

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS - PPGE3M**

LUIZ FERNANDO RODRIGUES JUNIOR

**MÉTODO DE PINTURA PARA RECOBRIMENTO DE
NANOHIĐROXIAPATITA SOBRE SUBSTRATO DE TITÂNIO**

PORTO ALEGRE, RS

2019

LUIZ FERNANDO RODRIGUES JUNIOR

**MÉTODO DE PINTURA PARA RECOBRIMENTO DE
NANOHIĐROXIAPATITA SOBRE SUBSTRATO DE TITÂNIO**

**Tese para Obtenção do Grau de
Doutor em Engenharia e Ciência dos
Materiais pela Universidade Federal
do Rio Grande do Sul – Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de
Minas, Metalúrgica e de Materiais
(PPGE3M)**

Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Loureiro dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre da Silva Rocha

PORTO ALEGRE, RS

2019

UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE DO SUL

Reitor: Rui Vicente Oppermann

Vice-reitora: Jane Tutikian

ESCOLA DE ENGENHARIA

Diretor: Luiz Carlos Pinto Silva Filho

Vice-diretor: Carla ten Caten

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Coordenador: Carlos Pérez Bergmann

Vice-coordenador: Afonso Reguly

Rodrigues Junior, Luiz Fernando

Método de Pintura para Recobrimento de
Nanohidroxiapatita sobre Substrato de Titânio / Luiz
Fernando Rodrigues Junior. -- 2019.

148 f.

Orientador: Luis Alberto Loureiro dos Santos.

Coorientador: Alexandre da Silva Rocha.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de
Materiais, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Biomaterial. 2. Revestimento. 3. Titânio. 4.
Hidroxiapatita. 5. Óleo de pinho. I. Santos, Luis
Alberto Loureiro dos, orient. II. Rocha, Alexandre da
Silva, coorient. III. Título.

LUIZ FERNANDO RODRIGUES JUNIOR

**MÉTODO DE PINTURA PARA RECOBRIMENTO DE
NANOHIIDROXIAPATITA SOBRE SUBSTRATO DE TITÂNIO**

Esta tese foi analisada e julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência dos Materiais e aprovado em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora designada pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (PPGE3M) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Luis Alberto Loureiro dos Santos

Prof. Dr. Alexandre da Silva Rocha

Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann

Aprovado em: 28 / 06 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Eng. Dr. Rafael Mello Trommer

Prof. Dr. Álvaro Meneguzzi

Prof. Dr. Fabrício Mezzomo Collares

Eu dedico este trabalho à minha amada esposa e aos meus pais pelo apoio e por compreender a minha ausência em vários momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela possibilidade de desenvolver o meu projeto de tese de doutorado. Agradeço ao Prof. Dr. Luis Alberto por ter aceitado o convite para ser o meu orientador no desenvolvimento deste projeto de doutorado, pelos momentos de discussão construtivas, pelo apoio em todos os momentos e pela compreensão da minha vida profissional como professor em uma instituição em outra cidade. Agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Rocha por ter aceito ser o meu coorientador e pelos momentos de discussões sobre avaliações e construções de novas superfícies. Agradeço ao meu aluno de iniciação científica e mais do que isso, meu parceiro de pesquisa, Matheus Tronco por toda ajuda, pelas caminhadas e entregas de amostra quando estava ausente de Porto Alegre. Com certeza a tua contribuição foi fundamental para este momento. Agradeço a colega Engenheira de Materiais, Camila Escobar, que sempre esteve presente nas dúvidas sobre o laboratório e sobre o funcionamento de alguns equipamentos. Agradeço ao amigo de longa data, o colega de doutorado e técnico de laboratório, Wilbur Trajano pelas conversas técnicas, pelo auxílio nas atividades práticas e pelas balas e doces para manter a atenção nos experimentos. Agradeço aos colegas de laboratório Junio, Fernando, Nayrim, Wilian, Fernando e Nathalia, pelas ótimas conversas, pelos momentos de descontração e pelo auxílio nas atividades práticas. Agradeço aos meus amados pais que sempre estiveram me acompanhando nesta caminhada para a construção do meu saber e da minha profissão como engenheiro, professor e pesquisador. Com certeza a caminhada do doutorado foi mais leve pela ajuda com todas as caronas, pelos cafés da manhã e jantas, muitas vezes em horários esdrúxulos e fora da rotina de vocês. Agradeço a compreensão com a minha rotina de ir e vir a Porto Alegre, sem poder ficar mais tempo e muitas vezes apenas vê-los no início da manhã e ou no final da

noite, amo vocês. Agradeço à minha amada esposa que desde 2009 está ao meu lado, me acompanhando na caminhada da minha formação pessoal e profissional. Tu estás desde o início desta jornada e sempre me apoiou neste desafio, me auxiliando nas minhas dúvidas técnicas, me incentivando a continuar e puxando a minha orelha nos momentos certos, me inspirando com a tua garra e organização. Sei que para ti foi difícil em muitos momentos, mesmo assim tu nunca me negaste um sorriso e um amparo nessa caminhada. Amo-te minha Lilica. Por afinal agradeço a Deus, que sempre me amparou nos momentos de dúvida, que me permitiu ter amigos e pessoas fantásticas ao meu lado, que me permitiu ter pais maravilhosos e que trouxe uma grande mulher para chamar de esposa e companheira.

A imaginação é mais importante que o conhecimento. Conhecimento auxilia por fora, mas só o amor socorre por dentro. Conhecimento vem, mas a sabedoria tarda.

Albert Einstein

PUBLICAÇÕES

PROCESSO DE REVESTIMENTO DE SUBSTRATO COM BIOCERÂMICA E SUBSTRATO COM SUPERFÍCIE REVESTIDA COM BIOCERÂMICA. PEDIDO DE PATENTE REALIZADO NO ANO DE 2017.

DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA METODOLOGIA PARA O REVESTIMENTO DE TITÂNIO COM HIDROXIAPATITA. TRABALHO COMPLETO PUBLIADO NO X CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAS (COLAOB), 2018

REVESTIMENTO DE TITÂNIO COM HIDROXIAPATITA: UMA NOVA METODOLOGIA. RESUMO PUBLICADO NO XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA (CBEB), 2018.

PAINTING METHOD FOR HYDROXYAPATITE COATING ON TITANIUM SUBSTRATE. ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CERAMICS INTERNATIONAL, 2019.

RESUMO

O desenvolvimento de novas tecnologias para a área de biomateriais é de fundamental importância. A cada dia a expectativa de vida aumenta e faz-se necessário o desenvolvimento de novas ligas ou novos processos de recobrimento que garantam maior biocompatibilidade, menos efeitos deletérios e maior interação com os tecidos. Neste sentido, muitos esforços têm sido desenvolvidos pela comunidade científica para a aplicação de recobrimentos em substratos metálicos, principalmente de fosfatos de cálcio, em especial de hidroxiapatita. Este tipo de recobrimento, pode conferir ao substrato metálico uma melhor adesão ao tecido ósseo, redução da formação de tecido fibroso e osteointegração. Contudo, muitas das técnicas comercialmente aplicadas apresentam custos elevados e formação de segundas fases, tais como tetrafosfato de cálcio (TTCP) e fosfato tricálcico (TCP). Neste sentido, este estudo procurou o desenvolvimento de uma nova metodologia com baixo custo e de fácil aplicação e que não houvesse a formação de outras fases, além da hidroxiapatita. Para tal, o projeto avaliou a formação de uma dispersão de hidroxiapatita em óleo de pinho e um processo de recobrimento realizado com pincel sobre substrato de titânio comercialmente puro (TiCp) e também foi avaliado a formação do filme sobre o TiCp anodizado em diferentes tensões. Os processos de recobrimento foram seguidos de etapas de tratamento térmico em forno a plasma ou forno elétrico. Os produtos obtidos foram caracterizados quanto ao seu comportamento químico e mecânico, morfologia, estabilidade eletroquímica, liberação de íons cálcio, comportamento em SBF e citotoxicidade em ambiente celular. Os resultados dos ensaios mecânicos demonstraram que o tratamento térmico afeta as propriedades do substrato, porém os valores finais se mantêm em valores de acordo com o preconizado pela norma ASTM F67-13. Os testes de difração de raios-X e Raman demonstraram a não formação de outras fases de fosfatos. Ensaios de SBF e citotoxicidade mostraram que a metodologia é

adequada para a aplicação e desenvolvimento de um biomaterial biocompatível. Estes resultados comprovam a eficácia da metodologia e demonstram que os produtos obtidos estão em acordo com normas nacionais e internacionais para o revestimento de substratos metálicos com hidroxiapatita.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, recobrimento, titânio, óleo de pinho.

ABSTRACT

The development of new technologies for biomaterials is very important. Daily life expectancy increases, and it is necessary to develop new alloys or new coating processes that guarantee greater biocompatibility, less deleterious effects and greater interaction with tissues. In this sense, many efforts have been developed by the scientific community for the application of coatings on metallic substrates, mainly calcium phosphates, especially hydroxyapatite. This type of coating can give the metallic substrate a better adhesion to the bone tissue, a reduction of fibrous tissue formation and osseointegration. However, many of the commercially available techniques present high costs and second phases formation, such as calcium tetrachlorophosphate (TTCP) and tricalcium phosphate (TCP). In this sense, this study sought the development of a new methodology with low costs, easy application without no other phosphates phase formation. For this, the project evaluated the formation of a dispersion of hydroxyapatite in pine oil and a coating process performed with a brush on commercially pure titanium substrate (TiCp) and the formation of the film on TiCp anodized at different voltages was evaluated. The products obtained were characterized by their chemical and mechanical behavior, morphology, electrochemical stability, calcium ion release, SBF behavior and cytotoxicity in the cellular environment. Results of the mechanical tests demonstrated that the heat treatment affects the properties of the substrate, but the final values are maintained in accordance with the ASTM F67-13 standard. X-ray diffraction and Raman tests demonstrated the non-formation of other phosphate phases. SBF and cytotoxicity tests showed that the methodology is suitable for the application and development of biocompatible biomaterial. These results confirm the effectiveness of the methodology and demonstrate that the products obtained are in accordance with national and international standards for the coating of metal substrates with hydroxyapatite.

Keywords: Hydroxyapatite, coating, titanium, pine oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática da complexidade envolvida para a concepção de um produto biocompatível.	38
Figura 2: Estrutura cristalina do titânio: (a) fase α e (b) fase β	42
Figura 3: Esquema mostrando as diversas aplicações das biocerâmicas no corpo humano.	45
Figura 4: Exemplo de aplicação de Al_2O_3 (A) e ZrO_2 (B) em dispositivos implantáveis ..	46
Figura 5: Estrutura cristalina da hidroxiapatita. As esferas azuis, brancas, vermelhas e amarelas são Ca, P, O e OH, respectivamente.	47
Figura 6: Esquema da interação tecido-implante.	50
Figura 7: Fotos de microscopia eletrônica de varredura de dois stents; (a) antes do eletropolimento e (b) após o eletropolimento.	54
Figura 8: Esquema do processo de anodização.	56
Figura 9: Esquema das reações químicas e do desenvolvimento da estrutura formado no processo de PEO.	57
Figura 10: Esquema do processo de deposição via <i>dip-coating</i>	59
Figura 11: Seção polida de um recobrimento de HA feito por aspensão térmica a plasma.	62
Figura 12: Classificação dos processos de aspensão térmica conforme a sua fonte de aquecimento.	62
Figura 13: Esquema da pistola de aspensão térmica a plasma.	63
Figura 14: Esquema de uma pistola de aspensão por HVOF.	64
Figura 15: Esquema demonstrando os processos de degradação da hidroxiapatita em função da temperatura.	65
Figura 16: Razão das fases presentes no recobrimento obtido por aspensão térmica a plasma em função das temperaturas de tratamento térmico.	66
Figura 17: Tensão de ligação de recobrimentos de HA feitos a plasma em função do tempo de imersão em SBF; sem tratamento térmico posterior (—◆—) e com tratamento térmico posterior (—■—).	67
Figura 18: Fluxograma do desenvolvimento do projeto.	69

Figura 19: Desenho esquemático do equipamento utilizado na sinterização a plasma com gaiola catódica.....	73
Figura 20: Imagem do modelo de corpo de prova utilizado para o ensaio de tração do titânio.	74
Figura 21: Ilustração do processo de precipitação da HAp sobre a superfície de Ti-OH (KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003).....	80
Figura 22: Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e resposta celular. EROs são gerados internamente nas células nas mitocôndrias e peroxissomas e por enzimas citocromas P450 (CYP). Luz UV, radiação ionizante e agentes químicos aumentam a produção destes tipos de compostos. Enzimas e antioxidantes endógenos e exógenos (GSH, NAC e vit. C e E). Macromoléculas celulares (DNA, lipídios e proteínas) podem sofrer danos, caso a produção de ERO for maior que a capacidade antioxidante das células. Adaptado de (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006).....	83
Figura 23: Difractogramas de raios-X das diferentes HAp utilizadas para o recobrimento das amostras. Fase Hidroxiapatita (ICDD: 09-0432)	86
Figura 24: Espectro de Infravermelho das diferentes HAp utilizadas para o recobrimento das amostras.	87
Figura 25: Potencial zeta da hidroxiapatita não calcinada e calcinada nas temperaturas de 800 °C e 1100 °C.	88
Figura 26: Micrografia óptica das amostras em barra de titânio grau 2 antes (A e B) e após o tratamento térmico (C e D) com aumentos de 100x e 200x.	89
Figura 27: Avaliação do comportamento mecânico em tração do TiCp antes (TiATT) e após (TiPTT) o tratamento térmico realizado para o processo de revestimento com hidroxiapatita.	91
Figura 28: Comportamento em dureza vickers para as amostras antes (TiATT) e após (TiPTT) o tratamento térmico.	91
Figura 29: Avaliação da rugosidade para as amostras de titânio sem tratamento prévio e tratadas pelos processos de anodização a 20 V, 40 V e 60 V.	93
Figura 30: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies das amostras anodizadas em diferentes potenciais: (A) 20 V; (B) 40 V e (C) 60 V obtidas em aumento de 1000 x e (D) 60 V obtida em aumento de 2000 x.	95

Figura 31: Avaliação do comportamento eletroquímico em SBF do TiCp e das amostras anodizadas a 20V, 40V e 60V. (A) Curvas de potencial de circuito aberto (PCA); (B) Curvas de polarização potenciodinâmica.....	96
Figura 32: Recobrimento via pincel de substratos com hidroxiapatita antes de realizar o processo de tratamento térmico: (A) hidroxiapatita não calcinada e (B) hidroxiapatita calcinada a 1100 °C.	98
Figura 33: Valores de viscosidade do óleo de pinho (OP) e das misturas com hidroxiapatita não calcinada (OPHApNC) e calcinada a 800 °C (OPHAp800) e 1100 °C (OPHAp1100).....	99
Figura 34: Imagens de microscopia óptica da superfície das peças revestidas em sistema a plasma: (A) temperatura de 300 °C; (B) temperatura de 400 °C; (C) temperatura de 500 °C.	101
Figura 35: Difração de raios-X do pó de hidroxiapatita (HAp) e das amostras tratadas a plasma nas temperaturas de 300°C (RP300), 400°C (RP400) e 500°C (RP500).....	101
Figura 36: Teste de adesividade dos filmes de HAp depositados pelo processo a plasma: temperaturas de 300°C (RP300), 400°C (RP400) e 500°C (RP500).....	102
Figura 37: Imagens de MO e MEV dos diferentes revestimentos de HAp: (A) HAp não calcinada; (B) calcinada a 800 °C e (C) calcinada a 1100 °C.....	105
Figura 38: Imagens de MEV dos diferentes revestimentos de HAp: (A) e (B) HAp não calcinada; (C) e (D) calcinada a 800 °C e (E) e (F) calcinada a 1100 °C	106
Figura 39: Imagens de MEV da secção das amostras de revestimentos com HAp: (A) calcinada a 800 °C e (B) calcinada a 1100 °C.....	107
Figura 40: Difractogramas dos recobrimentos de titânio com hidroxiapatita para as diferentes variações de pré-tratamento do substrato de titânio. Fase HAp (ICDD: 00-009-0432) e fase rutilo (ICDD: 01-086-0148).	109
Figura 41: Difractograma do titânio revestido com hidroxiapatita (A) e titânio anodizado a 60 V e revestido com hidroxiapatita (B). Fases de HAp (ICDD: 00-009-0432) e fases do rutilo (ICDD: 01-086-0148). Os gráficos mostram a mudança dos difratogramas conforme foi realizado o desgaste abrasivo.	110

Figura 42: Difratoograma do titânio revestido com hidroxiapatita. Os gráficos mostram as diferenças observadas para a amostra sem desgaste abrasivo (TiHAp1100) e após a última etapa de desgaste (TiHAp1100_C).....	111
Figura 43: Difratoograma do titânio anodizado a 60 V e revestido com hidroxiapatita. Os gráficos mostram as diferenças observadas para a amostra sem desgaste abrasivo (Ti60VHAp1100) e após a última etapa de desgaste (Ti60VHAp1100_D).	111
Figura 44: Espectro Raman dos recobrimentos de titânio com hidroxiapatita para as diferentes variações de pré-tratamento do substrato de titânio.	113
Figura 45: Avaliação do comportamento Raman do revestimento de hidroxiapatita sobre titânio anodizado a 60V em 3 níveis de desgaste: (A) imagem do microscópio do Raman com as regiões analisadas; (B) espectros Raman das 3 regiões.	115
Figura 46: Avaliação dos testes de adesividade para os diferentes tipos de pré-tratamentos aplicados para o revestimento.	116
Figura 47: Representação esquemática dos diferentes modos de falha: (A) falha por adesividade; (B) falha por coesão; (C) combinação de ambos modos de falha.	118
Figura 48: Adesividade do filme de hidroxiapatita sobre titânio anodizado a 60 V. HAp calcinada a 800 °C (Ti60VHAp800); HAp calcinada a 1100 °C (Ti60VHAp1100). Gráfico em destaque apresenta a média e o desvio padrão das amostras.....	119
Figura 49: Avaliação do comportamento eletroquímico do amostras de titânio puro, anodizado a 60 V e anodizado revestido com hidroxiapatita. (A) Curvas de potencial de circuito aberto (E_{CA}); (B) Curvas de polarização potenciodinâmica.	121
Figura 50: Comportamento em dissolução do revestimento de hidroxiapatita sobre o titânio anodizado a 60 V.	123
Figura 51: Imagens de microscopia eletrônica das diferentes amostras após contato com SBF: TiCp (A, D, G); Ti60V (B, E, H); Ti60VHAp (C, F, I). Imagens obtidas com aumento de 2000x.	126
Figura 52: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (A) e composição química por EDS (B) e (C) da amostra revestida com HAp após 7 dias em contato com SBF.	126
Figura 53: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (A) e composição química por EDS (B) e (C) da amostra revestida com HAp após 28 dias em contato com SBF.	127

Figura 54: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (A) e composição química por EDS (B) e (C) da amostra de TiCp após 28 dias em contato com SBF. 127

Figura 55: Comportamento in vitro dos diferentes materiais. Valores são apresentados como as médias \pm DP de três experimentos independentes. Citotoxicidade em 72 h de incubação via (A) técnica de MTT (B) DCFH-DA; (C) Óxido nítrico; (D) dsDNA. 130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Possíveis efeitos a saúde dos processos de corrosão em ligas metálicas.....	40
Tabela 2: Elementos de liga e os tipos de fase que eles estabilizam no Ti.....	41
Tabela 3: Propriedades mecânicas do titânio e suas ligas.....	42
Tabela 4: Métodos de modificação da superfície do titânio e suas ligas.....	51
Tabela 5: Comparação entre anodização convencional e a PEO.	58
Tabela 6: Resumo das características de filmes obtidos por aspensão térmica a plasma.	63
Tabela 7: Parâmetros de rede e tamanhos de cristalito obtidos segundo a Equação de Scherrer.....	86
Tabela 8: Parâmetros de corrosão do ensaio de polarização potenciodinâmica em SBF para as amostras de titânio puro e anodizado em 3 diferentes potenciais.....	97
Tabela 9: Relação dos picos observados.....	114
Tabela 10: Parâmetros de corrosão do ensaio de polarização potenciodinâmica em SBF para as amostras de titânio puro, anodizado e anodizado revestido com hidroxiapatita.	120

LISTA DE ABREVIações

Adm⁻² - ampere por decímetro quadrado;
ASTM - *American Society for Testing and Materials*;
Ca/P - razão molar de átomos de cálcio e fósforo;
Ca²⁺- íons cálcio;
CCC - cúbico de corpo centrada;
CVD - *chemical vapour deposition* (deposição química por vapor);
DLC - *diamond like carbon*;
DNA - ácido desoxirribonucleico
DRX - difração de raios-X;
Eca - potencial de circuito aberto;
Ecorr - potencial de corrosão;
EDS - espectroscopia de fluorescência de raios-X por energia dispersa;
ERO - espécies reativas de oxigênio;
FTIR - espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier;
HAP - hidroxiapatita;
HApNC - hidroxiapatita não calcinada;
HAp800 - hidroxiapatita calcinada a 800 °C;
HAp1100 - hidroxiapatita calcinada a 1100 °C;
HC - hexagonal compacta;
HVOF - *high velocity oxy-fuel*;
ICDD - *International Center for Diffraction Data*;
Icorr - corrente de corrosão;
kg - quilograma;
MEV - microscopia eletrônica de varredura;
mL - mililitro;
MO - microscopia óptica;
MPa - mega pascal;
OP - óleo de pinho;

OPHAp1100 - mistura de óleo de pinho e hidroxiapatita calcinada a 1100 °C;
OPHAp800 - mistura de óleo de pinho e hidroxiapatita calcinada a 800 °C;
OPHApNC - mistura de óleo de pinho e hidroxiapatita não calcinada;
PEAD - polietileno de alta densidade;
PEO - *plasma electrolytic oxidation* (oxidação eletrolítica a plasma);
ppm - partes por milhão;
PVD - *physical vapour deposition* (deposição física por vapor);
RP300 - revestimento a plasma com temperatura de 300 C;
RP400 - revestimento a plasma com temperatura de 400 C;
RP500 - revestimento a plasma com temperatura de 500 C;
SBF - *simulated body fluid* (solução simulada de fluido corpóreo);
TBS - *tris-buffered saline*;
TCP - fosfato tricálcico;
Ti - titânio;
Ti20V - titânio anodizado a 20 volts;
Ti40V - titânio anodizado a 40 volts;
Ti60V - titânio anodizado a 60 volts;
TiC, - carbeto de titânio;
TICN - carbeto e nitreto de titânio;
TiCp - titânio comercialmente puro;
TiHAp1100 - titânio revestido com hidroxiapatita calcinada a 1100 °C;
TiHAp800 - titânio revestido com hidroxiapatita calcinada a 800 °C;
TiHApNC - titânio revestido com hidroxiapatita não calcinada;
Ti20VHAp1100 - titânio anodizado a 20 volts e revestido com hidroxiapatita calcinada a 1100 °C;
Ti40VHAp1100 - titânio anodizado a 40 volts e revestido com hidroxiapatita calcinada a 1100 °C;
Ti60VHAp1100 - titânio anodizado a 60 volts e revestido com hidroxiapatita calcinada a 1100 °C;

Ti60VHAp800 - titânio anodizado a 60 volts e revestido com hidroxiapatita calcinada a 800 °C;

TiN - nitreto de titânio;

TiO₂ - óxido de titânio;

TTCP - tetra cálcio fosfato;

V - volt;

α-TCP - fase alfa do fosfato tricálcico;

β-TCP - fase beta do fosfato tricálcico;

λ - comprimento de onda da radiação do Cu;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
2	OBJETIVOS	35
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	36
3.1	O USO DE MATERIAIS EM DISPOSITIVOS MÉDICOS – BIOMATERIAIS	36
3.1.1	Biomateriais Metálicos	39
3.1.2	Biomateriais cerâmicos	43
3.1.3	Hidroxiapatita	46
3.2	SUPERFÍCIE: INTERFACE CORPO E BIOMATERIAL	49
3.3	TÉCNICAS DE PREPARO DE SUPERFÍCIES	50
3.3.1	Métodos Mecânicos	52
3.3.2	Métodos Químicos	54
3.3.3	Métodos Físicos	60
4	MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.1	SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA	69
4.2	RECOBRIMENTO DAS SUPERFÍCIES METÁLICAS COM HIDROXIAPATITA	70
4.2.1	Limpeza e pré-tratamento das superfícies	70
4.2.2	Processos de recobrimento	71
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	74
4.3.1	Dureza	74
4.3.2	Teste de tração	74
4.3.3	Avaliação da microestrutura	75
4.3.4	Perfilometria	75
4.3.5	Viscosidade	75
4.3.6	Difração de raios-X	75
4.3.7	Espectroscopia de Infravermelho	77
4.3.8	Espectroscopia Raman	77
4.3.9	Metodologia para desgaste abrasivo dos revestimentos	77
4.3.10	Microscopia Eletrônica de Varredura	77
4.3.11	Teste de adesão dos recobrimentos	78

4.3.12	Caracterização eletroquímica	78
4.3.13	Comportamento em SBF	79
4.3.14	Taxa de liberação de íons Ca^{2+}	80
4.3.15	Citotoxicidade e viabilidade celular	80
4.3.16	Avaliação estatística	84
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS DE HIDROXIAPATITA	85
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO	88
5.2.1	Avaliação da microestrutura	88
5.2.2	Comportamento mecânico	89
5.2.3	Superfície do substrato	92
5.3	AVALIAÇÃO DA MISTURA DE ÓLEO DE PINHO E HIDROXIAPATITA	97
5.4	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO REVESTIMENTO	99
5.4.1	Ensaio realizados em forno a plasma	99
5.4.2	Ensaio realizados em forno elétrico	103
5.4.3	Adesividade	116
5.5	COMPORTAMENTO DO REVESTIMENTO PARA ANODIZAÇÃO 60V	117
5.5.1	Adesividade	117
5.5.2	Comportamento eletroquímico dos revestimentos	119
5.5.3	Liberação de cálcio (Ca^{2+})	121
5.5.4	Avaliação em SBF	123
5.5.5	Avaliação de citogenotoxicidade das amostras	128
6	CONCLUSÕES	131
	REFERÊNCIAS	133

1 INTRODUÇÃO

Atualmente as expectativas para a função de um biomaterial tem avançado no sentido de se obter produtos que apresentem maior durabilidade, menores respostas deletérias, bioatividade e que auxiliem no crescimento de novos tecidos (ENDERLE; BLANCHARD; BRONZINO, 2005). Para tanto, 2 (dois) caminhos podem ser utilizados para se obter produtos com estas características: 1 – o tratamento da superfície de um biomaterial conhecido, promovendo a melhora ou a obtenção de novas propriedades ao mesmo. 2 – o desenvolvimento de um novo biomaterial do zero, como as novas ligas de fase beta (β) do titânio (Ti), compostas por elementos não tóxicos e estabilizadores da fase β , tais como o nióbio (Nb) e o zircônio (Zr) (JEONG et al., 2014). Porém, apesar destas novas ligas evitarem o uso de elementos que podem promover reações citotóxicas ou doença de Alzheimer (GEETHA; DURGALAKSHMI; ASOKAMANI, 2010) sua bioatividade limitada somente pode ser contornada por meio de tratamentos químicos com álcalis ou com recobrimentos de fosfato de cálcio (JEONG et al., 2014; LIU; CHU; DING, 2004).

Por tratamento superficial pode-se elencar diferentes tipos de técnicas, tais como: polimento mecânico e eletropolimento, anodização, tratamentos químicos, deposição química por vapor (“Chemical Vapour Deposition” – CVD), deposição física por vapor (“Physical Vapour Deposition” – PVD), jateamento, aspersão térmica, dip coating, entre outros (LIU; CHU; DING, 2004; TROMMER; SANTOS; BERGMANN, 2007). Dentre estas, a deposição de fosfatos de cálcio, em especial da hidroxiapatita (HAp), é considerada uma das principais maneiras de aprimorar as propriedades de osteointegração e aumentar a bioatividade e biocompatibilidade dos substratos metálicos. A sua alta biocompatibilidade e propriedades de osteointegração referem-se à sua composição e estrutura cristalina ser similar aos da apatita presente no tecido ósseo e desta forma, ser adequada a sua reconstrução e substituição (HARUN

et al., 2018; MOHSENI; ZALNEZHAD; BUSHROA, 2014; YANG; KIM; ONG, 2005).

Comercialmente, o processo de aspensão térmica (plasma spray) é o mais utilizado para a obtenção de recobrimentos bioativos com HAp (VAHABZADEH et al., 2015). Entretanto, a temperatura de processo do plasma induz a mudança de cristalinidade e de composição na HAp. Estas mudanças envolvem a formação de fases secundárias, tais como TCP, TTCP e oxiapatitas, além de compostos de fosfatos de cálcio amorfos (KWEH; KHOR; CHEANG, 2002a, 2002b; YANG; KIM; ONG, 2005). Por serem mais absorvíveis que a HAp cristalina, estes compostos podem reduzir a adesão do substrato com o revestimento, comprometendo a funcionalidade do implante (HENCH, 1991; KWEH; KHOR; CHEANG, 2002a). Além de efeitos não desejáveis, o processo de revestimento por plasma spray é caracterizado por fazer uso de robôs, sistemas de vácuo ou com atmosferas controladas e a necessidade de mão-de-obra altamente especializada. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias que propiciem a formação de revestimentos sem a degradação da fase HAp, que apresente boas propriedades de adesão e que seja simples e de baixo custo.

Neste projeto foi desenvolvido uma nova metodologia para o revestimento de titânio comercialmente puro (TiCp)¹. A metodologia envolve a formação de uma dispersão de HAp em óleo de pinho e sua aplicação via pincel, seguida de processos de tratamento térmico para eliminação do óleo e formação do filme de HAp.

¹ Nas normas internacionais ISO 5832-2:2018 e ASTM F67-13 (2017), o termo utilizado é titânio não ligado (*unalloyed titanium*), porém na literatura nacional e internacional e na norma NBR ISO 5832-2:2001 é usado o termo adotado neste trabalho: Titânio Comercialmente Puro (TiCp).

2 OBJETIVOS

Desenvolver uma metodologia para o revestimento de titânio comercialmente puro com HAp, utilizando método de pintura, e avaliar as suas propriedades físico-químicas e de biocompatibilidade.

Objetivos específicos:

Abaixo são apresentados os objetivos específicos do projeto:

- a. Caracterizar e desenvolver tinta de HAp que permita seu uso no processo de pintura para o recobrimento de substratos de titânio;
- b. Verificar a influência de diferentes condições das superfícies do substrato de titânio e verificar sua influência na obtenção de recobrimentos de HAp;
- c. Verificar a adequação dos recobrimentos obtidos às normas internacionais de recobrimento de biomateriais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O USO DE MATERIAIS EM DISPOSITIVOS MÉDICOS – BIOMATERIAIS

Ao longo dos séculos a humanidade sempre fez uso de materiais para substituição de tecidos, partes e membros do corpo. Porém, foi somente no século 19 que houve um aumento do uso destes materiais, “principalmente após as técnicas de assepsia cirúrgica desenvolvidas pelo Dr. Joseph Lister em 1860” (KUHN, 2005, p. 256). A primeira prótese total de quadril foi feita no ano de 1938 e nas décadas de 1950 e 1960 foram utilizados pela primeira vez polímeros para a substituição de córneas e vasos sanguíneos (KUHN, 2005). Ao longo destes anos, muitas definições foram utilizadas para os biomateriais, mas foi somente em 1982, na Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas que foi definido que um biomaterial é

toda substância (com exceção de fármacos) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregada como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008, p. 70)

Por esta definição, considera-se que todos os tipos de materiais, sejam eles; metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos, quando empregados na construção de próteses, implantes odontológicos, *scaffolds*, etc são um biomaterial.

Apesar de aceita pela comunidade científica, a definição proposta na Conferência de Conselho de Biomateriais para Aplicações Clínicas não fornece um entendimento prático dos biomateriais, principalmente no que diz respeito à interação entre estes tipos de materiais e o corpo humano. Quanto à

resposta biológica, os biomateriais podem ser classificados em: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e reabsorvíveis (HENCH; WILSON, 2013).

Biotoleráveis:

Materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Atinge-se assim, no máximo, a chamada "osteoproximação" a distância, provavelmente induzida pela liberação por parte do material de componentes (p. ex. monômeros, íons, produtos de corrosão) que se alojam no tecido hospedeiro. A espessura desta camada, assim como sua composição, depende do tipo de material empregado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formado, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos, como o polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) utilizado no inserto acetabular.

Bioinertes:

Materiais também tolerados pelo organismo, mas a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou, mais realisticamente, o faz em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima. A resposta fagocitária será passageira e uma fina cápsula tomará lugar após o implante. Em alguns casos, esta camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono.

Bioativos:

Materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração), em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea. O colágeno e a fase mineral do osso

adjacente são depositados diretamente sobre a superfície do material do implante, dando origem a uma ligação resistente à tração entre o material bioativo e o osso. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a HAp e os compostos de fosfato de cálcio.

Absorvíveis:

Materiais que após certo período de tempo em contato com os tecidos acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos destes materiais são: o fosfato tricálcico (TCP) e o poli (ácido lático) - PLA.

Na Figura 1 é apresentado um esquema da biocompatibilidade, mostrando a importância do entendimento das propriedades do biomaterial e dos tipos de tecidos em que o material será exposto no organismo.

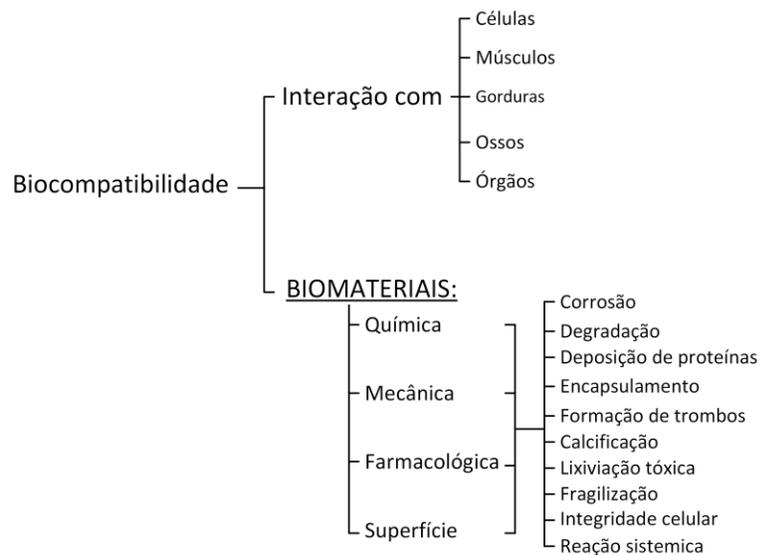


Figura 1: Ilustração esquemática da complexidade envolvida para a concepção de um produto biocompatível.

Fonte: Adaptado de (PARK; LAKES, 2007).

3.1.1 Biomateriais Metálicos

Materiais metálicos têm sido utilizados em muitos tipos de implantes ao longo dos anos. “O primeiro material metálico desenvolvido especialmente para uso em humanos foi *Sherman Vanadium Steel* que foi utilizado na produção de parafusos e placas para ossos fraturados” (PARK; LAKES, 2007, p. 100). O uso de materiais metálicos na área de ortopedia e odontologia como um biomaterial é justificado pelas suas boas propriedades mecânicas (resistência mecânica e à fratura), facilidade na produção de peças com geometrias simples, complexas e de variados tamanhos. Outra característica relevante na aplicação dos metais é a sua elevada condutividade elétrica que permite o desenvolvimento de sistemas de estímulo muscular, como marca-passos cardíacos (PILLIAR, 2009).

A biocompatibilidade destes materiais é um importante fator, pois materiais metálicos tendem a sofrer processos de corrosão em ambientes agressivos, como o corpo humano. Neste caso, a corrosão acarreta a liberação de elementos de liga no organismo, resultando em efeitos indesejáveis (Tabela 1), e também pode levar a uma falha catastrófica do dispositivo médico.

Apesar do efeito negativo oriundo do processo de corrosão dos biomateriais metálicos, estudos têm sido desenvolvidos na utilização de ligas especiais de Magnésio biodegradáveis. Com a utilização destas ligas biodegradáveis, um dispositivo de apoio à regeneração de um osso, que perde a sua funcionalidade após o tratamento, não precisaria de uma cirurgia de remoção, fato observado em implantes produzidos com ligas metálicas convencionais (MAHYUDIN; WIDHIYANTO; HERMAWAN, 2016). Contudo, estes materiais para serem utilizados em implantes devem ser elaborados com componentes que ao se oxidarem em contato com tecidos humanos, os seus produtos de corrosão, tipo e/ou quantidade de material liberado, não causem nenhum efeito indesejado ao organismo (PERSAUD-SHARMA; MCGORON, 2012).

Tabela 1: Possíveis efeitos a saúde dos processos de corrosão em ligas metálicas.

Elemento de Liga	Efeitos da Corrosão
Níquel	Causa problemas na pele – dermatites
Cobalto	Anemia do tipo B – inibição da absorção de ferro
Cromo	Úlceras e distúrbios do sistema nervoso central
Alumínio	Epilepsia e doença de Alzheimer
Vanádio	Toxico quando em estado metálico

Fonte: Adaptado de (GEETHA; DURGALAKSHMI; ASOKAMANI, 2010).

3.1.1.1 Ti e suas ligas

O titânio foi descoberto pelo reverendo britânico William Gregor em 1791, quando ele trabalhava com a “areia preta”, conhecida como ilmenita, proveniente do rio *Helford*, em *Menachan Valley, Cornwall*, Inglaterra. O reverendo e mineralogista obteve o novo elemento pela remoção do ferro e tratamento da areia com ácido clorídrico, produzindo um óxido de titânio de baixa pureza. Mas foi somente após 4 (quatro) anos que o termo titânio foi utilizado, quando o químico alemão Martin Heinrich Klaproth, que trabalhava com um mineral de rutila, utilizou o termo titânio para o novo elemento, uma homenagem aos titãs da mitologia grega. Entretanto, somente em 1932 o titânio foi produzido em grandes quantidades, por meio da reação de redução do $TiCl_4$, desenvolvida por Wilhelm Justin Kroll. Até os dias de hoje a redução do $TiCl_4$, conhecida como processo Kroll, é a principal forma de obtenção do Ti (LEYENS; PETERS, 2003). Desde então o Ti vem sendo utilizado nas indústrias de aviação, produtos químicos, energia, esportes e produtos médicos.

O Ti como material para uso em implantes já vem sendo estudado desde o início do século XX, quando este foi tolerado pelo fêmur de um gato,

assim como ligas de aço inox e Vitallium® (PARK; LAKES, 2007). Desde então, o uso de materiais implantáveis feitos em Ti e suas ligas têm sido justificado pela sua boa resistência à fadiga, sua elevada resistência à corrosão, baixo módulo de elasticidade (100–110 GPa), quando comparado a outros materiais metálicos, e sua elevada biocompatibilidade (PILLIAR, 2009).

O Ti Comercialmente Puro (TiCp) apresenta uma estrutura Hexagonal Compacta (HC), fase α (Figura 2a), à temperatura ambiente, permanecendo esta estrutura até temperaturas de 882,5°C (LIU; CHU; DING, 2004). Acima desta temperatura, o TiCp se torna Cúbico de Corpo Centrada (CCC), fase β (Figura 2b). A adição de elementos de liga permite estabilizar uma ou outra fase (Tabela 2), o que permite obter características diferentes ao produto obtido. Como no caso de materiais de fase β -isomorfos, que podem apresentar um módulo de Young muito inferior ao do TiCp (PILLIAR, 2009), reduzindo o efeito de blindagem de tensões (LIU; CHU; DING, 2004), favorecendo a sua aplicação no desenvolvimento de placas e pinos para uso em cirurgias ortopédicas.

Tabela 2: Elementos de liga e os tipos de fase que eles estabilizam no Ti.

	Fase α	Fase β	
		Isomorfo	Eutético
Elemento	Al, O, N e C	Mo, V, Nb e Ta	Fe, W, Cr, Si, Ni, Co, Mn e H

Fonte: Adaptado de (PILLIAR, 2009).

Na Tabela 3 é apresentado diferentes ligas de Ti, suas diferentes microestruturas e suas propriedades mecânicas. Apesar de apresentar ótimas características para o desenvolvimento de dispositivos médicos, o Ti e suas ligas apresentam um comportamento tribológico pobre quando submetidos a processos de atrito. Isto torna o Ti inadequado para peças que sofrem carregamento em articulações sem um tratamento que aumente a sua

resistência ao desgaste (DONG, 2010; LIU; CHU; DING, 2004; LONG, M., 1998).

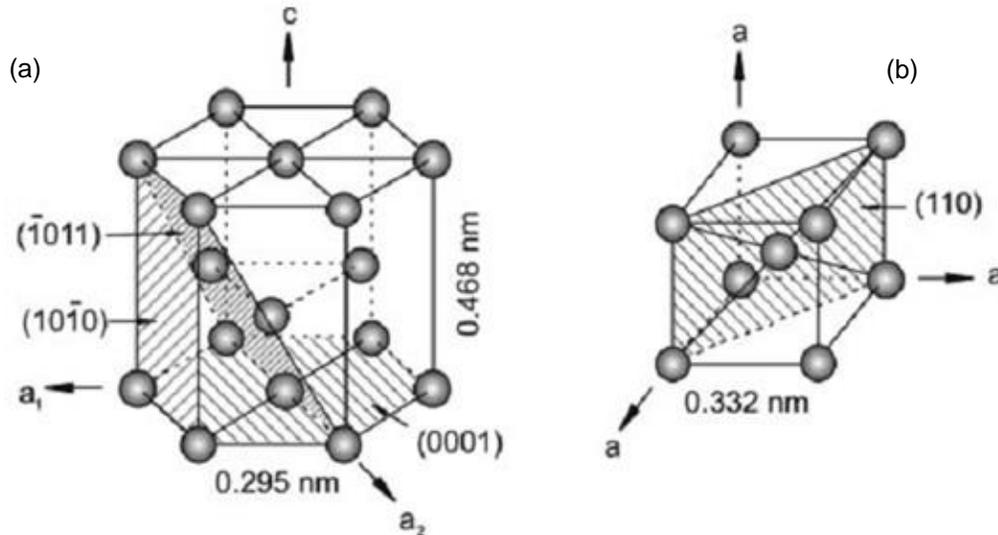


Figura 2: Estrutura cristalina do titânio: (a) fase α e (b) fase β .

Fonte: Adaptado de (LEYENS; PETERS, 2003).

Tabela 3: Propriedades mecânicas do titânio e suas ligas.

Liga	Microestrutura	Módulo Elástico (GPa)	Tensão de Escoamento (Mpa)	Tensão de Ruptura (MPa)
Ti CP	α	105	692	785
Ti-6Al-4V	α/β	110	850-900	960-970
Ti-6Al-7Nb (protasul 100)	α/β	105	921	1024
Ti-5Al-2.5Fe	α/β	110	914	1033
Ti-12Mo-6Zr- 2Fe (TMZF)	metaestável β	74-85	1000-1060	1060-1100
Ti-15Mo-5Zr- 3Al	metaestável β	82	771	812
	$\alpha + \beta$ envelhecida	100	1215	1310

Tabela 3: Propriedades mecânicas do titânio e suas ligas (continuação).

Ti-0/20Zr- 0/20Sn- 4/8Nb-2/4Ta+ (Pd, N, O)	α/β	N/A	726-990	750-1200
Ti-Zr	fundida α'/β	N/A	N/A	900
Ti-13Nb-13Zr	α'/β	79	900	1030
Ti-15Mo-3Nb- 0,30 (21SRx)	metaestável $\beta +$ α	82	1020	1020
Ti-35Nb-5Ta- 7Zr (TNZT)	metaestável β	55	530	590
Ti-35Nb-5Ta- 7Zr-0,40 (TNZTO)	metaestável β	66	976	1010
Osso	Compósito	10-40	-x-	90-140

Fonte: Adaptado de (LIU; CHU; DING, 2004).

3.1.2 Biomateriais cerâmicos

Os materiais cerâmicos há muito tempo têm sido aplicados no desenvolvimento de dispositivos para o tratamento de doenças. Porém, foi somente no final do século XX que as cerâmicas começaram a ser utilizadas como um biomaterial. As primeiras aplicações das biocerâmicas foram em próteses de joelho, utilizando Alumina (Al_2O_3) como um biomaterial (HENCH; WILSON, 2013; SANTOS, 2002).

A procura das cerâmicas como um biomaterial foi baseada inicialmente nas suas características de resistência à corrosão e ambientes agressivos e ao fato de se mostrarem inertes. Contudo, logo foi descoberto que as biocerâmicas poderiam apresentar características que eram opostas ao inicialmente planejado, ou seja, as biocerâmicas poderiam interagir com os tecidos do organismo humano, favorecendo o seu crescimento (SANTOS, 2002).

Com o passar dos anos muitas aplicações foram sendo desenvolvidas para os materiais cerâmicos (Figura 3). Atualmente as biocerâmicas são aplicadas em muitas formas e composições, com diferentes aplicações no tratamento de doenças humanas. Em muitas destas aplicações, estas são aplicadas com uma geometria específica, caso das próteses e implantes. Também são utilizadas na forma de pó, preenchendo os espaços vazios, até a completa restauração dos tecidos. Em outros casos, as biocerâmicas são aplicadas como revestimento de um substrato ou como uma segunda fase em um compósito (HENCH; WILSON, 2013). Baseado em sua reação com o organismo humano as biocerâmicas podem ser classificadas como: (ELSHAHAWY, 2011).

a. bioativas – caracterizadas por reagirem de uma forma positiva com os tecidos, são formuladas para que formem ligações químicas com tecidos moles e duros. São vitro-cerâmicos policristalinos obtidos pela cristalização controlada de vidros. Pode-se citar 3 (três) vitro-cerâmicos utilizados na fabricação de implantes: o $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ (Bioglass®); $\text{Li}_2\text{O-ZnO-SiO}_2$ (Ceravital®); A-W, nomeado assim por apresentar as fases apatita e wollastonita em sua formação (PARK, 2008);

b. bioinertes – caracterizadas por uma baixa ou quase nula reação com os tecidos do corpo. Dentre estes, pode-se citar a alumina (Al_2O_3) e a zircônia (ZrO_2) (Figura 4). A Al_2O_3 tem sido utilizada como um biomaterial desde 1970, especialmente em próteses articuladas (principalmente de quadril) e dente por causa de sua excelente biocompatibilidade e boas propriedades mecânicas (PARK, 2008). A ZrO_2 apresenta algumas de suas propriedades mecânicas tão boas ou até melhores que a alumina e uma elevada biocompatibilidade. Contudo, apresenta uma elevada densidade, baixa dureza e em meios

aquosos pode sofrer transformação de fase, afetando suas propriedades mecânicas (PARK, 2008);

c. absorvíveis – são estruturas porosas ou não porosas que são lentamente e gradualmente absorvidas pelo osso. Os fosfatos tricálcicos (α -TCP e β -TCP) são classificados como biocerâmicas reabsorvíveis. Apesar de possuírem a mesma composição química, eles diferem na sua estrutura cristalina e solubilidade, sendo o β -TCP mais estável que o α -TCP (VOLKMER, 2011).

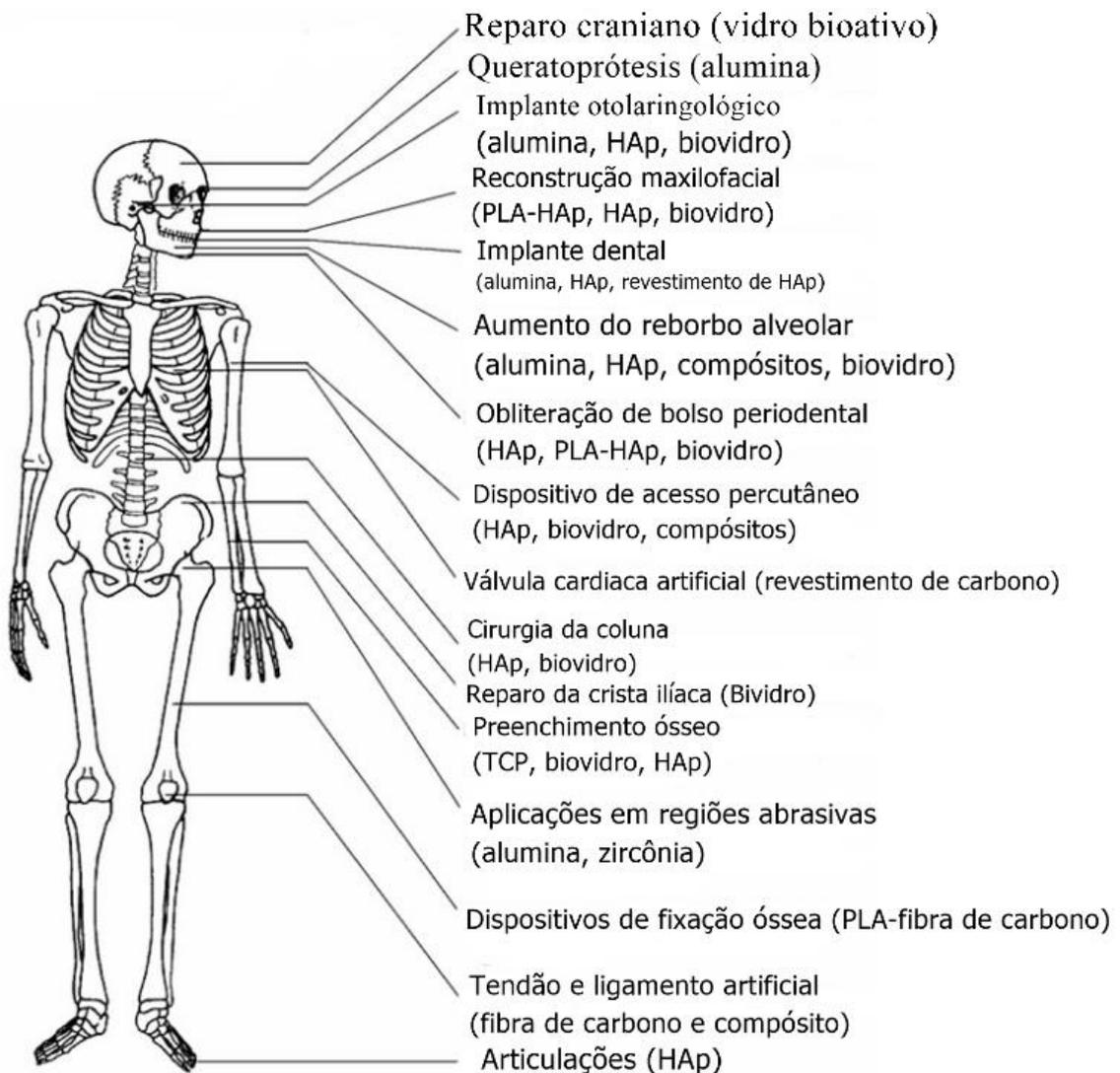


Figura 3: Esquema mostrando as diversas aplicações das biocerâmicas no corpo humano.

Fonte: Adaptado de (PARK, 2008)

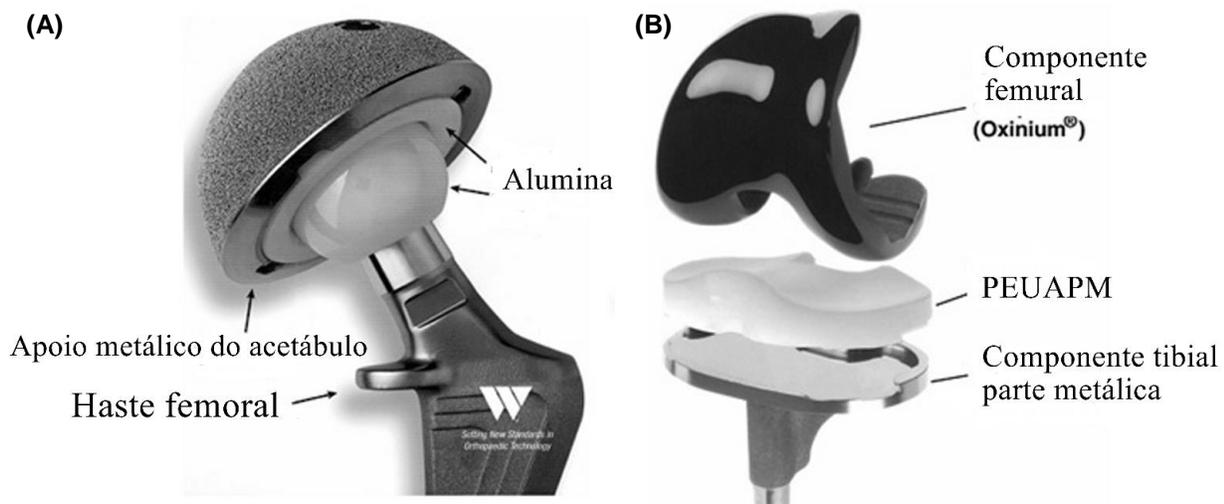


Figura 4: Exemplo de aplicação de Al_2O_3 (A) e ZrO_2 (B) em dispositivos implantáveis

Fonte: Adaptado de (PARK, 2008)

3.1.3 Hidroxiapatita

A Hidroxiapatita (HAp) é um dos compostos pertencentes à família das apatitas. Estes compostos cristalinos possuem a fórmula geral $[\text{M}_{10}(\text{Y}_6) \text{Z}_2]$, onde: $\text{M} = \text{Ca}, \text{Sr}, \text{Ba}, \text{Cd}, \text{Pb}$; $\text{Y} = \text{PO}_4, \text{VO}_4, \text{AsO}_4, \text{SO}_4, \text{SiO}_4, \text{GeO}_4$; $\text{Z} = \text{F}, \text{Cl}, \text{OH}, \text{O}, \text{Br}$ (VOLKMER, 2011). A nomenclatura das apatitas é referente ao ânion monovalente presente na estrutura, ou seja, fluorapatita (F), cloroapatita (Cl), hidroxiapatita (OH), etc (GOUVEIA, 2008; VOLKMER, 2011) e o termo apatita

vem do grego e significa “decepção”, em função de ela ser confundida com a turmalina, berilo e outras. A hidroxiapatita é o material utilizado pelos vertebrados para compor o esqueleto, devido à sua capacidade de atuar como reserva de cálcio e fósforo. Além disso, a hidroxiapatita biológica é ainda composta por íons em concentrações diversas, tais como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} , etc., permitindo o controle desses importantes íons nos líquidos corporais por meio da sua liberação ou armazenamento (SANTOS, 2002, p. 13).

A estrutura da HAp pertence ao sistema hexagonal, grupo espacial P63/m (caracterizado por um eixo C de 6 unidades perpendiculares a 3 eixos

equivalentes mantendo um triângulo de 120°), com dimensões de célula cristalina de $a = 9,423$ e $c = 6,875$ Å. Esses valores das dimensões de célula unitária valem para HAp mineral ou HAp pura preparada por reação em estado sólido ou precipitação e calcinação a 1100 °C. A célula unitária de HAp tem seis grupos PO_4^{-3} , cinco grupos Ca^{+2} e dois grupos OH^- (CARTER; NORTON, 2013). A estrutura cristalina da HAp é mostrada na Figura 5.

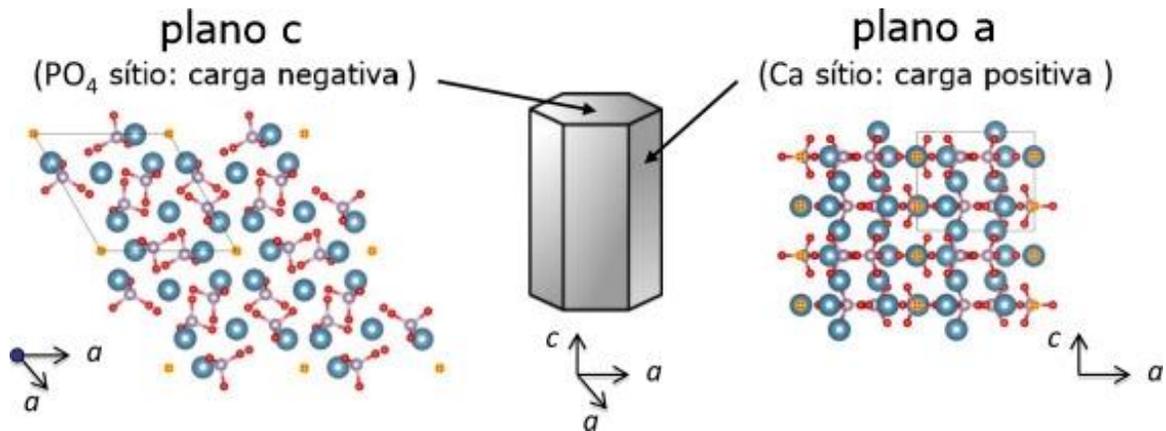


Figura 5: Estrutura cristalina da hidroxiapatita. As esferas azuis, brancas, vermelhas e amarelas são Ca, P, O e OH, respectivamente.

Fonte: Adaptado de (OKADA; MATSUMOTO, 2015).

3.1.3.1 Métodos de obtenção da HAp

Ao longo das décadas, vários métodos de síntese têm sido desenvolvidos para a obtenção de HAp. Segundo Sadat-Shoja et al, as metodologias podem ser divididas em 5 (cinco) grupos: via seca, via úmida, altas temperaturas, fontes biogênicas e combinação dos métodos (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

Via seca:

Na síntese por via seca a reação ocorre no estado sólido e produz HAp de alta cristalinidade e fina (GOUVEIA, 2008). Essa metodologia é

caracterizada por produzir pós com baixa ou nenhuma influência dos parâmetros de processo, sendo interessante para a produção de grandes quantidades de produto (SADAT-SHOJAI et al., 2013). Apesar destas vantagens, as metodologias normalmente envolvem altas temperaturas de reação (acima de 700 °C) e tempos longos de reação (OKADA; MATSUMOTO, 2015).

Via úmida:

Neste método a HAp é obtida pela reação de nitratos ou cloretos de cálcio e hidrogenofosfato de amônio em pH básico, ou pela reação entre hidróxidos de cálcio e ácido fosfórico. Em ambos os casos, o produto obtido apresenta uma elevada pureza e uma alta taxa de rendimento. Contudo, nas reações com de nitratos e cloretos existe a necessidade de processos posteriores de lavagem para remoção dos nitratos e cloretos presentes (VALENTE, 1999). As temperaturas de síntese normalmente são inferiores à 100 °C e permitem a formação de nanopartículas, porém para se obter produtos com alta cristalinidade faz-se necessário etapas posteriores de calcinação (OKADA; MATSUMOTO, 2015).

Altas temperaturas:

Este tipo de metodologia é caracterizado por fazer uso de processo com altas temperaturas, as quais são necessárias para queimar total ou parcialmente os seus precursores. Apesar de fazer uso de altas temperaturas, é possível se obter pós com elevada pureza e por meio de uma única etapa produtiva (SADAT-SHOJAI et al., 2013). Além da elevada pureza, a metodologia permite a obtenção de partículas com diferentes morfologias e tamanhos, sendo potencialmente favorável para a síntese de HAp nanométrica e com alta densidade (CANILLAS et al., 2017).

Fontes biogênicas

As metodologias envolvendo fontes biogênicas permitem a obtenção de HAp de bioresíduos, tais como: osso bovino, escama e osso de peixe (SOSSA et al., 2018). Além da questão ambiental e econômica, fontes biogênicas produzem HAp com alta cristalinidade e com características morfológicas e de composição da fonte de origem (SADAT-SHOJAI et al., 2013; SOSSA et al., 2018).

3.2 SUPERFÍCIE: INTERFACE CORPO E BIOMATERIAL

Quando um biomaterial é introduzido no organismo ele gera uma descontinuidade na anatomia dos tecidos do local de implantação e o sangramento da região. O sangue, carregado de proteínas, células, plaquetas e sais, é o primeiro a entrar em contato com a superfície do biomaterial (ENDERLE; BLANCHARD; BRONZINO, 2005; ROACH et al., 2007). Após o contato inicial, uma série de atividades, desencadeadas pelo implante do biomaterial, ocorrem para promover a cura da lesão gerada. Na Figura 6 é apresentado um esquema das interações que ocorrem entre os tecidos e a superfície de um biomaterial, bem como os efeitos gerados pelo tecido sobre o biomaterial e o do biomaterial sobre o tecido. Estas interações muitas vezes se mostram extremamente deletérias para os tecidos e/ou para o material implantado. Elas podem ocasionar a falha do biomaterial e a necessidade de um novo procedimento cirúrgico e em casos mais graves, podem levar ao óbito do paciente (RATNER et al., 2013).

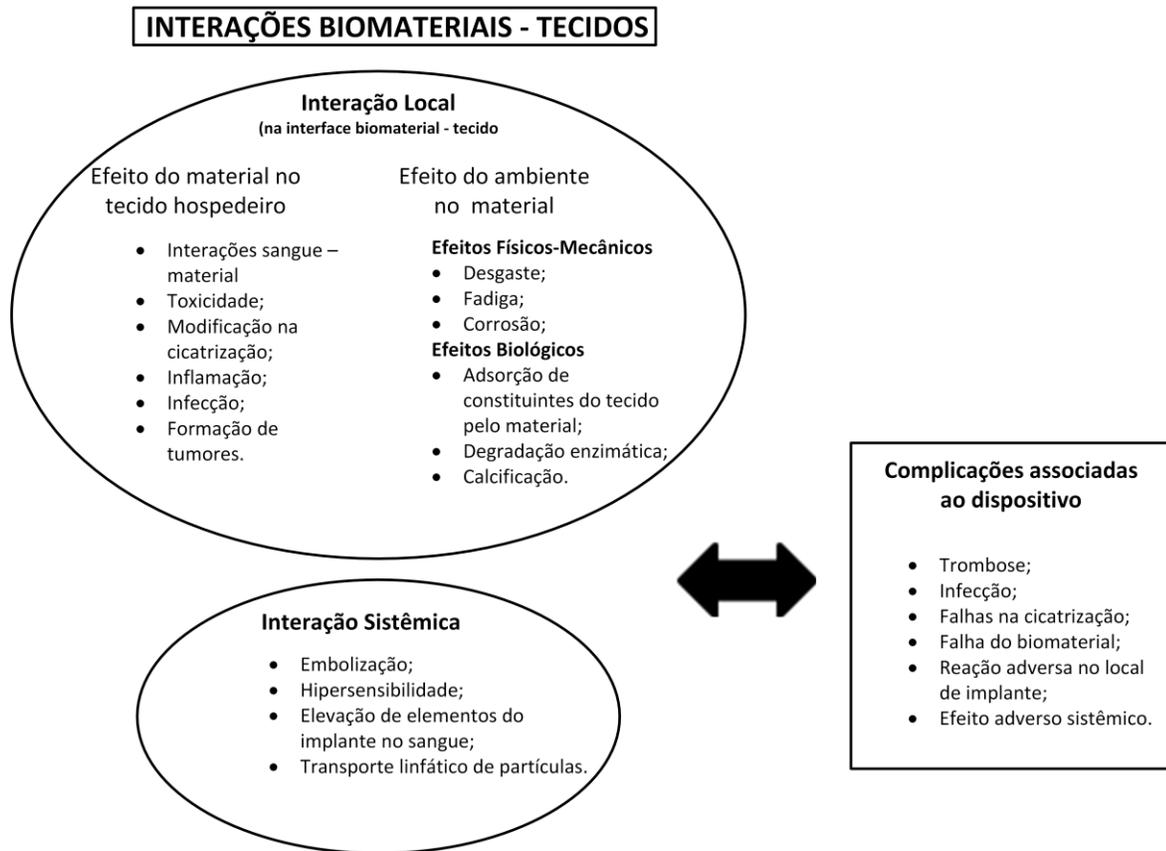


Figura 6: Esquema da interação tecido-implante.

Fonte: Adaptado de (RATNER et al., 2013).

3.3 TÉCNICAS DE PREPARO DE SUPERFÍCIES

Como discutido previamente na unidade **3.2 Superfície: Interface Corpo e Biomaterial** a superfície é um dos principais pontos no desenvolvimento de um biomaterial, pois é pela superfície que um biomaterial irá interagir com os tecidos do corpo humano. Desta forma, o estudo da superfície e o entendimento das técnicas de preparo desta é fundamental para o desenvolvimento de um novo dispositivo médico (LIU; CHU; DING, 2004).

Na Tabela 4 são apresentados os principais métodos de modificação da superfície para o Ti e suas ligas.

Tabela 4: Métodos de modificação da superfície do titânio e suas ligas.

Métodos de Modificação da Superfície	Camada modificada	Objetivos
Métodos Mecânicos		
Usinagem Moagem Polimento Jateamento	rugosidade gerada pela remoção de material da superfície	produzir uma topografia específica na superfície; limpeza da superfície; aumentar a adesão do revestimento
Métodos Químicos		
Tratamento químico		
Tratamento ácido	< 10 nm da camada de óxido	remoção de óxidos e contaminantes aumentar biocompatibilidade, bioatividade e condução óssea
Tratamento alcalino	~ 1 µm de titanato de sódio	aumentar biocompatibilidade, bioatividade e condução óssea
Tratamento com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	~ 5 nm do óxido interno denso e poros da camada externa	aumentar biocompatibilidade, bioatividade e condução óssea
Sol-gel	~ 10 µm de fosfato de cálcio, TiO ₂ e silicatos	aumentar biocompatibilidade, bioatividade e condução óssea
Oxidação anódica (Anodização e PEO)	~ 10 nm a 40 µm de TiO ₂ , adsorção e incorporação de ânions do eletrólito	produzir uma topografia específica na superfície, aumentar a resistência a corrosão, aumentar biocompatibilidade, bioatividade e condução óssea
CVD	~ 1 µm de TiN, TiC, TiCN e DLC	aumentar a resistência ao desgaste, a corrosão e a compatibilidade com o sangue
Métodos bioquímicos	modificação por meio de titânio sinalizado, fotoquímica, monocamadas auto-montadas, resistência a proteínas, etc	induzir uma resposta específica as células e aos tecidos pela imobilização de peptídeos, proteínas na superfície

Tabela 4: Métodos de modificação da superfície do titânio e suas ligas (continuação).

Métodos Físicos		
Aspersão térmica		
Chama	~ 30 a 200 µm de revestimento de titânio, HAp, silicato de cálcio, Al ₂ O ₃ , ZrO ₂ , TiO ₂	aumentar a resistência ao desgaste, a corrosão e propriedades biológicas
Plasma		
HVOF		
DGUN		
Deposição Física por Vapor "Physical Vapour Deposition -PVD"		
Evaporação	~ 1 µm de TiN, TiC, TiCN e DLC	aumentar a resistência ao desgaste, a corrosão e a compatibilidade com o sangue
Ion Plating		
Sputtering		
Implantação iônica e deposição		
Implantação por feixe linear PIII	~10 nm da superfície modificada	modificar a composição da superfície, aumentar a resistência ao desgaste, a corrosão e a biocompatibilidade
Tratamento por descarga de plasma	~1 nm a ~100 nm da superfície modificada	limpeza, esterilização, óxidos, nitretos, remoção de óxidos nativos

Fonte: Adaptado de (LIU; CHU; DING, 2004)

3.3.1 Métodos Mecânicos

3.3.1.1 Jateamento

Processos de jateamento, assim como os demais processos mecânicos, têm por finalidade se obter uma topografia e rugosidade específica da superfície e aumento da adesão do implante no osso (GEMELLI; SCARIOT; CAMARGO, 2007; LIU; CHU; DING, 2004; WENNERBERG et al., 1995). Usualmente são utilizadas partículas cerâmicas, tais como Al₂O₃ ou TiO₂, com diferentes faixas de tamanho e geometria irregular (LE GUÉHENNEC et al.,

2007). Estas partículas são aceleradas por meio de ar comprimido através de um bocal ou pistola e ao se chocarem com a superfície do material elas promovem o arrancamento de microrregiões da superfície. A rugosidade gerada na superfície é diretamente proporcional ao tamanho médio das partículas, ou seja, quanto maior o tamanho de partícula, maior será a rugosidade gerada na superfície (LE GUÉHENNEC et al., 2007; WENNERBERG et al., 1995).

Apesar de apresentar resultados positivos quanto à fixação biomecânica em tecidos ósseos (WENNERBERG et al., 1995), materiais residuais são comumente encontrados após o processo, mesmo após processos de limpeza ácida em ultrassom. Estas partículas quando liberadas nos tecidos próximos ao implante, podem ocasionar a redução das taxas de osseointegração e também problemas de corrosão no implante (APARICIO et al., 2003). Muitos trabalhos atualmente têm procurado utilizar o jateamento como um pré-tratamento do titânio. A possibilidade de gerar uma maior rugosidade e área superficial auxilia nos processos de ancoragem mecânica para deposição de materiais por aspensão térmica (FILHO et al., 2007; HEIMANN; WIRTH, 2006) e para gerar variações de micro a nano rugosidade seguido de tratamentos ácidos (BOK et al., 2015; LE GUÉHENNEC et al., 2007).

3.3.1.2 Polimento Mecânico e Eletroquímico

Polimentos mecânicos ou eletroquímicos têm a finalidade de promover uma superfície com baixa rugosidade a peças metálicas. Além disto, o polimento permite a remoção de defeitos superficiais, como microtrincas do processo produtivo, o que confere à peça uma maior vida em fadiga. No eletropolimento a peça é polarizada anodicamente em um eletrólito e a sua superfície é oxidada de maneira controlada, de forma a produzir uma baixa rugosidade (ZHAO et al., 2003). No caso de stents, uma superfície com baixa

rugosidade é conhecida por reduzir a possibilidade de formação de trombos (ZHAO et al., 2003), além disto, uma superfície menos rugosa diminui a quantidade de proteínas aderidas à superfície do material (SOJITRA et al., 2009). Na Figura 7 são mostradas duas imagens de um stent metálico antes e após o eletropolimento.

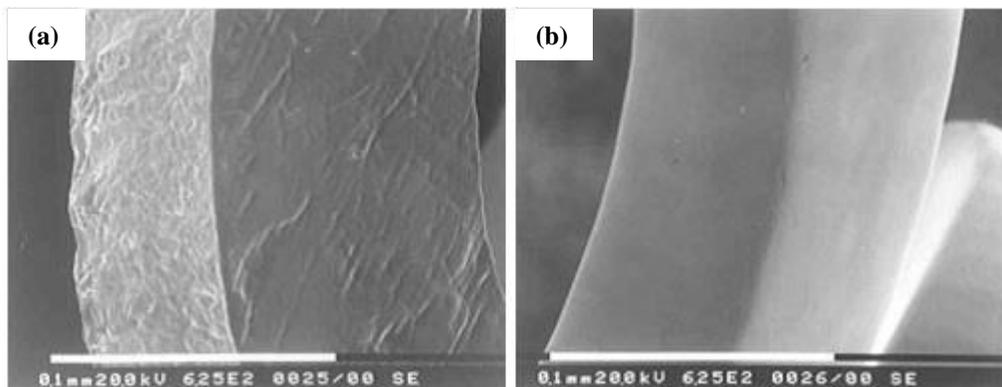


Figura 7: Fotos de microscopia eletrônica de varredura de dois stents; (a) antes do eletropolimento e (b) após o eletropolimento.

Fonte: Adaptado de (ZHAO et al., 2003).

3.3.2 Métodos Químicos

3.3.2.1 Tratamento ácidos ou básicos

Métodos químicos apresentam a possibilidade de alterar a rugosidade superficial do Ti e suas ligas e são geralmente divididos em tratamentos ácidos e básicos (LIU; CHU; DING, 2004; WEN et al., 1997).

Tratamentos ácidos:

Soluções ácidas, contendo ácido nítrico (HNO_3) e ácido fluorídrico (HF), são comumente utilizadas para a decapagem e limpeza do Ti e suas ligas.

Normalmente estes ácidos são utilizados numa razão de 10:1 de HNO_3 e HF , respectivamente. Esta relação entre os dois ácidos é utilizada, pois a reação do HF com o óxido de titânio gera a formação de hidrogênio gasoso que fragiliza o Ti (LIU; CHU; DING, 2004) e a relação 10:1 reduz a formação do hidrogênio livre. Além destes 2 (dois) ácidos, também são utilizados o HCl e o H_2SO_4 . Sendo reportado em estudos, que o tratamento duplo ($\text{HCl} + \text{H}_2\text{SO}_4$) e meio básico aumenta a bioatividade do Ti (LIU; CHU; DING, 2004).

Tratamentos Básicos:

Para o tratamento básico são normalmente utilizadas soluções com concentrações bastante elevadas (5-10 M) de bases fortes (NaOH ou KOH), que reagem por períodos de 24 h, a temperatura de 60 °C com o Ti. Este tipo de solução ataca o TiO_2 e converte o óxido de titânio em um gel de hidróxido de titânio $\text{Ti}(\text{OH})_3$. Este gel, após levado à temperatura de 600 °C, cristaliza e forma ligações extremamente fortes com o substrato (HIN, 2004; LIU; CHU; DING, 2004).

3.3.2.2 Anodização convencional

A anodização (Figura 8) é uma técnica que foi descoberta nos anos de 1930 e desde o final do século 20 é amplamente estudada para aplicações em Ti e suas ligas (JACKSON; AHMED, 2007). Na indústria são utilizados dois métodos de anodização: a anodização ácida e a anodização básica. Em ambos os métodos se obtém uma camada de TiO_2 poroso, sendo que em meio ácido o filme formado é submicrométrico ($<0,1 \mu\text{m}$) e em meio básico o filme pode alcançar espessuras de até $4,0 \mu\text{m}$ (YEROKHIN; KHAN, 2010). Na indústria de dispositivos médicos a anodização ácida é aplicada na coloração de parafusos, placas, braquetes, implantes dentários e componentes protéticos, etc. Em função de sua reduzida espessura, a sua finalidade é estética (YEROKHIN;

KHAN, 2010), mas também para facilitar a utilização pelo profissional de saúde, como no caso de implantes dentários e componentes protéticos. Por possibilitar a formação de camadas muito mais espessas, a anodização básica é mais indicada para componentes que necessitem uma maior resistência ao desgaste (YEROKHIN; KHAN, 2010).

- 1 Anodo de titânio
- 2 Catodo de platina
- 3 Eletrólito
- 4 Fonte
- 5 Sistema de resfriamento
- 6 Termômetro
- 7 Placa agitadora
- 8 Barra agitadora

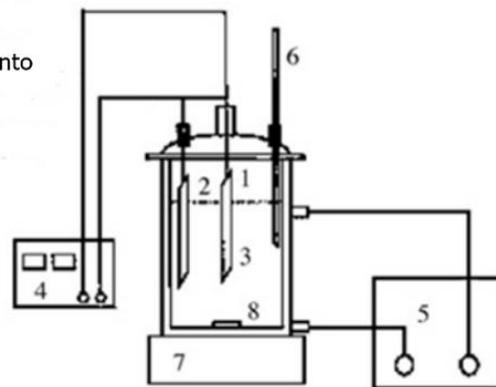


Figura 8: Esquema do processo de anodização.

Fonte: Adaptado de (LIU; CHU; DING, 2004).

3.3.2.3 Oxidação por plasma eletrolítico

A oxidação por plasma eletrolítico ("*Plasma Electrolytic Oxidation*" - PEO), também denominada de oxidação por micro-arcos ("*Micro Arc Oxidation*" - MAO), é um tratamento eletroquímico, assim como a anodização. Contudo, no PEO são utilizadas diferenças de potenciais (ddp) extremamente elevadas, que ultrapassam o potencial dielétrico de formação do filme de óxido, ocasionando a formação de microplasmas sobre a superfície (DONG, 2010). Na Figura 9 é apresentado um esquema das reações e do processo de formação do revestimento pela técnica de oxidação por plasma eletrolítico em substratos de Ti.

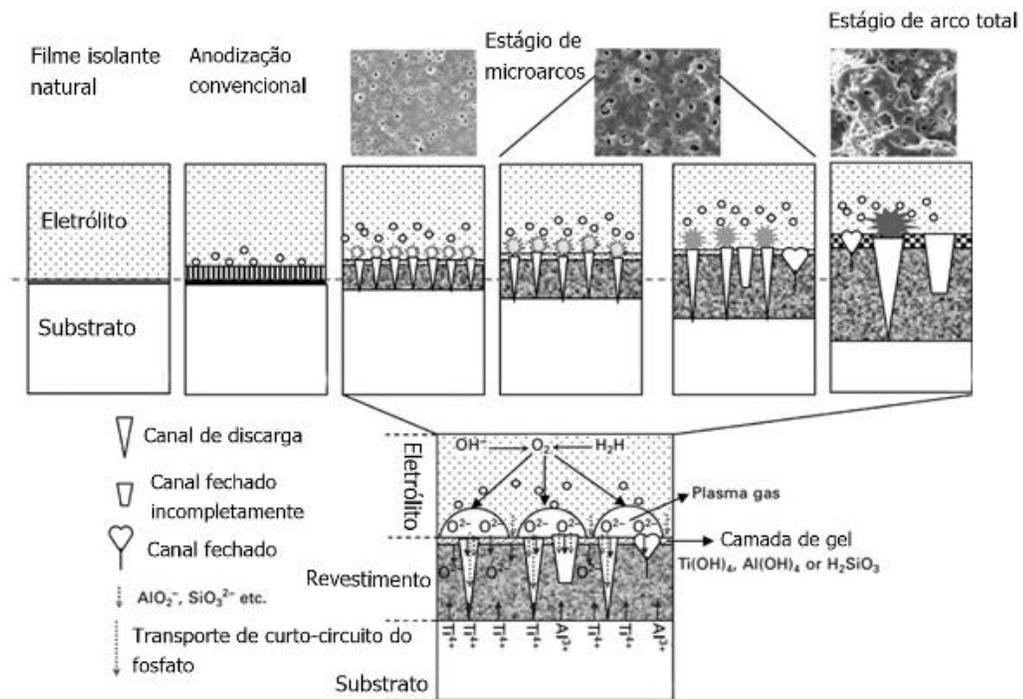


Figura 9: Esquema das reações químicas e do desenvolvimento da estrutura formado no processo de PEO.

Fonte: Adaptado de (DONG, 2010).

Um das principais vantagens desta técnica é a formação de revestimentos formados não somente dos óxidos do substrato, mas também de óxidos mais complexos, contendo elementos presentes no eletrólito. A elevada energia aplicada e a formação de óxidos mais complexos implicam em filmes de melhor qualidade e com propriedades não possíveis de serem obtidas pela anodização convencional. Na Tabela 5 são apresentadas diferenças entre os processos e as propriedades dos filmes formados pela anodização convencional e o PEO (DONG, 2010; YEROKHIN; KHAN, 2010).

Tabela 5: Comparação entre anodização convencional e a PEO.

Propriedade	Anodização convencional	PEO
Tensão (V)	10-120	120-800
Densidade de corrente (Adm^{-2})	0,5-3	5-20
Pre-tratamento do substrato	Crítico	Menos crítico
Eletrólitos mais comuns	Ácidos sulfúrico, crômico e fosfórico	Neutro/alcalino pH 7-12
Possibilidade de revestir ligas contendo compostos intermetálicos	Pobre	Boa
Espessura do óxido (μm)	<10	<200
Dureza superficial (HV)	150-600	800-2000
Adesão ao substrato	Moderada	Muito elevada
Resistência ao desgaste	Baixa - Alta	Altíssima
Resistência a corrosão	Baixa - Média	Alta
Controle da temperatura	Crítico	Não crítico

Fonte: Adaptado de (DONG, 2010; YEROKHIN; KHAN, 2010).

3.3.2.4 Sol Gel

O método via sol gel é normalmente utilizado com a técnica de *dip-coating* (ASRI et al., 2016; HARUN et al., 2018; MONTENERO et al., 2000). Muitos autores têm estudado essa metodologia com o intuito de aumentar a adesividade do recobrimento e permitir o revestimento de peças com geometria complexas (HARUN et al., 2018; KOUTSOPOULOS, 2002; ZHANG; GUAN; ZHANG, 2011). Para se obter uma camada mais espessa, muitos autores têm realizado o processo de *dip-coating* (Figura 10) com várias etapas de imersão e emersão. Essa possibilidade permite a obtenção de camadas de

alguns microns a camadas de centenas a milhares de microns (ASRI et al., 2016; BEN-NISSAN et al., 2015).

Revestimentos de HAp são normalmente obtidos a partir de diferentes precursores de cálcio e fósforo para a solução (sol) com adição de solventes orgânicos e água (HARUN et al., 2018). Como precursor para o fósforo pode-se utilizar o pentóxido de fósforo (P_2O_5), trietilfosfito (OCH_2CH_3) ou fosfato de amônio bibásico ($(NH_4)_2HPO_4$) dissolvidos em etanol. Quantidades de água podem ser adicionadas para hidrólise do sol. Para o precursor de cálcio o nitrato de cálcio tetra hidratado ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) é normalmente utilizado, sendo este também dissolvido em etanol (HARUN et al., 2018; LIU; TROCZYNSKI; TSENG, 2001; MONTENERO et al., 2000).

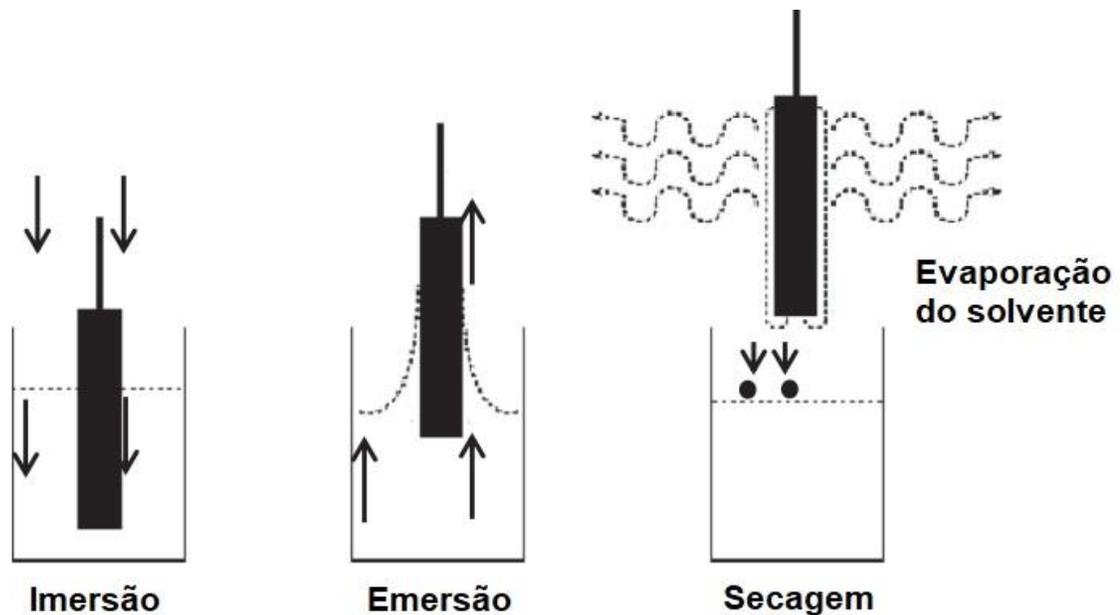


Figura 10: Esquema do processo de deposição via *dip-coating*.

Fonte: Adaptado de (ASRI et al., 2016).

3.3.3 Métodos Físicos

3.3.3.1 PVD

A deposição física por vapor – PVD, apresenta muitas aplicações para o revestimento de diferentes substratos e variáveis aplicações na indústria e na pesquisa (MATTOX, 2010). Sua grande variabilidade relaciona-se à construção de filmes cerâmicos e metálicos obtidos a baixas temperaturas e com estrutura cristalina específica. Na área de biomateriais a possibilidade de se revestir ligas metálicas com cerâmicas é muito estudada, pois as cerâmicas apresentam uma alta estabilidade química, resistência à corrosão e são não alergênicas (KALIARAJ et al., 2016; MCENTIRE et al., 2015).

A zircônia é umas das cerâmicas utilizadas no revestimento de ligas de titânio por PVD. Uma das vantagens do uso desta metodologia é a possibilidade de se obter a zircônia cubica, evitando os problemas decorrentes da transformação de fase de zircônias tetragonais para monoclinicas (CHEVALIER et al., 2009; KALIARAJ et al., 2016). Outros estudos têm demonstrado a construção de revestimentos bacteriológicos com a adição de prata (Ag) e cobre (Cu) à microestrutura da zircônia (APREUTESEI et al., 2014; ETIEMBLE et al., 2017; LEE; LIOU; DUH, 2017). Segundo os autores, estes revestimentos apresentaram elevada taxa de morte a bactérias do tipo *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), além de apresentarem elevada dureza, estabilidade química e resistência à corrosão.

3.3.3.2 Aspersão térmica

Os processos de aspersão térmica são utilizados em diversas áreas da engenharia, com o intuito de melhorar as propriedades de superfícies dos materiais, tais como resistência ao desgaste, corrosão e fadiga,

biocompatibilidade e osteointegração (KWEH; KHOR; CHEANG, 2002b; LIN; WANG, 2011; LIU; CHU; DING, 2004). Estes são um conjunto de processos em que metais, cerâmicos, sistemas intermetálicos e polímeros são usados para revestir um substrato, podendo estar na forma de pó, arame ou bastão, sendo utilizado uma pistola para fusão do material (TUCKER JR., 1994).

Na aspensão térmica as partículas fundidas ou parcialmente fundidas do material de revestimento são propelidas em direção ao substrato, onde sofrem um processo de achatamento, seguido de um rápido resfriamento e solidificação. Os revestimentos caracteristicamente apresentam uma estrutura lamelar, com a presença de óxidos, poros e partículas não totalmente fundidas na sua microestrutura (Figura 11). Para as partículas serem fundidas e aderirem ao substrato a temperatura de aquecimento das partículas e a taxa de aceleração são fatores importantes no processo (LIN; WANG, 2011; LIU; CHU; DING, 2004). Além destes, o tamanho e forma da partícula, distância e ângulo da pistola também são fatores importantes no processo. Conforme a fonte de aquecimento, química ou elétrica, os processos de aspensão térmica podem ser classificados conforme Figura 12.



Figura 11: Seção polida de um recobrimento de HA feito por aspersão térmica a plasma.
 Fonte: Adaptado de (KWEH; KHOR; CHEANG, 2002b).

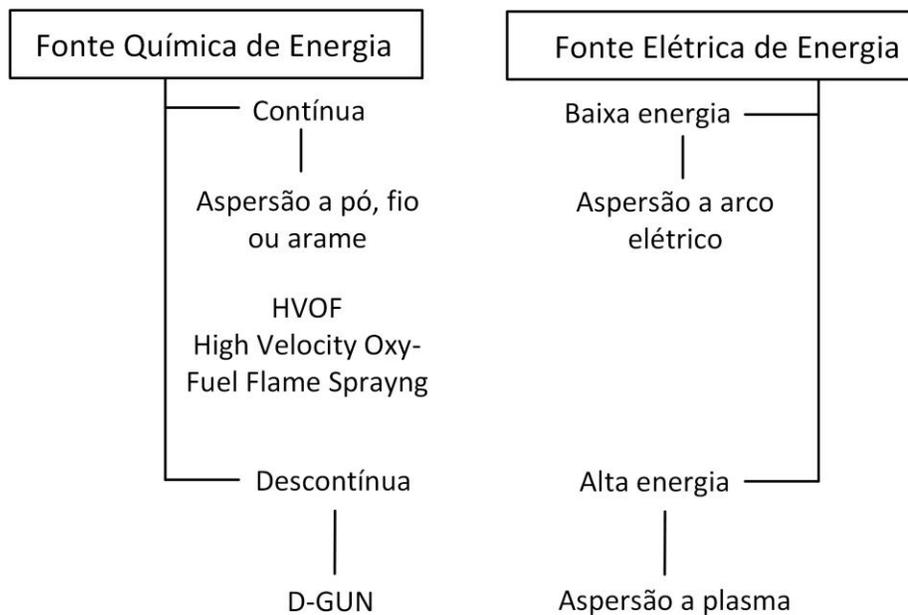


Figura 12: Classificação dos processos de aspersão térmica conforme a sua fonte de aquecimento.

Fonte: Adaptado de (LIU; CHU; DING, 2004).

Aspersão térmica a plasma:

Na Figura 13 é apresentado um esquema da pistola de aspersão a plasma. Neste processo, um gás, usualmente argônio, mas ocasionalmente adicionado de nitrogênio, hidrogênio ou hélio, é inserido entre um catodo de tungstênio e um anodo de cobre refrigerado. Um arco elétrico é iniciado entre os dois eletrodos por um sistema de alta frequência e mantido por uma fonte de alimentação CC. O arco ioniza o gás, levando ao aumento da temperatura e da pressão do gás, forçando este a ser expelido para fora da pistola a elevadas velocidades (TUCKER JR., 1994). A Tabela 6 apresenta um resumo das características dos filmes obtidos por aspersão a plasma.

Tabela 6: Resumo das características de filmes obtidos por aspersão térmica a plasma.

Velocidade (m/s)	Densidade (%)	Espessura de filme (μm)	Adesão (MPa)
300-550	80-95	50-500	34-69

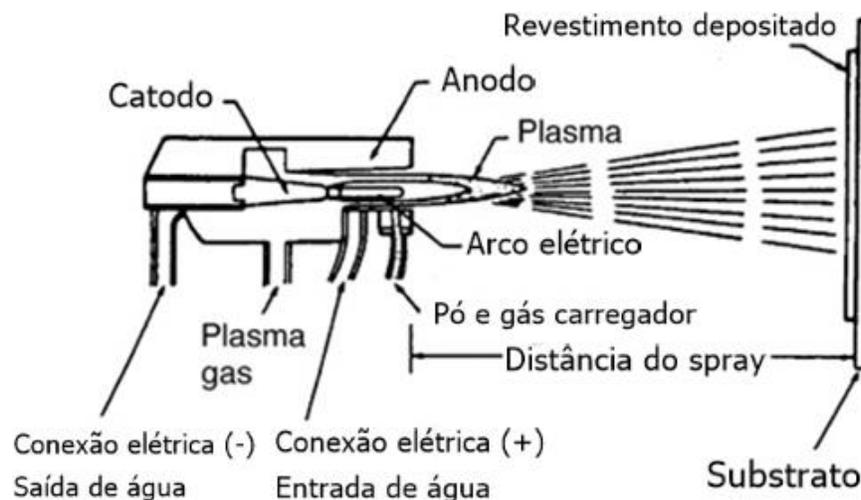


Figura 13: Esquema da pistola de aspersão térmica a plasma.

Fonte: Adaptado de (LIU; CHU; DING, 2004).

Aspersão por HVOF

Na técnica de aspersão por *high velocity oxy-fuel* (HVOF) um combustível, propano, propeno ou hidrogênio, é misturado com oxigênio e queimado em uma câmara, dentro da pistola (Figura 14). Os produtos da combustão são conduzidos até a saída da pistola onde expandem e atingem velocidades supersônicas. O pó do material depositado é introduzido na pistola onde é total ou parcialmente fundido e propelido sobre o substrato, podendo chegar a velocidades de 800 m/s (FERNÁNDEZ; GAONA; GUILMANY, 2007; TUCKER JR., 1994).

Pelo fato de o material de revestimento estar exposto aos produtos de combustão, este pode ser fundido em um ambiente oxidativo ou redutor, e significativos processos de oxidação podem ser observados sobre estes (TUCKER JR., 1994)

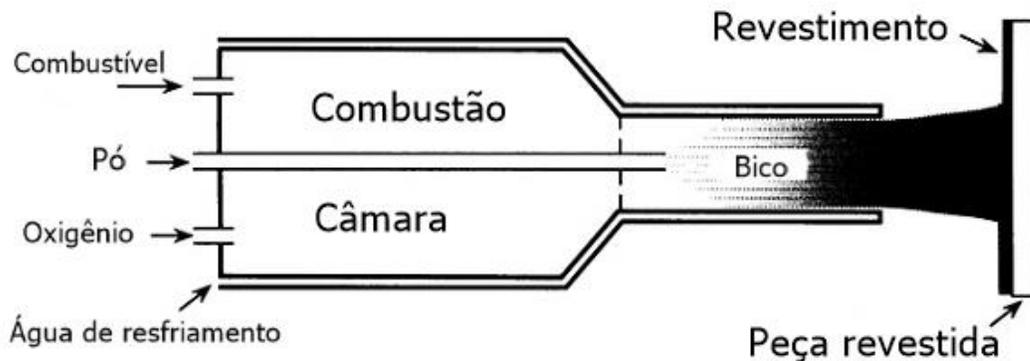


Figura 14: Esquema de uma pistola de aspersão por HVOF.

Fonte: Adaptado de (TUCKER JR., 1994)

3.3.3.3 Aspersão térmica da hidroxiapatita

Pelo fato de a HAp ser um material cerâmico em forma de pó, a utilização de processos de aspersão térmicos é restrita a processos que

envolvam altas energias (LIU; CHU; DING, 2004). Aoyagi et al foram os primeiros a proporem a aspersione térmica a plasma para o recobrimento de próteses e implantes com HAp (AOYAGI et al., 1979). Entretanto, as altas temperaturas de processo do plasma induzem a mudança de cristalinidade e a decomposição térmica da HAp. Na Figura 15 é apresentado um esquema dos processos de decomposição térmica da HAp em função da variação da temperatura. As elevadas temperatura também acarretam na formação de fases secundárias, tais como TCP, TTCP, oxiatpatitas e compostos de fosfatos de cálcio amorfos (DEMNATI et al., 2014; KWEH; KHOR; CHEANG, 2002a, 2002b). Por serem mais absorvíveis que a HAp cristalina, estes compostos podem reduzir a adesão do substrato com o revestimento, comprometendo a funcionalidade do implante (HENCH, 1991; KWEH; KHOR; CHEANG, 2002a).

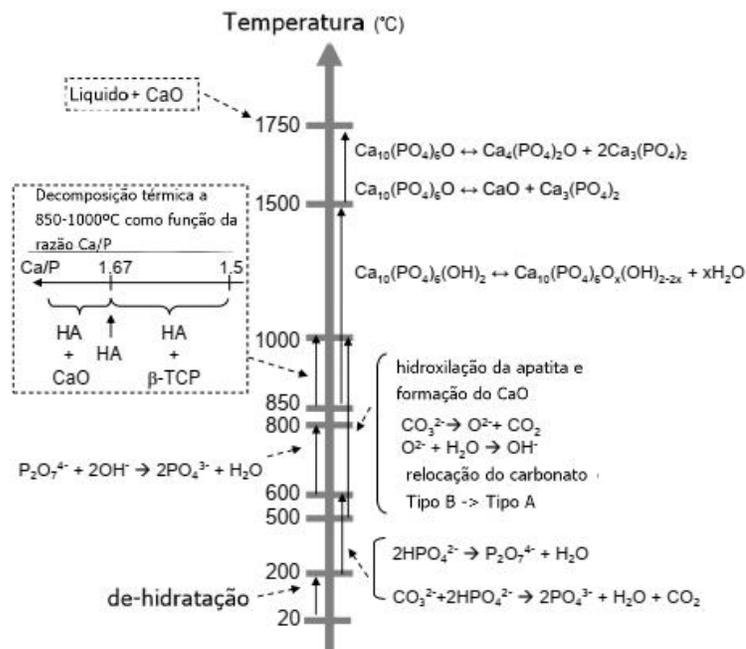


Figura 15: Esquema demonstrando os processos de degradação da hidroxiapatita em função da temperatura.

Fonte: Adaptado de (DEMNATI et al., 2014)

A solução adotada para reduzir este efeito é a recristalização da HAp pelo tratamento térmico das peças revestidas (Figura 16). Segundo Kweh (2002a) o tratamento térmico feito a temperatura de 600-650 °C permite a recristalização e a transformação de praticamente 100% das fases presentes no recobrimento em HAp. Na Figura 17 são apresentados os resultados observados por Kweh (2002b) no experimento de imersão em SBF de amostras de Ti recobertas com HAp. Neste experimento é observado que as amostras que sofreram tratamento térmico, posteriormente ao recobrimento por plasma, apresentaram uma maior adesão do filme ao substrato em relação aos filmes não tratados termicamente.

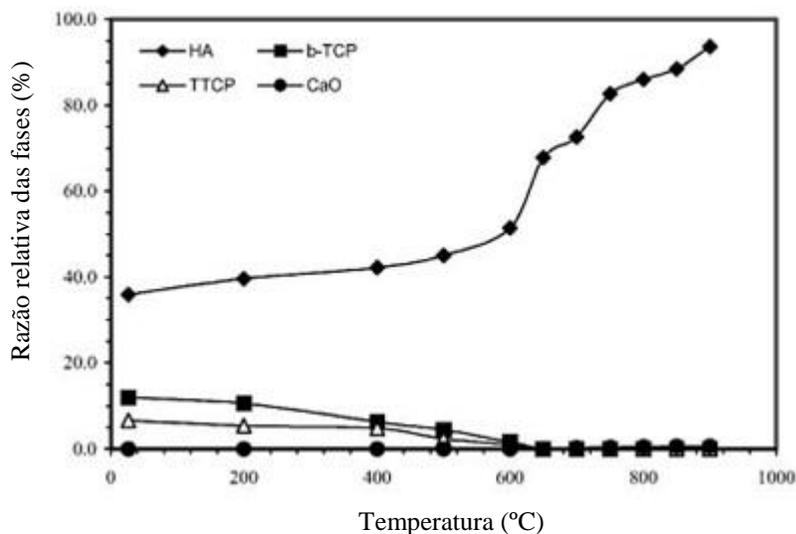


Figura 16: Razão das fases presentes no recobrimento obtido por aspersão térmica a plasma em função das temperaturas de tratamento térmico.

Fonte: Adaptado de (KWEH; KHOR; CHEANG, 2002b).

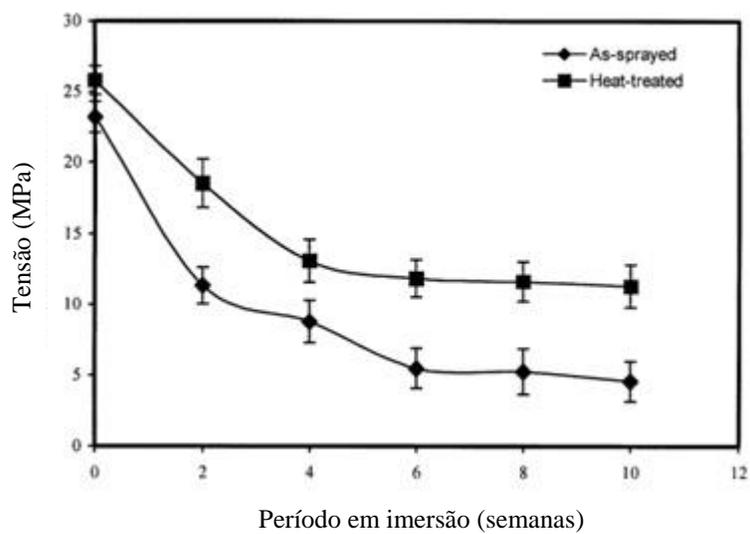


Figura 17: Tensão de ligação de recobrimentos de HA feitos a plasma em função do tempo de imersão em SBF; sem tratamento térmico posterior (-♦-) e com tratamento térmico posterior (-■-).

Fonte: Adaptado de (KWEH; KHOR; CHEANG, 2002a).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta tese de doutorado foi desenvolvida dentro do Laboratório de Biomateriais (LABIOMAT) no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAT), vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (PPGE3M) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizados reagentes de grau P.A. e TiCp especificado conforme norma ASTM F67-13, grau 2. Na Figura 18 é apresentado um fluxograma com a descrição das etapas de desenvolvimento do projeto.

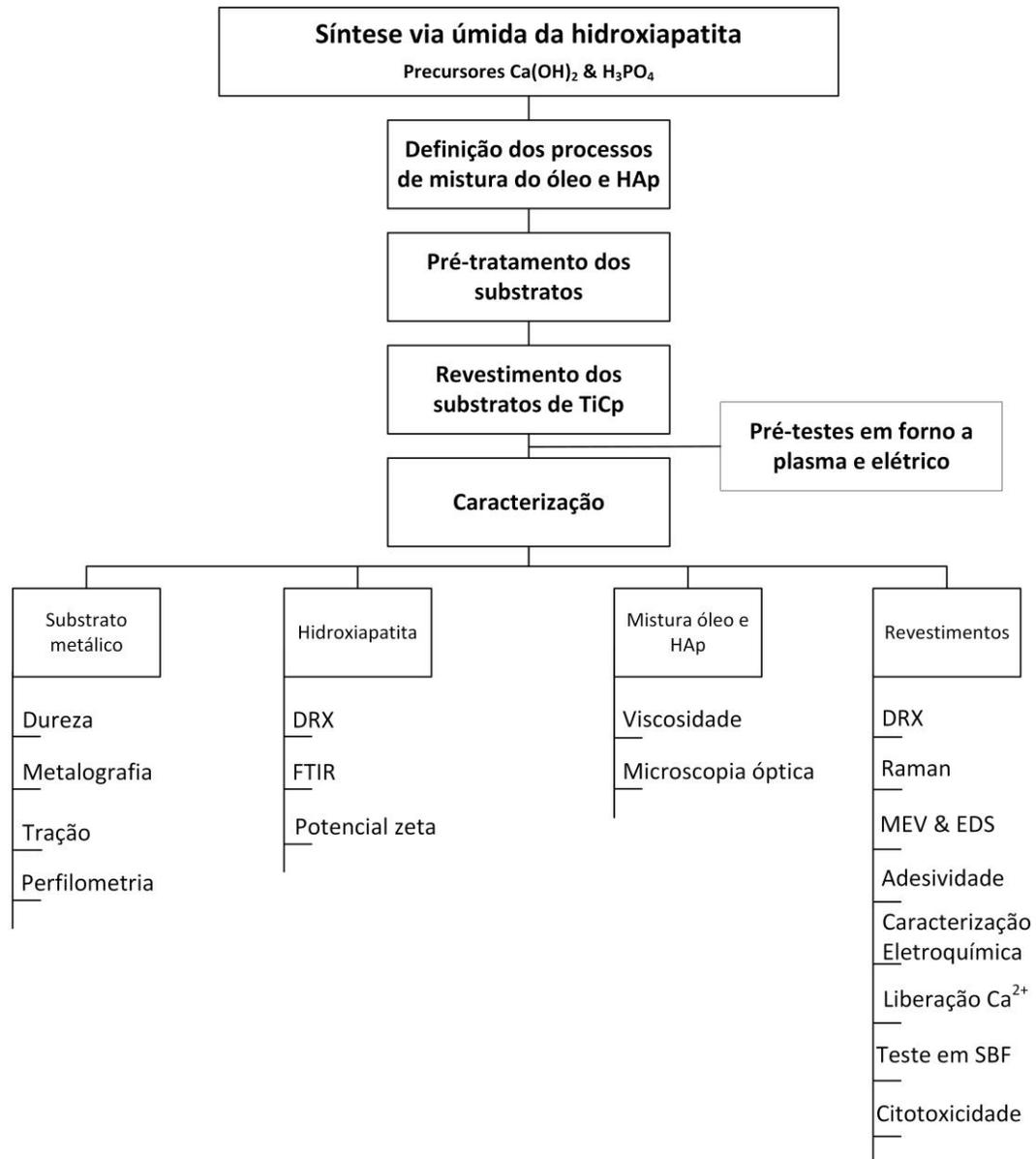


Figura 18: Fluxograma do desenvolvimento do projeto.

4.1 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

A metodologia de síntese do pó de HAp foi a via úmida, tendo como precursores o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2 , Nuclear - PA) e o ácido fosfórico (H_3PO_4 , Synth - 85%), mantendo uma relação molar de $\text{Ca/P} = 1,67$ (RAMESH

et al., 2007; VECHIETTI et al., 2019). Para realizar a reação, a suspensão de hidróxido de cálcio (0,132 molar) foi adicionada em um balão de 3 (três) bocas e conectada ao agitador mecânico com velocidade de 100 rpm. A solução ácida (0,079 molar) foi gotejada por meio de um funil de decantação conectado a uma das bocas do balão. Quando o sistema atingiu a temperatura de 70 ± 5 °C o processo de gotejamento do ácido foi iniciado. Ao término do gotejamento foi mantida a temperatura de 70 °C por 24 horas (período de maturação da solução), seguida de filtração utilizando bomba de vácuo e membrana de celulose. O produto obtido foi seco em estufa a 120 °C durante 12 horas. Posteriormente foi feita a calcinação a temperatura de 800 °C e 1100°C, com rampa de 10 °C/min., tempo de patamar de 1 (uma) hora e resfriamento realizado dentro do forno. Após calcinação, a HAp foi peneirada em peneira mesh 325.

Para caracterização dos produtos obtidos foram utilizadas as técnicas de difração por raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e potencial zeta.

4.2 RECOBRIMENTO DAS SUPERFÍCIES METÁLICAS COM HIDROXIAPATITA

4.2.1 Limpeza e pré-tratamento das superfícies

Para realizar os testes de recobrimento, todas as amostras foram previamente lixadas até lixa 600 e polidas com pasta de alumina de 1 μm . Após este procedimento, as peças foram lavadas com água destilada e etanol. As amostras secas foram então adicionadas em frascos contendo acetona e limpas em banho de ultrassom com frequência de 40 KHz, temperatura de 30 °C e tempo total de banho de 15 (quinze) minutos. Estes processos têm como finalidade padronizar a topografia superficial e garantir que a superfície

esteja livre de impurezas que possam comprometer a qualidade do recobrimento.

Para as amostras com pré-tratamento da superfície optou-se pela metodologia de anodização da superfície. Essa metodologia foi adotada com o objetivo de obter uma amostra com maior rugosidade da superfície, de forma a permitir uma maior ancoragem da camada de HAp e permitir uma potencial reação entre o TiO_2 e HAp. O processo de anodização foi realizado em solução eletrolítica de ácido sulfúrico 2 M, temperatura do banho de 25 °C e tempo de anodização de 3 minutos. Antes de efetuar o processo de anodização as peças foram atacadas em solução de ácido fluorídrico e nítrico (4% HF e 20% HNO_3), lavadas em água corrente e secas com jato de ar. Foi utilizado uma célula eletroquímica de 2 (dois) eletrodos, sendo o contra eletrodo uma chapa de aço inox 316L e o eletrodo de trabalho as peças de Ti a serem anodizadas. A distância entre eletrodos foi de 40 mm, o volume de solução utilizado na célula foi de 90 mL e as tensões aplicadas foram de 20 V, 40 V e 60 V.

4.2.2 Processos de recobrimento

Para efetuar os recobrimentos foram utilizadas placas metálicas de TiCp grau 2, com 16 mm de diâmetro e 7 mm de espessura, preparadas segundo 4.2.1. Para se obter a suspensão de HAp em óleo de pinho (Quimicamar-Brasil) foi realizada a mistura mecânica manual do óleo e da HAp, mantendo uma relação de 3 (volume de óleo) para 1 (massa de HAp). O processo de recobrimento por pincel foi realizado com pincéis Acrilex®, série 054, tamanho 8, com cerdas macias e de formato chato, realizando movimentos lentos e fazendo a deposição de uma única camada.

Outros fatores importantes para a formação do recobrimento são a temperatura de tratamento térmico e a atmosfera. No caso da temperatura, procurou-se uma faixa em que fosse evitado reações de desidroxilação da HAp e a formação de outras fases, tais como α -TCP e β -TCP, que apresentam uma

taxa de absorção diferente da HAp (HENCH, 1991; MOHSENI; ZALNEZHAD; BUSHROA, 2014; WANG; CHAKI, 1993). Conforme visto no item 3.1.1.1 o Ti apresenta na temperatura de 882,5 °C transformação da fase α (HC) para fase β (CCC). Esta transformação de fase em 882,5 °C, e a consequente deformação durante a transformação de fase acarreta a degradação da força de ligação do revestimento cerâmico (BEN-NISSAN, 2015). Com base nestes dados, optou-se pela escolha da temperatura máxima de 800 °C para o tratamento térmico do revestimento (YE; LIU; HONG, 2009).

Revestimento em forno elétrico

Para o desenvolvimento do revestimento em forno elétrico foi utilizado um forno Sanchis, com atmosfera ambiente e aquecimento elétrico. Foram utilizadas duas rampas de aquecimento distintas para a evaporação do óleo e para a fixação do revestimento ao substrato de titânio. A primeira rampa foi de 3 °C/min. com tempo de patamar de 60 minutos e temperatura de 300 °C. Após foi feito o resfriamento até temperatura ambiente, desligando o forno, e feito novo ciclo com a mesma taxa de aquecimento, porém com temperatura de patamar de 800 °C e tempo de 30 minutos. O resfriamento foi realizado com taxa máxima de 5 °C/min. até temperatura ambiente. Foram escolhidas taxas de aquecimento e resfriamento lentas de forma a evitar trincas e delaminações pela diferença de coeficiente de dilatação do TiCp e da HAp (CHEN; DING, 2006; KHALID et al., 2013)

Revestimento em forno a plasma

Os processos de revestimento a plasma foram realizados em um reator para tratamentos termoquímicos a plasma com capacidade de 1500 cm³. As amostras foram dispostas no cátodo, sendo o anodo a carcaça externa do reator. Na Figura 19 é apresentado um desenho esquemático do forno, da ligação elétrica e entrada e saída de gases.

Previamente à obtenção do plasma, foi realizado vácuo de 10^{-4} bar na câmara de reação e após foi introduzido argônio (Ar) na pressão de 25 mbar. O potencial foi aumentado até formação do plasma na câmara e depois foi controlado de forma a se manter uma taxa de aquecimento na ordem de $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Foram utilizados 3 (três) ciclos diferentes com patamares de $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ e tempo de permanência de 60 minutos. Para o resfriamento foi mantida uma taxa de resfriamento de $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até extinção do plasma e depois o sistema foi mantido fechado até resfriamento das peças a temperatura ambiente. Após essa etapa, as amostras foram tratadas termicamente até $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ em forno elétrico. As amostras foram aquecidas a uma taxa de $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. e ficaram na temperatura de $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Para o resfriamento foi mantida uma taxa de $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até temperatura de $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo em seguida o forno desligado e resfriado naturalmente.

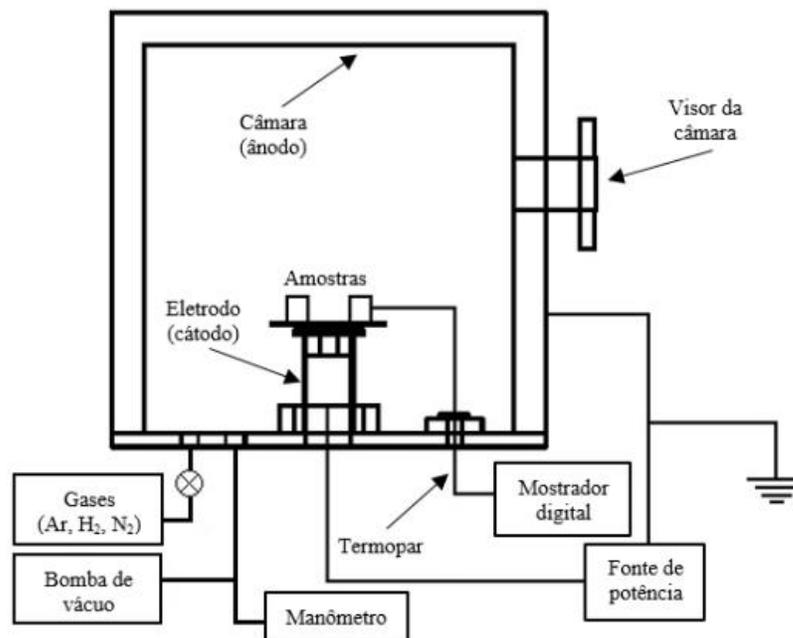


Figura 19: Desenho esquemático do equipamento utilizado na sinterização a plasma com gaiola catódica

Fonte: Adaptado de (GARCIA, 2016).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.3.1 Dureza

Os testes de dureza dos substratos metálicos foram realizados em durômetro EMCOTEST, modelo DURAJEt, usando dureza vickers e carga de 10 kg. Foram feitas 5 (cinco) indentações por peça e para cada tratamento foram avaliadas 3 (três) peças distintas.

4.3.2 Teste de tração

O comportamento mecânico do substrato de titânio foi medido em máquina de ensaios universal Instron, modelo 3369, equipada com célula de carga de 50 kN. O ensaio foi realizado a uma taxa de deslocamento de 5 mm/min. Para a realização dos ensaios foram elaboradas amostras do tipo gravata, conforma norma ASTM E8/E8m-16a, usando placas com 1,0 mm de espessura. Foram ensaiadas 6 amostras pré e pós tratamento térmico.

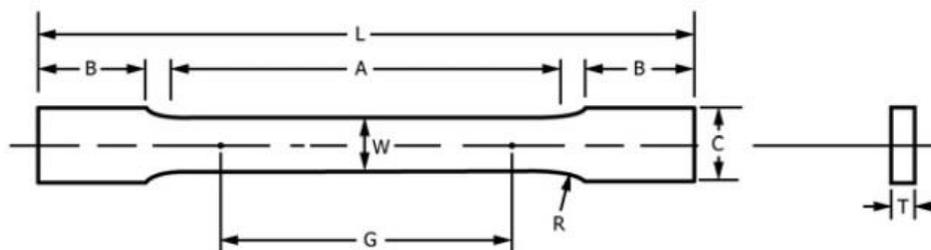


Figura 20: Imagem do modelo de corpo de prova utilizado para o ensaio de tração do titânio.

4.3.3 Avaliação da microestrutura

Para a avaliação do substrato metálico, foram realizadas metalografias com solução de Kroll (10% HF, 5% HNO₃, 85% H₂O - Reagente No. 186 ASTM E407-07). As amostras foram lixadas em lixas 220, 320, 400, 600 e 1200 e polidas com emulsão de alumina de 10 µm. Foi utilizado microscópio óptico Carl Zeiss, modelo Scope A1 com câmera modelo AxioCam ICc5 e software Axio Vision. As medidas de tamanho de grão foram realizadas com base na norma ASTM E112-13.

4.3.4 Perfilometria

Também foram avaliados o acabamento superficial (rugosidade) das superfícies dos substratos por perfilometria óptica, perfilometro Bruker modelo ContourGT. Para as medidas foi utilizado luz verde, sendo realizadas 5 (cinco) varreduras por ponto de análise e 3 (três) pontos por amostra.

4.3.5 Viscosidade

Para avaliação da viscosidade da mistura óleo + HA foi utilizado um viscosímetro *spindle* cone-placa da marca Brookfield, modelo LVDV II+. Foram avaliadas misturas com a HAp não calcinada e calcinadas a 800 °C e a 1100 °C.

4.3.6 Difração de raios-X

A difração de raios-X foi realizada em difratômetro Bruker, modelo D2 Advance Brunker, com tubo de cobre (radiação K α = 1,5418 Å). A tensão e a corrente utilizadas no tubo foram de 30 kV e 10 mA, respectivamente. A velocidade de varredura do goniômetro foi de 0,05°/s, sendo o intervalo de

varredura de 5° a 70°. Para a realização deste ensaio os pós foram compactados em um porta-amostra padrão, tomando cuidado para deixar a superfície a mais plana possível, evitando assim erros de medida. No caso dos substratos revestidos foi utilizado o mesmo porta amostra, porém com auxílio de uma massa polimérica para ajustar à altura das amostras.

Por meio dos difratogramas de raios-X foi possível determinar o tamanho de cristalito fazendo uma varredura em um intervalo de 25° a 26,5°, com um passo de 0,002° e tempo de 1 segundo. Então, empregando-se a equação de Scherrer (1) foi possível a determinação do tamanho de cristalito.

$$D_{Scherrer} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

em que $D_{Scherrer}$ é o diâmetro médio de cristalito; k é a constante de proporcionalidade que depende da forma das partículas, assumida como sendo esférica (0,9); λ é o comprimento de onda da radiação do Cu (1,5406 Å); e β é a largura à meia altura do pico.

A partir dos difratogramas também foi possível calcular os parâmetros de rede "a" e "c" da estrutura cristalina da HAp em relação aos planos perpendiculares (002) e (300). Para tal foi utilizado a relação padrão entre as distâncias interplanares para uma célula unitária de um sistema hexagonal, de acordo com a equação (2).

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (2)$$

em que d é a distância entre planos adjacentes definidos pelos índices de Miller (h k l) e os termos "a" e "c" representam os parâmetros de rede da célula unitária.

4.3.7 Espectroscopia de Infravermelho

O ensaio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado como técnica complementar ao DRX para avaliação e caracterização dos pós de HAp. As amostras foram produzidas com pastilhas de KBr e feito uma solução sólida do KBr e HAp. O equipamento utilizado foi o espectrômetro Perkin-Elmer, modelo Spectro One.

4.3.8 Espectroscopia Raman

A espectroscopia RAMAN foi realizada em equipamento Renishaw In-Via Spectomer System, com laser de 532 nm e faixa de medição de 150-1150 cm^{-1} . Assim como o FTIR, a espectroscopia Raman foi utilizada como técnica complementar ao DRX e para determinação de possível reação entre o substrato de titânio e o recobrimento de HAp.

4.3.9 Metodologia para desgaste abrasivo dos revestimentos

Para avaliar a interface entre o revestimento de HAp e o substrato foram realizados desgastes abrasivos com lixa 3000. Os desgastes foram realizados com movimentos lineares ao longo da superfície. A cada desgaste foi realizado ensaio de DRX e após o último desgaste foi realizado ensaio de Raman.

4.3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura

A caracterização da morfologia, espessura e a homogeneidade dos recobrimentos obtidos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio JOEL, modelo JIB-4500 Multi Beam System. Para análise das amostras foi efetuado recobrimento com ouro por *Sputtering*

e a análise de espessura foi realizado após embutimento com resina epóxi e corte com cortadora metalográfica de precisão. A distribuição de átomos foi determinada por mapeamento de raios-X, usando a técnica de espectroscopia por energia dispersiva (“Energy Dispersive X-ray” – EDX) com detector do tipo “Silicon Drift Detector” - SDD.

4.3.11 Teste de adesão dos recobrimentos

O ensaio de adesividade do revestimento ao substrato foi realizado com base na norma ISO 13779-4:2002. Para o teste foram utilizados o adesivo epóxi 3M DP460 e a máquina de ensaios universal Instron, modelo 3369, equipada com célula de carga de 2 kN. A taxa de deslocamento foi de 1 mm/min e foram ensaiadas 5 (cinco) amostras para cada teste. O cálculo de tensão de falha do recobrimento foi realizado conforme equação (3).

$$X = \frac{4F}{\pi d^2} \quad (3)$$

em que X é a medida da tensão *pull-off* (MPa) até a falha do recobrimento; F é a força (N) lida por meio da célula de carga até a falha do recobrimento; d é o diâmetro da área de contato da “dolly”² com o revestimento.

4.3.12 Caracterização eletroquímica

A caracterização eletroquímica das amostras foi realizada em fluido corporal simulado (*Simulated Body Fluid* – SBF) a temperatura de 37±1 °C e pH 7,4. Para o ensaio foi utilizado uma célula com três eletrodos com a

² Dispositivo metálico em formato de pino que é colado ao revestimento para realizar o ensaio de adesividade.

seguinte configuração: 1 – eletrodo de trabalho (amostra revestida e não revestida); 2 – eletrodo de referência de Ag/AgCl; 3 – contra eletrodo de aço inox. A área útil do eletrodo de trabalho foi mantida em 1 cm². As medidas de potencial de circuito aberto (PCA) foram monitoradas continuamente por 2 h. As curvas de potencial potenciodinâmico foram realizadas a uma taxa de 1 mV/s com varredura de +1 V a -1 V vs PCA. Por meio das curvas de polarização foram obtidos os valores de potencial de corrosão (E_{Corr}) e densidade de corrente de corrosão (I_{Corr}), segundo o método de extrapolação de Tafel. Para as medidas foi utilizado um potenciostato/ galvanostato da marca Metrohm Autolab modelo AUT84140um

4.3.13 Comportamento em SBF

Para o ensaio em fluido corpóreo simulado, *Simulated Body Fluid* (SBF), foi elaborada solução conforme descrito por Kokubo (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). As amostras foram colocadas em placas de cultura com 17 mL de volume por poço e postos em estufa com temperatura de 37 °C ± 2 °C pelo período de 3 dias, 7 dias e 28 dias. Na Figura 21 é apresentada uma ilustração do processo de precipitação de apatita sobre titanato e justifica o uso deste tipo de metodologia para predizer o comportamento de bioatividade para a superfície de um biomaterial. O teste foi realizado com as amostras de Ti, Ti anodizado a 60 V e Ti anodizado a 60 V e revestidas com a HAp calcinadas a 1100 °C.

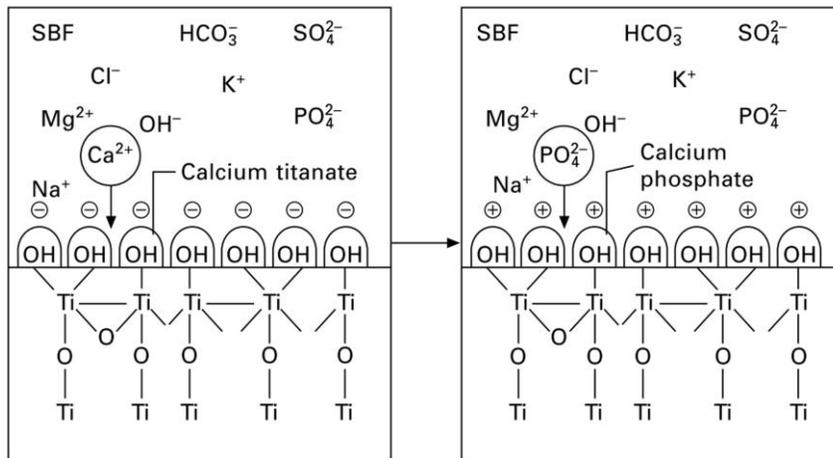


Figura 21: Ilustração do processo de precipitação da HAp sobre a superfície de Ti-OH (KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003)

4.3.14 Taxa de liberação de íons Ca^{2+}

O comportamento de liberação de Ca^{2+} foi avaliado em solução tampão tris (TBS, 0,9% de NaCl, pH 7,4). As amostras foram imersas em 150 mL de solução TBS e com controle de temperatura a 37 °C. Foram coletados 2 mL de solução nos períodos de 1 h, 6 h, 12 h, 3 dias, 7 dias e 28 dias. A concentração de Ca^{2+} foi mensurada por meio de espectroscopia de emissão óptica com plasma, marca Agilent Technologies, modelo 5110. O teste foi realizado em quintuplicata com as amostras revestidas com a HAp calcinadas a 1100 °C e com pré-tratamento de anodização a 60 V.

4.3.15 Citotoxicidade e viabilidade celular

As Células Sanguíneas Periféricas Mononucleares (CSPM) têm sido usadas há décadas como biomarcadores de efeitos citotóxicos e genotóxicos, entre outros. Por serem abundantes na corrente sanguínea, são expostos a qualquer agente mutagênico e são capazes de refletir danos recentes. As CSPM baseadas em cultura tornaram-se o modelo *in vitro* muito promissor para

vários estudos, o que destaca a utilidade dessa linhagem em estudos de citogenotoxicidade (MALUF; RIEGEL, 2011).

Neste contexto, o objetivo foi avaliar o potencial de efeitos citogenotóxicos do titânio e dos revestimentos obtidos em CSPM em cultura por meio da viabilidade celular e danos no DNA.

Amostras de sangue periférico foram obtidas por meio de três amostras de descarte do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Franciscana, sob aprovação do Comitê de Ética em Seres Humanos da Instituição (CAAE: 31211214.4 .0000.5306) com ausência de dados de identificação. As amostras foram obtidas por punção venosa utilizando tubos com heparina do tipo Vacutainer®, que foram utilizados para separar CSPM e tratamentos subsequentes e culturas de células.

Para testar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do composto sobre a viabilidade celular e danos no DNA, um protocolo experimental semelhante ao descrito por Wilms e colaboradores (WILMS et al., 2005), em CSPM foi seguido. Utilizou-se o meio de cultura contendo as células como controle negativo.

As separações de CSPM ocorreram por gradiente de densidade (Histopaque®-1077) por centrifugação, e a concentração de 2×10^5 células / mL foi obtida pela contagem em uma câmara de Neubauer com 0,4% de azul de tripano.

4.3.15.1 Avaliação da viabilidade celular por MTT

No ensaio MTT, o reagente brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio é solúvel em água e de cor amarelada, sendo prontamente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em atividade mitocondrial pela enzima succinato desidrogenase. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em cristais de formazan, insolúveis em água e de cor púrpura-azulada, armazenados no citoplasma da célula e posteriormente solubilizados

pela adição de DMSO (dimetilsulfóxido) e quantificados colorimetricamente por espectrofotometria em um comprimento de onda de 570 nm. O valor de absorvância é proporcional ao número de células viáveis em comparação com o controle negativo (DENIZOT; LANG, 1986; MOSMANN, 1983)

$$\%viabilidade = 100 X \frac{\text{média de absorvância da amostra}}{\text{média de absorvância do controle}} \quad (4)$$

4.3.15.2 Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA por reagente DNA-PicoGreen®

A fim de complementar a determinação da viabilidade celular, o ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA livre no meio foi conduzido usando o reagente Invitrogen-DNA-PicoGreen® (Life Technologies), que é um corante fluorescente que se liga à dupla fita de DNA. Este procedimento foi realizado no meio onde as células são tratadas, a fim de determinar a presença de DNA neste meio, devido à possível ruptura celular e morte celular. O corante foi adicionado à amostra em uma placa Elisa escura de 96 poços, incubando por 5 minutos e lendo a fluorescência no espectrofluorímetro do aparelho a 480 nm de excitação e 520 nm de emissão.

4.3.15.3 Protocolo para teste de nitrito

O teste de nitrito detecta a presença de nitrito orgânico na amostra. O nitrito é detectado e analisado pela formação de uma cor rosada quando o reagente de Griess é adicionado à amostra contendo NO_2^- . A sulfanilamida do reagente de Griess é responsável pela formação de diazônio do nitrito da amostra. Quando o composto azo (N-1-naftilenodiamino-bicloridrato) interage com os sais de diazônio, a coloração rosa aparece na amostra.

4.3.15.4 Teste de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)

O reagente diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), que tem a capacidade de atravessar a membrana celular, é desacetilado por enzimas mitocondriais, dando origem a 2',7'-diclorodidrofluoresceína, que reage com espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e produz 2',7'-diclorofluoresceína que emite fluorescência (ESPOSTI, 2002). Assim, a fluorescência no aparelho espectrofluorimétrico foi determinada com base nos comprimentos de onda de 488 nm de excitação e 525 nm de emissão.

O contínuo processo de danos pode acarretar mutações deletérias e os compostos presentes na composição de biomateriais podem estimular a produção de ERO (Figura 22). Desta forma, a redução destes tipos de compostos é um indicativo importante da segurança das diferentes amostras

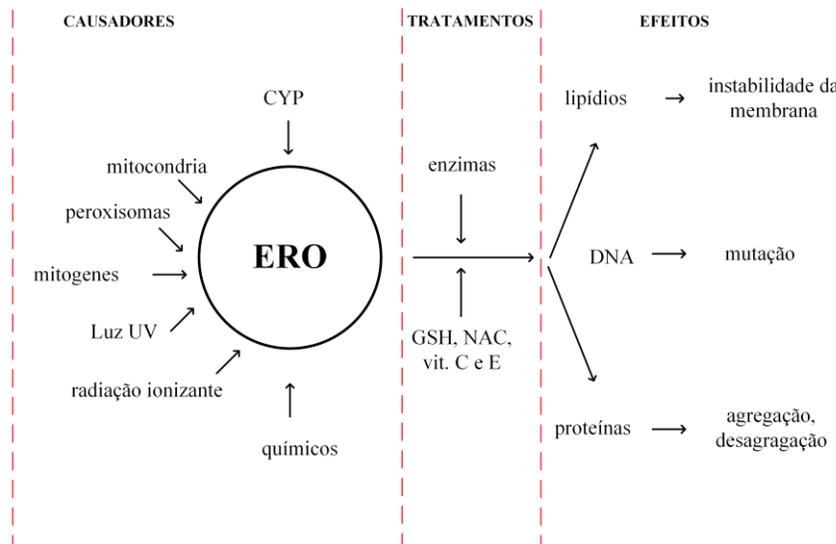


Figura 22: Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e resposta celular. EROs são gerados internamente nas células nas mitocôndrias e peroxissomas e por enzimas citocromas P450 (CYP). Luz UV, radiação ionizante e agentes químicos aumentam a produção destes tipos de compostos. Enzimas e antioxidantes endógenos e exógenos (GSH, NAC e vit. C e E). Macromoléculas celulares (DNA, lipídios e proteínas) podem sofrer danos, caso a produção de ERO for maior que a capacidade antioxidante das células. Adaptado de (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006)

4.3.16 Avaliação estatística

Estatísticas descritivas e análises estatísticas foram realizadas usando Origin Pro 2015 (Northampton, MA). O teste t de amostras pareadas foi utilizado para avaliar o comportamento mecânico (pré e pós tratamento térmico) em um nível de confiança de 95%. ANOVA *One-Way*, seguido do teste post-hoc de Tukey, foi usado para avaliar as diferenças de espessura e adesividade dos revestimentos. Foi considerado nível de significância de 5% para comparação das médias. Para avaliação celular foi usado ANOVA *One-Way*, seguido do teste post-hoc de Dunnet, com nível de significância de 5% para comparação das médias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS DE HIDROXIAPATITA

Na Figura 23 é apresentado o difratograma de raios-X dos pós de HAp sintetizados neste trabalho e utilizadas para o revestimento dos substratos de titânio. Conforme pode ser observado, o difratograma apresenta os picos característicos da HAp em 2θ de: $22,85^\circ$; $25,94^\circ$; $31,7^\circ$ e $39,7^\circ$ (ICDD: 09-0432). Além disso, a ausência dos picos em $27,8^\circ$, $29,6^\circ$, $31,07^\circ$, $34,4^\circ$ e $41,2^\circ$ (ICDD: 09-0169), que são característicos da fase β -TCP, mostram que o método de síntese foi eficaz para a obtenção de um filme caracterizado unicamente pela fase HAp (KOSTOV-KYTIN et al., 2018; PILLAI; FRASNELLI; SGLAVO, 2018). Na Tabela 7 são apresentados os valores de parâmetro de rede e tamanho de cristalito das diferentes HAp utilizadas. Como pode ser observado, o aumento da temperatura de calcinação promoveu o aumento do tamanho de cristalito. Além disso, é possível verificar um aumento significativo do eixo "a" da célula unitária. Estes resultados podem estar associados à transformação da HAp amorfa (imperfeita) em uma estrutura cristalina (GUO; HUANG; ZHANG, 2003; GUO et al., 2013).

O FTIR das diferentes HAp é apresentado na Figura 24. A banda em 962 cm^{-1} refere-se ao modo de estiramento ν_1 dos grupamentos fosfato. As bandas entre de $1045\text{-}1092\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao modo de vibração de estiramento ν_3 dos fosfatos. Entre as bandas de $568\text{-}605\text{ cm}^{-1}$ são observados os picos referentes aos modos de flexão dos grupamentos fosfato (GSHALAEV; DEMIRCHAN, 2012; SROKA-BARTNICKA et al., 2017). Em 472 cm^{-1} é observado um pequeno pico referente ao modo de flexão ν_2 do grupamento fosfato. Esses valores são característicos a formação da fase HAp (GSHALAEV; DEMIRCHAN, 2012; SATHIYAVIMAL et al., 2019).

Para os espectros das amostras de HAp não calcinada (HApNC) e calcinada a 800 °C foram observadas bandas referentes a HAp carbonatada. As bandas em 876 cm^{-1} e 1422 cm^{-1} são referentes aos modos vibracionais do grupamento CO_3^{2-} que substitui o grupamento fosfato na estrutura da HAp. Também foi observado a presença da banda em 1465 cm^{-1} referente a substituição do grupo hidroxila pelo carbonato (SROKA-BARTNICKA et al., 2017).

Tabela 7: Parâmetros de rede e tamanhos de cristalito obtidos segundo a Equação de Scherrer.

Nome da amostra	Parâmetros de rede		Largura à meia altura do pico	Tamanho de cristalito (nm)
	"a"	"c"		
HApNC	9,364	6,869	0,235	38,6
HAp800	9,422	6,884	0,221	41,2
HAp1100	9,627	6,887	0,128	70,8

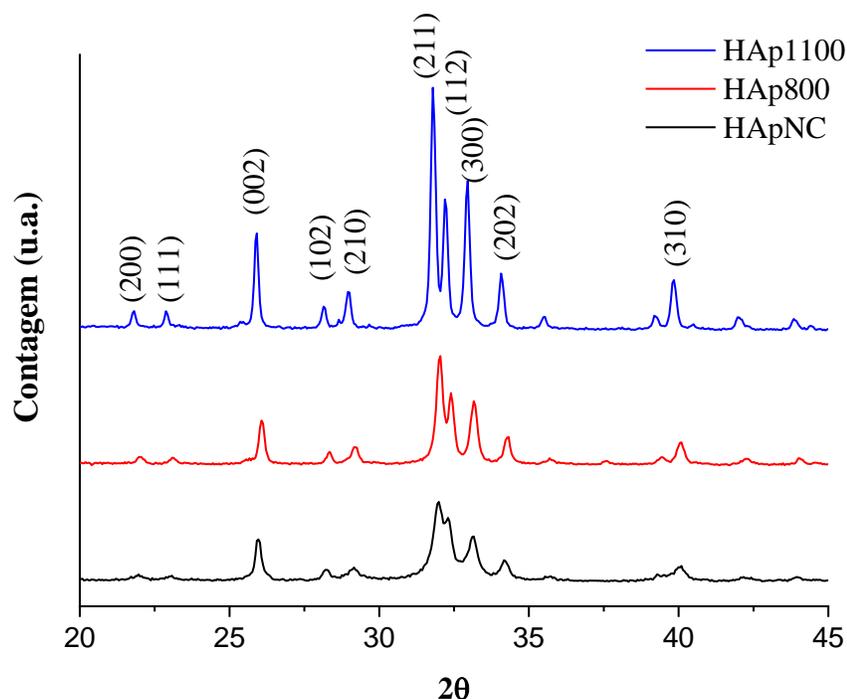


Figura 23: Difratogramas de raios-X das diferentes HAp utilizadas para o recobrimento das amostras. Fase Hidroxiapatita (ICDD: 09-0432)

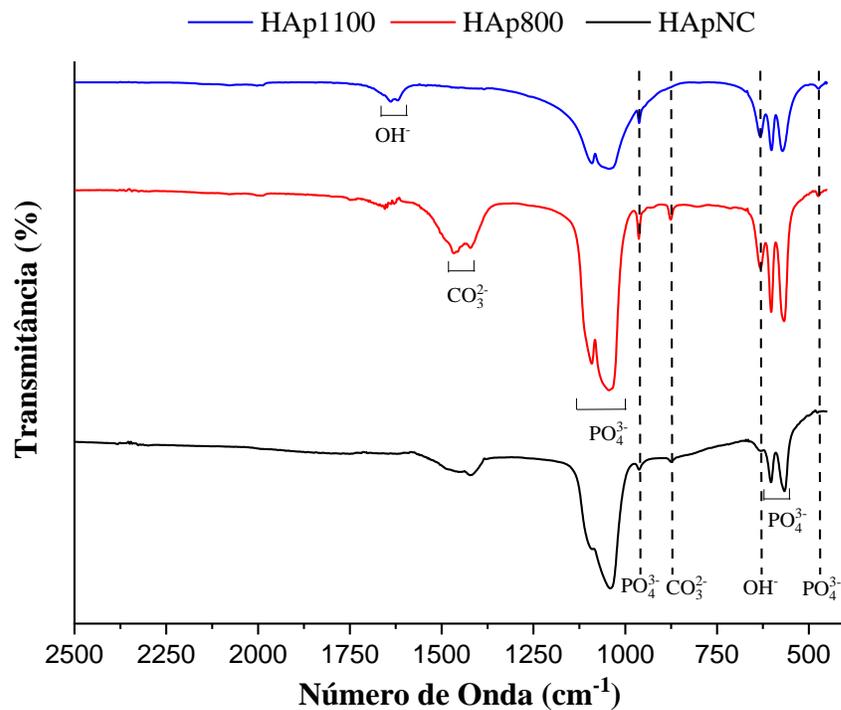


Figura 24: Espectro de Infravermelho das diferentes HAp utilizadas para o recobrimento das amostras.

Além do entendimento dos grupamentos químicos e fase da HAp obtida, também foi realizada a avaliação da carga superficial das diferentes HAp (Figura 25). Conforme pode ser observado, todas as amostras apresentaram uma carga superficial negativa, esse resultado está em acordo com o reportado pela literatura para HAp obtidas por precipitação em meio aquoso (HARDING; RASHID; HING, 2005; ZHANG; DARVELL, 2011). Entre as amostras avaliadas, é possível perceber um claro efeito da temperatura de calcinação na carga superficial, sendo a HAp calcinada a 1100 °C a que apresenta o maior valor absoluto de carga superficial (27 mV).

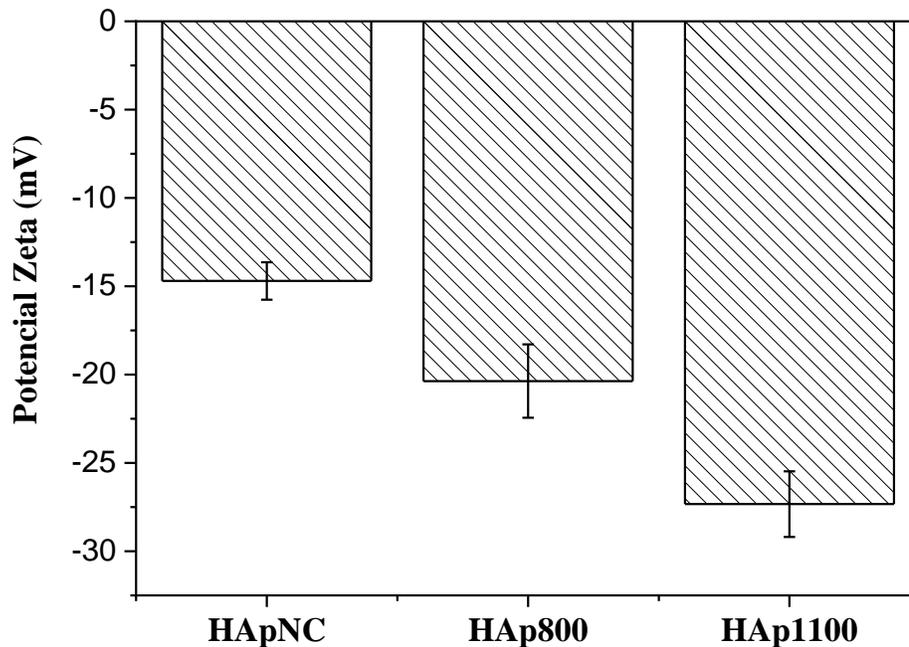


Figura 25: Potencial zeta da hidroxiapatita não calcinada e calcinada nas temperaturas de 800 °C e 1100 °C.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

5.2.1 Avaliação da microestrutura

Na Figura 26 são apresentados os resultados obtidos para os ensaios metalográficos das amostras de Ti, em barra, antes e após o tratamento térmico, obtidas com magnificações de 100X e 200X. A microestrutura observada é essencialmente de grãos equiaxiais, da fase alfa (α) do tipo hexagonal compacta (HC) (POONDLA et al., 2009). É claramente perceptível a variação do tamanho de grão entre as amostras e o valor médio de tamanho de grão, conforme ASTM E112-13, foi de No. 8.0 para a amostra sem tratamento térmico e de No. 6.5 para a amostra com tratamento térmico. Segundo a norma NBR ISO 5832-2, o tamanho máximo de grão para o TiCp é de No. 5.0, sendo assim, pode-se afirmar que o tamanho de grão obtido é

mais fino que o preconizado pela NBR. Quando comparado com valores observados na literatura, o tamanho médio de grão pós tratamento térmico é semelhante ao valor observado por outros autores (PAZOS; CORENGIA; SVOBODA, 2010).

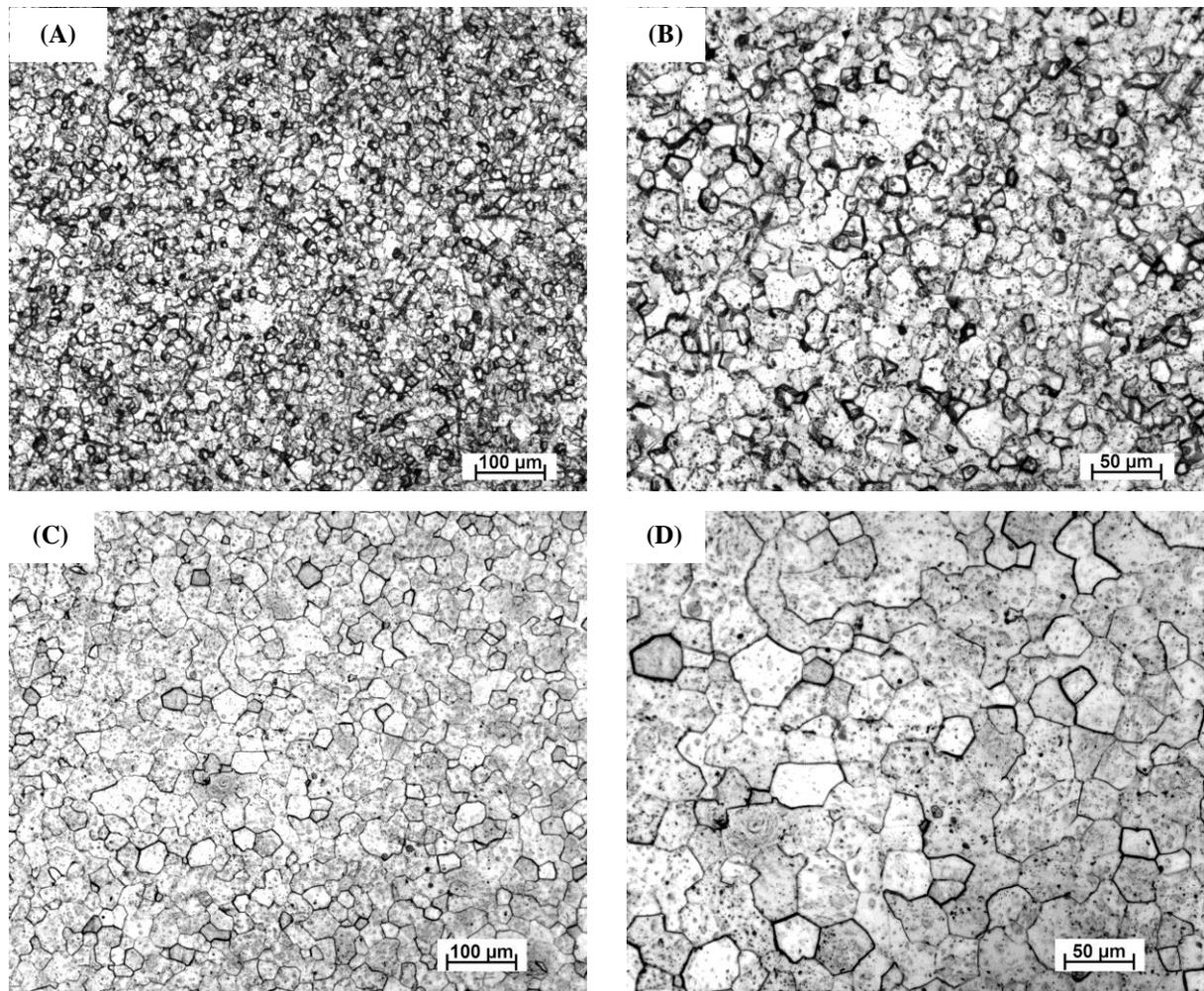


Figura 26: Micrografia óptica das amostras em barra de titânio grau 2 antes (A e B) e após o tratamento térmico (C e D) com aumentos de 100x e 200x.

5.2.2 Comportamento mecânico

Na Figura 27 é apresentado o resultado do ensaio de tração realizado nas amostras de TiCp grau 2. O ensaio demonstra que houve uma redução da

tensão máxima média de 397 ± 12 MPa para 362 ± 13 MPa e que os valores são significativamente diferentes ($p = 0,00892$) para um grau de confiabilidade de 95%. Apesar da redução da tensão máxima, os valores obtidos para o material pós tratamento térmico estão em acordo com os definidos na norma ASTM 67-13, que estabelece as especificações mecânicas, químicas e metalúrgicas para o Ti não ligado usado em implantes cirúrgicos. Segundo a norma, o TiCp grau 2 deve apresentar no mínimo uma tensão máxima de 345 MPa para todos os corpos de prova avaliados. Como o valor médio final foi de 362 ± 13 MPa e nenhuma amostra testada ficou abaixo de 345 MPa, pode-se considerar que os parâmetros definidos para as curvas de tratamento térmico são adequados para este tipo de material. Apesar disso, é necessário fazer a ressalva que os valores ficaram somente um pouco acima do valor mínimo e o menor valor para o teste de tração foi de 351 MPa.

De maneira a complementar o estudo das especificações mecânicas do substrato em Ti, foi realizado também uma avaliação da dureza do material (Figura 28). Conforme observado para a tensão máxima, a dureza do material também apresentou uma redução, sendo esta de $172,2 \pm 4,3$ HV₁₀ para $158,3 \pm 6,4$ HV₁₀ pós tratamento térmico. Os valores obtidos para a dureza do material antes do tratamento térmico estão em acordo com os valores obtidos por Poondla et al (2009) e pós tratamento está em acordo com o observado para o Ti recozido a 700 °C (LIU; CHU; DING, 2004). A redução da dureza já era esperada, pois a dureza de um material apresenta uma relação direta com a microestrutura do material (POONDLA et al., 2009) e com a tensão máxima do material.

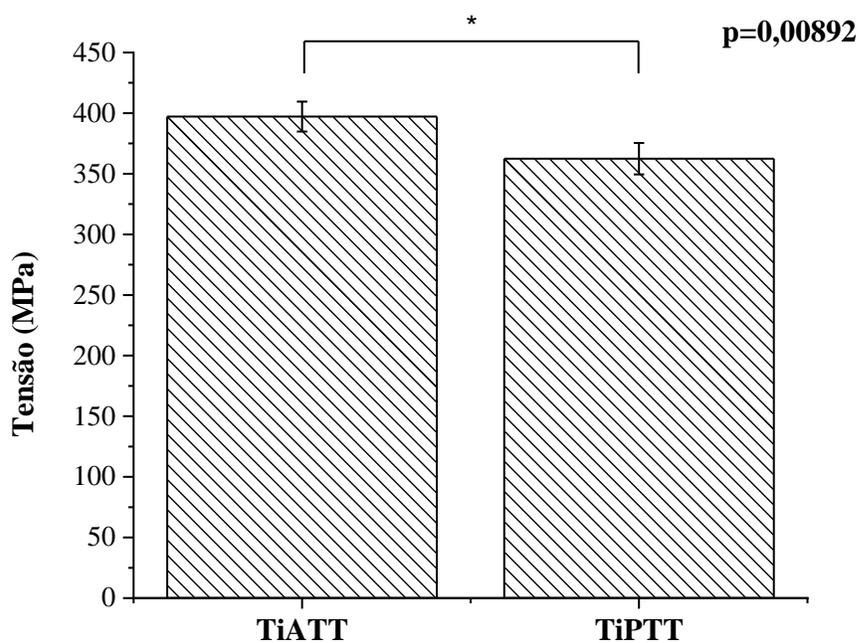


Figura 27: Avaliação do comportamento mecânico em tração do TiCp antes (TiATT) e após (TiPTT) o tratamento térmico realizado para o processo de revestimento com hidroxiapatita.

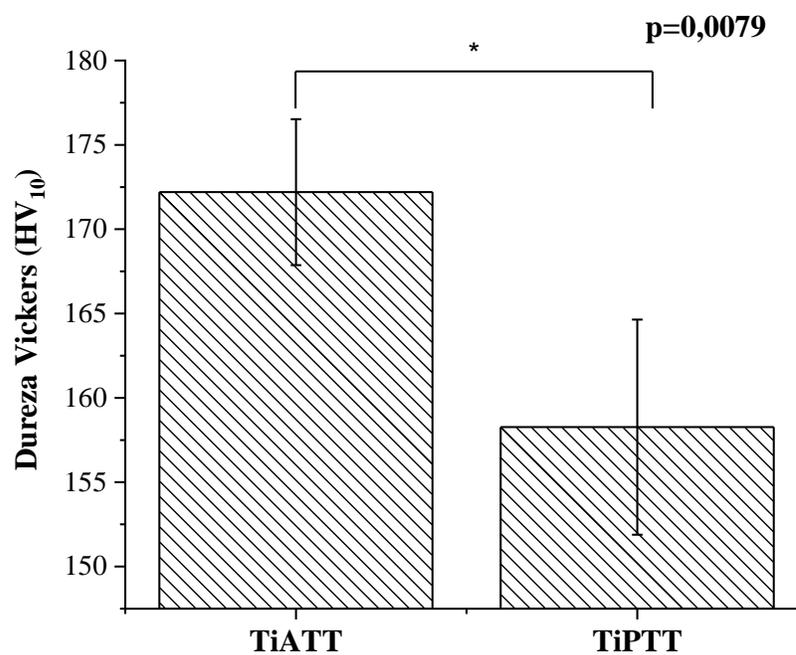


Figura 28: Comportamento em dureza vickers para as amostras antes (TiATT) e após (TiPTT) o tratamento térmico.

5.2.3 Superfície do substrato

Na Figura 29 são apresentados os valores de rugosidade média quadrática, obtidos do ensaio de perfilometria, para os pré-tratamentos realizados no substrato de Ti. Os resultados demonstraram que a conversão do Ti em TiO_2 acarretou um aumento da rugosidade superficial para os 3 (três) tratamentos aplicados. Dentre os tratamentos, a anodização realizada com potencial de 60 V foi a que apresentou o maior valor de rugosidade média quadrática ($0,473 \pm 0,007 \mu\text{m}$) sendo este 60% superior ao valor medido para o Ti sem tratamento ($0,296 \pm 0,007 \mu\text{m}$).

Os demais tratamentos apresentaram valores de rugosidade média quadrática de $0,425 \pm 0,003 \mu\text{m}$ (anodizado 20 V) e $0,379 \pm 0,004 \mu\text{m}$ (anodizado 40 V). Esses resultados apresentam um comportamento diferente do observado por Manjaiah & Laubscher (2017) que descrevem um aumento gradual da rugosidade de potenciais mais baixos a potenciais mais elevados. Porém, outros trabalhos demonstram que a rugosidade de Ti anodizado não apresenta um comportamento diretamente proporcional à variação do potencial de anodização (CRIDLING et al., 2017; ESCADA et al., 2017). Em casos de potenciais mais baixos, a rugosidade pode ser dependente de duas diferentes contribuições, a rugosidade do substrato e a rugosidade do processo de conversão de Ti metálico em TiO_2 (CRIDLING et al., 2017). Esse efeito pode ser a justificativa para a maior rugosidade observada na anodização a 20 V, quando comparado à anodização a 40 V.

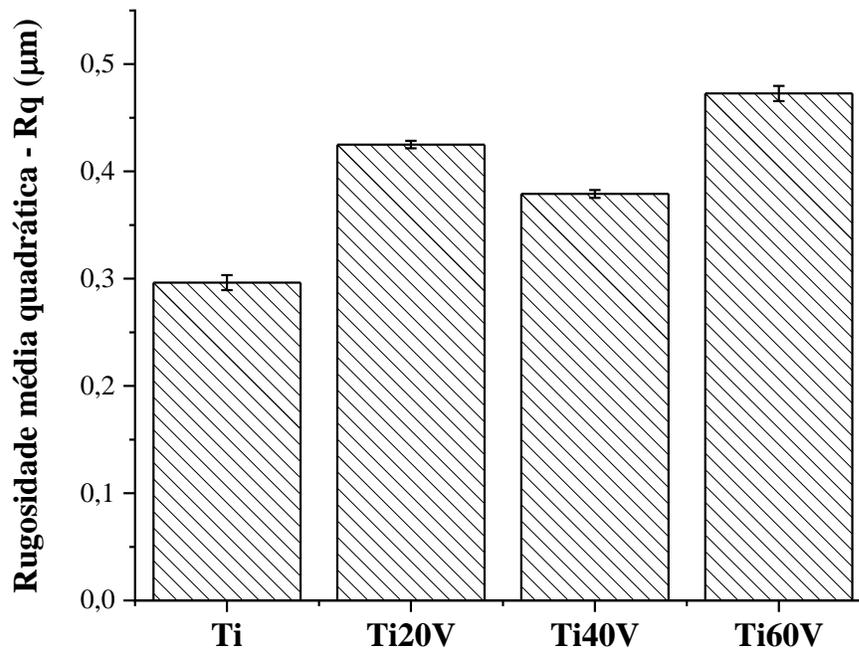


Figura 29: Avaliação da rugosidade para as amostras de titânio sem tratamento prévio e tratadas pelos processos de anodização a 20 V, 40 V e 60 V.

Para compreender melhor a morfologia da camada anodizada de TiO_2 , foi realizada avaliação por microscopia eletrônica de varredura das diferentes superfícies obtidas (Figura 30). Como se pode observar, a morfologia da amostra anodizada à 20 V apresenta muitos poros na sua estrutura superficial. Na amostra anodizada a 40 V ocorre uma menor presença de poros e existe a formação de uma estrutura formada por microrranhuras em alguns pontos da imagem. Além dos poros, a fácil distinção dos grãos, abaixo da camada de dióxido de Ti, corrobora o que foi observado e discutido para os valores de rugosidade média quadrática para a amostra anodizada à 20 V. Como dito por Cridling et al (2017), o Ti anodizado à 20 V tem a sua rugosidade formada pela contribuição das reações de oxidação do processo eletroquímico e pelo polimento aplicado ao substrato.

A estrutura composta por microrranhuras fica mais evidente quando é elevado o potencial de anodização à 60 V, além de ser menos perceptível a formação de poros na superfície da amostra. A imagem com aumento de

2000x da peça anodizada a 60 V (Figura 30D), mostra em mais detalhes a estrutura de microrranhuras formadas pelo processo de anodização. Esse tipo de estrutura pode ser um diferencial nos processos de formação do revestimento de HAp, pois além de conferir uma maior área superficial de contato com a HAp, a sua morfologia pode auxiliar no processo de ancoragem mecânica da camada de HAp com o substrato de Ti (MUCALO, 2015). A presença de poros pode ser um fator negativo, pois este tipo de estrutura normalmente funciona como concentradores de tensões, fragilizando a estrutura e reduzindo a adesividade final do revestimento (CHEN et al., 2018).

Na Figura 31 são apresentadas as curvas do comportamento eletroquímico das amostras de TiCp e anodizadas em diferentes potenciais. Na Tabela 8 são apresentados os valores de potencial de circuito aberto (E_{ca}), potencial de corrosão (E_{corr}) e densidade de corrente de corrosão (I_{corr}) obtidos das curvas de comportamento eletroquímico. Como pode ser observado na Figura 31A e na Tabela 8, os valores de E_{ca} para as amostras anodizadas apresentam um valor muito superior ao do Ti não anodizado. Esse aumento do potencial para direção mais nobre indica que as amostras anodizadas apresentam maior estabilidade termodinâmica e melhor comportamento em corrosão (QI et al., 2017; RATH et al., 2012). Quando observado o perfil de inclinação das diferentes curvas de E_{ca} , pode-se perceber que a exceção da amostra anodizada a 60 V, as demais apresentam um aumento do valor de potencial ao longo do tempo de ensaio. Este deslocamento para potenciais mais nobres pode estar relacionado ao espessamento da camada passivante sobre o Ti (RATH et al., 2012). Esse comportamento das amostras anodizadas pode ser explicado pela presença de defeitos na camada de óxido de Ti, como observado pelas imagens de microscopia eletrônica (Figura 30).

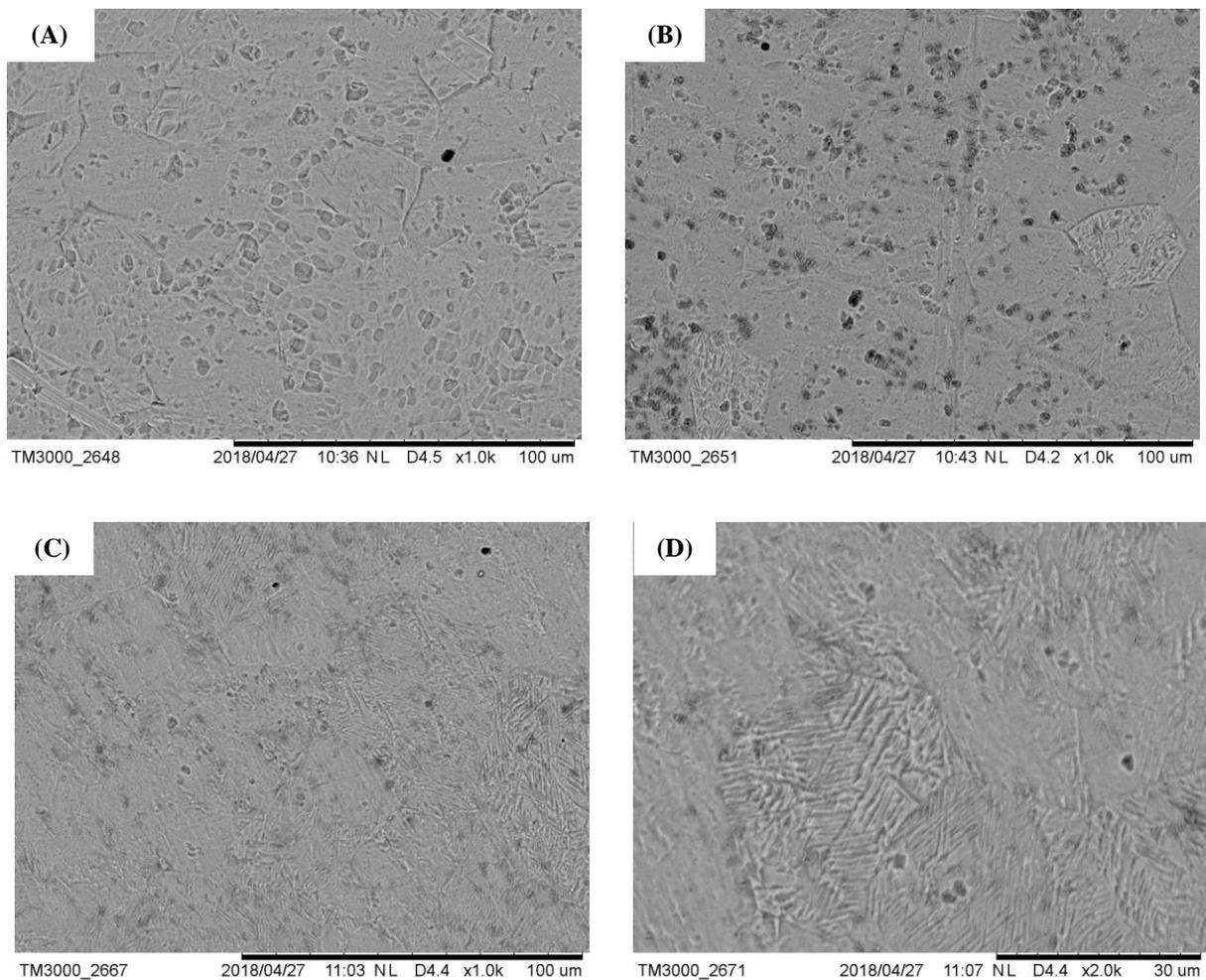


Figura 30: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies das amostras anodizadas em diferentes potenciais: (A) 20 V; (B) 40 V e (C) 60 V obtidas em aumento de 1000 x e (D) 60 V obtida em aumento de 2000 x.

As curvas de polarização potenciodinâmica das amostras são apresentadas na Figura 31B. O formato da curva do TiCp demonstra claramente o perfil deste tipo de material em um eletrólito neutro, sendo caracterizado por 3 (três) diferentes regiões: região ativa, região passiva e a quebra da camada passivante (SANTOS-COQUILLAT et al., 2019). A presença da camada natural de óxido acarreta em uma alta redução da taxa de dissolução do metal, agindo como um processo de inibição anódica natural (FRANKEL, 2016). Diferente da amostra TiCp, as amostras que foram anodizadas não

apresentaram a região de quebra da camada passivante. Este resultado demonstra que em meio de SBF, dentro da faixa de potenciais varridos, não ocorre a quebra do filme de óxido de Ti formado pela anodização.

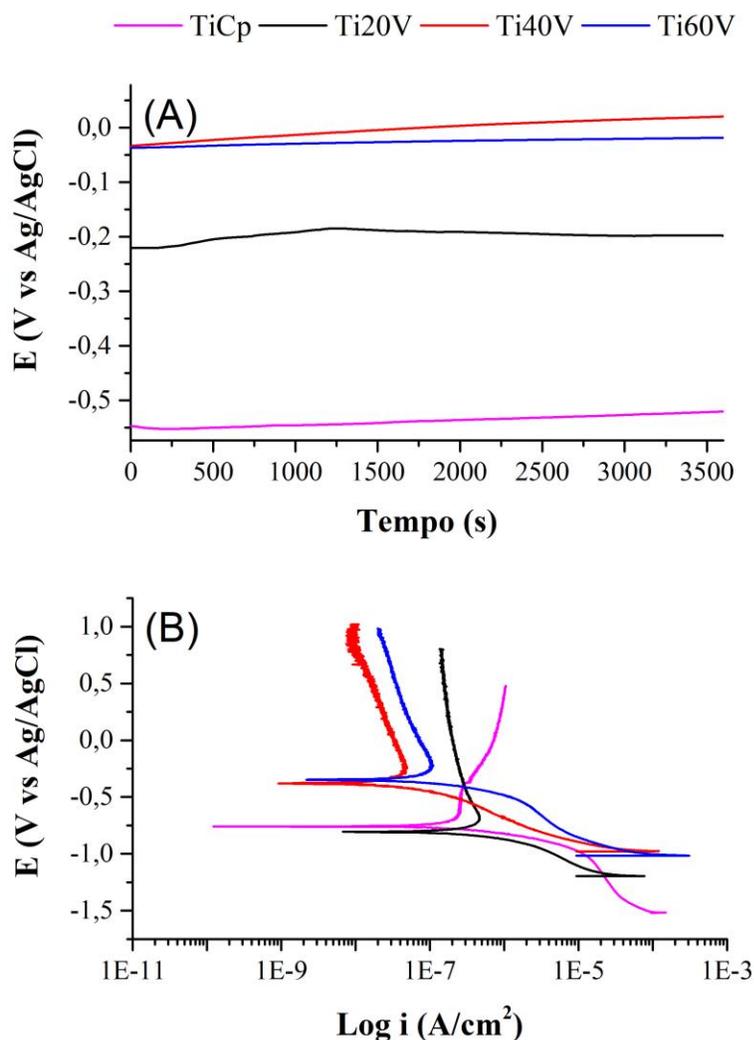


Figura 31: Avaliação do comportamento eletroquímico em SBF do TiCp e das amostras anodizadas a 20V, 40V e 60V. (A) Curvas de potencial de circuito aberto (PCA); (B) Curvas de polarização potenciodinâmica.

Comparado ao TiCp ($E_{\text{corr}} = -740 \text{ mV}$ e $I_{\text{corr}} = 0,09 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), houve um deslocamento dos valores para potenciais mais nobres das amostras anodizadas a 40 V e 60 V, -373 mV e -336 mV , respectivamente. Contudo,

este comportamento não foi observado para a amostra anodizada a 20 V (-797 mV), podendo este estar relacionado à presença de defeitos na camada de TiO₂. Os menores valores para I_{corr} das amostras anodizadas a 40 V (0,018 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) e 60 V (0,033 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) demonstram que essas amostras apresentam maior resistência à corrosão que o TiCp em meio de SBF (HUANG et al., 2016).

Tabela 8: Parâmetros de corrosão do ensaio de polarização potenciodinâmica em SBF para as amostras de titânio puro e anodizado em 3 diferentes potenciais.

Amostra	E_{ca} (mV)	E_{corr} (mV) vs Ag/AgCl	I_{corr} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
TiCp	-520	-740	0,09
Ti20V	-197	-797	0,15
Ti40V	20	-373	0,018
Ti60V	-18	-336	0,033

5.3 AVALIAÇÃO DA MISTURA DE ÓLEO DE PINHO E HIDROXIAPATITA

Na Figura 32 é apresentado o teste realizado com as misturas de óleo de pinho e HAp não calcinada e calcinada a 1100 °C sobre substrato de Ti polido. Como pode ser observado, a HAp não calcinada (Figura 32A) não apresentou uma boa dispersão no óleo, diferentemente da HAp calcinada a 1100 °C (Figura 32B). Esse comportamento pode ser explicado pelos valores de potencial zeta apresentados para a HAp não calcinada e calcinada a 1100 °C, -15 mV e -27 mV, respectivamente. A presença de uma carga superficial absoluta maior, em partículas dispersas numa suspensão sub-micrométrica, favorece a formação de um sistema mais homogêneo, evitando a aglomeração das partículas (AZOM, 2015; GUO et al., 2018).

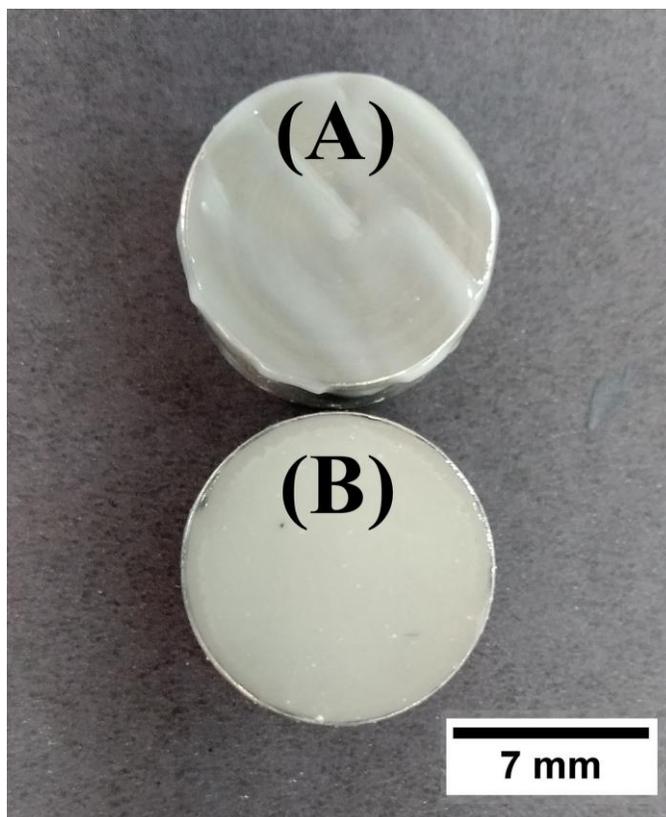


Figura 32: Recobrimento via pincel de substratos com hidroxiapatita antes de realizar o processo de tratamento térmico: (A) hidroxiapatita não calcinada e (B) hidroxiapatita calcinada a 1100 °C.

Além da avaliação visual das suspensões de HAp e óleo de pinho, também foi efetuada a medida da viscosidade das diferentes misturas (Figura 33). Como se pode observar, a suspensão elaborada com a HAp não calcinada foi a que apresentou o maior valor de viscosidade (219,7 cP) e a produzida com a HAp calcinada a 1100°C foi a que apresentou menor valor (47,9 cP). Segundo Ortega et al (1997) o comportamento reológico de suspensões está diretamente relacionado a características físicas das partículas, o tipo de interação entre sólido e líquido e a densidade dos fluídos e dos sólidos presentes. Como discutido previamente e observado na literatura, a temperatura de calcinação afeta diretamente a densidade, cristalinidade e cargas superficiais da HAp. Desta forma, pode-se concluir que a HAp calcinada

a altas temperaturas, ou seja, que apresenta uma alta densidade e cristalinidade e também um potencial zeta absoluto elevado, forma uma suspensão menos viscosa e mais favorável à formação de um filme homogêneo na superfície do Ti.

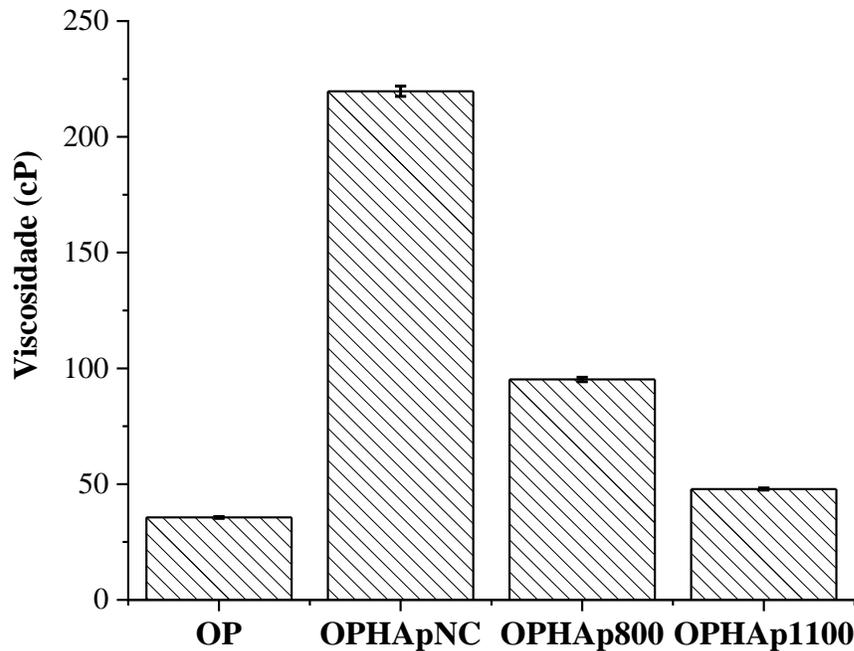


Figura 33: Valores de viscosidade do óleo de pinho (OP) e das misturas com hidroxiapatita não calcinada (OPHApNC) e calcinada a 800 °C (OPHAp800) e 1100 °C (OPHAp1100).

5.4 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO REVESTIMENTO

5.4.1 Ensaio realizado em forno a plasma

Na Figura 34 são apresentadas as imagens de microscopia óptica das amostras de Ti apenas polidas que foram revestidas com HAp no forno a plasma. Como pode ser observado pelas imagens de microscopia, houve uma alteração da coloração branca característica da HAp para tons de laranja. Essa

alteração de cor tornou-se mais expressiva conforme houve o aumento da temperatura de trabalho do forno a plasma. Esta mudança de coloração pode ser um indicativo de contaminação da amostra com íons presentes na estrutura da carcaça do reator a plasma. A parede do reator (anodo do sistema a plasma) é feita em aço inoxidável e essa coloração pode ser um indicativo de íons ferro removidos pelo processo de plasma e depositados na superfície de HAp. Como houve o tratamento posterior do filme em forno elétrico e em ambiente oxidante (atmosfera ambiente), a coloração pode ser a presença de compostos de óxido de ferro.

Os DRXs das amostras revestidas em diferentes temperaturas do tratamento a plasma e do pó de HAp são apresentados na Figura 35. Os difratogramas correspondem à presença da HAp pura para os revestimentos obtidos a 300°C e 400°C e para o pó de HAp (ICDD padrão nº 09-0432), não havendo presença da fase beta do fosfato tricálcico (ICDD padrão nº 09-0169), óxidos de cálcio (ICDD padrão nº 82-1690) e tetracálcio fosfatos (ICDD padrão nº 25-1137). Na amostra revestida em plasma a 500°C houve a formação de um pico em $2\theta = 27,3^\circ$, que pode estar correlacionado a decomposição térmica da HAp e formação da fase beta de fosfato tricálcico (SURMENEV, 2012). Apesar da mudança de coloração ser um indício de contaminação das amostras, não foi possível detectar nenhuma fase que não fosfato de cálcio na difração de raios-X.

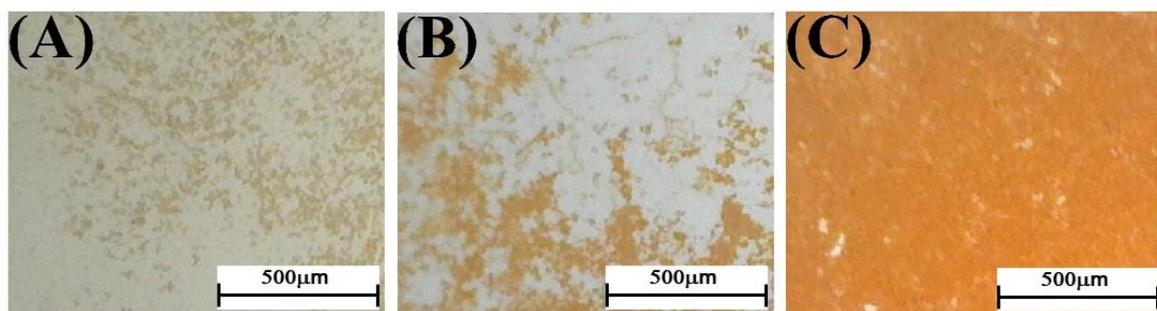


Figura 34: Imagens de microscopia óptica da superfície das peças revestidas em sistema a plasma: (A) temperatura de 300 °C; (B) temperatura de 400 °C; (C) temperatura de 500 °C.

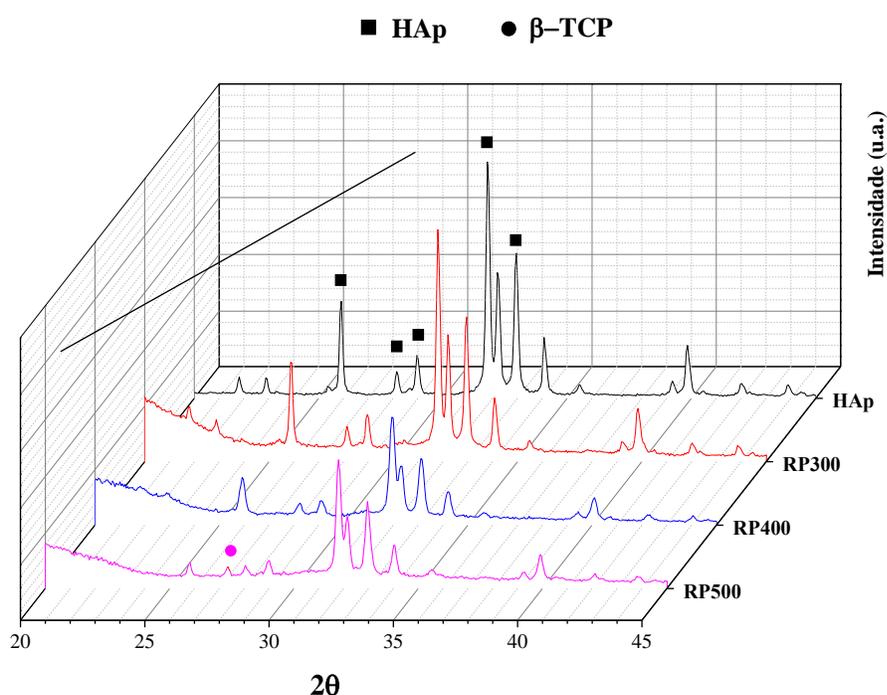


Figura 35: Difração de raios-X do pó de hidroxiapatita (HAp) e das amostras tratadas a plasma nas temperaturas de 300°C (RP300), 400°C (RP400) e 500°C (RP500).

Para avaliar o comportamento de adesividade do filme ao substrato de Ti foi realizado ensaio com pelo menos duas amostras de cada temperatura utilizada (Figura 36). Como pode ser observado, os filmes depositados à temperatura de 300 °C e 400 °C obtiveram valores muito semelhantes,

estando na ordem de 12 MPa. As amostras tratadas a 500 °C obtiveram valores inferiores, apenas 8 MPa.

Esperava-se que a alta energia do plasma conferisse ao revestimento uma maior adesividade ao substrato, garantindo um processo dentro das normas internacionais. Contudo, os valores ficaram abaixo de 15 MPa, valor preconizado pela norma ISO 13779-4:2002. Além de apresentar um comportamento em adesividade abaixo do esperado, a contaminação com elementos de construção do forno foi um resultado inesperado e complicador para um produto que possa ser implantado em meio fisiológico.

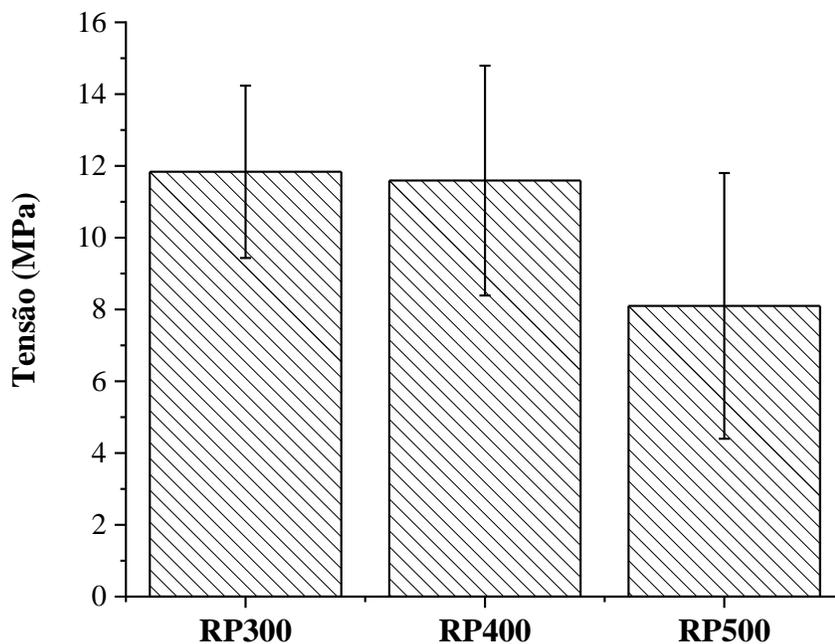


Figura 36: Teste de adesividade dos filmes de HAp depositados pelo processo a plasma: temperaturas de 300°C (RP300), 400°C (RP400) e 500°C (RP500).

5.4.2 Ensaios realizados em forno elétrico

5.4.2.1 Avaliação da morfologia dos revestimentos

Para avaliar a morfologia dos filmes produzidos sobre Ti polido, microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura foram realizadas. A Figura 37 apresenta as imagens das amostras que foram revestidas com a HAp não calcinada (Figura 37A), calcinada a 800 °C (Figura 37B) e a 1100 °C (Figura 37C). A amostra não calcinada apresentou a formação de um revestimento quebradiço ao longo de toda a sua superfície. O MEV mostrou que essas trincas são da ordem de algumas dezenas de micrômetros. Por meio da MO não foi possível observar diferenças entre os revestimentos de HAp calcinada a 800 °C e 1100 °C, contudo as imagens de MEV demonstraram que existe diferença entre estes filmes.

As imagens com maior aumento apresentadas na Figura 38 permitem uma maior compreensão sobre as características de cada um dos revestimentos. Como pode ser visto nas Figuras 39A e 39B, o revestimento elaborado com a HAp não calcinada apresenta partículas sem uma geometria definida, característica deste tipo de HAp (GUO et al., 2013; SCALERA et al., 2013). Também pode ser observado que a superfície apresenta grande heterogeneidade, além de partículas aglomeradas e a presença de poros. As Figuras 37B e 38C e D apresentam as imagens do revestimento obtido com HAp calcinada a 800 °C. Como já observado para a amostra não calcinada, não foi possível verificar uma diferença do formato das partículas da HAp, entretanto, houve a formação de um revestimento mais homogêneo, com menor presença de poros e algumas fraturas. A maior homogeneidade pode estar relacionada à melhor dispersão das partículas no óleo, como observado no ensaio de viscosidade. Diferentemente dos demais filmes, o revestimento da HAp calcinada a 1100 °C (Figura 37C e 38C e D) apresenta partículas de geometria bem definida, característica de HAp calcinadas a elevadas

temperaturas (GUO et al., 2013; SCALERA et al., 2013). Em adição ao tamanho de partícula bem definido, existe uma menor aglomeração de partículas, mas a presença de poros na estrutura é bem perceptível. A morfologia e a dispersão das partículas estão em acordo com os resultados observados nos ensaios de viscosidade e de microscopia óptica.

A Figura 39 apresenta as imagens da secção transversal das amostras revestidas com as HAp calcinadas a 800 °C e 1000 °C. Os valores de espessura para os dois revestimentos foram de $89,6 \pm 8,0 \mu\text{m}$ (HAp calcinada a 800 °C) e $64,2 \pm 4,8 \mu\text{m}$ (HAp calcinada a 1100 °C). O teste ANOVA uma-via demonstrou que existe uma diferença significativa ($p=0,001$) para espessura das amostras. Também foi possível perceber que a amostra de 1100 °C apresenta uma grande homogeneidade na espessura do filme (menor valor de desvio padrão). Este resultado pode estar relacionado à melhor dispersão no óleo e ao fato que partículas têm um menor tendência de formar aglomerados para HAp com maiores valores absolutos de potencial zeta (AZOM, 2015; GSHALAEV; DEMIRCHAN, 2012; GUO et al., 2018)

Os valores de espessura obtidos são similares àqueles observados para as técnicas de sol-gel e *dip-coating* (1 μm a 15 mm) e deposição eletroquímica (50-500 μm). Entretanto, eles são muito maiores que aqueles observados para plasma (<20 μm), revestimento biomimético (<30 μm) e *sputter* (0,5-3 μm) (ASRI et al., 2016; HARUN et al., 2018). Outros autores têm demonstrado que o revestimento a plasma spray podem apresentar filmes na ordem de centenas de micrometros (KWEH; KHOR; CHEANG, 2002a; LE GUÉHENNEC et al., 2007). Em adição às diferenças entre os valores de espessura e a homogeneidade dos filmes, é possível perceber que o revestimento com HAp calcinada a 800 °C apresenta pontos de resina epóxi na estrutura do filme (pontos marcados com flechas). A presença da resina pode estar relacionada aos poros e trincas existentes no revestimento.

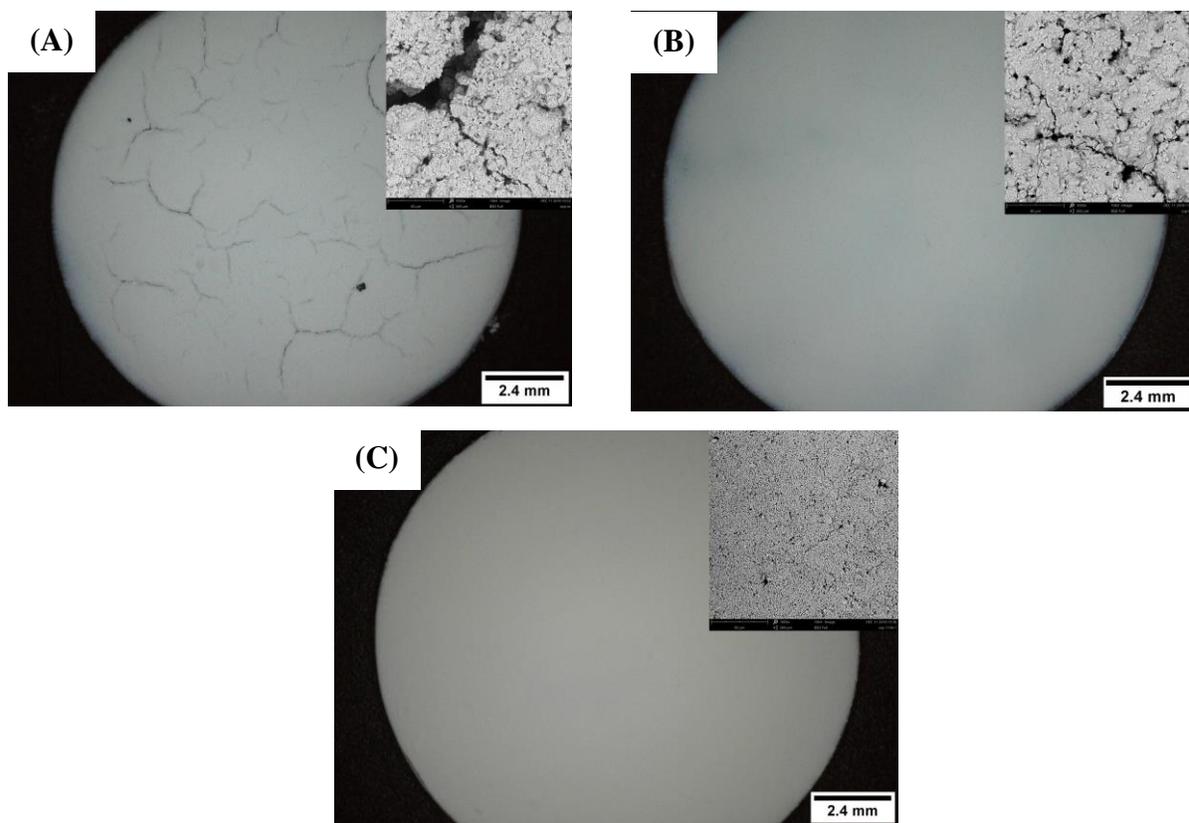


Figura 37: Imagens de MO e MEV dos diferentes revestimentos de HAp: (A) HAp não calcinada; (B) calcinada a 800 °C e (C) calcinada a 1100 °C.

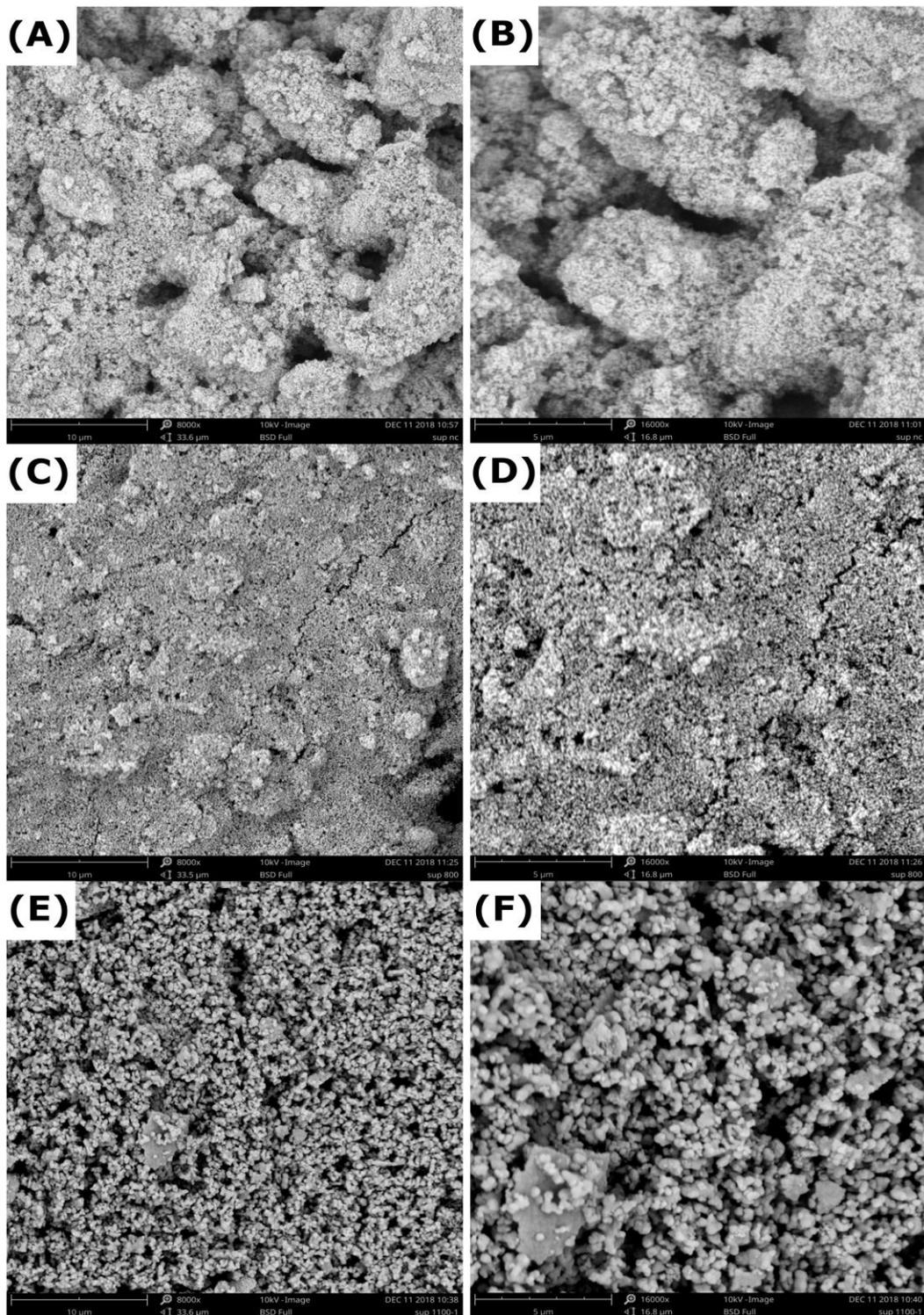


Figura 38: Imagens de MEV dos diferentes revestimentos de HAp: (A) e (B) HAp não calcinada; (C) e (D) calcinada a 800 °C e (E) e (F) calcinada a 1100 °C

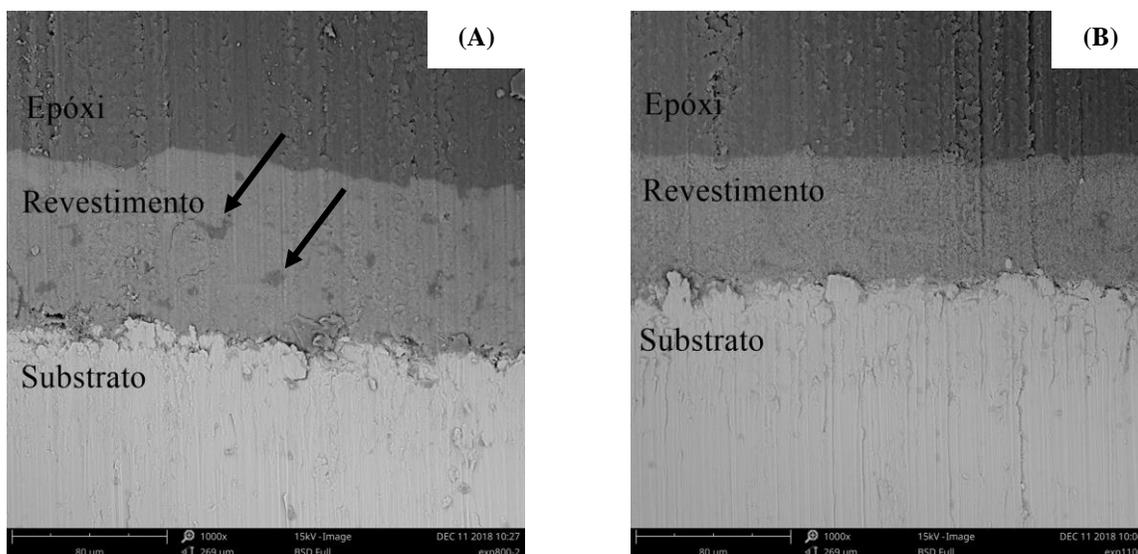


Figura 39: Imagens de MEV da secção das amostras de revestimentos com HAp: (A) calcinada a 800 °C e (B) calcinada a 1100 °C

5.4.2.2 Avaliação das características químicas do revestimento

Difração de raios-X

Um das principais informações no desenvolvimento de revestimentos de HAp é em relação ao entendimento das fases presentes. Para a definição das fases presentes, a técnica mais aplicada é de difração de raios-X, pois, por meio desta, torna-se possível identificar a presença das diferentes fases cristalinas de fosfatos de cálcio formados pelo processo de revestimento (ROY; BANDYOPADHYAY; BOSE, 2011; SURMENEV, 2012; VAHABZADEH et al., 2015).

Na Figura 40 são apresentados os difratogramas das amostras de Ti sem e com etapas de pré-tratamento e revestidas. Como pode ser observado nos difratogramas, a metodologia empregada para a construção do revestimento não acarretou a formação de nenhuma outra fase de fosfato de cálcio. Segundo Sridhar (2003) valores superiores 1050 °C para o Ti levam a degradação catalítica da HAp em fosfatos de cálcio anídricos. Kannan (2003)

demonstrou que o tratamento térmico de revestimentos de HAp a temperatura de 800 °C não gera modificações na estrutura cristalina da HAp. Esse resultado mostra-se muito promissor, pois conforme observado por Vahabzadeh et al (2015), os implantes comerciais revestidos por plasma spray apresentam a formação de segundas fases, tais como: (α/β) TCP, tetracálcio fosfato (TTCP) e óxido de cálcio (CaO).

A presença de fases como o TTCP e o CaO podem se mostrar muito prejudiciais ao revestimento, pois apresentam uma alta taxa de degradação e não são considerados favoráveis para a formação do tecido ósseo (ROY; BANDYOPADHYAY; BOSE, 2011). A presença do (α/β) TCP também afeta a taxa de degradação do revestimento (ZHANG et al., 2017, 2005). E apesar de alguns estudos demonstrarem que a formação de estruturas do tipo bifásicas de fosfato de cálcio (HAp/TCP) serem favoráveis à diferenciação das células do tipo osteoblastos, os estudos não apresentam conclusões quanto a aplicabilidade das cerâmicas bifásicas e da sua real influência no mecanismo de osteogênese (JALOTA; BHADURI; TAS, 2006; ZHANG et al., 2005). Em decorrência de afetar as características de degradação do revestimento, a presença destas segundas fases também acarretam na redução da força de adesão do revestimento e podem acarretar na falha tardia do implante (HARUN et al., 2018).

No intuito de compreender melhor a interface HAp/Ti, foi realizado estudo avaliando as fases presentes no produto (substrato + revestimento) ao longo de várias etapas de desgaste abrasivo do revestimento (Figura 41 a 44). Como pode ser observado nos dois difratogramas da Figura 41, houve a formação da fase rutilo cristalina na interface entre o substrato de Ti metálico e da HAp. A presença da fase cristalina na interface apresenta uma característica importante para a biocompatibilidade, pois favorece a precipitação de apatita e também auxilia na interação com os tecidos e células ao redor do implante (CUI et al., 2009; MANJIAH; LAUBSCHER, 2017; WU et

al., 2014). Essa maior biocompatibilidade é relacionada à correspondência existente entre as distâncias O-O do plano cristalino (101) da fase rutilo e Ca-Ca do plano (002) da fase apatita (CUI et al., 2009; WU et al., 2014). Essa correspondência favorece a interação dos íons cálcio presente no fluido corpóreo com os sítios de oxigênio da rutilo e conseqüentemente o cálcio atrai o fosfato para a precipitação da apatita (KOKUBO et al., 2004).

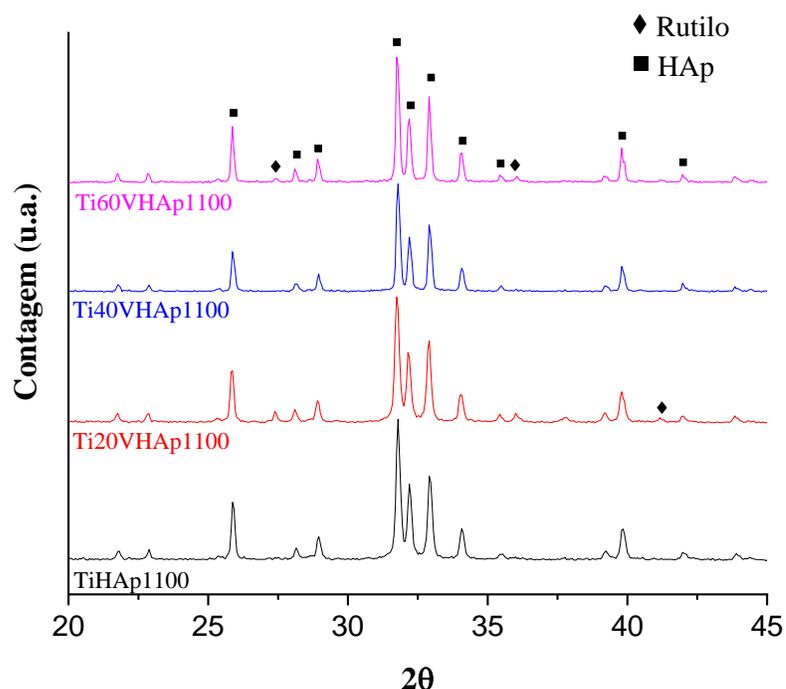


Figura 40: Difratogramas dos recobrimentos de titânio com hidroxiapatita para as diferentes variações de pré-tratamento do substrato de titânio. Fase HAp (ICDD: 00-009-0432) e fase rutilo (ICDD: 01-086-0148).

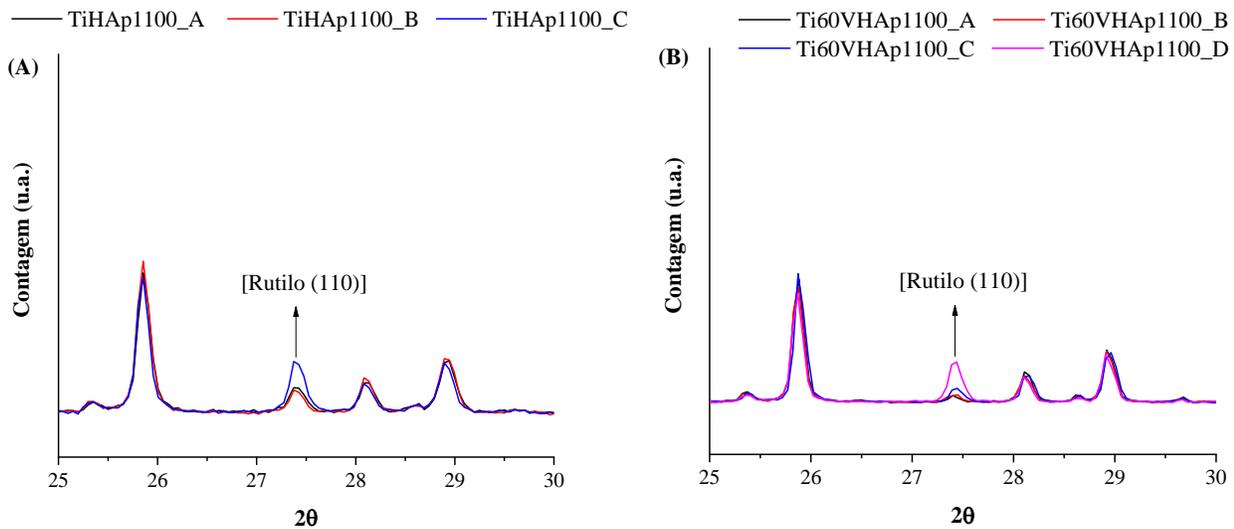


Figura 41: Difratoograma do titânio revestido com hidroxiapatita (A) e titânio anodizado a 60 V e revestido com hidroxiapatita (B). Fases de HAp (ICDD: 00-009-0432) e fases do rutilo (ICDD: 01-086-0148). Os gráficos mostram a mudança dos difratogramas conforme foi realizado o desgaste abrasivo.

Nas Figuras 43 e 44 são apresentados os difratogramas para as amostras do Ti e Ti anodizado a 60V, antes e após o processo de desgaste abrasivo. Como citado anteriormente, houve a formação da fase cristalina rutilo na superfície do Ti metálico. Além de apresentar a fase rutilo, as amostras também apresentaram a formação da outra variante alotrópica do dióxido de Ti ($2\theta = 37,74$). A presença das duas variações alotrópicas do dióxido de Ti é documentada por outros autores para processos de anodização e tratamentos térmicos (CUI et al., 2009; GEMELLI; SCARIOT; CAMARGO, 2007; HILARIO et al., 2017). Como explicado previamente, essas duas fases são de interesse para melhorar a biocompatibilidade e a formação de apatita nos dispositivos implantados.

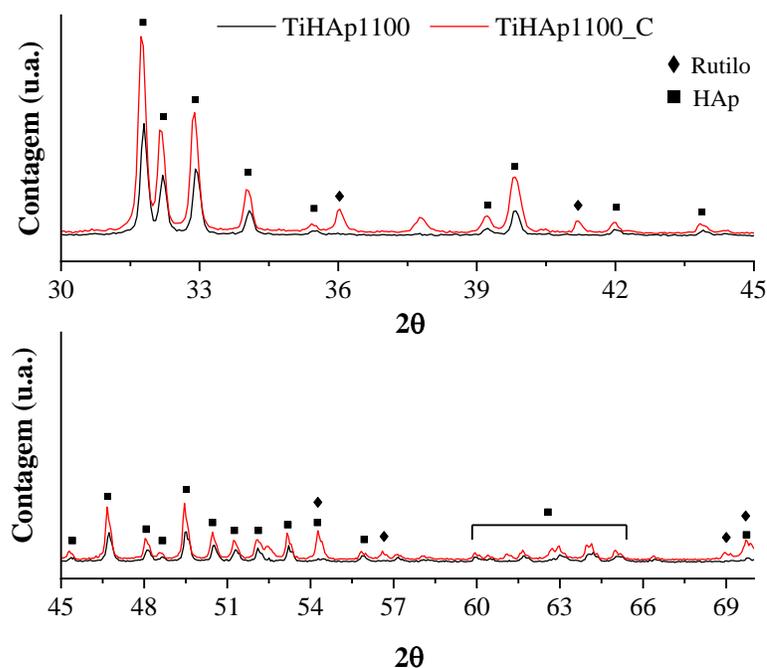


Figura 42: Difratoograma do titânio revestido com hidroxiapatita. Os gráficos mostram as diferenças observadas para a amostra sem desgaste abrasivo (TiHAp1100) e após a última etapa de desgaste (TiHAp1100_C).

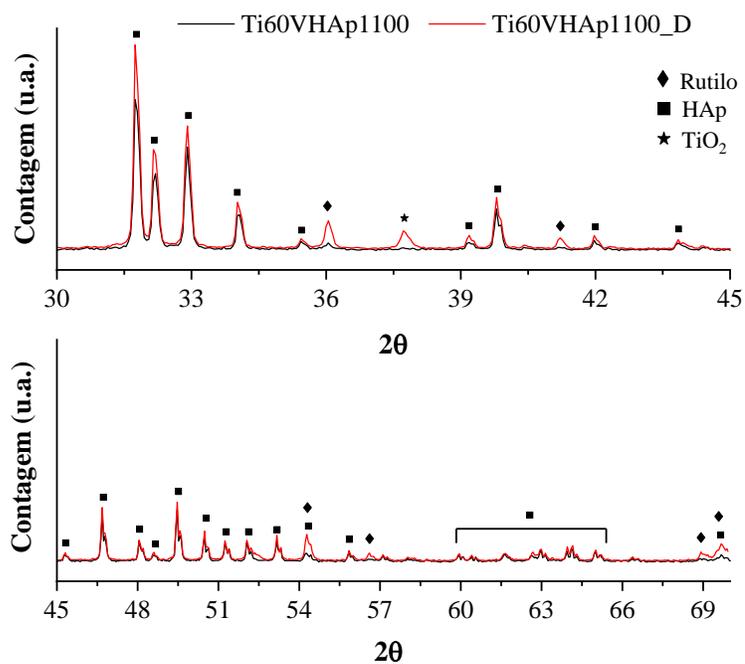


Figura 43: Difratoograma do titânio anodizado a 60 V e revestido com hidroxiapatita. Os gráficos mostram as diferenças observadas para a amostra sem desgaste abrasivo (Ti60VHAp1100) e após a última etapa de desgaste (Ti60VHAp1100_D).

Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman apresenta uma grande aplicabilidade na avaliação de estruturas inorgânicas e em relação aos fosfatos de cálcio o Raman apresenta modos vibracionais bem definidos para o grupamento PO_4^{3-} (AGUIAR et al., 2018). Dentre os modos vibracionais do grupamento fosfato, pode-se distinguir os relacionados à flexão simétrica (ν_2) entre 400-485 cm^{-1} e à flexão assimétrica (ν_4) entre 570-620 cm^{-1} . Além dos modos vibracionais de flexão, é possível identificar o alongamento simétrico e assimétrico do PO_4^{3-} , sendo o alongamento simétrico (ν_1) de grande intensidade e presente na região entre 930-990 cm^{-1} . Diferente do alongamento simétrico, o assimétrico é de pequena intensidade, próximo do observado para os modos de flexão, e são observados na região entre 1000-1100 cm^{-1} (AGUIAR et al., 2018; CUSCO et al., 1998; SMITH; REHMAN, 1994). Na Figura 44 é possível observar que todas as amostras apresentaram os modos de vibração característicos do grupamento fosfato. Além dos espectros apresentados na Figura 44, foi elaborado uma tabela com todos valores dos modos vibracionais (Tabela 9).

Segundo Cusco et al (2018) o modo vibracional do alongamento simétrico (ν_1) pode ser utilizado para identificar a presença de diferentes fases de fosfato de cálcio em uma amostra. Conforme o autor, a HAp apresenta um pico simples e intenso em 962 cm^{-1} , diferentemente do β -TCP que apresenta um pico duplo. Nos testes apresentados por Aguiar e colaboradores, em que os mesmos realizaram uma deconvolução do pico na região entre 930-990 cm^{-1} , foi observado que o pico simples e intenso da HAp era composto por dois modos vibracionais, 956 cm^{-1} e 962 cm^{-1} , atribuídos as fases monoclinicas e hexagonais da HA, respectivamente. Para a amostra com a presença unicamente da fase β -TCP, os autores obtiveram uma composição de 3 modos vibracionais em 948 cm^{-1} , 960 cm^{-1} e 971 cm^{-1} , correlacionais a presença de 2 sistemas cristalinos para o β -TCP.

De acordo com o apresentado na Figura 44 e na Tabela 9 e com base no que foi observado na literatura, pode-se inferir que as amostras revestidas não apresentaram a formação da fase β -TCP, pois não houve a formação de um pico duplo na região entre $930-990\text{ cm}^{-1}$, tendo somente a formação do pico simples e intenso com o valor de 962 cm^{-1} para todas as amostras obtidas. Esses resultados corroboram os que foram observados para o a difração de raios-X.

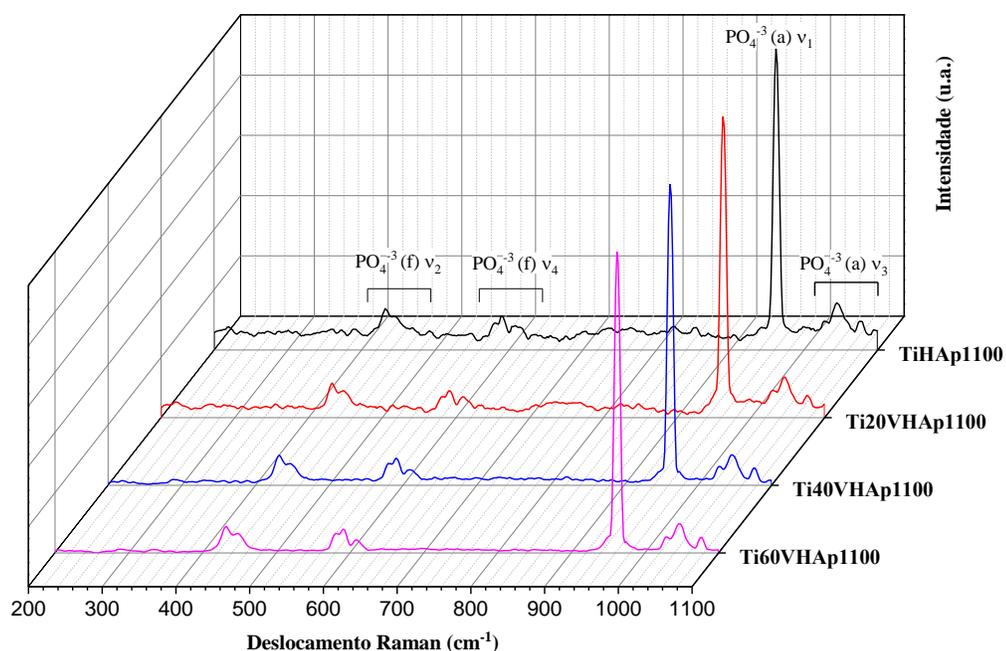


Figura 44: Espectro Raman dos recobrimentos de titânio com hidroxiapatita para as diferentes variações de pré-tratamento do substrato de titânio.

Tabela 9: Relação dos picos observados

Amostra	Modos vibracionais	Deslocamento Raman (cm⁻¹)
TiHAp1100	PO ₄ ⁻³ (f) v ₂	432 e 443
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₄	581, 590 e 609 e 614
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₁	962
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₃	1026, 1044 e 1075
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₂	434 e 449
Ti20VHAp1100	PO ₄ ⁻³ (f) v ₄	581, 592 e 611e 640
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₁	962
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₃	1030, 1046 e 1075
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₂	432 e 447
Ti40VHAp1100	PO ₄ ⁻³ (f) v ₄	579, 590 e 609
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₁	962
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₃	1028, 1046 e 1075
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₂	432 e 449
Ti60VHAp1100	PO ₄ ⁻³ (f) v ₄	581, 590 e 609
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₁	962
	PO ₄ ⁻³ (f) v ₃	1028, 1046 e 1075

Na Figura 45 é apresentado o espectro Raman da amostra revestida sobre Ti anodizado a 60 V e que foi desgastado por abrasão. Como pode ser observado na Figura 45B, foram feitas 3 medidas em um perfil que apresenta níveis diferentes de desgaste: 1- revestimento com metal exposto; 2- revestimento com camada fina de HAp e 3- revestimento com camada espessa de HAp. O espectro da região que apresenta o metal exposto (região 1) é possível perceber a clara formação de picos característicos da fase rutilo do dióxido de titânio (FRANK et al., 2012; RATH et al., 2012). Em 447 cm⁻¹ e 611 cm⁻¹ têm-se os picos característicos dos modos de vibração E_g e A_{1g}, respectivamente, e em 236 cm⁻¹ o modo de vibração Raman de segunda

ordem (RATH et al., 2012). Assim como anteriormente discutido para a difração de raios-X, não foi observada a presença da fase anatásio nas amostras. Estes resultados estão coerentes com a literatura para amostras de dióxido de titânio submetidas a processos de calcinação com temperaturas superiores a 700 °C (ALLEN et al., 2018).

O espectro da região 2 é composto pelos picos característicos das fases rutilo e HAp. Como discutido anteriormente e observado neste espectro, não houve a formação de um pico duplo na região entre 930-990 cm^{-1} , característico da fase β -TCP, e portanto, infere-se que a HAp manteve-se estável na interface com a superfície do Ti. O espectro da região 3 (camada mais espessa) mostra somente os picos característicos dos modos de vibração da HAp, não sendo possível distinguir os picos da interface substrato/revestimento.

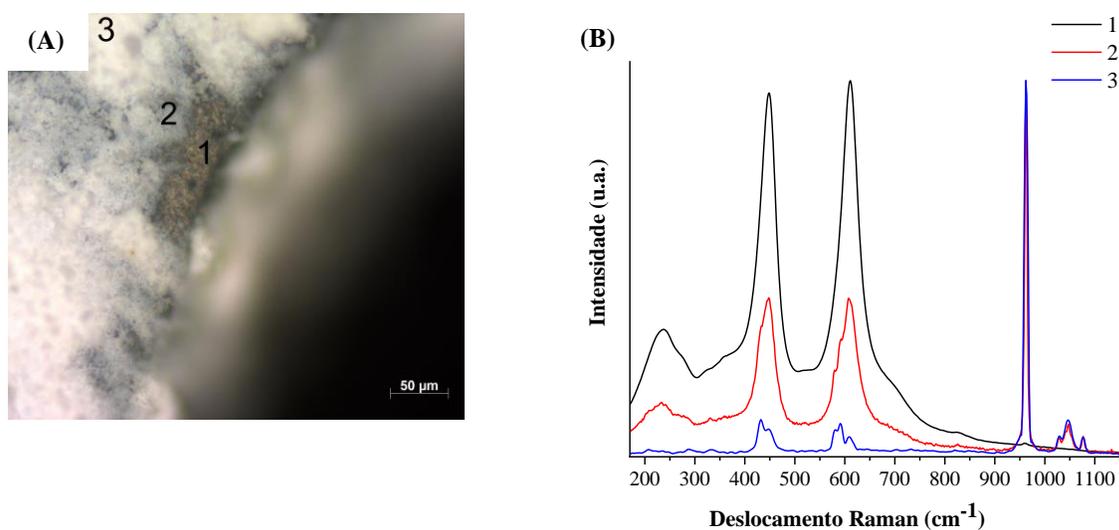


Figura 45: Avaliação do comportamento Raman do revestimento de hidroxiapatita sobre titânio anodizado a 60V em 3 níveis de desgaste: (A) imagem do microscópio do Raman com as regiões analisadas; (B) espectros Raman das 3 regiões.

5.4.3 Adesividade

Na Figura 46 é apresentado o comportamento de adesividade dos filmes obtidos sobre os diferentes pré-tratamentos. Como pode ser observado, a anodização a 60 V foi a que obteve o maior resultado para a tensão de adesividade ($12 \pm 5,9$ MPa). Apesar de apresentar os maiores valores de média, os resultados não podem ser considerados estatisticamente diferentes dos demais.

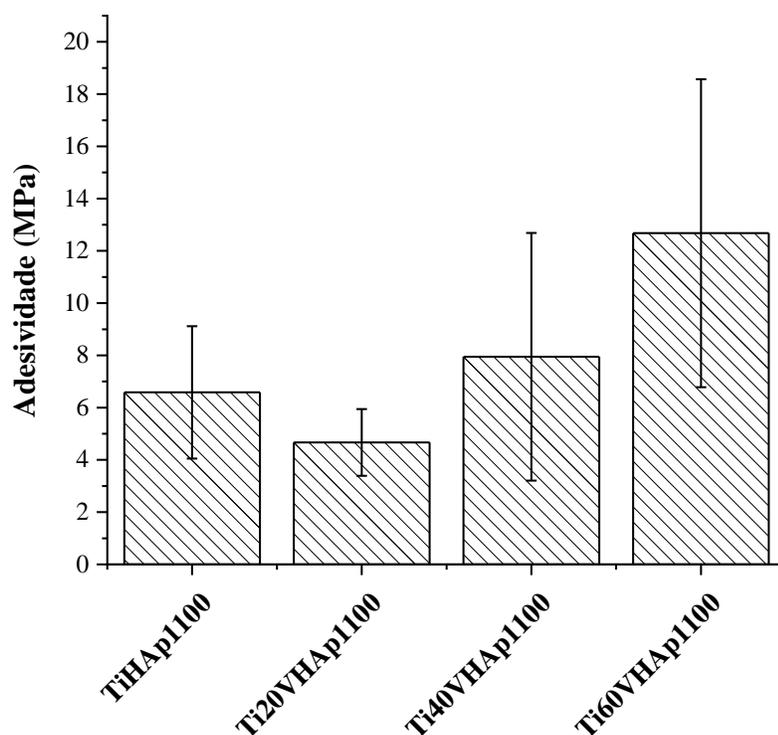


Figura 46: Avaliação dos testes de adesividade para os diferentes tipos de pré-tratamentos aplicados para o revestimento.

5.5 COMPORTAMENTO DO REVESTIMENTO PARA ANODIZAÇÃO 60V

A partir dos dados obtidos previamente, optou-se pelo desenvolvimento dos testes de bioatividade, biocompatibilidade e degradação para o revestimento obtido pela metodologia do forno elétrico e com pré-tratamento de anodização a 60 V.

5.5.1 Adesividade

Os dados de força de adesão são muito variáveis na literatura. Essa variabilidade é referente a diferentes modos de falha, como mostrado em: Figura 47A modo de falha adesivo; Figura 47B modo de falha coesivo; Figura 47C combinação de ambos os modos de falha (CAI et al., 2011b). Além dos diferentes modos de falha, a variabilidade da morfologia, cristalinidade e composição entre todos os processos contribuem para isso. Amostras preparadas por sol-gel podem apresentar grandezas na ordem de 20 a 50 MPa, enquanto os revestimentos obtidos por deposição eletroquímica são da ordem de 5-15 MPa. Os revestimentos obtidos por *plasma spray* também não são muito diferentes daqueles observados para outras técnicas e são da ordem de 2-23 MPa (HARUN et al., 2018). Alguns autores relatam valores da ordem de 30-40 MPa para a técnica de pulverização de plasma, no entanto, nestes casos as amostras foram pré-tratadas com jateamento de areia da área para gerar maior rugosidade e permitir maior ancoragem mecânica (HUNG et al., 2013).

Na Figura 48 são apresentados os valores de adesividade do revestimento obtidos para os filmes elaborados com HAp calcinada a 800 °C e 1100 °C. Como pode ser observado, as medidas de adesividade para a HAp calcinada a 1100 °C são pouco superiores aos da calcinada a 800 °C e apresentam uma menor dispersão de valores. Entretanto, não se pode inferir

que existe diferença significativa entre ambas, pois os valores de F e p foram de 2,36 e 0,16, respectivamente.

De acordo com a norma ISO 13779-4:2002 - Implants for surgery -- Hydroxyapatite -- Part 4: Determination of coating adhesion strength, o valor mínimo para a adesividade do revestimento de HAp deve ser de 15 MPa. Apesar da média de HAp calcinada a 800 °C ser exatamente este valor, o gráfico da Figura 48 mostra que existem valores pontuais que estão abaixo de 15 MPa, fato este não observado para as amostras preparadas com a HAp calcinada a 1100 °C.

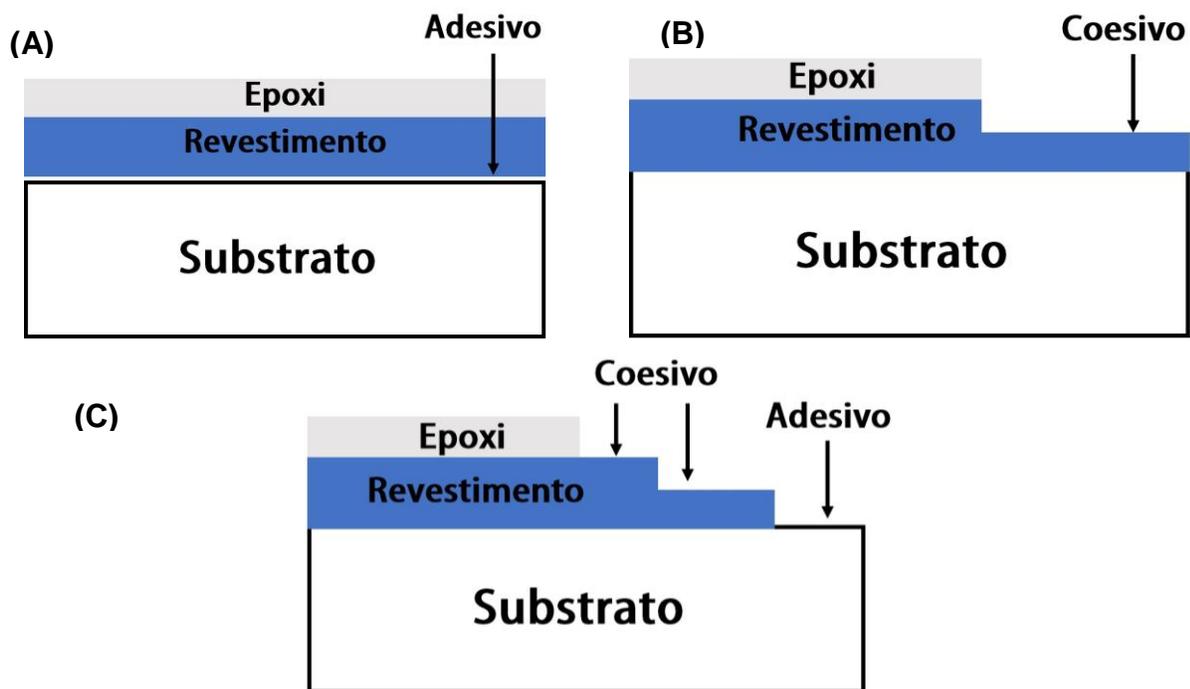


Figura 47: Representação esquemática dos diferentes modos de falha: (A) falha por adesividade; (B) falha por coesão; (C) combinação de ambos modos de falha.

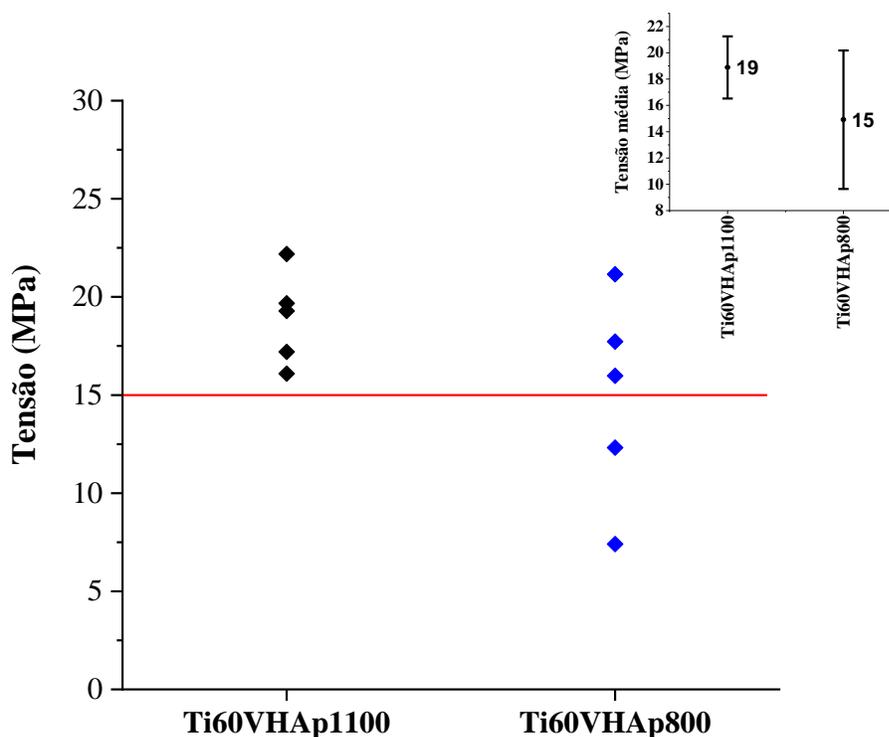


Figura 48: Adesividade do filme de hidroxiapatita sobre titânio anodizado a 60 V. HAp calcinada a 800 °C (Ti60VHAp800); HAp calcinada a 1100 °C (Ti60VHAp1100). Gráfico em destaque apresenta a média e o desvio padrão das amostras.

5.5.2 Comportamento eletroquímico dos revestimentos

Na Figura 49 são apresentadas as curvas do comportamento eletroquímico das amostras de TiCp, anodizada a 60 V e revestidas com HAp calcinadas a 800 °C e 1100 °C. Na Tabela 10 são apresentados os valores de potencial de circuito aberto (E_{ca}), potencial de corrosão (E_{corr}) e densidade de corrente de corrosão (I_{corr}) obtidos a partir das curvas de comportamento eletroquímico. Como descrito previamente (item 5.2.3) a amostra anodizada apresenta maior estabilidade termodinâmica (maior E_{ca}) que a TiCp. O mesmo pode ser observado para as amostras que foram revestidas com HAp, porém diferente do observado por outros autores (RATH et al., 2012), houve uma redução, quando comparada com a amostra anodizada, do potencial de

circuito aberto destas amostras. Entretanto, é possível perceber que ao longo do experimento, as amostras revestidas têm um deslocamento de potencial para valores mais nobres e ao término do ensaio, as amostras apresentaram praticamente o mesmo valor de E_{ca} .

Tabela 10: Parâmetros de corrosão do ensaio de polarização potenciodinâmica em SBF para as amostras de titânio puro, anodizado e anodizado revestido com hidroxiapatita.

Amostra	E_{ca} (mV) vs Ag/AgCl	E_{corr} (mV) vs Ag/AgCl	I_{corr} (μ A/cm ²)
TiCp	-520	-740	0,09
Ti60V	-18	-336	0,033
Ti60VHAp800	-116	-314	0,006
Ti60VHAp1100	-113	-245	0,012

Quando avaliado os valores de potencial de corrosão e densidade de corrosão obtidos a partir das curvas de polarização potenciodinâmica, percebe-se que as amostras revestidas apresentam maior resistência à corrosão. O efeito de barreira gerado pelo filme de HAp deslocou o E_{corr} para valores mais nobres, sendo o deslocamento de potencial para a amostra preparada com HAp calcinada a 1100 °C superior à preparada com HAp calcinada a 800 °C.

Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado para os valores de I_{corr} , pois a amostra que apresentou o menor valor de densidade de corrente foi a revestida com HAp calcinada a 800 °C. Esse comportamento pode ser justificado pela reação de redução catódica do oxigênio na superfície do TiO₂ (RAHMAN; SHABIB; HAIDER, 2016), abaixo do filme de HAp, e pela menor espessura do filme produzido com a HAp calcinada a 1100 °C. Contudo, este efeito não é um indicativo de menor resistência a corrosão, pois o filme anodizado de óxido de titânio também atua como barreira física na proteção ao substrato de Ti.

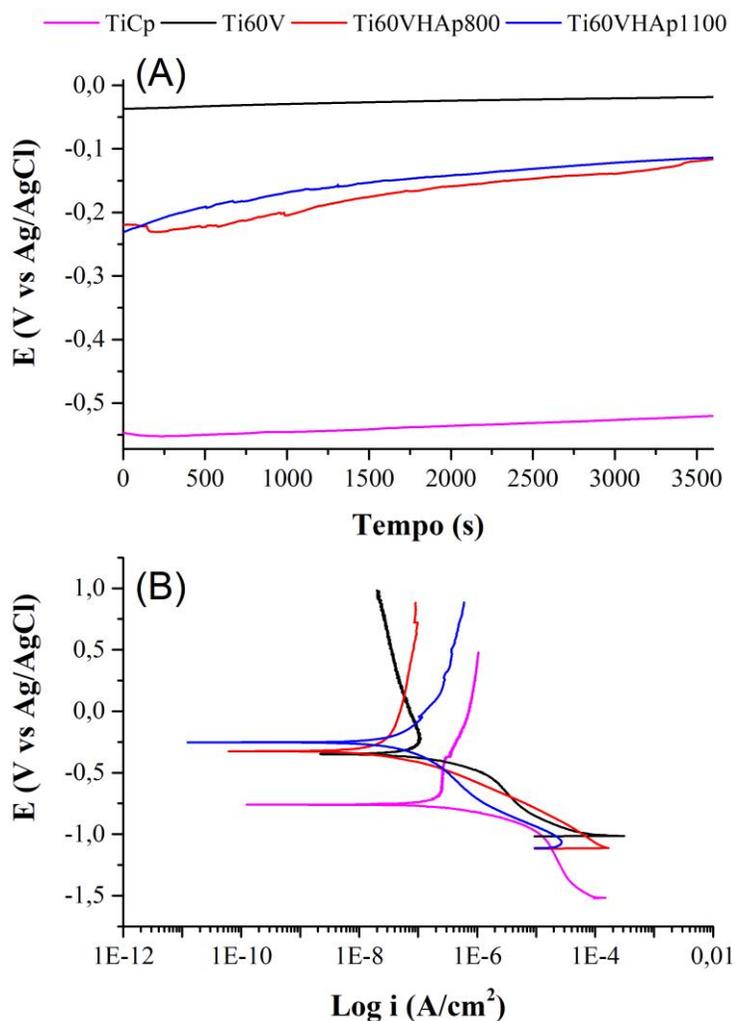


Figura 49: Avaliação do comportamento eletroquímico do amostras de titânio puro, anodizado a 60 V e anodizado revestido com hidroxiapatita. (A) Curvas de potencial de circuito aberto (E_{CA}); (B) Curvas de polarização potenciodinâmica.

5.5.3 Liberação de cálcio (Ca²⁺)

A liberação de Ca²⁺ é um importante fator para avaliar as características de estabilidade do revestimento em meio fisiológico. Estudos têm demonstrado que a estabilidade dos revestimentos de fosfatos de cálcio é dependente das diferentes fases presentes (ZHANG et al., 2017, 2005), sendo

que a maior estabilidade é da fase HAp, seguida da fase β -TCP e a menos estável é a fase α -TCP (CAI et al., 2011b, 2010). Além das fases presentes, a porcentagem de fase cristalina da HAp é fundamental para manter a maior estabilidade em meio fisiológico (CHEN; DING, 2006; NARAYANAN et al., 2008; SURMENEV, 2012). Contudo, é desejado que a HAp apresente uma taxa de liberação de cálcio em meio fisiológico, visto que a liberação de íons auxilia no processo de osteointegração e afeta quimicamente os tecidos ósseos, favorecendo o desenvolvimento dos osteoblastos, células-tronco hematopoiéticas e células endoteliais (NARAYANAN et al., 2008; ZHANG et al., 2017).

Na Figura 50 é apresentado os resultados para ensaio de liberação de cálcio (Ca^{2+}) em solução de TBS (Tris-buffered saline, 9% de NaCl e pH de 7,4). Como se pode observar, a concentração de cálcio liberado do revestimento na solução aumentou com tempo de imersão. A taxa de liberação nas primeiras 24 horas foi muito maior do que no resto do experimento. Durante este período houve uma liberação de 0,45 ppm/cm², valor que é aproximadamente 1/3 do valor total liberado durante o período de 672 h de testes. Após o período de 24 h, houve uma diminuição da taxa de liberação e após cerca de 375 h, a concentração de Ca^{2+} tendeu a ser saturada. No final do experimento, a concentração de Ca^{2+} foi de 1,59 ppm/cm². Este valor é inferior ao observado por Cai et al (CAI et al., 2011a, 2010) para recobrimento com fluorapatita, fase de apatita menos solúvel que a HAp, e mostra a elevada estabilidade do revestimento. Quando comparado com revestimentos por plasma spray, pode-se verificar que o valor ficou abaixo do apresentado na literatura por diversos autores (HUANG et al., 2009; MOHAMMADI; ZIAEI-MOAYYED; MESGAR, 2008; SUN et al., 2002; TONG et al., 1996; VAHABZADEH et al., 2015). A estabilidade do filme pode estar relacionada à alta cristalinidade do filme e à ausência de fases menos estáveis, como TCP e

TTCP (ROY; BANDYOPADHYAY; BOSE, 2011; VAHABZADEH et al., 2015), como mostrado pelas caracterizações por DRX e Raman.

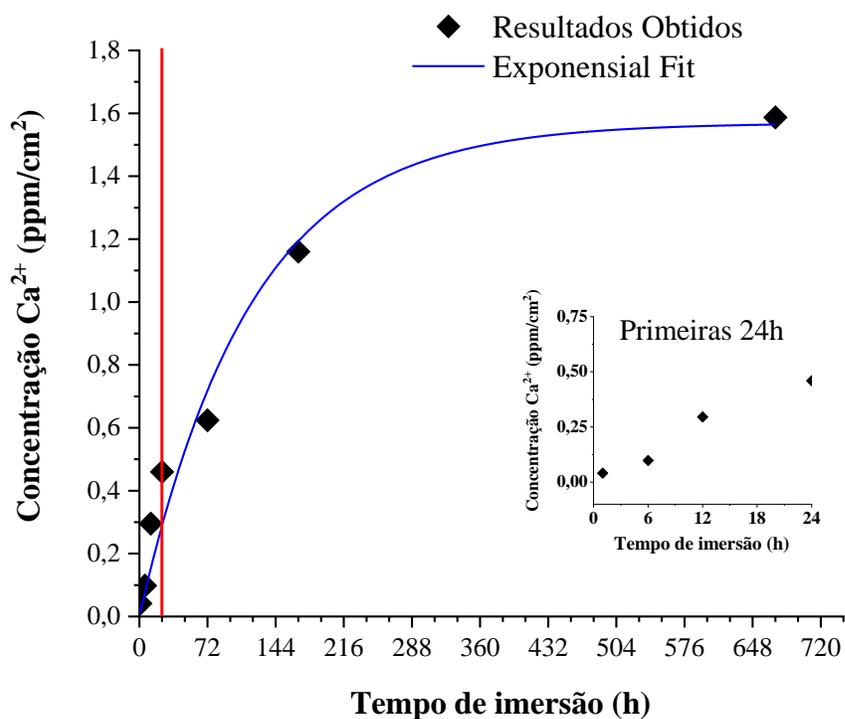


Figura 50: Comportamento em dissolução do revestimento de hidroxiapatita sobre o titânio anodizado a 60 V.

5.5.4 Avaliação em SBF

Na Figura 51 são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de Ti, Ti anodizado e Ti anodizado e recoberto com HAp após imersão em SBF a 37 °C por 3, 7 e 28 dias. Como pode ser observado, não há formação de camada de apatita em nenhuma das 3 amostras nos primeiros 3 dias de imersão em SBF. Após 7 dias de imersão, é possível perceber pequenos núcleos de camada de apatita na superfície da amostra revestida com HAp. Nas demais amostras, com o mesmo período de contato com o SBF, é possível distinguir alguns núcleos de cristais de cloreto

de sódio e também a presença de alguns resíduos de bactérias que se depositaram na superfície durante o ensaio.

Na Figura 52 é apresentada uma imagem com o detalhe da estrutura de apatita formada sobre a camada de HAp com 7 dias de exposição ao SBF. A análise de composição por EDS³ demonstra que o filme de apatita formado não apresenta a composição estequiométrica para a HAp ($\text{Ca/P} = 1,67$) no ponto denominado de "spectrum 7". Neste ponto o filme formado apresenta uma alta concentração de potássio (P), com a relação $\text{Ca/P} = 0,85$. Além de cálcio e fósforo, é possível perceber a presença de cloro e sódio nesta região. Este comportamento de formação de uma camada base de cloro e sódio também foi observado nas outras amostras. No ponto denominado de "spectrum 8", região com partículas de HAp bem definidas, é possível perceber que houve novamente deslocamento da relação estequiométrica, apresentando uma maior concentração de elementos fósforo na composição ($\text{Ca/P} = 1,01$).

Na Figura 53 é apresentada a amostra revestida com HAp e que esteve em contato com a solução de SBF por 28 dias. A imagem de MEV (Figura 53A) confirma o aumento da quantidade de filme de apatita formada pelo contato com SBF, demonstrando a característica de bioatividade deste tipo de material (KOKUBO et al., 2004; NISHIGUCHI et al., 2001; REN et al., 2018). É interessante observar que após 21 dias, a contar da mesma amostra com 7 dias, além do aumento da camada e de elementos de apatita formados, houve um deslocamento da relação Ca/P . Nos espectros de EDS (Figura 53 B e C) dos pontos denominados de "spectrum 2" ($\text{Ca/P} = 1,48$) e "spectrum 3" ($\text{Ca/P} = 1,52$) houve a formação de camadas mais próximas do valor estequiométrico da HAp. Esta variação da razão é característica deste tipo de ensaio (HASHMI; SHAH, 2014) e como explicado pelo modelo de Kokubo 2003

³ Os valores obtidos pela técnica de EDS são considerados semi-quantitativos e podem apresentar erros na ordem de 10% (<http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>)

(Figura 21), está relacionado à deposição de camadas de íons Ca^{2+} e PO_4^{2-} ao longo do processo de ensaio. A maior taxa de deposição e formação da camada com os valores de estequiometria estão relacionados com a composição da solução de SBF, que pode ser desenhada para acelerar o processo de formação da camada de apatita (BARRERE et al., 2002; HASHMI; SHAH, 2014; VARMA et al., 1999).

Em alguns relatos da literatura é apresentado que a superfície pura do Ti não é favorável à formação da camada de apatita (BARRERE et al., 2002; HELSEN; JÜRGEN BREME, 1998; REN et al., 2018; TENGVALL; LUNDSTRÖM, 1992). Contudo, nos estudos realizados com este tipo de amostra, foi possível observar a formação de alguns pontos de apatita sobre o Ti em 28 dias de SBF (Figura 54A). Os resultados de espectroscopia de EDS da amostra apontam para a formação de apatitas com relação Ca/P semelhante ao observado na amostra revestida com HAp. Essa formação de apatita pode estar relacionada à alta deposição de íons sódio e cloreto observados nas amostras de TiCp durante todo o período de ensaio.

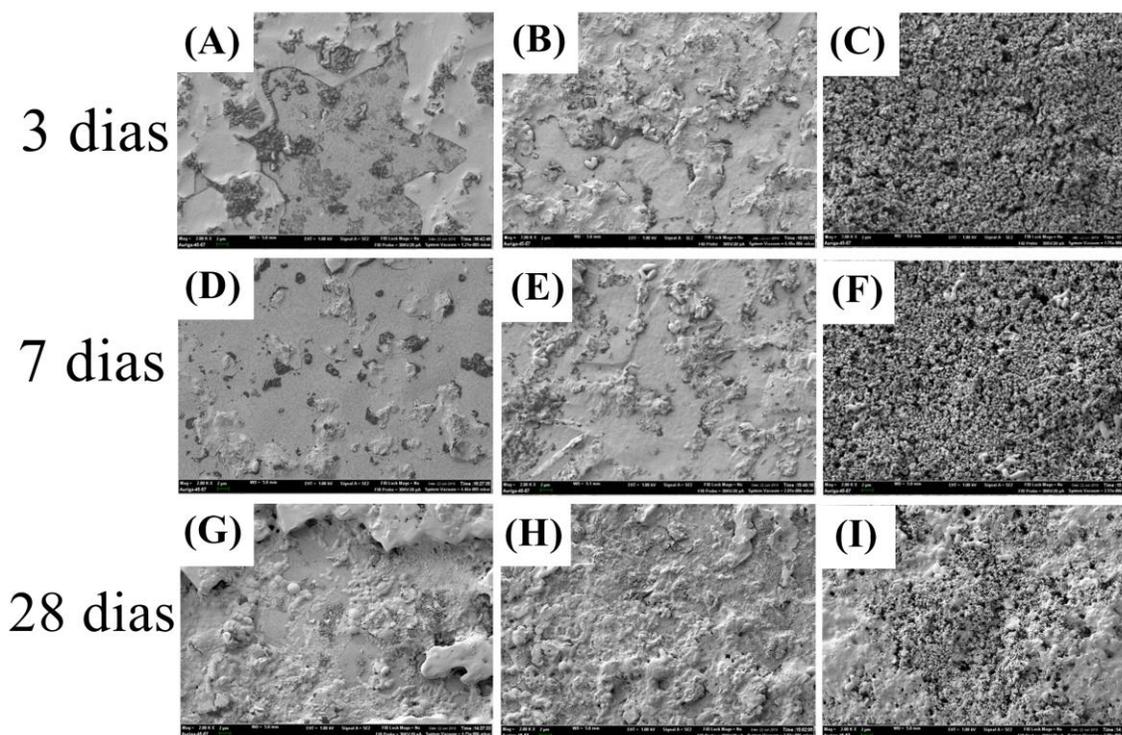


Figura 51: Imagens de microscopia eletrônica das diferentes amostras após contato com SBF: TiCp (A, D, G); Ti60V (B, E, H); Ti60VHAp (C, F, I). Imagens obtidas com aumento de 2000x.

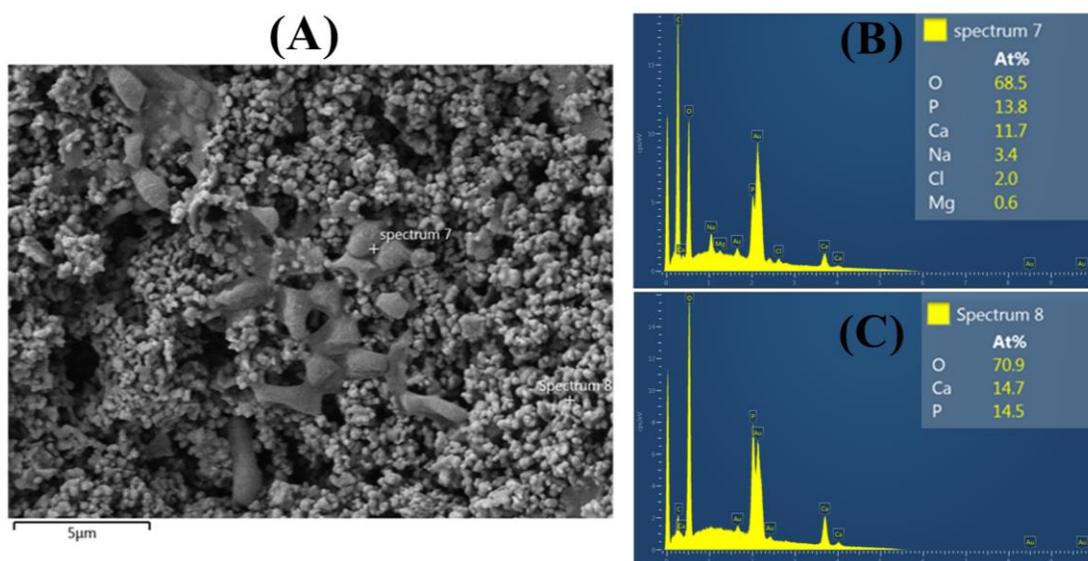


Figura 52: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (A) e composição química por EDS (B) e (C) da amostra revestida com HAp após 7 dias em contato com SBF.

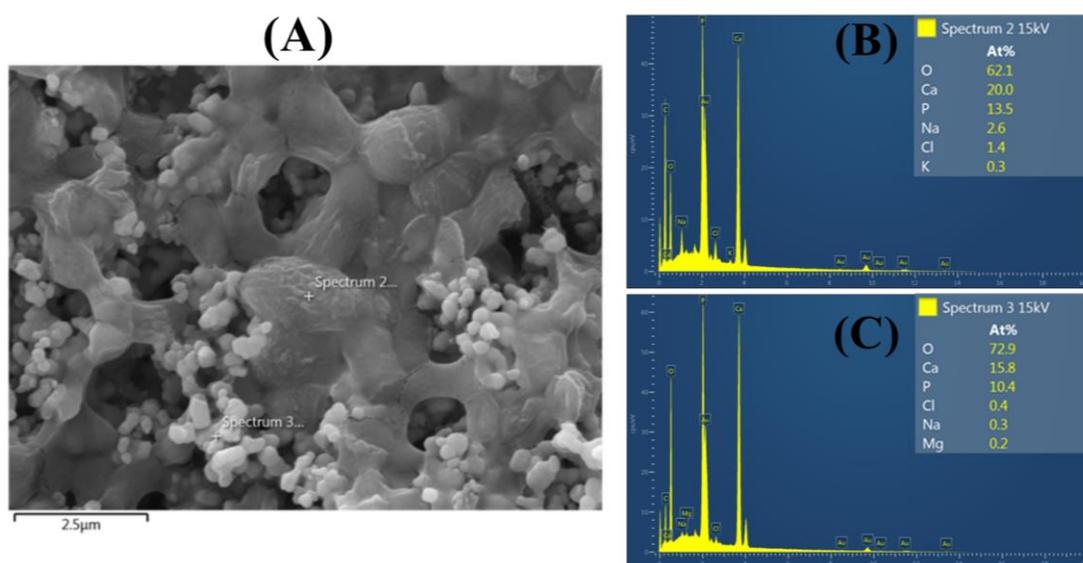


Figura 53: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (A) e composição química por EDS (B) e (C) da amostra revestida com HAp após 28 dias em contato com SBF.

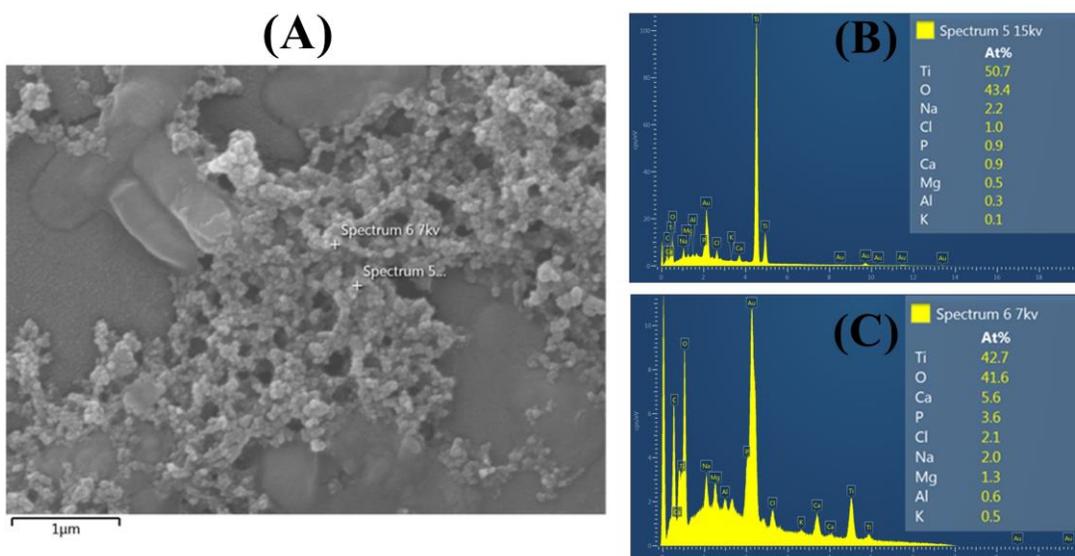


Figura 54: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (A) e composição química por EDS (B) e (C) da amostra de TiCp após 28 dias em contato com SBF.

5.5.5 Avaliação de citogenotoxicidade das amostras

Na Figura 55A é apresentado o gráfico para o teste de MTT do Ti puro (TiCp), Ti anodizado a 60 V (Ti60V) e Ti anodizado e revestido com HAp (Ti60VHAp). Como pode ser observado no gráfico, os valores de viabilidade celular ficaram todos muito semelhantes entre si, não havendo diferença significativa entre as amostras e o controle negativo ($F = 1,086$; $p = 0,3991$). A medida de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi realizada por meio da metodologia do teste DCFH-DA em comparação ao controle negativo (Figura 55B). Este tipo de ensaio avalia o desbalanço das reações redox intracelulares e desta forma, pode avaliar o efeito de danos oxidativos ocasionados a estruturas celulares (CIAPETTI et al., 2002; SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006; VALENTE et al., 2017). Como pode ser observado pelo gráfico, todas as amostras tiveram uma redução da produção de ERO nas 72 h de ensaio em relação ao controle negativo ($F = 15,23$; $p < 0,0001$).

Além do MTT e avaliação de produção de EROs, também foram realizados ensaios para avaliar a formação de nitrito (NO_2^-) e a presença de DNA dispersos no meio. Os valores de detecção de nitritos são apresentados na Figura 55C. Assim como observado para o ensaio de EROs, é possível perceber uma redução dos valores médios de detecção de NO_2^- para todas as amostras em relação aos valores do controle negativo ($F = 6,015$; $p < 0,0001$). Em relação a presença de DNA no meio (Figura 55D), não houve diferença das amostras de TiCp e Ti60V para o controle negativo. Contudo, é possível perceber uma redução significativa da amostra revestida com HAp em relação as demais amostras e ao controle ($F = 3,043$; $P = 0,0057$).

O ensaio de MTT demonstra que todos os materiais não afetaram o processo metabólico celular. Contudo, este tipo de ensaio não é considerado conclusivo sobre danos gerados as células. Segundo Mucalo (2015) o MTT é

considerado um teste para avaliação metabólica, sendo necessários outros testes para avaliação de resposta celular a presença de HAp (MUCALO, 2015).

Espécies reativas de oxigênio são as principais responsáveis por danos ao DNA, reagindo com bases de DNA, formando os sítios Apurínicos e Apirimidínicos (AP), além de quebras da cadeia de DNA (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006). Alguns autores também relatam a relação entre o estresse oxidativo, altas taxas de ERO, doenças cardíacas, acidentes vasculares e trombose (ESTERBAUER; WÄG; PUHL, 1993; VALENTE et al., 2017)..

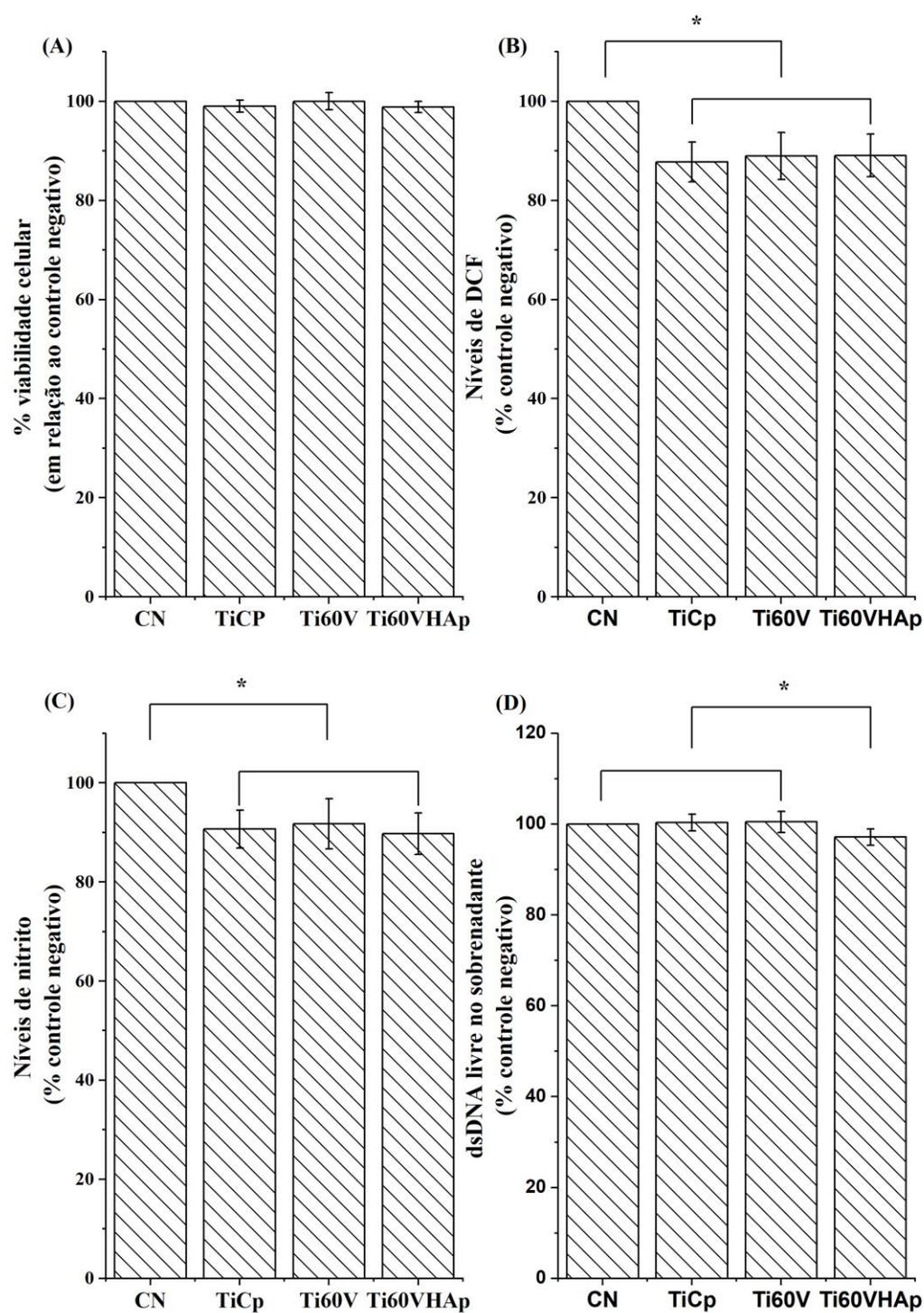


Figura 55: Comportamento in vitro dos diferentes materiais. Valores são apresentados como as médias \pm DP de três experimentos independentes. Citotoxicidade em 72 h de incubação via (A) técnica de MTT (B) DCFH-DA; (C) Óxido nítrico; (D) dsDNA.

6 CONCLUSÕES

A nova metodologia proposta demonstrou-se eficaz para o processo de revestimento de Ti comercialmente puro com HAp.

Como foi observado pelas técnicas de DRX e espectroscopia Raman, não houve a formação de segundas fases de fosfatos de cálcio, tais como β -TCP, TTCP e nem houve a degradação dos fosfatos em óxido de cálcio.

A avaliação da microestrutura do substrato de Ti demonstrou que apesar de existir alterações no tamanho de grãos após tratamento térmico, esses estão em acordo com o observado por outros autores. O mesmo foi observado para o comportamento mecânico do TiCp, pois os valores obtidos pré e pós tratamento térmico, apesar de estatisticamente diferentes, estão em acordo com a norma ASTM F67-13.

O teste de adesividade para as amostras anodizadas a 60 V e revestidas demonstrou que o filme formado apresenta boas propriedades de adesão, e que existe uma influência conforme as características de obtenção da HAp a diferentes temperaturas. Contudo, esse comportamento não pode ser considerado estatisticamente diferente. Os demais pré tratamentos de anodização não apresentaram valores adequados para a adesividade. Este comportamento pode ser justificado pela maior rugosidade das amostras que foram anodizadas a 60 V, confirmando a proposição que uma maior ancoragem mecânica favorece a adesividade do filme de HAp sobre o TiCp. Os resultados de estabilidade eletroquímica demonstraram que os revestimentos obtidos apresentam potencial de corrosão mais nobre que o TiCp e que funcionam como efeito de barreira para a proteção do substrato. A densidade de corrente de corrosão foi maior para o revestimento de HAp calcinada a 1100 °C, porém este valor pode estar relacionado a reações de redução catódica do oxigênio na superfície do TiO₂. A avaliação de liberação de íons cálcio em SBF demonstrou que o filme apresenta uma boa estabilidade, sendo superior a apresentada por diversos outros autores. Essa estabilidade é decorrência da

ausência de fases menos estáveis como TCP, TTCP e fosfatos amorfos na composição final do revestimento.

O comportamento dos revestimentos em meio celular demonstrou que a metodologia e os materiais propostos são biocompatíveis e garantem a segurança para a aplicação *in vivo*. Os testes de bioatividade em meio de SBF e liberação de íons Ca^{2+} demonstram que a morfologia e composição do filme de HAp é favorável à formação de apatita e isso é indício de alta integração deste tipo de produto com tecidos ósseos. O comportamento eletroquímico demonstrou que o produto também apresenta boas propriedades de resistência à corrosão, sendo seguros para o ambiente fisiológico.

O revestimento obtido apresentou propriedades em consonância ao observado por normas nacionais e internacionais e demonstrou-se biocompatível e bioativo. Todos os fatores técnicos adequados a um biomaterial implantável foram alcançados e isso com o uso de uma metodologia simples e de baixo custo, principalmente quando comparada à aspersão térmica a plasma, técnica atualmente empregada em produtos comerciais.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, H. et al. Structural characterization of bioceramics and mineralized tissues based on Raman and XRD techniques. **Ceramics International**, v. 44, n. 1, p. 495–504, 1 jan. 2018.

ALLEN, N. S. et al. The effect of crystalline phase (anatase, brookite and rutile) and size on the photocatalytic activity of calcined polymorphic titanium dioxide (TiO₂). **Polymer Degradation and Stability**, v. 150, p. 31–36, 1 abr. 2018.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E112-13**: standard test methods for determining average grain size. Philadelphia, 2014.

_____. **ASTM E407-07 (2015)e1**: standard practice for microetching metals and alloys. Philadelphia, 2015.

_____. **ASTM E8/E8M-16a**: standard test methods for tension testing of metallic materials. Philadelphia, 2016.

_____. **ASTM F67-13 (2017)**. standard specification for unalloyed titanium, for surgical implant applications. Philadelphia, 2017.

AOYAGI, M. et al. **Implants for bones, joints and tooth roots**. Google Patents, , 1979. Disponível em:
<<https://www.google.sc/patents/US4146936>>

APARICIO, C. et al. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 2, p. 263–273, 1 jan. 2003.

APREUTESEI, M. et al. Microstructural, thermal and mechanical behavior of co-sputtered binary Zr-Cu thin film metallic glasses. **Thin Solid Films**, v. 561, p. 53–59, 30 jun. 2014.

ASRI, R. I. M. et al. A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol-gel and electrochemical depositions on biocompatible metals. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 57, p. 95–108, abr. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 5832-2**: implantes para cirurgia – materiais metálicos. Parte 2: titânio puro. Rio de Janeiro, 2001.

AZOM. **The Influence of Particle Size, Zeta Potential and Rheology on Suspension Stability**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=10221>>.

BARRERE, F. et al. Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBF × 5 solution: Influence of magnesium. **Biomaterials**, v. 23, n. 10, p. 2211–2220, maio 2002.

BEN-NISSAN, B. et al. Adhesion of hydroxyapatite on titanium medical implants. **Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications**, p. 21–51, 1 jan. 2015.

BOK, W. M. et al. Surface characteristics and bioactivation of sandblasted and acid-etched (SLA) Ti-10Nb-10Ta alloy for dental implant. **International Journal of Precision Engineering and Manufacturing**, v. 16, n. 10, p. 2185–2192, 29 set. 2015.

CAI, Y. et al. Effect of fluorine incorporation on long-term stability of magnesium-containing hydroxyapatite coatings. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 7, p. 1633–1638, 2011a.

CAI, Y. et al. Interfacial study of magnesium-containing fluoridated hydroxyapatite coatings. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 15, p. 4629–4633, maio 2011b.

CAI, Y. L. et al. Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings: the effect of magnesium incorporation. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 5, n. 5, p. 054114, 2010.

CANILLAS, M. et al. Processing of hydroxyapatite obtained by combustion synthesis. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v. 56, n. 5, p. 237–242, 1 set. 2017.

CARTER, C. B.; NORTON, M. G. **Ceramic Materials Science and Engineering**. 2 nd ed. New York, NY: Springer New York, 2013.

CHEN, C.-C.; DING, S.-J. Effect of Heat Treatment on Characteristics of Plasma Sprayed Hydroxyapatite Coatings. **Materials Transactions**, v. 47, n. 3, p. 935–940, 2006.

CHEN, Z. et al. Improving the Tribological Properties of Spark-Anodized Titanium by Magnetron Sputtered Diamond-Like Carbon. **Coatings**, v. 8, n. 2, p. 83, 24 fev. 2018.

CHEVALIER, J. et al. On the kinetics and impact of tetragonal to monoclinic transformation in an alumina/zirconia composite for arthroplasty applications. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5279–5282, 1 out. 2009.

CIAPETTI, G. et al. In vitro testing of the potential for orthopedic bone cements to cause apoptosis of osteoblast-like cells. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 617–627, 1 jan. 2002.

CRIDLING, Q. et al. **Study of the influence of roughness on the gonioapparency of anodized titanium**. IS&T International Symposium on Electronic Imaging 2017 - Material Appearance 2017. **Anais...**29 jan. 2017Disponível em:
<<http://www.ingentaconnect.com/contentone/ist/ei/2017/00002017/00000008/art00014?crawler=true&mimetype=application/pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2018

CUI, X. et al. Preparation of bioactive titania films on titanium metal via anodic oxidation. **Dental Materials**, v. 25, n. 1, p. 80–86, jan. 2009.

CUSCO, R. et al. Differentiation between hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate by means of mu-raman spectroscopy. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 18, n. 9, p. 1301–1305, 1 jan. 1998.

DEMNATI, I. et al. Plasma-Sprayed apatite Coatings: Review of physical-chemical characteristics and their biological consequences. **Journal of Medical and Biological Engineering**, v. 34, n. 1, p. 1–7, 2014.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, 22 maio 1986.

DONG, H. **Surface engineering of light alloys Aluminium, magnesium and titanium alloys**. 1. ed. Cambridge: CRC Press, 2010.

ELSHAHAWY, W. Biocompatibility. In: SIKALIDIS, C. (Ed.). . **Advances in Ceramics - Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment**. Rijeka: InTech, 2011. p. 359–378.

ENDERLE, J. D.; BLANCHARD, S. M.; BRONZINO, J. D. **INTRODUCTION TO BIOMEDICAL ENGINEERING**. 2 nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

ESCADA, A. L. et al. Influence of Anodization Parameters in the TiO₂ Nanotubes Formation on Ti-7.5Mo Alloy Surface for Biomedical Application. **Materials Research**, v. 20, n. 5, p. 1282–1290, 24 jul. 2017.

ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**, v. 26, n. 4, p. 335–40, 2 abr. 2002.

VALENTE, D. et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**. v. 42, n. suppl 1, p. 2, 2017.

ETIEMBLE, A. et al. Innovative Zr-Cu-Ag thin film metallic glass deposited by magnetron PVD sputtering for antibacterial applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 707, p. 155–161, 15 jun. 2017.

FERNÁNDEZ, J.; GAONA, M.; GUILMANY, J. M. Effect of heat treatments on HVOF hydroxyapatite coatings. **Journal of Thermal Spray Technology**, v. 16, n. 2, p. 220–228, 2007.

FILHO, E. D. A. et al. Biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-CP modificada por aspersão térmica. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1229–1232, 2007.

FRANK, O. et al. Raman spectra of titanium dioxide (anatase, rutile) with identified oxygen isotopes (16, 17, 18). **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 42, p. 14567, 2012.

FRANKEL, G. S. Fundamentals of corrosion kinetics. In: HUGHES A., MOL J., ZHELUDKEVICH M., B. R. (Ed.). **Active Protective Coatings**. Dordrecht: Springer, Dordrecht, 2016. v. 233p. 17–32.

GARCIA, G. S. **Desenvolvimento de um Processo de Sinterização a Plasma do Alumínio Utilizando Gaiola Catódica**. 2016. 72f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia Programa de Pós Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Porto Alegre, 2016.

GEETHA, M.; DURGALAKSHMI, D.; ASOKAMANI, R. Biomedical implants: corrosion and its prevention - a review. **Recent Patents on Corrosion Science**, v. 2, p. 40–54, 2010.

GEMELLI, E.; SCARIOT, A.; CAMARGO, N. H. A. Thermal characterization of commercially pure titanium for dental applications. **Materials Research**, v. 10, n. 3, p. 241–246, set. 2007.

GOUVEIA, D. S. **Obtenção de Pós Nanométricos de Hidroxiapatita Sintetizados com Magnésio Utilizando Ultra-som**. 2008. 140f. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Autarquia Associada a Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

GSHALAEV, V. S.; DEMIRCHAN, A. C. **Hydroxyapatite: synthesis, properties, and applications**. 1. ed. New York, NY: Nova Science Publishers, 2012.

GUO, L.; HUANG, M.; ZHANG, X. Effects of sintering temperature on structure of hydroxyapatite studied with Rietveld method. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 9, p. 817–822, 2003.

GUO, X. et al. Effect of calcining temperature on particle size of hydroxyapatite synthesized by solid-state reaction at room temperature. **Advanced Powder Technology**, v. 24, n. 6, p. 1034–1038, 1 nov. 2013.

GUO, Y. et al. Relationship between the zeta potential and the chemical agglomeration efficiency of fine particles in flue gas during coal combustion. **Fuel**, v. 215, p. 756–765, 1 mar. 2018.

HARDING, I. S.; RASHID, N.; HING, K. A. Surface charge and the effect of excess calcium ions on the hydroxyapatite surface. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6818–6826, 1 dez. 2005.

HARUN, W. S. W. et al. A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials. **Ceramics International**, v. 44, n. 2, p. 1250–1268, 1 fev. 2018.

HASHMI, M. U.; SHAH, S. A. Dissolution behavior of bioactive glass ceramics with different CaO/MgO ratios in SBF-K9 and r-SBF. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 24, n. 4, p. 354–363, 1 ago. 2014.

HEIMANN, R.; WIRTH, R. Formation and transformation of amorphous calcium phosphates on titanium alloy surfaces during atmospheric plasma spraying and their subsequent in vitro performance. **Biomaterials**, v. 27, n. 6, p. 823–831, 1 fev. 2006.

HELMUS, M. N.; GIBBONS, D. F.; CEBON, D. Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 70–80, jan. 2008.

HELSEN, J. A.; JÜRGEN BREME, H. **Metals as Biomaterials**. 1. ed. Weinheim: Wiley, 1998.

HENCH, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487–1510, 1991.

HENCH, L. L.; WILSON, J. INTRODUCTION. In: HENCH, L. L. (Ed.). **An Introduction to Bioceramics**. 2. ed. London: Imperial College Press, 2013. p. 1–26.

HILARIO, F. et al. Influence of morphology and crystalline structure of TiO₂nanotubes on their electrochemical properties and apatite-forming ability. **Electrochimica Acta**, v. 245, p. 337–349, 10 ago. 2017.

HIN, T. S. **Engineering Materials for Biomedical Applications**. 1. ed. Singapore: WORLD SCIENTIFIC, 2004. v. 1.

HUANG, Y. et al. In vivo biological responses of plasma sprayed hydroxyapatite coatings with an electric polarized treatment in alkaline solution. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 8, p. 2411–2416, 15 out. 2009.

HUANG, Y. et al. Improving the bioactivity and corrosion resistance properties of electrodeposited hydroxyapatite coating by dual doping of bivalent strontium and manganese ion. **Surface and Coatings Technology**, v. 291, p. 205–215, abr. 2016.

HUNG, K.-Y. et al. Titanium surface modified by hydroxyapatite coating for dental implants. **Surface and Coatings Technology**, v. 231, p. 337–345, set. 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 13779-4:2002**. Implants for surgery -- Hydroxyapatite-- Part 4: Determination of coating adhesion strength. Genebra, 2002.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 5832-2:2018**. Implants for surgery -- Metallic materials -- Part 2: Unalloyed titanium. Genebra, 2018.

JACKSON, M. J.; AHMED, W. **Surface Engineered Surgical Tools and Medical Devices**. 1. ed. Boston, MA: Springer US, 2007.

JALOTA, S.; BHADURI, S. B.; TAS, A. C. In vitro testing of calcium phosphate (HA, TCP, and biphasic HA-TCP) whiskers. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 78, n. 3, p. 481–490, 1 set. 2006.

JEONG, Y. H. et al. Morphology of hydroxyapatite nanoparticles in coatings on nanotube-formed Ti-Nb-Zr alloys for dental implants. **Vacuum**, v. 107, p. 297–303, 2014.

KALIARAJ, G. S. et al. Bio-inspired YSZ coated titanium by EB-PVD for biomedical applications. **Surface and Coatings Technology**, v. 307, p. 227–235, 15 dez. 2016.

KHALID, M. et al. Dip Coating of Nano Hydroxyapatite on Titanium Alloy with Plasma Assisted γ -Alumina Buffer Layer: A Novel Coating Approach. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 29, n. 6, p. 557–564, 2013.

KOKUBO, T. et al. REVIEW Bioactive metals: preparation and properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 2, p. 99–107, fev. 2004.

KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2161–2175, 1 jun. 2003.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–15, 1 maio 2006.

KOSTOV-KYTIN, V. V. et al. Powder X-ray diffraction studies of hydroxyapatite and β -TCP mixtures processed by high energy dry milling. **Ceramics International**, v. 44, n. 7, p. 8664–8671, 1 maio 2018.

KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 4, p. 600–612, 15 dez. 2002.

KUHN, L. T. Biomaterials. In: ENDERLE, J. D.; BLANCHARD, S. M.; BRONZINO, J. D. (Eds.). **Introduction to Biomedical Engineering**. 2 nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 57.

KWEH, S. W. . W. K.; KHOR, K. . A.; CHEANG, P. An in vitro investigation of plasma sprayed hydroxyapatite (HA) coatings produced with flame-spheroidized feedstock. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 775–785, fev. 2002a.

KWEH, S. W. K. W. K.; KHOR, K. A. A.; CHEANG, P. High temperature in-situ XRD of plasma sprayed HA coatings. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 381–387, jan. 2002b.

LE GUÉHENNEC, L. et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, v. 23, n. 7, p. 844–854, 2007.

LEE, J.; LIOU, M.-L.; DUH, J.-G. The development of a Zr-Cu-Al-Ag-N thin film metallic glass coating in pursuit of improved mechanical, corrosion, and antimicrobial property for bio-medical application. **Surface and Coatings Technology**, v. 310, p. 214–222, 25 jan. 2017.

LEYENS, C.; PETERS, M. **Titanium and Titanium Alloys**. 1. ed. Weinheim: Wiley, 2003.

LIN, D. Y.; WANG, X. X. Preparation of hydroxyapatite coating on smooth implant surface by electrodeposition. **Ceramics International**, v. 37, n. 1, p. 403–406, 2011.

LIU, D.-M.; TROCZYNSKI, T.; TSENG, W. J. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. **Biomaterials**, v. 22, n. 13, p. 1721–1730, 1 jul. 2001.

LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 47, n. 3–4, p. 49–121, 2004.

LONG, M., R. H. Titanium alloys in total joint replacement: A materials science perspective. **Biomaterials**, v. 19, p. 1621–1639, 1998.

MAHYUDIN, F.; WIDHIYANTO, L.; HERMAWAN, H. Biomaterials in Orthopaedics. In: MAHYUDIN, F.; HERMAWAN, H. (Eds.). . **Biomaterials and Medical Devices. A Perspective from an Emerging Country**. Berlim: Springer, 2016. v. 58, p. 161–181.

MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética Humana**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MANJIAH, M.; LAUBSCHER, R. F. Effect of anodizing on surface integrity of Grade 4 titanium for biomedical applications. **Surface and Coatings Technology**, v. 310, p. 263–272, jan. 2017.

MATTOX, D. M. Introduction. In: MATTOX D. M., **Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing**. Amsterdã: Elsevier, 2010. p. 1–24.

MCENTIRE, B. J. et al. Ceramics and ceramic coatings in orthopaedics. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 35, n. 16, p. 4327–4369, 2015.

MOHAMMADI, Z.; ZIAEI-MOAYYED, A.; MESGAR, A. S. Analytically Modeling of In Vitro Calcium Dissolution of Plasma- Sprayed Hydroxyapatite Coatings. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences Summer**, v. 4, n. 3, p. 209–216, 2008.

MOHSENI, E.; ZALNEZHAD, E.; BUSHROA, A. R. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant: A review paper. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 48, p. 238–257, 2014.

MONTENERO, A. et al. Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrate. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 11, p. 2791–2797, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MUCALO, M. **Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications**. 1st. ed. Amsterdã: Elsevier, 2015.

NARAYANAN, R. et al. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 85B, n. 1, p. 279–299, abr. 2008.

NISHIGUCHI, S. et al. Titanium metals form direct bonding to bone after alkali and heat treatments. **Biomaterials**, v. 22, n. 18, p. 2525–2533, set. 2001.

OKADA, M.; MATSUMOTO, T. Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications. **Japanese Dental Science Review**, v. 51, n. 4, p. 85–95, 2015.

PARK, J. **Bioceramics Properties, Characterizations, and Applications**. New York, NY: Springer, 2008.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials: An Introduction**. 3rd. ed. New York, NY: Springer, 2007.

PAZOS, L.; CORENGIA, P.; SVOBODA, H. Effect of surface treatments on the fatigue life of titanium for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 3, n. 6, p. 416–424, ago. 2010.

PERSAUD-SHARMA, D.; MCGORON, A. Biodegradable Magnesium Alloys: A Review of Material Development and Applications. **Journal of biomimetics, biomaterials, and tissue engineering**, v. 12, p. 25–39, 3 fev. 2012.

PILLAI, R. S.; FRASNELLI, M.; SGLAVO, V. M. HA/ β -TCP plasma sprayed coatings on Ti substrate for biomedical applications. **Ceramics International**, v. 44, n. 2, p. 1328–1333, 1 fev. 2018.

PILLIAR, R. M. **Biomedical Materials**. 3 th ed. Boston, MA: Springer US, 2009.

POONDLA, N. et al. A study of the microstructure and hardness of two titanium alloys: Commercially pure and Ti–6Al–4V. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 486, n. 1–2, p. 162–167, nov. 2009.

QI, J. et al. Effect of deposition parameters and heat-treatment on the microstructure, mechanical and electrochemical properties of hydroxyapatite/titanium coating deposited on Ti6Al4V by RF-magnetron sputtering. **Materials Research Express**, v. 4, n. 9, p. 096409, 20 set. 2017.

RAHMAN, Z. UR; SHABIB, I.; HAIDER, W. Surface characterization and cytotoxicity analysis of plasma sprayed coatings on titanium alloys. **Materials Science and Engineering C**, v. 67, p. 675–683, 1 out. 2016.

RAMESH, S. et al. Rapid densification of nanocrystalline hydroxyapatite for biomedical applications. **Ceramics International**. v. 33, n. 7, p. 1363–1367, 2007.

RATH, P. C. et al. Titania/hydroxyapatite bi-layer coating on Ti metal by electrophoretic deposition: Characterization and corrosion studies. **Ceramics International**, v. 38, n. 4, p. 3209–3216, 1 maio 2012.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine**. 3rd ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2013.

REN, B. et al. Morphologically modified surface with hierarchical micro-/nano-structures for enhanced bioactivity of titanium implants. **Journal of Materials Science**, v. 53, n. 18, p. 12679–12691, 12 set. 2018.

ROACH, P. et al. Modern biomaterials: A review - Bulk properties and implications of surface modifications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1263–1277, 2007.

ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Induction plasma sprayed nano hydroxyapatite coatings on titanium for orthopaedic and dental implants. **Surface and Coatings Technology**, v. 205, n. 8–9, p. 2785–2792, 2011.

SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7591–7621, 1 ago. 2013.

SANTOS-COQUILLAT, A. et al. Bioactive multi-elemental PEO-coatings on titanium for dental implant applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, p. 738–752, 1 abr. 2019.

SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por fibras para o Uso na Área Médico-Odontológica**. 2002. 274f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Campinas, 2002.

SATHIYAVIMAL, S. et al. Biosynthesis and characterization of hydroxyapatite and its composite (hydroxyapatite-gelatin-chitosan-fibrin-bone ash) for bone tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 844–852, 15 maio 2019.

SCALERA, F. et al. Influence of the calcination temperature on morphological and mechanical properties of highly porous hydroxyapatite scaffolds. **Ceramics International**, v. 39, n. 5, p. 4839–4846, 1 jul. 2013.

SCHWEIKL, H.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G. Genetic and Cellular Toxicology of Dental Resin Monomers. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 10, p. 870–877, 2006.

SMITH, R.; REHMAN, I. Fourier transform Raman spectroscopic studies of human bone. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 5, n. 9–10, p. 775–778, 1994.

SOJITRA, P. et al. Characterization of L-605 Cobalt Alloy Cardiovascular Stent Surface Enhancement and Characterization of L-605 Cobalt Alloy Cardiovascular Stent by Novel Electrochemical Treatment. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 23, n. 2, p. 55–64, 2009.

SOSSA, P. A. F. et al. Comparative study between natural and synthetic Hydroxyapatite: structural, morphological and bioactivity properties. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 23, n. 4, 6 dez. 2018.

SROKA-BARTNICKA, A. et al. Structural transformation of synthetic hydroxyapatite under simulated in vivo conditions studied with ATR-FTIR spectroscopic imaging. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, p. 155–161, 15 jan. 2017.

SUN, L. et al. Surface characteristics and dissolution behavior of plasma-sprayed hydroxyapatite coating. **Journal of biomedical materials research**, v. 62, n. 2, p. 228–36, 2002.

SURMENEV, R. A. A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, n. 8–9, p. 2035–2056, jan. 2012.

TENGVALL, P.; LUNDSTRÖM, I. Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. **Clinical Materials**. v. 9, n. 2, p. 115–134, 1992.

TONG, W. et al. Effect of particle size on molten states of starting powder and degradation of the relevant plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. **Biomaterials**, v. 17, n. 15, p. 1507–1513, 1 jan. 1996.

TROMMER, R. M.; SANTOS, L. A.; BERGMANN, C. P. Alternative technique for hydroxyapatite coatings. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, n. 24, p. 9587–9593, 2007.

TUCKER JR., R. C. Thermal Spray Coatings. In: COTELL, C. M.; SPRAGUE, J. .; SMIDT JR., F. . (Eds.). . **ASM HandBook Volume 5 Surface Engineering**. 9. ed. Geauga County: ASM International, 1994. p. 497–509.

VAHABZADEH, S. et al. Phase stability and biological property evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings for orthopedic and dental applications. **Acta Biomaterialia**, v. 17, p. 47–55, 2015.

VALENTE, D. et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, n. suppl 1, p. 2, 2017.

VALENTE, M. C. **Síntese de Hidroxiapatita e sua Aplicação como Biomaterial**. 1999. 129f. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Autarquia Associada a Universidade de São Paulo. São Paulo, 1999.

VARMA, H. K. et al. Porous calcium phosphate coating over phosphorylated chitosan film by a biomimetic method. **Biomaterials**, v. 20, n. 9, p. 879–884, 1999.

VECHIETTI, F. A. et al. Influence of cobalt chromium alloy surface modification on the roughness and wettability behavior of pine oil / hydroxyapatite as coating. **Materials Research Express**. v. 6, n. 2, p. 25401, 2019.

VOLKMER, T. M. **Obtenção e Caracterização de α -Fosfato Tricálcio por Síntese de Combustão e Aplicação em Cimentos Ósseos e Arcabouços de Criogéis**. 2011. 206f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Porto Alegre, 2011.

WANG, P. E.; CHAKI, T. K. Sintering behaviour and mechanical properties of hydroxyapatite and dicalcium phosphate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 4, n. 2, p. 150–158, mar. 1993.

WEN, H. B. et al. Fast precipitation of calcium phosphate layers on titanium induced by simple chemical treatments. **Biomaterials**, v. 18, n. 22, p. 1471–1478, 1 jan. 1997.

WENNERBERG, A. et al. A histomorphometric study of screw-shaped and removal torque titanium implants with three different surface topographies. **Clinical Oral Implants Research**, v. 6, n. 1, p. 24–30, 1 mar. 1995.

WILMS, L. C. et al. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 582, n. 1-2, p. 155-162, 2005.

WU, L. et al. Effect of anodization time on morphology and electrochemical impedance of anodic oxide films on titanium alloy in tartrate solution. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 9, p. 5012-5024, 2014.

YANG, Y.; KIM, K.; ONG, J. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process?an alternative to plasma spraying. **Biomaterials**, v. 26, n. 3, p. 327-337, 2005.

YE, H.; LIU, X. Y.; HONG, H. Characterization of sintered titanium/hydroxyapatite biocomposite using FTIR spectroscopy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 4, p. 843-850, 26 abr. 2009.

YEROKHIN, A.; KHAN, R. H. U. Anodising of light alloys. In: DONG, H. (Ed.). **Surface Engineering of Light Alloys Aluminium, Magnesium and Titanium Alloys**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2010. p. 83-109.

ZHANG, H.; DARVELL, B. W. Morphology and structural characteristics of hydroxyapatite whiskers: Effect of the initial Ca concentration, Ca/P ratio and pH. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2960-2968, 1 jul. 2011.

ZHANG, J. X.; GUAN, R. F.; ZHANG, X. P. Synthesis and characterization of sol-gel hydroxyapatite coatings deposited on porous NiTi alloys. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 509, n. 13, p. 4643-4648, 31 mar. 2011.

ZHANG, Q. et al. A microstructural study of the degradation and calcium release from hydroxyapatite-calcium oxide ceramics made by infiltration. **Materials Science and Engineering C**, v. 73, p. 684-691, 2017.

ZHANG, Z. et al. Osteoinduction with HA/TCP Ceramics of Different Composition and Porous Structure in Rabbits. **Oral Science International**, v. 2, n. 2, p. 85-95, 1 nov. 2005.

ZHAO, H. et al. Electrochemical Polishing of 316L Stainless Steel Slotted Tube Coronary Stents: An Investigation of Material Removal and Surface Roughness. **Progress in Biomedical Research**, v. 8, n. 2, p. 70-81, 2003.