

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR *Emília Tiebo*
Uzumaki..... E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM *24.10.2006*

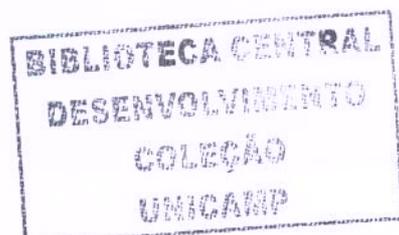
Cecília A. C. Zavaglia
ORIENTADOR B

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Desenvolvimento de filmes de carbono tipo diamante (DLC) obtidos pelo processo de imersão em plasma para implantes osteoarticulares

Autora: **Emília Tieko Uzumaki**
Orientadora: **Cecília A. C. Zavaglia**

48/2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

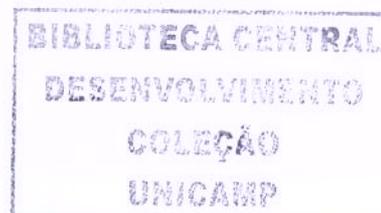
Desenvolvimento de filmes de carbono tipo diamante (DLC) obtidos pelo processo de imersão em plasma para implantes osteoarticulares

Autora: **Emília Tieko Uzumaki**
Orientadora: Cecília A. C. Zavaglia

Curso: Engenharia Mecânica
Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Tese de doutorado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Campinas, 2006
S.P. – Brasil



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	17un, CAMP
	Uz8d
V	EX
TOMAR BOI	0221
PROG.	16.P.00123-06
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11.00
DATA	05/10/06
Nº CPD	

Bib-ID 388938

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Uz8d Uzumaki, Emília Tieko
Desenvolvimento de filmes de carbono tipo diamante (DLC) obtidos pelo processo de imersão em plasma para implantes osteoarticulares / Emilia Tieko Uzumaki.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Filmes finos de diamantes. 2. Filmes finos. 3. Revestimentos protetores. 4. Plasma de baixa temperatura. 5. Plasma (Gases ionizados). 6. Biocompatibilidade. 7. Implantes ortopédicos. 8. Biomateriais. I. Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Titulo em Inglês: Development of diamond-like carbon (DLC) coatings produced by plasma immersion process for orthopaedic implants

Palavras-chave em Inglês: Diamond-like carbon films, Coatings, Plasma immersion process, Characterization, In vitro and in vivo biocompatibility, Orthopaedic implants, Biomaterials

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Doutora em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Célia Marina de Alvarenga Freire, Amauri Garcia, José Arana Varela, Luiz Sérgio Marcelino Gomes

Data da defesa: 24/02/2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

TESE DE DOUTORADO

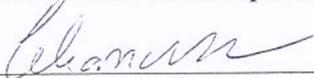
**Desenvolvimento de filmes de carbono tipo
diamante (DLC) obtidos pelo processo de imersão
em plasma para implantes osteoarticulares**

Autora: Emília Tiekô Uzumaki

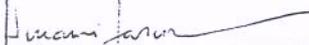
Orientadora: Cecília A. C. Zavaglia



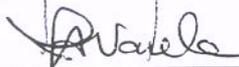
Prof. Dr. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente
Universidade Estadual de Campinas - FEM



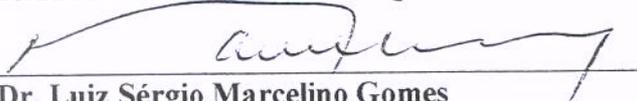
Prof. Dr. Célia Marina de Alvarenga Freire
Universidade Estadual de Campinas - FEM



Prof. Dr. Amauri Garcia
Universidade Estadual de Campinas - FEM



Prof. Dr. José Arana Varela
Universidade Estadual Paulista - IQ



Prof. Dr. Luiz Sérgio Marcelino Gomes
Centro de Estudos do Serviço de Cirurgia e Reabilitação Ortopédico-Traumatológica

Campinas, 24 de fevereiro de 2006

Dedico este trabalho ao meu esposo Carlos, ao meu filho Kenji, aos meus pais Yoshitaka e Satiko, e meus irmãos Flávio e Êmerson, que sempre me apoiaram.

Agradecimentos

Este trabalho trata-se de um estudo multidisciplinar e contou com o apoio de diversas pessoas e instituições, a quem sou muito grata, e sem o qual, não seria possível realizar todos os ensaios apresentados. Assim, agradeço a todos os colaboradores, em especial:

À minha orientadora, Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, que me apoiou e incentivou durante a execução deste trabalho.

Ao meu marido Carlos Salles Lambert (Departamento de Física Aplicada - IFGW - UNICAMP), pelo importante auxílio, conhecimento e carinho, que me ajudaram em todos os momentos.

Ao meu filho Kenji Lucas Uzumaki Lambert e aos meus pais Yoshitaka e Satiko e irmãos Flávio e Émerson, pelo apoio, compreensão e carinho.

Ao Dr. William Dias Belangero (Faculdade de Ciências Médicas, FCM - UNICAMP), e Nilza A. Batista (Núcleo de Medicina e Cirurgia experimental - NMCE, FCM-UNICAMP), sem os quais não seria possível realizar os ensaios *in vivo*.

Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr (Instituto de Biologia, IB-UNICAMP), Dra. Selma Candelária Genari (IB-UNICAMP) e Dra Célia Marina de Alvarenga Freire (FEM-UNICAMP), que colaboraram nos ensaios experimentais e também por suas valiosas discussões.

Ao Núcleo de Medicina e Cirurgia experimental (FCM-UNICAMP), Grupo de Preparação e Caracterização de Materiais (IFGW-UNICAMP), Laboratório de Interfaces e Nanoestruturas (IFGW-UNICAMP), Grupo de Propriedades Ópticas (IFGW-UNICAMP), Laboratório de Implantação Iônica e Tratamentos de Superfície (IFGW-UNICAMP), Laboratório de Processos de Plasma (IFGW-UNICAMP), Laboratório de Estudos de Corrosão e Desenvolvimento de Revestimentos (FEM-UNICAMP), Laboratório de Microscopia Eletrônica (FEM-UNICAMP), Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (FEQ-UNICAMP), pelo apoio técnico na realização dos estudos.

À Patrícia e Leandro do IB-UNICAMP; Ana Amélia, Sérgio, Cláudia e Luís do NMCE-FCM-UNICAMP; Kelly da FEQ-UNICAMP; Vanessa, Carmo, Claudenete e Maria Aparecida da FEM-UNICAMP, pelo apoio e colaboração.

À todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Engenharia de Materiais (FEM-UNICAMP), que colaboraram de forma direta e indireta neste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro, e à FAEPEX/FUNCAMP e CNPq pelo auxílio viagem (congresso).

Como o garimpeiro, humilde, simples, paciente e amante da liberdade... “capaz de sentir o despertar do tempo e o amanhecer da vida”... utópico...temos que arregaçar as mangas e pegar a bateia... arregaçar as calças e entrar no riacho... curvar-se diante dele e tirar de suas entranhas (perdido no infinito mundarél de seixos) a nossa pedra preciosa. Como o garimpeiro, temos que ter sempre em mente (como objetivo) a pedra de maior quilate, e saber, como ele, que por muitas e muitas vezes teremos em nossa bateia só pedregulhos e por tantas outras vezes, pedras travestidas de preciosas. E como ele: livre... vassalo de si mesmo... sonhador... devolver ao leito do rio os pedregulhos e as falsas pedras, para que suas águas as tornem preciosas... e tudo novamente recomeçar... o sol... a água... o trabalho.

Carlos Salles Lambert

Resumo

UZUMAKI, Emília Tiekko, *Desenvolvimento de filmes de carbono tipo diamante (DLC) obtidos pelo processo de imersão em plasma para implantes osteoarticulares*. Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 174 p. Tese (Doutorado)

O carbono tipo diamante (“diamond-like carbon” - DLC) tem demonstrado características, como alta dureza, baixo atrito, resistência ao desgaste e à corrosão, e biocompatibilidade, que podem melhorar as propriedades de implantes sólidos e articulados. O processo de imersão em plasma vem sendo usado para depositar DLC em substratos tridimensionais, pois, com esta técnica, se consegue melhor adesão do que com as técnicas convencionais. Neste trabalho, filmes de DLC foram depositados, pelo processo de imersão em plasma, em lamínulas de vidro, silício e liga de titânio Ti-13Nb-13Zr. A caracterização da microestrutura, morfologia, dureza e adesão dos filmes de DLC foi feita por espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (MFA), nanoindentação e ensaio de puxamento. Como exemplos de peças tridimensionais, filmes de DLC foram depositados em implantes osteoarticulares de quadril e joelho, titânio poroso (esponja de célula-aberta, semelhante à estrutura do osso esponjoso, expandida a vácuo), facas industriais, bisturi cirúrgico, engrenagem de motor, tubos de quartzo e de alumínio, e outros objetos. O filme obtido apresentou boas propriedades mecânicas, aumentando em 2 vezes a dureza da liga de Ti, alta adesão (filme sem interface definida e sem delaminação), resistência ao desgaste, baixa rugosidade e uniformidade de deposição em superfícies tridimensionais. Os resultados de corrosão (polarização de Tafel e espectroscopia de impedância eletroquímica em fluido corporal simulado) mostraram que o revestimento de DLC melhora a resistência da liga de Ti à corrosão. No ensaio de biocompatibilidade *in vitro*, com células fibroblásticas, foram estudados a citotoxicidade, adesão e morfologia celular (estudo citoquímico, microscopia de contraste de fase, MEV e MFA). No ensaio de biocompatibilidade *in vivo*, a liga de Ti-13Nb-13Zr, revestida com DLC, foi

investigada em tecido muscular e ósseo de ratos após 4 e 12 semanas do procedimento cirúrgico. A interface formada entre o DLC e o tecido foi investigada por histologia convencional, e os implantes retirados por MEV. A interface entre o implante e o tecido ósseo, não descalcificado, foi estudada por MEV na modalidade retroespalhamento. Os resultados mostraram a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* do filme de DLC, e foi verificado também que os implantes revestidos com DLC possuem resposta biológica mais favorável do que os implantes não revestidos.

Palavras-chave: filmes de carbono tipo diamante; recobrimento; processo de imersão em plasma; caracterização; biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*; implantes ortopédicos, biomateriais

Abstract

UZUMAKI, Emília Tiekko, *Development of diamond-like carbon (DLC) coatings produced by plasma immersion process for orthopaedic implants*. Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 174 p. Tese (Doutorado)

Diamond-like carbon (DLC) films are often considered a suitable coating material for orthopaedic applications. It has proven characteristics, such as hardness, wear resistance, low friction coefficient and biocompatibility that improve the properties of solid and articulated implants. Recently, the plasma immersion process was used to deposit DLC films with superior adhesion properties to those prepared with conventional techniques. DLC coatings were deposited on glass coverslips, silicon (Si) and Ti-13Nb-13Zr substrates using the plasma immersion process. The microstructure, morphology, roughness, hardness and adhesion of DLC films were characterized using Raman spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), nanoindentation and pull-test. As examples, DLC films produced by plasma immersion were deposited on industrial knives, surgical knives, knee implants, femoral heads (of hip prostheses), titanium foams, transmission gears of motorcycles, aluminium pipes, quartz pipes, and others objects. The corrosion susceptibility of DLC coatings produced by plasma immersion was studied in a simulated body fluid environment (Hanks' solution) using polarization test and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Electrochemical results showed that DLC coating produced by plasma immersion could improve corrosion resistance, and no significant damage has been observed. Vero cells (fibroblasts) were utilized for the *in vitro* biocompatibility studies, by cytotoxicity, adhesion and cell morphology (phase contrast microscopy, SEM, AFM, and cytochemical study). DLC-coated Ti-13Nb-13Zr was investigated in an animal model using the muscular tissue and femoral condyles of rats for intervals of 4 and 12 weeks postoperatively. The interface between the implants and tissue were analysed by light microscopy, and the removed implants by SEM. The SEM by backscattering

was used to access the interface between the implants the bone tissue without decalcifying. Our results indicate that DLC coatings are biocompatible *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: diamond-like carbon films; coatings; plasma immersion process; characterization; *in vitro* and *in vivo* biocompatibility; orthopaedic implants; biomaterials

Sumário

Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	xi
Nomenclaturas.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos	4
2. Revisão da literatura	5
2.1. Aplicações ortopédicas de biomateriais.....	5
2.2. Materiais utilizados em implantes ortopédicos.....	11
2.2.1. Metais e ligas.....	12
2.2.2. Polímeros	18
2.2.3. Cerâmicas.....	21
2.3. Técnicas de deposição a vácuo	23
2.3.1. Técnicas convencionais de deposição	24
2.3.1.1. Evaporação em vácuo	24
2.3.1.2. Deposição através de “sputtering” de material sólido	25
2.3.1.3. CVD com filamento-quente.....	28
2.3.1.4. CVD assistido por plasma	29
2.3.2. Implantação iônica por imersão em plasma e deposição (IIP&D).....	31

2.4. Filme de carbono tipo diamante (DLC).....	34
2.4.1. Estrutura e morfologia do DLC.....	37
2.4.1.1. Espectroscopia Raman.....	40
2.4.1.2. Morfologia da superfície por MFA.....	43
2.4.2. Propriedades do DLC.....	44
2.4.2.1. Dureza e adesão.....	44
2.4.2.2. Corrosão em meio fisiológico.....	50
2.4.2.3. Biocompatibilidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	57
2.4.2.4. Atrito e desgaste.....	65
3. Análise Experimental.....	71
3.1. Deposição de DLC pelo processo de imersão em plasma.....	73
3.2. Caracterização do filme de DLC.....	77
3.2.1. Microestrutura e morfologia da superfície.....	77
3.2.2. Nanoindentação e ensaio de adesão (<i>pull-test</i>).....	79
3.3. Ensaio de corrosão em solução de Hanks.....	80
3.3.1. Teste de polarização de Tafel.....	80
3.3.2. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).....	80
3.4. Ensaio de biocompatibilidade <i>in vitro</i>	82
3.4.1. Ensaio de citotoxicidade.....	82
3.4.2. Ensaio de adesão celular.....	83
3.4.3. Morfologia celular (MCF, citoquímica, MEV, MFA).....	84
3.5. Ensaio de biocompatibilidade <i>in vivo</i>	86
3.5.1. Procedimento experimental.....	86
3.5.2. Coleta do material.....	89

4. Resultados e Discussões	91
4.1. Objetos tridimensionais revestidos com DLC.....	91
4.2. Caracterização do filme de DLC.....	96
4.2.1. Microestrutura e morfologia da superfície.....	96
4.2.2. Nanodureza e adesão	104
4.3. Resistência à corrosão	106
4.4. Biocompatibilidade <i>in vitro</i>	111
4.4.1. Análise de citotoxicidade.....	111
4.4.2. Análise de adesão celular.....	114
4.4.3. Análise de morfologia celular.....	117
4.5. Biocompatibilidade <i>in vivo</i>	125
4.5.1. Retirada dos implantes.....	125
4.5.2. Análise do tecido muscular.....	125
4.5.3. Análise do tecido ósseo	128
4.5.4. Análise dos pinos retirados do tecido muscular e ósseo	131
5. Conclusões e sugestões para próximos trabalhos	137
Referências bibliográficas	141
Participação do autor em publicações relacionadas à tese	153
Prêmios internacionais recebidos pelo autor relacionados à tese	156
Anexo. Artigos sobre a tese publicada nas revistas “Thin Solid Films” e “Diamond and Related Materials” (Editora Elsevier) e entrevista concedida à revista Pesquisa Fapesp sobre os resultados e prêmios internacionais recebidos pelo trabalho	157

Lista de figuras

2.1. Exemplos de dispositivos de fixação de fraturas: (a) parafusos; (b) fio; (c) placa de compressão; (d) grampo; e (e) <i>cage</i> retangular para coluna	7
2.2. Exemplo de implante de quadril: (a) desenho esquemático; e (b) implante de quadril de liga de titânio, com revestimento poroso de “plasma spray” a vácuo de titânio na haste e microesferas de titânio no acetábulo	7
2.3. Exemplos de: (a) acetábulo de malha de titânio (esquerda) e de microesferas (direita); (b) taça acetabular de PEUAPM; e (c) cabeça femoral metálica e haste femoral não cimentada.....	8
2.4. Exemplos de implantes de joelho: (a) desenhos esquemáticos de sua colocação (Zimmer [®]); (b) implantes de joelho de Co-Cr-Mo – componente femoral.	8
2.5. Módulo de elasticidade da alumina, ligas biocompatíveis e osso cortical (em GPa).....	12
2.6. Exemplos de: (a) copo acetabular (implante de quadril); e (b) platô tibial (implante de joelho) de PEUAPM	20
2.7. Desgaste do platô tibial que faz par com joelho artificial de Co-Cr-Mo retirado por cirurgia de revisão após: (a) 14 anos (Howmedica); (b) 6 anos (Pourbaix); e (c) 9.5 anos (DePuy).....	20
2.8. Exemplos de: (a) espaçador (esquerda) e centralizador distal (direita) de PMMA; e (b) haste femoral cimentada com pré-revestimento de PMMA	20
2.9. Modelos antigos de: (a) cabeça femoral; e (b) parafusos de alumina monocristalina (transparente), da Kyocera [®]	22
2.10. Articulação de implante de quadril da Kyocera [®] : uma cabeça femoral de alumina (superior - mais escura) e duas de zircônia (inferiores - mais claras).....	22

2.11. Articulação de joelho da Kyocera [®] : componente femoral de alumina (esquerda) e de zircônia (direita).....	22
2.12. Representação esquemática de uma evaporação em vácuo.....	25
2.13. Representação esquemática de uma deposição por “sputtering” DC.....	27
2.14. Representação esquemática de uma deposição por “ion beam sputtering”.....	28
2.15. Representação esquemática de uma deposição por CVD com filamento-quente.....	29
2.16. Modelo esquemático de deposição pelo processo CVD, onde várias formas de carbono sólido competem entre si, e ocorre conversão das diferentes configurações de ligações na superfície (PEHRSSON, CELII, BUTLER, 1993).....	30
2.17. Implantação iônica: (a) convencional; e (b) por imersão em plasma (IIP&D).....	32
2.18. Representação esquemática de deposição de DLC utilizando IIP&D.....	33
2.19. Arranjo atômico do: (a) diamante; e (b) grafite.....	37
2.20. Configuração de rede não cristalina para o DLC com: (a) ligações sp^2 (⊙), sp^3 (●), e hidrogênio (o); e (b) a mesma rede sem os átomos de hidrogênio (ANGUS & WANG, 1991).....	38
2.21. Estado da arte do carbono tipo diamante: (a) delimitações das propriedades do DLC (KOIDL et al, 1991); e (b) diagrama de fase dos materiais de DLC (ROBERTSON, 1999).....	39
2.22. Circuitos equivalentes para ajuste de EIE: (a) modelo mais simples; e (b) modelo utilizado neste trabalho.....	54
2.23. Resumo de ensaios de desgaste (adaptado de TIAINEM, 2001).....	67
3.1. Esquema dos ensaios realizados para a caracterização dos filmes de DLC.....	72
3.2. Representação esquemática do equipamento de imersão em plasma utilizado.....	74

3.3. Substratos utilizados no trabalho: (a) lamínulas de vidro da Corning; (b) discos de Ti-13Nb-13Zr; (c) pinos de Ti-13Nb-13Zr sobre um suporte de titânio	75
3.4. Substratos sem revestimento (esquerda) e com revestimento de DLC (direita) de: (a) lamínulas de vidros; (b) discos de Ti-13Nb-13Zr; e (c) pinos de Ti-13Nb-13Zr, sobre placas de Petri	75
3.5. Plasma ao redor de: (a) pinos de Ti-13Nb-13Zr; e (b) implante de joelho de Co-Cr-Mo.....	76
3.6. Esquema de colocação de amostras para análise da uniformidade de deposição do processo de imersão em plasma.....	78
3.7. Esquema de colocação da amostra para análise da adesão do filme de DLC depositado em liga de Ti-13Nb-13Zr.....	79
3.8. Célula de corrosão montada com solução de Hanks (superior); e equipamento utilizado nos ensaios	81
3.9. Diagrama esquemático do ensaio <i>in vivo</i> . Utilização de dois grupos (pinos de Ti, e pinos de Ti-13Nb-13Zr com revestimento de DLC), subdivididos em dois tempos de seguimento	87
3.10. Colocação do implante no músculo	88
3.11. Pino introduzido no côndilo	88
4.1. Implantes de joelho e cabeça femoral de Co-Cr-Mo revestidos com DLC.....	91
4.2. Implante de quadril não cimentado de Ti-13Nb-13Zr: cabeça femoral com revestimento de DLC, acetábulo com revestimento de microesferas e haste femoral com revestimento de “plasma spray” a vácuo. Combinação de módulo de elasticidade mais próxima ao do osso (liga de titânio) e revestimento resistente ao desgaste na articulação (DLC)	92
4.3. Esponja de titânio expandido a vácuo revestido com DLC.....	93

4.4. Bisturi cirúrgico com revestimento de DLC apenas no corte.....	94
4.5. Brocas revestidas com DLC	94
4.6. “Boarding” de ataque de avião revestido com DLC.....	94
4.7. Engrenagens de motor revestidas com DLC	95
4.8. Sede de rolamento revestido com DLC.....	95
4.9. Tubos de quartzo e alumínio revestidos interna e externamente com DLC.....	95
4.10. Espectro Raman do filme de DLC	96
4.11. Imagem por MFA da superfície tridimensional do silício. Rugosidade média = 0.22 nm. Obs: na realidade o substrato de Si é mais liso do que aparenta na figura, pois artefatos (linhas paralelas) foram criados pelo microscópio de força atômica.	97
4.12. Imagens por MFA da superfície do filme de DLC depositado sobre silício com diversas escalas, mostrando a baixa rugosidade do filme obtido. Rugosidade média = 1 nm.	98
4.13. Imagem por MFA da superfície tridimensional do filme de DLC depositado sobre silício. Rugosidade média = 1 nm.....	98
4.14. Imagem por MFA da superfície tridimensional da lamínula de vidro. Rugosidade média = 0.46 nm	99
4.15. Imagem por MFA da superfície tridimensional do filme de DLC depositado sobre vidro. Rugosidade média = 0.58 nm.....	99
4.16. Imagem por MEV da superfície da liga Ti-13Nb-13Zr. Barra = 10 µm. Aumento original 1500X.....	100
4.17. Imagem por MEV da superfície do revestimento de DLC depositado sobre Ti-13Nb-13Zr. Barra = 10 µm. Aumento original 1500X	100

4.18. Imagem por microscopia óptica da superfície do pino de Ti cp com diferentes aumentos: (a)100X; (b) 200X; e (c) 500X.....	101
4.19. Imagem por MEV da superfície do pino de Ti cp. Aumento original: 100X.....	101
4.20. Imagem por MEV da superfície do pino revestido com DLC. Aumento original: 100X ..	102
4.21. Espessura do filme de DLC formado em substratos de Ti-13Nb-13Zr colocados em cada lado de um suporte hexagonal	102
4.22. Microscopia óptica da interface DLC/Ti-13Nb-13Zr (com luz polarizada). Aumento original: 100X.....	103
4.23. Nanodureza do substrato de Ti-13Nb-13Zr e do revestimento de DLC.....	104
4.24. Teste de puxamento do DLC/Ti-13Nb-13Zr em 6 amostras (força média = 87.8 MPa; e desvio padrão = 7.0 MPa)	105
4.25. Curvas de polarização de Tafel para Ti-13Nb-13Zr com e sem revestimento de DLC em solução de Hanks	106
4.26. Diagramas de Bode para as amostras de Ti-13Nb-13Zr antes e após Tafel em solução de Hanks: (a) sem revestimento; e (b) com revestimento de DLC	109
4.27. Diagramas de Bode para comparação das amostras de Ti-13Nb-13Zr com e sem revestimento de DLC: (a) antes; e (b) após polarização de Tafel.....	110
4.28. Circuito equivalente utilizado para simular os dados de EIE.....	110
4.29. Ensaio de citotoxicidade celular. As colunas representam a média de seis leituras de absorbâncias e as barras verticais o intervalo de desvio padrão	111
4.30. Ensaio de adesão celular com: (a) 2 horas; e (b) 24 h. As colunas representam a média de seis leituras de absorbâncias e as barras verticais o intervalo de desvio padrão	114

4.31. Imagem por microscopia de contraste de fase de células fibroblásticas após 24 h de cultivo. Células Vero sobre o controle (esquerda) e DLC/vidro (direita) com aumento original de 20X (superior) e 40X (inferior)	117
4.32. Morfologia de células fibroblásticas coradas com azul de toluidina (pH 4.0) após 24h de cultivo. Células Vero sobre controle (esquerda) e DLC/vidro (direita) com aumento original de 20X (superior) e 40X (inferior)	118
4.33. Imagem por MEV de células fibroblásticas cultivadas durante 24h sobre: (a)-(b) vidro (material controle); (c)-(d) DLC/vidro; (e)-(f) DLC/Ti-13Nb-13Zr; e (g)-(h) Ti-13Nb-13Zr.....	120
4.34. Imagens de MFA mostrando células fibroblásticas cultivadas sobre o material controle (vidro). Do lado direito, a mesma imagem com sombreamento. N = núcleo; F = fibras de <i>stress</i> ; V = vesículas (formas ovaladas em grande número no item d).....	121
4.35. Imagens de MFA mostrando células fibroblásticas cultivadas sobre o DLC/vidro. Do lado direito, a mesma imagem com sombreamento. N = núcleo; F = fibras de <i>stress</i> ; V = vesículas (formas ovaladas em grande número no item d).....	122
4.36. Imagens de MFA mostrando células fibroblásticas cultivadas em: (a) DLC/Ti-13Nb-13Zr; e (b) Ti-13Nb-13Zr. Do lado direito, a mesma imagem com sombreamento.....	123
4.37. Grau de achatamento das células em: (a) DLC/Ti-13Nb-13Zr; e (b) Ti-13Nb-13Zr; utilizando MFA.....	124
4.38. Cortes histológicos transversais do tecido muscular, após a retirada dos pinos de: Ti cp (esquerda); e DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita), corados com HE, com seguimento de 4 (superior) e 12 semanas (inferior). Aumento original = 20X	126
4.39. Cortes histológicos transversais do tecido muscular, após a retirada dos pinos de: Ti cp (esquerda); e DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita), corados com TM, com seguimento de 4 (superior) e 12 semanas (inferior). Aumento original = 20X	127

4.40. Cortes histológicos transversais do tecido ósseo, após a retirada dos pinos de: Ti cp (esquerda); e DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita), corados com HE, com seguimento de 4 (superior) e 12 semanas (inferior). Aumento original = 20X	128
4.41. Cortes histológicos transversais do tecido ósseo, após a retirada dos pinos de: Ti cp (esquerda); e DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita), corados com TM, com seguimento de 4 (superior) e 12 semanas (inferior). Aumento original = 20X	129
4.42. Imagem por MEV (por feixe de elétrons retroespalhados) de cortes do tecido ósseo com pinos de: Ti cp (esquerda); e DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita), com seguimento de 4 (superior) e 12 semanas (inferior). Os implantes aparecem em branco, o osso em cinza e o tecido não mineralizado em preto. Aumento original = 50X. Barra = 500 µm	130
4.43. Imagem por MEV da superfície do pino retirado do tecido muscular com 4 semanas: pinos de Ti (esquerda) e pinos de DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita).....	132
4.44. Imagem por MEV da superfície do pino retirado do tecido muscular com 12 semanas: pinos de Ti (esquerda) e pinos de DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita).....	133
4.45. Imagem por MEV da superfície do pino retirado do tecido ósseo com 4 semanas: pinos de Ti (esquerda) e pinos de DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita).....	134
4.46. Imagem por MEV da superfície do pino retirado do tecido ósseo com 12 semanas: pinos de Ti (esquerda) e pinos de DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita).....	135

Lista de tabelas

2.1. Propriedades mecânicas de tração de materiais de implante e tecido ósseo (NIINOMI 1998; BRUNSKI, 1996)	12
2.2. Teor dos elementos químicos dos aços inoxidáveis conforme norma ASTM F138 (316L) grau 1 e grau 2	13
2.3. Composição das ligas de cromo-cobalto conforme norma ASTM	14
2.4. Composição do titânio puro grau 2 e ligas de titânio F1108 e F 136.....	15
2.5. Espectro Raman do diamante, grafite e DLC.....	42
2.6. Propriedades do diamante e filmes de DLC obtidos por diversas técnicas.....	46
2.7. Resumo das propriedades dos filmes de diamante, HDLC e taC.....	47
2.8. Dureza de filmes de DLC obtidos por IIP&D.....	47
4.1. Resultado do ensaio de nanoindentação (nanodureza em GPa).....	104
4.2 Valor dos elementos do circuito equivalente em solução de Hanks	108
4.3. Análise de variância para o ensaio de citotoxicidade.....	112
4.4. Valor absoluto das diferenças entre pares das médias para o ensaio de citotoxicidade	113
4.5. Análise de variância para o ensaio de adesão de 2h.....	115
4.6. Análise de variância para o ensaio de adesão de 24h.....	115
4.7. Valor absoluto das diferenças entre pares das médias para o ensaio de adesão de 2h.....	116
4.8. Valor absoluto das diferenças entre pares das médias para o ensaio de adesão de 24h.....	116

Nomenclaturas

Abreviações

- ANOVA** – análise de variância
 α – nível de significância
Cf – capacitância do filme
CPE – elemento de constante de fase
CN – carbonitreto
CoCrMo – cromo-cobalto-molibidênio
Cb – capacitância da camada barreira
Cp – capacitância da camada porosa
CVD - “chemical vapor deposition” (deposição por vapor químico)
DC – “direct current” (corrente contínua)
d.d.p. - diferença de potencial
DLC - “diamond-like carbon” (carbono tipo diamante)
dms – diferença mínima significativa
EIE – espectroscopia de impedância eletroquímica
ELI – “extra low interstitial”
HA – hidroxiapatita
HE – hematoxilina-eosina
HV – dureza Vickers
HDLC – DLC hidrogenado
 f – frequência
 i – densidade de corrente
 i_{corr} – densidade de corrente de corrosão
 H_0 – hipótese da nulidade
 H_1 – hipótese alternativa
IIIP – implantação iônica por imersão em plasma
IIIP&D – implantação iônica por imersão em plasma e deposição
IIIPMe - implantação iônica por imersão em plasma de metal
MEV – microscopia eletrônica de varredura
MFA – microscopia de força atômica
MSIBD - “mass selected ion beam deposition”
PEUAPM - polietileno de ultra alto peso molecular
PMMA – poli(metacrilato de metila)
PIII – “plasma immersion ion implantation”
PSII – “plasma source ion implantation”
PVD – “physical vapor deposition” (deposição física de vapor)
RF – rádio-frequência
Rb – resistência da camada barreira
Rf – resistência do filme

R_p – resistência da camada porosa
R_s – resistência da solução eletroquímica
taC – carbono tetraédrico
Ti cp – titânio comercialmente puro
TiN – nitreto de titânio
TiO₂ – dióxido de titânio
Ti-6Al-4V – liga de titânio com 6% de alumínio e 4% de vanádio
Ti-6Al-7Nb – liga de titânio com 6% de alumínio e 7% de nióbio
Ti-13Nb-13Zr – liga de titânio com 13% de nióbio e 13% de zircônio
TM – tricrômico de Masson
Z – impedância
Φ – ângulo de fase

Unidades de Medida

A – ampére
eV – elétron-volt (unidade de energia utilizada em física nuclear, equivalente à energia adquirida por um elétron acelerado sob uma diferença de potencial de 1 volt)
°C – graus Celsius
µm – micron
µs – microssegundo
Hz – Hertz
Pa – pascal (1 Pa = 10⁻⁵ bar = 10⁻² mbar = 7.5 x 10⁻³ Torr)
Torr – Torricelli (1 Torr = pressão de 1 mmHg, 1 atm = 760 Torr)
mV - milivolts
V – volt
W – watt

Normas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
AISI – “American Iron and Steel Institute”
ASTM – “American Society for Testing and Materials”
ISO – “International Standards Organization”

Siglas

DEMA - Departamento de Engenharia de Materiais
FDA - “Food and Drug Administration”
FEM - Faculdade de Engenharia Mecânica
GPCM - Grupo de Preparação e Caracterização de Materiais
IFGW - Instituto de Física Gleb Wataghin
NMCE - Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

Capítulo 1

Introdução

Os biomateriais, na ortopedia, são empregados na fabricação de implantes temporários para fixação de fraturas (placas, parafusos, fios e hastes), na fabricação de implantes permanentes de articulações, como quadril, joelho, ombro, etc (Cap. 2.1). Os implantes melhoram a qualidade de vida dos pacientes, no entanto, possuem vários problemas, associados à sua fixação e interação com os tecidos vivos, que ainda necessitam ser solucionado.

As ligas metálicas mais utilizadas em implantes ortopédicos são: os aços inoxidáveis austeníticos, as ligas de cromo-cobalto e as ligas de titânio (Cap. 2.2). As ligas de titânio se destacam por possuírem boa resistência à corrosão, maior biocompatibilidade e módulo de elasticidade mais próximo ao do osso cortical, do que as outras ligas citadas¹. (LONG & RACK, 1998). A liga de titânio mais utilizada é a liga Ti-6Al-4V, mas existem dúvidas quanto à sua biocompatibilidade, pois o alumínio e o vanádio podem ser prejudiciais ao organismo (OKAZAKI et al, 1998a). A liga **Ti-13Nb-13Zr** é uma boa alternativa, pois contém elementos metálicos considerados não citotóxicos, excelente resistência à corrosão, maior tenacidade e menor módulo de elasticidade do que a liga Ti-6Al-4V (NIINOMI, 1998). Uma desvantagem associada às ligas de titânio é a sua baixa resistência ao desgaste, levando à uma limitação do seu uso em articulações.

¹ Módulo de elasticidade (GPa): Osso cortical: 15-30, Ti-6Al-4V: 110, aço inox: 190, e liga de Co-Cr: 210. Recentemente o tântalo vem sendo também utilizado em implantes acetabulares (como revestimento poroso), apresentando baixo módulo de elasticidade (cerca de 3 GPa).

Os tratamentos de superfícies a vácuo (Cap. 2.3), como a deposição de filmes finos e a implantação de íons, podem ser utilizados para melhorar as propriedades superficiais de implantes ortopédicos. Os filmes finos podem ser depositados por diversas técnicas, como “sputtering” (pulverização catódica), processo baseado em “ion beam” (feixe de íons), e CVD (“chemical vapor deposition”) assistido por plasma (GRILL, 1999). No entanto essas técnicas geralmente trabalham com amostras planas, áreas pequenas, e têm dificuldade em revestir formas complexas – como é o caso de implantes, que são tridimensionais –, e os filmes gerados por esses processos possuem interface definida, com pouca aderência, podendo ocorrer delaminação, e portanto não são adequadas para implantes osteoarticulares.

Uma técnica recente, ou melhor, família de técnicas, que trabalha tanto com implantação de íons quanto com deposição, é a **Implantação Iônica por Imersão em Plasma e Deposição (IIIP&D)**. A IIIP&D é uma técnica desenvolvida para modificação de superfícies tridimensionais que permite um tratamento uniforme de peças de formas complexas, sem necessidade de rotacioná-las (ANDERS, 2002). O termo IIIP&D é utilizado para representar a grande família de técnicas de imersão em plasma (incluindo as técnicas de formação de filmes), enquanto o termo IIIP é utilizado para tratamentos de superfície sem formação de filmes. Desde o surgimento da IIIP em 1986, devido à J. R. Conrad e seu grupo da Universidade de Wisconsin, EUA, o interesse por esta técnica tem aumentado. Quando a IIIP&D é utilizada para formar filmes, obtêm-se filmes com adesão superior às técnicas tradicionais pois, o novo processo, não gera interface definida (há uma difusão para dentro do substrato) e o revestimento é feito com uniformidade, mesmo na parte interna de tubos ou estruturas porosas. O **Processo de Imersão em Plasma** (plasma frio), desenvolvido por Carlos Salles Lambert - Instituto de Física/UNICAMP, é um novo processo que está em fase de patenteamento e que pode ser incluído na família das técnicas já conhecidas de IIIP&D.

Os **filmes finos cerâmicos**, depositados a vácuo, são muito usados como revestimentos protetores, visando o endurecimento superficial, a resistência ao desgaste e à corrosão e, mais recentemente, para evitar que íons metálicos cheguem aos tecidos do corpo. Entre os filmes cerâmicos podem ser citados os filmes de dióxido de titânio (TiO_2), o de nitreto de titânio (TiN),

e carbono tipo diamante (DLC - “diamond-like carbon”). Para todos eles, existem técnicas (convencionais) de deposição a vácuo, no entanto, como já comentado, estes recobrimentos (obtidos por técnicas convencionais) possuem interface definida entre o substrato e o filme, não podendo assim, serem usados na área médica, pois o revestimento se destaca com facilidade.

A idéia de se depositar **filmes de TiO₂** vem da excelente resistência à corrosão do titânio puro, o que se dá devido à fina camada de óxido (principalmente TiO₂) que se forma naturalmente na sua superfície, como no caso alumínio (Al₂O₃), onde a camada de óxido formada naturalmente, o protege contra a corrosão. Ao contrário do óxido de alumínio, o óxido de titânio é muito estável em solução salina à temperatura ambiente (PARK, 1979). Além de proporcionar resistência à corrosão, pode contribuir para a performance biológica, como mostrado por Albrektsson & Albrektsson (1987) nos trabalhos de osseointegração com implantes dentários. Os filmes de TiO₂ são utilizados para implantes osseointegráveis, por serem considerados filmes bioativos, mas não para articulações, pois são menos duros e resistentes ao desgaste que os outros revestimentos. Os **filmes de nitreto de titânio (TiN)**, considerados bioinertes, também já foram estudados e utilizados clinicamente como revestimento de cabeça femoral (LIU, BI & MATTHEUS, 2001), mas a pesquisa teve pouco êxito, pois eram obtidos por processos convencionais a vácuo - “sputtering” reativo ou “electron beam” reativo -. Por se tratar de filme com interface definida, pode delaminar (se soltar) e, ao invés de aumentar o tempo de vida do implante, suas partículas, altamente duras, acabam provocando mais desgaste nas articulações. Além disso, possui maior coeficiente de atrito se comparado ao DLC (TIAINEM, 2001).

O **filme de carbono tipo diamante (DLC - Cap. 2.4)**, considerado um filme bioinerte, apresenta-se como um dos mais promissores para implantes articulados (GRILL, 2003). Possui diversas propriedades de interesse tecnológico, tais como: dureza elevada, baixo atrito², resistência ao desgaste, resistência à corrosão, e biocompatibilidade. O DLC pode ser depositado através de diversas técnicas, entre as quais, a IIP&D. Atualmente, válvulas cardíacas e *stents* revestidos com DLC - implantes em contato com o sangue - estão sendo comercializados para

² Dos revestimentos existentes na literatura, o seu coeficiente de atrito é o mais próximo de uma articulação natural (0.025-0.05).

prevenir a formação de trombos (pois o DLC é hemocompatível). O **revestimento de cabeça femoral com o DLC**, para reduzir o desgaste, continua em estudo, devido há inúmeras variáveis que ainda devem ser analisadas, apesar de alguns exemplares estarem à venda nos EUA, por exemplo, com DLC depositado por “sputtering” (obs: a deposição por “sputtering” gera interface definida). Além disso, o DLC também pode reduzir a liberação de íons metálicos dos implantes (como o níquel, principal causador de alergias, e presente no aço inoxidável e na liga de cromo-cobalto), podendo ser útil também para dispositivos de fixação de fratura.

1.1. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar filmes de carbono tipo diamante (DLC) obtidos pelo processo de imersão em plasma. Foram depositados filmes em lamínulas de vidro, substratos de silício e liga de titânio Ti-13Nb-13Zr. Como exemplos de revestimento de substratos tridimensionais, filmes de DLC foram depositados em articulações de implante de quadril e joelho, titânio poroso (esponja de célula-aberta expandida a vácuo e semelhante à estrutura do osso esponjoso), facas industriais, bisturi cirúrgico, engrenagem de motor, tubos de quartzo e de alumínio (interna e externamente), e outros objetos.

A caracterização da microestrutura, morfologia, dureza e adesão dos filmes de DLC foram feitos por espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (MFA), nanoindentação e ensaio de puxamento (*pull-test*). A resistência à corrosão do filme foi estudada por teste de polarização de Tafel e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) em ambiente de fluido corporal simulado (solução de Hanks). A biocompatibilidade *in vitro* (cultura de células fibroblásticas) foi estudada por ensaio de citotoxicidade, adesão e morfologia celular (estudo citoquímico, microscopia de contraste de fase, MEV e MFA). No ensaio de biocompatibilidade *in vivo*, o DLC revestindo Ti-13Nb-13Zr foi investigado em um modelo animal utilizando o tecido muscular e ósseo de ratos. A interface formada entre o DLC e o tecido ósseo e muscular foi investigada por histologia convencional, e, os implantes retirados, por MEV. A interface entre o implante e o tecido ósseo não descalcificado foi estudada por MEV-retroespalhamento.

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2.1. Aplicações ortopédicas de biomateriais

Há várias razões para se utilizar biomateriais¹ no corpo humano, e todos os tecidos do corpo podem ser envolvidos, como tecidos duros de articulação/osso, e tecidos moles como componentes do olho ou do sistema cardiovascular (NICHOLSON, 1998). Assim, o uso de biomateriais é muito abrangente e inclui aplicações ortopédicas, cardiovasculares, odontológicas, neurológicas, etc (RATNER et al, 1996).

O uso dos biomateriais como implantes ortopédicos excede em volume e quantidade qualquer outra aplicação (PIEHLER, 2000). Usados como dispositivos para fixação de fraturas, que podem ou não ser removidos, após a recuperação do local fraturado (ex.: placas de compressão para osteossíntese, parafusos, fios e hastes - ver Fig. 2.1), ou como implantes permanentes para substituição de articulação (ex.: articulação de quadril - Fig. 2.2 a 2.3, e joelho - Fig. 2.4, cotovelo e ombro (BLACK, 1988; KATZ, 1996)).

¹ **Biomaterial** é qualquer material usado para substituir ou restaurar partes do corpo humano que perderam suas funções e está continuamente ou de forma transitória em contato com fluidos do corpo (PARK, 1987). Existem diversas definições, e a definição de consenso obtida na Conferência de Biomateriais para Aplicações Clínicas de 1982 define como: substância (ou combinação de substâncias, com exceção de droga) natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente, pelos diversos tecidos que constituem o organismo humano (WILLIAMS, 1987).

O implante artroplástico de quadril tem sido o sistema mais estudado na pesquisa de substituição protética de articulação. Existem vários modelos desenvolvidos, como os de Moore, Thompson, McKee-Farrar, Müller e outros. No entanto, o implante de quadril introduzido por volta de 1960, pelo cirurgião ortopedista inglês John Charnley, foi uma das grandes evoluções. Grande parte dos implantes deriva desse modelo, que consiste de duas partes: cabeça e haste femoral de aço inox numa única peça, suportada por poli(metacrilato de metila) (PMMA), e taça acetabular feito de polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM), também sustentado com PMMA (KATZ, 1996). Inicialmente John Charnley tentou utilizar o politetrafluoretileno como material da taça/componente acetabular, devido ao seu baixo atrito (por volta de 0.05), mas o seu desgaste é muito rápido e suas partículas de desgaste causam fortes reações no organismo. Assim, substituiu o politetrafluoretileno por PEUAPM, obtendo grande sucesso (AGRAWAL, 1998).

Atualmente os modelos consistem em geral de quatro partes² (Fig 2.2 e 2.3): acetábulo metálico, componente acetabular de PEUAPM ou de cerâmica, cabeça femoral metálica³ ou cerâmica⁴, e haste femoral metálica. O acetábulo metálico e o componente/inserto acetabular de PEUAPM são encaixados, e a cabeça femoral (encaixada na haste) desliza dentro do inserto acetabular. A haste e o acetábulo metálico podem ser cimentados (PMMA como elemento de sustentação do implante) ou não cimentados através da utilização de revestimentos porosos⁵.

² A separação da cabeça femoral da haste é interessante porque, em cirurgias primárias se obtém um braço de momento adequado do aparelho abdutor do quadril e uma tensão adequada de partes moles e, portanto da estabilidade da articulação protética. Também, numa cirurgia de revisão, muitas vezes não há necessidade de trocar a haste, apenas a cabeça femoral. O mesmo ocorrendo na parte superior, onde se mantém o acetábulo metálico e troca-se apenas o inserto acetabular de polietileno.

³ Liga de cromo-cobalto, aço inox, ou Ti-6Al-4V.

⁴ Alumina, zircônia ou compósito alumina-zircônia.

⁵ A tentativa de eliminar o uso do cimento (PMMA) como método de sustentação dos implantes levou à concepção e à idéia dos implantes sem cimento, através da utilização de **revestimentos porosos**, que tem se tornado muito popular. Os revestimentos porosos podem ter várias formas e diferentes tecnologias de fabricação e fornecem locais para que o tecido ósseo cresça diretamente para dentro da superfície do implante (poros), promovendo uma fixação biológica (BLACK, 1988; HENSSGE et al, 1990). Os **revestimentos porosos de hidroxapatita** e os **revestimentos porosos metálicos** de titânio ou cromo-cobalto são utilizados em locais de contato com o osso (como acetábulo e haste femoral) (ELSBURG & MOORE, 1996). Existem alguns problemas inerentes ao uso de revestimentos porosos metálicos, como possível diminuição da resistência mecânica e aumento da toxicidade devido à grande área superficial da interface. Porém, depois da implantação de um implante com revestimento poroso de Co-Cr-Mo, não foi detectado aumento significativo de íons de Co ou Cr excretados pela urina (HENSSGE et al, 1990).

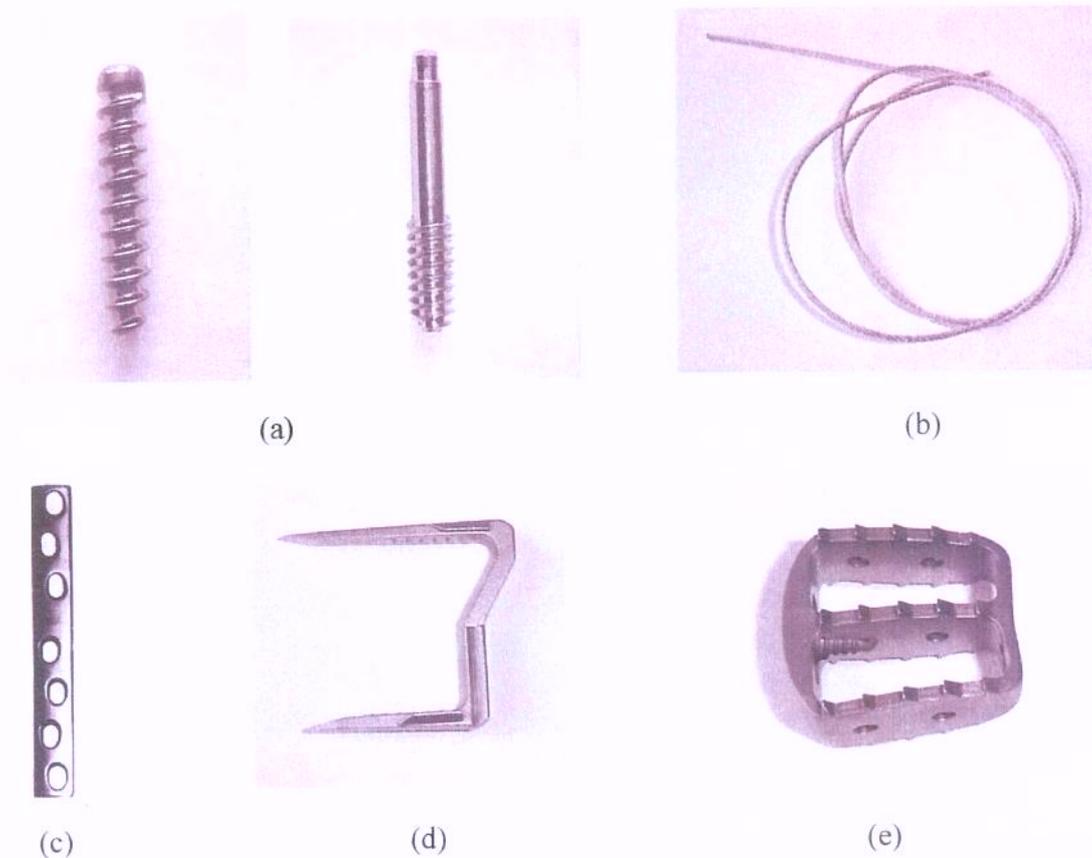


Figura 2.1. Exemplos de dispositivos de fixação de fraturas: (a) parafusos; (b) fio; (c) placa de compressão; (d) grampo; e (e) cage retangular para coluna.

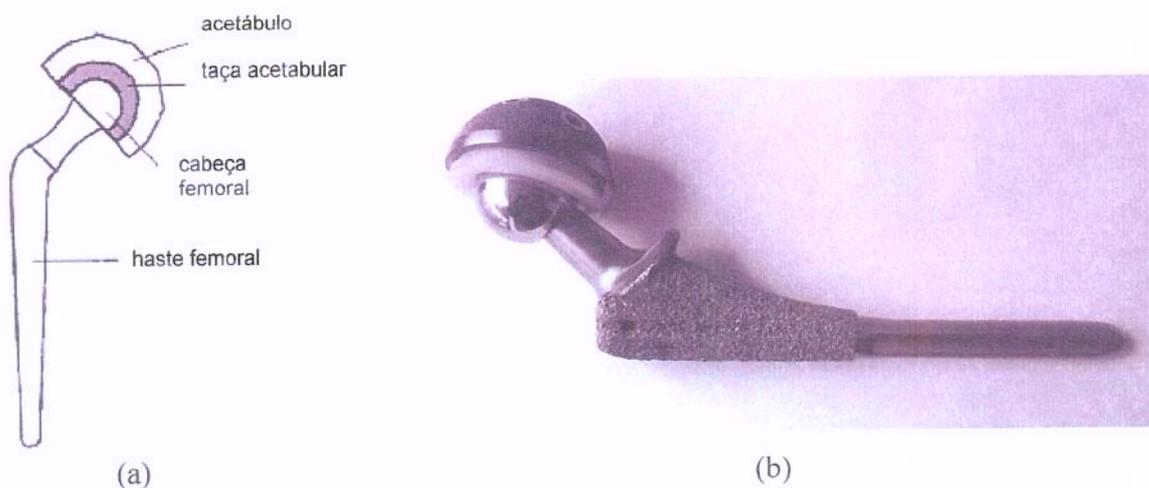
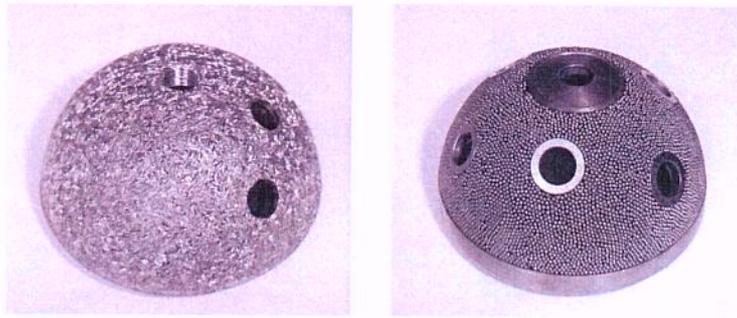


Figura 2.2. Exemplo de implante de quadril: (a) desenho esquemático; e (b) implante de quadril de liga de titânio, com revestimento poroso de “plasma spray” a vácuo de titânio na haste e microesferas de titânio no acetábulo.



(a)

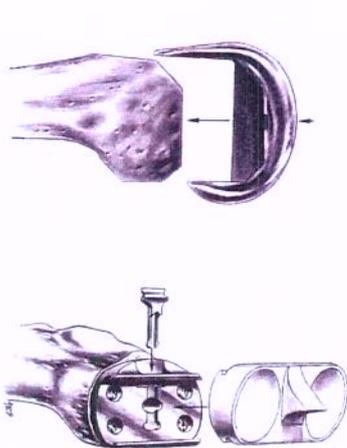


(b)



(c)

Figura 2.3. Exemplos de: (a) acetábulo de malha de titânio (esquerda) e de microesferas (direita); (b) taça acetabular de PEUAPM; e (c) cabeça femoral metálica e haste femoral não cimentada.



(a)



(b)

Fig. 2.4. Exemplos de implantes de joelho: (a) desenhos esquemáticos de sua colocação (Zimmer[®]); e (b) implantes de joelho de Co-Cr-Mo – componente femoral.

Devido ao sucesso do implante total de quadril, configurações com desenho geométrico apropriado e materiais similares têm sido usados para o joelho (Fig. 2.4), e para as outras articulações (KATZ, 1996). O procedimento para a substituição de um joelho é extremamente sensível a desvios do alinhamento dos implantes, mas o sucesso do implante de joelho é semelhante ao de quadril (KAO et al, 1996).

Os principais motivos para uma cirurgia de substituição total de quadril são: fraturas articulares, artrite e artrose. Eventualmente, a fratura do colo femoral associada à osteoporose também pode levar à uma artroplastia. Estima-se que no mundo se façam 400.000 operações de substituição total de quadril por ano, e existam cerca de 25 milhões de pessoas que já passaram por isso, mas números precisos são muito difíceis, pois não há um registro oficial para implantes (TIAINEM, 2001). Implantes protéticos de quadril em 1994 considerando-se hemiartroplastia, primária e revisão foram 258.300 procedimentos para o quadril, 230.342 considerando-se artroplastia primária e revisão (cirurgias primárias em 1994 foram 211.872 de joelhos e 137.415 de quadril). Dados publicados pela Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos mostram que 138.000 artroplastias primárias de quadril e 245.000 artroplastias primárias de joelho foram feitos nos EUA em 1996. Para 2030, nos EUA, esses números estão estimados em 248.000 e 454.000, respectivamente (PRAEMER, FURNER & PRICE, 1999). No Brasil, cerca de 14 mil cirurgias para colocação de implantes de quadril e joelho (cirurgias primárias) são feitas por ano pelo Sistema Único de Saúde (ERENO, 2005).

O implante de quadril tem uma vida curta: 85% de sobrevivência em 20 anos, e implantes tipo Charnley com até 40 anos. Atualmente, em 12 anos, 98% de sobrevivência. As principais causas de falhas entre 5 a 15 anos é a falha técnica.

Os materiais usados na confecção de implantes (Cap. 2.2) podem liberar íons metálicos e partículas de desgaste nos tecidos adjacentes (por exemplo, *debris* do cimento ósseo, do polietileno e das ligas metálicas). Ainda não se sabe ao certo a composição e a estrutura das partículas liberadas do implante, mas duas causas são bem aceitas: a corrosão e o desgaste. O efeito à longo prazo dos *debris* não é conhecido totalmente, mas pode gerar complicações como a hipersensibilidade alérgica, a toxicidade, a formação de pseudotumores em partes moles e osteólise - reabsorção óssea - (SCHWARTSMANN et al, 1995). A perda da fixação do implante,

que pode ser causada pela osteólise, é considerada a causa mais importante na falha dos implantes osteoarticulares (DOWLING et al, 1997; TIAINEM, 2001). A reação do tecido depende do tipo de material, da sua concentração, e das características das partículas - tamanho, topografia, química da superfície, etc -. Algumas partículas são mais benignas do que outras. Por exemplo, na mesma concentração e tamanho (4-5 μm), partículas de liga de cromo-cobalto parecem causar mais necrose tecidual se comparado com partículas de PMMA, PEUAPM e Ti-6Al-4V (GOODMAN et al, 1998).

Outra razão para a perda de interface do implante é a distribuição desigual da carga na interface (problema que pode estar relacionado à diferença do módulo de elasticidade entre o osso e o implante). Foi postulado por Julius Wolff, em 1892, que a remodelação ocorre pela alteração do padrão de transmissão de carga, e a perda de densidade mineral óssea ocorre pelo menor carregamento, dependendo da diferença de módulo de elasticidade e do design protético (AGRAWAL, 1998). É por isso que se buscam novas ligas que se aproximem mais do módulo de elasticidade do osso, como as novas ligas de titânio desenvolvidas para fins biomédicos. Outras razões para cirurgias de revisão são: infecções, luxações, fratura do osso e posicionamento ruim do implante (TIAINEM, 2001).

O revestimento de implantes metálicos com filmes protetores, com o intuito de reduzir a corrosão e o desgaste, pode prevenir ou diminuir os problemas descritos anteriormente, e estender o tempo de vida dos implantes. Os filmes de carbono tipo diamante (DLC - “diamond-like carbon”) aparecem como um material ideal para tais propósitos. Ele se destaca dos outros por seu coeficiente de atrito próximo ao da articulação natural, e pela sua maior resistência ao desgaste e à corrosão, e o seu uso como revestimento protetor tem sido sugerido desde a década de 90 (GRILL, 2003). Suas propriedades e aplicações são descritas no Cap. 2.4.

2.2. Materiais utilizados em implantes ortopédicos

Os materiais de implante precisam atender a requisitos como **biocompatibilidade**⁶ e **biofuncionalidade**⁷ (DUCHEYNE, HASTINGS & CHEM, 1984; RATNER, 1996), e podem ser classificados de acordo com o seu desempenho fisiológico:

- **Materiais biotoleráveis:** são tolerados pelo organismo e são separados do tecido ósseo através de uma camada de tecido fibroso. A espessura e a composição dessa camada dependem do tipo de material empregado. Exemplos: aço inoxidável ASTM F138, ligas de cromo-cobalto, e a maioria dos polímeros, como PMMA e PEUAPM.
- **Materiais bioinertes:** são tolerados pelo organismo, com espessura mínima do tecido envoltório fibroso, mas sem nenhum tipo de resposta imunológica. Sob determinadas condições, pode ocorrer a formação de contato direto com o tecido ósseo adjacente. Exemplos: alumina, zircônia, titânio e suas ligas, carbono, nitreto e carboneto de titânio.
- **Materiais bioativos:** formam ligações químicas com o tecido ósseo (**osteointegração**). O colágeno e a fase mineral do osso adjacente são depositados pelo organismo diretamente sobre a superfície do material de implante, dando origem a uma ligação resistente entre o material bioativo e o osso. Ex: hidroxiapatita (HA), biovidro, vitrocerâmicas, etc. Alguns trabalhos consideram o titânio bioativo devido à camada de óxido (TiO₂) que se forma na sua superfície (ALBREKTSSON & ALBREKTSSON, 1987).
- **Materiais bioreabsorvíveis:** são materiais que, além de apresentarem degradação, são absorvidos *in vivo*, isto é, são eliminados naturalmente pelo organismo por uma simples filtração de produtos de degradação ou após a sua metabolização. Bioreabsorção é, assim, um conceito que reflete total eliminação do material estranho inicial e de produtos de degradação (componentes de baixo peso molecular) sem nenhum efeito residual. Exemplos: β-tricálcio fosfato, poli(ácido láctico) ou PLLA, poli(ácido glicólico) ou PGA.

⁶ A biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material ter um desempenho satisfatório quando em contato com o meio fisiológico, com resposta adequada do tecido hospedeiro, numa dada aplicação.

⁷ O material não deve causar efeitos nocivos ao sistema biológico, e a sua degradação deve ser minimizada. O material também não deve ser tóxico ou carcinogênico e deverá possuir propriedades físicas e mecânicas adequadas à aplicação.

2.2.1. Metais e ligas

Atualmente, os **metais e ligas** mais utilizados em implantes ortopédicos são: aços inoxidáveis ASTM F138, ligas de cromo-cobalto (Co-Cr-Mo), titânio comercialmente puro (Ti cp), e ligas de titânio (principalmente Ti-6Al-4V) (AGRAWAL, 1998). Uma comparação do módulo de elasticidade das ligas biocompatíveis com o osso cortical pode ser vista na Fig. 2.5, e algumas propriedades mecânicas estão citadas na Tabela 2.1.

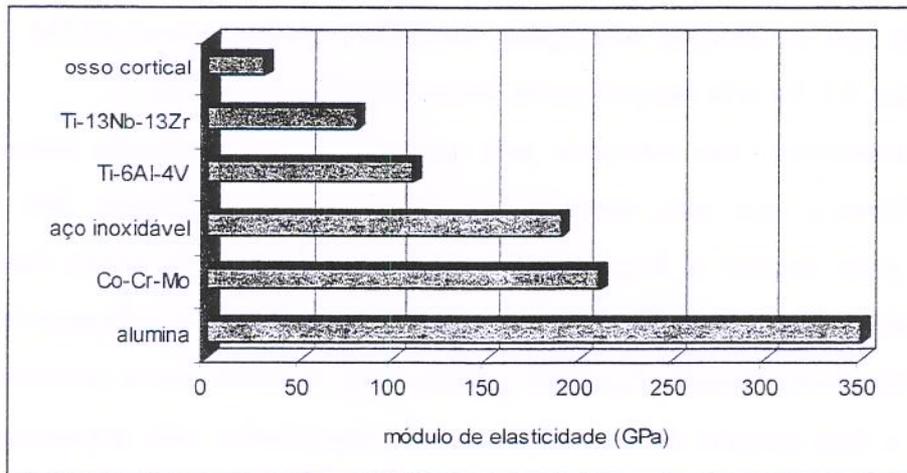


Fig. 2.5. Módulo de elasticidade da alumina, ligas biocompatíveis e osso cortical (em GPa).

Tabela 2.1. Propriedades mecânicas de tração de materiais de implante e tecido ósseo (Niinomi 1998; Brunski, 1996).

Propriedades	Módulo de elasticidade (GPa)	Limite de escoamento à tração (MPa)	Limite de resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)
Alumina	350	-----	1000-10000	0
Co-Cr-Mo	210	448-517	655-889	10
Aço inox 316L	190	331	586	55
Ti-6Al-4V	110-114	825-869	895-930	6-10
Ti-6Al-4V ELI	101-110	795-875	860-965	10-15
Ti-6Al-7Nb	114	880-950	900-1050	8.1-15
Ti-13Nb-13Zr	79-84	836-908	973-1037	10-16
Ti cp grau 4	104.1	485	550	15
Osso cortical (*)	15-30	30-70	70-150	0-8

(*) O osso esponjoso possui módulo de elasticidade de 3 GPa (HEIMKE, 1990).

a1) Aço inoxidável

Na prática, os **aços inoxidáveis** disponíveis para implantes são o AISI 316 e AISI F138 grau 1 e grau 2, com composições especificadas na Tabela 2.2, segundo a norma ASTM F138-86.

Tabela 2.2. Teor dos elementos químicos dos aços inoxidáveis conforme norma ASTM F138 (316L) grau 1 e grau 2.

Elemento	Composição (%) – ASTM F138	
	Grau 1	Grau 2
Carbono	0.08 máx.	0.03 máx.
Manganês	2.00 máx.	2.00 máx.
Fósforo	0.025 máx.	0.025 máx.
Enxofre	0.010 máx.	0.010 máx.
Silício	1.00 máx.	1.00 máx.
Cromo	17.00 – 19.00	17.00 – 19.00
Níquel	13.00 – 15.50	13.00- 15.50
Molibdênio	2.00 – 3.00	2.00 – 3.00
Nitrogênio	0.10 máx.	0.10 máx
Cobre	0.50 máx.	0.50 máx.

O aço inoxidável é muito usado como dispositivo de fixação de fratura. Comparado a outros metais usados na ortopedia, exibe um módulo de elasticidade de moderado a alto, e boa tenacidade à fratura. Possui boa ductilidade, permitindo que o cirurgião conforme as placas de acordo com a anatomia do osso, durante a cirurgia (AGRAWAL, 1998).

O aço inoxidável é também o material de implante de quadril mais antigo, mas vem sendo abandonado por ter alto coeficiente de atrito com o polietileno, o que leva a um desgaste mais rápido do componente acetabular de PEUAPM, se comparado com outros materiais disponíveis. Tem também menor resistência à corrosão do que ligas de cromo-cobalto e titânio. Outra desvantagem é que, a sua obtenção por microfusão (que reduziria em o seu custo de fabricação), não é adequado por reduzir a resistência à fadiga, ao contrário dos implantes de liga de cromo-cobalto e titânio, que mantêm as suas propriedades. É utilizado ainda devido ao seu custo, disponibilidade e facilidade de produção (PIEHLER, 2000; TIAINEM, 2001).

a2) Ligas de cromo-cobalto (Co-Cr)

As ligas de cromo-cobalto incluem F75, F799 e F562 (Tabela 2.3). As normas F75 e F799 descrevem requisitos para a liga Co-Cr-Mo, e são idênticas na composição, diferindo no seu processamento (o F799 é termomecanicamente processado). A norma F562 descreve o requisito para a liga Co-Cr-Ni-Mo, e tem menos Co e Cr, e mais níquel (BRUNSKI, 1996). A F75 (possui equivalente na ISO 5832-4) é a mais comum e possui várias marcas registradas: Vitallium (Howmedica Inc.), Haynes-Stellite 21 (Cabot Corp), Protasul-2 (Sulzer, Suíça) e Zimaloy (Zimmer, USA).

Tabela 2.3. Composição das ligas de cromo-cobalto conforme norma ASTM.

Liga	ASTM	Composição % (valores máx., a não ser que os limites sejam fornecidos)											
		C	Co	Cr	Fe	Mn	Mo	N	Ni	P	S	Si	Ti
Co-Cr-Mo	F75	0.35	bal	27-30	0.7 5	1.0	5-7	-	1.0	-	-	1.0	-
Co-Cr-Mo	F799	0.35	bal	26-30	1.5	1.0	5-7	0.2 5	1.0	-	-	1.0	-
Co-Cr-Ni-Mo	F562	0.02 5	bal	19-21	1.0	0.1 5	9-10.5	-	33-37	0.01 5	0.0 1	0.1 5	1.0

As ligas de cromo-cobalto têm sido utilizadas para dispositivos de fixação de fratura (desde 1920) e implantes permanentes (desde 1960). Comparadas ao aço inox, exibem maiores módulo de elasticidade, tenacidade, e dureza, mas relativamente baixa ductilidade e dificuldade em ser usinadas (AGRAWAL, 1998; HEIMKE, 1990). Este material tem substituído o aço inoxidável, em implantes de quadril cimentado, por ser mais resistente ao desgaste e à corrosão, portanto mais adequado para utilização em implantes osteoarticulares. O alto módulo de elasticidade das ligas de cromo-cobalto sugere a utilização do PMMA como elemento de sustentação do implante, porém implantes não cimentados também são utilizados (AGRAWAL, 1998).

Atualmente, o Co-Cr-Mo é o material mais utilizado em articulação de implante de quadril (cabeça femoral) e de joelho. As ligas de titânio possuem um desgaste mais acentuado que a liga de cromo-cobalto, e necessitam receber um tratamento de superfície para serem utilizadas. Além disso, os implantes de articulação de cromo-cobalto podem ser microfundidas em ambiente natural, ao contrário das ligas de titânio que necessitam ser microfundidas a vácuo (o que encarece o processo) ou usinadas (que gera grande perda de material). Uma das desvantagens é a

taxa de corrosão linear do Co-Cr-Mo, que é de 0.05 mm/ano, e pacientes com esse tipo de implante tem 3-8 vezes mais concentração de metais no sangue, apesar dessa relação ainda não ter sido estudada em detalhes (HENSSEGE et al, 1990). Além disso, a liberação de íons metálicos pode provocar alergias em algumas pessoas. O revestimento de carbono tipo diamante (Cap 2.4) pode atuar como uma barreira protetora, evitando a liberação de íons metálicos e diminuindo a corrosão.

a3) Titânio e suas ligas

O titânio comercialmente puro (Ti cp ASTM F67) e suas ligas (principalmente **Ti-6Al-4V** F1108 e liga **Ti-6Al-4V ELI** ASTM F136 - Tab. 2.4), desenvolvidos inicialmente como materiais estruturais para a indústria aeroespacial, passou a ser usada também como biomaterial na década de 50 (BRUNSKI, 1996). Esses materiais possuem várias das propriedades exigidas para um implante, como: excelente resistência à corrosão, módulo de elasticidade mais próximo ao do osso cortical (Fig. 2.5 e Tabela 2.1) e, em muitos casos, aderência do tecido ósseo à superfície do implante (sem a formação de uma camada fibrosa espessa entre o tecido e o implante).

Tabela 2.4. Composição do titânio puro grau 2 e ligas de titânio F1108 e F 136.

Designação	ASTM	Limite de impureza, % em peso (valor máximo)					Composição nominal, % em peso	
		N	C	H	Fe	O	Al	V
Ti cp grau 2	F 67	0.03	0.10	0.015	0.30	0.25	-	-
Ti-6Al-4V	F 1108	0.05	0.10	0.0125	0.30	0.20	6.0	4.0
Ti-6Al-4V ELI	F 136	0.05	0.08	0.0125	0.25	0.13	6.0	4.0

As ligas de titânio podem ser classificadas em: α , “near”- α , $\alpha + \beta$, “near”- β e β , dependendo da sua composição e processamentos térmico e mecânico. O titânio puro é do tipo α , sendo relativamente fraco, é usado somente como revestimento poroso em implantes osteoarticulares. A presença das fases $\alpha + \beta$ a temperatura ambiente, em algumas ligas de titânio (ex: Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb), conferem-lhes propriedades mecânicas superiores em relação ao Ti cp.

A liga Ti-6Al-4V é muito usada em dispositivos de fixação de fraturas, principalmente para pessoas que tem alergia a outros metais. Além disso, possui melhor imagem através de tomografia computadorizada e ressonância magnética, do que os demais materiais metálicos (LONG & RACK, 1998). Em implante de quadril, a liga Ti-6Al-4V é utilizada como acetábulo e haste femoral. O seu uso recebeu especial atenção devido à sua grande resistência à fadiga, baixo módulo de elasticidade, grande resistência à corrosão e, principalmente, maior biocompatibilidade (LONG & RACK, 1998). Como haste não cimentada, obteve grande sucesso devido ao módulo de elasticidade próximo ao do osso. Tem também menor densidade e, portanto, é mais leve se comparado ao aço inox ou à liga de cromo-cobalto. A liga Ti-6Al-4V é relativamente mais cara que os outros metais citados e, para ser microfundida, devido à alta reatividade do titânio, tem que ser a vácuo (ao contrário das outras ligas citadas). Além disso, devido à baixa resistência ao desgaste, tem sido recomendado que não seja utilizada em superfície de deslizamento (cabeça femoral e joelho) (WANG, 1996). A liga de titânio apresenta grande suscetibilidade ao desgaste abrasivo pelas partículas de cimento acrílico e tende a originar mais desgaste e partículas metálicas formadoras de debris, em contato com o polietileno, se comparado aos implantes fabricados em aço inoxidável ou cromo-cobalto (SCHWARTSMANN et al, 1995). Além disso, os estudos indicam que as ligas de titânio podem não articular estavelmente, devido à ruptura da camada de óxido, acelerando o desgaste da superfície por abrasão dessas partículas (desgaste oxidativo).

Por volta de 1980, debris escuros com alto nível de titânio, vanádio e alumínio foram encontrados ao redor de tecidos sob condição de alto desgaste, como componentes femorais e de joelho. Embora nenhum efeito tóxico tenha sido associado a esses debris escuros, os possíveis danos relacionados ao vanádio (V) e alumínio (Al) tem sido investigados (LONG & RACK, 1998). Enquanto não há qualquer informação clínica suficiente que prove que a presença do alumínio e vanádio sejam prejudiciais, há trabalhos baseados no seu potencial tóxico, que pode inibir a formação de apatita e possível associação com desordens neurológicas.

Steinemann (1980) demonstrou a alta citotoxicidade do vanádio e uma resposta com tecido de encapsulamento para o alumínio. Alguns trabalhos estudam a relação entre o alumínio e a ocorrência de demência senil do tipo Alzheimer (OKAZAKI et al, 1996, 1998a). Devido às

dúvidas quanto aos elementos de liga do Ti-6Al-4V, novas composições com o titânio, voltadas para aplicações ortopédicas, foram desenvolvidas.

A primeira geração, do tipo $\alpha + \beta$, inclui Ti-6Al-7Nb (módulo de elasticidade de 114 GPa) e Ti-5Al-2.5Fe (módulo de 112 GPa), que possuem propriedades similares ao Ti-6Al-4V, e foram desenvolvidas em resposta ao potencial citotóxico e reações adversas, com os tecidos do corpo, relacionadas ao vanádio (NIINOMI, 1998).

Com a dúvida também quanto ao alumínio, uma segunda geração de ligas do tipo near- β e β , sem Al e V, foram desenvolvidas. Essas ligas possuem uma boa combinação de resistência mecânica, tenacidade à fratura, resistência à fadiga, além de terem melhor usinabilidade, menor módulo de elasticidade e maior resistência ao desgaste, comparadas às ligas do tipo $\alpha + \beta$. Para escolher os componentes dessas ligas de titânio, foram utilizados principalmente o nióbio (Nb), o zircônio (Zr), o tântalo (Ta) e o paládio (Pd), que exibiram excelente biocompatibilidade e pertencem ao grupo cuja reação do tecido é classificado como conjuntivo frouxo vascularizado, como também apresentado no estudo de Steinemann (1980).

Essa segunda geração, com maior biocompatibilidade e menor módulo de elasticidade inclui Ti-12Mo-6Zr-2Fe “TMZF” (módulo de 74-85 GPa), Ti-15Zr-4Nb-4Ta-0.2Pd (módulo de 94-99 GPa), Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0.2Pd (módulo de 89-103 GPa), assim como a “completamente biocompatível” **Ti-13Nb-13Zr** (módulo de 79-84 GPa). E finalmente, o menor módulo de elasticidade tem sido obtido por ligas “TNZT” baseados no sistema Ti-Nb-Zr-Ta, especificamente pelo desenvolvimento da liga biocompatível Ti-35.3Nb-7.1Zr-5.1Ta, com módulo de elasticidade de 55 GPa (NIINOMI, 1998; NIINOMI et al, 1999; WANG, 1996; OKAZAKI et al, 1996).

O desenvolvimento da liga **Ti-13Nb-13Zr** (ASTM F 1713-96) tem respondido à questão da biocompatibilidade com o uso de elementos biocompatíveis, isto é Zr e Nb, e foi desenvolvida por pesquisadores da Smith e Nephew Richards Inc, USA, e colocada no mercado em 1992 (WANG, 1996). A liga Ti-13Nb-13Zr é do tipo “near”- β , com módulo de elasticidade 79-84 GPa (portanto mais próximo do osso do que a liga Ti-6Al-4V, que possui valores de 101-110 GPa), e resistência à corrosão superior à das ligas Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb (KHAN, WILLIAMS & WILLIAMS, 1999; YU & SCULLY, 1997). Na condição envelhecida, apresenta maior limite de

resistência à tração, menor módulo de elasticidade e maior tenacidade do que a liga Ti-6Al-4V recozida (WANG, 1996).

A liga Ti-13Nb-13Zr possui alta adesão de osteoblasto e menor adesão de bactérias do que Ti cp e Ti-6Al-4V, e está sendo considerada para ser usada em vários dispositivos ortopédicos (OKAZAKI et al, 1998b). Seligson et al (1997) compararam placas e parafusos de aço e de Ti-13Nb-13Zr (endurecida por difusão de oxigênio) através de implantação em animais (*in vivo*) e concluiu que a liga Ti-13Nb-13Zr é uma alternativa atraente para materiais de osteossíntese. Há sugestões de se depositar filmes de carbono tipo diamante sobre a liga Ti-13Nb-13Zr, mas não foram encontrados estudos publicados na literatura (apenas para outros materiais de uso comercial, como aço inox, liga de cromo-cobalto, e Ti-6Al-4V).

2.2.2. Polímeros

Serão comentados apenas os dois principais tipos de polímeros que são utilizados em implantes osteoarticulares (KATZ, 1996): o polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) e o polimetacrilato de metila (PMMA).

O material mais comum do componente/taça acetabular é o **PEUAPM** (Fig. 2.6), mas o polietileno pode ser encontrado comercialmente em mais dois graus diferentes: baixa e alta densidade, mas não são adequados para uso em articulações. Apesar do PEUAPM ser muito usado, o seu desgaste linear (0.10-0.20 mm/ano e possível aumento após 10 anos de uso) pode provocar dano ou quebra do implante e várias reações teciduais. Baseado na análise histológica, essas partículas de desgaste são consideradas a principal razão de indução de perda/reabsorção óssea. Além disso, o desgaste do polietileno pode ser bastante alterado dependendo da oxidação, lubrificação, cristalinidade e rugosidade da superfície do material que faz conjunto com o componente acetabular (TIAINEM, 2001).

Três exemplos de desgaste de polietileno que articula com joelho artificial podem ser vistos na Fig 2.7. Foram retiradas em cirurgias de revisão após 14, 6 e 9.5 anos de uso e foram fabricadas pela Howmedica, Pourbaix e Depuy, respectivamente. Nota-se o grande estrago

provocado no polietileno, apesar de não ter sido informado a razão da cirurgia de revisão. O PEUAPM, apesar dos problemas relatados, ainda é o material mais usado. Uma taça de PEUAPM atua como um amortecedor.

O **polimetacrilato de metila (PMMA)** é usado como elemento de sustentação do implante, ficando na interface entre o implante e o tecido ósseo. Atualmente a maior parte dos implantes de quadril continua sendo sustentada com PMMA. Sua elasticidade pode distribuir a carga entre o osso flexível e a haste rígida, e pode ser usado como portador de antibióticos ou produtos químicos. Porém, o cimento ósseo tem um comportamento frágil, embora na temperatura do organismo a fluência é um fenômeno importante, não dentro da massa do cimento, mas na interface cimento osso. A temperatura de transição do cimento também é muito próxima da temperatura corporal, e ainda é necessário considerar que o cimento ósseo apresenta tensões residuais muito próximas de seu limite de resistência ou seja, cerca de 1000 micrômetros/metro. Assim, tem-se um comportamento frágil do cimento com fratura do manto, principalmente em locais de espessura menor que 2 milímetros. As partículas de PMMA também podem entrar na interface das superfícies articuladas, acelerando o seu desgaste.

Devido à preocupação com os problemas associados ao PMMA, métodos alternativos de sustentação do implante estão sendo usados, como os revestimentos porosos, que permitem que o osso cresça para dentro dos poros. O PMMA é usado também como espaçador e centralizador para ajustar adequadamente o implante no local (Fig. 2.8a). Além disso, o PMMA é usado como um pré-revestimento (Fig. 2.8b), isto é, a haste femoral recebe um revestimento de PMMA no processo final de fabricação (pré-cirurgia), para que durante a cirurgia o PMMA polimerizado fixe melhor na haste (sem o aparecimento de vazios na interface, como é comum acontecer).

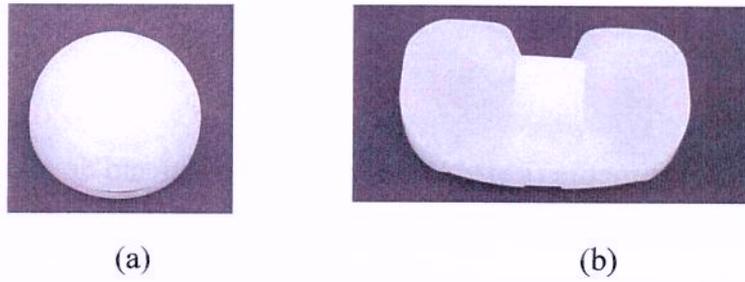


Figura 2.6. Exemplos de: (a) taça acetabular (implante de quadril); e (b) platô tibial (implante de joelho) de PEUAPM.

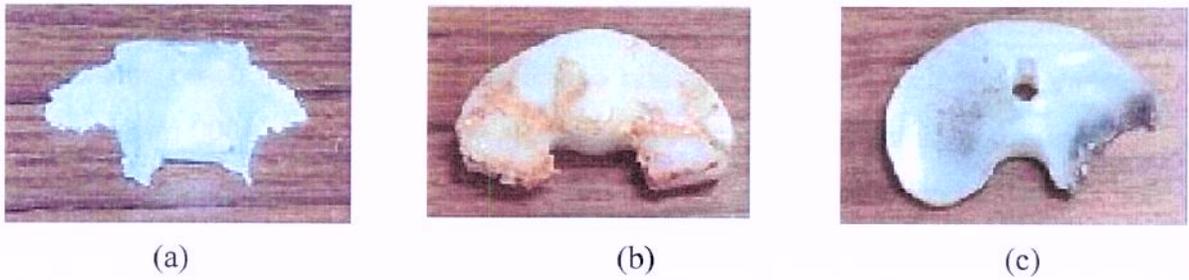


Fig. 2.7. Desgaste do platô tibial que faz par com joelho artificial de Co-Cr-Mo retirado por cirurgia de revisão após: (a) 14 anos (Howmedica); (b) 6 anos (Pourbaix); e (c) 9.5 anos (DePuy).



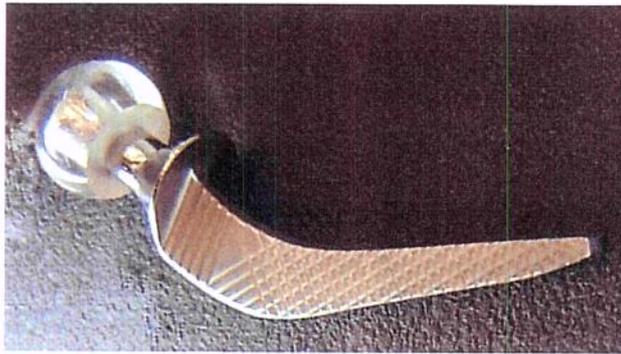
Figura 2.8. Exemplos de: (a) espaçador (esquerda) e centralizador distal (direita) de PMMA; e (b) haste femoral cimentada com pré-revestimento de PMMA.

2.2.3. Cerâmicas

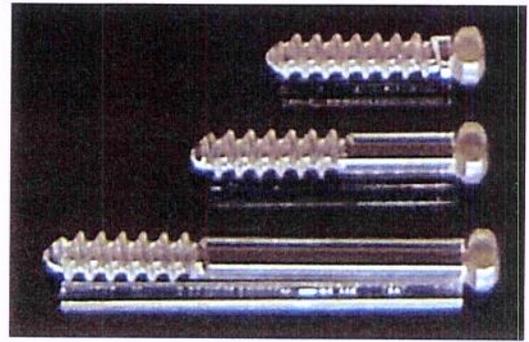
A **alumina** e a **zircônia** estão sendo usadas para diminuir o desgaste da superfície de deslizamento (em conjunto com PEUPAM ou conjunto cerâmica/cerâmica), mas o seu alto módulo de elasticidade e natureza frágil impedem o uso como material da haste (HEIMKE, 1990). Em 1972, Boutin informou que a alumina foi usada como superfície de deslizamento pela primeira vez em 1970. Em 1974, vários grupos de pesquisa estudaram o desempenho do par alumina-alumina em um implante de quadril. Estima-se que meio milhão de implantes de quadril com componentes de alumina foram colocados em 1992. No entanto, nos EUA, o componente cerâmico para implante de quadril não tem sido muito usado, com exceção da cabeça cerâmica contra PEUAPM, que tem sido aprovado para testes clínico (MILLER, TALTON & BHATIA, 1996). No Japão, há cerca de 20 anos atrás, foram utilizados cabeça femoral (Figura 2.9a) e parafusos ortopédicos (Figura 2.9b) de alumina monocristalina (menos resistentes), que foram substituídos primeiro por alumina policristalina e atualmente por zircônia policristalina, tanto para articulação de quadril (Figura 2.10), como para articulação de joelho (Figura 2.11)⁸.

Na cabeça femoral, a cerâmica pode apresentar menor atrito e desgaste contra o PEUAPM do que a liga de cromo-cobalto, e assim reduzir o desgaste do componente acetabular (LONG & RACK, 1998). Se o par for cerâmico o desgaste é ainda menor que o par polietileno/cerâmica (MILLER, TALTON & BHATIA, 1996). O coeficiente de atrito da alumina em lubrificação com água é de 0.05, e seu desgaste linear em um par cerâmico é menor do que 0.025 mm/ano, embora casos de avaria do implante tenham sido comunicados. Mas a fabricação dos implantes de cerâmica é mais cara e difícil, se comparado com as ligas metálicas. Experimentos de curta duração tem dado resultados promissores, mas experimentos de longa duração ainda estão sendo feitos.

⁸ Fonte: Catálogo Kyocera/Kobelco. A Kyocera and Kobe Steel joint company, Corporate Profile, Japan Medical Materials Corporation, Printed with Soy Ink, nov 2005.



(a)



(b)

Figura 2.9. Modelos antigos de: (a) cabeça femoral; e (b) parafusos de alumina monocristalina (transparente), da Kyocera[®].



Figura 2.10. Articulação de implante de quadril da Kyocera[®]: uma cabeça femoral de alumina (superior - mais escura) e duas de zircônia (inferiores - mais claras).

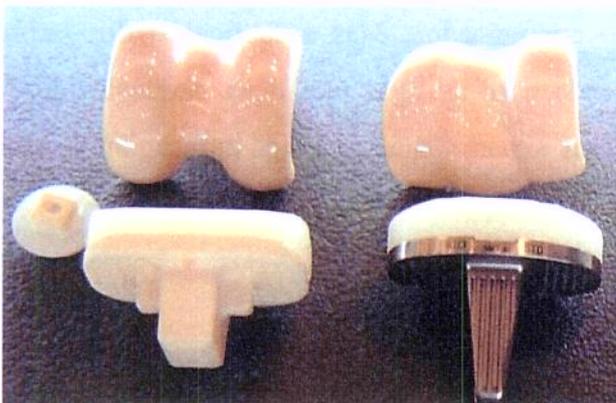


Figura 2.11. Articulação de joelho da Kyocera[®]: componente femoral de alumina (esquerda) e de zircônia (direita).

2.3. Técnicas de deposição a vácuo

A razão para a modificação da superfície de biomateriais é muito simples: manter as boas propriedades do material, modificando somente a camada superficial. As técnicas a vácuo fazem uso de plasma¹, laser, feixe de íons² (“ion beam”) e feixe de elétrons (“electron beam”) como meios para alteração da estrutura e composição da superfície.

Os filmes finos cerâmicos, depositados a vácuo, são muito usados como revestimentos protetores, podendo ter vários objetivos, como endurecimento superficial, resistência ao desgaste, resistência à corrosão, barreira de difusão e também para evitar que íons metálicos cheguem aos tecidos do corpo. O **filme de carbono tipo diamante** (DLC) apresenta-se como um dos mais promissores na área de biomateriais e, as suas propriedades e resultados da literatura, serão apresentados com mais detalhes no Cap. 2.4. O DLC pode ser depositado através de diversas técnicas (Cap. 2.3.1), sendo os mais comuns os processos baseados em “ion beam”, “sputtering” (pulverização catódica) e CVD (“chemical vapor deposition”) assistido por plasma. As principais fontes de carbono utilizadas são: grafite de alta pureza e hidrocarbonetos (como metano, acetileno, etano, propano, etileno e benzeno). Recentemente, a “Implantação Iônica por Imersão em Plasma e Deposição” ou IIP&D (Cap. 2.3.2) tem sido usada para depositar DLC em objetos tridimensionais, obtendo melhor adesão do que por outras técnicas, o que foi um dos motivos que levou a escolher a IIP&D para este trabalho.

¹ O **plasma** é conhecido como **quarto estado da matéria** ou **gás ionizado**. Pode ser gerado por diversos processos (RF, microondas, DC e DC pulsado); a escolha do processo de geração do plasma é determinado pelo que se pretende fazer. Como exemplos: Na deposição de filmes finos metálicos (por sputtering) e de algumas cerâmicas (TiN, TaN, etc) (por sputtering reativo), e também na deposição de polímeros (polimerização a plasma) partindo-se de hidrocarbonetos e organometálicos, o plasma é gerado através de uma descarga (*glow*) no gás precursor; descarga produzida por RF ou fonte DC. Já na deposição de filmes isolantes e semicondutores o gás é ionizado (o *glow* é produzido) por fontes de baixa (RF-KHz e MHz) ou alta (microondas-GHz) frequência (CHAPMAN, 1980, D'AGOSTINO, 1990).

² Os íons são positivamente carregados, isto é, são átomos ou moléculas que perderam um elétron, como por exemplo, um íon de argônio: Ar^+ . (SEQUEDA, 1989a).

2.3.1. Técnicas convencionais de deposição

Este capítulo é dedicado à apresentação das principais técnicas de deposição de filmes finos. Os métodos de deposição podem ser divididos em PVD (“physical vapor deposition”) e CVD (“chemical vapor deposition”).

No método **PVD**, o transporte dos vapores, a partir da fonte geradora, até o substrato é feito por **meios físicos**. Isto é possível porque o processo de deposição ocorre em vácuo. Sob condições de baixa pressão, o transporte de material, da fonte até o substrato, ocorre fisicamente através de feixes moleculares. Nessas técnicas, os depósitos são formados a partir de unidades atômicas ou moleculares, simplesmente pelo processo físico da condensação. Os métodos PVD cobrem técnicas de deposição que dependem de evaporação ou ejeção de materiais através de uma fonte e incluem evaporação e “sputtering” em vácuo (SEQUEDA, 1989b).

O método **CVD** compreende a exposição do substrato a um ou mais compostos, na forma de vapores ou gases que contém os componentes do material a depositar. Uma reação química toma então lugar perto ou na superfície do substrato, produzindo o material desejado, que se deposita formando o filme (MORAES, 1980). Os processos CVD podem ser classificados de acordo com o método em que a energia é introduzida, para que as reações sejam iniciadas. Têm-se as reações induzidas termicamente, que compreende a maioria dos processos e onde o calor é aplicado por resistência, por RF, por radiação infravermelho, etc, e o CVD assistido por plasma (SEQUEDA, 1989b).

2.3.1.1. Evaporação em vácuo

A **evaporação em vácuo** (Figura 2.12) é um método no qual o material é aquecido (através de uma fonte térmica) e se transforma em vapor que se condensa no substrato, formando o filme (MORAES, 1980). A **fonte térmica depende do material a ser evaporado** e pode ser uma resistência (filamento), feixe de elétrons (“electron beam”), feixe de laser (“laser beam”), canhão de moléculas, bobina de indução (radiofrequência – RF), arco, microondas, etc. A **evaporação por feixe de elétrons** é utilizada para materiais com alto ponto de fusão. A **evaporação por feixe de laser** (“laser beam”) oferece vantagens como contaminação mínima proveniente da fonte de

aquecimento e alta taxa de deposição para materiais com alto ponto de fusão. Mas é um processo utilizado basicamente para substratos pequenos e planos, e possui dificuldade em revestir formas complexas. Pode ser utilizado para depositar DLC, mas o carbono é difícil de vaporizar, por seu alto ponto de sublimação e alta condutividade térmica. Portanto, nesse caso geralmente utiliza-se pó de grafite ou pó de diamante como fonte de material (FUJIMORI, KASAI & INAMURA, 1982).

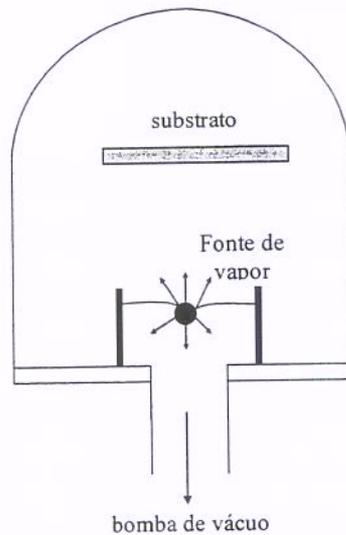


Fig. 2.12. Representação esquemática de evaporação em vácuo.

2.3.1.2. Deposição através de “sputtering” de material sólido

A **deposição através de pulverização ou “sputtering”** é um dos métodos mais versáteis para preparação de filmes finos. O processo de pulverização de material, conhecido como “sputtering”, ocorre como resultado da transferência de “momentum” entre os íons incidentes e os átomos do material bombardeado. Os átomos ejetados percorrem o espaço entre o alvo e o substrato e, ao se condensarem no substrato, formam um filme. Vários tipos de materiais podem ser pulverizados (“sputtered”), e os filmes depositados geralmente tem a mesma composição e estrutura da fonte original. A distinção entre evaporação por feixe de elétrons e “sputtering”, é que na evaporação por feixe de elétrons, a energia cinética dos elétrons é convertida em energia térmica, enquanto no “sputtering”, uma parte da energia cinética dos íons é transferida aos átomos

do alvo como energia cinética (SEQUEDA, 1989b). Portanto, os átomos ejetados do alvo ganham energia através da transferência de “momentum”, ao invés de calor.

O **processo de pulverização pode ser classificado em dois tipos**: pulverização catódica utilizando descarga luminescente (chamado simplesmente de “sputtering”), e pulverização por feixe de íons (também chamado de “direct ion beam” ou “ion beam sputtering”). Em ambos os processos, as partículas energéticas são direcionadas para a superfície do alvo e as partículas “ejetadas” da superfície são depositadas no substrato.

(a) “Sputtering” ou pulverização catódica

Na deposição por “sputtering” ou pulverização catódica, o filme é formado pela transferência de material proveniente de um eletrodo situado dentro de uma câmara de vácuo para um substrato. No “sputtering” DC (sistema diodo DC, Fig. 2.13) utiliza-se uma câmara de vácuo com dois eletrodos: catodo e porta-substrato (ou anodo), onde se aplica uma diferença de potencial contínua, de alguns milhares de volts. Se dentro da câmara existe um gás (em geral o argônio, por ser quimicamente inerte e de baixo custo), numa pressão na faixa entre 0.03-0.1 Torr, haverá a formação de um plasma (ou seja, o gás se torna ionizado, emitindo luz). Os íons positivos do gás são atraídos para o catodo (onde está o alvo), onde colidem com energias relativamente elevadas, arrancando átomos (MORAES, 1980).

O “sputtering” DC possui baixa taxa de deposição e o “sputtering” de RF é usado para materiais (alvos) semicondutores e isolantes. O “sputtering” realizado por eletrodos do tipo “magnetron” (processo de “magnetron sputtering”) utiliza campos magnéticos gerados por ímãs permanentes ou eletroímãs, que atuam como armadilha de elétrons. Eles são colocados nas proximidades do alvo, de tal forma que, produzindo linhas de campo magnético, formam um caminho fechado na frente do alvo (catodo). O campo magnético exerce uma força sobre os elétrons secundários emitidos do catodo, fazendo com que percorram a trajetória das linhas de campo magnético. Devido à formação dessas armadilhas de elétrons, a região é confinada próximo à superfície do catodo, aumentando conseqüentemente a eficiência do processo. Para deposição de DLC não hydrogenado por “sputtering”, utiliza-se um alvo de grafite, e para HDLC acrescenta-se o gás hidrogênio ou hidrocarboneto ao processo.

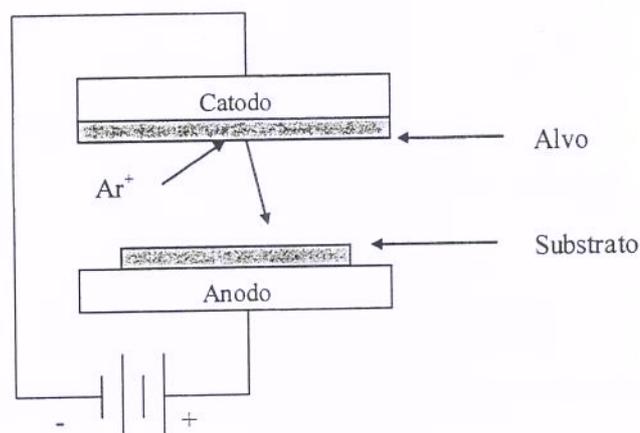


Fig. 2.13. Representação esquemática de deposição por “sputtering” DC.

(b) “Ion beam sputtering” ou pulverização através de feixe de íons

O processo de pulverização por feixe de íons (ou em inglês, “ion beam sputtering”) difere do sistema anterior (“sputtering”) porque a descarga é separada do alvo. Os íons são acelerados da fonte de íons e viajam até o alvo como um feixe (“beam”) através de uma região de baixa pressão, para minimizar a colisão de íons com os átomos do gás (Fig 2.14). Os átomos arrancados do alvo viajam até o substrato e não passam através de um plasma (SEQUEDA, 1989a).

Para qualquer fonte de íons, o feixe de íons deve chegar ao alvo sem significante perda de energia, e a distribuição de energia dos íons depende do tipo de fonte. O alvo é pulverizado pelos átomos e íons energéticos, e uma grande quantidade de partículas é ejetada, mas estes não são acelerados para o substrato através do alvo, porque o alvo tem potencial zero. Assim, íons carregados positivamente podem chegar até o substrato através do alvo, enquanto no sistema de descarga por “sputtering”, eles não são capazes de escapar devido ao potencial negativo do alvo.

Neste método, a deposição de DLC é feita com um alvo de grafite, que é pulverizado por feixe de íons de argônio com alta energia (~0.5 a 1 keV), e os átomos de carbono ejetados bombardeiam o substrato, crescendo um filme (FUJIMORI, KASAI & INAMURA, 1982). Quando comparado ao processo de CVD assistido por plasma, a deposição por “ion beam” requer um sistema mais caro e complicado, com baixa taxa de deposição, mas a técnica não é sensível à composição do substrato e produz filmes de alta qualidade (JETHANANDANI, 1997).

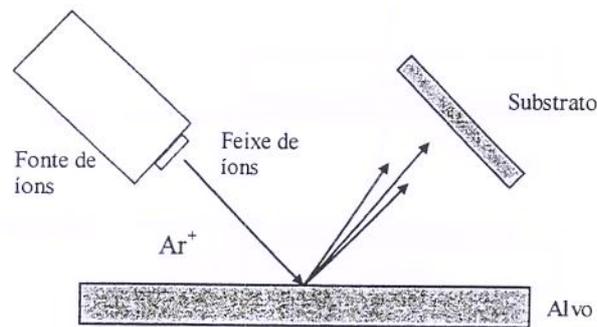


Fig. 2.14. Representação esquemática de uma deposição por “ion beam sputtering”.

(c) MSIBD ou deposição através de feixe de íons com seleção de massa

A técnica MSIBD (“mass selected ion beam deposition”) é um caso especial de deposição por “ion beam” que geralmente usa uma fonte de íons em forma de gás (CO, CO₂, hidrocarboneto, ou outros) para a deposição de carbono, e oferece um bom controle de todos os parâmetros de deposição (CATHERINE, 1991). Nesta técnica os íons são acelerados por uma alta voltagem, 20-30 keV, transformando-se em um intenso canhão, que passa por um filtro magnético, onde a massa é selecionada, eliminando contaminação por micro-partículas, e é então desacelerada, tocando no substrato com energia controlada, de 5 eV a 20 keV (LIFSHITZ, 1999). Esta técnica é muito utilizada para obter filmes de alta qualidade em substratos planos e de pequenas dimensões. No entanto, possui dificuldade em revestir objetos de formas complexas.

2.3.1.3. CVD com filamento-quente

Um exemplo de CVD com reação induzida termicamente é o **CVD com filamento-quente** (Fig. 2.15). É um processo amplamente utilizado pela simplicidade do processo e baixo custo de instrumentação e operação. Há a injeção de uma mistura gasosa em um reator que se encontra a uma pressão menor do que a atmosférica, havendo um filamento suficientemente aquecido em seu interior, capaz de dissociar os gases em radicais livres. O substrato é mantido perto do filamento e pode ser aquecido independentemente dele. Esta técnica é muito utilizada para obter filmes de diamante policristalinos, com a mistura dos gases hidrogênio e hidrocarboneto (BACHMANN, 1994).

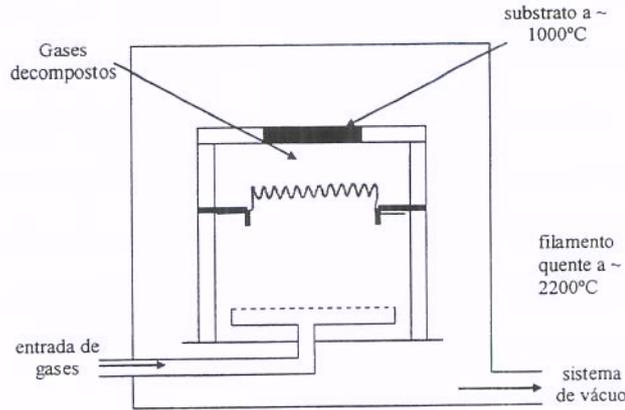


Fig. 2.15. Representação esquemática de uma deposição por CVD com filamento-quente.

2.3.1.4. CVD assistido por plasma

O CVD assistido por plasma pode utilizar uma fonte DC ou de RF para ativar os gases, produzindo uma descarga luminescente. Desde que a energia de ativação é produzida por um plasma e não por aquecimento, os filmes podem ser produzidos a menores temperaturas do que a técnicas de CVD convencionais (ativadas termicamente). O aquecimento é usado para controlar certas propriedades do filme, mas não para influenciar a taxa de deposição (SEQUEDA, 1989b).

No **CVD assistido por plasma DC**, os gases contidos na câmara são excitados por uma descarga contínua através de dois eletrodos paralelos, e a deposição do filme ocorre em um substrato localizado em um dos eletrodos (obs: o sistema é similar ao da Fig. 2.13, do “sputtering” diodo, mas com a grande diferença de que no CVD não há pulverização de alvo sólido, e a fonte de material para formar o filme vem de uma mistura de gases). No **CVD assistido por plasma de RF**, a fonte de radiofrequência é geralmente acoplada a um dos eletrodos enquanto o outro se encontra aterrado. Em muitos casos a deposição é uma técnica direcional, e o filme é depositado somente em uma superfície do substrato. O CVD assistido por plasma (com mistura dos gases hidrogênio e hidrocarboneto) é muito utilizado para depositar filmes de HDLC com conteúdo de 10-50% de hidrogênio (MICHLER et al, 1998). O CVD assistido por plasma é muito utilizado para formar filmes de diamante policristalinos (BACHMAN, 1994) e também usado para realizar uma polimerização a plasma (formação de polímeros de hidrocarboneto).

Na formação de filme de diamante por CVD, a partir da decomposição dos gases hidrogênio e hidrocarboneto, várias formas de carbono concorrem entre si. O hidrogênio atômico induz reações de conversão entre as diferentes configurações de ligações na superfície (Fig. 2.16). A qualidade do filme depositado é determinada pelo balanço dinâmico e pelo processo das reações (PEHRSSON, CELII, BUTLER, 1993). Uma das preocupações ao se depositar filmes de DLC também é essa, ou seja, os parâmetros têm que ser adequadamente ajustados para que o filme obtido seja realmente DLC, e não outras formas de carbono.

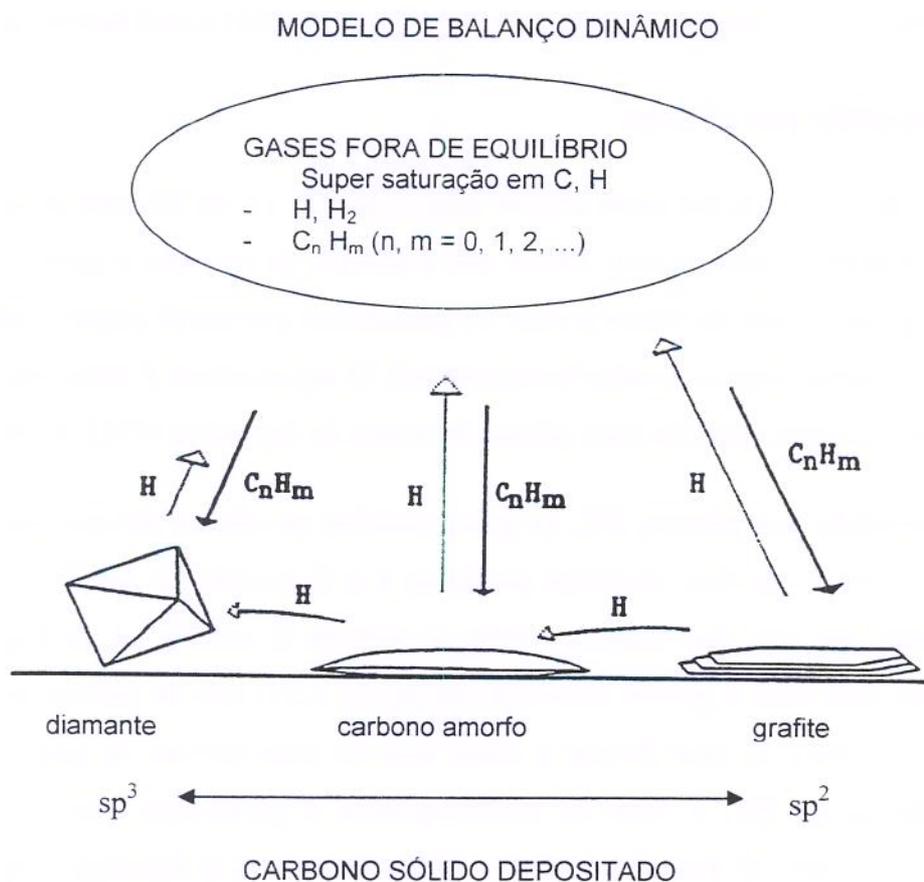


Figura 2.16. Modelo esquemático de deposição pelo processo CVD, onde várias formas de carbono sólido competem entre si, e ocorre conversão das diferentes configurações de ligações na superfície (PEHRSSON, CELII, BUTLER, 1993).

2.3.2. Implantação iônica por imersão em plasma e deposição (IIIP&D)

Na **implantação iônica**, os íons são implantados na peça sob vácuo. Átomos de nitrogênio, oxigênio ou carbono, penetram na superfície do substrato, aumentando a dureza superficial, interferindo assim no desgaste. Podem melhorar as propriedades superficiais de materiais ortopédicos, sem interferir nas características do substrato.

A **implantação utilizando feixe de íons** (método convencional), quando utilizada para implantar íons de nitrogênio, produz alta dureza da camada nitretada e baixo aquecimento do metal e conseqüentemente baixa deformação (RODRIGUEZ, 1996). A **principal limitação** é a característica direcional do processo (técnica de linha reta - Fig. 2.17a), possuindo dificuldade em revestir formas complexas. Assim, o feixe tem que esquadrihar cada ponto ou realizar uma manipulação da amostra, como rotação, mas a superfície oculta à incidência do bombardeio de íons não podem ser tratadas e o interior das cavidades onde o feixe entra tangenciando não se beneficiam da implantação. É, portanto, utilizado principalmente para substratos planos e de pequenas dimensões. O **implantador iônico** consiste de um sistema mantido em pressões de vácuo onde os íons são gerados, acelerados, analisados e dirigidos na direção do substrato a ser implantado. A projeção se realiza a baixa pressão e com aceleradores magnéticos. Os íons são produzidos a partir de materiais cuja composição contém as espécies atômicas desejadas para a implantação, e pode ser gasoso, líquido ou sólido. Nos dois últimos casos vaporiza-se o material antes de sua introdução na fonte de íons. O mecanismo de endurecimento e modificação das propriedades da superfície do metal ocorre pela ação de processos químicos e físicos. Pode também ser utilizado para formar um revestimento (ver MSIBD, p. 28).

Para contornar a restrição da implantação por feixe de íons, surgiram as técnicas de **“Implantação Iônica por Imersão em Plasma e Deposição”** (IIIP&D). A IIIP&D é uma técnica desenvolvida para modificação de superfícies tridimensionais que permite um tratamento uniforme de peças de formas complexas (Fig. 2.17b), sem necessidade de rotacioná-las (ANDERS, 2002). O termo IIIP&D é utilizado para representar a grande família de técnicas de imersão em plasma (incluindo as técnicas de formação de filmes), enquanto o termo IIIP é utilizado para tratamentos de superfície sem formação de filmes (ANDERS, 2002). Quando a

IIIP&D é utilizada para formar filmes, obtêm-se filmes com adesão superior às técnicas tradicionais, pois o novo processo não gera interface definida (há uma difusão para dentro do substrato) e o revestimento é feito com uniformidade, mesmo na parte interna de tubos ou estruturas porosas.

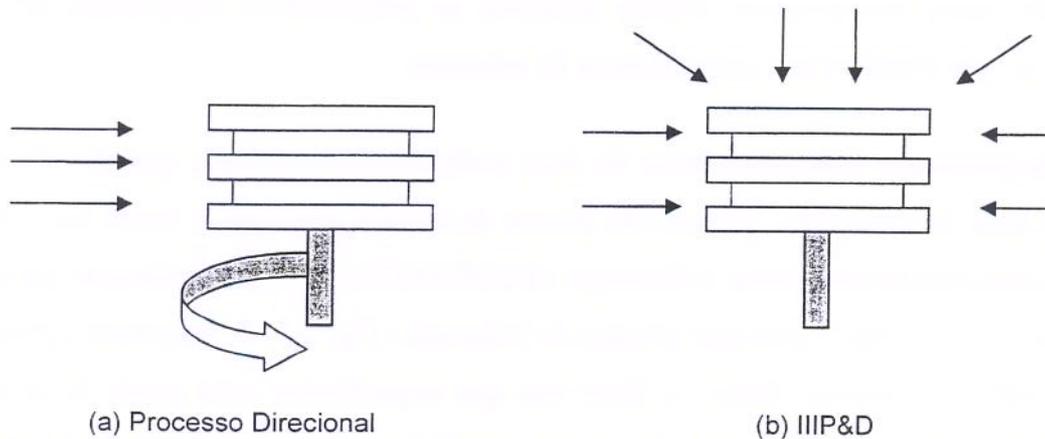


Figura 2.17. Implantação iônica: (a) convencional; e (b) por imersão em plasma (IIIP&D).

Desde que o desenvolvimento da implantação de íons por imersão em plasma começou em 1986 (publicado inicialmente por Conrad et al da Universidade de Wisconsin, USA) e um processo similar em 1988 (por Tendys et al, Austrália), o interesse nesta técnica versátil tem aumentado (CONRAD et al, 1988; WALTER et al, 1998). O número de sistemas de IIIP duplica a cada dois anos e existem aproximadamente 50 sistemas em operação. Entre 1986 e 1998, a maioria dos sistemas estava nos EUA (WALTER et al, 1998). No período de 1991 a 1994 alguns sistemas na Ásia (Japão, China, Índia, etc) foram introduzidos. Recentemente, alguns países europeus, especialmente Alemanha, têm aumentado os seus esforços em IIIP. O número de variações do tema original do IIIP, que estava limitado à implantação de íons, teve um grande crescimento, incluindo deposição de revestimento e engenharia de interface (ANDERS, 2002).

A IIIP possibilita o tratamento uniforme de grandes superfícies com formas irregulares, a baixo custo, e em tempo reduzido (minutos ou poucas horas), com aumento de temperatura restrito à superfície, com economia de tempo e energia (GOMES, 2000). De um modo geral, o que todas as técnicas de imersão em plasma tem em comum, é que a superfície do substrato (ou “alvo”) é exposta a, ou imersa, em um plasma, e que uma alta voltagem de polarização (“bias”) pulsada é aplicada ao substrato (ANDERS, 2002). Em um sistema típico, ao substrato imerso em

um plasma são aplicados pulsos de alta tensão da ordem de -5 a -100 kV, com cerca de 5 a 100 μ s de duração e taxas de repetição da ordem de 10 a 1000 Hz. A tensão negativa aplicada permite a extração de íons positivos do plasma. Durante a aplicação do pulso, a bainha de plasma se modifica, envolvendo o substrato (CONRAD et al, 1998; GOMES, 2000). Esta bainha modificada fornece os íons que são acelerados na direção normal à superfície do substrato, com energias que dependem das voltagens de polarização aplicadas. Estes íons são, então, implantados na superfície do substrato, produzindo modificações, dependendo da dose, nas suas propriedades superficiais (ANDERS, 2002).

A deposição de filmes por IIP&D, em comparação às técnicas convencionais, é caracterizada pelas propriedades superiores de adesão e estrutura densa, sem “pinholes”. Portanto, um método muito atrativo para tratamento de superfícies de implantes biomédicos. Na deposição de filmes de DLC por IIP&D (Fig. 2.18), o substrato a ser tratado é imerso em um plasma de hidrocarboneto (como metano, etano, propano, acetileno, etc), que reage com a camada superficial do material (MIYAGAWA et al, 2000; NISHIMURA et al, 2002). No caso de IIP de Metal (IIPMe³), o DLC é formado com carbono proveniente do grafite.

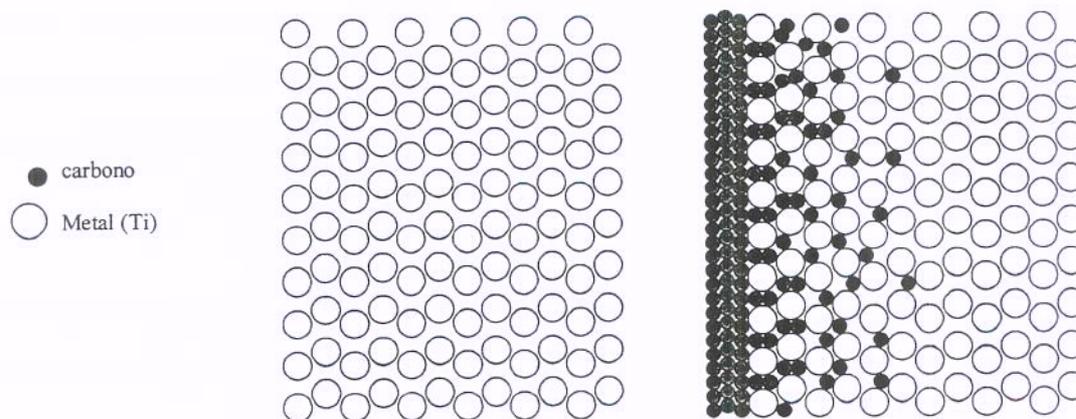


Fig. 2.18. Representação esquemática de deposição de DLC utilizando IIP&D.

³ IIPMe: o “plasma de metal” é produzido por arco a vácuo a partir de um alvo sólido, e inclui também plasma de materiais semimetálicos e semicondutores, tais como carbono, germânio e silício.

2.4. Filme de carbono tipo diamante (DLC) como biomaterial

O carbono tipo diamante (do inglês, "diamond-like carbon" - DLC) é uma forma de carbono que foi produzido pela primeira vez há 30 anos atrás (~1969) por Aisenberg & Chabot (1971). Utilizaram um "ion beam" (feixe de íons) de carbono de baixa energia para a deposição, obtendo um filme de carbono duro, transparente e isolante, cujos átomos estão ligados de maneira tetraédrica (presentes no diamante puro) e trigonal plana (como encontrado no grafite). Esse filme de carbono tinha muitas propriedades do diamante natural, mas era predominantemente amorfo¹ e não cristalino. Assim, o termo "tipo-diamante" ou "diamond-like" serve para identificá-lo como tendo propriedades similares ao do diamante (LIFSHITZ, 1999; GRILL, 1999).

A baixa taxa de deposição, utilizando íons de carbono, levaram à deposição usando plasmas de hidrocarbonetos, onde a taxa de deposição foi aumentada por duas ordens de grandeza. Esses novos filmes, ainda duros e transparentes, contêm de 15-50% de hidrogênio. Nesse caso tem sido proposto que esses materiais sejam chamados² de DLC hidrogenado (HDLC) ou carbono amorfo hidrogenado (a-C:H). Quando não existam quantidades significativas de hidrogênio (<1%), o DLC é chamado de: DLC não hidrogenado, DLC livre de hidrogênio, carbono amorfo livre de hidrogênio, carbono amorfo (a-C), ou carbono tetraédrico (taC). O termo taC é utilizado quando o filme tem alta fração de ligações de carbono do tipo sp³, ou seja, acima de 70%.

A partir de meados da década de 80 foram intensificadas as investigações a respeito das propriedades do DLC, e os resultados revelaram excelentes características ópticas, mecânicas,

¹ Todos os filmes de DLC são predominantemente amorfos, mas algumas inclusões micro ou nanocristalinas de todas as formas de carbono podem ser encontradas na matriz amorfa.

² O DLC não é um material único, mas uma família de materiais com ligações locais de carbono variando de 0<sp³<100%, dificultando a discussão de suas propriedades de maneira clara e rigorosa. Isso acaba provocando o aparecimento de diversos nomes para o DLC, que pode ter sido causado também pela falta de um consenso para a sua nomenclatura. Além disso, podem ser encontrados nomes diferentes para filmes similares, e o mesmo nome para filmes totalmente diferentes; e, às vezes é chamado de filme de diamante, ou de "diamante amorfo", que é tão lógico quanto "cristal amorfo" (LIFSHITZ, 1999). Na deposição realizada neste trabalho serão obtidos filmes de HDLC (devido à utilização do gás metano no processo de imersão em plasma), mas com quantidade mínima de hidrogênio (devido às condições de deposição).

químicas e elétricas, sendo utilizado em várias aplicações (CLAUSING et al, 1991; TZENG et al, 1991; LETTINGTON, 1998; GRILL, 1999; LIFSHITZ, 1999). As aplicações vão desde revestimentos resistentes ao desgaste, de partes metálicas na indústria automobilística e aeroespacial (válvulas, engrenagens, pistões, rolamentos, etc), lâminas de barbear (conjunto de 3 lâminas MACH3 da Gillette), até revestimentos de polímeros contra a abrasão (como óculos de sol de policarbonato) ou barreira de oxigênio para embalagens de alimentos e líquidos.

Os filmes de DLC possuem várias características que podem melhorar implantes humanos: alta dureza, baixo atrito, resistência ao desgaste, resistência à corrosão, biocompatibilidade e hemocompatibilidade. Os estudos realizados por diversos grupos de pesquisa têm mostrado o forte potencial dos filmes de DLC e suas modificações (incorporação de outros elementos) como revestimentos protetores para melhorar as características de dispositivos biomédicos (GRILL, 2003; HAUERT & MÜLLER, 2003).

Em implantes, para substituição de articulação (implantes osteoarticulares), como os de quadril, o DLC pode ser usado como **revestimento de articulação** (cabeça femoral de aço inoxidável, liga de cromo-cobalto ou liga de Ti) para aumentar a resistência ao desgaste e diminuir o coeficiente de atrito, e conseqüentemente, diminuir o desgaste do componente acetabular de PEUAPM (que é considerado um dos fatores mais importantes na causa de reações teciduais que levam à perda óssea e a uma cirurgia de revisão). Como **revestimento de hastes de liga de cromo-cobalto**, pode melhorar a ligação do cimento ósseo ao implante cimentado; e em hastes não cimentadas, pode servir como barreira de difusão, e evitar o contato entre a camada porosa metálica e o osso. Portanto, utilizando o revestimento de DLC, é possível que se encontre uma combinação perfeita de haste elástica (uma haste com módulo de elasticidade mais próxima ao do osso) com revestimento resistente ao desgaste. Por exemplo, um implante de quadril totalmente em liga de titânio Ti-13Nb-13Zr com apenas a cabeça femoral revestida com DLC. Ou um implante de quadril com cabeça femoral de Co-Cr-Mo revestida com DLC e o restante da parte metálica em liga de Ti-13Nb-13Zr.

O DLC também pode **reduzir a liberação de íons metálicos** dos implantes, o que pode ser útil para dispositivos de fixação de fratura, como placas e parafusos ortopédicos (LETTINGTON,

1991; MITURA et al, 1994), e para cirurgia buco-maxilofacial (OLBORSKA et al, 1994). **Válvulas cardíacas**³ e **stents**⁴ revestidos com DLC já são disponíveis comercialmente (HAUERT, 2003; HAUERT & MÜLLER, 2003).

Como alguns métodos de deposição permitem trabalhar com temperaturas menores (próximo da temperatura ambiente), o DLC também está sendo usado como **revestimento de polímeros** (como poliuretano, policarbonato, polietileno, PVC e PMMA), que são utilizados, por exemplo, em sondas de diferentes tipos, cateteres, tubos de drenagem, lentes de contato e caixas de lentes de contato, podendo melhorar a compatibilidade com o tecido do corpo (GRILL, 1999), a compatibilidade com o sangue (CUI & LI, 2000), ou evitar a adesão de células e bactérias à superfície do implante, tendo atividade antibacteriológica, isto é, prevenção da multiplicação de microorganismos (HAUERT & MÜLLER, 2003). O revestimento de lentes de contato oculares com o DLC aumenta seu índice de refração e é capaz de reduzir a sua espessura e providenciar também proteção contra UV. O taC (carbono tetraédrico - DLC não hidrogenado) tem se mostrado **neurocompatível** e promissor como revestimento de micro-sondas usadas para fazer a conexão de neurônios no sistema nervoso central (IGNATIUS et al, 1998).

Apesar da grande quantidade de estudos sobre o DLC para aplicações biomédicas, antes de ser usado em produtos biomédicos comerciais, esses produtos tem que ser estudados por ensaios clínicos prolongados e ser aprovado por agências governamentais (como FDA – “Food and Drug Administration”, USA). Portanto, apesar do forte potencial do DLC, as aplicações reais ainda são limitadas (GRILL, 2003), sendo uma exceção a empresa “Morgan Advanced Ceramics”, que já está comercializando uma cabeça femoral revestida com DLC.

³ As **válvulas cardíacas** precisam ter boas propriedades mecânicas e compatibilidade biológica com o corpo humano. A coagulação dos componentes sanguíneos sobre a superfície de implantes de válvulas cardíacas poderá resultar em resultados catastróficos como trombose e conseqüentemente falha em aplicações. Há vários materiais estudados, entre eles o aço inox e a liga de titânio, que atendem às propriedades mecânicas, mas a sua alta energia de superfície não é compatível com o sangue e o tecido.

⁴ Os **stents** de artéria coronariana (prótese intravascular para aumentar ou manter um vaso sanguíneo, podendo ser permanente ou temporária) podem induzir ativação de plaquetas em contato com o biomaterial, que pode liberar íons metálicos e dar início a uma trombose. Gutensohn et al (2000) confirma a redução de liberação de íons metálicos e formação de trombos ao se depositar filmes de DLC.

2.4.1. Estrutura e morfologia do DLC

O carbono pode existir de diversas formas: amorfo, vítreo e cristalino. Geralmente é incluído como cerâmica por possuir propriedades “tipo-cerâmica”, mas, embora resistente, não é um composto e conduz elétrons na sua forma grafítica. O carbono é um material de grande interesse por ocorrer com duas estruturas cristalinas diferentes: na forma do diamante e do grafite.

Tanto no diamante quanto no grafite, as ligações são covalentes em orbitais híbridos superpostos, sendo que o diamante possui hibridização sp^3 e o grafite sp^2 . No grafite forma-se uma base hexagonal polimerizada em duas dimensões, formando-se uma folha infinita. Assim, o grafite tem estrutura lamelar, que é frágil na ligação que une uma camada à outra. Já o diamante possui uma distribuição tetraédrica regular, em uma rede cristalina cúbica com entrelaçamento muito apertado entre os átomos de carbono. O arranjo atômico do diamante e do grafite está apresentado na Figura 2.19. O diamante é o material mais duro conhecido⁵, com densidade específica de 3.31 g/cm^3 e baixo coeficiente de atrito⁶. É um ótimo condutor térmico e ao mesmo tempo um isolante elétrico, e com dopagem adequada, pode ser um semicondutor. O grafite possui densidade específica de 2.25 g/cm^3 e coeficiente de atrito de 0.10.

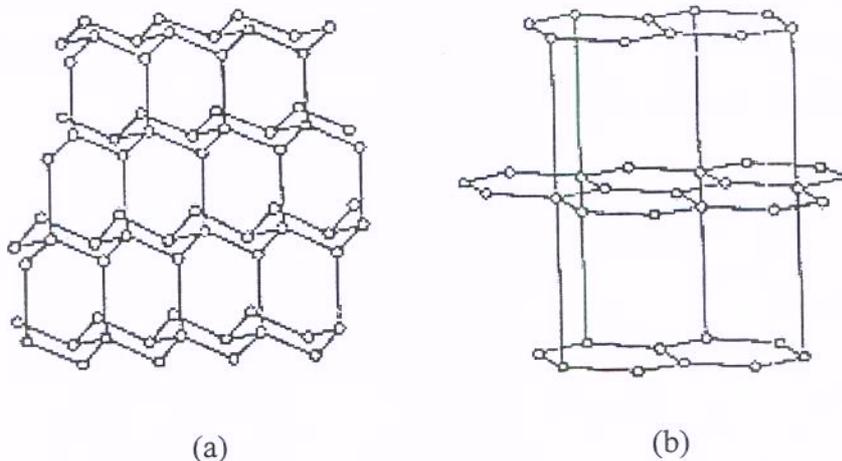


Figura 2.19. Arranjo atômico do: (a) diamante; e (b) grafite.

⁵ Dureza Knoop (kg/mm^2) (298K): diamante: 10.000, BN cúbico: 4500, BC: 2.250, WC: 2.190, TiC: 2.190, alumina: 2.000, SiC: 1.875-3.980, TiN: 1.800 (YODER, 1993).

⁶ O coeficiente de atrito do diamante no ar (300 K) é aproximadamente 0.1. Porém, pode variar entre 0.05 (equivalente ao Teflon) a 0.15, dependendo da carga, orientação e geometria.

O DLC é constituído⁷ de átomos de carbono hibridizados de maneira sp^1 , sp^2 e sp^3 . O valor atingido em suas propriedades está relacionado com a razão entre os tipos de hibridizações existentes entre os átomos de carbono do filme (assim como da distribuição de hidrogênio). Como a fração de sp^1 existentes nesses filmes é desprezível em relação às frações sp^2 e sp^3 , pode-se afirmar que a razão $sp^3:sp^2$ é que rege a qualidade do filme. Por sua vez, esta razão depende das condições de deposição do filme, da concentração de hidrogênio, da polarização do substrato e da temperatura de deposição. Em geral, os filmes de HDLC contêm frações de sp^3 menores do que 50%, enquanto o taC (carbono tetraédrico) pode chegar a 85% ou mais ligações sp^3 . No entanto, filmes de HDLC com alta fração de sp^3 têm sido obtidos recentemente, e por analogia ao taC, são chamados de taC:H.

Basicamente, o HDLC é uma rede amorfa composta de carbono e hidrogênio, onde os átomos de carbono são fortemente reticulados com ligações principalmente de sp^2 (tipo-grafite), e sp^3 (tipo-diamante). Embora as ligações sejam saturadas com hidrogênio, a estrutura do filme é metaestável, assim como os métodos de deposição são processos de “não-equilíbrio” (baseados em reações de conversão das diferentes configurações de ligações na superfície). Uma representação esquemática de rede não cristalina pode ser vista na Figura 2.20, onde a figura (a) exemplifica as ligações sp^2 , sp^3 , e hidrogênio, e a figura (b) a mesma rede sem os átomos de hidrogênio (ANGUS & WANG, 1991).

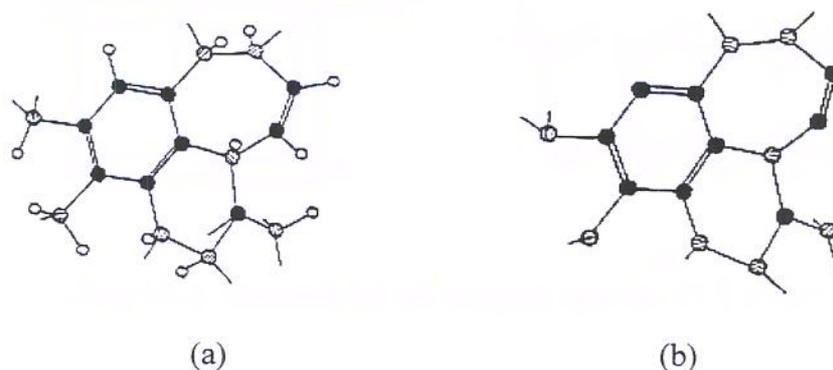


Figura 2.20 Configuração de rede não cristalina para o DLC com: (a) ligações sp^2 (⊙), sp^3 (●), e hidrogênio (o); e (b) a mesma rede sem os átomos de hidrogênio (ANGUS & WANG, 1991).

⁷ Há várias revisões sobre o HDLC e o taC (carbono tetraédrico), como os trabalhos de Robertson (1999), Grill (1997, 1999) e Lifshitz (1996, 1999), e podem ser consultados nesses textos.

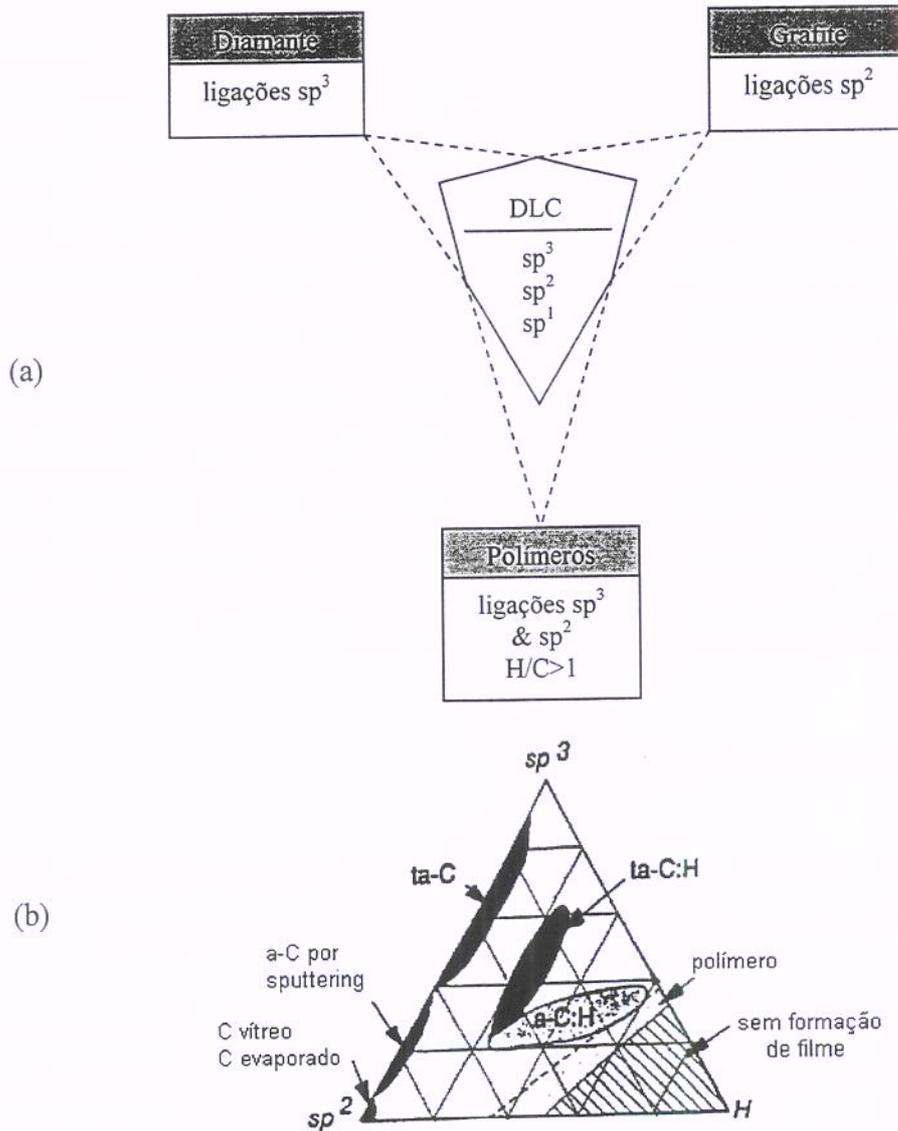


Figura 2.21. Estado da arte do carbono tipo diamante: (a) delimitações das propriedades do DLC (KOIDL et al, 1991); e (b) diagrama de fase dos materiais de DLC (ROBERTSON, 1999).

A estrutura dos filmes de DLC ainda é objeto de estudo, mas o estado da arte do DLC pode ser resumido pela Figuras 2.21, que: (a) mostra o filme de DLC com ligações sp^3 , sp^2 e também sp^1 , cujas propriedades estão delimitadas pelas propriedades do diamante, grafite e polímeros (KOIDL et al, 1991); e (b) descreve a composição estrutural do DLC em uma fase ternária do diagrama de sp^2 , sp^3 e concentração de hidrogênio. A posição específica do material “diamond-like” está determinado pelo sistema de deposição (precursor, método e parâmetro do método). O parâmetro mais importante na determinação do filme, no diagrama ternário, parece ser a energia de bombardeamento das partículas durante o crescimento do filme (ROBERTSON, 1999).

A natureza amorfa do DLC abre a possibilidade de **introduzir certos elementos** dentro do filme, tais como Si, F, N, O, W, V, Co, Mo, Ti e suas combinações, e ainda manter a fase amorfa do revestimento (HAUERT, 2003). Esses elementos permitem uma mudança controlada de propriedades físicas básicas, como dureza, coeficiente de expansão térmica, propriedades elétricas, reatividade química, elasticidade, tensão intrínseca, que alteram a sua performance. Além disso, propriedades tribológicas, energia de superfície e reações biológicas de células em contato com a superfície, podem ser continuamente adaptadas para um valor desejado. Porém, somente algumas relações entre as propriedades básicas, microestruturas, e comportamento em aplicações técnicas e biológicas são conhecidas. Outro modo de melhorar o DLC é tentar obter os chamados **nanocompósitos**, que consiste de uma alta densidade de cristais de tamanho nanométrico embebidos em uma matriz amorfa, como partículas de carbeto de titânio em uma matriz de HDLC (VOEVODIN & ZABINSKI, 1998).

2.4.1.1. Espectroscopia Raman

A caracterização estrutural de filmes de DLC é complicada por sua natureza amorfa. Por isso, várias técnicas têm sido usadas, sendo a mais comum a espectroscopia Raman.

A espectroscopia Raman é uma análise não destrutiva, muito utilizada em filmes de diamante e assim também se tornou uma das principais técnicas para a caracterização de filmes de DLC. Com o advento da invenção do laser, a técnica analítica da espectroscopia de espalhamento Raman (ou simplesmente espectroscopia Raman) tem sido largamente utilizada na caracterização de materiais, principalmente de sólidos. Com esta técnica, as investigações são bastante precisas, identificando as diferentes formas cristalinas e amorfas que podem compor a amostra.

O princípio do efeito Raman baseia-se no **espalhamento inelástico** de luz. O recurso de espectroscopia Raman consiste na análise da radiação **inelasticamente espalhada*** pela matéria, com comprimento de onda mais curto ou mais longo em relação à radiação incidente, conhecido

* a radiação **elasticamente espalhada**, portanto sem alterações no comprimento de onda, é conhecida como espalhamento Rayleigh.

como anti-Stokes e Stokes, respectivamente, e que são características intrínsecas de cada material (HAGA, 1997). Geralmente, os sinais anti-Stokes são bem menos intensos em relação ao Stokes em razão da população no estado excitado, em geral, sempre menor do que no estado fundamental. A diferença de frequência entre a radiação incidente (proveniente de um laser) e a espalhada constitui o espectro Raman. Essas diferenças correspondem às frequências de vibrações de moléculas e podem ser convertidos em seu comprimento de onda correspondente, ou ainda nos seus números de onda (eixo x do espectro). Os espectros Raman geralmente cobrem uma faixa de deslocamento de 0 a 400 cm^{-1} , onde o deslocamento zero corresponde ao espalhamento Rayleigh. Já valores negativos correspondem ao espalhamento anti-Stokes.

Em princípio, o estudo Raman deverá permitir a identificação de ligações sp^2 e sp^3 no DLC. Até recentemente, porém, a presença de ligações sp^3 em filmes de carbono amorfo não tem sido detectada por estudos Raman (no espectro do visível^{**}). Isto ocorre porque muitos experimentos Raman são feitos usando excitação de laser visível a 488 ou 514 nm, e nesses comprimentos de onda, as ligações sp^2 sobrepõe a contribuição das ligações sp^3 . Isto ocorre porque a seção de choque Raman dos sítios sp^2 é de 30 a 60 vezes maior do que a dos sítios sp^3 , mascarando a presença destes nos espectros Raman de filmes de carbono amorfo, não permitindo então, medir diretamente a concentração das ligações sp^2 e sp^3 (PRAWER et al, 1996; ADAMOPOULOS et al, 1999).

O espectro Raman de primeira ordem de um filme de HDLC é caracterizado pela superposição de duas bandas, onde a banda principal tem o pico **G**, em torno de 1550 cm^{-1} , e a segunda o pico **D**, posicionado próximo de 1350 cm^{-1} , ambos atribuídas às ligações sp^2 . Estas estruturas também são observadas nos filmes de taC (carbono tetraédrico). A Tabela 2.5 apresenta um resumo dos espectros do diamante, grafite e DLC.

^{**} O Raman UV, recentemente tem sido informado como capaz de aumentar a sensibilidade à ligação sp^3 com respeito à sp^2 , e se calibrado apropriadamente com respeito ao traço do sp^3 , pode servir como uma medida direta da fração de sp^3 nos filmes de taC (LIFSHITZ, 1999).

Tabela 2.5. Espectro Raman do diamante, grafite e DLC.

	Diamante	Grafite	DLC
Estrutura	cristalina	cristalina	predominantemente amorfa
Ligação de C	somente sp^3	somente sp^2	sp^1 , sp^2 e sp^3
Espectro Raman	1332 cm^{-1}	1580 cm^{-1}	Em torno de 1350 cm^{-1} e 1550 cm^{-1}
Condutividade elétrica	isolante	condutor	isolante

Para se ter uma idéia da concentração das ligações sp^2 , esta concentração deve ser medida por outras técnicas e relacioná-las com a razão entre as áreas dos picos I_D/I_G , o deslocamento e o alargamento do pico. A variação na posição e na largura de cada uma dessas bandas nos fornece informações relativas às modificações estruturais do filme (que pode depender da composição das ligações de carbono e variações na ordenação estrutural cristalográfica). Dependendo do método e condições de deposição, os espectros Raman se alteram bastante, mas sempre mantendo um pico próximo de 1550 cm^{-1} , já o pico de 1330 cm^{-1} possui uma frequência menor e às vezes não se nota visualmente. A largura a meia altura de cada uma das bandas pode fornecer algumas informações importantes, como o tratamento térmico em filmes de DLC.

A deconvolução dos espectros Raman para o pico G e pico D, e a avaliação da proporção sp^3/sp^2 pela razão das intensidades I_D/I_G desses picos, é feita por grande parte dos autores, mas, segundo Lifshitz (1999), não tem base científica, pois ainda se encontra em discussão na literatura a origem física dos picos, como também as modificações sofridas por estes quando se varia a estrutura dos filmes. No entanto, essa proporção pode ser utilizada apenas como uma modo de comparar os diferentes filmes obtidos. Como o objetivo deste trabalho não é o estudo detalhado da microestrutura dos filmes obtidos, o espectro Raman será utilizado apenas para confirmar que o filme depositado é DLC, ou seja, a verificação da “assinatura” do DLC.

2.4.1.2. Morfologia da superfície por MFA

O microscópio de força atômica eleva a potência visual do olho humano em 1 milhão de vezes e multiplica em 100 vezes a capacidade dos microscópios eletrônicos. No sistema de microscopia de força atômica (MFA), uma agulha é localizada na extremidade de uma haste delgada, espelhada e flexível (cantilever) sobre a qual é incidido um feixe de laser, e refletido sobre sensores ópticos que estabelecem uma posição de referência. O sistema de varredura faz uso de uma base confeccionada em cerâmica piezoelétrica, sobre a qual é posicionada a amostra. Por um circuito de realimentação, a amostra é movimentada fazendo com que o acompanhamento da agulha desloque o feixe luminoso gerando linhas correspondentes ao perfil em análise. O princípio motriz do microscópio de força atômica, trabalhando em modo contato, é a repulsão eletrostática entre os elétrons da superfície da amostra e os da agulha. O sistema de realimentação controla a altura da ponta em relação à amostra utilizando a força de interação eletrostática como referência para manter a distância constante durante o processo de varredura, resultando desta interação o perfil topográfico (BERNARDES FILHO, ASSIS & PESSOA, 1998).

A microscopia de força atômica (MFA) tem se mostrado uma técnica muito útil para medir a morfologia da superfície de filmes de DLC, pois o DLC possui uma superfície de baixíssima rugosidade. Niedzielski et al (1997) compararam a estrutura da superfície de DLC depositado sobre silício através de três técnicas: CVD de plasma gerado por RF, processo de “ion beam”, e descarga por arco catódico. A MFA mostrou diferenças significativas entre as morfologias da superfície estudados, que dependeu fortemente do método utilizado. Nota-se elementos esféricos na morfologia da superfície, que, segundo os autores, são típicos de filmes de DLC com conteúdo de hidrogênio. Peng, Barber & Clyne (2001) também estudaram o DLC através de MFA (depositado sobre silício pelos processos de plasma de metano gerado por RF, “magnetron sputtering”, e processo baseado em arco catódico). A difusão na superfície promovida pela energia do impacto dos íons e a alta temperatura do substrato causou rugosidades na superfície, promovendo nucleação local e crescimento de clusters grafíticos. Mas em alguns casos, a alta energia dos íons de bombardeamento na superfície suavizou a superfície. Assim, ainda é necessário muito estudo para compreender os mecanismos de formação do DLC.

2.4.2. Propriedades do DLC

2.4.2.1. Dureza e adesão

A dureza é uma propriedade complexa, e definida como a resistência de um corpo contra a intrusão de outro corpo (mais duro). A medida de dureza depende das propriedades plásticas e elásticas do material a ser investigado, das técnicas de medidas aplicadas e da forma e natureza do indentador. Como consequência, existem diferentes escalas de dureza para diferentes técnicas, que não podem ser comparadas simplesmente. No caso de materiais não homogêneos, isto é, sistema “filme/substrato”, os resultados de medida de dureza dependem das propriedades do revestimento, do substrato, e também da natureza da interface entre eles. Como uma regra geral, na investigação apenas do revestimento, a profundidade do indentador deve ser menor do que 10% da espessura do filme. Apesar disso, a influência do substrato e da interface nos resultados, em geral, não podem ser excluídos (KULISCH, 1999).

As técnicas convencionais de medida de dureza consistem, em geral, na penetração de uma ponta de diamante ou aço (com diversas formas geométrica), sob uma carga conhecida em um material menos duro, e na medida das dimensões da região deformada.

Para medidas de nanoindentação, um indentador de diamante Berkovich (piramidal de base triangular) é aplicado em uma profundidade muito pequena e com carga P controlada. A força aplicada durante a inserção e extração é registrada em função da profundidade. A força necessária para marcar a peça até uma determinada profundidade é o indicativo da dureza do material, enquanto a recuperação do material durante o descarregamento é indicativa das suas propriedades elásticas. Na prática, o termo nanoindentação geralmente implica no registro contínuo da distância percorrida pelo indentador (profundidade de penetração) e da carga, ao invés da área de contato (estimação da área indentada após remoção da carga), como é comum em ensaios de microindentação.

Os filmes de HDLC são caracterizados pela alta dureza e alto módulo de elasticidade*, mas também pela alta tensão intrínseca**. Essas propriedades são diretamente correlacionadas com a proporção de carbono sp^3 nesses filmes. A dureza do HDLC está na faixa de 10-30 GPa com módulo de Young correspondente, 6-10 vezes maior. Os filmes são caracterizados por tensão de tração na faixa de 0.5-7.0 GPa.

A dureza dos filmes de taC ($sp^3 > 70\%$) pode atingir altos valores (40-80 GPa) e seu módulo de Young pode chegar a valores maiores do que 900 GPa, mas a tensão intrínseca também pode chegar a atingir valores superiores a 13 GPa. A alta tensão intrínseca limita a espessura dos filmes de taC, freqüentemente para valores menores do que 1 μm de espessura (GRILL, 1999), sendo este o seu maior problema. Enquanto a tensão é um fator determinante na formação de sp^3 , ele tem um efeito negativo, pois pode causar delaminação ou torção do filme. Uma tensão intrínseca de 6-11 GPa foi medida para filmes de taC com $sp^3 \sim 70-80\%$ (LIFSHITZ, 1999). Este problema pode ser parcialmente resolvido com a diminuição das ligações sp^3 , para um valor que mantenha as boas propriedades “tipo-diamante” e tensão relativamente baixa. A redução de tensão pode ser feita pela incorporação de elementos ou pela composição de estruturas de multicamadas de carbono amorfo, compreendendo filmes duros e “moles”, variando a energia do íon durante a deposição (GRILL, 1999). Além disso, recentemente foi encontrado que a tensão pode diminuir por recozimento, sem afetar outras propriedades (LIFSHITZ, 1999). O taC pode ser estável a temperaturas de no mínimo 600°C, e o recozimento, a aproximadamente 600°C providencia

* Todo corpo rígido pode ser considerado como sendo elástico, isto é, as suas dimensões podem ser deformadas, mesmo que ligeiramente, quando este é submetido a tensões. A tensão é proporcional à deformação produzida no material, e é definida como F/A , ou seja, a força dividida pela área onde ela atua. A deformação é definida como a variação do comprimento do material relativo ao seu estado original. A constante de proporcionalidade entre a tensão e a deformação é chamada de **módulo de elasticidade**. O módulo de elasticidade, quando há tração ou compressão do material, é chamado de **módulo de Young**.

** A **tensão** pode ser definido como sendo a tensão F/A , e pode ser observado em filmes finos após a sua deposição, causando a sua deformação. A tensão responsável por esta deformação pode ser descrito através de duas contribuições. Uma é causada pela diferença entre os coeficientes de dilatação térmica do filme e do substrato, conhecido como **tensão térmica** (encontrado quando se utiliza temperatura de deposição muito alta). A outra é gerada durante o crescimento do filme, através de rearranjos atômicos que ocorrem durante a sua formação devido ao vínculo com o substrato, sendo conhecido como **tensão intrínseca**. Assim, o conjunto filme-substrato pode se encontrar com **tensão tensiva**, quando está tensionado devido à sua tendência de se contrair ou com **tensão compressiva**, quando está comprimido devido à sua tendência de se expandir paralelamente à superfície. O valor da tensão pode ser calculado a partir da teoria da elasticidade através da medida do raio de curvatura do sistema filme/substrato.

relaxamento da tensão, sem reduzir significativamente o conteúdo de sp^3 ou as suas propriedades mecânicas (ROBERTSON, 1999).

Nas Tabelas 2.6 e 2.7 pode ser visto como as propriedades do DLC variam (dentro de uma faixa) dependendo do método de deposição utilizado. Os valores foram retirados de Robertson (1994) e Voevodin & Donley (1996), que por sua vez também retiraram de vários artigos. Na Tabela 2.7 é apresentada uma comparação do HDLC com taC (GRILL, 1999, LIFSHITZ, 1999). Os filmes de DLC obtidos por processos de imersão em plasma (ou IIP&D, utilizado neste trabalho) têm demonstrado possuir várias propriedades interessantes para implantes humanos, como adesão superior e possibilidade de deposição em objetos de formas complexas. No entanto, essa técnica é mais recente, se comparada aos demais métodos, e há bem menos estudos visando aplicação na área biomédica, com exceção de estudos de hemocompatibilidade *in vitro* (YANG et al, 2003; YIN et al, 1999). Alguns valores de dureza podem ser vistos na Tabela 2.8.

Tabela 2.6. Propriedades do diamante e filmes de DLC obtidos por diversas técnicas (ROBERTSON, 1994; VOEVODIN & DONLEY, 1996).

Material	Técnica	Densid. (g/cm ³)	% sp^3	Dureza (GPa)	Mód. Young (GPa)	Coef. atrito (contra metal)
Diamante	Ocorr. natural	3.52	100	100	1050	0.02-0.10
HDLC	“Sputtering”	1.9-2.4	2-5	11-24	140	0.20-1.20
HDLC	Plasma de R.F.	1.6-2.2	30-60	16-40	145	0.02-0.47
HDLC; DLC não H.	“Ion beam”	1.8-3.5	-	32-75	-	0.06-0.19
DLC não H	“Sputtering”	2.0-2.4	95	10-14	-	-
DLC não H	MSIBD	2.5-3.0	90±5	100	-	-
DLC não H.	Arco em vácuo	2.8-3.0	85-95	40-100	500	0.04-0.14
DLC não H	Laser	2.4	70-95	30-60	200-500	0.03-0.12

Tabela 2.7. Resumo das propriedades dos filmes de diamante, HDLC e taC.

	Diamante (Yoder, 1993)	HDLC (Grill, 1999)	taC (Lifshitz, 1999)
% sp ³	100	20-50	70-80
Densidade (g/cm ³)	3.3-3.5	0.9-2.2	1.9-3
Dureza (GPa)	90-103	10-30	40-80
Mód. Young (GPa)	1050	60-150	300-800
tensão (GPa)	59	0.5-7.0	6-11
Coef. de atrito (*)	~0.1	0.1-0.19 sem umidade ~0.3 com umidade	0.1-0.15

(*) O coeficiente de atrito do filme de diamante depende também da geometria, direção de polimento, e pode ser reduzido para 0.05 (equivalente ao Teflon). Os filmes de DLC também podem ser polidos, diminuindo o coeficiente de atrito para valores próximos de uma articulação natural (0.025-0.05).

Tabela 2.8. Dureza de filmes de DLC obtidos por IIP&D.

Referência	Dureza (GPa)	Conteúdo de hidrogênio (%)
Walter et al (1997)	20	30
He et al (1999)	30	<30
Miyagawa et al (2002)	17.5-18.9	20-26
Watanabe et al (2003)	7-12	----

Adesão

A determinação da adesão é de grande importância para prever o desempenho do sistema revestimento/substrato, mas, dependendo da adesão e espessura do filme, isto pode ser muito difícil. Existem diversos métodos para medir a adesão (RICKERBY, 1988; WEISS, 1995). Um exemplo de método direto é o ensaio de tração, que é feito unindo-se as superfícies de barras revestidas através de um adesivo e se submete uma força de tração à peça. Neste caso a resistência do adesivo não deve exceder a resistência da interface. Outro exemplo é a caracterização por arrancamento, e consiste na aplicação de uma fita adesiva à superfície do filme, com conseqüente arrancamento para determinação da tensão de destacamento. Neste ensaio a limitação está na resistência da fita, que em geral é baixa, limitando o ensaio de resistência de

adesão filme/substrato para valores também baixos. Além disso, o ensaio não é quantitativo, e as tensões requeridas para a deformação plástica do filme não podem se separar das tensões de destacamento. Outro tipo de ensaio é o de arrancamento de pino, onde um cilindro é aderido ou soldado em ângulo reto ao filme, e a força de tração necessária a delaminação é monitorada. Em geral se utiliza o epóxi como adesivo.

Uma condição necessária para capacitar o uso do DLC como revestimento de implantes é a boa adesão ao substrato, mas geralmente o filme tem alta tensão, da ordem de 4 GPa. A alta tensão torna difícil depositar filmes de DLC espessos ($>10 \mu\text{m}$) e bem aderidos, devido à sua tendência a delaminação.

A adesão é mais um dos problemas do DLC, que muitas vezes depende também do substrato e do método de deposição. Por exemplo, McNamara, Murphy & Morshed (2001a) estudaram a adesão de filmes de HDLC (com carbono proveniente do acetileno) a três ligas biocompatíveis: aço inox 316L, Co-Cr-Mo e Ti-6Al-4V. As análises indicaram que o DLC tem maior adesão ao aço inox 316L, comparado a Co-Cr-Mo e Ti-6Al-4V. Os autores utilizaram os testes “pull-off” (arrancamento) e ensaio de resistência ao risco (“scratch”). Sheeja et al (2001b) também estudaram a adesão do DLC (depositado por processo baseado em arco catódico filtrado, IIP de metal) ao aço inox, Ti e Ti-6Al-4V, através de ensaio de pino-disco (“pin-on-disk”), e neste trabalho a adesão do DLC também foi maior no aço inox.

Uma adesão satisfatória pode ser obtida com o uso de **intercamadas metálicas**, como titânio (transição do tipo metal/metal/carbeto), silício (transição do tipo metal/silício/carbeto) (BUTTER et al, 1995; IANNO, DILLON & ALLI, 1995), cromo e tântalo (TIAINEM, 2001). Revestimentos **multicamadas** (como intercamadas de TiN-TiC ou com mais composições) têm sido estudados como meios de melhorar as propriedades do DLC e a adesão.

A estrutura multicamada pode ser feita, por exemplo, com uma combinação de “magnetron sputtering” com CVD assistido por plasma de RF. Dumkum, Grant & McColl (1997) estudaram o sistema Ti-TiN-TiC-DLC sobre Ti cp e Deng & Braun (1996) o sistema Ti-TiN-TiCN-TiC-DLC

sobre aço AISI 420. É importante observar aqui, que quando se trabalha com estrutura multicamada é preciso se preocupar com a interface entre as camadas, que pode ser local para falha do filme, crescimento de trincas, diferentes propriedades mecânicas e diferentes tensões residuais. Além disso, quando se trabalha com biomateriais, é necessário fazer um estudo de biocompatibilidade com cada camada em particular, pois caso haja uma delaminação do revestimento superior de DLC, é preciso que as camadas internas também sejam biocompatíveis. Voevodin et al (1997) criaram um revestimento gradual Ti-TiC-DLC sobre aço inox 440C pela combinação de “magnetron sputtering” com laser pulsado, obtendo boa adesão. Este processo gerou uma interface gradual **dentro** do revestimento, **mas não entre** o filme e o substrato.

Através da **implantação iônica por imersão em plasma e deposição** ou IIIP&D (Cap. 2.3.2), também se está conseguindo uma melhor adesão. Walter, Nastasi & Munson (1997) depositou DLC por IIIP de hidrocarboneto (metano para implantação e acetileno para deposição) sobre Ti-6Al-4V, Si, aço 304, Mg, Al, Cr, W, Ni e outros, obtendo boa adesão (medido por “Sebastian® stud pull test” - teste de puxamento). Baba & Hatada (1998) obtiveram boa adesão de DLC em silício (medido por ensaio de resistência ao risco). Miyagawa et al (2002) analisaram a adesão do DLC depositado por IIIP em silício através de “stud pull test” (teste de puxamento) e notou que, quando se trabalhou com um processo de implantação (com metano) mais deposição (com tolueno), o filme não foi removido, excedendo o “strength” do epóxi, que é de 90 a 100 MPa, e sem delaminação do revestimento, e quando se trabalhou com deposição (sem implantação), o filme foi removido com 40 MPa.

2.4.2.2. Corrosão em meio fisiológico

A corrosão é a destruição ou deterioração de um material devido a reações com o meio em que se encontra. A corrosão em meio aquoso, motivada por fluidos do corpo, é também um processo eletroquímico, e é um dos principais problemas para a aplicação de certos tipos de metais como implantes no meio fisiológico. De um modo geral, as morfologias de ataque por corrosão pode ser classificada em duas grandes famílias: a corrosão uniforme e a corrosão localizada.

Na corrosão uniforme é observada a perda de material de uma forma relativamente uniforme ao longo de toda a superfície exposta do material. No caso dos implantes, esta forma de ataque é desprezível devido à presença do filme passivo. Essas perdas são tão reduzidas que não é possível detectá-las por inspeção visual ou medidas de perda de massa, sendo, no entanto, possível determiná-las através de técnicas eletroquímicas. Já na segunda forma de ataque, são observados os pontos microscópicos de corrosão (pites), alvéolos, fendas, trincas, dissoluções seletivas, etc, confinadas a macro e microrregiões da superfície metálica. Trata-se de processos que envolvem a dissolução intensa de material em regiões confinadas, muitas vezes, extremamente localizadas, como por exemplo, a corrosão por pites. No caso de implantes temporários de aço inoxidável, a corrosão observada é do tipo localizada e está associada às condições que levam à instabilidade do filme passivo (CAVALCANTI & COELHO, 1997). A seguir, algumas formas de corrosão, observadas em implantes temporários:

- Corrosão por pites: corrosão por pontos, podendo atuar como pontos nucleadores de trincas quando da presença de sollicitação mecânica.
- Corrosão em frestas: corrosão de natureza intersticial decorrente da presença de anteparos sobre a superfície metálica que restringem o acesso desejável do oxigênio; apresenta mecanismo similar ao da corrosão por pites, sendo, no entanto, um processo mais intenso; comumente verificada nos pontos de contato que se estabelecem entre as cabeças de parafusos e os furos das placas de osteossíntese.
- Corrosão sob atrito: corrosão também de natureza intersticial provocada por micromovimentos oscilatórios relativos entre duas superfícies metálicas em contato e sob

pressão; comumente verificada na interface acima mencionada; são removidas pequenas partículas de material metálico (“debris”), sendo observadas ranhuras, por exemplo, nas cabeças dos parafusos; sua incidência é associada à corrosão em frestas e pites (esta última em menor grau) tendo em vista a impossibilidade de preservação e recomposição do filme passivo; um fator importante neste processo é a dureza relativa dos materiais envolvidos.

- Corrosão intergranular: tipo de corrosão que se manifesta nas adjacências dos contornos de grão, que passam a sofrer ataque preferencial.
- Corrosão sob fadiga: caracteriza-se pela formação de trincas de fadiga em material passível sujeito à solitação cíclica em meio corrosivo.
- Corrosão galvânica: também conhecida como corrosão bimetálica, refere-se à aceleração do processo corrosivo de um metal com maior tendência à corrosão quando colocado em contato com outro metal de menor tendência. Exemplo: quando fios de sutura de aço menos nobre entram em contato com implantes de aço inox mais nobre, observa-se a corrosão preferencial do fio.

Nos materiais metálicos, a corrosão é devida à transformação eletroquímica destrutiva de um metal ou liga, que é ocasionada por um fluxo de elétrons. Para uma corrente escoar é necessário um circuito elétrico completo. O sistema de corrosão possui um circuito elétrico composto de quatro elementos básicos:

- Anodo: eletrodo onde ocorre a oxidação (corrosão) e de onde a corrente, na forma de íons metálicos positivos, entra no eletrólito;
- Eletrólito: meio condutor (geralmente um meio líquido) que contém íons que transportam a corrente até o catodo (fluxo iônico);
- Catodo: eletrodo onde ocorre a redução e o local onde a corrente sai do eletrólito;
- Circuito metálico: ligação entre o anodo e o catodo, por onde escoam os elétrons, no sentido anodo-catodo.

A diferença do potencial entre os pontos anódicos e catódicos obriga os elétrons a fluírem. Assim, um meio muito usado para estudar a relação de potencial para corrosão é através de um diagrama de equilíbrio desenvolvido por Pourbaix, que colocou em um gráfico, potencial versus pH, um parâmetro igualmente de grande importância para processos de corrosão, pois para

qualquer combinação particular de pH e potencial, existirá uma única reação dominante para um metal específico em uma solução específica.

Mesmo sabendo que um material tem tendência à corrosão, é necessário determinar o seu potencial de corrosão. Ainda que a tendência para a corrosão seja muito forte, a velocidade de corrosão, no meio em que ele está inserido, pode ser muito baixa, e isso pode não representar nenhum problema quando o material for utilizado como implante.

Neste trabalho foram utilizados dois métodos eletroquímicos (Cap. 3.3) para análise da resistência à corrosão do filme de DLC obtido pelo processo de imersão em plasma: o teste de extrapolação de Tafel e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

Teste de extrapolação de Tafel

Uma aplicação do método de polarização é a determinação da densidade de corrente através do teste de extrapolação de Tafel. A relação entre a sobrevoltagem de um metal em corrosão e densidade de corrente elétrica correspondente pode ser estabelecida empiricamente segundo a equação proposta por Tafel: o logaritmo da corrente observada num processo eletroquímico é diretamente relacionado à diferença do potencial aplicado e o potencial redox para uma reação eletroquímica. Ao circular então uma corrente entre os eletrodos, os mesmos apresentarão uma variação de potencial que pode ser chamado polarização. A densidade de corrente (i) e as curvas de polarização podem ser formuladas em função da densidade de corrente de corrosão (i_{corr}), polarização (η), e inclinação anódica e catódica de Tafel. O gráfico da polarização em função do logaritmo da densidade de corrente apresenta um comportamento linear para determinados valores do potencial, e a extrapolação dessas linhas retas até o potencial de circuito aberto pode ser utilizada para determinar a densidade de corrente do processo de corrosão

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica que também pode ser utilizada para analisar a resistência à corrosão de filmes ou revestimentos em um meio eletrolítico. O método consiste em aplicar um potencial de corrente alternada com diferentes valores de frequência sobre a interface a ser estudada, e como resposta, a mudança de fase e

amplitude, ou a parte real e imaginária da impedância é medida (MCDONALD, 1987, SCULLY, 2000). A corrente alternada, com a frequência desejada, é programada pelo computador e aplicada no eletrodo de trabalho através de um sistema potenciostato/analizador de frequência. A resposta do eletrodo é recebida pelo detector de resposta em frequência que encaminha os dados ao computador para o processamento. Assim, são obtidos gráficos e as curvas relacionadas ao circuito equivalente.

Existem várias representações que podem ser utilizadas, sendo a mais comum o gráfico chamado de Bode, que consiste na representação de $\log(|Z|)$ versus $\log \omega$ (Bode Z) e de $-\Phi$ versus $\log \omega$ (Bode Fase), onde Z é chamado de impedância, Φ é a defasagem da corrente com relação ao potencial e é conhecido como ângulo de fase, e $\omega=2\pi f$, sendo f a frequência com que a corrente alternada oscila, normalmente medida em Hertz (SOUZA, 2002).

O processo de corrosão pode ser representado esquematicamente por um circuito equivalente, onde na sua maneira mais simples, considera apenas a resistência da solução (R_s) em série com a resistência do filme (R_f) e capacitância (C_f) do filme que estão em paralelo (Fig. 2.22a). Para determinar os parâmetros é necessário realizar medidas da impedância do sistema para vários valores de frequência. O valor mínimo do módulo da impedância medida no teste de EIE é igual à resistência da solução (R_s , ou resistência entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência), enquanto o valor máximo da impedância é igual à soma das resistências: $R_s + R_p$ (SCULLY, 2000).

Se a superfície em estudo possuir rugosidade e/ou propriedades de carga heterogêneas, a contribuição individual da corrente total será diferente e a distribuição na superfície do eletrodo ou propriedades de cargas conduzirão a uma distribuição da resistência, ou seja, haverá muitos elementos resistivos (Fig. 2.22b mostra um circuito maior - utilizado neste trabalho). Esta situação é mais complicada quando pequenos sinais de frequência e dependência do tempo estão envolvidos (SOUZA, 2002). Para esses processos dependentes do tempo é que se introduziram alguns elementos que suprem essa necessidade, entre os quais, o elemento de fase constante (CPE), que foi utilizado neste trabalho. Nos dois modelos apresentados na Fig. 2.22, o elemento capacitivo trata-se de um elemento de fase constante.

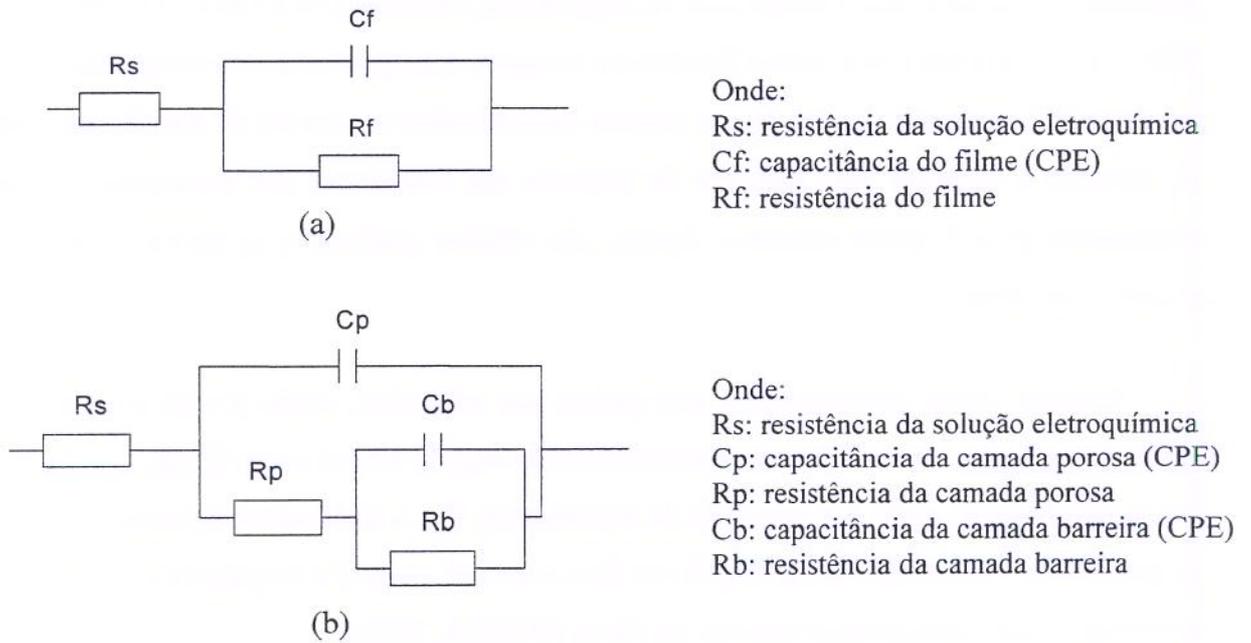


Figura 2.22. Circuitos equivalentes para ajuste de EIE: (a) modelo mais simples; e (b) modelo utilizado neste trabalho.

A seguir, alguns resultados do DLC:

Os filmes de DLC são inertes quimicamente a praticamente qualquer solvente à temperatura ambiente, e não são atacados por: ácidos, bases ou solventes orgânicos. Os filmes são inertes à mistura de ácidos fortes, tais como $\text{HNO}_3:\text{HF}=7:2$ e a exposição em solução básica a 85°C por várias horas. Os estudos de corrosão com DLC revestindo materiais metálicos biocompatíveis encontrados na literatura são feitos por diversos métodos, como os ensaios de corrosão eletroquímicos e a voltagem de “breakdown”. A voltagem de “breakdown” em solução fisiológica é um dos parâmetros que torna possível propor um revestimento aplicável em medicina. O valor da voltagem permite estimar a resistência à corrosão dentro do corpo humano. A voltagem de “breakdown” em solução de Tyrode para aço inox 316L sem revestimento oscila entre 340 e 420 milivolts. Aço inox 316L com polimento eletrolítico tradicional e passivação tem um aumento da voltagem de “breakdown” para 600 milivolts. O revestimento aplicado deverá aumentar o valor da voltagem de “breakdown”.

Nos estudos de Couvrat et al (1995) e Mitura et al (1996), a deposição de DLC (por CVD assistido por plasma de RF) em aço inox AISI 316L resultou em um aumento da voltagem de “breakdown” para 1100-1300 mV. Mitura et al (1994) estudaram a resposta de amostras que ficaram em solução de Tyrode e a análise por MEV não revelou qualquer traço de degradação após três períodos: 1 semana, 1 mês, e 3 meses. Couvrat et al (1995) também estudaram a resistência à corrosão utilizando 2% HCl diluído em água com exposição por 1 ano, e o teste mostrou que o DLC ficou intacto e nenhum produto de corrosão se tornou visível.

Dowling et al (1997) estudaram a resistência à corrosão de barras cilíndricas de aço inox 316L (com dimensões 100x15 mm de diâmetro) revestidas com DLC (obtido através de acetileno por “saddle field source”) e imersas em solução de Ringer (líquido que simula o fluido do ambiente corporal), onde as barras revestidas com DLC sobreviveram a uma voltagem aplicada de 2400 mV por um período mínimo de 4 h. Por outro lado, a voltagem de “breakdown” de barras não revestidas foi de 200-600 mV. Este aumento na resistência à corrosão indica que o revestimento de DLC deverá reduzir o potencial de liberação de íons do implante.

As resistências à corrosão de aço inoxidável 316L, Co-Cr-Mo e Ti-6Al-4V, com e sem revestimento de 1 μ DLC (taC obtido por um processo baseado em arco pulsado com plasma de carbono filtrado por campo magnético) foram testadas por exposição durante 45 dias em 10% HCl diluído em água para aceleração, e com 1% em peso de NaCl diluído em água para equivalência com o corpo humano (essa mistura é equivalente ao fluido corporal do corpo humano por longo tempo, 45 dias equivalem a aproximadamente 2 anos). Esta solução é extremamente corrosiva e permite a análise de revestimentos em testes relativamente curtos (algumas semanas ou meses). A quantidade de produtos de corrosão na solução testada foi determinada usando análise por PIXE (“Particle Induced X-Ray Emission”). A concentração, quantidade de líquido testado (30 ml), e área exposta (7 mm²) foram usadas para obter a taxa de corrosão média em $\mu\text{g}/(\text{cm}^2.\text{dia})$, isto é, $[(\text{massa corroída})/(\text{área exposta} \cdot \text{tempo})]$. A taxa de corrosão das amostras, após 45 dias, de aço inoxidável 316L, Co-Cr-Mo e Ti-6Al-4V sem revestimento foi de 870, 650 e 750 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2.\text{dia})$, respectivamente; e com revestimento de DLC, 2.2, 0.04, 0.01 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2.\text{dia})$, respectivamente (LAPPALAINEN et al, 1998b). Ou seja, uma liga de Co-Cr-Mo com 1 μm de DLC diminui a taxa de corrosão em 100.000 vezes quando exposta a

uma solução salina equivalente ao fluido corporal de 37°C durante 2 anos. O significativo aumento da resistência à corrosão é demonstrada pelas amostras de Ti-6Al-4V, que após 11 dias, foram claramente corroídas, mas as amostras revestidas com DLC não apresentaram corrosão visível mesmo após 45 dias. Baseado no pico de Ti analisado por PIXE, a quantidade de titânio diminuiu por um fator de 4000, usando o revestimento de DLC (LAPPALAINEN et al, 1998a).

Sheeja et al (2001a) estudaram a corrosão de Co-Cr-Mo com revestimento de DLC (depositado por arco catódico, com plasma de carbono obtido do grafite com 99.999% de pureza, que pode ser considerado um IIPMe) usando um sistema eletroquímico DC, disponível comercialmente, em solução de SBF (líquido que simula o fluido corporal) A corrosão em termos de densidade de corrente é muito pequena para DLC revestindo Co-Cr-Mo (da ordem de 10^{-8} a 10^{-9}), que é aproximadamente de 4-5 ordens de magnitude menor do que Co-Cr-Mo sem revestimento. Isto mostra que o DLC aumenta a resistência à corrosão da liga. Dorner-Reisel et al (2004) também estudaram o comportamento da corrosão, por ensaio eletroquímico, de DLC (obtido por plasma de hidrocarboneto) depositado sobre Co-Cr-Mo e verificou que o revestimento reduziu o ataque de corrosão nesse material.

O comportamento de corrosão por técnicas eletroquímicas (teste de polarização potenciodinâmica e espectroscopia de impedância eletroquímica) de filmes de DLC (obtido por PACVD) sobre aço 316L (KIM et al, 2005b) e Ti-6Al-4V (KIM et al, 2005a) também foram estudados. Nos dois casos o material revestido com filme de DLC apresentou melhor resistência à corrosão do que o não revestido.

Chen, Conrad & Dodd (1995) estudaram a corrosão, por polarização anódica, de DLC obtido por IIP de metano sobre aço inox 304 e Ti-6Al-4V. Para o aço inox 304 em solução de 0.1 NH₂SO₄, notou-se que a taxa de corrosão diminuiu em relação à amostra não tratada. A corrosão do Ti-6Al-4V em solução de Hanks praticamente não se alterou.

2.4.2.3. Biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*

Os testes de biocompatibilidade são de extrema importância no desenvolvimento de um material para implante, e apresentam-se como um conjunto de medidas que permite caracterizar corretamente o desempenho biológico de um material e estabelecer critérios para identificação, eliminação ou determinação de limites toleráveis de reações adversas, com relação a um determinado material ou dispositivo. Vários estudos de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados, e demonstrado que o revestimento de DLC adere bem a vários biomateriais e nenhuma resposta tóxica ou inflamatória, e nem perda de integridade celular, foram verificadas.

Avaliação de biocompatibilidade através de citotoxicidade (*in vitro*)

O objetivo do teste de citotoxicidade é detectar o quanto um material ou dispositivo é tóxico para a célula (NORTHUP, 1996). Existem diferentes protocolos padrões já estabelecidos para os testes de citotoxicidade, dentre os quais:

- ASTM F 813-83: Método de contato direto para avaliação de materiais e dispositivos médicos frente à cultura de células;
- ASTM F 895-84: Método de difusão em ágar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade; e
- ISO 10993-5: Avaliação biológica de dispositivos médicos – Parte 5: Testes para citotoxicidade: métodos *in vitro*.

Além de aspectos referentes ao procedimento, os padrões normalmente especificam a linhagem celular, o meio de cultura e as técnicas para avaliação de citotoxicidade. Além disso, todos os protocolos padrões prevêm a utilização de controle positivo e negativo, e especificam os materiais a serem utilizados. Controle positivo é uma substância que apresenta efeito citotóxico de maneira reprodutível e controle negativo é o material ou substância que não produz efeito citotóxico.

Existem três possibilidades para o teste de citotoxicidade: o teste por eluição*, o teste por difusão em agar**, e o teste por contato direto (descritos com detalhes na norma ISO 10993-5):

- No teste por eluição, prepara-se um extrato do material, que é adicionado, em concentrações variadas, às células em cultura. O parâmetro de avaliação, em geral, é a inibição do crescimento das culturas celulares.
- No teste por difusão em agar, uma quantidade do material sob teste é colocada sobre uma camada de agar que recobre uma monocamada confluyente de células. Caso substâncias tóxicas sejam liberadas pelo material, estas se difundem através da camada fina de agar, matando ou rompendo células da monocamada confluyente.
- No método por contato direto, uma quantidade do material, sob teste, é colocada diretamente sobre uma monocamada de células em cultura, e é recoberta com uma película de meio de cultura. A liberação de substâncias tóxicas pelo material pode lesar as células ou reduzir a taxa de crescimento da cultura. Este foi o método utilizado neste trabalho.

A elevada sensibilidade do teste é devida ao ambiente controlado das células em cultura, onde não estão presentes os mecanismos de proteção celular existentes no sistema biológico. Entretanto, os resultados dos testes de citotoxicidade são um indicador primário de compatibilidade biológica e não eliminam a necessidade dos testes *in vivo*, concebidos para interações específicas. Para ser aprovado num teste de citotoxicidade *in vitro*, um material não deve causar a morte das células e nem afetar as suas funções celulares. Assim, com o uso da técnica de cultura de células, os testes podem detectar se ocorreu a morte de células, a inibição do crescimento celular, e outros efeitos que possam ser causados nas células pelo material e/ou extrato oriundo do material. A avaliação de citotoxicidade pode ser feita através da morfologia celular, da integridade da membrana celular (pela utilização de métodos com corantes vitais ou não), da proliferação celular, etc (KIRKPATRICK et al, 1998).

* Método de separação de materiais químicos através de lavagem por um eluente (geralmente a água); um determinado material que possua em sua composição substâncias hidrossolúveis e não hidrossolúveis, ao ter contato com a água, irá liberar seletivamente aquelas que são solúveis na água ou sangue (eluato).

** Alga marinha do gênero *Gelidium*, utilizado como um meio solidificante para culturas de bactérias, células, etc

Avaliação da biocompatibilidade através da implantação em animais (*in vivo*)

A maneira mais eficiente de conhecer os efeitos causados, na interface implante/tecido, por um material ou dispositivo, é a implantação desse material em um animal de laboratório. A norma ISO 10993-6 recomenda o uso de amostras do material ou pequena porção do dispositivo com dimensões adequadas, esterilizadas e implantadas sob condições assépticas. Após um período de tempo que pode variar de algumas semanas até meses, os sítios de implantação são examinados microscopicamente. A atenção do teste está centrada inteiramente na observação dos efeitos locais (nos tecidos adjacentes), surgidos como resposta à presença do material em contato íntimo com o tecido vivo.

Para a maioria dos materiais, o teste de implantação é realizado em músculo esquelético mas, a norma ISO relata que, para certos tamanhos e formatos de materiais e para certos dispositivos, dependendo do tipo de utilização, podem ser realizados testes de implantação no tecido subcutâneo ou ósseo.

O DLC é conhecido por ser quimicamente inerte, e o primeiro aspecto a ser investigado, quando se considera o seu uso como implante, é a interação com o organismo. A grande variedade nas características dos diferentes filmes de DLC e a diversidade nos métodos de caracterização, torna difícil uma comparação da biocompatibilidade desses filmes. Dados de curta duração, obtidos por experimentos *in vitro* e *in vivo*, indicam a biocompatibilidade deste revestimento (GRILL, 2003; HAUERT & MÜLLER, 2003), não havendo até o momento nenhum resultado contraditório. No entanto, a investigação de sua performance biológica em experimentos de longa duração é necessária, antes de ser utilizado em aplicações práticas. A seguir, alguns resultados da literatura.

Resultados *in vitro* com os filmes de DLC:

Muitos estudos de biocompatibilidade, *in vitro* com o DLC, foram feitos com o filme revestindo diversos materiais, em ambientes simulando o meio ambiente corpóreo. Esses ambientes incluem macrófagos (células que envolvem corpos estranhos), fibroblastos (células formadoras de tecido conectivo), e osteoblastos (células formadoras de osso), que são células

derivadas de tecidos que circundam um implante osteoarticular. Os estudos de resposta celular incluem taxa de proliferação, viabilidade, adesão celular, diferenciação, morfologia celular e arquitetura do citoesqueleto.

Estudos *in vitro* de interação de fibroblastos ou macrófagos de ratos com o DLC, depositado sobre placas de cultura celular, disco de poliuretano, e membranas de policarbonato (THOMSON et al, 1991; EVANS, FRANKS & REVEL, 1991; PARKER et al, 1994, respectivamente) tem mostrado que o DLC não induz reações inflamatórias, e que as células apresentam características normais de proliferação e crescimento.

Teste *in vitro*, utilizando fibroblastos, mostrou que o DLC depositado em Ti-6Al-4V tem baixo nível de citotoxicidade e atua como uma barreira efetiva de difusão entre a liga e as células fibroblásticas. Por outro lado, a liga não revestida causou a morte de muitas células (DOWLING et al, 1997). A adesão e dispersão celular de fibroblasto humano sobre revestimento de DLC (depositado sobre aço inoxidável) foram verificadas, comprovando a biocompatibilidade do DLC.

O comportamento morfológico de osteoblastos foi estudado por Butter et al (1995) e Du et al (1998) com DLC depositado sobre vidro (com camada intermediária de silício para melhorar a adesão) e sobre silício, respectivamente. Notou-se que o desenvolvimento morfológico das células nos revestimentos foi similar ao controle, indicando a biocompatibilidade do DLC.

Allen, Myer & Rushton (2001) estudaram o revestimento de DLC, depositado por processo baseado em feixe de íons, sobre placas de poliestireno para cultura de tecido, utilizando duas linhagens celulares tipo-osteoblasto. Mediram a produção de três proteínas marcadoras específicas de osteoblastos: alcalino fosfatase, osteocálcio e colágeno tipo I, por um período de até 72 horas, e foi notado que o DLC não teve qualquer efeito adverso em qualquer dos parâmetros medidos.

Rodil et al (2003) estudaram a resposta biológica de filmes de DLC, depositados sobre aço inox, utilizando “magnetron sputtering”. Foi verificada a biocompatibilidade através de adesão e proliferação celular (culturas de osteoblastos e fibroblastos) por estudos *in vitro*.

Enquanto muitos estudos investigam a biocompatibilidade do DLC com relação a uma população celular, Linder, Pinkowski & Aepfelbacher (2002) investigaram o comportamento de uma célula unitária sobre o revestimento de DLC (depositado sobre vidro). A adesão, arquitetura do citoesqueleto e ativação de macrófagos e seus monócitos precursores (monócitos do sangue) não foram significativamente alterados, por crescer sobre a superfície do DLC. Isso sinaliza uma boa biocompatibilidade do DLC. O estudo dos monócitos do sangue é importante porque estes controlam reações inflamatórias e podem afetar a osteointegração.

Segundo Gutensohn et al (2000), o revestimento de stents coronarianos, de aço inox 316L, com o DLC melhora significativamente a biocompatibilidade com o sangue (estudo *in vitro*), e o DLC pode, portanto, contribuir para a redução da trombogenicidade. O estudo mostrou que o DLC não afeta a taxa de proliferação de células musculares lisas e de células endoteliais, e não tem efeito citotóxico. Num equipamento de fluxo contínuo, a análise revelou que a ativação de plaquetas foi menor com stents revestidos com DLC, do que o não revestido. Análise de espectroscopia de adsorção atômica revelou que nos stents não revestidos houve liberação de íons de níquel e cromo, após 96 horas no plasma humano, enquanto no stent revestido com DLC houve uma concentração mínima de liberação de íons.

O DLC também pode ser utilizado como revestimento de válvulas cardíacas. Os filmes de DLC (por ensaio de hemocompatibilidade *in vitro*), têm mostrado resultados biológicos satisfatórios (JONES et al, 1999, 2000; LENG et al, 2003), com resultados próximo ao de carbono LTI (ZHENG et al, 1991; YANG et al, 2003; YU et al, 2000). Por exemplo, no trabalho de Yu et al (2000) a hemocompatibilidade do taC foi medida usando taxa de hemólise (decomposição do sangue) e observado a adesão de plaquetas à sua superfície. O resultado mostrou que o taC tinha melhor propriedade de anticoagulação do que carbono pirolítico isotrópico de baixa temperatura, que está sendo usado atualmente como material para válvula

cardíaca. Em um outro trabalho, Cui & Li (2000) estudaram a hemocompatibilidade do DLC e do carbonitreto (CN) depositados em PMMA, um material usado para lentes intra-oculares, e verificaram que o DLC e o CN têm melhor compatibilidade com o sangue do que o PMMA (CUI & LI, 2000).

Assim como as propriedades mecânicas do DLC podem mudar com a incorporação de elementos, o mesmo ocorre com as propriedades biológicas. O comportamento biológico é fortemente influenciado pela composição química da superfície, portanto reações biológicas podem ser induzidas pela modificação da superfície. O DLC como material biocompatível pode ser “ligado” com outros materiais biocompatíveis como o titânio ou o silício. Variando a concentração do elemento, podem-se variar as reações biológicas, indo das propriedades do DLC chegando às dos elementos adicionados (HAUERT & MULLER, 2003). A adsorção de proteínas pode ser alterada em função do conteúdo de titânio no DLC, e a diferenciação de células de reabsorção óssea (osteoclastos) pode ser inibida (SCHROEDER et al, 2000).

Para aplicações onde nenhuma célula ou bactéria deve aderir à superfície - cateteres, sensores e implantes temporários -, a proliferação e diferenciação celular podem ser inibidas com filmes de DLC contendo elementos citotóxicos, como prata, ouro ou vanádio. Quando esses filmes são expostos ao meio biológico, os elementos metálicos são liberados aos poucos, em alguns dias ou semanas, e causam reações adversas nas células aderidas à superfície, evitando a sua permanência na superfície (HAUERT & MÜLLER, 2003).

Quando se introduz um revestimento no corpo, a adesão do revestimento tem que ser perfeita. **No caso de delaminação**, as partículas delaminadas não podem causar qualquer reação tóxica ou inflamatória. Materiais que são bem tolerados na forma “bulk” podem, na forma de partículas, induzir reações adversas. Schroeder, em 1999, estudou as partículas de DLC, *in vitro*, e verificou que as células envolveram muitas dessas partículas, mas a aparência dessas células não foi diferente das outras células, após 7 dias. A exposição às partículas de DLC não teve qualquer efeito na atividade das células, nem na sua proliferação ou diferenciação, indicando que

mesmo que haja delaminação do DLC no corpo, nenhuma reação tóxica ou inflamatória é esperada (HAUERT & MÜLLER, 2003).

Resultados *in vivo* com os filmes de DLC

O número de estudos *in vivo* informados na literatura é significativamente menor do que os estudos *in vitro*. A seguir, alguns resultados:

Para verificar a reação do organismo à partículas que são liberadas pelos implantes, Aspenberg et al (1996) realizaram testes em câmaras de crescimento ósseo (estudo *in vivo*) em coelhos, e notou que partículas de diamante não causam reações no tecido e não diminuem o crescimento ósseo se comparado com partículas de PEUAPM, cimento ósseo e cromo-cobalto.

Uma indicação da biocompatibilidade *in vivo* de DLC foi feita com DLC revestindo pinos ortopédicos implantados em ovelhas. Este trabalho visava resolver o problema da retração do tecido ao redor dos pinos. Houve indícios de que o DLC reduziu o problema de retração do tecido e infecções relacionadas (LETTINGTON, 1991).

Teste *in vivo*, após 52 semanas, com DLC revestindo disco de aço inoxidável 316L (5 mm de diâmetro por 1 mm de espessura) no tecido subcutâneo, músculo, e tibia de porcos, resultou na formação de uma fina cápsula de tecido conectivo através de fibrócitos e fibras colágenas. Nenhuma reação fagocitária foi observada e nenhum produto de corrosão foi encontrado, e os órgãos internos não mostraram qualquer mudança morfológica ou patológica. A investigação histopatológica mostrou uma boa biotolerância do implante revestido e mostrou que o revestimento é uma proteção eficiente contra a corrosão e reações inflamatórias crônicas (MITURA et al, 1994).

O teste *in vivo* de Dowling et al (1997) foi feito com cilindros de aço inox (comprimento de 12 mm por 4 mm de diâmetro) revestidos com HDLC, implantados em osso cortical e tecido muscular de ovelhas. Os implantes foram analisados após 4 semanas e outros após 12 semanas e,

em todos os casos, a reação foi mais favorável aos implantes revestidos com DLC do que sem DLC. Além disso, não houve efeitos macroscópicos adversos no osso ou tecido muscular.

Allen, Myer & Rushton (2001) realizaram estudos *in vivo* com DLC, implantando cilindros de cromo-cobalto em tecido intramuscular de ratos e intracorticais de ovelhas. Após 90 dias, análises histológicas mostraram que os cilindros revestidos com DLC foram bem tolerados em ambos os casos.

Tiainem (2001) estudou o DLC com a implantação de hastes de titânio (normalmente utilizados quando os ossos são quebrados e reparados cirurgicamente) no osso da coxa de ratos e a reação local foi mais favorável do que na haste sem revestimento. As camadas fibrosas ao redor dos implantes revestidos com DLC foram muito mais finas, embora o DLC não seja bioativo. Cápsulas fibrosas finas geralmente indicam boa ligação com o osso. Experimentos iniciais com implante de quadril em coelhos e implantes de dentes em cachorros mostraram resultados similares.

Dispositivos para fixação de fraturas revestidos com DLC, e implantados no corpo humano foram relatados em 1996 por Zolynski et al (GRILL, 2003). Hastes de aço inox revestidas com DLC, foram implantadas, por 7 meses, para fixar um osso fraturado. O revestimento evitou a corrosão da haste, a metalose (liberação de íons de metal), e, conseqüentemente, preveniu inflamação, recuperando uma fratura óssea complicada.

2.4.2.4. Atrito e desgaste^{*}

Existem diversos equipamentos para analisar as propriedades tribológicas, sendo o mais comum o tribômetro pino-disco^{**} (“pin-on-disk”). O tribômetro pino-disco é um equipamento mecanicamente simples, cujo princípio de funcionamento se baseia no posicionamento de um pino estacionário sobre um disco que possui movimento de rotação unidirecional. Os discos têm faces planas e os pinos possuem extremidade de contato hemisférica ou plana. A escolha do tipo de extremidade de contato se faz conforme os objetivos e tipo de material em estudo.

A colocação de pequenas massas concentricamente com o eixo do pino determina a carga normal aplicada. Uma célula de carga impede o movimento de arrastamento do sistema porta pinos em torno do eixo vertical, impondo uma força de reação igual à força de atrito. A leitura do sinal de saída da célula de carga permite medir o valor da força de atrito. A máquina é controlada automaticamente por computador, através de um programa que gera a aquisição e armazenamento dos dados. Assim, antes do início de cada teste, são estabelecidos os parâmetros: duração (s) e velocidade de rotação do disco (m/s). Selecionam-se também os parâmetros que se deseja adquirir, como força de atrito^{***}, distância de deslizamento, temperatura ambiente e do disco, desgaste linear, etc. Além disso, é possível estabelecer a frequência de aquisição de dados, duração e eventual pausa na aquisição.

* Obs.: A ciência ou a tecnologia das superfícies que se interagem em movimento relativo é chamada de **Tribologia** (da palavra grega “Tribus”, que significa atritamento). Esse estudo se concentra principalmente na resistência ao desgaste e no coeficiente de atrito. O **desgaste** é definido como: “perda progressiva de material da superfície operacional de um corpo, como resultado do movimento relativo desta”, ou em outras palavras: é a remoção de material de um sólido como consequência de ação mecânica. A força de fricção ou **atrito** pode ser definida como a resistência encontrada por um corpo em mover-se sobre outro. A relação entre a força normal e a resultante de atrito é conhecida como coeficiente de atrito.

** O tribômetro pino-disco é o mais utilizado, mas não é o mais adequado para implantes utilizados em artroplastia de quadril. Por sua característica unidirecional, deixa de avaliar as consequências oriundas de uma cinemática tipo cisalhamento cruzado, que domina o ambiente tribológico do quadril. Quando se movimentam unidirecionalmente um pino sobre o PE, o PE apresenta cerca de 10 a 100 vezes mais resistência ao desgaste do que quando se utiliza um padrão cruzado.

*** O coeficiente de atrito, μ , é calculado pelo quociente entre a força tangencial de atrito (F_a), desenvolvida no contato e o valor da carga normal aplicada (W), isto é, $\mu = F_a/W$

Uma das principais razões do sucesso do DLC é seu baixo coeficiente de atrito contra diversos materiais - aço, materiais cerâmicos e alguns polímeros -. A baixa taxa de desgaste, da ordem de 10^{-9} mm³/Nm, que pode ser encontrada em filmes de DLC é geralmente atribuído à combinação de alta dureza e baixo coeficiente de atrito (entre 0.05 a 0.2 no ar).

Lifshitz (1999) citou algumas medidas de desgaste realizadas por diferentes procedimentos e comparou aos valores de desgaste de uma variedade de materiais duros. A resistência ao desgaste do taC (carbono tetraédrico) é menor por um fator de 290, 230, 60 e 40, comparado a alumina, SiN, WC-Co e SiC, respectivamente. E diminuiu por um fator de 100 e 60, se comparado à WC e zircônia, respectivamente. Porém, o comportamento real sob contato tribológico é extremamente complexo. Sob vácuo ou ambiente seco, valores abaixo de 0.05 têm sido medidos (JARRAT et al, 2003). Dependendo das condições de deposição, o revestimento de DLC não é igual e pode comportar-se diferentemente. Além disso, as condições tribológicas usadas em um experimento podem influenciar os resultados obtidos (DONNET & GRILL, 1997; ERDEMIR et al, 1999; VERCAMMEN et al, 2000). Portanto, os dados tribológicos apresentados são válidos especificamente para o filme de DLC estudado (HAUERT & MÜLLER, 2003).

Devido à natureza complexa dos contatos tribológicos e também da grande variedade de propriedades dos filmes de DLC, com freqüência resultados aparentemente contraditórios são publicados por diferentes autores. Por exemplo, Gangopadhyay em 1998, mostrou que o DLC, depositado por CVD assistido por plasma de RF, tem coeficiente de atrito que depende fortemente da polarização do substrato e que é independente da pressão de contato (0.8-1.7 GPa) e independente da velocidade de deslizamento (0.02-0.9 m/s). Por outro lado, Ronkainen et al (2001) estudaram filmes de DLC, obtidos pelo mesmo processo, com coeficiente de atrito fortemente dependente da velocidade de deslizamento (0.02-3.0 m/s) e da força normal aplicada (5-40 N para esferas de aço com 10 mm de diâmetro), e também uma diminuição do coeficiente de atrito para aumento da carga normal e velocidade de deslizamento. Essas diferenças não são somente devido aos diferentes parâmetros investigados, mas também devido aos diferentes meios de deposição do filme e detalhes na caracterização tribológica (HAUERT & MÜLLER, 2003).

Como o DLC apresenta excelentes propriedades tribológicas no ar, ele é um forte candidato para proteger articulações artificiais (implantes permanentes) do desgaste. Uma revisão de diferentes materiais e tratamentos de superfícies, usados em superfícies de deslizamento para substituição de articulação humana, foi publicada por Dearnaley (1999).

Há vários trabalhos informando experimentos tribológicos, utilizando um equipamento de pino-disco ou simulador de quadril, para determinar o atrito e desgaste de DLC revestindo cabeça femoral de implante de quadril contra PEUPAM ou de articulação metal/metal com um ou ambos os lados revestidos com DLC. Na Figura 2.23 pode ser visto um resumo de ensaios de desgaste (adaptado de TIAINEM, 2001).

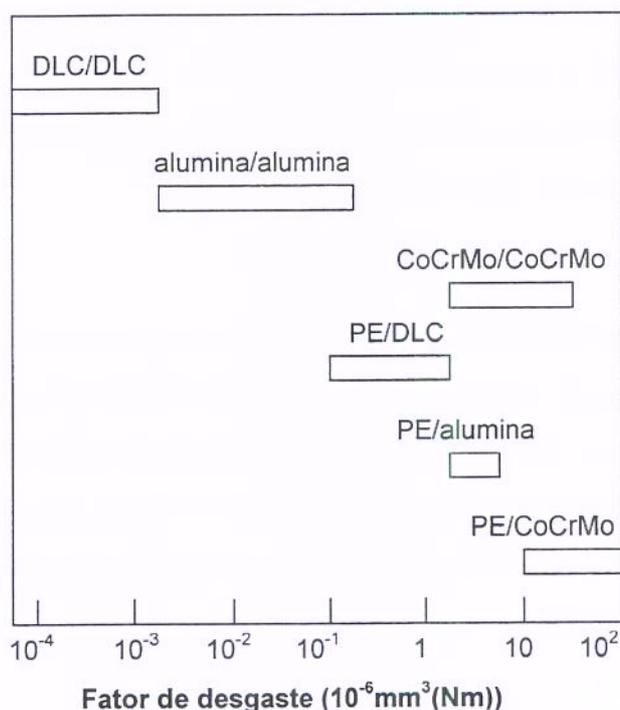


Figura 2.23. Resumo de ensaios de desgaste (adaptado de TIAINEM, 2001).

Vários autores informaram uma diminuição do desgaste do PEUPAM pelo revestimento da parte metálica com DLC. Alguns desses experimentos foram feitos usando como lubrificante água destilada ou 1 % em peso de NaCl em água (DOWLING et al, 1997; TIAINEM, 2001; LAPPALAINEM et al, 1998; OÑATE et al, 2001; DONG, SHI & BELL, 1999). Em alguns

trabalhos a comparação foi feita com cabeça femoral de cerâmica, e notou-se que o metal revestido com DLC tem comportamento similar.

A seguir estão relatados resultados de ensaios de desgaste voltados à articulações de implantes ortopédicos. Foi tomado o cuidado de informar o processo de deposição utilizado, quando houver, pois as propriedades do DLC podem variar com o método de deposição, parâmetros do processo, e condições de teste.

Através de testes com pino-disco, Xu & Pruitt (1999) e Dorner et al (2001) estudaram o DLC como revestimento de Ti-6Al-4V (DLC com estrutura multicamada obtido por plasma a arco em vácuo, e DLC obtido por descarga DC utilizando benzeno como precursor, respectivamente). Os resultados mostraram considerável redução no nível de desgaste do componente de PEUAPM e diminuição na formação de “debris”. No estudo de Dorner et al (2002) foi verificado também que a resistência ao desgaste com revestimento de DLC aumenta de 8-10 vezes em comparação com o metal não revestido.

Huang et al (2001) estudaram o DLC (obtido por plasma de hidrocarboneto gerado por RF) depositado sobre Ti-6Al-4V, através de ensaio recíproco. Obteve boa adesão, mas o filme delaminou no estágio final, indicando a necessidade de melhora na resistência ao desgaste. O atrito foi sensível ao ambiente úmido e teve valor alto (0.4) em umidade relativa menor que 10 por cento. Imerso na água, o atrito foi abaixo de 0.1, indicando que teria um bom comportamento em ambiente de fluido corporal.

No estudo de Dong, Shi & Bell (1999) o DLC (obtido por “magnetron sputtering”) revestindo Ti-6Al-4V, com água destilada como lubrificante reduziu o desgaste do PEUAPM. Os autores compararam também a implantação por feixe de íons de nitrogênio, oxidação térmica e difusão de oxigênio, que também melhoraram a resistência ao desgaste.

Affatato, Frigo & Toni (2000) compararam a resistência ao desgaste de PEUAPM com cabeças femorais de aço inox 316L, Co-Cr-Mo, alumina e DLC revestindo Ti-6Al-4V (obtido por

CVD assistido por plasma de RF), utilizando um simulador de quadril, com soro bovino como lubrificante. O desgaste do PEUAPM acoplado com cabeça femoral de Ti-6Al-4V revestida com DLC obteve desempenho igual ao obtido com cabeça femoral de alumina, que possui a menor taxa de desgaste. Nesse caso, o Ti-6Al-4V revestido com DLC poderia ser usado na cabeça femoral, ao invés da alumina, que, por ser difícil de ser fabricada, custa mais caro.

Dowling et al (1997) realizaram testes em simulador de quadril (6 milhões de ciclos) com cabeça femoral de aço inoxidável revestido com HDLC (obtido através de acetileno por “saddle field source”) imerso em água destilada e em contato com componentes acetabulares de PEUAPM. O desgaste do componente de PEUAPM contra cabeça femoral revestida com HDLC foi significativamente menor do que contra o não revestido, e comparável ao observado com cabeça femoral de zircônia. Após 1 milhão de ciclos, a água destilada foi filtrada (filtro com 10 e 0.1 μm) e um exame microscópico mostrou somente partículas de PEUAPM, mas nenhuma partícula associada com o DLC foi observada. A redução no desgaste, observado em PEUAPM em contato com a cabeça revestida com DLC, está associada à baixa rugosidade e ao baixo atrito da superfície do implante revestido.

Oñate et al (2001) estudaram o comportamento em relação ao desgaste do revestimento de DLC e TiN e também a implantação de íons de nitrogênio (por feixe de íons), quando aplicados sobre Co-Cr-Mo e articulados contra PEUAPM. Utilizou um simulador de joelho que utiliza uma combinação de rolagem-deslizamento, que corresponde a uma situação não favorável ao joelho. Cabeças femorais de Co-Cr-Mo, Co-Cr-Mo revestido, Co-Cr-Mo implantado com íons de nitrogênio e cabeças femorais de alumina, foram analisadas após 5 milhões de ciclos (que corresponde a 3 anos de vida do implante). Água destilada à $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ foi utilizada como lubrificante. Os resultados mostraram que o revestimento de DLC e a implantação iônica resultam na redução do desgaste do PEUAPM, similares ao da alumina, que por sua vez é aproximadamente 5 vezes menor do que o Co-Cr-Mo sem tratamento. Portanto o revestimento de DLC ou a implantação de íons de nitrogênio são dois bons tratamentos para reduzir o desgaste do PEUAPM em articulações de implante de quadril e joelho, e podem substituir os materiais cerâmicos, que são mais caros. Já a utilização de nitreto de titânio (TiN), obtido pelo processo de

“ion plating”, não obteve bons resultados, aumentando em 5 vezes o desgaste do PEUAPM, se comparado ao Co-Cr-Mo sem revestimento.

Tiainen (2001) em um estudo por pino-disco, do PEUAPM contra Co-Cr-Mo revestido com taC (obtido por arco pulsado com plasma de carbono filtrado) encontrou redução no desgaste de no mínimo 10 vezes, e o atrito, nas mesmas condições, publicado em outro trabalho de seu grupo de pesquisa (LAPPALAINEN, ANTTILA & HEINONEN, 19998) foi de aproximadamente 0.03, próximo de uma articulação natural. Os testes mostraram também que o DLC em superfícies de deslizamento, protege o substrato contra ranhuras provocadas por debris de PMMA. O desgaste do componente acetabular de PEUAPM contra cabeça femoral de Co-Cr-Mo, e Co-Cr-Mo revestido com DLC, utilizando um simulador de quadril, obteve os seguintes coeficientes de atrito: 0.17 e 0.10, respectivamente. Neste caso não houve melhora no coeficiente de atrito, mas o autor argumenta que o valor pode ser diminuído para valores próximos de 0.03, como os já obtidos em análises por “pino-disco”. Isso pode ser conseguido, por exemplo, através da deposição de um filme mais suave, acrescentando uma filtragem de partículas na deposição, ou polimento do filme. O autor estudou também o conjunto: “metal/metal”, “metal revestido/metal”, e “metal revestido/metal revestido”, obtendo os seguintes coeficientes de atrito: 0.22, 0.17, 0.07, respectivamente, onde o metal é Co-Cr-Mo, e o revestimento é DLC. No entanto, o conjunto “metal/metal” não é muito usado devido a problemas que podem surgir quando um metal articula contra outro. No caso de “metal revestido com DLC/metal revestido com DLC”, pode ser uma boa sugestão desde que o filme esteja bem depositado e não ocorram problemas de delaminação ou falha na adesão do filme.

Atualmente uma companhia francesa (M.I.L. SA) está comercializando uma articulação revestida com DLC e uma empresa americana, a “Morgan Advanced Ceramics”, comercializa uma cabeça femoral revestida com DLC.

Capítulo 3

Análise experimental

Neste capítulo são apresentados os tipos de ensaios realizados e a metodologia adotada para o desenvolvimento deste trabalho, que compreende a deposição do revestimento de DLC, caracterização da microestrutura, morfologia da superfície, propriedades mecânicas (nanodureza e adesão por teste de puxamento, ou *pull-test*), resistência à corrosão e biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*. A Figura 3.1 mostra um esquema dos procedimentos realizados neste trabalho.

Dependendo do tipo de experimento, foram utilizados substratos de silício polido (espelhado), lamínulas de vidro (Corning®, próprio para cultura de células), e substratos de liga de titânio Ti-13Nb-13Zr (ASTM F-1713). Os substratos tiveram formatos diferentes, conforme a exigência de cada ensaio. Para a caracterização da microestrutura, propriedades mecânicas e ensaios biológicos *in vitro*, com substratos metálicos, foram utilizados discos com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. A avaliação biológica *in vitro*, com substrato de vidro, foi feita com lamínulas da Corning® de 13 mm de diâmetro e 0.5 mm de espessura. A avaliação biológica *in vivo* foi feita com pinos de 1 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento. O ensaio de corrosão foi feito com discos de 15 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. O número de amostras utilizadas está descrito em cada ensaio em particular.

As amostras metálicas foram polidas com lixa (2400), e pasta de diamante (1 µm), e limpas com acetona em banho ultra-sônico por 20 min. Como exemplos de revestimento de substratos tridimensionais de formas complexas, filmes de DLC foram depositados em implantes de joelho e quadril, titânio poroso (esponja expandida a vácuo, semelhante à estrutura do osso esponjoso), facas industriais, bisturi cirúrgico, engrenagem de motor, tubos, e outros objetos.

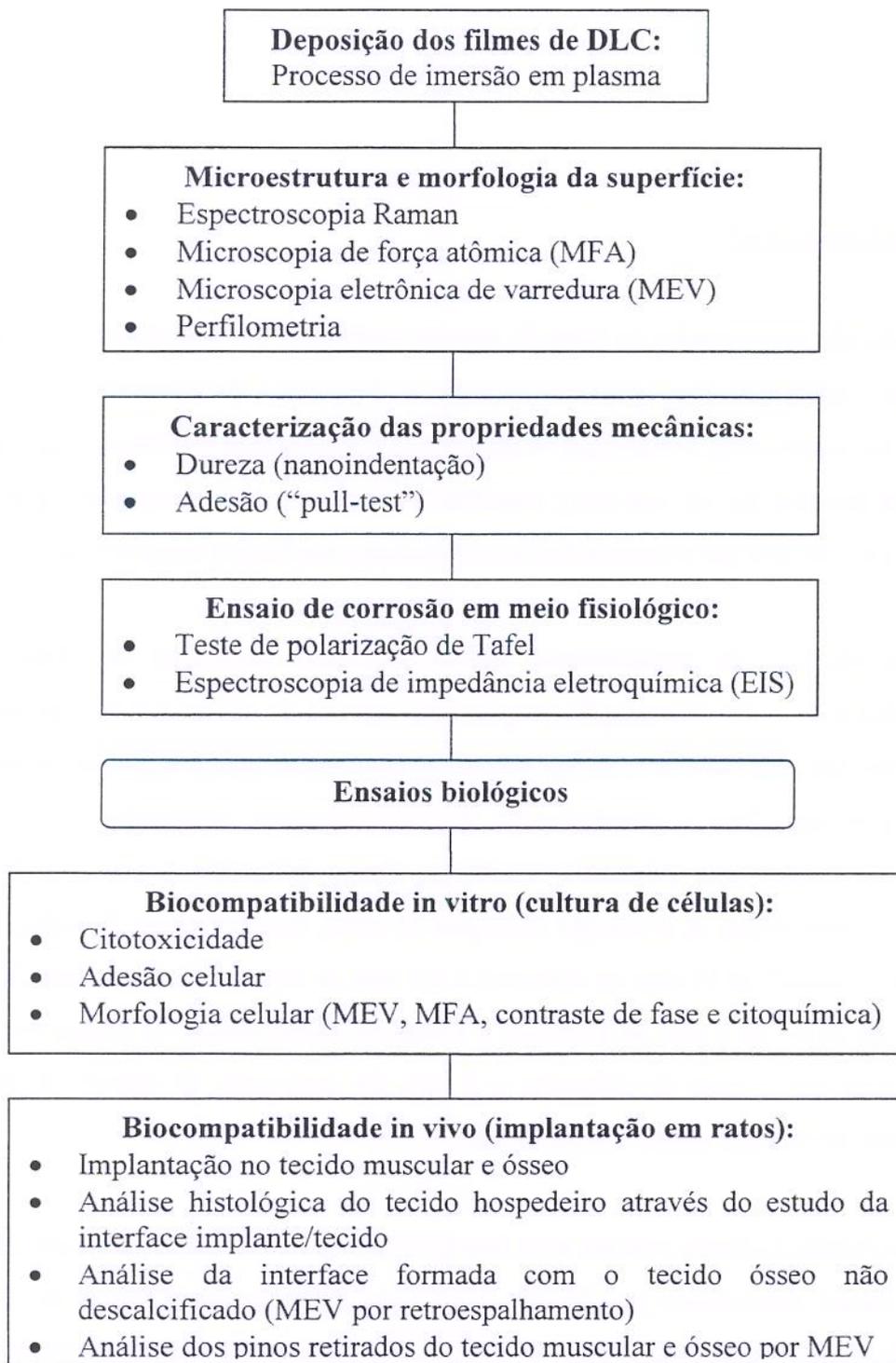


Figura 3.1. Esquema dos ensaios realizados para a caracterização dos filmes de DLC.

3.1. Deposição de DLC pelo processo de imersão em plasma

O **Processo de Imersão em Plasma** (plasma frio) para deposição de DLC, desenvolvido por Carlos Salles Lambert (Departamento de Física Aplicada, Instituto de Física Gleb Wataghin UNICAMP), e utilizado neste trabalho, é um novo processo que está em fase de patenteamento e que pode ser incluído na família das técnicas já conhecidas de “Implantação Iônica por Imersão em Plasma e Deposição” (IIIP&D - Cap. 2.3.2). O equipamento utilizado no trabalho foi desenvolvido totalmente no Brasil, e pode ser facilmente implementado em empresas nacionais. Superfícies rugosas, estruturadas ou com nanotopografias também podem receber o revestimento, sem perda de sua topografia original.

O equipamento (Fig 3.2) possui um sistema de alto vácuo, uma fonte de potência e um reator de aço inoxidável 304, onde é feita a deposição. A fonte de potência tem uma saída **DC negativa pulsada**¹, que é acoplada ao porta-substrato (suporte para fixação das peças a serem revestidas). O sistema possui ainda um medidor de alto vácuo tipo Penning (até 10^{-7} Torr), e um medidor de membrana capacitiva – MKS - (até 100 Torr). A temperatura das peças é controlada com um termopar tipo K. Os gases – argônio e metano – são introduzidos no reator através de uma válvula agulha para alto vácuo – VL10 Edward.

Preparação das amostras para revestimento:

As amostras de Ti-13Nb-13Zr foram previamente polidas com lixa (2400) pasta de diamante (1 μm), e limpas com acetona PA em banho ultra-sônico por 20 minutos (3 vezes, com troca da acetona), e por último, banho ultra-sônico por 20 minutos com álcool isopropílico PA (3 vezes, com troca do álcool). Em seguida, as amostras foram colocadas em vácuo (10^{-6} Torr), e submetidas à uma “decapagem iônica”, isto é, foram bombardeadas com íons de argônio (plasma

¹ Por muitos anos, a fonte de potência DC tem sido usada para a geração de descarga luminescente. A descarga luminescente está na região de descarga anômala, que pode ser instável e mudar para uma descarga a arco. Na década de 80 a potência DC pulsada foi introduzida para gerar a descarga luminescente, pois possui algumas vantagens em relação à DC: a temperatura do tratamento pode ser variada sem alterar os parâmetros do plasma, tal como a voltagem aplicada aos eletrodos, através da mudança na duração do pulso e tempo de repetição (frequência); a mudança de uma descarga anômala para uma descarga em arco pode ser suprimida; a “camada luminescente” segue o contorno da peça, até mesmo em orifícios estreitos e fendas profundas, se a pressão correta é usada; uma descarga pode ser feita sem ocorrência de dano, como resultado do superaquecimento, se a duração do pulso e tempo de repetição forem escolhidos adequadamente (RIE, 1999).

de argônio em uma pressão de 10^{-2} Torr) para remoção de toda camada de óxido da superfície da liga. Em seguida introduziu-se metano até atingir a pressão de trabalho e foi estabelecido o plasma para realizar a deposição, que durou 1 hora. A temperatura foi mantida em 300° C. A espessura foi controlada pelo tempo de deposição, de acordo com os parâmetros do processo. O equipamento já havia sido caracterizado em trabalhos anteriores (ERENO, 2005).

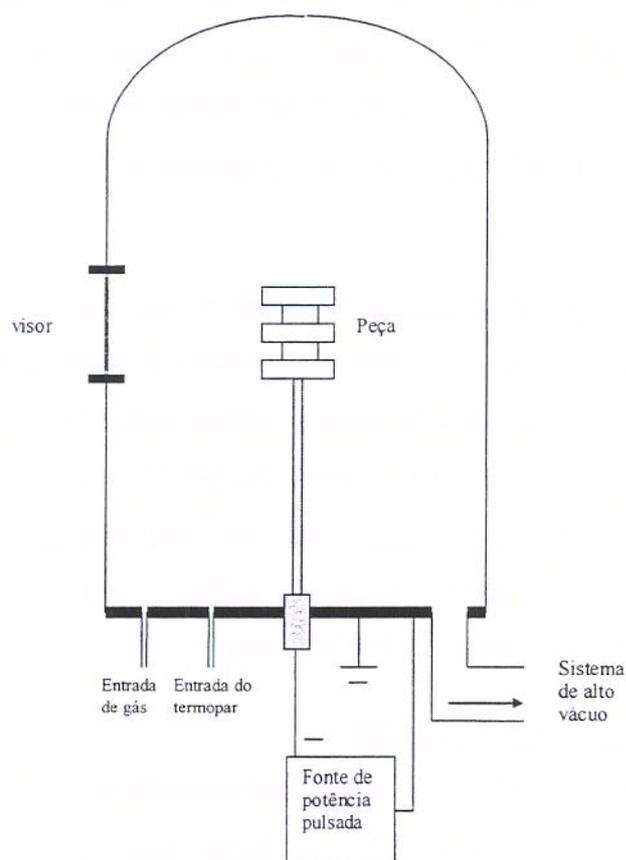


Figura 3.2. Representação esquemática do equipamento de imersão em plasma utilizado.

A Figura 3.3 mostra os substratos utilizados no trabalho: lamínulas de vidro da Corning (próprio para cultura celular) de 13 mm de diâmetro, discos de Ti-13Nb-13Zr de 6 mm de diâmetro, e cilindros (bastões) de 1 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento. E a Figura 3.4, um par de cada material, com e sem revestimento de DLC, sobre placas de Petri. O número de amostras utilizadas está descrito em cada ensaio em particular. A caracterização do filme de DLC é apresentada no Capítulo 4.2.

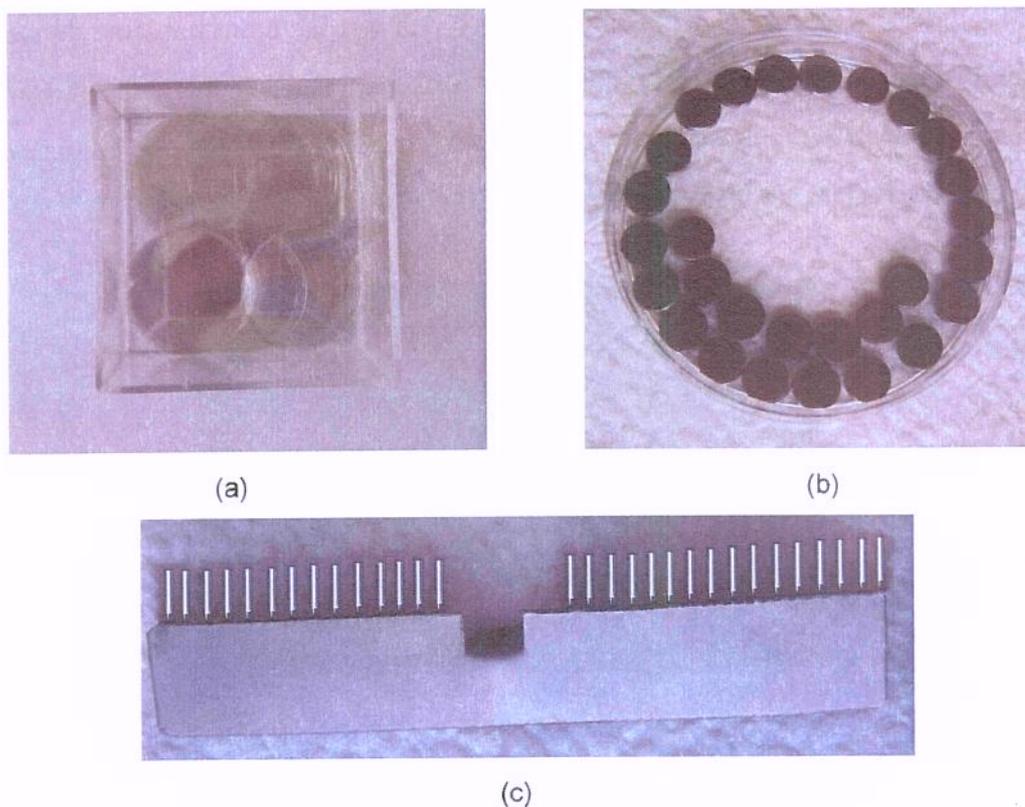


Figura 3.3. Substratos utilizados no trabalho: (a) lamínulas de vidro da Corning; (b) discos de Ti-13Nb-13Zr; (c) pinos de Ti-13Nb-13Zr sobre um suporte de titânio.

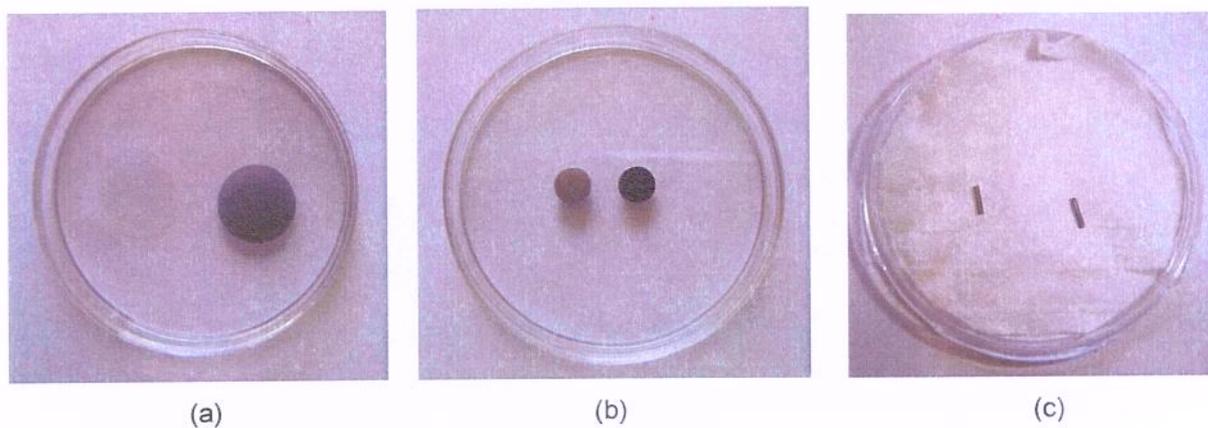
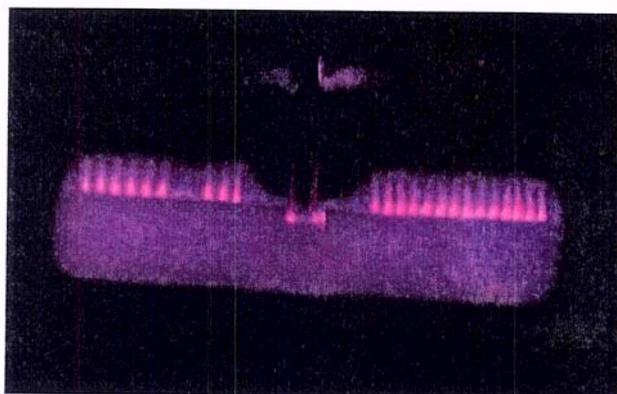
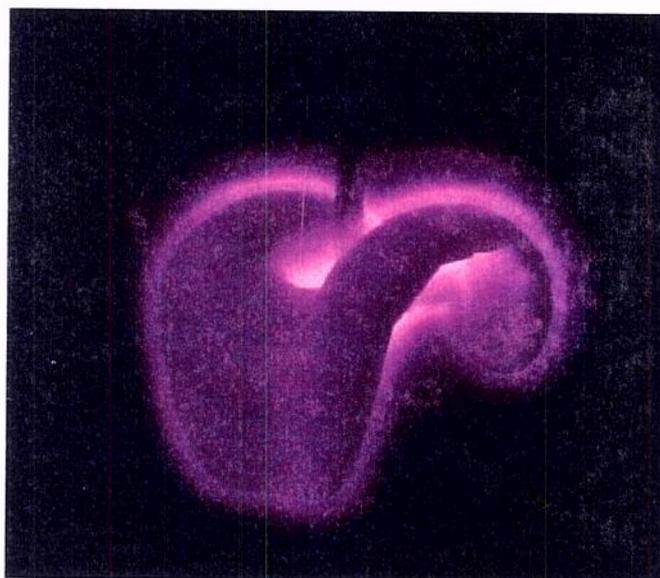


Figura 3.4. Substratos sem revestimento (esquerda) e com revestimento de DLC (direita) de: (a) lamínulas de vidros; (b) discos de Ti-13Nb-13Zr; e (c) pinos de Ti-13Nb-13Zr, sobre placas de Petri.

Na Figura 3.5 podem ser vistos os pinos de Ti-13Nb-13Zr e um implante de joelho de Co-Cr-Mo sendo revestidos com DLC. Nota-se que o plasma está concentrado em torno de cada peça, e toda a superfície exposta está sendo bombardeada pelos íons. Os implantes e outros objetos revestidos podem ser vistos no Capítulo 4.1.



(a)



(b)

Fig. 3.5. Plasma ao redor de: (a) pinos de Ti-13Nb-13Zr; e (b) implante de joelho de Co-Cr-Mo.

3.2. Caracterização do filme de DLC

3.2.1. Microestrutura e morfologia da superfície

Microestrutura do DLC

A caracterização estrutural de filmes de DLC é complicada por sua natureza amorfa. Com isso, várias técnicas têm sido usadas, sendo a mais comum a espectroscopia Raman (Cap. 2.3.1.1). Neste estudo foram analisadas 3 amostras de Ti-13Nb-13Zr revestidas com DLC (discos com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura), utilizando um micro-Raman da Jobin-Yvon - modelo 6400. Antes de se iniciar a obtenção dos espectros de cada conjunto de amostras foi feita uma calibração do equipamento. O espectro de uma amostra padrão de diamante natural foi obtido, para corrigir o pico relativo ao diamante (1332 cm^{-1}). Em geral se trabalha com a faixa de varredura do equipamento ajustada para um intervalo entre 1100 a 1900 cm^{-1} , que é uma faixa onde estão contidas as informações sobre as bandas do DLC. Submete-se a amostra ao feixe de laser e se obtém o seu espectro. O espectro final de cada amostra foi feito pelo resultado médio de vários espectros, para eliminar ruídos. A deconvolução dos espectros Raman para o pico G e pico D, e a avaliação da proporção sp^3/sp^2 pela razão das intensidades I_D/I_G desses picos foi feita com o auxílio do software Origin. O equipamento de espectroscopia Raman, utilizado neste trabalho, está localizado no Laboratório do Grupo de Propriedades Ópticas do Departamento de Física da Matéria Condensada (DFMC) do IFGW-UNICAMP, sob coordenação do Prof. Fernando Iikawa.

Morfologia da superfície

A morfologia da superfície de amostras de silício altamente polido ($100 \times 150 \times 1\text{ mm}^3$) e lamínulas de vidro (13 mm de diâmetro e 0.5 mm de espessura), com e sem revestimento, foram analisadas por microscopia de força atômica (MFA) (3 amostras de cada material). Todas as imagens de MFA utilizadas neste trabalho foram obtidas no modo contato (microlever tip), utilizando um Thermomicroscopes Autoprobe. A rugosidade média do revestimento foi

calculada, utilizando o software que acompanha o MFA, sobre uma área de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Esta análise foi realizada no Laboratório de Interfaces e Nanoestruturas do Departamento de Física Aplicada do IFGW-UNICAMP, sob coordenação do Prof. Omar Teschke.

A morfologia da superfície de amostras de Ti-13Nb-13Zr na forma de discos (6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) e pinos (1 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento) foi obtida através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens de MEV foram feitas em um JEOL JXA 840A, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da FEM-UNICAMP. Além disso, imagens de pinos de titânio puro, utilizados como controle no ensaio *in vivo*, foram adquiridas utilizando microscopia óptica (microscópio estéreo Olympus SZ40) e MEV. Três amostras de cada material foram estudadas.

A uniformidade de deposição do filme foi verificada utilizando um sistema sugerido por Nishimura (2002). Filmes de DLC foram depositados sobre 6 amostras de liga de Ti-13Nb-13Zr colocadas sobre cada lado de um objeto de forma hexagonal (Fig. 3.6), onde a espessura foi medida por perfilometria (modelo Alpha-Step 500, pertencente ao Laboratório de Processos de Plasma, IFGW, UNICAMP).

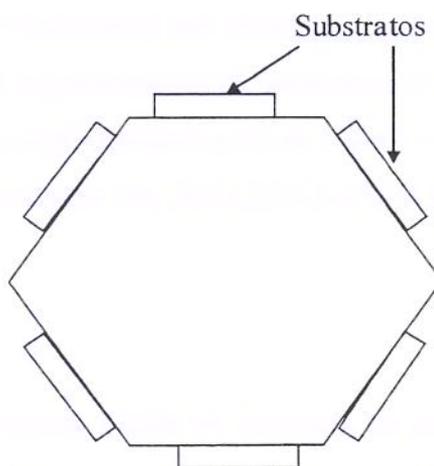


Figura 3.6. Esquema de colocação de amostras para análise da uniformidade de deposição do processo de imersão em plasma.

3.2.2. Nanoindentação e ensaio de adesão (*pull-test*)

Dureza

A nanodureza de 6 amostras de liga de Ti-13Nb-13Zr revestidas com DLC (discos com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foi medida utilizando-se o equipamento de nanoindentação “NanoTest MicroMaterials” com ponta de diamante tipo Berkovich instalado no Laboratório de Implantação Iônica e Tratamentos de Superfície do IFGW-UNICAMP, sob responsabilidade do Prof. Fernando Alvarez. Obs: deve-se prestar atenção ao fato de que a camada de DLC é mais dura do que o substrato de Ti-13Nb-13Zr em que ele está depositado. Além disso, é importante comparar com o diamante policristalino: 90 GPa, Ti cp: 6.5 GPa, aço inox: 5.56 GPa, e Ti-6Al-4V: 8.5 GPa (SHEEJA et al, 2001b).

Adesão

Neste trabalho foi utilizado o método de puxamento ou *pull-test* para se analisar a adesão do filme de DLC depositado sobre substrato de liga Ti-13Nb-13Zr (Figura 3.7). Utilizou-se uma barra de Ti-13Nb-13Zr revestida com DLC unida à uma barra de aço através do adesivo epóxi, e o conjunto foi submetido à uma força de tração. Foram feitas 6 repetições do experimento. O equipamento utilizado (EMIC) está instalado na empresa Microsteel (Sumaré-SP), que permitiu a realização dos testes.

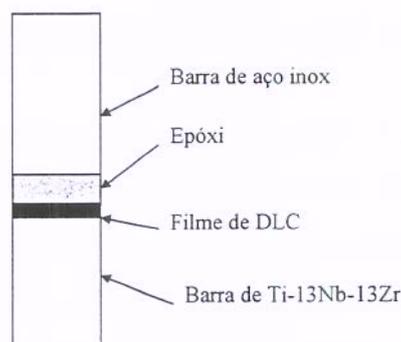


Figura 3.7. Esquema de colocação da amostra para análise da adesão do filme de DLC depositado em liga de Ti-13Nb-13Zr.

3.3. Ensaio de corrosão em solução de Hanks

Amostras de Ti-13Nb-13Zr, com e sem revestimento de carbono tipo diamante, foram usadas para o ensaio de corrosão por imersão em meio corrosivo a 37°C, simulando o fluido corporal (3 amostras para cada material). Esses ensaios foram feitos no Laboratório de Estudos de Corrosão e Desenvolvimento de Revestimentos do Departamento de Engenharia de Materiais da FEM-UNICAMP, sob responsabilidade da Prof^a Célia M. A Freire.

3.3.1. Teste de polarização de Tafel

Experimentos de polarização D.C. foram conduzidos em solução de Hanks (Cultilab) - líquido que simula o fluido corporal (em g/l): NaCl 8, CaCl₂ 0.14, KCl 0.4, NaHCO₃ 0.35, glucose 1.00, MgCl₂·6H₂O 0.1, Na₂HPO₄·2H₂O 0.06, KH₂PO₄ 0.06, MgSO₂·7H₂O 0.06, fenol vermelho 0.011 - através de uma célula de corrosão, de vidro (Fig. 3.8a), e 3 eletrodos conectados no sistema de interface eletroquímica (Fig. 3.8b, equipamento EG, modelo 273A, Princeton Applied Research, PAR, interfaciado com um microcomputador para o controle e processamento dos dados através de um software: PAR-342I). Um eletrodo calomelano saturado foi utilizado como uma referência e para medir o potencial do sistema. Uma placa de platina serviu como contra-eletrodo. A área exposta foi de 1 cm². As curvas de polarização foram então obtidas pela técnica de polarização de Tafel a uma taxa de varredura de 1mV/s.

3.3.2. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

Os dados de impedância A.C. foram obtidos utilizando um potenciostato e um analisador de frequência Solatron, modelo SI 1255, com o sistema de interface eletroquímico (e um microcomputador e software M398), durante a imersão em solução de Hanks. Uma perturbação senoidal A.C. de 10 mV de amplitude (rms) foi aplicado aos eletrodos, e o potencial de corrosão foi medido sobre a amplitude de frequência de 10mHz a 100 kHz. O espectro da impedância e o potencial de corrosão foram então coletados com o tempo de exposição.

Amostras de Ti-13Nb-13Zr, com e sem revestimento de DLC, foram usadas para o ensaio de corrosão por imersão em meio corrosivo a 37°C, simulando o fluido corporal. Esses ensaios foram feitos no Laboratório de Estudos de Corrosão e Desenvolvimento de Revestimentos do Departamento de Engenharia de Materiais da FEM-UNICAMP, sob responsabilidade da Prof. Célia M. A Freire.

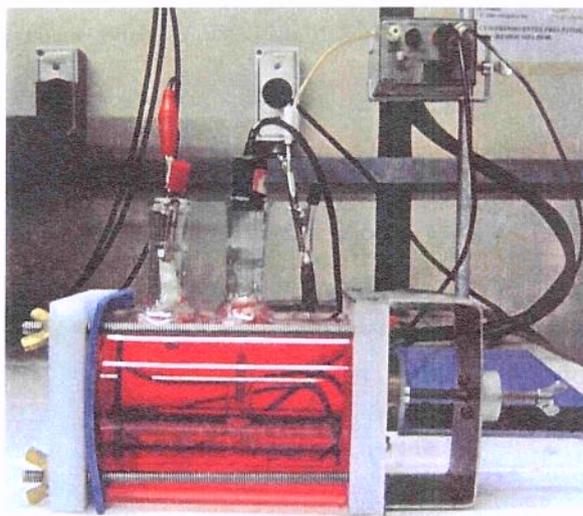


Figura 3.8. Célula de corrosão montada com solução de Hanks (superior); e equipamento utilizado nos ensaios.

3.4. Ensaio de biocompatibilidade *in vitro*

A cultura celular é um método muito importante para pesquisas de biomateriais, pois permite uma rápida avaliação da performance biológica do material em estudo (KIRKPATRICK, 1998; DEKKER et al, 1994). É importante avaliar as interações célula-biomaterial para prever possíveis reações ao DLC *in vivo*, quando utilizado como revestimento de biomateriais.

Nos estudos de cultura celular foram utilizadas células Vero (células fibroblásticas renais obtidas de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*). Essas células são recomendadas para ensaios com citotoxicidade e estudos com biomateriais por normas internacionais (ISO 10993-5 1992(E); KIRKPATRICK, 1992). Além disso, as linhagens fibroblásticas são células que são encontradas no ambiente de um implante ortopédico. Essas células foram mantidas em meio Ham F10 (Sigma) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Nutricell). Os testes *in vitro* foram realizados no Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, UNICAMP, pelo Prof. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr.

3.4.1. Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade é uma avaliação biológica considerada prioritária na norma ISO 10993-5. Essa norma não especifica um teste único, mas um conjunto de procedimentos para a escolha dos testes disponíveis (KIRKPATRICK, 1988). A norma também permite testes qualitativos e quantitativos. O teste utilizando MTT (teste quantitativo) é uma medida da função metabólica celular, e depende da atividade de uma enzima da mitocôndria. Em resumo, depende da conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium para um produto insolúvel, que pode ser quantificado por espectrofotometria (DEKKER et al, 1994). Este procedimento dá informações sobre a citotoxicidade do material e a funcionalidade da célula na superfície do material.

No ensaio de citotoxicidade, foram utilizadas as seguintes amostras: Ti-13Nb-13Zr sem revestimento, Ti-13Nb-Zr revestida com DLC, placas de polipropileno (controle negativo) e discos de látex (controle positivo), todas previamente esterilizadas por radiação UV. A avaliação

dos diferentes materiais foi efetuada através da utilização do teste de viabilidade celular pelo ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium) (DEKKER et al, 1994). As diferentes repetições (n=6) de cada amostra foram colocadas em placas de 96 poços (Corning/Costar Corporation, Cambridge, MA, USA).

A montagem do experimento seguiu a norma ISO citada acima. As placas foram embebidas em meio de cultura celular livre de soro fetal bovino e incubadas por 24h a 37°C. Após esse tempo de incubação foram adicionadas $2,5 \times 10^5$ células/ml em cada poço com as respectivas amostras a serem estudadas. Após 24h de cultura, as amostras foram fixadas, coradas com cristal violeta e analisadas em leitor de microplacas “Multiskan Bichromatic Version 1.06” à 540 nm. Os dados obtidos permitem acessar o número de células viáveis para cada amostra. Foi feita uma análise estatística aplicando o teste de Tukey para determinar a significância à $p < 0.05$.

3.4.2. Ensaio de adesão celular

Se foi verificado que o biomaterial não é citotóxico, a adesão celular é, provavelmente, o aspecto mais importante da interação celular com o biomaterial. É, a adesão celular, um dos passos iniciais para a subsequente proliferação e diferenciação das células, antes da formação dos tecidos. Um dispositivo médico, designado para ser integrado ao osso ou articulação de um implante, deve, em princípio, promover a adesão celular (KIRKPATRICK, 1988).

No ensaio de adesão celular, as placas foram preparadas como descrito no item anterior. Foram inoculadas $2,5 \times 10^5$ células/ml em cada uma das situações experimentais estudadas. Após 2 horas de incubação as amostras foram fixadas, processadas e analisadas em leitor de microplacas “Multiskan Bichromatic Version 1.06” à 540 nm. Foram feitas 6 repetições de cada um dos experimentos analisados. As amostras utilizadas eram: liga de Ti sem revestimento, liga de Ti com DLC, placa de poliestireno (controle positivo) e discos de Teflon (controle negativo). Foi feita uma análise estatística aplicando o teste de Tukey para determinar a significância à $p < 0.05$.

3.4.3. Morfologia celular (MCF, citoquímica, MEV, MFA)

As placas de plástico e as lamínulas de vidro (produzidas para cultura de células) são consideradas bons substratos porque são disponíveis comercialmente, estão de acordo com a norma ISO 10993-5, são transparentes (necessário para estudos citoquímicos, análises por microscópio de luz e técnica de imunofluorescência, - que distingue elementos do citoesqueleto), possui resposta celular conhecida, e portanto, podem ser utilizadas na comparação com os resultados da literatura. É importante padronizar os resultados, porque as células são sensíveis às características físicas e químicas do material com o qual interagem e, a simples modificação do material, variações na textura da superfície, ou rugosidade, podem afetar mudanças significantes na resposta celular. Thomsom et al (1991) estudou o DLC revestindo placas de cultura em seu trabalho pioneiro de biocompatibilidade, Allen et al (2001) estudou os efeitos do DLC revestindo placa de poliestireno, Butter et al (1995) estudou DLC revestindo lamínulas de vidro com intercamada de silício para melhor a adesão do DLC, e Linder et al (2002) analisou a biocompatibilidade do DLC produzido por CVD assistido por plasma revestindo vidro.

Uma suspensão de $2,5 \times 10^5$ células/ml foi utilizada para todos os estudos de morfologia. As células foram cultivadas como previamente descritas no item 3.4.1, e os experimentos foram feitos em triplicata. Como um controle, células foram cultivadas em lamínulas de vidro (lamínula da Corning, próprio para cultura celular, com 13 mm de diâmetro). A morfologia celular em vidro, com e sem revestimento de DLC, foi examinada por microscopia de contraste de fase (MCF) e por ensaio citoquímico, utilizando um microscópio invertido Olympus IX-50. As amostras foram fixadas com 4% de paraformaldeído (em 0.1M de tampão fosfato pH 7.2), e coradas² com azul de toluidina³ (pH 4.0) para a análise citoquímica e sem corar para MCF. O

² Muitos componentes celulares são transparente e incolores, o que dificulta o seu estudo microscópico. Para vencer esta dificuldade foram criados vários processos de coloração, que tornam visíveis os diferentes componentes. Mas não existe uma técnica de coloração que, sozinha, ponha em evidência todas as estruturas celulares. Por isso, para se conhecer a morfologia de todos os constituintes de um tipo de célula, diversos preparados são feitos, cada um deles evidenciando certas estruturas. A maioria dos corantes citológicos comportam-se como bases ou como ácidos. Nos corantes básicos, o grupamento químico responsável pela cor ou grupamento cromóforo é catiônico. Os cromóforos desses corantes combinam-se com os grupamentos ácidos (aniônicos) das moléculas celulares. Portanto, as moléculas ácidas, como as do DNA e RNA são basófilas, i.e., tem afinidade pelos corantes básicos. O azul de toluidina (AT), o azul de metileno e a hematoxilina são exemplos de corantes básicos. Nos corantes ácidos o cromóforo é aniônico,

microscópio de contraste de fase baseia-se nos princípios da difração da luz, isto é, o caminho do feixe luminoso, na formação da imagem por este microscópio, sofre um retardo óptico, permitindo a observação de materiais biológicos sem a coloração, que, à microscopia de luz convencional apareceriam transparentes ou com pouco contraste. O microscópio é dotado de um sistema óptico especial, que transforma diferenças de fase dos raios luminosos em diferenças de intensidade. Desse modo, as diferenças de fase, para as quais o olho não é sensível, tornam-se visíveis, pois são trazidos em diferenças de intensidade luminosa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1973; DE ROBERTIS, 1998).

Para a análise de morfologia celular utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA), as células foram cultivadas em 4 superfícies: vidro (disco de controle), vidro revestido com DLC, liga sem revestimento e liga com revestimento de DLC. Após o tempo de incubação de 24h, as amostras foram fixadas com 4% de paraformaldeído / 2.5% glutaraldeído em tampão fosfato pH 7.2, por 45 min à temperatura ambiente, e pós-fixados com 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4 da Sigma) no mesmo tampão por 15 min, à 4°C. As amostras foram então desidratadas com soluções de etanol em concentrações crescentes (70 a 100%) e secas em ponto crítico (Balzers CPD030), para análise por microscopia de força atômica (Thermomicroscopes Autoprobe, Laboratório de Nanoestruturas, IFGW-UNICAMP). Para análise por MEV (JEOL JXA 840A, FEM-UNICAMP), as células foram também metalizadas com ouro.

portanto com carga elétrica negativa, e tende a se combinar com os componentes celulares básicos, que são eletricamente positivos. Estruturas ricas em grupamentos básicos são acidófilos, por terem afinidade pelos corantes ácidos. Os corantes ácidos, como a eosina, orange G e fucsina ácida coram principalmente os componentes básicos das proteínas citoplasmáticas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1973)

³ O azul de toluidina (AT) cora os tecidos de azul, exceto os que são ricos em poliânions (por exemplo, matriz cartilaginosa e grânulos de mastócitos), que se coram em púrpura. Um tecido ou um componente celular que se cora em púrpura com este corante é dito metacromático, e diz-se que o azul de toluidina exibe metacromasia (GARTNER & HIATT, 1999).

3.5. Ensaio de biocompatibilidade *in vivo*

O objetivo deste estudo foi analisar a interface formada entre o revestimento de carbono tipo diamante (DLC) e o tecido muscular e ósseo do rato, de acordo com o procedimento de Belangero (1988) e a norma ISO 10993-6. Através da análise histológica do tecido hospedeiro, é possível avaliar a interação implante/tecido, além de possíveis respostas inflamatórias. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo Prof. William Dias Belangero, no Laboratório de Biomecânica Ortopédica (LABIMO), Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Depto Ortopedia, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), UNICAMP.

Foram utilizados 20 *Rattus Novergicus* da variedade *Wistar*, machos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Durante todo o tempo de estudo, os animais foram mantidos no Biotério do NMCE. Todos os procedimentos foram avaliados e autorizados pelo “Comitê de Ética em Experimentação Animal” (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA), sob nº 795-1, em reunião de 09 de março de 2005.

Foram utilizados 40 pinos de 5 mm de comprimento e 1 mm de espessura, sendo:

- (a) 20 pinos de Ti cp sem revestimento (material controle)
- (b) 20 pinos de Ti-13Nb-13Zr revestido com carbono tipo diamante

Antes de implantar o material, todos os implantes foram esterilizados por autoclave a 120°C por 30 minutos.

3.5.1. Procedimento experimental

Os animais foram divididos em 2 grupos, que por sua vez foram subdivididos em 2 tempos de seguimento (Figura 3.9):

- **GRUPO 1:** 10 animais submetidos à implantação de pinos de Ti sem revestimento (controle), sendo 5 animais para tempo de seguimento de 4 semanas (SUBGRUPO 1A), e 5 animais com tempo de seguimento de 12 semanas (SUBGRUPO 1B).
- **GRUPO 2:** 10 animais submetidos à implantação de pinos de Ti-13Nb-13Zr revestidos com DLC, sendo 5 animais para tempo de seguimento de 4 semanas (SUBGRUPO 2A), e 5 animais com tempo de seguimento de 12 semanas (SUBGRUPO 2B).

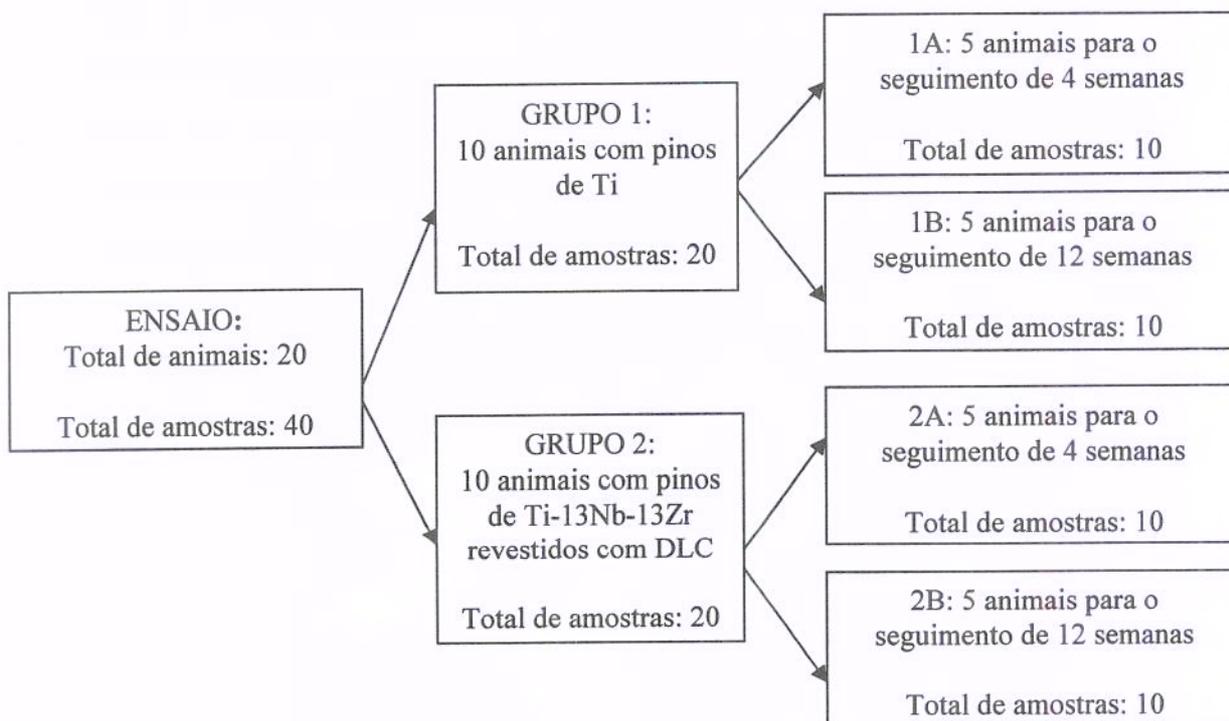


Figura 3.9. Diagrama esquemático do ensaio *in vivo*. Utilização de 2 grupos (pinos de Ti, e pinos de Ti-13Nb-13Zr com revestimento de DLC), subdivididos em 2 tempos de seguimento.

Cada animal foi submetido à implantação de 2 pinos: um na região intercondiliana do fêmur, da pata esquerda; e o outro no ventre do músculo tríceps sural, da pata direita. Os animais permaneceram em jejum pré-operatório de 8 horas e foram submetidos à anestesia por meio de injeção intravenosa de Pentobarbital sódico na dose 50 mg/Kg. Na área a ser operada, foi realizada tricotomia, e as patas posteriores foram lavadas com solução de álcool iodado a 2%, seguindo-se o isolamento da área cirúrgica com campo estéril fenestrado.

- Para a implantação dos pinos no tecido muscular, a musculatura adutora foi exposta por meio de incisão na face medial da pata, que foi aberta por divisão longitudinal de suas fibras, expondo-se o músculo tríceps sural (Figura 3.10). O músculo foi isolado com um afastador e com o auxílio de um trocater e de um êmbolo, o pino foi implantado no músculo. O afastador foi retirado e o músculo adutor foi aproximado sem sutura, e foi feito o fechamento do plano cirúrgico com um fio de nylon.
- Para a implantação dos pinos no tecido ósseo, o acesso cirúrgico foi feito na face lateral do joelho dos ratos. A patela foi lateralizada, expondo-se a região intercondiliana do fêmur. Foi utilizado uma broca de 1 mm de diâmetro com profundidade de 5 mm (equivalente ao diâmetro do pino) para realizar a perfuração no centro da região intercondiliana e posterior introdução dos pinos (Fig. 3.11). O fechamento do plano cirúrgico foi feito com um fio de nylon.



Figura 3.10. Colocação do implante no músculo.



Figura 3.11. Pino introduzido no côndilo.

3.5.2. Coleta do material

Após o tempo de seguimento pré-estabelecido, os animais foram sacrificados com dose letal de pentobarbital sódico para a coleta dos tecidos.

- O corpo do músculo tríceps sural foi exposto pelo mesmo acesso utilizado na colocação dos implantes e retirado pela secção da sua porção distal e proximal, lavado com soro fisiológico e fixado⁴ em solução de formaldeído a 10% por 24h. Em seguida os pinos foram retirados. Foram obtidas 20 amostras (sem os pinos) para serem analisadas por microscopia óptica convencional. Esse material foi desidratado com soluções de etanol em concentrações crescentes (70 a 100%) e por xilol para tornar o material translúcido. Em seguida o material foi mergulhado em parafina⁵ fundida à 60°C, mantido em temperatura ambiente para solidificação, obtendo-se blocos, que foram cortados no micrótomo rotatório (Leica RM 2155), com espessura de 6 µm e corados com “Hematoxilina Eosina” (HE) e “Tricrômico de Masson” (TM).
- A articulação do joelho foi exposta para desarticular o fêmur e o seccionar no seu terço distal, lavado com soro fisiológico e fixado em solução de formaldeído a 10% por 24 horas. Para cada subgrupo (5 amostras de fragmentos do fêmur distal), 2 amostras foram preparadas para

⁴ Antes de serem corados, os tecidos devem ser fixados, desidratados, incluídos e cortados. Todos esses procedimentos provocam alterações químicas e morfológicas nas células e na matriz extracelular. A **fixação do material**, que consiste na morte das células de uma maneira tal que as estruturas que possuíam em vida sejam conservadas com um mínimo de artefatos, é essencial para a preservação da morfologia e a composição química dos tecidos e das células. Os **fixadores** são agentes químicos das mais diversas funções orgânicas, que reagem quimicamente com os componentes celulares, promovendo a sua estabilização molecular. Os principais componentes celulares que podem ser preservados são as macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídios). (TABOGA, 2001).

⁵ A **técnica histológica** consiste na obtenção de cortes extremamente finos e na sua colocação sobre a lâmina. Entretanto, para a obtenção desses cortes, é preciso que o material a ser analisado passe por um tratamento de inclusão em parafina, resina, gelatina ou seja congelado, tornando-se uniformemente duro e podendo ser cortado pelo micrótomo, um equipamento utilizado para cortes. O meio de inclusão mais comum é a **parafina**, mas como esse composto não é miscível em água, o material deve ser desidratado. A desidratação é feita em série crescente de álcool etílico. Em seguida o material passa por banhos de xilol (ou óleo de cedro) para promover o clareamento ou clarificação e também porque a parafina não é miscível no álcool. Após o tratamento por xilol, as peças histológicas ficam imersas em parafina fundida (60° C) com a finalidade de ocorrer a impregnação ou infiltração da parafina à medida que o xilol evapora. Após a infiltração, deposita-se o fragmento a ser estudado no interior de uma caixinha de papel ou plástico contendo parafina fundida e, à temperatura ambiente, formar-se-á um bloco, que será levado ao micrótomo para fazer os cortes histológicos. Após isso, os cortes histológicos são coletados em lâminas e passam pelos métodos de coloração desejados (TABOGA, 2001).

microscopia óptica convencional, e 3 amostras para MEV-retroespalhamento. Desta forma foram obtidos 20 fragmentos do fêmur distal, dos quais 8 foram destinados à microscopia óptica convencional e 12 à MEV-retroespalhamento.

- a) Para a análise por microscopia óptica (n=8), foi realizada a descalcificação dos ossos em ácido nítrico 5% por 3 dias. Em seguida os pinos foram retirados. O material retirado para análise por microscopia óptica (já sem os pinos) foi desidratado com soluções de etanol em concentrações crescentes (70 a 100%) e por xilol para tornar o material translúcido. Em seguida o material foi mergulhado em parafina fundida à 60°C, mantido em temperatura ambiente para solidificação, obtendo-se blocos, que foram cortados no micrótomo rotatório (Leica RM 2155), com espessura de 6 µm e corados com “Hematoxilina Eosina” (HE) e “Tricrômico de Masson” (TM).
 - b) O material ósseo sem descalcificação (n=12) foi analisado por MEV-retroespalhamento⁶. Os ossos (sem a retirada dos pinos) foram submetidos à desidratação com soluções crescentes de etanol e embutidas em resina acrílica para obtenção de blocos, que foram cortados numa máquina ISOMET (FEM-UNICAMP), com o auxílio de um disco de diamante a velocidade baixa, e espessuras de 0.5 mm. A interface do implante (pino) com o tecido foi analisada por MEV-retroespalhamento (o material foi metalizado com ouro - espessura de 7 nm, tempo de 20 segundos). As imagens foram obtidas com o microscópio eletrônico modelo JEOL JXA 840A.
- Todos os pinos retirados (n=32, sendo 20 pinos retirados do músculo e 8 pinos retirados do osso) ficaram em solução alcoólica a 70%, em temperatura ambiente, até a sua análise por MEV (o material foi metalizado com ouro - espessura de 7 nm, tempo de 20 segundos). A adesão celular e tecidual (aos implantes) foi analisada. As imagens foram obtidas com o microscópio eletrônico modelo JEOL JXA 840A, FEM-UNICAMP.

⁶ O MEV destina-se basicamente ao exame de superfície das amostras (pode-se ver a superfície interna das amostras, se fraturadas e expostas) utilizando-se principalmente de elétrons secundários. É possível também obter imagens de superfície coletando-se elétrons retroespalhados que, embora produzam imagens de menor resolução e qualidade, são utilizados em certas circunstâncias, como neste estudo. Como os sinais são gerados de **partes mais profundas das amostras**, é possível **visualizar detalhes logo abaixo da superfície**, não observáveis usando apenas os elétrons secundários. Seu aproveitamento pode ser feito usando o próprio detector de elétrons secundários. Deve-se chamar atenção ao fato de que o uso de elétrons retroespalhados resulta em menor resolução, pois eles são gerados por uma área/volume do espécimen várias vezes maior que o diâmetro do feixe incidente.

Capítulo 4

Resultados e discussões

4.1. Objetos tridimensionais revestidos com DLC

Como exemplos de revestimento de substratos tridimensionais, filmes de DLC foram depositados em implantes ortopédicos e objetos para aplicação industrial (Fig. 4.1 a 4.10). A Figura 4.1 mostra implantes de joelho e cabeça femoral de Co-Cr-Mo revestidos com DLC, e a Figura 4.2 um implante de quadril, não cimentado, de Ti-13Nb-13Zr com cabeça femoral revestida com DLC e implante de Ti-13Nb-13Zr fabricado no IFGW-UNICAMP, em colaboração com C. S. Lambert.



Figura 4.1. Implantes de joelho e cabeça femoral de Co-Cr-Mo revestidos com DLC.



Fig. 4.2. Implante de quadril, não cimentado, de Ti-13Nb-13Zr: cabeça femoral com revestimento de DLC, acetábulo com revestimento de microesferas e haste femoral com revestimento de “plasma spray” a vácuo. Combinação de módulo de elasticidade mais próxima ao do osso (liga de titânio) e revestimento resistente ao desgaste na articulação (DLC).

Na Figura 4.3 pode ser visto uma esponja de titânio expandida a vácuo* com revestimento de carbono tipo diamante (DLC), com poros de 100-300 μm , ideal para crescimento celular e transporte de fluidos biológicos. O revestimento desse material não seria possível por técnicas a vácuo convencionais. Neste trabalho, a deposição do DLC foi feita para confirmar que o processo de imersão em plasma é adequado para revestimento de estruturas tridimensionais complexas. Para implantes em contato com o osso, o TiO_2 -considerado bioativo - seria mais adequado do que o DLC - considerado bioinerte, e estudos nesse sentido já foram iniciados.

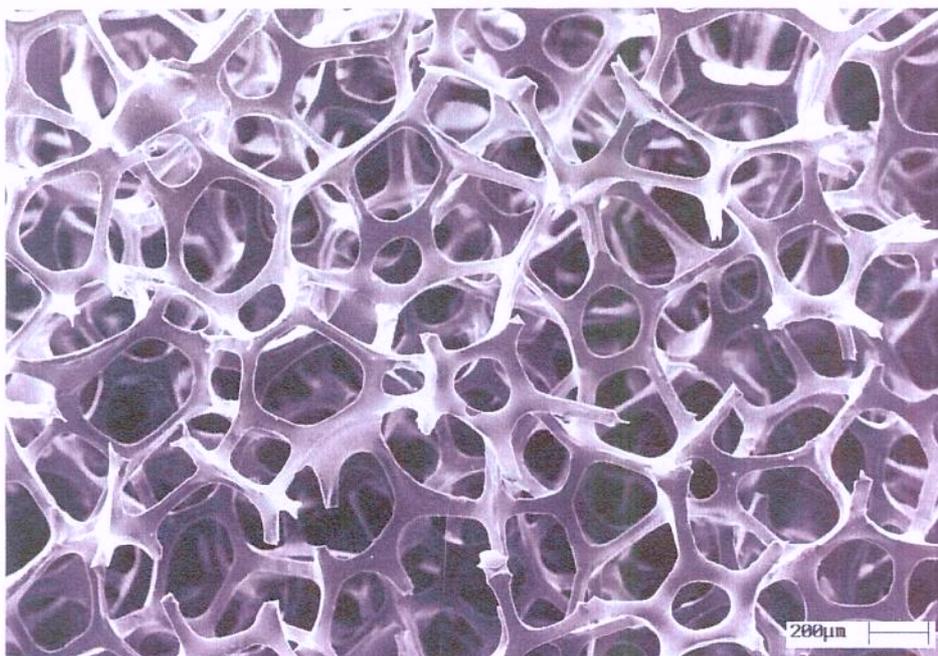


Figura 4.3. Esponja de titânio expandido a vácuo revestido com DLC.

* O processo de expansão a vácuo é uma nova tecnologia de fabricação de materiais porosos e foi desenvolvido por C. S. Lambert na década de 80. A técnica de expansão a vácuo produz materiais porosos (esponjas de célula-aberta), com tamanho de célula de acordo com a aplicação desejada. É possível expandir praticamente todos os materiais metálicos (titânio, alumínio, níquel, tungstênio, tântalo e molibdênio), cerâmicos (alumina, zircônia, titânia e hidroxiapatita), e vidros (incluindo os biovidros). Os materiais porosos são usados como suporte para catalisadores, misturadores de gases, eletrodos para célula de combustível, baterias, tanques criogênicos, dispositivos de controle de fluxo de fluidos, tanques de combustíveis para aeronaves, estruturas de aeronaves, absorvedores de impacto para a indústria automobilística, trocadores de calor, e como biomateriais (suporte para crescimento de tecido ósseo).

A seguir são apresentados diversos objetos utilizados na indústria em geral: bisturi cirúrgico (Fig. 4.4, além da utilização na área médica, é também utilizado como ferramenta de corte de tecidos e filmes plásticos na indústria têxtil), brocas (Fig. 4.5), “boarding” de ataque de avião (Fig. 4.6), engrenagem de motor (Fig. 4.7), sede de rolamento (Fig. 4.8), e tubos de quartzo e de alumínio (Fig. 4.9). Facas industriais e bisturis cirúrgicos, sujeitas ao desgaste abrasivo, foram testados em condições reais de uso em uma fábrica de tecelagem (estado de SP). Em todos os casos, o tempo de vida desses materiais aumentou em no mínimo 3 vezes**.

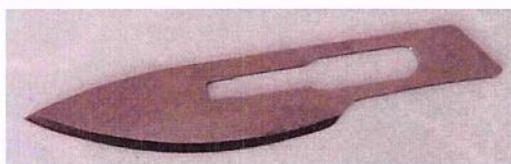


Figura 4.4. Bisturi cirúrgico com revestimento de DLC apenas no corte.



Figura 4.5. Brocas revestidas com DLC.



Figura 4.6. “Boarding” de ataque de avião revestido com DLC.

** Máquinas que cortam filmes plásticos ou tecidos em pequenas tiras e utilizam cerca de 200 bisturis cirúrgicos emparelhados (de acordo com a espessura da tira desejada) foram utilizadas para o teste. Nessa mesma fábrica, outra máquina que utiliza cerca de 300 facas industriais emparelhadas que cortam filmes plásticos por cisalhamento também foi utilizada.

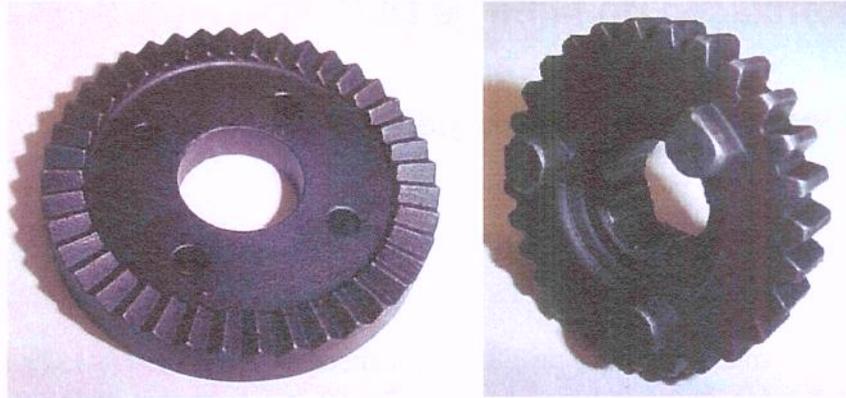


Figura 4.7. Engrenagens de motor revestidas com DLC.



Figura 4.8. Sede de rolamento revestido com DLC



Figura 4.9. Tubos de quartzo (esquerda) e alumínio (direita) revestidos interna e externamente com DLC.

4.2. Caracterização do filme de DLC

4.2.1. Microestrutura e morfologia da superfície

Microestrutura do DLC

O espectro Raman do filme de DLC depositado sobre Ti-13Nb-13Zr (Fig. 4.10) está em conformidade com o espectro típico de DLC, para temperaturas em torno de 300°C. Mostra os picos típicos de DLC: o pico G em torno de 1580 cm^{-1} e o pico D próximo de 1350 cm^{-1} . A forma e a posição dos picos são também consistentes com aquelas obtidas por outros métodos. A razão I_D/I_G foi calculada com o auxílio do software Origin, e obteve-se o valor de 1.71, também em conformidade com resultados da literatura. No trabalho de Chang et al (2002), apesar de ter sido utilizado outro método de deposição - “magnetron sputtering” -, com diversas condições de deposição, a forma das curvas foi bastante semelhante ao obtido neste trabalho. No trabalho de Watanabe et al (2003), onde o DLC foi obtido também por um processo de IIP&D, nota-se que, para determinados conjuntos de parâmetros, o espectro Raman se assemelha muito ao obtido neste trabalho.

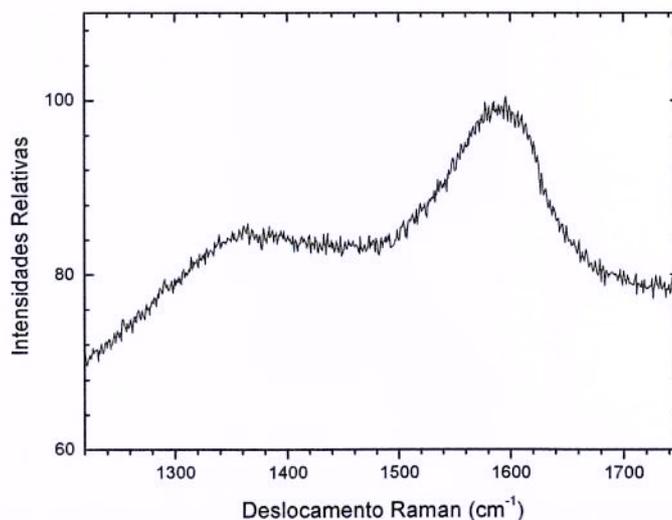


Figura 4.10. Espectro Raman do filme de DLC.

Morfologia da superfície

A microscopia de força atômica (MFA) é a melhor técnica para se observar a superfície de filmes de DLC, pois estes possuem baixa rugosidade, dificultando a sua observação por MEV. O substrato de silício (Si) altamente polido (espelhado - Fig. 4.11) costuma ser utilizado neste tipo de observação, para evitar que a superfície do substrato seja confundida com a do próprio filme, pois, os filmes finos acompanham a superfície do substrato, e substratos mal preparados podem levar à interpretações errôneas.

Pode ser visto nas Figuras 4.12 e 4.13 (obtidas por MFA), que o DLC depositado sobre Si apresenta uma superfície bastante uniforme e com baixa rugosidade, indicando uma textura bastante plana e lisa, onde elementos esféricos podem ser vistos somente em imagens com maior aumento (eixo de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$). A superfície de lamínulas de vidro revestida com DLC também foi observada (Fig. 4.13), pois foram utilizadas no ensaio de cultura de células. A rugosidade média medida por MFA foi 1 nm para DLC revestindo silício e 0.58 nm para DLC revestindo vidro. Antes da deposição, a rugosidade do silício era 0.22 nm e do vidro 0.46 nanômetro. Foram analisadas 3 amostras de cada material.

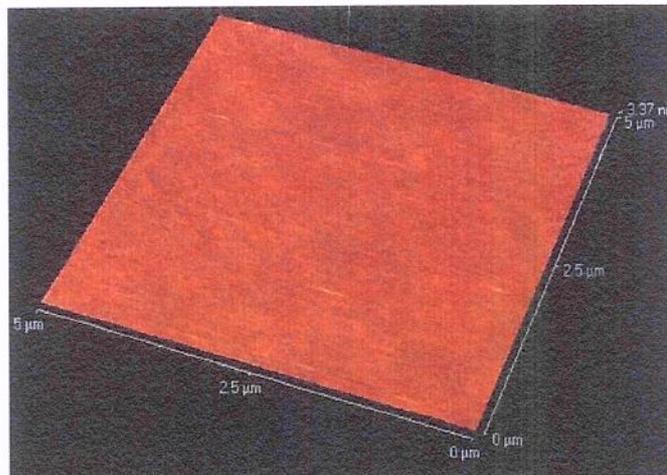


Figura 4.11. Imagem por MFA da superfície tridimensional do silício. Rugosidade média = 0.22 nm. Obs: na realidade o substrato de Si é mais liso do que aparenta na figura, pois artefatos (linhas paralelas) foram criados pelo microscópio de força atômica.

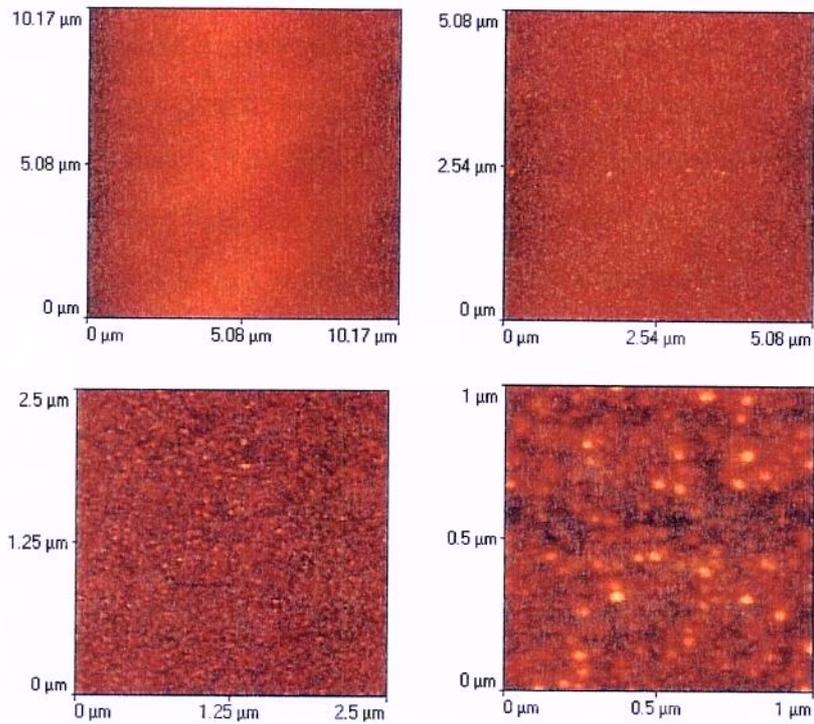


Figura 4.12. Imagens por MFA da superfície do filme de DLC depositado sobre silício com diversas escalas, mostrando a baixa rugosidade do filme obtido. Rugosidade média = 1 nm.

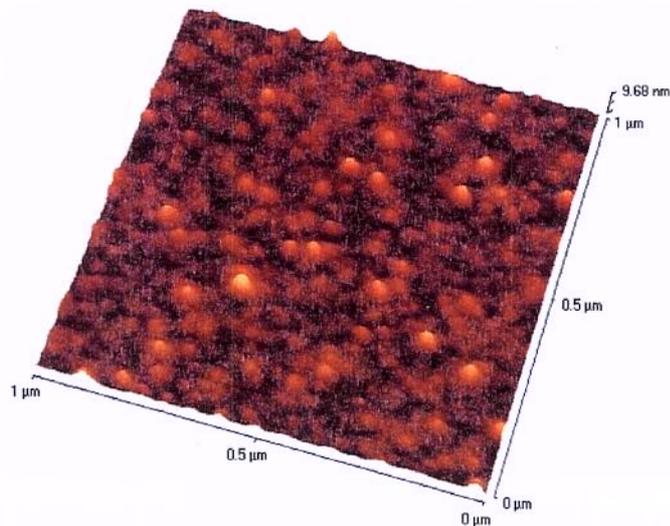


Figura 4.13. Imagem por MFA da superfície tridimensional do filme de DLC depositado sobre silício. Rugosidade média = 1 nm.

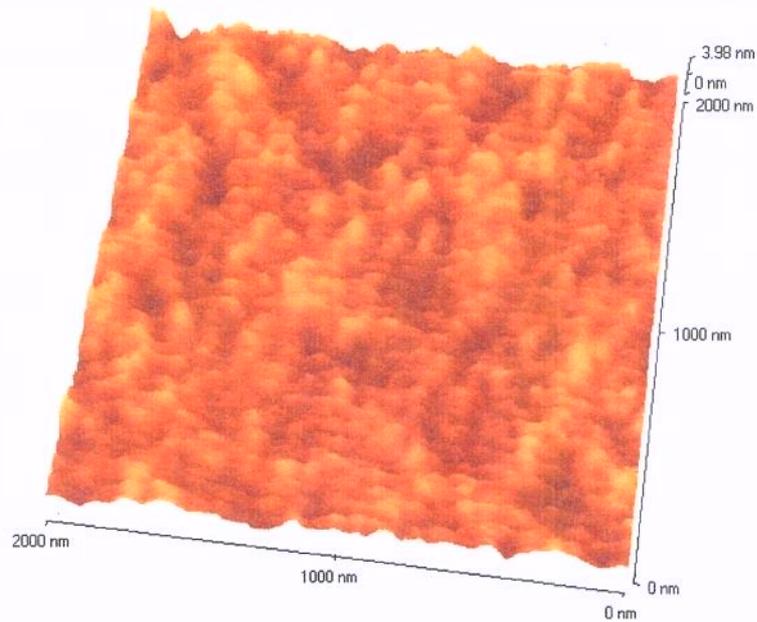


Figura 4.14. Imagem por MFA da superfície tridimensional da lamínula de vidro. Rugosidade média = 0.46 nm.

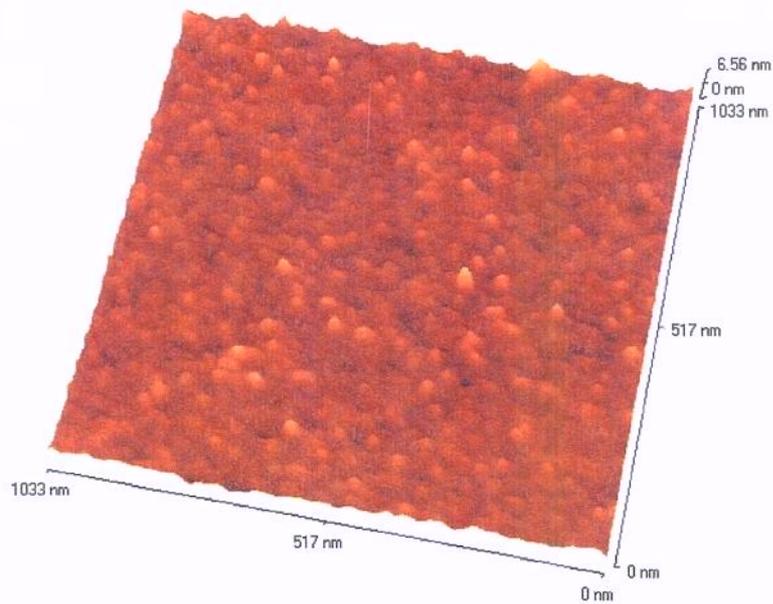


Figura 4.15. Imagem por MFA da superfície tridimensional do filme de DLC depositado sobre vidro. Rugosidade média = 0.58 nm.

A imagem da superfície de 3 amostras de discos de liga de Ti-13Nb-13Zr sem revestimento e 3 com DLC foram obtidas por MEV, e uma imagem representativa de cada material pode ser vista nas Figuras 4.16 e 4.17, respectivamente. Como era de se esperar, o revestimento acompanhou a superfície da liga, sem o aparecimento de delaminações. Ainda se notam os riscos do polimento.



Figura 4.16. Imagem por MEV da superfície da liga Ti-13Nb-13Zr. Barra = 10 μm . Aumento original 1500X.



Figura 4.17. Imagem por MEV da superfície do revestimento de DLC depositado sobre Ti-13Nb-13Zr. Barra = 10 μm . Aumento original 1500X.

As Figuras 4.18 e 4.19 mostram os pinos de titânio puro (controle), e a Figura 4.20 um pino de Ti-13Nb-13Zr revestido com DLC, utilizados no ensaio de biocompatibilidade *in vivo*.

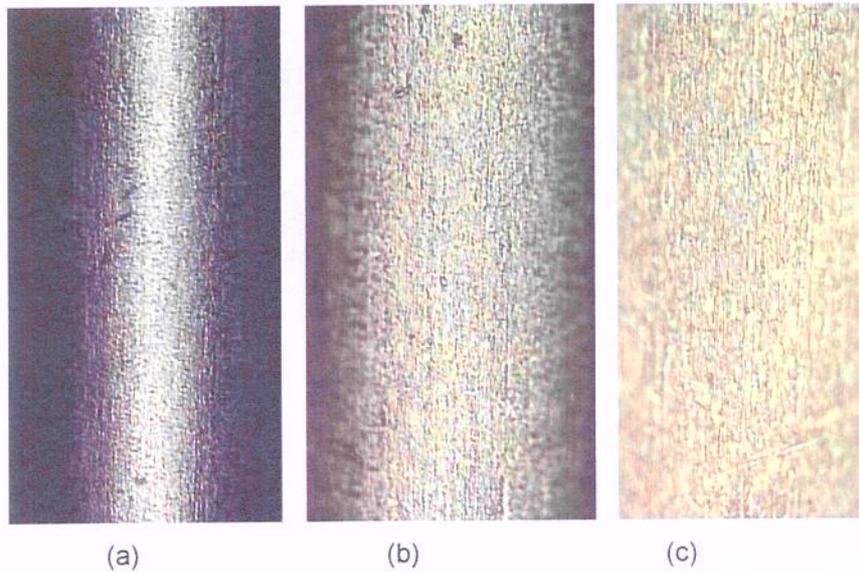


Figura 4.18. Imagem por microscopia óptica da superfície do pino de Ti cp com diferentes aumentos: (a)100X; (b) 200X; e (c) 500X.

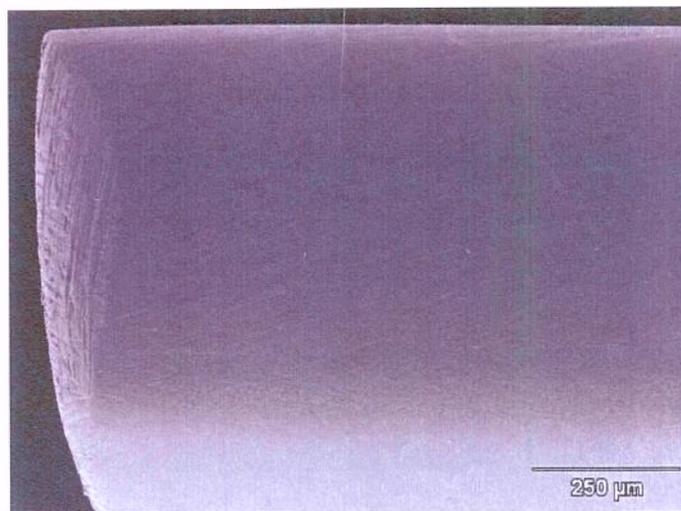


Figura 4.19. Imagem por MEV da superfície do pino de Ti cp. Aumento original: 100X.



Figura 4.20. Imagem por MEV da superfície do pino revestido com DLC. Aumento original: 100X.

A espessura de 6 amostras de Ti-13Nb-13Zr revestidas com DLC e colocadas sobre cada lado de um suporte de forma hexagonal (Fig. 3.6), foi medida por perfilometria. Os valores obtidos são mostrados na Figura 4.21. A espessura média encontrada foi de: 1.01 μm e o desvio padrão de: 0.21 μm , para 1 hora de deposição. Nota-se que o revestimento formado foi bastante uniforme ao redor do objeto estudado.

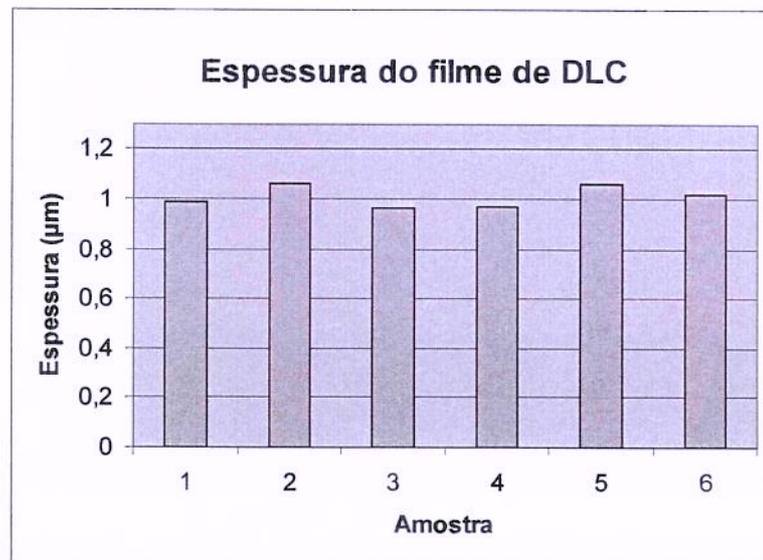


Figura 4.21. Espessura do filme de DLC formado em substratos de Ti-13Nb-13Zr colocados em cada lado de um suporte hexagonal (6 amostras).

Para a análise da interface DLC/substrato, foram estudadas 6 amostras. Na Figura 4.22, pode ser vista uma micrografia, que correspondente à seção transversal na região da interface DLC/substrato, obtido por microscopia óptica, onde é possível verificar que o revestimento formado possui difusão para dentro do substrato, e não se trata de um simples filme com interface definida. Isso já é um indicativo de boa adesão do revestimento. A luz polarizada foi utilizada para evidenciar a região formada pelo filme de DLC (cor esverdeada – parte superior), região de transição DLC/carbeto (azulado), região de carbeto (rosa) e substrato (amarelo). Nota-se que, em todas as transições não há interface definida, ou seja, trata-se de uma interface gradual do tipo metal \Rightarrow carbeto \Rightarrow DLC (ligaTi/TiC/DLC), ao contrário do que acontece nas técnicas convencionais, como “sputtering”, onde claramente se verifica a transição filme/substrato.

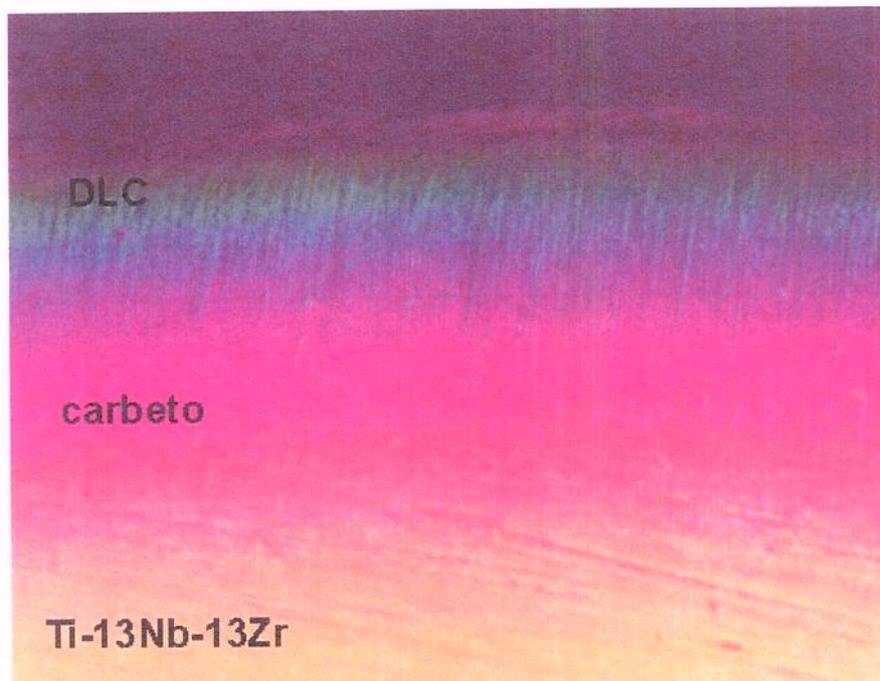


Figura 4.22. Microscopia óptica da interface DLC/Ti-13Nb-13Zr (com luz polarizada). Aumento original: 100X.

4.2.2. Nanodureza e adesão

A nanoindentação foi utilizada para medir a nanodureza dos revestimentos de DLC formados em 6 amostras de Ti-13Nb-13Zr (discos com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura - 3 medidas em cada amostra). Os valores médios obtidos para cada amostra são apresentados na Tabela 4.1. A nanodureza média encontrada para o DLC foi de: 17.55 GPa (desvio padrão de: 0.73 GPa), para 1 hora de deposição (Figura 4.23). A dureza da camada depositada é cerca de 2 vezes a dureza do substrato de Ti-13Nb-13Zr (aumento de 100 por cento).

Tabela 4.1. Resultado do ensaio de nanoindentação (nanodureza em GPa)

No.	Dureza da liga de Ti	Dureza do revestimento
1	8.4	17.9
2	9.9	18.1
3	8.8	16.6
4	7.9	17.3
5	8.1	16.7
6	7.2	18.5
Média	8.38	17.55
Desvio padrão	0.79	0.73

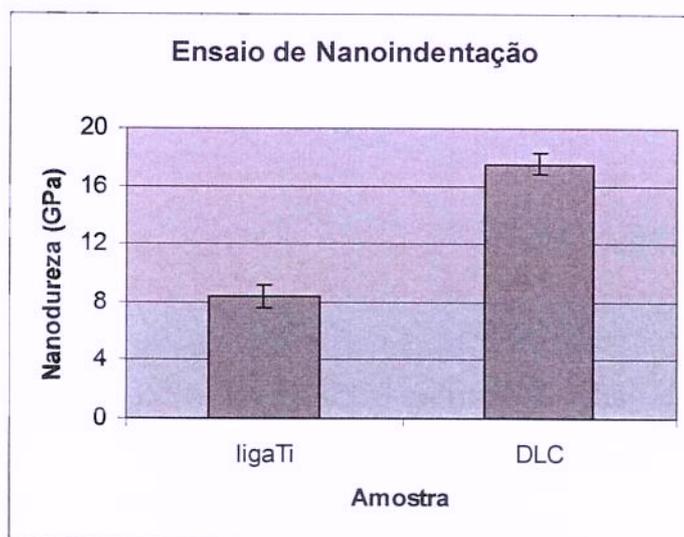


Figura 4.23. Nanodureza do substrato de Ti-13Nb-13Zr e do revestimento de DLC.

O teste de puxamento (ou *pull-test*) foi utilizado para analisar a adesão do revestimento de DLC (Figura 4.24). O ensaio foi feito em 6 amostras de Ti-13Nb-13Zr revestidas com DLC, e em todos os casos, a resistência à adesão do DLC excedeu a resistência do adesivo epóxi usado, que está em torno de 80 a 100 MPa, e nenhuma delaminação do revestimento foi observada.

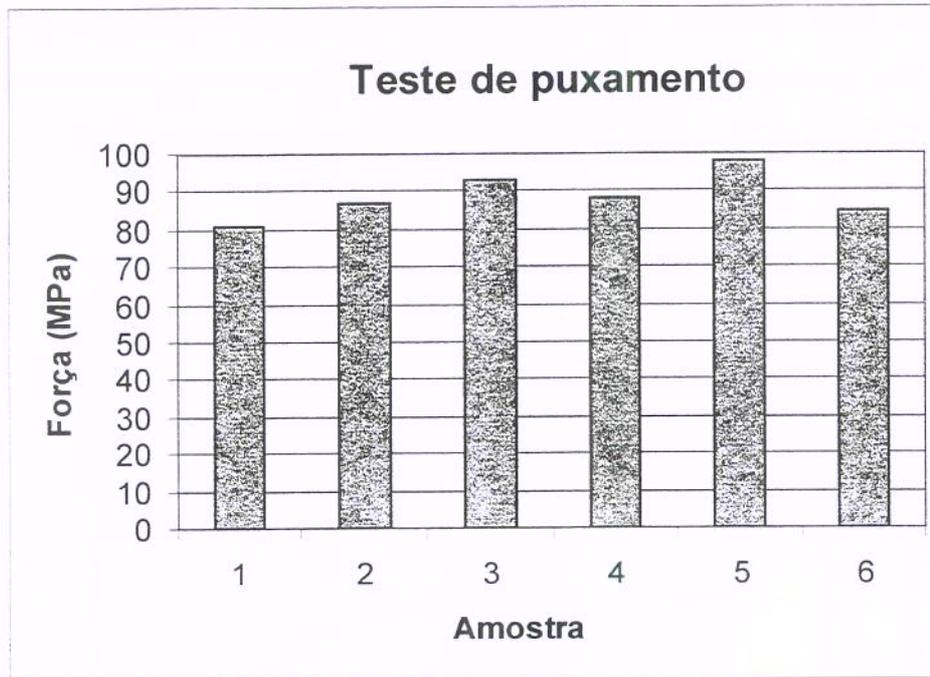


Figura 4.24. Teste de puxamento do DLC/Ti-13Nb-13Zr em 6 amostras (força média = 87.8 MPa; e desvio padrão = 7.0 MPa).

4.3. Resistência à corrosão

A Figura 4.25 mostra as curvas de polarização das amostras de Ti-13Nb-13Zr com e sem revestimento de DLC, em solução de Hanks. A amostra de liga de Ti revestido com DLC mostrou potencial de corrosão mais elevado, i.e, mais nobre do que a amostra não revestida: $E_{corr} = -328$ mV para DLC e $E_{corr} = -430$ mV para Ti-13Nb-13Zr, um patamar acima de aproximadamente 100 mV. Além disso, pode ser visto nessa mesma figura que a densidade de corrente para formação de filme protetor é menor para DLC revestindo liga de Ti ($i_{corr} = 0.52 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) do que para a liga de Ti ($i_{corr} = 0.68 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), e isto indica melhor resposta para o DLC.

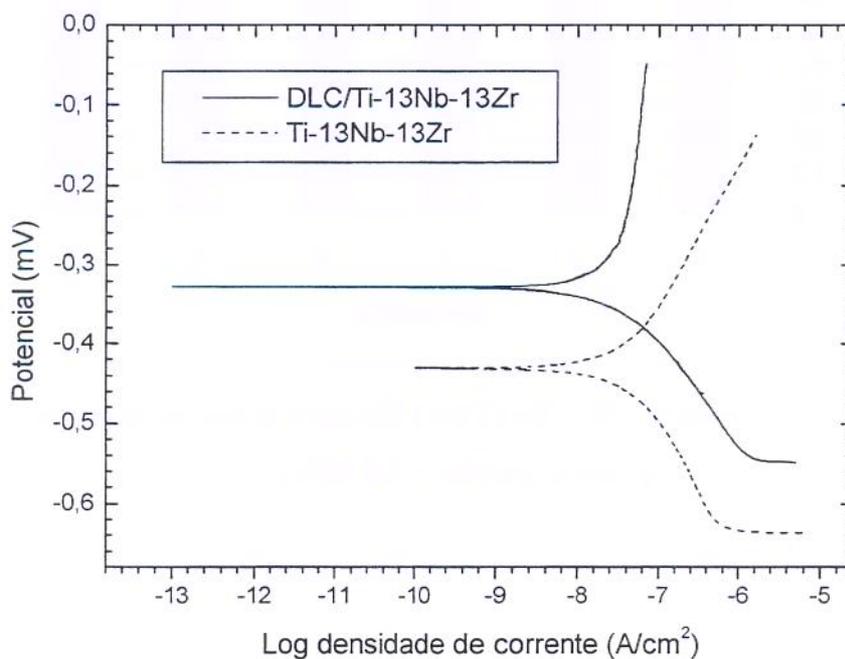


Figura 4.25. Curvas de polarização de Tafel para Ti-13Nb-13Zr com e sem revestimento de DLC em solução de Hanks.

As amostras de Ti-13Nb-13Zr com e sem revestimento de DLC foram submetidos à análise de corrosão utilizando a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), que foram feitas antes e após o ensaio de polarização de Tafel. Com isso, é possível verificar o efeito de um processo de corrosão acelerado no desempenho desses materiais. Os resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica são apresentados na forma de diagramas de Bode Fase e Bode $|Z|$. Para uma melhor visualização, esses resultados são apresentados nas Figuras 4.26 e 4.27. A Figura 4.26 mostra cada material em separado, isto é, a Fig. 4.26a mostra o resultado para a liga de Ti, e a Fig. 4.26b para o DLC. E a Figura 4.27 compara a liga com e sem revestimento.

Estes diagramas são interpretados com base em circuitos elétricos equivalentes, que representam os processos físicos que ocorrem no sistema sob investigação (KIM et al, 2005). O modelo adotado foi o mesmo de Pan et al (1996) e Kim et al (2005), que utilizaram esse modelo para simular os dados de titânio e DLC revestindo Ti-6Al-4V em solução salina, respectivamente, e é dado na Figura 4.28. Este modelo assume a existência de duas camadas no filme formado na superfície do substrato: uma camada mais interna e compacta, chamada de barreira, e uma camada mais externa, chamada porosa. Na Figura 4.28, Cp and Rp representam a capacitância da camada mais externa (CPE1 – elemento de constante de fase 1) e resistência da camada porosa, respectivamente. Cb e Rb representam a capacitância da camada interna (CPE2 – elemento de constante de fase 2) e resistência da camada barreira, respectivamente. Rs representa a resistência da solução eletroquímica, que existe entre o eletrodo de referência (RE) e o eletrodo de trabalho (WE).

A resistência da camada porosa do revestimento (Rp) e a resistência da camada interna (Rb) diminuem quando a área delaminada aumenta, e portanto, é importante que os valores de Rp e Rb não diminuam após o tempo de exposição, ou após o ensaio de polarização. O programa Zview foi utilizado para simular os dados utilizando o modelo proposto, e os valores obtidos são mostrados na Tabela 4.2.

Na Figura 4.26, a EIE apresentada como ($|Z|$) vs frequência, antes e após Tafel, mantêm a

mesma posição das curvas tanto para DLC quanto para a liga de Ti. Na EIE apresentada como ângulo de fase vs frequência, é observado um deslocamento do ângulo de fase para ambos os materiais, sendo que as amostras após Tafel mostram um ângulo de fase ligeiramente superior, indicando a formação de um filme protetor, como também observado através das curvas de polarização (Figura 4.25). A Tabela 4.2 mostra que os valores de R_p e R_b não diminuem significativamente após o teste de polarização. Além disso, após o ensaio de polarização, as amostras apresentam valores de constante de fase (CPE) na mesma ordem de grandeza. Esses resultados sugerem que ambos os materiais foram bem estabilizados, sem a formação de pites.

A Figura 4.27 mostra que o filme de DLC aumenta a impedância ($|Z|$) da liga de Ti, e obtém um ângulo de fase superior, e isso se repete tanto antes quanto após o ensaio de polarização de Tafel. Comparando os resultados da liga com e sem revestimento de DLC (Tabela 4.2), os valores superiores de R_p e R_b observado nos filmes de DLC (aproximadamente 7 vezes), quando comparado à liga sem revestimento, indicam que o revestimento de DLC oferece proteção contra a corrosão para a liga de Ti, que segundo a literatura, possui resistência à corrosão superior às outras ligas biocompatíveis. Estes resultados também indicam que o revestimento de DLC pode reduzir o potencial de liberação de íons dos implantes.

Portanto, os resultados indicam que o modelo utilizado é adequado para explicar o comportamento das amostras expostas em solução de Hanks, e indicam a característica protetora dos revestimentos de DLC produzido pelo processo de imersão em plasma.

Tabela 4.2. Valor dos elementos do circuito equivalente em solução de Hanks.

Amostras	R_s (Ω)	C_p ($10^{-6}F$)	R_p (Ω)	C_b ($10^{-6}F$)	R_b ($10^6\Omega$)
Liga de Ti antes	102.5	0.17	726	7.84	0.91
Liga de Ti depois	102.9	0.19	675	8.94	0.88
DLC antes	115.7	8.48	5543	3.54	8.72
DLC depois	115.9	9.09	4809	4.05	7.63

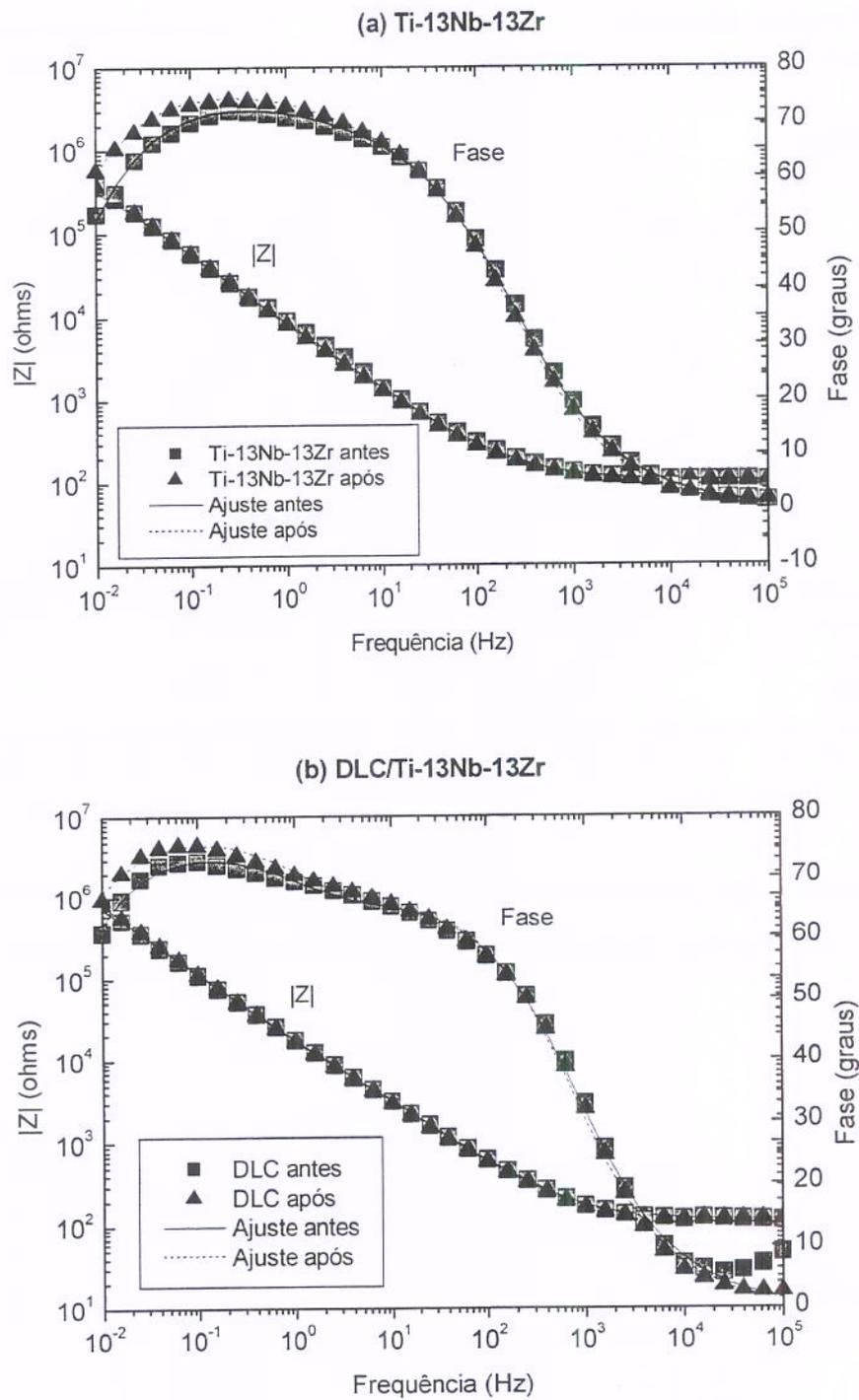


Figura 4.26. Diagramas de Bode para as amostras de Ti-13Nb-13Zr antes e após Tafel em solução de Hanks: (a) sem revestimento; e (b) com revestimento de DLC.

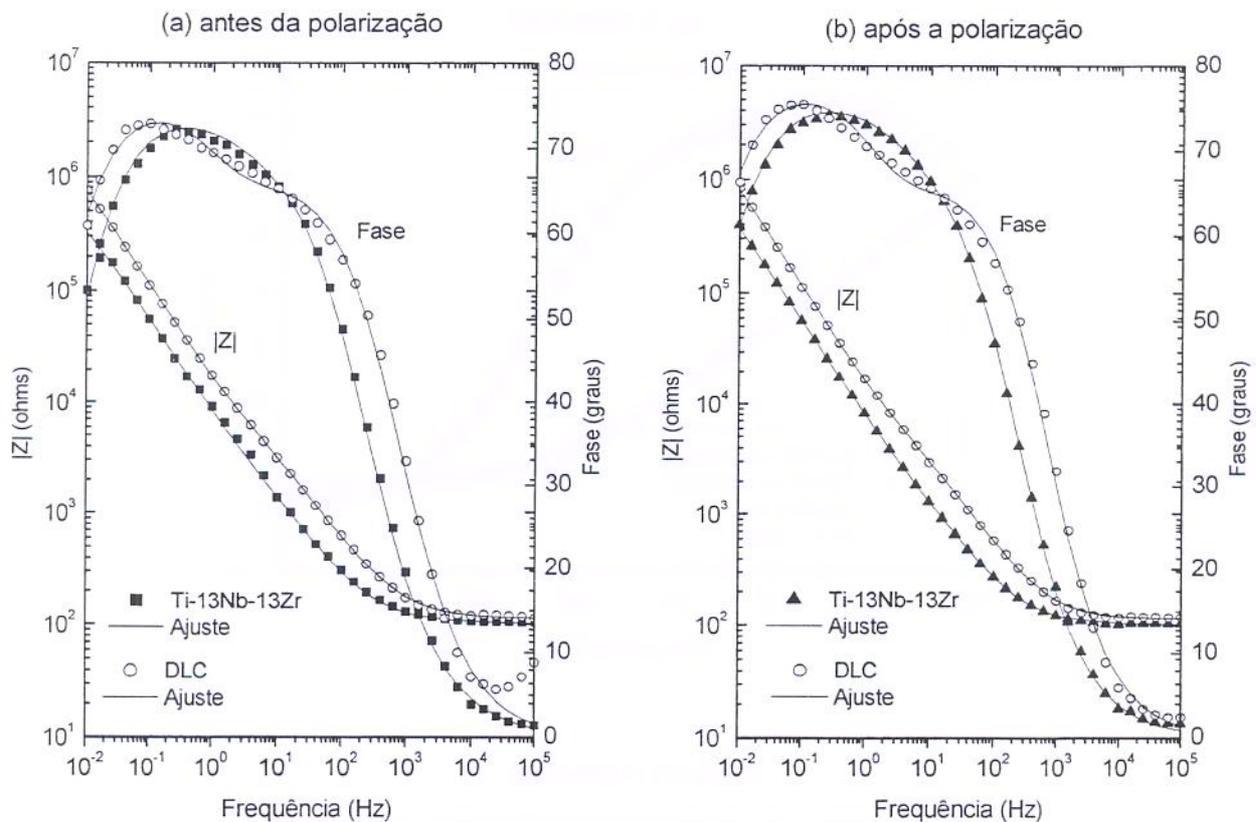


Figura 4.27. Diagramas de Bode para comparação das amostras de Ti-13Nb-13Zr com e sem revestimento de DLC: (a) antes; e (b) após polarização de Tafel.

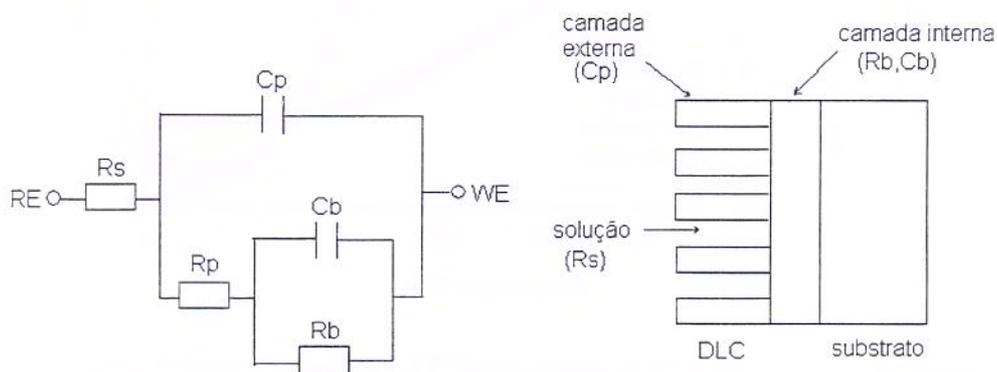


Figura 4.28. Circuito equivalente utilizado para simular os dados de EIE.

4.4. Biocompatibilidade *in vitro*

4.4.1. Análise de citotoxicidade

A viabilidade celular de fibroblastos cultivados em substratos de Ti-13Nb-13Zr com e sem revestimento de DLC foram obtidas utilizando o ensaio de citotoxicidade descrito no Cap. 3.4.1. Os fibroblastos foram utilizados porque são representativos de células encontradas no ambiente de implantes ortopédicos articulados. O número médio de células obtidas no ensaio de citotoxicidade é mostrado na Figura 4.29. Tanto o DLC revestindo titânio, quanto a amostra de Ti-13Nb-13Zr sem revestimento não mostram qualquer tipo de citotoxicidade para células fibroblásticas.

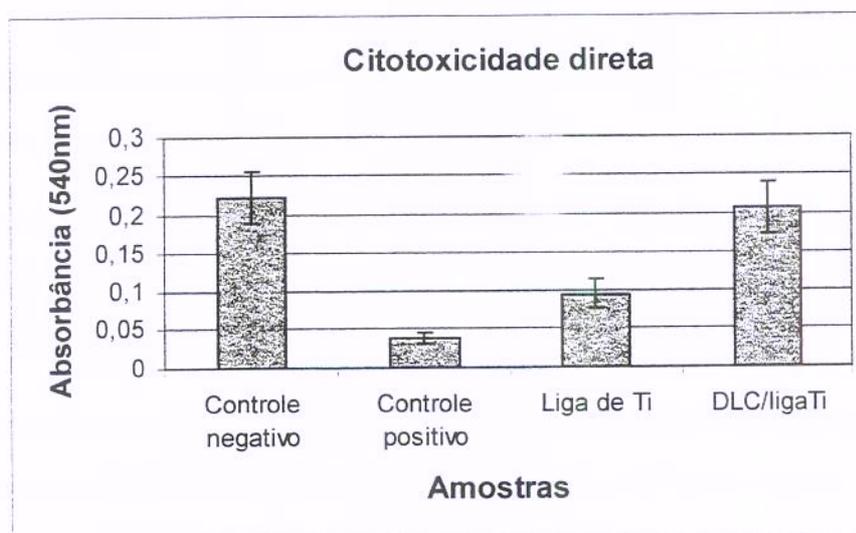


Figura 4.29. Ensaio de citotoxicidade celular. As colunas representam a média de seis leituras de absorbâncias e as barras verticais o intervalo de desvio padrão.

Os resultados indicam também que a viabilidade celular do revestimento de DLC não é significativamente diferente do controle negativo (células cultivadas em material não tóxico, i.e., poliestireno), e que a viabilidade celular sobre a liga de Ti foi significativamente menor que a do DLC. Verifica-se que o DLC aumentou a proliferação celular de fibroblastos na liga de Ti, desde que o número médio de células viáveis sobre o DLC foi muito maior do que na liga de titânio (aproximadamente 2 vezes). Esses resultados foram comprovados utilizando-se a “Análise de

Variância” ou ANOVA¹ (Tabela 4.3). A hipótese utilizada na ANOVA é:

H₀: $\mu_{CN} = \mu_{CP} = \mu_{Ti} = \mu_{DLC/Ti}$ contra a hipótese:

H₁: pelo menos uma das médias é diferente

Onde: μ_{CN} : média do controle negativo (poliestireno); μ_{CP} : média do controle positivo (discos de látex); μ_{Ti} : média da liga Ti-13Nb-13Zr; e $\mu_{DLC/Ti}$: média do DLC/Ti-13Nb-13Zr.

Tabela 4.3. Análise de variância para o ensaio de citotoxicidade².

Causa de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamentos	3	0.1423	0.0474	71.7104
Resíduo	20	0.0132	0.0007	
Total	23	0.1556		

Como o valor calculado de F (= 71.7104, Tabela 4.3) é maior do que o F tabelado³ [F(3,20) = 3.10], F é significativa ao nível de 5%. Em outras palavras, H₀ é falsa, e é possível afirmar que ao nível de significância de 5%, pelo menos um dos grupos tem média diferente.

Para verificar qual média é diferente, ou quais são diferentes, deve-se fazer o teste de Tukey (VIEIRA, 1981), que permite, feito a ANOVA, comparar médias de tratamentos duas a duas. Para proceder ao teste de Tukey, deve-se estabelecer o nível de significância α (neste trabalho padronizado em 5%) e calcular a diferença mínima significativa (dms⁴), que é igual a 0.0416.

¹ Para testar que as médias de duas populações contra a hipótese de que as médias de duas populações são diferentes utiliza-se o teste t, desde que seja razoável pressupor que a variável em análise tem, nas duas populações, distribuição normal ou aproximadamente normal. Mas, quando se trata de comparar a média de mais de 2 populações, o teste t não se aplica, e deve ser feita a análise de variância (VIEIRA, 1981).

² Sendo k = n° de tratamentos = 4, e r = n° de repetições = 6, os graus de liberdade são: [k-1 = 4; e k(r-1) = 20].

³ O F tabelado é função do nível de significância adotado (no trabalho, $\alpha = 5\%$) e dos graus de liberdade. Ou seja, F(3,20) com 5% = 3.10.

⁴ dms é igual a: q * raiz quadrada (QMR/r), onde QMR é o quadro médio de resíduo (=0.0007), r o número de repetições (=6). O valor de q é tabelado em função de k (=número de tratamentos=4), e k(r-1) =20, e para $\alpha = 5\%$, q(4,20) =3.96.

Toda vez que o valor absoluto de uma diferença entre médias for igual ou superior a dms é dito que existe diferença entre os tratamentos. Na Tabela 4.4 pode ser visto o valor absoluto das diferenças entre médias, e os valores da tabela que são maiores do que a dms estão marcados com asterisco (*).

Tabela 4.4. Valor absoluto das diferenças entre pares das médias para o ensaio de citotoxicidade.

	μ_{CN}	μ_{CP}	μ_{Ti}
μ_{CP}	0.1845 (*)	-	-
μ_{Ti}	0.1275 (*)	0.057 (*)	-
$\mu_{DLC/Ti}$	0.0155	0.169 (*)	0.112 (*)

Pelo teste de Tukey, ao nível de 5%, é possível concluir que o DLC apresentou resposta similar ao controle não tóxico (controle negativo - CN), que por sua vez, apresentou maior viabilidade celular que a liga de Ti, que é diferente do material tóxico (controle positivo - CP). Ou seja,

$$\mu_{CN} = \mu_{DLC/Ti} > \mu_{Ti} > \mu_{CP}$$

IMPORTANTE: antes de se analisar o ensaio de adesão celular deve-se tomar o cuidado para não confundir os controles positivos e negativos de cada ensaio.

- No caso de citotoxicidade, **controle negativo (CN) para citotoxicidade** significa que o **material não é tóxico**, portanto um material “bom”.
- No caso de adesão celular, **controle positivo (CP) para adesão** significa que o **material adere**.

4.4.2. Análise de adesão celular

A Fig. 4.30 mostra a adesão de fibroblastos após 2h e 24h. Os resultados são apresentados como porcentagem celular em relação ao controle positivo (substrato que é ótimo para adesão). Não houve variações significativas no padrão de adesão celular ao DLC e ao controle positivo, e a adesão foi maior sobre o DLC do que sobre a liga de Ti, nos dois tempos estudados (de acordo com análise estatística). A ANOVA e o teste de Tukey foram calculados para os dois tempos estudados (Tab 4.5-4.8). Esses resultados mostram que a adesão de fibroblastos à liga de Ti pode ser significativamente melhorada após o seu revestimento com DLC.

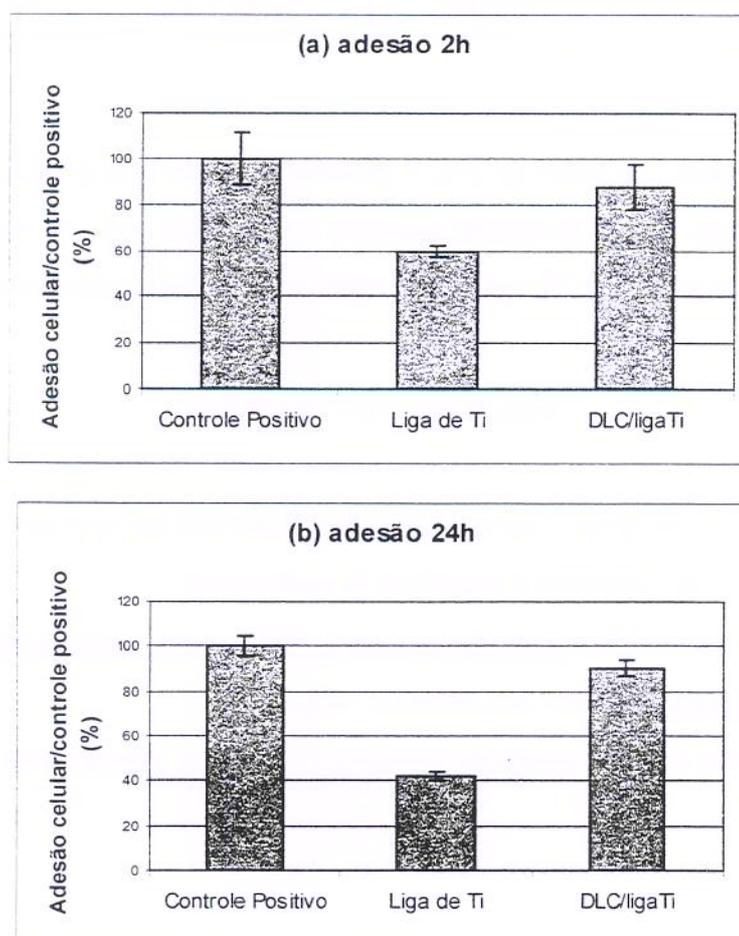


Figura 4.30. Ensaio de adesão celular com: (a) 2 horas; e (b) 24 h. As colunas representam a média de seis leituras de absorbâncias e as barras verticais o intervalo de desvio padrão.

A hipótese utilizada na ANOVA (para os dois tempos estudados) é:

$H_0: \mu_{CP} = \mu_{CN} = \mu_{Ti} = \mu_{DLC/Ti}$ contra a hipótese:

H_1 : pelo menos uma das médias é diferente

Onde: μ_{CP} : média do controle positivo (poliestireno); μ_{CN} : média do controle negativo (Teflon); μ_{Ti} : média da liga Ti-13Nb-13Zr; e $\mu_{DLC/Ti}$: média do DLC/Ti-13Nb-13Zr.

Como o valor de F para 2 h e 24 h (ANOVA nas Tab 4.5 e 4.6, respectivamente), é maior do que o F tabelado ($=3.10$), é possível afirmar que ao nível de significância de 5%, tanto para o ensaio de 2h quanto para o de 24h, pelo menos um dos grupos tem média diferente.

Tabela 4.5. Análise de variância para o ensaio de adesão de 2h.

Causa de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamentos	3	1.0477	0.3492	40.7097
Resíduo	20	0.1716	0.0086	
Total	23	1.2193		

Tabela 4.6. Análise de variância para o ensaio de adesão de 24h.

Causa de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamentos	3	0.1397	0.0466	107.7445
Resíduo	20	0.0086	0.0004	
Total	23	0.1484		

Tabela 4.7. Valor absoluto das diferenças entre pares das médias para o ensaio de adesão de 2h.

	μ_{CP}	μ_{CN}	μ_{Ti}
μ_{CN}	0.5327 (*)	-	-
μ_{Ti}	0.3682 (*)	0.1645 (*)	-
$\mu_{DLC/Ti}$	0.1147	0.4180 (*)	0.2535 (*)

Tabela 4.8. Valor absoluto das diferenças entre pares das médias para o ensaio de adesão de 24h.

	μ_{CP}	μ_{CN}	μ_{Ti}
μ_{CN}	0.1845 (*)	-	-
μ_{Ti}	0.1275 (*)	0.0570 (*)	-
$\mu_{DLC/Ti}$	0.0188	0.1657 (*)	0.1087 (*)

Fazendo o teste de Tukey, o valor de dms é igual a 0.1497, para o ensaio de 2h, e igual a 0.0336, para o ensaio de 24h. As médias maiores que a dms estão marcadas com (*) na Tabela 4.7 e 4.8, respectivamente.

Pelo teste de Tukey, ao nível de 5%, é possível concluir que o DLC apresentou adesão similar ao controle positivo (CP - material que adere bem), e maior adesão que a liga de Ti, que por sua vez adere melhor que o controle negativo (CN - Teflon). Ou seja,

$$\mu_{CP} = \mu_{DLC/Ti} > \mu_{Ti} > \mu_{CN}$$

4.4.3. Análise de morfologia celular

A Figura 4.31 mostra a morfologia celular em meio de cultura após 24 h de incubação, utilizando microscopia de contraste de fase (MCF). A morfologia de fibroblastos cultivados no revestimento de DLC/vidro e no material controle (lamínula de vidro, próprio para cultura celular) foi similar. O exame morfológico não mostrou nenhuma evidência de dano celular, e as células possuem características típicas de crescimento e dispersão.

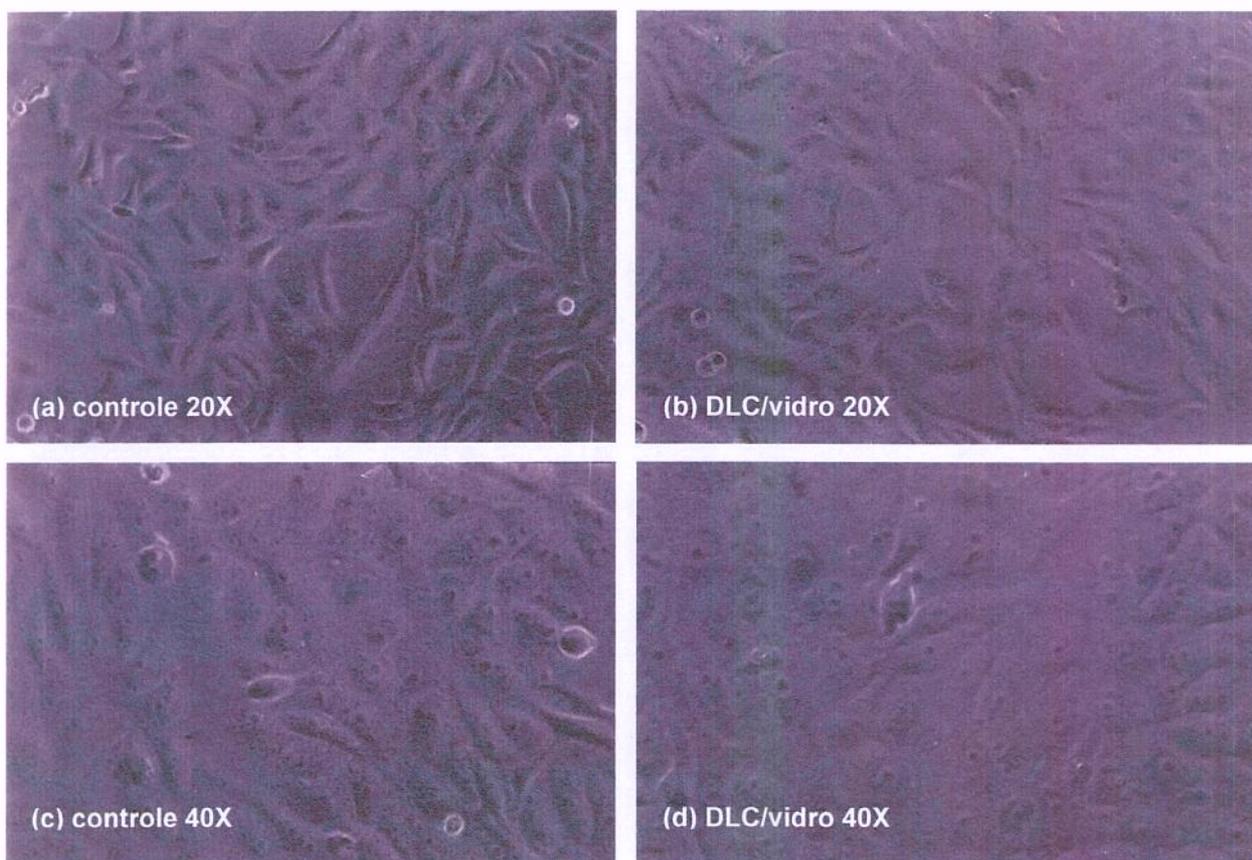


Figura 4.31. Imagem por microscopia de contraste de fase de células fibroblásticas após 24 h de cultivo. Células Vero sobre controle (esquerda) e DLC/vidro (direita) com aumento original de 20X (topo) e 40X (baixo).

O azul de toluidina (AT) é um corante básico que, com pH 4.0, pode corar o DNA, RNA e glicossaminoglicanas. Em todas as amostras (Figura 4.32), foram encontradas células basófilas, devido à alta concentração de RNA, sugerindo que as células são capazes de sintetizar proteínas. Os dados citoquímicos indicam uma alta atividade metabólica das células sobre o revestimento de DLC, similar ao controle (vidro). Não houve evidência de morte ou células anormais. Isto indica claramente que o DLC não é tóxico para as células.

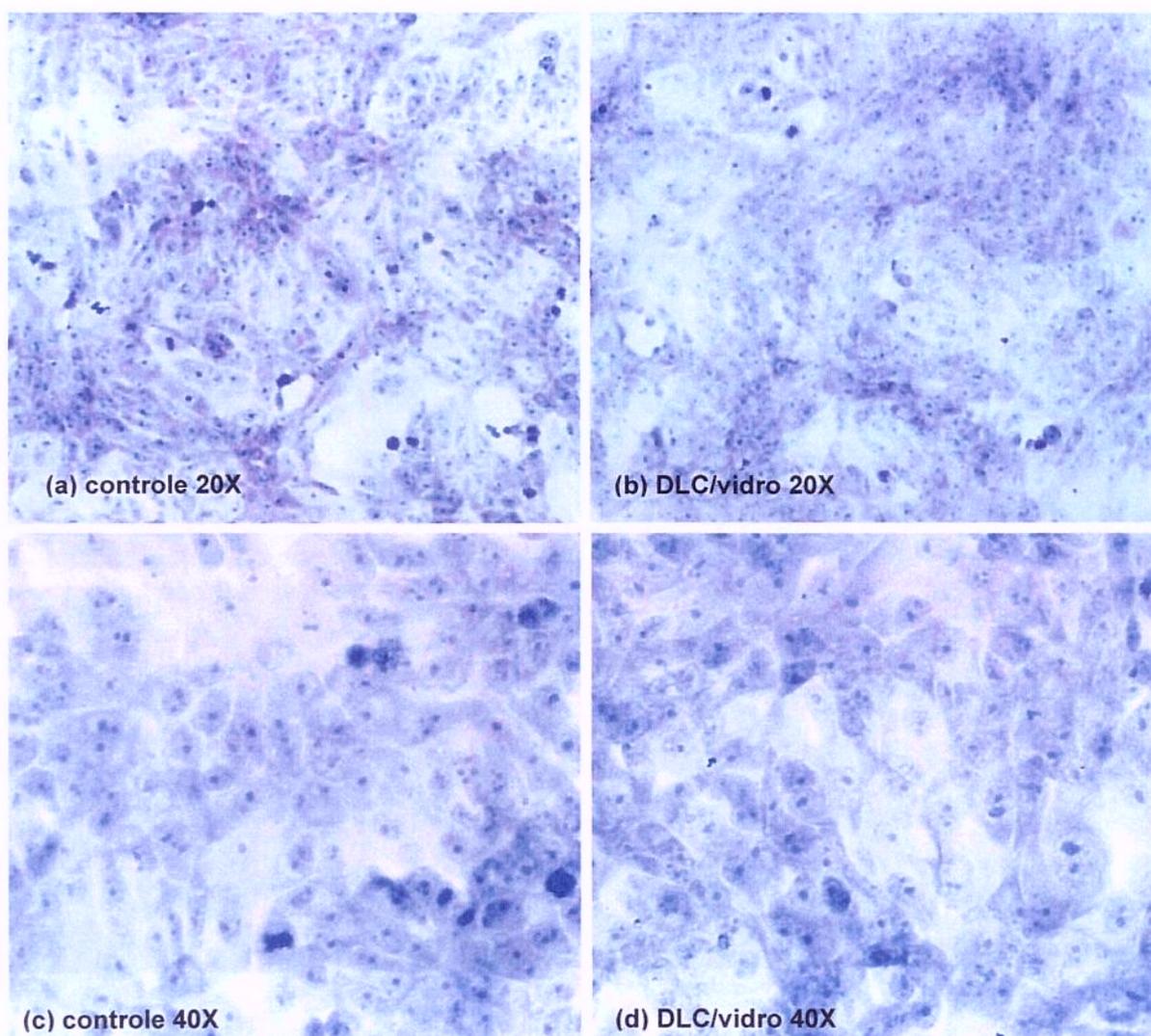


Figura 4.32. Morfologia de células fibroblásticas coradas com azul de toluidina (pH 4.0) após 24h de cultivo. Células Vero sobre controle (esquerda) e DLC/vidro (direita) com aumento original de 20X (topo) e 40X (baixo).

A morfologia de fibroblastos pode ser observada nas micrografias obtidas por MEV (Figura 4.33). As células Vero formaram uma camada semiconfluyente sobre o material controle (lamínulas de vidro não revestidas), sobre o DLC/vidro e sobre o DLC/Ti-13Nb-13Zr. Essas células são alongadas, muito achatadas e com microvilosidades ou prolongamentos celulares em sua superfície. Pode ser visto nessas imagens também que a morfologia celular não é alterada. A presença de uma camada semiconfluyente de células alongadas e bem aderidas sobre o revestimento de DLC, demonstra a boa resposta celular ao material em estudo. A liga de Ti-13Nb-13Zr não revestida (Fig 4.33g e 4.33h) exibiu boa morfologia celular, mas apresenta menos células em sua superfície.

A microscopia de força atômica (MFA) pode ser utilizada para obter imagens de uma grande variedade de células e tem demonstrado ser útil para revelar estruturas submembranas que não podem ser vistas em micrografias obtidas por MEV. Outra vantagem da MFA sobre a MEV é o fato das imagens celulares poderem ser feitas com as células vivas e sem necessidade de fixação, utilização de vácuo ou revestimento (YAMASHINA et al, 1995; BRAET et al, 2001). Com isso é possível a visualização de várias arquiteturas do citoesqueleto e organelas, sem a necessidade de qualquer preparação.

A morfologia de fibroblastos em lamínulas de vidro (Fig. 4.34) e DLC depositado em vidro (Fig. 4.35) foram analisadas por microscopia de força atômica (MFA). As células estão muito achatadas e o núcleo é claramente visto (um círculo oval localizado no centro da célula), cercado por um citoplasma bem esparramado, com numerosas fibras de *stress* intercelulares abaixo da membrana celular. Os núcleos nas Figura 4.34 a-c, e 4.35 a-c foram marcadas com a letra "N", e algumas fibras de *stress* com a letra "F". As vesículas mereceram destaque nas Figuras 4.34d e 4.35d. Nota-se que as fibras do citoesqueleto são mais claramente visíveis por MFA do que por MEV. É verificado, portanto, que a MFA pode ser uma importante ferramenta na análise de células.

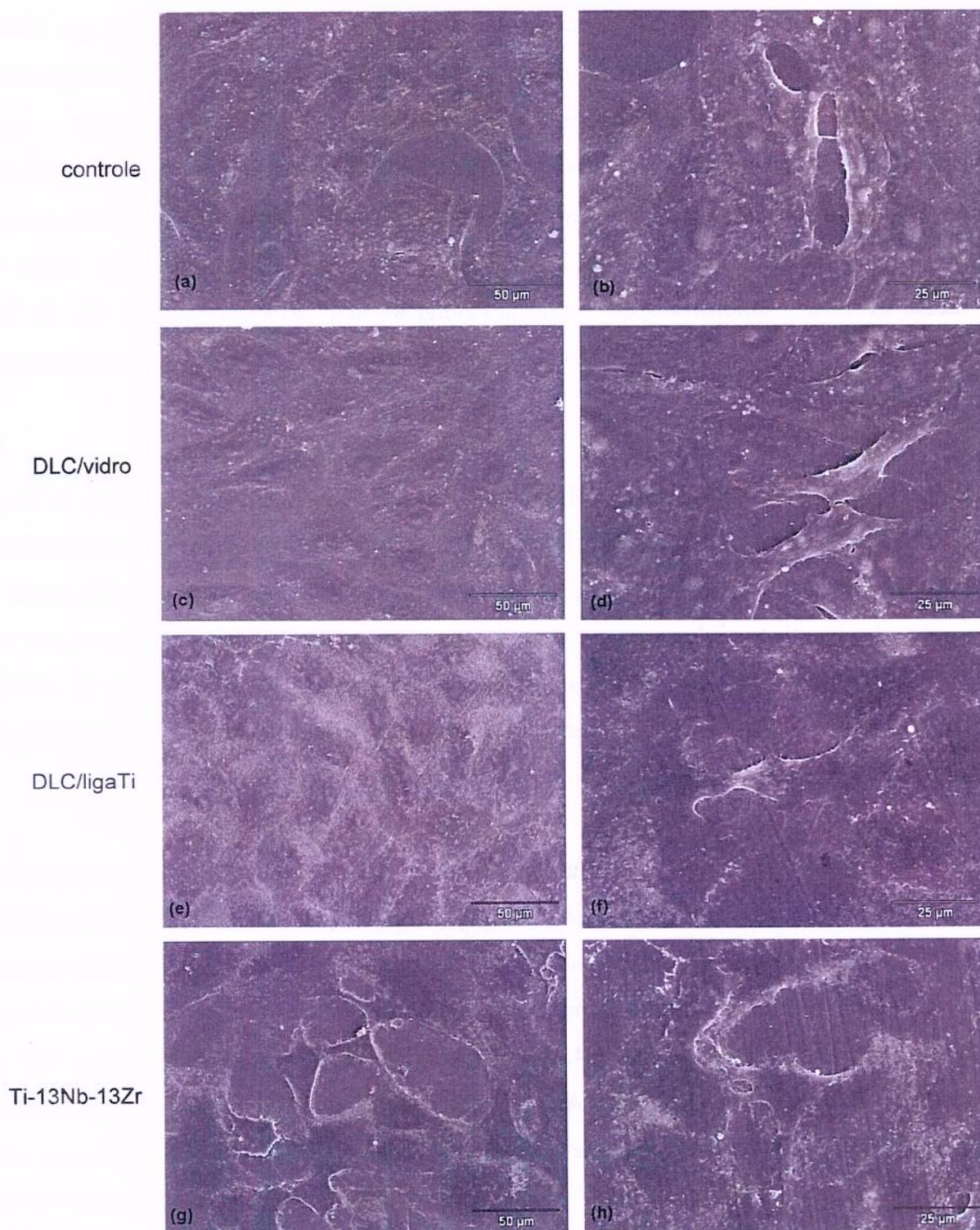


Figura 4.33. Imagem por MEV de células fibroblásticas cultivadas durante 24h sobre: (a)-(b) vidro (material controle); (c)-(d) DLC/vidro; (e)-(f) DLC/Ti-13Nb-13Zr; e (g)-(h) Ti-13Nb-13Zr.

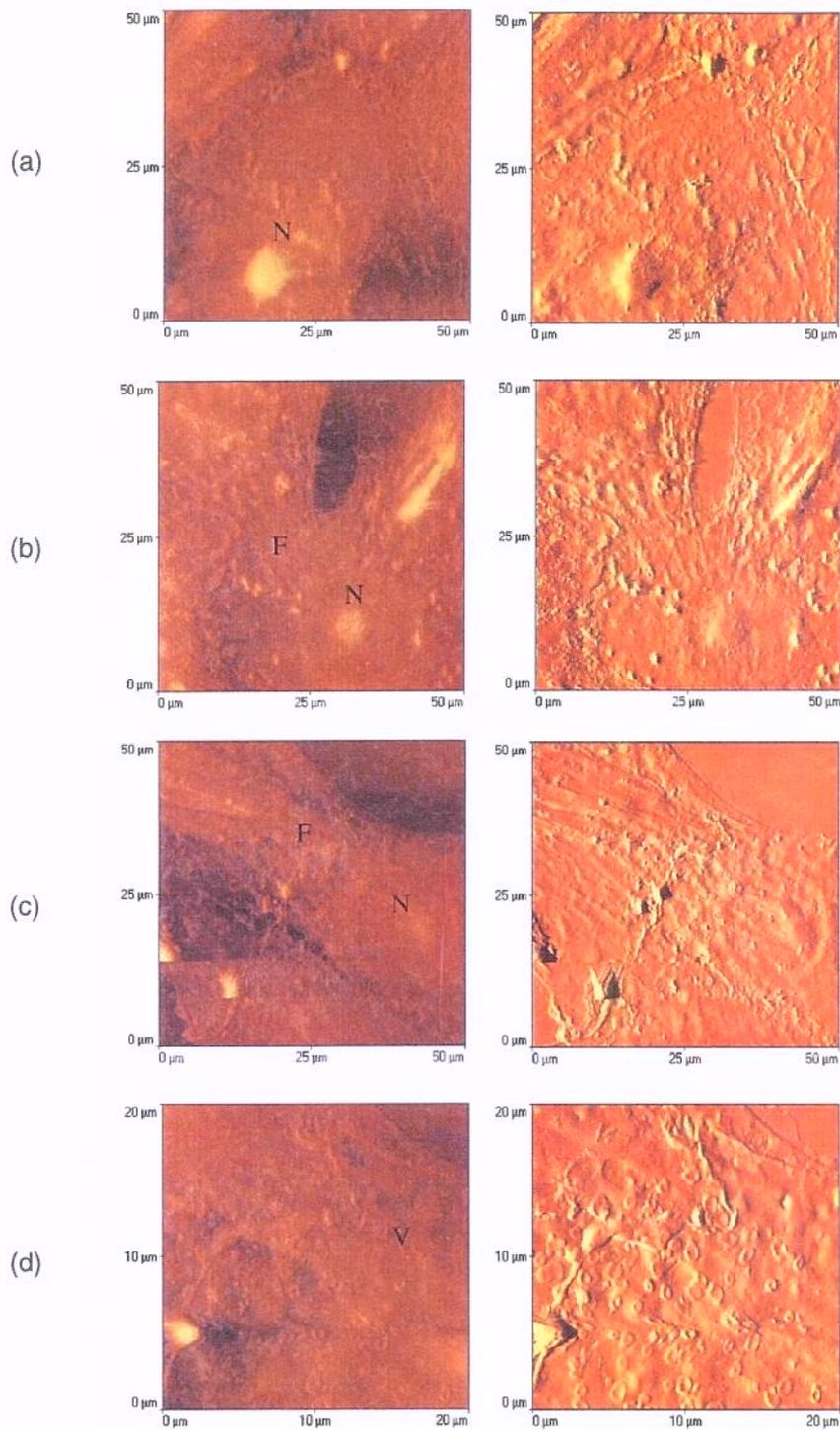


Figura 4.34. Imagens de MFA mostrando células fibroblásticas cultivadas sobre o material controle (vidro). Do lado direito, a mesma imagem com sombreamento. N = núcleo; F = fibras de *stress*; V = vesículas (formas ovaladas em grande número no item d).

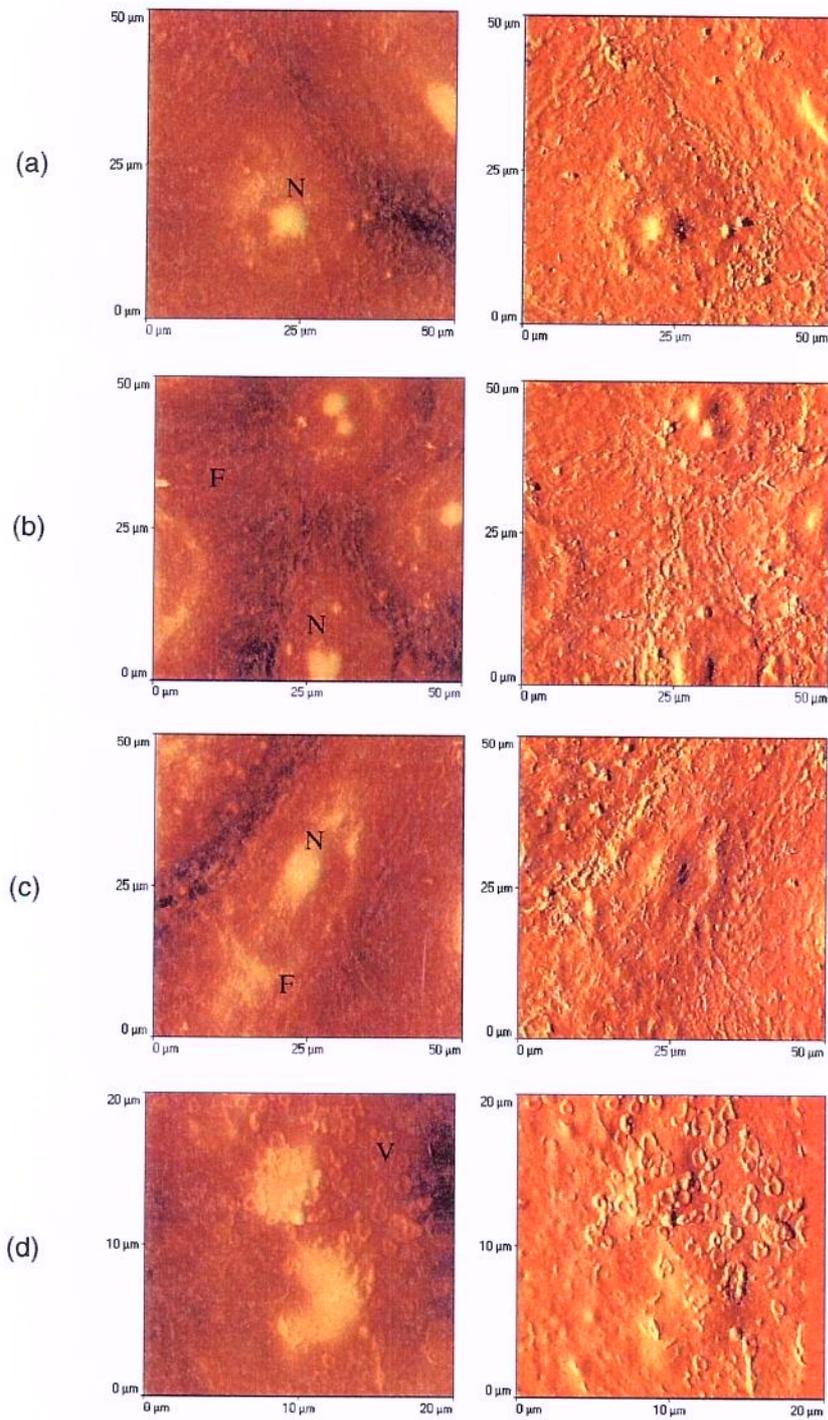


Figura 4.35. Imagens de MFA mostrando células fibroblásticas cultivadas sobre o DLC/vidro. Do lado direito, a mesma imagem com sombreamento. N = núcleo; F = fibras de *stress*; V = vesículas (formas ovaladas em grande número no item d).

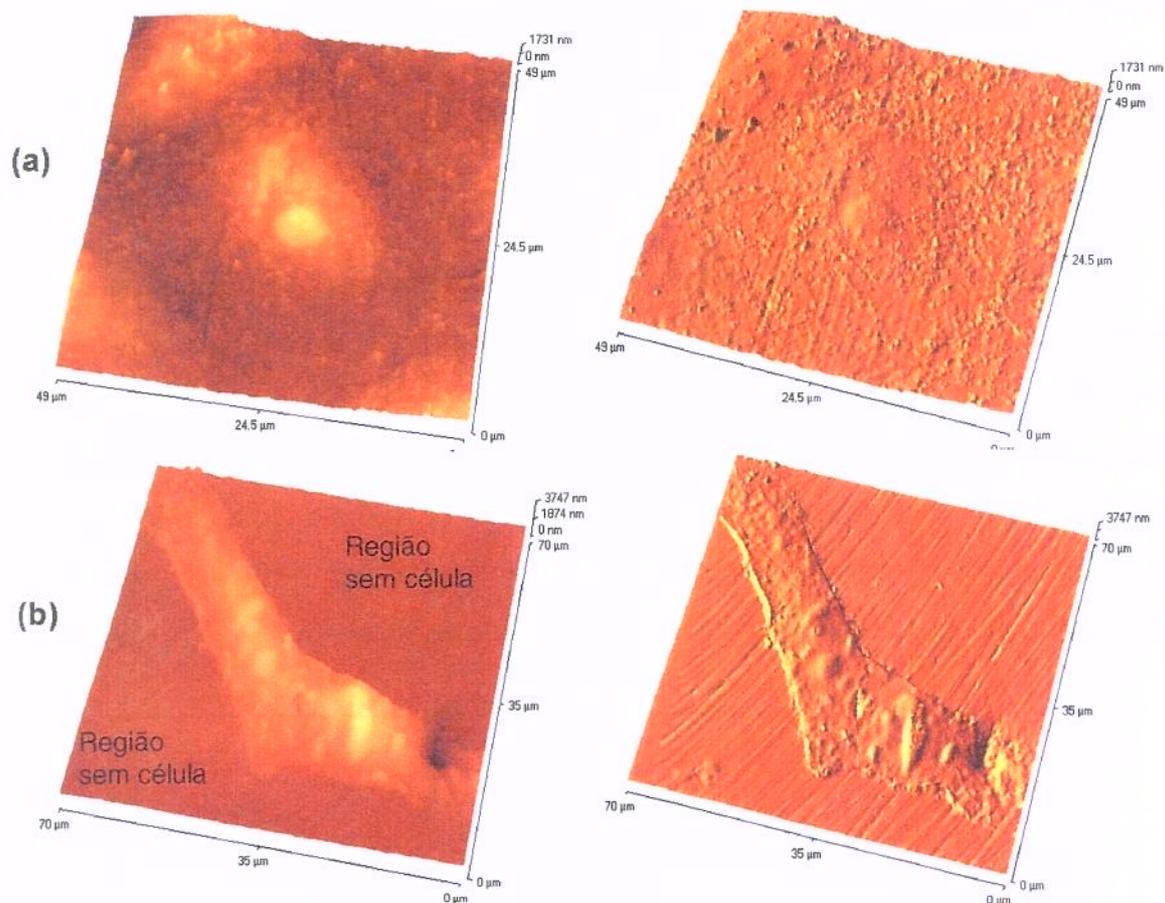


Figura 4.36. Imagens de MFA mostrando células fibroblásticas cultivadas em: (a) DLC/Ti-13Nb-13Zr; e (b) Ti-13Nb-13Zr. Do lado direito, a mesma imagem com sombreamento.

A Figura 4.36 mostra, utilizando MFA, a morfologia de células sobre a liga Ti-13Nb-13Zr com e sem revestimento de DLC. As células sobre o DLC são muito mais achatadas (Fig 4.36a) e o núcleo pode ser visto claramente, enquanto células cultivadas sobre a liga sem revestimento são menos achatadas e é difícil a visualização do núcleo (Fig 4.36b). Além disso, várias regiões ficaram sem células, ao contrário do DLC revestindo a liga, que praticamente não teve região sem células, i.e., as células formaram uma camada semiconfluente sobre o filme.

A Figura 4.37 mostra uma análise quantitativa do grau de achatamento das células sobre o DLC (Fig 3.37a) e sobre a liga (Fig 4.37b), que correspondem às Figuras 4.36a e 4.36b, respectivamente. Nota-se que, no caso do DLC, o citoplasma (área sem o núcleo) está muito

achatado, com uma diferença de no mínimo 1400 nm em relação à liga não revestida. Desde que a morfologia celular está relacionada à função celular, os resultados sugerem que as células aderem melhor na liga revestida com DLC, do que na liga de titânio sem revestimento, confirmando os resultados quantitativos de adesão (Cap. 4.4.2).

Os resultados de biocompatibilidade *in vitro* encontrados neste trabalho estão de acordo com os resultados da literatura (Cap. 2.3.2.3). Ou seja, foi verificado que a morfologia das células no revestimento foi similar ao controle, como no trabalho de Thomson et al (1991) e Parker et al (1994), indicando a biocompatibilidade do DLC, e foi verificado que o DLC depositado em Ti-13Nb-13Zr pode estar atuando como uma barreira de difusão entre a liga e as células fibroblásticas, pois a liga não revestida apresentou menos células, como ocorreu no trabalho de Dowling et al (1999) que estudou o DLC revestindo a liga Ti-6Al-4V.

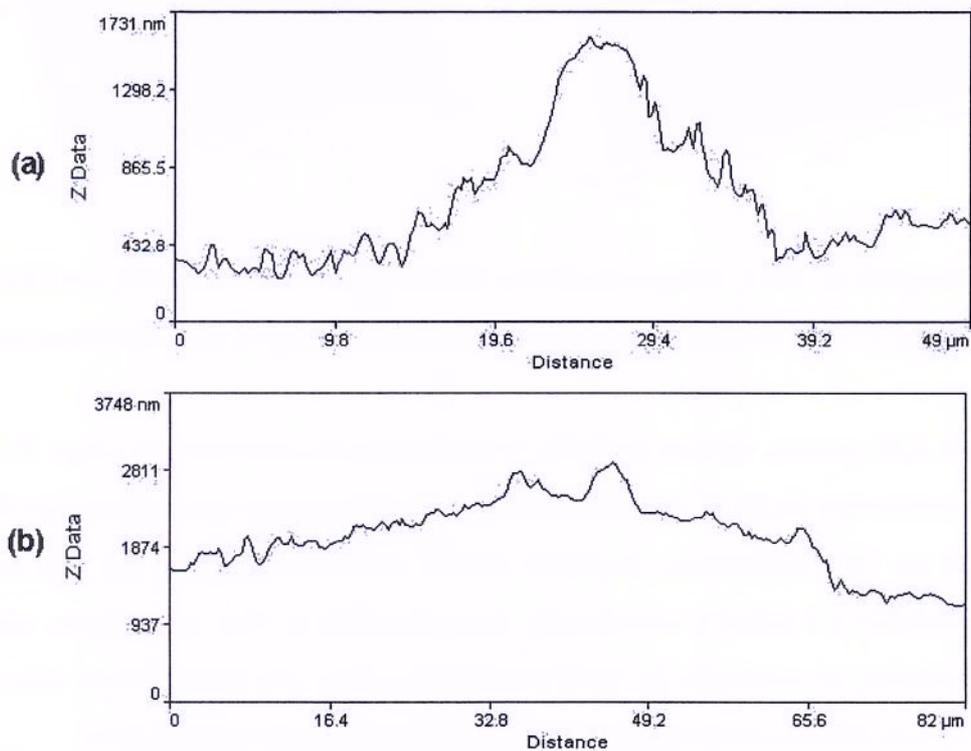


Figura 4.37. Grau de achatamento das células em: (a) DLC/Ti-13Nb-13Zr; e (b) Ti-13Nb-13Zr; utilizando MFA.

4.5. Biocompatibilidade *in vivo*

4.5.1. Retirada dos implantes

Em todos os animais utilizados no experimento, após a implantação dos pinos, tanto no tecido muscular quanto no tecido ósseo, verificou-se, que após 1 semana, houve a cicatrização dos cortes realizados, sem a presença de sinais inflamatórios e completa recuperação da função, indicando que o material não era tóxico.

Os pinos foram retirados com 4 e 12 semanas de seguimento. Verificou-se que o material com 12 semanas de implantação, apresentou-se mais aderido do que o de 4 semanas, dificultando a sua retirada, tanto do músculo quanto do osso. Além disso, a retirada dos pinos revestidos com DLC foi mais difícil do que o não revestido, nos 2 seguimentos estudados. Nenhuma reação tecidual anormal pôde ser observada ao redor dos implantes. Também não houve evidência de necrose ou inflamação de qualquer espécie.

4.5.2. Análise do tecido muscular

Na Figura 4.38 e 4.39 são mostradas algumas imagens da cápsula fibrosa formada ao redor dos pinos com e sem revestimento de DLC, corados com Hematoxilina Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM), respectivamente, nos 2 tempos de seguimentos (4 e 12 semanas). Notou-se que houve formação de uma cápsula em todos os implantes estudados, sendo que essa cápsula era maior no grupo de 4 semanas do que no grupo de 12 semanas. Não houve diferença evidente entre a cápsula formada ao redor do pino revestido e do não revestido, para os dois seguimentos estudados. Os resultados são similares aos apresentados por Mohanty et al (2002), que comparou pinos de Ti cp com e sem revestimento de DLC (neste trabalho, o material de estudo é o pino de Ti-13Nb-13Zr com revestimento de DLC).

Verificou-se também que o tecido formado ao redor dos pinos foi predominantemente composto de fibroblastos, que diminuíram em concentração no segundo seguimento (12 semanas), diferenciando-se em fibrócitos. A espessura da cápsula de tecido fibroso pode dar informações indiretas do grau de toxicidade do implante, e os resultados obtidos mostraram que o material de estudo, isto é, o revestimento de DLC, não apresentou toxicidade, uma vez que houve formação da cápsula tanto ao redor do pino de DLC quanto do material controle (sem revestimento). Além disso, a espessura da cápsula se tornou menos espessa para um tempo de seguimento maior. No entanto, um valor quantitativo da espessura não foi possível, uma vez que a retirada do pino, que estava firmemente aderido ao tecido, comprometeu o resultado.

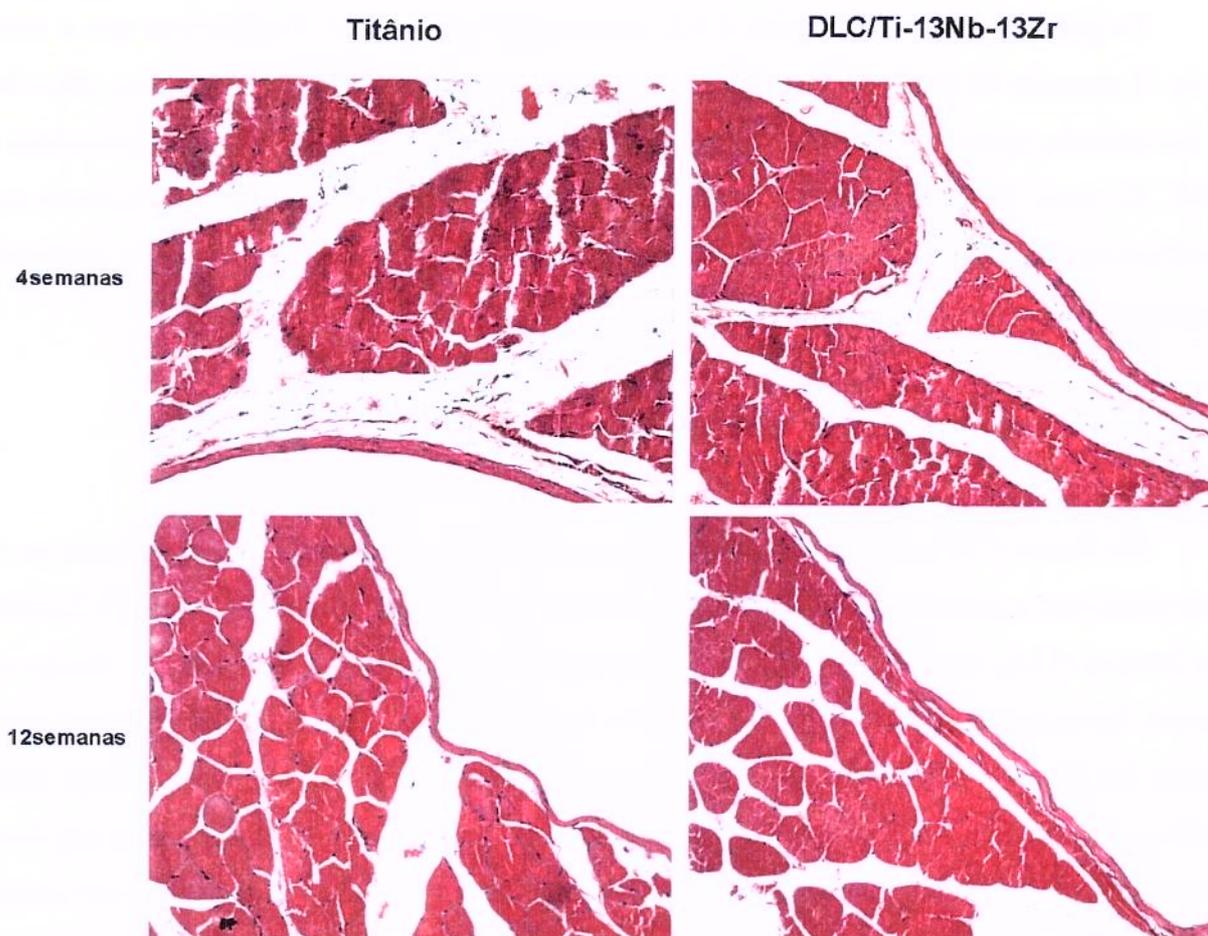


Figura 4.38. Cortes histológicos transversais do tecido muscular, após a retirada dos pinos de: Ti cp (esquerda); e DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita), corados com HE, com seguimento de 4 semanas (topo) e 12 semanas (baixo). Aumento original = 20X.

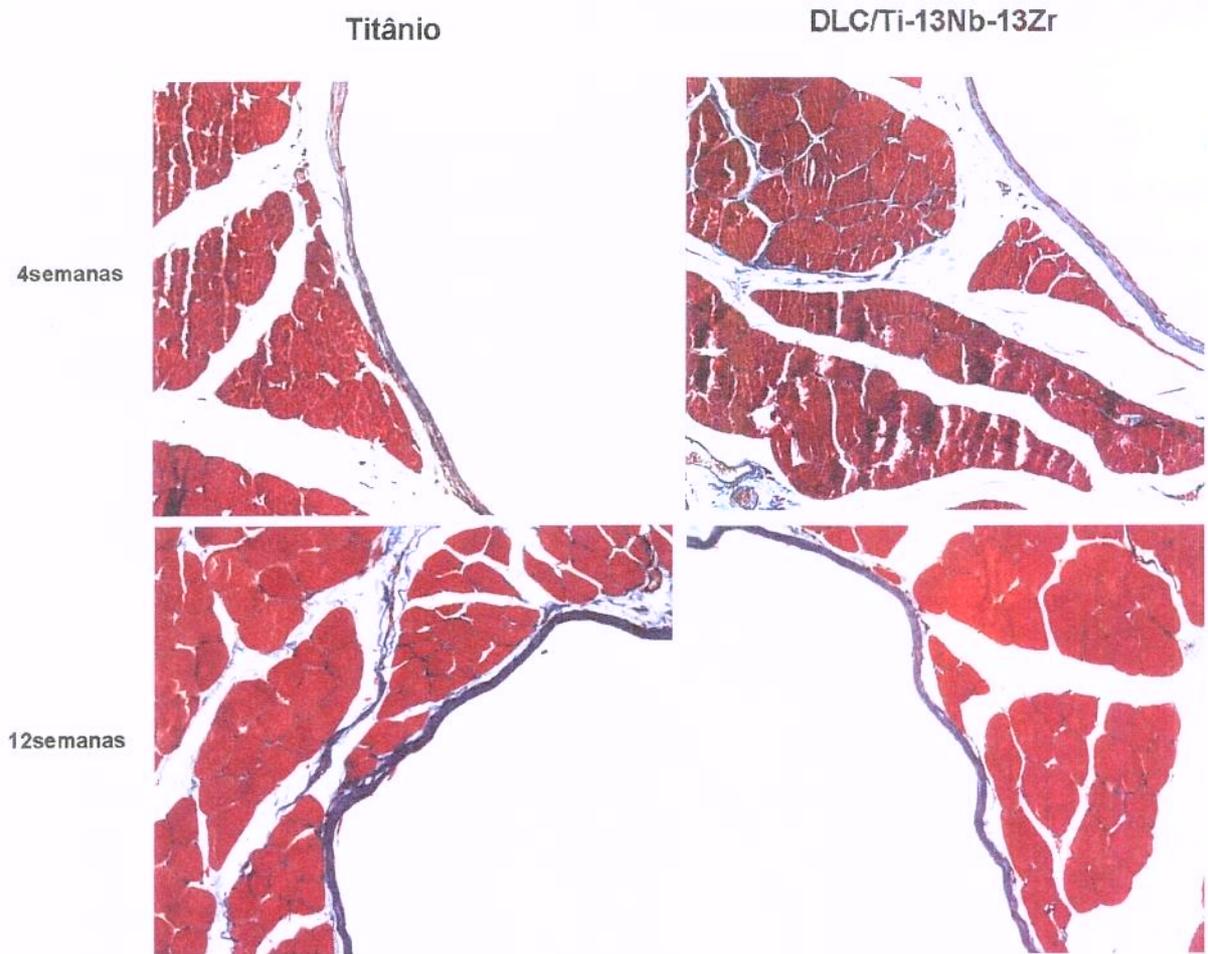


Figura 4.39. Cortes histológicos transversais do tecido muscular, após a retirada dos pinos de: Ti cp (esquerda); e DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita), corados com TM, com seguimento de 4 semanas (topo) e 12 semanas (baixo). Aumento original = 20X.

4.5.3. Análise do tecido ósseo

Nas Figuras 4.40 e 4.41 são mostradas algumas imagens, por microscopia óptica, do tecido ósseo após a retirada dos pinos. Não houve evidência de formação de cápsula de tecido fibroso ao redor dos pinos, seja revestido ou não revestido, embora a análise por MEV mostre que existe algum tipo de adesão tecidual na superfície dos pinos (Cap. 4.5.4). A retirada dos pinos revestidos com DLC foi mais trabalhosa do que sem revestimento, mas não foi possível apresentar um valor quantitativo.

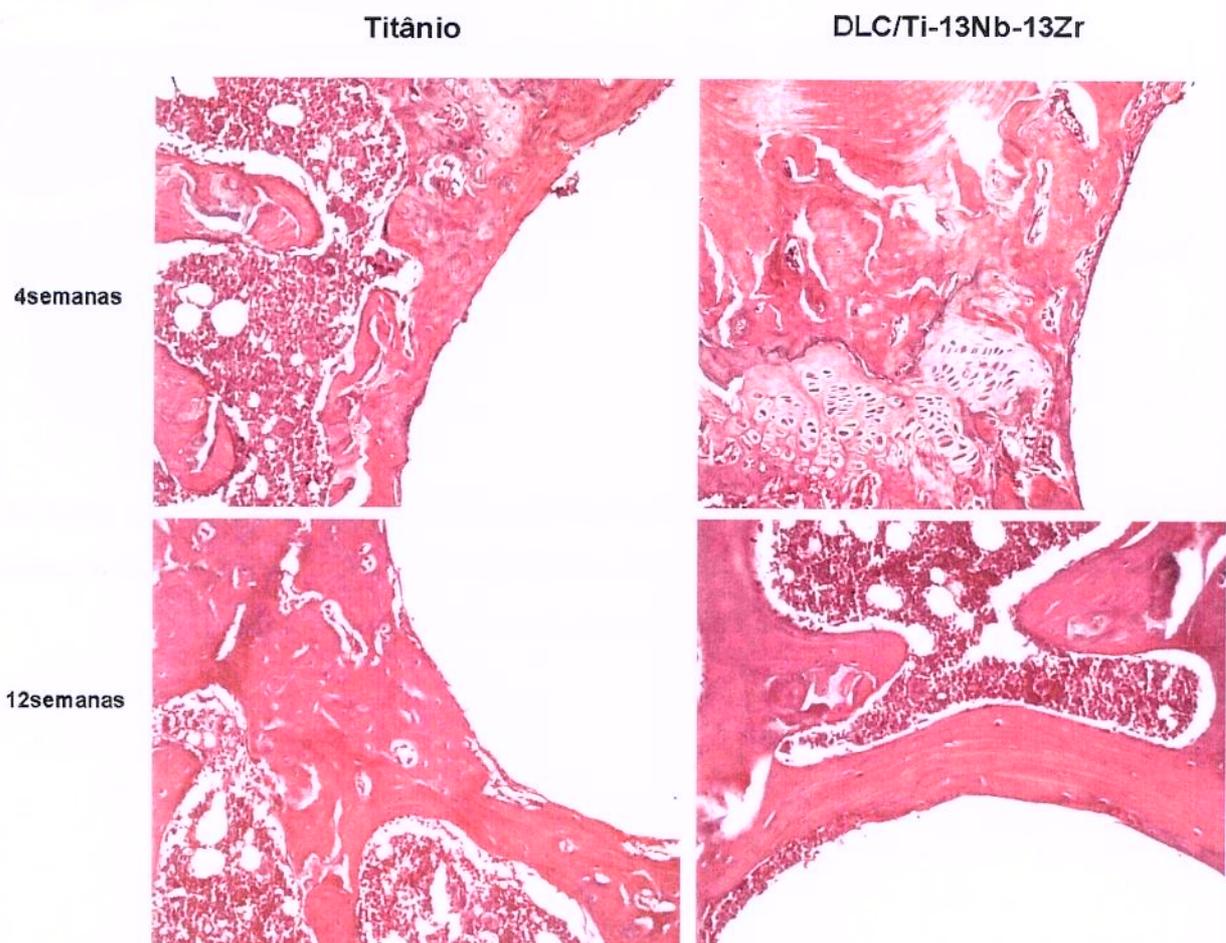


Figura 4.40. Cortes histológicos transversais do tecido ósseo, após a retirada dos pinos de: Ti cp (esquerda); e DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita), corados com HE, com seguimento de 4 semanas (topo) e 12 semanas (baixo). Aumento original = 20X.

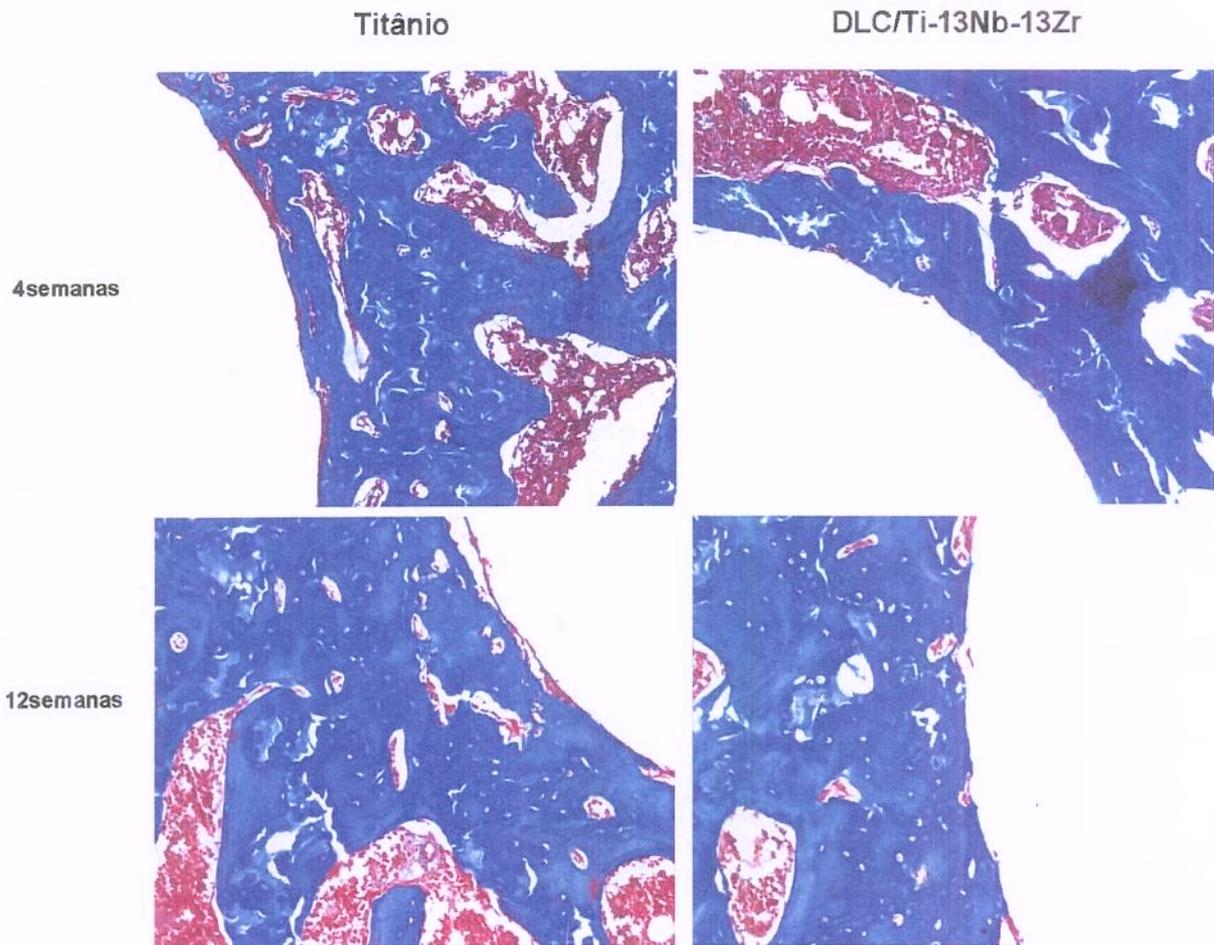


Figura 4.41. Cortes histológicos transversais do tecido ósseo, após a retirada dos pinos de: Ti cp (esquerda); e DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita), corados com TM, com seguimento de 4 semanas (topo) e 12 semanas (baixo). Aumento original = 20X.

MEV na modalidade retroespalhamento (isto é, por feixe de elétrons retroespalhados) foi utilizada para se avaliar detalhes da interface entre os pinos e o tecido ósseo, sem que haja a necessidade de se realizar a descalcificação prévia do tecido ósseo. Na Figura 4.42 são mostradas algumas imagens obtidas. Essas imagens mostram a interface formada entre o pino e o tecido ósseo. Verificou-se que, em todos os casos, com e sem revestimento de DLC, houve formação de tecido ósseo ao redor dos pinos, sem visualização de tecido adverso entre eles. Além disso, com 12 semanas, o tecido ósseo aparentava estar totalmente aderido ao pino.

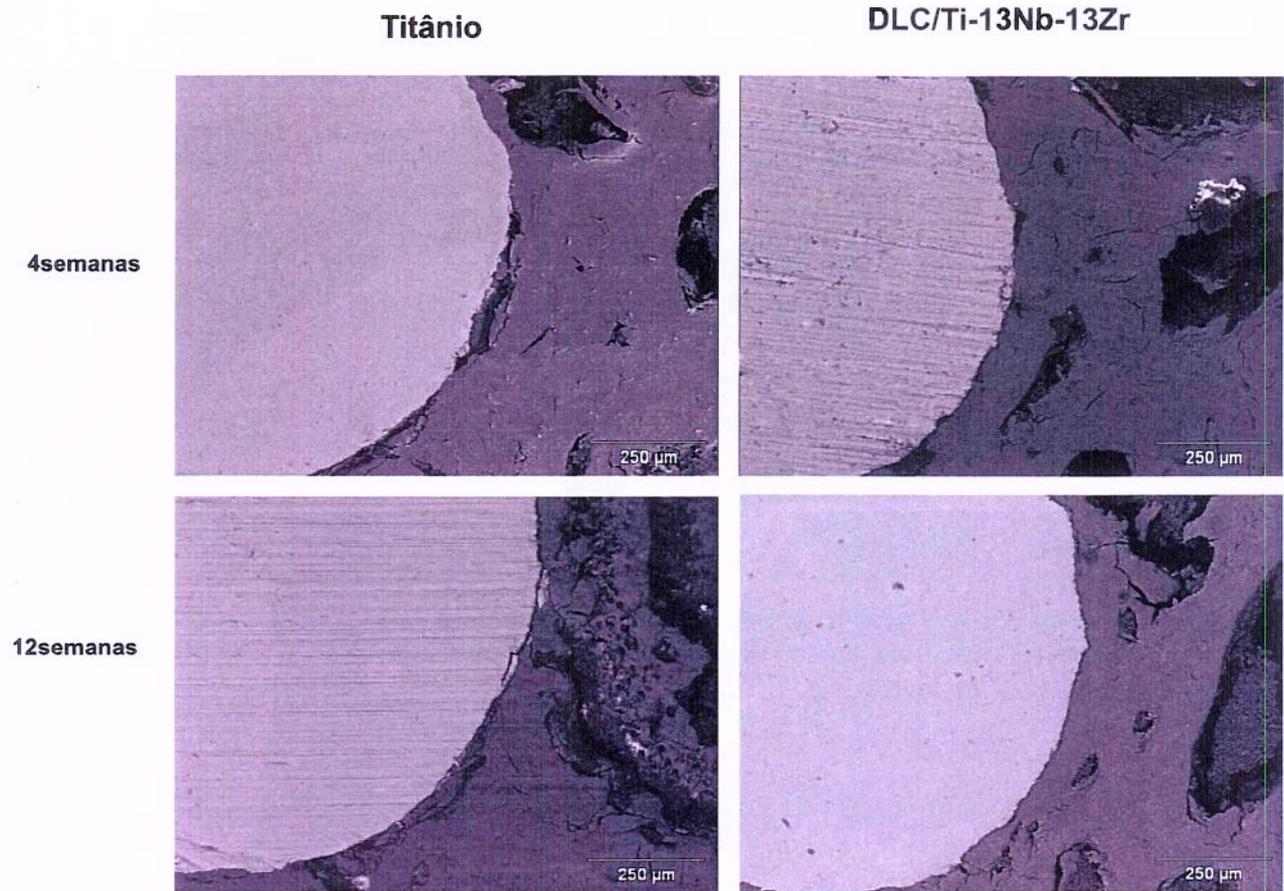


Figura 4.42. Imagem por MEV (por feixe de elétrons retroespalhados) de cortes do tecido ósseo com pinos de: Ti cp (esquerda); e DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita), com seguimento de 4 (topo) e 12 semanas (baixo). Os implantes aparecem em branco, o osso em cinza e o tecido não mineralizado em preto. Aumento original = 50X. Barra = 500 μm .

4.5.4. Análise dos pinos retirados do tecido muscular e ósseo

Nas Figuras 4.43 (seguimento de 4 semanas) e 4.44 (seguimento de 12 semanas) são mostradas algumas imagens, obtidas por MEV, dos pinos retirados do tecido muscular. Observou-se adesão tecidual na superfície de todos pinos, sendo que, para o maior tempo de seguimento, maior foi a adesão celular e o crescimento tecidual. Além disso, verificou-se que a quantidade de tecido era maior e mais organizado ao redor do pino revestido com DLC, enquanto no pino de titânio, o material crescido parecia apenas células aglomeradas.

Nas Figuras 4.45 (seguimento de 4 semanas) e 4.46 (seguimento de 12 semanas) são mostradas algumas imagens obtidas por MEV dos pinos retirados do tecido ósseo. Novamente, não foi possível quantificar o tecido formado na superfície dos pinos, mas os resultados indicam que a adesão celular e o crescimento tecidual foi maior nos pinos revestidos com DLC, para os 2 tempos de seguimento. Nota-se também que o tipo de material depositado sobre os pinos de Ti com 12 semanas é muito parecido com o de 4 semanas para o DLC, ou seja, a formação de tecido sobre o pino de Ti parece ter um “atraso” em relação ao DLC.

Os resultados de biocompatibilidade *in vivo* obtidos estão de acordo com os trabalhos de Allen et al (2001) e Dowling et al (1997), que demonstraram a biocompatibilidade do DLC revestindo implantes em um modelo animal (ovelhas). Pode-se concluir que o revestimento de DLC é um material que não induz reação inflamatória, mesmo quando implantado no tecido muscular e ósseo de ratos por 12 semanas. A análise histológica convencional e MEV por retroespalhamento indicaram que a interface formada entre o pino com e sem revestimento de DLC, com o tecido ósseo, não era formada por tecido fibroso. Além disso, apesar de não ser bioativo, a resposta tecidual ao seu redor foi mais favorável do que ao redor de titânio. Este resultado está de acordo com o resultado relatado por Tianem (2001).

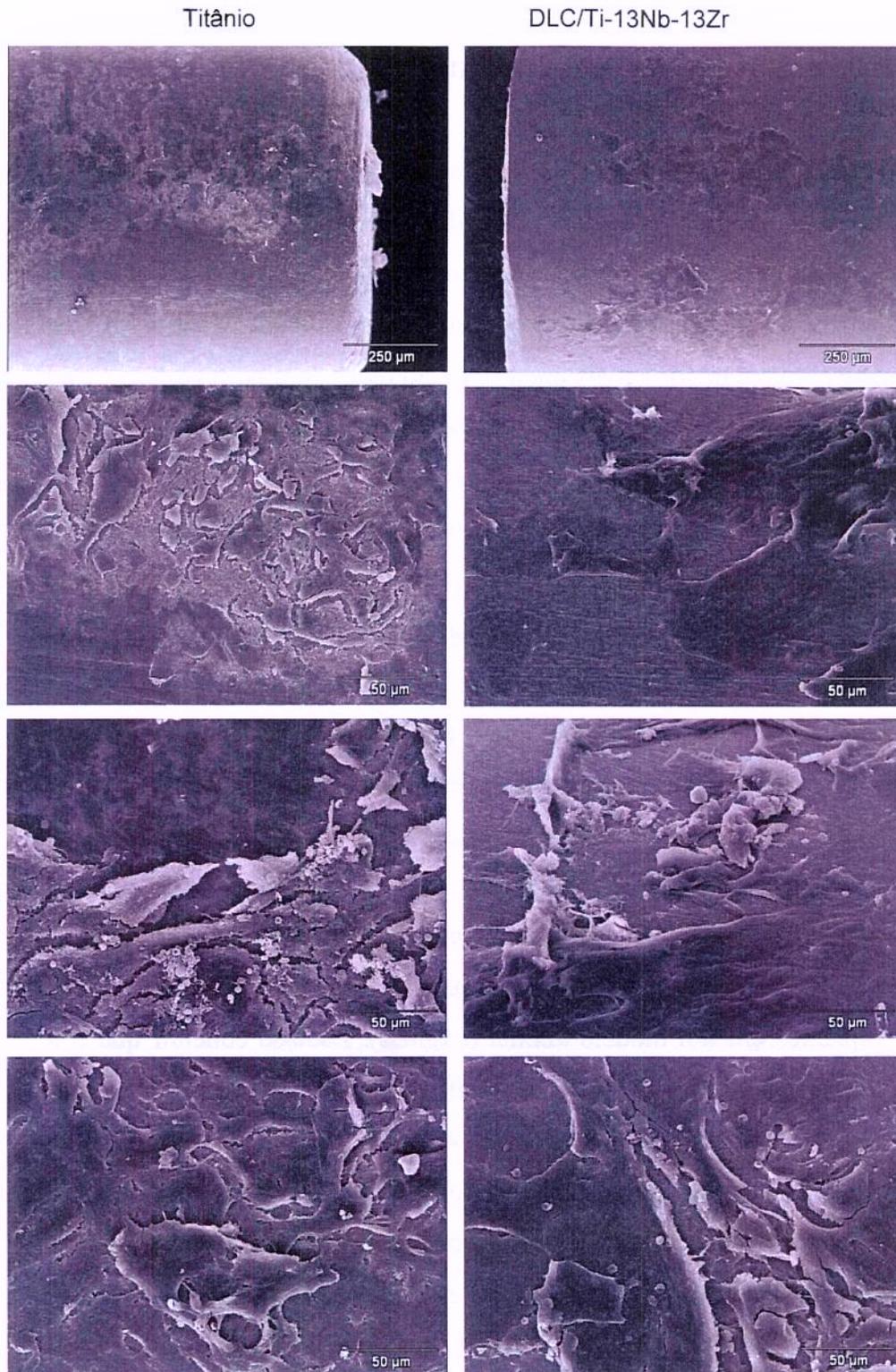


Figura 4.43. Imagem por MEV da superfície do pino retirado do tecido muscular com 4 semanas: pinos de Ti (esquerda) e pinos de DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita).

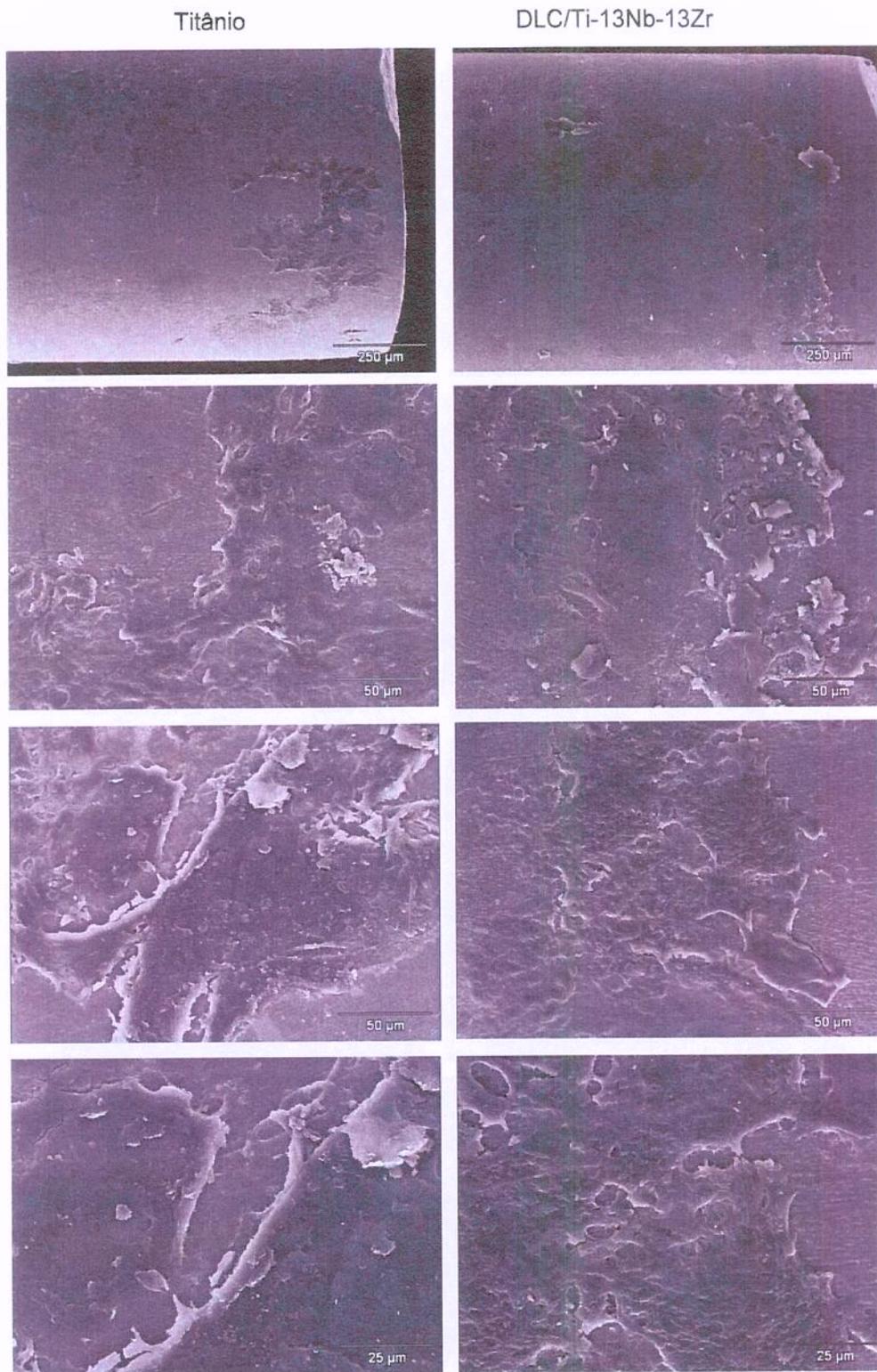


Figura 4.44. Imagem por MEV da superfície do pino retirado do tecido muscular com 12 semanas: pinos de Ti (esquerda) e pinos de DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita).

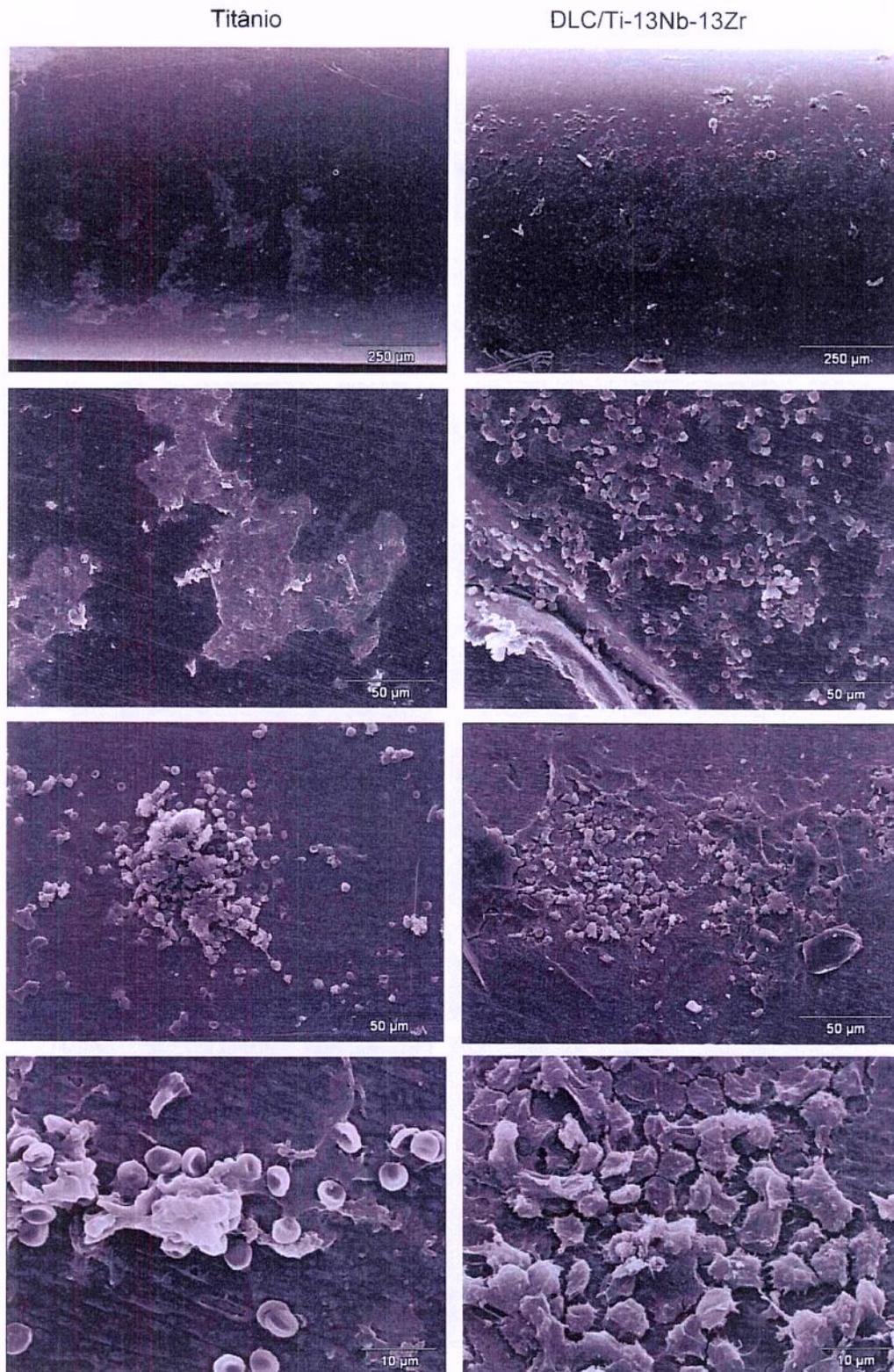


Figura 4.45. Imagem por MEV da superfície do pino retirado do tecido ósseo com 4 semanas: pinos de Ti (esquerda) e pinos de DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita).

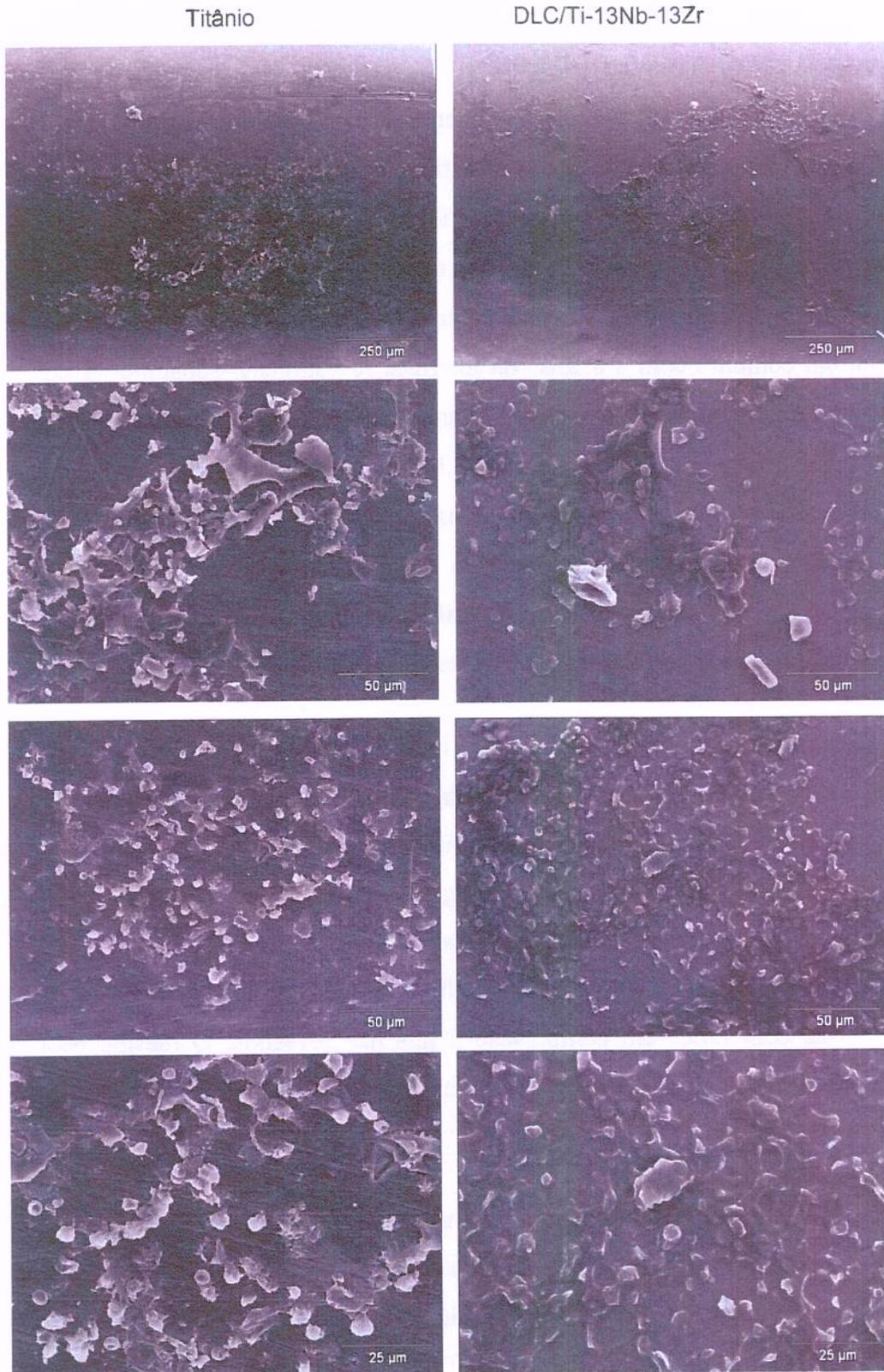


Figura 4.46. Imagem por MEV da superfície do pino retirado do tecido ósseo com 12 semanas: pinos de Ti (esquerda) e pinos de DLC/Ti-13Nb-13Zr (direita).

Síntese dos resultados obtidos

Os resultados indicaram que o revestimento de DLC obtido pelo processo de imersão em plasma é viável para ser utilizado como revestimento de implantes ortopédicos. O filme obtido possui microestrutura semelhante aos dos filmes depositados por outros métodos - baixa rugosidade (Cap. 4.2.1), e boas propriedades mecânicas (Cap. 4.2.2) -. O DLC obteve dureza aproximada de 18 GPa (medida por nanoindentação), com boa adesão, verificada por teste de puxamento, em conjunto com a análise da interface revestimento-substrato. A uniformidade de deposição também foi comprovada através da análise de espessuras de amostras colocadas em um suporte hexagonal (espessura de 1 μm para 1 h de deposição), além do revestimento de vários objetos tridimensionais, que foram apresentados no Capítulo 4.1. Não foi realizado um ensaio de desgaste de pino-disco, mas a resistência ao desgaste do DLC foi comprovada por estudos paralelos para a indústria automobilística e têxtil, onde objetos revestidos com DLC tiveram o seu tempo de vida aumentado em no mínimo 3 vezes (ERENO, 2001).

Os resultados eletroquímicos (Cap. 4.3) indicaram que o revestimento de DLC melhora a resistência à corrosão da liga de Ti-13Nb-13Zr, que já é considerada um material que resiste à corrosão. Provavelmente também melhoraria a resistência à corrosão de outras ligas biocompatíveis, como aço inoxidável 316L e ligas de cromo-cobalto. Foi comprovado que o DLC é biocompatível por ensaios *in vitro*, utilizando cultura de células (Cap. 4.4). Além disso, a adesão de fibroblastos sobre a liga de Ti-13Nb-13Zr foi significativamente melhorada quando esta é revestida com DLC, em comparação à liga não revestida. O mesmo ocorreu quanto à morfologia de células cultivadas sobre esses substratos, que foi claramente verificada utilizando MFA.

O ensaio de biocompatibilidade *in vivo*, utilizando um modelo animal (Cap. 4.4), também indicou a biocompatibilidade do revestimento de DLC. Os resultados histológicos foram semelhantes ao controle, mas o estudo dos pinos retirados dos tecidos e a análise, por MEV-retroespalhamento, do tecido ósseo não descalcificado indicam que o DLC tem uma resposta mais favorável do que o titânio usado como controle. Apesar do DLC não ser considerado bioativo, a sua resposta foi mais favorável do que a resposta do titânio.

Capítulo 5

Conclusões e sugestões para outros trabalhos

a) Conclusões

Os estudos realizados levaram às seguintes conclusões sobre o revestimento de carbono tipo diamante (DLC) obtido pelo processo de imersão em plasma:

i) Propriedades

- Deposição em grandes áreas tridimensionais
- Uniformidade do revestimento
- Baixa rugosidade
- Revestimento denso e livre de poros
- Revestimento sem interface definida
- Alta adesão
- Nenhuma delaminação
- Aumento de dureza da liga de titânio Ti-13Nb-13Zr, em no mínimo 100%
- Resistência ao desgaste (estudos paralelos em condições reais)

ii) Ensaio de corrosão

- O revestimento aumentou a resistência à corrosão da liga de titânio Ti-13Nb-13Zr, que já possui boa resistência à corrosão em ambiente corporal

iii) Ensaio *in vitro*

- Não citotóxico
- Maior adesão celular que a liga de titânio Ti-13Nb-13Zr, considerada a liga metálica mais biocompatível (aumenta em no mínimo 100% a adesão celular da liga de titânio)

iv) Ensaio *in vivo*

- O revestimento mostrou biocompatibilidade, com performance semelhante ao titânio puro, observado por histologia
- Mostrou resultado mais favorável que o titânio puro, se considerado a análise por imagens obtidas por MEV (análise qualitativa)
- A retirada dos pinos do local implantado foi muito mais difícil para os pinos revestidos do que os não revestidos, mostrando maior biocompatibilidade do DLC.

Portanto, é possível concluir que os filmes de carbono tipo diamante, obtidos pelo processo de imersão em plasma, são viáveis para utilização como revestimento de implantes ortopédicos. Ensaios *in vivo* de longa duração devem ser feitos para futuras aplicações deste material na área ortopédica, seja na articulação de implantes ortopédicos ou como revestimento de dispositivos de fixação de fratura.

Vale destacar também que, para que o filme de carbono tipo diamante seja utilizado no corpo humano, é necessário que o revestimento não tenha interface definida, para não correr o risco de se soltar no organismo – questão muito importante para implantes –, e seja disponível para objetos tridimensionais complexos, como é o caso de implantes ortopédicos. O processo de imersão em plasma, responde a todas essas questões, pois possibilita o revestimento uniforme de grandes áreas (área de 1 metro quadrado ou superior, dependendo do equipamento), ou de várias peças ao mesmo tempo, com formas tridimensionais complexas, a baixo custo (se comparado a outras técnicas de deposição a vácuo), e a peça já sai esterilizada, pronta para ser utilizada ou embalada. Além disso, para implantes onde se deseje superfícies rugosas, estruturadas ou com nanotopografias, o filme também pode ser depositado por este processo, sem perda da superfície original.

b) Comentários adicionais

- O trabalho de doutorado foi apresentado em diversos congressos nacionais e internacionais (França, Japão, Itália, Portugal, República Tcheca, Austrália e Cuba)
- Foi premiado em dois congressos:
 - ❖ Congresso Europeu de Biomateriais, organizado pela Sociedade Européia de Biomateriais, realizado em Sorrento/Itália, em 2005
 - ❖ Congresso Internacional de Superfícies, Intefaces e Materiais Nanoestruturados, realizado em Aveiro/Portugal, em 2005
- O trabalho gerou diversos artigos e foi publicado em revistas internacionais indexadas: Thin Solid Films – Elsevier, Diamond and Related Materials – Elsevier, Key Engineering Materials – Trans Tech Publications, Microscopy and Microanalysis – Sociedade Americana de Microscopia.
- O trabalho foi noticiado na Revista PESQUISA FAPESP (n.117, p. 72-73, outubro/2005), Portal da Unicamp (14/10/2005), Jornal Correio Popular (17/10/2005), e convidado para entrevista na Rádio Eldorado - Programa da Fapesp de divulgação científica.
- Três empresas de ortopedia estão interessadas no desenvolvimento realizado.
- Empresas de outras áreas estão interessadas no revestimento de DLC obtido pelo processo de imersão em plasma, como por exemplo, empresas da área automobilística, aeroespacial, petroquímica, petrolífera, embalagens, indústria têxtil, empresas de eletrodomésticos, empresas produtora de painelas e fôrmas para substituir o anti-aderente convencional, etc.

c) Sugestões para trabalhos futuros

- Análise de desgaste do DLC utilizando um ensaio do tipo “pino-disco”;
- Análise de desgaste do DLC utilizando um simulador de quadril em condições agressivas de funcionamento;
- Realizar ensaios *in vivo* de longa duração com placas de fixação revestidos com DLC, em animal de grande porte;
- Realizar ensaios *in vivo* de longa duração com implante de quadril ou joelho revestidos com DLC, em animal de grande porte;
- Estudar o revestimento em Cone Morse (para evitar corrosão em frestas)
- Estudo de outros filmes finos cerâmicos obtidos pelo processo de imersão em plasma;
- Estudo de filmes finos cerâmicos, considerados bioativos, obtidos pelo processo de imersão em plasma para revestimento de implantes osseointegráveis;
- As análises realizadas neste trabalho e as citadas acima podem ser repetidas para outras ligas biocompatíveis utilizadas na ortopedia, como o aço inoxidável e as ligas de cromo-cobalto.

Referências bibliográficas^{***}

AFFATATO, S.; FRIGO, M.; TONI, A. An in vitro investigation of diamond-like carbon as a femoral head coating. Journal of Biomedical Materials Research, v. 53, n. 3, p. 221-226, jun. 2000.

AGRAWAL, C. M. (Overview) Reconstructing the human body using biomaterials. JOM, v. 50, n. 1, p. 31-35, jan. 1998.

AISENBERG, S.; CHABOT, R. Ion-beam deposition of thin films of diamondlike carbon. Journal Applied Physics, v. 42, n. 7, p. 2953-2958, 1971.

ALBREKTSSON, T.; ALBREKTSSON, B. Osseointegration of bone implants: a review of an alternative mode of fixation. Acta Orthop. Scand., v. 58, p. 567-577, 1987.

ALLEN, M.; MYER, B.; RUSHTON, N. In vitro and in vivo investigation into the biocompatibility of diamond-like carbon (DLC) coatings for orthopedic applications. Journal of Biomedical Materials Research, v. 58, n. 3, p. 319-328, may 2001.

ANDERS, A. From plasma immersion ion implantation to deposition: a historical perspective on principle and trends. Surface and Coatings Technology, v. 156, n. 1-3, p. 3-12, jul. 2002.

ANGUS, J.; WANG, Y. Diamond-like hydrocarbon and carbon films. In : CLAUSING, R. E.; HORTON, L. L.; ANGUS, J. C.; KOIDL, P. (eds.) Diamond and diamond-like films and coatings: NATO-ASI Series B: Physics. New York: Plenum Press, 1991, p. 173-192.

ASPENBERG, P.; ANTILLA, A.; KONTINEN, Y. T.; LAPPALAINEN, R.; GOODMAN, S. B.; NORDSLETTEN, L.; SANTAVIRTA, S. Benign response to particles of diamond and SiC: bone chamber studies of new joint replacement coating materials in rabbits. Biomaterials, v. 17, n. 8, p. 807-812, sept. 1996.

BABA, K.; HATADA, R. Formation of amorphous carbon thin films by plasma source ion implantation. Surface and Coatings Technology, v. 103-104, p. 235-239, may 1998.

* Referências segundo: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Rio de Janeiro. NBR-6023; referências bibliográficas. Rio de Janeiro, ago 2000.

** Citação segundo: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Rio de Janeiro. NBR-10520; referências bibliográficas. Rio de Janeiro, julho 2001

BACHMAN, P. Microwave plasma CVD and related techniques for low pressure diamond synthesis. In: LETTINGTON, A.; STEEDS, J. W. (eds.) Thin film diamond. London: Chapman & Hall, 1994, p. 31-53.

BERNARDES FILHO, R.; ASSIS, O. B. G.; PESSOA, J. D. C. Relação entre parâmetros de rugosidade obtidos por microscopia de força atômica e por microscopia eletrônica de varredura. Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo, v. 17, n. 2, p. 3-7, 1998.

BLACK, J. Orthopaedic biomaterials in research and practice. New York: Churchill Livingstone, 1988.

BRAET, F.; ZANGER, R.; SEYNAVE, C.; BAEKELAND, M.; WISSE, E. A comparative atomic force microscopy study on living skin fibroblasts and liver endothelial cells. Journal of Electron Microscopy, v. 54, n. 4, p. 283-290, 2001.

BRUNSKI, J. B. Metals. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. (eds.) Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. San Diego: Academic Press, 1996. p. 37-50.

BUTTER, R.; ALLEN, M.; CHANDRA, L.; LETTINGTON, A. H.; RUSHTON, N. In vitro studies of DLC coatings with silicon intermediate layer. Diamond and related materials, v. 4, p. 857-861, 1995.

CATHERINE, Y. Preparation techniques for diamond-like carbon. In: CLAUSING, R. E.; HORTON, L. L.; ANGUS, J. C.; KOIDL, P. (eds.) Diamond and diamond-like films and coatings: NATO-ASI Series B: Physics. New York: Plenum Press, 1991, p. 193-227.

CAVALCANTI, E.; COELHO, S. Implantes ortopédicos temporários de aços inoxidáveis: aspectos a considerar para minimizar a corrosão. Inox, n. 8, p. 6-8, maio 1997.

CHANG, J. F.; UENG, H. Y.; YOUNG, T. F.; WANG, Y. C.; HWANG, W. C. Combined magnetron sputtering and ECR-CVD deposition of diamond-like carbon films. Surface and Coatings Technology, v. 157, p. 179-194, 2002.

CHAPMAN, B. Glow discharge processes. Sputtering and plasma etching. John Wiley & Sons, N.Y., 1980.

CHEN, J.; CONRAD, J. R.; DODD, R. A. Methane plasma source ion implantation (PSII) for improvement of tribological and corrosion properties. Journal of Materials Processing Technology, v. 49, n. 1-2, p. 115-124, feb. 1995.

CLAUSING, R. E.; HORTON, L. L.; ANGUS, J. C.; KOIDL, P. (eds.) Diamond and diamond-like films and coatings: NATO-ASI Series B: Physics. New York: Plenum Press, 1991.

CONRAD, J. R.; DODD, A.; WORZALA, F. J.; QIU, X. Plasma source ion implantation: A new, cost-effective, non-line-of-sight technique for ion implantation of materials. Surface and Coatings Technology, v. 36, n. 3-4, p. 927-937, dec. 1988.

COUVRAT, P.; DENIS, M.; LANGER, M.; MITURA, S.; NIEDZIELSKI, P.; MARCINIAK, J. The corrosion tests of amorphous carbon coatings deposited by r.f. dense plasma onto steel with different chromium contents. Diamond and Related Materials, v. 4, n. 11, p. 1251-1254, oct. 1995.

CUI, F. Z.; LI, D. J. A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films. Surface and Coatings Technology, v. 131, n. 1-3, p. 481-487, sept. 2000.

D'AGOSTINO, R. Plasma deposition, treatment and etching of polymers. New York: Academic Press; 1990

DEARNALEY, P. A. A review of metallic, ceramic and surface-treated metals used for bearing surfaces in human joint replacements. Proceeding of Institution of Mechanical Engineers , Part H: Journal of Engineering Medicine, v. 213, p. 107-135, 1999.

DENG, J.; BRAUN, M. Residual stress and microhardness of DLC multiplayer coatings. Diamond and Related Materials, v. 5, n. 3-5, p. 478-482, apr. 1996.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. Bases da biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3a. ed., 1998.

DONG, H.; SHI, W.; BELL, T. Potential of improving tribological performance of UHMWPE by engineering the Ti6Al4V counterfaces. Wear, p. 146-153, apr 1999.

DONNET, C.; GRILL, A. Friction control of diamond-like carbon coatings. Surface and Coatings Technology, v. 94-95, n. 1-3, p. 456-462, oct. 1997.

DORNER, A.; SCHÜRER, C.; REISEL, G.; IRMER, G.; SEIDEL, O.; MÜLLER, E. Diamond-like carbon-coated Ti6Al4V: influence of the coating thickness on the structure and the abrasive wear resistance. Wear, v. 249, n. 5-6, p. 489-497, jun. 2001.

DORNER-REISEL, A.; SHCÜRER, C.; IRMER, G.; MÜLLER, E. Electrochemical corrosion behaviour of uncoated and DLC coated medical grade Co28Cr6Mo. Surface and Coatings Technology, v. 177-178, p. 830-837, 2004.

DOWLING, D. P.; KOLA, P. V.; DONNELLY, K.; KELLY, T. C.; BRUMITT, K.; LLOYD, L.; ELOY, R.; THERIN, M.; WEILL, N. Evaluation of diamond-like carbon-coated orthopaedic implants. Diamond and Related Materials, v. 6, n. 2-4, p. 390-393, mar. 1997.

DUCHEYNE, P; HASTINGS, G. W.; CHEM, C. (eds) Functional behavior of orthopedic biomaterials. Vol I: Fundamentals. Boca Raton: CRC Press, 1984.

DUMKUM, C.; GRANT, D. M.; McCOLL, I. R. A multiplayer approach to high adhesion diamond-like carbon coatings on titanium. Diamond and Related Materials, v. 6, n. 5-7, p. 802-806, apr. 1997.

ELSBURG, L.; MOORE, M. Total hip replacement: metal-on-metal systems. In: HENCH, L. L.; WILSON, J. (eds) Clinical Performance of Skeletal Prostheses. London: Chapman & Hall, 1996, p. 57-70.

ERDEMIR, A.; NILUFER, I. B.; ERYILMAZ, O. L.; BESCHLIESSER, M.; FENSKE, G. R. Friction and wear performance of diamond-like carbon films grown in various source gas plasmas. Surface and Coatings Technology, v. 120-121, p. 589-593, nov. 1999.

ERENO, B. Articulações artificiais: equilíbrio garantido. Revista Pesquisa Fapesp, n. 117, p. 72-73, nov 2005.

EVANS, A. C.; FRANKS, J.; REVELL, P.J. Diamond-like carbon applied to bioengineering materials. Surface and Coatings Technology, v. 47, n. 1-3, p. 662-667, aug. 1991.

FUJIMORI, S.; KASAI, T.; INAMURA, T. Carbon film formation by laser evaporation and ion beam sputtering. Thin Solid Films, v. 92, p. 71-80, 1982.

GOMES, G. F. Modificação na superfície do aço inoxidável 304 por implantação de íons de nitrogênio por imersão em plasma. Lorena, 2000. Tese (Doutorado). – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

GOODMAN, S. B.; LIND, M.; SONG, Y.; SMITH, R. L. In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris. Clinical Orthopaedics and Related Research, n. 352, p. 25-34, jul. 1998.

GRILL, A. Tribology of diamondlike carbon and related materials: an updated review. Surface and Coatings Technology, v. 94-95, n. 1-3, p. 507-513, oct. 1997.

GRILL, A. Diamond-like carbon: state of the art. Diamond and Related Materials, v. 8, n. 2-5, p. 428-434, mar. 1999 .

GRILL, A. Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials - an overview. Diamond and Related Materials, v. 12, n. 2, p. 166-170, feb. 2003.

GUTENSOHN, K., BEYTHIEN, C., BAU, J.; FENNER, T.; GREWE, P.; KOESTER, R.; PADMANABAN, K.; KUEHN, P. In vitro analyses of diamond-like carbon coated stents. Reduction of metal ion release, platelet activation, and thrombogenicity. Thrombosis Research, v. 99, n. 6, p. 577-585, sept. 2000.

HAGA, M. S. Deposição de filmes de diamante policristalino e diamond-like carbon – DLC por chama oxi-acetilênica. Campinas, 1997, 105 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

HAUERT, R. A review of modified DLC coatings for biological applications. Diamond and Related Materials, v. 12, n. 3-7, p. 583-589, mar-jul 2003.

HAUERT, R.; MÜLLER, U. An overview on tailored tribological and biological behavior of diamond-like carbon. Diamond and Related Materials, v. 12, n. 2, p. 171-177, feb. 2003.

HE, X. M.; WALTER, K. C.; NASTASI, M.; LEE, S.T.; SUN, X. S. Optical and tribological properties of diamond-like carbon films synthesized by plasma immersion ion processing. Thin Solid Films, v.355-356, p. 167-173, nov. 1999.

HEIMKE, G. The aspects and modes of fixation of bone replacements. In HEIMKE, G. (ed.) Osseo-integrated implants: Basics, materials, and joint replacements (Volume 1). Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 1-30.

HENSSGE, E. J.; DUFEK, P.; BENSMANN, G.; LJUTON, A. Surface structured implants consisting of Co-based alloys. In: HEIMKE, G. (ed.) Osseo-integrated implants: Basics, materials, and joint replacements (Volume 1). Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 153-170

HUANG, L.; XU, K; LU, J.; GUELORGET, B.; CHEN, H. Nano-scratch and fretting wear study of DLC coatings for biomedical application. Diamond and Related Materials, v. 10, n. 8, p. 1448-1456, aug. 2001.

IANNO, N. J.; DILLON, R. O.; ALI, A.; AHMAD, A. Deposition of diamond-like carbon on a titanium biomedical alloy. Thin Solid Films, v. 270, n. 1-2, p. 275-278, dec. 1995.

IGNATIUS, M. J.; SAWHNEY, N.; GUPTA, A.; THIBADEAU, B. M.; MONTEIRO, O. R.; BROWN, I. G. Bioactive surface coatings for nanoscale instruments: Effects on CNS neurons. Journal of Biomedical Materials Research, v. 40, n. 2, p. 264-274, 2000.

ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5 - Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods, 1992(E).

JARRAT, M.; STALLARD, J.; RENEVIER, N. M.; TEER, D. G. An improved diamond-like carbon coating with exceptional wear properties. Diamond and Related Materials, v. 12, n. 3-7, p. 1003-1007, mar-jul 2003.

JETHANANDANI, R. The development and application of diamond-like carbon films. JOM – J Min Met Mat S, v. 49, n. 2, p. 63-65, feb. 1997.

JONES, M. I.; McCOLL, I. R.; GRANT, D. M.; PARKER, K. G.; PARKER, T. L. Haemocompatibility of DLC and TiC-TiN interlayers on titanium. Diamond and Related Materials, v. 8, n. 2-5, p. 457-462, 1999.

JONES, M. I.; McCOLL, I. R.; GRANT, D. M.; PARKER, K. G.; PARKER, T. L. Protein adsorption and platelet attachment and activation, on TiN, TiC, and DLC coatings

on titanium for cardiovascular applications. Journal of Biomedical Materials Research, v. 52, n. 2, p. 413-421, nov. 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Citologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973.

KADDICK, C.; WIMMER, M. A. Hip simulator wear testing according to the newly introduced standard ISO 14242. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H: Journal of Engineering in Medicine, v. 215, n. H5, p. 429-442, 2001.

KAO, P.; EGGERS, S.; GRAF, N.; LIESENFELD, B. A comparison of artificial knee arthroplasties. In: In: HENCH, L. L.; WILSON, J. (eds) Clinical Performance of Skeletal Prostheses. London: Chapman & Hall, 1996, p. 71-81.

KATZ, J. L. Orthopedic applications. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. (eds.) Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. San Diego: Academic Press, 1996. p. 335-345.

KHAN, M. A.; WILLIAMS, R. L.; WILLIAMS, D. F. The corrosion behaviour of Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solutions. Biomaterials, v. 20, n. 7, p. 631-637, apr. 1999.

KIM, H. G.; AHN, S. H.; KIM, J. G.; PARK, S. J.; LEE, K. R. Corrosion performance of diamond-like carbon (DLC)-coated Ti alloy in the simulated body fluid environment. Diamond and Related Materials, v. 14, n.1, p. 35-41, 2005a.

KIM, H. G.; AHN, S. H.; KIM, J. G.; PARK, S. J.; LEE, K. R. Electrochemical behavior of diamond-like carbon films for biomedical applications. Thin Solid Films, v. 475, n. 1-2, p. 291-297, 2005b.

KIRKPATRICK, C. J. Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity in vitro. Reg Affairs, v.4, p13-32, 1992.

KIRKPATRICK, C. J.; BITTINGER, F.; WAGNER, M.; KÖHLRT, H.; KOOTEN, T. G.; KLEIN, C. L.; OTTO, M. Current trends in biocompatibility testing. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H: Journal of Engineering in Medicine, v. 212, n. H2, p. 75-84, 1998.

KOIDL, P.; WILD, C.; LOCHER, R.; SAH, R. E. Amorphous, hydrogenated carbon films and related materials: plasma deposition and film properties. In: CLAUSING, R. E.; HORTON, L. L.; ANGUS, J. C.; KOIDL, P. (eds.) Diamond and diamond-like films and coatings: NATO-ASI Series B: Physics. New York: Plenum Press, 1991, p. 243-265.

KULISCH, W. Deposition of diamond-like superhard materials. Germany: Springer-Verlag, 1999.

- LAPPALAINEN, R.; ANTTILA, A.; HEINONEN, H. Diamond coated total hip replacements. Clinical Orthopaedics and Related Research, n. 352, p. 118-127, 1998 (a).
- LAPPALAINEN, R.; HEINONEN, H.; ANTTILA, A.; SANTAVIRTA, S. Some relevant issues related to the use of amorphous diamond coatings for medical applications. Diamond and Related Materials, v. 7, n. 2-5, p. 482-485, feb. 1998 (b).
- LENG, Y. X.; CHEN, J. Y.; YANG, P.; SUN, H.; WANG, G. Y.; HUANG, N. Mechanical properties and platelet adhesion behavior of diamond-like carbon films synthesized by pulsed vacuum arc plasma deposition. Surface Science, v. 531, n. 2, p. 177-184, may 2003.
- LETTINGTON, A. H. Applications of diamond-like (hard carbon) films. In: : CLAUSING, R. E.; HORTON, L. L.; ANGUS, J. C.; KOIDL, P. (eds.) Diamond and diamond-like films and coatings: NATO-ASI Series B: Physics. New York: Plenum Press, 1991, p. 481-498.
- LETTINGTON, A. H. Applications of diamond-like carbon thin films. Carbon, v. 36, n. 5-6, p. 555-560, 1998.
- LIFSHITZ, Y. Diamond-like carbon – present status. Diamond and Related Materials, v. 8, n. 8-9, p. 1659-1676, aug. 1999.
- LINDER, S.; PINKOWSKI, W.; AEPFELBACHER, M. Adhesion, cytoskeletal architecture and activation status of primary human macrophages on a diamond-like carbon coated surface. Biomaterials, v. 23, n. 2, p. 767-773, feb. 2002.
- LIU, C.; BI, Q.; MATTHEWS, A. Tribological and electrochemical performance of PVD TiN coatings on the femoral head of Ti-6Al-4V artificial hip joints. Surface and Coatings Technology, v. 163-164, p. 597-604, jan. 2003.
- LONG, M.; RACK, H. J. Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective. Biomaterials, v. 19, n. 18, p. 1621-1639, sept. 1998.
- MACDONALD, J. R. Impedance spectroscopy. New York: John Wiley & Sons, 1987.
- McNAMARA, B.P.; MURPHY, H.; MORSHED, M.M. Adhesion properties of diamond-like coated orthopaedic biomaterials. Diamond and Related Materials, v. 10, n. 3-7, p. 1098-1102, mar.-jul. 2001.
- MICHLER, T.; GRISCHKE, M.; TRAUS, I.; BEWILOGUA, K.; DIMIGEN, H. DLC films deposited by bipolar pulsed DC PACVD. Diamond and Related Materials, v. 7, n. 2-5, p. 459-462, feb. 1998.
- MILLER, J. A.; TALTON, J. D.; BHATIA, S. Alumina-alumina and alumina-polyethylene total hip prostheses. In: HENCH, L. L.; WILSON, J. (eds) Clinical Performance of Skeletal Prostheses. London: Chapman & Hall, 1996, p. 41-55.

MITURA, E.; MITURA, S.; NIEDZIELSKI, P.; HAS, Z.; WOLOWIEC, R.; JAKUBOWSKI, K.; SZMIDT, J.; SOKOLOWSKA, Z.; LOUDA, P.; MARCIANIKAK, J.; KOCZY, B. Diamond-like carbon coatings for biomedical applications. Diamond and related materials, v. 3, p. 896-898, 1994.

MITURA, S.; NIEDZIELSKI, P.; JACHOWICZ, D.; LANGER, M.; MARCINIAK, J.; STANISHEVSKY, A.; TOCHITSKY, E.; LOUDA, P.; COUVRAT, P.; DENIS, M.; LOURDIN, P. Influence of carbon coatings origin on the properties important for biomedical application. Diamond and Related Materials, v. 5, n. 10, p. 1185-1188, 1996.

MIYAGAWA, S.; NAKAO, S.; SAITOH, K.; BABA, K.; MIYAGAWA, Y. Deposition of diamond-like carbon films using plasma source ion implantation with pulsed plasmas. Surface and Coatings Technology, v.128-129, p. 260-264, jun. 2000.

MORAES, M. A. B. Filmes Finos. Apostila de Curso, IFGW, UNICAMP, 1990.

NASCENTE, P. A. P. Análise de superfícies por espectroscopia de elétrons. Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo, v. 17, n. 1, p. 15-22, 1998.

NICHOLSON, J. Current trends in biomaterials. Materials Today, v. 1, n. 2, p. 6-8, 1998.

NIEDZIELSKI, P.; MITURA, E.; MITURA, S.; DLUZNIIEWSKI, M.; PRZYMUSIALA, P.; Der SAHAGUIAN, S. D.; STARYGA, E.; ZAK, J.; SOKOLOWSKA, A.; SZMIDT, J.; STANISHEVSKY, A.; MOLL, J. J.; MOLL, J. A. Comparison of the surface structure of carbon films deposited by different methods. Diamond and Related Materials, v. 6, n. 5-7, p. 721-724, apr. 1997.

NIINOMI, M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. Materials Science and Engineering A, v. 243, n. 1-2, p. 231-236, mar. 1998.

NIINOMI, M.; KURODA, D.; FUKUNAGA, K.; MORINAGA, M.; KATO, Y.; YASHIRO, T.; SUZUKI, A. Corrosion wear fracture of new β type biomedical titanium alloys. Materials Science and Engineering A, v. 263, n. 2, p. 193-199, maio 1999.

NISHIMURA, Y.; CHAYAHARA, A.; HORINO, Y.; YATSUZUKA, M. A new PBIID processing system supplying RF and HV pulses through a single feed-through. Surface and Coatings Technology, v. 156, n. 1-3, p. 50-53, 2002.

NORTHUP, S. J. In vitro assessment. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. (eds.) Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. San Diego: Academic Press, 1996. p. 215-220.

OLSBORKA, A.; SWIDER, M.; WOLOWIEC, R.; NIEDZIELSKI, P.; RYLSKI, A.; MITURA, S. Amorphous carbon - biomaterial for implant coating. Diamond and related materials, v. 3, p. 899-901, 1994.

OKAZAKI, Y.; ITO, Y.; KYO, K.; TATEISHI, T. Corrosion resistance and corrosion fatigue strength of new titanium alloys for medical implants without V and Al. Materials Science and Engineering A, v. 213, n. 1-2, p. 138-147, aug. 1996.

OKAZAKI, Y.; RAO, S.; TATEISHI, T.; ITO, Y. Cytocompatibility of various metals and development of new titanium alloys for medical implants. Materials Science and Engineering A, v. 243, n. 1-2, p. 250-256, mar. 1998 (a).

OKAZAKI, Y.; RAO, S.; ITO, Y.; TATEISHI, T. Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new Ti alloys without Al and V. Biomaterials, v. 19, n. 13, p. 1197-1215, jun. 1998 (b).

OÑATE, J. I.; COMIN, M.; BRACERAS, I.; GARCIA, A.; VIVIENTE, J. L.; BRIZUELA, M.; GARAGORRI, N.; PERIS, J. L.; ALAVA, J. I. Wear reduction effect on ultra-high-molecular-weight polyethylene by application of hard coatings and ion implantation on cobalt chromium alloy, as measured in a knee wear simulation machine. Surface and Coatings Technology, v. 142-144, p. 1056-1062, jul. 2001.

PARK, J. B. Biomaterials – an introduction. New York: Plenum Press, 1979.

PARKER, T. L.; PARKER, K. L.; McCOLL, I. R.; GRANT, D. M.; WOOD, J. V. The biocompatibility of low temperature diamond-like carbon films: a transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and cytotoxicity study. Diamond and related materials, v. 3, n. 8, p. 1120-1123, jun. 1994.

PEHRSSON, P. E.; CELII, F. G.; BUTLER, J. E. Chemical mechanisms of diamond CVD. In: DAVIS, R. F. (ed.) Diamond films and coatings: developments, properties, and applications. Park Ridge: Noyes Publications, 1993, p. 68-146

PENG, X. L.; BARBER, Z. H.; CLYNE, T. W. Surface roughness of diamond-like carbon films prepared using various techniques. Surface and Coatings Technology, v. 138, n. 1, p. 23-32, apr. 2001.

PIEHLER, H. R. The future of medicine: biomaterials – materials challenges for next century. Mrs Bulletin, p. 67-73, aug. 2000.

PRAEMER, A.; FURNER, S.; PRICE, D. P. Musculoskeletal conditions in the United States. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1999.

PRAWER, S.; NUGENT, K. W.; LIFSCHITZ, Y.; LEMPET, G. D.; GROSSMAN, E.; KULIK, J.; AVIGAL, I.; KALISH, R. Systematic variation of the Raman spectra of DLC films as a function of $sp^2:sp^3$ composition. Diamond and Related Materials, v. 5, n. 3-5, p. 433-438, apr. 1996.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. (eds.) Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. San Diego: Academic Press, 1996.

RICKERBY, D. S. A review of the methods for the measurement of coating-substrate adhesion. Surface and Coatings Technology, v. 36, n. 1-2, p. 541-557, dec. 1988.

RIE, K. T. Recent advances in plasma diffusion processes. Surface and Coatings Technology, v.112, n. 1-3, p. 56-62, feb. 1999.

ROBERTSON, J. Deposition and properties of diamond-like carbons. In: JOHNSON, R. N.; LEE, W. Y.; PICKERING, M. A.; SHELDON, B. W. (eds) Properties and processing of vapor-deposited coatings. Warrendale: Materials Research Society (MRS), 1999, p. 291-302.

RODIL, S. E.; OLIVARES, R.; ARZATE, H.; MUHL, S. Properties of carbon films and their biocompatibility using in-vitro tests. Diamond and Related Materials, v. 12, n. 3-7, p. 931-937, mar.-jul. 2003.

RODRIGUEZ, R.J. Modificación de superficies por implantación iônica. In: VÁZQUEZ, A.J.; DAMBORENEA, J.J. (eds) Segundo curso de ciencia e ingeniería de la superficie de los materiales metálicos. Españã: JISAN Printer, 1996, p. 203-216.

RONKAINEN, H.; VARJUS, S.; KOSKINEN, J.; HOLMBERG, K. Differentiating the tribological performance of hydrogenated and hydrogen-free DLC coatings. Wear, v. 249, n. 3-4, p. 260-266, may 2001.

SCHROEDER, A.; FRAN CZ, G.; BRUININK, A.; HAUERT, R.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E. Titanium containing amorphous hydrogenated carbon films (a-C:H/Ti): surface analysis and evaluation of cellular reactions using bone marrow cell cultures in vitro. Biomaterials, v. 21, n. 5, p. 449-456, mar. 2000.

SCHWARTSMANN, C. R.; FERREIRA, C. A. M. P.; MOLINA, M. A. P.; GARZELLA, M. M.; OLIVEIRA, G. K. "Debris" em prótese total do quadril não cimentada: novo caso clínico. Revista Brasileira de Ortopedia, v. 30, n. 10, p. 793-796, oct. 1995.

SCULLY, J. R. Polarization resistance method for determination of instantaneous corrosion rates. Corrosion, v. 56, n. 2, p. 199-217.

SELIGSON, D.; MEHTA, S.; MISHRA, A. K.; FITZGERALD, T. J.; CASTLEMAN, D. W.; JAMES, A. H.; VOOR, M. J.; BEEN, J.; NAWAB, A. In vivo study of stainless steel and Ti-13Nb-13Zr bone plates in a sheep model. Clinical Orthopaedics and Related Research, n. 343, p. 213-223, oct. 1997.

SEQUEDA, F. Application of plasma processes to thin film materials technology. Apostila 1 do Curso Básico. 10º Congresso Brasileiro de Aplicações de Vácuo na Indústria e na Ciência. Campinas, 27 e 28 de julho de 1989 (a).

SEQUEDA, F. Thin film deposition techniques and their applications for microelectronics. Apostila 2 do Curso Básico. 10º Congresso Brasileiro de Aplicações de Vácuo na Indústria e na Ciência. UNICAMP, Campinas, 27 e 28 de julho de 1989 (b).

SHEEJA, D.; TAY, B. K.; LAU, S. P.; NUNG, L. N. Tribological characterization of diamond-like carbon coatings on Co-Cr-Mo alloy for orthopaedic applications. Surface and Coatings Technology, v. 146-147, p. 410-416, 2001 (a).

SHEEJA, D.; TAY, B. K.; SHI, X.; LAU, S. P.; DANIEL, C.; KRISHNAN, S. M.; NUNG, L. N. Mechanical and tribological characterization of diamond-like carbon coatings on orthopedic materials. Diamond and Related Materials, v. 10, n. 3-7, p. 1043-1048, mar.-jul. 2001 (b).

SOUZA, M. E. P. Estudo do processo de anodização por voltagem modulada do titânio e da liga Ti-6Al-7Nb. Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado). – Universidade Estadual de Campinas.

STEINEMANN, S. G. In: WINTER, G. D.; LERAY, J.L.; DE GOOT, K. (eds). Evaluation of biomaterials. New York: Wiley, p. 1-34, 1980.

TABOGA, S. R. Preparações citológicas. Métodos de estudo da célula. In: CARVALHO, H. F. & RECCO-PIMENTEL, S. M. A célula 2001. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2001b, p. 15-19.

THOMSON, L.A.; LAW, F. C.; RUSHTON, N.; FRANKS, J. Biocompatibility of diamond-like carbon coating. Biomaterials, v. 12, n. 1, p. 37-40, jan. 1991.

TIAINEM, V.M. Amorphous carbon as a bio-mechanical coating - mechanical properties and biological applications. Diamond and Related Materials, v. 10, n. 2, p. 153-160, feb. 2001.

TZENG, Y.; YOSHIKAWA, M.; MURAKAWA, M.; FELDMAN, A. (eds.) Application of diamond films and related materials: materials science monographs. New York: Elsevier, 1991.

VERCAMMEN, K.; HAEFKE, H.; GERBIG, Y.; HULSEL, A. V.; PFLÜGER, E.; MENEVE, J. A comparative study of state-of-the-art diamond-like carbon films. Surface and Coatings Technology, v. 133-134, p. 466-472, nov. 2000.

VIEIRA, S. Introdução à Bioestatística. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1981.

VOEVODIN, A. A.; CAPANO, M. A.; LAUBE, S. J. P.; DONLEY, M. S.; ZABINSKI, J. S. Design of a Ti/TiC/DLC functionally gradient coating based on studies of structural transitions in Ti-C thin films. Thin Solid Films, v. 298, n. 1-2, p. 107-115, apr. 1997.

VOEVODIN, A. A.; DONLEY. Preparation of amorphous diamond-like carbon pulsed laser deposition: a critical review. Surface and Coatings Technology, v. 82, p. 199-213, 1996.

VOEVODIN, A. A.; ZABINSKI, J. S. Superhard, functionally gradient, nanolayered and nanocomposite diamond-like carbon coatings for wear protection. Diamond and Related Materials, v. 7, p. 463-467, 1998.

WALTER, K. C.; NASTASI, M.; BAKER, N. P.; MUNSON, C. P.; SCARBOROUGH, W. K.; SCHEUER, J. T.; WOOD, B. P.; CONRAD, J. R.; SRIDHARAN, K.; MALIK, S.; BRUEN, R. A. Advances in PSII techniques for surface modification. Surface and Coatings Technology, v. 103-104, p. 205-211, may. 1998.

WANG, K. The use of titanium for medical applications in the USA. Materials Science and Engineering A, v. 213, n. 1-2, p. 134-137, aug. 1996.

WATANABE, T.; ISHIHARA, M.; YAMAMOTO, K.; TSUDA, O; TANAKA, A.; TAKAI, O, KOGA, Y. Tribological properties of a-C:H films coated by the PBII method. Diamond and Related Materials, v. 12, n. 2, p. 105-109, feb. 2003.

WEISS, H. Adhesion of advanced overlay coatings: Mechanisms and quantitative assessment. Surface and Coatings Technology, v. 71, n. 2, p. 201-207, 1995.

WILLIAMS, D. F. Definitions in Biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986, Vol. 4, New York: Elsevier, 1987.

XU, T.; PRUITT, L. Diamond-like carbon coatings for orthopaedic applications: an evaluation of tribological performance. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 10, n. 2, p. 83-90, feb. 1999.

YANG, P.; KWOK, C. H.; CHU, P. K.; LENG, Y. X.; CHEN, J. Y.; WANG, J.; HUANG, N. Haemocompatibility of hydrogenated amorphous carbon (a-C:H) films synthesized by plasma immersion ion implantation-deposition. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, v. 206, p. 721-725, may 2003.

YODER, M. N. Diamond properties and application. In: DAVIS, R. F. (ed.) Diamond films and coatings: Developments, properties, and applications. Park Ridge: Noyes Publications, 1993, p. 1-30.

YU, S. L.; SCULLY, J. R. Corrosion and passivity of Ti-13%Nb-13%Zr in comparison to other biomedical implant alloys. Corrosion: the journal of science and engineering, v. 53, n. 12, p. 965-976, dec. 1997.

YU, L. J.; WANG, X.; WANG, X. H.; LIU, X. H. Haemocompatibility of tetrahedral amorphous carbon films. Surface and Coatings Technology, v. 128-129, n. 1, p. 484-488, jun. 2000.

ZHENG, C. Q. et al. Application of glow-discharge plasma deposited diamond-like film on prosthetic artificial heart valves. In: TZENG, Y.; YOSHIKAWA, M.; MURAKAWA, M.; FELDMAN, A. (eds.) Application of diamond films and related materials: materials science monographs. New York: Elsevier, 1991, p. 711-716.

Participação do autor em publicações relacionadas à tese

a) Periódicos Nacionais e Internacionais*

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; SANTOS JR, A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C. Surface properties and cell behaviour of diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion. Thin Solid Films, p. 1-8, 2006. Elsevier, Inglaterra, ISSN 0040-6090. *In Press. Corrected Proof, Available online 19 January 2006 (8 páginas no formato da revista).*

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; BELANGERO, W. D.; FREIRE, C. M. A.; ZAVAGLIA, C. A. C. Evaluation of diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion for orthopaedic applications. Diamond and Related Materials, v. 15, n. 4-8, p. 982-988, abr.-ag. 2006. Elsevier, Inglaterra, ISSN 0925-9635.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; SANTOS JR, A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C. Atomic force microscopic observation of diamond-like carbon (DLC) films produced by plasma immersion and fibroblastic cultured on DLC. Microscopy & Microanalysis, v. 11, p. 82-85, dez 2005. Cambridge University Press, Estados Unidos, ISSN 1431-9276.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; BONUGLI, L. O.; SANTOS JR, A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C. Morphology of fibroblastic cells cultured on diamond-like carbon coating produced by plasma immersion using AFM and SEM. Key Engineering Materials, v. 309-311, p. 713-714, maio 2006. Trans Tech Publications, Suíça, ISSN 1013-9826.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; BATISTA, N. A.; BELANGERO, W. D.; ZAVAGLIA, C. A. C. Tissue response in the femur of rats after implantation of diamond-like carbon coatings on Ti-13Nb-13Zr produced by plasma immersion. Key Engineering Materials, v. 309-311, p.783-786, maio 2006. Trans Tech Publications, Suíça, ISSN 1013-9826.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; ZAVAGLIA, C. A. C. Diamond-like carbon coatings on Ti-13Nb-13Zr alloy produced by plasma immersion for orthopaedic applications. Key Engineering Materials, v. 254-256, p. 435-438, 2004. Trans Tech Publications, Suíça, ISSN 1013-9826.

* Os artigos da "Thin Solid Films" e "Diamond and Related Materials", da Editora Elsevier, estão no Anexo.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; SANTOS JR, A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C. Scanning electron microscopy of Vero cells cultured on diamond-like carbon coating produced by plasma immersion. Brazilian Journal of Morphological Sciences, Supplement, p. 141, 2005.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; ZAVAGLIA, C. A. C. Filmes de carbono tipo diamante depositado em grandes áreas tridimensionais. SBPN Scientific Journal, v. 8, p. 50, 2004. ISSN 1415-6512.

b) Congressos Nacionais e Internacionais

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; GENARI, S. C.; ZAVAGLIA, C. A. C. Fibroblast growth on diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion. 19th European Conference on Biomaterials (ESB2005), Sorrento, Itália, 11-15 Setembro, 2005.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; ZAVAGLIA, C. A. C. Porous titanium scaffold for tissue ingrowths with diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion. 19th European Conference on Biomaterials (ESB2005), Sorrento, Itália, 11-15 Setembro, 2005.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; ZAVAGLIA, C. A. C. Mechanical properties of diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion for orthopaedic applications. 16th European Conference on Diamond, Diamond-like Materials, Carbon Nanotubes, and Nitrides (DIAMOND2005), Ed. Elsevier/UK), Toulouse, França, 11-16 Setembro, 2005.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; ZAVAGLIA, C. A. C. Diamond-like carbon coatings on three-dimensional workpieces produced by plasma immersion: studies of lifetime. European Congress on Advanced Materials and Processes (EUROMAT2005), Praga, República Tcheca, 05-08 Setembro, 2005.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; BELANGERO, W. D.; ZAVAGLIA, C. A. C. Short term in vivo biocompatibility testing of diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion for orthopaedic applications. European Congress on Advanced Materials and Processes (EUROMAT2005), Praga, República Tcheca, 05-08 Setembro, 2005.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; FREIRE, C. M. A.; ZAVAGLIA, C. A. C. Electrochemical corrosion behavior of diamond-like carbon coating produced by plasma immersion for orthopedic applications. Proceedings of the European Corrosion Congress (EUROCORR2005), Lisboa, Portugal, 04-08 Setembro, 2005. p. 1-6.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; SANTOS JR, A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C. Surface properties and cell behaviour of diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion. Proceedings of the International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials (nanoSMAT), Aveiro, Portugal, 07-09 Setembro, 2005, p. 1-3.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; MOREIRA, P. L.; SANTOS Jr, A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C. Characterization and In Vitro Cytotoxicity Studies of Diamond-like Carbon Coatings on Ti-13Nb-13Zr Alloy Produced by Plasma Immersion. Transactions of the 7th World Biomaterials Congress, Sidney, Austrália, 17-21 Maio, 2004, p.1115. ISBN 1877040193.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; GAMA, S.; ZAVAGLIA, C. A. C. Diamond-like carbon coatings on orthopaedic implants by plasma immersion process. Proceedings of the 3º Congreso Internacional de Biomateriales (BIOMAT 03), Havana, Cuba, 25-28 Março, 2003, p. 1-6.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; SANTOS JR, A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C. Adhesion and cellular morphology of fibroblastic cells cultured on diamond-like carbon (DLC)-coated and uncoated Ti-13Nb-13Zr. Proceedings of 18th International Congress of Mechanical Engineering (COBEM), Ouro Preto, 06-11 Novembro, 2005, p. 1-7.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; BATISTA, N. A.; BELANGERO, W. D.; ZAVAGLIA, C. A. C. The response to the intramuscular implantation of diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion on Ti-13Nb-13Zr alloy. IV Encontro da SBPMAT - Brazilian MRS Meeting, Recife, 16-19 Outubro 2005.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; ZAVAGLIA, C. A. C. Morfologia da superfície de filmes de carbono tipo diamante (DLC) obtidos pelo processo de imersão em plasma para aplicações ortopédicas. Anais do 49º Congresso da Associação Brasileira de Cerâmica, São Pedro, 06-09 Junho, 2005, p. 1-7.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; ZAVAGLIA, C. A. C. Revestimento cerâmico de carbono tipo diamante obtido pelo processo de imersão em plasma e aplicado à indústria em geral. 26º Congresso Brasileiro de Aplicações de Vácuo na Indústria e na Ciência (CBRAVIC), Londrina, 27-29 Julho, 2005.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; GENARI, S. C.; SANTOS Jr, A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C. Filmes de carbono tipo diamante para articulações de implantes ortopédicos. Estudos de adesão celular e citotoxicidade in vitro. Anais do 3º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (III COLAOB), Campinas, 27-30 Julho, 2004, p. 1-5.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; PUPO, P. P. R.; ZAVAGLIA, C. A. C. Deposição de carbono tipo diamante em grandes áreas tridimensionais pelo processo de imersão em plasma. 24º Congresso Brasileiro de Aplicações de Vácuo na Indústria e na Ciência (CBRAVIC), Bauru, 28-30 Julho, 2003, p. 96.

UZUMAKI, E. T.; LAMBERT, C. S.; ZAVAGLIA, C. A. C. Filmes de carbono tipo diamante como revestimento de implantes ortopédicos (prótese de quadril e joelho). Anais do 15º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (CBECIMAT), Natal, 09-13 Novembro, 2002, p. 3722-3727.

Prêmios internacionais recebidos pelo autor relacionados à tese

- Student Travel Awards of the **19th European Conference on Biomaterials** (organizado pela European Society for Biomaterials - ESB), Sorrento, Itália, 11-15 Setembro, 2005.
- Student Award of the **International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials (nanoSMAT)**, Aveiro, Portugal, 07-09 Setembro, 2005.

Anexo

Artigos sobre a tese publicada nas revistas “Thin Solid Films” e “Diamond and Related Materials” (Editora Elsevier) e entrevista concedida à revista Pesquisa Fapesp sobre os resultados e prêmios internacionais recebidos pelo trabalho



Surface properties and cell behaviour of diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion

E.T. Uzumaki ^{a,*}, C.S. Lambert ^b, A.R. Santos Jr. ^c, C.A.C. Zavaglia ^a

^a Department of Materials Engineering, Mechanical Engineering Faculty, State University of Campinas, PO BOX 6122, Campinas/SP, 13083-970, Brazil

^b Department of Applied Physics, Gleb Wataghin Physical Institute, State University of Campinas, Brazil

^c Department of Cellular Biology, Biology Institute, State University of Campinas, Brazil

Abstract

The morphology, microstructure and roughness of the diamond-like carbon (DLC) films produced by plasma immersion were investigated. Vero cells (fibroblasts) were utilized for the *in vitro* biocompatibility studies of the DLC-coated Ti–13Nb–13Zr alloy. In the cytotoxicity assay, fibroblast cells were cultured for a period of 24 h, and in the adhesion assay, cells were cultured for a period of 2 and 24 h. The cell morphology was investigated by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). No evidence was found that the presence of the DLC coating had any adverse effect. Our results show that the adherence of fibroblasts was significantly enhanced when Ti alloy was coated with DLC from the uncoated.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Diamond-like carbon coating; Ti–13Nb–13Zr alloy; Cell culture; Biocompatibility

1. Introduction

Titanium alloys (e.g., Ti–6Al–4V) are widely used as biomaterials, because they have good corrosion resistance and desirable mechanical properties close to those of bone [1]. The release of potentially harmful metal ions, i.e., the toxicity of Vanadium and neurological disorders associated with Aluminium, have created problems for biological applications, and new types of alloys have been developed [1,2]. Ti–13Nb–13Zr alloy has been proposed as an alternative to the Ti–6Al–4V due to its superior corrosion resistance and biocompatibility [2].

In general, the titanium alloys were not suitable for bearing surface application without a coating or surface treatment [2]. A diamond-like carbon (DLC) film could be used to protect titanium-based implants, improving wear behaviour and surface hardness. Studies have indicated smoothness of the surface, excellent tribological properties and biocompatibility [3–7]. Therefore, DLC coatings appear to have a great potential for improving replacement joint articulation performance [4,6,7].

DLC coatings can be deposited using various techniques; however it has proved difficult to obtain films which exhibit good adhesion. The conventional techniques of deposition of DLC form films with defined interface, and depending on the deposition conditions, in an articulation the film can suffer delamination. The plasma immersion process, unlike the conventional techniques, allows the deposition of DLC on three-dimensional workpieces with high adhesion [8–10], an important aspect for orthopaedic articulations. Plasma immersion techniques are known by several names, and are being called recently of “plasma immersion ion implantation and deposition” (PIII and D) to represent the whole family of plasma immersion processes (including film-forming techniques), while PIII is used when referring to processes without film formation [9]. For the deposition of DLC using a plasma immersion process, pulsed high negative voltage is applied to the target, producing a plasma, and the total surface of the target is coated, even without moving the sample, and without an intermediate layer. This technique is potentially useful for real medical devices with irregular geometries.

Cell culture is a very important methodology for biomaterials research because it permits a fast evaluation of the biological performance of the material to be studied [11–15]. It is important to evaluate the cell-biomaterial interaction for

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3788 5456; fax: +55 19 3289 3722.
E-mail address: emilia@fem.unicamp.br (E.T. Uzumaki).

the prediction of possible reactions to the DLC in vivo when used as coating of the biomaterials.

The cytotoxicity assay is a biological evaluation of medical devices that is priority to the International Standard [12]. This step does not specify a single test, but rather attempts to present guidelines for the choice of suitable tests and defines important principles for these tests [13]. The standard also allows for qualitative and quantitative evaluation. The MTT test (quantifiable test) is a measure of cell metabolic function, dependent on the intact activity of a mitochondrial enzyme, succinate dehydrogenase, which is impaired after exposure of cells to toxic surroundings [13]. In brief, the test involves the conversion of the tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), to an insoluble formazan product, which can be quantified by spectrophotometry [14]. This procedure gave us information about the cytotoxicity of the material and the cell functionality at the material surface.

If the biomaterial cytotoxicity can be excluded, cell adhesion is probably the most important aspect of cell interaction with a biomaterial. Cell adhesion is one of the initial events essential to subsequent proliferation and differentiation of cells before tissue formation. A medical device designed to be integrated to bone or joint prosthesis must, in the first analysis, promote cell adhesion [13]. Concisely, cell adhesion study describes the relative adherence of a cell to its substrate, generally at an early stage of culture when the cells are directly in contact with the surface material [15].

In this study, DLC coatings were deposited on Ti–13Nb–13Zr alloy substrates using the plasma immersion process. In vitro studies have been carried out using cell culture to investigate the biocompatibility of DLC-coated Ti alloy. We tested these uncoated and DLC-coated Ti–13Nb–13Zr alloys concerning the cytotoxicity, adhesion and cellular morphology of fibroblastic cells on their surface. In vivo biocompatibility assays are under way.

2. Materials and methods

2.1. Diamond-like carbon deposition

DLC films were deposited on Ti alloy (Ti–13Nb–13Zr) substrates and glass coverslips (Corning[®], traditional tissue culture disk) using the plasma immersion process [10]. In spite of the objective of the work to be to study the DLC-coated Ti alloy, is necessary also to study the DLC-coated glass because, as well as the plastic plates (used in cellular culture), the glass coverslips (produced for cellular culture) are considered a good control, i.e., are available commercially, are in agreement with the ISO 10993-5 [12], are transparent (necessary for cytochemical studies, analysis by light microscope, and immunofluorescence technique which distinguish cytoskeletal elements), possess known cellular response, and, therefore, can be used in the comparison of results of the literature. It is important to standardize the results, because the cells are sensitive to the physical and

chemical characteristics of the materials with which they interact, and simple modifications of the material, variations in surface texture, or topography can cause significant changes in cellular response [16]. For example, Thomson et al. [3] have studied the DLC-coated tissue culture plates in their pioneering work on the biocompatibility of DLC coatings, and Butter et al. [17] studied DLC-coated glass coverslips with an intermediate layer of silicon to improve the adhesion of the DLC layer.

The Ti alloy substrates were polished to a 1 μm finish with diamond paste. Before the coating deposition, the substrates were ultrasonically cleaned in acetone for 20 min. After Ar sputtering, to remove surface contamination, DLC deposition was performed by immersion in a methane plasma [10].

Raman spectroscopy was employed to characterize the microstructure of the DLC films, and graphite was used as a control in the analyses. A spectrophotometer micro-Raman of the type Jobin Yvon – model 6400 – was utilized for data acquisitions. The surface morphology of the DLC films was characterized using scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). All the AFM images presented here were obtained in contact mode (microlever tip), using a Thermomicroscopes Autoprobe. The average roughness of the coatings was calculated using the software comes with AFM over an area of $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. For the biological evaluation, the samples were sterilized by exposure to UV-light.

2.2. Cell culture

Vero cells, a fibroblastic cell line established from the kidney of the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*), were obtained from the Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil. Vero cells are recommended for studies of cytotoxicity and cell-substratum interactions in biomaterial research [11,12]. The cells were cultured in Ham-F10 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, from Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brazil) at 37 °C.

2.3. Cytotoxicity assay

In the cytotoxicity assay, fibroblast cells (Vero) were cultured on uncoated and DLC-coated disks of Ti alloy for a period of 24 h. Culture plates (polystyrene) were used as negative control samples and Latex disks were used as positive control, according to the ISO 10993-5 [11,12]. Six repetitions were made of all experiments. Briefly, the substrates were incubated in 96 well plates (Corning/Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) with culture medium (Ham-F10 medium with 10% FCS) for 24 h at 37 °C. After this incubation, 100 μL of a cell suspension (2.5×10^5 cell/mL) in Ham-F10 medium (Sigma) with 10% FCS (Nutricell) was added to the wells containing the different samples. The cells were cultured for 24 h at 37 °C, and then the medium was replaced by 50 μL of MTT (5 mg/mL in HamF-12). After 4 h incubation, 100 μL /well of isopropanoic acid (Merck) was

added. The plate was read in a microplate reader (Multiskan Bichromatic Version 1.06) at wavelength of 540 nm. Comparisons between sample groups were made using one-factor ANOVA and the Tukey test was used to determine statistical significance at $p < 0.05$.

2.4. Adhesion assay

In the adhesion assay, the cells were on uncoated and DLC-coated disks of Ti alloy for 2 and 24 h at 37 °C, and the plates were prepared as previously described (item 2.3). The culture plate itself (polystyrene) was used as a positive control (a substrate that is optimum for adhesion) and Teflon disks as a negative control. All controls are in agreement with the ISO 10993-5 [11,12]. Six repetitions were made of all experiments. The plate was read in a microplate reader (Multiskan Bichromatic Version 1.06) at 540 nm. Then comparisons between sample groups were made using one-factor ANOVA and the Tukey test was used to determine statistical significance at $p < 0.05$.

2.5. Cell morphology by SEM and AFM

A suspension of cells (2.5×10^5 cell/mL) were used for all morphology studies. They were cultured as previously described (item 2.3). All experiments were done in triplicate. As a control, cells were cultured on glass coverslips.

For the study of cell morphology using scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM), cell monolayer was grown on four surfaces: uncoated glass (control disk), DLC-coated glass, DLC-coated Ti alloy (Ti–13Nb–13Zr) and uncoated Ti alloy. After 24 h, the samples were fixed in 4% paraformaldehyde/2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer pH 7.2, for 45 min at room temperature, and postfixed with 1% OsO₄ (Sigma) in the same buffer for 15 min, at 4 °C. The specimens were then dehydrated through an ethanol series and critical point (Balzers CPD030) and examined by AFM using a Thermomicroscopes Autoprobe. For the SEM (JEOL JXA 840A scanning electron microscope), the samples were also gold sputtered.

3. Results and discussion

3.1. Surface properties

The Raman spectrum showed structures typical of DLC films, exhibiting two Raman features: the D peak located at about 1350 cm^{-1} , and the G peak positioned at approximately 1580 cm^{-1} . The presence of these two bands in the Raman spectra is an indicative that the obtained films are amorphous carbon films. Fig. 1 show the AFM morphology of the DLC films on glass and Ti–13Nb–13Zr, respectively. It is clear that DLC-coated glass exhibits a smoother surface than those of the DLC-coated Ti alloy. AFM indicated that the original surface root-mean-square (RMS) roughness of Ti–13Nb–13Zr, about 4.74 nm, was much higher than that of glass coverslips, about 0.46 nm. It was found that after DLC

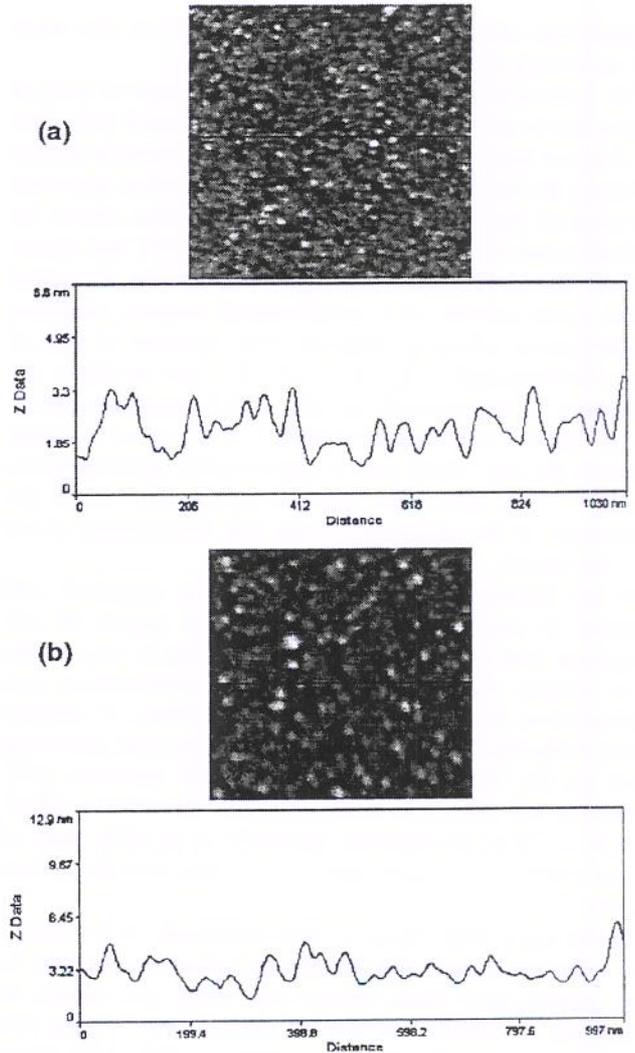


Fig. 1. Surface morphology of: (a) DLC-coated glass; and (b) DLC-coated Ti–13Nb–13Zr, by AFM.

deposition, the RMS roughness of DLC-coated Ti–13Nb–13Zr was 5.02 nm and of DLC-coated glass was 0.58 nm. The DLC coating produced by plasma immersion process (IIP and D) grew homogeneously on the substrate without defect formation and good adhesion. As example, Fig. 2 shows uniformly DLC coated knee implant and femoral head (of hip prosthesis). IIP and D method used in the work is useful for DLC coating on complicated three-dimensional substrate, as in artificial articulations. The uniformity of the deposited film was verified in previous work [18], where we used a system suggested by Nishimura [19]. DLC coatings were prepared on a Ti–13Nb–13Zr plate on each side of hexagonal sample holder, where film thickness was measured by cross-sectional SEM observations. The average thickness was $0.97 \pm 0.21 \mu\text{m}$.

3.2. Cytotoxicity analysis

The cellular viability of fibroblasts cultured on DLC-coated and uncoated substrates were calculated from experimental

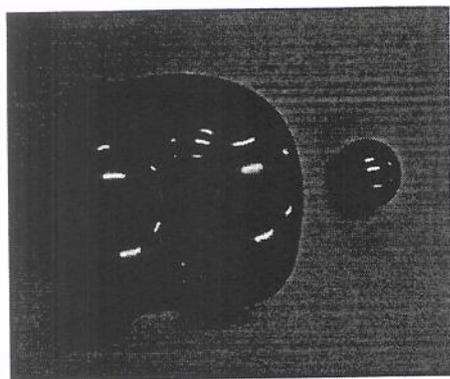


Fig. 2. DLC-coated knee implant (left) and femoral head (right).

data that was collected using cytotoxicity assay described in the materials and methods section. We utilized fibroblast cell line since these cells are representative of cells that will be encountered in the articulated orthopaedic implant environment.

The average cell numbers in the culture media exposed to samples are shown in Fig. 3. Both samples (DLC-coated and uncoated Ti alloy) did not show any type of cytotoxicity for fibroblastic cells. The results indicated that cell viability on DLC coatings was not significantly different from negative control (cells cultured on non-toxic plastic, i.e., polystyrene). The cellular viability on Ti alloy was significantly smaller than the DLC films. It was even evident that the DLC coating did improve the proliferation of fibroblastic cells on the Ti–13Nb–13Zr, since viable cells on its surface were higher than the Ti alloy (according to statistical analysis, $p < 0.005$). This result indicates that the DLC coating acts as a diffusion barrier between the Ti–13Nb–13Zr alloy and the Vero cells.

3.3. Cell adhesion analysis

Fig. 4 shows the fibroblast adhesion after an incubation period of 2 and 24 h. The results are presented as the cellular percentage of attached cells in relation to the positive control

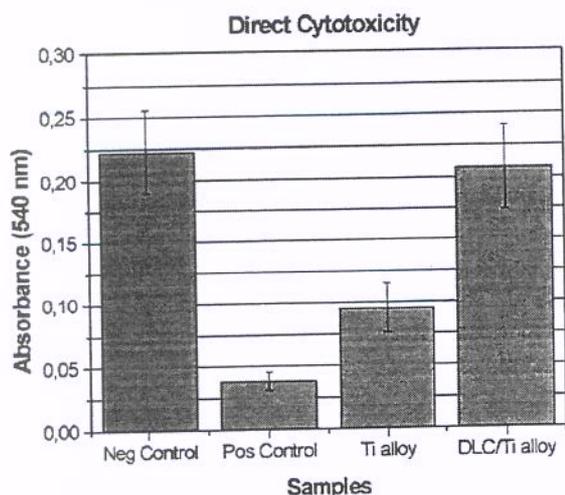


Fig. 3. Cellular cytotoxicity assays. Columns represent means of six absorbance readings, vertical bars indicate standard deviation interval.

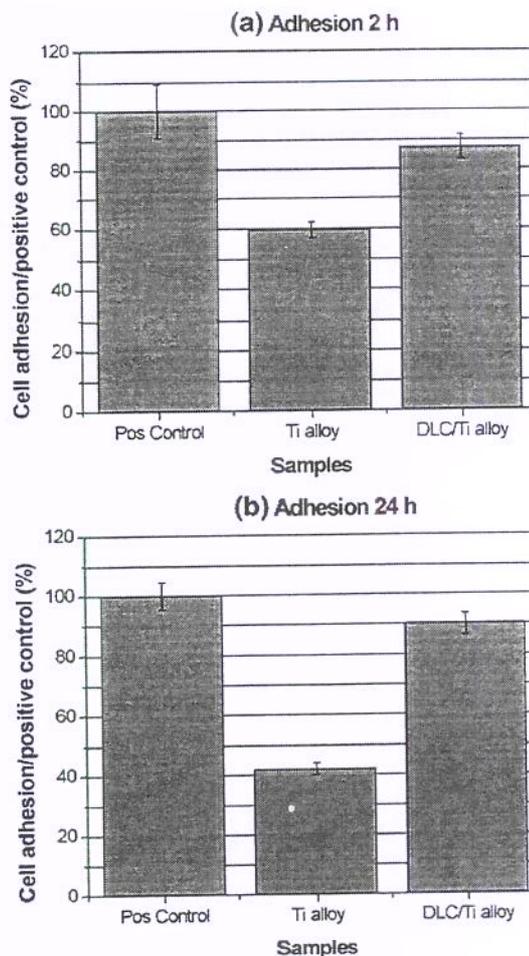


Fig. 4. Cellular adhesion assays for: (a) 2 h; and (b) 24 h. Columns represent means of six absorbance readings, vertical bars indicate standard deviation interval.

(substrate that is optimum for adhesion). There were no significant variations in the pattern of cell adhesion on the DLC coating and positive control, and the adhesion was greater in the DLC-coated Ti alloy than on Ti alloy, in the two studied timings (according to statistical analysis, $p < 0.005$). These results show that the adherence of fibroblasts was significantly enhanced when Ti alloy was coated with DLC from the uncoated.

3.4. Cell morphology analyses

Vero cells formed a semi-confluent layer on control (uncoated glass coverslips), DLC-coated glass and DLC-coated Ti–13Nb–13Zr (Fig. 5). These cells are often elongated, much flattened with microvilli and/or cell prolongations on their surface. It can be seen from the images that the morphology of the cell is not changed in all cases. The presence of a pseudo-confluent layer of elongated and adherent cells demonstrated very good adhesion and good spreading of the fibroblasts cells on the DLC coatings. The titanium alloy surface exhibited good morphology, although fewer cells could be seen on Ti alloy surface (Fig. 5g) compared to DLC-coated Ti alloy (Fig. 5e). The lower adhesion was not caused by any toxic effect of

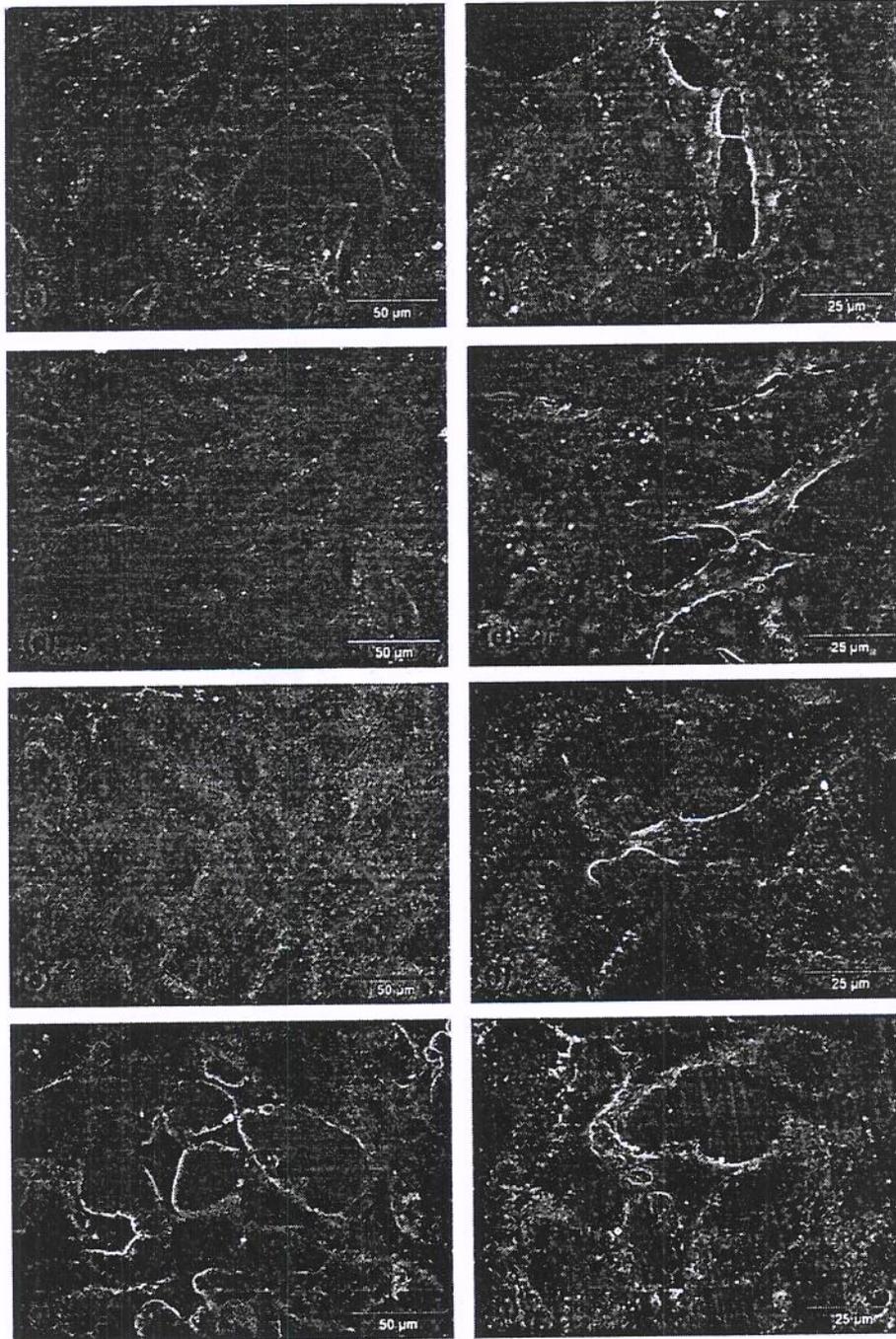


Fig. 5. SEM micrographs showing fibroblastic cells after 24 h grew on: (a)–(b) uncoated glass (control); (c)–(d) DLC-coated glass; (e)–(f) DLC-coated Ti–13Nb–13Zr; and (g)–(h) uncoated Ti–13Nb–13Zr.

the Ti alloy, as demonstrate by SEM. Cellular processes linking these cells were also observed in all of the samples.

AFM has been used to image a wide variety of cells and has proven to be successful in cellular imaging, and reveals submembranous structures, which could not be observed by SEM. The other advantages of AFM over SEM for imaging cells are the fact that no coating and no vacuum is required, electrons are avoided and imaging can be done successfully in an aqueous environment [20]. This concerns the visualization of overall cytoskeletal architecture and organelles, without the

necessity of any preparative steps [20], in spite that, in this study, the cells were fixed.

Fig. 6 shows the morphology of cells on DLC-coated and uncoated glass (control) by AFM. The cells were much flattened, and showed a round to oval centrally located nucleus, surrounded by a well spread cytoplasm, with numerous intracellular stress fibres underlying the cell membrane. It is verified that cytoskeletal fibers of the cells are more clearly visible by AFM than by SEM. Fig. 7 shows the morphology of cells on DLC-coated and uncoated Ti–13Nb–13Zr. Cells

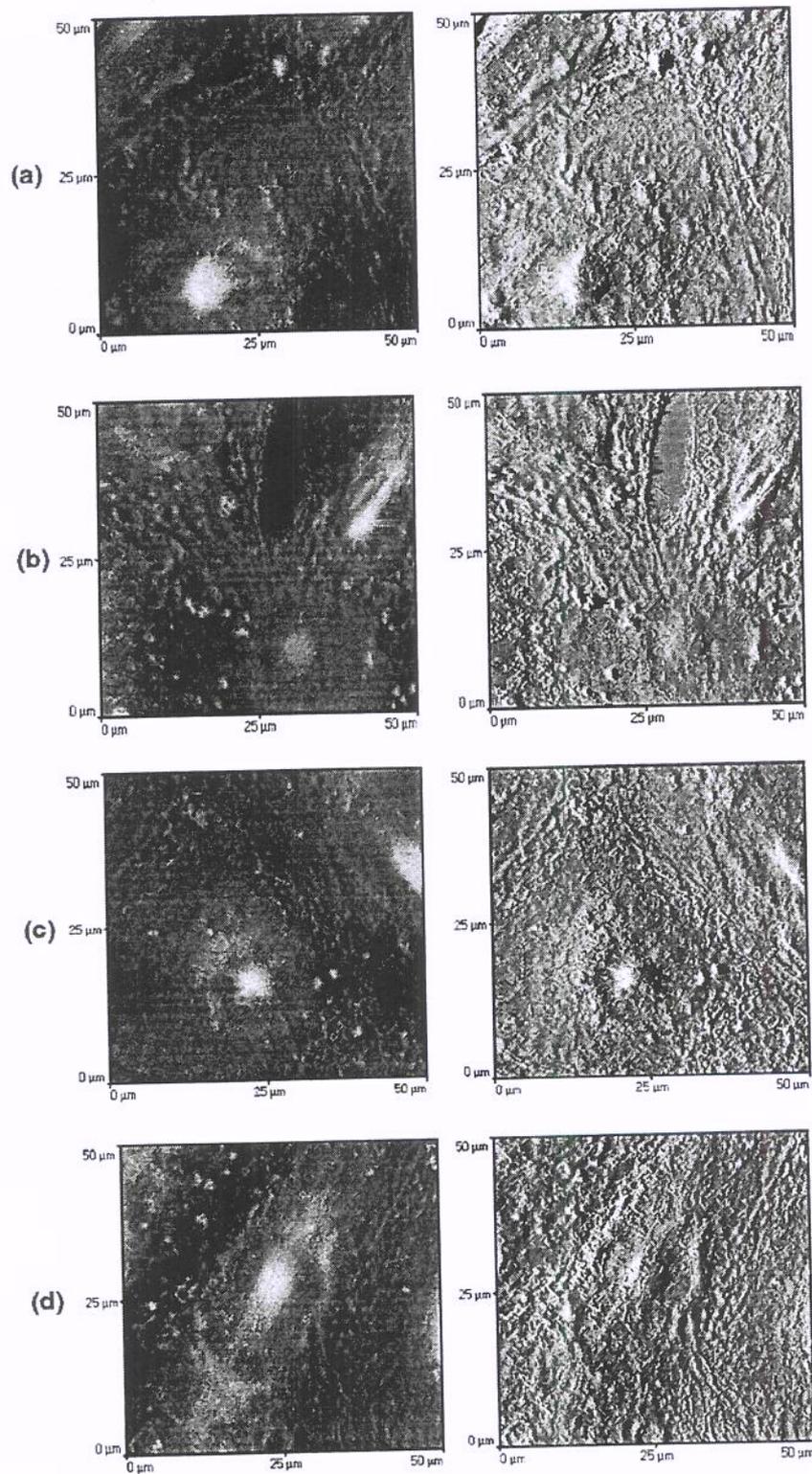


Fig. 6. AFM images showing fibroblastic cells grew on: (a)–(b) uncoated glass (control); (c)–(d) DLC-coated glass. On the right side, the same image with shading.

cultured on DLC-coated Ti alloy were much flattened (Fig. 7a) and the nucleus is clearly visible, while cells cultured on uncoated Ti alloy were less flattened, and with difficulty of visualization of the nucleus (Fig. 7b). That observation repeated in other cells. Fig. 8 shows a quantitative analysis of the degree

of flattening of the cells on DLC-coated (Fig. 8a) and uncoated Ti alloy (Fig. 8b), corresponding to Fig. 7a and b, respectively. It is verified that the nucleus maintains a similar height for both cases (maximum differences about 100 nm), but in the case of the DLC film, the cytoplasm (the area out of the nucleus) is much

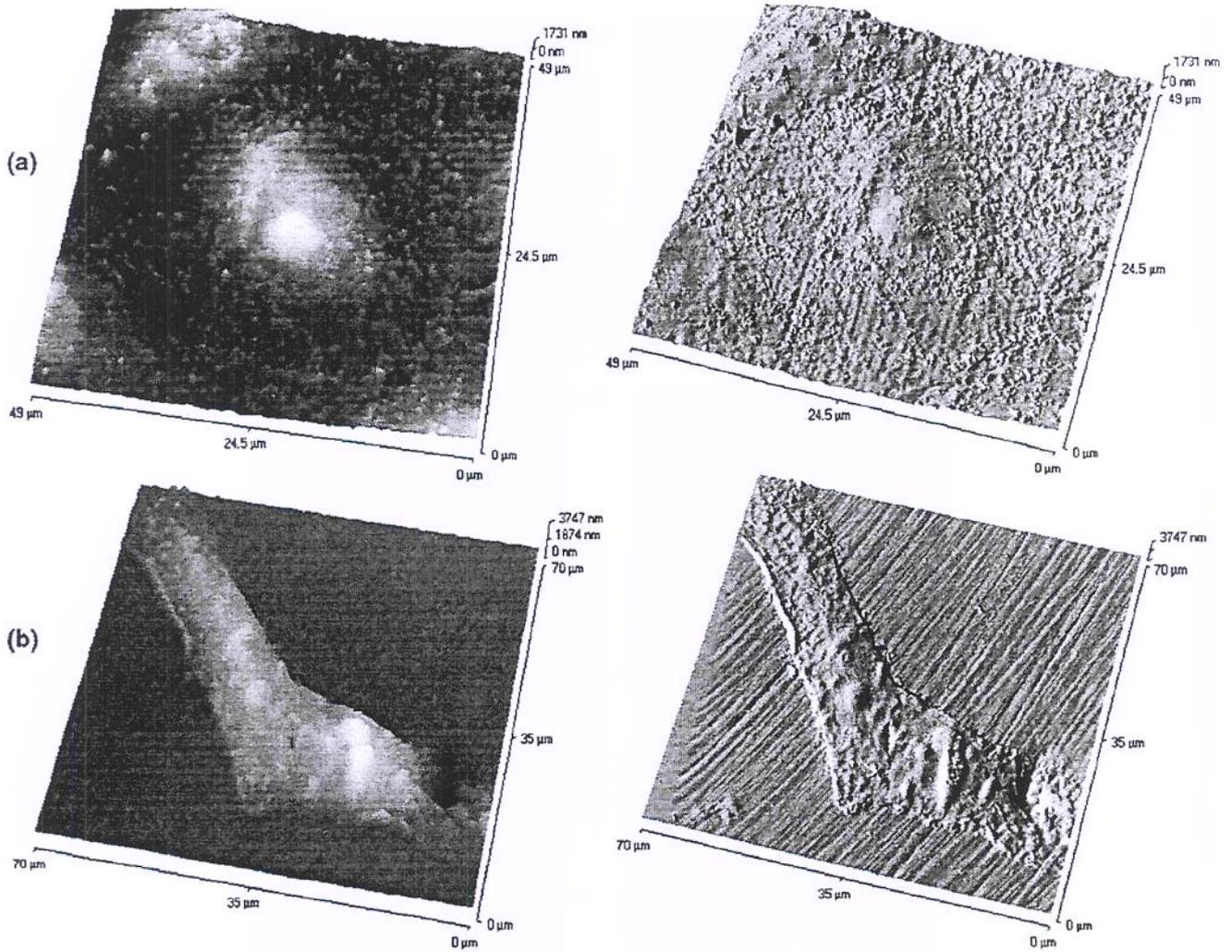


Fig. 7. AFM images showing fibroblastic cells grew on: (a) DLC-coated Ti–13Nb–13Zr; and (b) uncoated Ti–13Nb–13Zr. On the right side, the same image with shading.

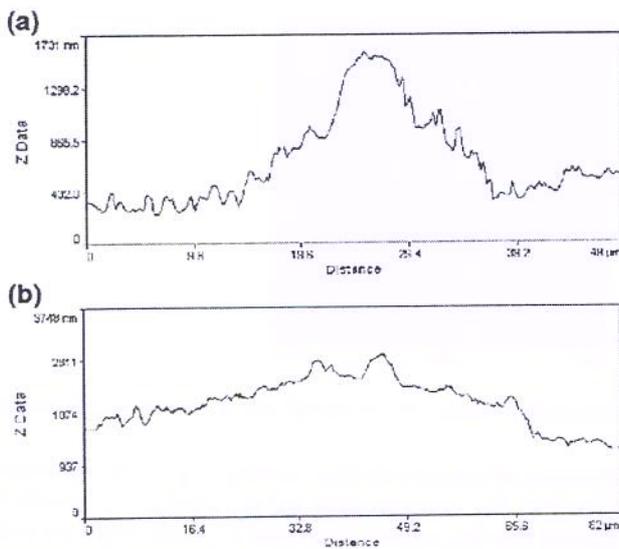


Fig. 8. Degree of flattening of the cells on: DLC-coated Ti–13Nb–13Zr (top); and uncoated Ti–13Nb–13Zr (bottom) by AFM.

flattened, with a minimum difference of 1200 nm. Since morphology is related to cell function, our results suggest that cells adhere better in DLC-coated Ti alloy than in uncoated Ti alloy, confirming the result of the quantitative study of adhesion (Section 3.3).

4. Conclusions

Our results show that the DLC coating produced by plasma immersion is not cytotoxic for fibroblastic cells, and the adherence of fibroblasts was significantly enhanced when Ti alloy was coated with DLC from the uncoated. These results indicate that DLC coatings are biocompatible in vitro, and in vivo biocompatibility assays are under way.

Acknowledgments

The authors are very grateful to CAPES, to Laboratório de Nanoestruturas (IFGW/UNICAMP), to Grupo de Propriedades Ópticas (IFGW/UNICAMP), to Laboratório de Microscopia Eletrônica (FEM/UNICAMP), and to Dra. S. C. Genari and their students (IB/UNICAMP).

References

- [1] M. Long, H.J. Rack, *Biomaterials* 19 (1998) 1621.
- [2] K. Wang, *Mater. Sci. Eng.* 213A (1996) 134.
- [3] L. A. Thomson et al. 12 (1991) 37.
- [4] D. Dowling, et al., *Diamond Relat. Mater.* 6 (1997) 390.
- [5] F.Z. Cui, D.J. Li, *Surf. Coat. Technol.* 131 (2000) 481.
- [6] V.M. Tiainem, *Diamond Relat. Mater.* 10 (2001) 153.
- [7] A. Grill, *Diamond Relat. Mater.* 12 (2003) 166.
- [8] K.C. Walter, M. Nastasi, C. Munson, *Surf. Coat. Technol.* 93 (1997) 287.
- [9] A. Anders, *Surf. Coat. Technol.* 156 (2002) 3.
- [10] E.T. Uzumaki, C.S. Lambert, C.A.C. Zavaglia, *Key Eng. Mater.* 254–256 (2004) 435.
- [11] C.J. Kirkpatrick, *Regul. Aff.* 4 (1992) 13.
- [12] ISO 10993-5 (E) Biological evaluation of medical devices – Part 5 – Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1992.
- [13] C.J. Kirkpatrick, et al., *Proc. Inst. Mech. Eng.* 212H (1988) 75.
- [14] A. Dekker, et al., *Cells Mater.* 4 (1994) 101.
- [15] K. Anselme, *Biomaterials* 21 (2000) 667.
- [16] B.D. Boyan, et al., *Biomaterials* 17 (1996) 137.
- [17] R. Butter, et al., *Diamond Relat. Mater.* 4 (1995) 857.
- [18] E.T. Uzumaki, C.S. Lambert, S.C. Genari, A.R. Santos Jr., C.A.C. Zavaglia, *Proceeding of 3rd Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials*, 2004 (July 27–30), p. BR232, Campinas, Brazil.
- [19] Y. Nishimura, et al., *Surf. Coat. Technol.* 156 (2002) 50.
- [20] M. Yamashina, J. Shigeno, *J. Electron Microsc.* 44 (1995) 462.

Evaluation of diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion for orthopaedic applications^{☆,☆☆}

E.T. Uzumaki^{a,*}, C.S. Lambert^b, W.D. Belangero^c, C.M.A. Freire^a, C.A.C. Zavaglia^a

^a Department of Materials Engineering, Mechanical Engineering Faculty, State University of Campinas, PO BOX 6122, Campinas/SP, 13083-970, Brazil

^b Department of Applied Physics, Gleb Wataghin Physical Institute, State University of Campinas, Brazil

^c Department of Orthopaedic, Medical Science Faculty, State University of Campinas, Brazil

Available online 26 January 2006

Abstract

The purpose of the present study was to evaluate the properties of diamond-like carbon (DLC) coating on Ti alloy (Ti–13Nb–13Zr) produced by plasma immersion. Measurements of mechanical properties and corrosion behaviour were investigated. The corrosion studies (polarization test and electrochemical impedance spectroscopy) indicated that DLC coating could improve corrosion resistance in the simulated body fluid environment. In vivo tests were carried out by inserting 5 × 1 mm diameter DLC-coated Ti–13Nb–13Zr cylinders into both muscular tissue and femoral condyles of rats for intervals of 4 and 12 weeks postoperatively. Histological analyses showed that the DLC coatings were well tolerated in both types of implantation, demonstrating the in vivo biocompatibility of the DLC coatings produced by plasma immersion.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Diamond-like carbon; Corrosion; In vivo test; Biocompatibility

1. Introduction

For biomedical applications of diamond-like carbon films two main fields of research can be found in the literature: DLC in blood contacting applications to prevent thrombus formation and DLC in load bearing applications (that includes articulated implants), to reduce wear [1–5].

DLC coatings can be deposited using various techniques, such as plasma assisted chemical vapour deposition (PACVD), magnetron sputtering, laser ablation, and others [6]. However, it has been proved difficult to obtain films that exhibit good adhesion. The plasma immersion process, unlike the conventional techniques, allows the deposition of DLC on three-dimensional workpieces with high adhesion [7,8], an important

aspect for orthopaedic articulations. In the plasma immersion process, pulsed high negative voltage is applied to the target, producing a plasma, and the total surface of the target is coated, even without moving the sample, and without an intermediate layer.

Ti–6Al–4V alloy has been used extensively for many years as an implantable material mainly in the application of orthopaedic prostheses [9,10]. However, the strong cytotoxicity of vanadium and neurological disorders associated with aluminium (related with the occurrence of Alzheimer's disease [11]), have created problems for biological applications. Ti–13Nb–13Zr alloy (ASTM F 1713-96) has been proposed as an alternative to the Ti–6Al–4V, because it was developed specifically for use in biomedical applications, and is composed of non-toxic elements (i.e., Nb and Zr) [10,11]. Also, the Ti–13Nb–13Zr in the aged condition was reported to have higher tensile strength, a lower modulus than the mill annealed Ti–6Al–4V [10]. However, titanium alloys have relatively poor wear resistance, it was soon realized that the Ti alloy was not suitable for bearing surface applications without a coating or surface treatment [10]. A DLC film could be used to protect titanium-based implants.

A great number of studies have shown that diamond-like carbon (DLC) coatings could be developed for orthopaedic

[☆] This work evaluates the properties of DLC films (mechanical properties, corrosion behaviour and in vivo evaluation) obtained by the plasma immersion process, which possesses superior adhesion properties to the conventional methods.

^{☆☆} Submission of the article has been approved by author/co-author(s). The article is the author's original work, and has not been published or submitted simultaneously elsewhere.

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3788 5456; fax: +55 19 3289 3722.
E-mail address: emilia@fem.unicamp.br (E.T. Uzumaki).

applications, but few articles have been published about *in vivo* evaluation. Exceptions are the papers of Allen et al. [12] with DLC-coated CoCr alloy using PACVD, Mohanty et al. [13] with DLC-coated Ti using PACVD, and Lavan et al. [14] with DLC-coated silicon using pulsed laser deposition. Their works confirm the biocompatibility of the DLC.

In this study, DLC coatings were deposited on Ti–13Nb–13Zr substrates using the plasma immersion process. The films were analyzed by nanoindentation, pull test and electrochemical tests. The *in vivo* biocompatibility of DLC coatings has been evaluated into both muscular tissue and femoral condyles of rats for intervals of 4 and 12 weeks postoperatively.

2. Materials and methods

2.1. Diamond-like carbon deposition and characterization

DLC films were deposited on mirror finish silicon (Si) wafer of $100 \times 150 \times 1$ mm, Ti–13Nb–13Zr disks of 15×2 mm, and Ti–13Nb–13Zr cylinders of 5×1 mm using the plasma immersion process. The CP-Ti and Ti alloy cylinders with 5×1 mm diameter were used for the biological evaluation and Ti alloy disks with a diameter of 15 mm and thickness of 2 mm were used for the other measures. Before deposition, the substrates were firstly mechanically ground and polished progressively with diamond paste ($1 \mu\text{m}$ diamond finish).

The substrates were ultrasonically cleaned in acetone for 20 min. After Ar sputtering, to remove surface contamination, DLC deposition was performed by immersion in a methane plasma. Our deposition equipment possesses a vacuum system, a power source (pulsed DC negative output) and a reactor with two electrodes [15]. After pumping the system down to 10^{-6} Torr, methane is introduced until reaching the working pressure, and a potential difference of 2.000 V between the electrodes (300 mA) is used. The duration of the pulse bias was 60 μs . For the biological evaluation, the samples were sterilized by dry heat, at 120 °C for 30 min.

The surface morphology was measured by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). The average roughness of the coatings was calculated using the

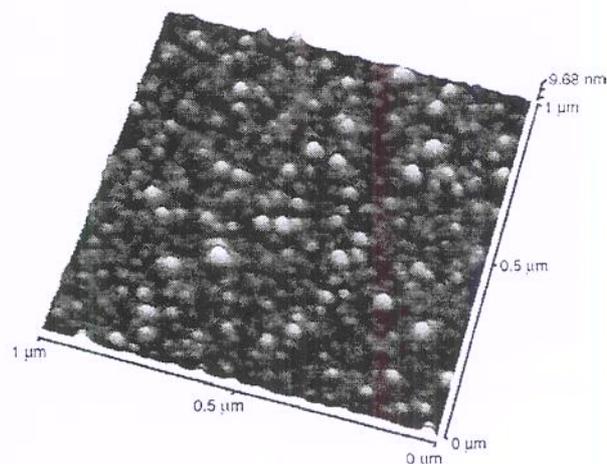


Fig. 2. Surface morphology of DLC-coated silicon by AFM.

software comes with AFM over an area of $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Raman spectroscopy was used to characterize the structure of the coatings. Hardness was obtained by nanoindentation and adhesion was assessed with a stud pull test.

2.2. Corrosion tests

DLC-coated and uncoated Ti alloy disks with a diameter of 15 mm and thickness of 2 mm were used for the corrosion studies. D.C. polarization experiments were conducted in Hanks' solution (simulated body fluid: (all in g/l) NaCl 8, CaCl₂ 0.14, KCl 0.4, NaHCO₃ 0.35, glucose 1.00, MgCl₂·6-H₂O 0.1, Na₂HPO₄·2H₂O 0.06, KH₂PO₄ 0.06, MgSO₄·7H₂O 0.06), through a glass corrosion cell kit, and three electrode cell connected to the electrochemical interface system (Fig. 1). A saturated calomel electrode (SCE) was used as a reference electrode and to measure the potential across the system. Platinum plate served as the counter electrode. The exposed area of the samples was 1 cm². Polarization curves were then obtained by Tafel polarization techniques at the sweep rate of 1 mV/s.

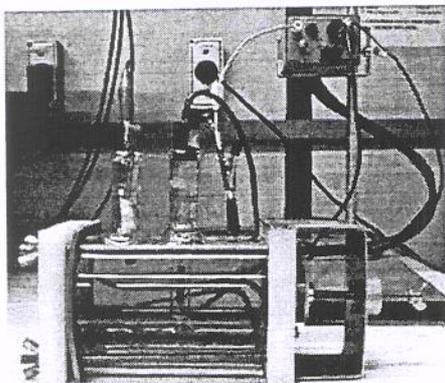


Fig. 1. Glass corrosion cell kit and three electrode cell connected to the electrochemical interface system.

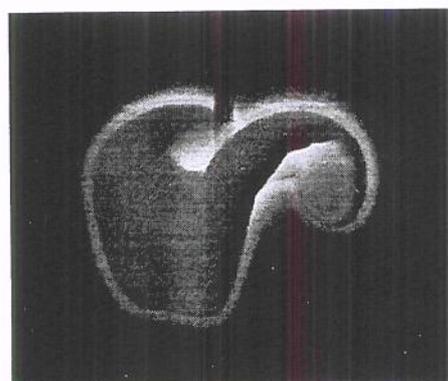


Fig. 3. Plasma around of a knee implant.

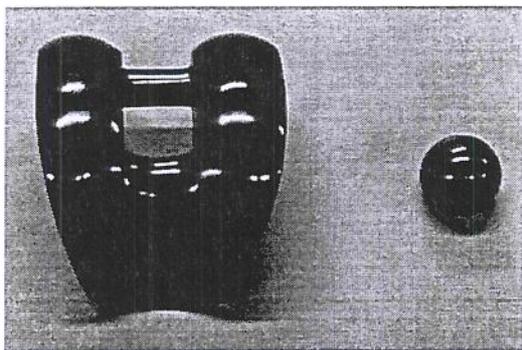


Fig. 4. DLC-coated knee implant (left) and femoral head of artificial hip joints (right).

A.C. impedance data were derived using the impedance gain-phase analyser with the electrochemical interface system, during the immersion in Hank's solution. A sinusoidal A.C. perturbation of 10 mV amplitude (rms) was applied and the working electrode was at corrosion potential over the frequency range of 10 mHz to 100 kHz. The data collection for each system was conducted before and after the polarization measurements. The impedance diagrams were interpreted using Bode representation on the basis of the equivalent circuit using ZView® fitting program. In the Bode plot, the impedance ($|Z|$) and the phase angle (Φ) are functions of the frequency (f) of the AC voltage applied in the electrolytic cell.

2.3. In vivo tests

DLC-coated Ti alloy (Ti–13Nb–13Zr) and uncoated CP-Ti cylinders (control) were implanted in muscular tissue and femoral condyles of 20 Wistar rats. Male *Ratus Norvegicus* supplied by Central Biotery of the UNICAMP. The procedures were authorized by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Institute of Biology at UNICAMP. Twenty DLC-coated Ti alloy cylinders were implanted in 10 animals and twenty Ti cylinders were implanted in others 10 animals. Each animal received one

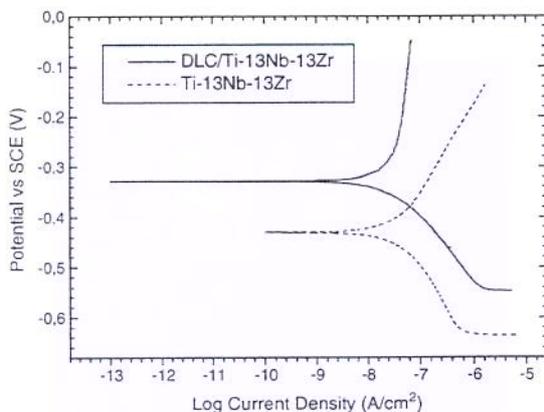


Fig. 5. Polarization curves of DLC-coated and uncoated Ti–13Nb–13Zr in Hank's solution.

implant in the muscular tissue (right) and other in the femoral condyles (left). In each group, the 10 animals were divided into two subgroups, followed during 4 weeks (5 animals) and 12 weeks (5 animals).

After either period (4 and 12 weeks), the rats were sacrificed by an intravenous overdose of pentobarbital. For each animal, implants with surrounding skeletal muscle and femoral condyles were removed and fixed in 10% buffered formaldehyde solution by 24 h, and dehydrated in ethanol of increasing concentration. The femoral condyles were also decalcified in a nitric acid solution at 3% during 2 days, except for samples of the 3 animals of each group, which were critical point dried and embedded in acrylic resin (polymethylmetacrylate).

After the fixation, the samples were bivalved for the removal of the cylinders, with a minimum lesion to the samples. The samples, without the cylinders, were prepared for the histological analysis and the sections obtained were tinted with Haematoxylin Eosin. The evaluation was realized by light microscopy.

The samples incrustated with acrylic resin were cut with a diamond saw, perpendicular to the longitudinal direction of insertion. Each sample was gold coated prior to their

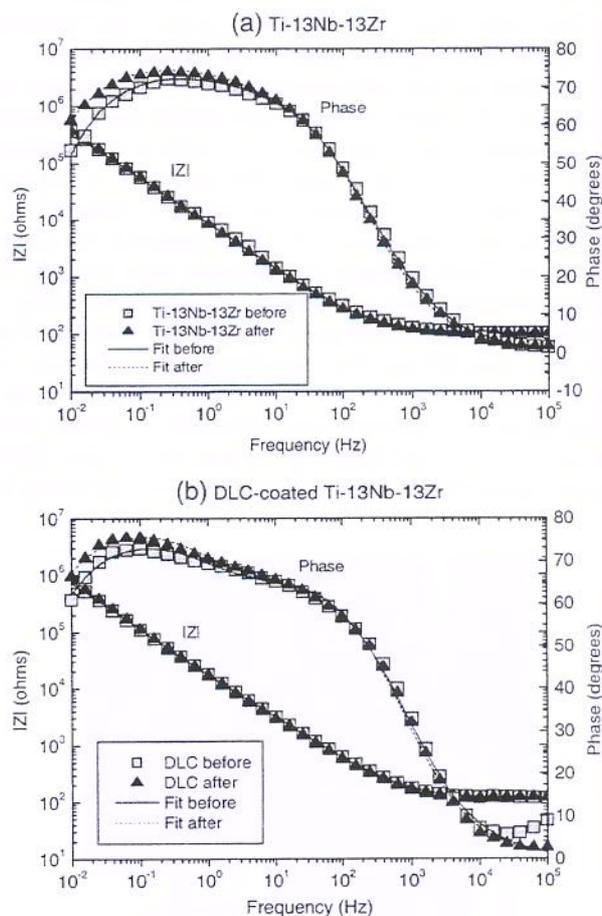


Fig. 6. Bode plots of impedance spectra of: (a) Ti–13Nb–13Zr; and (b) DLC-coated Ti–13Nb–13Zr in Hank's solution before and after the polarization measurements.

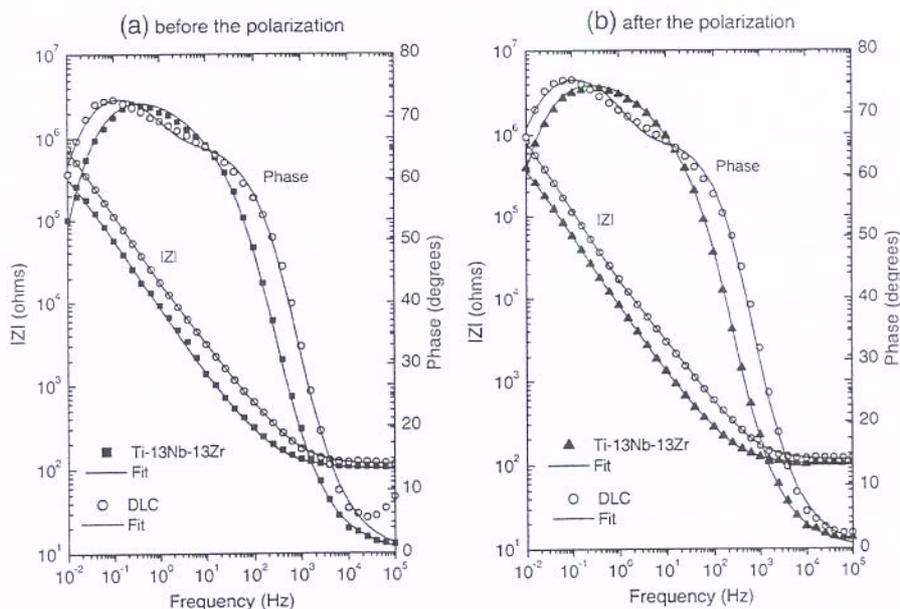


Fig. 7. Bode plots of impedance spectra of DLC-coated and uncoated Ti-13Nb-13Zr in Hank's solution: (a) before; and (b) after the polarization measurements.

observations with a 20 kV scanning electron microscopy using backscattered electrons (JEOL JXA 840).

3. Results and discussion

3.1. Surface properties

The average roughness measured by AFM was 5.02 nm for DLC-coated Ti alloy and 1.00 nm for DLC-coated Si. In Fig. 2, DLC-coated Si is shown. The DLC coating grew homogeneously on the substrate without defect formation and good adhesion. As examples, Fig. 3 shows the knee implant with plasma luminescence around, and Fig. 4 shows uniformly DLC coated orthopaedic implants (knee implant and femoral head of hip prosthesis). Plasma immersion process used in the work is useful for DLC coating on complicated three-dimensional substrate, as in artificial articulations. The uniformity of the deposited film was verified in previous work [16], where we used a system suggested by Nishimura [17]. DLC coatings were prepared on a Ti-13Nb-13Zr plate on each side of hexagonal sample holder, where film thickness was measured

by cross-sectional SEM observations. The average thickness was $0.97 \pm 0.21 \mu\text{m}$.

The Raman spectrum showed structures typical of DLC films, exhibiting two Raman features: the D peak located at about 1350 cm^{-1} , and the G peak positioned at approximately 1580 cm^{-1} . The Raman spectrum can be fitted employing two Gaussian curves, and based on the fitting parameters, the peak position and ratio of the integrated areas under the G and D peaks (I_D/I_G) can be obtained. For the parameters used in this work, I_D/I_G was of 1.71. The average hardness, measured by a nanoindenter, was 17.08 GPa for DLC-coated Ti alloy and 8.52 GPa for uncoated. The adhesion test of DLC-coated Ti-13Nb-13Zr was realized using a stud pull machine, which uses an epoxy adhesive. The adhesion strength of DLC coating exceeded the strength of epoxy ($\sim 80 \text{ MPa}$), and no area of delamination between DLC and Ti alloy was observed.

3.2. Corrosion behaviour

Fig. 5 shows typical polarization curves of the uncoated and the DLC-coated Ti-13Nb-13Zr samples. The potential region

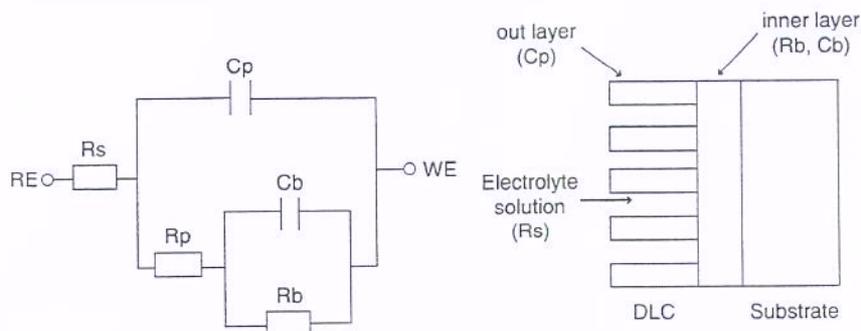


Fig. 8. Equivalent electric circuit used to simulate the impedance spectra of DLC-coated Ti-13Nb-13Zr and uncoated Ti-13Nb-13Zr. WE: working electrode; RE: reference electrode.

Table 1
EIS modelling results values of parameters for circuit elements in Hank's solution

Samples	R_s (Ω)	C_p (F)	R_p (Ω)	C_b (F)	R_b (Ω)
Ti alloy before	102.5	0.17×10^{-6}	726	7.84×10^{-6}	0.91×10^6
Ti alloy after	102.9	0.19×10^{-6}	675	8.94×10^{-6}	0.88×10^6
DLC before	115.7	8.48×10^{-6}	5543	3.54×10^{-6}	8.72×10^6
DLC after	115.9	9.09×10^{-6}	4809	4.05×10^{-6}	7.63×10^6

of the DLC-coated samples was shifted towards more positive values ($E_{\text{corr}} = -328$ mV) compared to uncoated Ti–13Nb–13Zr ($E_{\text{corr}} = -430$ mV), i.e., showed more noble corrosion potentials (a shift of approximately 100 mV). Besides, it can be seen from the figure that the range of current density for protecting film formation is smaller for DLC-coated Ti alloy ($i_{\text{corr}} = 0.52 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) than for Ti alloy ($i_{\text{corr}} = 0.68 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

The electrochemical impedance spectroscopy (EIS) for DLC-coated and uncoated Ti–13Nb–13Zr are presented in the Figs. 6 and 7. Fig. 6 shows each material in separate, i.e., Ti alloy (Fig. 6a) and DLC films (Fig. 6b), and Fig. 7, compares the two materials, i.e., DLC-coated and uncoated Ti–13Nb–13Zr. Interpretation of the EIS measurements was done by fitting the impedance data to an equivalent circuit, which is representative of the physical process taking place in the system under investigation [18]. The adopted model was the same of Pan et al. [19] and Kim et al. [18] (used for to simulate data for titanium, and DLC-coated Ti–6Al–4V in saline solution, respectively), and is given in Fig. 8. This consists of different

electrical elements assembled to describe the electrochemical corrosion at the electrochemical interface system. This model assumes the existence of two layers in the film formed on the surface of the substrate: an inner layer compacts, called barrier, and an outer layer, called porous. In Fig. 8, C_p and R_p are the outer layer capacitance (CPE1 — constant phase element 1) and pore resistance (or the electrolyte resistance inside porous), respectively. C_b and R_b are the inner layer capacitance (CPE2 — constant phase element 2) and resistance or charge transfer resistance, respectively. R_s represent the electrolyte resistance, which exists between the reference electrode (RE) and working electrode (WE). The pore resistance of coating (R_p) and the resistance of the inner layer (R_b) decrease as the delaminated area increases, and therefore, it is important that the values of R_p and R_b don't decrease with exposure time, or after polarization test. Table 1 shows the simulated parameters values obtained using the proposed equivalent electric circuit.

In Fig. 6, the EIS presented as the magnitude ($|Z|$) vs. frequency, before and after Tafel polarization, maintain the same position of the curves for both uncoated and DLC-coated Ti alloy. EIS is presented as the magnitude phase angle vs. frequency, it is observed a displacement of the phase angle for both materials, and the samples after Tafel polarization show a phase angle lightly superior, indicating the formation of protecting film, as observed through the polarization curves (Fig. 5). Table 1 shows that the values of R_p and R_b , don't decrease significantly after polarization test. Besides, after polarization test the samples presented values of constant phase

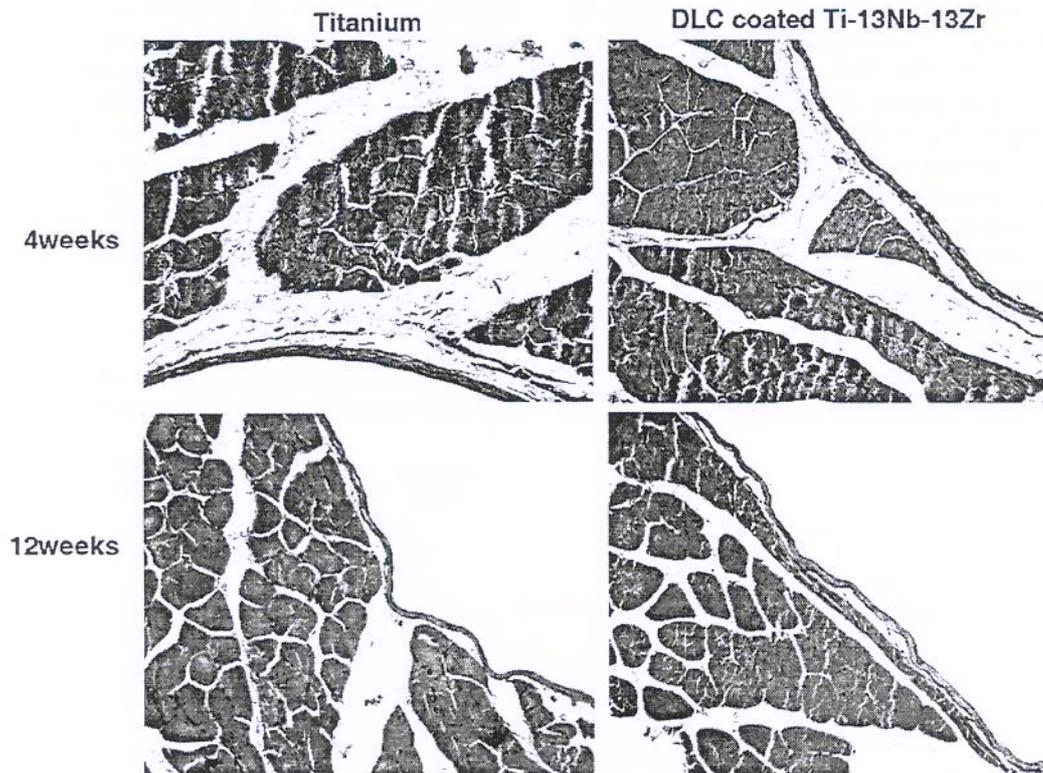


Fig. 9. Light microscopic pictures of muscular tissue response at 4 weeks (top) and 12 weeks (bottom). Left row: CP-Ti; Right row: DLC-coated Ti–13Nb–13Zr. Original magnification: 20 \times .

elements (CPE) in the same order of greatness. Those results suggest that both DLC films and Ti–13Nb–13Zr substrate were stabilized without any development of pits. Fig. 7 shows that DLC films increased the impedance ($|Z|$) of the Ti alloy, and obtained a phase angle superior, for both before and after the polarization. Comparing the results of DLC-coated and uncoated Ti alloy (Table 1), the higher values of R_p and R_b observed in the DLC films (approximately 7 times), when compared to the Ti–13Nb–13Zr, indicate that the DLC coating offer protection to the Ti–13Nb–13Zr against corrosion. Therefore, the results show that the model used is adequate to explain the behaviour of the uncoated Ti alloy and DLC-coated Ti alloy, exposed in Hanks' solution, and indicate the protective character of the DLC coatings produced by plasma immersion.

The SEM observations were made after the experiment and confirmed that both uncoated and DLC-coated Ti alloy surface was not damaged, in the studied experimental conditions. This increasing in the corrosion resistance indicates that the DLC coatings produced by plasma immersion should reduce the potential for metal ion release from implants.

3.3. Tissue reactions to implants

All animals tolerated the surgery well and recovered from the implantation procedure without any complication. After sacrifice, no abnormal tissue reaction could be observed around

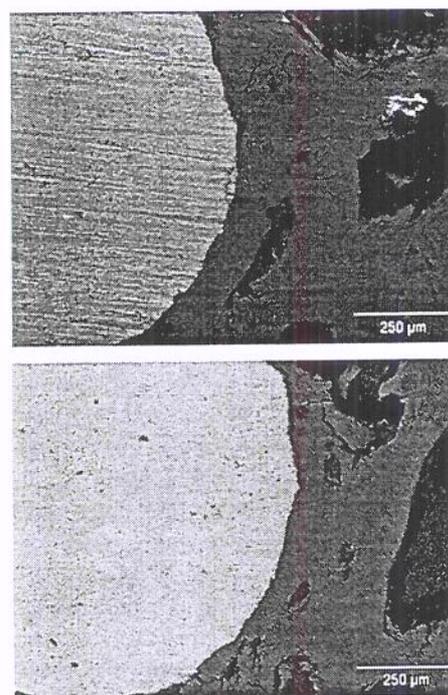


Fig. 11. Backscattered scanning electron image of CP-Ti (top) and DLC-coated Ti alloy (bottom) on insertion sites after 12 week period. The implant appears in white, bone in grey and non-mineralised tissue in black.

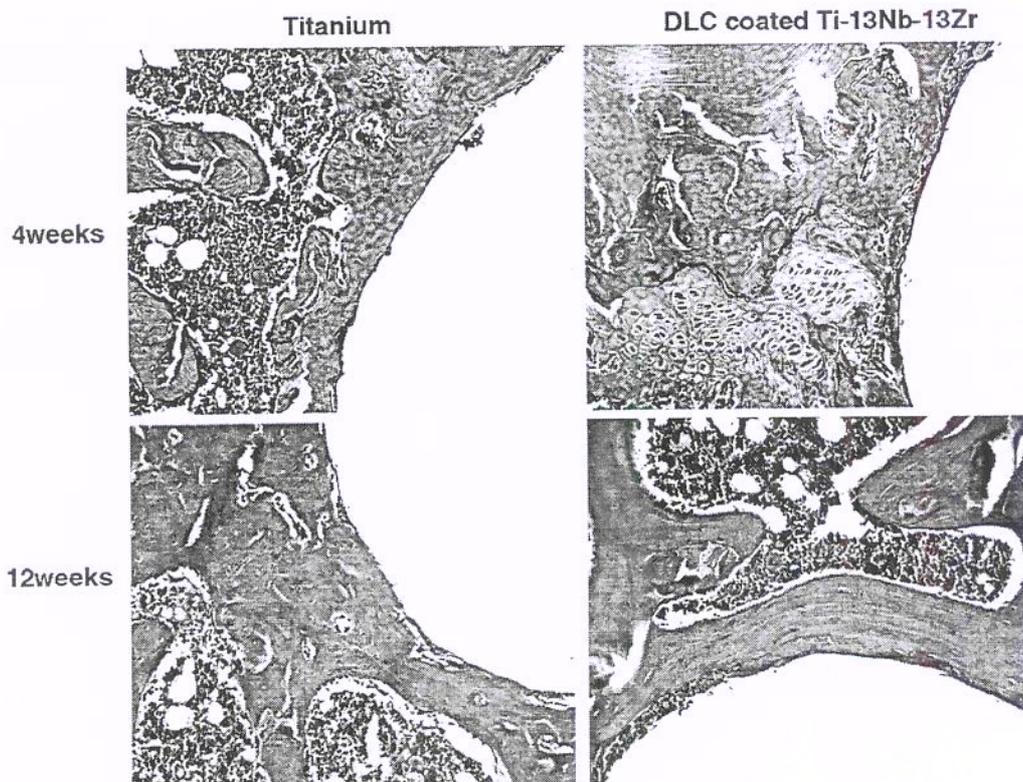


Fig. 10. Light microscopic pictures of femoral condyles tissue response at 4 weeks (top) and 12 weeks (bottom). Left row: CP-Ti; Right row: DLC-coated Ti–13Nb–13Zr. Original magnification: 20 \times .

the implants. There was no evidence of necrosis or inflammation in any specimen.

The light microscopy of the skeletal muscle around both control and DLC-coated implants was normal at all time periods, and there was not evidence of adverse reactions (Fig. 9). Thin fibrous connective tissue was observed as a capsule around the site. Surrounding muscle appeared normal for both DLC-coated Ti alloy and uncoated CP-Ti implants at 4 and 12 weeks. There were no obvious signs of an increased leaching or release of particles from the bulk material at the interface. The results are similar to the work presented for Mohanty et al. [13] in the studied timings.

The histological analysis of the femoral condyles samples with 4 and 12 weeks (Fig. 10) showed that there was no formation of a fibrous capsule around the implants in both groups, in the studied timings. The removal of the DLC-coated cylinders was more difficult, because they were more adhered. SEM by backscattering observations after 4 and 12 weeks of cylinders insertion showed no evidence of adverse reactions. For all the DLC-coated Ti alloy and Ti samples, it was noticed that bone was in tight apposition with the coating, e.g., the interface formed between the cylinders and the bone was constituted essentially from bone tissue. In addition, the results indicate that the tight apposition is larger in the group with 12 weeks (Fig. 11). Those results are in agreement with Allen et al. [12] and Dowling et al. [3], which have demonstrated the biocompatibility of DLC-coated implants using an implantation protocol in sheep bone.

The histological and SEM by backscattering observations showed a good result of the implants coated with the DLC, and indicate that the coatings is efficient protection against corrosion and metalosis.

4. Conclusions

The mechanical properties were good and the pull test results indicate the adhesion of DLC coatings to Ti–13Nb–13Zr. Our electrochemical tests in simulated body fluid indicate that DLC coatings produced by plasma immersion can improve the corrosion resistance. The findings regarding the tissue response of the DLC coatings implants are considered very favourable, and indicated that these materials were biocompatible in muscular tissue and bone tissue of rats. Besides, in our previous works, the in vitro studies showed the biocompatibility of DLC

coatings produced by plasma immersion [20,21]. Therefore, our results indicate that the DLC coating produced by plasma immersion is a promising candidate for coatings of metallic implants. Wear studies assays are under way.

Acknowledgements

The authors are very grateful to CAPES for financial support; Laboratório de Microscopia Eletrônica (FEM, UNICAMP); to Dra. M. A. Pinto (FEM, UNICAMP); and to N. A. Batista, A. A. Rodrigues, and S. P. Magalhães (NMCE, FCM, UNICAMP).

References

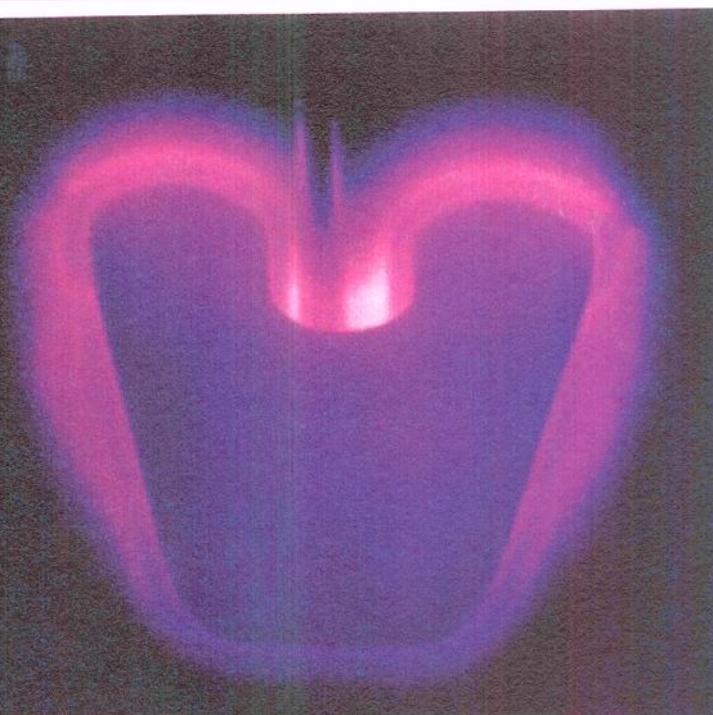
- [1] A. Grill, *Diamond Relat. Mater.* 12 (2003) 166.
- [2] R. Hauert, *Diamond Relat. Mater.* 12 (2003) 583.
- [3] D. Dowling, et al., *Diamond Relat. Mater.* 6 (1997) 390.
- [4] V.M. Tiainen, *Diamond Relat. Mater.* 10 (2001) 153.
- [5] M.I. Jones, et al., *J. Biomed. Mat. Res.* 52 (2000) 413.
- [6] A. Grill, *Diamond Relat. Mater.* 8 (1999) 428.
- [7] K.C. Walter, M. Nastasi, C. Munson, *Surf Coat Technol.* 93 (1997) 287.
- [8] S. Miyagawa, et al., *Surf Coat Technol.* 128–129 (2000) 260.
- [9] M. Long, H.J. Rack, *Biomaterials* 19 (1998) 1621.
- [10] K. Wang, *Mater. Sci. Eng.* 213A (1996) 134.
- [11] Y. Okazaki, et al., *Mater. Sci. Eng., A Struct. Mater.: Prop. Microstruct. Process.* 243 (1998) 250.
- [12] M. Allen, et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 58 (2001) 319.
- [13] M. Mohanty, et al., *Biom. Eng.* 19 (2002) 125.
- [14] D.A. Lavan, et al., *Biomaterials* 26 (2005) 465.
- [15] E.T. Uzumaki, C.S. Lambert, C.A.C. Zavaglia, *Key Eng. Mater.* 254–256 (2004) 435.
- [16] E.T. Uzumaki, C.S. Lambert, S.C. Genari, A.R. Santos Jr., C.A.C. Zavaglia, *Proceeding of 3rd Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials*, Campinas, Brazil, July 27–30 2004, p. BR232 (reference of the work).
- [17] Y. Nishimura, et al., *Surf Coat Technol.* 156 (2002) 50.
- [18] H.G. Kim, et al., *Diamond Relat. Mater.* 14 (2005) 35.
- [19] J. Pan, D. Thierry, C. Leygraf, *Electrochim. Acta* 41 (1996) 1143.
- [20] E.T. Uzumaki, C.S. Lambert, A.R. Santos Jr., C.A.C. Zavaglia, *Proceedings of the International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials*, Aveiro, Portugal, September 6–9, 2005, *Thin Solid Films*, in press.
- [21] E.T. Uzumaki, C.S. Lambert, A.R. Santos Jr., C.A.C. Zavaglia, *Proceedings of the 18th International Symposium on Ceramics in Medicine*, Kyoto, Japan, December 5–8, 2005, *Key Eng. Mater.*, 2006, p. 713.

ARTICULAÇÕES ARTIFICIAIS

Equilíbrio garantido

Novo tratamento para próteses resulta em menor desgaste

DINORAH ERENO



Todos os anos são feitas no Brasil cerca de 14 mil cirurgias para colocação de próteses de joelho e quadril pelo sistema público de saúde.

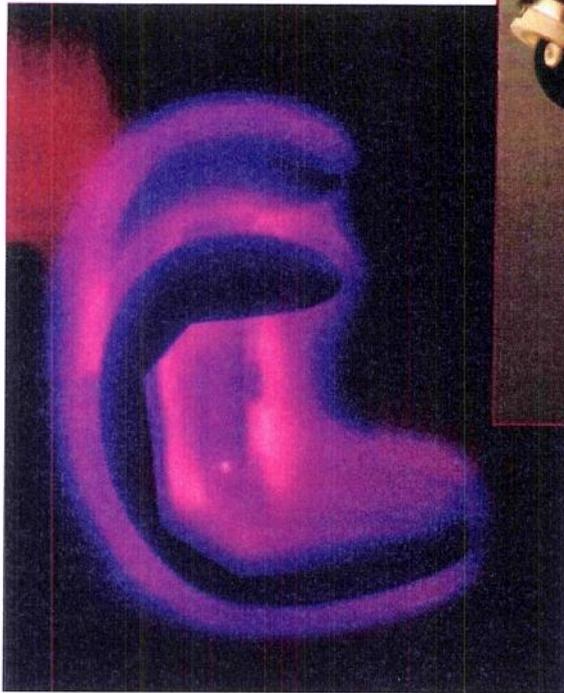
Afinal, elas são fundamentais para recuperar movimentos perdidos em decorrência de acidentes, doenças degenerativas como artrose e artrite ou tumores ósseos. A busca por articulações artificiais cada vez mais parecidas com as originais levou pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) a aplicar um novo processo de tratamento em uma liga de titânio, usada em aplicações ortopédicas, que resultou em um revestimento biocompatível com alta resistência ao desgaste. “É o revestimento com o mais baixo atrito já obtido para esse tipo de aplicação”, diz a pesquisadora Emília Tieko Uzumaki, responsável pelo estudo, apresentado e premiado em dois congressos interna-

cionais realizados em setembro, um no Congresso da Sociedade Européia de Biomateriais na Itália e outro no Congresso de Superfícies, Revestimentos e Materiais Nanoestruturados em Portugal. Na pesquisa, realizada durante a sua tese de doutorado na Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp orientada pela professora Cecília Zavaglia, a liga de titânio foi recoberta com carbono tipo diamante, também conhecido como DLC, do inglês Diamond-Like Carbon, material biocompatível que possui propriedades como alta dureza, baixo atrito, resistência ao desgaste e à corrosão. “A liga de titânio é a melhor liga biocompatível”, diz Emília. No entanto, para ser utilizada em articulações, ela tem de passar por um tratamento de superfície, para resistir ao desgaste.

Para aplicar o DLC foi utilizado um processo de imersão em plasma desenvolvido pelo pesquisador Carlos Salles Lambert, do Instituto de Física da Unicamp, que está em fase de patenteamento. Essa técnica de deposição utiliza um plasma de um hidrocarboneto – gás como o metano ou o acetileno – para envolver, por inteiro, as peças e reves-

ti-las com o carbono tipo diamante. Isso possibilita o revestimento uniforme de grandes áreas – até 1 metro quadrado ou mais, dependendo do tamanho do equipamento utilizado –, com baixo custo em comparação com outras técnicas de deposição a plasma. “As técnicas convencionais, além de não terem boa aderência, não permitem que o filme de carbono seja depositado em grandes áreas e em formas complexas”, diz Lambert. Elas são utilizadas principalmente para pequenas superfícies planas.

Materiais biocompatíveis - Atualmente o material mais utilizado entre as articulações metálicas das próteses de joelho e de quadril é o polietileno de ultra-alto peso molecular com características especiais, que atua como “amortecedor” e é o melhor polímero conhecido para essa aplicação. Mesmo assim, ele é o limitador do tempo de vida útil da prótese, que pode variar de cinco a 15 anos. O que significa que, de tempos em tempos, as próteses têm de ser revisadas e substituídas total ou parcialmente. Por isso a procura por novos materiais biocompatíveis para as



Prótese de joelho (à esq.) imersa no plasma e de quadril (acima) revestida com DLC

próteses ortopédicas que tenham maior tempo de vida útil não pára. E o interesse das empresas por produtos inovadores também. O revestimento da liga metálica com DLC diminui o desgaste da prótese e, com isso, aumenta o seu tempo de vida útil. Até agora três empresas demonstraram estar interessadas no novo material.

Todos os testes para avaliar se o revestimento de DLC obtido por imersão em plasma pode ser utilizado no corpo humano, exigidos pelas normas brasileiras e pela agência norte-americana de controle de alimentos e medicamentos, a Food and Drug Administration (FDA), estão sendo realizados na Unicamp. No Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia foram feitos os testes de biocompatibilidade *in vitro* – realizados com a cultura de células em laboratório –, como citotoxicidade, adesão e morfologia celular. O ensaio de biocompatibilidade *in vivo*, com implantes no tecido muscular e ósseo de animais, foi realizado no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental com a colaboração do professor William Dias Belangero, do Departamento

de Ortopedia da Faculdade de Ciências Médicas da universidade. “Os estudos mostraram que a resposta celular foi melhor para a liga de titânio revestida com DLC do que para a liga sem revestimento”, diz Emília. “Assim como a resistência à corrosão.”

Os filmes de DLC obtidos por processos convencionais começaram a ser estudados no Instituto de Física da Unicamp no início da década de 1980. A nova técnica de deposição, que começou a ser pesquisada por Lambert nos anos 1990, já foi utilizada para tratar peças destinadas à área médica, automobilística, aeroespacial, petroquímica e petrolífera. No setor automobilístico, engrenagens para motor, peças para rolamentos e parafusos já estão sendo revestidos com DLC para diminuir o atrito. No aeroespacial, o processo foi usado experimentalmente com sucesso em peças que compõem asas de avião. “O tratamento melhora a superfície, aumentando o tempo de vida, sem aumentar o peso da peça”, diz o pesquisador. Na área biomédica, válvulas cardíacas e *stents*, utilizados durante cirurgias como sustentação mecânica para impe-

dir que a artéria volte a se fechar, revestidos com DLC estão sendo testados em animais. Resultados preliminares mostraram que o novo processo ajuda a reduzir a formação de coágulos. A possibilidade de aplicação do DLC em diversos produtos chamou a atenção de várias empresas que estiveram no Congresso Internacional de Nanotecnologia, realizado em julho, em São Paulo. Depois disso, algumas delas estiveram na Agência de Inovação (Inova) da Unicamp para iniciar os entendimentos que podem resultar em contratos de licenciamento.

FOTOS: MEGUIE BOWMAN

Bisturi cirúrgico - Em um trabalho conjunto, Lambert e Emília estudaram em condições reais de uso objetos sujeitos a desgaste abrasivo. Facas industriais e bisturis cirúrgicos com revestimento de DLC foram testados em uma fábrica de tecelagem em Jundiaí, no interior de São Paulo. A empresa utiliza o bisturi cirúrgico em várias máquinas para cortar grandes quantidades de tecidos e plásticos. Em cada uma delas são colocados de 100 a 200 bisturis emparelhados – o número depende da largura das tiras desejadas –, que têm tempo de vida útil de 20 dias, em média, considerando como parâmetro os tecidos mais abrasivos. Com o revestimento de DLC, os bisturis duraram 60 dias, três vezes mais do que o tempo normal, representando uma substancial economia para a empresa, que utiliza cerca de 500 deles por mês. As facas industriais, semelhantes a discos, também puderam ser usadas por um período três vezes maior depois do tratamento com plasma. Em vez de 30 dias resistiram por 90 dias.

Das muitas aplicações já testadas, uma está bem próxima de entrar no mercado. Três empresas de Cordeirópolis, no interior de São Paulo, estão dispostas a aplicar o revestimento de DLC em utensílios domésticos e industriais, como panelas, frigideiras, assadeiras e fôrmas para bolo e pães, inclusive de panificadoras, em substituição aos antiaderentes convencionais. O processo de imersão em plasma dá ao material resistência ao desgaste e à abrasão, propriedades que garantem a aderência do revestimento mesmo quando em contato com palha de aço durante o processo de limpeza.