

**Revestimentos Inorgânicos para Ligas de Magnésio Usadas em
Implantes Ortopédicos**

Eduardo Sim Sim Torres

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia de Materiais

Orientadores: Prof. João Carlos Salvador Santos Fernandes

Prof. Dalila Madeira Nascimento Mil-Homens

Júri

Presidente: Prof. José Paulo Sequeira Farinha

Orientador: Prof. João Carlos Salvador Santos Fernandes

Vogal: Prof. Maria Teresa Oliveira de Moura e Silva

Janeiro 2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero deixar os meus sinceros agradecimentos ao Professor João Salvador por toda a orientação, transmissão de conhecimentos e revisões que tiveram um papel preponderante neste trabalho.

Um agradecimento especial para a Doutora Dalila Mil-Homens por todo o trabalho que ajudou a desenvolver na parte dos ensaios celulares, onde contribuiu sempre com conhecimento, disponibilidade, otimismo, simpatia e sinceridade.

À Professora Amélia Almeida pelos esclarecimentos de dúvidas, opiniões e ajuda que foram de grande utilidade numa fase final do trabalho.

Um agradecimento a todos os elementos do grupo de Ciências da Corrosão e Engenharia de Superfícies (CSSE) que sempre me receberam bem e ajudaram, transformando este trabalho num período mais ligeiro e divertido.

Aos meus colegas de curso: Brenda, Filipe, João, Jonas, Miguel e Rosa, por todos os momentos partilhados ao longo destes cinco anos, momentos que rimos e sofremos em conjunto e que ficam para sempre na nossa história. Foram eles que ajudaram a transformar estes cinco anos naquele que dizem ser o melhor tempo das nossas vidas.

Aos meus amigos, por todos os momentos partilhados e que ajudaram a viver este período de forma mais feliz, pelos dias e noites intermináveis que deixam saudades.

À minha namorada Jéssica por toda a ajuda, paciência, carinho, e por ter sempre uma palavra otimista e de conforto para dar. Um especial obrigado por ter sido a minha confidente durante todo o curso.

À minha família por todo o apoio, carinho, ajuda, compreensão e preocupação ao longo deste período desafiante. Um agradecimento muito especial aos meus pais e às minhas duas avós que tornaram este sonho possível e que merecem partilhar as vitórias comigo, hoje e sempre.

Resumo

Os implantes utilizados atualmente são comumente produzidos com metais ou ligas metálicas biocompatíveis (ligas de titânio, ligas de cobalto, aço inoxidável,...), principalmente pelas propriedades mecânicas que permitem suportar os esforços a que os implantes estão sujeitos. A escolha dos materiais passa por encontrar aqueles que possuam as propriedades mecânicas mais idênticas ao osso quanto possível. Os implantes biocompatíveis desempenham as funções de suporte necessárias e conseguem corresponder aos esforços mecânicos a que são sujeitos, contudo, existem grandes discrepâncias entre a densidade e o módulo de Young destes materiais e os do osso humano, e colocam a necessidade de uma segunda cirurgia para remoção do implante quando este deixa de ter utilidade ou quando a sua degradação ameaça ser prejudicial ao organismo humano. De forma a evitar os potenciais problemas associados a uma segunda cirurgia, nos últimos anos têm sido realizados diversos estudos com vista à produção de implantes com materiais bioabsorvíveis, de que são exemplo as ligas de magnésio, como a liga AZ31 utilizada neste trabalho.

A elevada taxa de corrosão do magnésio apresenta-se como o maior entrave à produção de implantes deste metal. A aplicação de revestimentos cerâmicos permite a diminuição da taxa de corrosão para valores que garantam que o implante cumpre a sua função estrutural durante o período estipulado e ao mesmo tempo que a concentração de produtos decorrentes da sua corrosão não representa qualquer problema para o organismo humano. Estes revestimentos para além de fornecerem proteção das superfícies relativamente ao meio, facilitam a adesão das células formadoras de tecido ósseo e fornecem localmente iões de elementos necessários à regeneração dos tecidos.

No presente trabalho, para a produção de revestimentos cerâmicos, foram utilizadas as técnicas: Oxidação Eletrolítica por Plasma (PEO) seguida de Tratamento Hidrotérmico, e a técnica de imersão (“Dip-Coating”) para a aplicação de policaprolactona (PCL). O comportamento das amostras à corrosão foi avaliado com a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), e foram realizados ensaios celulares de avaliação da taxa de sobrevivência das células quando em contacto com as amostras (viabilidade celular).

A taxa de corrosão foi significativamente diminuída pela aplicação dos revestimentos, sendo o revestimento das amostras PEO+PCL aquele que obteve melhores resultados. A avaliação da viabilidade celular revelou que o revestimento PEO+Hidrotérmico é aquele que fornece melhores resultados relativamente ao substrato AZ31. As análises de SEM-EDS e XRD permitiram identificar os compostos formados ao longo de cada camada do revestimento. Nas amostras PEO+Hidrotérmico formou-se hidroxiapatite.

Palavras-Chave: AZ31; Hidroxiapatite; Implantes Ortopédicos; Oxidação Eletrolítica por Plasma (PEO); Tratamento Hidrotérmico; Dip-Coating; Policaprolactona (PCL); Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS);

Abstract

The implants used nowadays are commonly produced with biocompatible metals and metallic alloys (titanium alloys, cobalt alloys, stainless steel...), mainly by their mechanical properties that allow to support the efforts that the implants are subjected to. The chosen materials have to have the mechanical properties as identical as possible to the ones of the human bone. The biocompatible implants perform the necessary support function and can withstand the mechanical efforts that are submitted to, although, some differences exist between the density and the Young's modulus of these materials and the ones of the human bone. Additionally, the biocompatible implants imposes the need for a second surgery for the removal of the implant when it is no longer necessary or when its degradation starts to be a concern to the human body. In order to avoid the potential problems associated with a second surgery, multiple studies were done in the past few years, with the target of the production of bioabsorbable implants, of which are example the magnesium alloys, like the AZ31 alloy used in this study.

The higher corrosion rate of the magnesium is the major issue to the production of magnesium implants. The application of ceramic coatings allow to lower the corrosion rate to values that allow the implant to perform its structural function during the established period of time, at the same time, ensuring that the concentration of the corrosion by-products does not represent a problem to the human organism. These coatings allow to protect the surfaces from the corrosion medium, favor the adhesion of bone tissue forming cells, and supply, locally, ions that are useful for the regeneration of the tissues.

In this study, for the production of the ceramic coatings, were used techniques like: Plasma Electrolytic Oxidation (PEO) followed by Hydrothermal Treatment, and the Dip-Coating technique for the application of polycaprolactone (PCL). The characterization of the behavior of the samples to corrosion was evaluated by Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS), and were performed cellular tests to evaluate the cells survival rate when in contact with the samples.

The coatings allowed to significantly decrease the corrosion rate, being the PEO+PCL the coating that obtained a better result. The cellular tests evaluation revealed that the PEO+Hydrothermal treatment is the one that offers better results, when compared with the AZ31 substrate. The analysis of the SEM and XRD allowed to identify the compounds formed along each layer of the coatings. In the PEO+Hydrothermal samples hydroxyapatite was detected.

Keywords: AZ31; Hydroxyapatite; Orthopedic Implants; Plasma Electrolytic Oxidation (PEO); Hydrothermal Treatment; Dip-Coating; Polycaprolactone (PCL); Electrolytic Oxidation Spectroscopy (EIS)

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	IV
Lista de Tabelas	VII
Lista de Figuras	VIII
Lista de Abreviaturas e Símbolos	X
1. Introdução	1
1.1 Osso Humano	3
1.2 Corrosão do Magnésio	5
1.3 Liga AZ31.....	9
1.4 Corrosão da Liga AZ31	12
2. Estado da Arte	15
2.1 Implantes utilizados atualmente.....	15
2.2 Novas tendências para materiais de implante	16
2.3 Tipos de revestimentos aplicados e modificação da superfície.....	16
2.3.1 Oxidação Eletrolítica por Plasma (PEO)	17
2.3.2 Tratamento Hidrotérmico	22
2.4 Hidroxiapatite	24
2.5 Efeito da Porosidade	25
3. Técnicas de Caracterização	27
3.1 Espetroscopia de Impedância Eletroquímica	27
3.2 Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)	33
3.3 Ensaio Celulares.....	35
4. Materiais e Métodos	37
4.1 Preparação das Amostras	37
4.2 Oxidação Eletrolítica por Plasma	38
4.3 Tratamento Hidrotérmico	41
4.4 Imersão	41
4.5 Ensaio celulares.....	43
4.6 Espetroscopia de Impedância Eletroquímica	44
4.7 Difração de Raios X.....	45
4.8 Análise Metalográfica.....	45
4.9 Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)	46
5. Resultados e Discussão	47
5.1 Análise Estrutural e Morfológica.....	47
5.1.1 Microscópio Ótico.....	47

5.1.2 Difração de Raios X	47
5.1.3 Medição de Espessura	49
5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)	51
5.2 Ensaio de Viabilidade Celular	59
5.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	60
6. Conclusões	73
7. Referências Bibliográficas	75
Anexo.....	82

Lista de Tabelas

Tabela 1: Propriedades mecânicas dos tipos de ossos, do magnésio e da liga de magnésio AZ31. Adaptado de [8, 13, 17, 18, 19, 20, 21]	4
Tabela 2: Composição da liga AZ31. Adaptado de [2]	9
Tabela 3: Influência dos elementos de liga/impurezas nas propriedades das ligas de magnésio à temperatura ambiente, e a concentração limite dos elementos no corpo humano e no soro sanguíneo. Adaptado de [35].	10
Tabela 4: Comparação entre os tratamentos de anodização convencional e PEO. Adaptado de: [68, 69].....	21
Tabela 5: Solução utilizada para o ensaio de PEO	38
Tabela 6: Parâmetros utilizados para o tratamento de PEO	38
Tabela 7: Concentrações e condições utilizadas para o tratamento hidrotérmico das amostras. Adaptado de [2].	41
Tabela 8: Reagentes e concentração utilizadas para preparar a solução 2,5% PCL para imersão.....	42
Tabela 9: Tabela resumo das amostras produzidas	42
Tabela 10: Reagentes e concentrações utilizados na solução de SBF	44
Tabela 11: Comparação da concentração iônica do plasma humano com a solução de SBF e do pH [11]	44
Tabela 12: Espessuras dos revestimentos obtidos após tratamento de PEO e Tratamento Hidrotérmico	50
Tabela 13: Medições do diâmetro médio dos poros.....	52
Tabela 14: Percentagem atômica dos elementos identificados no SEM-EDS das diferentes amostras	53
Tabela 15: Espessuras das camadas do revestimento de PEO.....	57
Tabela 16: Espessura do revestimento obtido após PEO e Tratamento Hidrotérmico	58
Tabela 17: Dados obtidos para cada parâmetro com o circuito equivalente para a amostra simples	62
Tabela 18: Dados obtidos para cada parâmetro com o circuito equivalente para a amostra PEO	64
Tabela 19: Dados obtidos para cada parâmetro com o circuito equivalente para a amostra PEO+Hidrotérmico .	67
Tabela 20: Dados obtidos para cada parâmetro com o circuito equivalente para a amostra PEO+PCL	69
Tabela 21: Variação do valor médio de R_p com o tempo para os diferentes tipos de amostras	69

Lista de Figuras

Figura 1: Corte transversal de uma secção de um osso humano cortical. Adaptado de [13].....	4
Figura 2: Diagrama de Pourbaix (E-pH) para o magnésio. Adaptado de [22]	6
Figura 3: Diagrama de fases binário Al-Mg [34]	11
Figura 4: Revestimento depositado por Oxidação Eletrolítica por Plasma (PEO) [39]	18
Figura 5: Secção transversal de um revestimento aplicado por PEO [64]	18
Figura 6: Esquema típico de um ensaio de PEO [55].....	20
Figura 7: Funções sinusoidais da voltagem e corrente, ao longo do tempo. Adaptado de [69]	28
Figura 8: Diagrama de Nyquist	30
Figura 9: Diagramas de Bode. Adaptado de [70].....	30
Figura 10: Circuito constituído por um condensador e uma resistência e diagrama de Nyquist correspondente. Adaptado de [70].....	31
Figura 11: Representação de um sistema a três elétrodos.	32
Figura 12: Preparação das amostras	37
Figura 13: Equipamento utilizado para o tratamento de PEO	38
Figura 14: "Duty cycle" utilizado para o ensaio de PEO	39
Figura 15: "Duty cycle" de 20% utilizado para realizar o tratamento de PEO. Captura de ecrã do programa AC Source GUI durante a realização do ensaio.....	40
Figura 16: Medidor de espessura Elcometer®	40
Figura 17: Equipamento utilizado para realização do tratamento hidrotérmico.....	41
Figura 18: Equipamento utilizado para realização do tratamento de imersão).....	42
Figura 19: Placas de 6 poços com as amostras.....	43
Figura 20: Equipamento utilizado para realização dos testes de impedância eletroquímica	45
Figura 21: Microestrutura da amostra simples	47
Figura 22: Padrões de raios X obtidos para os 4 tipos de amostras utilizadas	48
Figura 23: Micrografia SEM: amostra 39 tratada com PEO	51
Figura 24: Micrografia SEM: amostra 6 tratada com PEO+Hidrotérmico.....	51
Figura 25: Micrografia SEM: amostra 12 tratada com PEO+PCL.....	51
Figura 26: Amostra 39 (PEO), pormenor de um poro	52
Figura 27: Detalhes das superfícies das amostras 39 (a) e 6 (b)).....	54
Figura 28: Corte transversal da amostra 39 (PEO).....	55
Figura 29: Análise SEM-EDS da secção transversal da amostra 39 (PEO)	56
Figura 30: Corte transversal da amostra 6 (PEO + Hidrotérmico)	57
Figura 31: Análise SEM-EDS da secção transversal da amostra 6 (PEO+Hidrotérmico)	58
Figura 32: Corte transversal da amostra 12 (PEO+PCL)	58
Figura 33: Análise SEM-EDS da secção transversal da amostra 12 (PEO+PCL)	59
Figura 34: Taxa de viabilidade das células em cada tipo de amostra.....	59
Figura 35: Diagramas de Nyquist e Bode para a impedância da amostra 28 (Simples).....	60

Figura 36: Circuito equivalente utilizado para descrever a impedância da amostra simples	61
Figura 37: Ajuste do modelo da figura 36 aos dados experimentais da amostra 28 (simples) para 48 horas	62
Figura 38: Diagramas de Nyquist e Bode para a impedância da amostra 14 (PEO)	63
Figura 39: Circuito equivalente utilizado para descrever a impedância da amostra PEO	64
Figura 40: Ajuste do modelo da figura 39 aos dados experimentais da amostra 14 (PEO) para 48 horas	64
Figura 41: Diagramas de Nyquist e Bode para a impedância da amostra 1 (PEO+Hidrotérmico)	65
Figura 42: Circuito equivalente utilizado para descrever a impedância da amostra PEO+Hidrotérmico	66
Figura 43: Ajuste do modelo da figura 42 aos dados experimentais da amostra 1 (PEO+Hidrotérmico) para 48 horas.....	66
Figura 44: Diagramas de Nyquist e Bode para a impedância da amostra 11 (PEO+PCL).....	67
Figura 45: Circuito equivalente utilizado para descrever a impedância da amostra PEO+PCL	68
Figura 46: Ajuste do modelo da figura 45 aos dados experimentais da amostra 10 (PEO+PCL) para 48 horas...	68
Figura 47: Variação do valor médio da resistência de polarização com o tempo de imersão na solução de SBF	70
Figura 48: Curvas de OCP para as amostras durante 1 hora imersas na solução SBF	71

Lista de Abreviaturas e Símbolos

HAp	Hidroxiapatite
PEO	Oxidação Eletrolítica por Plasma (<i>Plasma Electrolytic Oxidation</i>)
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i>
AC	Corrente Alternada
DC	Corrente Direta
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios X
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
XRD	Difração de raios X
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento
E_{corr}	Potencial de corrosão
R	Resistência
Z	Impedância
V	Potencial
I	Intensidade de Corrente Elétrica
C	Condensador
L	Indutor
CPE	Elemento de Fase Constante
OCP	Potencial de Circuito Aberto
R_p	Resistência de Polarização
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>

1. Introdução

Os materiais implantáveis têm sido utilizados regularmente nos últimos 50 anos com os objetivos de ajudar na cicatrização de fraturas, mantendo o osso no local pretendido, ou para substituição do osso quando este não existe. Para que o organismo não rejeite o implante, têm sido utilizados diversos materiais quimicamente inertes como o titânio, o cobalto, e várias ligas destes elementos, e o aço inoxidável, entre outros. Muitas das vezes, apesar de o organismo não rejeitar o implante, este tem de ser removido numa segunda cirurgia, quando a sua função de suporte deixa de ser necessária, ou quando a sua vida útil termina por desgaste, irritação dos tecidos...sendo necessário submeter o paciente a nova operação e aos riscos inerentes à mesma. Adicionalmente, as propriedades mecânicas destes materiais são, em geral, bastante distintas das propriedades apresentadas pelo osso humano. [1, 2]

Os materiais implantáveis utilizados são considerados biocompatíveis, podendo a biocompatibilidade ser descrita como “a capacidade que um biomaterial possui de desempenhar a sua função, relativamente a uma terapia, sem que efeitos indesejados ou sistêmicos sejam produzidos no paciente, mas gerando a resposta mais apropriada por parte de células ou tecidos para a situação específica, otimizando os aspetos mais relevantes da terapia.” [3]

Mais recentemente têm sido estudadas novas ligas metálicas como as ligas de magnésio, sendo utilizados como elementos de liga: cálcio, manganês, zinco...Estas ligas de magnésio são de elevado interesse científico por possuírem propriedades mecânicas idênticas às do osso humano, por serem bioabsorvíveis, isto é, a liga metálica é decomposta dentro do corpo pelos fluidos corporais, sendo os produtos da sua decomposição absorvidos, evitando a produção de resíduos e com o mínimo de efeitos tóxicos possíveis. Adicionalmente, as ligas de magnésio podem ainda possuir atividade anti tumoral (devido à libertação de hidrogénio durante a degradação que causa um efeito citopatogénico nas células tumorais). [1, 4, 5, 6]

Os produtos resultantes da decomposição dos materiais bioabsorvíveis podem ser excretados ou utilizados pelo corpo para desempenho de alguma função em específico, como é o caso do magnésio, visto ser um dos elementos necessários para o correto funcionamento do corpo humano, tendo funções de estabilização de membranas celulares, regulação do crescimento celular e sua reprodução, sendo um elemento necessário para mais de 300 enzimas e tendo funções importantes para o coração, músculos e ossos. O corpo de um adulto tem em média 22-26 g de magnésio, sendo que 60% está presente nos ossos. O nível de magnésio tem de ser constantemente repostado no organismo através de uma dieta equilibrada e do consumo de água, sendo a dose diária recomendada para um adulto o consumo de 4,5 mg/kg/dia (o valor varia com idade, género, características físicas). A concentração de magnésio no corpo é controlada pelos rins. [4, 5, 6]

Os implantes bioabsorvíveis têm de ser dimensionados de acordo com o período de utilização e a taxa de dissolução, garantindo assim que o implante cumpre a sua função durante o tempo requerido (12-18 semanas em caso de fraturas) e que é gradualmente substituído por tecido, ao mesmo tempo que é introduzida nos fluxos corporais uma quantidade de material não tóxica e que não comprometa qualquer função do organismo. [7, 8] A taxa de corrosão/dissolução do material deverá ser afinada de acordo com a dose diária recomendada do elemento em questão. Por exemplo, no caso do magnésio, a taxa de dissolução

não deverá ser muito superior a 4,5 mg/kg/dia (dose diária recomendada) visto que grande parte do magnésio é obtido através dos alimentos e do consumo de água. É de ter em conta que em alguns casos, e visto que os tecidos em crescimento utilizam alguns iões como Mg^{2+} ou Ca^{2+} para crescerem, a taxa de corrosão poderá ser superior à dose diária recomendada uma vez que a quantidade extra de iões será consumida localmente.

A utilização de elementos bioabsorvíveis impõe a necessidade de considerar diversos fatores dado que a taxa de dissolução destes elementos varia com a composição da liga utilizada, fatores metalúrgicos (reatividade, filmes superficiais, fases secundárias com impurezas, tamanho de grão), pH e que por sua vez pode variar com o local do corpo e com os fluidos corporais presentes. [9, 10]

Antes de serem implantados no corpo humano, os materiais são submetidos a várias fases de testes biológicos onde são estudados alguns parâmetros como: a osteointegração, a biocompatibilidade ou a taxa de corrosão. Os testes biológicos começam geralmente por ser realizados com culturas celulares (*in vitro*) em que é replicado, ainda que de forma simplista, o conteúdo dos fluidos humanos. No entanto, dado que as soluções utilizadas são simplistas e retratam apenas parte do conteúdo existente no sangue/linfa, não contendo muitas vezes proteínas, aminoácidos, gases dissolvidos, e vários tipos de iões, os resultados fornecem apenas uma primeira noção de como os materiais se comportam na presença de alguns componentes dos fluidos corporais. A utilização de testes *in vitro* é útil para evitar a testagem de implantes num número elevado de animais, diminuindo também os custos associados às cirurgias e o tempo necessário para a realização dos testes. Fases posteriores dos testes biológicos envolvem a análise do comportamento dos materiais *in vivo*, recorrendo-se a animais como pequenos roedores, cães e primatas não humanos. [11]

Quando são utilizados animais, a amostra considerada não é geralmente muito grande e como tal, os resultados estatísticos poderão apresentar uma distribuição que se aproxime, ou não, da realidade, não deixando muitas vezes espaço ao aparecimento de casos raros ou invulgares em que surgem infeções, rejeições ou outro tipo de anomalias. Cada indivíduo, animal ou humano, possui as suas próprias características fisiológicas e como tal, existirão diferentes casos clínicos decorrentes da cirurgia de implantação. Sendo difícil, se não mesmo impossível, prever todos os casos clínicos, deverão ser realizados os testes biológicos de forma a garantir que a taxa de aceitação é o mais elevada possível e que mesmo no caso da ocorrência de uma reação mais violenta da parte do organismo, não existe risco de rejeição, o que implicaria a remoção do implante.

O magnésio é descrito na literatura como sendo um elemento bioativo, será portanto importante definir o conceito de bioatividade para que não existam confusões com o termo “biocompatibilidade” definido anteriormente. O conceito de bioatividade pode ser descrito como: o modo como um determinado composto ou elemento interage com os tecidos vivos do corpo humano. Para alguns autores é necessário que o efeito resultante da bioatividade seja positivo para o corpo humano e não cause problemas como toxicidade, enquanto para outros autores o efeito resultante poderá ser tanto positivo como negativo, deixando margem a uma definição mais abrangente, que inclui muito mais substâncias e concentrações. Kokubo e Takadama [11] referiram no seu artigo que a bioatividade de um material, e a sua interação com os tecidos poderiam ser previstas através da utilização de uma solução de SBF (*Simulated Body Fluid*), em que as concentrações iónicas sejam idênticas às do plasma humano. A formação de apatite na superfície do material em solução

seria indicadora da bioatividade do mesmo e da aderência deste material aos tecidos ósseos numa situação *in vivo*. No entanto, Bohner e Lemaitre [12] referiram que a bioatividade nem sempre poderá ser prevista recorrendo apenas a uma solução de SBF e que esse método poderá levar a alguns resultados falsos positivos ou falsos negativos. Será importante então utilizar outros métodos complementares para avaliar a bioatividade de um material, avaliando esses dados conjuntamente com os dados resultantes da solução de SBF.

1.1 Osso Humano

O osso é constituído por tecidos, sendo um sistema dinâmico, em que os tecidos são continuamente produzidos e destruídos. Existem dois grupos de células especializadas para produzir e para destruir os tecidos ósseos: osteoblastos e osteoclastos, respetivamente. Os osteoblastos são responsáveis pela mineralização e síntese óssea enquanto os osteoclastos dissolvem e absorvem os tecidos ósseos. A atuação conjunta destes dois tipos de células permite que os tecidos ósseos sejam renovados, bem como o crescimento ósseo durante a infância, fase em que a produção de tecido é superior à dissolução. [13]

Outro tipo de células relevante para o crescimento e regeneração óssea são os fibroblastos, células do tecido conectivo que são responsáveis por estabelecer a ligação entre as várias camadas de tecidos. Estas células são responsáveis por produzir a matriz extracelular, algumas macromoléculas, segregar colagénio e alinhar as fibras de colagénio. As fibras de colagénio possuem funções de suporte e transmissão de esforços mecânicos, estando presentes em tendões, ligamentos, músculos e ossos, onde representam uma grande percentagem da matriz orgânica óssea. [14, 15, 16]

O compósito que constitui a matriz óssea pode ser dividido em parte orgânica (30% em peso), e parte mineral (70% em peso). A parte mineral da matriz óssea, após a maturação do osso, é principalmente constituída por hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), sendo ainda de destacar a presença de carbonato de cálcio e carbonato de apatite. [13]

Os ossos podem ser distinguidos em dois tipos: o osso cortical (ou compacto) e o osso trabecular (ou esponjoso). Enquanto o primeiro assume funções de suporte e resistência aos esforços mecânicos, o segundo confere flexibilidade e funções de suporte em zonas onde a resistência aos esforços mecânicos não é tão relevante, como nas costelas ou no crânio. Como o nome indica, o osso trabecular (ou esponjoso) é formado por uma estrutura porosa tridimensional, enquanto o osso cortical tem uma estrutura do tipo favo de mel constituída por tecido esponjoso no interior e uma camada mais densa no exterior. Para além desta diferença estrutural, os ossos corticais diferem também dos trabeculares na existência de “osteons”, estruturas formadas por camadas concêntricas de osso interpenetradas por canais vasculares. [13]

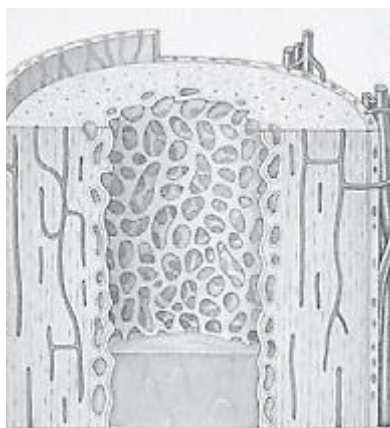


Figura 1: Corte transversal de uma secção de um osso humano cortical. Adaptado de [13]

As fraturas ósseas impõem a necessidade de reparação do osso humano, quando não é possível que a reparação ocorra de forma natural torna-se necessária a inserção de um implante ósseo, que será necessariamente biocompatível, mas que poderá também ter a capacidade de ser bioabsorvível. De entre os materiais bioabsorvíveis, como foi já referido anteriormente, encontram-se o magnésio e algumas das suas ligas, de que pode ser exemplo a liga AZ31 utilizada neste trabalho. A escolha destes materiais não passa exclusivamente pela capacidade de bioabsorção, sendo de extrema importância a consideração das propriedades mecânicas. A tabela 1 permite comparar as propriedades mecânicas do osso humano com as propriedades mecânicas do aço inoxidável 316L, das ligas Ti-6Al-4V e AZ31, e do magnésio. A análise da mesma tabela permite perceber que o magnésio e a liga AZ31 possuem propriedades mecânicas que se aproximam muito mais das propriedades do osso humano comparativamente com a liga Ti-6Al-4V e com o aço inoxidável 316L. Os dois últimos apresentam para todas as propriedades listadas na tabela 1, valores que excedem largamente os ideais. A liga AZ31 por sua vez possui uma densidade muito próxima da do osso humano, tendo um módulo de Young superior, bem como tensão máxima de tração e tenacidade à fratura superiores. Ainda que os valores da liga AZ31 sejam superiores para a maioria das propriedades mecânicas do osso, existe uma grande aproximação dos valores requeridos.

Tabela 1: Propriedades mecânicas dos tipos de ossos, do magnésio e da liga de magnésio AZ31. Adaptado de [8, 13, 17, 18, 19, 20, 21]

Osso/Tecidos	Densidade (g/cm ³)	Módulo de Young (GPa)	Tensão Máxima de Tração (MPa)	Tensão Máxima de Compressão (MPa)	Tenacidade à Fratura (MPa.m ^{1/2})
Osso cortical	1,914	7-30	50-150	130-180	2-12
Osso trabecular	1,874	0,01-3	-	2-12	-
Ti-6Al-4V	4,4-4,5	110-117	830-1025	896-1172	55-115
Aço Inoxidável 316L	7,9-8,1	189-205	450-650	480-620	50-200
Magnésio	1,74-2,0	41-45	90-190	65-100	15-40
AZ31	1,78	45	250-290	-	22-28

O valor do módulo de Young torna-se particularmente importante quando é considerado o fenómeno de “stress shielding”: caso o módulo de Young do material do implante seja superior ao do osso (ou seja, se o implante apresentar maior rigidez), este irá suportar os esforços a que o osso estaria sujeito, levando a uma

diferente distribuição das tensões a que o osso está sujeito. Como resultado desta redistribuição de esforços, o osso em que o implante foi inserido adapta-se às novas necessidades e diminui de espessura, perdendo também massa óssea, principalmente junto à medula, ficando mais suscetível a fraturas. Por outro lado, se os esforços a que o osso está sujeito forem superiores ou iguais àqueles a que estava submetido antes da operação, o osso não perderá espessura nem massa óssea. Este fenómeno foi largamente estudado nas décadas de 80 e 90 do século passado, particularmente em implantes que fazem a ligação entre o fémur e a anca. Diversos estudos realizados em canídeos e humanos concluíram que a solução passaria por utilizar uma haste de um material com baixa rigidez, uma vez que os resultados obtidos com os materiais que cumpriam este requisito levaram a uma menor perda de massa óssea. A rigidez (caraterística de uma determinada peça ou estrutura) é diretamente proporcional ao módulo de Young. A substituição de um osso, ou parte dele, por um implante de igual módulo de Young e igual rácio área de secção transversal/comprimento do implante, garante que o osso adjacente continua a suportar os mesmos esforços mecânicos, sendo evitada a redução de massa óssea, bem como a redução de espessura. Por esta razão, o material que constitui o implante deverá possuir um módulo de Young o mais próximo possível do valor do osso onde será instalado, idealmente igual ou inferior a esse valor. [22, 23, 24, 20]

De notar ainda que os valores das propriedades mecânicas dos ossos humanos variam muito, uma vez que cada osso possui um valor de densidade distinto, tendo diferentes percentagens de osso trabecular e cortical na sua constituição, e como tal, diferentes valores de módulo de Young, tensão de cedência, tensão máxima e tenacidade à fratura.

Será importante definir dois termos que serão referenciados ao longo deste trabalho e que estão relacionados com os tecidos ósseos, são eles: osteocondutividade e osteointegração. A osteocondutividade é uma propriedade da superfície que permite o crescimento orientado de tecido ósseo quer na superfície do implante, quer na porosidade existente. A osteointegração é a ligação funcional e estrutural entre os tecidos ósseos vivos e o implante, com crescimento de tecido ósseo em redor do implante, e sem a formação de tecido fibroso. [25]

1.2 Corrosão do Magnésio

O magnésio e as suas ligas são caracterizados por possuírem um conjunto de propriedades mecânicas muito interessante, tais como: densidade e módulo de Young reduzidos comparativamente a outros metais, possibilidade de ser produzido por fundição, excelente soldabilidade, bio compatibilidade e bio absorção, sendo por estes motivos ligas promissoras em indústrias onde um baixo peso e boa performance mecânica são necessárias, como nas indústrias aeroespacial, automóvel e biomédica. Os maiores problemas, que têm impedido a utilização massiva destes materiais, prendem-se com a baixa resistência à corrosão e com a sua elevada reatividade que conduzem a alguns problemas de segurança.

De acordo com *Pourbaix* [26], e analisando a figura 2, é perceptível que o magnésio apresenta uma grande afinidade para reagir com a água, reduzindo-a ao mesmo tempo que o magnésio se oxida, formando iões Mg^{2+} e possivelmente Mg^+ . A mesma figura permite perceber que o magnésio sofre corrosão para pH's

ácidos, neutro e ligeiramente alcalinos, sendo que a velocidade de corrosão diminui à medida que o pH aumenta.

As reações de dissolução anódica para o magnésio em meio ácido (1) e básico (2) são, respectivamente [27]:

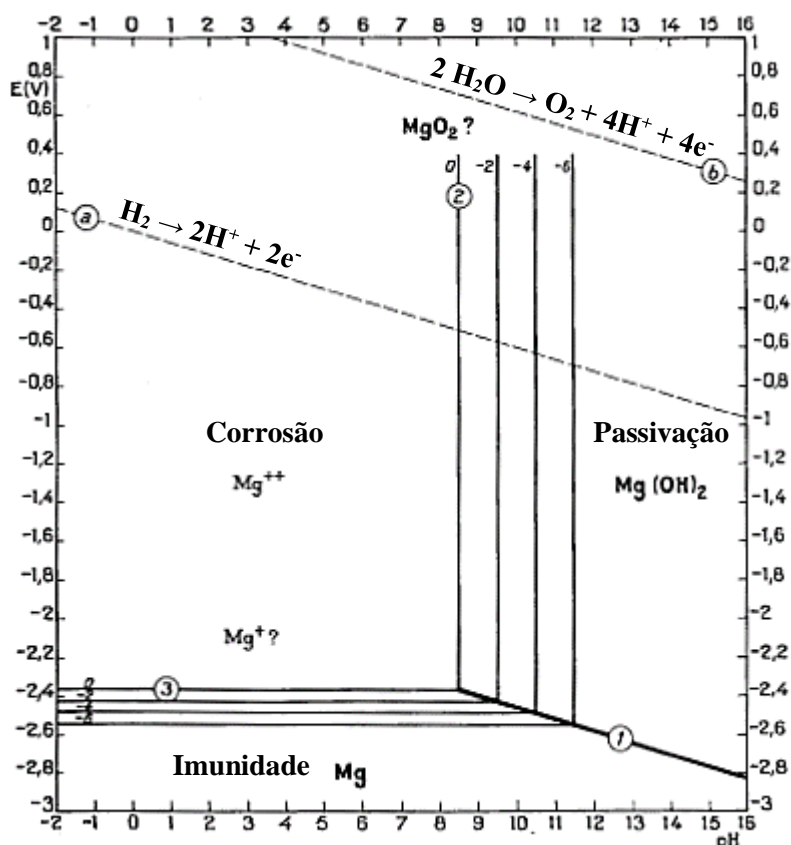
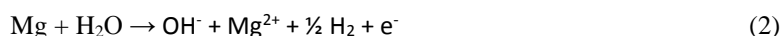
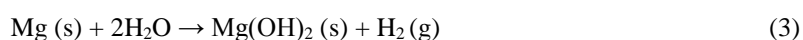


Figura 2: Diagrama de Pourbaix (E-pH) para o magnésio. Adaptado de [22]

Na presença de uma solução de caráter alcalino (pH≈8,5 ou superior), o magnésio fica passivado através da formação de uma camada de Mg(OH)₂ que protege a superfície da corrosão. A passivação do magnésio irá ocorrer para pH≈8,5 se existir em solução uma concentração de Mg²⁺ igual a 10⁰ mol/L, e irá ocorrer para pH≈11,5 se existir em solução uma concentração vestigial (10⁻⁶ mol/L) de Mg²⁺. Em suma, o magnésio irá passivar para pH menos alcalinos quanto maior for a quantidade de Mg²⁺ presente em solução. No entanto, a formação desta camada passivante depende da solução e das impurezas presentes no metal. [26] Considerando um pH = 7,5, dependendo do potencial que se estabeleça, o magnésio poderá estar na zona de corrosão ou de imunidade, ao passo que para um pH de 13 o magnésio poderá ter um comportamento de imunidade ou de passivação. Portanto, não se pode ter apenas em conta o pH da solução, sendo de extrema importância considerar também o potencial que se estabelece, de forma a conseguir prever o comportamento do metal.

Janning *et al* [28] referiram que a corrosão de ligas de magnésio na zona da fratura óssea provoca um aumento da atividade dos osteoblastos (células formadoras de tecido ósseo) e uma diminuição da atividade dos osteoclastos (células destruidoras de tecido ósseo), afirmando assim que os produtos da corrosão de ligas de magnésio são vantajosos para a formação de tecido ósseo. O composto identificado pelos autores como sendo o principal promotor do crescimento ósseo foi o $Mg(OH)_2$.

O magnésio, apesar de possuir densidade e módulo de Young idênticos aos do osso humano, é rapidamente dissolvido pelos fluidos corporais por ser naturalmente reativo, não podendo portanto ser utilizado, na produção de implantes, no seu estado puro. [7, 29, 8] Neste caso, a reação do magnésio com a água presente nos fluidos corporais é descrita da seguinte forma:



Da equação 3 resulta hidróxido de magnésio que se dissolve lentamente, no entanto, a reação deste composto com iões Cl^- dá origem a $MgCl_2$ que se dissolve a um ritmo mais acelerado (equação 4). [7, 8]



Associada à rápida corrosão do magnésio nos fluidos corporais está a formação de bolhas de hidrogénio (equação 3), que originam a formação de cavidades nos tecidos envolventes, dificultando a regeneração dos mesmos. O aumento da quantidade de hidrogénio gasoso induz um aumento de pressão que por sua vez origina a formação de protuberâncias subcutâneas observáveis na região submetida a cirurgia. Adicionalmente, a rápida degradação do magnésio leva a uma resposta inflamatória dos tecidos envolventes que pode provocar dor no paciente, podendo mesmo levar à necrose dos tecidos. A taxa de corrosão/dissolução do magnésio nos fluidos corporais tem de ser controlada de forma a garantir que o implante cumpre a sua função até que os tecidos ósseos produzidos estejam aptos a substituí-lo. [1, 30, 31, 32, 33]

A equação 4 apresenta outro potencial problema, uma vez que a produção de grupos OH^- induz um aumento do pH em torno do local onde foi inserido o implante, potenciando uma alteração importante ao meio fisiológico e às reações que nele têm lugar. No entanto, deve ser considerado que o meio fisiológico tem ação tampão e como tal tem tendência a impedir variações de pH. Ainda assim, será importante reduzir a taxa de corrosão do magnésio de forma que seja possível cumprir com a dose diária recomendada de magnésio no organismo, bem como com a baixa produção de hidrogénio gasoso e a manutenção local do pH. [33]

A elevada reatividade do magnésio está associada ao potencial de redução deste elemento que apresenta um dos valores mais reduzidos de entre os materiais utilizados em engenharia. Quando colocado em contacto com outro metal, o magnésio comporta-se como ânodo (potencial mais negativo) e como tal irá corroer-se, ao passo que o outro metal atuará como cátodo. A corrosão galvânica poderá acontecer caso existam precipitados, fases secundárias ou ainda se algum metal for colocado em contacto com o magnésio. [34]

A formação de pares galvânicos nas ligas de magnésio ocorre facilmente, através da quebra da camada de óxidos e na presença de íons agressivos, como os cloretos. A corrosão por picadas ocorre ao potencial livre de corrosão (E_{corr}) quando o metal é exposto a íons cloreto, num meio não oxidante. Na corrosão por picadas a área da picada atua como ânodo, enquanto toda a restante área do implante atua como cátodo, existindo uma grande diferença de áreas, fazendo com que o fenómeno de corrosão seja ainda mais severo dentro da picada. No caso do magnésio, apesar de ser um dos tipos de corrosão mais típicos quando exposto a meios fisiológicos, não é um fenómeno muito intenso uma vez que a área em torno da picada fica alcalinizada, contrariamente ao que costuma acontecer com outros metais para este tipo de corrosão. [34] Ainda assim, as picadas apresentam-se como locais concentradores de tensões que podem levar ao comprometimento da estrutura do implante através da redução das propriedades mecânicas do mesmo.

Corrosão sob tensão é um tipo de corrosão que pode ocorrer quando há tensões aplicadas num material (incluindo tensões residuais) e um meio corrosivo, podendo ainda estar relacionado com a fragilização pelo hidrogénio. A taxa de corrosão é duas a três vezes maiores quando o meio corrosivo e as tensões aplicadas se combinam, a presença de alguns elementos de liga como o alumínio e o zinco podem levar a uma maior suscetibilidade da ocorrência deste fenómeno. É um tipo de corrosão localizado visto que a maior parte do material não é afetado, no entanto leva normalmente à fratura. A nucleação da fenda está regularmente associada a pontos concentradores de tensões como picadas ou sulcos presentes no material. Este tipo de corrosão apresenta algum perigo uma vez que não é de fácil deteção, não leva à perda de massa da peça/estrutura e pode ocorrer para tensões consideradas seguras. Apesar de normalmente acontecer de forma transgranular, a presença de fases secundárias depositadas nos limites de grão pode levar a que aconteça de forma intergranular. Deve ainda ter-se em conta que este fenómeno ocorre mais facilmente em peças que foram forjadas comparativamente com peças que foram fundidas. [34, 21]

A corrosão com fricção ocorre quando duas superfícies estão em contacto e sujeitas a movimentos de pequena amplitude, podendo gerar desgaste e fadiga nas amostras. O desgaste das superfícies liberta detritos que aceleram ainda mais o desgaste, levando a uma perda das tolerâncias e das propriedades mecânicas e pode levar inclusive à fratura do implante, o que implica a realização de uma nova cirurgia. No caso do magnésio, apesar do consumo acelerado do implante e das complicações ao nível estrutural que possam advir, a libertação de pequenos detritos resultantes do desgaste não é muito problemática dado que os mesmos podem ser consumidos localmente ou ser dissolvidos e excretados. [34]

A corrosão sob fadiga acontece quando são aplicadas tensões cíclicas a um material que está exposto a um meio corrosivo, podendo levar à fratura prematura do material. Este tipo de corrosão é de extrema importância quando a peça a considerar é um implante uma vez que vai estar sujeito a muitos milhares de ciclos e exposto aos fluidos corporais que atuam como meio corrosivo. Dependendo do local de aplicação do implante, o número de ciclos a que estará sujeito poderá variar. [34]

De modo a diminuir a taxa de corrosão do magnésio, possibilitando o aumento de vida útil do implante, podem ser utilizadas ligas de magnésio, ou revestimentos, uma vez que os filmes formados à superfície, resultantes da corrosão do magnésio em meio aquoso, não fornecem praticamente nenhuma proteção. [9, 35] Adicionalmente, a utilização de revestimentos como a hidroxiapatite é útil para diminuir a produção de hidrogénio, aumentar a biocompatibilidade e a bioactividade. [1, 8]

1.3 Liga AZ31

Uma das ligas de magnésio que tem sido estudada para solucionar problemas de suscetibilidade à corrosão inerentes ao magnésio, e que permite também uma melhoria das propriedades mecânicas do magnésio é a liga AZ31, utilizada neste trabalho, e que tem a composição listada na tabela 2. Na nomenclatura da liga, as letras “AZ” significam que os dois elementos de liga em maior quantidade são o alumínio (Al) e o zinco (Zn), seguidos das respectivas percentagens em peso, arredondadas à unidade.

Tabela 2: Composição da liga AZ31. Adaptado de [2]

Elemento	Al	Zn	Si	Cu	Fe	Ni	Mn	Outros
Conteúdo (%peso)	2,5-3,5	0,5-1,5	0,1	0,1	0,03	0,005	0,05-0,4	0,1

Enquanto alguns elementos como o alumínio e o zinco foram incluídos propositadamente na composição da liga, outros elementos como o níquel podem estar presentes na forma de impurezas, geralmente em quantidades muito menores. No entanto, a presença de cada elemento tem de ser considerada visto que o implante será absorvido pelo corpo humano e cada um dos elementos estará em contacto com o organismo, podendo ser absorvidos ou ficar acumulados. Como tal, é imperativo conhecer o efeito de cada elemento nas propriedades da liga bem como a sua concentração limite no corpo humano.

Elementos como cálcio ou zinco são úteis para diminuir a taxa de corrosão do implante no ambiente intra corporal, ao mesmo tempo que não apresentam toxicidade para os humanos.

A adição de elementos metálicos como o alumínio e a prata (não presente na composição da liga AZ31) é realizada com o intuito de obter melhores propriedades mecânicas e maior resistência à corrosão. No entanto, a inclusão de alumínio na composição das ligas de magnésio tem levantado muitos problemas visto que a acumulação deste elemento no organismo, principalmente no cérebro, está associada a doenças como a demência e o Alzheimer [1, 36]. Contudo, o alumínio é um elemento que está presente no organismo, e como tal a utilização das ligas que contêm este elemento poderá ainda ser considerada desde que os níveis de libertação de alumínio no organismo sejam precisamente controlados e garantindo que este elemento não se acumula no sistema.

A introdução de manganês é realizada com o propósito de aumentar a resistência à corrosão, ainda que de forma indireta, uma vez que este elemento atenua os efeitos das impurezas presentes na liga (particularmente o ferro), mesmo quando estas impurezas ultrapassam o valor de tolerância exigido para a composição da liga metálica. Este elemento foi também reportado como sendo tóxico e suscetível de causar doenças do foro neurológico. [36, 21].

A adição de zinco é benéfica para uma rápida regeneração dos tecidos ósseos e um aumento da tolerância das ligas Mg-Al à presença de impurezas como: Cu, Fe e Ni. A adição de cálcio ou prata tem um efeito idêntico à adição de zinco, sendo que estes elementos contribuem ainda para a inibição de infeções bacterianas. [1, 37, 38]

A presença de ferro (Fe) ou cobre (Cu) podem levar à formação de precipitados (Mg_2Cu ; $FeAl_3$) que, por possuírem um potencial de corrosão muito distinto da matriz da liga, podem atuar como pares galvânicos.

A presença de silício (Si) leva à formação de precipitados Mg_2Si que reforçam a liga de magnésio, não tendo impacto ao nível da corrosão por possuírem um potencial de corrosão idêntico ao do magnésio. [38]

Os efeitos produzidos pelos elementos de liga têm de ser considerados e devidamente conhecidos, devendo a inclusão dos mesmos resultar de um balanço entre as propriedades mecânicas, os efeitos de biocompatibilidade, os efeitos corrosivos e de toxicidade introduzidos na liga metálica. [1]

Apesar de não estar presente nesta liga, é de destacar o efeito do cálcio nas ligas de magnésio, sendo um dos principais elementos adicionados para produção de ligas bioabsorvíveis uma vez que é um elemento fundamental ao funcionamento do corpo humano, em diversos sistemas do mesmo, fazendo parte da composição química do osso humano e estando associado a propriedades anti carcinogénicas. O cálcio tem sido também bastante utilizado na preparação de soluções para realização de tratamentos de PEO (*Plasma Electrolytic Oxidation*) e tratamentos hidrotérmicos com vista à formação de hidroxiapatite, como será explicado mais à frente neste trabalho. [1]

Do ponto de vista mecânico os elementos presentes em maior quantidade apresentam todos aspetos positivos, o elemento que apresenta mais aspetos negativos é o cobre, visto apresentar citotoxicidade e ter uma influência negativa nas tensões máximas à tração e compressão, refinamento de grão e resistência à corrosão. No aspeto da resistência à corrosão, para além do cobre, também os elementos: Si, Fe e Ni têm um impacto negativo. Estes dados estão listados na tabela 3.

Tabela 3: Influência dos elementos de liga/impurezas nas propriedades das ligas de magnésio à temperatura ambiente, e a concentração limite dos elementos no corpo humano e no soro sanguíneo. Código utilizado: ++ = excelente; + = bom; - = mau; -- = prejudicial. Adaptado de [35].

Efeito do elemento de liga/impureza na:	Elementos de liga						
	Al	Zn	Si	Cu	Fe	Ni	Mn
Tensão máxima à tração	+	+		-			+
Tensão máxima de compressão			+	-			
Ductilidade	+			+	+		+
Dureza	+		+				
Resistência à fadiga			+				+
Resistência à corrosão			-	--	--	--	+*
Refinamento de grão	+			-			+
Quantidade no Corpo Humano (mg)	300	2000	18	200	4000-5000	10	12
Concentração Limite no Soro Sanguíneo	2,1-4,8 µg/L	0,8-1,1 mg/L	-	0,9-1,6 mg/L	5-17,6 g/L	0,1 mg/L	0,8 µg/L

*Apenas em combinação com Al

De acordo com a tabela 3, o alumínio (Al) e o manganês (Mn) têm um efeito positivo no refinamento do tamanho de grão, sendo este facto particularmente útil visto que a redução do tamanho de grão está associada a um processo de corrosão mais uniforme da liga. A redução do tamanho de grão não está apenas associada à presença de elementos de liga mas também ao método pelo qual é produzido o implante e pelas tensões térmicas e mecânicas introduzidas por cada um desses processos. Como tal, devem ser favorecidos processos de fabrico que estejam associados a um arrefecimento rápido e que não permitam um crescimento de grão acentuado. [1, 39]

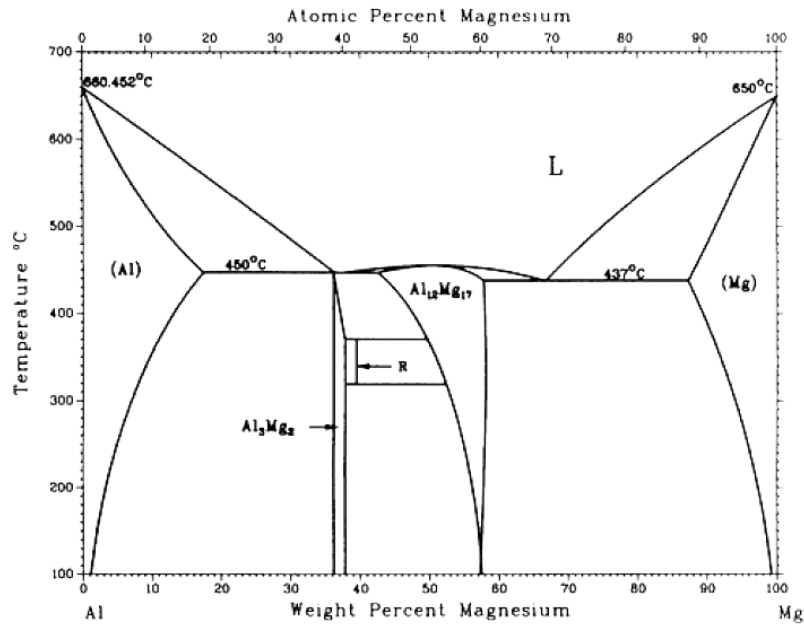


Figura 3: Diagrama de fases binário Al-Mg [34]

A análise do diagrama de fases Al-Mg (elementos em maior quantidade) permite perceber que, à temperatura ambiente, uma composição que contenha 97% (em peso) de Mg e 3% (em peso) de Al é constituída por duas fases: fase- α (Mg) na qual o alumínio se encontra em solução sólida, e fase- β ($\text{Al}_{12}\text{Mg}_{17}$) que se deposita nos limites de grão da fase- α . Traçando uma linha vertical para esta composição e que representa o arrefecimento a partir do líquido: para uma temperatura inferior a 650°C ocorre a nucleação e crescimento da fase- α (Mg), a partir do líquido; seguidamente todo o líquido é consumido e forma-se uma só fase sólida ($\approx 600^\circ\text{C}$), constituída por grãos de fase- α ; finalmente, o arrefecimento leva à formação de grãos de fase- β ($\text{Al}_{12}\text{Mg}_{17}$) nos limites de grão da fase- α . [40, 41, 42]

Sendo o magnésio e o alumínio os principais elementos desta liga, a análise deste diagrama devia resultar numa boa aproximação daquilo que seria a microestrutura da liga AZ31. No entanto, diversos autores [43, 44, 45, 46] reportaram difractogramas de raios X e análises metalográficas para a liga AZ31 onde não foi possível identificar a fase- β ($\text{Al}_{12}\text{Mg}_{17}$), sendo esse facto justificado pela quantidade reduzida desta fase na liga. De notar ainda que a adição dos restantes elementos de liga, em especial do Zn (1% em peso), modificam as zonas de estabilidade das fases metálicas no diagrama Al-Mg (figura 3). A identificação da fase- β foi realizada pelos mesmos autores para ligas com maior teor de alumínio, como a liga AZ91 (9% Al). Então, estes autores descreveram a microestrutura da liga AZ31 como sendo constituída exclusivamente por fase- α (Mg), encontrando-se os elementos de liga dissolvidos nesta fase, ou distribuídos ao longo dos limites de grão na forma de precipitados. [47]

A adição de zinco e a produção da liga por técnicas com arrefecimento rápido justificam a presença de uma só fase de magnésio.

A utilização de ligas como Mg-Al, AZ91 e AZ31 para estudos de aplicações de implantes prende-se sobretudo com o facto de serem ligas disponíveis no mercado e com propriedades mecânicas muito próximas das requeridas (propriedades mecânicas do osso humano).

1.4 Corrosão da Liga AZ31

No caso da indústria biomédica, como já foi visto anteriormente (tabela 1), as propriedades mecânicas da liga de magnésio AZ31 são muito próximas das propriedades mecânicas do osso cortical humano. Esta liga apresenta-se então como forte candidata à utilização em implantes, sendo ainda bioabsorvível. No entanto, os problemas corrosivos associados ao magnésio permanecem e se nenhum revestimento for aplicado à liga esta irá corroer-se rapidamente. [48, 49, 50]

No caso a considerar neste trabalho a superfície da liga metálica irá estar exposta a uma solução de SBF que contém diversos iões em solução, que diferem dos iões presentes na composição da água, e que consequentemente, alteram as zonas de imunidade, corrosão e passivação do magnésio apresentados na figura 2. Deve ter-se em conta que o diagrama de Pourbaix (figura 2) não pode ser utilizado para ligas metálicas, apenas para metais puros.

A liga de magnésio AZ31, por possuir uma baixa percentagem de alumínio, apresenta maior suscetibilidade à corrosão quando comparada com ligas com maior quantidade deste elemento, como é o caso da liga AZ91. Como referido anteriormente, esta liga contém uma única fase (fase- α) e possivelmente precipitados intermetálicos formados pelos restantes elementos de liga presentes na composição, que se encontram depositados nos limites de grão. Os precipitados, por conterem elementos mais nobres que o magnésio, apresentam um potencial de corrosão superior, atuando como cátodo, e fazendo com que a fase rica em magnésio atue como ânodo, corroendo-se. Desenvolve-se assim, devido a fatores metalúrgicos, a formação de pares galvânicos, na própria liga metálica. [40, 51]

Para tentar reduzir a taxa de corrosão a que a liga AZ31 está sujeita, podem ser utilizadas duas estratégias:

- A redução do tamanho de grão à superfície de uma peça de AZ31, em particular através de laminagem a quente ou de um processo de deformação por contacto, denominado de “*burnishing*”, resultando numa maior quantidade de defeitos cristalográficos e menor quantidade de precipitados intermetálicos [40]. O aumento da quantidade de defeitos cristalográficos leva à diminuição da quantidade de precipitados intermetálicos na matriz, devido à sua grande solubilidade nos defeitos. Por seu lado, a menor concentração de precipitados leva a uma diminuição da taxa de corrosão, uma vez que estes atuam como cátodo face à matriz da liga, e que este efeito é muito mais intenso que a corrosão provocada pelo aumento dos limites de grão. Song [40] refere também que uma diminuição continuada do tamanho de grão não tem efeitos positivos uma vez que são apenas inseridos mais defeitos no material e não há uma contínua dissolução dos precipitados, resultando apenas na criação de uma quantidade maior de defeitos (zonas ativas) que potenciam a corrosão da liga. O mesmo autor refere que a técnica de “*burnishing*” permite, para além da redução do tamanho de grão, uma alteração da orientação cristalográfica superficial, ficando os planos basais, mais resistentes à corrosão, expostos, e que irão, consequentemente, aumentar a resistência à corrosão do material.

- Aplicação de revestimentos cerâmicos de que é exemplo a hidroxiapatite, um revestimento poroso constituído por cálcio, fósforo, oxigénio e hidrogénio e de fórmula química: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, semelhante à composição química e estrutural do osso. A utilização deste revestimento deve-se também ao facto de ser biocompatível e bioativo. Este revestimento é normalmente obtido recorrendo às técnicas de PEO e Tratamento Hidrotérmico. É geralmente realizada à temperatura ambiente, fator bastante importante quando o tema são ligas para aplicações biomédicas uma vez que o comportamento da liga à corrosão depende da microestrutura e desta forma garante-se que a microestrutura inicialmente obtida não é alterada, não existindo alterações ao tamanho de grão e, portanto, não alterando a suscetibilidade da liga à corrosão. [27, 42]

Um estudo realizado *in vivo*, em ovelhas, permitiu acompanhar o processo de corrosão a que parafusos da liga AZ31 estão sujeitos quando expostos a fluidos corporais. Neste estudo foi identificada a formação de um tecido fibroso de colagénio em redor do local no qual foi colocado o parafuso, sendo notória a presença deste tecido tanto aos 3 como aos 6 meses após o início do estudo, registando-se um aumento da espessura deste tecido. Fazendo uma ponte com aquilo que foi referido na secção 1.1 “Osso Humano” desta dissertação, a presença de tecido fibroso de colagénio é indicador da presença e atividade de fibroblastos, que irão possibilitar a ligação entre as várias camadas de tecidos no local em que foi realizada a cirurgia. Ao mesmo tempo, o encapsulamento do implante por tecido fibroso é característico de materiais inativos biologicamente, sendo os implantes classificados como praticamente inertes. [52]

No estudo realizado *in vivo* referido no parágrafo anterior são ainda apontados dois factos quanto ao alumínio presente na liga que são de particular importância: o primeiro facto refere-se à aparente insolubilidade do alumínio, resultante da corrosão da liga, no local envolvente ao parafuso; o segundo facto, na sequência do primeiro, reporta que não foram encontrados vestígios de alumínio nos tecidos ósseos, bem como nos tecidos fibrosos circundantes, demonstrando que este elemento não se acumulou nos tecidos em torno do implante e que terá sido removido através do sistema circulatório, muito provavelmente através da ação de macrófagos. [53]

2. Estado da Arte

2.1 Implantes utilizados atualmente

Inicialmente, a procura por materiais implantáveis requeria que os mesmos não causassem qualquer reação por parte do organismo, sendo inertes. Como tal, foram durante alguns anos utilizados metais e ligas metálicas (titânio, platina, ligas de cobalto, aço inoxidável), cerâmicos (alumina, zircónia) e até polímeros biocompatíveis e bio estáveis (PEEK, Polietileno, PTFE, Polipropileno), com elevada resistência à corrosão e propriedades mecânicas que conseguissem suportar os esforços a que os ossos estariam sujeitos. [54]

A utilização de aço inoxidável como implante potencia a existência de vários problemas. O níquel é adicionado na composição do aço inoxidável para estabilizar o domínio austenítico e conferir maior resistência à corrosão, no entanto apresenta toxicidade para o corpo humano. A corrosão do implante e consequente libertação de iões de níquel torna possível que este elemento entre no sistema circulatório e percorra o organismo, podendo ficar acumulado tanto em órgãos e tecidos perto como longe do local da implantação. Outro problema associado a este elemento é o desenvolvimento de sensibilidade por parte dos pacientes implantados. Neste caso, a exposição continuada ao níquel libertado durante a corrosão do implante deixa os pacientes mais propensos a desenvolver uma reação alérgica quando expostos a objetos que contêm este elemento, como é o caso de algumas jóias, causando dermatites de contacto. Este problema pode no entanto ser solucionado ao produzir aços ligados com azoto, em vez de níquel. [55, 56, 57]

Outro elemento presente na composição dos aços inoxidáveis é o crómio, cuja forma hexavalente é muito perigosa por ser extremamente oxidante e poder circular pelo sistema circulatório, causando danos irreparáveis nos rins e no fígado. Os pacientes implantados desenvolvem sensibilidade a este elemento, à semelhança do que acontece com o níquel, tendo reações alérgicas a produtos que contenham este elemento, como é o caso de muitos produtos de limpeza. [56]

Os problemas associados ao níquel e ao crómio, juntamente com problemas de resistência à corrosão e resistência à fadiga (principalmente para o aço inoxidável 316L), e com o desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas, fizeram com que os aços inoxidáveis perdessem mercado, no entanto, as propriedades mecânicas e o preço reduzido, comparativamente com outros materiais utilizados na produção de implantes como o titânio, suportam até hoje a utilização destas ligas. [55]

Apesar de metais e ligas, cerâmicos e polímeros continuarem a ser utilizados, sozinhos ou de forma combinada (compósitos ou sistemas de dois ou mais componentes de materiais diferentes), os esforços da ciência viraram-se para a tentativa de encontrar materiais bioabsorvíveis e bioativos (materiais que promovem uma resposta biológica na interface do material e a formação de uma ligação entre os tecidos e o material implantado [52]), de forma que a sua utilização seja apenas temporária, com o crescimento ósseo a suplantar a degradação gradual dos materiais bioabsorvíveis. Assistimos então a uma mudança de paradigma, em que os materiais utilizados para implantes deixam de ser inertes para serem bioativos e parte integrante do organismo, sendo os produtos resultantes da corrosão utilizados como fornecimento de iões necessários ao crescimento de tecidos, ou excretados pelo organismo.

2.2 Novas tendências para materiais de implante

A procura por materiais bioabsorvíveis e bioativos levou a que a comunidade científica se voltasse para materiais que fazem parte do nosso organismo, em especial elementos que estivessem presentes na composição óssea, tais como: cálcio, magnésio, fósforo, sódio, que para além de serem naturalmente aceites pelo organismo podem circular pelos fluidos fisiológicos e serem excretados sem efeitos tóxicos ou nocivos para a saúde, desde que a sua concentração seja controlada e conservada dentro de valores aceitáveis para o organismo. Adicionalmente, estes elementos são muito tentadores do ponto de vista económico uma vez que são abundantes e estão associados a um baixo custo por quilograma. A possibilidade da obtenção de revestimentos porosos a partir do material base, que possui propriedades mecânicas mais próximas daquelas que são características do osso fazem com que estes materiais sejam aparentemente a escolha acertada.

A maior dificuldade na utilização de materiais bioabsorvíveis reside no facto de estes se corroerem nos fluidos do organismo a um ritmo elevado, levando a que o implante se corroa de forma mais rápida do que os tecidos crescem, fazendo com que o implante deixe de cumprir a sua função antes que o osso esteja completamente desenvolvido e consiga suportar esforços mecânicos, e provocando uma libertação não controlada de hidrogénio gasoso. De forma a diminuir a taxa de corrosão a que o implante está sujeito, podem ser produzidas ligas com elementos como: alumínio, lítio, terras raras e cálcio, ou podem ser aplicados revestimentos ao material base do implante. [42]

Os revestimentos utilizados podem ser cerâmicos, poliméricos ou um compósito destes materiais. Os revestimentos são classificados de acordo com a sua interação com o corpo humano podendo ser bio inertes, bioativos ou bioabsorvíveis. Apesar de os revestimentos cerâmicos bio inertes estarem associados a melhores propriedades mecânicas, atualmente, os cerâmicos bioativos são os mais utilizados para implantes, sendo os cerâmicos bioabsorvíveis os que despertam maior interesse no campo da investigação. A maior vantagem dos revestimentos compósitos está relacionada com a capacidade de ajustar o rácio polímero/cerâmico de acordo com as propriedades requeridas para cada aplicação. [50]

2.3 Tipos de revestimentos aplicados e modificação da superfície

Os tipos de tratamentos superficiais podem ser divididos em físicos e químicos. Os tratamentos físicos englobam os tratamentos realizados com plasma, laser, spray, tratamentos térmicos, deformações mecânicas. Os tratamentos químicos incluem os tratamentos de conversão química da superfície, tratamentos eletroquímicos, método de sol-gel.

Durante a escolha dos processos disponíveis para a produção de revestimentos deve ser considerado que o objetivo é diminuir a taxa de corrosão do material do implante (liga AZ31, nesta dissertação) e não eliminar por completo a corrosão, o que faria com que o implante deixasse de ser bio absorvível. Deve ser considerada a biocompatibilidade do revestimento, bem como a sua bioatividade, uma vez que será o revestimento a estabelecer o contacto inicial com as células do tecido em crescimento.

A modificação da superfície da liga com recurso a esmeril ou laminagem a quente (“hot rolling”) por exemplo está associada a uma melhoria da resistência à corrosão devido ao refinamento de grão à superfície do metal e dissolução de precipitados intermetálicos, como já foi referido. No entanto, a utilização de jato

de areia ou a realização de tratamentos térmicos (revenido e envelhecimento) estão associados a uma diminuição da resistência à corrosão. [51, 58] A modificação mecânica da topografia da superfície induz um aumento da área superficial bem como um aumento da energia da superfície, levando a uma melhor osteointegração e adesão de células formadoras de tecido ósseo. [50]

A superfície pode ser modificada com a utilização de soluções ácidas (ex.: ácido fosfórico), em que a superfície é atacada, obtendo-se uma topografia mais uniforme e com menores variações, levando à obtenção de uma camada formada por compostos resultantes da reação da solução ácida com o material base do implante (bio absorvível, no caso do ácido fosfórico). Com uma superfície mais uniforme é possível obter uma adesão melhor entre o material base e o revestimento, uma vez que a área real de contacto entre as duas superfícies é maior. No entanto, este método leva a um fenómeno quase comparável com a impermeabilização do implante dado que a porosidade é reduzida, levando a taxas de corrosão menores e consequentemente um aumento da vida útil do implante. Este método favorece a adesão de camadas posteriores de outros materiais. [59]

Outros métodos como: deposição eletroquímica, oxidação eletrolítica por plasma (PEO), deposição por fase líquida, podem ser utilizados para produzir revestimentos que protegem a superfície e, consequentemente, aumentam a resistência à corrosão do implante. [42] O PEO apresenta-se como uma solução muito apropriada para tratar ligas metálicas com vista a aplicações biomédicas (como a liga AZ31), uma vez que não são utilizados percussores tóxicos e a superfície da liga não é submetida a temperaturas elevadas.

2.3.1 Oxidação Eletrolítica por Plasma (PEO)

O tratamento de Oxidação Eletrolítica por Plasma (PEO) que pode também ser denominado Oxidação por Micro Arco (MAO) consiste num processo eletrolítico para a formação de filmes porosos, a partir de um substrato metálico (Al, Ti, Mg, Ta, Zr). As maiores vantagens deste processo prendem-se com a realização do tratamento à temperatura ambiente, evitando assim a criação de tensões térmicas e modificação da microestrutura do substrato, e com o facto de produzir um filme poroso, de espessura controlável, que permitirá a adesão de células formadoras de tecido ósseo. Esta técnica não requer equipamento complexo ou dispendioso, sendo uma técnica de baixo custo e de fácil operação, tendo ainda um fator ambiental positivo visto que utiliza eletrólitos alcalinos com baixa concentração, e não forma gases nocivos para a saúde humana. [42, 60, 61]

O controlo da espessura da camada produzida é realizado através de um controlo da voltagem imposta: uma voltagem mais elevada origina a formação de uma camada mais espessa. Como a camada produzida é porosa, uma maior espessura está associada a uma maior proteção da superfície metálica à corrosão, fornecendo ao mesmo tempo uma estrutura de suporte para o crescimento ósseo, com um fornecimento local de iões de cálcio, magnésio e fósforo (dependendo do eletrólito utilizado), úteis às células formadoras de tecido ósseo.

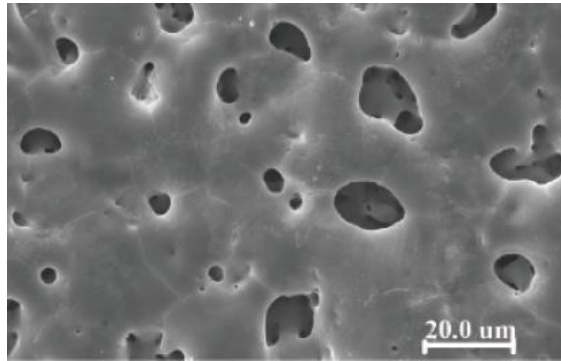


Figura 4: Revestimento depositado por Oxidação Eletrolítica por Plasma (PEO) onde é possível observar a superfície da estrutura porosa [39]

A técnica de PEO deriva da anodização, em que a peça metálica a ser tratada é o ânodo. É utilizado um eletrólito neutro ou básico (pH 7-12). Ao circuito é aplicada uma diferença de potencial numa gama de valores das centenas de Volts e uma densidade de corrente inferior a 30 A/dm^2 . A adesão do revestimento ao substrato é boa, sendo o revestimento produzido de elevada dureza e de espessuras que podem atingir os $200 \text{ } \mu\text{m}$. Em relação à anodização típica, a técnica de PEO apresenta melhores resultados para a adesão ao substrato e dureza do revestimento, quanto à espessura, a técnica de PEO permite a obtenção de espessuras muito superiores. O pré tratamento e o controlo de temperatura não são tão críticos como na anodização. [60]

O revestimento obtido com a técnica de PEO pode ser decomposto em três zonas diferentes: a camada inferior é densa, pouco espessa e caracterizada por boa adesão ao substrato, a camada intermédia é densa e a camada superior é porosa, representando 20 a 40% da espessura total do revestimento (figura 5). Estas camadas cerâmicas são formadas por óxidos resultantes da oxidação do material do substrato bem como da formação de compostos que incluem elementos presentes no eletrólito (fosfatos, silicatos ou outros, dependendo da composição do eletrólito) [60, 62]. Arrabal *et al* [62] referiram que a camada inferior obtida era constituída por MgO policristalino, a camada intermédia constituída principalmente por MgO e óxidos de elementos de liga, e a camada superior por fosfatos e silicatos (ambos presentes no eletrólito utilizado por Arrabal *et al*) [60, 62]. A divisão do revestimento em 3 zonas não é consensual entre a comunidade científica e outros autores fizeram a separação em 2 zonas [63] ou até em 4 zonas [61], sendo apenas uma análise subjetiva e que em nada afeta a caracterização do substrato.

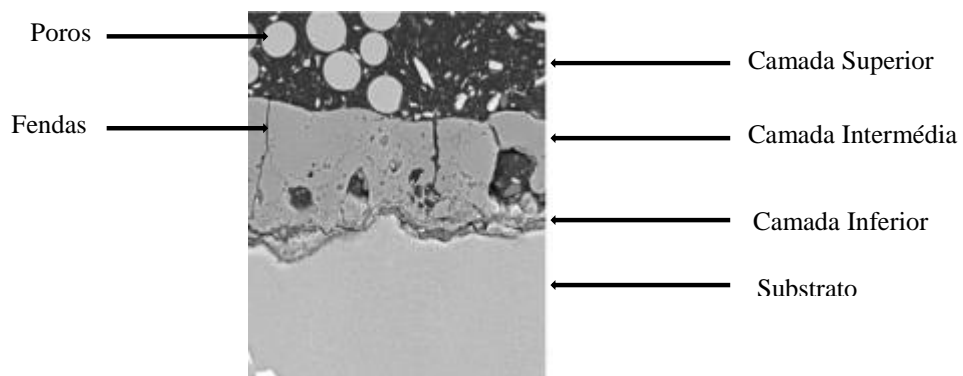


Figura 5: Secção transversal de um revestimento aplicado por PEO [64]

A formação do revestimento na técnica de PEO começa pela aplicação de um potencial elétrico ao substrato de magnésio que irá provocar o aumento da espessura da camada de MgO e Mg(OH)₂ à superfície (reações 5, 6, e 7). A composição do eletrólito utilizado irá determinar a existência de outros compostos na camada de óxidos formada. [48, 61] No entanto, não será apenas importante a composição do eletrólito, Arrabal *et al* [62] referiram que a composição da camada intermédia do revestimento é originada por migração de oxigénio para a superfície e pela migração, em sentido inverso, dos elementos de liga. De acordo com estes autores, também a composição do metal/liga metálica terá importância na composição do revestimento formado, nomeadamente da camada intermédia. Para a mesma camada, Arrabal *et al* [62] referiram que em condições impostas de corrente alternada (AC), só é comum a inclusão do oxigénio de entre todos os elementos presentes no eletrólito.



O aumento de espessura da camada de óxidos provoca um aumento da resistência da camada, pelo que num sistema em que a densidade de corrente imposta é constante, será necessário aumentar a voltagem para manter a corrente constante e dar continuidade ao processo. A voltagem aumenta até que o valor se torna muito elevado para a camada de óxido, levando à rutura dielétrica do óxido, formando-se uma descarga microscópica de plasma que rompe a camada de óxido anteriormente formada e que gera várias descargas menores e de curta duração que provocam reações localizadas de plasma, a temperaturas e pressões elevadas, modificando a camada de óxidos. Como resultado disso o óxido fundido, formado na interface entre o óxido e o material base, é ejetado até à superfície onde é rapidamente arrefecido pelo eletrólito que se encontra a uma temperatura inferior, solidificando. Como tal, a decomposição de hidróxido de magnésio para óxido (equação 7), bem como a formação de compostos complexos pode ocorrer. Após a destruição da camada de óxidos inicialmente formada, pode ser observada uma libertação de bolhas de gás a partir da superfície do ânodo (magnésio). As reações que ocorrem estão descritas de seguida: [48, 61]



A voltagem imposta entre os eléctrodos é muito elevada e como consequência, leva à acumulação de cargas positivas em torno da superfície do magnésio (ânodo), sendo este fenómeno observável durante o tratamento de PEO. A acumulação das cargas positivas na superfície do magnésio acontece sobretudo em torno das bolhas de gás anteriormente formadas, gerando um campo eléctrico intenso que provoca a ionização do gás no interior das bolhas, formando um plasma que pode atingir temperaturas na ordem dos 2000°C, induzindo a formação de um revestimento cerâmico. Contudo, este aquecimento é apenas local e como tal, o eletrólito envolvente permanece a uma temperatura mais reduzida que será próxima da temperatura de ebulição da água. A diferença de temperaturas e a voltagem imposta provocam uma implosão das bolhas de gás, libertando energia e acelerando os iões em torno das bolhas contra a superfície do ânodo. O arrastamento dos iões presentes no eletrólito no processo de implosão das bolhas explica a inclusão destes na camada de óxidos formada. [61, 65]

Das reações entre o magnésio do substrato e os iões presentes no eletrólito, é de destacar a reação 10, que explica a presença do composto $Mg_3(PO_4)_2$ na camada superior do revestimento [66]:



Na figura 6 está representado o esquema típico de um ensaio de PEO.

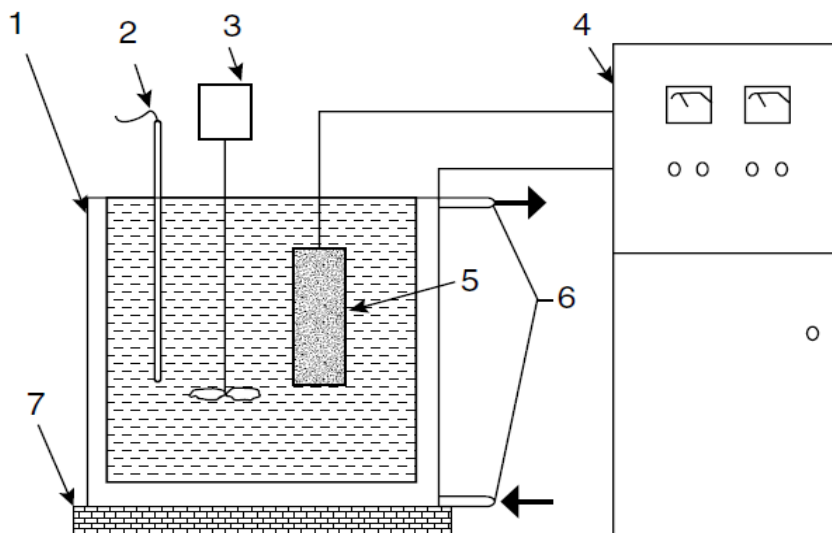


Figura 6: Esquema típico de um ensaio de PEO. 1- Reservatório de aço inoxidável (cátodo); 2- Termopar; 3- Misturador; 4- Fonte de alimentação; 5- Amostra (ânodo); 6- Sistema de arrefecimento; 7- Placa isoladora [55]

A utilização de agitação na solução tem como propósito aumentar a taxa de deposição no processo de PEO, aumentando o fluxo hidrodinâmico e o transporte iónico. As fontes de corrente contínua (DC) causam alguns problemas ao nível do controlo das descargas, sendo portanto utilizadas apenas para amostras ou peças com geometrias simples e em que é apenas necessário depositar uma camada pouco espessa. De forma a conseguir um melhor controlo da espessura podem ser utilizadas corrente contínua pulsada ou corrente alternada (AC). A utilização destes tipos de correntes também é útil para diminuir o excesso de porosidade induzida pela utilização de uma fonte de corrente contínua (DC). [61]

As distribuições quanto ao número de poros e quanto ao tamanho dos mesmos estão relacionadas com a voltagem aplicada. Para voltagens elevadas, a formação de poros é explicada pela fusão de óxidos e libertação de bolhas de gás através dos canais de descarga do micro arco. Muitas superfícies apresentam também fissuras que estão relacionadas com a diferença de temperaturas entre o eletrólito e os óxidos fundidos e que ao entrarem em contacto geram tensões térmicas. [60]

Em amostras submetidas ao tratamento de PEO, a microporosidade permite que o eletrólito se infiltre no revestimento e possa atingir a superfície do metal/liga metálica. Na interface entre o magnésio e a camada de óxidos forma-se hidróxido de magnésio como produto da corrosão (equação 3). O hidróxido de magnésio cresce, criando tensões e induzindo a separação da camada de óxidos da superfície de magnésio, expondo ainda mais superfície do material base. Será portanto importante diminuir o tamanho dos poros, apresentando-se o tratamento hidrotérmico como candidato a esse objetivo. [61]

É importante notar que o revestimento não cresce apenas para “fora” da superfície, mas também para o interior, com a oxidação do metal base, que assim se consome. Apesar de o crescimento ocorrer em simultâneo nos dois sentidos, há uma variação das velocidades de crescimento durante a duração do tratamento de PEO. [60, 62]

Blawert *et al* [65] reportaram que a aplicação de ultrassons durante o ensaio de PEO aumenta a taxa de crescimento da camada anódica, devendo-se este efeito a um aumento da taxa de transferência de massa através do filme de óxidos. Os mesmos autores referiram ainda neste artigo que a estrutura e distribuição dos elementos que compõem o filme são influenciadas pela aplicação de frequências ultrassônicas. [65]

A presença de fluoretos na solução do eletrólito irá induzir a formação de uma camada com menos poros mas de maiores dimensões, uma espessura de camada maior, rugosidade menor, maior dureza bem como maiores resistências ao desgaste e à corrosão, quando comparado a um revestimento produzido num eletrólito sem fluoretos. [67] A microestrutura da camada de óxidos irá ainda depender de fatores elétricos, da temperatura a que é realizado o tratamento, do pH e da duração do mesmo. Uma vez que existem várias variáveis que influenciam o revestimento obtido no final, é de crucial importância a referência e manutenção das condições para que exista boa reprodutibilidade dos resultados. [60, 61]

Em suma, a camada produzida irá depender de vários parâmetros, que deverão ser controlados, com vista à reprodutibilidade, otimização de parâmetros e comparação com bibliografia. São eles: corrente e voltagem impostas, duração do tratamento, composição e concentração do eletrólito, composição do substrato, agitação do eletrólito, temperatura, e características da corrente pulsada. Estas características incluem frequência (ciclos por segundo) e “duty cycle” (percentagem de tempo em que a voltagem imposta é positiva num ciclo). [65]

A técnica de PEO, apesar de possuir princípios idênticos aos da técnica de anodização convencional, apresenta diferenças significativas quanto aos parâmetros do ensaio e às características do revestimento obtido, como se pode observar na tabela 4.

Tabela 4: Comparação entre os tratamentos de anodização convencional e PEO. Adaptado de: [68, 69]

Parâmetros	Anodização	PEO
Densidade de corrente (A/dm ²)	< 10	< 30
Diferença de Potencial (V)	20 - 80	100 - 800
Consumo energético (kWh m ⁻² μm ⁻¹)	0,1 - 0,5	3 - 26,7
Controlo de temperatura	Crítico	Não importante
Eletrólito	Ácido	Neutro/alcalino
Pré tratamento do substrato	Crítico	Menos crítico
Espessura do revestimento (μm)	< 10	< 200
Adesão ao substrato	Moderada	Muito Elevada
Micro Dureza (HV)	≤ 500	≤ 1400 – 1700
Limite fadiga 10 ⁷ ciclos (MPa)	100 - 210	160 - 270

A análise da tabela 4 permite perceber que o tratamento de PEO é realizado para correntes e voltagens superiores às utilizadas na anodização convencional, estando também associado a um consumo energético superior. O pré tratamento do substrato e o controlo de temperatura não são parâmetros tão críticos como na anodização convencional, e o facto de os eletrólitos utilizados no PEO não serem ácidos e serem relativamente diluídos constitui uma vantagem do ponto de vista ambiental. Os revestimentos produzidos através da técnica de PEO são caracterizados por uma melhoria das propriedades mecânicas, entenda-se: da adesão ao substrato, da micro dureza e do limite de fadiga. Adicionalmente, os revestimentos obtidos com a técnica de PEO são caracterizados por possuírem resistência à corrosão e resistência ao desgaste superiores aos revestimentos obtidos com a técnica de anodização convencional.

Apesar de este tipo de tratamento apresentar resultados promissores e de possuir já alguns métodos industrializados, de que é exemplo o método Keronite®, será necessário um maior desenvolvimento e redução de custos, em termos de consumo elétrico e de reagentes químicos utilizados para que o PEO possa competir em muitos setores industriais com os métodos de conversão química. [65]

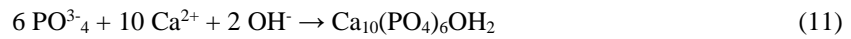
2.3.2 Tratamento Hidrotérmico

O tratamento hidrotérmico é uma técnica que utilizada para produzir revestimentos cerâmicos sobre substratos metálicos, permitindo a obtenção de um revestimento de hidroxiapatite, caracterizado por possuir elevadas biocompatibilidade e osteocondutividade. É realizado a temperaturas superiores a 90° C e tem duração superior a 90 minutos, geralmente, numa solução de Ca-EDTA que permite a formação de revestimentos cristalinos a partir da precipitação de iões de cálcio [70, 71]. O revestimento formado pode ser produzido mesmo em substratos tridimensionais com formas complexas. É ainda caracterizado por possuírem boa adesão ao substrato, por não apresentar toxicidade para o corpo humano, e por conferir proteção contra a corrosão, especialmente contra a corrosão localizada. [71, 72, 73]

Utilizado frequentemente após a realização de um tratamento de PEO, o tratamento hidrotérmico permite o crescimento de uma camada de hidroxiapatite de forma simples e economicamente viável. Apesar de o processo ser simples, a utilização de temperaturas superiores a 90° C e a solução aquosa favorecem a reação de corrosão do magnésio, que como visto anteriormente, é oxidado a Mg^{2+} para soluções com caráter ácido, neutro e ligeiramente alcalinas (figura 2). A formação de iões de magnésio, pode levar à formação de $Mg(OH)_2$ à superfície do revestimento de PEO, bem como à substituição dos iões de cálcio por iões de magnésio na estrutura do revestimento, levando a uma formação de menores quantidades de hidroxiapatite. [70, 72]

Tian *et al* [74] referiram que a degradação da camada de PEO durante o tratamento hidrotérmico provoca um aumento do pH da solução, tornando-se ideal para a nucleação da hidroxiapatite.

O pH da solução utilizada no tratamento hidrotérmico deve ser próximo do pH corporal (~7,35-7,45) de forma a aumentar a proteção que o revestimento de hidroxiapatite oferece em ambiente intracorporal. [73, 75] A hidroxiapatite é produzida através da equação 11:



As propriedades da camada obtida com o tratamento hidrotérmico, ao nível da microestrutura, propriedades mecânicas e resistência à corrosão, variam com a composição da solução, o pH, a duração do tratamento e a temperatura. [72] O revestimento obtido pode ser dividido em duas camadas, uma camada interior densa e uma camada exterior porosa [70, 72]. Chunyan *et al* [72] referiram que a camada exterior é composta por cristais na forma de crisântemos, que possuem vários micrómetros de comprimento, enquanto a camada interior é composta por cristais em formas de agulhas, que possuem um comprimento na ordem de 1 micrómetro, e que crescem perpendicularmente em relação ao substrato. Os mesmos autores referem que enquanto a camada exterior apresenta uma porosidade ideal para o crescimento de células formadoras de tecido, a camada interior confere uma maior proteção contra a corrosão. Tian *et al* [74] apresentam resultados concordantes, com o revestimento a ser dividido em duas camadas: uma camada exterior com cristais em forma de agulhas, e uma camada interior densa.

O revestimento formado depende do pH da solução utilizada para o tratamento hidrotérmico. Dorozhkin [70] afirma que para pH=5,9 a camada interior é densa e constituída principalmente por cristais de hidroxiapatite, enquanto a camada exterior apresenta cristais planos de fosfato de octacálcio (OCP ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)) em forma de placa. Yao *et al* [71] referem que para pH=5,6 a estrutura obtida é de cristais planos, mas devendo-se estes cristais a outro composto: a brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Quando são considerados pH superiores os autores parecem concordar quanto às microestruturas obtidas: Dorozhkin [70] refere que para pH=8,9 o revestimento é composto por hidroxiapatite, sendo a camada exterior formada por cristais em forma de cilindro e a camada interior, muito mais densa, apresenta um maior empacotamento dos cristais. Já Yao *et al* [71] refere que para pH=9,4 o revestimento apresenta cristais cilíndricos com diâmetros na ordem dos 40-50 nm e um comprimento de aproximadamente 300 nm. Dorozhkin [70] afirma ainda que para pH=11,9 os cristais apresentam-se sobre a forma de agulhas. Yao *et al* [71] refere que o tratamento quando realizado a pH=5,6 forma um revestimento de maior espessura e menor rugosidade superficial comparativamente ao tratamento realizado a pH=9,4, sendo que a taxa de deposição depende do pH e é superior para pH mais reduzidos.

Como referido, as condições de ensaio induzem uma alteração das propriedades do revestimento, Dorozhkin [70] reportou que a aplicação do revestimento permite aumentar a resistência à corrosão e que o aumento da duração do ensaio leva ao aumento da espessura das camadas. De referir ainda que o mesmo autor reporta que os revestimentos possuem boa adesão, não apresentando deformação plástica quando sujeitos a fadiga abaixo do limite crítico. [70]

A realização do tratamento hidrotérmico causa um aumento da espessura total do revestimento, bem como a diminuição do diâmetro e o fecho de poros e fissuras presentes no revestimento depositado por PEO, sendo estes os dois principais fatores que levam a um aumento da resistência à corrosão conferida por este tratamento. [71]

2.4 Hidroxiapatite

A hidroxiapatite, de fórmula química: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ é o principal constituinte da parte mineral da matriz óssea, e portanto, um cerâmico considerado biocompatível devido à sua não toxicidade e por não originar inflamação dos tecidos envolventes. Por ser um cerâmico, as suas propriedades mecânicas não se adequam às propriedades requeridas para os esforços a que um implante está sujeito, como tal, este material não é utilizado sozinho mas sim como um revestimento para implantes metálicos como titânio, aço inoxidável, magnésio. A sua utilização prende-se sobretudo com a osteocondutividade que facilita a adesão das células formadoras de tecido ósseo e a formação de uma camada de apatite. [50]

Testes realizados *in vivo*, em coelhos, com amostras de AZ31 e de AZ31 revestido com hidroxiapatite demonstraram que o revestimento cerâmico foi útil na prevenção da corrosão por picadas, servindo ainda como base ao crescimento dos tecidos ósseos, que teve início aproximadamente às 18 semanas. A utilização do revestimento de hidroxiapatite permitiu ainda reduzir a resposta inflamatória dos tecidos envolventes e diminuir a perda de massa. Considerando a dose diária recomendada do consumo de magnésio e a taxa de corrosão do implante, é possível estimar a área superficial máxima que o implante pode ter. O estudo revelou que a utilização da camada de hidroxiapatite permite produzir implantes com uma área superficial duas vezes e meia superior em relação a um implante não revestido. [42]

Kokubo e Takadama [11] reportaram que um revestimento de hidroxiapatite possibilita uma ligação direta com o osso através do crescimento de uma camada de apatite. Os mesmos autores referiram que é possível prever a taxa de crescimento ósseo através do comportamento do material numa solução de SBF (simulated body fluid): quanto mais rápida for a taxa de formação de apatite na solução de SBF, mais rápida será a formação de apatite dentro do corpo humano, e consequentemente, mais célere será a regeneração óssea a partir do implante.

Idealmente, a hidroxiapatite presente no implante deverá possuir um elevado grau de cristalinidade bem como estabilidade química para que seja o mais idêntica possível aos tecidos ósseos. A hidroxiapatite cristalina está associada a um rácio Ca/P igual a 1.67, no entanto, a hidroxiapatite com défice de cálcio pode existir para valores do rácio Ca/P entre 1.5 e 1.67. A rugosidade superficial do revestimento revela-se particularmente importante para facilitar a adesão das células. [76, 70, 72]

A dissolução da camada de hidroxiapatite está relacionada com a atividade dos osteoclastos, sendo os produtos resultantes da dissolução utilizados pelos osteoblastos para formação de novo tecido ósseo. Desta forma, a dissolução do revestimento cerâmico é benéfica para o corpo humano, estando a taxa de corrosão/dissolução da hidroxiapatite relacionada com a taxa de crescimento ósseo. No entanto, e como referido anteriormente, uma rápida corrosão do revestimento irá acelerar a corrosão de todo o implante e este poderá perder as características mecânicas necessárias antes de o novo osso estar formado. [50]

2.5 Efeito da Porosidade

A obtenção de estruturas porosas pode constituir um benefício do ponto de vista da osteointegração uma vez que a área superficial disponível para o crescimento de tecidos é muito superior à área que existiria numa estrutura não porosa, e que são fornecidos pontos de ancoragem para os tecidos. O diâmetro e número de poros têm influência nas propriedades de osteointegração, bem como nas propriedades mecânicas e tempo de vida útil do implante.

O campo das estruturas porosas engloba revestimentos porosos aplicados sobre um substrato (que podem ou não ser crescidos a partir deste), que conferem maior resistência à corrosão ao substrato e beneficiam a osteointegração, e “*scaffolds*”, estruturas tridimensionais que servem como suporte mecânico ao crescimento ósseo. Apesar de partilharem algumas semelhanças, as estruturas são bem diferentes, pelo que, de forma a não criar equívocos, os “*scaffolds*” não serão abordados em mais detalhe.

Quanto à porosidade dos revestimentos podemos distinguir entre macroporosidade ($>50 \mu\text{m}$) e microporosidade ($<10 \mu\text{m}$). A macroporosidade está associada a um crescimento mais rápido e à osteointegração do implante após a cirurgia, estando ainda associada a uma maior vascularização e maior oxigenação, comparativamente com a microporosidade. A microporosidade por sua vez está associada a funções importantes como a adsorção de proteínas, a trocas iónicas e à formação de apatite. [77, 76] Idealmente o revestimento não será constituído apenas por micro ou macro porosidade mas sim por uma combinação dos dois tipos de porosidade, que podem coexistir em gamas de tamanhos bem distintos, ou ainda numa distribuição contínua de diâmetros que vai desde a unidade até algumas centenas de micrómetros. Desta forma, será possível garantir os benefícios associados a ambos os tipos de porosidade.

Outro fator bastante importante para a osteointegração é a interconectividade dos poros presentes no revestimento. A interconectividade dos poros permite que os osteoblastos se fixem dentro dos poros e que criem um tecido ósseo contínuo, ao mesmo tempo permite a troca de nutrientes e a vascularização. Sopyan *et al* [76] referiram que a interconectividade dos poros num revestimento de hidroxiapatite deverá ter um diâmetro de pelo menos $20 \mu\text{m}$ de forma a permitir a passagem dos osteoblastos entre os poros. [76]

A porosidade tem um papel importante no revestimento de hidroxiapatite, dado que a superfície porosa é útil para a formação de tecido ósseo, fornecendo um substrato, idêntico à estrutura óssea, com pontos de ancoragem para as células. A porosidade na ordem dos micrómetros pode ainda ser utilizada para o armazenamento e libertação local de medicamentos que favoreçam a osteointegração e que reduzam o risco de infeção. [42]

A produção de revestimentos porosos pode ser conseguida através de técnicas como a oxidação eletrolítica por plasma (PEO). A produção de hidroxiapatite pode ser conseguida através da técnica anteriormente referida e/ou de tratamento hidrotérmico, técnicas que serão abordadas mais à frente neste trabalho.

O objetivo deste trabalho passa por produzir amostras com as condições otimizadas por Albuquerque [2], comparar os resultados obtidos e avançar na caracterização dos revestimentos, tanto do ponto de vista morfológico como da resistência à corrosão, a par de um estudo do impacto destes tratamentos na viabilidade celular de fibroblastos.

3. Técnicas de Caraterização

A caraterização das amostras apresenta-se como um dos pontos fundamentais deste trabalho. Para a caraterização morfológica e estrutural foram consideradas análise metalográfica com recurso a microscópio ótico, microscopia eletrónica de varrimento (SEM), e difração de raios X (XRD). Para analisar o comportamento das amostras à corrosão foi utilizada a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. Os ensaios celulares consistiram na medição da fluorescência das células após 24 horas em contacto com as amostras, o resultado permite avaliar a taxa de sobrevivência das células (viabilidade celular) colocadas em contacto com cada um dos tipos de amostras produzidas.

3.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, como o nome indica, permite medir a impedância de um sistema para vários valores de frequência. Os dados obtidos nesta técnica são geralmente apresentados sob a forma de diagramas de Bode e Nyquist. Com base na análise destes gráficos são gerados circuitos elétricos equivalentes que tentam replicar, através de condensadores, resistências, indutores, e outros elementos mais complexos, o comportamento das amostras e dos seus revestimentos [78, 79, 80]. A criação dos circuitos equivalentes deve contemplar sempre o significado físico resultante, de forma que os resultados obtidos sejam úteis na correta identificação do comportamento do sistema em estudo [81]. Esta técnica permite caraterizar algumas propriedades do material (sobretudo elétricas), realizar estudos de: corrosão superficial (taxa de corrosão e mecanismos de corrosão), estruturas de dupla camada, filmes poliméricos, eletrodeposição, bem como analisar os fenómenos que acontecem na superfície de eléctrodos, analisar tecidos vivos, e o estado de implantes biomédicos. Pode ainda ser utilizada para identificar alterações de microestrutura e a presença de defeitos. [78, 79, 80]

A aplicação de uma voltagem (V) a um circuito gera uma corrente elétrica (I). De forma a relacionar estes dois parâmetros, a Lei de Ohm (equação 12) introduz a resistência do sistema (R). A resistência nada mais é do que a oposição que um circuito apresenta à passagem de corrente elétrica gerada pela aplicação de uma voltagem. [78]

$$V = R \times I \quad (12)$$

A impedância permite estender o conceito de resistência aos circuitos de corrente alternada (AC). Por ser um parâmetro complexo, apresenta: parte real (resistência à passagem de corrente elétrica) e parte imaginária (aptidão do circuito para armazenar energia elétrica). A aplicação a um determinado sistema de uma pequena perturbação de potencial com a amplitude V_A e frequência f pode ser expressa pela equação 13. [78, 79]

$$V(t) = V_A \text{sen}(2\pi ft) \Leftrightarrow V(t) = V_A \text{sen}(wt) \quad (13)$$

Sendo “ ω ” a frequência angular e “ t ” o tempo. A resposta a esta perturbação é uma corrente I , também sinusoidal, com igual frequência e um desfasamento φ (diferença de fase), de acordo com a equação 14 e como se pode observar na figura 7. [78]

$$I(t) = I_A \text{sen}(wt + \varphi) \quad (14)$$

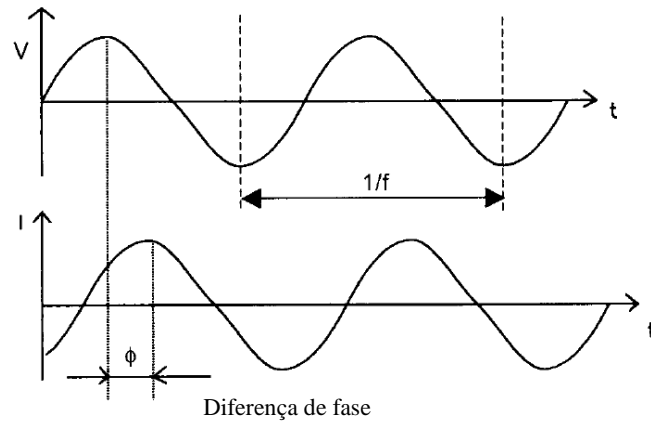


Figura 7: Funções sinusoidais da voltagem e corrente, ao longo do tempo. É possível observar no gráfico a diferença de fase (φ) entre as ondas sinusoidais. Adaptado de [69]

E a impedância Z^* é dada pela equação 15:

$$Z^* = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_A \text{sen}(wt)}{I_A \text{sen}(wt + \varphi)} = Z_A \frac{\text{sen}(wt)}{\text{sen}(wt + \varphi)} \quad (15)$$

Através da relação de Euler podemos reescrever as equações para a voltagem (V) e corrente (I) na representação complexa (equações 16 e 17):

$$V(t) = V_A e^{j\omega t} \quad (16)$$

$$I(t) = I_A e^{j\omega t - j\varphi} \quad (17)$$

Substituindo agora as equações 16 e 17 na equação 15:

$$Z^* = Z_A e^{j\varphi} = Z_A (\cos(\varphi) + j\text{sen}(\varphi)) = Z_{real} + jZ_{imaginário} \quad (18)$$

A conversão da equação na forma retangular para a forma polar permite que a impedância seja definida por magnitude $|Z|$ e diferença de fase φ (equações 19 e 20). [78, 79]

$$|Z|^2 = (Z_{real})^2 + (Z_{imaginário})^2 \quad (19)$$

$$\varphi = \arctg\left(\frac{Z_{\text{Imaginário}}}{Z_{\text{real}}}\right) \quad (20)$$

Um dos elementos mais simples que pode ser utilizado para compreender os princípios de funcionamento desta técnica é um condensador puro. A impedância para este elemento é descrita pela equação 21. [78]

$$Z^* = -j (\omega C)^{-1} \quad (21)$$

Em que “C” é a capacidade. A análise da equação 21 permite perceber que a impedância resultante corresponde à parte imaginária da equação 18, sendo puramente capacitiva e dependendo apenas da frequência ω [78]. Um condensador representa a acumulação de cargas elétricas. Uma comparação com a dupla camada eletroquímica que se estabelece na interface do metal com o eletrólito, e consequente separação de cargas, permite associar a este fenômeno um condensador que é regularmente representado como C_{dc} ou C_{dl} . [81]

O outro elemento utilizado na explicação é a resistência ideal, sendo que para este, a impedância resultante corresponde à parte real da equação 18 e é puramente resistiva (equação 22). [78]

$$Z^* = R \quad (22)$$

Uma resistência pode representar um eletrólito, um condutor eletrônico ou uma reação que ocorre no eletrodo [82]. Podem existir diferentes resistências num circuito equivalente, de que são exemplo a resistência ôhmica que inclui a resistência da solução, dos fios e dos eletrodos, a resistência à transferência de carga, a resistência do óxido, entre outras. [81]

Utilizando agora estes dois elementos podemos formar um circuito simples constituído por um condensador ideal e por uma resistência ideal em paralelo, também denominado circuito R/C. De acordo com a Lei de Kirchoff, para este circuito, os potenciais elétricos, após a passagem pelos dois elementos, são iguais, enquanto a corrente total é resultante da soma das correntes individuais que passam pela resistência e pelo condensador. [78]

$$I(t) = \frac{V(t)}{Z^*} = \frac{V(t)}{R} - \frac{\omega C V(t)}{j} = V(t) \left[\frac{1}{R} - \frac{\omega C}{j} \right] = V(t) \frac{1 + (\omega RC)^2}{R - j\omega R^2 C} \quad (23)$$

A corrente elétrica será dependente da resistência dos fios, dos eletrodos e do eletrólito (resistências ôhmicas), da taxa da reação na interface eletrodo-eletrólito, bem como da acumulação de cargas na interface metal eletrólito, constituindo a dupla camada eletroquímica. [79]

Substituindo a equação 23 na equação 15, podemos reescrever:

$$Z^* = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V(t)}{V(t) \frac{1 + (\omega RC)^2}{R - j\omega R^2 C}} = \underbrace{\frac{R}{1 + (\omega RC)^2}}_{\text{Real}} - j \underbrace{\frac{\omega R^2 C}{1 + (\omega RC)^2}}_{\text{Imaginária}} \quad (24)$$

Criando agora um gráfico tal que o eixo vertical corresponda à parte imaginária da equação e o eixo horizontal corresponda à parte real, obtemos o diagrama de Nyquist (figura 8). [78]

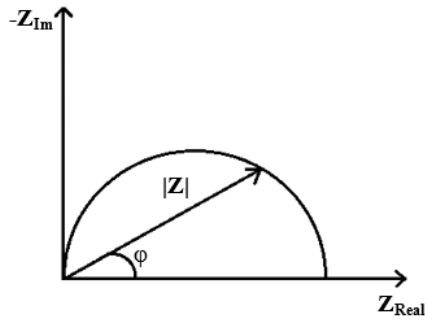


Figura 8: Diagrama de Nyquist

Para frequências elevadas a impedância é idêntica à de um condensador puro, enquanto para frequências baixas a impedância é próxima à de uma resistência pura. Para valores de ângulo de fase intermédios, o circuito adquire um comportamento que é característico de uma associação de condensadores e resistências. O diagrama de Nyquist é útil para estimar parâmetros relacionados com a impedância, como a resistência de polarização, no entanto não se revela útil quando se pretendem determinar valores de baixa impedância, bem como, qual a frequência a que se regista determinado valor de impedância. De forma a solucionar este problema é muitas vezes utilizado o diagrama de Bode, que revela ser particularmente útil na análise de circuitos e comparação do modelo teórico com os dados experimentais, muito devido ao eixo do ângulo de fase (φ) [78, 79, 81]. Os diagramas de Bode também se revelam particularmente úteis quando é necessário representar valores de impedância que englobam várias ordens de grandeza, como acontece para sistemas de maior complexidade. [81]

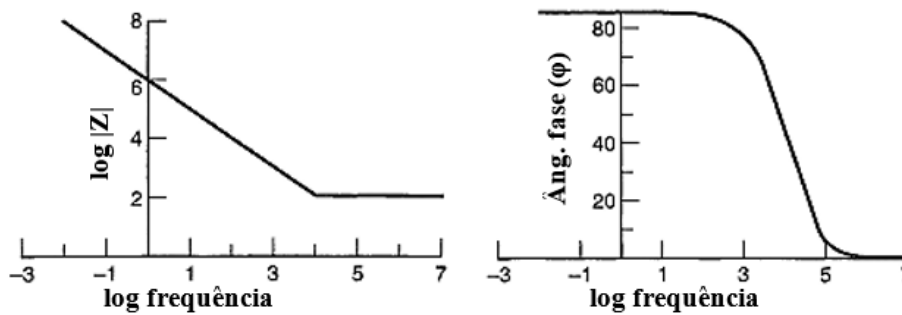


Figura 9: Diagramas de Bode. Adaptado de [70]

Os sistemas reais não são, geralmente, descritos por um circuito R/C, ou por apenas um elemento como um condensador ou uma resistência. Com base na análise dos gráficos obtidos tem então de ser criado um modelo teórico que tente replicar os resultados, utilizando para isso resistências e condensadores em série e/ou paralelo (figura 10), bem como elementos de fase constante (CPE) e indutores. No entanto, é necessário ter em conta que não existe apenas um único circuito que descreva os resultados obtidos. [78]

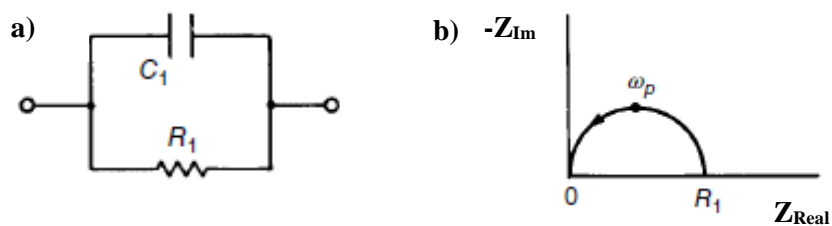


Figura 10: a) Circuito constituído por um condensador e uma resistência; b) diagrama de Nyquist correspondente. Adaptado de [70]

A impedância de um indutor é dada pela equação 25 [83]:

$$Z^* = j\omega L \quad (25)$$

O princípio de funcionamento do indutor e do condensador é semelhante: ambos armazenam energia elétrica, sendo que o condensador realiza esse processo sob a forma de energia electrostática, enquanto o indutor o faz sob a forma de energia magnética (criação de um campo magnético). [84]

Analisando a equação do indutor (equação 25) percebemos que existe apenas a parte imaginária da impedância, à semelhança do que acontece com o condensador, mas com o sinal oposto e uma dependência diferente da frequência, o que faz com que o comportamento do indutor seja também ele o oposto do comportamento do condensador (diferença de fase de 90° relativamente à voltagem). [78]

A formação dos “loops” indutivos pode dever-se a processos de adsorção ou desadsorção de espécies ou ainda a outros fatores como instabilidade do sistema, efeitos cinéticos, entre outros. [78]

A presença de heterogeneidades na superfície do eléctrodo, de que são exemplo a porosidade ou a rugosidade da superfície, provocam uma dispersão da frequência, representando um desvio ao comportamento ideal da impedância do sistema. De forma a tentar adaptar um circuito a estes dados anómalos, pode ser introduzido um outro elemento a que se dá o nome de Elemento de Fase Constante (CPE). A designação deste elemento engloba elementos como a resistência, o condensador e o indutor, que possuem um ângulo de fase constante, e portanto independente da frequência da corrente alternada (AC). [78, 83, 85]

A impedância do CPE é descrita pela equação 26 [83, 86]:

$$Z^* = \frac{1}{(j\omega)^{\alpha} Q} \quad (26)$$

A grande vantagem deste elemento prende-se com a possibilidade de atribuir valores a “ α ” e assim obter diversos tipos de gráficos. Para $\alpha=1$ o CPE irá comportar-se como um condensador, para $\alpha=0$ irá comportar-se como um resistência, e para $\alpha=-1$ irá apresentar o comportamento característico de um indutor. Para além destes valores, “ α ” pode tomar valores entre 1 e -1, e desta forma, aproximar-se mais de curvas que apresentem anomalias devidas a filmes de óxidos depositados na superfície do eléctrodo, porosidade, reações que ocorrem à superfície e que envolvem transferência de cargas elétricas, adsorção não uniforme, distribuição de corrente e voltagem não uniformes, limites de grão e diferentes fases cristalinas. [78, 83]

À semelhança do que acontece com os circuitos RC, os parâmetros do CPE advêm de constantes de tempo que são associadas, por exemplo, a revestimentos depositados sobre a superfície. Desta forma, as constantes de tempo são dispostas na direção normal ao eléctrodo. Os parâmetros podem apresentar nomenclaturas alternativas, sendo o ângulo de fase (α) descrito por CPE-P, ou o coeficiente Q por CPE-T. [86]

Lvovich [78] referiu que os circuitos equivalentes representam, para frequências elevadas, a impedância resultante da passagem de corrente eléctrica através da solução, e para baixas frequências, a impedância resultante da passagem de corrente através da interface superficial.

Esta técnica tem algumas desvantagens associadas, para além da já referida possibilidade da existência de mais do que um circuito que corresponda ao comportamento descrito, podem existir erros na interpretação dos resultados, uma vez que o tratamento dos dados resulta de uma aproximação a um circuito ideal para condições experimentais específicas, os resultados não podem ser extrapolados para outras condições de ensaio nem ser considerados como uma descrição absoluta e precisa do sistema. Alguns sistemas apresentam ainda outra limitação: a dependência anómala da frequência de parâmetros como a condutividade e a capacidade da interface. Nos materiais policristalinos deverá ainda ser considerado o efeito dos limites de grão que contribuem para a impedância e que podem levar à formação de dois arcos, em vez de um, no diagrama de Nyquist. [79]

A técnica utiliza normalmente uma montagem a três eléctrodos: eléctrodo de trabalho (a amostra em estudo), eléctrodo de referência e eléctrodo auxiliar (figura 11). Para casos específicos pode ser aplicada uma atmosfera controlada. Como já foi referido neste tópico, o funcionamento desta técnica prende-se com a aplicação de um estímulo eléctrico ao eléctrodo e consequente análise dos resultados. Dado que o objetivo da técnica de espectroscopia é determinar as propriedades da amostra, bem como a dependência de fatores como a temperatura ou pressão hidrostática, é assumido na realização da experiência que as propriedades não variam ao longo do tempo. [80]

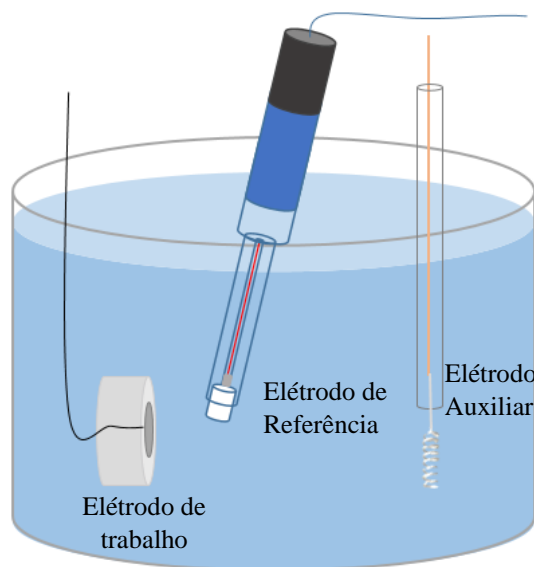


Figura 11: Representação de um sistema a três eléctrodos.

A precisão das medições de impedância dependerá da corrente e da voltagem impostas ao sistema. É recomendado a utilização de gaiolas de Faraday de forma a diminuir as interferências exteriores que possam perturbar os resultados da experiência. É importante considerar também que é mais difícil de realizar, com precisão, medições para frequências elevadas (>1MHz) do que para frequências mais reduzidas [79]. Para frequências elevadas os erros derivados do equipamento, cabos, entre outros, tornam-se mais proeminentes e podem de certa forma mascarar os resultados. Para frequências baixas existe maior ruído e portanto a razão sinal/ruído torna-se mais baixa, dificultando a obtenção de medidas.

Apesar da existência de outros métodos, o método mais utilizado é aquele que foi descrito ao longo desta secção e que tem o nome de “*single frequency*” (aplicação de uma perturbação com frequência única e consequente medição da impedância do sistema, repetindo essa análise para várias frequências, cobrindo toda uma gama de frequências). A maior utilização deste método prende-se com uma maior facilidade de tratamento de resultados, bem como a disponibilidade no mercado de vários equipamentos que permitem a aplicação deste sinal, resultando num espectro com bom rácio de sinal/ruído. [80]

3.2 Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

A sigla SEM significa “Scanning Electron Microscope” ou, em português, microscópio eletrónico de varrimento. Este tipo de microscópio utiliza um feixe de eletrões para conseguir uma imagem aumentada da superfície da amostra em estudo. A principal vantagem associada a este tipo de microscópio é a possibilidade de obter ampliações maiores e mais detalhadas da superfície, em relação ao microscópio ótico, visto que o comprimento de onda do feixe de eletrões é menor do que o comprimento de onda da luz utilizada num microscópio ótico. Este tipo de microscopia é uma técnica versátil por permitir a análise da superfície a escalas micrométricas e nanométricas, fornecendo dados sobre a superfície quanto ao tamanho de grão, presença de precipitados, diferentes fases presentes, topografia da superfície, existência de porosidade e tamanho da mesma, elementos presentes e respetiva quantificação, análise de revestimentos, entre outros parâmetros. [80]

É uma técnica que permite analisar uma grande variedade de materiais, desde cerâmicos a polímeros, metais e compósitos, podendo ainda estes materiais estarem sob a forma de pó. Para as amostras não condutoras de eletricidade tem de ser aplicado um material condutor, como fita adesiva condutora, de forma a ser possível de realizar a sua análise. Apesar de a técnica exigir a presença de uma amostra que possa ser colocada dentro da câmara de vácuo (limitação de tamanho da amostra), e isso possa exigir a destruição, ainda que parcial, de um componente, a amostra não é destruída durante o ensaio. No entanto, em casos específicos, o feixe de eletrões pode causar algum dano à amostra analisada. O facto de ser necessário realizar vácuo na câmara principal onde é colocada a amostra pode constituir uma limitação à análise das amostras, sobretudo quando são consideradas amostras hidratadas, no entanto, existem soluções específicas para alguns casos, tais como operar em baixo vácuo ou baixa voltagem. [80]

O SEM é constituído por uma coluna de eletrões, uma câmara principal, um sistema de vácuo com bombas de vácuo e um sistema de arrefecimento, um sistema de controlo computadorizado, detetores de eletrões secundários e retrodifundidos, um espectrómetro dispersivo de energia (EDS), podendo ainda conter outros

detetores. A coluna de eletrões é constituída pelos seguintes componentes: fonte de eletrões, lentes eletromagnéticas, bobinas eletromagnéticas, condensador e objetivas. A fonte de eletrões pode ser de vários tipos: filamento de tungsténio, emissor LaB₆, canhão de emissão de campo (FEG). [80]

O feixe de eletrões é produzido na fonte de eletrões, dentro da coluna de eletrões, que se encontra sob vácuo para evitar a dispersão do feixe nas partículas que poderiam estar presentes no ar. O feixe é focado através das lentes eletromagnéticas e posicionado na amostra com recurso às bobinas eletromagnéticas. O foco resultante da passagem do feixe pelas lentes possui um diâmetro da ordem dos nanómetros que irá ditar a resolução possível de atingir. A interação do feixe eletrónico com os átomos superficiais e sub superficiais da amostra, na câmara principal, gera a emissão de eletrões secundários, eletrões retrodifundidos e raios X. Para cada tipo de sinal emitido existe um detetor específico que permite transformar o sinal em imagem ou numa análise composicional da superfície da amostra. São ainda emitidos outros tipos de sinais como eletrões Auger ou fotões que podem ser captados por detetores próprios para obtenção de informações específicas da superfície. [80, 87]

A interação dos eletrões com os átomos da superfície da amostra pode gerar difusão elástica, se não existir perda de energia cinética dos eletrões incidentes, existindo apenas uma alteração da direção de propagação do eletrão, ou inelástica, quando alguma da energia cinética do eletrão incidente é transferida para o núcleo dos átomos. A difusão elástica origina eletrões retrodifundidos que são posteriormente captados por um detetor, permitindo formar uma imagem de contraste com base no número atómico dos elementos presentes. A difusão inelástica por sua vez origina eletrões secundários que se formam quando o feixe de eletrões provoca a ejeção de um eletrão de uma das orbitais mais exteriores dos átomos superficiais e sub-superficiais. A captação dos eletrões secundários permite formar uma imagem de contraste topográfico. [80]

Uma vez que a difusão ocorre à superfície e imediatamente abaixo desta, é de fácil perceção que o volume afetado é consideravelmente superior ao que aparenta ser quando se tem em conta a área da superfície na qual o feixe de eletrões incide. Este volume assume o nome de volume de interação e depende dos parâmetros do ensaio (ex.: densidade do material da amostra, energia do feixe, ângulo de incidência do feixe eletrónico). [80]

Os raios X são produzidos quando o feixe de eletrões provoca a ejeção de um eletrão de uma das orbitais interiores dos átomos da amostra. A ejeção deste eletrão deixa uma vaga na orbital que é preenchida pelo decaimento de um eletrão de uma orbital mais exterior. A transição eletrónica leva à emissão de radiação raios X de energia equivalente à diferença das energias de ligação dos eletrões nas orbitais, e que corresponde a um valor característico de cada elemento da tabela periódica. A emissão de energia é registada no espetro de EDS, permitindo, a análise do mesmo, realizar uma identificação dos elementos presentes na amostra. [80]

Para realização da técnica de EDS (Energy Dispersive X-rays Spectrometer) é necessário que um detetor específico esteja acoplado ao microscópio eletrónico de varrimento. Este tipo de detetor permite a realização de análises semi-quantitativas e qualitativas dos elementos presentes na superfície do material.

De referir ainda uma desvantagem relacionada com esta técnica, o detetor de EDS não é capaz de detetar elementos com menor número atómico que o berílio, são eles: hidrogénio, hélio e lítio. [80]

3.3 Ensaios Celulares

A formação de tecido ósseo na superfície do implante envolve vários processos, como a adesão celular ao substrato, desenvolvimento e proliferação. Torna-se portanto imperativo avaliar como ocorre cada um destes processos na superfície do material implantado. O desenvolvimento de um material para aplicações biomédicas segue regras definidas pela *International Organization for Standardization* (ISO), na norma ISO-10993 (*Biological evaluation of medical devices*). Esta norma apresenta as linhas guia que um fabricante tem de seguir para produzir um material seguro para determinada aplicação. A norma define os testes a que um determinado equipamento ou material tem de ser submetido, com base nas condições a que irá estar sujeito na sua aplicação tais como: duração de contacto com o paciente e local do corpo onde é realizado o contacto. [88, 89]

Considerando um material com a finalidade de ser utilizado como implante ósseo, em contacto com o paciente por um período permanente (> 30 dias), terá de ser sujeito aos seguintes testes para que possa ser aprovado: citotoxicidade, sensibilização, irritação e reatividade intracutânea, toxicidade aguda/sistemática, toxicidade subaguda e subcrónica, genotoxicidade, implantação, toxicidade crónica e carcinogenicidade. Deste modo, é obtido um registo e caracterização completa dos efeitos do implante nos tecidos e nas células, a resposta a curto e longo prazos do sistema imunitário, bem como potenciais danos causados no ADN. [89]

A análise de citotoxicidade permite realizar uma primeira análise quantitativa e qualitativa dos efeitos tóxicos do material para as células. Para realizar esta avaliação podem ser utilizados métodos que envolvem a identificação de células vivas ou mortas, tirando partido das atividades celulares (atividade enzimática, conteúdo e síntese do ADN, entre outros) ou da permeabilidade das membranas celulares. As células podem ser analisadas individualmente ou em população, sendo esta última opção vantajosa do ponto de vista da rapidez de obtenção dos resultados. No entanto, o grau de pormenor obtido com uma análise individual é muito superior. [90]

De entre os reagentes que existem para identificar a integridade/atividade celular (XTT, MTT, Calcein AM, MTS, resazurina, entre outros), os compostos fluorescentes ganham destaque, particularmente para análise de população, por estarem associados a uma maior sensibilidade. Reagentes com resazurina penetram nas células e atuam como resposta a uma alteração do ambiente redutor das células. A resazurina é um composto azul e não fluorescente, mas a sua redução em ambiente celular dá origem a outro composto, a resorufina, que é vermelho e fluorescente. Portanto, apenas as células vivas que consigam reduzir a resazurina a resorufina serão contabilizadas na análise de fluorescência. Num ensaio de fluorescência a alteração da cor do meio face a um controlo, fornece os dados sobre a percentagem de células vivas existentes numa amostra. A medição da fluorescência é geralmente realizada recorrendo a leitores de microplacas, permitindo analisar várias amostras de uma só vez. [90]

A realização de diferentes tipos de análises de citotoxicidade permite ainda a identificação do mecanismo de morte celular, bem como a validação necessária para realização de testes posteriores como a genotoxicidade. A morte celular pode ocorrer por apoptose ou necrose: a apoptose é um processo natural responsável pela eliminação de células indesejáveis e a sua ocorrência pode estar relacionada com, por exemplo, períodos de stress; a necrose por seu lado pode ser decorrente de infeções ou presença de elementos tóxicos. A importância da identificação do processo responsável pela morte celular advém do facto de a apoptose ser um processo natural e possivelmente decorrente da presença de um objeto estranho ao organismo, enquanto a necrose se pode dever a toxicidade do material implantado, e que pode inviabilizar a utilização desse mesmo material. [90]

A existência de diversos tipos de análise de citotoxicidade coloca a necessidade de identificação das condições utilizadas, de forma a permitir a comparação e reprodutibilidade dos ensaios. [88]

Na realização dos testes *in vitro* deve ser considerado que os resultados são apenas referentes à linha celular utilizada, e que apesar de o meio usado replicar as condições fisiológicas do corpo humano, será sempre diferente e menos complexo. Adicionalmente, deve ser considerado que os testes *in vitro* são geralmente realizados para períodos curtos (1 a 7 dias) e que, portanto, nada se pode concluir sobre os efeitos a longo prazo. Como tal, os testes *in vitro* devem ser complementados com testes *in vivo*. Ainda assim convém ressaltar que a realização dos testes *in vitro* é útil para reduzir custos, permitir a obtenção de uma amostragem maior e permitir a obtenção de uma primeira previsão do comportamento que o material terá nos ensaios *in vivo*. [88]

Nos ensaios celulares a análise estatística tem um papel fundamental na análise de resultados. A análise da média e desvio padrão deve ser realizada mas nunca como análise única. O método “*One-way analysis of variance* (ANOVA)” permite realizar a análise da variância das amostras utilizadas. Neste tipo de análise são consideradas duas hipóteses: a hipótese nula (as médias para cada um dos tipos de amostras são todas iguais) e a hipótese alternativa (pelo menos uma das médias é diferente das outras). É ainda considerado o parâmetro “ α ” como sendo estatisticamente relevante. [91]

A rejeição da hipótese nula (quando: $p \leq \alpha$) indica que existe uma diferença estatística entre as amostras, não indicando entre que grupos de amostras essa diferença ocorre. É por esse motivo necessário realizar uma análise posterior. Quando o objetivo passa por comparar todos os pares possíveis de grupos de igual tamanho é escolhido o método de Tukey, em que é realizada uma comparação da diferença absoluta das médias dos grupos com o critério de Tukey (T), dado pela equação 27:

$$T = q_{\alpha(c,n-c)} \sqrt{\frac{MSE}{n_i}} \quad (27)$$

Em que o parâmetro “q” provém da tabela “*studentized range distribution*” para um “ α ” predefinido (neste caso $\alpha=0,05$), “c” é o número de tratamentos ou grupos e “n” o número total da amostra utilizada. O parâmetro MSE corresponde ao erro quadrático médio dentro de grupos, proveniente da tabela ANOVA, e “ n_i ” é o número da amostra dentro do grupo. Quando a diferença absoluta entre as médias de dois grupos é superior ao critério de Tukey (T), a diferença diz-se estatisticamente significativa, e caso contrário, diz-se estatisticamente não significativa, para o “ α ” predefinido. [92]

4. Materiais e Métodos

4.1 Preparação das Amostras

O estudo realizado partiu de condições previamente testadas por Albuquerque [2]. No trabalho realizado por esse autor foram testadas várias condições dos ensaios PEO e Tratamento Hidrotérmico, obtendo-se dois conjuntos de parâmetros otimizados, cujas amostras apresentaram os melhores resultados, umas privilegiando a resistência à corrosão e outras apresentando maior biocompatibilidade. Uma vez que a biocompatibilidade é de extrema importância para aplicações biomédicas, foram escolhidas as condições de tratamento aplicadas para as amostras que demonstraram possuir esse melhor comportamento. [2]

De um varão da liga metálica AZ31 da Goodfellow, com diâmetro de 25 mm e com a composição descrita na tabela 2, foram cortados 40 discos com 6 mm de espessura cada. Uma vez que a liga não pode ser submetida a temperaturas elevadas e tensões mecânicas sob pena de sofrer alterações da microestrutura, o varão foi cortado com recurso à técnica de electro erosão por fio, que evita, relativamente às técnicas de corte tradicionais os problemas de geração de calor, de tensões térmicas e de tensões mecânicas.

As amostras obtidas foram polidas numa das superfícies com recurso a lixa de SiC com tamanho de grão P1200. A superfície foi lavada com água Millipore® e etanol, sendo de seguida seca ao ar. Na mesma superfície foi colado um fio de cobre com tinta de prata SPI®.

Após a secagem da tinta de prata, foi medida a resistência dos fios recorrendo a um multímetro. As amostras foram depois inseridas em moldes previamente revestidos com agente removedor Buehler®, e embebidas em resina epóxi Epofix da marca Struers®.

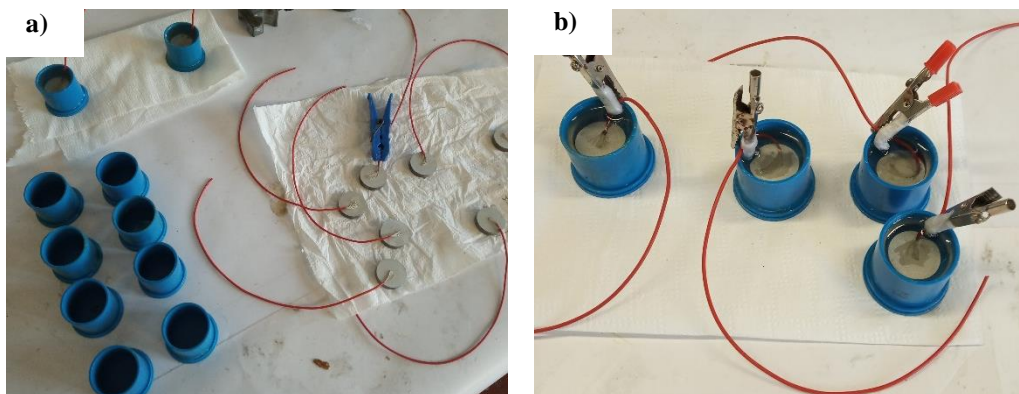


Figura 12: Preparação das amostras. a) Aplicação da tinta de prata e fixação do fio de cobre na amostra; aplicação de agente removedor nos copos. b) Após deposição da resina

Terminada a cura da resina epóxi, a resina das amostras foi furada lateralmente com uma broca, com o intuito de facilitar a fixação da amostra nos processos seguintes, tendo o cuidado de não expor o metal do fio de cobre e/ou da amostra. Foram também marcadas com um número sequencial de forma a tornar a sua identificação possível (foram preparadas 39 amostras). As amostras foram polidas no equipamento Struers LaboPol-25 com recurso a lixas de carboneto de silício (SiC): P320, P600, P1200, P2400, das marcas Buehler® e Struers®. Foram de seguida lavadas com água Millipore®, etanol e secas ao ar.

4.2 Oxidação Eletrolítica por Plasma

Foram sujeitas a tratamento de PEO 31 amostras, com o equipamento apresentado na figura 13, que inclui uma fonte AC Agilent® 6813B, uma célula composta por um copo de vidro de 1L e uma espiral de aço inoxidável 316, bem como um refrigerador da marca Julabo®. Para realizar este tratamento foi preparada uma solução com a concentração apresentada na tabela 5, e foram impostas as condições apresentadas na tabela 6.

Tabela 5: Solução utilizada para o ensaio de PEO

Reagentes	Concentração (g/L)
Na ₃ PO ₄	20,0
Ca(OH) ₂	2,0

Tabela 6: Parâmetros utilizados para o tratamento de PEO

Parâmetros	Valores
Duty Cycle	20 %
V _{rms}	160 V
DC	80 V
Frequência	100 Hz
Corrente Limite	0,6 A
Corrente de Pico	26 A
Tempo	600 s
Temperatura	10 ± 0,5 ^o C
Agitação	350 rpm

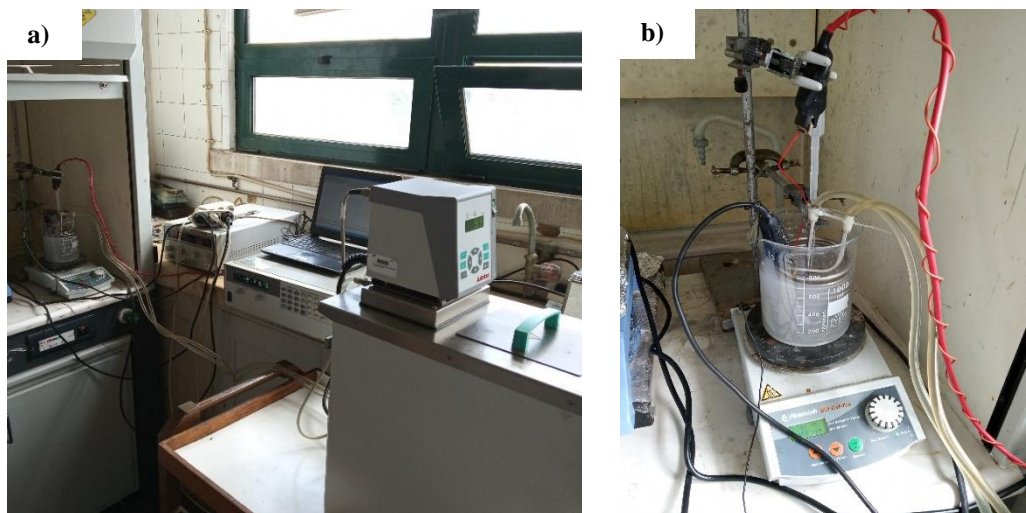


Figura 13: a) Equipamento utilizado para o tratamento de PEO; b) Imagem em pormenor da célula utilizada

O parâmetro “duty cycle” corresponde à percentagem de tempo em que a voltagem imposta é positiva num ciclo. Neste caso o “duty cycle” utilizado foi de 20%, o que significa que a voltagem é aplicada apenas em 20% do tempo total do ciclo, sendo que no restante 80% do tempo a voltagem aplicada é nula.

Dado que ao fonte de alimentação não permite especificar directamente os valores mínimos e máximos de voltagem, mas sim a voltagem eficaz da componente pulsada (V_{rms} , do inglês “root mean square”),

equivalente a valor quadrático médio) e a voltagem da componente contínua (V_{bias}), foi necessário efetuar os cálculos que se seguem.

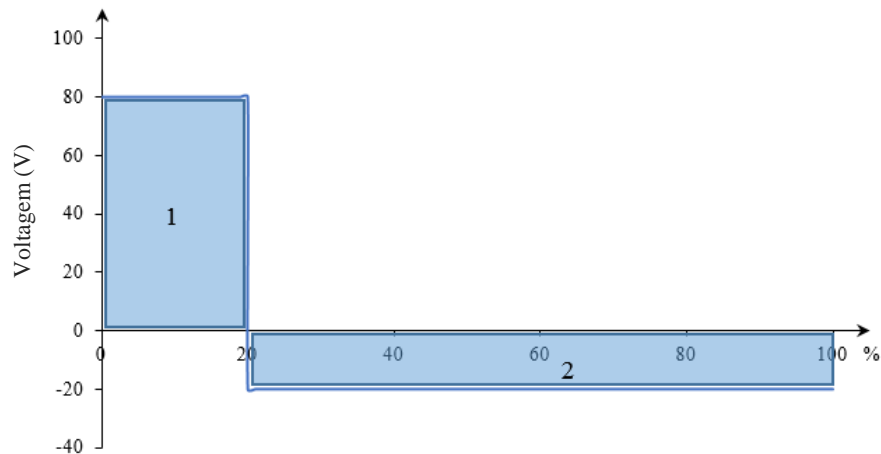


Figura 14: "Duty cycle" utilizado para o ensaio de PEO

Considerando que as áreas "1" e "2" da figura 14 deverão ser iguais:

$$20 \times V_{max} = 80 \times (-V_{min}) \Leftrightarrow V_{min} = -0,25 V_{max} \quad (28)$$

Considerando agora a equação que permite calcular V_{rms} , definindo o valor de $V_{rms} = 160$ V, e substituindo a equação 28 na equação 29:

$$V_{rms} = \sqrt{(0,2 \times V_{max}^2) + (0,8 \times (V_{min})^2)} \Leftrightarrow V_{max} = V_{rms} \times 2 \Leftrightarrow V_{max} = 320 \text{ V} \quad (29)$$

Por fim, substituindo novamente na equação 28, obtemos o valor de V_{min} : $V_{min} = -80$ V

De forma que não fossem aplicadas voltagens negativas, foi aplicada uma componente contínua (DC) de valor igual a 80V, provocando um aumento de V_{max} e V_{min} para os 400 V e 0 V, respetivamente, obtendo-se o gráfico da figura 15. Como se pode observar pela figura 14, a diferença de potencial (V) é aplicada por pulsos e não de forma contínua, sendo apenas positiva em 20% do ciclo e nula nos restantes 80% .

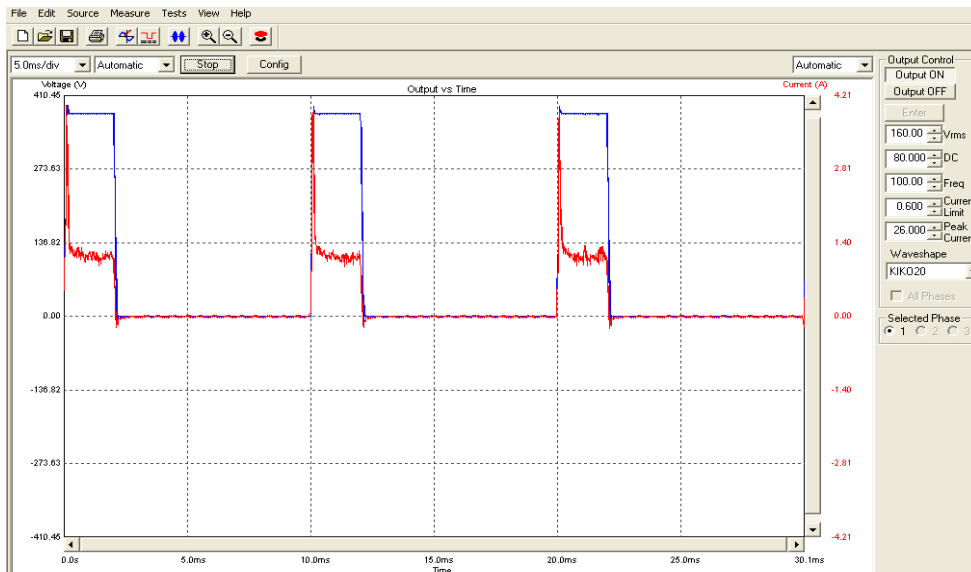


Figura 15: “Duty cycle” de 20% utilizado para realizar o tratamento de PEO. Captura de ecrã do programa AC Source GUI durante a realização do ensaio.

Após o tratamento de PEO as amostras foram lavadas com água Millipore® e secas ao ar, sendo depois armazenadas num exsiccador. A todas as amostras submetidas ao tratamento de PEO foi medida a espessura da camada de óxidos criada, com recurso ao medidor de espessura da marca Elcometer®, apresentado na figura 16.



Figura 16: Medidor de espessura Elcometer®

4.3 Tratamento Hidrotérmico

Das amostras sujeitas ao tratamento de PEO, 12 foram sujeitas a Tratamento Hidrotérmico que foi realizado com o equipamento de aquecimento e circulação da marca Julabo®, com uma célula de vidro de parede dupla, apresentados na figura 17, com as condições e com a solução com a concentração apresentada na tabela 7.

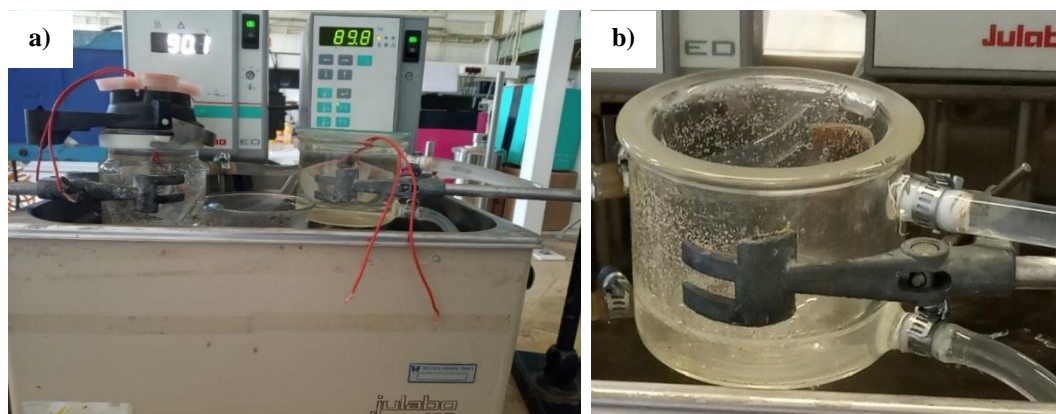


Figura 17: a) Equipamento utilizado para realização do tratamento hidrotérmico. b) Célula de vidro de parede dupla utilizada

Tabela 7: Concentrações e condições utilizadas para o tratamento hidrotérmico das amostras. Adaptado de [2].

Concentrações (g/L)		Condições		
KH ₂ PO ₄	EDTA(Ca)	pH	Tempo (h)	Temperatura (°C)
13,609	37,628	8,5	4	90 ± 0,5

Após a realização do tratamento hidrotérmico foi medida a espessura da camada de óxidos recorrendo novamente ao medidor de espessura Elcometer®.

4.4 Imersão

Após o tratamento de PEO, 10 amostras foram submetidas ao revestimento com policaprolactona (PCL), que foi preparado de acordo com a concentração apresentada na tabela 8. A policaprolactona é um polímero biodegradável utilizado em revestimentos aplicados em implantes, principalmente por estar associado a uma taxa de degradação baixa em meios fisiológicos, possibilitando o crescimento ósseo num espaço de tempo tal que o implante bioabsorvível não perca as funções estruturais cedo demais. [93, 94] O revestimento foi obtido através da técnica de imersão (“Dip-Coating”), com o equipamento Bungard RDC 15, apresentado na figura 18.

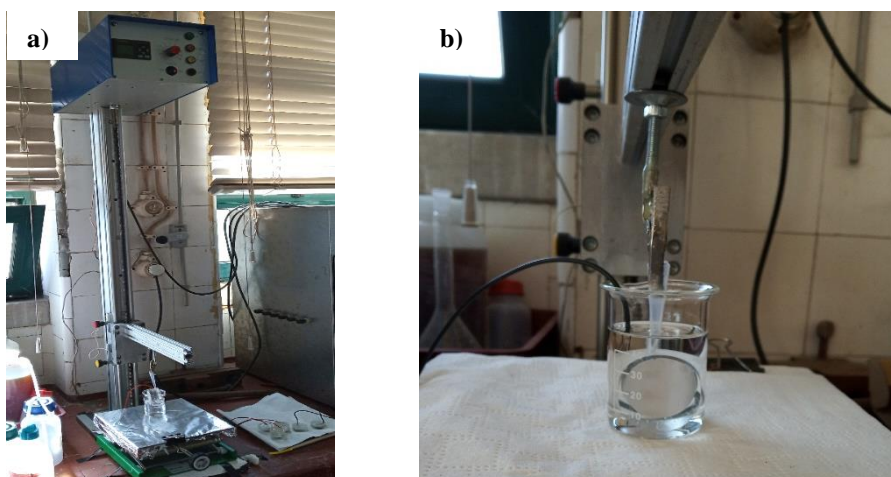


Figura 18: a) Equipamento utilizado para realização do tratamento de imersão). b) Pormenor do sistema de fixação da amostra

Tabela 8: Reagentes e concentração utilizadas para preparar a solução 2,5% PCL para imersão

Reagentes	Concentração (g/L)
Policaprolactona (PCL)	26,56
Clorofórmio	(solvente)

Para realizar o tratamento de imersão a solução, formada pelos reagentes referidos na tabela 8, foi preparada num copo de vidro de 50 mL, tendo os dois reagentes sido misturados, com agitação magnética, por duas horas. As amostras foram fixadas no equipamento apresentado na figura 18 b) e posteriormente mergulhadas na solução de forma que a superfície da amostra estivesse perpendicular à solução, com o objetivo de evitar a formação de bolhas de ar e conseqüente um revestimento deficiente da superfície. As amostras permaneceram mergulhadas na solução por um período de 60 segundos e foram de seguida retiradas da solução a uma velocidade de subida constante e igual a 1,4 mm/s. Após a realização do tratamento as amostras foram armazenadas durante as primeiras 24 horas num local protegido e nas seguintes num exsiccador de forma a promover a secagem da camada de PCL depositada.

Foram utilizadas 5 amostras de referência (não foram submetidas a qualquer tratamento) e foram denominadas por amostras Simples. A denominação das restantes amostras foi realizada de acordo com os tratamentos a que cada amostra foi submetida (tabela 9). A título de exemplo: a amostra referida como PEO+Hidrotérmico foi tratada em primeiro lugar com o tratamento de PEO e posteriormente com o Tratamento Hidrotérmico.

Tabela 9: Tabela resumo das amostras produzidas

Tratamento	Quantidade de Amostras
Simples	5
PEO	13
PEO + Hidrotérmico	12
PEO + PCL	6

4.5 Ensaios celulares

Foram de seguida realizados testes biológicos de forma a avaliar a biocompatibilidade de células fibroblastos quando em contacto com o material base e os diferentes revestimentos obtidos (viabilidade celular). Começou-se por crescer fibroblastos ATCC L-929 em meio de cultura celular “Dulbecco's Modified Eagle Medium” (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e penicilina/estreptomicina 100 U/mL, a 37°C em atmosfera humidificada e com 5% CO₂. Quando o crescimento celular apresentou uma confluência de cerca de 80%, o meio foi removido e procedeu-se a uma lavagem com 0,25% tripsina, seguida de uma incubação de 10 minutos a 37°C com mais solução de tripsina para permitir que as células se soltassem da superfície do frasco. A ação da tripsina foi verificada por visualização da cultura celular num microscópio ótico invertido. Foi posteriormente adicionado meio DMEM suplementado ao frasco, para parar a atividade da tripsina pela ação do FBS. A suspensão celular foi transferida para um tubo e homogeneizada por pipetagem suave. Uma amostra de 10 µL foi utilizada para quantificar a densidade celular utilizando uma câmara de “Neubauer”. A concentração foi ajustada para um valor de 5×10^5 células/mL. Entretanto as amostras (1 simples, 1 PEO, 1 PEO+Hidrotérmico, 1 PEO+PCL) foram desinfetadas com álcool etílico a 70% (v/v) para evitar contaminações e foram colocadas em placas de cultura celular de seis poços, sendo que um dos poços ficou sem amostra servindo como controlo. Adicionou-se 1 mL da suspensão celular à superfície de cada amostra e deixou-se incubar cerca de 2h, perfazendo-se depois o volume completo do poço com mais 3 mL de meio DMEM suplementado, ficando as amostras submersas. A placa foi colocada numa estufa a 37°C em atmosfera humidificada e com 5% CO₂, durante 24h.

Todas as soluções usadas na cultura das células foram previamente aquecidas a 37°C.

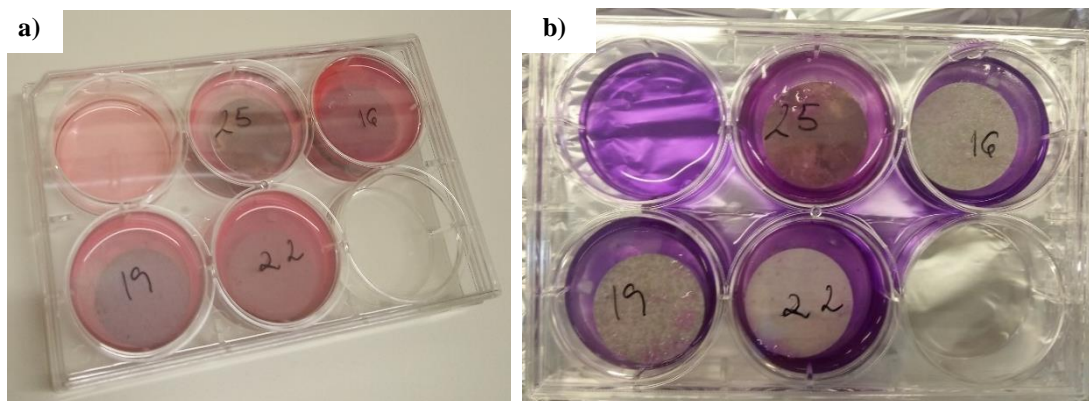


Figura 19: Placas de 6 poços com as amostras. a) Placa de 6 poços com as amostras incubadas com fibroblastos em meio DMEM suplementado; b) Placa de 6 poços com amostras submersas em meio DMEM contendo 10% de PrestoBlue.

Após 24 horas, removeu-se o meio de cultura dos poços e adicionou-se 4 mL de meio DMEM com 10% (v/v) de PrestoBlue (resazurina). As placas foram incubadas durante 3,5 horas a 37°C, em atmosfera humidificada e com 5% CO₂ (Fig 19). De seguida recolheu-se uma amostra de 100 µl de cada poço e colocou-se numa placa de 96 poços para proceder à medição da fluorescência. Para o efeito utilizou-se um leitor multimodo de microplacas (FilterMax F5), efetuando-se a determinação da intensidade da fluorescência para excitação a 535 nm e emissão a 625 nm. As células viáveis reduzem a resazurina

convertendo-a em resorufina que emite fluorescência permitindo determinar a percentagem de células viáveis em cada amostra.

A análise estatística foi realizada, tendo-se obtido as médias e desvios padrão para cada tipo de amostras. A análise da variância foi realizada recorrendo ao método “*One-way analysis of variance (ANOVA)*”, foram utilizadas as percentagens obtidas da viabilidade celular e foi utilizado $\alpha=0,05$, foi ainda considerado $p<0,05$ como sendo estatisticamente relevante. Posteriormente foi realizada outra análise recorrendo ao método de Tukey, de forma a determinar a relevância da diferença estatística entre cada 2 grupos de amostras, para $\alpha=0,05$.

4.6 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Das amostras produzidas foram submetidas a ensaios de espectroscopia de impedância eletroquímica: 2 de PEO+Hidrotérmico, 2 de PEO+PCL, 3 de PEO e 2 Simples, de modo a avaliar a resistência à corrosão dos diferentes tipos de revestimentos das amostras. Para a realização destes ensaios foi preparada uma solução de SBF de acordo com o procedimento descrito em [95] e com as concentrações descritas por Kokubo *et al* [96] (tabela 10).

Tabela 10: Reagentes e concentrações utilizados na solução de SBF

Reagentes	Concentração (g/L)
NaCl	7,996
NaHCO ₃	0,350
KCl	0,224
K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O	0,228
MgCl ₂ •6H ₂ O	0,305
HCl (1M)	40 mL/L de solução
CaCl ₂	0,278
Na ₂ SO ₄	0,071
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057

A solução de SBF foi utilizada por possuir uma concentração iónica idêntica à do plasma humano (tabela 11). Existem várias soluções que de forma mais simples ou mais complexa tentam replicar o plasma humano, tendo como principal requisito a concentração iónica sendo que algumas destas soluções incluem também a presença de proteínas e/ou aminoácidos. A solução de SBF não contempla nenhum tipo destas moléculas na sua composição. [34]

Tabela 11: Comparação da concentração iónica do plasma humano com a solução de SBF (mmol⁻¹) e do pH [11]

	Na ⁺ (mmol ⁻¹)	K ⁺ (mmol ⁻¹)	Mg ⁺ (mmol ⁻¹)	Ca ⁺ (mmol ⁻¹)	HCO ₃ ⁻ (mmol ⁻¹)	Cl ⁻ (mmol ⁻¹)	HPO ₄ ²⁻ (mmol ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ (mmol ⁻¹)	pH
Plasma Humano	142,0	5,0	1,5	2,5	27,0	103,0	1,0	0,5	7,2-7,4
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	4,2	147,8	1,0	0,5	7,4

Para a realização dos testes de espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizado um potenciostato Gamry® Ref. 600+ com *software* Gamry® *Framework*, e uma célula de três eléctrodos em que a amostra funciona como eléctrodo de trabalho, com um eléctrodo de calomelanos saturado como eléctrodo de referência

e com contra elétrodo de platina (Figura 20). Foram utilizadas perturbações de potencial com uma amplitude de 10 mV (rms), frequência inicial de 50 kHz, frequência final de 10 mHz, com 7,13 pontos por década e 300 s de estabilização inicial. A impedância foi medida em 5 momentos após a introdução das amostras na solução de SBF: 1, 24, 48, 72 e 168 horas. A célula foi mantida dentro de uma câmara climática Memmert HPP 260 (que também funcionou como gaiola de Faraday), mantendo-se uma temperatura constante de 37°C, durante todo o processo. Terminado o ensaio as amostras foram lavadas com água Millipore®, secas ao ar e armazenadas no exsiccador.

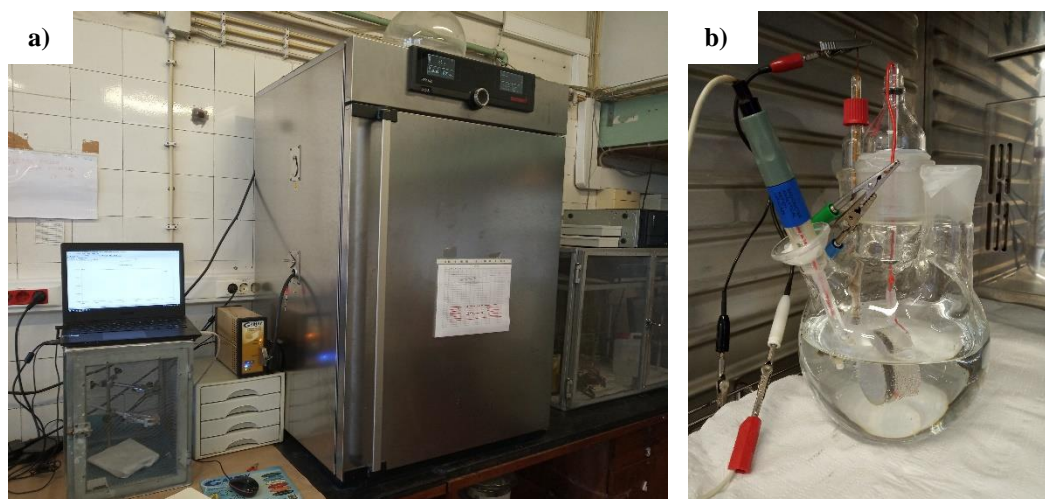


Figura 20: a) Equipamento utilizado para realização dos testes de impedância eletroquímica. b) Célula utilizada

4.7 Difração de Raios X

A análise de difração de raios X foi realizada com recurso ao difractor de raios X Philips PW, utilizando uma fonte de raios X CuK_α , com comprimento de onda 1,542 Å, voltagem de 40kV e intensidade de corrente de 30mA. Foram ainda utilizados um incremento de 0,05° e uma variação de 0,5 s entre cada medição. Posteriormente os dados foram analisados recorrendo ao *software* Match! (versão 3.11.0.180) e à base de dados COD (Crystallography Open Database). Para o PCL foram utilizados os picos referidos por Rezaei e Mohammadi [97].

4.8 Análise Metalográfica

Um dos discos da liga AZ31 foi polido nas lixas de carboneto de silício: P320, P600, P1200, P2400 e P4000, no pano de 3 µm com suspensão de diamante e no pano OPS, com água Millipore® corrente durante 2 minutos. As amostras foram lavadas com água e sabão, etanol, e secas com um secador. A contrastação foi realizada numa solução de Picral: 10mL de ácido acético (99%), 4,2g de ácido pícrico, 10mL de água Millipore® e 70mL de etanol (75%), por um período de 6 segundos. A contrastação foi parada com água corrente, as amostras foram lavadas com água Millipore®, etanol e secas com um secador. A análise microscópica foi realizada no microscópio Leica DM 2700M.

A medição da área e diâmetro médio de grão foi realizada com o *software* ImageJ.

4.9 Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

Uma amostra de cada tipo de revestimento (PEO; PEO+Hidrotérmico; PEO+PCL) foi analisada no topo e na secção transversal no microscópio eletrônico de varrimento Hitachi® S2400 equipado com um detetor de elementos de baixo número atômico EDS Bruker®. As amostras foram revestidas com um filme condutor de ouro-paládio (Au-Pd).

5. Resultados e Discussão

5.1 Análise Estrutural e Morfológica

5.1.1 Microscópio Ótico

A análise metalográfica realizada à amostra simples (figura 21) revelou uma microestrutura constituída por grãos de fase- α , estando esse resultado concordante com as análises metalográficas realizadas por Sunil *et al* [43], Pardo *et al* [44], Chamos *et al* [45] e Feliu (Jr) *et al* [58]. Na figura não são observáveis precipitados ou sinais de uma segunda fase, como a fase- β , referida na secção 1.3, desta dissertação.

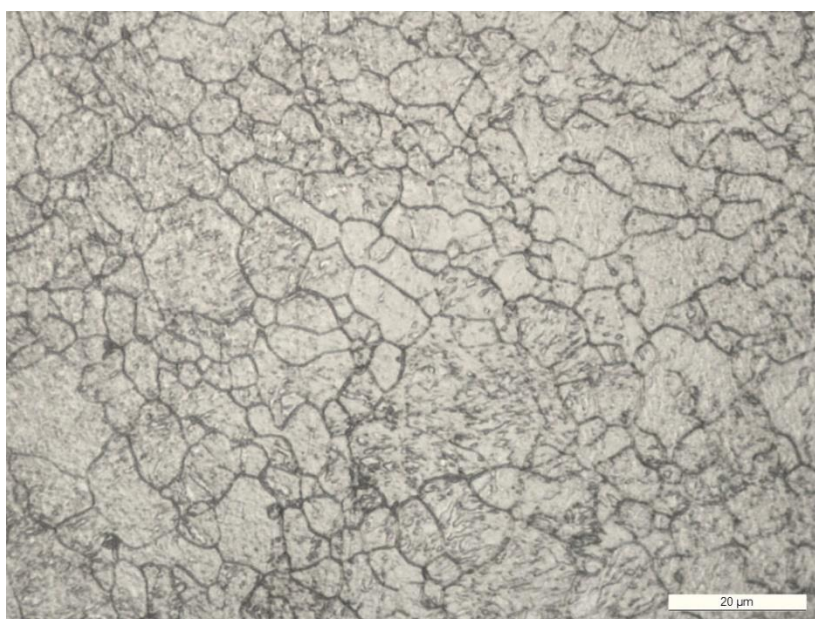


Figura 21: Microestrutura da amostra simples

Utilizando o *software* ImageJ foram realizadas 200 medições de 3 imagens de locais diferentes da amostra e que permitiram obter uma área de grão média de $35,78 \mu\text{m}^2$, com desvio padrão de $37,54 \mu\text{m}^2$. O valor da área permitiu obter o diâmetro médio de grão: $6,75 \mu\text{m}$, que corresponde a um tamanho de grão ASTM 12.

5.1.2 Difração de Raios X

A análise dos padrões de raios X obtidos permitiu identificar as fases cristalográficas presentes nas amostras (figura 22). O padrão para a amostra simples (material base) revelou a presença de uma só fase: Mg- α . Apesar de o diagrama de fases Al-Mg sugerir a presença da fase $\text{Al}_{12}\text{Mg}_{17}$, a mesma não foi identificada nesta análise, estando estes dados de acordo com a análise metalográfica realizada.

Os dados da amostra Simples confirmam os resultados obtidos na análise de raios X realizada por Albuquerque [2] e outros autores ([43], [63]). Para esta amostra foram ainda identificados óxido de magnésio (MgO) e hidróxido de magnésio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$), que se formam pelas equações 7 e 6, respetivamente. A intensidade reduzida dos picos de MgO e $\text{Mg}(\text{OH})_2$ é indicadora de uma camada superficial de reduzida espessura formada por estes dois compostos.

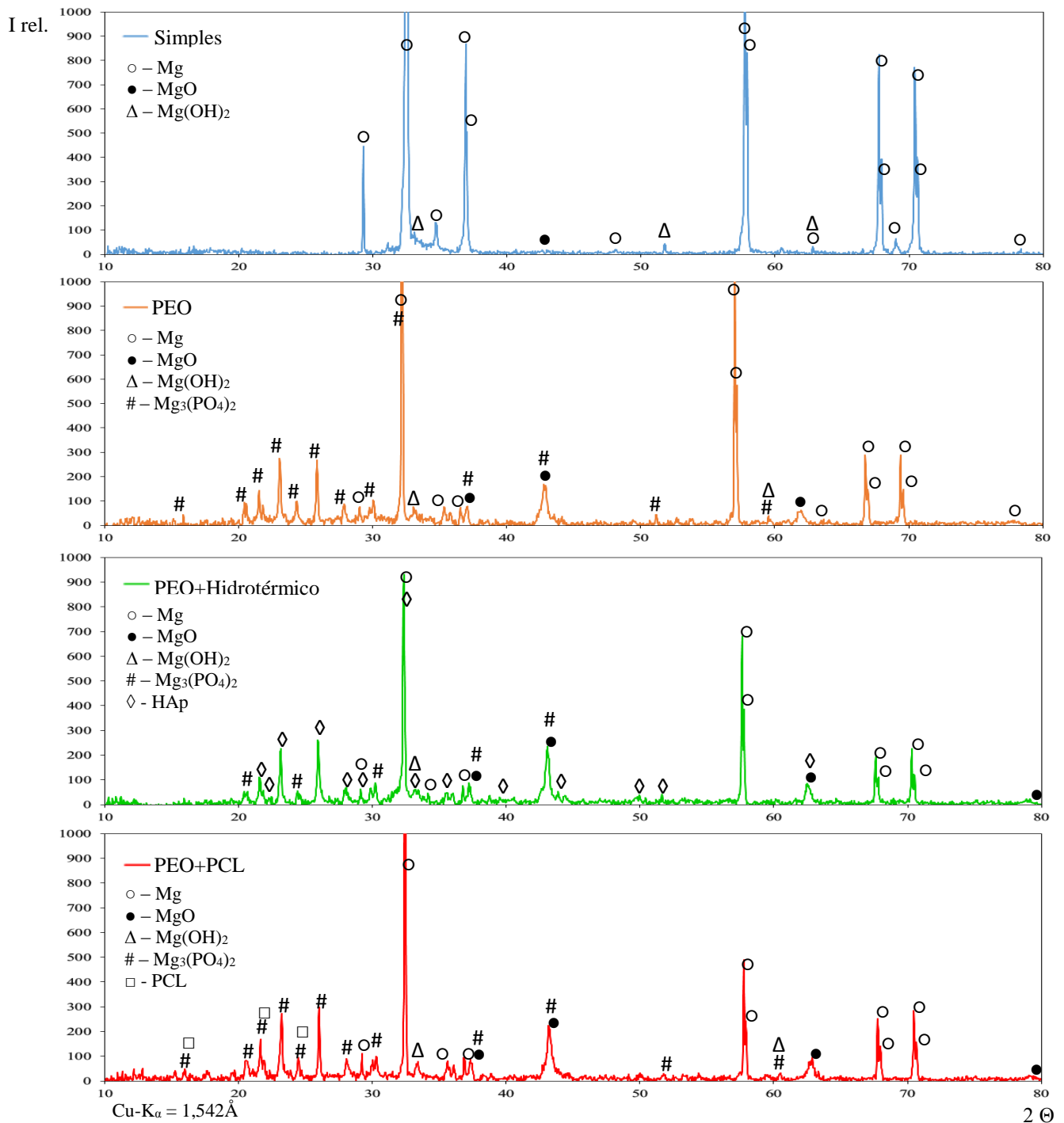


Figura 22: Padrões de raios X obtidos para os 4 tipos de amostras utilizadas: Simples; PEO; PEO+Hidrotérmico; PEO+PCL. Os símbolos utilizados para identificar os picos seguem a seguinte legenda: ○ — Mg; ● — MgO; Δ — Mg(OH)₂; # — Fosfato de Magnésio (Mg₃(PO₄)₂); ◇ — Hidroxiapatite; □ — PCL

O padrão de raios X para a amostra PEO, para além dos picos identificados previamente como sendo de Mg-α e Mg(OH)₂, apresentou picos de MgO de maior intensidade. A presença deste óxido é facilmente explicada pela formação de uma camada de óxidos e hidróxidos de espessura muito superior à camada

existente na amostra Simples. Para além destes picos foram também identificados vários picos que foram atribuídos ao fosfato de magnésio ($Mg_3(PO_4)_2$), que se forma de acordo com a equação 10.

No padrão de raios X resultante da análise da amostra de PEO+Hidrotérmico foram identificados picos de Mg- α , MgO, Mg(OH) $_2$, fosfato de magnésio ($Mg_3(PO_4)_2$) e hidroxiapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), que se forma de acordo com a equação 11. A menor intensidade dos picos referentes ao Mg é explicada pela menor deteção deste elemento, provocada pelo aumento da espessura do revestimento, bem como pela presença em menor quantidade deste elemento, uma vez que o revestimento é formado principalmente por fosfatos e não por óxidos e hidróxidos como acontecia para o revestimento de PEO.

Por último, o padrão de raios X para a amostra tratada com PEO+PCL revelou a presença de todos os picos identificados para a amostra de PEO. Os picos referentes ao PCL (polímero semicristalino) encontram-se praticamente sobrepostos pelos picos de fosfato de magnésio, uma vez que partilham ângulos de difração idênticos, sendo os picos de PCL caraterísticos para ângulos 2θ : 15,7 $^\circ$; 21,5 $^\circ$; 23,8 $^\circ$. [97]

A fraca intensidade dos picos de PCL é explicada pela reduzida quantidade existente na amostra, dado que foi depositada apenas uma camada de reduzida espessura deste polímero.

5.1.3 Medição de Espessura

Na tabela 12 apresentam-se os resultados das espessuras médias e respetivos desvios padrão dos revestimentos obtidos com os tratamentos de oxidação eletrolítica por plasma (PEO) e posterior tratamento hidrotérmico. As medições foram realizadas com o medidor de espessura Elcometer[®].

Os resultados apresentados na tabela 12 demonstram que o tratamento de PEO produz uma camada de óxidos com uma espessura média de 66,2 μm . Por sua vez o tratamento hidrotérmico provoca um aumento da espessura da camada de óxidos para um valor médio de 69,0 μm , um aumento face à espessura obtida no tratamento de PEO de 2,8 μm .

A taxa de crescimento da camada de PEO foi em média de 6,6 $\mu m/min$, um valor superior aos obtidos nos estudos realizados por Arrabal *et al* [62] e Albuquerque [2]. A espessura total dos revestimentos nas amostras PEO e PEO+Tratamento Hidrotérmico foram superiores aos registados por Albuquerque [2], para as mesmas condições.

Uma vez que as medições foram realizadas em diferentes locais da amostra, e que cada valor registado resulta de uma média de 15 valores, sendo o desvio padrão um valor reduzido, podemos afirmar que a espessura da camada de óxidos crescida nas amostras é homogénea. A não uniformidade da amostra ao nível microscópico e a porosidade podem explicar os valores do desvio padrão que são, em geral, reduzidos.

Tabela 12: Espessuras dos revestimentos obtidos após tratamento de PEO e Tratamento Hidrotérmico. O valor para cada amostra resulta de uma média de 15 medições realizadas com o medidor de espessura Elcometer®

Número da Amostra	Após tratamento de PEO		Após Tratamento Hidrotérmico	
	Média (µm)	Desvio Padrão (µm)	Média (µm)	Desvio Padrão (µm)
1	66,9	7,2	70,8	4,8
2	65,9	4,5	67,6	4,7
3	62,7	5,5	63,2	7,0
4	67,9	6,8	72,4	7,2
5	63,5	5,1	74,1	8,2
6	65,6	5,5	71,2	6,3
7	66,9	4,9	69,0	7,0
8	66,4	5,0	68,4	7,9
9	62,4	4,2	64,8	5,3
10	65,6	3,8	—	—
11	68,1	5,7	—	—
12	65,6	5,9	—	—
13	66,4	8,2	—	—
14	67,1	6,8	—	—
15	67,4	6,1	—	—
16	69,8	6,8	—	—
17	64,9	7,7	—	—
18	64,3	4,2	—	—
19	64,2	4,2	—	—
20	67,0	5,7	—	—
21	66,0	5,0	—	—
22	66,5	4,7	70,8	4,2
23	69,4	4,3	68,9	6,0
24	66,5	8,3	66,7	6,5
33	68,9	3,7	—	—
34	64,3	4,9	—	—
35	66,5	5,4	—	—
36	67,0	5,8	—	—
37	64,9	4,9	—	—
38	65,5	6,0	—	—
39	67,3	4,8	—	—
Média	≈66,2		≈69,0	

5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

A técnica de microscopia eletrônica de varrimento foi utilizada para analisar a superfície e a secção transversal de todos os tipos de amostras produzidos.

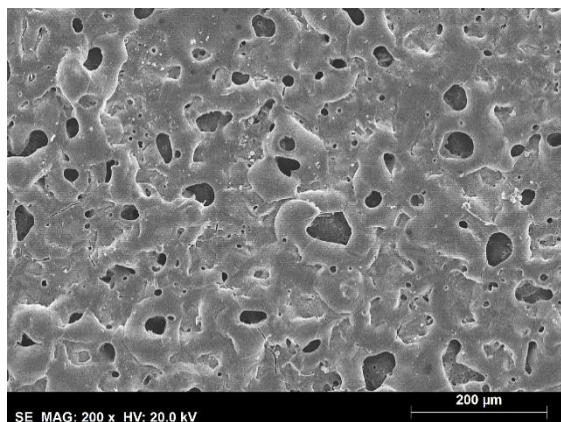


Figura 23: Micrografia SEM: amostra 39 tratada com PEO

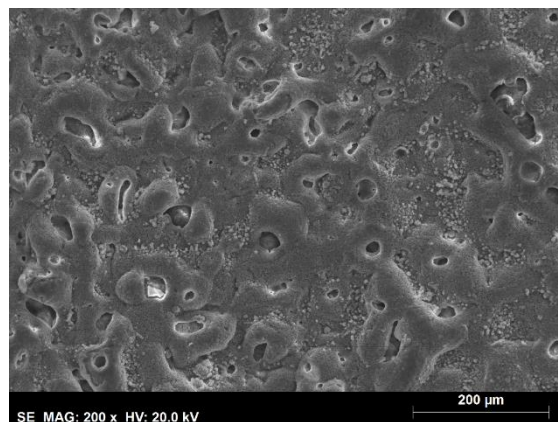


Figura 24: Micrografia SEM: amostra 6 tratada com PEO+Hidrotérmico

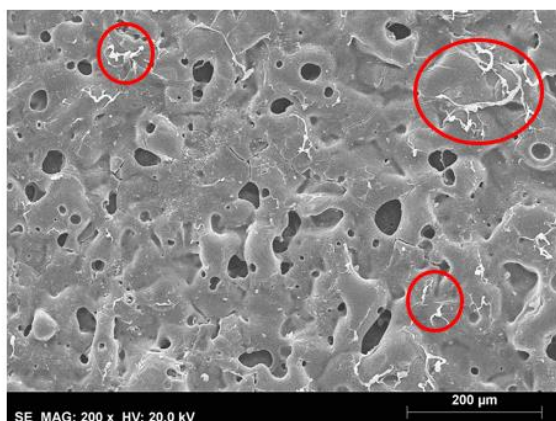


Figura 25: Micrografia SEM: amostra 12 tratada com PEO+PCL. Os círculos vermelhos identificam as fibras de PCL

A análise das amostras no SEM permitiu verificar que os poros da amostra de PEO (figura 23) apresentam um diâmetro médio superior aos da amostra de PEO+Hidrotérmico (figura 24), provando que o tratamento hidrotérmico resulta na diminuição do diâmetro dos poros. Os dados estão de acordo com a bibliografia [74, 71, 2]. O tamanho médio dos poros nestas duas amostras foi registado na tabela 13.

A amostra tratada com PEO+PCL (figura 25) apresenta fibras de polímero (PCL) um pouco por toda a amostra (identificadas por círculos vermelhos na figura 25). Estas fibras são explicadas por uma dissolução deficiente das fibras de PCL no clorofórmio, no processo de produção da solução utilizada na técnica de imersão. A solução para este problema passa por aumentar o tempo de agitação utilizado, ou por modificar o mecanismo de agitação utilizado, aplicando, por exemplo, frequências ultrassónicas.

Tabela 13: Medições do diâmetro médio dos poros. Os valores resultam de uma média de 30 medições para 15 poros, em cada amostra

Amostras	Diâmetro médio dos poros (μm)	Desvio padrão (μm)
39 (PEO)	24,92	16,24
6 (PEO+Hidrotérmico)	22,38	13,56

A amostra tratada com PEO apresenta uma gama de tamanho de poros mais variada, explicando assim o valor de desvio padrão mais elevado, comparativamente à amostra tratada com PEO+Hidrotérmico. Para ambas as amostras o desvio padrão deve-se à grande variedade existente no tamanho dos poros.

Nas três amostras são identificáveis fendas. A sua formação pode acontecer durante o tratamento de PEO, pela diferença de temperaturas entre a descarga de plasma e a temperatura do banho, ou podem ainda formar-se devido ao vácuo que é necessário criar para analisar as amostras no SEM.

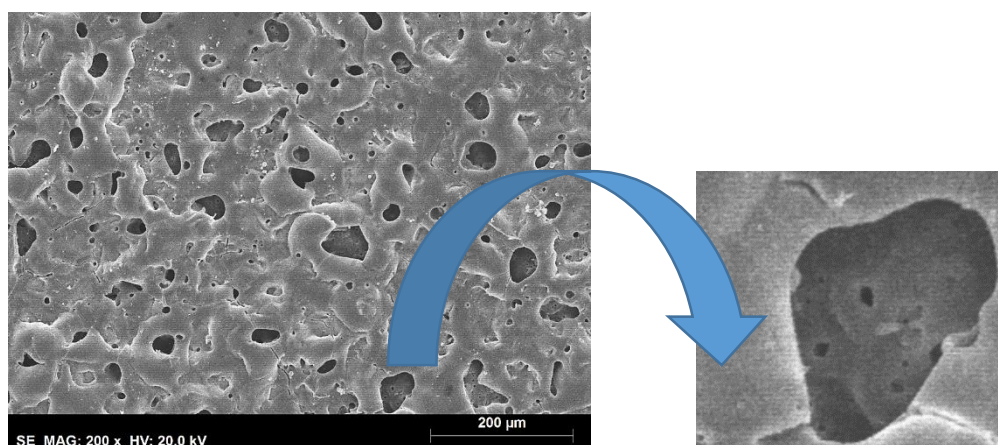


Figura 26: Amostra 39 (PEO), pormenor de um poro

Na amostra 39 (PEO) são observáveis poros de menor dimensão dentro dos poros superficiais (figura 26), demonstrando que o revestimento não apresenta apenas porosidade superficial, e que existe uma ligação entre os poros, a interconectividade dos poros referida na secção 2.7, desta dissertação. Para as amostra 6 (PEO+Hidrotérmico) e 12 (PEO+PCL) também são observáveis poros referentes à interconectividade, sendo que na amostra 6 (PEO+Hidrotérmico) existem em menor quantidade. A presença de interconectividade de poros nos revestimentos obtidos com PEO foi identificada por Moon *et al* [98] para a liga AZ31, e por Alves *et al* [99] para titânio.

A secção transversal do revestimento permite apenas observar alguns poros, não sendo possível observar a extensão real da porosidade e a interconectividade dos poros. Uma estratégia possível de realizar para observar a porosidade total existente no revestimento passa por depositar resina epóxi sobre a superfície do revestimento, e aplicar vácuo. Terminada a cura da resina a amostra é mergulhada numa solução ácida que dissolve todo o revestimento, deixando como resultado final um negativo tridimensional da porosidade do revestimento. No entanto, o negativo tridimensional irá apenas revelar a porosidade aberta e com interconectividade dos poros, não sendo possível revelar a porosidade fechada presente no revestimento. Esta técnica foi aplicada por Moon *et al*. [98]

Foram realizadas análises EDS na superfície das diferentes amostras, obtendo-se os resultados que se apresentam na tabela 14.

Tabela 14: Percentagem atômica dos elementos identificados no SEM-EDS das diferentes amostras

Amostras	Elementos (% At)								Rácio Ca/P
	Mg	Al	Zn	O	C	P	Na	Ca	
Simples	95,5	1,19	1,93	1,39	-	-	-	-	-
PEO (39)	19,39	-	1,6	43,18	20,83	10,12	4,51	0,36	0,035
PEO+Hidrot. (6)	3,32	0,18	-	43,83	16,62	14,62	1,62	19,8	1,354
PEO+PCL (12)	11,36	0,2	-	31,7	47,7	6,41	2,62	-	-

A análise da amostra Simples (tabela 14) apresentou dados coerentes com a composição da liga. Foi identificada uma baixa quantidade de oxigênio (O), o que leva a considerar que a superfície estava muito pouco oxidada e que a existir, a camada de óxidos seria de espessura muito reduzida.

A análise realizada à superfície da amostra 39 (PEO) permitiu perceber que os elementos majoritariamente presentes são: Mg, O e P (tabela 14). A camada superficial da amostra deverá então ser majoritariamente constituída por óxido e hidróxido de magnésio (MgO, Mg(OH)₂) e fosfatos de magnésio. As quantidades de Mg e Zn diminuíram, enquanto o Al desapareceu, indicando que se formou uma camada suficientemente espessa que evitou que a detecção destes elementos fosse tão intensa como no substrato (amostra Simples). Além deste fator, a diminuição percentual de magnésio detetada deve-se a um aumento das quantidades de oxigênio e fósforo detetadas e que foram incorporadas no revestimento de PEO. O rácio cálcio/fósforo permitiu perceber que não existiu formação de hidroxiapatite para esta amostra. A quantidade de cálcio identificada na amostra deve-se muito provavelmente a solução que ficou aprisionada na porosidade e não a um elemento que faça parte do revestimento cerâmico, uma vez que no tratamento de PEO a liga AZ31 atua como ânodo e, como tal, não tem tendência para atrair iões positivos como o Ca²⁺. A superfície da amostra apresentou homogeneidade composicional em toda a sua extensão.

A amostra 6 (PEO+Hidrotérmico) apresentou uma superfície menos uniforme topograficamente do que a amostra 39 (PEO), como se pode observar pelas figuras 27 a) e b), sendo possível observar para a amostra 6 estruturas esféricas na superfície. A análise de EDS realizada na superfície da amostra 6 revelou que os principais elementos presentes eram O, Ca e P, indicando que a superfície é muito provavelmente constituída por fosfatos de cálcio, de que é exemplo a hidroxiapatite.

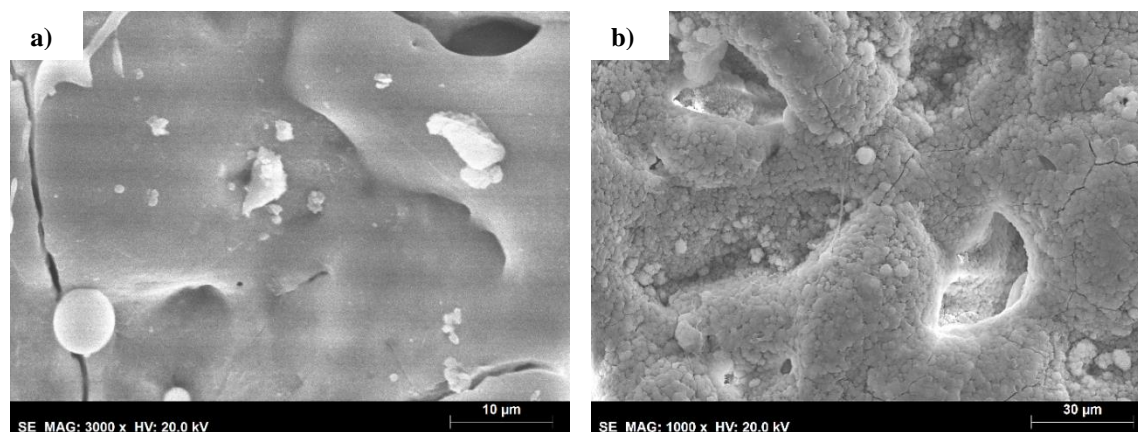


Figura 27: Detalhes das superfícies das amostras 39 (a) e 6 (b)

Na amostra submetida 6 (PEO+Hidrotérmico) há uma diminuição da quantidade de Mg detetada, que é explicada pela detecção de outros elementos presentes, como o Ca ou o P, que se encontram em maior quantidade do que o Mg na zona mais próxima da superfície do revestimento. Os aumentos de P e Ca poderão ser explicados pela formação e hidroxiapatite, no entanto, o rácio Ca/P para esta amostra fica ainda abaixo do rácio ideal (1,67), como se pode observar na tabela 14. Deverá ser considerado que a pré existência de P no revestimento de PEO poderá afetar a correta identificação do rácio real de Ca/P existente na camada depositada no tratamento hidrotérmico. A quantidade de O permaneceu praticamente constante relativamente à amostra 39 (PEO).

As percentagens atómicas registadas para as amostras PEO e PEO+Hidrotérmico foram idênticas às registadas por Tian *et al* [74], em especial para as amostras tratadas com Tratamento Hidrotérmico dado que as soluções utilizadas eram iguais, enquanto para o tratamento de PEO as soluções foram diferentes, existindo nas amostras do artigo Si e F em vez do P utilizado nesta dissertação.

A amostra tratada com PEO+PCL, comparativamente com a amostra de PEO, sofreu um claro aumento da quantidade de C (tabela 14), que é explicado pela formação da camada de PCL ($[C_6H_{10}O_2]_n$). Em comparação com a amostra 39 (PEO), praticamente todos os elementos, à exceção do C, aparecem em menor quantidade. Foram realizadas análises pontuais às fibras presentes na superfície e ao substrato onde não era notória a presença de fibras. Esta análise revelou presença de maiores percentagens de C, e menores percentagens de O nas fibras, em comparação com a análise realizada na restante superfície. Foi realizada uma análise pontual de EDS nas fibras e fora delas, tendo-se obtido 71,98% C na fibra e 39% C na zona sem fibras, revelando que há um aumento da quantidade de carbono em toda a superfície relativamente à amostra tratada apenas com PEO, e comprovando que existe uma camada de PCL que reveste toda a superfície.

A análise da tabela 14 permite relacionar as percentagens dos elementos com os compostos existentes, ainda que de forma pouco precisa uma vez que a análise de SEM-EDS é menos precisa para elementos de menor número atómico como é o caso do carbono. Na difração de raios X da amostra de PEO foram identificados os compostos: MgO, Mg(OH)₂ e Mg₃(PO₄)₂. Tendo em conta que o fósforo só existe num dos

compostos, será de esperar que todo o fósforo identificado na análise de SEM-EDS esteja sob a forma de $Mg_3(PO_4)_2$. Considerando a percentagem de fósforo (10,12%) e atendendo à estequiometria do composto é possível determinar que são necessários 15,18% de Mg e 40,48% de O para que exista $Mg_3(PO_4)_2$ no revestimento de PEO. Subtraindo essas percentagens às iniciais, que se encontram na tabela, é possível perceber que sobram 4,21% de Mg e 2,7% de O, não sendo essas percentagens suficientes para garantir a presença de MgO e $Mg(OH)_2$. No entanto, como referido anteriormente, esta análise não é precisa e como tal é possível que o óxido de magnésio e o hidróxido existam no revestimento da amostra de PEO.

O mesmo raciocínio foi utilizado para a amostra de PEO+Hidrotérmico, para a qual foram identificados na difração de raios X os compostos: hidroxiapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), fosfato de magnésio ($Mg_3(PO_4)_2$), hidróxido de magnésio ($Mg(OH)_2$) e óxido de magnésio (MgO). Como a hidroxiapatite é o único composto com Ca, todo o cálcio deverá estar no revestimento sob a forma de hidroxiapatite, tendo em conta a estequiometria do composto é possível determinar que serão necessários 11,88% de P e 51,48% de O. Apesar de existir a quantidade suficiente de P para formar o composto, não foi identificado O suficiente nesta análise. No entanto, a quantidade de O varia ao longo da superfície do revestimento. Tendo ainda em conta a percentagem de P destinada à hidroxiapatite, sobram 2,74% de P e 3,32% de magnésio, colocando a hipótese da existência de $Mg_3(PO_4)_2$ e/ou MgO e $Mg(OH)_2$, como identificado na difração de raios X, ainda que não exista quantidade suficiente de O para formar estes compostos.

A análise da secção transversal das amostras foi realizada, de forma a investigar a morfologia e espessura dos revestimentos e a variação composicional na direção perpendicular ao revestimento.

A observação da área transversal da amostra 39 (PEO), representada na figura 28, permite distinguir três camadas: uma camada inferior densa e de pouca espessura; uma camada intermédia que apresenta alguma porosidade, ainda que de diâmetro reduzido, e espessura intermédia entre as duas outras camadas; e por fim uma camada superior de maior espessura e que apresenta mais porosidade e de maior diâmetro.

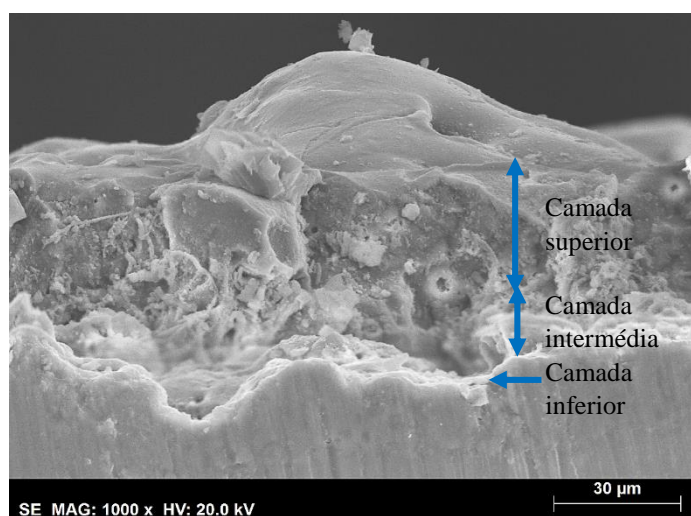


Figura 28: Corte transversal da amostra 39 (PEO)

A análise de SEM-EDS realizada ao longo da secção transversal (figura 29) revelou uma diminuição acentuada da quantidade de magnésio na transição entre o substrato e a camada inferior, ao mesmo tempo foi registado um aumento da quantidade de oxigénio e fósforo. A quantidade de magnésio diminuiu ao longo da secção transversal, o fósforo manteve-se constante e o oxigénio diminuiu consideravelmente na transição entre a camada intermédia e a camada superior. A diminuição abrupta por volta dos 35 μm deve-se exclusivamente a uma alteração do plano da secção transversal e não a uma diminuição real da quantidade dos elementos, que deveria ser contínua. A diminuição contínua do magnésio e a diminuição do oxigénio levam a concluir que a quantidade de óxidos de magnésio presentes no revestimento de PEO é progressivamente menor ao longo da espessura, existindo portanto maior quantidade destes compostos na camada inferior, menor quantidade na camada intermédia e ainda menos na camada superior.

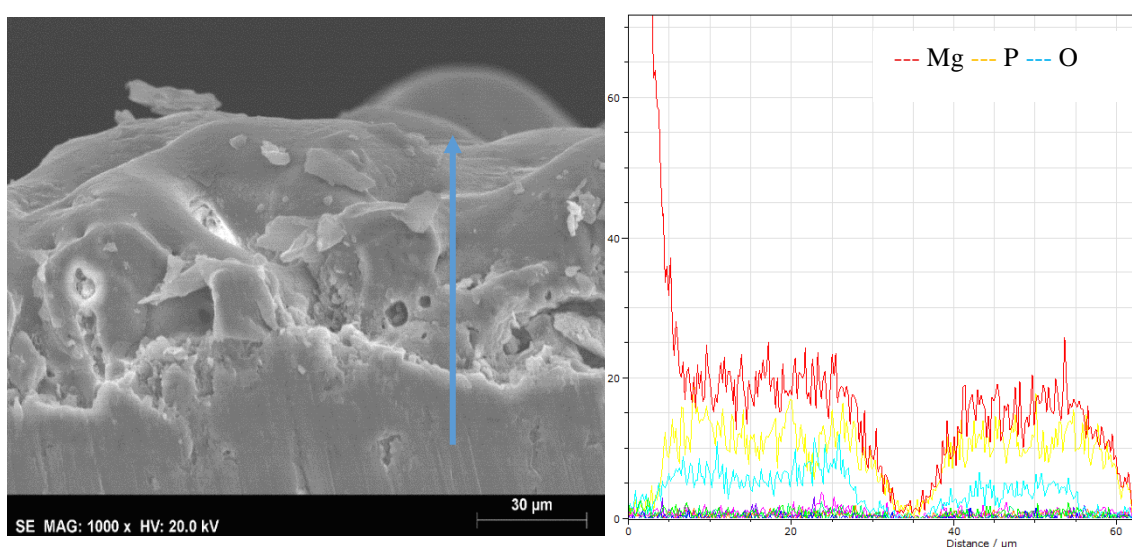


Figura 29: Análise SEM-EDS da secção transversal da amostra 39 (PEO)

A espessura média das 3 camadas do revestimento de PEO da amostra 39 foi medida e registada na tabela 15. O valor médio da espessura total do revestimento, 53,18 μm , obtido através de 20 medições em diferentes micrografias, é menor que o valor registado no medidor de espessura Elcometer®: 67,3 μm (tabela 12) para esta amostra. Os dados da tabela 15 demonstram que a camada inferior é a menos espessa, que a camada intermédia possui uma espessura intermédia, e que a camada superior é a mais espessa das três. A classificação em 3 camadas e a relação de espessura entre elas são coerentes com o artigo elaborado por Arrabal *et al* [62]. A espessura da camada superior neste trabalho tem um valor correspondente a 72% da espessura total do revestimento, valor que é bem distante dos 20 a 40% referidos por Arrabal *et al* [62], contudo, é importante referir que a transição entre a camada intermédia e superior não é facilmente identificável e que isso, bem como a diferença de parâmetros utilizados relativamente ao artigo de Arrabal *et al* [62], constituem possíveis razões que explicam a discrepância entre os valores. Os desvios padrões registados demonstram que existe uma grande variação na espessura das 3 camadas, demonstrando uma não uniformidade das camadas, como é observável na figura 28.

Tabela 15: Espessuras das camadas do revestimento de PEO. Os valores registados para cada espessura resultam de uma média de 20 medições, a partir das fotografias obtidas no SEM para a amostra 39

Amostra 39 (PEO)		
	Média (µm)	Desvio Padrão (µm)
Espessura Camada Inferior	2,40	1,10
Espessura Camada Intermédia	16,83	6,79
Espessura Camada Superior	33,96	4,96
Espessura Total	53,19	7,19

O corte transversal da amostra 6 (PEO+Hidrotérmico) permitiu observar o revestimento obtido após PEO e Tratamento Hidrotérmico. O valor registado para a espessura total do revestimento (tabela 16) resultou de 20 medições de micrografias obtidas no SEM para esta amostra. Este valor é menor que o registado na tabela 12 para a mesma amostra: 71,2 µm. O desvio padrão demonstra a não uniformidade da camada obtida com o tratamento hidrotérmico, que é observável na figura 30.

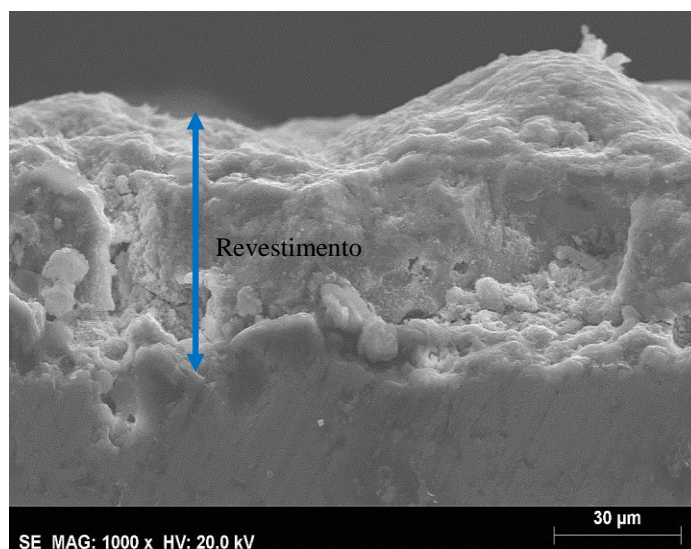


Figura 30: Corte transversal da amostra 6 (PEO + Hidrotérmico)

A análise de SEM-EDS realizada ao longo da secção transversal (figura 31) revelou uma diminuição acentuada da quantidade de magnésio na transição do substrato para o revestimento, e um aumento de fósforo e oxigénio, como registado para a amostra de PEO, no entanto a quantidade de magnésio não se manteve constante ao longo do revestimento, como se observou para a amostra 39, e diminuiu largamente. No revestimento foram detetados cálcio e fósforo, indicando a formação de fosfatos de cálcio. A análise pontual realizada no revestimento obtido após PEO e tratamento hidrotérmico revelou um rácio Ca/P = 1,57, que é característico da hidroxiapatite com défice de cálcio, como referido na secção 2.6 desta dissertação.

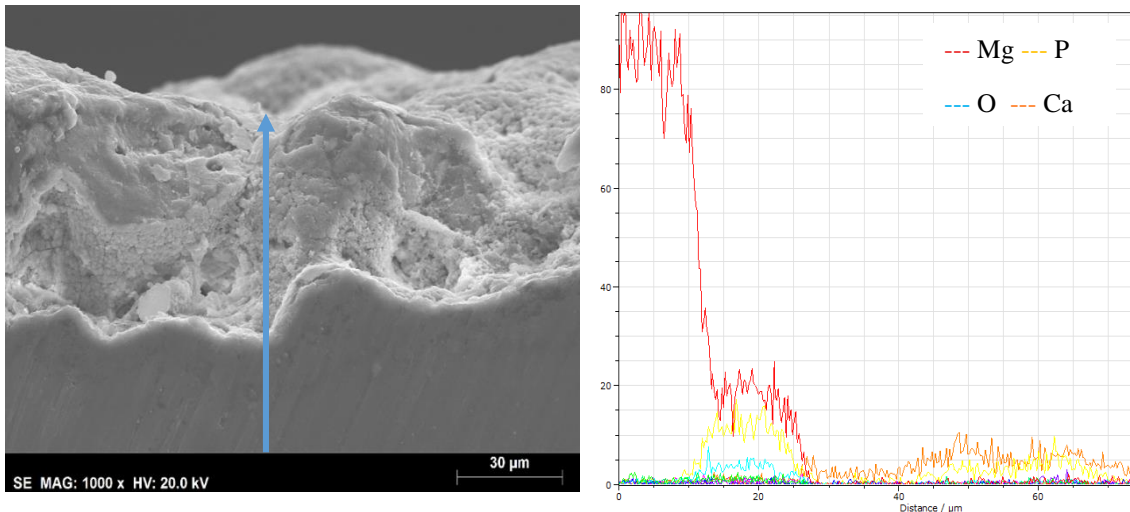


Figura 31: Análise SEM-EDS da secção transversal da amostra 6 (PEO+Hidrotérmico)

Tabela 16: Espessura do revestimento obtido após PEO e Tratamento Hidrotérmico. Os valores registados resultam de uma média de 20 medições, a partir das fotografias obtidas no SEM para a amostra 6 (PEO+Hidrotérmico)

Espessura total do revestimento após Tratamento Hidrotérmico	Amostra 6 (PEO+Hidrotérmico)	
	Média (μm)	Desvio Padrão (μm)
	54,40	7,64

A análise transversal da amostra 12 (PEO+PCL) permitiu observar a camada de PCL depositada à superfície, sendo notório em vários locais da amostra fibras do polímero, como se pode observar na figura 32.

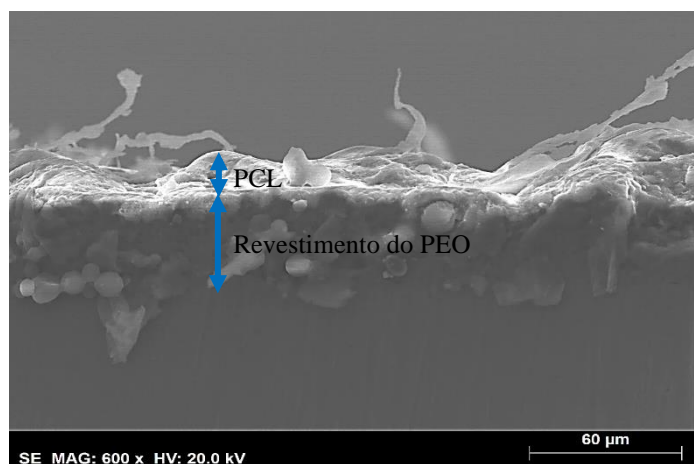


Figura 32: Corte transversal da amostra 12 (PEO+PCL)

Na secção transversal foram ainda identificadas esferas, que após a análise de SEM-EDS (figura 33) foram identificadas como sendo carboneto de silício, originárias das lixas utilizadas para realizar o polimento da amostra e que ficaram presas sob o revestimento polimérico durante o polimento. À semelhança do que aconteceu para a amostra 39 (PEO) a análise de SEM-EDS realizada ao longo da secção transversal (figura

33) permitiu identificar que na zona correspondente ao revestimento de PEO existiu uma diminuição de Mg e um aumento de O e P. Na zona mais brilhante da figura há um aumento de O e C que se devem ao PCL.

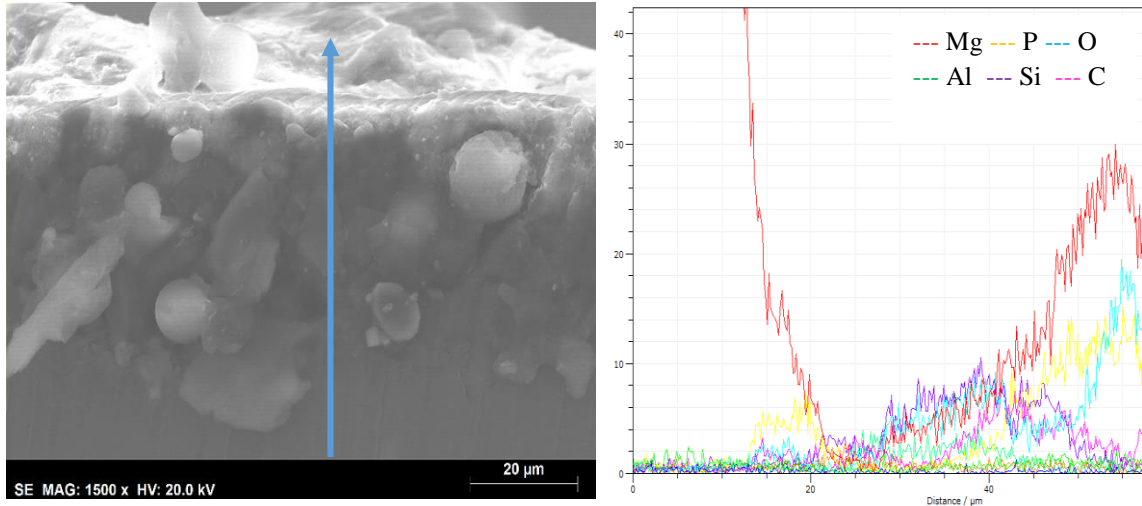


Figura 33: Análise SEM-EDS da secção transversal da amostra 12 (PEO+PCL)

5.2 Ensaios de Viabilidade Celular

Os resultados dos ensaios celulares utilizando uma linha celular de fibroblastos evidenciaram que a viabilidade celular em percentagem relativa ao controlo após 24 horas de contacto é superior para as amostras Simples, de seguida para as amostras tratadas com PEO+Hidrotérmico, em terceiro lugar as amostras tratadas com PEO+PCL e finalmente, as amostras tratadas apenas com PEO são aquelas que apresentam a percentagem mais reduzida (figura 34).

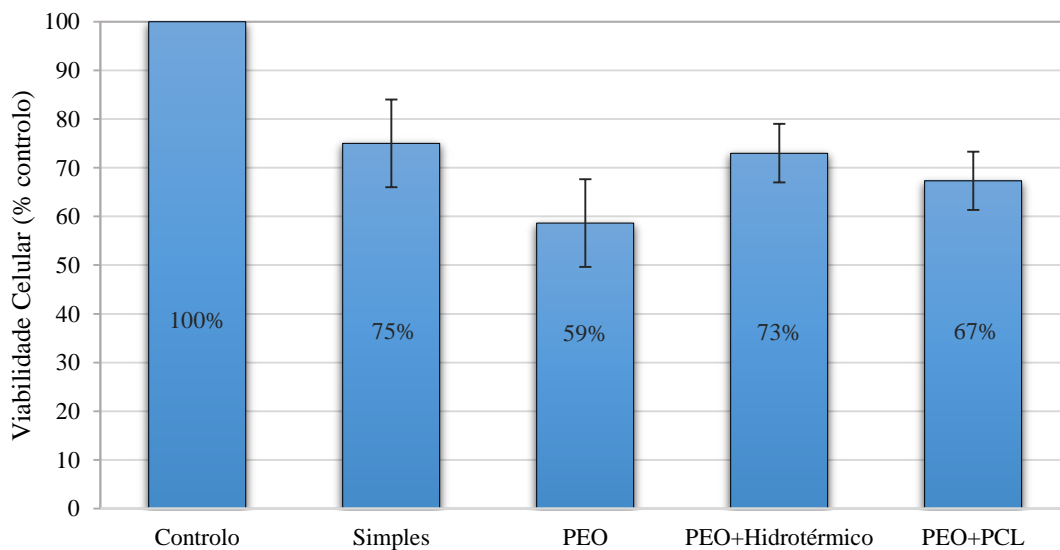


Figura 34: Taxa de viabilidade das células em cada tipo de amostra. Os resultados apresentados para cada tipo de amostra resultam da média de 3 ensaios independentes.

Na avaliação da citotoxicidade deve ser considerado que o controlo era apenas constituído por meio suplementado num dos poços da placa de 6 poços, e não continha resina epóxi. Apesar de as células não aderirem à resina, alguma impureza presente na resina, ou até a própria composição da resina pode ter efeitos na viabilidade celular, diminuindo o valor da mesma para as amostras. Também deve ser considerado que a existência de algum efeito prejudicial por parte da resina afeta igualmente todas as amostras, e como tal, a comparação entre elas não é afetada por esse fator, apenas a comparação das amostras com o controlo.

Apesar de as amostras simples apresentarem o valor mais elevado de sobrevivência das células, devido à rápida corrosão da liga de magnésio AZ31, este tipo de material não pode ser utilizado como implante ortopédico sem que seja realizado algum tipo de tratamento de revestimento da peça.

De acordo com os dados apresentados na figura 34 as amostras PEO+Hidrotérmico são aquelas que se perfilam como a melhor solução para utilizar em implantes ortopédicos.

Da análise de variância ANOVA (tabela A1 em anexo) resulta um valor “p” inferior a $\alpha=0,05$ e como tal é rejeitada a hipótese nula. A análise da mesma tabela permite ainda notar que “F” é superior ao valor de “F crítico”, ou seja, o valor de “F” encontra-se dentro da zona de rejeição da função, e como tal, mais uma vez, é rejeitada a hipótese nula. O método de Tukey (tabela A2 em anexo) realizado após a análise de variância revela a existência de uma diferença estatística significativa entre o grupo de controlo e cada um dos grupos de amostras (Simples; PEO; PEO+Hidrotérmico; PEO+PCL), para $\alpha = 0,05$. A mesma análise revela que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de amostras (Simples; PEO; PEO+Hidrotérmico; PEO+PCL), para $\alpha = 0,05$.

5.3 Espetroscopia de Impedância Eletroquímica

Os espectros de Bode e Nyquist relativos à impedância eletroquímica da amostra 28 (Simples) para 24, 48 e 168 horas encontram-se representados na figura 35.

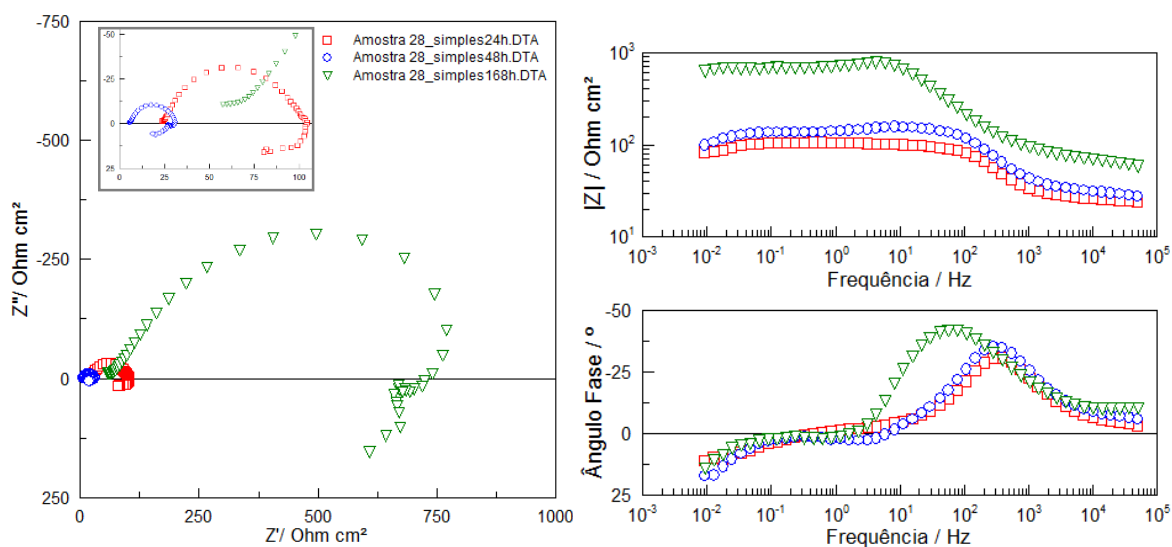


Figura 35: Diagramas de Nyquist e Bode para a impedância da amostra 28 (Simples)

A análise dos diagramas de Nyquist para a amostra simples (figura 35) permite constatar que existe uma evolução ao longo do tempo, com os valores dos gráficos a ficarem maiores ao longo do tempo. A forma dos três diagramas de Nyquist mantêm-se idêntica ao longo do tempo, sendo constituída por dois “loops” capacitivos (semicírculos), um deles quase impercetível, para frequências elevadas, normalmente associado à presença de um filme de óxidos ou produtos de corrosão, e outro para frequências moderadas, em princípio associado à reação de transferência de carga envolvida no processo de corrosão. Para frequências baixas, os gráficos descrevem um “loop” para valores positivos de Z'' , correspondente a um comportamento indutivo, encontrado frequentemente em ensaios com magnésio e suas ligas e que pode ser associado à cinética própria da corrosão deste elemento ou à instabilidade do sistema. Um possível circuito que descreve o comportamento de corrosão da liga de magnésio AZ31 é apresentado por Bland *et al* [100], e é constituído por uma resistência R_0 que representa a resistência da solução, dois circuitos RC em cascata ($R1/C1$ e $R2/C2$) e que estão em paralelo com uma associação em série de outra resistência ($R3$) e um indutor. O filme de produtos de corrosão é aqui representado pela capacidade do filme ($C1$) e pela resistência adicional da solução dentro dos seus poros ($R1$), no interior dos quais se situa a área ativa do material, onde ocorre a reação de corrosão, representada pela resistência à transferência de carga ($R2$), e pela capacidade da dupla camada ($C2$). Finalmente, a resposta indutiva é representada pelos elementos $R3$ e $L1$. O circuito equivalente utilizado para realizar os ajustes aos dados das amostras Simples 28 e 29 foi modificado a partir do circuito descrito por Bland *et al* [100], tendo sido substituídos os condensadores por elementos de fase constante (CPE), para permitir ter em conta os desvios à idealidade. O circuito utilizado encontra-se na figura 36 e na figura 37 apresenta-se um exemplo do ajuste deste circuito aos resultados experimentais, evidenciando uma excelente sobreposição dos valores experimentais aos do circuito, com os parâmetros ajustados. Este facto é corroborado pela análise dos valores de χ^2 , parâmetro que mede as diferenças entre valores experimentais e obtidos do circuito ajustado, e que deve apresentar valores na ordem dos 10^{-3} ou inferiores.

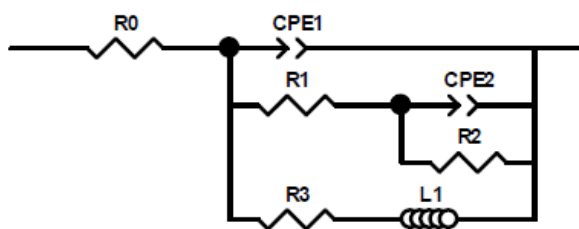


Figura 36: Circuito equivalente utilizado para descrever a impedância da amostra simples

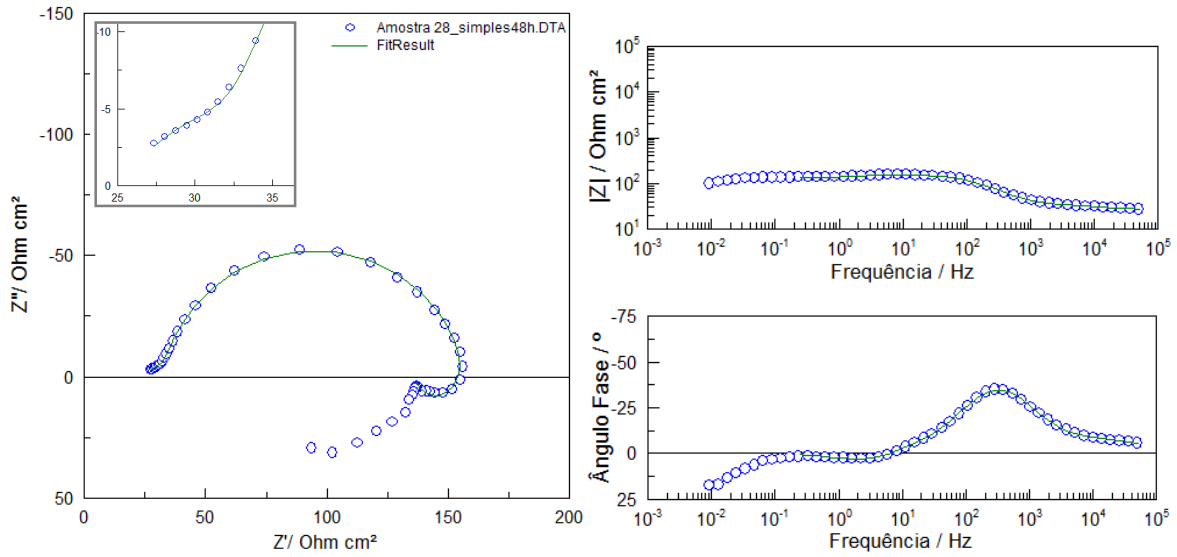


Figura 37: Ajuste do modelo da figura 36 aos dados experimentais da amostra 28 (simples) para 48 horas

Os parâmetros obtidos no ajuste do circuito aos dados experimentais estão listados na tabela 17.

Tabela 17: Dados obtidos para cada parâmetro com o circuito equivalente para a amostra simples

Parâmetros	Amostra 28 (Simples)			Amostra 29 (Simples)		
	24h	48h	168h	24h	48h	168h
R₀ (Ω cm²)	2,3E+1	2,6E+1	4,6E+1	3,0E+1	3,5E+1	3,7E+1
CPE₁-T (F cm⁻² s^p)	5,0E-5	9,8E-6	9,6E-6	3,2E-5	7,3E-6	1,1E-5
CPE₁-P	7,6E-1	8,1E-1	6,8E-1	8,0E-1	8,7E-1	7,1E-1
R₁ (Ω cm²)	1,2E+1	1,1E+1	3,5E+1	8,2	7,0	2,3E+1
CPE₂-T (F cm⁻² s^p)	3,2E-6	1,4E-5	3,9E-5	6,4E-6	2,1E-5	5,2E-5
CPE₂-P	1,1	9,0E-1	7,4E-1	9,9E-1	8,7E-1	7,1E-1
R₂ (Ω cm²)	6,8E+1	1,2E+2	1,0E+3	6,4E+1	1,3E+2	7,9E+2
R₃ (Ω cm²)	1,0E+2	6,7E+2	1,7E+3	3,3E+2	5,9E+2	1,5E+3
L₁ (H cm²)	1,6E+3	4,6E+1	1,0E+2	8,8E+2	5,3E+1	8,7E+1
R_p (Ω cm²)	4,4E+1	1,1E+2	6,5E+2	5,9E+1	1,1E+2	5,3E+2
X²	9,7E-4	2,8E-4	1,1E-3	4,1E-4	1,8E-3	1,1E-3

A análise da tabela 17 permite perceber que as amostras 28 e 29 apresentam um comportamento bastante idêntico com o aumento do tempo. É de particular interesse a evolução de R₂, já que este parâmetro está relacionado com o processo de transferência de carga. Admitindo que o ambiente local na zona ativa não varia significativamente, o marcado aumento de R₂ ao longo do tempo pode ser atribuído à diminuição da área ativa, ou seja, ao aumento da cobertura da superfície da amostra com produtos de corrosão. A resistência de polarização, dada para este circuito pela equação 30 aumenta com o aumento do tempo (tabela 17) indicando que o material apresenta maior estabilidade. Esta maior estabilidade pode ser justificada pela formação de uma camada fina de óxidos/hidróxidos de magnésio que protege o substrato.

$$R_p = \frac{1}{\frac{1}{R_1 + R_2} + \frac{1}{R_3}} \quad (30)$$

Ao contrário do que acontece com as amostras de liga AZ31 não revestida, os diagramas de Nyquist para a amostra 14 (PEO) permitem identificar uma diminuição dos valores dos espectros com o aumento do tempo da amostra na solução de SBF (figura 38).

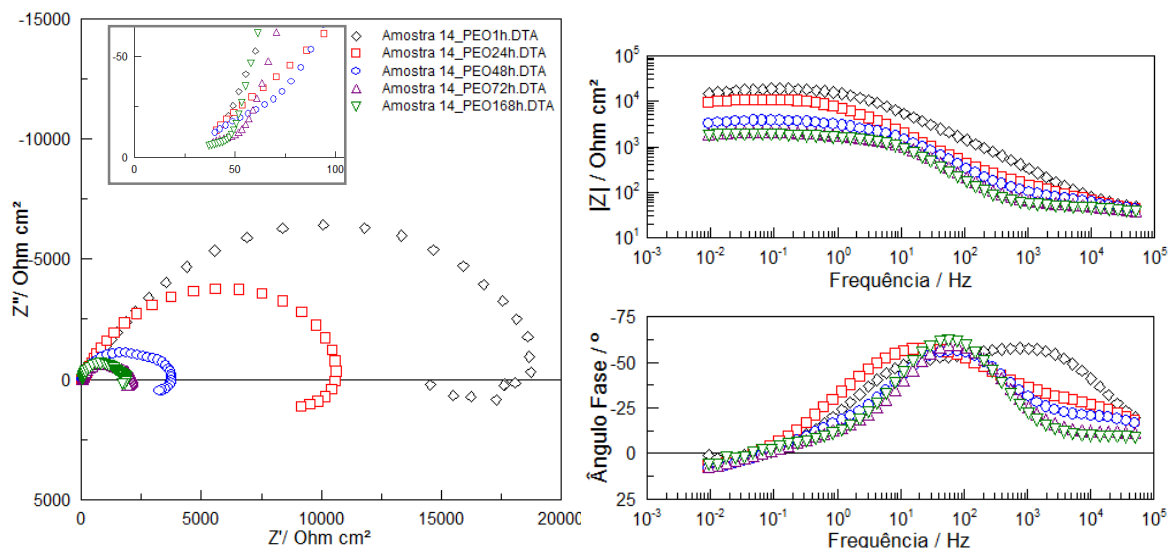


Figura 38: Diagramas de Nyquist e Bode para a impedância da amostra 14 (PEO)

A forma dos diagramas mantém-se idêntica ao longo do tempo e é caracterizada por quatro “*loops*”: três “*loops*” capacitivos: um para frequências elevadas, outro para frequências moderadas e outro para frequências moderadas-baixas, e um “*loop*” indutivo para frequências baixas.

O circuito equivalente utilizado é idêntico ao circuito utilizado para as amostras simples, mas com a adição de um circuito RC em cascata após a resistência R2. Neste novo circuito, adaptado a partir de um circuito proposto por Bland [100], representado na figura 39, o revestimento produzido no tratamento de PEO é representado pelos elementos R1 e CPE1, que representam a resistência da solução dentro dos poros do revestimento de PEO e a capacidade do revestimento, respetivamente. Os pares R2/CPE2 e R3/CPE3 em cascata e que se encontram em paralelo com a resistência R4 e o indutor L1 constituem o circuito equivalente produzido para a amostra Simples e assumem o significado que foi anteriormente explicado. Na figura 40 apresenta-se um exemplo do ajuste deste circuito aos resultados experimentais, mais uma vez evidenciando uma excelente sobreposição dos valores experimentais aos do circuito, com os parâmetros ajustados, confirmada pelos respectivos valores de χ^2 .

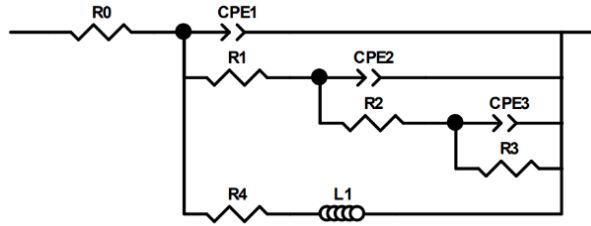


Figura 39: Circuito equivalente utilizado para descrever a impedância da amostra PEO

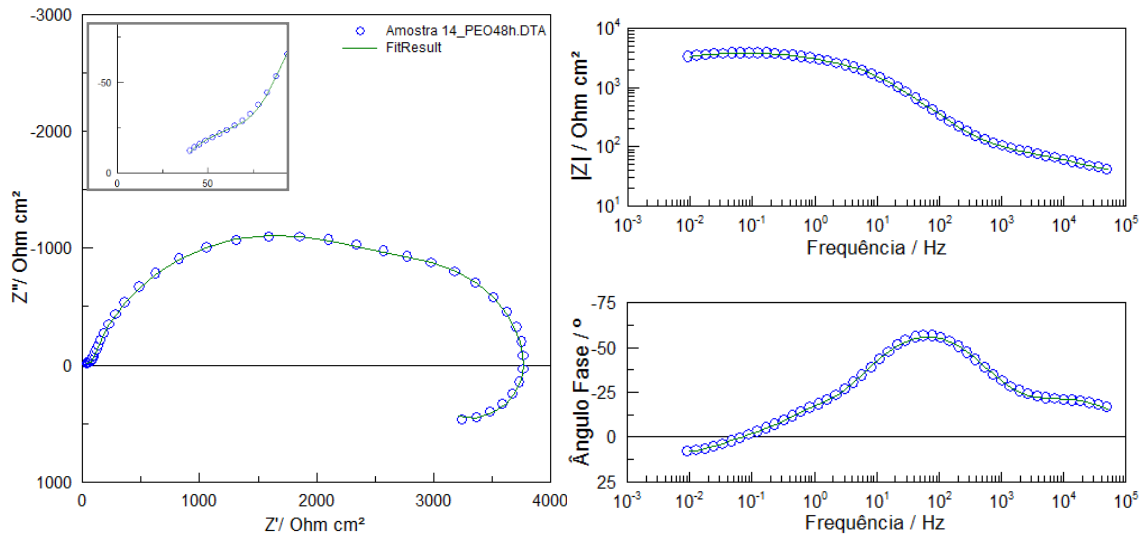


Figura 40: Ajuste do modelo da figura 39 aos dados experimentais da amostra 14 (PEO) para 48 horas

Os parâmetros obtidos no ajuste do circuito aos dados experimentais estão listados na tabela 18.

Tabela 18: Dados obtidos para cada parâmetro com o circuito equivalente para a amostra PEO

Parâmetros	Amostra 14 (PEO)					Amostra 15 (PEO)				
	1h	24h	48h	72h	168h	1h	24h	48h	72h	168h
R_0 ($\Omega \text{ cm}^2$)	3,8E+1	3,2E+1	3,2E+1	3,4E+1	3,4E+1	4,3E+1	3,4E+1	3,3E+1	3,7E+1	3,8E+1
CPE_1 -T ($F \text{ cm}^{-2} \text{ s}^p$)	4,0E-6	6,7E-6	8,6E-6	6,2E-6	5,6E-6	3,1E-6	7,5E-6	9,7E-6	7,8E-6	6,0E-6
CPE_1 -P	7,6E-1	7,2E-1	7,0E-1	7,7E-1	8,0E-1	7,7E-1	7,1E-1	6,8E-1	7,2E-1	8,0E-1
R_1 ($\Omega \text{ cm}^2$)	3,3E+3	1,0E+2	7,1E+1	3,0E+1	2,0E+1	4,0E+3	9,7E+1	8,5E+1	4,3E+1	2,2E+1
CPE_2 -T ($F \text{ cm}^{-2} \text{ s}^p$)	-	7,4E-6	1,1E-5	1,2E-5	1,4E-5	-	8,1E-6	1,1E-5	1,1E-5	1,4E-5
CPE_2 -P	-	7,7E-1	8,3E-1	9,0E-1	9,1E-1	-	7,6E-1	8,2E-1	8,9E-1	9,2E-1
R_2 ($\Omega \text{ cm}^2$)	-	3,5E+2	3,1E+3	1,6E+3	1,5E+3	-	4,2E+2	3,7E+3	2,0E+3	1,6E+3
CPE_3 -T ($F \text{ cm}^{-2} \text{ s}^p$)	4,5E-6	6,4E-6	2,8E-4	5,6E-4	1,7E-3	4,0E-6	6,2E-6	2,5E-4	4,8E-4	1,2E-3
CPE_3 -P	7,2E-1	7,6E-1	1,0	8,9E-1	7,7E-1	7,2E-1	7,7E-1	1,0	8,9E-1	7,6E-1
R_3 ($\Omega \text{ cm}^2$)	1,7E+4	1,1E+4	6,9E+2	4,7E+2	3,5E+2	2,3E+4	1,2E+4	8,3E+2	5,8E+2	5,0E+2
R_4 ($\Omega \text{ cm}^2$)	1,4E+5	3,5E+4	1,1E+4	6,7E+3	6,2E+3	1,4E+5	3,5E+4	1,3E+4	8,8E+3	7,3E+3
L_1 (H cm^2)	3,6E+5	4,0E+5	1,9E+5	1,4E+5	1,6E+5	4,5E+5	4,1E+5	2,2E+5	1,9E+5	2,8E+5
R_p ($\Omega \text{ cm}^2$)	1,7E+4	8,5E+3	2,8E+3	1,6E+3	1,4E+3	2,2E+4	9,0E+3	3,4E+3	2,0E+3	1,6E+3
X^2	1,0E-4	1,2E-4	2,1E-4	3,8E-4	5,7E-4	1,5E-4	1,7E-4	1,3E-4	2,8E-4	3,2E-4

A variação dos parâmetros para as duas amostras de PEO (tabela 18) é idêntica. Os valores de R_p para as amostras de PEO diminuem, na generalidade, ao longo do tempo (tabela 18) indicando uma degradação progressiva do revestimento poroso, com conseqüente aumento do diâmetro dos poros e maior quantidade de substrato a ficar exposto à solução de SBF, levando a uma maior oxidação do substrato. Note-se que, ao contrário das amostras simples, que partiram de uma superfície limpa e que foi sendo gradualmente coberta de produtos de corrosão, o que justifica o aumento da sua resistência de polarização, as amostras de PEO estavam inicialmente revestidas pelo revestimento e este foi-se degradando, levando à diminuição progressiva de R_p .

Para este circuito a resistência de polarização é dada pela equação 31.

$$R_p = \frac{1}{\frac{1}{R_1 + R_2 + R_3} + \frac{1}{R_4}} \quad (31)$$

Os diagramas de Nyquist para a amostra 1 (PEO+Hidrotérmico) mostram que também neste caso existe uma diminuição dos valores de impedância com o tempo do ensaio (figura 41).

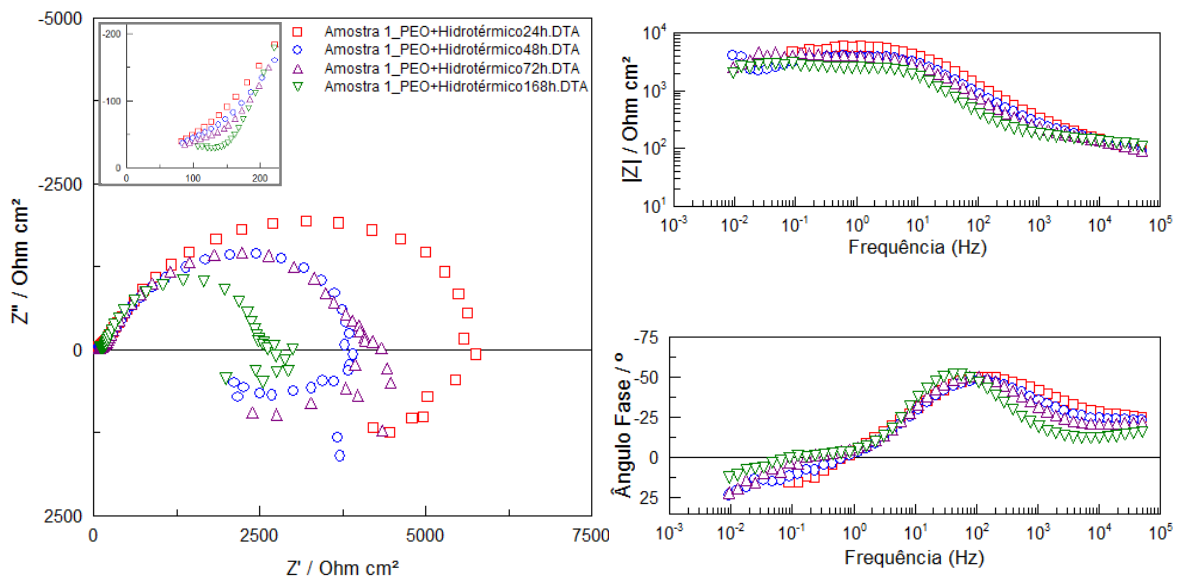


Figura 41: Diagramas de Nyquist e Bode para a impedância da amostra 1 (PEO+Hidrotérmico)

A forma dos diagramas não sofre grandes alterações, sendo de destacar que os diagramas de Nyquist para 48 e 72 horas são idênticos. Os diagramas são constituídos por quatro “loops”: três “loops” capacitivos para frequências elevadas, para frequências moderadas e moderadas-baixas, e um “loop” indutivo para frequências baixas. O comportamento das amostras PEO+Hidrotérmico foi idêntico ao registado para as amostras PEO, e como tal, o circuito equivalente utilizado para ajustar os dados experimentais foi o mesmo usado para as amostras PEO, figura 42. Mais uma vez se apresenta, na figura 43, um exemplo do ajuste deste circuito aos resultados experimentais.

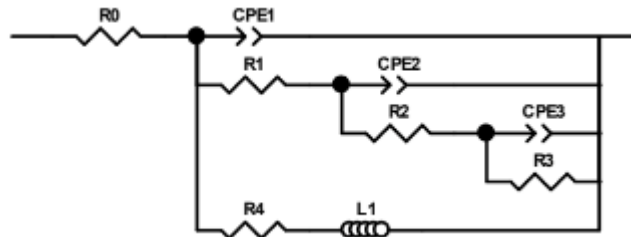


Figura 42: Circuito equivalente utilizado para descrever a impedância da amostra PEO+Hidrotérmico

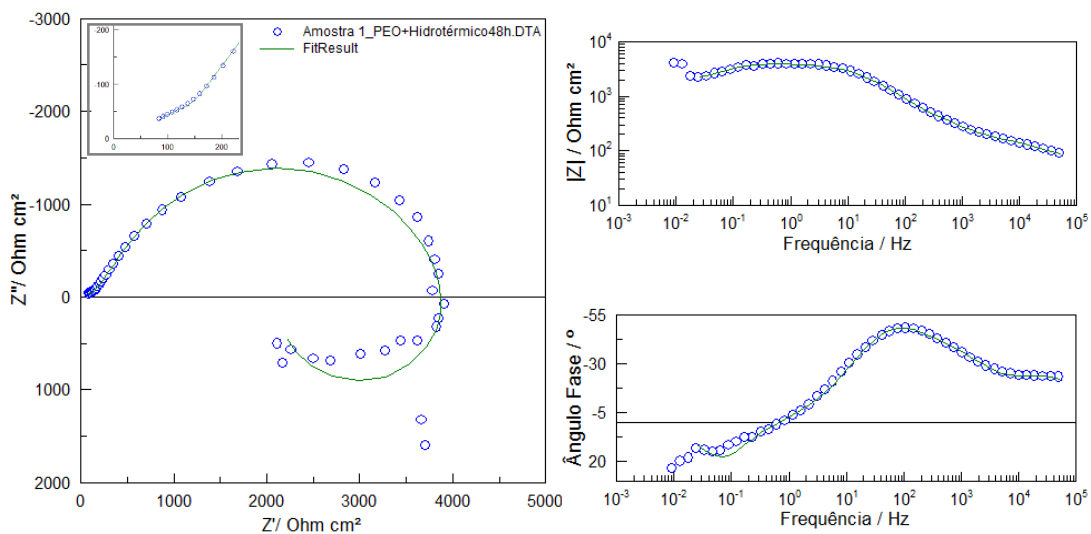


Figura 43: Ajuste do modelo da figura 42 aos dados experimentais da amostra 1 (PEO+Hidrotérmico) para 48 horas

Os parâmetros obtidos no ajuste do circuito aos dados experimentais estão listados na tabela 19.

Tabela 19: Dados obtidos para cada parâmetro com o circuito equivalente para a amostra PEO+Hidrotérmico

Parâmetros	Amostra 1 (PEO+Hidrotérmico)				Amostra 2 (PEO+Hidrotérmico)			
	24h	48h	72h	168h	24h	48h	72h	168h
R_0 (Ω cm ²)	4,2E+1	5,8E+1	4,8E+1	4,7E+1	2,6E+1	4,4E+1	5,6E+1	4,9E+1
CPE_1 -T (F cm ⁻² s ^p)	4,3E-6	1,2E-6	4,7E-6	4,6E-6	7,3E-7	4,7E-6	8,6E-7	2,6E-6
CPE_1 -P	6,4E-1	7,7E-1	6,4E-1	6,0E-1	6,8E-1	6,1E-1	7,4E-1	6,4E-1
R_1 (Ω cm ²)	1,7E+2	1,4E+2	1,6E+2	1,2E+2	4,4E+2	3,7E+2	1,9E+2	2,1E+2
CPE_2 -T (F cm ⁻² s ^p)	3,7E-6	2,7E-6	2,6E-6	3,6E-6	8,8E-7	9,0E-7	1,9E-6	2,1E-6
CPE_2 -P	7,4E-1	8,3E-1	8,7E-1	9,5E-1	6,6E-1	8,8E-1	8,2E-1	8,6E-1
R_2 (Ω cm ²)	1,8E+3	6,5E+2	5,8E+2	2,6E+2	5,8E+2	9,3E+2	2,3E+2	2,0E+2
CPE_3 -T (F cm ⁻² s ^p)	5,4E-7	3,3E-6	2,3E-6	3,9E-6	8,5E-7	1,1E-6	3,1E-6	3,1E-6
CPE_3 -P	9,0E-1	8,2E-1	8,5E-1	9,2E-1	7,2E-1	8,1E-1	7,8E-1	8,0E-1
R_3 (Ω cm ²)	4,3E+3	3,1E+3	3,4E+3	2,2E+3	1,1E+4	9,6E+3	7,2E+3	5,9E+3
R_4 (Ω cm ²)	1,1E+4	4,3E+3	3,9E+3	4,4E+3	2,7E+4	3,9E+4	4,3E+4	1,2E+4
L_1 (H cm ²)	8,7E+3	1,4E+4	8,5E+4	1,3E+5	4,3E+5	1,9E+5	6,0E+4	2,2E+5
R_p (Ω cm ²)	3,9E+3	2,0E+3	2,0E+3	1,6E+3	8,5E+3	6,5E+3	4,1E+3	1,9E+3
X^2	3,4E-4	2,1E-3	4,8E-3	7,8E-3	1,1E-2	5,3E-3	5,7E-3	1,7E-2

A variação dos parâmetros não é idêntica nas duas amostras. Foi identificado muito ruído para as baixas frequências. No entanto, os valores de R_p assumem uma variação idêntica à das amostras de PEO, com a resistência de polarização a diminuírem com o aumento do tempo de ensaio. Esta diminuição mais uma vez indica uma degradação do revestimento produzido, sendo importante destacar que a variação de R_p não foi tão significativa como para as amostras de PEO. Uma menor variação da resistência de polarização pode dever-se ao efeito de diminuição do diâmetro/fecho dos poros e consequente aumento da proteção que o revestimento produzido por PEO e tratamento hidrotérmico confere ao substrato. A equação utilizada para calcular a resistência de polarização foi a mesma utilizada para as amostras de PEO (equação 31).

Os diagramas de Nyquist para a amostra 11 (PEO+PCL) demonstram, mais uma vez, a diminuição dos valores da impedância com o aumento do tempo do ensaio (figura 44).

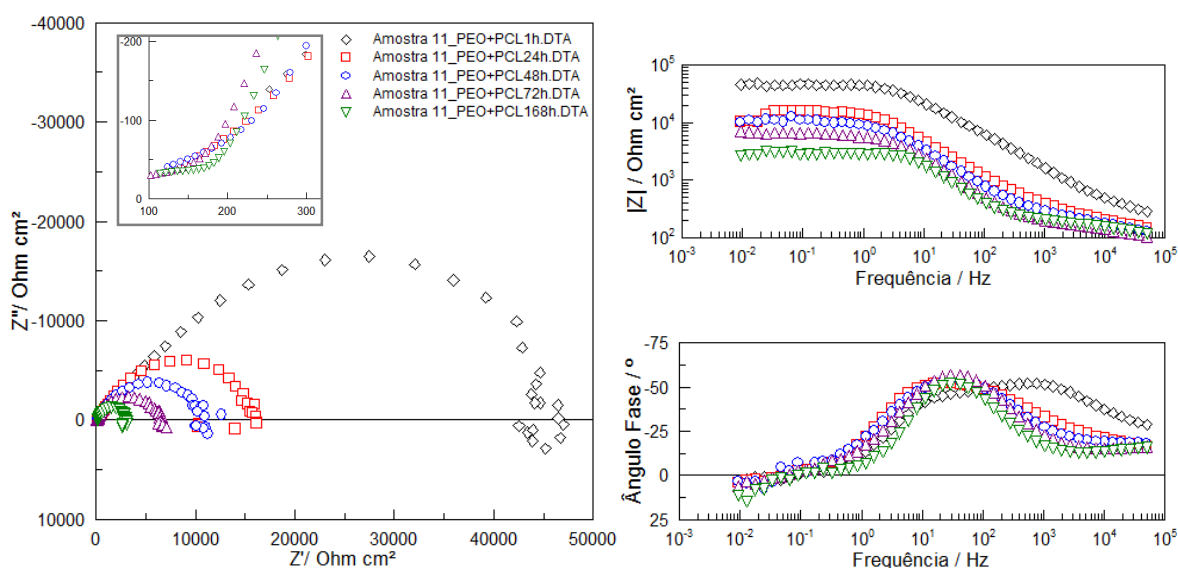


Figura 44: Diagramas de Nyquist e Bode para a impedância da amostra 11 (PEO+PCL)

A forma dos diagramas não sofre grandes alterações, sendo os diagramas constituídos por quatro “*loops*”: três “*loops*” capacitivos para frequências elevadas, moderadas e moderadas-baixas, e um “*loop*” indutivo para frequências baixas. O comportamento das amostras PEO+PCL foi distinto do registado para as amostras PEO, motivo pelo qual foi desenvolvido um novo circuito equivalente (figura 45). Para as amostras PEO+PCL foi utilizado um circuito que pode ser decomposto em 2 partes: o par R1/CPE1 que representa a camada de PCL (CPE1 é a capacidade do revestimento e R1 a resistência da solução dentro dos seus poros) e o circuito que descreve o comportamento da corrosão da liga de magnésio AZ31, utilizado para a amostra Simples. Quando a solução de SBF atravessa os poros do revestimento de PCL, ataca o revestimento de PEO que se encontra por baixo, provocando um aumento dos poros e a consequente infiltração da solução até ao substrato, que se irá corroer. As duas partes foram colocadas em cascata e o circuito formado encontra-se representado na figura 45, mostrando-se na figura 46, um exemplo do ajuste deste circuito aos resultados experimentais.

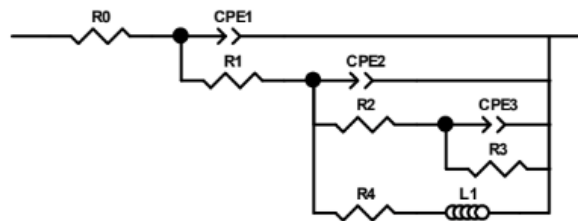


Figura 45: Circuito equivalente utilizado para descrever a impedância da amostra PEO+PCL

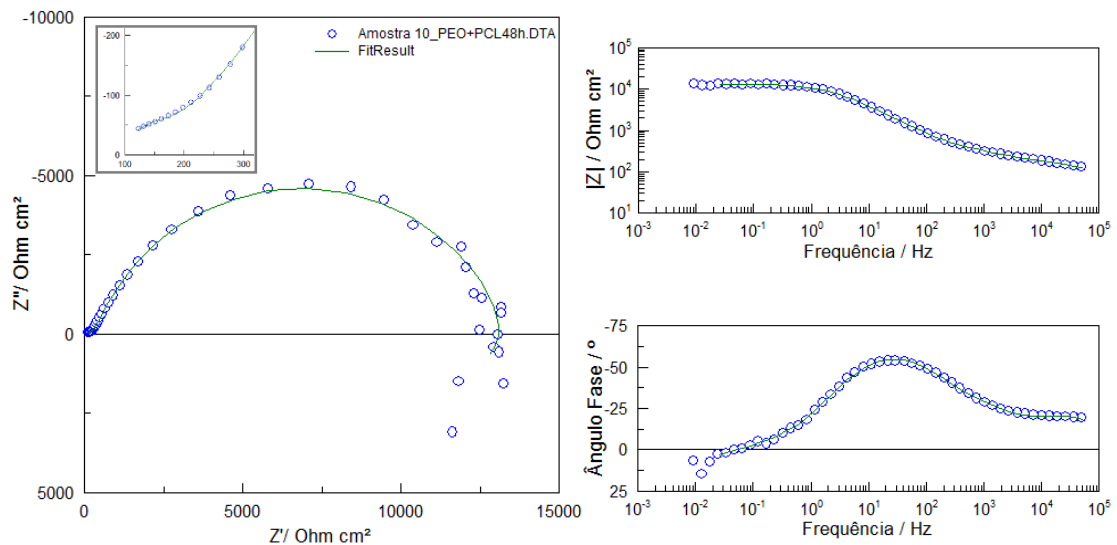


Figura 46: Ajuste do modelo da figura 45 aos dados experimentais da amostra 10 (PEO+PCL) para 48 horas

Os parâmetros obtidos no ajuste do circuito aos dados experimentais estão listados na tabela 20.

Tabela 20: Dados obtidos para cada parâmetro com o circuito equivalente para a amostra PEO+PCL

Parâmetros	Amostra 10 (PEO+PCL)					Amostra 11 (PEO+PCL)				
	1h	24h	48h	72h	168h	1h	24h	48h	72h	168h
R_0 ($\Omega \text{ cm}^2$)	1,1E+2	8,9E+1	8,6E+1	7,3E+1	7,1E+1	1,2E+2	1,2E+2	7,6E+1	6,3E+1	8,0E+1
CPE_{1-T} ($F \text{ cm}^{-2} s^p$)	5,0E-7	1,9E-6	1,3E-6	1,6E-6	2,4E-6	3,4E-7	1,8E-6	1,7E-6	9,1E-6	3,4E-6
CPE_{1-P}	7,0E-1	7,2E-1	7,4E-1	7,4E-1	7,1E-1	7,3E-1	7,3E-1	7,0E-1	5,9E-1	6,7E-1
R_1 ($\Omega \text{ cm}^2$)	4,8E+2	2,3E+2	1,6E+2	1,3E+2	1,1E+2	3,7E+2	2,3E+2	1,4E+2	1,4E+2	1,2E+2
CPE_{2-T} ($F \text{ cm}^{-2} s^p$)	7,6E-7	4,1E-6	3,7E-6	3,7E-6	3,9E-6	8,8E-7	3,4E-6	2,0E-6	2,8E-6	4,0E-6
CPE_{2-P}	7,0E-1	7,6E-1	8,0E-1	8,8E-1	9,5E-1	7,1E-1	7,9E-1	8,3E-1	9,2E-1	9,4E-1
R_2 ($\Omega \text{ cm}^2$)	1,5E+4	2,6E+3	4,8E+2	4,3E+2	2,5E+2	1,6E+4	2,8E+3	1,6E+2	2,8E+2	2,4E+2
CPE_{3-T} ($F \text{ cm}^{-2} s^p$)	2,1E-6	2,9E-6	4,8E-6	3,9E-6	4,3E-6	7,9E-7	2,2E-6	7,6E-6	3,2E-6	4,8E-6
CPE_{3-P}	6,6E-1	7,7E-1	7,6E-1	8,4E-1	9,2E-1	8,3E-1	8,7E-1	7,4E-1	8,7E-1	9,2E-1
R_3 ($\Omega \text{ cm}^2$)	4,2E+4	4,1E+4	1,3E+4	5,3E+3	3,6E+3	3,5E+4	1,3E+4	1,1E+4	6,3E+3	2,7E+3
R_4 ($\Omega \text{ cm}^2$)	2,7E+5	1,7E+5	4,3E+4	9,6E+3	1,6E+4	3,6E+5	9,8E+4	5,2E+4	3,6E+4	4,3E+3
L_1 ($H \text{ cm}^2$)	4,4E+5	1,4E+6	7,0E+5	1,2E+5	1,1E+5	1,1E+5	7,6E+5	7,8E+5	4,7E+5	1,3E+5
R_p ($\Omega \text{ cm}^2$)	4,8E+4	3,5E+4	1,0E+4	3,7E+3	3,2E+3	4,5E+4	1,4E+4	9,3E+3	5,7E+3	1,8E+3
X^2	5,7E-4	7,5E-4	1,1E-3	4,4E-3	1,0E-3	6,5E-4	1,8E-3	1,1E-3	4,1E-4	1,2E-3

A variação dos parâmetros para as duas amostras de PEO+PCL (tabela 20) é idêntica. Para este circuito a resistência de polarização é dada pela equação 32.

$$R_p = R_1 + \frac{1}{\frac{1}{R_2 + R_3} + \frac{1}{R_4}} \quad (32)$$

Os valores de R_p diminuem ao longo do tempo para as amostras de PEO+PCL indicando um aumento da instabilidade do sistema, que se deve provavelmente à corrosão do revestimento, com consequente aumento do diâmetro dos poros e maior quantidade de substrato a ficar exposto à solução de SBF, levando a uma maior oxidação do substrato.

Na tabela 21 apresenta-se um sumário dos resultados obtidos através da espectroscopia de impedância eletroquímica, sob a forma de uma comparação dos valores médios de R_p ao longo do tempo para os vários tipos de amostra.

Tabela 21: Variação do valor médio de R_p com o tempo para os diferentes tipos de amostras

Amostras	Tempo				
	1h	24h	48h	72h	168h
R_p (Simples) ($\Omega \text{ cm}^2$)	—	5,15E+1	1,10E+2	—	5,90E+2
R_p (PEO) ($\Omega \text{ cm}^2$)	1,95E+4	8,75E+3	3,10E+3	1,80E+3	1,50E+3
R_p (PEO+Hidrotérmico) ($\Omega \text{ cm}^2$)	—	6,20E+3	4,25E+3	3,05E+3	1,75E+3
R_p (PEO+PCL) ($\Omega \text{ cm}^2$)	4,65E+4	2,45E+4	9,65E+3	4,70E+3	2,50E+3

A análise da tabela 21 leva a concluir que qualquer um dos revestimentos produzidos dá origem a um aumento do valor da resistência de polarização face à amostra simples, indicando que todos eles conferem maior proteção ao substrato.

Pode concluir-se que a oxidação eletrolítica por plasma aumenta significativamente a resistência à corrosão da liga de magnésio. Comparando os resultados das amostras de PEO e PEO+Hidrotérmico, verifica-se que as amostras de PEO apresentam uma resistência de polarização superior para os primeiros tempos de imersão, mas que esta decai significativamente ao longo do tempo, pelo que no final de 48h já é inferior à das amostras de PEO+Hidrotérmico. Este comportamento pode ser explicado com base no estado de hidratação dos respetivos óxidos. De facto, as amostras de PEO foram imersas tal qual como foram obtidas após a oxidação eletrolítica, ou seja, com um óxido pouco hidratado, que vai hidratar ao longo da imersão em SBF. Contrariamente, o tratamento hidrotérmico promoveu a hidratação das amostras, pelo que as amostras de PEO+Hidrotérmico no início da imersão em SBF já se encontravam fortemente hidratadas. Por este motivo, é de esperar uma variação menos significativa dos valores de resistência de polarização ao longo do tempo de imersão das amostras. Atendendo a que um óxido hidratado apresenta uma menor resistência e, portanto, conduz a um menor valor de R_p , pode compreender-se a evolução observada. Desta forma, conclui-se que, a longo termo, a proteção conferida às amostras de PEO+Hidrotérmico será mais eficaz do que a das amostras de PEO.

Por último, a análise da tabela 21 revela que a resistência de polarização das amostras PEO+PCL apresenta valores mais elevados do que qualquer outro dos revestimentos, para todos os tempos de imersão das amostras na solução de SBF. Assim, o revestimento das amostras PEO+PCL assume-se como aquele que confere maior proteção face à corrosão das amostras, apesar da sua biodegradabilidade.

Os dados da tabela 21 foram representados graficamente na figura 47. Foram apenas considerados os tempos de imersão na solução iguais e superiores a 24 horas. Nesta figura é notória uma diminuição da resistência de polarização ao longo do tempo para as amostras PEO, PEO+Hidrotérmico e PEO+PCL, e um comportamento contrário das amostras AZ31, com o aumento da resistência de polarização ao longo do tempo de imersão das amostras.

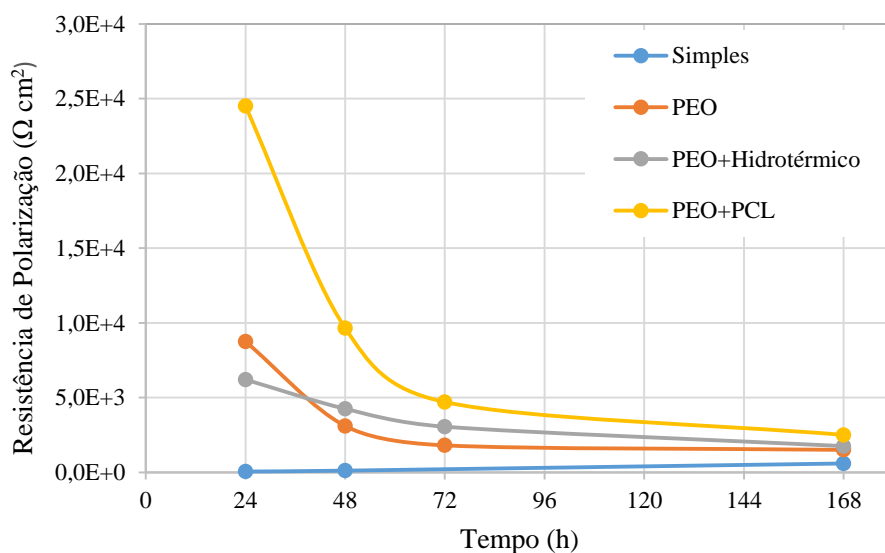


Figura 47: Variação do valor médio da resistência de polarização com o tempo de imersão na solução de SBF

É notória a superioridade das amostras de PEO face às amostras de PEO+Hidrotérmico numa fase inicial, bem como a inversão desse comportamento algures entre as 24 e as 48 horas. Por último, é evidente o valor mais elevado da resistência de polarização das amostras de PEO+PCL, face a todas as outras amostras, ao longo de todo o tempo de estudo.

A variação do potencial de circuito aberto (OCP) com o tempo foi registada durante a primeira hora de imersão das amostras na solução de SBF, e é apresentada na figura 48.

A amostra AZ31 apresentou um aumento do potencial a uma taxa praticamente constante. Após uma hora o potencial era igual a -1,61V. Esta evolução no sentido de valores crescentes de potencial confirma a tendência para uma maior resistência à corrosão do material, devida à formação de uma camada moderadamente protetora de produtos de corrosão.

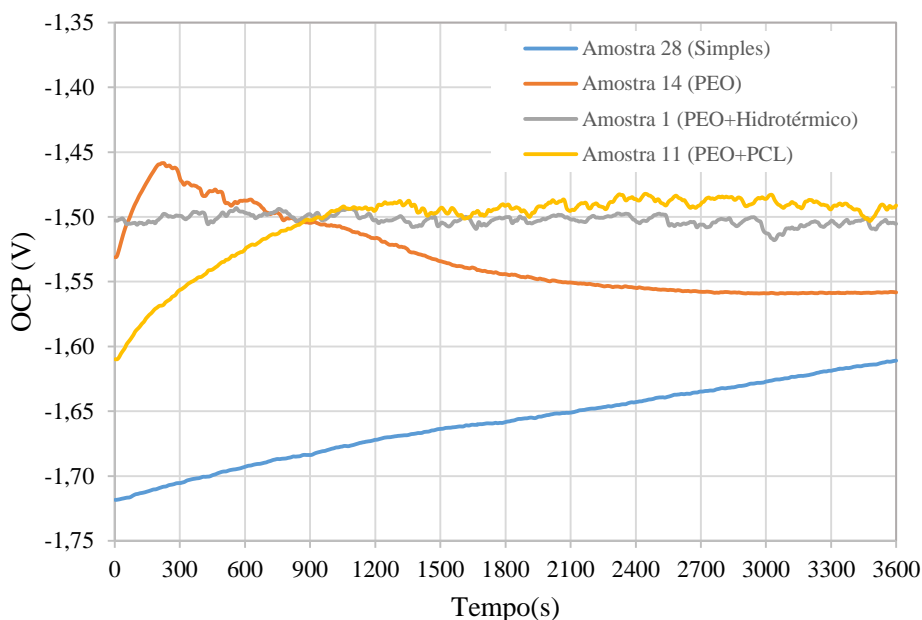


Figura 48: Curvas de OCP para as amostras durante 1 hora imersas na solução SBF

Para a amostra de PEO existiu um aumento do potencial (de -1,53V para -1,46 V) até aos 236 segundos, e uma diminuição mais gradual que se prolongou até cerca dos 2900 segundos, altura em que o gráfico estabilizou ao potencial de -1,56V. O aumento inicial pode dever-se à penetração do eletrólito nos poros do revestimento de PEO, e a diminuição mais gradual do potencial corresponde ao ataque contínuo do revestimento por parte da solução de SBF, levando à sua lenta mas progressiva degradação. O valor de estabilização do potencial para esta amostra foi idêntico ao registado por Albuquerque [2].

Para a amostra PEO+Hidrotérmico o potencial manteve-se praticamente constante ao longo do tempo, num valor de -1,50V, e com oscilações entre os potenciais: -1,496V e -1,518V. O comportamento estável desta amostra e a diferença de comportamento face à amostra de PEO está de acordo com a diferença, acima referida, entre os estados de hidratação dos dois tipos de amostra no momento de início da imersão. Por outro lado, o valor mais elevado de potencial, face às amostras de PEO, demonstra que o revestimento é

mais protetor. O comportamento desta amostra durante a primeira hora foi distinto do registado por Albuquerque [2].

Para a amostra PEO+PCL o potencial aumentou desde -1,61 até -1,49, que corresponde aos 1230 segundos, e manteve-se praticamente constante entre os 1230 segundos e os 3600 segundos. Foi de todas as amostras aquela que registou um potencial mais elevado, e portanto, é de todas as amostras aquela que possui o potencial de corrosão mais elevado. Note-se, contudo, que o facto de o potencial inicial ser bastante negativo, dentro da mesma gama que as restantes amostras, mostra que o revestimento de PCL não é uma barreira completamente eficaz à penetração de eletrólito como acontece, por exemplo, com as tintas protetoras.

6. Conclusões

O mundo está em constante mudança e os implantes ortopédicos não são exceção, a procura por materiais bioabsorvíveis coloca a necessidade de estudar novas ligas e revestimentos de forma a garantir que os materiais implantados cumpram os requisitos mecânicos durante o período necessário e sejam gradualmente absorvidos pelo corpo humano. A elevada taxa de corrosão destes materiais é hoje o maior problema e o seu controlo o maior objetivo. O controlo da taxa de corrosão permitirá reduzir os problemas de inflamação dos tecidos e rejeição, ao mesmo tempo que é garantido que a libertação de iões acontece sem que a sua quantidade no organismo seja excedida. Neste trabalho foram estudados 3 revestimentos com vista ao aumento da resistência à corrosão da liga AZ31. Este estudo incluiu caracterização metalográfica da liga e caracterização estrutural e morfológica dos revestimentos produzidos, bem como o estudo da resistência à corrosão, através da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, e o estudo da viabilidade celular dos revestimentos.

Os resultados obtidos neste trabalho estão sumarizados a seguir:

- A análise metalográfica da liga AZ31 revelou a presença de apenas uma fase (fase Mg- α) e um diâmetro médio de grão de 6,75 μm , que corresponde a um tamanho de grão ASTM 12.
- A difração de raios X confirmou os resultados da análise metalográfica para a amostra Simples e revelou a presença de MgO e Mg(OH)₂. Foi identificada a presença de Mg₃(PO₄)₂ para todos os revestimentos, sendo este composto produzido durante o tratamento de PEO. Para a amostra PEO+Hidrotérmico foi identificada hidroxiapatite e para a amostra PEO+PCL a presença de policaprolactona (PCL).
- As medições dos revestimentos realizadas com o Elcometer[®] revelaram um aumento da espessura total do revestimento de 2,8 μm com a realização do tratamento hidrotérmico após o tratamento de PEO.
- A análise de SEM revelou superfícies completamente revestidas, com um revestimento uniforme e poroso. Nesta análise foi possível medir o tamanho dos poros e constatar que o tratamento hidrotérmico resulta numa diminuição do diâmetro médio dos poros, de 24,92 μm (PEO) para 22,38 μm (PEO+Hidrotérmico). Para todos os revestimentos foi identificada interconectividade dos poros. As amostras PEO+Hidrotérmico revelaram pequenas estruturas esféricas na superfície e a análise composicional realizada (EDS) revelou um rácio Ca/P característico da presença de hidroxiapatite no revestimento.
- Os ensaios de viabilidade celular revelaram que a taxa de sobrevivência dos fibroblastos foi mais elevada para as amostras Simples (75%), no entanto, os problemas de corrosão da liga AZ31 tornam inviável o seu uso sem a aplicação de um revestimento. Dos revestimentos aplicados o PEO+Hidrotérmico foi o que obteve melhores resultados (73%), com uma taxa de sobrevivência apenas 2 pontos percentuais abaixo da amostra Simples.

- A espectroscopia de impedância eletroquímica revelou que o revestimento PEO+PCL é o que apresenta melhores resultados para todos os tempos testados (até 168h). No entanto, para as 168 horas a resistência de polarização dos 3 tipos de revestimentos foi da mesma ordem de grandeza. O revestimento PEO+Hidrotérmico foi o que apresentou o segundo melhor comportamento.
- A presença de hidroxiapatite, a diminuição da porosidade e a maior taxa de viabilidade celular, associadas à segunda melhor resistência à corrosão, determinam que o revestimento de PEO+Hidrotérmico seja o revestimento que obteve na globalidade uma melhor performance. Não deve contudo ser desconsiderado o comportamento do polímero PCL e deverá ser considerada a utilização deste revestimento sobre o revestimento PEO+Hidrotérmico, caso seja necessário um aumento da resistência à corrosão.

Este trabalho demonstrou que é possível obter um revestimento uniforme e que confere um aumento da resistência à corrosão da liga AZ31, sem que a viabilidade celular seja praticamente comprometida. Estudos posteriores deverão ser realizados, tendo como ponto de partida o sistema PEO+Tratamento Hidrotérmico, e deverão ser realizadas avaliações do comportamento mecânico e avaliações complementares do comportamento biológico deste revestimento para averiguar a possibilidade de aplicar este revestimento nos implantes bioabsorvíveis do futuro.

7. Referências Bibliográficas

- [1] M. Kiselevsky, N.Yu.Anisimova, B. Polotsky, N.S.Martynenko, E.A.Lukyanova, S. Sitdikova, S. Dobatkin e Y. Estrin, “Biodegradable Magnesium Alloys as Promising Materials for Medical Applications (Review),” *Sovremennye Tehnologii v Medicine*, vol. 11 N°3, 2019.
- [2] F. P. S. d. Albuquerque, “Magnesium AZ31 alloy coating for bone implant applications,” Dissertação de Mestrado em Engenharia de Materiais. Instituto Superior Técnico, Lisboa, 2018.
- [3] W. DF, “On the mechanisms of biocompatibility,” em *Biomaterials*, Elsevier Ltd., 2008, pp. 29:2941-2953.
- [4] R. Swaminathan, “Magnesium Metabolism and its Disorders,” *Clin Biochem Rev.*, vol. 24 (2), pp. 47-66, 2003.
- [5] B. M. Altura, “Introduction: Importance of Mg in physiology and medicine and the need for ion selective electrodes,” *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 54, pp. 5-9, 1994.
- [6] Y. F. Zheng, X. N. Gu e F. Witte, “Biodegradable metals,” *Materials Science & Engineering R*, pp. 1-34, 2014.
- [7] S. Chatterjee, M. Saxena, D. Padmanabhan, M. Jayachandra e H. J. Pandya, “Futuristic medical implants using bioresorbable materials and devices,” *Elsevier*, vol. 142 Biosensors and Bioelectronics, 2019.
- [8] M. P. Staiger, A. M. Pietak, J. Huadmai e G. Dias, “Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review,” *Elsevier*, vol. Biomaterials 27, pp. 1728-1734, 2006.
- [9] A. Atrens, S. Johnston, Z. Shi e M. S. Dargusch, “Viewpoint - Understanding Mg corrosion in the body for biodegradable medical implants,” *Elsevier*, vol. Scripta Materialia 154, pp. 92-100, 2018.
- [10] F. Witte, V. Kaese, H. Haferkamp, E. Switzer, A. Meyer-Lindenberg, C. Wirth e H. Windhagen, “In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response,” *Elsevier*, vol. Biomaterials 26, pp. 3557-3563, 2005.
- [11] T. Kokubo e H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2907-2915, 2006.
- [12] M. Bohner e J. Lemaître, “Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?,” *Biomaterials*, vol. 30, pp. 2175-2179, 2009.
- [13] K. Rogers, *The Human Body - Bone And Muscle: Structure, Force and Motion*, Britannica, 2011.
- [14] S. R. Bolsover, J. S. Hyams, E. A. Shepard, H. A. White e C. G. Wiedemann, *Cell Biology - A Short Course*, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.
- [15] B. A. e. al, *Essential cell biology*, Garland Science, 2013.
- [16] P. Fratzl, *Collagen Structure and Mechanics*, Springer, 2008.

- [17] K. Prasad, O. Bazaka, M. Chua, M. Rochford, L. Fedrick, J. Spoor, R. Symes, M. Tieppo, C. Collins, A. Cao, D. Markwell, K. Ostrikov e K. Bazaka, “Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities,” *Materials*, vol. 10:884, 2017.
- [18] H. Somekawa, A. Singh e T. Mukai, “Synergetic Effect of Grain Refinement and Spherical Shaped Precipitate DIspersions in Fracture Toughness of a Mg-Zn-Zr Alloy,” *Materials Transactions*, Vols. %1 de %248, No.6, pp. 1422-1426, 2007.
- [19] M. Haghshenas, “Mechanical characteristics of biodegradable magnesium matriz composites: A review,” *Journal of Magnesium and Alloys*, vol. 5, pp. 189-201, 2017.
- [20] T. Turner, D. Sumner, R. M. Urban, R. Igloria e J. Galante, “Maintenance of Proximal Cortical Bone with Use of a Less Stiff Femoral Component Hemiarthroplasty of the Hip without Cement,” *Journal of Bone and Joint Surgery*, pp. 1381-1390, 1997.
- [21] G. L. Song e A. Atrens, “Corrosion Mechanisms of Magnesium Alloys,” *Advanced Engineering Materials*, vol. 1 N° 1, pp. 11-33, 1999.
- [22] D. Sumner, T. Turner, R. Igloria, R. Urban e J.O.Galante, “Functional adaptation and ingrowth of bone vary as a function of hip implant stiffness,” *Journal of Biomechanics*, vol. 31, pp. 909-917, 1998.
- [23] D. Sumner, “Long-term implant fixation and stress-shielding in total hip replacement,” *Journal of Biomechanics*, vol. 48, pp. 797-800, 2014.
- [24] S. C. Cowin, *Bone Mechanics Handbook*, CRC Press, 2001.
- [25] T. Albrektsson e C. Johansson, “Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration,” *European Spine Journal*, vol. 10, pp. 96-101, 2001.
- [26] M. Pourbaix, *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions*, National Association of Corrosion Engineers, 1974.
- [27] G.-L. Song, *Corrosion of magnesium alloys*, Woodhead Publishing, 2011.
- [28] C. Janning, E. Willbold, C. Vogt, J. Nellesen, A. Meyer-Lindenberg, H. Windhagen, F. Thorey e F. Witte, “Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling,” *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 1861-1868, 2010.
- [29] M. Gupta e G. K. Meenashisundaram, *Insight into Designing Biocompatible Magnesium Alloys and Composites - Processing, Mechanical and Corrosion Characteristics*, Springer, 2015.
- [30] R. Montoya, C. Iglesias, M. Escudero e M. García-Alonso, “Modeling in vivo corrosion of AZ31 as temporary biodegradable implants. Experimental validation in rats,” *Materials Science and Engineering*, vol. 41, pp. 127-133, 2014.
- [31] J. Kuhlmann, I. Bartsch, E. Willbold, S. Schuchardt, O. Holz, N. Hort, D. Hoche, W. R. Heineman e F. Witte, “Fast escape of hydrogen from gas cavities around corroding magnesium implants,” *Acta Biomaterialia*, vol. 9, pp. 8714-8721, 2013.
- [32] D. Noviana, D. Paramitha, M. F. Ulum e H. Hermawan, “The effect of hydrogen gas evolution of magnesium implant on the postimplantation mortality of rats,” *Journal of Orthopaedic Translation*, vol. 5, pp. 9-15, 2016.

- [33] G. Song e S. Song, "A Possible Biodegradable Magnesium Implant Material," *Advanced Engineering Materials*, Vols. %1 de %29, N°4, pp. 298-302, 2007.
- [34] Y. Zheng, *Magnesium Alloys as Degradable Biomaterials*, CRC Press, 2016.
- [35] Y. Chen, J. Dou, H. Yu e C. Chen, "Degradable magnesium-based alloys for the biomedical applications: The role of critical alloying elements," *biomaterials applications*, vol. 0(0), pp. 1-25, 2019.
- [36] Y. Ding, C. Wen, P. Hodgson e Y. Li, "Effects of alloying elements on the corrosion behavior and biocompatibility of biodegradable magnesium alloys: a review," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 2, pp. 1912-1933, 2014.
- [37] C. Liu, Z. Ren, Y. Xu, S. Pang, X. Zhao e Y. Zhao, "Biodegradable Magnesium Alloys Developed as Bone Repair Materials: A Review," *Scanning*, vol. 4, pp. 1-15, 2018.
- [38] F. Czerwinski, *Magnesium Alloys: Properties in Solid and Liquid States*, AvE4EvA, 2014.
- [39] L. Bukovinová e B. Hadzima, "Electrochemical characteristics of magnesium alloy AZ31 in Hank's solution," *Corrosion Engineering Science and Technology*, vol. 47(5), pp. 352-357, 2012.
- [40] G.-L. Song, "The Effect of Texture on the Corrosion Behavior of AZ31 Mg Alloy," *JOM*, vol. 64(6), pp. 671-679, 2012.
- [41] S. F. (Jr), A. A. E. Hadad, V. Barranco, I. Llorente, F. R. García-Galván, A. Jiménez-Morales e J. C. Galván, "Native Oxide Films on AZ31 and AZ61 Commercial Magnesium Alloys - Corrosion Behaviour, Effect on Isothermal Oxidation and Sol-gel Thin Film Formation," em *New Trends in Alloy Development, Characterization and Application*, BoD - Books on Demand, 2015, pp. 97-123.
- [42] F. Czerwinski, *Magnesium Alloys - Corrosion and Surface Treatments*, Croatia: In Tech, 2011.
- [43] B. R. Sunil, K. V. Ganesh, P. Pavan, G. Vadapalli, C. Swarnalatha, P. Swapna, P. Bindukumar e G. P. K. Reddy, "Effect of aluminium content on machining characteristics of AZ31 and AZ91 magnesium alloys during drilling," *Journal of Magnesium and Alloys*, vol. 4, pp. 15-21, 2016.
- [44] A. Pardo, M. Merino, A. Coy, F. Viejo, R. Arrabal e S. F. Jr., "Influence of microstructure and composition on the corrosion behaviour of Mg/Al alloys in chloride media," *Electrochimica Acta*, vol. 53, pp. 7890-7902, 2008.
- [45] A. Chamos, Sp.G.Pantelakis, G. Haidemenopoulos e E. Kamoutsi, "Tensile and fatigue behaviour of wrought magnesium alloys AZ31 and AZ61," *Fatigue & Fracture of Engineering Materials & Structures*, vol. 31, pp. 812-821, 2008.
- [46] S. F. (Jr), A. A. E. Hadad, V. Barranco, I. Llorente, F. R. García-Galván, A. Jiménez-Morales e J. C. Galván, "Native Oxide Films on AZ31 and AZ61 Commercial Magnesium Alloys - Corrosion Behaviour, Effect on Isothermal Oxidation and Sol-gel Thin Film Formation," em *New Trends in Alloy Development, Characterization and Application*, Zaki Ahmad, 2015, pp. 97-122.
- [47] S. Agarwal, J. Curtin, B. Duffy e S. Jaiswal, "Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications," *Elsevier*, vol. Materials Science and Engineering C 68, pp. 948-963, 2016.
- [48] R. Hussein, X. Nie e D. Northwood, "An investigation of ceramic coating growth mechanisms in plasma electrolytic oxidation (PEO) processing," *Electrochimica Acta*, vol. 112, pp. 111-119, 2013.

- [49] W. Wu, X. Sun, C.-L. Zhu, F. Zhang, R.-C. Zeng, Y.-H. Zou e S.-Q. Li, “Biocorrosion resistance and biocompatibility of Mg-Al layered double hydroxide/poly-L-glutamic acid hybrid coating on magnesium alloy AZ31,” *Progress in Organic Coatings*, vol. 147, 2020.
- [50] B. Priyadarshini, M. Rama, Chetan e U. Vijayalakshmi, “Bioactive coating as a surface modification technique for biocompatible metallic implants: a review,” *Journal of Asian Ceramic Societies*, vol. 7:4, pp. 397-406, 2019.
- [51] G.-L. Song e Z. Xu, “The surface, microstructure and corrosion of magnesium alloy AZ31 sheet,” *Electrochimica Acta*, vol. 55, pp. 4148-4161, 2010.
- [52] W. Cao e L. L. Hench, “Bioactive materials,” *Ceramics International*, vol. 22, pp. 493-507, 1996.
- [53] E. Willbold, A. Kaya, R. Kaya, F. Beckmann e F. Witte, “Corrosion of magnesium alloy AZ31 screws is dependent on the implantation site,” *Materials Science and Engineering B*, vol. 176, pp. 1835-1840, 2011.
- [54] J.-P. Boutrand, *Biocompatibility and performance of medical devices*, Woodhead Publishing, 2012.
- [55] Q. Chen e G. A. Thouas, “Metallic Implant biomaterials,” *Materials Science and Engineering R*, vol. 87, pp. 1-57, 2015.
- [56] K. Merritt e J. J. Rodrigo, “Immune Response to Synthetic Materials,” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 326, pp. 71-79, 1996.
- [57] J. A. Disegi e L. Eschbach, “Stainless steel in bone surgery,” *International Journal of the Care of the Injured*, vol. 31, pp. S-D2-6, 2000.
- [58] S. F. Jr., A. Samaniego, V. Barranco, A. El-Hadad, I. Llorente e P. Adeva, “The effect of low temperature heat treatment on surface chemistry and corrosion resistance of commercial magnesium alloys AZ31 and AZ61 in 0.6 M NaCl solution,” *Corrosion Science*, vol. 80, pp. 461-472, 2014.
- [59] J. E. Gray-Munro, C. Seguin e M. Strong, “Influence of surface modification on the in vitro corrosion rate of magnesium alloy AZ31,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 91A, pp. 221-230, 2009.
- [60] Q. Li, J. Liang e Q. Wang, “Plasma Electrolytic Oxidation Coatings on Lightweight Metals,” em *Modern Surface Engineering Treatments*, IntechOpen, 2013, pp. Chapter 4 (75-100).
- [61] B. Jiang e Y.F. GE, “Micro-arc oxidation (MAO) to improve the corrosion resistance of magnesium (Mg) alloys,” em *Corrosion prevention of magnesium alloys*, Woodhead Publishing, 2013, pp. 163-196.
- [62] R. Arrabal, E. Matykina, T. Hashimoto, P. Skeldon e G. Thompson, “Characterization of AC PEO coatings on magnesium alloys,” *Surface & Coatings Technology*, vol. 203, pp. 2207-2220, 2009.
- [63] C. Liu, J. Yuan, H. Li e B. Jiang, “Role of Substrates in the Corrosion Behaviors of Micro-Arc Oxidation Coatings on Magnesium Alloys,” *Metals*, vol. 9, 2019.
- [64] G. B. Darband, M. Aliofkhaezai, P. Hamghalan e N. Valizade, “Plasma electrolytic oxidation of magnesium and its alloys: Mechanism, properties and applications,” *Journal of Magnesium and Alloys*, vol. 5(1), pp. 74-132, 2017.

- [65] C. Blawert, W. Dietzel, E. Ghali e G. Song, "Anodizing Treatments for Magnesium Alloys and Their Effect on Corrosion Resistance in Varios Environments," *Advanced Engineering Materials*, vol. 8, pp. 511-533, 2006.
- [66] D. Sreekanth, N. Rameshbabu e K. Venkateswarlu, "Effect of various additives on morphology and corrosion behavior of ceramic coatings developed on AZ31 magnesium alloy by plasma electrolytic oxidation," *Ceramics International*, vol. 38, pp. 4607-4615, 2012.
- [67] L. White, Y. Koo, S. Neralla, J. Sankar e Y. Yun, "Enhanced mechanical properties and increased corrosion resistance of a biodegradable magnesium alloy by plasma electrolytic oxidation (PEO)," *Elsevier - Materials Science and Engineering B*, 2016.
- [68] F. C. Walsh, C. T. J. Low, R. J. K. Wood, K. T. Stevens, J. Archer, A. R. Poeton e A. Ryder, "Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys," *Transactions of the Institute of Metal Finishing*, vol. 3, pp. 122-135, 2009.
- [69] L. Famiyeh e X. Huang, "Plasma Electrolytic Oxidation Coatings on Aluminum Alloys: Microstructures, Porperties, and Applications," *Modern Concepts in Material Science*, vol. 2, 2019.
- [70] S. V. Dorozhkin, "Surface modification of magnesium and its biodegradable alloys by calcium orthophosphate coatings to improve corrosion resistance and biocompatibility," em *Surface Modification of Magnesium and its Alloys for Biomedical Applications*, Woodhead Publishing, 2015, pp. 151-191.
- [71] Z. Yao, Q. Xia, L. Chang, C. Li e Z. Jiang, "Structure and properties of compound coatings on Mg alloys by micro-arc oxidation / hydrothermal treatment," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 633, pp. 435-442, 2015.
- [72] Z. Chunyan, M. Yanlong e L. Chenglong, "Hydroxyapatite Coating on Fluorine-treated Magnesium Alloy by Hydrothermal Method and Its Electrochemical Corrosion Behaviour in Hank's Solution," *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*, vol. 1, n° New Substances, Materials, and Coatings, pp. 127-135, 2019.
- [73] S. Hiromoto e M. Tomozawa, "Corrosion Behavior of Magnesium with Hydroxyapatite Coatings Formed by Hydrothermal Treatment," *Materials Transactions*, vol. 11, pp. 2080-2087, 2010.
- [74] P. Tian, X. Liu e C. Ding, "In vitro degration behavior and cytocompatibility of biodegradable AZ31 alloy with PEO/HT composite coating," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 128, pp. 44-54, 2015.
- [75] W. Aoi, X. Zou, J. B. Xiao e Y. Marunaka, "Body Fluid pH Balance in Metabolic Health and Possible Benefits of Dietary Alkaline Foods," *eFood*, vol. 1, pp. 12-23, 2020.
- [76] I. Sopyan, M. Mel, S. Ramesh e K. A. Khalid, "Porous hydroxyapatite for artificial bone applications," *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 8, pp. 116-123, 2007.
- [77] H. Yuan, K. Kurashina, J. D. d. Bruijn, Y. Li, K. d. Groot e X. Zhang, "A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics," *Elsevier*, vol. Biomaterials 20, pp. 1799-1806, 1999.
- [78] V. F. Lvovich, *Impedance Spectroscopy - Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena*, New Jersey: Wiley, 2012.

- [79] A. Yamamoto e S. Hiromoto, "Effect of inorganic salts, amino acids and proteins on the degradation of pure magnesium in vitro," *Elsevier - Materials Science and Engineering C*, vol. 29, pp. 1559-1568, 2009.
- [80] A. Ul-Hamid, *A Beginner's Guide to Scanning Electron Microscopy*, Springer, 2018.
- [81] J. S. Fernandes, "Espectroscopia de Impedância Electroquímica," Instituto Superior Técnico, 2000.
- [82] E. Barsoukov e J. R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment and Applications*, Wiley, 2018.
- [83] M. E. Orazem e B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, Wiley, 2008.
- [84] L. Callegaro, *Electrical Impedance: Principles, Measurement, and Applications*, CRC Press, 2013.
- [85] A. Lasia, *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*, Springer, 2014.
- [86] B. Hirschorn, M. E. Orazem, B. Tribollet, V. Vivier, I. Frateur e M. Musiani, "Constant-Phase-Element Behavior Caused by Resistivity Distributions in Films," *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 157 (12), pp. C452-C457, 2010.
- [87] V. Kazmiruk, *Scanning Electron Microscopy*, InTech, 2012.
- [88] M. Bernard, E. Jubeli, M. D. Pungente e N. Yagoubi, "Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices-regulations, in vitro screening and risk-management," *Biomaterials Science*, vol. 2025, pp. 2025-2053, 2018.
- [89] S. Ramakrishna, L. Tian, C. Wang, S. Liao e W. E. Teo, "Safety Testing of a new medical device," em *Medical Devices*, Woodhead Publishing, 2015, pp. 137-153.
- [90] M. J. Stoddart, "Cell Viability Assays: Introduction," em *Mammalian Cell Viability*, Humana Press, 2011, pp. 1-6.
- [91] R. M. Heiberger e E. Neuwirth, "One-Way ANOVA," em *R Through Excel*, Springer, 2009, pp. 165-191.
- [92] A. Rutherford, *ANOVA and ANCOVA: a GLM Approach*, Wiley, 2011.
- [93] H. M. Wong, S. Wu, P. K. Chu, S. H. Cheng, K. D. Luk, K. M. Cheung e K. W. Yeung, "Low-modulus Mg/PCL hybrid bone substitute for osteoporotic fracture fixation," *Biomaterials*, vol. 34, pp. 7016-7032, 2013.
- [94] A. Zomorodian, M. Garcia, T. M. e. Silva, J. Fernandes, M. Fernandes e M. Montemor, "Biofunctional composite coating architectures based on polycaprolactone and nanohydroxyapatite for controlled corrosion activity and enhanced biocompatibility of magnesium AZ31 alloy," *Materials Science and Engineering C*, vol. 48, pp. 434-443, 2015.
- [95] D. o. M. Chemistry, "Protocol for Preparing Simulated Body Fluid (SBF)," Graduate School of Engineering, Kyoto University.
- [96] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi e T. Yamamuro, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W," *J. Biomed.Mater.Res.*, vol. 24, pp. 721-734, 1990.

- [97] A. Rezaei e M. R. Mohammadi, "In vitro study of hydroxyapatite/polycaprolactone (HA/PCL) nanocomposite synthesized by an in situ sol-gel process," *Materials Science and Engineering C*, vol. 33, pp. 390-396, 2013.
- [98] S. Moon, R. Arrabal e E. Matykina, "3-Dimensional structures of open-pores in PEO films on AZ31 Mg alloy," *Materials Letters*, vol. 161, pp. 439-441, 2015.
- [99] A. Alves, F. Wenger, P. Ponthiaux, J.-P. Celis, A. Pinto, L. Rocha e J. Fernandes, "Corrosion mechanisms in titanium oxide-based films produced by anodic treatment," *Electrochemical Acta*, vol. 234, pp. 16-27, 2017.
- [100] L. Bland, A. King, N. Birbilis e J. Scully, "Assessing the Corrosion of Commercially Pure Magnesium and Commercial AZ31B by Electrochemical Impedance, Mass-Loss, Hydrogen Collection, and Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy Solution Analysis," *Corrosion*, vol. 71(2), pp. 128-145, 2015.

Anexo

Tabela A1: Análise de variância ANOVA para $\alpha = 0,05$

ANOVA						
Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	Valor p	F crítico
Entre Grupos	2863,07	4	715,77	10,21	1,48E-3	3,48
Dentro de Grupos	701,33	10	70,13	-	-	-
Total	3564,40	14	-	-	-	-

Tabela A2: Análise realizada com o método de Tukey

Pares	Diferença Absoluta	Tukey		
		$q_{0,05(5,10)}$	T	Diferença estatística significativa
Controlo/Simples	25	4,65	22,50	Sim
Controlo/PEO	41,33	-	-	Sim
Controlo/PEO+HT	27	-	-	Sim
Controlo/PEO+PCL	32,67	-	-	Sim
Simples/PEO	16,33	-	-	Não
Simples/PEO+HT	2	-	-	Não
Simples/PEO+PCL	7,67	-	-	Não
PEO/PEO+HT	14,33	-	-	Não
PEO/PEO+PCL	8,67	-	-	Não
PEO+HT/PEO+PCL	5,67	-	-	Não