

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
COORDENADORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS

CRISTIAN PADILHA FONTOURA

**ESTUDO DA NITRETAÇÃO A PLASMA DA LIGA TI6AL4V ELI PARA APLICAÇÃO
ORTOPÉDICA**

Orientador: Prof. Dr. Cesar Aguzzoli

CAXIAS DO SUL

2019

Cristian Padilha Fontoura

**ESTUDO DA NITRETAÇÃO A PLASMA DA LIGA TI6AL4V ELI PARA
APLICAÇÃO ORTOPÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Aguzzoli

Caxias do Sul

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

F684e Fontoura, Cristian Padilha

Estudo da nitretação a plasma da liga Ti6Al4V ELI para aplicação
ortopédica / Cristian Padilha Fontoura. – 2019.

79 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2019.

Orientação: Cesar Aguzzoli.

1. Materiais biomédicos. 2. Biocompatibilidade. 3. Nitruação. 4.
Ligas de titânio. I. Aguzzoli, Cesar, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 616-7

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

CRISTIAN PADILHA FONTOURA

**ESTUDO DA NITRETAÇÃO A PLASMA DA LIGA Ti6Al4V ELI PARA
APLICAÇÃO ORTOPÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cesar Aguzzoli (Orientador)
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Alexandre Fassini Michels
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Alexandre Vieceli
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Marcos Antonio Zen Vasconcellos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Caxias do Sul, 2019

PUBLICAÇÕES

A relação a seguir contempla os artigos publicados e submetidos durante o período de concessão da bolsa de mestrado CAPES.

Artigos Publicados

Título: *Investigation of plasma treatment on UHMWPE surfaces: Impact on physicochemical properties, sterilization and fibroblastic adhesion*

Autores: Melissa Machado Rodrigues, Cristian Padilha Fontoura, Charlene Silvestrin Celi Garcia, Sandro Tomaz Martins, João Antonio Pêgas Henriques, Carlos Alejandro Figueroa, Mariana Roesch-Ely e Cesar Aguzzoli.

Periódico: Materials Science and Engineering: C, v. 102, p. 264-275, 2019.

Título: *Assessment of mechanical and corrosion properties of plasma oxidized medical grade NiTi wire*

Autores: Diego Augusto Campeol, Cristian Padilha Fontoura, Melissa Machado Rodrigues e Cesar Aguzzoli.

Periódico: Vacuum, v. 171, p. 109013, 2020.

Artigos Submetidos

Título: *Plasma nitrided tailored surfaces of medical grade Ti6Al4V: In vitro cytotoxicity, wear and corrosion properties*

Autores: Cristian Padilha Fontoura, Melissa Machado Rodrigues, Charlene Silvestrin Celi Garcia, Kléster dos Santos Souza, João Antonio Pêgas Henriques, Janete Eunice Zorzi, Mariana Roesch-Ely e Cesar Aguzzoli.

Título: *Plasma nitrided tailored surfaces of medical grade Ti6Al4V: Physicochemical characterization*

Autores: Cristian Padilha Fontoura, Melissa Machado Rodrigues e Cesar Aguzzoli.

Título: *Ti, Zr and Ta coated UHMWPE aiming surface improvement for biomedical purposes*

Autores: Melissa Machado Rodrigues, Cristian Padilha Fontoura, Ana Elisa Dotta Maddalozzo, Leonardo Mathias Leidens, Higor Gomes Quevedo, Klester dos Santos Souza, Janaina da Silva Crespo, Alexandre Fassini Michels, Carlos Alejandro Figueroa e Cesar Aguzzoli.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha mãe, que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis da minha caminhada e celebrou cada passo dado por mim como se fosse uma jornada à Lua. Obrigado pelo carinho. Agradeço também a meu pai, meus irmãos e sobrinho por entenderem que um mestrado exige muito tempo e a ausência se fez inevitável muitas vezes.

Agradeço ao Prof. Dr. Cesar Aguzzoli pelo aprendizado e paciência ao longo desses anos e por dedicar seu tempo para me orientar. Vou levar muitos ensinamentos para a vida.

Agradeço aos colegas do LESTT I, Ana, Carina, Melissa e Murilo, pelas contribuições, pelos momentos de descontração, pelas discussões científicas, políticas, cinematográficas e claro, apoio durante esses dois anos. Como diz nosso lema, ciência é poder. E esse poder não nos pode ser tirado, de forma alguma.

Um muito obrigado aos colaboradores deste trabalho, Dra. Charlene Silvestrin Celi Garcia, Profa. Dra. Janete Zorzi, Profa. Dra. Mariana Roesch-Ely e Prof. Dr. Klester dos Santos Souza. Também do grupo Epipolé, que disponibilizou suas instalações e muitas vezes experiência para a realização de ensaios. Agradeço a todos os professores e funcionários do PPGMAT-UCS que contribuíram de forma direta ou indireta na minha formação. Eles são a base científica desse trabalho. Agradeço também a banca avaliadora que colaborou com o enriquecimento científico da versão final da dissertação.

E por último, mas não menos importante, agradeço a CAPES pela bolsa de estudos. Tive o privilégio de ser um mestrando em um país ainda tão desigual, onde muitos não têm acesso a universidade. E, embora os problemas sejam outros, dentro de um laboratório, pude entender a importância de se fazer e de se divulgar a ciência.

Sumário

Lista de Figuras.....	7
Lista de Tabelas	9
Resumo	13
Abstract.....	14
1. Introdução.....	15
1.1. Objetivos.....	16
1.1.1. Objetivo geral.....	16
1.1.2. Objetivos específicos.....	16
2. Referencial Teórico	17
2.1. Titânio e suas ligas.....	17
2.2. Nitretação a plasma.....	19
2.3. Interfaces biológicas	23
2.4. Artroplastia	26
3. Metodologia.....	29
3.1. Planejamento dos experimentos.....	29
3.2. Preparação de amostras.....	30
3.3 Nitretação a plasma.....	30
3.4. Caracterização físico-química	31
3.4.1. Ângulo de Contato.....	31
3.4.1. Microscopia Óptica	31
3.4.2. Rugosidade	32
3.4.3. Difração de raios X com ângulo rasante	32
3.4.4. Microdureza	32
3.4.5. Espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente	32
3.4.6. Microscopia eletrônica de varredura e análise química elementar de varredura	33
3.5. Definição da condição ideal.....	33

3.5.1. Caracterização físico-química da condição ideal	33
3.5.2. Caracterização biológica <i>in vitro</i> da condição ideal.....	36
4. Resultados e discussão.....	39
4.1. Análise estatística dos dados.....	39
4.2. Ângulo de contato e rugosidade	44
4.3. Aspecto visual e microscopia óptica	46
4.5. Difração de raios X.....	47
4.6. Microdureza	49
4.7. GD-OES	50
4.8. Avaliação da microestrutura por microscopia eletrônica de varredura	51
4.9. Caracterização da condição ideal.....	53
4.9.1. RBS.....	53
4.9.2. Perfilometria óptica	54
4.9.3. Teste de micro-abrasão	55
4.9.4. Testes eletroquímicos	57
4.9.5. Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	60
5. Conclusões	66
6. Continuidade.....	67
Referências.....	68
ANEXOS.....	76

Lista de Figuras

Figura 1 – Formas alotrópicas do titânio, adaptado de [17].....	17
Figura 2 – Diagrama de fases ternário do Ti6Al4V, adaptação de [19].....	18
Figura 3 – Segmentação das camadas representando a cinética, formação e crescimento de camadas na nitretação do titânio, adaptado de [31].....	21
Figura 4 – diagrama de fases para Ti-N, adaptado de [45].....	23
Figura 5 – Esquema do antes e depois de uma artroplastia total do joelho, adaptado de [82].	27
Figura 6 – Esquema de câmara de nitretação a plasma.....	31
Figura 7 – Esquema do equipamento para princípio de funcionamento do ensaio de microabrasão, reprodução [97]......	35
Figura 8 – Diagramas de Pareto para as variáveis estudadas: a) AC, b) rugosidade Ra, c) intensidade do pico TiN (111), d) dureza e e) razão Ti/N das linhas de intensidade obtidas em GD-OES.....	41
Figura 9 – Superfícies de resposta para os parâmetros (a) ângulo de contato, (b) rugosidade Ra, (c) pico TiN (111), (d) microdureza e (e) razão Ti/N por GD-OES.....	43
Figura 10 – Correlação entre molhabilidade e rugosidade superficial, mostrando extremos ângulos de contato obtidos.....	45
Figura 11 – Respostas obtidas para a rugosidade das superfícies (■) e ângulo de contato com a água (▲) como função de (a) variação da temperatura do processo com tempo fixo e (b) variação do tempo com temperatura fixa.	46
Figura 12 – Comparação entre as texturas de diversas amostras (a) E-5(600,300), (b) E-8(800,480) e (c) E-6(1000,300), com um aumento nas microcavidades da esquerda à direita.....	47
Figura 13 – Comparativo entre difratogramas de amostras sem tratamento, E-5(600,300), E-6(1000,300) e E-9(800,300).....	48
Figura 14 – Tendência dos resultados de microdureza para as amostras do delineamento experimental, em função da temperatura.	50
Figura 15 – Espectros de GD-OES de uma amostra nitretada (a) e tendência da razão Ti/N nas camadas conforme incremento de temperatura (b)	51
Figura 16 – Micrografias das amostras em seção transversal: amostras E-5(600,300) (a) e E-6(1000,300) (b). Maior magnificação evidenciando esses efeitos para (c) E-6(1000,300) e (d) E-3(660,430).....	52

Figura 17 – Espectros de RBS simulados e experimentais para amostra nitretada a plasma a 940°C.....	54
Figura 18 – Perfilometria óptica de amostras com aumento de 10x para (a) sem tratamento e (b) nitretada e ampliação de 50x para (c) sem tratamento e (d) nitretada.....	55
Figura 19 – Resultados de desgaste por microabrasão para as amostras estudadas neste trabalho. As regiões sombreadas representam de nível de confiança de 95%.....	56
Figura 20 – Curvas de polarização potenciodinâmica das ligas Ti6Al4V não revestidas e Ti6Al4V nitretadas após 1 h em fluido corporal simulado a 36 ± 0,5 °C.	58
Figura 21 – (a) gráfico de Nyquist e (b) gráfico de Bode das ligas sem tratamento e nitretada em solução simulada de fluido corporal após 1 h de imersão.	59
Figura 22 – Ensaios de pós-corrosão micrografias de (a) amostra pura com uma ampliação de 500x, (b) amostra PN com uma ampliação de 200x e (c) amostra PN com uma ampliação de 500x.....	60
Figura 23 – Efeito citotóxico obtido no ensaio ISO 10993-5-2009 e ISO 10993-12-4 de extratos de Ti6Al4V intocadas e nitretadas, comparando ao controle negativo e controle positivo em relação à viabilidade de células tratadas por 1, 2 e 7 dias. As letras correspondem as diferenças estatisticamente significantes, usando o teste <i>Tukey</i> ($p \leq 0,05$).	61
Figura 24 – Morfologia das células L929 dos extratos de Ti6Al4V incubados por 1, 2 e 7 dias, comparados aos controles positivo e negativo. Fotomicrografias foram realizadas em microscópio de luz (100x).	62
Figura 25 – Micrografias obtidas por MEV-FEG mostrando adesão celular e disseminação ao longo dos períodos de 1, 2 e 7 dias; uma diminuição na presença de células é notada em ambas as superfícies. No sétimo dia quase nenhuma célula pode ser encontrada anexada a essas superfícies.....	63
Figura 26 – <i>Linha superior</i> : amostras sem tratamento, em sua maioria, com fibroblastos arredondados no primeiro (a) e sétimo dia (c); no segundo dia, algumas células com fibrilas de colágeno foram observadas (b) <i>Linha inferior</i> : nas nitretadas, tanto no primeiro (d) como no sétimo dia (e), nota-se células quase destacadas da superfície.	64

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Propriedades mecânicas do Ti6Al4V ELI recozido	19
Tabela 2 – Superfícies ideais em componentes ortopédicos metálicos	24
Tabela 3 – Delineamento de experimentos composto central	29
Tabela 4 – Composição química da liga Ti6Al4V ELI, de acordo com a norma [95].....	30
Tabela 5 – Resultados qualitativos e semi-quantitativos para as respostas avaliadas	39
Tabela 6 – Tabelas ANOVA para as variáveis estudadas.....	44
Tabela 7 – Coeficientes de desgaste para as amostras de Ti6Al4V.....	56
Tabela 8 – Parâmetros de corrosão obtidos a partir de curvas de Tafel de discos de Ti6Al4V puros e nitretados, imersos em fluido corporal simulado.....	58

Lista de abreviaturas e siglas

2 θ	ângulos em graus no DRX
AC	ângulo de contato
AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i>
Al	alumínio
ANOVA	análise de variância
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
CCC	cúbica de corpo centrado
CeP	cerâmico em polietileno
CL	camada de compostos
CoCr, CoCrMo	ligas de cobalto-cromo (e molibdênio)
DCCR	delineamento composto central rotacional
DL	zona de difusão
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DRX	Difração de Raios X
EDS	espectroscopia por dispersão em energia
ELI	<i>extra low interstitial</i> (concentração baixa de interstícios)
F	teste F, variação entre médias da amostra pela variação dentro das amostras
Fe	ferro
GD-OES	Espectroscopia de Emissão Óptica por Descarga Luminescente

H	hidrogênio
HC	hexagonal compacta
He	hélio
IMC	Instituto de Materiais Cerâmicos
ISO	<i>International Standard Organization</i>
L929	fibroblastos de camundongos
LACASUNE	Laboratório de Caracterização de Superfícies em Nano-Escala
LCMic	Laboratório Central de Microscopia Professor Israel Baumvol
LESTT I Térmicos	Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos
LMCer	Laboratório de Materiais Cerâmicos
MeP	metal em polietileno
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MEV-FEG	microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
MTT	brometo de 3- (4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N	nitrogênio
Ni	níquel
OCP	<i>open circuit potential</i>
<i>p</i>	valor-p
P/S	penicilina/estreptomicina
PEUAMM	polietileno de ultra alta massa molar
PMMA	poli(metilmetacrilato)
Ra	rugosidade média aritmética

RBS	Espectrometria de Retroespalhamento de Rutherford
RF	radiofrequência
SBF	<i>simulated body fluid</i> , fluido corporal simulado
SFB	soro fetal bovino
SiC	carbeto de silício
T	temperatura
t	tempo
Ti	titânio
Ti6Al4V	liga de titânio
TiN, Ti ₂ N	nitreto de titânio
UCS	Universidade de Caxias do Sul
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
V	vanádio
α	titânio com estrutura hexagonal compacta
α'	martensita hexagonal
α''	martensita ortorrômbica
β	titânio com estrutura cúbica de corpo centrado
δ	TiN
ϵ	Ti ₂ N

Resumo

Os implantes intra-corpóreos feitos com titânio ainda são uma parcela significativa dos componentes metálicos da artroplastia, devido à excelente biocompatibilidade e baixas características alergênicas e tóxicas. No entanto, modificações de superfície são de suma importância para tais aplicações, visando a melhoria de desempenho tribológico. Neste trabalho, a nitretação a plasma de Ti6Al4V em configuração cátodo oco foi analisada estatisticamente, variando-se tempos e temperaturas do processo e avaliando-se as superfícies resultantes. Todas as superfícies mostraram uma camada em microescala, contendo nitretos de titânio. Os discos nitretados apresentaram maior molhabilidade, rugosidade e dureza, devido à penetração de nitrogênio nos substratos. Uma condição ideal para nitretação a plasma a 940 °C por 3 horas foi alcançada. Testes de desgaste e corrosão foram realizados para avaliar a superfície resultante em comparação com as amostras originais. Observou-se uma melhoria significativa na resistência ao desgaste, com um coeficiente de desgaste cerca de três vezes menor do que o original, devido à camada de compostos de caráter cerâmico. O resultado dos ensaios eletroquímicos aponta para uma superfície mais corrosiva em uma solução de fluido corporal, mas não o suficiente para torná-la bioincompatível. Ensaio biológicos mostraram que a superfície nitretada não é tóxica, de acordo com a análise citotóxica *in vitro* padronizada pela ISO e os testes de adesão celular através de linhas celulares de fibroblastos de camundongo L929. A proliferação celular diminuiu ao longo do tempo nas amostras tratadas, em parte devido à superfície micro-ranhurada e seu caráter hidrofílico.

Palavras-chave: nitretação a plasma, Ti6Al4V, biomateriais, caracterização da superfície, citotoxicidade.

Abstract

Titanium-made intra-corporeal implants are still a significant portion of arthroplasty metallic components, due to excellent biocompatibility and low allergenic and toxic features. However, surface modifications are of paramount importance for such applications, aiming performance improvement. In this work, plasma nitriding of Ti6Al4V in a hollow cathode setting was statistically evaluated by varying different times and temperatures of process and assessing the resulting surfaces. All surfaces showed a micro-scale layer, containing titanium nitrides. The nitrided disks showed increased wettability, roughness and hardness, due to the nitrogen penetration into the substrates. An optimal point for plasma nitriding at 940 °C for 3 hours was achieved. Wear and corrosion tests were carried out to evaluate the tailored surface in comparison to the pristine samples. A significant improvement in wear was observed, with a wear coefficient about thrice smaller than the original one, due to the hardened, ceramic-like compound layer. The corrosion tests outcome points to a surface responding slightly worse in a body fluid solution, but not enough to make it bioincompatible. Biological assays showed that the nitrided surface is not toxic, according to ISO standardized *in vitro* cytotoxic analysis and cell adhesion tests through L929 mouse fibroblast cell lines. Cell proliferation decreased over the treated samples, in part due to modifications on micro-grooved surface and its hydrophilic character.

Keywords: plasma nitriding, Ti6Al4V, biomaterials, surface characterization, cytotoxicity.

1. Introdução

A engenharia tem hoje, entre suas prioridades, adaptar-se às condições que a vida humana exige em conforto, segurança e praticidade. Muitas dessas adaptações são projetadas e planejadas para a área da saúde, através da engenharia de biomateriais, que cresce com o aumento da demanda de uma população envelhecida [1].

Um dos materiais mais proeminentes, o titânio, é um dos metais mais aplicados [2] no organismo humano, sendo usado há décadas com a finalidade de ter propriedades biocompatíveis e assegurar um tempo de vida útil com segurança ao paciente. A liga Ti6Al4V é uma das ligas do titânio que possui diversas aplicações biomédicas e, especialmente, em implantes ortopédicos [3–5]. Dentre as desvantagens da liga, porém, encontram-se a baixa resistência ao cisalhamento e a baixa resistência ao desgaste. Os detritos provenientes do desgaste podem induzir respostas inflamatórias [6] ou o desprendimento do implante [7]. Há ainda a possibilidade de efeito tóxico resultante da liberação de íons vanádio e alumínio. Há uma grande discrepância em módulos de elasticidade entre as ligas de titânio (103-120 GPa) e ossos (10-30 GPa), o que é desfavorável para a recuperação óssea e sua remodelagem.

Revestimentos ou tratamentos de superfície são de grande importância para promover uma aceleração no processo de deposição e integração óssea, especialmente em estágios iniciais [8]. Como a proliferação de bactérias é um dos grandes problemas que ocorrem em implantes ósseos, muitas alternativas na engenharia de superfícies buscam alcançar o efeito inibidor de bactérias; o nitreto de titânio (TiN) é um dos mais relevantes revestimentos utilizados com essa finalidade. Seu caráter antimicrobiano já foi diversas vezes caracterizado [9].

A nitretação por plasma para funcionalizar a superfície do titânio e suas ligas é um método já estabelecido [10,11], o qual melhora suas propriedades físico-químicas e tribológicas e mantém – ou melhora, suas propriedades de biocompatibilidade. Além disso, o caráter não poluente e a aplicabilidade a nível industrial de processos por plasma é um dos mais atraentes entre os processos de modificação superficial e muitos trabalhos e revisões foram gerados com essa temática [12–15].

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Obter condições aprimoradas de nitretação por plasma para a modificação da superfície de Ti6Al4V, visando a formação de uma camada de TiN.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Formular um planejamento experimental apropriado para o estudo proposto, delimitando condições e limites inferiores e superiores de variáveis e tipos de análises estatísticas a serem realizadas.
2. Realizar nitretação a plasma em amostras de Ti6Al4V com o equipamento existente no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos I (LESTT I), alterando variáveis tempo e temperatura.
3. Caracterizar físico-quimicamente as amostras, a fim de verificar os principais mecanismos de modificação da superfície causados após a nitretação a plasma na liga.
4. Estimar uma condição ou faixa adequada no qual o processo de nitretação deve ser conduzido.
5. Caracterizar biologicamente a condição mais adequada, a fim de investigar os efeitos biológicos do contato com a superfície do biomaterial, a partir de testes de viabilidade celular e citotoxicidade;
6. Caracterizar as resistências ao desgaste e à corrosão da liga não-tratada e a condição mais adequada da nitretação a plasma.

A partir da perspectiva proposta nesta breve introdução, a continuidade ao trabalho segue com um referencial teórico, de modo a contextualizar o trabalho dentro da linha de pesquisa já consolidada e também nos esforços atuais da ciência dos materiais.

2. Referencial Teórico

2.1. Titânio e suas ligas

Titânio e suas ligas são materiais de grande importância dentro do subgrupo de biomateriais. Sua aplicação se dá em diversos componentes, especialmente em substituições ósseas ou equipamentos cardiovasculares [2]. O titânio pode ser puro, com fase α ou ligado, sendo este o que apresenta melhor resistência à corrosão e maior resistência mecânica, exibindo, à temperatura ambiente, fases α e β . A resistência à fadiga do Ti6Al4V é dependente do tamanho dos grãos da colônia α . Diminuindo-os, aumenta-se as propriedades de resistência à fadiga do material. Além disso, mostra-se que aumentando a resistência à tração, aumenta-se a resistência à fadiga do Ti6Al4V [16]. A fase α possui estrutura cristalina hexagonal compacta (HC), enquanto que a fase β apresenta a estrutura cúbica de corpo centrado (CCC), sendo, portanto, mais dúctil que a anterior. A **Figura 1** ilustra ambas formas alotrópicas do titânio.

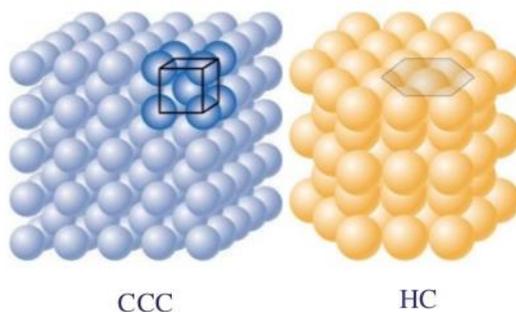


Figura 1 – Formas alotrópicas do titânio, adaptado de [17].

Dentre as ligas de titânio α e β , ocupa lugar de destaque o Ti6Al4V, sendo a mais comumente usada em aplicações biomédicas. Comumente usada na indústria aeronáutica e chamado de grau 5, em aplicações biomédicas ela tem a denominação ELI (*extra-low interstitial*), cuja menor presença de elementos intersticiais, como oxigênio, nitrogênio e carbono a tornam mais resistente à fadiga, mais tenaz à fratura e mais dúctil. Também é conhecida por titânio grau 23 ou ASTM F136.

Para ligas de titânio $\alpha+\beta$, o parâmetro microestrutural mais importante em determinar propriedades mecânicas é o tamanho dos sítios α . Quanto menor for a colônia α , maiores o limite de escoamento, a resistência à nucleação de trinca e a resistência à

propagação de microtrinca. A única vantagem de se ter um sítio α de tamanho grande é uma maior resistência à propagação de macrotrinca. O tamanho do sítio α depende da taxa de resfriamento da fase β e no tamanho de grão β , limitando as dimensões máximas da colônia α [18].

O Ti6Al4V apresenta duas formas alotrópicas em equilíbrio termodinâmico. Acima de 980 °C, a liga possui estrutura cúbica de corpo centrado (CCC), que constitui a fase matriz β . Abaixo disso, apresenta estrutura hexagonal compacta (HC), denominada por fase α . No diagrama de fases visto na **Figura 2**, a divisão é dada pela linha β -transus, cujo deslocamento é determinado pela adição de elementos de liga, estabilizando a fase favorecida, através da presença dos elementos em questão ¹. As transformações dependem da temperatura de trabalho, taxa de resfriamento e microestrutura inicial. Além dessas, há as fases martensíticas α' e α'' , obtidas através de transformação martensítica que ocorre em altas taxas de resfriamento a partir de temperaturas > 800 °C.

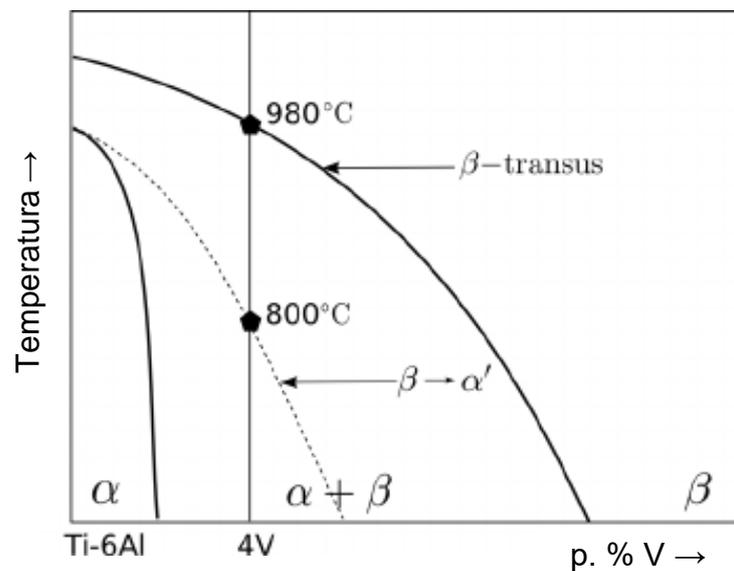


Figura 2 – Diagrama de fases ternário do Ti6Al4V, adaptação de [19].

Não há uma microestrutura do titânio que possua melhores propriedades para todas aplicações. Os grandes problemas enfrentados com o uso da liga são: sua baixa tensão de cisalhamento, sua baixa resistência ao desgaste e a liberação de íons alumínio e íons vanádio. Devido a esses problemas, a modificação da superfície do Ti6Al4V ainda é

¹ vanádio, em massa, no caso do diagrama supracitado

necessária. A dureza relativamente baixa do Ti6Al4V fez com que ligas como CoCr e CoCrMo (15% mais duras) o substituíssem em próteses femorais. Propriedades tribológicas desfavoráveis [1] também influenciaram na preferência por ligas de cobalto, embora o desgaste do Ti6Al4V/PEUAMM (polietileno de ultra-alta massa molar) seja controverso na literatura [20]. Ligas de titânio em implantes de articulações ortopédicas, de maneira geral, precisam de modificação superficial que aumente sua dureza e diminua o desgaste [21].

A **Tabela 1** traz um resumo dessas e de algumas outras das mais importantes propriedades da liga.

Tabela 1 – Propriedades mecânicas do Ti6Al4V ELI recozido

Propriedade	Valor
Densidade	4430 kg/m ³
Módulo de elasticidade	114 GPa
Coefficiente de Poisson	0,342
Tensão de escoamento	880 MPa
Resistência à tração	950 MPa
Dureza	350 HV

Fonte: adaptado de [22].

2.2. Nitretação a plasma

Esforços atuais da engenharia de superfícies enfatizam em modificar superfícies, de forma a evitar problemas em biomateriais em ambiente biológico, como reações adversas, risco de infecção, inflamação, osteólise [23], fibrose [24] e trombose [25]. A funcionalização por plasma em biomateriais para aplicação biomédica vem sendo estudada recentemente como uma ferramenta para esterilizar um biomaterial, aumentar sua vida útil frente ao desgaste e evitar efeitos indesejáveis, tais como a adesão celular nociva, adesão de bactérias, ou baixa viabilidade celular. A nitretação é um dos procedimentos que pode ser utilizado como agente promovedor das melhores propriedades de biocompatibilidade [26–28].

A nitretação a plasma é um processo realizado em uma câmara de vácuo, na qual são injetados gases que reagem com as superfícies metálicas a serem processadas. Os gases de interesse em nitretação são o nitrogênio e o hidrogênio, comumente. Os gases são ionizados através de uma diferença de potencial, a qual ioniza o gás. O gás ionizado é chamado de descarga luminescente ou plasma. O plasma é uma região intensa de gás ionizado. Há várias maneiras e configurações na qual o plasma pode ser obtido. O plasma por cátodo oco é uma técnica empregada para maximizar-se o potencial da descarga, geometricamente gerando uma confinamento do plasma. Nessa configuração, a descarga é mais energizada e compreende maiores excitação do gás (até 90%), ionização e densidade de corrente (10^{13} a 10^{15} cm^{-3}) [29].

A nitretação da superfície de metais como aços, titânio, alumínio, zircônio e outros pode ser atribuída ao bombardeamento de íons NH^+ e N^+ e à absorção de radicais NH e N , seguidos de enriquecimento da região superficial com nitrogênio e difusão de nitrogênio ao material. A camada nitretada é composta de duas camadas diferentes, uma camada de compostos (CL) e camada de difusão (DL) [30].

O nitrogênio em forma ionizada e com alta energia entra em contato com o metal, dentro da câmara de vácuo. O titânio é ativado a altas temperaturas, então uma transferência de massa do meio para o sólido ocorre. O nitrogênio é absorvido na superfície e se difunde para o substrato, formando uma solução intersticial de nitrogênio na fase α – a qual é denominada de $\alpha(\text{N})$. Quando a concentração de nitrogênio na matriz α é maior que o limite de solubilidade, uma reação na interface ocorre, levando a formação de uma nova fase, Ti_2N , que possui uma estrutura cristalina tetragonal. Nesse caso, apenas metade dos sítios intersticiais do titânio são ocupados por nitrogênio. Se o processo continua, os sítios restantes são ocupados por átomos de nitrogênio, formando uma nova fase, TiN [31].

A camada nitretada se divide 3 níveis, do mais externo para o mais interno: camada de compostos de TiN e Ti_2N \Rightarrow zona de difusão composta de $\alpha(\text{N})$ \Rightarrow substrato, que no caso do Ti6Al4V é $\alpha+\beta$. Esse esquema pode ser visualizado na **Figura 3**. O nitrogênio forma solução sólida proveniente da sua implantação no titânio, precipitados de TiN , o que acaba ocasionando o travamento do movimento das discordâncias, devido aos campos de tensão [32]. Os átomos de nitrogênio, interstícios e solutos, causam expansão das células

crystalinas, fazendo com que a superfície retenha tensões compressivas [33]. Os campos de tensão interagem com as discordâncias e, portanto, maiores tensões são necessárias para movimentá-las. O bloqueio nos movimentos das discordâncias confere maior dureza aos materiais nitretados, o que também confere, em alguns casos, maior resistência à fadiga.

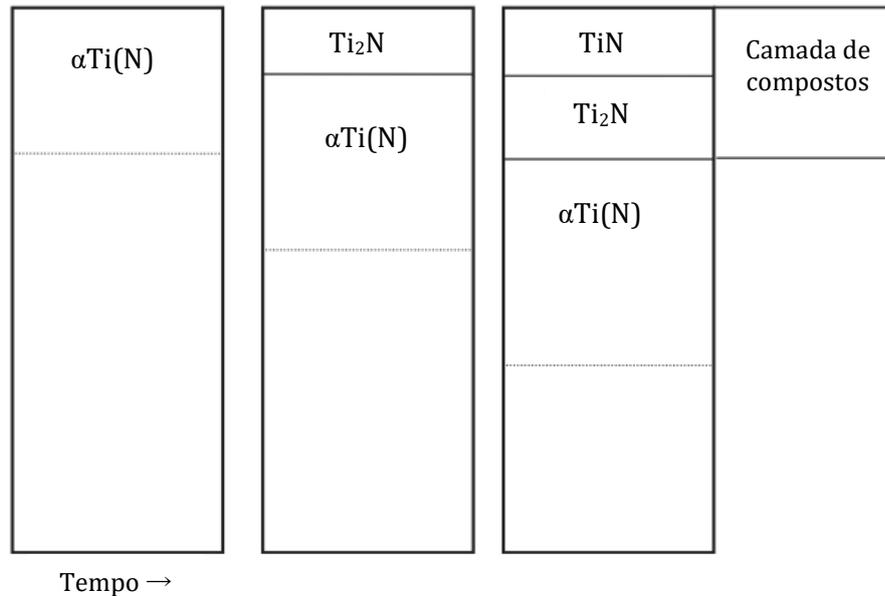


Figura 3 – Segmentação das camadas representando a cinética, formação e crescimento de camadas na nitretação do titânio, adaptado de [31].

As tensões residuais também podem ser atribuídas às tensões intrínsecas devido ao crescimento da camada nitretada e a tensões térmicas produzidas pelo resfriamento a partir de uma temperatura alta (há uma discrepância na expansão térmica entre a camada e o substrato) [34]. As tensões residuais podem inibir a nucleação de trincas devido a inibição de deslizamento cíclico e, portanto, aumentar as propriedades de resistência à fadiga [35,36], porém atenção especial deve ser dada à temperatura do processo. Outra propriedade que é afetada nesses tratamentos termoquímicos é a resistência à fluência, uma vez que as tensões residuais e a própria camada de compostos agem como uma barreira para a difusão de oxigênio [28].

A nitretação do titânio aumenta sua microdureza [37,38] e a energia de superfície do substrato [31]. Quanto maior a temperatura do processo, possivelmente, maior será a dureza do substrato. A adição de hidrogênio durante a nitretação por plasma pode aumentar a taxa de nitretação e contribui para a fase TiN- α ser preferencialmente formada, em temperaturas mais baixas. A baixa resistência ao desgaste do Ti6Al4V pode

ser melhorada com o processo de nitretação [39–41], principalmente devido à formação da fase TiN no plano (111). O TiN formado superficialmente, além disso, é duro e diminui a deformação plástica e causa menor área de contato de desgaste [40], além de melhor resistência à corrosão. A nitretação por plasma do titânio traz resultados muito semelhantes a revestimentos de TiN. Ambos demonstram resultados muito melhores que uma amostra de titânio pura [42]. Propriedades ligadas com a biocompatibilidade, como valores mais altos de rugosidade e de molhabilidade, são também atingidos em tratamentos por plasma de nitrogênio [29].

A estrutura e propriedades das ligas depende da composição do plasma de nitrogênio. O hidrogênio promove a formação de fases ϵ e δ , enquanto que o argônio promove a fase ϵ ; conforme a quantidade de hidrogênio é aumentada, numa mistura de hidrogênio e nitrogênio, uma mudança na orientação preferida do TiN ocorre de TiN (220) para o pico TiN (200). A orientação preferida de TiN (220) aumenta quando a quantidade de argônio na mistura de argônio e nitrogênio é aumentada, em estudos que analisaram padrões de difração de raios X (DRX) [43]. Com 50% de N_2 , obtém-se maior formação de δ -TiN, composto de composição estequiométrica, visto também pela coloração dourada da amostra [44]. O diagrama de fases Ti-N, na **Figura 4**, mostra quais fases são favorecidas a diferentes temperaturas e concentrações de nitrogênio.

Uma vez que a camada nitretada é constituída de ligações químicas iônicas entre as espécies do plasma e o substrato, formando um composto cerâmico, proveniente de soluções sólidas supersaturadas e precipitados, há uma forte força de ligação entre a camada e o substrato. Para a nitretação a plasma, recomenda-se a realização de um *etching*, de argônio ou misturas, anterior ao tratamento, para a remoção de óxidos e contaminantes.

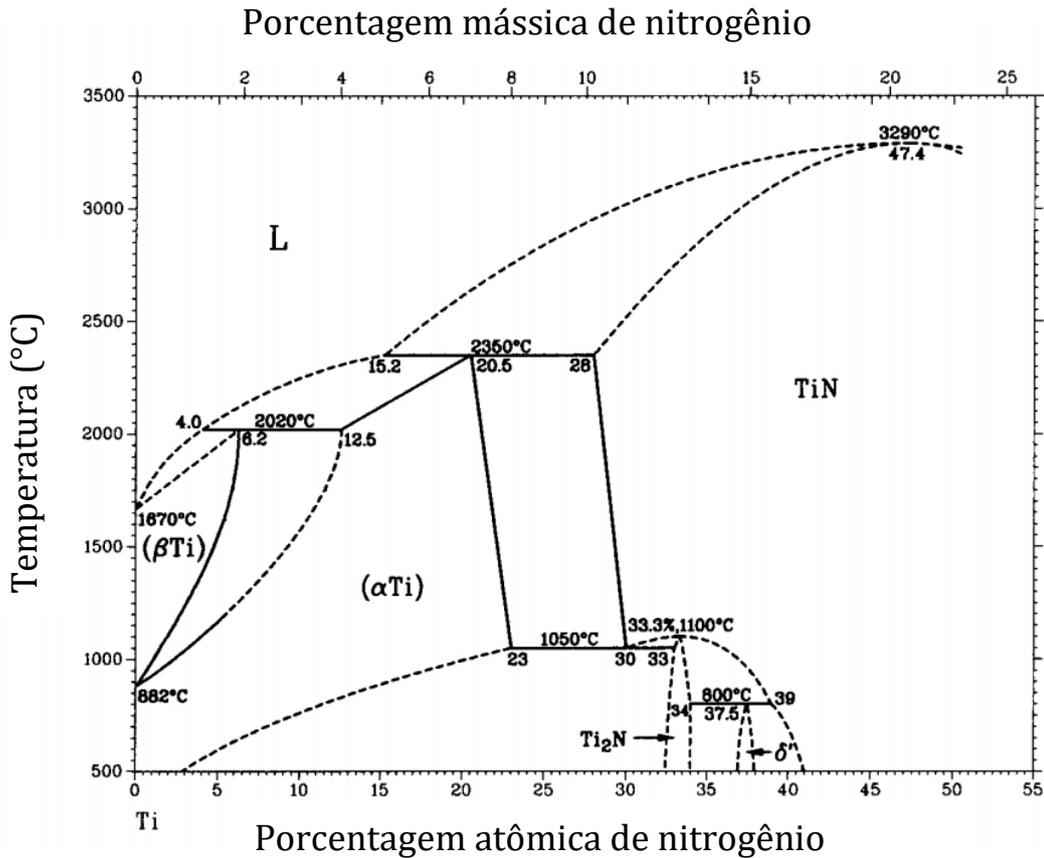


Figura 4 – diagrama de fases para Ti-N, adaptado de [45].

2.3. Interfaces biológicas

As interfaces biológicas, em contato com superfícies metálicas, precisam de diversas propriedades que auxiliem na melhor integração do implante ao corpo humano. A **Tabela 2** busca exemplificar algumas propriedades de superfícies e suas desejadas características em aplicações ortopédicas.

A topografia superficial e sua rugosidade afetam a osteointegração [46]. Superfícies moderadamente rugosas tendem a ter uma melhor integração óssea do que superfícies altamente rugosas ou pouco rugosas [47,48]. Em relação à molhabilidade, bactérias hidrofóbicas geralmente aderem à superfícies hidrofóbicas, assim como bactérias hidrofílicas tendem a aderir à superfícies hidrofílicas. Estudos afirmam que a adesão de patógenos humanos, como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, está correlacionada ao aumento da hidrofobicidade da superfície de um biomaterial; com isso, a hidrofobicidade é considerado um agente que favorece a adesão de bactérias [49].

Tabela 2 – Superfícies ideais em componentes ortopédicos metálicos

Propriedade superficial	Objetivo	Observações	Referências
Ângulo de contato	Caráter hidrofílico, com ângulos de contato < 80°C	Superfícies hidrofílicas induzem atividade osteoblástica e diminuem adesão fibroblástica.	[50-52]
Rugosidade	< 200 nm em superfícies metálicas e até 2000 nm em aplicações de osteointegração, com revestimentos de CaP, por exemplo.	Rugosidade aumentada pode levar a desgaste excessivo de componentes associados ao componente metálico. A rugosidade moderada é considerada a melhor para osteointegração, devido à melhor e mais difusa ancoragem celular.	[48]
Dureza	2100 HV para revestimentos de TiN	A dureza deve ser aumentada apenas superficialmente, sem alcançar o <i>bulk</i> .	[53]
Tipo de acoplamento	CeP (cerâmico em polietileno) tem taxas de desgaste menor que MeP (metal em polietileno)	Juntas CeP são geralmente aplicadas em pacientes mais jovens e ativos.	[54,55]

Na investigação de resposta celular de fibroblastos às camadas nitretadas, pode-se considerar o número de crescimento de células, suas características morfológicas e resistência biológica à corrosão [56]. A adesão celular e atividade de fosfatase alcalina (ALP) se mostram maiores em superfícies de titânio nitretado a plasma, comparado àqueles sem tratamento; no mesmo estudo notou-se a redução da osteocalcina, considerada um regulador negativo da formação óssea [57]. A formação de uma camada de apatita e a atração de certos tipos de proteínas com reações desejáveis para células formadoras de ossos são mecanismos importantes que uma superfície deve conter para facilitar a osteointegração em implantes [58]. A formação de coágulos sanguíneos, desencadeada pelo acúmulo de plaquetas em implantes, é considerada um agente na formação de crescimento celular e ósseo [59-61]. A adesão inicial, proliferação e diferenciação de osteoblastos é essencial para a osteointegração e, nesse caso, propriedades como molhabilidade e rugosidade superficiais são importantes.

No contexto das ligas de titânio, que fazem parte do grupo bioinerte de materiais, elas têm ganhado espaço entre materiais metálicos em odontologia, cardiologia, ortopedia, angiologia e outros [4,62,63]. Enquanto elas oferecem um ambiente favorável em aplicações direcionadas à inércia [64,65], faltam às ligas de titânio as propriedades de superfície para osteointegração [63,66,67] e elas até podem, contrariamente, formar um encapsulamento que leva à rejeição do corpo estranho [68]. Por essas e outras razões [4], a modificação da superfície das ligas de titânio deve ser considerada.

Fibroblastos desempenham papéis cruciais no corpo humano, sendo os pilares para tecidos conjuntivos. Porém há muitos outros aspectos em relação a essas importantes células. Para nomear alguns, serve como pivô na cicatrização de feridas, inflamação, angiogênese, progressão do câncer, fibrose do tecido fisiológico e patológico[69]. A fibrose pode acontecer através de várias circunstâncias em humanos, incluindo cicatrizes anormais em indivíduos que receberam um biomaterial implantado [24,70]. O encapsulamento fibroso de um implante ocorre devido à proliferação de miofibroblastos induzidos por corpo estranho e estes são derivados de várias fontes, incluindo – mas não apenas – a diferenciação de fibroblastos teciduais [69,71]. Enquanto o encapsulamento é necessário para isolamento e integração no meio biológico [72], excesso de tecido fibrótico pode levar a artrofibrose. A artrofibrose afeta o ciclo normal de caminhada, causa dor e, em circunstâncias extremas, resultam na falha do implante [73–75]. Da mesma forma, detritos em aplicações de articulações podem causar processos inflamatórios que, em caso extremo, promovem o afrouxamento asséptico do material implantado [7,76–78]. Os efeitos da modificação da superfície na relação dicotômica da redução em resposta fibrótica, enquanto simultaneamente melhora a osteointegração, já serviu de tema de um trabalho [78].

O desgaste abrasivo é um grande problema, especialmente em juntas onde diferentes materiais são colocados em contato e atrito constante. Na artroplastia, uma peça central de polietileno (PEUAMM) é usualmente intercalada entre duas placas metálicas para servir como um dispositivo de apoio. Os acoplamentos de metal em polietileno (MeP), cerâmico em polietileno (CeP) têm sido os mais comuns em aplicações para próteses de artroplastia de terceira geração. Os acoplamentos CeP têm menores taxas de desgaste em comparação com os acoplamentos MeP [53,79,80] e são usados principalmente em pacientes mais jovens [54], pois estes são mais ativos e tendem a

impor cargas com maior frequência em uma articulação. A osteólise é uma ocasião rara nas aplicações em que os acoplamentos CeP foram aplicados.

2.4. Artroplastia

Os tecidos ósseos, em humanos, sofrem danos de diversas naturezas, como o envelhecimento natural, acidentes, desgaste causado por esforços contínuos, obesidade, doenças como a artrite, artrose, entre outros. O joelho, por exemplo, é a maior e uma das mais importantes juntas no corpo humano, além de ser uma das que podem apresentar problemas com mais facilidade, por estar em constante uso e suportar grande parte do impacto e do peso de uma pessoa. Além disso, é de grande complexidade e está mais predisposta a sofrer danos do que qualquer outra junta do corpo [81].

Problemas nas articulações muitas vezes não têm uma solução simples e próteses são recomendadas em pacientes com grande deformação na junta. Esses procedimentos são chamados de artroplastia. A cirurgia de substituição de uma junta pode ser total ou parcial e a prótese permite a movimentação do joelho do paciente, sem dor. Esse tipo de operação causa dor pós-operatória e requer uma vigorosa reabilitação do paciente. O período de recuperação pode levar seis semanas ou mais. Por esse motivo, a colocação de um corpo estranho, como uma prótese, requer uma extensiva avaliação pré-cirúrgica. O material utilizado deve ser compatível com o tecido humano, não trazer risco de contaminação ou toxicidade, e ter propriedades mecânicas que lhe confirmem uma vida útil entre uma e duas décadas. A **Figura 5** ilustra um joelho artrítico, antes e após a artroplastia total.



Figura 5 – Esquema do antes e depois de uma artroplastia total do joelho, adaptado de [82].

Atualmente, a engenharia se preocupa em proporcionar o bem-estar de pacientes que precisam passar por tal procedimento e avanços vêm sendo feitos, especialmente no que diz respeito da melhoria das propriedades dos materiais no ambiente biológico. Para um indivíduo saudável, por exemplo, o carregamento tíbiofemoral é entre 3 e 4 vezes a massa corporal para caminhada, de 4 a 5 vezes a massa corporal para escalada e até 8 vezes andando morro abaixo [83]. Muitas pesquisas estimaram que a carga compressiva máxima na junta do joelho está entre duas e quatro vezes o peso corpóreo de um indivíduo, durante uma marcha normal. Algo entre 2.100 N, para um corpo de 70 kg é uma boa estimativa [84].

A substituição total do tornozelo, análoga ao procedimento de substituição total do joelho, é uma solução alternativa à artrodese para solucionar problemas relacionados à osteoartrite no tornozelo humano, quando os problemas são sintomáticos [85,86]. O tornozelo, assim como o joelho e o quadril, é uma articulação que está sujeita a grandes esforços axiais (de quatro a sete vezes o peso corporal) e a grandes forças cisalhantes (80% do peso corporal) [87]. A articulação do tornozelo também tem seu biomecanismo associado a um ciclo de caminhada (*gait cycle*). A movimentação natural da junta é claramente modificada após procedimentos como a artroplastia, embora sugira-se que a mudança é menor do que a vista em abordagens como a artrodese [88].

Uma prótese de artroplastia total consiste de cabeça femoral, componente tibial, componente patelar e componente de substituição do menisco. Componentes metálicos são impactados no osso ou fixados, usando-se cimento de poli(metilmetacrilato) (PMMA). Técnicas alternativas fixam o implante sem uso do cimento e requerem osteointegração, incluindo prótese de metal poroso. Atualmente, grande parte dos implantes é constituído de ligas como CoCrMo e ligas de titânio. Materiais para pessoas com hipersensibilidade são disponibilizados por algumas companhias, entre eles revestimentos de TiN e próteses de titânio [89]. A osteointegração é um processo, cujas propriedades do implante como superfície e geometria desempenham um papel fundamental no comportamento celular. Embora haja algumas diferenças, os mecanismos são os mesmos que os da cura após fratura óssea [61].

Processos que modifiquem a superfície de biomateriais são de constante uso, para melhoria de suas propriedades. A nitretação, por exemplo, é um dos processos que confere uma característica de boa dureza, boas condições tribológicas, mas há uma preocupação com a fragilização do material utilizado [90,91]. Apesar da falha em um componente metálico de uma junta ortopédica prótica ter baixa incidência [92], o comportamento mecânico de um material modificado em condições de uso, durante o ciclo humano de marcha (*gait cycle*), pode ser previsto por meio de simulações [93].

3. Metodologia

3.1. Planejamento dos experimentos

A fim de conhecer o processo e a influência das variáveis, um planejamento fatorial de experimentos foi aplicado ao trabalho. Essa metodologia permite tornar uma série de experimentos mais sucinta e, com os resultados, avaliar e determinar fatores que exercem maior influência nas respostas obtidas.

Optou-se por um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , com duas variáveis. Um total de 11 amostras foi planejado, conforme visto na **Tabela 3**. Os experimentos estão codificados da seguinte forma **E-número**(temperatura do processo, tempo do processo). Os parâmetros variados dados pelas variáveis codificadas x_1 e x_2 são, respectivamente: temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo (min). Os parâmetros 1 e -1 representam uma faixa escolhida e 0, o ponto médio. Em planejamentos do tipo 2^k , o valor α representa a distância dos pontos axiais que estendem o delineamento a uma faixa maior de variáveis. Para $k=2$, o valor de α é 1,4, que é calculado pela fórmula vista na **Equação 1**.

$$\text{(Eq. 1)} \quad \alpha = (2^k)^{1/4}$$

Tabela 3 – Delineamento de experimentos composto central

Código do Experimento	x_1	x_2	x_1' ($^{\circ}\text{C}$)	x_2' (min)
E-1(660,170)	-1	-1	660	170
E-2(940,170)	1	-1	940	170
E-3(660,430)	-1	1	660	430
E-4(940,430)	1	1	940	430
E-5(600,300)	-1,4	0	600	300
E-6(1000,300)	1,4	0	1000	300
E-7(800,120)	0	-1,4	800	120
E-8(800,480)	0	1,4	800	480
E-9(800,300)	0	0	800	300
E-10(800,300)	0	0	800	300
E-11(800,300)	0	0	800	300

Optou-se por usar erro puro, com uma confiabilidade de 95%. Assim, diagramas de Pareto e análises de variância (ANOVA) foram obtidos e superfícies de resposta foram traçadas para as respostas quantitativas. Para ANOVA, foi utilizado o método quadrático de duas vias. As medições com desvio-padrão abaixo de 10% foram utilizadas [94]. Os

valores de temperatura e tempo foram baseados na literatura consulta no referencial teórico e em experimentos preliminares realizados na câmara de nitretação, bem como sua caracterização superficial.

3.2. Preparação de amostras

As amostras de Ti6Al4V ELI foram cortadas a partir de uma barra (Sandinox, Brasil), cuja composição é vista na **Tabela 4**, em discos de diâmetro 15,8 mm e espessura 1 mm através de discos de corte de SiC (Microdiamant, Alemanha) em uma serra de precisão (Buehler, Estados Unidos da América) e lixadas de forma uniaxial em 4 etapas, com abrasivos de granulometrias de 400, 600, 800 e 1.000 até um acabamento superficial de aproximadamente 85 nm. Após isso, foram limpas em banho ultrassônico, imersas em acetona P.A. por 30 minutos e secadas ao ar. Este acabamento superficial não precisa de polimento, uma vez que a norma não restringe a rugosidade das superfícies metálicas para implantes. Além disso, esse procedimento de preparação é comumente aplicado na indústria. Como foi discutido, a viabilidade celular e a osteogênese são favorecidas em superfícies com maior rugosidade.

Tabela 4 – Composição química da liga Ti6Al4V ELI, de acordo com a norma [95]

Elemento	H	N	C	Fe	O	V	Al	Ti
Composição	≤ 0,012	≤ 0,050	≤ 0,080	≤ 0,205	≤ 0,130	3,5 – 4,5	5,5 – 6,5	Saldo

3.3 Nitretação a plasma

Cada amostra foi colocada individualmente na câmara de nitretação, disposta em uma cavidade formadora do fenômeno cátodo oco, em um porta-amostras também feito de Ti6Al4V. As amostras foram tratadas termicamente em plasma gerado por fonte de radiofrequência (RF) de frequência 13,56 MHz e potências que foram variadas conforme a temperatura. A pressão de base de 0,1 mbar foi usada e pressão de trabalho em todos os tratamentos foi de 1 mbar. A **Figura 6** mostra um esquema da câmara de nitretação em funcionamento.

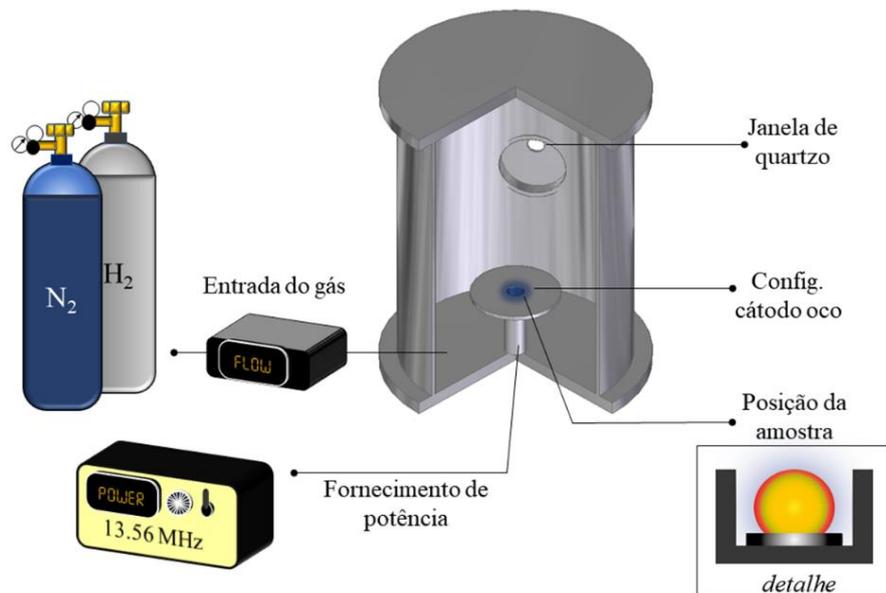


Figura 6 – Esquema de câmara de nitretação a plasma

O plasma gerado para realização de um *etching*, processo para limpeza e remoção de óxidos, foi composto, em volume, de 70% de H₂ e 30% de Ar. O plasma gerado para o processo de nitretação foi de uma composição, em volume, de 80% de N₂ e 20% de H₂. Após os tratamentos, as amostras foram mantidas em vácuo até o total resfriamento da câmara. A temperatura foi medida na superfície da amostra.

3.4. Caracterização físico-química

3.4.1. Ângulo de Contato

Medidas de ângulo de contato (AC) estático foram realizadas nas amostras, através de um tensiômetro (Modelo 300, SEO Phoenix, Coreia do Sul), a partir de 6 medições, com a técnica da gota sêssil, utilizando-se de água destilada.

3.4.1. Microscopia Óptica

A textura foi analisada utilizando-se microscopia óptica. Foi utilizado um microscópio Epiphot, localizado no Laboratório de Metalografia da UCS.

3.4.2. Rugosidade

A rugosidade Ra foi avaliada através de medições em um perfilômetro (112, Taylor Hobson, Inglaterra), com a média de 3 trilhos de 10 mm em 3 direções diferentes (0°, 45°, 90°). O equipamento encontra-se no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos II (LEST II).

3.4.3. Difração de raios X com ângulo rasante

Difração de raios X por ângulo rasante foi realizada para observar-se a formação de diferentes compostos na região próxima à superfície, utilizando um difratômetro (Modelo XRD-6000, Shimadzu, Japão) e uma radiação Cu-K α de $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$. Um ângulo rasante de 2° foi utilizado, variando-se 2θ entre 33-45°.

3.4.4. Microdureza

A microdureza foi avaliada por meio de medidas através de um aparelho de dureza ultra-micro (modelo DUH211S, Shimadzu, Japão), equipado com indentador de diamante, com cargas de 100 mN e profundidades inferiores a 1 μm por, pelo menos, três medições. O equipamento encontra-se no Laboratório de Materiais Cerâmicos – LMCer da UCS.

3.4.5. Espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente

A penetração de nitrogênio foi avaliada por espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente (GD-OES), através de um espectrômetro (GD-Profilier 2, Horiba, Japão) com pressão de 630 Pa e potência RF de 40 W. Dos espectros de GD-OES também foram obtidos dados da razão titânio/nitrogênio, integrando as linhas de ambos elementos e dividindo suas áreas.

3.4.6. Microscopia eletrônica de varredura e análise química elementar de varredura

As amostras supracitadas foram cortadas transversalmente em uma serra de precisão e então embutidas em resina condutora, lixadas e polidas com pasta de diamante até obtenção de superfície espelhada e atacadas com reagente Kroll (1-3 mL de HF + 2-6 mL de HNO₃ + 100 mL de H₂O) para realizar microscopia transversal através de microscopia óptica de varredura por emissão de campo, MEV-FEG (Mira 3, Tescan, República Tcheca), para medir-se a camada nitretada e verificar a microestrutura. Junto à microscopia, espectroscopia por dispersão em energia (EDS) foi realizada, em um detector (X-act, Oxford Instruments, Reino Unido), a fim de obter um mapa de composições da superfície. As microscopias foram realizadas no LCMic.

3.5. Definição da condição ideal

A condição ideal da nitretação a plasma da liga foi obtida levando-se em consideração as caracterizações supracitadas. Além disso, ponderou-se sobre a microestrutura obtida nas diferentes condições e sobre os aspectos de produção e aplicabilidade, dando especial preferência a tempos mais curtos.

3.5.1. Caracterização físico-química da condição ideal

As subseções seguintes descrevem os métodos utilizados na caracterização da condição ideal selecionada com base nos dados estatísticos das caracterizações físico-químicas preliminares.

3.5.1.1. Espectrometria de retro-espalhamento de Rutherford (RBS)

Para quantificar o nitrogênio difundido na superfície da amostra, foi realizada a espectrometria de retroespalhamento de Rutherford (RBS) em um acelerador Tandem 3

MV, do Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com um feixe iônico monoenergético de He⁺ de 2 MeV e um ângulo de retroespalhamento de 165°. A simulação foi feita usando SIMNRA [96], através do qual uma comparação fornece a composição da amostra.

3.5.1.2. Perfilometria óptica

A análise da topografia de superfície formada após PN foi realizada através de um perfilômetro óptico (CountouGT-K, Bruker, EUA), localizado no Instituto de Materiais Cerâmicos (IMC) da UCS. As medições foram feitas em áreas de varredura de 1 mm² (ampliação de 10x) e 0,2 mm² (ampliação de 50x), com *cut-offs* de 0,8 mm e 0,08 mm, respectivamente.

3.5.1.3. Teste de micro-abrasão

O teste de desgaste foi realizado com um equipamento modificado, anteriormente descrito em [97], que se encontra no LMCer-UCS. Uma suspensão abrasiva aquosa de carboneto de silício (SiC), com diâmetro de partículas de 0,5 µm, foi gotejada sobre uma esfera rolante através de uma bomba peristáltica e um agitador magnético foi usado para manter a suspensão em constante movimento. A força de contato da esfera de aço duro na superfície da amostra é medida com uma célula de carga. O deslizamento da esfera contra a superfície da amostra gera crateras, cujos diâmetros (relacionados à resistência ao desgaste da amostra e condições de teste), foram medidos com o auxílio de um microscópio óptico e software de aquisição de imagens. O coeficiente de desgaste é obtido como a inclinação da linha reta ajustada ao volume de desgaste por força normal *versus* os dados da distância de deslizamento. A **Figura 7** ilustra o mecanismo, descrito acima, que gera as crateras nas amostras.

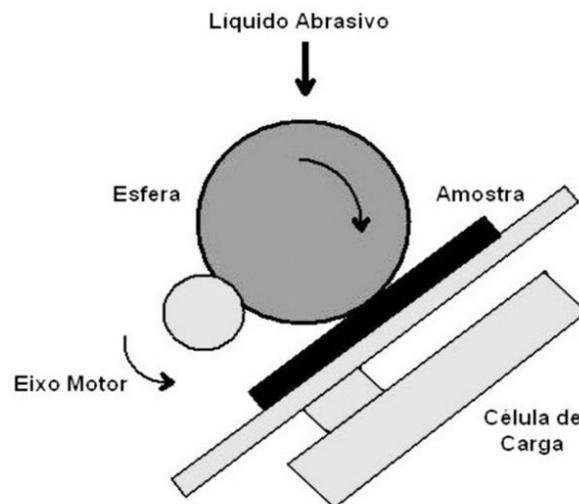


Figura 7 – Esquema do equipamento para princípio de funcionamento do ensaio de microabrasão, reprodução [97].

3.5.1.4. Ensaio eletroquímico

Estudos eletroquímicos foram realizados utilizando técnicas de polarização potenciodinâmica e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) empregando um equipamento Gamry Interface 1010E. As amostras foram mantidas por 1 h até que o potencial de circuito aberto (OCP) fosse alcançado antes de qualquer experimento eletroquímico. Os ensaios eletroquímicos foram realizados em fluido corporal simulado (SBF) a $36 \pm 0,5$ °C utilizando uma configuração de três eletrodos com eletrodo de referência Ag/AgCl, um fio de platina (Pt) como contra-eletrodo e a liga Ti6Al4V como eletrodo de trabalho (área de amostra de $1,6 \text{ cm}^2$). Todos os potenciais foram referenciados ao eletrodo Ag/AgCl. A solução de SBF foi preparada de acordo com [98] usando produtos químicos de grau reagente: $8,035 \text{ g L}^{-1}$ NaCl, $0,355 \text{ g L}^{-1}$ NaHCO₃, $0,225 \text{ g L}^{-1}$ KCl, $0,231 \text{ g L}^{-1}$ K₂HPO₄ · 3H₂O, $0,311 \text{ g L}^{-1}$ MgCl₂·6H₂O, 1,0 M HCl (39 mL), $0,292 \text{ g L}^{-1}$ CaCl₂ e $0,072 \text{ g L}^{-1}$ de Na₂SO₄ e água deionizada. A solução de SBF foi tamponada a pH 7,4 com $6,118 \text{ g L}^{-1}$ de tris (hidroximetil) aminometano e 1,0 M de HCl. O pH foi aumentado gradualmente para evitar a precipitação do fosfato de cálcio, em cada passo foi dada uma grande atenção para garantir que a solução permanecesse incolor e transparente. Quando ocorreu qualquer precipitação, a preparação da solução foi interrompida e reiniciada. A solução preparada de SBF foi mantida entre 5 – 10 °C no refrigerador antes de ser utilizada, dentro de um prazo de 30 dias após sua preparação. Os experimentos de EIS

foram realizados em potencial de circuito aberto com uma amplitude de 10 mV de 10 kHz a 100 mHz. Curvas de polarização potenciodinâmica (PDP) foram realizadas a partir do EIS para avaliar a característica das camadas de nitreto crescidos nas superfícies das ligas. O potencial de corrosão (E_{corr}), a densidade de corrente de corrosão (I_{corr}) e a taxa de corrosão foram calculados a partir das curvas de potenciodinâmica usando o método de extrapolação de Tafel. Imagens pós-corrosão foram obtidas com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura (SSX-550, Shimadzu, Japão).

3.5.2. Caracterização biológica *in vitro* da condição ideal

Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular foram realizados conforme métodos descritos na norma ISO 10993-5-2009 e ISO 10993-12-2004 utilizando-se células L929 (fibroblasto de camundongo) para determinar a citotoxicidade e a biocompatibilidade das amostras de Ti6Al4V puras e nitretadas. Primeiramente, para a obtenção de uma solução de extração, o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) foi colocado em contato com as amostras: 1) condição pura; 2) condição nitretada de Ti6Al4V com tratamento de plasma; (3 cm² mL⁻¹) durante 24 h a 37 °C em 5% de CO₂.

3.5.2.1. Citotoxicidade indireta – MTT

A citotoxicidade foi avaliada pelo método indireto do ensaio de MTT. Este método é baseado na redução do MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) pela enzima desidrogenase mitocondrial, na formação de cristais de formazan (Denizot & Lang, 1986). Resumidamente, as células L929 foram semeadas a uma densidade de 5x10⁴ células mL⁻¹ em 100 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). Após 24 horas, as células foram tratadas com a solução de extração obtida pela imersão das amostras durante 1, 2 e 7 dias. Para o controle negativo, utilizou-se meio DMEM (10% de SFB e 1% P/S) e para o controle positivo utilizou-se DMSO 5% (dimetilsulfóxido) a 37°C em 5% de CO₂. O meio foi removido e 1 mg mL⁻¹ de MTT em meio isento de SFB e P/S foi adicionado aos poços. As placas foram incubadas a 37 °C durante 2 h em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Subsequentemente, retirou-se a solução de MTT e dissolveu-se os cristais de formazan em

100 μL de DMSO (dimetilsulfóxido). Realizou-se a leitura espectrofotométrica a 570 nm em um leitor de microplacas (espectros Max190, Molecular Devices, EUA) e os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade. A absorbância do controle negativo representou 100% de viabilidade e os valores das células tratadas foram calculadas como porcentagem do controle. As alterações na viabilidade celular analisadas pelo método indireto foram observadas e documentadas, após 1, 2 e 7 dias de exposição ao tratamento das amostras. O grupo de controle negativo foi tratado com meio DMEM (10% de SFB e 1% P/S).

A significância estatística foi avaliada utilizando t-teste e análise de sentido único de variância (ANOVA) com o teste de comparação de múltiplas médias (Tukey) para avaliar as diferenças estatísticas no caso da distribuição normal. Significância foi aceita para p inferior a 0,05 utilizando o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, versão 19.0) para Windows.

3.5.2.2. Ensaio de alteração morfológica – *Giemsa*

Para verificar alterações morfológicas nas células L929 utilizou-se a coloração de *Giemsa*, para isso as mesmas foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^4 células mL^{-1} com 100 μL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). Após 24 horas, as células foram tratadas com a solução de extração, citada anteriormente, e incubadas por 1, 2 e 7 dias. Para o controle negativo, utilizou-se meio DMEM (10% de SFB e 1% P/S) e para o controle positivo utilizou-se DMSO 5% (dimetilsulfóxido), incubou-se a 37 °C em 5% de CO_2 , no mesmo tempo citado acima. O meio foi removido e fixaram-se as células com metanol durante cinco minutos e adicionou-se solução de *Giemsa* durante 10 minutos na mesma placa. Após, visualizou-se a placa em microscopia com ampliação de 100x.

3.5.2.3. Determinação de morfologia, distribuição topográfica e parâmetros de adesão de células L929

Para a determinação de parâmetros de adesão, distribuição topográfica e morfologia células L929 foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 5×10^4 células mL^{-1} sobre as amostras citadas anteriormente para as análises de 1,2 e 7 dias. Sendo assim, utilizou-se 2000 μL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) sobre as amostras durante 1, 2 e 7 dias. Posteriormente fixou-se as células com solução de glutaraldeído 3% em PBS (v/v) durante 15 minutos e com etanol 30, 50, 70, 90 e 100% (v/v) durante 10 minutos para cada concentração, para permitir o seu manuseio no interior do microscópio eletrônico. Após, as amostras foram mantidas em dessecador até a realização da análise de MEV-FEG.

4. Resultados e discussão

O presente capítulo traz os resultados obtidos para as caracterizações físico-químicas e biológicas das amostras, incluindo as análises estatísticas para dados quantitativos e semi-quantitativos e correlações com a literatura dentro das possíveis aplicações das superfícies resultantes em aplicações biomédicas.

4.1. Análise estatística dos dados

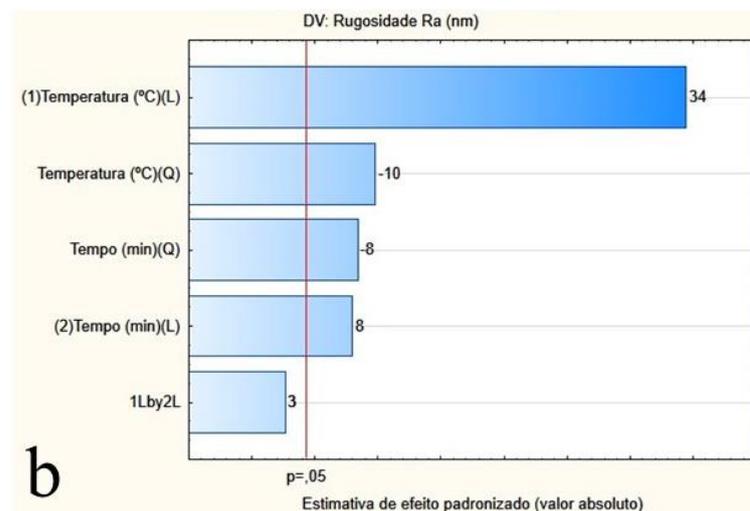
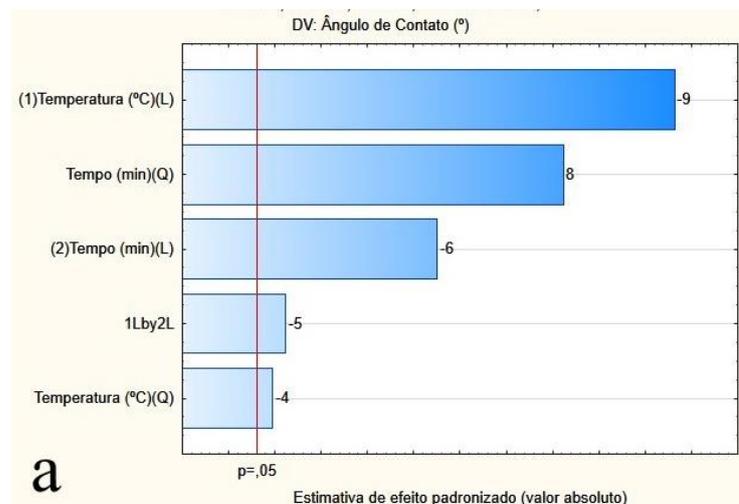
A análise estatística dos dados foi realizada para todas as variáveis quantitativas estudadas. Análise de variância (ANOVA) e superfícies de resposta serviram de base na definição de alguns parâmetros, incluindo na determinação de uma condição ideal. Os dados utilizados nas análises estatísticas se encontram na **Tabela 5**, onde para cada caracterização encontram-se os dados de referência.

Tabela 5 – Resultados qualitativos e semi-quantitativos para as respostas avaliadas

Código do experimento	AC (°)	Rugosidade (nm)	Pico TiN (intensidade areal)	Dureza (HV)	Razão Ti/N
Sem tratamento	72 ± 1	86 ± 14	0	353 ± 8	-
E-1 _(660,170)	55 ± 2	139 ± 6	0	715 ± 37	23,8
E-2 _(940,170)	47 ± 3	384 ± 19	30	1464 ± 75	11,1
E-3 _(660,430)	61 ± 5	169 ± 4	17	1057 ± 37	20,7
E-4 _(940,430)	37 ± 4	474 ± 35	30	1492 ± 41	12,5
E-5 _(600,300)	44 ± 3	87 ± 6	0	659 ± 19	25,0
E-6 _(1000,300)	36 ± 3	474 ± 3	61	1605 ± 39	10,5
E-7 _(800,120)	67 ± 1	247 ± 17	24	1279 ± 39	16,0
E-8 _(800,480)	48 ± 5	342 ± 22	24	1334 ± 97	13,1
E-9 _(800,300)	46 ± 2	369 ± 7	27	1212 ± 105	14,7
E-10 _(800,300)	46 ± 3	370 ± 6	25	1223 ± 102	14,4
E-11 _(800,300)	49 ± 3	389 ± 21	24	1213 ± 74	14,5

O fator mais relevante de nitretação, de acordo com os dados estatísticos, foi a temperatura. Os diagramas de Pareto na **Figura 8** mostram como a temperatura linear (L) em todos os casos é o fator mais relevante, acima do *cut-off* estabelecido para o valor de *p*. Os fatores quadráticos (Q) e as interações LxL também aparecem entre os principais fatores nas respostas, porém com menor significância. Sendo assim, o fator temperatura

linear é o principal influenciador nos resultados para as caracterizações estudadas, sendo decisivo na diminuição do ângulo de contato, no aumento da rugosidade, na intensidade do pico referente ao TiN (111) nos difratogramas, na microdureza superficial e na diminuição da razão entre o titânio e o nitrogênio nessas superfícies. Os resultados baseados nas caracterizações servem de embasamento para corroborar algumas das hipóteses levantadas na literatura, tais como a presença do composto cerâmico TiN acompanhada de aumento na microdureza e a difusão de nitrogênio em regiões próximas à superfície de peças tratadas em processos assistidos por plasma.



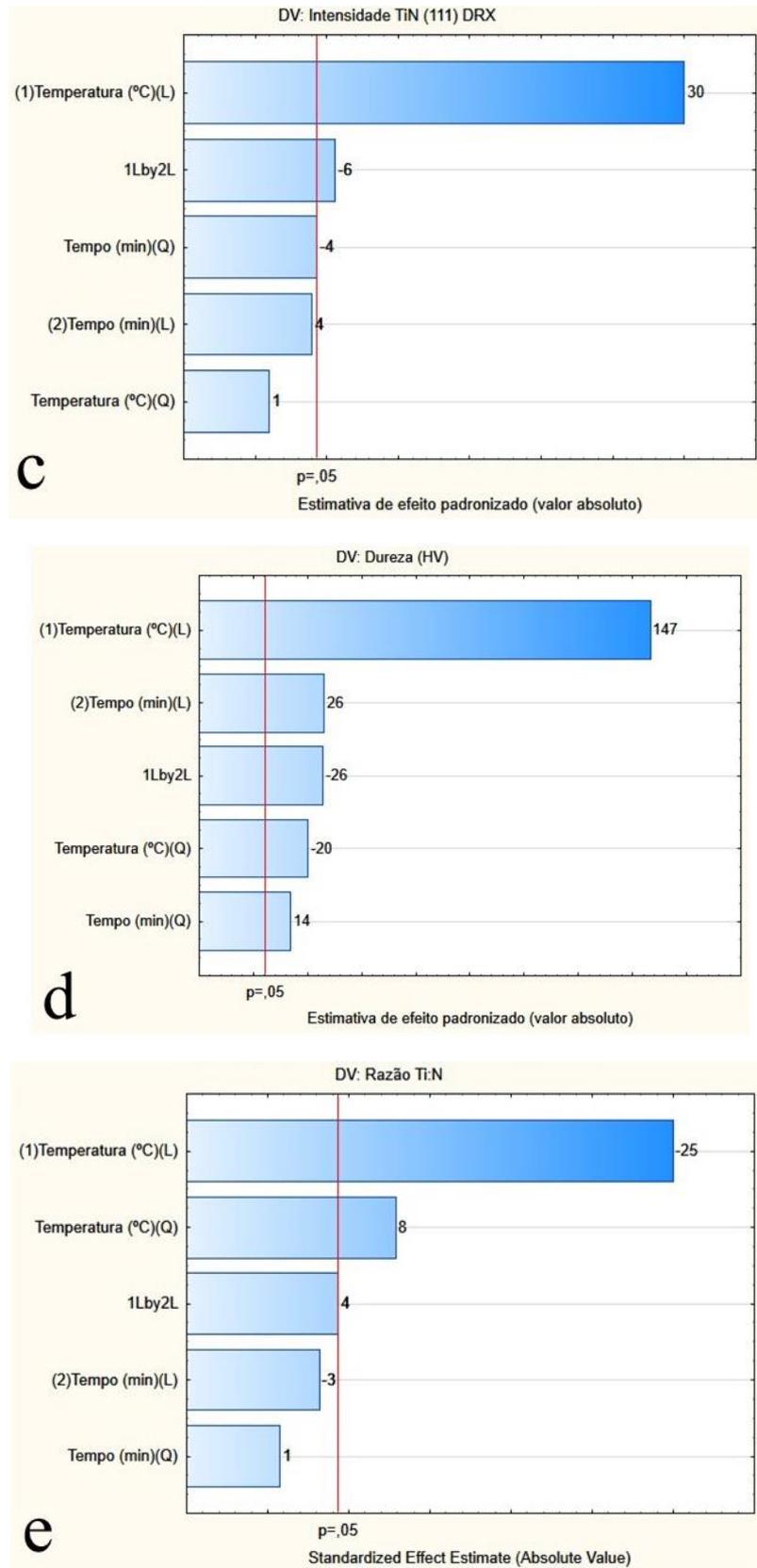
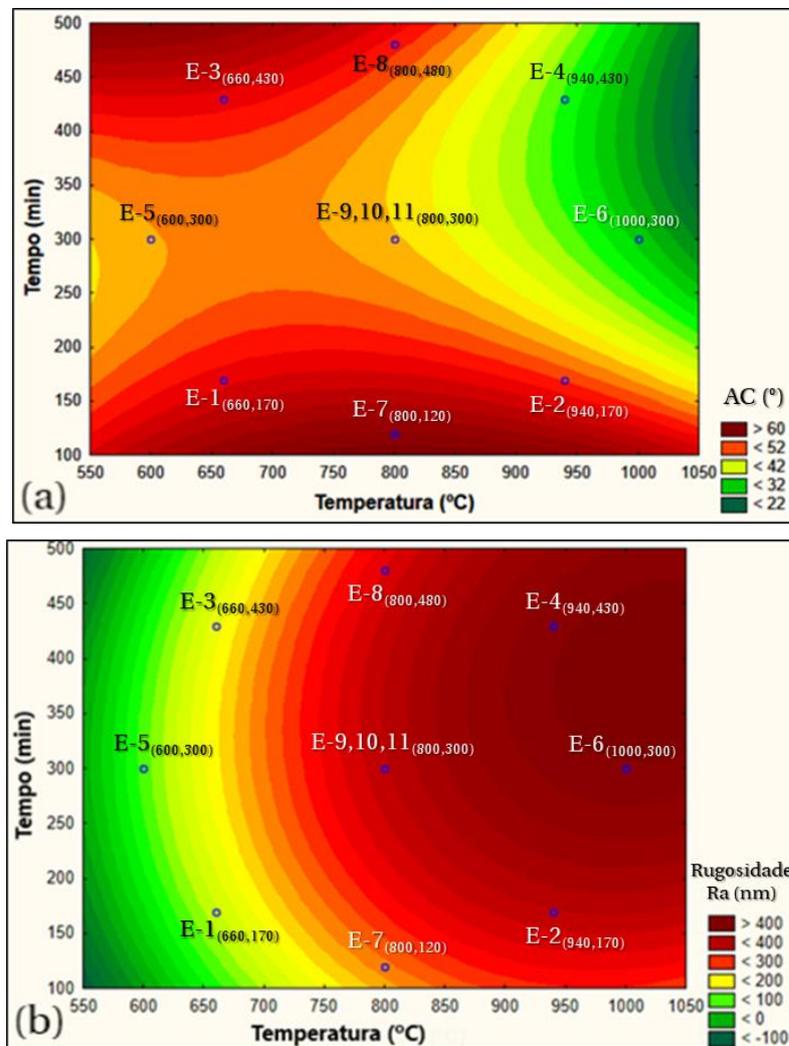


Figura 8 – Diagramas de Pareto para as variáveis estudadas: a) AC, b) rugosidade Ra, c) intensidade do pico TiN (111), d) dureza e e) razão Ti/N das linhas de intensidade obtidas em GD-OES

Já a **Figura 9** mostra as superfícies de respostas para as caracterizações em função das variáveis. Nota-se que a superfície de resposta referente ao ângulo de contato não possui uma tendência única, como as demais, apresentando um paraboloide hiperbólico (sela). Elas complementam o que os diagramas de Pareto mostram, que a temperatura provoca as mais impactantes alterações nas propriedades das superfícies. Nota-se, por meio destas, que tratamentos acima de 800 °C apresentam propriedades mais próximas do esperado para um biomaterial aplicado, com aumentada molhabilidade, maior dureza, maior rugosidade e presença de nitrogênio, que confere o caráter cerâmico dessas camadas.



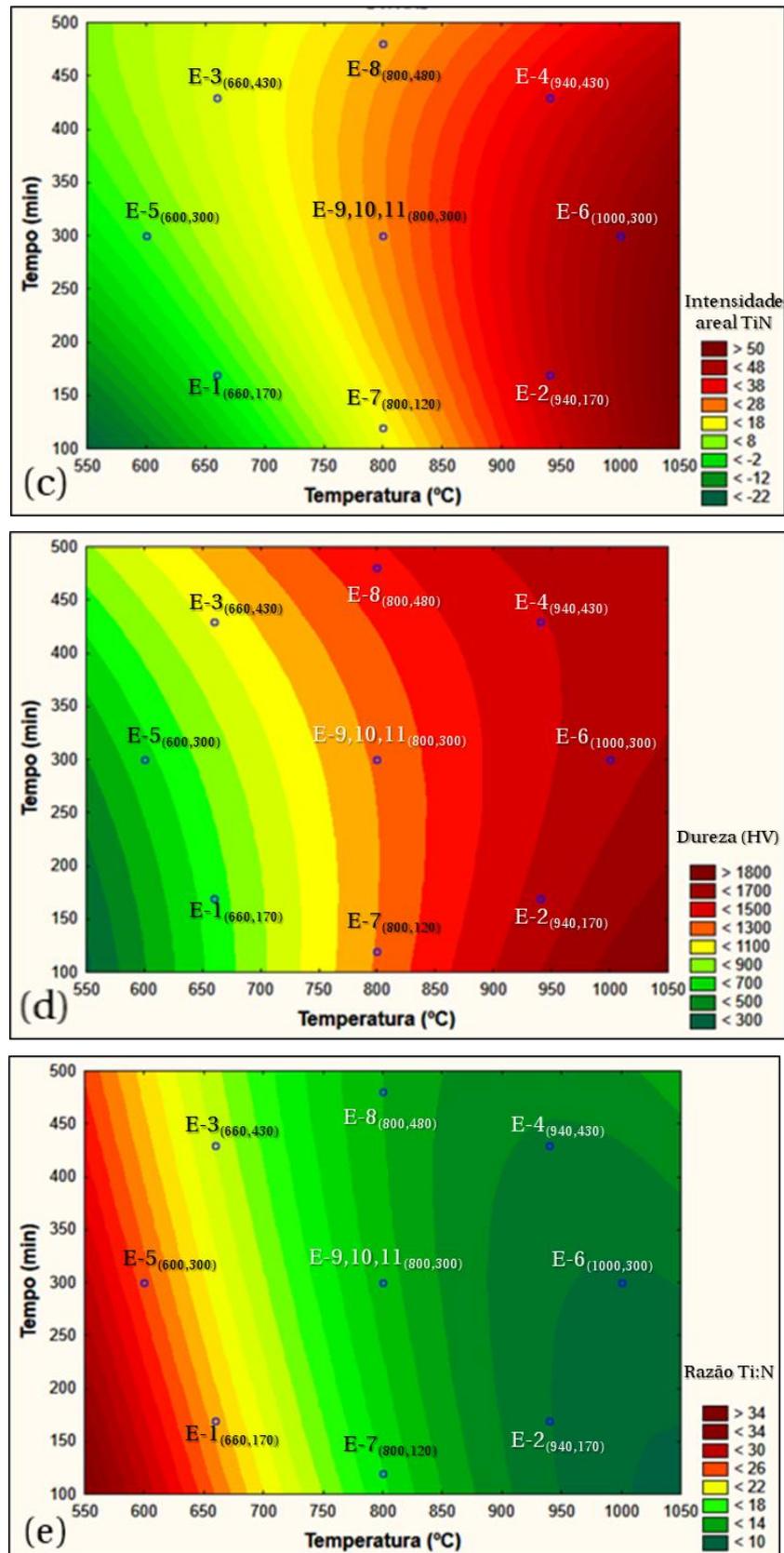


Figura 9 – Superfícies de resposta para os parâmetros (a) ângulo de contato, (b) rugosidade Ra, (c) pico TiN (111), (d) microdureza e (e) razão Ti/N por GD-OES.

É também através das superfícies de resposta que podemos observar a interação de algumas variáveis. Por exemplo, a razão de Ti:N diminui ao longo da temperatura no gráfico e, de maneira análoga, o pico referente a TiN se intensifica, e esta última informação está em consonância com o aumento no perfil de microdureza, que aumenta conforme a temperatura.

A tabela ANOVA, esquematizada na **Tabela 6**, na qual se observa o alto valor de F calculado em comparação com o valor tabelado, proveniente de uma tabela com percentis 95% da distribuição F para os graus de liberdade, e o baixo valor de p para o modelo, justificam a sua significância estatística.

Tabela 6 – Tabelas ANOVA para as variáveis estudadas

Variável	Varição	SS ²	DF ³	MS ⁴	F _{calculado}	p
Ângulo de contato (°)	Regressão	782,7346	5	156,5469	5,9301	0,0365
	Residual	131,9927	5	26,3985		
	Total	914,7273	10			
$R^2 = 0,8557$; $F_{\text{tabelado}} = 5,05$						
Rugosidade (Ra)	Regressão	1,7598E5	5	3,5197E4	510,9688	9,1407E-7
	Residual	344,4134	5	68,8827		
	Total	1,7633E5	10			
$R^2 = 0,9980$; $F_{\text{tabelado}} = 5,05$						
Intensidade do pico TiN (DRX)	Regressão	9,8933E3	5	1,9787E3	7,7881	0,0209
	Residual	1,2703E3	5	254,0640		
	Total	1,1164E4	10			
$R^2 = 0,8862$; $F_{\text{tabelado}} = 5,05$						
Dureza (HV)	Regressão	8,766E5	5	1,7533E5	54,1630	2,3572E-4
	Residual	1,6186E4	5	3,2371E3		
	Total	8,9285E5	10			
$R^2 = 0,9980$; $F_{\text{tabelado}} = 5,05$						
Razão Ti/N	Regressão	242,8671	5	48,5734	98,1402	5,4912E-5
	Residual	2,4747	5	0,4949		
	Total	245,3418	10			
$R^2 = 0,9980$; $F_{\text{tabelado}} = 5,05$						

4.2. Ângulo de contato e rugosidade

O Ti6Al4V, com acabamento de superfície de lixa de 1.000 grãos, possui um caráter hidrofílico médio, com um ângulo predominante de cerca de $72^\circ \pm 1$. Todas as amostras tratadas mostraram redução nos valores do ângulo de contato. Os experimentos E-

² SS: soma de quadrados

³ DF: graus de liberdade

⁴ MS: média quadrática

1_(660,170) e E-3_(660,430) exibiram um caráter menos hidrofílico comparado ao experimento E-5_(600,300), apesar de ambos terem superfícies mais ásperas. E-5_(600,300) não teve sua rugosidade afetada - quando comparada com amostras intactas; no entanto, a molhabilidade aumentou. Embora a temperatura tenha maior influência do que o tempo, na molhabilidade (de acordo com a Figura 9a), o experimento com menor variação na sua molhabilidade foi o E-7_(800,120), tratado a 800 °C, pelo menor tempo (2 h). Pontos axiais no DCRR, E-9_(800,300)-E-11_(800,300), também tratados a 800 °C por 5 h, apresentaram um AC médio de 47°. A temperatura também é o principal efeito do aumento da rugosidade, um fator que está diretamente relacionado ao bombardeamento iônico com maior intensidade que leva à pulverização catódica e à redeposição do substrato e da camada de compostos [48,49]. Uma correlação esquemática rugosidade-molhabilidade (**Figura 10**) ilustra alguns dos principais efeitos observados, comparando os maiores e menores ângulos de contato experimentais.

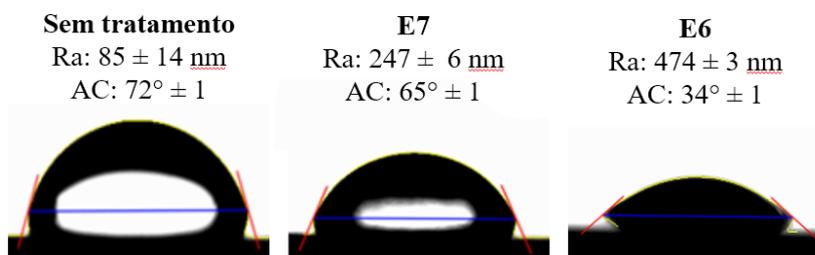


Figura 10 – Correlação entre molhabilidade e rugosidade superficial, mostrando extremos ângulos de contato obtidos.

Ângulos de contato menores de 90° caracterizam superfícies hidrofílicas, enquanto que acima disso, as superfícies são consideradas hidrofóbicas. De acordo com a literatura, a hidroflicidade mais alta de uma superfície, em contato com tecidos, promove cura acelerada e osteointegração [66]. A molhabilidade é um indicativo precoce, em biomateriais, de como pode ocorrer a adesão e disseminação de tecido ou material celular [51]. A baixa molhabilidade também está relacionada com a incrustação biológica, embora o incremento da rugosidade possa auxiliar a adesão das bactérias [99,100]. Os baixos ângulos de contato também são conhecidos por serem mais adequados para a osseointegração [66,101]. A adesão e a proliferação de fibroblastos são diminuídas, enquanto favorecem a atividade dos osteoblastos [102,103].

A molhabilidade afeta quatro aspectos principais do sistema biológico, de acordo com [104]: (1) adesão de proteínas e outras macromoléculas na superfície, (2) interações dos tecidos mole e ósseo com a superfície pré-condicionada, (3) adesão microbiana e formação de biofilme e (4) taxa de osteointegração *in vivo*.

Para investigar melhor esse padrão, a **Figura 11** correlaciona o comportamento da rugosidade superficial e do AC. As tendências observadas são como o ângulo de contato tende a diminuir junto com o aumento da rugosidade e como o tempo e a temperatura impõem variações nos valores para ambas as variáveis. Como observado na Figura 5b, a duração do processo, após algum tempo, parece não afetar de forma significativa a variação da rugosidade e do AC. No entanto, a análise estatística prova que é difícil prever resultados de molhabilidade com alta precisão, algo já mencionado na literatura [105–107].

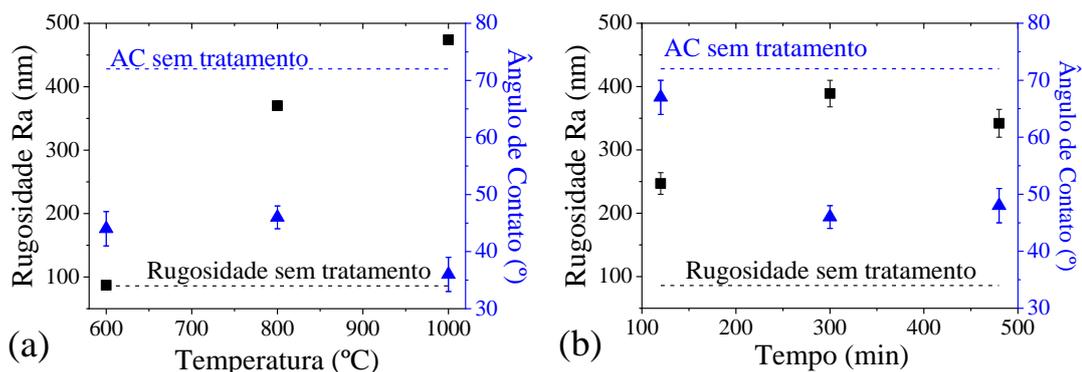


Figura 11 – Respostas obtidas para a rugosidade das superfícies (■) e ângulo de contato com a água (▲) como função de (a) variação da temperatura do processo com tempo fixo e (b) variação do tempo com temperatura fixa.

4.3. Aspecto visual e microscopia óptica

Aspecto visual é um dos primeiros indicativos da síntese de TiN. As amostras de nitretadas exibiram principalmente uma coloração dourada após os processos. Sabe-se que o TiN estequiométrico tem uma cor dourada, enquanto variações sub-estequiométricas de TiN têm tons de laranja ou cinza. Os tratamentos realizados a uma temperatura mais baixa resultaram em uma mudança de coloração não uniforme, com um halo de aspecto chamuscado nos contornos das amostras, indicando que nenhuma camada de composto foi formada, devido ao efeito de borda. **O Anexo A1**, ao final deste documento, ilustra a aparência visual das amostras. Quanto menor a temperatura, maior

esse halo se apresentou. A cor em amostras de temperatura mais baixa ($<700\text{ }^{\circ}\text{C}$) apresentou um aspecto cinza-amarelado, atribuído ao Ti_2N [47]. Posteriormente, os padrões do DRX para essas amostras confirmam isso.

A **Figura 12** mostra a textura da amostra através de microscopia ótica, em uma comparação entre E-5_(600,300), E-8_(800,480) e E-6_(1000,300) (de menor a maior temperatura); o primeiro mostrando a mesma textura como na condição não tratada, o segundo com uma superfície texturizada, e o último exibindo uma superfície altamente texturizada, com picos e vales em micro-escala por toda a superfície, condizendo com os resultados observados para rugosidade.

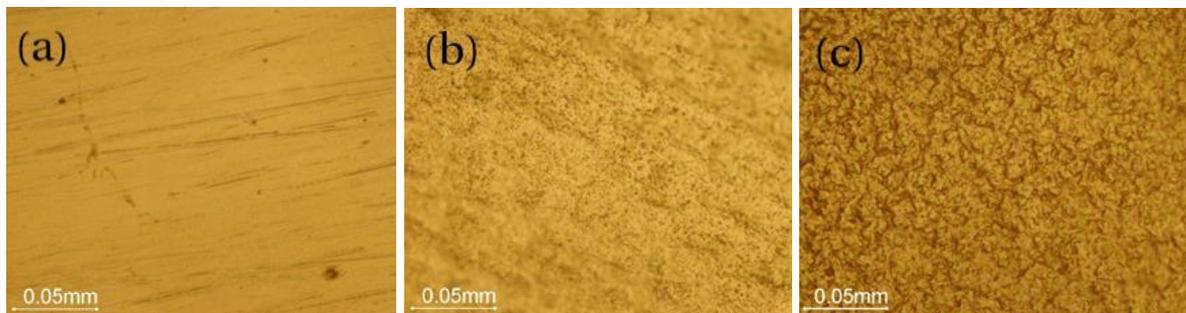


Figura 12 – Comparação entre as texturas de diversas amostras (a) E-5_(600,300), (b) E-8_(800,480) e (c) E-6_(1000,300), com um aumento nas microcavidades da esquerda à direita.

4.5. Difração de raios X

Medições de DRX elucidaram quais compostos se formaram na região da superfície. Os resultados mostraram o perfil predito de aumento na intensidade dos picos de TiN (111) e TiN (200) com a temperatura, sendo o tempo uma variável menos efetiva para a formação de TiN estequiométrico. A **Figura 13** mostra uma comparação entre E-5_(600,300) e E-6_(1000,300), que apresentam a maior variação nos picos totais. Tratamentos realizados a temperaturas de $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ e abaixo apresentaram pico de Ti_2N (111) mais intenso que o de TiN e, a partir de $940\text{ }^{\circ}\text{C}$, o TiN tornou-se o cristal preferencial obtido durante a nitretação.

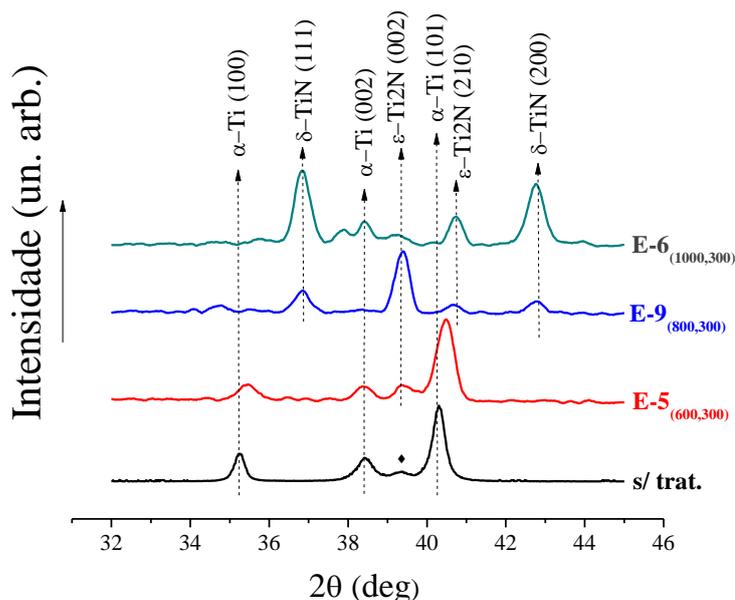


Figura 13 – Comparativo entre difratogramas de amostras sem tratamento, E-5_(600,300), E-6_(1000,300) e E-9_(800,300).

A Figura 13 é uma comparação válida, pois três amostras foram submetidas a tratamentos pelo mesmo tempo, mas diferentes temperaturas. Tanto para E-6_(1000,300) quanto para E-9_(800,300) é perceptível um pico referente a ϵ -Ti₂N (002). Os picos de α -Ti, inversamente, mostram uma diminuição na intensidade. Os picos de δ -TiN são claramente vistos para E-6_(1000,300) e E-9_(800,300), mas particularmente no primeiro. Uma mudança nos picos correspondentes a α -Ti (de $2\theta = 40,3^\circ$ na amostra pura para $40,48^\circ$ e $40,74^\circ$ em E-5_(600,300) e E-6_(1000,300)) é possivelmente atribuída a uma maior fase contendo nitrogênio Ti(N) em direção ao pico ϵ -Ti₂N (210). Os demais difratogramas podem ser vistos no **Anexo A2**.

Os processos de nitretação foram feitos na faixa das fases $\alpha + \beta$, exceto em 1000°C , que está acima da temperatura do β transus de 980°C . Picos de Ti- β não foram observados em nenhuma amostra, devido ao fato de que o nitrogênio estabiliza a fase α [12,108], uma vez que o Ti- β , quando enriquecido com nitrogênio, se transforma em Ti- α e acima da solubilidade máxima do nitrogênio Ti- α , transforma-se em nitretos de titânio. O Ti₂N é termodinamicamente favorecido em temperaturas mais baixas, pois a entalpia de formação para Ti₂N é menor que a TiN [28,109]. Diagramas de fase binária de nitrogênio-titânio ilustram aproximadamente como a difusão de nitrogênio acontece no titânio, onde menor concentração atômica de nitrogênio a temperaturas abaixo de peritectóide (1050°C) favorece tanto α -Ti quanto Ti₂N e além de 41%, TiN é favorecido [110]. Desvios nos

picos α estão associados a deformações de rede, indicando tanto as deformações compressivas, que são residuais do processo de nitretação [111], quanto a redução no espaçamento d [31,40], ou ligeira mudança na concentração da solução sólida [112], que favorece essas mudanças em direção aos picos contendo nitrogênio. Tanto as tensões de compressão residuais quanto a concentração de solução sólida contribuem para maior dureza e, a primeira, para melhorar a resistência e a fadiga, à medida que o estágio de nucleação de trinca é atrasado [113]. Além disso, não foram observados picos de óxidos de titânio (TiO_x) nos difratogramas. A **Equação 2**⁵ mostra de que profundidade a intensidade desses picos vem, onde é mostrado que a intensidade desses picos é majoritariamente (95%) dentro de uma profundidade de 3 μm .

$$(Eq. 2) \quad x = \frac{-\ln(1 - G_x)}{\mu \left(\frac{1}{\sin(\alpha)} + \frac{1}{\sin(2\theta - \alpha)} \right)}$$

O **Anexo A3** exemplifica como a penetração dos raios X ocorre em função da porção do pico em que se origina o sinal. Considerou-se um valor de coeficiente de absorção dos raios X (μ) para o TiN de $8,49 \times 10^{-2} \mu\text{m}^{-1}$ [38].

4.6. Microdureza

O endurecimento ocorreu em todas as amostras. Além disso, os valores de dureza mostraram aumento ao longo do tempo e temperatura. O experimento E-6(1000,300), tratado na temperatura máxima, apresentou a camada mais dura, enquanto a condição oposta, E-5(600,300), apresentava os menores valores de dureza. No entanto, E-5(600,300) teve uma dureza medida de 659 HV, quase o dobro da dureza do material não tratado (353 HV). A **Figura 14** explora essa tendência juntamente com a mudança de temperatura para a amostragem experimental.

⁵ Equação da profundidade de penetração dos raios X, onde G_x é a porção do pico, μ é o coeficiente de absorção dos raios X, α é o ângulo de incidência fixo e θ o ângulo de difração.

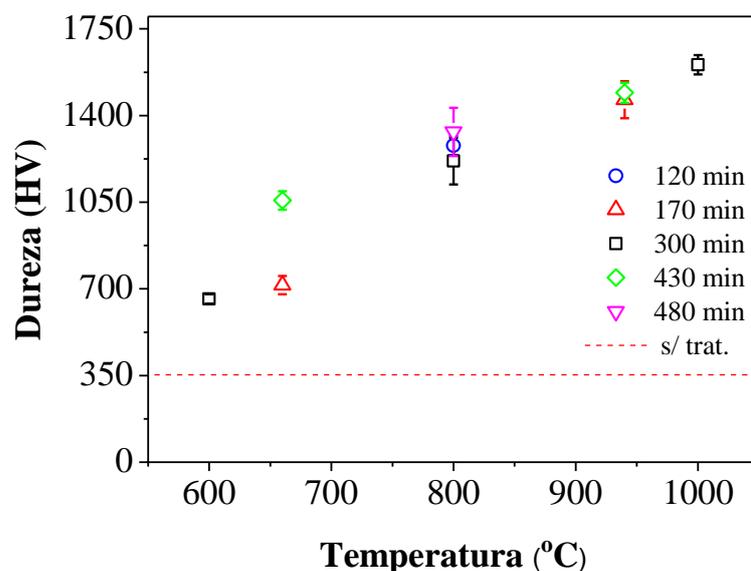


Figura 14 – Tendência dos resultados de microdureza para as amostras do delineamento experimental, em função da temperatura.

A dureza é um fator chave para o aprimoramento da superfície dos implantes ortopédicos ao fornecer um material de contato que compartilha dureza semelhante à dos ossos. A dureza também está correlacionada com o desgaste, a resistência à tração e a resistência ao escoamento [1]. Amostras com maior teor de nitrogênio apresentaram maior dureza. Quanto maior a quantidade de nitrogênio na superfície de Ti6Al4V, mais o nitrogênio compartilha ligações com Ti, diminuindo as ligações de Ti-Ti. Portanto, uma camada enriquecida com nitrogênio é de características mais dura e cerâmica [109]. Uma simplificação da cinética de difusão foi resumida como nitrogênio entrando na rede cristalina do titânio e sedimentando-se em seus interstícios como solução sólida. Acima da solubilidade do nitrogênio em titânio, os precipitados de Ti_2N e em altas temperaturas acompanhados de maior difusão de nitrogênio, os sítios octaédricos remanescentes são preenchidos e o TiN começa a se formar [114]. A solução sólida ancora os movimentos de discordância e, portanto, aumenta a dureza [113,115].

4.7. GD-OES

O espectro de GD-OES esclarece a existência de um perfil de difusão de nitrogênio no substrato. Para comparar a difusão de nitrogênio no substrato, foi realizada uma

relação semi-quantitativa de Ti/N, considerando a região em que o nitrogênio está concentrado. A relação Ti/N diminuiu significativamente de acordo com o tempo e a temperatura. Uma proporção máxima de 25 para E-5_(600,300) diminuiu para uma razão mínima de apenas 10,5 para E-6_(1000,300), o que também é um indicador do maior caráter da ligação Ti-N na região da superfície. Uma camada enriquecida em alumínio, abaixo da camada de compostos, também foi observada para quase todas as amostras (exceto para E-5_(600,300)). A **Figura 15** mostra as linhas GD-OES de titânio, alumínio e nitrogênio; a Figura 9a mostra o perfil detalhado para E-6_(1000,300) e a Figura 9b a variação da razão Ti / N para cada experimento no DCCR. O perfil sombreado mostra a difusão de nitrogênio, que chega até a zona enriquecida com alumínio.

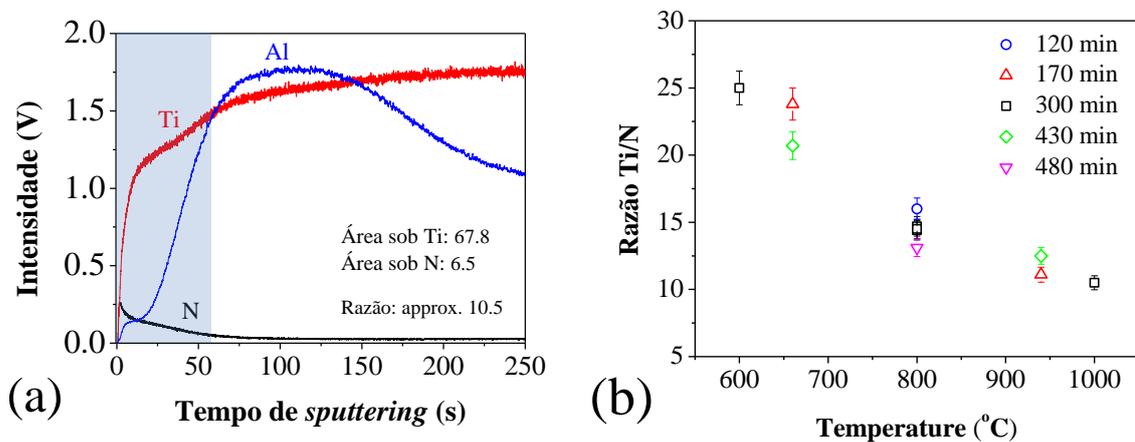


Figura 15 – Espectros de GD-OES de uma amostra nitretada (a) e tendência da razão Ti/N nas camadas conforme incremento de temperatura (b)

A razão das intensidades de luz obtidas dos espectros de GD-OES de titânio e nitrogênio comprovam que há uma correlação direta com a temperatura de tratamento [116] no aumento dos atributos cerâmicos da camada de composto. Todos os espectros de GD-OES podem ser vistos no **Anexo A4**.

4.8. Avaliação da microestrutura por microscopia eletrônica de varredura

A espessura das camadas nitretadas mostrou uma inclinação clara em relação aos mesmos valores, com valores de espessura para a camada composta caindo entre 1,5-2,5 μm . A **Figura 16** traz um resumo dos principais resultados que foram observados, mostrando microscopias da seção transversal das amostras de vários experimentos. A camada de compostos, em geral, não mostrou sinais de porosidade. Além disso, a

microestrutura varia com o incremento de temperatura. A formação de grãos colunares em uma matriz de Widmanstätten foi observada em E-2_(940,170), E-4_(940,430) e E-6_(1000,300) (acima de 900 °C), abaixo da camada de composto e uma camada de fase α , na zona de difusão. Isto é visto na Figura 17b e Figura 17d. Outro resultado visto foi como a zona de difusão foi maior em E-4_(940,430) em vez de E-6_(1000,300), com o tempo influenciando na profundidade com que o substrato foi afetado. E-1_(660,170) e E-3_(660,430) (Figura 17a e Figura 17d, respectivamente), mostraram presença de partículas β , uma vez que estes tratamentos foram realizados a temperaturas mais baixas.

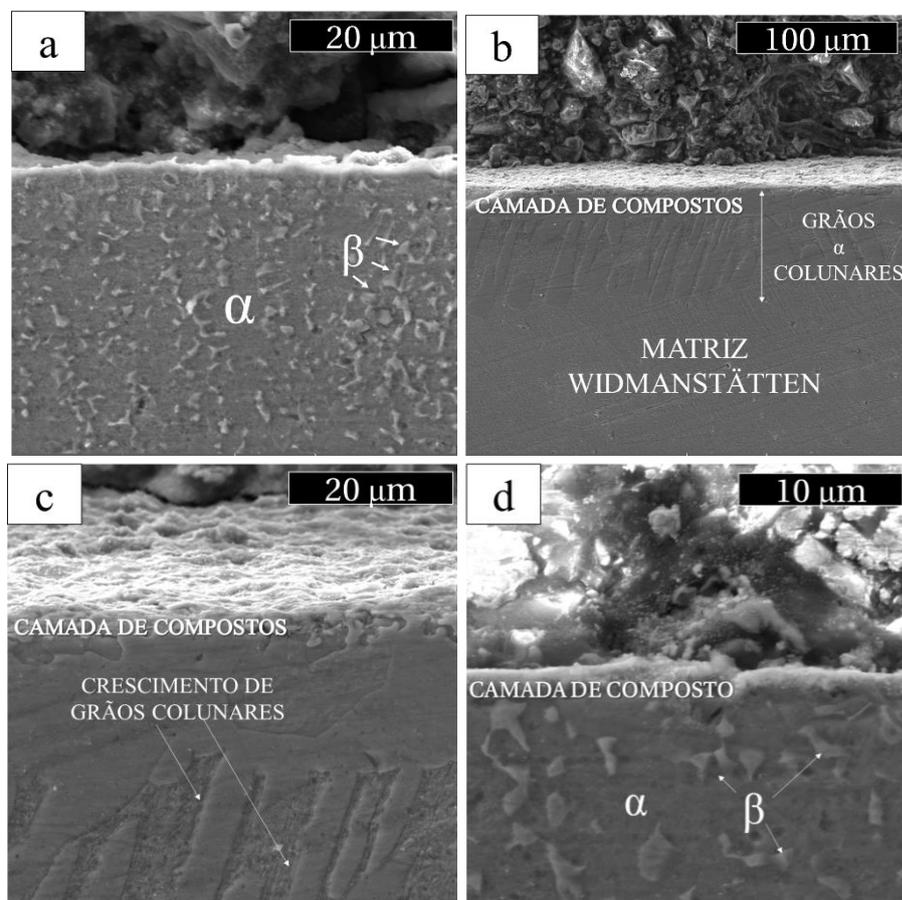


Figura 16 – Micrografias das amostras em seção transversal: amostras E-5_(600,300) (a) e E-6_(1000,300) (b). Maior magnificação evidenciando esses efeitos para (c) E-6_(1000,300) e (d) E-3_(660,430).

Uma fina camada de composto e uma zona de difusão muito mais espessa é uma maneira de fornecer estabilização para o primeiro, tornando menos provável que ele falhe por fadiga [117]. A característica mencionada foi observada nas amostras E-2_(940,170), E-4_(940,430) e E-6_(1000,300). Outra consideração é a possibilidade insignificante de ocorrer

retenção de martensita (α') durante o resfriamento do sistema. A energia desligada abruptamente fornecerá uma taxa máxima de resfriamento de aproximadamente $19\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$, enquanto a taxa mínima de resfriamento para obtenção de martensita se $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ [114–116]. Notou-se que o resfriamento rápido fazia com que a amostra sofresse macrodeformações. Deste modo, a energia foi desligada suavemente (cerca de $1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$) para evitar o efeito e fornecer uma taxa de resfriamento mais baixa, impedindo a obtenção de martensita. A menor taxa de resfriamento resulta em uma estrutura de Widmanstätten grosseira, ao invés de uma estrutura fina [118].

4.9. Caracterização da condição ideal

De todas amostras do planejamento amostral elencado, uma condição ideal, a qual reúne as propriedades mais aplicáveis no contexto dos biomateriais foi eleita, com base nos dados estatísticos obtidos, bem como na literatura consultada. As amostras com maior dureza, concentração de nitrogênio e pico atribuído ao TiN foram aquelas nitretadas em temperaturas mais elevadas. E-2_(940,170), conduzida a $T = 940^{\circ}\text{C}$ e $t = 170\text{ min}$ foi designada como a melhor condição, uma vez que há pouca diferença na camada resultante entre E-2_(940,170) e E-4_(940,430), por exemplo, que diferem no tempo de processo. Dentro do contexto da engenharia, um processo com menor tempo e resultantes semelhantes é empregado, a fim de diminuir custos.

4.9.1. RBS

Através da comparação de espectros simulados e experimentais de dados de RBS, **Figura 17**, é possível estimar, com dados simulados pelo SIMNRA [96], a concentração dos elementos encontrados na liga. A relação quantitativa atômica Ti:N é aproximadamente 1,06 de acordo com o espectro simulado, confirmando a estequiometria de TiN [109]. Traços de aço inoxidável AISI 304, como Fe e Ni, da câmara de vácuo foram encontrados. No entanto, as quantidades vestigiais para tais elementos são baixas e, de acordo com os ensaios biológicos realizados (*vistos em 4.9.5.*), não foi observada a citotoxicidade.

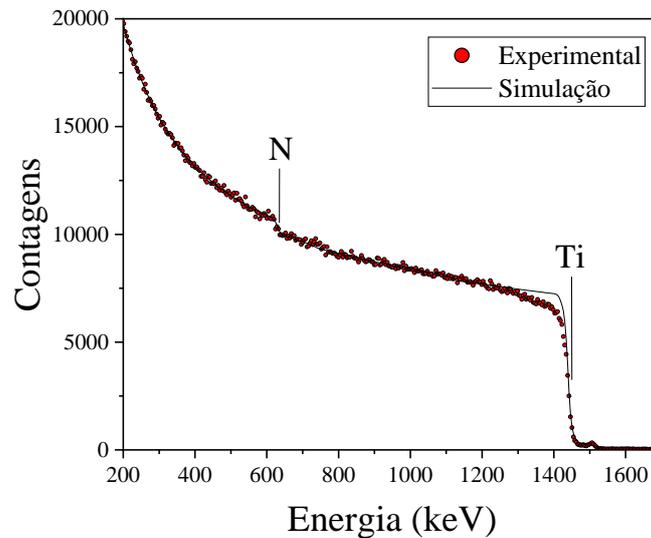


Figura 17 – Espectros de RBS simulados e experimentais para amostra nitretada a plasma a 940°C

4.9.2. Perfilometria óptica

Resultados de perfilometria óptica representaram a topografia das superfícies, tanto antes quanto após a nitretação a plasma. As superfícies processadas mostraram, conforme observado na análise prévia de rugosidade, um aumento no desnível. Isto é ainda confirmado através de superfícies escaneadas tridimensionalmente, **Figura 18**, onde as micro-ranhuradas e micro-cristas podem ser vistas em detalhe na Figura 20d para a amostra nitretada. Estudos anteriores mostraram que a temperatura da nitretação a plasma cria grãos mais difusos, o que pode ser devido à aglomeração de grãos menores e à ocultação de linhas de polimento [67,119], algo não alcançado aqui, provavelmente pela escolha de um acabamento mais grosseiro. Em vez disso, a texturização seguiu aproximadamente as linhas de lixamento (a Figura 20c e a Figura 20d expõem este efeito).

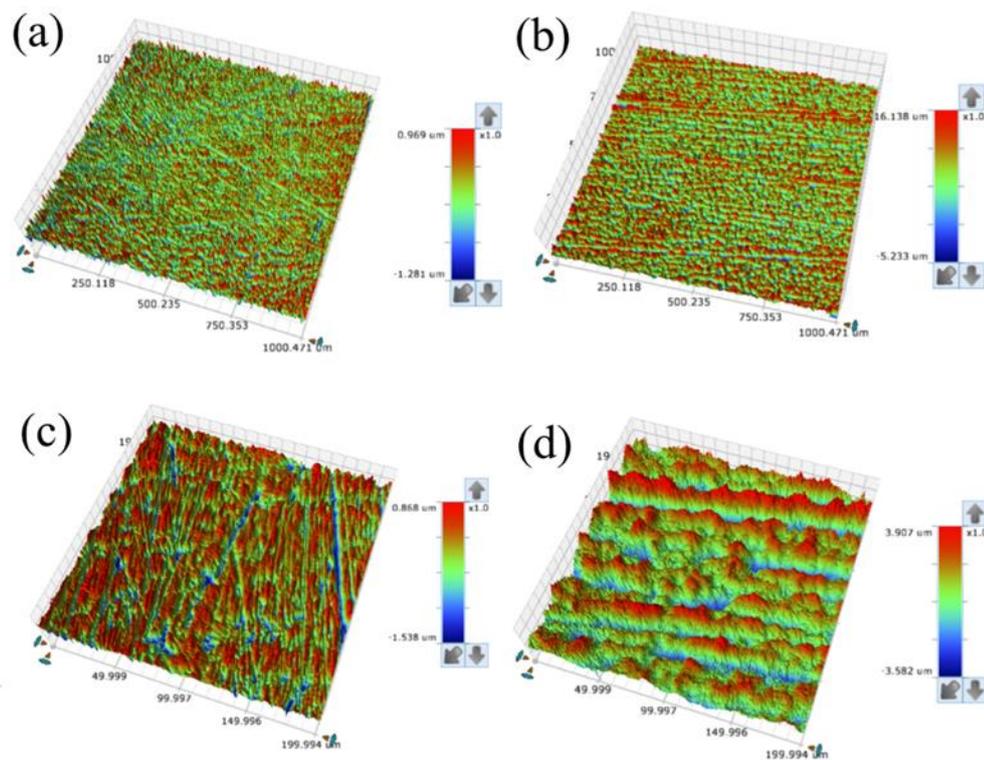


Figura 18 – Perfilometria óptica de amostras com aumento de 10x para (a) sem tratamento e (b) nitretada e ampliação de 50x para (c) sem tratamento e (d) nitretada.

A altura média, considerando-se picos e vales, em torno de 5 nm para a amostra nitretada é um aumento considerável em comparação com a amostra não tratada, cuja altura média é de -0,115 nm. Essa intensificação na irregularidade se desenvolve a partir do jateamento iônico da descarga luminescente que deforma essas superfícies plasticamente [35,119].

O efeito de rugosidade desempenha um papel significativo nas aplicações de osteointegração, pois a área superficial é aumentada e ajuda a proliferar os osteoblastos e, portanto, induz a formação de tecido ósseo [67,120]. Superfícies texturizadas promovidas pela nitretação também têm um papel em outras implicações biológicas, como discutido em 4.9.5.

4.9.3. Teste de micro-abrasão

As amostras para os testes de microabrasão foram processadas a 660 °C e 940 °C, ambas por 3 horas (*etching* de 10 minutos, seguida pela nitretação de 170 minutos). Estes

últimos mostraram oferecer um menor coeficiente de desgaste, embora ambos tenham apresentado melhora em comparação à amostra original, como pode ser inferido a partir da análise dos dados mostrados na **Figura 19**. Um exemplo de cratera gerada nos ensaios de micro-abrasão pode ser visto no **Anexo A5**.

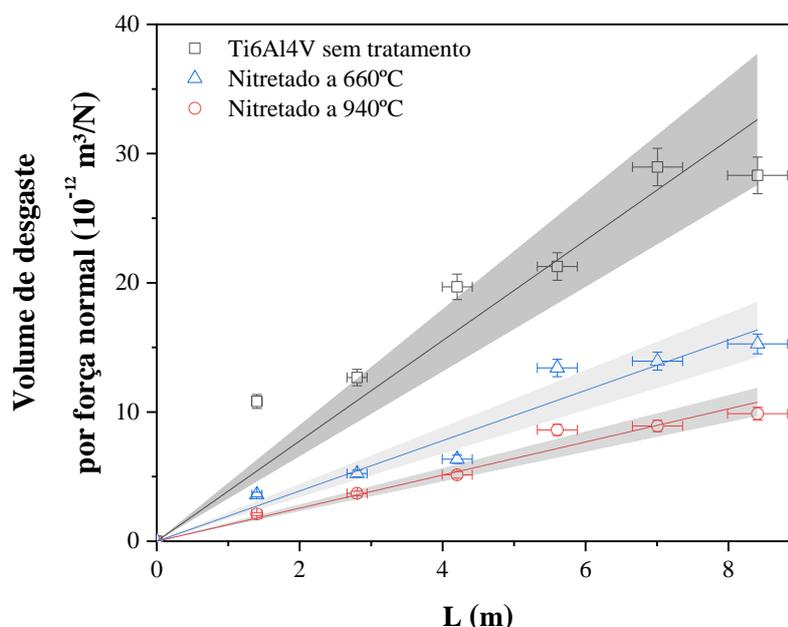


Figura 19 – Resultados de desgaste por microabrasão para as amostras estudadas neste trabalho. As regiões sombreadas representam de nível de confiança de 95%.

A **Tabela 7** resume os coeficientes de desgaste para as três condições aqui exploradas. Os resultados apontam uma diminuição no volume de desgaste para ambas as condições de nitretação testadas, mas um resultado melhor para aquele tratado na condição ideal deste estudo, processada a uma temperatura mais alta. O primeiro, contém uma camada composta de ϵ - Ti_2N e o outro, δ - TiN . O TiN tem uma estrutura sal-gema e Ti_2N tem uma estrutura tetragonal, enquanto o Ti6Al4V puro apresenta formas α (HC) e β (CCC). O TiN é de características mais duras, com uma célula unitária mais compacta, já que para ϵ - Ti_2N apenas metade dos sítios octaédricos disponíveis são ocupados na rede de titânio [109,121].

Tabela 7 – Coeficientes de desgaste para as amostras de Ti6Al4V

Amostra	Coeficiente de desgaste ($10^{-12} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{N}^{-1}$)
Sem tratamento	$4,46 \pm 0,50$
Nitretada a 660 °C	$1,99 \pm 0,15$
Nitretada a 940 °C	$1,33 \pm 0,06$

A superfície mais dura - resultante da expansão de rede e bloqueio de discordâncias - é causada pelos campos de tensão gerados pelas soluções sólidas de TiN/Ti₂N e pelos precipitados, o que, por sua vez, leva a uma maior resistência ao desgaste abrasivo. Isto está de acordo com a literatura [32,76,122] e quando tais superfícies são acopladas com o PEUAMM, por exemplo, a taxa de desgaste também é diminuída [123] em comparação a uma superfície restritamente metálica. Espera-se que este tipo de sistema "CeP" reduza drasticamente a formação de detritos (em comparação com o sistema MeP) e as respostas imunológicas associadas que podem ou não levar à inflamação e afrouxamento asséptico. Não obstante, se criadas, as partículas de nitreto de titânio têm uma fagocitose muito similar a das partículas de titânio [124], que oferecem baixa toxicidade.

4.9.4. Testes eletroquímicos

Medidas de polarização potenciodinâmica foram realizadas em solução de SBF para investigar o comportamento de corrosão das ligas Ti6Al4V não revestida e Ti6Al4V nitretada. As ligas foram mantidas por 1 h para OCP e as curvas de polarização obtidas de -750 mV a + 500 mV a uma taxa de varredura de 1 mV/s. A **Figura 20** apresenta as curvas de polarização e a **Tabela 8** os parâmetros de corrosão, potencial de corrosão (E_{corr}), curvas Tafel anódica e catódica (i_a e i_c) e valores de taxa de corrosão.

As curvas Tafel apresentadas na Figura 22 mostram que as ligas foram passivadas em solução simulada de fluido corporal. O Ti6Al4V nitretado apresenta um potencial de eletrodo mais positivo, $E_{corr} = -215$ mV, contra $E_{corr} = -416$ mV para Ti6Al4V não revestido, indicando que a superfície do primeiro é menos reativa, apresentando uma superfície mais inerte. Para a liga revestida, os valores de i_{corr} e taxa de corrosão são um pouco maiores em comparação com a liga não revestida, indicando que há outro processo ocorrendo na superfície da liga devido ao filme nitretado. No entanto, os valores i_{corr} estão na ordem de nA, indicando uma excelente resistência à corrosão para a liga contendo a camada de Ti_xN_y. Os biometais devem ter uma taxa máxima de corrosão de $1 \mu\text{m ano}^{-1}$ [125].

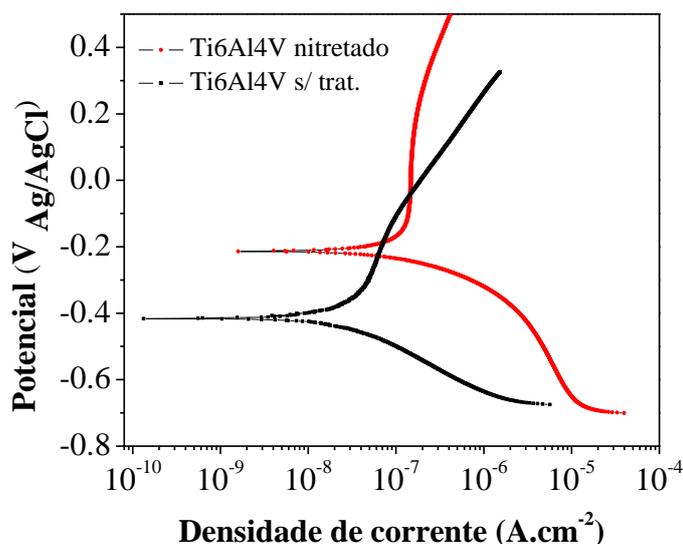


Figura 20 – Curvas de polarização potenciodinâmica das ligas Ti6Al4V não revestidas e Ti6Al4V nitretadas após 1 h em fluido corporal simulado a $36 \pm 0,5$ °C.

Os resultados da espectroscopia de impedância eletroquímica na solução SBF são apresentados na **Figura 21** na forma de diagramas de Nyquist e Bode. Pode ser visto nos diagramas de Nyquist (Figura 23a) que mesmo havendo uma pequena diferença na impedância real ($6,7 \text{ kW.cm}^2$ para liga sem tratamento e $4,2 \text{ kW.cm}^2$ para liga nitretada) os resultados mostram que a camada de nitretos não afeta a resistência à corrosão da liga em grandes proporções. Os diagramas de Bode (Figura 23b) mostram um ângulo de fase máximo de 77° para Ti6Al4V puro e 78° para nitretação, estes valores próximos de $\pi / 2$ significam uma superfície com forte resposta capacitiva. É possível também ver uma constante de duas vezes para amostras nitretadas, Fig. 23b, sugerindo a presença de um processo de passivação extra devido à camada de TiN.

Tabela 8 – Parâmetros de corrosão obtidos a partir de curvas de Tafel de discos de Ti6Al4V puros e nitretados, imersos em fluido corporal simulado.

Amostra	E_{corr} (mV)	I_{corr} (A.cm^{-2})	$\beta\alpha$ (mV/dec)	$-\beta c$ (mV/dec)	Taxa de corrosão (mmpy)
Ti6Al4V sem tratamento	-416,3	$29,1 \times 10^{-9}$	617,0	143,1	11,5
Ti6Al4V nitretada	-215,3	$63,0 \times 10^{-9}$	247,0	82,7	28,8

Os resultados eletroquímicos mostraram que a camada de nitreto no Ti6Al4V não melhora a resistência à corrosão da liga, nem contribui para uma perda significativa de suas propriedades de corrosão. Como a camada de nitreto é formada para melhorar a biocompatibilidade, os resultados eletroquímicos mostraram que esse tratamento pode ser realizado sem preocupação com o comportamento de corrosão da liga. Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente na literatura [32,119] e esta diminuição nas propriedades de corrosão é atribuída a: a) uma fina camada de óxido formada sob a camada de composto antes da NP, que aumenta a atividade química e b) a distribuição desigual de nitrogênio nas superfícies de amostras tratadas com plasma, que resultam em propriedades irregulares de corrosão. Como mencionado anteriormente, se a taxa de corrosão é tomada como o principal fator decisivo, ela ainda está sob valores propostos para implantes metálicos, com um limite de 1 μm por ano [125].

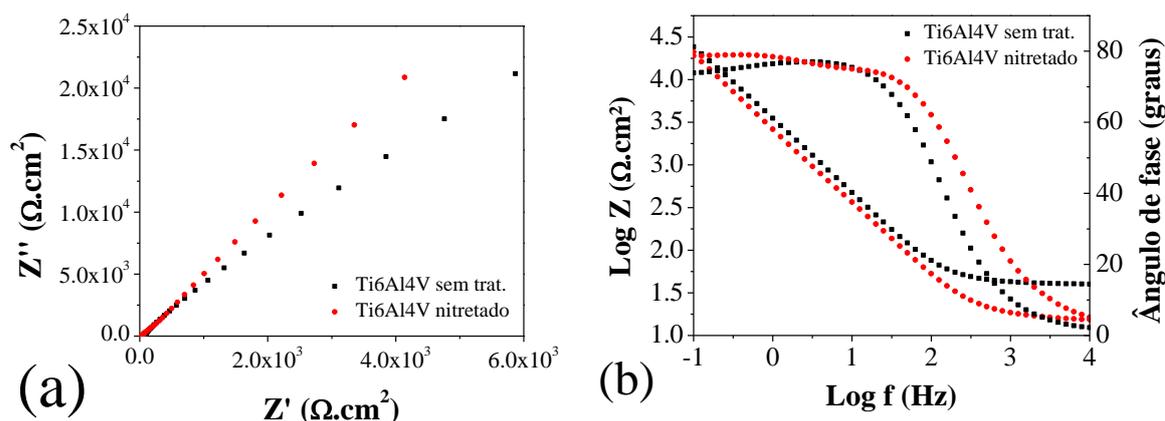


Figura 21 – (a) gráfico de Nyquist e (b) gráfico de Bode das ligas sem tratamento e nitretada em solução simulada de fluido corporal após 1 h de imersão.

Micrografias obtidas por MEV, **Figura 22**, deram uma melhor visão sobre as superfícies pós-corrosão. Foi possível determinar que o mecanismo responsável pela corrosão dessas amostras é a formação de pites, corroborando que a corrosão para Ti6Al4V e outras ligas de titânio acontece da mesma forma [126–128]. A principal diferença entre sua ocorrência em amostras sem tratamento e nitretadas foi a distribuição ao longo das superfícies, distribuída mais uniformemente em nitretados e ligeiramente em regiões maiores. Além disso, pites mais pronunciados foram vistos em amostras nitretadas. A Figura 24, com uma magnificação de 200x, representa um pite de proporções maiores encontrado na amostra nitretada, embora essa não seja a geometria dominante

detectada. A razão para a corrosão por pite ser favorecida em amostras nitretadas pode ser devido a sua maior rugosidade, repleta de micro-sulcos e micro-cristas, que ajudam a nuclear e propagar mais pites [129,130] e o fato de que quaisquer discontinuidades na camada nitretada são sítios de propagação de falhas e corrosão [39].

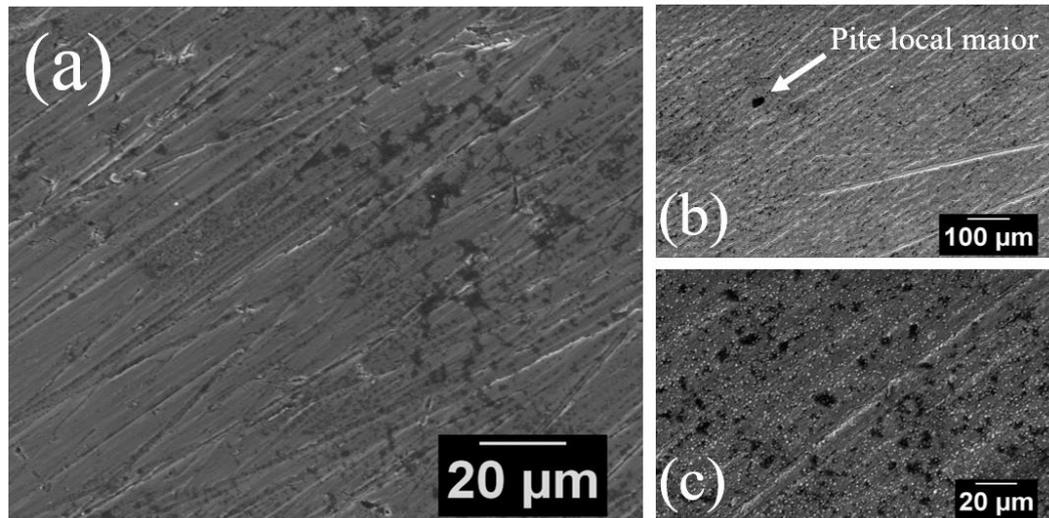


Figura 22 – Ensaio de pós-corrosão micrografias de (a) amostra pura com uma ampliação de 500x, (b) amostra PN com uma ampliação de 200x e (c) amostra PN com uma ampliação de 500x.

4.9.5. Ensaio biológico *in vitro*

4.9.5.1. Citotoxicidade indireta – MTT

A fim de avaliar o efeito citotóxico das amostras, prepararam-se extratos das mesmas conforme descrito na norma ISO 10993-5-2009 e colocou-se em contato com as células L929. Deste modo, a **Figura 23** demonstra os resultados obtidos no ensaio MTT.

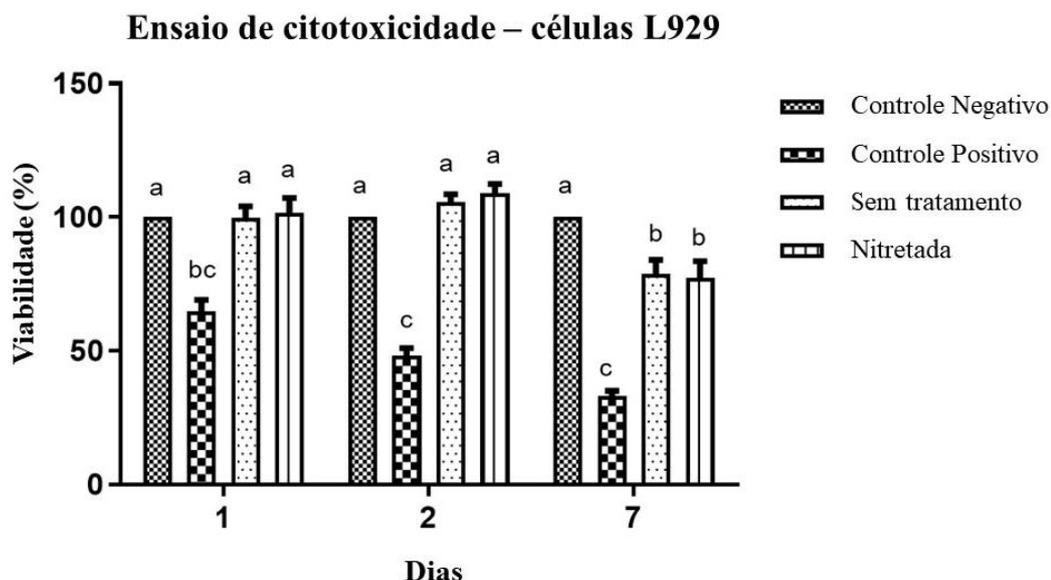


Figura 23 – Efeito citotóxico obtido no ensaio ISO 10993-5-2009 e ISO 10993-12-4 de extratos de Ti6Al4V intocadas e nitretadas, comparando ao controle negativo e controle positivo em relação à viabilidade de células tratadas por 1, 2 e 7 dias. As letras correspondem as diferenças estatisticamente significantes, usando o teste *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Segundo a ISO 10993-5 (2009), um material desencadeia efeitos citotóxicos quando provoca uma redução da viabilidade celular superior a 30% no período de 24 h. Ao comparar os resultados de viabilidade celular da liga de titânio com a classificação dos padrões internacionais de avaliação para dispositivos médicos, foi possível observar que as amostras não apresentaram efeito citotóxico para as células L929. Em adição, nos tempos testados de 1 e 2 dias verificou-se que a viabilidade dos extratos foi superior em comparação ao controle positivo de 1 dia (64,73%) e 2 dias (48,21%).

Do mesmo modo, quando avaliado o tempo de exposição de 7 dias, observou-se uma leve redução da viabilidade celular para a liga nitretada: 1) amostra sem tratamento (78,66%); 2) amostra com tratamento (77,24%). Porém, salienta-se que mesmo ultrapassando o tempo recomendado pela normativa, as membranas continuam não apresentando efeito citotóxico e com viabilidade superior a encontrada para o controle positivo (33,23%).

4.9.5.2. *Giemsa*: Ensaios de alteração morfológica

Para verificar alterações morfológicas colocaram-se as células L929 em contato com os extratos citados anteriormente e realizou-se coloração de *Giemsa*. Corroborando com os resultados obtidos no ensaio de MTT, no tempo de 1 e 2 dias observaram-se células com morfologia arredondada e distendida, envolvida em citoplasma abundante, bem definidas e integras, caracterizando uma cultura celular saudável. Uma pequena redução na população de células e alterações morfológicas pode ser observada após 7 dias de exposição (**Figura 24**).

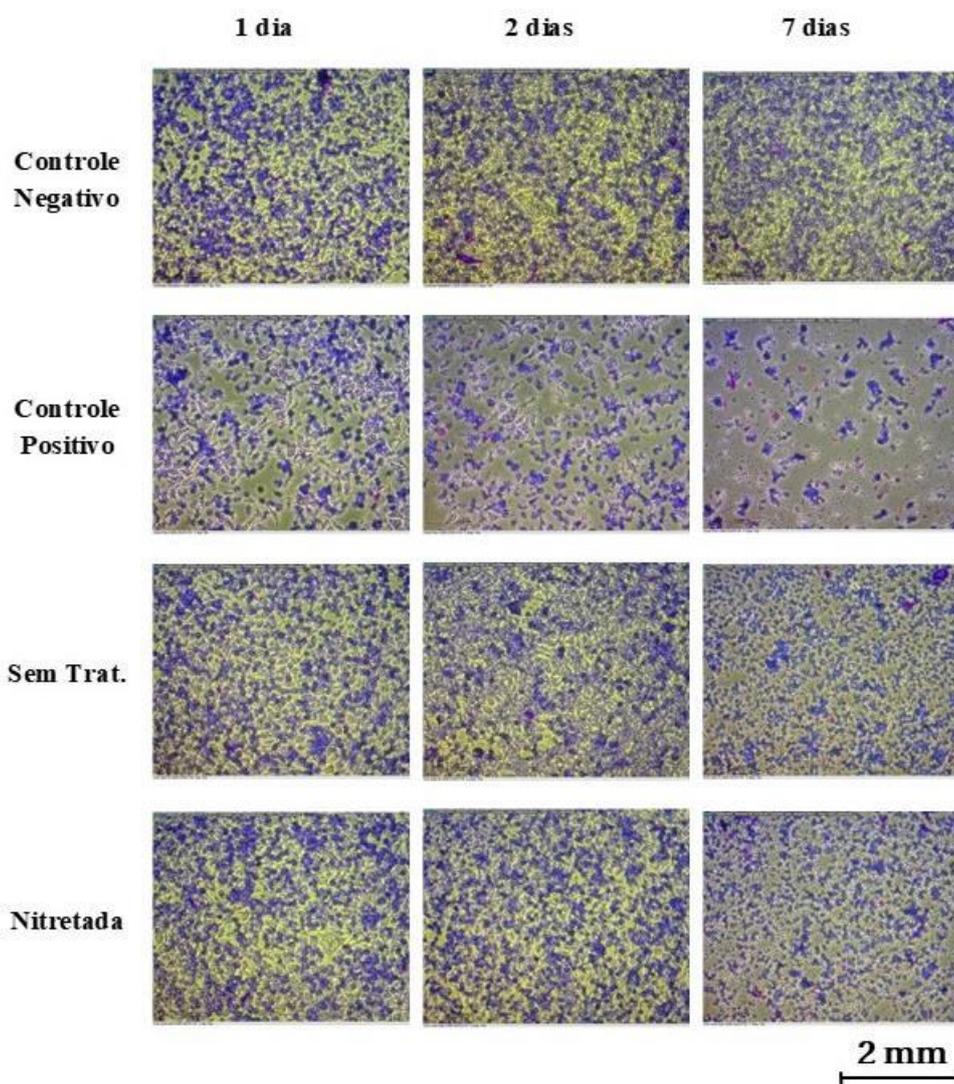


Figura 24 – Morfologia das células L929 dos extratos de Ti6Al4V incubados por 1, 2 e 7 dias, comparados aos controles positivo e negativo. Fotomicrografias foram realizadas em microscópio de luz (100x).

4.9.5.3. Determinação de parâmetros de adesão, distribuição topográfica e padrões morfológicos de L929

Realizou-se o ensaio de determinação de parâmetros de adesão, distribuição topográfica e morfologia das células L929 depositadas sobre as condições citadas, anteriormente. Pode-se observar através das imagens da **Figura 25** que devido ao material apresentar características hidrofílicas houve pouca adesão e dispersão celular sobre o material. Ambas superfícies promoveram menos adesão celular após a incubação crônica, porém amostras tratadas mostram esse comportamento de forma pronunciada.

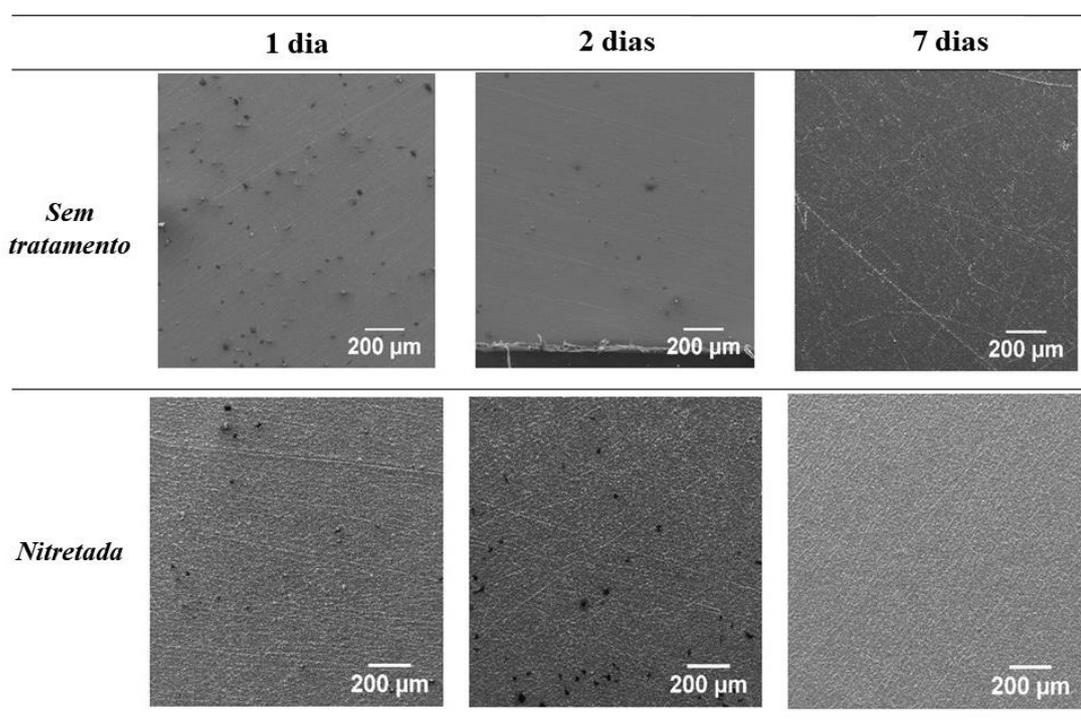


Figura 25 – Micrografias obtidas por MEV-FEG mostrando adesão celular e disseminação ao longo dos períodos de 1, 2 e 7 dias; uma diminuição na presença de células é notada em ambas as superfícies. No sétimo dia quase nenhuma célula pode ser encontrada anexada a essas superfícies.

Embora o ensaio de coloração Giemsa tenha apresentado células após 7 dias, deve-se considerar que este teste avalia a resposta das células após a exposição do extrato. Dessa forma, as células não são expostas ao material diretamente. Uma vez que os

fibroblastos foram crescidos na superfície do material, as células foram apresentadas a superfícies altamente ranhuradas, que se mostraram inóspitas à adesão e à dispersão celular, em maior extensão na condição nitretada do que na superfície da liga pura. Detritos celulares apareceram nas superfícies da liga pura; a condição nitretada mostra células quase desprendidas das superfícies metálicas.

A **Figura 26** mostra a adesão destas células a uma magnificação maior. Por exemplo, fibrilas de colágeno não apenas apareceram somente em superfícies intactas, mas as superfícies contendo nitretos mostraram células quase separadas do substrato. Isto pode ser explicado pelo aumento da rugosidade e da superfície preenchida por ranhuras, o que não facilita o espalhamento celular. A natureza dessas células, tratada como hidrofóbica por alguns autores, também teria um papel significativo em não aderir a superfícies mais hidrofílicas.

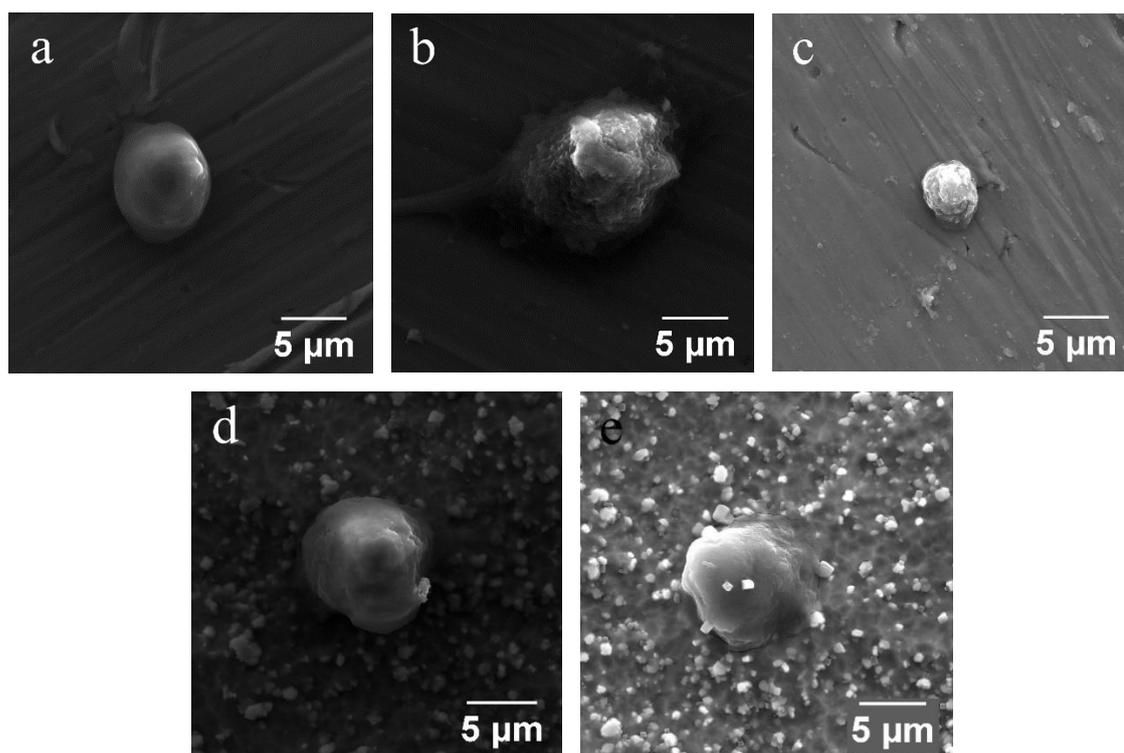


Figura 26 – Linha superior: amostras sem tratamento, em sua maioria, com fibroblastos arredondados no primeiro (a) e sétimo dia (c); no segundo dia, algumas células com fibrilas de colágeno foram observadas (b) **Linha inferior:** nas nitretadas, tanto no primeiro (d) como no sétimo dia (e), nota-se células quase destacadas da superfície.

A interação entre as células e os discos, tanto para os puros quanto nitretados, promoveu mudança na morfologia das células, gerando fibroblastos arredondados, que são principalmente influenciados pela topografia da amostra. Os picos e vales encontrados através das superfícies das amostras aumentam a rugosidade; vários estudos que afirmam que o aumento da rugosidade está correlacionado com uma diminuição da proliferação de fibroblastos *in vitro* [105,131–134] e do espalhamento celular [135]. Superfícies mais hidrofóbicas, além de serem menos favoráveis nesse ambiente, também levam a maior adesão e proliferação bacteriana [136]. Nas superfícies de titânio, a fibronectina induz a proliferação e ligação dos osteoblastos, enquanto a albumina sérica não parece desempenhar um papel significativo [137]. A fibronectina prefere superfícies mais rugosas, quando se trata de ligas de titânio [138].

Este aspecto repelente de fibroblastos em superfícies com características hidrofílicas e de maior rugosidade - acompanhado de uma área superficial maior - tem sido comumente associado a uma adesão e atividade de osteoblastos reforçada [139], o que seria ideal para promover a osteointegração, diminuindo uma possível resposta fibrótica [78].

5. Conclusões

A metodologia proposta mostrou-se apropriada para o estudo da modificação da superfície do Ti6Al4V em diversas condições de nitretação a plasma. Diversos tipos de superfícies podem ser obtidos, inclusive para aplicações biomédicas. A camada protetora, se aplicada a um implante pode vir a aumentar sua vida útil frente ao desgaste, interação celular nociva e outros problemas relacionados à superfície. Pode concluir-se que:

- a) A nitretação a plasma, com fonte de radiofrequência e configuração amostral de cátodo oco, com a metodologia descrita na seção 3.3, é eficiente na modificação da liga Ti6Al4V. O objetivo de se obter uma complexa camada de nitretos foi atingido, com camadas de espessuras entre 1,5 e 2,0 μm . Além disso, aumento em propriedades como rugosidade e molhabilidade foram observados;
- b) A análise estatística é uma boa ferramenta para descrever quais parâmetros exercem mais influência no sistema; neste caso, a temperatura mostrou-se o fator mais importante a ser considerado. As amostras 2, 4 e 6 mostraram as melhores propriedades de superfície, de maneira geral. Dentro do contexto da engenharia, E-2(940,170) sai em vantagem por prover uma camada de compostos fina, seguida de uma zona de difusão maior em tempo mais curto que as demais.

Para onde os processos assistidos por plasma nos levam, no campo dos biomateriais? Diminuir a possível resposta fibrótica, para mencionar um dos achados deste estudo, é uma das muitas vantagens. Processos assistidos por plasma têm propriedades esterilizantes e fornecem texturização acompanhada de aumento no caráter hidrofílico, propriedades muito buscadas em biomateriais. Em materiais metálicos, aumentam a dureza, que está proximamente relacionada à resistência ao desgaste. A camada protetora composta de nitretos também pode servir como barreira de difusão de íons vanádio e alumínio em ligas TiAlV.

6. Continuidade

Considerando todos os aspectos, a nitretação a plasma conduzida com esses parâmetros para a liga Ti6Al4V pode ser pré-clinicamente testada em peças odontológicas ou ortopédicas. A nitretação a plasma pode ser utilizada como modo de obter uma intercamada de TiN prévia à deposição de revestimentos bioativos, tais como a hidroxiapatita, visando maior adesão dos mesmos e melhor osteointegração.

A influência de agentes bactericidas, tais como a prata e o cobre, incorporados em camadas nitretadas é outro possível objeto de estudo. Estudos mostram que a lixiviação a longo prazo de agentes bactericidas previne a formação de biofilmes e subsequente acarretamento em cirurgia de revisão de implantes. Há uma escassez de trabalhos que investiga esse fenômeno e, ainda menos, na presença de um substrato tratado a plasma.

A análise por método dos elementos finitos de componentes tratados a plasma em aplicações biomédicas, nas quais estão sujeitos a esforços cíclicos, é uma possível linha de pesquisa que pode ser seguida, a fim de avaliar a estabilidade e a durabilidade destes materiais.

Referências

- [1] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*, 2013.
- [2] X. Liu, P. Chu, C. Ding, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. R Reports*. 47 (2004) 49–121. doi:10.1016/j.mser.2004.11.001.
- [3] E.P. Ferraz, A.T. Sverzut, G.P. Freitas, J.C. Sá, C.A. Jr., M.M. Beloti, A.L. Rosa, Bone tissue response to plasma-nitrided titanium implant surfaces, *J. Appl. Oral Sci.* 23 (2015) 9–13.
- [4] V.S. de Viteri, E. Fuentes, Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials, in: *Tribol. Adv.*, 2013: pp. 155–181. doi:10.5772/55860.
- [5] H.S. Dobbs, J.T. Scales', Titanium Alloys in Surgical Implants, *Behav. Commer. Pure Titan. Ti-318 Orthop. Implant. ASTM STP 7* (1983) 173–186.
- [6] Y. Kirmanidou, M. Sidira, M.-E. Drosou, V. Bennani, A. Bakopoulou, A. Tsouknidas, Nikolaos Michailidis, K. Michalakakis, New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review, *Biomed Res. Int.* 2016 (2016).
- [7] T. Ma, S.B. Goodman, Biological Effects of Wear Debris from Joint Arthroplasties, in: *Compr. Biomater.*, 2011: pp. 79–87. doi:10.1016/b978-0-08-055294-1.00204-x.
- [8] G. Sovak, I. Gotman, A. Weiss, Osseointegration of Ti-6Al-4V Alloy Implants with a Titanium Nitride Coating Produced by a PIRAC Nitriding Technique: A Long-Term Time Course Study in the Rat, *Microsc. Microanal.* 21 (2015) 179–189. doi:10.1017/S1431927614013634.
- [9] A. Scarano, M. Piattelli, G. Vrespa, S. Caputi, A. Piattelli, Bacterial adhesion on titanium nitride-coated and uncoated implants: an in vivo human study, *J. Oral Implantol.* 29 (2003) 80–85.
- [10] F.M. El-Hossary, N.Z. Negm, S.M. Khalil, M. Raaif, Surface modification of titanium by radio frequency plasma nitriding, *Thin Solid Films*. 497 (2006) 196–202. doi:10.1016/j.tsf.2005.09.193.
- [11] E. Roliński, Surface properties of plasma-nitrided titanium alloys, *Mater. Sci. Eng. A*. 108 (1989) 37–44. doi:10.1016/0921-5093(89)90404-8.
- [12] A. Edrisy, K. Farokhzadeh, Plasma Nitriding of Titanium Alloys, in: T. Mieno (Ed.), *Plasma Sci. Technol. - Prog. Phys. States Chem. React.*, 1st ed., InTech, 2016. doi:10.5772/61937.
- [13] X. Wang, S. Bai, F. Li, D. Li, J. Zhang, M. Tian, Q. Zhang, Y. Tong, Z. Zhang, G. Wang, T. Guo, C. Ma, Effect of plasma nitriding and titanium nitride coating on the corrosion resistance of titanium, *J Prosthet Dent.* 116 (2016) 450–456. doi:10.1016/j.prosdent.2016.01.016.
- [14] K. Farokhzadeh, Modification of ion nitriding of Ti-6Al-4V for simultaneous improvement of wear and fatigue properties, University of Windsor, 2014.
- [15] H.C. Man, N.Q. Zhao, Z.D. Cui, Surface morphology of a laser surface nitrided and etched Ti-6Al-4V alloy, *Surf. Coatings Technol.* 192 (2005) 341–346. doi:10.1016/j.surfcoat.2004.07.076.
- [16] S. Hosseini, Fatigue of Ti-6Al-4V, (2012). doi:10.5772/45753.
- [17] W.D. Callister Jr, *Materials Science and Engineering - An Introduction* (5th ed.), *Anti-Corrosion Methods Mater.* (2000). doi:10.1108/acmm.2000.12847aae.001.
- [18] G. Lütjering, Influence of processing on microstructure and mechanical properties of (α + β) titanium alloys, *Mater. Sci. Eng. A*. 243 (1998) 32–45.
- [19] B. Babu, A. Lundbäck, Physically based constitutive model for TI-6AL-4V used in the simulation of manufacturing chain, in: *Comput. Plast. X - Fundam. Appl.*, 2009.
- [20] I.C. Clarke, H.A. McKellop, P. McGuire, R. Okuda, A. Sarmiento, Titanium Alloys in Surgical Implants, *Wear Ti-6Al-4V Implant Alloy Ultrah. Mol. Weight Polyethyl. Comb. ASTM STP 7* (1983) 136–147.
- [21] R.P. van Hove, I.N. Sierevelt, B.J. van Royen, P.A. Nolte, Titanium-Nitride Coating of Orthopaedic Implants: A Review of the Literature, *Biomed Res Int.* 2015 (2015) 485975.

- doi:10.1155/2015/485975.
- [22] A.A.S. Metals, Titanium Ti-6Al-4V (Grade 5), Annealed, (2018). <http://asm.matweb.com/search/SpecificMaterial.asp?bassnum=MTP641>.
- [23] J. Gallo, S.B. Goodman, Y.T. Konttinen, M.A. Wimmer, M. Holinka, Osteolysis around total knee arthroplasty: a review of pathogenetic mechanisms, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8046–8058. doi:10.1016/j.actbio.2013.05.005.
- [24] N. Abdul, D. Dixon, A. Walker, J. Horabin, N. Smith, D.J. Weir, N.T. Brewster, D.J. Deehan, D.A. Mann, L.A. Borthwick, Fibrosis is a common outcome following total knee arthroplasty, *Sci Rep.* 5 (2015) 16469. doi:10.1038/srep16469.
- [25] P. Thevenot, W. Hu, L. Tang, Surface chemistry influence implant biocompatibility, *Curr Top Med Chem.* 8 (2008) 270–280.
- [26] J.S.P. da Silva, Estudo das características físico-químicas e biológicas pela adesão de osteoblastos em superfícies de titânio modificadas pela nitretação em plasma, Universidade de São Paulo, 2008.
- [27] M. de M. Aires, Superfícies de Titânio Modificadas Termoquimicamente por Plasma: Avaliação da Resposta Biológica, UFRN, 2011.
- [28] G.F.C. Almeida, A.A. Couto, D.A.P. Reis, M. Massi, A. da Silva Sobrinho, N.B. de Lima, Effect of Plasma Nitriding on the Creep and Tensile Properties of the Ti-6Al-4V Alloy, *Metals (Basel).* 8 (2018) 618. doi:10.3390/met8080618.
- [29] C. Alves, C.L.B. Guerra Neto, G.H.S. Morais, C.F. da Silva, V. Hajek, Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge, *Surf. Coatings Technol.* 194 (2005) 196–202. doi:10.1016/j.surfcoat.2004.10.009.
- [30] A. Raveh, Mechanisms of r.f. plasma nitriding of Ti-6Al-4V alloy, *Mater. Sci. Eng. A.* 167 (1993) 155–164.
- [31] M. Raaif, F.M. El-Hossary, N.Z. Negm, S.M. Khalil, P. Schaaf, Surface treatment of Ti-6Al-4V alloy by rf plasma nitriding, *J. Phys. Condens. Matter.* 19 (2007) 1–12.
- [32] B.S. Yilbas, A.Z. Sahin, A.Z. Al-Garni, S.A.M. Said, Z. Ahmed, B.J. Abdulaleem, M. Sami, Plasma nitriding of Ti-6Al-4V alloy to improve some tribological properties, *Surf. Coatings Technol.* 80 (1996) 287–292. doi:10.1016/0257-8972(95)02472-7.
- [33] S.L.R. Silva, L.O. Kerber, L. Amaral, C.A. Santos, X-ray diffraction measurements of plasma-nitrided Ti – 6Al – 4V, 119 (1999) 342–346.
- [34] M. Leoni, P. Scardi, B. Tesi, T. Bacci, Grazing angle XRD on ion-nitrided Ti6Al4V components, *Titan. '99 Sci. Technol. Proc. 9th World Conf. Titan. Saint Petersburg. 7-11/06/1999.* ISBN 5-900791-08-4. (2000) 876–883.
- [35] M.C.B. de Castro, A.A. Couto, G.F.C. Almeida, M. Massi, N.B. de Lima, A. da S. Sobrinho, M. Castagnet, G.L. Xavier, R.R. Oliveira, The effect of plasma nitriding on the fatigue behavior of the Ti-6Al-4V alloy, *Materials (Basel).* 12 (2019) 1–12. doi:10.3390/ma12030520.
- [36] T. Bonello, J.C. Avelar-Batista Wilson, J. Housden, E.Y. Gutmanas, I. Gotman, A. Matthews, A. Leyland, G. Cassar, Evaluating the effects of PIRAC nitrogen-diffusion treatments on the mechanical performance of Ti-6Al-4V alloy, *Mater. Sci. Eng. A.* 619 (2014) 300–311. doi:10.1016/j.msea.2014.09.055.
- [37] A.D. Wilson, A. Leyland, A. Matthews, A comparative study of the influence of plasma treatments, PVD coatings and ion implantation on the tribological performance of Ti-6Al-4V, *Surf. Coatings Technol.* 114 (1999) 70–80.
- [38] M.A.Z. Vasconcellos, S.C. Lima, R. Hinrichs, Hardness evaluation, stoichiometry and grain size of titanium nitride films obtained with plasma nitriding on Ti-6Al-4V samples, *Matéria (Rio Janeiro).* 15 (2010) 299–302. doi:10.1590/S1517-70762010000200030.
- [39] F. Yildiz, A.F. Yetim, A. Alsaran, A. Çelik, Plasma nitriding behavior of Ti6Al4V orthopedic alloy, *Surf. Coat. Technol.* 202 (2008) 2471–2476.
- [40] B.R. Lanning, R. Wei, High intensity plasma ion nitriding of orthopedic materials, *Surf. Coatings Technol.* 186 (2004) 314–319. doi:10.1016/j.surfcoat.2004.02.047.
- [41] R. Wei, T. Booker, C. Rincon, J. Arps, High-intensity plasma ion nitriding of orthopedic materials, *Surf. Coatings Technol.* 186 (2004) 305–313.

- doi:10.1016/j.surfcoat.2004.02.052.
- [42] N. Lin, X. Huang, J. Zou, X. Zhang, L. Qin, A. Fan, B. Tang, Effects of plasma nitriding and multiple arc ion plating TiN coating on bacterial adhesion of commercial pure titanium via in vitro investigations, *Surf. Coat. Technol.* 209 (2012) 212–215.
- [43] H.J. Brading, P.H. Morton, T. Bell, L.G. Earwaker, Plasma nitriding with nitrogen, hydrogen, and argon gas mixtures: structure and composition of coatings on titanium, *Surf. Eng.* 8 (2013) 206–212.
- [44] G.F. da C. Almeida, A.A. Couto, D.A.P. Reis, M. Massi, A.S. da S. Sobrinho, N.B. de Lima, Estudo da nitretação por plasma na fluência da liga Ti-6Al-4V, *Tecnol. Em Metal. Mater. e Mineração.* 13 (2016) 331–339.
- [45] H.A. Wriedt, J.L. Murray, The N-Ti (Nitrogen-Titanium) system, *Bull. Alloy Phase Diagrams.* 8 (1987) 378–388. doi:10.1007/BF02869274.
- [46] A. Palmquist, K. Grandfield, B. Norlindh, T. Mattsson, R. Branemark, P. Thomsen, Bone-titanium oxide interface in humans revealed by transmission electron microscopy and electron tomography, *J R Soc Interface.* 9 (2012) 396–400. doi:10.1098/rsif.2011.0420.
- [47] A. Wennerberg, T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review, *Clin. Oral Implants Res.* 20 (2009) 172–184. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x.
- [48] ASTM standard F2887-17, Standard Specification for elbow prostheses, *ASTM Int. Stand.* (2017) 1–9. doi:10.1520/F2887.
- [49] R.A. Gittens, L. Scheideler, F. Rupp, S.L. Hyzy, J. Geis-Gerstorfer, Z. Schwartz, B.D. Boyan, A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2907–2918. doi:10.1016/j.actbio.2014.03.032.
- [50] K.L. Menzies, L. Jones, The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials, *Optom. Vis. Sci.* 87 (2010) 387–399. doi:10.1097/OPX.0b013e3181da863e.
- [51] R.A. Gittens, R. Olivares-Navarrete, Z. Schwartz, B.D. Boyan, Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: Lessons for spine implants, *Acta Biomater.* (2014). doi:10.1016/j.actbio.2014.03.037.
- [52] H. Asgar, K.M. Deen, Z.U. Rahman, U.H. Shah, M.A. Raza, W. Haider, Functionalized graphene oxide coating on Ti6Al4V alloy for improved biocompatibility and corrosion resistance, *Mater. Sci. Eng. C.* 94 (2019) 920–928. doi:10.1016/j.msec.2018.10.046.
- [53] R. Khanna, J. Ong, E. Oral, R. Narayan, Progress in Wear Resistant Materials for Total Hip Arthroplasty, *Coatings.* 7 (2017) 99. doi:10.3390/coatings7070099.
- [54] N.A. Beckmann, T. Gotterbarm, M.M. Innmann, C. Merle, T. Bruckner, J.P. Kretzer, M.R. Streit, Long-term durability of alumina ceramic heads in THA Orthopedics and biomechanics, *BMC Musculoskelet. Disord.* 16 (2015). doi:10.1186/s12891-015-0703-2.
- [55] C. Parsons, R. Batson, S. Reighard, S. Tanner, B. Snider, T.B. Pace, Clinical outcomes assessment of three similar hip arthroplasty bearing surfaces, *Orthop. Rev. (Pavia).* 6 (2014) 75–79. doi:10.4081/or.2014.5334.
- [56] E. Czarnowska, T. Wierzhón, A. Maranda-Niedbala, Properties of the surface layers on titanium alloy and their biocompatibility in in vitro tests, *J. Mater. Process. Technol.* 92 (1999) 190–194.
- [57] E.P. Ferraz, J.C. Sa, P.T. de Oliveira, C. Alves, M.M. Beloti, A.L. Rosa, The effect of plasma-nitrided titanium surfaces on osteoblastic cell adhesion, proliferation, and differentiation, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 102 (2014) 991–998. doi:10.1002/jbm.a.34761.
- [58] C.Y. Guo, J.P. Matinlinna, A.T.H. Tang, Effects of surface charges on dental implants: past, present, and future, *Int. J. Biomater.* (2012) 1–5.
- [59] C. Ota-Tsuzuki, C.E. Datte, K.A. Nomura, L.A. Gouvea Cardoso, J.A. Shibli, Influence of titanium surface treatments on formation of the blood clot extension, *J Oral Implant.* 37 (2011) 641–647. doi:10.1563/AAID-JOI-D-09-00125.1.
- [60] H.T. Shiu, B. Goss, C. Lutton, R. Crawford, Y. Xiao, Formation of blood clot on biomaterial implants influences bone healing, *Tissue Eng Part B Rev.* 20 (2014) 697–712. doi:10.1089/ten.TEB.2013.0709.

- [61] J. Yang, Y. Zhou, F. Wei, Y. Xiao, Blood clot formed on rough titanium surface induces early cell recruitment, *Clin Oral Implant. Res.* 27 (2016) 1031–1038. doi:10.1111/clr.12672.
- [62] C.N. Elias, J.H.C. Lima, R. Valiev, M. a Meyers, Biomedical Applications of Titanium and its Alloys, *J. Miner. Met. Mater. Soc.* (2008) 46–49. doi:10.1007/s11837-008-0031-1.
- [63] Y. Sasikumar, K. Indira, N. Rajendran, Surface Modification Methods for Titanium and Its Alloys and Their Corrosion Behavior in Biological Environment: A Review, *J. Bio- Tribo- Corrosion.* 5 (2019) 0. doi:10.1007/s40735-019-0229-5.
- [64] C. Zhou, F. Lei, J. Chodosh, E.I. Paschalis, The role of titanium surface microtopography on adhesion, proliferation, transformation, and matrix deposition of corneal cells, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57 (2016) 1927–1938. doi:10.1167/iovs.15-18406.
- [65] P. Santiago-Medina, P.A. Sundaram, N. Difffoot-Carlo, Titanium Oxide: A Bioactive Factor in Osteoblast Differentiation, *Int J Dent.* 2015 (2015) 357653. doi:10.1155/2015/357653.
- [66] L. Feller, Y. Jadwat, R.A. Khammissa, R. Meyerov, I. Schechter, J. Lemmer, Cellular responses evoked by different surface characteristics of intraosseous titanium implants, *Biomed Res Int.* 2015 (2015) 171945. doi:10.1155/2015/171945.
- [67] K. Ren, W. Yue, H. Zhang, Surface modification of Ti6Al4V based on ultrasonic surface rolling processing and plasma nitriding for enhanced bone regeneration, *Surf. Coatings Technol.* 349 (2018) 602–610. doi:10.1016/j.SURFCOAT.2018.06.039.
- [68] Z. Sheikh, P.J. Brooks, O. Barzilay, N. Fine, M. Glogauer, Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials, *Materials (Basel).* 8 (2015) 5671–5701. doi:10.3390/ma8095269.
- [69] R.T. Kendall, C.A. Feghali-Bostwick, Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators, *Front. Pharmacol.* 5 MAY (2014) 1–13. doi:10.3389/fphar.2014.00123.
- [70] R. Thompson, D. Novikov, Z. Cizmic, J.E. Feng, K. Fideler, Z. Sayeed, M. Meftah, A.A. Anoushiravani, R. Schwarzkopf, Arthrofibrosis After Total Knee Arthroplasty: Pathophysiology, Diagnosis, and Management, *Orthop. Clin. North Am.* 50 (2019) 269–279. doi:10.1016/j.ocl.2019.02.005.
- [71] B. Hinz, Formation and function of the myofibroblast during tissue repair, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 526–537. doi:10.1038/sj.jid.5700613.
- [72] B. Rolfe, J. Mooney, B. Zhang, S. Jahnke, S.-J. Le, Y.-Q. Chau, Q. Huang, H. Wang, G. Campbell, J. Campbell, The Fibrotic Response to Implanted Biomaterials: Implications for Tissue Engineering, *Regen. Med. Tissue Eng. - Cells Biomater.* (2012). doi:10.5772/21790.
- [73] Z.-Y. Gao, J.-X. Wu, W.-B. Liu, J.-K. Sun, Reduction of adhesion formation after knee surgery in a rat model by botulinum toxin A, *Biosci. Rep.* 37 (2017) BSR20160460. doi:10.1042/BSR20160460.
- [74] J. Kzhyshkowska, A. Gudima, V. Riabov, C. Dollinger, P. Lavalle, N.E. Vrana, Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine, *J. Leukoc. Biol.* 98 (2015) 953–962. doi:10.1189/jlb.5VMR0415-166R.
- [75] K.M. Usher, S. Zhu, G. Mavropalias, J.A. Carrino, J. Zhao, J. Xu, Pathological mechanisms and therapeutic outlooks for arthrofibrosis, *Bone Res.* 7 (2019) 9. doi:10.1038/s41413-019-0047-x.
- [76] A. Samanta, M. Bhattacharya, I. Ratha, H. Chakraborty, S. Datta, J. Ghosh, S. Bysakh, M. Sreemany, R. Rane, A. Joseph, S. Mukherjee, B. Kundu, M. Das, A.K. Mukhopadhyay, Nano- and micro-tribological behaviours of plasma nitrided Ti6Al4V alloys, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 77 (2018) 267–294. doi:10.1016/j.jmbbm.2017.09.013.
- [77] Z.-Y. Qiu, C. Chen, X.-M. Wang, I.-S. Lee, Advances in the surface modification techniques of bone-related implants for last 10 years, *Regen. Mater.* 1 (2014) 67–79.
- [78] X. Hu, K.G. Neoh, Z. Shi, E.-T. Kang, W. Wang, An In Vitro Assessment of Fibroblast and Osteoblast Response to Alendronate-Modified Titanium and the Potential for Decreasing Fibrous Encapsulation, *Tissue Eng. Part A.* 19 (2013) 1919–1930. doi:10.1089/ten.tea.2012.0218.
- [79] J.N. Peck, Weight-Bearing Surfaces, in: *Adv. Small Anim. Total Jt. Replace.*, 2013. doi:10.1002/9781118704776.ch4.

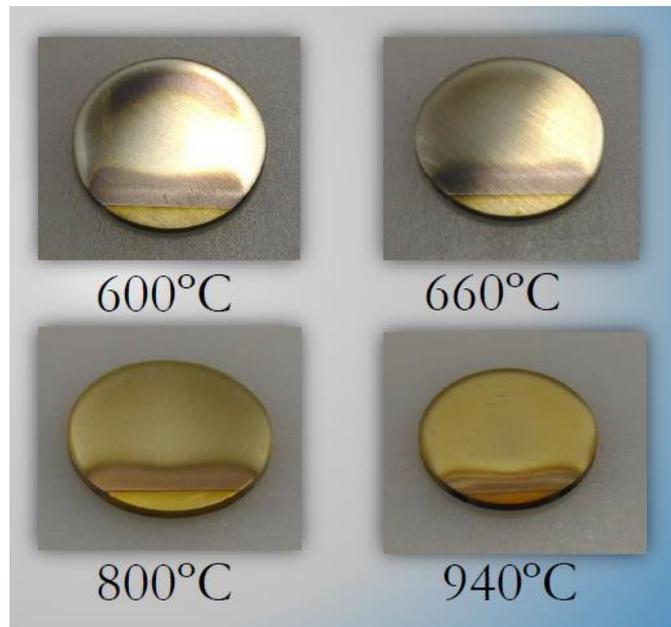
- [80] S.S. Rajaei, R. V Theriault, M.E. Pevear, E.L. Smith, National Trends in Primary Total Hip Arthroplasty in Extremely Young Patients : A Focus on Bearing Surface Usage From 2009 to 2012, *J. Arthroplasty*. 31 (2016) 63–68. doi:10.1016/j.arth.2016.01.061.
- [81] Martin Kubíček, Z. Florian, Stress strain analysis of knee joint, *Eng. Mech.* . 16 (2009) 315–322.
- [82] Azalea Orthopedics, (2018). <http://azaleaortho.com/ask-an-orthopedist-total-right-knee-replacement/> (accessed October 30, 2018).
- [83] Q. Rong, J. Bai, Y. Huang, J. Lin, Biomechanical Assessment of a Patient-Specific Knee Implant Design Using Finite Element Method, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 1–7.
- [84] H. Bougherara, Z. Mahboob, M. Miric, M. Youssef, Finite element investigation of hybrid and conventional knee implants., *Int. J. Eng.* 3 (2009) 257–266.
- [85] B. Hintermann, V. Valderrabano, Total ankle replacement, *Foot Ankle Clin.* 8 (2003) 375–405. doi:10.1016/s1083-7515(03)00015-9.
- [86] R.S. Sopher, A.A. Amis, J.D. Calder, J.R.T. Jeffers, Total ankle replacement design and positioning affect implant-bone micromotion and bone strains, *Med Eng Phys.* 42 (2017) 80–90. doi:10.1016/j.medengphy.2017.01.022.
- [87] M.P. Jackson, D. Singh, Total ankle replacement, *Curr. Orthop.* 17 (2003) 292–298. doi:10.1016/s0268-0890(02)00195-0.
- [88] A. Leardini, J.J. O'Connor, S. Giannini, Biomechanics of the natural, arthritic, and replaced human ankle joint, *J. Foot Ankle Res.* 7 (2014) 1–16.
- [89] S.H. Ajwani, C.P. Charalambous, Availability of Total Knee Arthroplasty Implants for Metal Hypersensitivity Patients, *Knee Surg Relat Res.* 28 (2016) 312–318. doi:10.5792/ksrr.16.018.
- [90] T. Morita, N. Uehigashi, C. Kagaya, Effect of Hybrid Surface Treatment Composed of Plasma Nitriding and Fine Particle Bombarding on Fatigue Strength of Ti–6Al–4V Alloy, *Mater. Trans.* 54 (2013) 22–27. doi:10.2320/matertrans.M2012262.
- [91] K.Tokaji, T.Ogawa, H.Shibata, The effects of gas nitriding on fatigue behaviour in titanium and titanium alloys, *J. Mater. Eng. Perform.* 8 (1999) 159–167.
- [92] M. Wada, S. Imura, A. Bo, H. Baba, T. Miyazaki, Stress fracture of the femoral component in total knee replacement: a report of 3 cases, *Int. Orthop.* 21 (1997) 54 – 55.
- [93] B.R. Rawal, A. Yadav, V. Pare, Life estimation of knee joint prosthesis by combined effect of fatigue and wear, *Procedia Technol.* 23 (2016) 60–67.
- [94] D. Sicard, L.E. Fredenburgh, D.J. Tschumperlin, Measured pulmonary arterial tissue stiffness is highly sensitive to AFM indenter dimensions, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 74 (2017) 118–127. doi:10.1016/j.jmbbm.2017.05.039.
- [95] American Society for Testing and Materials, ASTM F136-13: Standard Specification for Wrought Titanium-6Aluminum-4Vanadium ELI (Extra Low Interstitial) Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R56401), *Annu. B. ASTM Stand.* (2015). doi:10.1520/F0136-13.2.
- [96] M. Mayer, SIMNRA, a simulation program for the analysis of NRA, RBS and ERDA, 541 (2008) 541–544. doi:10.1063/1.59188.
- [97] R.F. de L. Lorenzi, C.A. Perottoni, J.E. Zorzi, Adaptação de um equipamento para ensaios de desgaste de materiais cerâmicos, *Cerâmica.* 56 (2011) 315–319. doi:10.1590/s0366-69132010000400001.
- [98] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials.* (2006). doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [99] F. Rupp, R.A. Gittens, L. Scheideler, A. Marmur, B.D. Boyan, Z. Schwartz, J. Geis-Gerstorfer, A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects, *Acta Biomater.* (2014). doi:10.1016/j.actbio.2014.02.040.
- [100] M. Jäger, H.P. Jennissen, F. Dittrich, A. Fischer, H.L. Köhling, Antimicrobial and osseointegration properties of nanostructured titanium orthopaedic implants, *Materials (Basel).* 10 (2017) 1–28. doi:10.3390/ma10111302.
- [101] R. Yamauchi, T. Itabashi, K. Wada, T. Tanaka, G. Kumagai, Y. Ishibashi, Photofunctionalised

- Ti6Al4V implants enhance early phase osseointegration, *Bone Jt. Res.* 6 (2017) 331–336. doi:10.1302/2046-3758.65.bjr2016-0221.r1.
- [102] N. Lin, D. Li, J. Zou, R. Xie, Z. Wang, B. Tang, Surface texture-based surface treatments on Ti6Al4V titanium alloys for tribological and biological applications: A mini review, *Materials (Basel)*. 11 (2018). doi:10.3390/ma11040487.
- [103] W.Y. Tseng, S.H. Hsu, C.H. Huang, Y.C. Tu, S.C. Tseng, H.L. Chen, M.H. Chen, W.F. Su, L.D. Lin, Low pressure radio-frequency oxygen plasma induced oxidation of titanium--surface characteristics and biological effects, *PLoS One*. 8 (2013) e84898. doi:10.1371/journal.pone.0084898.
- [104] G. Strnad, N. Chirila, C. Petrovan, O. Russu, Contact Angle Measurement on Medical Implant Titanium Based Biomaterials, *Procedia Technol.* 22 (2016) 946–953. doi:10.1016/j.protcy.2016.01.094.
- [105] M.M. Rodrigues, C.P. Fontoura, C.S.C. Garcia, S.T. Martins, J.A.P. Henriques, C.A. Figueroa, M. Roesch-Ely, C. Aguzzoli, Investigation of plasma treatment on UHMWPE surfaces: Impact on physicochemical properties, sterilization and fibroblastic adhesion, *Mater. Sci. Eng. C*. 102 (2019) 264–275. doi:10.1016/j.msec.2019.04.048.
- [106] C.W. Extrand, Uncertainty in contact angle measurements from the tangent method, *J. Adhes. Sci. Technol.* 30 (2016) 1597–1601. doi:10.1080/01694243.2016.1142799.
- [107] A. Grandoni, G. Mannini, A. Glisenti, A. Manariti, G. Galli, Use of statistical design of experiments for surface modification of Kapton films by CF₄-O₂microwave plasma treatment, *Appl. Surf. Sci.* 420 (2017) 579–585. doi:10.1016/j.apsusc.2017.05.140.
- [108] A.S. Bolokang, M.J. Phasha, Formation of titanium nitride produced from nanocrystalline titanium powder under nitrogen atmosphere, *Int. J. Refract. Met. Hard Mater.* 28 (2010) 610–615. doi:10.1016/j.ijrmhm.2010.05.008.
- [109] S. Yu, Q. Zeng, A.R. Oganov, G. Frapper, L. Zhang, Phase stability, chemical bonding and mechanical properties of titanium nitrides: A first-principles study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 11763–11769. doi:10.1039/c5cp00156k.
- [110] Y. Zhao, J. Zhang, Microstrain and grain-size analysis from diffraction peak width and graphical derivation of high-pressure thermomechanics, *J. Appl. Crystallogr.* 41 (2008) 1095–1108. doi:10.1107/S0021889808031762.
- [111] Z. Zhang, X. Li, H. Dong, Plasma-nitriding and characterization of FeAl₄₀ iron aluminide, *Acta Mater.* 86 (2015) 341–351. doi:10.1016/j.actamat.2014.11.044.
- [112] A. Akbari, R. Mohammadzadeh, C. Templier, J.P. Riviere, Effect of the initial microstructure on the plasma nitriding behavior of AISI M2 high speed steel, *Surf. Coatings Technol.* 204 (2010) 4114–4120. doi:10.1016/j.surfcoat.2010.05.042.
- [113] V. Fouquet, L. Pichon, A. Straboni, M. Drouet, Nitridation of Ti6Al4V by PBI: Study of the nitrogen diffusion and of the nitride growth mechanism, *Surf. Coatings Technol.* 186 (2004) 34–39. doi:10.1016/j.surfcoat.2004.04.006.
- [114] N. Kazantseva, P. Krakhmalev, M. Thuvander, I. Yadroitsev, N. Vinogradova, I. Ezhov, Martensitic transformations in Ti-6Al-4V (ELI) alloy manufactured by 3D Printing, *Mater. Charact.* 146 (2018) 101–112. doi:10.1016/j.matchar.2018.09.042.
- [115] H. Galarraga, R.J. Warren, D.A. Lados, R.R. Dehoff, M.M. Kirka, P. Nandwana, Effects of heat treatments on microstructure and properties of Ti-6Al-4V ELI alloy fabricated by electron beam melting (EBM), *Mater. Sci. Eng. A*. 685 (2017) 417–428. doi:10.1016/j.msea.2017.01.019.
- [116] R. Cottam, S. Palanisamy, M. Avdeev, T. Jarvis, C. Henry, D. Cuiuri, L. Balogh, R. Abdul Rahman Rashid, Diffraction Line Profile Analysis of 3D Wedge Samples of Ti-6Al-4V Fabricated Using Four Different Additive Manufacturing Processes, *Metals (Basel)*. 9 (2019) 60. doi:10.3390/met9010060.
- [117] K. Farokhzadeh, A. Edrisy, Fatigue improvement in low temperature plasma nitrided Ti-6Al-4V alloy, *Mater. Sci. Eng. A*. 620 (2014) 435–444. doi:10.1016/j.msea.2014.10.008.
- [118] F.J. Gil, M.P. Ginebra, J.M. Manero, J.A. Planell, Formation of α -Widmanstätten structure: effects of grain size and cooling rate on the Widmanstätten morphologies and on the

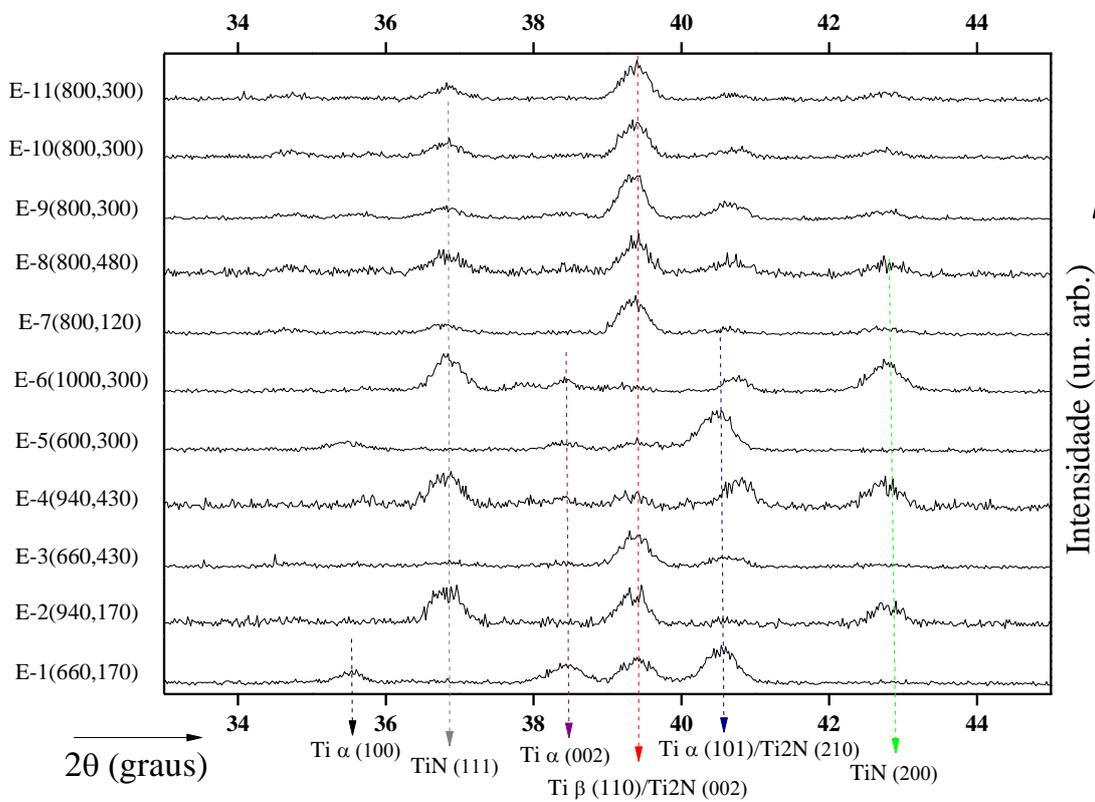
- mechanical properties in Ti6Al4V alloy, *J. Alloys Compd.* 329 (2001) 142–152. doi:10.1016/S0925-8388(01)01571-7.
- [119] A. Maranda-Niedbala, R. Nowakowski, AFM of titanium nitride layers prepared under glow discharge conditions, *J. Alloys Compd.* 424 (2006) 272–278. doi:10.1016/j.jallcom.2005.11.082.
- [120] C. Alves, C.L.B. Guerra Neto, G.H.S. Morais, C.F. da Silva, V. Hajek, Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge, *Surf. Coatings Technol.* 194 (2005) 196–202. doi:10.1016/j.surfcoat.2004.10.009.
- [121] R. Yang, C. Zhu, Q. Wei, Z. Du, Investigations on structural, elastic, thermodynamic and electronic properties of TiN, Ti₂N and Ti₃N₂ under high pressure by first-principles, *J. Phys. Chem. Solids.* 98 (2016) 10–19. doi:10.1016/j.jpccs.2016.05.012.
- [122] F.M. El-Hossary, N.Z. Negm, A.M. Abd El-Rahman, M. Raaif, A.A. Seleem, A.A. Abd El-Moula, Tribo-mechanical and electrochemical properties of plasma nitriding titanium, *Surf. Coatings Technol.* 276 (2015) 658–667. doi:10.1016/j.surfcoat.2015.06.003.
- [123] F. Movassagh-Alanagh, A. Abdollah-zadeh, M. Aliofkhaezrai, M. Abedi, Improving the wear and corrosion resistance of Ti–6Al–4V alloy by deposition of TiSiN nanocomposite coating with pulsed-DC PACVD, *Wear.* 390–391 (2017) 93–103. doi:10.1016/j.wear.2017.07.009.
- [124] Y. Tamura, A. Yokoyama, F. Watari, T. Kawasaki, Surface Properties and Biocompatibility of Nitrided Titanium for Abrasion Resistant Implant Materials., *Dent. Mater. J.* (2002). doi:10.4012/dmj.21.355.
- [125] N. Eliaz, Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review, *Materials (Basel).* 12 (2019) 407. doi:10.3390/ma12030407.
- [126] I. Simsek, D. Ozyurek, Investigation of the wear and corrosion behaviors of Ti5Al2.5Fe and Ti6Al4V alloys produced by mechanical alloying method in simulated body fluid environment, *Mater. Sci. Eng. C.* 94 (2019) 357–363. doi:10.1016/j.msec.2018.09.047.
- [127] G. Gunawarman, R. Andrew, I. Ilhamdi, A. Jon, C. Ken, N. Maasaki, H. Hendra, N. Mitsuo, Corrosion behavior of new beta type Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy in simulated body fluid solution, *Front. Bioeng. Biotechnol.* (2016). doi:10.3389/conf.fbioe.2016.01.01060.
- [128] Q. Qu, Y. He, L. Li, M. Yang, B. Lai, Y. Chen, Effect of fluorine ion on the corrosion of Ti-6Al-4V alloy in artificial saliva, *Int. J. Electrochem. Sci.* 10 (2015) 7453–7464.
- [129] A. Shahryari, W. Kamal, S. Omanovic, The effect of surface roughness on the efficiency of the cyclic potentiodynamic passivation (CPP) method in the improvement of general and pitting corrosion resistance of 316LVM stainless steel, *Mater. Lett.* 62 (2008) 3906–3909. doi:10.1016/j.matlet.2008.05.032.
- [130] Q. Qu, L. Wang, Y. Chen, L. Li, Y. He, Z. Ding, Corrosion behavior of titanium in artificial saliva by lactic acid, *Materials (Basel).* 7 (2014) 5528–5542. doi:10.3390/ma7085528.
- [131] E.R. Takamori, R. Cruz, F. Gonçalves, R.V. Zanetti, A. Zanetti, J.M. Granjeiro, Effect of roughness of zirconia and titanium on fibroblast adhesion, *Artif. Organs.* 32 (2008) 305–309. doi:10.1111/j.1525-1594.2008.00547.x.
- [132] S. Migita, S. Okuyama, K. Araki, Sub-micrometer scale surface roughness of titanium reduces fibroblasts function, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 14 (2016) 0–0. doi:10.5301/jabfm.5000260.
- [133] C.J. Oates, W. Wen, D.W. Hamilton, Role of titanium surface topography and surface wettability on focal adhesion kinase mediated signaling in fibroblasts, *Materials (Basel).* 4 (2010) 893–907. doi:10.3390/ma4050893.
- [134] R.C.-C. Wang, M.-C. Hsieh, T.-M. Lee, Effects of nanometric roughness on surface properties and fibroblast's initial cytocompatibilities of Ti6Al4V, *Biointerphases.* 6 (2011) 87–97. doi:10.1116/1.3604528.
- [135] S.K. Nishimoto, M. Nishimoto, S.-W. Park, K.-M. Lee, H.-S. Kim, J.-T. Koh, J.L. Ong, Y. Liu, Y. Yang, The effect of titanium surface roughening on protein absorption, cell attachment, and cell spreading., *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 23 (2007) 675–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18807564>.
- [136] A. Hasan, V. Saxena, L.M. Pandey, Surface Functionalization of Ti6Al4V via Self-assembled

- Monolayers for Improved Protein Adsorption and Fibroblast Adhesion, 2018. doi:10.1021/acs.langmuir.7b03152.
- [137] Y. Yang, R. Cavin, J.L. Ong, Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 67 (2003) 344–349. doi:10.1002/jbm.a.10578.
- [138] D.D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, Y.F. Missirlis, Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption, *Biomaterials.* 22 (2001) 1241–1251. doi:10.1016/S0142-9612(00)00274-X.
- [139] K. Anselme, M. Biggerelle, B. Nol, A. Iost, P. Hardouin, Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth, *J. Biomed. Mater. Res.* 60 (2002) 529–540. doi:10.1002/jbm.10101.

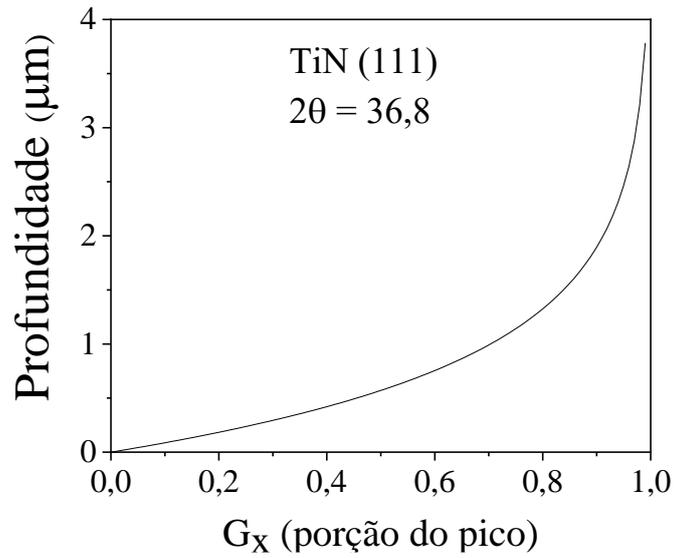
ANEXOS



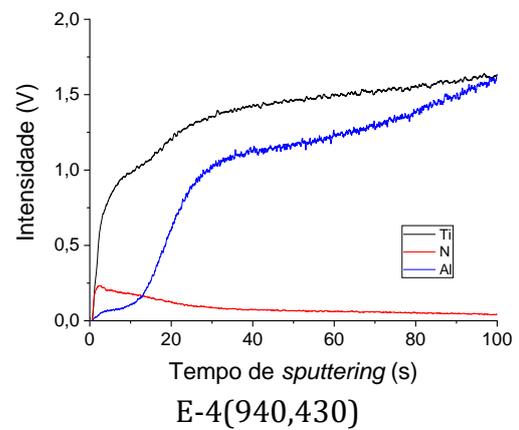
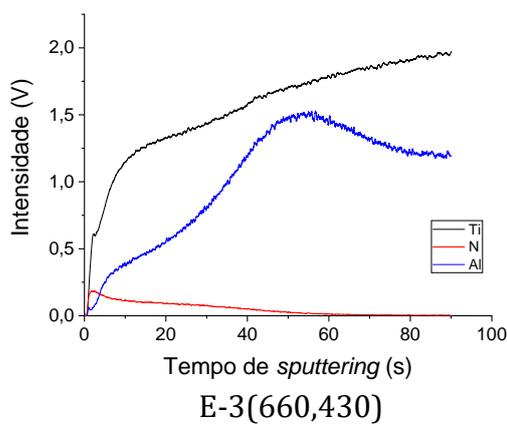
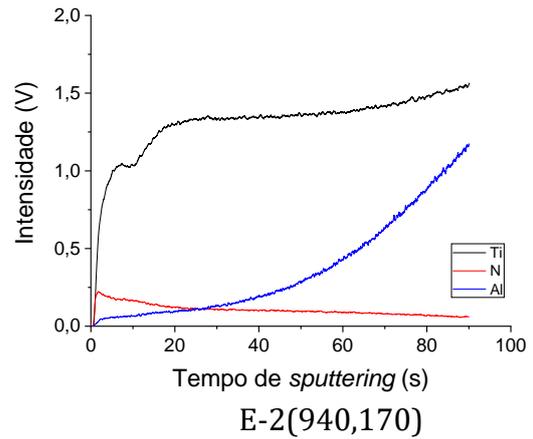
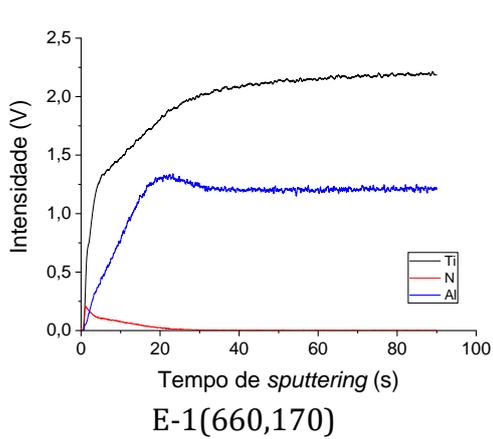
Anexo A1 – Fotografias das amostras após os tratamentos realizados em diferentes temperaturas.

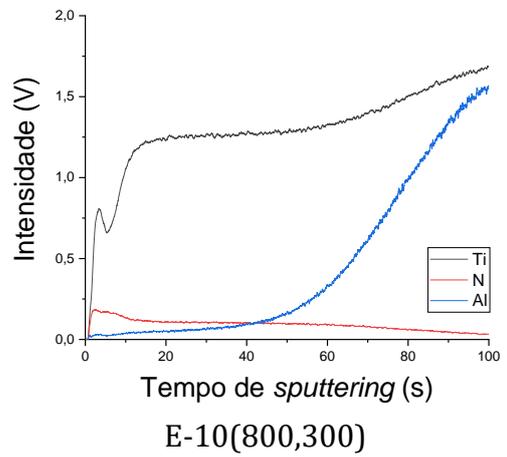
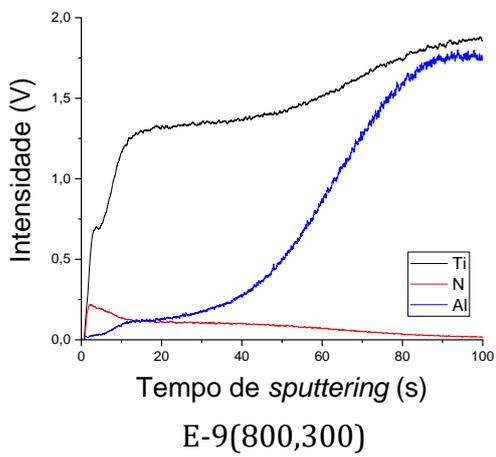
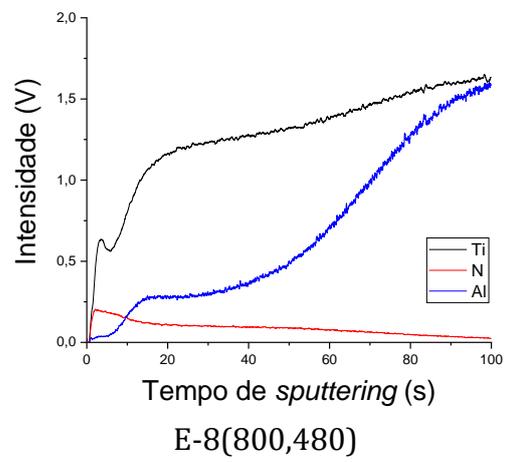
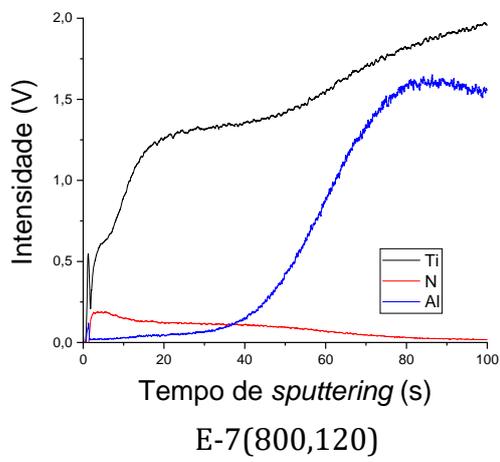
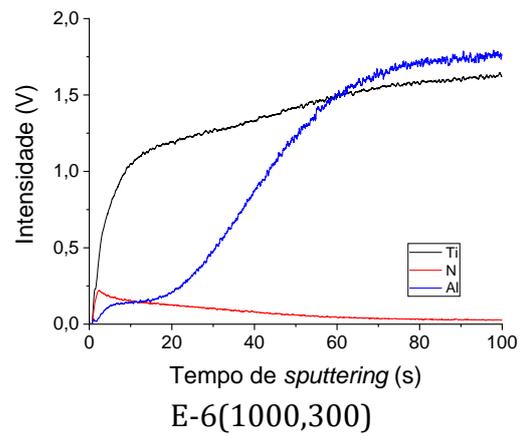
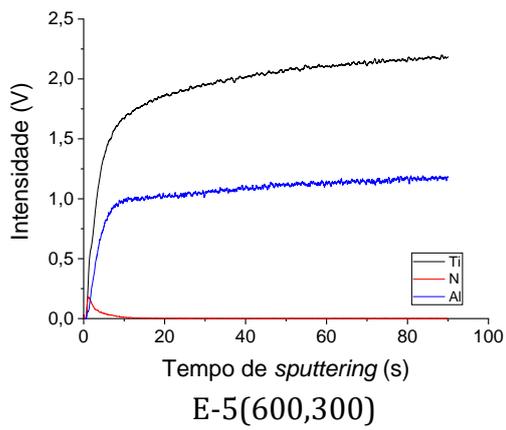


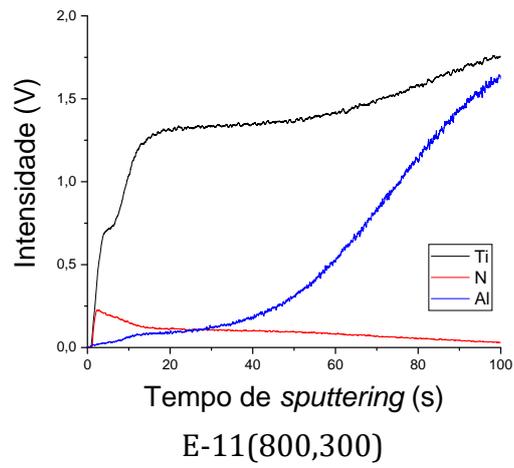
Anexo A2 – Difractogramas das amostras do planejamento experimental.



Anexo A3 – Profundidade de penetração dos raios X em função da porção do pico para o TiN (111)







Anexo A4 – Espectros GD-OES das amostras do planejamento experimental.



Anexo A5 – Exemplo de cratera do ensaio de micro-abrasão.