ao caso anterior, três regiões principais podem ser identificadas: a primeira associada à camada de zircônio (representada pelos sinais de  $ZrO^-$  e  $ZrO_2^-$ ), a segunda representada pelo sinal de  $TiO^-$  e a terceira região representada pelos sinais dos íons  $NbO_2^-$  e  $NbO^-$ . O filme formado por Zr/Ti/Nb/SS é composto por três regiões distintas, com ligeira sobreposição de elementos nas interfaces, que seguem a sequência de deposição.

A figura 4.8(b) apresenta o perfil de profundidade obtido para o filme de Zr/Ti/Nb/SS após tratamento térmico. O tratamento térmico causou uma significativa sobreposição de óxidos de Zr, Ti e Nb. Mesmo depois de cerca de 4000 s de análise em profundidade não há nenhuma camada estruturada, estando os sinais de  $ZrO^-$ ,  $ZrO_2^-$ ,  $TiO_2^-$ ,  $TiO^-$ ,  $NbO^-$  e  $NbO_2^-$  presentes até o final da análise. Como informação adicional, é importante notar que a amostra Zr/Ti/Nb/SS manteve-se superficialmente homogênea após o tratamento térmico (a partir de um exame por microscopia iônica - figura 4.9(b)), diferentemente do substrato de Si (figura 4.9(a)). Para este substrato, a imagem obtida revela pequenas áreas circulares mais claras, talvez sem recobrimento.

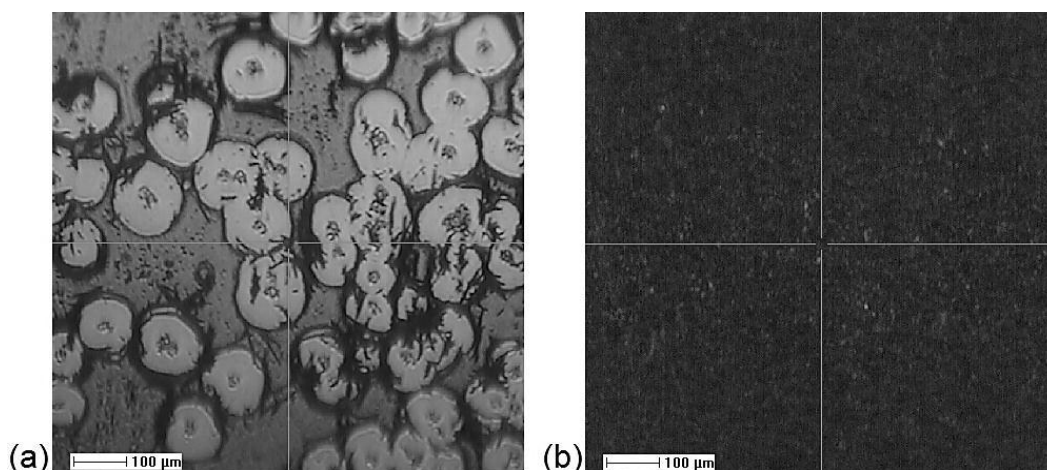


Figura 4.9 Imagens obtidas por ToF-SIMS das superfícies dos filmes após tratamento térmico de (a) Zr/Ti/Nb/Si(111) e (b) Zr/Ti/Nb/SS.

Uma análise de ToF-SIMS destas áreas mais claras (figura 4.10(b)) comprovou a existência única de Si, demonstrando que o substrato penetrou o

filme durante o tratamento térmico e irrompeu na superfície. A análise na área mais homogênea e escura revelou a presença normal do filme (figura 4.10(a)).

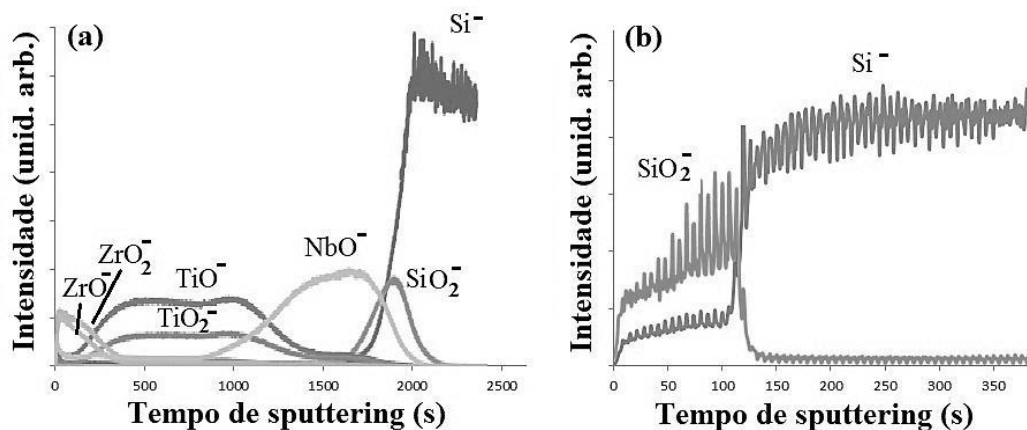


Figure 4.10 Perfil de profundidade para o filme de Zr/Ti/Nb/Si(111) após tratamento térmico a  $1000^{\circ}\text{C}$  por 1 h: (a) área homogênea, (b) centro de uma área circular mais clara (figura 4.9).

O tratamento térmico aplicado foi eficiente para uma maior homogeneização na distribuição dos metais presentes no filme de Zr/Ti/Nb/SS, aproximando este filme, que foi depositado em três camadas consecutivas, de um filme de liga TiNbZr, como era desejado neste trabalho. Dessa forma, esse filme possui os requisitos necessários (de composição e morfologia) para ser testado com as proteínas.

O mesmo não ocorreu para o filme depositado sobre silício. No caso deste filme, o substrato penetrou nas camadas do filme durante o aquecimento e irrompeu na superfície, mudando a sua composição. Como o silício não é um elemento desejável na superfície do filme de TiNbZr, este filme após o tratamento térmico não obteve os requisitos necessários para ser testado com as proteínas. Além disso, o filme manteve a sua estrutura em três camadas distintas, com apenas pequena difusão dos elementos presentes nas interfaces das camadas. A causa provável desse fenômeno é que o substrato absorveu grande parte da energia térmica e a usou para penetrar no filme.

Uma possível solução para evitar o superaquecimento do silício, e assim garantir uma maior homogeneização do filme e a não contaminação da

superfície deste durante o tratamento térmico, seria um aquecimento feito com uma rampa de aquecimento maior (menor taxa de aquecimento °C/s).

#### 4.2.2 XPS

A figura 4.11 mostra os espectros exploratórios dos três filmes de óxidos (Ti-4.11(a), Nb-4.11(b) e Zr-4.11(c)).

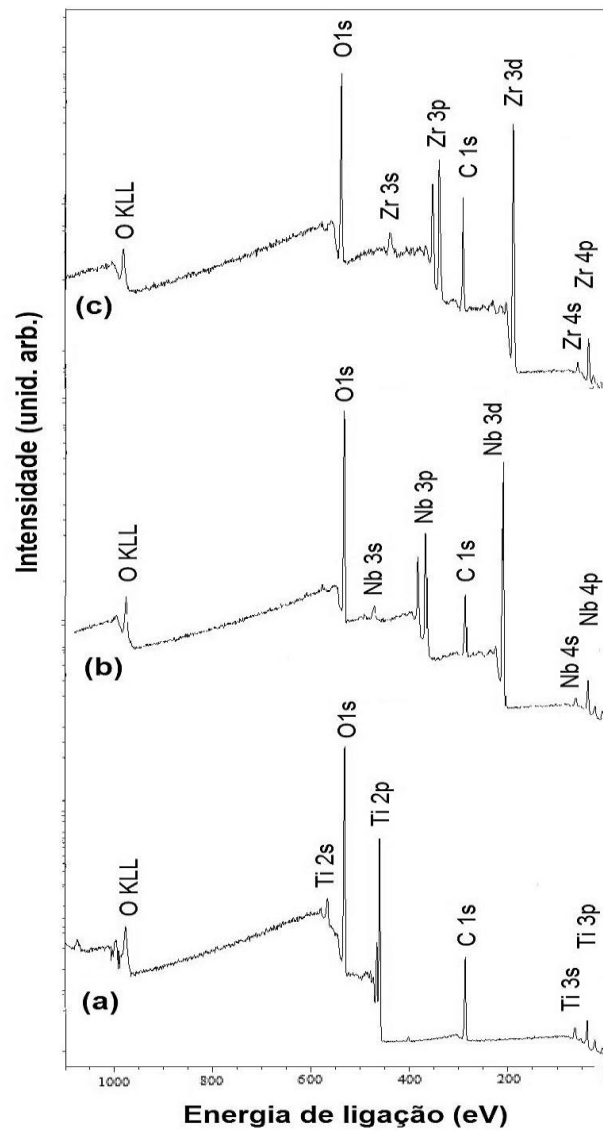


Figura 4.11 Espectro exploratório de XPS para os filmes finos de (a) Ti, (b) Nb e (c) Zr depositados sobre Si(111).

Os espectros mostram que além dos metais, apenas C e O estão presentes nas superfícies das amostras. Em nenhum filme foi detectado qualquer traço do Si, sugerindo um bom recobrimento dos substratos com os filmes de óxidos metálicos. O pico de carbono observado em todos os espectros corresponde à contaminação da superfície.

A figura 4.12 apresenta os espectros de alta resolução de (a) Ti 2p, (b) Nb 3d e (c) Zr 3d para os filmes de óxidos depositados sobre Si(111). O duplete Ti 2p foi fitado com apenas um componente, tendo Ti 2p<sub>3/2</sub> a 458,5 eV, que corresponde a TiO<sub>2</sub>. O espectro Nb 3d apresentou também apenas um componente, com Nb 3d<sub>5/2</sub> a 207,1 eV; este componente corresponde a Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. O duplete Zr 3d foi fitado também com apenas um componente, com Zr 3d<sub>5/2</sub> a 182,0 eV, que corresponde a ZrO<sub>2</sub>.

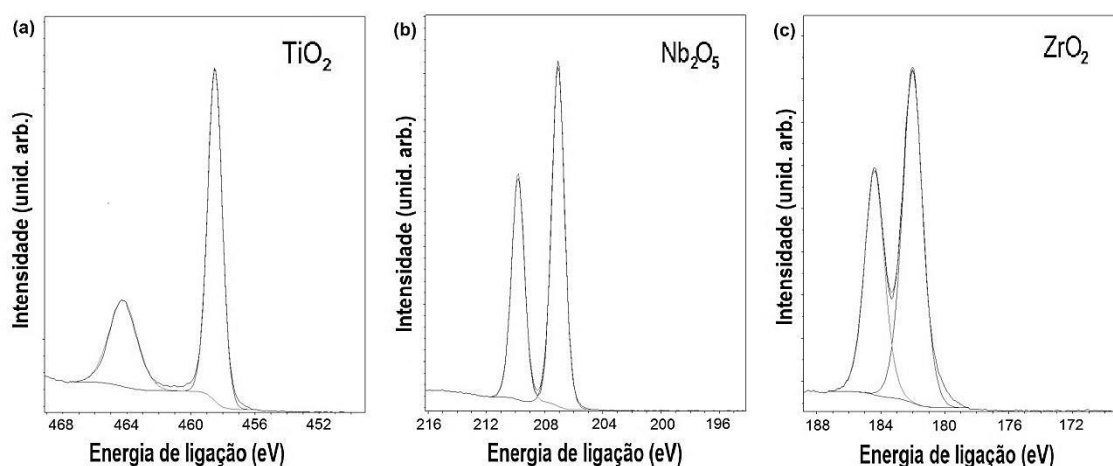


Figura 4.12 Espectros de XPS de alta resolução de (a) Ti 2p, (b) Nb 3d e (c) Zr 3d para os filmes de óxidos depositados sobre Si(111).

A figura 4.13 apresenta os espectros de XPS de alta resolução de Zr 3d, Ti 2p e Nb 3d para o filme de Zr/Ti/Nb depositado sobre Si(111) como depositado e após tratamento térmico. Antes do tratamento térmico observamos apenas a presença de Zr na superfície (figuras 4.13(a),(b),(c)). O espectro Zr 3d apresentou dois dubletos (fig. 4.13(a)), com o componente Zr 3d<sub>5/2</sub> mais intenso a 182,2 eV, correspondendo a ZrO<sub>2</sub>, e o menos intenso a 178,2 eV, associado a Zr metálico.

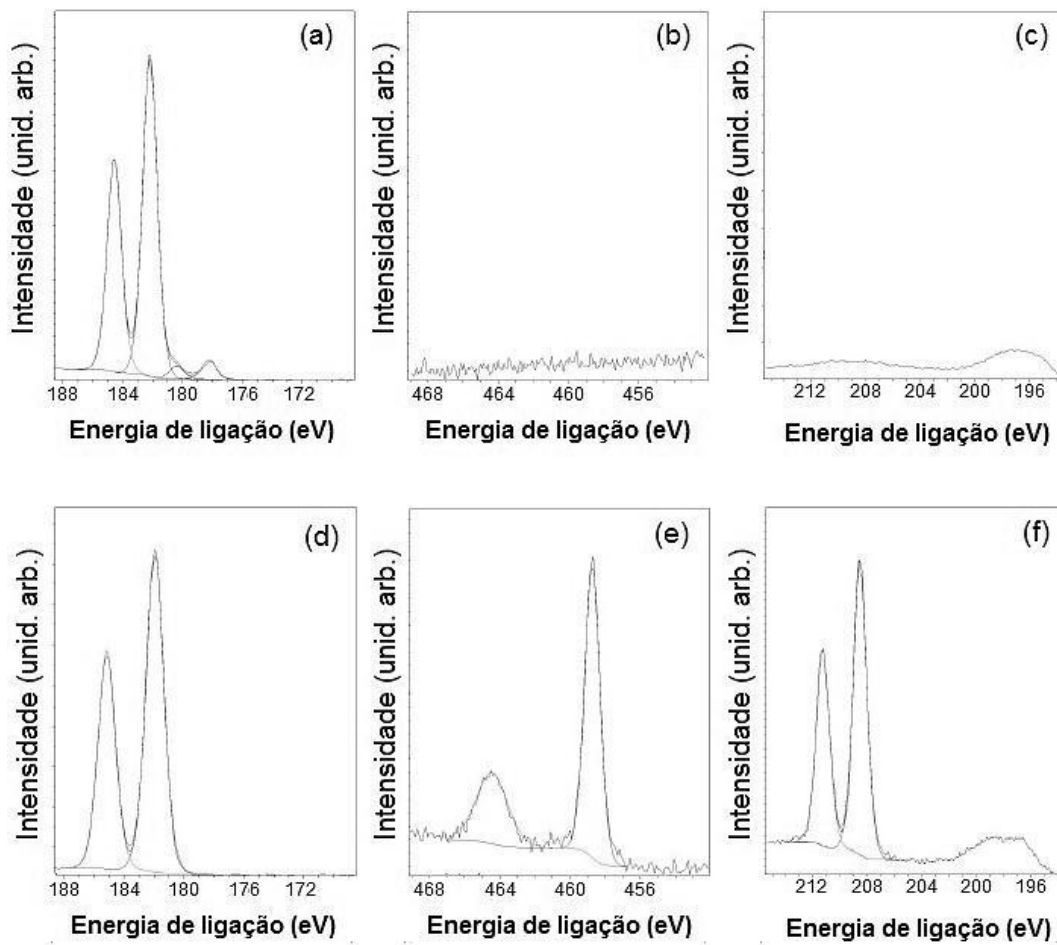


Figura 4.13 Espectros de XPS de alta resolução de (a) Zr 3d, (b) Ti 2p e (c) Nb 3d, do filme Zr/Ti/Nb/Si(111) como depositado, e (d) Zr 3d, (e) Ti 2p e (f) Nb 3d, do filme de Zr/Ti/Nb/Si(111) tratado termicamente.

Após o tratamento térmico o espectro Zr 3d foi ajustado com apenas um dubleto (fig. 4.13(d)), com Zr 3d<sub>5/2</sub> a 182,1 eV (ZrO<sub>2</sub>). O espectro Ti 2p apresentou apenas um dubleto (Fig. 4.13(e)), com Ti 2p<sub>3/2</sub> a 458,7 eV, que corresponde a TiO<sub>2</sub>. O espectro Nb 3d (Fig. 4.13(f)) apresentou um dubleto, com Nb 3d<sub>5/2</sub> a 207,2 eV, que pode ser atribuído a Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

A Figura 4.14 mostra os espectros Zr 3d, Ti 2p e Nb 3d para o filme de Zr/Ti/Nb depositados sobre aço inoxidável, como depositado e após tratamento térmico. Como para o filme depositado sobre Si(111), os picos referentes a Ti e Nb não foram detectados para o filme como depositado (figuras 4.14(b) e (c)),

mas aparecem após o tratamento térmico. Os resultados são muito semelhantes àqueles obtidos para o filme depositado sobre Si(111): presença de  $ZrO_2$  e Zr metálico para o filme como depositado (figura 4.14 (a)), e presença de uma mistura de  $ZrO_2$ ,  $TiO_2$  e  $Nb_2O_5$  na superfície após o tratamento térmico (figuras 4.14 (d) a (f)).

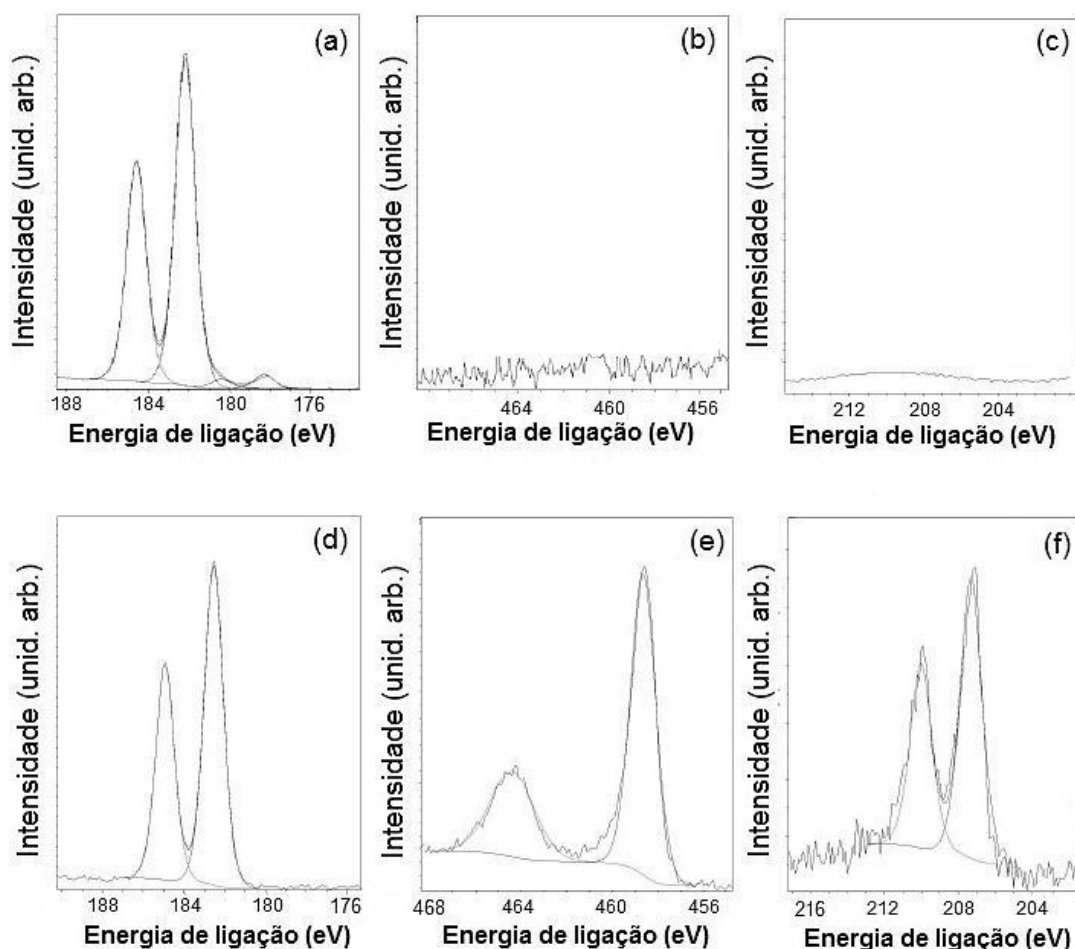


Figura 4.14 Espectros de XPS de (a) Zr 3d, (b) Ti 2p e (c) Nb 3d, do filme de Zr/Ti/Nb/SS como depositado, e (d) Zr 3d, (e) Ti 2p e (f) Nb 3d, do filme de Zr/Ti/Nb/SS tratado termicamente.

Para completar as informações obtidas por ToF-SIMS a partir de um ponto de vista quantitativo, tanto os filmes Zr/Ti/Nb/Si(111) quanto os filmes Zr/Ti/Nb/SS foram analisados por perfil de profundidade (bombardeamento iônico com  $Ar^+$ ) por XPS após o tratamento térmico. As figuras 4.15 e 4.16 comparam os espectros de alta resolução de (a) C 1s, (b) O 1s, (c) Zr 3d, (d) Ti

2p e (e) Nb 3d obtidos antes do bombardeamento (espectros em cima) e depois (espectros em baixo) da última sessão de bombardeamento com  $\text{Ar}^+$  (foram 20 ao todo). A figura 4.15 refere-se ao substrato de silício e a figura 4.16, ao substrato de aço inoxidável.

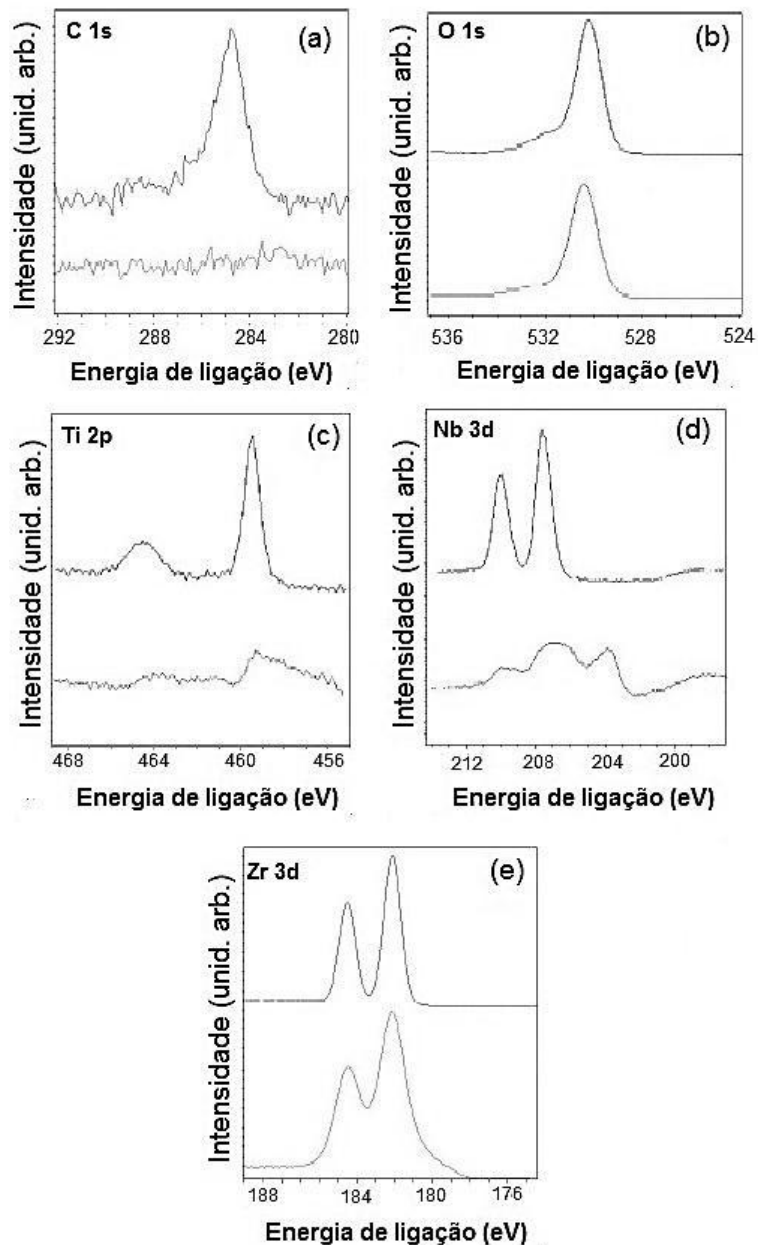


Figura 4.15 Espectros de XPS de (a) C 1s, (b) O 1s, (c) Ti 2p, (d) Nb 3d e (e) Zr 3d, para o filme fino de Zr/Ti/Nb/Si(111) tratado termicamente à 1000°C por 1h, antes (em cima) e depois (em baixo) do bombardeamento iônico com  $\text{Ar}^+$ .



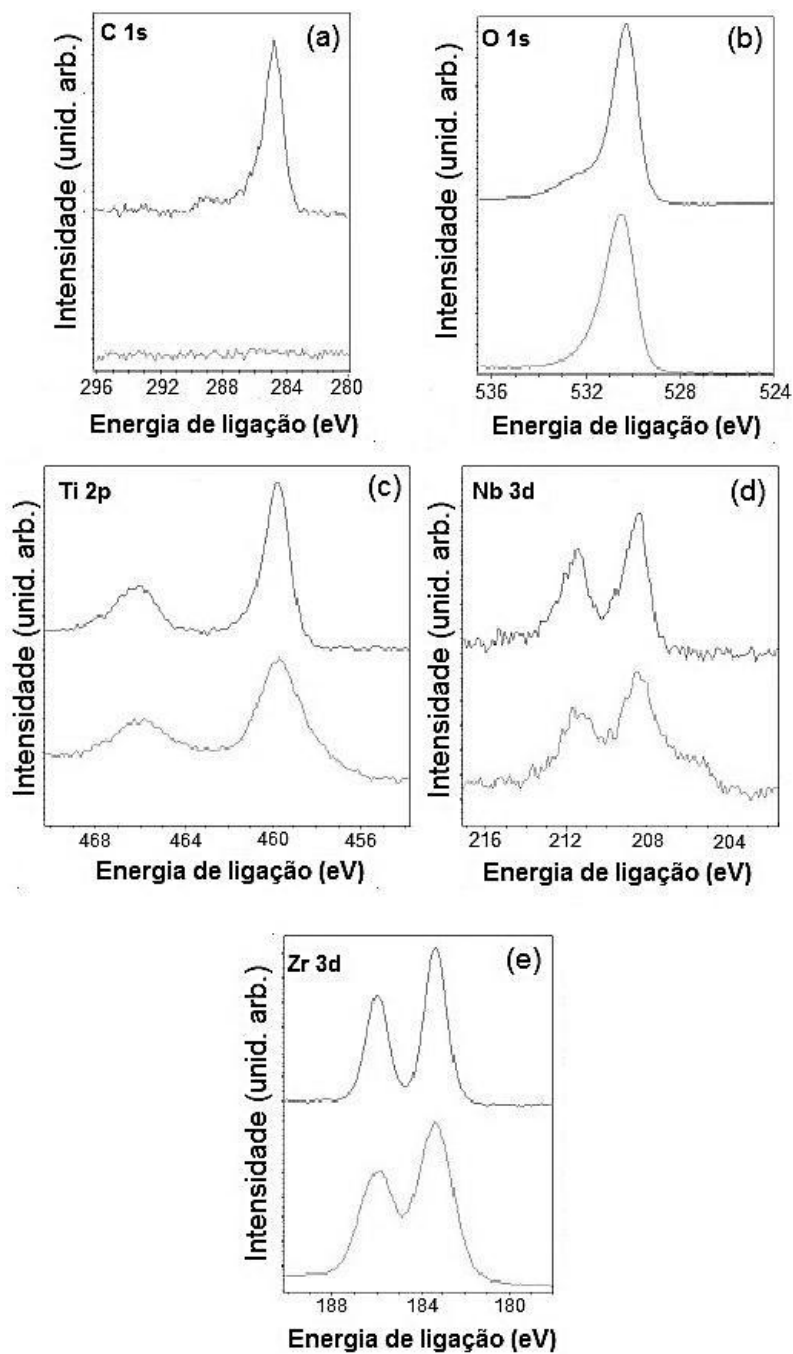


Figura 4.16 Espectros de XPS de (a) C 1s, (b) O1s, (c) Ti 2p, (d) Nb 3d e (e) Zr 3d, para o filme fino de Zr/Ti/Nb/SS tratado termicamente à 1000°C por 1h, antes (em cima) e depois (em baixo) do bombardeamento iônico com Ar<sup>+</sup>.

Pode ser observado nessas figuras que o pico de C 1s foi removido pelo bombardeamento iônico, o que confirma que o carbono era apenas devido à contaminação da superfície. O pico de O 1s não mudou muito com o bombardeamento iônico, com seu componente principal a aproximadamente 530,5 eV, que está associado a óxido metálico.

Para o substrato de Si depois do bombardeamento iônico, a forma do espectro de Zr 3d mudou (figura 4.15(e)), ocorrendo o aparecimento de dois dubletos com Zr3d<sub>5/2</sub> a 180,1 e 182,1 eV, correspondendo a um óxido de zircônio como ZrO e a ZrO<sub>2</sub>, respectivamente. Para o substrato de aço inoxidável, o espectro de Zr 3d não se alterou (figura 4.16(e)).

O espectro de Ti 2p mudou para ambos os substratos após o bombardeamento iônico, apresentando três componentes de Ti 2p<sub>3/2</sub> a 455,2, 457,0 e 458,5 eV, para o filme depositado sobre o substrato de Si(111), e dois componentes para o filme depositado sobre substrato de aço inoxidável, a 456,9 e 458,6 eV. O componente com uma menor energia de ligação corresponde a TiO, o com uma energia de ligação intermediária corresponde a Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, e o de maior energia de ligação, a TiO<sub>2</sub>.

O espectro de Nb 3d também mudou para ambos os substratos após o bombardeamento iônico, apresentando dois dubletos com Nb 3d<sub>5/2</sub> a 203,3 e 207,0 eV (Nb 3d<sub>5/2</sub>), para Si (111), e 204,6 e 207,0 eV para SS. O componente com menor energia de ligação corresponde provavelmente a NbO e aquele com maior energia, a Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

O bombardeamento iônico com argônio causou uma redução parcial dos componentes dos filmes [96,97], mas se assumirmos que é apenas um efeito induzido pelo próprio bombardeamento, é possível medir as áreas totais dos espectros para estimar a composição do filme.

A Tabela 4.2 apresenta as razões atômicas Zr/(Zr+Ti+Nb), Ti/(Zr+Ti+Nb) e Nb/(Zr+Ti+Nb) para os filmes de Zr/Ti/Nb depositados sobre substratos de Si(111) e SS.

Tabela 4.2 Razões entre as composições atômicas obtidas por XPS para os filmes de Zr/Ti/Nb depositados sobre Si(111) e SS, como depositados, tratados termicamente e após bombardeamento iônico.

Filme de Zr/Ti/Nb sobre:	$\frac{\text{Zr}}{\text{Zr+Ti+Nb}}$	$\frac{\text{Ti}}{\text{Zr+Ti+Nb}}$	$\frac{\text{Nb}}{\text{Zr+Ti+Nb}}$
Si(111), como depositado	1	0	0
Si(111), tratado termicamente	0,60	0,12	0,28
Si(111), após o último ciclo de bombardeamento de Ar <sup>+</sup>	0,77	0,06	0,17
SS, como depositado	1	0	0
SS, tratado termicamente	0,57	0,34	0,09
SS, após o último ciclo de bombardeamento de Ar <sup>+</sup>	0,61	0,29	0,10

Os filmes como depositados de Zr/Ti/Nb/Si e Zr/Ti/Nb/SS apresentaram apenas zircônio na superfície (linhas 1 e 4 na tabela 4.2) e um perfil de composição em camadas, seguindo a ordem de deposição, como pode ser observado nas figuras 4.7(a) e 4.8(a). Após o tratamento de oxidação a 1000°C por uma hora em ar, as quantidades de Ti e Nb na superfície aumentaram (linhas 2 e 5 na tabela 4.2), indicando uma difusão entre as diferentes camadas, como observado por ToF-SIMS (figuras 4.7(b) e 4.8(b)).

O bombardeamento com íons de argônio analisado por XPS revelou diferenças na composição em profundidade para os filmes depositados sobre Si(111): um aumento da contribuição de Zr e uma diminuição nas contribuições de Ti e de Nb (diferença entre as linhas 2 e 3 na tabela 4.2), demonstrando a não uniformidade na distribuição dos elementos químicos pelo filme (como se esperaria numa liga). Essa não uniformidade já tinha sido observada por ToF-SIMS na figura 4.7(b).

Para o bombardeamento com íons de argônio no filme sobre SS a composição em profundidade permaneceu estatisticamente constante (diferença entre as linhas 5 e 6 na tabela 4.2) confirmando a maior homogeneidade do filme, como já havia demonstrado os dados de ToF-SIMS na figura 4.8(b)). Como este filme tratado termicamente aproximou-se da condição ideal (de ser um filme de TiNbZr), ele será utilizado como modelo

para a interação da superfície de uma liga de TiNbZr com as proteínas BSA e Fn.

#### 4.3 Medidas da dureza e módulo elástico dos filmes

Como foi dito anteriormente na seção 2.2, na seleção de materiais para implantes ortopédicos devemos levar em conta duas importantes propriedades mecânicas: o módulo de elasticidade e a dureza. Para o módulo de elasticidade, são desejáveis valores cada vez menores, a fim de gerar uma transferência de cargas mais uniforme entre implante e osso evitando danos ao tecido recuperado em torno do material. Do ponto de vista do desgaste, é importante que a superfície do implante possua dureza elevada para evitar a liberação no organismo de resíduos de abrasão gerados durante os carregamentos funcionais, pois estes podem causar inflamações e afrouxamento do implante. Deste modo, é importante associar baixo módulo de elasticidade com valores elevados de dureza.

O módulo elástico (E) e a dureza (H) dos filmes finos de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e  $\text{ZrO}_2$  obtidos por meio da técnica de nanoindentação, são representados na figura 4.17 em função da profundidade de indentação. Cada valor é uma média de 15 medições. A figura 4.17 mostra um comportamento não uniforme próximo à superfície (nos primeiros 40 nm, aproximadamente). Uma vez que essas diferenças foram observadas nos três filmes finos utilizados neste estudo, elas podem ser associadas às condições experimentais. Como sugerido por Cáceres *et al.* [98] em um estudo semelhante com ligas de titânio, esta poderia ser uma combinação de erros na determinação da profundidade em deslocamento de contato muito pequenos e que pode definir um limite inferior para a profundidade inicial útil de nanoindentação. Após os primeiros nanômetros, as medições atingiram um valor constante (região de platô). A região de platô para estes três filmes finos descritos neste estudo foi considerada entre 40 e 140 nm.

Como mostrado nas figuras 4.17(a) e 4.17(b), o filme de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  apresentou o menor módulo elástico (90 GPa) e filme de  $\text{ZrO}_2$  apresentou a maior dureza (14,5 GPa).

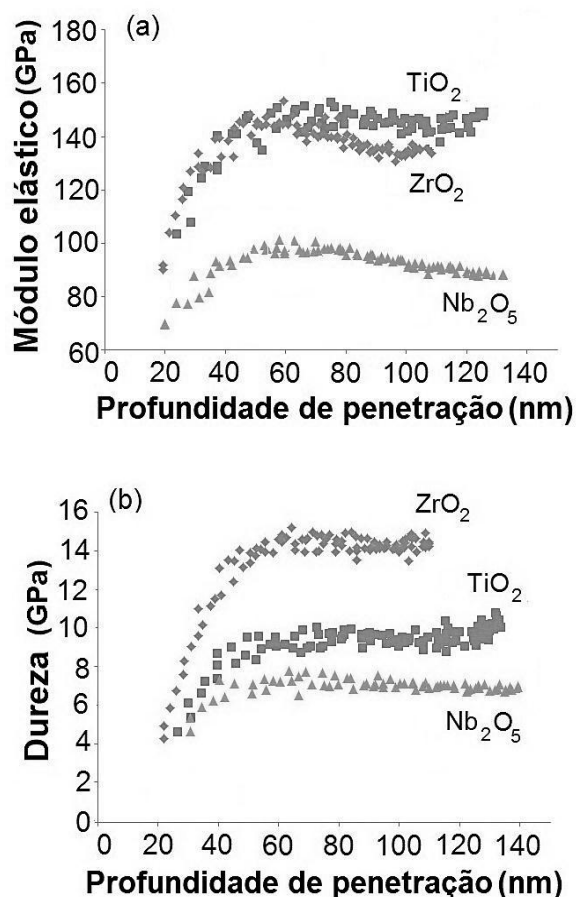


Figura 4.17 (a) Módulo elástico e (b) dureza para os filmes finos de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e  $\text{ZrO}_2$ ,

A figura 4.18 apresenta os valores para (a) o módulo elástico e (b) a dureza para os filmes finos de Zr/Ti/Nb. Como mostrado nas figuras 4.18(a) e 4.18(b), o filme de Zr/Ti/Nb/Si(111) apresentou o menor módulo elástico (105 GPa) e o filme de Zr/Ti/Nb/SS apresentou a maior dureza (12 GPa). A figura 4.18 mostra um comportamento não uniforme próximo à superfície (nos primeiros 50 nm, aproximadamente). Uma vez que essas diferenças foram observadas nos dois filmes finos utilizados neste estudo, elas podem ser associadas às condições experimentais definindo um limite inferior para a profundidade inicial útil de nanoindentação (50 nm). Após os primeiros

nanômetros, as medições atingiram um valor constante (região de platô). A região de platô para estes dois filmes finos descritos neste estudo foi considerada entre 50 e 140 nm.

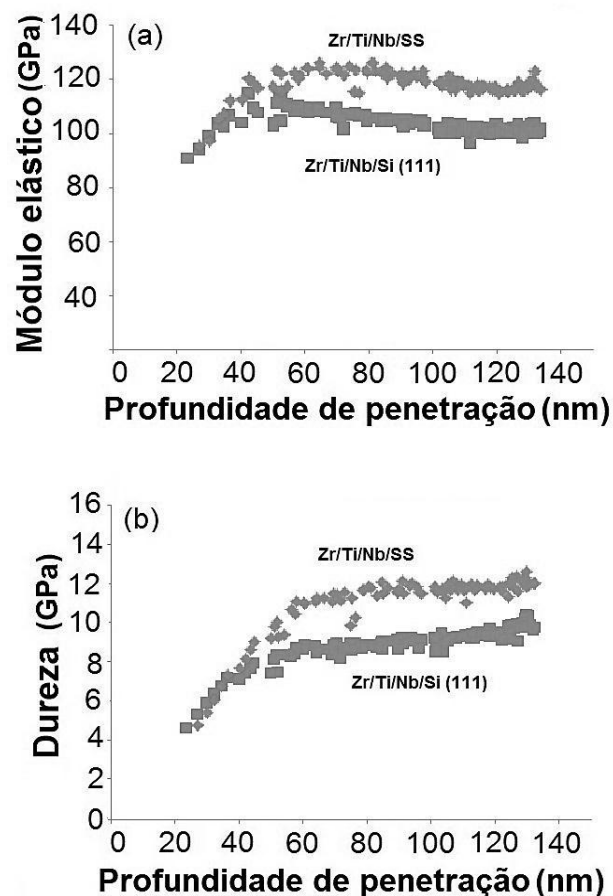


Figura 4.18 (a) Módulo elástico e (b) dureza para os filmes finos de Zr/Ti/Nb depositados sobre silício e sobre aço inoxidável.

Apesar de os filmes de Zr/Ti/Nb serem constituídos por  $ZrO_2$  na sua superfície, conforme observado pela análise por XPS, as suas propriedades mecânicas medidas apresentaram valores diferentes daquelas do filme fino de  $ZrO_2$ , sendo os valores dos seus módulos de elasticidade e das suas durezas menores do que as do filme de  $ZrO_2$  (comparação entre as linhas 3, 4 e 5 da tabela 4.3), indicando a influência das camadas de  $TiO_2$  e  $Nb_2O_5$  nessas propriedades dos filmes.

Entre os filmes de Zr/Ti/Nb sobre Si e SS podemos observar uma diferença entre os valores dos módulos de elasticidade e da dureza (linhas 4 e 5 da tabela 4.3). Esta diferença é devida as diferentes propriedades e morfologias dos substratos, sendo tanto a rugosidade quanto a dureza do SS maior do que as do Si, o que levou o filme depositado sobre o SS a ter um maior módulo de elasticidade e maior dureza.

Tabela 4.3 Resultados obtidos por nanoindentação para todos os filmes finos.

<b>Filme</b>	<b>Módulo Elástico (GPa)</b>	<b>Dureza (GPa)</b>
TiO <sub>2</sub>	145	9,0
Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	95	7,0
ZrO <sub>2</sub>	140	14,5
Zr/Ti/Nb/Si(111)	105	9,0
Zr/Ti/Nb/SS	125	12,0

A tabela 4.3 mostra os valores de módulo elástico e de dureza obtidos para os filmes. Todos os filmes apresentaram valores de módulos de elasticidade inferiores aos obtidos para o aço inoxidável 316L (200 GPa) e para ligas cobalto-cromo (de 200 a 248 GPa). Sendo que o valor do módulo elástico para o ZrO<sub>2</sub> neste trabalho (140 GPa) foi menor do que o valor obtido tradicionalmente para este óxido (200 GPa).

O valor da dureza obtida para os filmes foi maior do que a dureza do titânio comercialmente puro (1,6 GPa), de ligas tradicionais de titânio como Ti6Al4V (4,9 GPa) e do aço inoxidável 316L (2 a 6,7 GPa), sendo somente comparável à dureza de aços inoxidáveis 316L nitretados (10 a 14 GPa). Estes valores de módulo de elasticidade menores e de durezas maiores obtidos, inclusive para o caso do filme de ZrO<sub>2</sub>, que apresentou módulo de elasticidade menor do que o esperado para este óxido, podem ser atribuídos a nanoestrutura dos filmes, o que lhes garante propriedades únicas. Estudos tem demonstrado que superfícies nanoestruturadas apresentam propriedades mecânicas superiores de dureza e resistência ao desgaste quando comparadas aos materiais convencionais [99,100].

#### 4.4 Análises da adsorção de proteínas

A adsorção das proteínas foi realizada sobre as superfícies dos filmes de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$  e  $\text{Zr/Ti/Nb/SS}$  após o tratamento térmico, sendo que a escolha deste último foi devido a ele ter se apresentado volumetricamente homogênea e ser a superfície mais adequada para representar uma liga. A partir deste momento, o filme fino de  $\text{Zr/Ti/Nb/SS}$  tratado termicamente será denominado de  $\text{TiNbZr/SS}$ .

##### 4.4.1 Adsorção de BSA sobre as superfícies dos filmes finos

###### 4.4.1.1 Análise por ToF-SIMS

Para extrair informações dos espectros de proteínas por ToF-SIMS e relacionar os picos ( $m/z$ ) aos aminoácidos específicos, os espectros de referência para os 20 aminoácidos mais comuns foram usados para construir a tabela 4.4, que relaciona os picos dos íons secundários mais intensos obtidos neste trabalho com cada aminoácido individual.

A identificação dos fragmentos dos íons secundários nos permite não só calcular a homogeneidade da adsorção, mas também nos permite identificar as características da proteína na superfície do material.

A figura 4.19 apresenta os espectros de ToF-SIMS da superfície do filme de  $\text{TiO}_2$  após as adsorções de (a) 20  $\mu\text{g/ml}$  e (b) 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA. Podemos observar a identificação de vários picos que correspondem a aminoácidos como apontados na tabela 4.4. O pico  $m/z = 48^+$  é o pico característico do Ti, representando assim o filme. Como pode ser observado, tanto o pico mais intenso ( $m/z = 43^+$ ), que corresponde à arginina, quanto o pico característico de Ti não sofreram grandes alterações com a diferença de concentração de proteína. A variação que podemos observar é entre os outros fragmentos, como o aumento da intensidade dos picos  $m/z = 70^+$ ,  $84^+$  e  $120^+$ , que como



podem ser identificados na tabela 4.5, correspondem a um caráter neutro e apolar na superfície da proteína que está em contato com o meio externo.

Tabela 4.4 Correspondência entre os aminoácidos e os picos característicos de íons positivos mais intensos obtidos por ToF-SIMS [65].

Aminoácido	Fragmentos de íons secundários	
	m/z	Estrutura molecular
Alanina (Ala)	42	$C_2H_4N^+$
	44	$C_2H_6N^+$
Arginina (Arg)	43	$CH_3N_2^+$
	59	$CH_5N_3^+$
	73	$C_2H_7N_3^+$
Aspargina (Asn)	70	$C_3H_4NO^+$
	87	$C_3H_7N_2O^+$
	88	$C_3H_6NO_2^+$
Cisteína (Cys)	45	$CHS^+$
Glutamina (Gln)	84	$C_4H_6NO^+$
Glicina (Gly)	30	$CH_4N^+$
Histidina (His)	54	$C_3H_4N^+$
	81	$C_4H_5N_2^+$
	82	$C_4H_6N_2^+$
	110	$C_5H_8N_3^+$
Leucina (Leu)	28	$CH_2N^+$
	86	$C_5H_{12}N^+$
Lisina (Lys)	56	$C_3H_6N^+$
	68	$C_4H_6N^+$
Fenilalanina (Phe)	120	$C_8H_{10}N^+$
Serina (Ser)	58	$C_3H_8N^+$
	60	$C_2H_6NO^+$
	71	$C_3H_3O_2^+$
Teonina (Thr)	69	$C_4H_5O^+$
	74	$C_3H_8NO^+$
Valina (Val)	72	$C_4H_{10}N^+$
	83	$C_5H_7O^+$

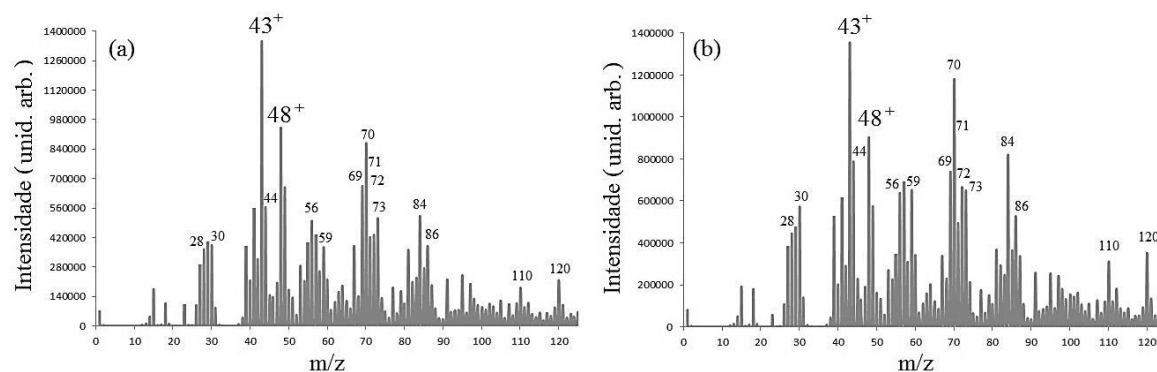


Figura 4.19 Espectros de íons positivos obtidos por ToF-SIMS para o filme fino de  $\text{TiO}_2$  após a adsorção de: (a) 20  $\mu\text{g/ml}$  e (b) 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA.

Tabela 4.5 Propriedades de carga-polaridade dos fragmentos de íons secundários obtidos por ToF-SIMS neste trabalho [101].

Íon secundário característico	Propriedades da cadeia lateral do aminoácido
<b>30:</b> $\text{CH}_4\text{N}^+$	Neutro-apolar
<b>43:</b> $\text{CH}_3\text{N}_2^+$	Positivamente carregado – polar
<b>44:</b> $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}^+$	Neutro-apolar
<b>56:</b> $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}^+$	Positivamente carregado - polar
<b>70:</b> $\text{C}_3\text{H}_4\text{NO}^+$	Neutro-apolar
<b>72:</b> $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}^+$	Neutro-apolar
<b>73 :</b> $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}_3^+$	Positivamente carregado - polar
<b>84:</b> $\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}^+$	Neutro-apolar
<b>86 :</b> $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}^+$	Neutro-apolar
<b>120:</b> $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}^+$	Neutro-apolar

A profundidade da análise por ToF-SIMS corresponde a cerca de 2 nm, ou seja, apenas a superfície da proteína que está em contato com o ambiente é analisada. Uma parte significativa da proteína não é analisada, esta corresponde ao volume da proteína e a parte da proteína que está em contato

com a superfície do filme fino. Como as proteínas são formadas por diferentes cadeias laterais e estas possuem diferentes cargas e polaridades, a maior presença de cadeias laterais neutras e apolares na interface proteína/meio externo indica a maior presença de cadeias polares e carregadas eletricamente na interface proteína/filme fino.

Dessa forma, como o aumento da concentração de BSA adsorvida sobre o filme de  $\text{TiO}_2$  (figura 4.19(b)) resultou num aumento dos íons neutros e apolares na interface proteína/meio externo, temos que o aumento na concentração de BSA na superfície de  $\text{TiO}_2$  resultou numa interação, entre a proteína e o filme, de caráter polar e carregado eletricamente.

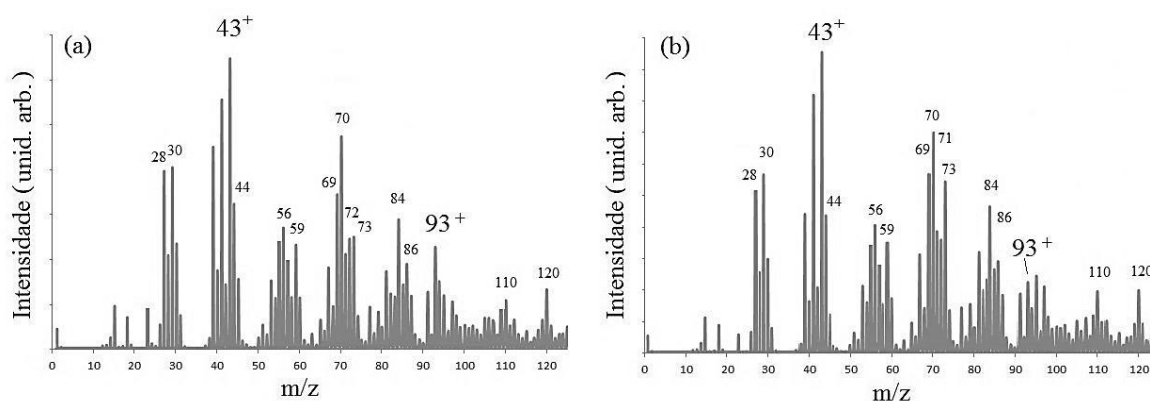


Figura 4.20 Espectros de íons positivos obtidos por ToF-SIMS para o filme fino de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  após a adsorção de: (a) 20  $\mu\text{g/ml}$  e (b) 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA.

A figura 4.20 apresenta os espectros de ToF-SIMS da superfície do filme de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  com as adsorções de (a) 20  $\mu\text{g/ml}$  e (b) 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA. Podemos observar a identificação de vários picos que correspondem a aminoácidos como apontados na tabela 4.4. O pico  $m/z = 93^+$  é o pico característico do Nb, representando assim o filme. Como pode ser observado, tanto o pico mais intenso ( $m/z = 43^+$ ), que corresponde à arginina, quanto o pico característico de Nb não sofreram grandes alterações com o aumento da concentração de proteína. A variação que podemos observar é o aumento da intensidade do pico  $m/z = 73^+$ , que como pode ser identificado na tabela 4.5, corresponde a um caráter positivamente carregado-polar na superfície proteína/meio externo,

caracterizando um aumento no caráter neutro-apolar na superfície proteína/filme fino.

A figura 4.21 apresenta os espectros de ToF-SIMS da superfície do filme de  $ZrO_2$  com as adsorções de (a) 20  $\mu\text{g/ml}$  e (b) 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA. Podemos observar a identificação de vários picos que correspondem a aminoácidos como apontados na tabela 4.4. O pico  $m/z = 91^+$  é o pico característico do Zr, representando assim o filme. Como pode ser observado, tanto o pico mais intenso ( $m/z = 43^+$ ), que corresponde à arginina, quanto o pico característico de Zr não sofreram grandes alterações com a diferença de concentração de proteína. A variação que podemos observar é entre os outros fragmentos de íons secundários, como a diminuição da intensidade dos picos  $m/z = 70^+$  e  $84^+$ , que como podem ser identificados na tabela 4.5, correspondem a uma redução no caráter neutro-apolar na superfície proteína/meio externo, resultando num aumento do caráter positivamente carregado-polar na interface proteína/meio externo (garantido pelo pico  $m/z = 43^+$ ).

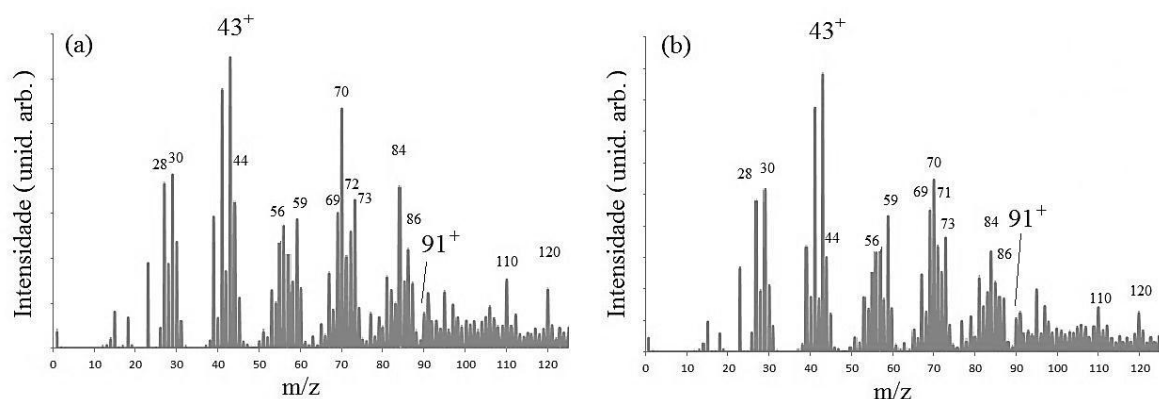


Figura 4.21 Espectros de íons positivos obtidos por ToF-SIMS para o filme fino de  $ZrO_2$  após a adsorção de: (a) 20  $\mu\text{g/ml}$  e (b) 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA.

A figura 4.22 apresenta os espectros de ToF-SIMS da superfície do filme de  $TiNbZr/SS$  com as adsorções de (a) 20  $\mu\text{g/ml}$  e (b) 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA. Podemos observar a identificação de vários picos que correspondem a aminoácidos como apontados na tabela 4.4. O pico  $m/z = 91^+$  é o pico característico do Zr, que é o elemento metálico de maior concentração na

superfície deste filme, como foi detectado pela análise de XPS. O pico característico de Zr apresenta baixa intensidade a baixas concentrações de BSA e não é detectado numa maior concentração de BSA, indicando total recobrimento da superfície analisada com a proteína.

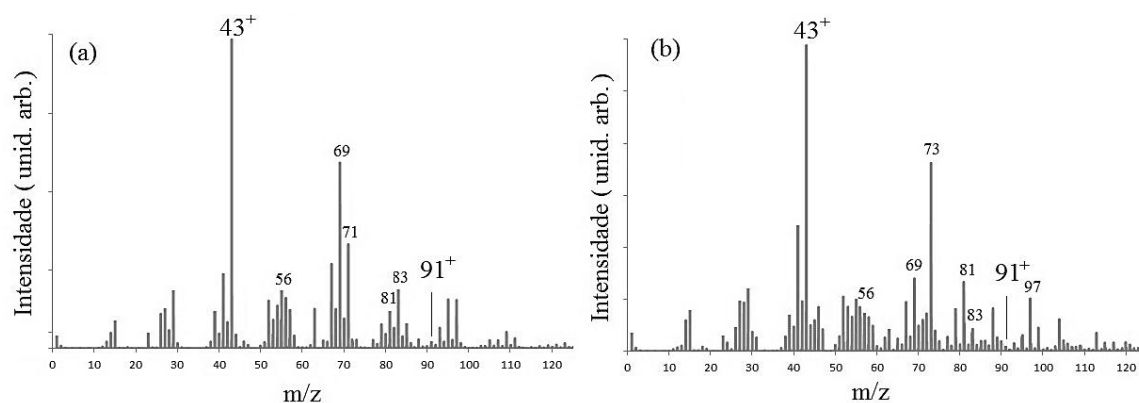


Figura 4.22 Espectros de íons positivos obtidos por ToF-SIMS para o filme fino de TiNbZr/SS (tratado termicamente) após a adsorção de (a) 20  $\mu\text{g/ml}$  e (b) 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA.

Apesar de existir um pico de  $m/z = 91^+$  no espectro da figura 4.22(b), ele não corresponde ao zircônio. Esta constatação só é possível devido a alta sensibilidade da técnica de ToF-SIMS ao número de massa do íon analisado. Esta técnica permite a separação de íons com números de massa muito próximos, como pode ser observado na figura 4.23, obtida para a concentração de 20  $\mu\text{g/ml}$  de BSA sobre o filme de TiNbZr/SS, onde foi possível separar a razão massa/carga de 91,22 para o Zr, diferenciando de outros picos mais intensos que não correspondiam a ele e sim a fragmentos de aminoácidos.

Uma informação direta que podemos obter da figura 4.22 é que foi detectado um menor número de fragmentos de íons secundários de aminoácidos em relação às superfícies apresentadas anteriormente. Este fato associado à baixa detecção do substrato é um indicio de uma forte ligação entre a proteína e a superfície do filme. Quanto à identificação da mudança na carga-polaridade de acordo com a concentração de BSA, podemos observar um aumento expressivo do pico  $m/z = 73^+$  que, de acordo com a tabela 4.5, é característico de caráter positivamente carregado e polar. Isso indica um

aumento da interação neutra-apolar na superfície proteína/filme fino com o aumento da concentração de BSA.

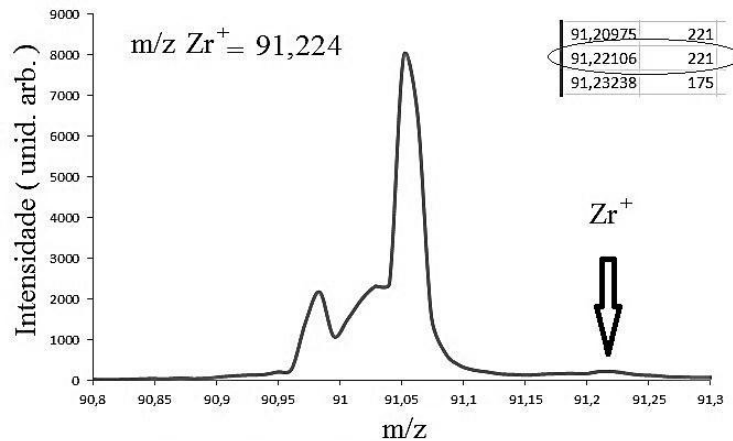


Figura 4.23 Detalhe do espectro de íons positivos obtido por ToF-SIMS para o filme fino de TiNbZr/SS após a adsorção de 20 µg/ml de BSA, onde pode ser visto a área de separação entre as diferentes relações (massa atômica)/(carga do íon) detectadas.

Identificadas as alterações de carga-polaridade na interface proteína/filme fino devido ao aumento da concentração de proteína, podemos identificar também o perfil de adsorção da BSA nestes filmes finos. Isso porque os dados obtidos por ToF-SIMS permitem que se trace um gráfico da intensidade da proteína adsorvida em função da sua concentração no filme fino, a fim de se determinar a isoterma de adsorção.

Para o cálculo da quantidade de proteína adsorvida ( $I$ ) foi utilizada a fórmula:  $I = I_p / (I_p + I_f)$ , onde  $I_p$  é o valor do pico mais intenso identificado como um íon de aminoácido ( $I_p$  = intensidade proteína) e  $I_f$  é a intensidade do pico característico do filme fino ( $I_f$  = intensidade filme). Dessa forma, uma adsorção máxima de proteína existirá quando o substrato não for identificado ( $I_f = 0$ ), o que corresponde a formação de uma camada uniforme de proteína e conseqüentemente  $I = 1$

As curvas de adsorção para os filmes de  $TiO_2$ ,  $Nb_2O_5$ ,  $ZrO_2$  e TiNbZr/SS podem ser vistas nas figuras 4.24 a 4.28. A figura 4.24 apresenta a isoterma de adsorção da albumina para a superfície de  $TiO_2$ . Nesta superfície não houve

um recobrimento completo da superfície e um platô de adsorção foi encontrado ainda em baixas concentrações (20  $\mu\text{g/ml}$  de BSA), indicando pouca afinidade entre a superfície de  $\text{TiO}_2$  produzida neste trabalho e a BSA.

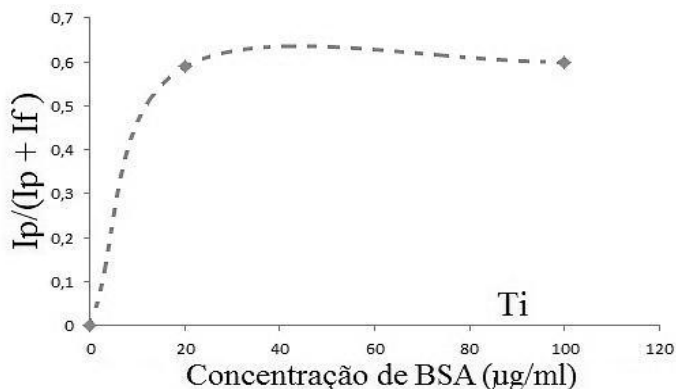


Figura 4.24 Isoterma de adsorção de BSA para o filme fino de  $\text{TiO}_2$ .

A figura 4.25 apresenta a isoterma de adsorção da albumina para a superfície de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . Nesta superfície a taxa de adsorção da BSA aumentou proporcionalmente com a concentração da proteína em solução e um platô de adsorção foi alcançado na concentração de aproximadamente 45  $\mu\text{g/ml}$  de BSA.

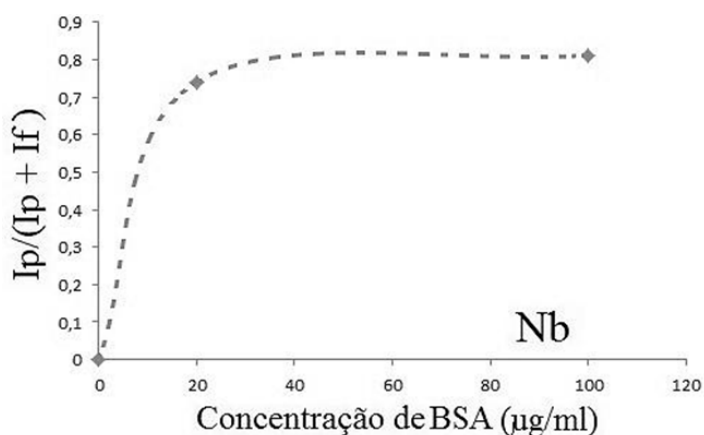


Figura 4.25 Isoterma de adsorção de BSA para o filme de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ .

A isoterma de adsorção da albumina para a superfície de  $\text{ZrO}_2$  pode ser vista na figura 4.26. Esta superfície demonstrou boa afinidade com a BSA, sendo que a taxa de adsorção da BSA aumentou proporcionalmente com a

concentração da proteína em solução e um platô de adsorção foi alcançado para concentrações inferiores a 40  $\mu\text{g/ml}$  de BSA.

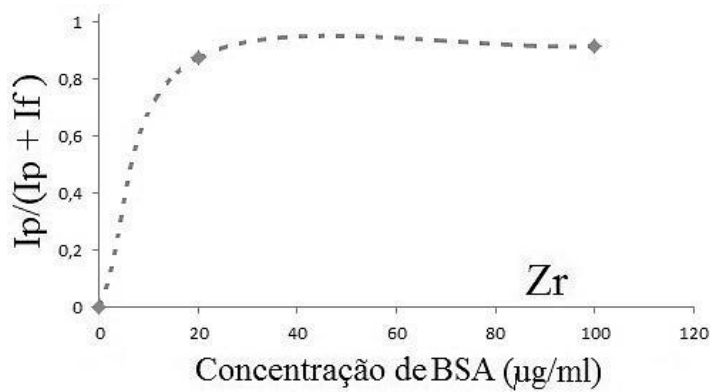


Figura 4.26 Isoterma de adsorção de BSA pra o filme de  $\text{ZrO}_2$ .

Como pode ser visto na figura 4.27, o filme de TiNbZr/SS foi o filme que apresentou a maior cobertura com albumina, aproximando-se da cobertura total (valor 1 no eixo das ordenadas). Podemos observar também que o comportamento do filme de  $\text{ZrO}_2$  foi muito parecido com o do filme de TiNbZr/SS, isso pode ser atribuído a grande presença de zircônio na superfície deste filme.

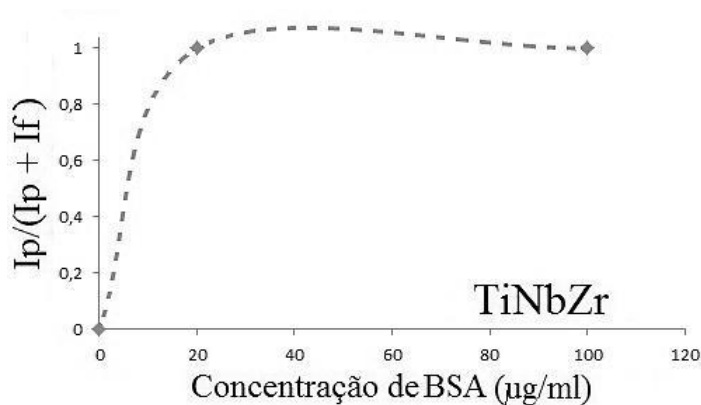


Figura 4.27 Isoterma de adsorção de BSA para o filme de TiNbZr/SS.

Uma comparação entre os dados da figura 4.28 e os dados da tabela 4.1 para a rugosidade obtida por AFM para as superfícies analisadas nos revela que o aumento na taxa de recobrimento com BSA foi proporcional ao aumento



da rugosidade das superfícies para os filmes de TiNbZr/SS,  $ZrO_2$  e  $Nb_2O_5$ . A correlação observada entre rugosidade e a adsorção de BSA sobre as superfícies pode ser explicada por uma maior área de superfície disponível. Mas as alterações nas características das cadeias laterais detectadas também fornecem informações sobre as interações físico-químicas que influenciam a adsorção desta proteína.

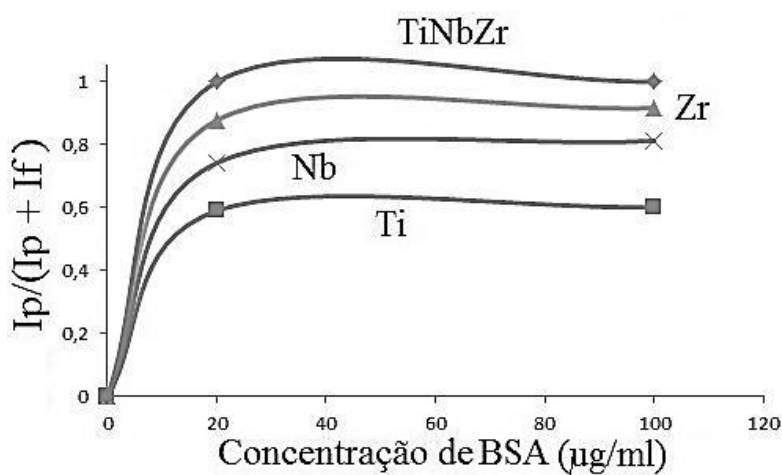


Figura 4.28 Isoterma de adsorção de BSA para todos os filmes analisados.

As superfícies que apresentaram um aumento do caráter positivamente carregado-polar na interface proteína/meio externo ( $TiNbZr/SS$ ,  $ZrO_2$  e  $Nb_2O_5$ ) obtiveram uma maior interação com a BSA, isso significa um aumento das cadeias laterais de caráter apolar na interface proteína/filme fino.

Um aumento das cadeias laterais apolares na interface proteína/filme fino é indicativo de interações hidrofóbicas entre a proteína e o filme fino. Portanto, essa maior adsorção se deve também à forte afinidade que a BSA possui por interações hidrofóbicas [102]. Assim, apesar de a rugosidade do filme de  $TiO_2$  ser maior do que a do filme de  $Nb_2O_5$ , o filme de  $TiO_2$  apresentou uma menor adsorção de BSA devido ao caráter hidrofílico/polar apresentado pela interação entre o filme de  $TiO_2$  e a BSA.

#### 4.4.1.3 Análise por AFM

A análise de AFM é importante para a visualização da proteína adsorvida e para a identificação da configuração adotada pela proteína nas diferentes superfícies. A figura 4.29 mostra as micrografias 2D (500nm x 500nm) da superfície do filme fino de  $\text{TiO}_2$  (a) antes e (b) após a adsorção de 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA. Antes da adsorção a superfície era formada por pequenos grãos de altura máxima de 10 nm entre a base do filme e o maior pico do grão. Após a adsorção podemos observar grãos maiores, que correspondem aos aglomerados de proteína com uma altura máxima de pico de 7,2 nm. A cobertura parece ser não uniforme.

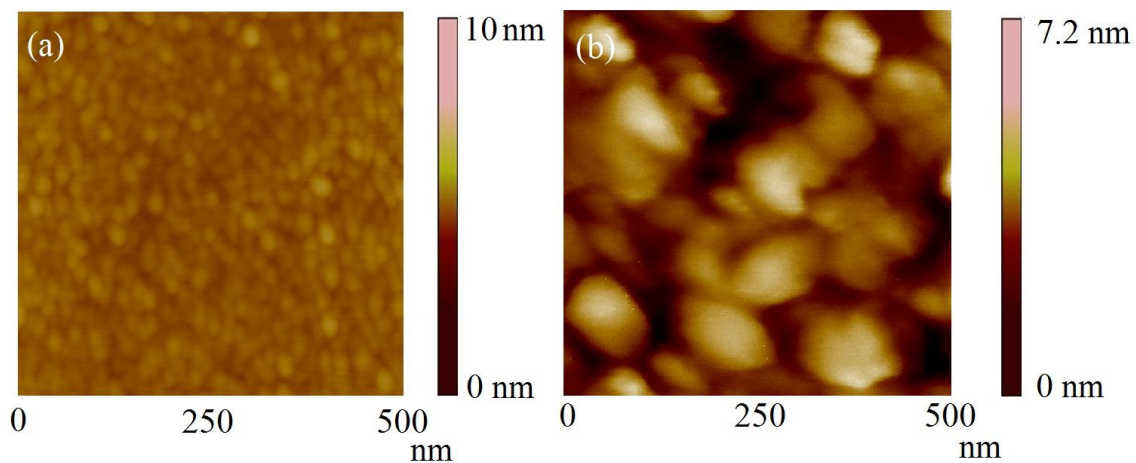


Figura 4.29 Micrografias obtidas por AFM no modo não contato da superfície do filme fino de  $\text{TiO}_2$  (a) antes e (b) após a deposição de 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA.

A figura 4.30 mostra as micrografias 2D (500nm x 500nm) da superfície do filme fino de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  (a) antes e (b) após a adsorção de 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA. Antes da adsorção a superfície era formada por pequenos grãos de altura máxima de 5 nm entre a base do filme e o maior pico do grão. Após a adsorção podemos observar uma cobertura quase totalmente uniforme, com grãos de tamanho proporcional ao do filme original, que correspondem aos aglomerados

de proteína com uma altura máxima de pico de grão de 2 nm. A BSA adsorvida parece acompanhar a topografia da superfície inicial.

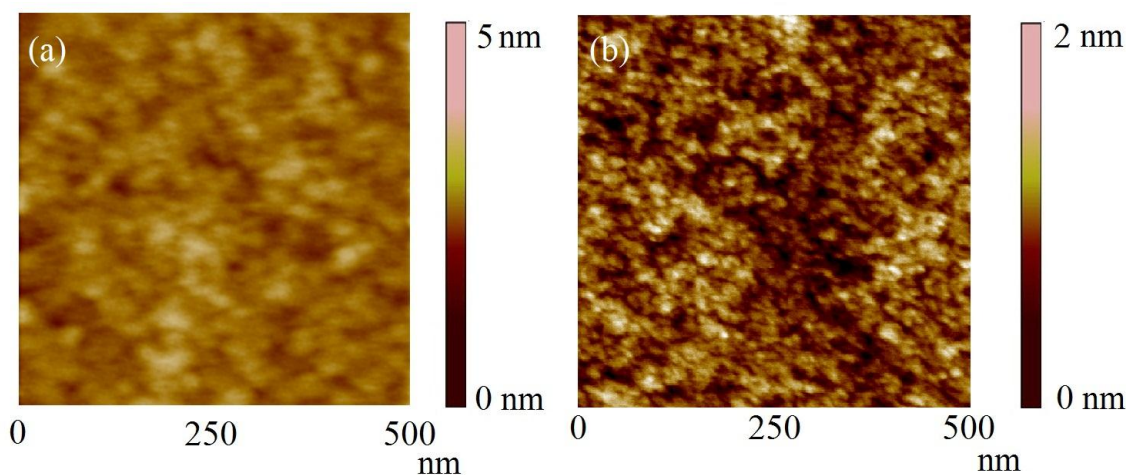


Figura 4.30 Micrografias obtidas por AFM no modo não contato da superfície do filme fino de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  (a) antes e (b) depois da deposição de 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA.

A figura 4.31 mostra as micrografias 2D (500nm x 500nm) da superfície do filme fino de  $\text{ZrO}_2$  (a) antes e (b) após a adsorção de 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA. Antes da adsorção a superfície era formada por grãos maiores do que os observados para os filmes de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e uma altura máxima de 30 nm entre a base do filme e o maior pico do grão. Após a adsorção podemos observar pequenos grãos dispersos quase uniformemente e alguns aglomerados maiores (mais claros). Estes grãos correspondem aos aglomerados de proteína com uma altura máxima de pico de 9,3 nm.

A figura 4.32 mostra as micrografias 2D (500nm x 500nm) da superfície do filme fino de TiNbZr/SS (a) antes e (b) após a adsorção de 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA. Após a adsorção de BSA o filme parece quase uniforme, indicando um bom recobrimento da superfície. A diferença entre as alturas base-pico antes e após a adsorção indica que a superfície após a adsorção da proteína se tornou menos rugosa.

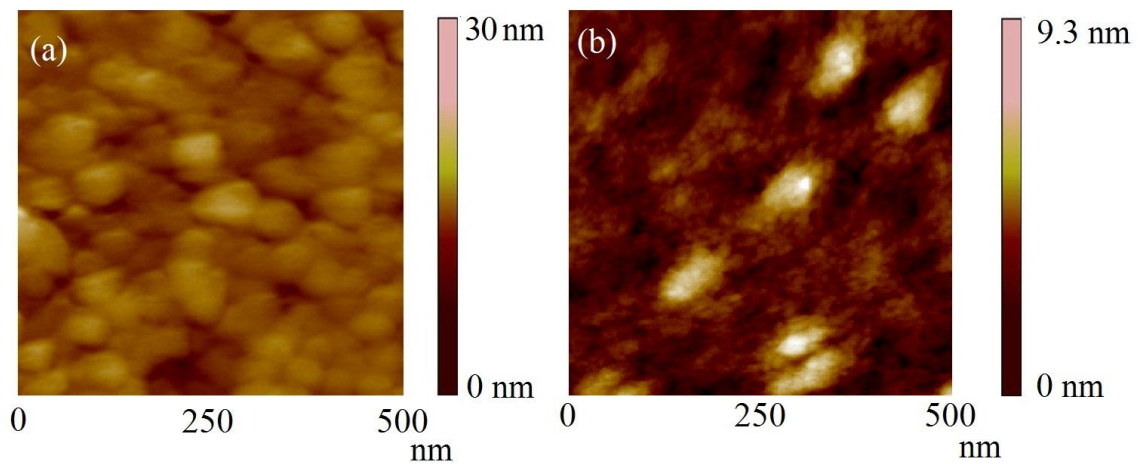


Figura 4.31 Micrografias obtidas por AFM no modo não contato da superfície do filme fino de  $ZrO_2$  (a) antes e (b) depois da deposição de  $100 \mu\text{g/ml}$  de BSA.

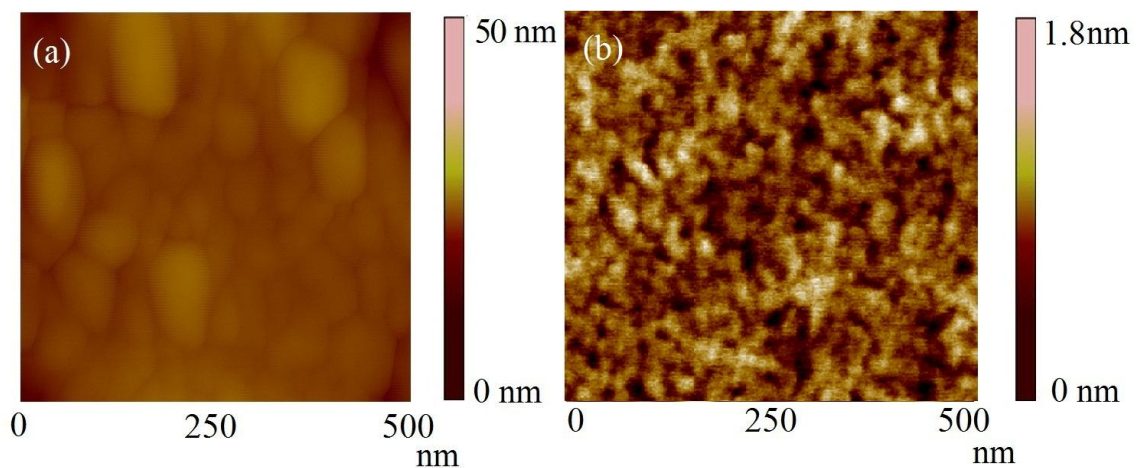


Figura 4.32 Micrografias obtidas por AFM no modo não contato da superfície do filme fino de TiNbZr/SS (a) antes e (b) depois da deposição de  $100 \mu\text{g/ml}$  de BSA.

A análise das imagens obtidas por AFM por meio de um programa específico nos forneceu os novos dados apresentados na tabela 4.6. Os parâmetros de rugosidade e tamanho de grão confirmaram a presença da BSA em todas as superfícies analisadas.

A superfície do filme de  $TiO_2$  apresentou um aumento significativo em sua rugosidade após a adsorção de BSA, sendo que a proteína adsorveu em

aglomerados de tamanho médio de 107 nm de diâmetro. Para a superfície do filme de Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, os aglomerados de BSA se formaram com um tamanho médio de 30 nm de diâmetro e, devido a pequena altura dos aglomerados, a rugosidade não sofreu um aumento tão expressivo como no caso da superfície de TiO<sub>2</sub>. Para a superfície do filme de ZrO<sub>2</sub>, temos a formação de aglomerados de BSA de aproximadamente 90 nm de diâmetro e, devido ao baixo valor das alturas destes aglomerados, o aumento da rugosidade também não foi significativo. Para a superfície do filme de TiNbZr/SS, os aglomerados de BSA acompanharam o tamanho dos grãos na superfície do filme de TiNbZr/SS, isso associado ao baixo valor da altura dos aglomerados das moléculas de BSA reduziram significativamente a rugosidade da superfície.

Tabela 4.6 Valores das rugosidades e tamanhos de grão para os filmes.

<b>Substrato</b>	<b>Rugosidade –Ra (nm)</b>	<b>Tamanho de grão (nm)</b>
TiO <sub>2</sub> sem BSA	0,21 ± 0,01	17 ± 1
TiO <sub>2</sub> com 100 µg/ml de BSA	2,8 ± 0,1	107 ± 8
Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> sem BSA	0,17 ± 0,04	13 ± 2
Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> com 100 µg/ml de BSA	0,48 ± 0,02	30 ± 5
ZrO <sub>2</sub> sem BSA	1,10 ± 0,02	35 ± 3
ZrO <sub>2</sub> com 100 µg/ml de BSA	1,8 ± 0,02	90 ± 4
Zr/Ti/Nb/SS sem BSA	3,8 ± 0,2	31 ± 5
TiNbZr/SS com 100 µg/ml de BSA	0,42 ± 0,01	47 ± 5

Todas as superfícies apresentaram aglomerados de proteína, indicando um recobrimento irregular das superfícies. Isso se deve, ao fato das superfícies não serem uniformes e existirem, portanto, locais preferenciais onde a adsorção ocorre, isso, associado a pouca mobilidade da molécula adsorvida dificultam a formação de uma camada uniforme.

As superfícies dos filmes de TiO<sub>2</sub> (figura 4.33) e de ZrO<sub>2</sub> (figuras 4.35 e 4.36) apresentaram diâmetros de moléculas adsorvidas semelhantes. O



mesmo pode ser dito das superfícies do filme de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  (figura 4.34) e do filme de  $\text{TiNbZr/SS}$  (figura 4.37).

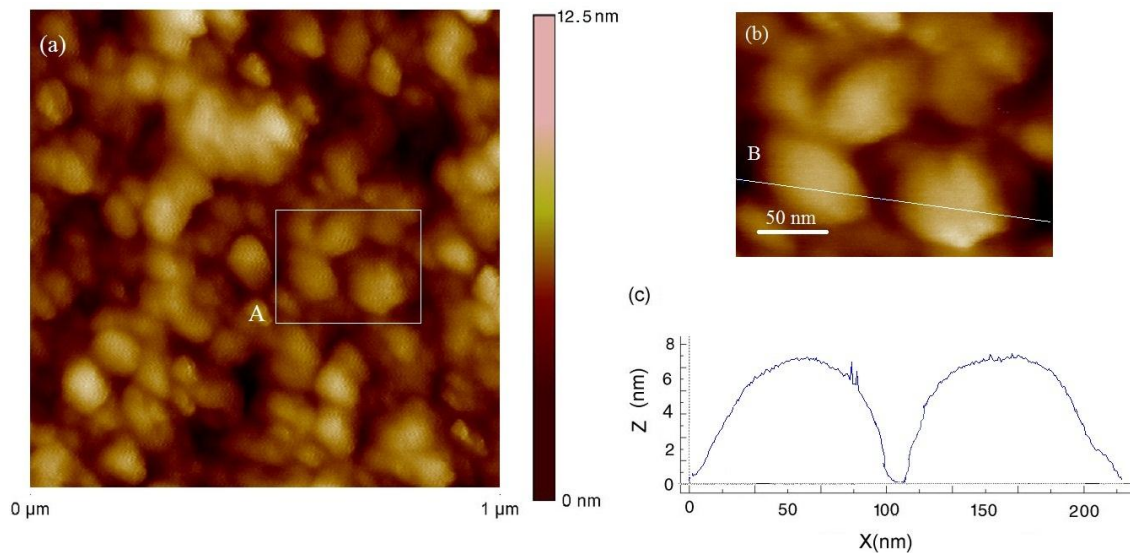


Figura 4.33 (a) Imagem 2D obtida no modo não contato para a BSA adsorvida sobre o filme de  $\text{TiO}_2$  ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ). (b) Ampliação da área A selecionada na imagem (a) onde moléculas de BSA podem ser distinguidas (c) imagem lateral de uma molécula de BSA (reta B).

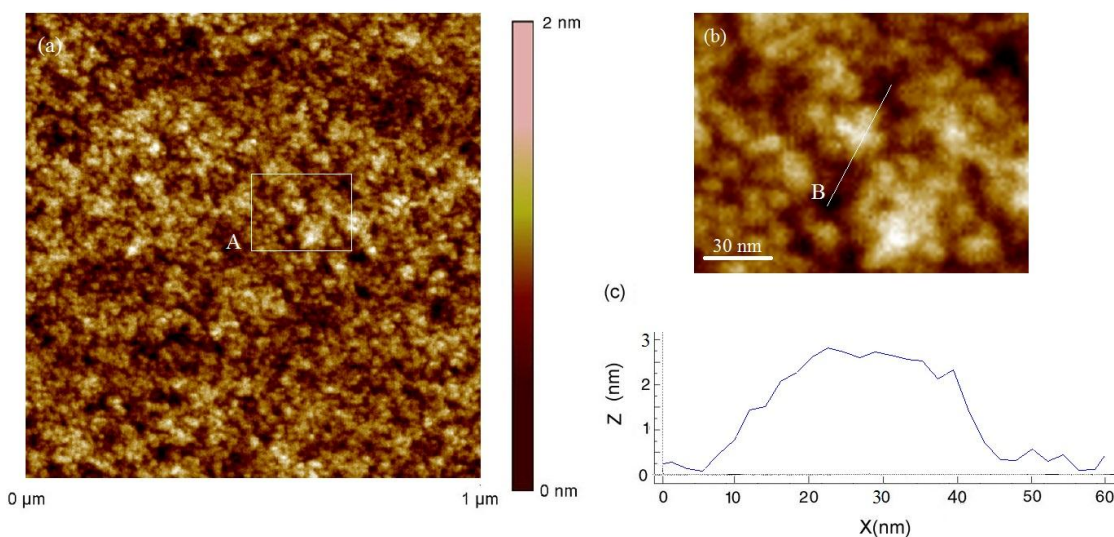


Figura 4.34 (a) Imagem 2D obtida no modo não contato para a BSA adsorvida sobre o filme de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ). (b) Ampliação da área A selecionada na imagem (a) onde moléculas de BSA podem ser distinguidas (c) imagem lateral de uma molécula de BSA (reta B).

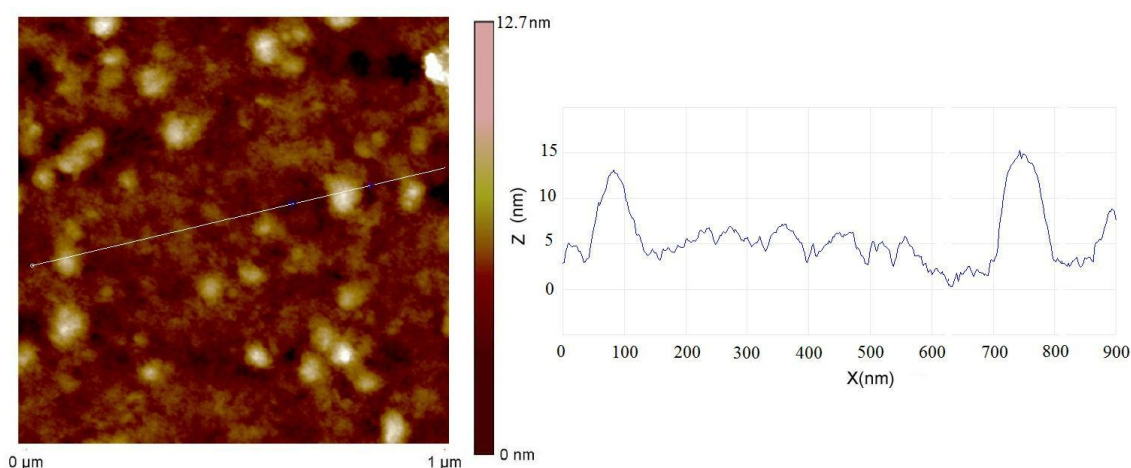
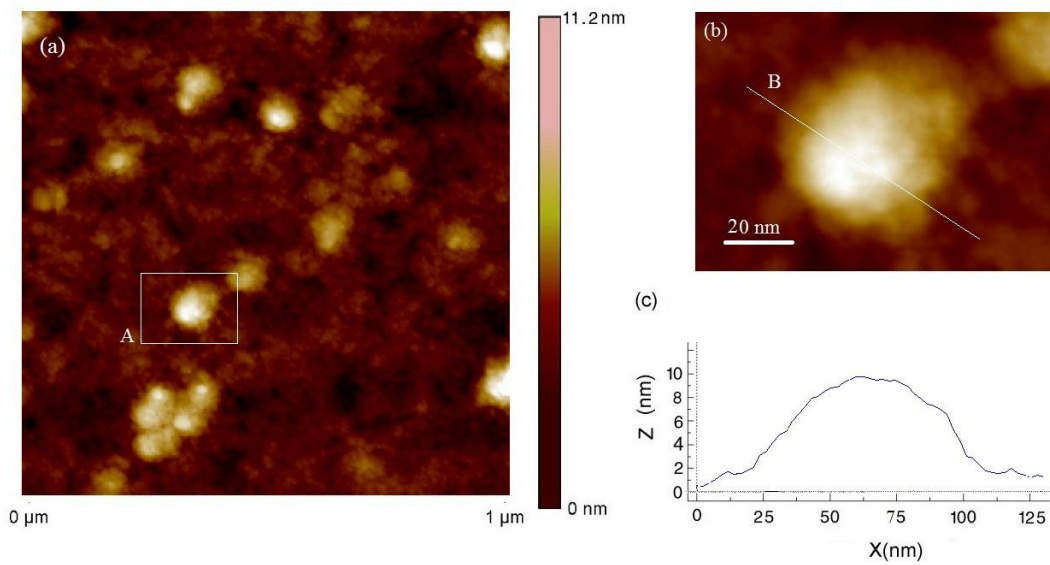


Figura 4.35 Imagem 2D obtida no modo não contato para a BSA adsorvida sobre o filme de  $ZrO_2$  ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ) mostrando a não uniformidade do filme de BSA adsorvido.

Para a superfície do filme de  $TiO_2$  (figura 4.33), as moléculas adsorvidas apresentaram aproximadamente 100 nm de diâmetro e 8 nm de altura, e para a superfície do filme de  $ZrO_2$  (figuras 4.35 e 4.36), as moléculas adsorvidas apresentaram aproximadamente 100 nm de diâmetro e altura variável: enquanto a maior parte da superfície foi recoberta com moléculas na altura de aproximadamente 5 nm (figura 4.35), alguns pontos apresentam aglomerados de 10 nm de altura (figura 4.36). Como a altura medida por AFM dos aglomerados de moléculas de BSA adsorvidas nestas duas superfícies é maior do que o tamanho da molécula da proteína (4 nm x 4 nm x 14 nm) [103], ocorreu a formação, nestas duas superfícies, de multicamadas de BSA em sua forma nativa, sendo que a adsorção sobre a superfície do filme de  $ZrO_2$  foi mais uniforme e com a formação de poucos aglomerados de multicamadas. Na superfície do filme de  $TiO_2$  houve um maior número de aglomerados de multicamadas, porém a adsorção não foi uniforme (como demonstrado pelos dados de ToF-SIMS).



Figuras 4.36 (a) Imagem 2D obtida no modo não contato para a BSA adsorvida sobre o filme de  $ZrO_2$  ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ). (b) Ampliação da área A selecionada na imagem (a) onde moléculas de BSA podem ser distinguidas (c) imagem lateral de uma molécula de BSA (reta B).

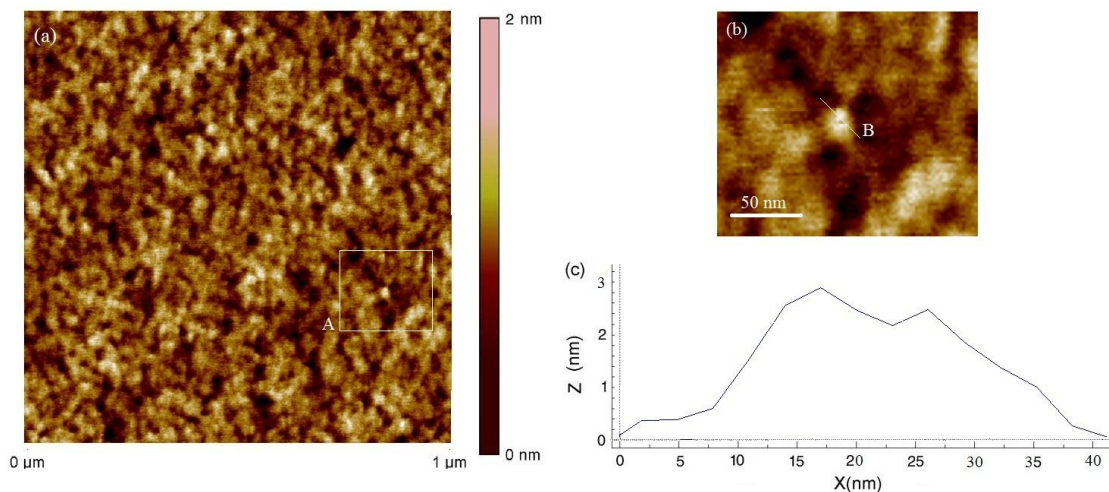


Figura 4.37 (a) Imagem 2D obtida no modo não contato para a BSA adsorvida sobre o filme de TiNbZr/SS ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ). (b) Ampliação da área A selecionada na imagem (a) onde moléculas de BSA podem ser distinguidas (c) imagem lateral de uma molécula de BSA (reta B).

Tanto a superfície do filme de  $Nb_2O_5$  (figura 4.34) quanto a superfície do filme de TiNbZr/SS (figura 4.37) apresentaram aglomerados de 40 nm de



diâmetro e 3 nm de altura. A altura da camada medida por AFM das moléculas de BSA adsorvidas nestes dois filmes é menor do que o tamanho da molécula de proteína (4 nm x 4 nm x 14 nm) [103], logo, os resultados do presente estudo apoiam a possibilidade de desnaturação (espalhamento) da proteína na superfície. Esta explicação está de acordo com outros trabalhos sobre a adsorção de proteínas leves tais como albumina (BSA e HSA) sobre  $\text{TiO}_2$  [104,105] e superfícies de outros materiais [106-111]. Mudanças conformacionais de proteínas adsorvidas em superfícies de materiais podem alterar as suas propriedades biofuncionais, eventos que são muito importantes porque eles podem posteriormente levar a uma acessibilidade ou inacessibilidade de sítios bioativos, que são ligantes para interações celulares e funções relevantes para fisiologia e patologia.

#### 4.4.2 Adsorção de Fn sobre as superfícies dos filmes finos

##### 4.4.2.1 Análise por ToF-SIMS

Esta técnica já foi descrita na seção 4.4.1.1 deste capítulo e os espectros obtidos por ToF-SIMS já foram exemplificados nas figuras 4.19 a 4.22, demonstrando a relação entre os íons secundários dos aminoácidos detectados e a relação com a carga-polaridade na interface proteína/meio externo e na interface proteína/filme fino. Dessa forma, os espectros obtidos para a Fn não serão mostrados aqui, sendo apenas descrito os resultados obtidos.

Para a Fn foram utilizadas quatro concentrações de proteína (25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  e 200  $\mu\text{g/ml}$ ) e os picos dos fragmentos de íons secundários obtidos foram identificados de acordo com os dados das tabelas 4.4 e 4.5.

Como podem ser observadas nas figuras 4.38 a 4.42, as isotermas de adsorção mostram que a quantidade de fibronectina adsorvida em todas as superfícies analisadas aumentou proporcionalmente com o aumento da

concentração de Fn em solução e um platô foi atingido para todas as superfícies, indicando que todas as superfícies analisadas possuem grande afinidade com a Fn. Observando a figura 4.42, temos que o melhor recobrimento aconteceu para o filme de  $\text{TiO}_2$ , seguido pelo filme de  $\text{ZrO}_2$  e o filme de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  foi o que teve o menor recobrimento.

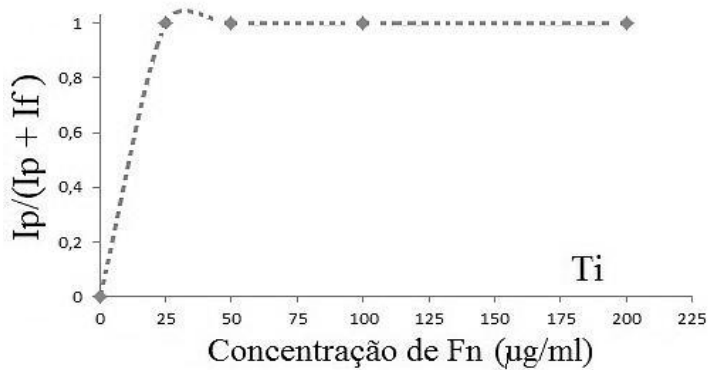


Figura 4.38 Isoterma de adsorção de Fn para o filme de  $\text{TiO}_2$ .

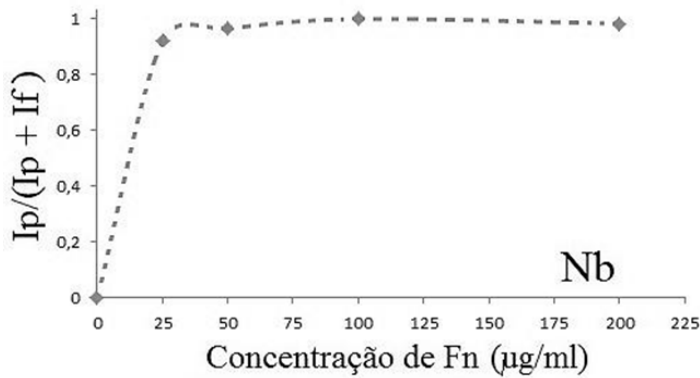


Figura 4.39 Isoterma de adsorção de Fn para o filme de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ .

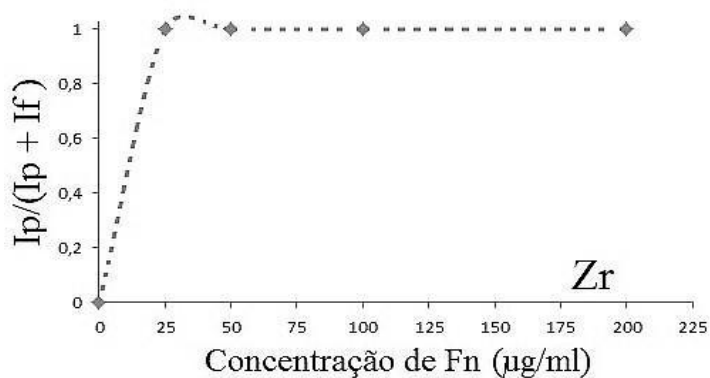


Figura 4.40 Isoterma de adsorção de Fn para o filme de  $ZrO_2$ .

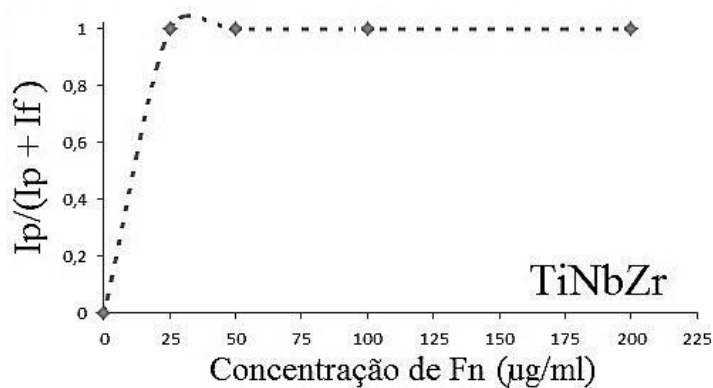


Figura 4.41 Isoterma de adsorção de Fn para o filme de TiNbZr/SS.

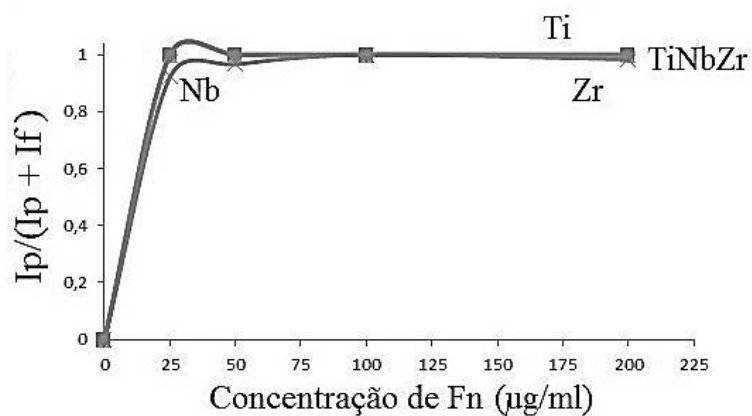


Figura 4.42 Isoterma de adsorção de Fn para todos os filmes analisados.

As alterações nos caracteres dos aminoácidos detectados (não mostrados aqui) forneceram informações sobre as interações físico-químicas

que influenciam a adsorção da Fn nestas superfícies. O aumento sucessivo na concentração de Fn adsorvida sobre o filme de  $\text{TiO}_2$  correspondeu a um aumento proporcional dos íons neutros e apolares na interface proteína/meio externo.

As cargas globais das cadeias laterais dos aminoácidos detectadas na superfície do filme de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  mostraram-se constantes durante todas as concentrações, mantendo um leve caráter positivamente carregado-polar na interface proteína/meio externo.

Para a superfície do filme de  $\text{ZrO}_2$ , o aumento na concentração de Fn correspondeu a uma redução das cadeias laterais de caráter neutro-apolar na interface proteína/meio externo e a um aumento das cadeias laterais de caráter positivamente carregado-polar na interface proteína/meio externo. Para a superfície do filme de  $\text{TiNbZr/SS}$ , o aumento na concentração de Fn correspondeu a um aumento nas cadeias laterais de caráter positivamente carregado e polar.

A interação entre a fibronectina e os filmes finos de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$  e  $\text{TiNbZr/SS}$  possui provavelmente um caráter apolar/hidrofóbico devido as cadeias laterais presentes na interface proteína/meio externo nestes filmes. No caso do filme de  $\text{TiO}_2$ , o caráter da ligação é provavelmente polar (como também foi para a BSA). A maior taxa de recobrimento para o filme de  $\text{TiO}_2$  pode ser explicada pelo fato de a Fn adsorver mais fortemente em superfícies hidrofílicas do que em superfícies hidrofóbicas [112-116], sendo provavelmente as forças hidrofílicas que governam a adsorção da Fn na superfície do filme de  $\text{TiO}_2$ . Quanto aos outros filmes finos, a adsorção aumentou com o aumento da rugosidade, sendo, portanto, os rearranjos conformacionais nas moléculas da proteína o principal fator para a alta adsorção de Fn nestas superfícies, de forma a superar quaisquer condições desfavoráveis à adsorção que poderiam ser causadas por interações apolares.

#### 4.4.2.2 Análise por XPS

A grande mudança observada nos espectros de XPS para as quatro superfícies, antes e após o contato com a molécula de fibronectina, foi a presença do pico N 1s característico da proteína, como pode ser observado na figura 4.43 para o filme de TiO<sub>2</sub>.

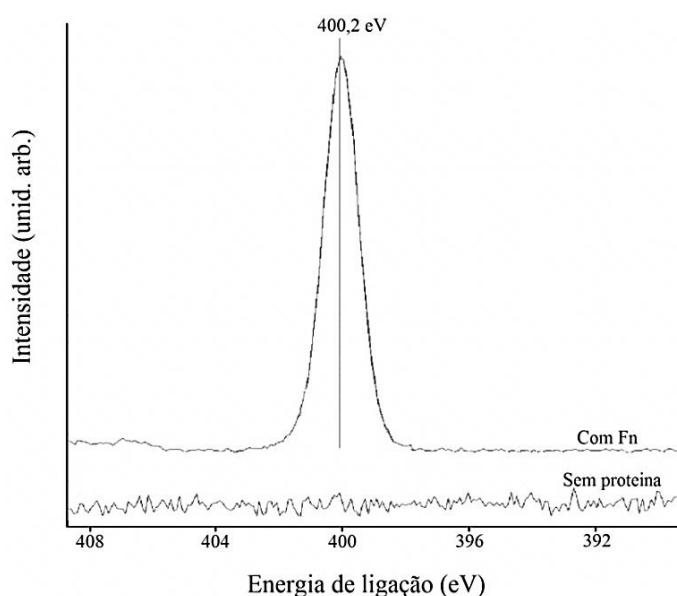


Figura 4.43 Espectro obtido por XPS de N 1s para o filme de TiO<sub>2</sub> antes e após o recobrimento com Fn.

As figuras 4.44, 4.45, 4.46 e 4.47 mostram os espectros exploratórios das superfícies dos filmes de TiO<sub>2</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ZrO<sub>2</sub> e TiNbZr/SS, respectivamente, após a adsorção de 50 µg/ml de fibronectina por 1h. Todas as superfícies analisadas apresentam carbono, oxigênio e nitrogênio após a adsorção de Fn, sendo o nitrogênio, como dito anteriormente, um indicativo da presença da proteína adsorvida. Todos os filmes apresentaram também os picos correspondentes ao metal do filme fino correspondente (Ti, Nb, Zr), demonstrando que o recobrimento não foi uniforme nesta concentração, como indicado pelas análises de ToF-SIMS (figuras 4.38 a 4.41).

O filme de TiNbZr/SS apresentou Zr em sua superfície, mas Ti e Nb não foram detectados. Os filmes de Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ZrO<sub>2</sub> e TiNbZr/SS apresentaram sódio, proveniente da solução tampão (PBS) usada para manter o pH 7,4 na solução

de Fn. Os filmes de  $ZrO_2$  e  $TiNbZr/SS$  apresentaram ainda fósforo e cloro, também provenientes da solução tampão.

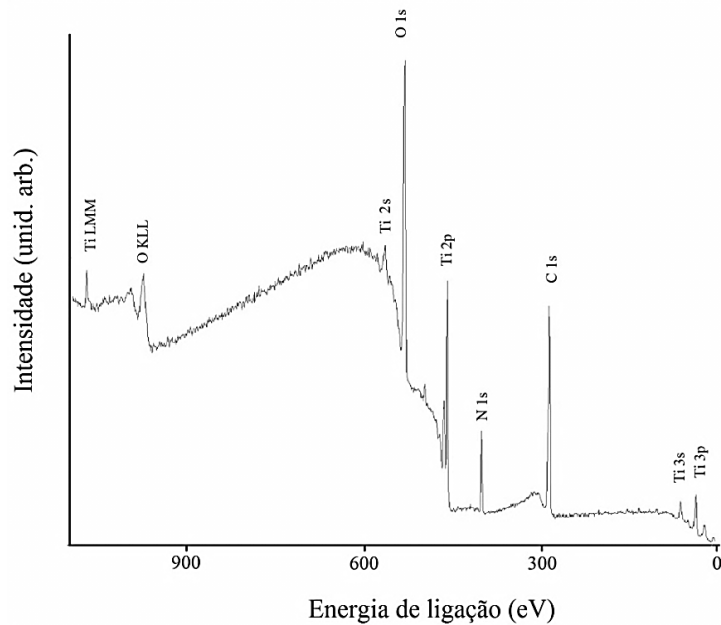


Figura 4.44 Espectro exploratório obtido por XPS do filme fino de  $TiO_2$  após a adsorção de  $50 \mu\text{g/ml}$  de fibronectina por 1h.

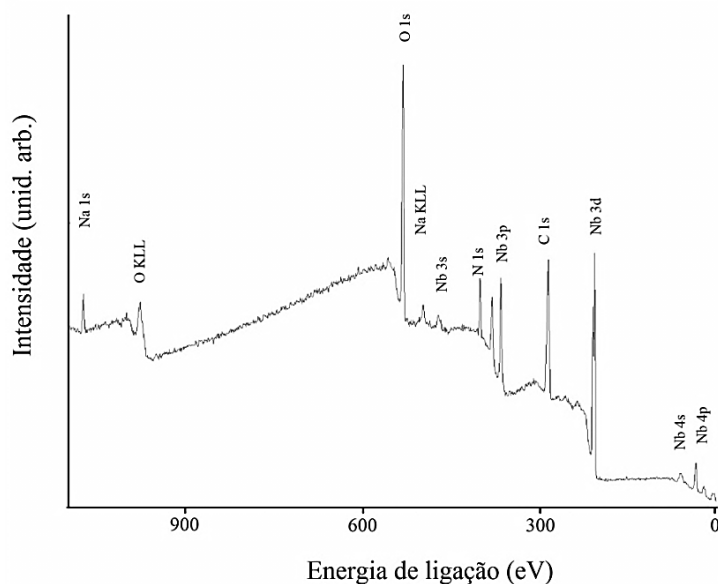


Figura 4.45 Espectro exploratório obtido por XPS do filme fino de  $Nb_2O_5$  após a adsorção de  $50 \mu\text{g/ml}$  de fibronectina por 1h.

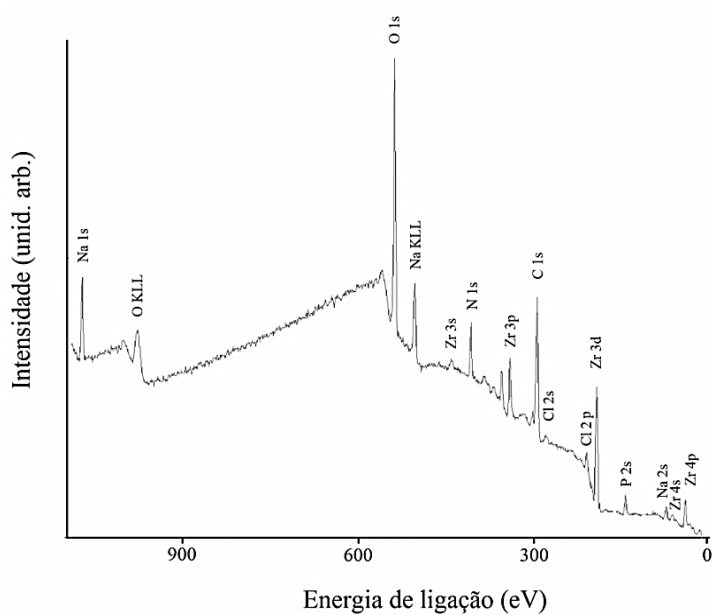


Figura 4.46 Espectro exploratório obtido por XPS do filme fino de  $ZrO_2$  após a adsorção de 50  $\mu\text{g/ml}$  de fibronectina por 1h.

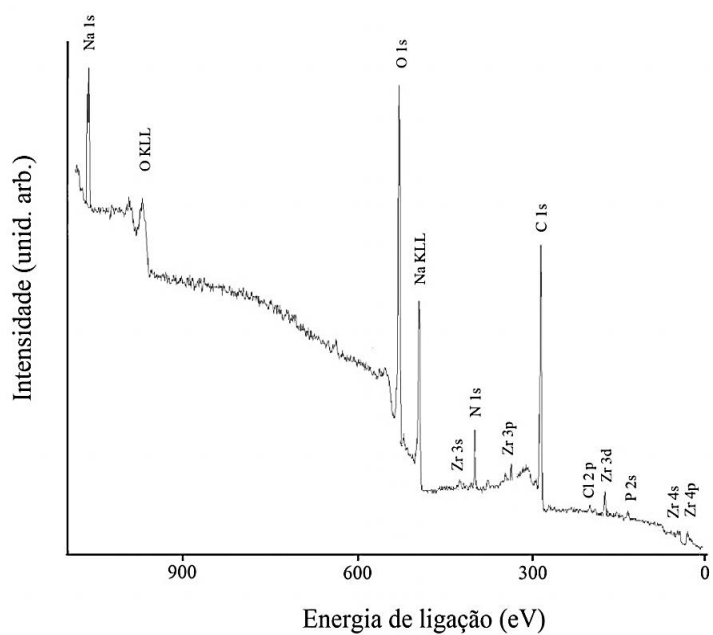


Figura 4.47 Espectro exploratório obtido por XPS do filme fino de Zr/Ti/Nb/SS após a adsorção de 50  $\mu\text{g/ml}$  de fibronectina por 1h.

Foi possível identificar dois tipos de espectros de N 1s dentre todos os filmes analisados. Um corresponde aos espectros que podem ser vistos na figura 4.43 e que foram obtidos para todas as concentrações de Fn sobre os

substratos dos filmes de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . Nestes espectros foi identificado após a adsorção de Fn apenas um pico a 400,2 eV que correspondente à ligação peptídica ( $\text{C} = \text{O}-\text{NH}$ ).

O outro tipo de espectro corresponde a figura 4.48, que representa os espectros de N 1s característicos para todas as concentrações de Fn sobre os substratos dos filmes de  $\text{ZrO}_2$  e  $\text{TiNbZr/SS}$ . Este espectro apresenta três componentes: o componente a 398,3 eV que corresponde aos grupos  $\text{NH}_2$ , o componente a 400,2 eV que corresponde à ligação peptídica, e o componente a 401,8 eV que corresponde a  $\text{NH}_3^+$ .

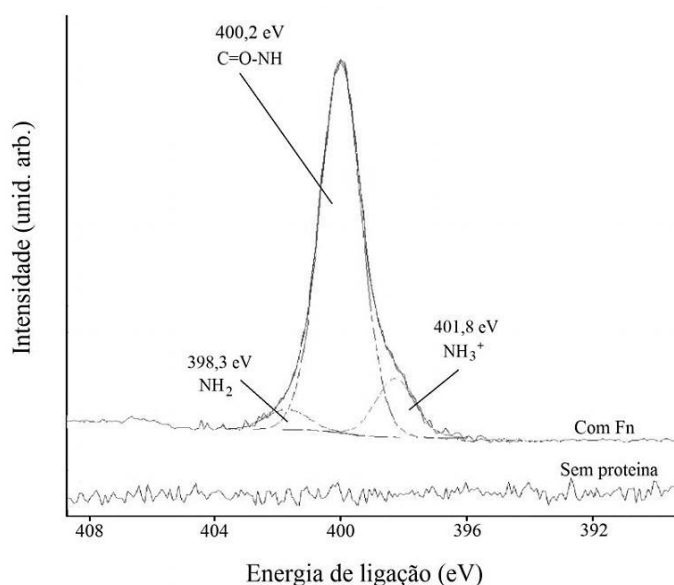


Figura 4.48 Espectros de N1s antes e após o recobrimento com Fn para o filme de  $\text{ZrO}_2$ .

A figura 4.49 ilustra como os espectros de O 1s se modificaram após a deposição da proteína usando a superfície de  $\text{TiO}_2$  como exemplo. Podemos observar que com o aumento da concentração de proteína ocorre um aumento dos picos correspondentes a Fn ligada ao oxigênio e à água adsorvida (proveniente da solução).



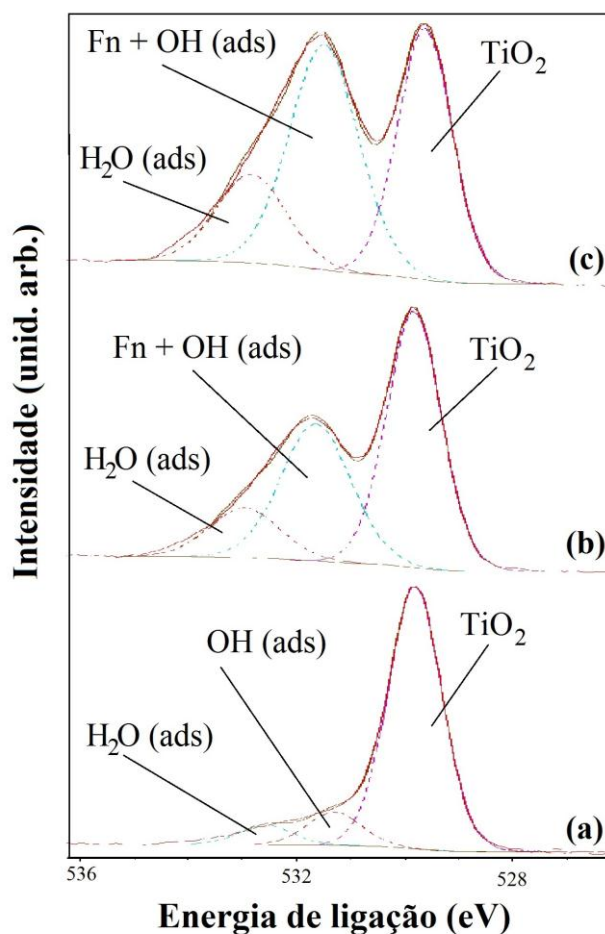


Figura 4.49 Espectros de O 1s do filme de  $\text{TiO}_2$  (a) antes da adsorção de Fn, (b) depois da adsorção de  $25 \mu\text{g/ml}$  de Fn e (c) depois da adsorção de  $200 \mu\text{g/ml}$  de Fn.

Da mesma forma, o espectro de C 1s está intimamente ligado à adsorção de proteína. Espectros típicos de C 1s podem ser vistos na figura 4.50, onde observamos dois picos após a adsorção de Fn que estão relacionados à ligação carbono-nitrogênio. O pico C 1s tem três contribuições diferentes: grupos de hidrocarbonetos saturados ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ) a  $285,0 \text{ eV}$ , grupos de amina ( $\text{CNH}$ ) a  $286,5 \text{ eV}$  e ligação peptídica ( $\text{C} = \text{O-NH}$ ) a  $288,3 \text{ eV}$ .

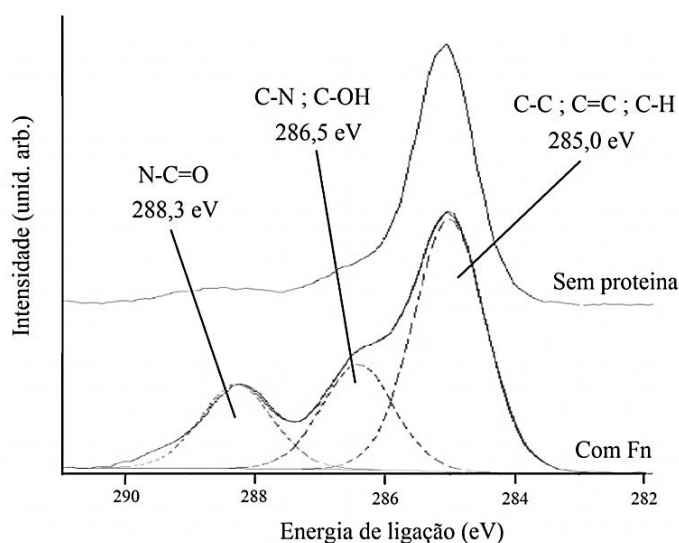


Figura 4.50 Espectros de C 1s do filme de TiO<sub>2</sub> antes e após a adsorção de Fn.

A partir dos espectros XPS de alta resolução para o C 1s e N 1s, duas relações envolvendo a adsorção de Fn podem ser calculadas e comparadas com os valores calculados a partir da distribuição teórica dos aminoácidos na molécula de Fn:

$$\frac{N}{C_{total}} \text{ e } \frac{C3}{C_{total}}$$

Onde ( $C_{total} = C1 + C2 + C3$ ), sendo  $C1 = 285 \text{ eV}$ ,  $C2 = 286,5 \text{ eV}$  e  $C3 = 288,3 \text{ eV}$ .

O valor  $\frac{N}{C_{total}}$  é uma indicação da conformação da proteína: quanto mais próximo estiver o valor calculado do valor teórico (0,27), mais próxima à conformação da proteína adsorvida estará da conformação nativa da Fn.

E o valor  $\frac{C3}{C_{total}}$  faz referência ao estado de contaminação da superfície, quanto mais próximo estiver o valor calculado do valor teórico (0,26), menor a contaminação na superfície com Fn adsorvida.

Os valores encontrados para  $\frac{N}{C_{total}}$  e  $\frac{C3}{C_{total}}$  foram estatisticamente iguais numa mesma superfície independentemente da concentração de Fn. A tabela 4.7 apresenta a média dos valores obtidos para todas as concentrações de Fn

em cada filme fino. Os valores teóricos apresentados foram calculados a partir da composição dos aminoácidos presentes na molécula da fibronectina.

Tabela 4.7 Taxas atômicas calculadas a partir das intensidades dos picos de alta resolução de C 1s e N 1s para todas as concentrações de Fn adsorvidas sobre os filmes finos.

Condição	$\frac{N}{C \text{ total}}$	$\frac{C3}{C \text{ total}}$
Valor teórico para a Fn	0,27	0,26
Fn sobre a superfície de $TiO_2$	0,17	0,18
Fn sobre a superfície de $Nb_2O_5$	0,20	0,20
Fn sobre a superfície de $ZrO_2$	0,19	0,22
Fn sobre a superfície de TiNbZr/SS	0,12	0,23

Dentre todas as moléculas de Fn adsorvidas, segundo a tabela 4.7, podemos concluir que as moléculas adsorvidas sobre a superfície de  $Nb_2O_5$  sofreram a menor alteração em sua conformação nativa. A superfície de TiNbZr/SS foi aquela na qual as moléculas de Fn sofreram a maior alteração na sua conformação e foi também a superfície que obteve o menor grau de contaminação. A superfície de  $ZrO_2$  apresentou uma mudança de conformação intermediária quando comparada aos outros filmes e baixa contaminação. A adsorção sobre a superfície do  $TiO_2$  apresentou o maior grau de contaminação e um grau de alteração na conformação da proteína apenas menor do que o obtido para o filme de TiNbZr/SS.

É sabido que a matriz extracelular (MEC) incorpora a Fn quando ela se encontra na forma flexível e estendida (auto-associada a uma densa rede fibrilar) [83], portanto, esta modificação na estrutura da Fn observada para o filme de  $TiO_2$  e TiNbZr/SS pode ser benéfica para a osseointegração, disponibilizando sítios de ligação com a superfície das células, que após a adesão na superfície do implante+Fn se diferenciarão em osteoblastos e iniciarão a formação de uma camada óssea em contato direto com o implante.

## 4.5 Estudo de uma nova liga de TiNbZr

Filmes finos de titânio-nióbio-zircônio foram produzidos a partir de alvos dos elementos puros Ti, Nb e Zr (pureza de 99,9%, diâmetro de 60 mm e espessura de 3 mm) com deposição simultânea sobre os substratos de Si(111) e de aço inoxidável 316L (SS) sobre as mesmas condições. Os substratos foram mecanicamente fixados ao catodo do sistema convencional de *DC magnetron sputtering* (Orion 8) e gás argônio (99,999% de pureza) foi utilizado como gás de pulverização catódica (*sputtering*). Os filmes foram depositados simultaneamente com potências de catodo de 380 W, para Ti, 90 W, para Nb, e 50 W, para Zr. A pressão de vácuo foi de  $5,3 \times 10^{-8}$  Pa. A espessura final do filme obtido foi de 460 nm em ambos os substratos.

### 4.5.1 Caracterização morfológica dos filmes finos de TiNbZr por AFM

As figuras 4.51 e 5.52 mostram a rugosidade e a morfologia da superfície dos filmes depositados sobre os substratos de Si(111) e de aço inoxidável, respectivamente.

É possível observar a baixa rugosidade e os tamanhos nanométricos dos grãos. A análise das imagens por meio de um programa específico nos forneceu os valores da rugosidade (Ra) e do tamanho de grão dos filmes de TiNbZr que são apresentados na Tabela 4.8.

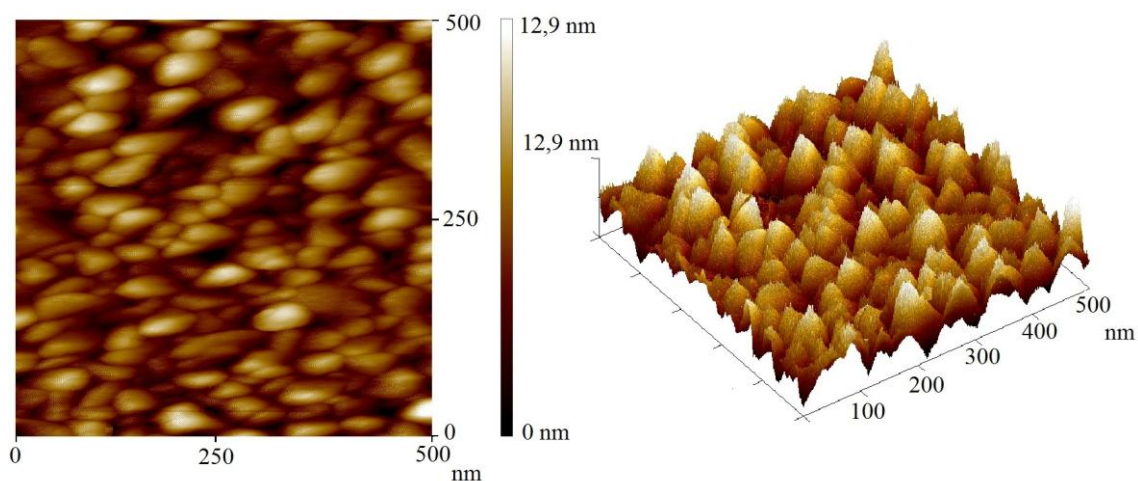


Figura 4.51 Imagens obtidas no modo não contato para o filme de TiNbZr/Si(111) (500 nm x 500 nm) (a) 2D e (b) 3D.

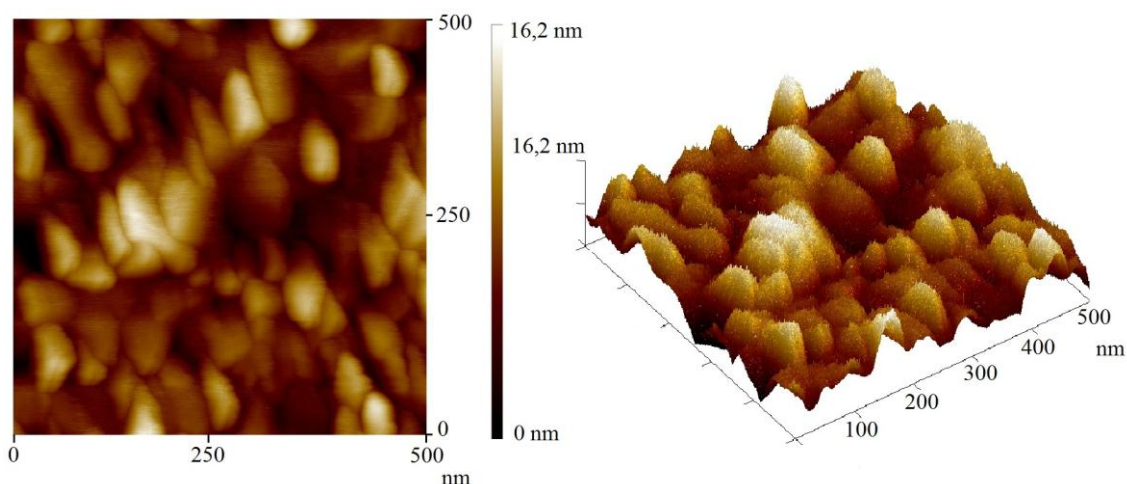


Figura 4.52 Imagens obtidas no modo não contato para o filme de TiNbZr/SS (500 nm x 500 nm) (a) 2D e (b) 3D.

Os filmes finos da deposição simultânea de Ti, Nb e Zr apresentaram tamanhos de grão maiores dos que os obtidos para os filmes de mesma composição, mas depositados em camadas, analisados na seção 4.1.1 deste trabalho.

Tabela 4.8 Valores das rugosidades e tamanhos de grão para os filmes.

Filme fino	Rugosidade - Ra (nm)	Tamanho de grão (nm)
Zr/Ti/Nb/Si	$3,0 \pm 0,4$	$53 \pm 3$
Zr/Ti/Nb/SS	$2,8 \pm 0,2$	$70 \pm 6$

Para obter a composição dos filmes, foram feitas análises de: EDS e XPS.

#### 4.5.2 Caracterização química da superfície dos filmes finos de TiNbZr

A análise por EDS forneceu a composição (em % atômica) do volume dos filmes. Os resultados estão apresentados na tabela 4.9.

Tabela 4.9 Composição (% at.) para as ligas de TiNbZr obtida por EDS

Filme	$\frac{\text{Ti}}{\text{Ti+Nb+Zr}}$	$\frac{\text{Nb}}{\text{Ti+Nb+Zr}}$	$\frac{\text{Zr}}{\text{Ti+Nb+Zr}}$
TiNbZr/Si	0,64	0,17	0,18
TiNbZr/SS	0,67	0,13	0,20

A composição volumétrica em % atômica dos filmes é de aproximadamente: Ti<sub>17</sub>Nb<sub>18</sub>Zr/Si(111) e Ti<sub>13</sub>Nb<sub>20</sub>Zr/SS.

Análises de XPS foram feitas para a obtenção da composição química da superfície dos filmes.

A figura 4.53 mostra o espectro exploratório do filme de TiNbZr/Si(111). Este espectro mostra que a superfície do filme apresenta C, O, Ti, Nb e Zr, confirmando a formação da liga. Nenhum traço do substrato foi detectado, sugerindo um bom recobrimento.

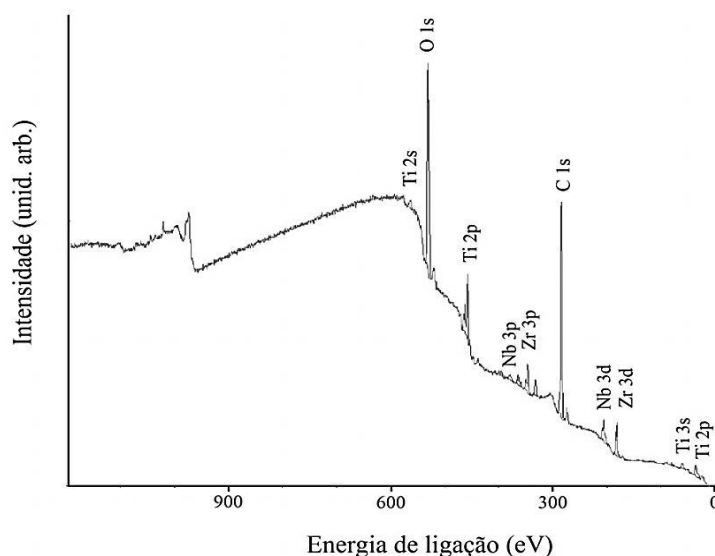


Figura 4.53 Espectro exploratório de XPS do filme de TiNbZr/Si(111).

A figura 4.54 apresenta os espectro de XPS de alta resolução para os picos de Ti 2p, Nb 3d e Zr 3d, para o filme fino de TiNbZr depositado sobre Si(111). O espectro Ti 2p (figura 4.54(a)) apresentou dois dubletos, com Ti 2p<sub>3/2</sub> a 453,9eV e 458,6 eV, correspondendo a Ti metálico e TiO<sub>2</sub>, respectivamente.

O espectro Nb 3d (figura 4.54(b)) apresentou três dubletos, com Nb 3d<sub>5/2</sub> a 202,4; 204,5 e 207,2 eV, correspondendo a Nb metálico, NbO e Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, respectivamente. O espectro Zr 3d (figura 4.54(c)) apresentou dois dubletos, com Zr 3d<sub>5/2</sub> a 182,4 eV (mais intenso) e 178,2 eV. O dubleto mais intenso corresponde a ZrO<sub>2</sub> e o dubleto de menor intensidade, a Zr metálico.

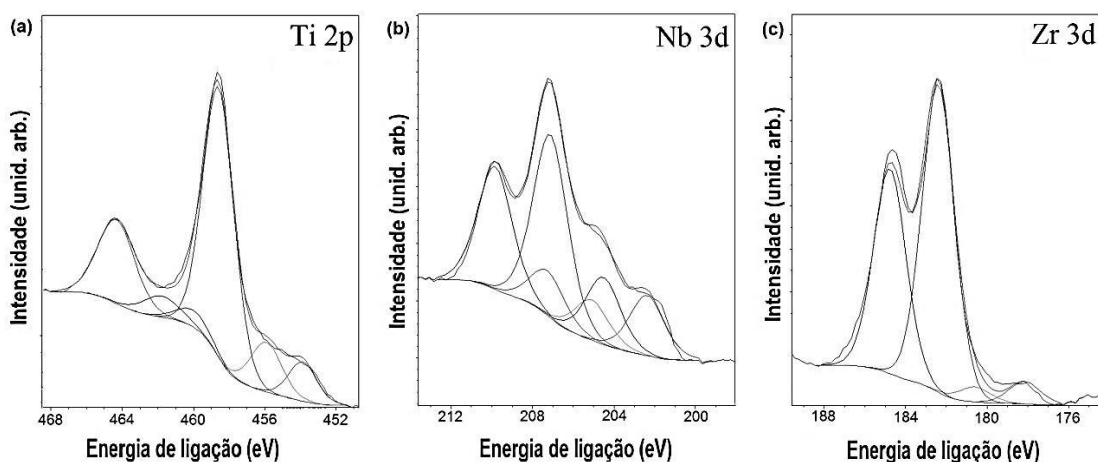


Figura 4.54 Espectros de XPS do filme de TiNbZr/Si(111): (a) Ti 2p, (b) Nb 3d e (c) Zr 3d.

A figura 4.55 apresenta o espectro exploratório do filme de TiNbZr/SS. Como ocorreu com a análise do filme anterior, este espectro mostra que a superfície do filme apresenta C, O, Ti, Nb e Zr, confirmando a formação da liga. Nenhum traço do substrato foi detectado, sugerindo um bom recobrimento.

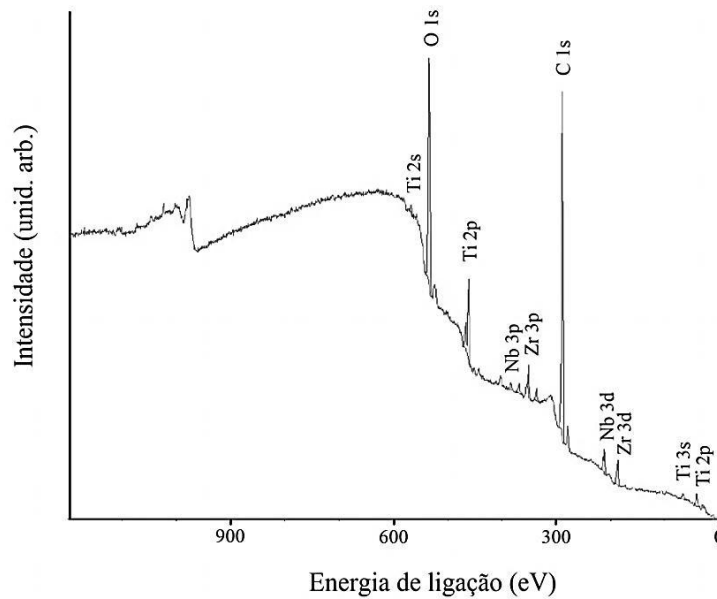


Figura 4.55 Espectro exploratório de XPS do filme de TiNbZr/SS.

A figura 4.56 apresenta o espectro de XPS de alta resolução para os picos de Ti 2p, Nb 3d e Zr 3d, para o filme fino de TiNbZr depositado sobre SS. O espectro Ti 2p (Fig. 4.56(a)) apresentou dois dubletos, com Ti 2p<sub>3/2</sub> a 453,8 e 458,6 eV, que estão associados a Ti metálico e TiO<sub>2</sub>, respectivamente.



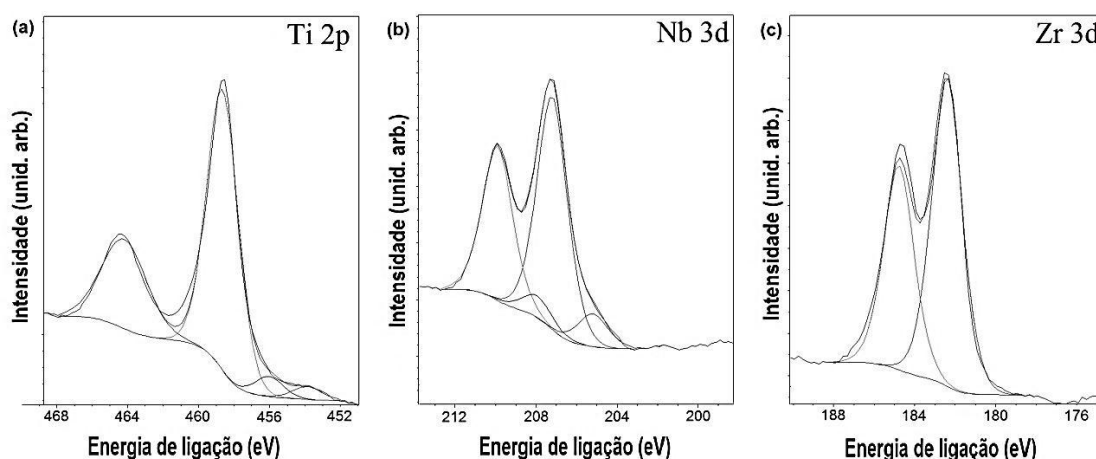


Figura 4.56 Espectros de XPS do filme de TiNbZr/SS: (a) Ti 2p, (b) Nb 3d e (c) Zr 3d.

O espectro Nb 3d (Fig. 4.56(b)) apresentou dois dubletos, com Nb 3d<sub>5/2</sub> a 205,2 e 207,2 eV, que são atribuídos a NbO<sub>2</sub> e Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. O espectro de Zr 3d apresentou apenas um dubleto, com Zr 3d<sub>5/2</sub> a 182,4 eV, que corresponde a ZrO<sub>2</sub>.

A Tabela 4.10 apresenta as taxas atômicas: Ti/(Ti+Nb+Zr), Nb/(Ti+Nb+Zr) e Zr/(Ti+Nb+Zr) para os filmes de TiNbZr depositados sobre substratos de Si(111) e SS. De acordo com a tabela 4.10, podemos inferir que nas superfícies dos filmes as composições (em % atômica) aproximadas são Ti30Nb20Zr/Si(111) e Ti16Nb21Zr/SS.

Tabela 4.10 Razões atômicas (% at.) obtida por XPS para os filmes de TiNbZr depositados sobre Si(111) e aço inoxidável.

Filme	$\frac{\text{Ti}}{\text{Ti+Nb+Zr}}$	$\frac{\text{Nb}}{\text{Ti+Nb+Zr}}$	$\frac{\text{Zr}}{\text{Ti+Nb+Zr}}$
TiNbZr/Si(111)	0,50	0,30	0,20
TiNbZr/SS	0,63	0,16	0,21

As duas ligas produzidas apresentaram grãos nanométricos e uma elevada área superficial, o que pode ser promissor na área de biomateriais devido a maior energia para realizar ligações com as proteínas da MEC.



## 5 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

- Os filmes produzidos apresentaram as composições químicas esperadas:  $\text{TiO}_2/\text{Si}(111)$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{Si}(111)$ ,  $\text{ZrO}_2/\text{Si}(111)$  e  $\text{TiNbZr/SS}$ . O tratamento térmico empregado foi eficiente para a homogeneização do filme de  $\text{Zr/Ti/Nb}$  depositado sobre aço mas não foi eficiente para a deposição deste filme sobre o substrato de silício. Uma possível solução para evitar o superaquecimento do substrato de silício seria um aquecimento feito com uma taxa de aquecimento menor ( $^\circ\text{C/s}$ ).
- Todos os filmes finos produzidos neste trabalho apresentaram tamanhos de grão nanométricos, o que produz partículas de desgaste não imunorreativas, melhorando a biocompatibilidade do implante recoberto. O tamanho de grão nanoestruturado pode ainda favorecer a adesão de osteoblastos, responsáveis pela formação do osso e desfavorecer a adesão de fibroblastos, responsáveis pelo encapsulamento do implante.
- Todos os filmes apresentaram valores de módulos de elasticidade inferiores aos obtidos para o aço inoxidável 316L e ligas cobalto-cromo. O valor da dureza obtida para os filmes foi maior do que a dureza do titânio comercialmente puro, de ligas tradicionais de titânio como  $\text{Ti6Al4V}$  e do aço inoxidável 316L, sendo somente comparável à dureza de aços inoxidáveis 316L nitretados. Estes valores de módulos de elasticidade menores e de durezas maiores obtidos favorecem uma transferência mais efetiva das cargas funcionais entre o osso e o implante e protegem o implante da formação de partículas de desgaste.
- O filme de  $\text{TiNbZr}$  foi o filme que apresentou maior afinidade com a BSA, sendo este o filme de recobrimento mais indicado para aplicações onde a adesão de coágulos deve ser evitada, como em marca-passos, stents e válvulas cardíacas.

- O filme de  $\text{TiO}_2$  foi o filme que apresentou maior afinidade com a Fn, embora todos os filmes analisados tenham apresentado alta afinidade com esta proteína, e por isso, todos são indicados para aplicações ortopédicas e odontológicas onde a adesão de osteoblastos na superfície do implante e conseqüentemente a osseointegração são desejáveis.
- Os filmes das ligas de TiNbZr, depositadas simultaneamente, também apresentaram propriedades morfológicas e químicas adequadas para o recobrimento de implantes, possuindo uma elevada área superficial, o que pode ser promissor na área de biomateriais devido a maior energia para realizar ligações com as proteínas da MEC.

## 6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Produzir modificações morfológicas por ablação a laser em superfícies de aço 316L e ligas TiAlV e recobri-las com a liga TiNbZr e a liga TiNb a fim de determinar um modelo de recobrimento.

Estudar as deposições de fibronectina e albumina sobre a superfície dessas ligas individualmente e simultaneamente em várias concentrações a fim de aprofundar o entendimento sobre a relação entre as propriedades de superfície e a adsorção de proteínas.

Realizar testes de biocompatibilidade *in vitro* (com a adesão de células epiteliais, plaquetas e bactérias) nessas superfícies com e sem a adsorção de proteínas.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HELMUS, M.N.; TWEDEN, K. In Wise, Donald (Ed.). Materials selection for medical devices. Encyclopedic Handbook of Biomaterials. New York: Marcel Dekker, Inc. chap. 2, 1995.
- [2] GEETHA, M.; SINGH, A.K.; MURALEEDHARAN, K.; GOGIA, A.K.; ASOKAMANI, R. Effect of thermo mechanical processing on microstructure of a Ti-13Nb-13Zr alloy. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 329, p. 264-271, 2001.
- [3] GEETHA, M.; SINGH, A.K.; GOGIA, A.K.; ASOKAMANI, R. Effect of thermomechanical processing on evolution of various phases in Ti-Nb-Zr alloys. *Journal of Alloys and Compounds*. v. 384, p. 131-144, 2004.
- [4] YOSHIMITSU, O.; EMIKO, G. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro, *Biomaterials*, v. 26, p.11–21, 2005.
- [5] NIINOMI, M. Recent metallic materials for biomedical applications. *Metallurgical and Materials Transactions B*, 32A, p. 477–486, 2001.
- [6] RIGUETTI, G.R.P. Caracterização de ligas à base de titânio com adição de Nb, Zr, Pd para finalidades biomédicas. Dissertação de mestrado, PPGEMM/UFRJ, 2005.
- [7] MERTMANN, M. NiTi: The new material for implants and instruments, *Technology & Services*, 2000.
- [8] DISEGI, J.A.; ESCHBACH, L. Stainless steel in bone surgery. *Journal of the care of the injured*, v. 31, p. D2-D6, 2000.
- [9] PEREIRA, M.L.; SILVA, A.; TRACANA, R.; CARVALHO, G.S. Toxic effects caused by stainless steel corrosion products on mouse seminiferous cells. *Cytobios*, v. 77, p.73-80, 1994.

- [10] NIINOMI, M. "Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods", *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 4, pp. 445-454, 2003.
- [11] SYKARAS, N.; LACOPINO, A. M.; MARKER, V. A.; TRIPLETT, R. G.; WOODY, R. D. Implant Materials, Designs and Surfaces Topographies: Their effect on Osseo integration. A Literature Review. *Oral Maxillofacial Implants*, v. 15, p.675-690, 2000.
- [12] LONG, M.; RACK, H. J. Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective. *Biomaterials*, v.19 (18), p.1621-1639, 1998.
- [13] DONATO, T.A.G.; ALMEIDA, L. H.; NOGUEIRA, R.A; NIEMEYER, T.C; GRANDINI, C. R.; CARAM, R.; SCHNEIDER, S.G.; SANTOS, A.R. Cytotoxicity study of some Ti alloys used as biomaterial, *Journal Materials Science and Engineering C*, v. 29, p. 1365–1369, 2009.
- [14] GEETHA, M.; SINGH, A.K.; ASOKAMANI, R.; GOGIA, A.K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopedic implants – a review, *Progress in Materials Science*, v. 54 (3), p. 397- 425, 2009.
- [15] LIU, X.; CHU, P.K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v.27, n.3-4, p.49-121, 2004.
- [16] LIU, Y. Lamellar spacing and mechanical property of undercooled Ti–45Al–2Cr–2Nb alloy, *Materials. Letters*, v. 57, p. 2262-2266, 2003.
- [17] NIEMEYER, T.C.; GRANDINI, C.R.; FLORÊNCIO, O.; SCHNEIDER, S.G. Atrito interno em baixa temperatura para amostras da liga Ti-13Nb-13Zr usadas como biomaterial. *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo*, v. 25 (2), p. 89-91, 2006.
- [18] MISHRA, A.K.; DAVIDSON, J.A.; KOVACS, P.; POGGIE, R.A. Ti-13Nb-3Zr: a new low modulus, high strength, corrosion resistant near-beta alloy for orthopedic implants. *The Minerals Metals & Materials Society*, p. 61-72, 1993.



- [19] SONG, Y.; XU, D.S.; YANG, R.; LI, D.; WU, W.T.; GUO, Z.X. Theoretical study of the effects of alloying elements on the strength and modulus of  $\beta$ -type bio-titanium alloys, *Materials Science and Engineering A*, 260, p. 269-274, 1999.
- [20] LAVOS-VALERETO, I.C.; WOLYNEC, S.; RAMIRES, I.; GUASTALDI, A.C.; COSTA, I. J. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of passive film formed on implant Ti–6Al–7Nb alloy in Hank's solution, *Journal of Materials Science: Materials Medicine*, v. 15, n.1, p. 55-59, 2004.
- [21] AGUILAR MAYA, A.E.; GRANA, D.R.; HAZARABEDIAN, A.; KOKUBU, G.A.; LUPPO, M.I.; VIGNA, G. Zr–Ti–Nb porous alloys for biomedical application, *Materials Science and Engineering C*, v. 32 (2), p. 321–329, 2012.
- [22] ELIAS, L.M.; SCHNEIDER, S.G.; SCHNEIDER, S.; SILVA, H.M.; MALVISI, F. Microstructural and mechanical characterization of biomedical Ti–Nb–Zr(–Ta) alloys, *Materials Science and Engineering A*, v. 432 (1–2), p. 108–112, 2006.
- [23] TANG, X.; AHMED, T.; RACK, H.J. Phase transformations in Ti-Nb-Ta and Ti-Nb-Ta-Zr alloys. *Journal Materials Science*, v. 35, p. 1805-1811, 2000.
- [24] BANIA, P.J. Beta titanium alloys and their role in the titanium industry. *Journal of Metals*, v.46, n.7, p.16-19, 1994.
- [25] McMAHON, R.E.; MA, J.; VERKHOTUROV, S.V.; MUNOZ-PINTO, D.; KARAMAN, I.; RUBITSCHKEK, F.; MAIER, H. J.; HAHN M.S. A comparative study of the cytotoxicity and corrosion resistance of nickel–titanium and titanium-niobium shape memory alloys, *Acta Biomaterialia*, v. 8 (7), p. 2863-2870, 2012.
- [26] HABAZAKI, H.; YAMASAKI, M.; OGASAWARA, T.; FUSHIMI, K.; KONNO, H.; SHIMIZU, K.; IZUMI, T.; MATSUOKA, R.; SKELDON, P.; THOMPSON, G.E. Thermal degradation of anodic niobia on niobium and oxygen-containing niobium, *Thin Solid Films*, v. 516 (6), p. 991-998, 2008.

- [27] GODLEY, R., STAROSVETSKY, D., GOTMAN, I. Bonelike apatite formation on niobium metal treated in aqueous NaOH. *Materials Science*, v. 15, p. 1073–1077, 2004.
- [28] O'BRIEN, B.J.; STINSON, J.S.; CAROLL, W.M. Development of a new niobium-based alloy for vascular stent applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 1, p. 303–312, 2008.
- [29] DICKERSON, S.L., GIBELING, J.C. Low cycle fatigue of niobium–zirconium and niobium–zirconium–carbon alloys. *Materials Science and Engineering A*, v. 278, p. 121–134, 2000.
- [30] ASSELIN, E., AHMED, T.M., ALFANTAZI, A. Corrosion of niobium in sulphuric and hydrochloric acid solutions at 75 and 95°C. *Corrosion Science*, v. 49, p. 694–710, 2007.
- [31] RAMÍREZ, G.; RODIL, S.E.; ARZATE, H.; MUHL, S.; OLAYA, J.J. Niobium based coatings for dental implants, *Applied Surface Science*, v. 257 (7), p. 2555-2559, 2011.
- [32] MATSUNO, H.; YOKOYAMA, A.; WATARI, F.; UO, M.; KAWASAKI, T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium, *Biomaterials*, v. 22, p. 1253–1262, 2001.
- [33] TAMILSELVI, S.; RAMAN, V.; RAJENDRAN, N. Corrosion behaviour of Ti–6Al–7Nb and Ti–6Al–4V ELI alloys in the simulated body fluid solution by electrochemical impedance spectroscopy, *Electrochimica Acta*, v. 52, p. 839–846, 2006.
- [34] OKAZAKI, Y.; GOTOH, E.; MANABE, T.; KOBAYASHI, K. Comparison of metal concentrations in rat tibia tissues with various metallic implants, *Biomaterials*, v. 25, p. 5913–5920, 2004.

- [35] CONTU, F.; ELSENER, B.; BÖHNI, H. Serum effect on the electrochemical behavior of titanium, Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys in sulphuric acid and sodium hydroxide, *Corrosion Science*, v. 46, p. 2241–2254, 2004.
- [36] SAJI, V.S.; CHOE, H.C. Electrochemical corrosion behavior of nanotubular Ti–13Nb–13Zr alloy in Ringer’s solution, *Corrosion Science*, v. 51, p. 1658–1663, 2009.
- [37] OKAZAKI, Y.; NISHIMURA, E.; NAKADA, H.; KOBAYASHI, K. Surface analysis of Ti–15Zr– 4Nb–4Ta alloy after implantation in rat tibia, *Biomaterials*, v. 22, p. 599–607, 2001.
- [38] CVIJOVIĆ-ALAGIĆ, I.; CVIJOVIĆ, Z.; MITROVIĆ, S.; PANIĆ, V.; RAKIN, M. Wear and corrosion behavior of Ti–13Nb–13Zr and Ti–6Al–4V alloys in simulated physiological solution, *Corrosion Science*, v. 53, p. 796–808, 2011.
- [39] SEMLITSCH, M.F.; WEBER, H.; STREICHER, R.M.; SCHÖN, R. Joint replacement components made of hot-forged and surface treated Ti-6Al-7Nb alloy. *Biomaterials*, v. 13, p. 781-788, 1992.
- [40] GODMANN, S.B.; DAVIDSON, J.A.; FORNASIER, V.L.; MISHRA, A.K. Histological response to cylinders of a low modulus Titanium alloy (Ti-13Nb-13Zr) and a wear resistant Zirconium alloy (Zr-2.5Nb) implanted in the rabbit tibia. *Journal of Applied Biomaterials*, v. 4, p. 331-339, 1993.
- [41] METIKOŠ-HUKOVIĆ, M.; KWOKAL, A.; PILJAC, J. The influence of niobium and vanadium on passivity of titanium-based implants in physiological solution. *Biomaterials*, v. 24, p. 3765-3775, 2003.
- [42] EISENBARTH, E.; VELTEN, D.; MÜLLER, M.; THULL, R.; BREME, J. Biocompatibility of  $\beta$ -stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials*, v. 25 (26), p. 5705-5713, 2004.
- [43] HANAHA, T. Evaluation techniques of metallic biomaterials in vitro, *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 3, p. 289–295, 2002.

- [44] HANAHA, T. Metal ion release from metal implants, *Materials Science & Engineering C*, v. 24, p. 745–752, 2004.
- [45] BARDWELL, J.A.; McKUBRE, M.C.H. AC Impedance spectroscopy of the anodic film on zirconium in neutral solution, *Electrochimica Acta*, v. 36 (3-4), p. 647–653, 1991.
- [46] MEISTERJAHN, P.; HOPPE, H.W.; SHULTZE, J.W. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 217, p. 159–185, 1987.
- [47] KOHN, D. H. Metals in medical applications, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, v. 3 (3), p. 309-316, 1998.
- [48] HIROMOTO, S.; HANAHA, T. Re-passivation current of amorphous Zr<sub>65</sub>Al<sub>7.5</sub>Ni<sub>10</sub>Cu<sub>17.5</sub> alloy in a Hanks' balanced solution, *Electrochimica Acta*, v. 47 (9), p. 1343-1349, 2002.
- [49] HANAHA, T. In vivo metallic biomaterials and surface modification, *Mater. Sci. Eng. A*, v. 267, p. 260-266, 1999.
- [50] PREUSSER, S.; STIMMING, U.; WIPPERMANN, K. An optical and electrochemical investigation of ZrO<sub>2</sub> thin films (from NM to MM thickness), *Electrochimica Acta*, v. 39 (8-9), p. 1273–1280, 1994.
- [51] GONZALEZ, J.E.G.; MIRZA-ROSCA, J.C. Study of the corrosion behavior of titanium and some of its alloys for biomedical and dental implant applications, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 471 (2), p. 109-115, 1999.
- [52] WEN, C.E.; YAMADA, Y.; HODGSON, P.D. Fabrication of novel TiZr alloy foams for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C*, v. 2, p. 1439-1444, 2006.
- [53] OKAZAKI, Y.; RAO, S.; TATEISHI, T.; ITO, Y. Cytocompatibility of various metal and development of new titanium alloys for medical implants, *Materials Science and Engineering A*, v. 243, p. 250-256, 1998.

- [54] CABRINI, R.L.; GUGLIELMOTTI, M.B.; ALMAGRO, J.C.; Histomorphometry of initial bone healing around zirconium implants in rats. *Implant Dental*, v. 2, p. 207-264, 1993.
- [55] GUGLIELMOTTI, M.B.; GUERRERO, C.; CABRINI, R.L. Chronodynamic evaluation of the stages of osseointegration in zirconium laminar implants. *Acta Odontológica Latinoamericana*, v. 10, p. 11–23, 1997.
- [56] GUGLIELMOTTI, M.B.; RENO, S.; CABRINI, R.L. A histomorphometric study of tissue interface by laminar implant test in rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 14, p. 565–570, 1999.
- [57] KULAKOV, O.B.; DOKTOROV, A.A.; D'IAKOVA, S.V.; DENISOV-NIKOL'SKII, I.U.I.; GROTZ, K.A. Experimental study of osseointegration of zirconium and titanium dental implants. *Morfologiya*, v. 27, p. 5–52, 2005.
- [58] HUANG, B.X.; KIM, H.Y.; DASS, C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 15, p. 1237-1247, 2004.
- [59] PETERS, T. All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. San Diego, CA: Academic Publishers; 1996.
- [60] FOSTER, J.F. Albumin structure, function and uses. Pergamon: Oxford, 1977.
- [61] CARTER, D.C.; HE, X.M.; MUNSON, S.H.; TWIGG, P.D.; GERNER, K.M.; BROOM, M.B.; MILLER, T.Y. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science*, v. 244, p. 1195-1198, 1989.
- [62] PATRA, S.; SANTHOSH, K.; PABBATHI, A.; SAMANTA, A. Diffusion of organic dyes in bovine serum albumin solution studied by fluorescence correlation spectroscopy, *RSC Advances*, 2012.
- [63] TANG, L.P.; EATON, J.W. Inflammatory Responses to Biomaterials. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 103 (4), p. 466-471, 1995.

- [64] TANG, L.P.; EATON, J.W. Natural responses to unnatural materials: A molecular mechanism for foreign body reactions. *Molecular Medicine*, v. 5 (6), p. 351-358, 1999.
- [65] MACDONALD, D.E.; MARKOVIC, B.; ALLEN, M.; SOMASUNDARAN, P.; BOSKEY, A.L. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 41, p. 120-130, 1998.
- [66] KREIS, T.; VALE, R. *Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins*. Sambrook and Tooze, 1999.
- [67] MAILLET, M.; LEMULLOIS, M. *Biologie cellulaire*. Elsevier Masson, 2006.
- [68] RENNER, L.; POMPE, T.; SALCHERT, K.; WERNER, C. Fibronectin displacement at polymer surfaces. *Langmuir*, v. 21, p. 4571-4577, 2005.
- [69] <http://www.farmacologiaoculare.com/2009/01/19/i-peptidi-rgd-per-la-modulazione-del-deflusso-di-umore-acqueo/>, acesso em junho, 2012.
- [70] LHOEST, J.B.; WAGNER, M.S.; TIDWELL, C.D.; CASTNER, D.G. Characterization of adsorbed protein films by time of flight secondary ion mass spectrometry, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 57 (3), p. 432-440, 2001.
- [71] NORDE, W. My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, v. 61, p. 1-9, 2008.
- [72] VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 74, p. 69-117, 1998.
- [73] HAYNES, C.A.; NORDE, W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, v. 2, p. 517-566, 1994.
- [74] TIE, Y.; CALONDER, C.; VAN TASSEL, P.R. Protein adsorption: Kinetics and history dependence. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 268, p. 1-11, 2003.

[75] HEMMERSAM, A.G.; RECHENDOR, K.; FOSS, M.; SUTHERLAND, D.S.; BESENBACHER, F. Fibronectin adsorption on gold, Ti, and Ta-oxide investigated by QCM-D and RSA modelling. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 320, p. 110-116, 2008.

[76] GISPERT, M.P.; SERRO, A.P.; COLACO, R.; SARAMAGO, B. Bovine serum albumin adsorption onto 316L stainless steel and alumina: a comparative study using depletion, protein radiolabeling, quartz crystal microbalance and atomic force microscopy. *Surface and Interface Analysis*, v. 40, p. 1529-1537, 2008.

[77] KESELOWSKY, B.G.; COLLARD, D.M.; GARCIA, A.J. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 66, p. 247-259, 2003.

[78] YANG, Y.; GLOVER, R.; ONG, J.L. Fibronectin adsorption on titanium surfaces and its effect on osteoblast precursor cell attachment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 30, p. 291-297, 2003.

[79] HAYAKAWA, T.; YOSHINARI, M.; NEMOTO, K. Quartz-crystal microbalance-dissipation technique for the study of initial adsorption of fibronectin onto tresyl chloride-activated titanium. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 73, p. 271-276, 2005.

[80] PUDGE, K.; SHIBATA, Y.; YAMAMICHI, N.; TSUTSUMI, H.; YOSHINARI, M.; ABIKO, Y.; HAYAKAWA, T. Gene expression of MC3T3-E1 cells on fibronectin-immobilized titanium using tresyl chloride activation technique. *Dental Materials Journal*, v. 26, p. 647-655, 2007.

[81] SOUSA, S.; MORADAS-FERREIRA, P.; BARBOSA, M. TiO<sub>2</sub> type influences fibronectin adsorption. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 16, p. 1173-1178, 2005.

- [82] GALTAYRIES, A.; WAROCQUIER-CLEROUT, R.; NAGEL, M.D.; MARCUS, P. Fibronectin adsorption on Fe-Cr alloy studied by XPS. *Surface and Interface Analysis*, v. 38, p. 186-190, 2006.
- [83] SOUSA, S.; MANUELA BRAS, M.; MORADAS-FERREIRA, P.; BARBOSA, M. Dynamics of fibronectin adsorption on TiO<sub>2</sub> surfaces. *Langmuir*, v. 23, p. 7046-7054, 2007.
- [84] LORD, M.S.; COUSINS, B.G.; DOHERTY, P.J.; WHITELOCKA, J.M.; SIMMONSA, A.; WILLIAMS, R.L.; MILTHORPE, B.K. The effect of silica nanoparticulate coatings on serum protein adsorption and cellular response. *Biomaterials*, v. 27, p. 4856-4862, 2006.
- [85] HULL, J.R.; TAMURA, G.S.; CASTNER, D.G. Structure and reactivity of adsorbed fibronectin films on mica. *Biophysical Journal*, v. 93, p. 2852-2860, 2007.
- [86] NORDE, W.; GIACOMELLI, C.E. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states , *Article Journal of Biotechnology*, v. 79 (3), p. 259-268, 2000.
- [87] WANG, M.S.; PALMER, L.B.; SCHWARTZ, J.D.; RAZATOS, A. Evaluating protein attraction and adhesion to biomaterials with the atomic force microscope, *Langmuir*, v. 20, p. 7753–7759, 2004.
- [88] LÓPEZ, M.F.; GUTIÉRREZ, A.; JIMÉNEZ, J.A.; MARTINESI, M.; STIO, M.; TREVES, C. Thermal oxidation of vanadium-free Ti alloys: An X-ray photoelectron spectroscopy study, *Materials Science and Engineering C*, v. 30, p. 465–471, 2010.
- [89] TALLARICO, D.A. Caracterização química e morfológica de filmes finos de TiZrV para utilização como NEG. Dissertação de mestrado, PPGEM/UFSCar, 2008.
- [90] WANG, S.Q.; MAYER, J.W. Reactions of Zr thin films with SiO<sub>2</sub> substrates, *Journal of Applied Physics*, v. 64, p. 4711, 1988.



- [91] BORTUN, A.I.; BORTUN, L.N.; KHAINAKOV, S.A.; CLEARFIELD, A.; TROBAJO, C.; GARCIA, J.R. Hydrothermal synthesis and ion exchange properties of the novel framework sodium and potassium niobium silicates, *Solvent extraction and ion exchange*, v. 17 (3), p. 649-675, 1999.
- [92] WEBSTER, T.J.; EJIOFOR, J.U. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo, *Biomaterials*, v. 25, p. 4731, 2004.
- [93] WEBSTER, T.J.; ERGUN, C.; DOREMUS, R.H.; SIEGEL, R.W.; BIZIOS, R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics, *Biomaterials*, v. 21, p.1803, 2000.
- [94] KAPLAN, F.S.; HAYES, W.C.; KEAVENY, T. M.; BOSKEY, A.; EINHORN, T. A.; IANNOTTI, J.P. *Orthopedic basic science*, edited by S. P. Simon (American Academy of Orthopedic Surgeons: Columbus), p. 127-185, 1994.
- [95] ELIAS, K.L.; PRICE, R.L.; WEBSTER, T.J. Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers, *Biomaterials*, v. 23 (15), p. 3279-3287, 2002.
- [96] PETIGNY, T.S.; MOSTEFA-SBA, H.; DOMENICHINI, B.; LESNIEWSKA, E.; STEINBRUNN, A.; BOURGEOIS, S. Superficial defects induced by argon and oxygen bombardments on (110) TiO<sub>2</sub> surfaces, *Surface Science*, v. 410 (2–3), p. 250-257, 1998.
- [97] HASHIMOTO, S.; TANAKA, A.; MURATA, A.; SAKURADA, Formulation for XPS spectral change of oxides by ion bombardment as a function of sputtering time, *Surface Science*, v. 556 (1), p. 22-32, 2004.
- [98] CÁCERES, D.; MUNUERA, C.; OCAL, C.; JIMÉNEZ, J.A.; GUTIÉRREZ, A.; LÓPEZ, M.F. Nanomechanical properties of surface-modified titanium alloys for biomedical applications, *Acta Biomaterialia*, v. 4 (5), p. 1545–1552, 2008.
- [99] CHRISTENSON, E.M.; ANSETH, K.S.; VAN DEN BEUCKEN, J.J.; CHAN, C.K.; ERCAN, B.; JANSEN, J.A.; LAURENCIN, C.T; LI, W.J.; MURUGAN, R.;

NAIR, L.S.; RAMAKRISHNA, S.; TUAN, R.S.; WEBSTER, T.J.; MIKOS, A.G. Nanobiomaterial applications in orthopedics. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 25 (1), p. 11–22, 2007.

[100] HANSEN, J.C.; LIM, J.Y.; XU, L.-CH.; SIEDLECKI, C.A.; MAUGER, D.T.; DONAHUE, H.J. Effect of surface nanoscale topography on elastic modulus of individual osteoblastic cells as determined by atomic force microscopy. *Journal of Biomechanics*, v. 40 (13), p. 2865–2871, 2007.

[101] HENRY, M.; DUPONT-GILLAIN, C.; BERTRAND, P. Conformation Change of Albumin Adsorbed on Polycarbonate Membranes as Revealed by ToF-SIMS, *Langmuir*, v. 19, p. 6271-6276, 2003.

[102] PUTMAN, B.; VAN DER MEEREN P.; THIERENS D. Reduced bovine serum albumin adsorption by prephosphatation of powdered zirconium oxide, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 121(1), p. 81-88, 1997.

[103] MALMSTEN M. Ellipsometry studies of the effects of surface hydrophobicity on protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 3(5), p. 297-308, 1995.

[104] HÖÖK, F.; VÖRÖS, J.; RODAHL, M.; KURRAT, R.; BÖNI, P.; RAMSDEN, J.J.; TEXTOR, M.; SPENCER, N.D.; TENGVALL, P.; GOLD, J.; KASEMO, B. A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide light mode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 24 (2), p. 155-170, 2002.

[105] GIACOMELLI, C.E.; ESPLANDIÚ, M.J.; ORTIZ, P.I.; AVENA, M.J.; DE PAULI, C.P. Ellipsometric Study of Bovine Serum Albumin Adsorbed onto Ti/TiO<sub>2</sub> Electrodes, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 218 (2), p. 404-411, 1999.

- [106] KOPAC, T.; BOZGEYIK, K.; YENER, J. Effect of ph and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide, *Colloids And Surfaces A - Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 322, p. 19-28, 2008.
- [107] ROACH, P.; FARRAR, D.; PERRY, C.C. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127 (22), p. 8168-8173, 2005.
- [108] NORDE, W. IN: M. MALMSTEN (Ed.), *Driving Forces for Protein Adsorption at Solid Surfaces, Biopolymers at Interfaces*, v. 110, Marcel Dekker, New York, 2003.
- [109] TSARGORODSKAYA, A.; NABOK, A.V.; RAY, A.K. Ellipsometric study of the adsorption of bovine serum albumin into porous silicon. *Nanotechnology*, v. 15, p.703-709, 2004.
- [110] SAPSFORD, K.E.; LIGLER, F.S. Real-time analysis of protein adsorption to a variety of thin films. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 19, p. 1045-1055, 2004.
- [111] DE VOS, W.M.; BIESHEUVEL, P.M.; DE KEIZER, A.; KLEIJN, J.M.; COHEN STUART, M.A. Adsorption of the Protein Bovine Serum Albumin in a Planar Poly(acrylic acid) Brush Layer As Measured by Optical Reflectometry, *Langmuir*, v. 24 (13), p. 6575-6584, 2008.
- [112] MILLER, R.; TREPPO S.; VOIGT, A.; ZINGG, W.; NEUMANN, A.W. Contact-Angle Kinetics of Human Albumin Solutions at Solid- Surfaces. *Colloids and Surfaces*, v. 69 (4), p. 203-208, 1993.
- [113] NORDE, W.; FAVIER, J.P. Structure of Adsorbed and Desorbed Proteins. *Colloids and Surfaces*, v. 64 (1), p. 87-93, 1992.
- [114] SERRO, A.P.V.A.; FERNANDES, A.C.; SARAMAGO, B.D.V.; NORDE, W. Bovine serum albumin adsorption on titania surfaces and its relation to wettability aspects. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 46(3), p. 376-381, 1999.

[115] BERGKVIST, M.; CARLSSON, J.; OSCARSSON, S. Surface-dependent conformations of human plasma fibronectin adsorbed to silica, mica, and hydrophobic surfaces, studied with use of Atomic Force Microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 64 (2), p. 349-356, 2003.

[116] BAUGH, L.; VOGEL, V. Structural changes of fibronectin adsorbed to model surfaces probed by fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 69 (3), p. 525-534, 2004.