UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LUARA ALINE PIRES

**Avaliação estrutural, morfológica e mecânica de cerâmica densa de
hidroxiapatita bovina reforçada com nanotubos de TiO_2 e
nanopartículas de ZnO e TiO_2**

BAURU
2019

LUARA ALINE PIRES

**Avaliação estrutural, morfológica e mecânica de cerâmica densa de
hidroxiapatita bovina reforçada com nanotubos de TiO_2 e
nanopartículas de ZnO e TiO_2**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de **Doutora** em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Flávia Sanches Borges

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan

BAURU

2019

Pires, Luara Aline

Avaliação estrutural, morfológica e mecânica de cerâmica densa de hidroxiapatita bovina reforçada com nanotubos de TiO_2 e nanopartículas de ZnO e TiO_2 / Luara Aline Pires. – Bauru, 2019.

102p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Ana Flávia Sanches Borges

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo apoio, motivação, amor incondicional e por serem meus maiores exemplos de honestidade e caráter.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Professora Dra. **Ana Flávia Sanches Borges**

Primeiramente agradeço sua orientação como professora ao longo destes anos e a confiança que sempre depositou em mim. Por todo tempo que passamos juntas, pelo apoio e incentivo de mudança para São Carlos para expandir meus conhecimentos em áreas diferentes. Mesmo com a distância, as conversas, a amizade e o respeito que construímos permaneceram. Minha admiração por você cresceu ainda mais até aqui. Por ter sido compreensiva e me dar apoio inimaginável nos momentos difíceis que precisei. Muitas vezes com afeto maternal. Principalmente pelo exemplo de ser em essência um bom ser humano antes de ser uma excelente profissional. A sua humanidade, empatia e generosidade com certeza te fazem uma pessoa diferenciada nesse mundo acadêmico. Analisando toda minha trajetória nesses anos, sem dúvidas, eu não poderia ter ganhado presente melhor do que tê-la como orientadora de trabalho e de vida. Você também é responsável pelas minhas conquistas. Continue sendo luz e que a vida te retribua todas essas boas energias que transmite. Muito obrigada!

Ao meu coorientador Professor Dr. **Carlos Alberto Fortulan**

Pelos bons anos de parceria e convívio que tivemos. Agradeço por toda paciência de ter ensinado uma cirurgiã dentista tantas complexidades da engenharia. É imensurável o que aprendi e o quanto tudo foi proveitoso. Sair da zona de conforto da odontologia me fez expandir a visão do que é uma pesquisa e valorizar essa interação entre cursos. Agradeço por toda compreensão e apoio que teve por mim nos momentos que precisei. Pelos momentos de descontração. Por me tranquilizar até quando quebrei a ponta do dispositivo às vésperas de enviar um resumo precisando dos dados por fazer. Por não ter dia nem hora para ajudar quando precisei no laboratório. Sua tranquilidade, a maneira ver e levar a vida tornaram esse tempo um aprendizado que foi além do estudo e levarei como exemplo para vida toda. Tem toda minha admiração e carinho. Muito obrigada professor!

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela minha vida e por me dar forças diariamente para buscar ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais **José** e **Maria Sueli**, por tudo que fizeram e fazem por mim. Por acreditarem nos meus sonhos e ajudarem a torná-los realidade. Pelos conselhos e palavras de conforto em todos os momentos que precisei. Sem vocês esse momento não teria sido possível. Muito obrigada! Amo muito vocês!

À minha irmã **Luana** por ser quem sempre me apoia em toda decisão e escolhas. Por ser exemplo de amor e respeito. Minha parceira da vida. Muito obrigada! Te amo!

Ao meu cunhado **Mário** por todo apoio e conselhos.

Aos meus queridos **avós**, **tios** e **primos** pelo incentivo e apoio.

Às que se tornaram amigas ao longo dos anos de convivência em Bauru. **Ana Paula**, **Tamires** e **Lorena** agradeço cada conversa, companhia, conselho e ajuda que recebi de cada uma. Foi imprescindível! Muito obrigada!

Aos companheiros de pesquisa em São Carlos **Brunna**, **Lucas** e **Victor** pela parceria, preocupações e soluções conjuntas, boas conversas e bons momentos de descontração durante o tempo que passamos juntos. Vocês foram fundamentais e sempre serão bem-vindo em casa! Obrigada!

Aos colegas de turma e demais alunos do departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos da FOB. Obrigada pela convivência e bons momentos. Desejo que todos tenham muito sucesso.

Aos colegas do laboratório de Tribologia do Departamento de Engenharia Mecânica da EESC / USP.

Ao colega **Rogério Erbereli** pela doação dos ossos bovinos advindos do seu projeto, bem como por todo apoio e suporte durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Dr. **Paulo Noronha Lisboa Filho**, do Departamento de Física da Faculdade de Ciências de Bauru / UNESP pela parceria, confiança na realização do trabalho e pelos auxílios todas as vezes que precisamos. Obrigada pela orientação nos experimentos, por ter sido sempre acessível e disposto a nos ajudar. Minha admiração e eterna gratidão. Muito obrigada!

Aos alunos do laboratório do Departamento de Física da UNESP por toda atenção e ajuda na realização dos testes.

Aos professores do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos da FOB. Em especial aos professores **Rafael Mondelli**, **Sérgio Ishikirama**, **Linda Wang**, **Maria Teresa Atta**, **Juliana Bombonatti**, **Adilson Furuse**, **Diana Soares**, **José Mondelli** e **Maria Fidela Navarro**, **Paulo Francisconi** e **César Antunes de Freitas** meus sinceros agradecimentos por todos os ensinamentos passados, pelos bons exemplos e por toda dedicação.

Aos funcionários da FOB, em especial **Alcides**, **Elízio**, **Audria**, **Charlene**, **Rita**, **Natália**, **Nelson** e **Zuleica** por toda dedicação, ajuda e apoio aos alunos.

Aos queridos **pacientes** da FOB que contribuíram para o aumento de conhecimentos durante essa etapa. Obrigada!

Ao amigo professor **Marcos Jacobovitz** e à **UNICEP / São Carlos** meus sinceros agradecimentos por tornarem possível a realização do sonho de me tornar docente. Por toda confiança e oportunidades de crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, **CNPq** pela bolsa concedida. Processo nº **154705/2015-2**.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para execução deste trabalho, minha eterna gratidão!

*“A conquista é um acaso que talvez dependa mais das
falhas dos vencidos do que do gênio do vencedor.”*

Anne Louise Germaine de Staël

RESUMO

A Hidroxiapatita (HA) é um material biocompatível, osteocondutor e bioativo, apresentando excelentes propriedades osteogênicas que a credencia como substitutos de tecidos ósseos, porém apresenta baixas propriedades mecânicas, comparadas ao osso natural e dente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂) e nanotubos de TiO₂ em diferentes concentrações (1, 2 e 5%) na microestrutura e na resistência à flexão de uma cerâmica densa de hidroxiapatita bovina. Discos ($\varnothing = 12,5$ mm; espessura = 1,3 mm) foram preparados e submetidos à difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (MEV / FEG), resistência à flexão biaxial (BFS) e dureza Vickers (VH). Os dados BFS e VH foram submetidos a ANOVA e pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) e análise de Weibull. DRX mostrou que a adição dos nanomateriais causou a formação de fases secundárias quando adicionadas 5% das nanopartículas de ZnO, ou em todas as porcentagens de nanopartículas de TiO₂ / nanotubos, com a manutenção dos planos cristalográficos de HA. Os maiores valores de BFS foram mostrados para HA pura e com a adição de 5% de nanopartículas de TiO₂, sem diferença entre eles, mas foram diferentes para os outros grupos ($p = 0,067$). A análise de Weibull mostrou que houve diminuição da resistência característica (σ_0) em todos os grupos com reforços, exceto com 5% de nanopartículas de TiO₂, que se apresentou próximo à HA pura. O módulo de Weibull (m) aumentou nos grupos com nanotubos de TiO₂ à 5% e com nanopartículas de TiO₂ à 2%, diminuiu com 1 e 2% de nanotubos de TiO₂, enquanto não houve alterações nos grupos com 2 e 5% de nanopartículas de TiO₂ e todos os grupos contendo nanopartículas de ZnO. Os resultados de VH demonstraram que a adição de 1% e 2% de nanopartículas de TiO₂ apresentaram os maiores valores dentre todos os grupos e foram semelhantes entre si ($p = 0,102$), seguidos de 2 e 5% de nanopartículas de TiO₂ e 5% de nanopartículas de ZnO, os quais obtiveram valores mais elevados que a HA pura. Este estudo concluiu que a mistura de HA com 5% de nanopartículas de TiO₂ é a mais promissora para o reforço da cerâmica densa de HA bovina.

Palavras-chave: Hidroxiapatita. Cerâmica. Nanomateriais. Nanotubos. Nanopartículas.

ABSTRACT

Structural, morphological and mechanical evaluation of dense hydroxyapatite bovine ceramic reinforced with TiO₂ nanotubes and ZnO / TiO₂ nanoparticles

Hydroxyapatite (HA) is a biocompatible, osteoconductive and bioactive material. Albeit, it presents low mechanical properties, compared to natural bone and tooth. This study aimed to evaluate the influence of the addition of zinc oxide (ZnO) and titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles and TiO₂ nanotubes in different concentrations (1, 2 and 5%) in the microstructure and in the flexural strength of a bovine hydroxyapatite dense ceramic. Disks ($\varnothing$ = 12.5 mm, thickness = 1.3 mm) were prepared and submitted to X-ray diffraction, field emission scanning electron microscopy (FE / SEM), biaxial flexural strength (BFS) and hardness Vickers (VH). The BFS and VH data were submitted to ANOVA and Tukey's post-hoc test (α = 0.05) and Weibull's analysis. XDR showed that the addition of the nanomaterials caused the formation of secondary phases when 5% of ZnO nanoparticles, or in all percentages of TiO₂ nanoparticles / nanotubes, with the maintenance of crystallographic HA planes. The highest BFS values were shown for pure HA and with 5% TiO₂ nanoparticles, with no difference between them, but were different for the other groups (p = 0.067). Weibull's analysis showed that there was a decrease in the characteristic resistance (σ_0) in all groups with reinforcements, except with 5% of TiO₂ nanoparticles, which was similar to the pure HA. Weibull (m) modulus increased in the groups with 5% TiO₂ nanotubes and 2% TiO₂ nanoparticles, decreased with 1 and 2% TiO₂ nanotubes, whereas there were no changes in the groups with 2 and 5% nanoparticles of TiO₂ and all groups containing ZnO nanoparticles. The VH results showed that the addition of 1 and 2% of TiO₂ nanoparticles had the highest values among all groups and were similar to each other (p = 0.102), followed by 2 and 5% TiO₂ nanoparticles and 5% of ZnO nanoparticles, which obtained higher values than pure HA. This study concluded that the mixture of HA with 5% TiO₂ nanoparticles is the most promising for the reinforcement of dense bovine HA ceramics.

Keywords: Hydroxyapatite. Ceramics. Nanostructures. Nanotubes. Nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita	29
Figura 2.2 - Padrões de DRX da hidroxiapatita	30
Figura 2.3 - Aplicações da HA em diferentes áreas do corpo	31
Figura 2.4 - Escala nanométrica.....	32
Figura 2.5 - Estruturas cristalinas do TiO_2 : anatase, rutilo e brookita.....	33
Figura 2.6 - Etapas de formação dos nanotubos TiO_2 por meio do método hidrotermal	35
Figura 2.7 - Representação das estruturas cristalinas do ZnO nas formas hexagonal da wurtzita, cúbica da blenda de zinco e cúbica da sal-gema	36
Figura 2.8 - Processos envolvendo trincas na presença de reforços microestruturais: <i>crack bridging</i> , <i>crack deflection</i> e <i>crack bridging sliding</i>	38
Figura 4.1 - Diagrama de fluxo do processo de síntese alcalina para obtenção dos nanotubos de TiO_2	46
Figura 4.2 - Fluxograma do processo de síntese das nanopartículas de TiO_2 ...	47
Figura 4.3 - Fluxograma do processo de síntese das nanopartículas de ZnO ...	47
Figura 4.4 - Evaporação do líquido durante a síntese de nanopartículas de TiO_2 (A) e ZnO (B).....	49
Figura 4.5 - Fluxograma do processamento termo-químico para retirada da matéria orgânica do tecido ósseo	50
Figura 4.6 - Processamento do osso após calcinação	51
Figura 4.7 - Diagrama de fluxo da metodologia.....	52

Figura 4.8 - Moagem realizada no jarro maior em moinho giratório (A) e moinho vibratório (B).....	53
Figura 4.9 - Mistura contendo nanomateriais no jarro menor em moinho vibratório	54
Figura 4.10 - Secagem com jato de ar quente para obtenção do pó.....	54
Figura 4.11 - Pesagem do pó (A), inserção na matriz metálica (B e C) e prensagem uniaxial de 2T por 30 segundos (D)	55
Figura 4.12 - Discos preparados em luvas à vácuo (A) para inserção na prensa isostática (B)	55
Figura 4.13 - Posicionamento dos discos (A) para sinterização à 1300 °C no forno (B)	56
Figura 4.14 - Aspectos dos discos após a sinterização.....	56
Figura 4.15 - Equipamento EDX-720 para análise de composição química.....	57
Figura 4.16 - Máquina de ensaio da resistência à flexão biaxial (A) com suporte adaptado (B) e disco em posição para realização do teste. Esquema do posicionamento do disco no suporte (D).....	58
Figura 4.17 - Durômetro (A) e endentação realizada na amostra (B).....	59
Figura 5.1 - Padrões de DRX dos grupos com 1, 2 e 5% de nanotubos de TiO ₂ comparados à HA pura	63
Figura 5.2 - Padrões de DRX dos grupos com 1, 2 e 5% de nanopartículas de TiO ₂ comparados à HA pura	64
Figura 5.3 - Padrões de DRX dos grupos com 1, 2 e 5% de nanopartículas de ZnO comparados à HA pura	64
Figura 5.4 - Imagens da superfície das amostras sinterizadas a 1300°C sequenciadas de acordo com as porcentagens dos grupos em 1, 2 e 5%. Sendo: A) HA pura; B, E e H) 1, 2 e 5% de nanotubos de TiO ₂ respectivamente; C, F e I) 1, 2 e 5% de nanopartículas de TiO ₂ respectivamente; D, G e J) 1, 2 e 5% de nanopartículas de ZnO respectivamente.....	66

Figura 5.5 - Espectro de EDX para amostra de HA pura.....	67
---	----

- GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Média e desvio padrão dos valores de resistência à flexão biaxial.....	68
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Classificação das cerâmicas quanto à resposta biológica da interação com o tecido receptor	28
Tabela 4.1 - Identificação dos grupos experimentais de acordo com as estruturas de reforço utilizada.	45
Tabela 4.2 - Materiais utilizados para moagem e confecção dos discos.....	51
Tabela 5.1 - Elementos químicos encontrados nos grupos por meio do EDX. ...	68
Tabela 5.2 - Valores de dureza Vickers (HV).	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
DRX	Difratometria de Raios X
ED	Etileno Diamina
EDX	Espectroscopia por espalhamento de energia dispersiva de raios-X
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
ER	Estrutura de reforço
HA	Hidroxiapatita
HA/TiO ₂ nt1%	Hidroxiapatita reforçada com nanotubos de TiO ₂ à 1%
HA/TiO ₂ nt2%	Hidroxiapatita reforçada com nanotubos de TiO ₂ à 2%
HA/TiO ₂ nt5%	Hidroxiapatita reforçada com nanotubos de TiO ₂ à 5%
HA/TiO ₂ np1%	Hidroxiapatita reforçada com nanopartículas de TiO ₂ à 1%
HA/TiO ₂ np2%	Hidroxiapatita reforçada com nanopartículas de TiO ₂ à 2%
HA/TiO ₂ np5%	Hidroxiapatita reforçada com nanopartículas de TiO ₂ à 5%
HA/ZnOnp1%	Hidroxiapatita reforçada com nanopartículas de ZnO à 1%
HA/ZnOnp2%	Hidroxiapatita reforçada com nanopartículas de ZnO à 2%
HA/ZnOnp5%	Hidroxiapatita reforçada com nanopartículas de ZnO à 5%
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV / FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
np	Nanopartículas
nt	Nanotubos
PABA	Ácido Para-Aminobenzóico
PVB	Polivinil Butiral
pH	Potencial Hidrogeniônico
SISBOV	Sistema Brasileiro de Rastreabilidade Bovina e Bubalina
TCP	Tricálcio Fosfato
UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato de cálcio
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
GPa	Giga Pascal
HNO_3	Ácido nítrico
μm	Micrometro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MPa	Mega Pascal
NaOH	Hidróxido de sódio
T	Tonelada
TiO_2	Dióxido de titânio
ZnO	Óxido de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	SUSTENTABILIDADE E OSSOS BOVINOS	25
2.2	BIOCERÂMICAS	27
2.2.1	Hidroxiapatita.....	28
2.3	NANOMATERIAIS	32
2.3.1	Nanotubos e nanopartículas de TiO ₂	33
2.3.2	Nanopartículas de ZnO	36
2.3.3	Reforços estruturais em cerâmica de HÁ	37
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	CONFEÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS	45
4.1.1	Síntese dos nanomateriais	45
4.1.1.1	Nanotubos de TiO ₂	45
4.1.1.2	Nanopartículas de TiO ₂	46
4.1.1.3	Nanopartículas de ZnO	47
4.1.2	Cerâmica de hidroxiapatita pura e reforçada.....	49
4.2	CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL, ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA.....	57
4.2.1	Difratometria de Raios X (DRX).....	57
4.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	57
4.2.3	Energia dispersiva de raios-X (EDX)	57
4.3	TESTES MECÂNICOS	58
4.3.1	Resistência à flexão biaxial	58
4.3.2	Dureza	59
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59

5	RESULTADOS.....	63
5.1	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA.....	63
5.1.1	DRX.....	63
5.1.2	MEV.....	65
5.1.3	EDX.....	67
5.2	TESTES MECÂNICOS.....	68
5.2.1	Resistência à flexão biaxial	68
5.2.1.1	Análise de Weibull.....	69
5.2.2	Dureza.....	71
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os grandes exportadores mundiais de carne bovina, mas os resíduos gerados de abates animais e sua destinação são dependentes das condições locais, mercado e logística operacional (PACHECO, YAMANAKA, 2006). Existem cidades onde há abatedouros sem infraestruturas adequadas e os resíduos sólidos são destinados a lixões e aterros sanitários e descartados sem qualquer tipo de controle, misturando-se ao lixo comum. Como consequência, os problemas ambientais e de saúde pública são agravados (MATTAR, FRADE-JÚNIOR, OLIVEIRA, 2014). O procedimento mais adequado para preservar a qualidade ambiental é a reciclagem de subprodutos sólidos, ou seja, a transformação de restos animais em matéria prima para outros produtos (SZABO-JÚNIOR, 2010; JABBOUR, JABBOUR, 2013; ARAÚJO, COSTA, 2014).

Os ossos bovinos são fontes de hidroxiapatita (HA), que é um biomaterial amplamente aceito e utilizado clinicamente para tratamentos e restaurações esqueléticas e dentárias por ser o componente majoritário de ossos e dentes humanos (EANES, 1980; OGUCHI et al., 1995). Por isso, o aproveitamento do osso bovino, quando devidamente controlado, seja na alimentação, patologias, vacinação, pode ser fonte renovável de HA para sua utilização como matéria prima. Dentre as vantagens haveria a imensa redução do alto custo da HA sintética e o fornecimento de um material seguro a partir de uma fonte biológica controlada, desenvolvendo-se um produto sustentável.

HA devido à sua propriedade osteogênica é conhecida por se unir química e diretamente ao osso, quando implantada (BAGAMBISA et al., 1993). Sua fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e estrutura cristalina lhe conferem uma de suas propriedades mais importantes, que é a facilidade de substituições catiônicas e aniônicas, possibilitando seu uso na área médica como material biocompatível em implantes e próteses (KAWACHI et al., 2000; RODRIGUES et al., 2003). Na área Odontológica, a HA é utilizada para evitar perda óssea após extração de um ou vários elementos dentários, como também, recuperação de áreas com reabsorção ósseas. No entanto, apresenta limitações de uso relacionadas à sua fragilidade e baixa resistência mecânica, como a tenacidade à fratura, não sendo indicadas em casos

que exigem alto carregamento de forças (BOUSLAMA, AYED, BOUAZIZ, 2010; RAMESH et al., 2012; SEBDANI, FATHI, 2012).

Visando a obtenção de cerâmica densa de HA de origem bovina, para futura utilização em implantes ósseos, Meira et al. (2014) processou a HA e obteve resultados mecânicos satisfatórios por meio da prensagem isostática, seguida de usinagem à verde, ou seja, sem pré-sinterização e em seguida, a fabricação de peças porosas por manufatura aditiva. A viabilidade e proliferação de células pré-odontoblasticas, em contato com este material produzido, também se apresentou similar ao titânio e à zircônia, materiais atualmente utilizados para implantes dentários (PIRES et al., 2015). Com adição de reforços (wiskers de alumina), a dureza foi superior à cerâmica densa pura de HA, apesar da tenacidade à fratura apresentar resultados superiores, apresentou valores aquém do matematicamente esperado baseado na ponderação das fases nas misturas, ou seja, a adição de reforços seria um dos caminhos a seguir em busca do aumento desta propriedade. Porém, aspectos morfológicos, de superfície e dimensionais além das propriedades físicas, precisam ser considerados (MEIRA et al., 2014).

A adição de reforços microestruturais já tem sido feita na tentativa de melhora dessas propriedades de materiais compósitos a base de HA sintética, por meio de controle de densidade e microestrutura (RAVARIAN et al., 2010; YELTEN, YILMAZ, OKTAR, 2012). Os reforços podem atuar como “escudo” na frente das trincas (crack bridging); desviar ou defletir a trinca de seu eixo (crack deflection), diminuindo sua tensão máxima local, assim como pela absorção da energia da trinca, uma vez que o reforço ocupa volume no seu trajeto, resultando na eliminação da concentração de tensão em sua ponta (FORTULAN, 1999; FANG, FENG, TAN, 2013).

A nanotecnologia proporcionou a síntese de óxidos de metais nanocristalinos inorgânicos, mostrando-se eficientes como mecanismo de reforços (FORTUNY et al., 1999; RANA et al., 2006; CHENG et al., 2013), uma vez que apresentam alta relação superfície/volume, e, dependendo de sua síntese, com alta energia de superfície (ARRUDA et al., 2015). Dentre eles, nanoestruturas de dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de zinco (ZnO) têm sido investigadas. O TiO₂ se destaca como agente de reforço de materiais odontológicos (RAMOS-TONELLO et al., 2017; CIBIM et al., 2017) e pela propriedade antimicrobiana, devido à sua atividade fotocatalítica sob luz UV, durabilidade superior, menor toxicidade e maior seletividade e resistência ao calor

(FORTUNY et al., 1999; RANA et al., 2006). O ZnO é um agente importante que exibe amplo espectro de atividade antimicrobiana (JONES et al, 2008). Além disso, as partículas de menores dimensões em escala nano com maior área superficial tem potencializado seu comportamento antibacteriano (PADMAVATHY, VIJAYARAGHAVAN, 2008; NAIR et al, 2009; RAGHUPATHI, KOODALI, MANNA, 2011).

Segundo a classificação de Gracis et al., 2015, cerâmicas policristalinas atuais possuem diversas aplicações na odontologia (SIDDIGI, KHAN, ZAFAR, 2017). A manufatura de cerâmica densa policristalina de HA de origem bovina contribui para a reutilização de resíduos sólidos, diminuindo o impacto ambiental causado pelo seu descarte inadequado. Por isso, estudos envolvendo a HA bovina podem proporcionar a obtenção de um material promissor, biocompatível, de baixo custo e sustentável para a área odontológica, por agregar características intrínsecas composicionais, caso se conheça, no futuro, mecanismos para melhorar sua resistência mecânica.

Este trabalho tem como hipótese que a manufatura da hidroxiapatita de origem bovina com buscas a micronização e seu reforço com materiais nanoestruturados e osteogênicos podem resultar em materiais mais resistentes e mais confiáveis.

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de cerâmicas densas de HA óssea bovina reforçadas com nanomateriais em diferentes concentrações para análise estrutural e da influência nas propriedades mecânicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este trabalho se caracteriza como multidisciplinar e para suportar as decisões e discussões necessárias ao seu desenvolvimento foram elencados tópicos onde foram concentradas buscas e destacados assuntos apresentados neste capítulo.

2.1 SUSTENTABILIDADE E OSSOS BOVINOS

Sustentabilidade é o desenvolvimento multidimensional para se atingir qualidade de vida para todos e é baseada nos desenvolvimentos econômico, social e na proteção ambiental, sendo eles interdependentes (KUHLMAN, FARRINGTON, 2010; UNITED NATIONS, 2007).

Segundo as definições da Norma Brasileira (NBR) ISO 14001 (ABNT, 1996), aspecto ambiental é o resultado das atividades, produtos e / ou serviços de uma organização que pode interagir com o meio ambiente, enquanto impacto ambiental é qualquer modificação do meio ambiente, adversa ou benéfica, que resulte, no todo ou em parte, dos aspectos ambientais da organização. Assim, aspectos ambientais são constituídos pelos agentes geradores ou causadores das interações e alterações do meio ambiente. A cada aspecto ambiental pode estar relacionado um ou mais impactos ambientais.

Os principais aspectos ambientais e impactos gerados do segmento produtor e beneficiador de carnes e derivados, estão associados ao alto consumo de água, geração de efluentes líquidos com alta carga poluidora e geração de resíduos sólidos (PACHECO, 2008).

Sendo o Brasil um dos grandes exportadores mundiais de carne bovina, a indústria de abate e processamento de carnes participa de forma relevante na economia brasileira (SARDA et al., 2009). Entretanto, o aumento na quantidade de abatedouros e frigoríficos tem como consequência o aumento de resíduos gerados e lançados no ambiente por esses estabelecimentos (NIETO, 2000). Muitos destes

resíduos são poluentes necessitando assim, de adequada separação, tratamento e descarte no meio ambiente (FERNANDES, 2004).

Os abatedouros em seu processo produtivo geram diversos resíduos que precisam ser corretamente geridos de forma a amenizar o impacto ambiental. Dentre os resíduos gerados têm-se os efluentes líquidos (águas residuais contaminadas com sangue e esterco) e os resíduos sólidos (sebo, ossos, esterco, couro, vísceras e outros). Os resíduos sólidos representam um volume maior e, frequentemente, são depositados em lixões, terrenos particulares ou queimados como combustíveis fósseis, gerando sérios prejuízos ao ar, ao solo e à saúde. as práticas de destinação dos resíduos de origem animal, geralmente, utilizadas, são: aterros, enterramento, compostagem, queima, incineração e reciclagem. Os aterros representam um proejto deficiente por não apresentar temperaturas adequadas para eliminar bactérias e esporos resistentes ao calor. O enterramento traz sérias preocupações com contaminações de águas subterrâneas. A compostagem é uma adaptação do processo que o agricultor utiliza desde a antiguidade para transformar restos agrícolas podendo considerar como uma alternativa apenas para pequenas quantidades. A queima libera fumaça, odores e outros poluentes atmosféricos. Sob certos aspectos a incineração seria ideal para este tipo de atividade, pois converte matéria orgânica em inorgânica eliminando qualquer tipo de organismo patogênico, porém deve-se considerar a escassez e custo de incineradores. Por último destaca-se a reciclagem, pois consiste no aproveitamento pela transformação de restos de animais em produtos ainda utilizáveis como sebo, óleo e adubos, sendo quando possível, devido aos baixos custos, a prática mais recomendada entre as demais (RABELO, SILVA, PERES, 2014; ARAUJO, COSTA, 2014).

O processamento e o destino dos subprodutos gerados do abate dos animais dependem de características locais (PACHECO, YAMANAKA, 2006). Em cidades com abatedouros que não possuem infraestrutura, os resíduos sólidos geralmente são destinados a lixões ou aterros e descartados sem controle sanitário, o que agrava os problemas ambientais e de saúde pública (MATTAR et al, 2014).

Os ossos bovinos estão dentre os resíduos sólidos gerados e são formados por uma matriz extracelular que é composta por parte orgânica e inorgânica. A parte orgânica contém colágeno, proteoglicanos, e outras proteínas não colágenas. O cálcio (Ca) e fósforo (P) são os principais componentes inorgânicos da matriz, e a relação

Ca/P, igual a 1,67, indica que provavelmente os cristais consistem em hidroxiapatita. O uso do osso bovino como fonte de matéria-prima na produção de biomaterial de enxerto vem sendo estudado há tempos. Após a coleta, faz-se o processamento do osso para remover restos celulares, lipídios e proteínas. Quando passam por processos termoquímicos e são calcinados, a parte orgânica da matriz óssea é removida restando principalmente a hidroxiapatita (CARÚS, 2012). O osso bovino vem sendo utilizado como principal fonte natural de biomateriais como hidroxiapatita, matriz óssea desmineralizada, colágeno membranas ósseas, entre outros (NEVINS et al., 2003; HANKS, ATKINSON, 2004; KRAMER et al., 2008; CHIAPASCO, CASENTINI, ZANIBONI, 2009; PIERI et al., 2010; JENSEN et al., 2012).

2.2 BIOCERÂMICAS

Biocerâmicas é a classe das cerâmicas utilizadas no reparo e reconstrução de partes doentes ou danificadas do sistema biológico, sendo materiais biocompatíveis. Elas podem ser classificadas de acordo com as respostas biológicas provocadas no local receptor como porosas, bioativas e reabsorvíveis, representadas na Tabela 2.1 (VALLET-REGÍ, GONZÁLEZ-CALBET, 2004; ORÉFICE, PEREIRA, MANSUR, 2006).

Biocompatibilidade é definida atualmente como a capacidade de determinado material em promover uma função favorável para determinada terapia no hospedeiro, sem causar efeitos locais ou sistêmicos indesejados, porém gerando uma resposta celular ou tecidual adequada para uma condição específica, otimizando a performance clínica (WILLIAMS, 2008, SOARES et al., 2018).

Biocerâmicas incluem vidros, vitrocerâmicas, alumina (Al_2O_3), zircônia (ZrO_2), compósitos metálicos, HA e fosfatos de cálcio reabsorvíveis (HULBERT et al., 1987; HENCH, 1991; DUBOK, 2000; BEST et al., 2008).

Tabela 2.1 – Classificação das cerâmicas quanto à resposta biológica da interação com o tecido receptor.

BIOCERÂMICA	TIPO DE ADESÃO	EXEMPLOS
Porosas	Crescimento ósseo pelos poros; interação por fixação biológica	Alumina porosa e materiais revestidos com HA
Bioativas	Forte ligação; interação por fixação bioativa	Vidros bioativos, vitrocerâmicas bioativas, HA
Reabsorvíveis	Degradam e são substituídas por tecidos; interação por fixação biológica específica	Fosfato tricálcico, vidros bioativos

Fonte: adaptado de HENCH, WILSON, 1993 e ORÉFICE, PEREIRA, MANSUR, 2006.

A primeira biocerâmica com uso muito difundido foi a alumina densa (α -Al₂O₃) (HULBERT, COOKE, 1970). Este material, devido a sua boa biocompatibilidade e elevada resistência mecânica, vem sendo usado com frequência até hoje em próteses ortopédicas que substituam ossos ou parte deles que são submetidos, na sua atividade funcional, a esforços elevados. Além da alumina densa, outras cerâmicas como a zircônia (ZrO₂) e as derivadas dos fosfatos de cálcio e as vitrocerâmicas de sílica/fosfato de cálcio, apresentam uso muito difundido atualmente. O uso das biocerâmicas tem se estendido desde o emprego isolado do material até outras formas de utilização, como por exemplo, no revestimento de próteses metálicas ou na associação com materiais poliméricos, tais como o colágeno (KAWASHI et al., 2000).

Dentre as variáveis determinantes das propriedades das biocerâmicas, a estequiometria, a estrutura cristalina e a porosidade são importantes para o comportamento biológico de tais materiais (LACOUT, 1992; LIU, 1996). De forma geral, o preparo de um corpo biocerâmico envolve etapas fundamentais, sendo elas: o preparo do pó; secagem, conformação e o aquecimento em altas temperaturas para obtenção do corpo sinterizado (KAWASHI et al, 2000).

2.2.1 Hidroxiapatita

Dentre as biocerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita (HA) recebe destaque na área de pesquisa por ser o principal componente na fase mineral dos ossos, com ampla utilização nas áreas médicas e odontológicas. A figura 2.1 representa a estrutura cristalina da HA, que possui fórmula química Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂,

apresenta uma razão Ca/P de 1,67, que pode variar até 1,5 nos casos de substituições (FULMER et al., 2002) e se cristaliza no sistema hexagonal sendo que sua célula unitária contém 10 íons cálcio (ELLIOT, 1994).

Fonte: ChemTube 3D. Disponível em: <http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm>

Figura 2.1 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita.

A HA é principal constituinte mineral natural encontrado no osso e representa de 30 a 70% da massa dos ossos e dos dentes. Suas principais características consistem na biocompatibilidade, osteocondução e bioatividade. Esta última ocorre devido às similaridades químicas da hidroxiapatita em relação à parte mineral óssea, permitindo diversas ligações químicas. A osteocondutividade, por sua vez, representa a capacidade de formar ligações químicas com os ossos, aumentando a velocidade de formação de um novo osso ao redor do implante e, com isso, acelera a cicatrização e diminui o tempo de tratamento. Ao contrário de outros fosfatos, a HA não se fragmenta em condições fisiológicas, é termodinamicamente estável em pH fisiológico, participa de maneira ativa em ligações ósseas e caracteriza-se por não apresentar toxicidade local ou sistêmica (LIU et al., 1997; CARRODEGUAS et al., 1999; GALDINO, 2011).

A figura 2.2 demonstra os padrões estrutural de DRX da hidroxiapatita em comparação com outros tipos de apatitas como osso humano, esmalte dental, fluorapatita e cloroapatita.

Fonte: adaptado de AOKI, 1991.

Figura 2.2 – Padrões de DRX da hidroxiapatita.

Existem várias formas de cerâmicas de HA disponíveis, incluindo absorvíveis ou não, particuladas ou em blocos, densas ou porosas (TONG et al., 1998).

As características químicas e estruturais da HA possibilitam seu uso na área médica e odontológica como material biocompatível em implantes e próteses (EANES, 1980).

A cerâmica de HA pode ser encontrada na forma densa ou porosa. Dentre elas, a densa possui maior resistência mecânica e menor potencial de dissolução e degradação, quando comparada à HA porosa, sendo assim, não há neoformação óssea no interior deste arcabouço, o que a faz permanecer no sítio de implantação por maior período (UEMURA et al., 2003). As cerâmicas densas são utilizadas como biomaterial para o preenchimento de defeitos ósseos (METSGER et al., 1999; RIMINUCCI, BIANCO, 2003).

Dentre as principais limitações da cerâmica de hidroxiapatita para aplicação como componente majoritário em implantes, por exemplo, estão a baixa tenacidade à

fratura e o crescimento subcrítico de trincas. Apesar da boa densificação e microestrutura adequada na sua forma pura é incapaz de apresentar alto desempenho mecânico, tornando a baixa resistência mecânica um dos desafios a serem resolvidos. Por isso, atualmente a hidroxiapatita tem sido utilizada principalmente como preenchimentos e recobrimentos, não sendo recomendada em aplicações que requerem grande sustentação de cargas (HENCH, WILSON, 2013).

A Figura 2.3 demonstra algumas aplicações da hidroxiapatita no corpo humano.

Fonte: adaptado de HENCH, 2013.

Figura 2.3 – Aplicações da HA em diferentes áreas do corpo.

2.3 NANOMATERIAIS

Os nanomateriais são materiais cujos tamanhos das partículas que os constituem encontram-se na faixa dos nanômetros (Figura 2.4). A visualização e identificação de nanomateriais só se torna possível por meio de microscópios eletrônicos de alta resolução. O estudo de materiais nanométricos ganhou importância significativa no final do século XX, levando ao aparecimento e consolidação de toda uma área do conhecimento, hoje reconhecida como “Nanociência e Nanotecnologia” (ZARBIN, 2007). Materiais com microestrutura de tamanho nanométrico podem ser chamados de materiais nanoestruturados, nanomateriais, materiais nanofásicos, materiais nanocristalinos ou sólidos supramoleculares (GLEITER, 2000).

Fonte: adaptado de Canon Nanotechnologies. Disponível em: <http://cnt.canon.com/technology/>

Figura 2.4 – Escala nanométrica.

As nanoestruturas tornaram-se alvo de muitos trabalhos de pesquisa, pois a redução nas dimensões das partículas de um sólido, em uma ou mais ordens de grandeza, pode alterar de forma significativa as propriedades deste sólido. Propriedades físicas e mecânicas relevantes podem ser desenvolvidas a partir da elevada fração de átomos que se concentram nos contornos de grãos com dimensões nanométricas (GLEITER, 2000; BINNER, VAYDHIANATHAN, 2008).

Nanopartículas são uma ampla classe de materiais que incluem substâncias particuladas, que possuem dimensão menor que 100 nm (LAURENT et al., 2010). O tamanho destes materiais ganhou destaque quando descobriram a influência nas propriedades físico-químicas das substâncias (DREADEN et al., 2012).

2.3.1 Nanotubos e nanopartículas de TiO_2

O interesse pelo dióxido de titânio (TiO_2) surgiu desde 1930 quando foram observados fenômenos fotocatalíticos. Desde então foram evidenciadas suas propriedades de biocompatibilidade, insolubilidade em água, fotoestabilidade e estabilidade química em ampla faixa de pH, baixo custo, entre outras. É um composto inorgânico, de baixo custo e inócuo, largamente utilizado em diversas aplicações como: pigmento branco em tintas, bloqueador solar em cosméticos e agente promovedor da biocompatibilidade em implantes ósseos (DIEBOLD, 2003; CHEN, MAO, 2007).

O TiO_2 pertence à família de óxidos metálicos de transição e composto apresenta geralmente três diferentes estruturas cristalográficas: anatase (tetragonal), rutilo (tetragonal) e brookita (ortorrômbico). As três estruturas apresentam-se em formas de octaedros de TiO_2^{6-} . A Figura 2.5 demonstra as diferenças entre as estruturas cristalinas, que são apenas a distorção desses octaedros e os padrões de montagem das cadeias octaédricas. A anatase é obtida em baixas temperaturas (até $400\text{ }^\circ\text{C}$) e tem a estrutura construída por octaedros ligados pelas suas bordas; a rutilo apresenta transição em temperaturas mais altas ($800\text{ }^\circ\text{C}$ em média) e possui os vértices ligados; a brookita, sendo a fase menos densa, têm ambos os vértices e as extremidades ligadas, de difícil síntese e raramente encontrada na natureza. A fase rutilo é estável enquanto anatase e brookita são metaestáveis (BAUR, 1961; MOR et al., 2006; CARTER, NORTON, 2007).

Fonte: adaptado de HAGGERTY et al., 2017.

Figura 2.5 – Estruturas cristalinas do TiO_2 : anatase, rutilo e brookita.

O TiO_2 apresenta grande capacidade de degradação fotocatalítica de compostos orgânicos e tem sido utilizado na área de biomateriais, sendo tal característica conveniente ao estudo para os tratamentos de câncer (JOMINI et al., 2012; MAKUMIRE et al., 2014; WANG et al., 2015), antimicrobianos (ALLAHVERDIYEV et al., 2013; WEI et al., 2014; GAO, WU, FAN, 2014), e na fabricação de próteses dentárias (NIINOMI, 2003; ALVARENGA et al., 2013; SIMONI, SILVA, 2013) e ortopédicas (BRAMMER, FRANDSEN, JIN 2012; CAO, LIU, 2013; PARCHAROEN et al., 2014).

Os nanotubos de titânio foram produzidos e descritos pela primeira vez em 1999 (ZWILLING, 1999). São nanoestruturas tubulares, auto-organizadas, dispostas paralelamente ao substrato, com diâmetros que variam de 15 nm a 200 nm e possuem comprimento (espessura da camada) entre 200 nm e 2 μm . Houve aumento da utilização do TiO_2 com o surgimento dos nanotubos nas áreas de implantes ósseos, dispositivos eletroquímicos, sensores bioquímicos, adsorção e fotocatalise. Existem diversas rotas para síntese de nanotubos, dentre elas o método sol-gel, métodos hidrotérmicos e vias eletroquímicas (KASUGA et al., 1998; KASUGA, 2006; ROY, BERGER, SCHMUKI, 2011).

Os nanotubos de TiO_2 vêm atraindo atenção como tratamento superficial devido a suas características morfológicas que aumentam a biocompatibilidade quando comparado com a camada compacta de dióxido de titânio (ALHOSHAN et al., 2012). Estudos indicam que camadas de nanotubos de titânio estimulam a formação de apatita quando comparada com camadas oxidas nativas em titânio por possuírem maior área superficial (KODAMA et al., 2009). Quando comparada com o titânio comercialmente puro a adesão de osteoblastos e a habilidade de osseointegração são amplamente aceleradas pela topografia dos nanotubos de titânio (MA et al., 2008). Além disso, nanotubos de TiO_2 favorecem um acréscimo no percentual de osso neo formado e na expressão genética associada com a formação e remodelamento ósseo durante o período de osseointegração. Devido à semelhança morfológica entre a superfície nanotubular e a matriz de colágeno, a adesão de condrócitos (células do tecido cartilaginoso) sobre os nanotubos é maior que a adesão sobre o titânio não modificado (BURNS; YAO; WEBSTER, 2009; WANG et al., 2011).

Existem três métodos principais foram desenvolvidos para a preparação de TiO_2 baseados nas estruturas tubulares: síntese química (modelo), síntese

eletroquímica (anodização de metais Ti), e o método hidrotérmico alcalino (BAVYKIN, FRIEDRICH, WALSH, 2006). A síntese de nanotubos através do método hidrotérmico é amplamente aplicado por sua simplicidade e por poder ser reproduzível em larga escala. O método consiste na mistura do óxido em pó a uma solução de NaOH, e esta é mantida sob aquecimento em autoclave por um certo período. Os íons de sódio provenientes do hidróxido adicionado se ligam ao titânio, organizando camadas de óxido de titânio alternadas a camadas de íons Na^+ . Com a presença de água na fase de lavagem, estas camadas são substituídas e removidas até entrarem em colapso. Com a desestruturação nos planos periódicos, a tendência do material força a formação de nanolâminas, que enrolam gerando as estruturas tubulares (WANG et al., 2004).

Fonte: adaptado de WANG et al., 2004.

Figura 2.6 – Etapas de formação dos nanotubos TiO_2 por meio do método hidrotérmico.

A formação de determinada estrutura cristalina está diretamente relacionada ao método e as condições experimentais de síntese, e o tamanho inicial das partículas (ALTOMARE et al., 2015). O diâmetro das nanopartículas de TiO_2 tem grande influência na fase obtida. A fase anatase é termodinamicamente estável para diâmetros menores que 11 nm, a brookita é estável na faixa de 11 nm a 35 nm, enquanto a fase rutilo é estável para diâmetros maiores que 35 nm (KITAYAKARN et al., 2013).

2.3.2 Nanopartículas de ZnO

O óxido de zinco é um composto inorgânico com fórmula molecular ZnO, é o 23º elemento mais abundante na crosta terrestre. O ZnO é um pó branco insolúvel em água e é amplamente utilizado como aditivo em diversos materiais e produtos. Apesar de ser encontrado na natureza como o mineral zincita, a maioria do ZnO utilizado atualmente é produzido sinteticamente. As estruturas cristalinas do ZnO são wurtzita, blenda de zinco e sal-gema (Figura 2.5). Em condições ambientes, a fase termodinamicamente estável é a wurtzita. A estrutura blenda de zinco só pode ser estabilizada através de crescimento em substratos cúbicos e a estrutura sal-gema pode ser obtida em pressões relativamente altas (WANG, HERRON, 1987; TAKAHASHI, YOSHIKAWA, SANDHU, 2007).

Fonte: adaptado de

Figura 2.7 – Representação das estruturas cristalinas do ZnO nas formas hexagonal da wurtzita, cúbica da blenda de zinco e cúbica da sal-gema.

O ZnO é insolúvel em água e em etanol, solúvel em ácidos minerais diluídos e é um pó fino, branco ou levemente amarelado. Quando se encontra em grande quantidade e em alta pureza, é recomendado para utilização nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos (RAMALHO, 2004).

O ZnO é um material de fácil cristalização e quando está na forma de nanopartículas apresenta algumas mudanças em suas propriedades, tais como, área superficial e estrutural (CHIANG et al., 2011). Em função de seu tamanho médio de

partícula (abaixo de 100nm) os pós nanocristalinos podem mostrar comportamentos variados resultantes da energia de superfície mais alta devido à grande área superficial dos mesmos e à abertura mais larga entre a banda de valência e a banda de condução, efeitos estes característicos dos tamanhos próximos aos átomos. Tais fatores podem aumentar o potencial de uso do material, incluindo propriedades óticas, químicas, eletromagnéticas, dentre outras. Assim, devido as suas qualidades físicas e químicas excepcionais o ZnO nanométrico é uma matéria-prima importante para muitas aplicações, como por exemplo, na formulação de sensores de gás, óxidos luminescentes, borrachas, tintas, cerâmicas, componente de protetor solar (KWON et al., 2002; RAVI, PASRICHA, DHAGE, 2004, PEREZ-LOPES et al., 2005).

O zinco é um elemento importante que está presente no osso, possui capacidade de aumentar a mineralização tanto *in vivo* como *in vitro*, e está relacionado à produção de colágeno da matriz óssea (STORRIE, STUPP, 2005). A HA com incorporação de zinco apresenta efeitos favoráveis na produção de citocinas pelos monócitos, confirmando que o zinco tem efeito na produção dos monócitos (GRANDJEAN-LAQUERRIERE et al., 2006). O zinco aumenta a atividade da enzima fosfatase alcalina ao ser incluído em pastilhas de compósito cerâmicos de HA. Estudos relatam que um conteúdo de 1,26% de zinco em peso aumentou em três a quatro vezes o nível de fosfatase alcalina em relação as cerâmicas sem zinco (ITO et al., 2005). Outra propriedade é a inibição da atividade dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea (MOONGA, DEMPSTER, 1995).

2.3.3 Reforços estruturais em cerâmica de HA

O desempenho mecânico da HA inferior quando comparado ao tecido ósseo, principalmente quando se refere a sua natureza frágil e baixa tenacidade à fratura e faz sua utilização clínica ainda limitada a regiões não sujeitas a grandes esforços mecânicos (KALITA et al., 2004; NING, ZHOU, 2004; RAMESH et al., 2012; SEBDANI, FATHI, 2012). Visando melhorar essas propriedades, por meio do controle da densidade e microestrutura, vários métodos de reforço microestrutural da HA têm sido utilizados. Dentre os materiais utilizados como agente de reforço para a HA destacam-se zircônia, alumina, mulita, titânio e biovidro. Outra abordagem é a adição de íons em solução sólida na HA WANG, 2003; KHOR et al., 2004; KONG et al., 2005; KUMAR

et al., 2005; KALITA, BHATT, 2007; NATH et al., 2009; SALMAN et al., 2009; SOPYAN et al., 2011; SEBDANI, FATHI, 2012).

A melhora da tenacidade à fratura pôde ser observada com adição de reforços na matriz por meio de processos chamados *crack bridging*, *crack deflection* e *crack bridging sliding* (Figura 2.7), pelos quais ocorre absorção da energia de propagação de trinca e eliminação da concentração de tensão na ponta da trinca (FANG, FENG, TAN, 2013). *Crack bridging* é o reforço obtido por pontes de transferência da propagação da trinca observado quando características microestruturais como fibras, precipitados ou grãos individuais separam as superfícies como um escudo na frente da trinca. *Crack deflection* é o mecanismo de desvio ou deflexão da trinca que ocorre quando características microestruturas obrigam a trinca a defletir ou desviar do eixo de máxima tensão. *Crack bridging sliding* é o reforço obtido pelo deslizamento da trinca na matriz, característica comum gerada por *whiskers* (FORTULAN, 1999).

Fonte: adaptado de FORTULAN, 1999 e MEIRA, 2014.

Figura 2.8 – Processos envolvendo trincas na presença de reforços microestruturais: *crack bridging*, *crack deflection* e *crack bridging sliding*.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades estruturais e mecânicas de uma cerâmica de hidroxiapatita de origem bovina pura e com adição de nanopartículas de ZnO e TiO₂ e nanotubos de TiO₂ em diferentes concentrações.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações (1, 2 e 5%) de nanotubos de TiO₂, nanopartículas de TiO₂ e nanopartículas de ZnO na estrutura da cerâmica de HA;
- Avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações (1, 2 e 5%) de nanotubos de TiO₂, nanopartículas de TiO₂ e nanopartículas de ZnO na micr dureza da cerâmica de HA;
- Avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações (1, 2 e 5%) de nanotubos de TiO₂, nanopartículas de TiO₂ e nanopartículas de ZnO na resistência à flexão biaxial da cerâmica de HA;

3.3 HIPÓTESES NULAS

- Não haveria alteração estrutural das cerâmicas de hidroxiapatita as reforçadas por nanomateriais em comparação com a cerâmica de HA pura
 - Não haveria diferença na resistência à flexão entre a HA pura e as reforçadas com nanomateriais.
 - Não haveria diferença nos valores de dureza entre a HA pura e as reforçadas com nanomateriais.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONFEÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Os grupos de cerâmicas pura e aditivadas em concentrações de 1, 2 e 5% com nanotubos de TiO_2 , nanopartículas de TiO_2 e nanopartículas de ZnO que foram avaliados no estudo estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Identificação dos grupos experimentais de acordo com as estruturas de reforço utilizada.

Grupo	Estrutura de reforço (ER)	Proporção ER (%) em peso de HA
HA	-	0
HA/ TiO_2 nt1%	Nanotubos de TiO_2	1
HA/ TiO_2 nt2%		2
HA/ TiO_2 nt5%		5
HA/ TiO_2 np1%	Nanopartículas de TiO_2	1
HA/ TiO_2 np2%		2
HA/ TiO_2 np5%		5
HA/ ZnO np1%	Nanopartículas de ZnO	1
HA/ ZnO np2%		2
HA/ ZnO np5%		5

4.1.1 Síntese dos nanomateriais

A etapa de síntese dos nanotubos e nanopartículas foi realizada na Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) de Bauru / SP, por meio dos protocolos descritos a seguir.

4.1.1.1 Nanotubos de TiO_2

Os nanotubos foram obtidos por meio de síntese alcalina. Foi feita a mistura de 10 g de pó comercial de TiO_2 anatase (Aldrich, 99%) para 120 ml de solução alcalina de hidróxido de sódio (NaOH) 10M. A mistura foi mantida a 120 °C por 24 horas em

um recipiente de Teflon, o qual foi submetido a aquecimento através de banho de glicerina, utilizando como fonte térmica, uma manta aquecedora. Após 24 horas a solução alcalina de NaOH mais pó de TiO_2 foi lavada com água deionizada e solução de ácido clorídrico (HCl) (0,1M), sequencialmente e repetidamente. As amostras foram lavadas até atingir o pH final 7 ou 4. Em seguida, passaram por processo de secagem a 200 °C por 24 horas em atmosfera de ar, para eliminação da parte líquida e obtenção do material final (ARRUDA et al., 2015).

Fonte: adaptado de ARRUDA et al., 2015.

Figura 4.1 – Diagrama de fluxo do processo de síntese alcalina para obtenção dos nanotubos de TiO_2 .

4.1.1.2 Nanopartículas de TiO_2

A rota sol-gel foi escolhida por apresentar a possibilidade de controle da microestrutura e homogeneidade do produto formado e menor gasto energético. As nanopartículas de TiO_2 resultaram de reações de hidrólise do alcóxido isopropóxido de titânio (IV), utilizando uma alta razão molar água:alcóxido (200:1), isopropanol como co-solvente e HNO_3 como catalisador ácido. Proporcionalmente em um Becker acrescentou-se 185 ml de água destilada para 56,7 ml de isopropanol e 2,6 ml de ácido nítrico (HNO_3). Em seguida, foi adicionado 15 ml de alcóxido na solução sob agitação por 30 min. Promoveu-se o aquecimento da solução a 85 °C, permanecendo

em agitação (Figura 4.4 A). Esses padrões de aquecimento e agitação foram mantidos até a completa evaporação do líquido, resultando na cristalização. Posteriormente o material foi desaglomerado por moagem manual em almofariz e levado ao forno em 500 °C para redução do pó homogêneo (adaptado de TRINO, 2014).

Figura 4.2 – Fluxograma do processo de síntese das nanopartículas de TiO₂.

4.1.1.3 Nanopartículas de ZnO

A nanopartículas de ZnO resultaram de processo sol-gel. Em uma balança digital, pesou-se o pó amorfo de ZnO (99,9%, Sigma-Aldrich). Em um Becker, adicionou-se água deionizada (100 ml) e ácido nítrico (10/15 ml), sobre agitador magnético de agitação por imã de 300 rpm e temperatura por volta de 90 °C. Aos poucos, adicionou-se ZnO ao líquido. Em seguida, pesou-se 5,5 g de ácido cítrico (C₆H₈O₇) em balança digital e foi adicionado, aos poucos, em 190 ml de água deionizada em outro Becker. Misturou-se os dois conteúdos líquidos no Becker maior, para abertura do ácido cítrico. Aguardou-se 15 minutos para adição de 10,5 ml de etilenoglicol, mantido em agitação por algumas horas para iniciar a medição do pH. Para regular o pH foi adicionado vagarosamente etileno diamina (ED) (por volta de 2/3 ml) para tornar o meio mais básico. Isso foi realizado em temperatura por volta de 290 °C. As medições do pH foram feitas a cada acréscimo de 0,5 ml de ED. Após atingir o

pH por volta de 3 e 4, a temperatura foi reduzida para 180 °C, mantendo a agitação e posteriormente, a 70 °C para evaporação da água dessa solução, de um dia para o outro (Figura 4.4 B). Após a cristalização o material foi desaglomerado por moagem manual em almofariz e levado ao forno à 800 °C para redução do pó homogêneo (adaptado de TRINO, 2014).

Figura 4.3 – Fluxograma do processo de síntese das nanopartículas de ZnO.

Figura 4.4 – Evaporação do líquido durante a síntese de nanopartículas de TiO_2 (A) e ZnO (B).

4.1.2 Cerâmica de hidroxiapatita pura e reforçada

O enquadramento de risco geográfico emitido pelo Código Zoosanitário Internacional e pelo *Scientific Steering Committee – European Commission* (SSCEC, agosto de 2005) isentou o Brasil de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) e o país também se declara livre da doença por meio da portaria 516/97.

Os ossos utilizados neste trabalho foram doações providas do projeto de pesquisa “Estudo comparativo da qualidade óssea de bovinos das raças Canchim e Nelore, baseado na estrutura cristalina da hidroxiapatita”, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética (Anexo A). Os metatarsos traseiros bovinos adquiridos de gados da raça Canchim, os quais eram devidamente cadastrados pelo Sistema Brasileiro de Rastreabilidade Bovina e Bubalina (SISBOV), foram provenientes do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudoeste (CPPSE) da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA), situada em São Carlos / SP, em conformidade com a Instrução Normativa N° 46 (6 de outubro de 2011), a qual contempla o bem-estar animal (ERBERELI, 2017).

A figura 4.5 representa o processamento químico feito para retirada da matéria orgânica do tecido ósseo em peróxido de hidrogênio a 100% para obtenção da hidroxiapatita. Após este processo, amostras foram enviadas para laboratório credenciado pelo Ministério da Saúde para realização de análise química para comprovar a ausência de metais pesados na composição do osso e análise citotóxica

para comprovar a ausência de contaminação biológica. Uma vez que o resultado da análise não apresenta metais pesados na composição do tecido ósseo e ausência de citotoxicidade, este é liberado para ser utilizado na produção da hidroxiapatita em grânulos (ERBERELI, 2017).

Fonte: adaptado de ERBERELI, 2017.

Figura 4.5 – Fluxograma do processamento termoquímico para retirada da matéria orgânica do tecido ósseo.

A etapa de confecção dos discos de cerâmica de hidroxiapatita pura e reforçada com nanoestruturas foi realizada no Laboratório de Tribologia e Compósitos da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP) na cidade de São Carlos / SP.

Após o processamento termoquímico para retirada de matéria orgânica, os ossos foram calcinados à 900 °C e moídos manualmente com auxílio de almofariz e

pistilo para redução em pó com partículas de tamanhos variados e passado em malhas (peneiras) de aço inoxidável para tamanhos inferiores à 180 μm (Figura 4.6). Posteriormente foram realizadas moagens mecânicas por meio de moinhos giratório e vibratório.

Figura 4.6 – Processamento do osso após calcinação.

Os materiais utilizados no processo de moagem e confecção dos discos de cerâmicas experimentais de hidroxiapatita pura e reforçada, suas densidades, proporções e funções estão descritos na Tabela 2.

Tabela 4.2 – Materiais utilizados para moagem e confecção dos discos.

Componente	Densidade (g/cm^3)	Proporção (%)	Função
HA	3,14	30% (volume total)	Pó cerâmico
PABA	1,37	0.05% (peso de HA)	Defloculante
PVB	1,1	2% (peso de HA)	Ligante
Álcool isopropílico	0,78	70% (volume total)	Solvente do PVB e meio líquido da mistura
Nanotubos de TiO_2	4,23	1, 2 ou 5% (peso de HA)	Reforço
Nanopartículas de TiO_2	4,23		
Nanopartículas de ZnO	5,61		

A Figura 4.7 representa a sequência da etapa de confecção das cerâmicas e os ensaios realizados, resumindo a metodologia aplicada no trabalho.

Figura 4.7 - Diagrama de fluxo da metodologia.

A moagem da Hidroxiapatita foi realizada para diminuir o tamanho das partículas e aumentar a reatividade entre elas, reduzindo assim, a temperatura, o tempo necessário da sinterização e a porosidade final da cerâmica. Para a moagem e obtenção de um pó submicrométrico foi utilizado um jarro de polietileno com altura de 85 mm e volume de 300 cm³ (jarro maior) carregado com 40 vol% (500 g) de elementos de moagem, no caso, esferas de zircônia 3Y com 10 mm de diâmetro perfazendo um volume útil de 100 ml.

O jarro foi carregado com 30 vol% de Hidroxiapatita, 70 vol% de álcool isopropílico e 0,05 wt% de PABA (ácido para-aminobenzoico) e colocado por 48 horas em moinho giratório (Figura 4.8 A) de bolas e 72 horas em moinho vibratório (Figura 4.8 B). Após esse período foi adicionado 2% em peso de PVB (polivinil butiral) sobre o peso de hidroxiapatita, que é misturado e homogeneizado em moinho vibratório de bolas por duas horas.

Da mistura resultante de HA pura após a moagem antes da adição do PVB uma pequena parte foi separada e para ser analisada por meio do equipamento SediGraph III Plus V1.00 na empresa Engecer Ltda em São Carlos para análise do tamanho médio das partículas.

Figura 4.8 - Moagem realizada no jarro maior em moinho giratório (A) e moinho vibratório (B).

Para hidroxiapatita pura após a homogeneização com PVB o jarro foi descarregado e a barbotina seca com soprador de ar quente a aproximadamente 80°C. Todos os pós preparados são granulados e classificados em peneiras de #250 mesh $\leq 75 \mu\text{m}$.

Para as amostras com nanomateriais, após essas duas horas em moinho vibratório com PVB as nanopartículas e nanotubos foram pesados nas concentrações de 1, 2 e 5% em relação ao peso de hidroxiapatita e adicionados na mistura em outro jarro menor. A mistura foi levada novamente ao moinho vibratório por 10 minutos (Figura 4.9). O jarro foi descarregado e a mistura seca com soprador de ar quente a aproximadamente 80 °C.

Figura 4.9 - Mistura contendo nanomateriais no jarro menor em moinho vibratório.

A Figura 4.10 demonstra a secagem das misturas com jato de ar quente (80 °C) feita tanto para hidroxiapatita pura quanto com adição de nanoestruturas.

Figura 4.10 - Secagem com jato de ar quente para obtenção do pó.

Tanto para a HA pura quanto para as reforçadas foram pesados 0,5 g do pó gerado e inseridos em um dispositivo metálico (matriz), que por meio da prensagem uniaxial de 2 toneladas (T) durante 30 segundos, gerou a conformação dos discos

com 15 mm de diâmetro e 1,4 mm de altura. A Figura 4.11 representa a sequência realizada desde a pesagem do pó até a prensagem uniaxial.

Figura 4.11 – Pesagem do pó (A), inserção na matriz metálica (B e C) e prensagem uniaxial de 2T por 30 segundos (D).

Todos os discos foram preparados em luva livre de talco à vácuo (Figura 4.12 A) e logo em seguida prensados em prensa isostática a 200 Mpa por 1 minuto (Figura 4.12 B).

Figura 4.12 – Discos preparados em luvas à vácuo (A) para inserção na prensa isostática (B).

Em seguida foi feita a sinterização para consolidação das partículas, densificação (redução da porosidade e aumento da densidade volumétrica) e aumento da resistência mecânica. Foi utilizado um forno tipo câmara de Lindberg Blue/M em atmosfera de ar, da temperatura ambiente até 160 °C com taxa de aquecimento de 2,7 °C/min, depois até 600 °C a 4 °C/min, em seguida até 1100 °C a 5 °C/min e, finalmente até a temperatura máxima de 1300 °C a 6 °C/min, com patamar de 2h seguido de resfriamento do forno até a temperatura ambiente (Figura 4.13). A Figura 4.14 apresenta o aspecto final dos discos após a sinterização, totalizando os 10 grupos.

Figura 4.13 – Posicionamento dos discos (A) para sinterização à 1300 °C no forno (B).

Figura 4.14 – Aspectos dos discos após a sinterização.

4.2 CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL, ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA

4.2.1 DRX

Para a análise química, estrutural e determinar as fases cristalinas formadas as amostras foram analisadas em temperatura ambiente por meio da técnica de difração de raios-x (DRX) utilizando um equipamento Rigaku Dmax Ultima, operando na geometria θ - 2θ e com ângulos de 10 a 80°. A análise foi feita com ajustes de perfil dos picos de XRD individuais selecionados.

4.2.2 MEV

O MEV foi realizado utilizando magnificações de até 2.500x para análise do tamanho e conformação dos grãos. Para isso, as amostras foram lixadas com granulações #150, #240, #320, #400, #600, #800 e #1200 durante 5 minutos para cada uma delas. Posteriormente polidas com disco de feltro e pasta diamantada de 4 μm , 2 μm e 1 μm em uma politriz. Após o polimento os discos foram submetidos ao tratamento térmico em forno de sinterização (1300 °C) para exposição do contorno dos grãos e então submetidas à cobertura com carbono para análise no MEV.

4.2.3 EDX

A composição química das amostras de HA pura e reforçadas foram analisadas no laboratório de Tribologia e Compósitos da EESC / USP. Foi utilizada a técnica de espectroscopia por espalhamento de energia dispersiva de raios-X (EDX) por meio do equipamento EDX-720 (Shimadzu) em atmosfera à vácuo (Figura 4.15).

Figura 4.15 – Equipamento EDX-720 para análise de composição química.

4.3 TESTES MECÂNICOS

4.3.1 Resistência à flexão biaxial

A resistência à flexão biaxial foi realizada na Escola de Engenharia de São Carlos (EESC / USP), determinada de acordo com a norma ISO 6872:2015, por meio da máquina hidráulica de ensaios Bionix 370.02 produzida pela MTS (Figura 4.16 A). Para o apoio das amostras, foi utilizado um dispositivo que consiste em três esferas de aço com diâmetro de 3,5 mm, posicionadas a 120° entre si, num círculo de apoio com um diâmetro de 10 mm. Os discos foram limpos com álcool isopropílico, colocado concentricamente sobre o suporte e a carga foi aplicada com punção plana com diâmetro de 1,2 mm, no centro da amostra com célula de carga de 15000 N, e velocidade de avanço de 0,2 mm/min (Figuras 4.16 B, C e D). Foram utilizados 30 discos de cada grupo ($n = 30$).

Figura 4.16 – Máquina de ensaio da resistência à flexão biaxial (A) com suporte adaptado (B) e disco em posição para realização do teste. Esquema do posicionamento do disco no suporte (D).

4.3.1 Dureza

Previamente aos ensaios de Dureza Vickers os discos foram embutidos em resina epóxica e lixados com granulações #150, #240, #320, #400, #600, #800 e #1200 durante 5 minutos para cada uma delas e posteriormente polidas com disco de feltro e pasta diamantada de 4 μm , 2 μm e 1 μm em uma politriz. Por fim, foram lavados e inseridos em ultrassom com água deionizada para remoção de resíduos da superfície.

Os testes foram realizados no Laboratório de Transformação de Fases do Departamento de Materiais da EESC / USP com o durômetro VMHT Mot Leica com indentador Vickers. Foram utilizados dois discos de cada grupo e realizadas 5 indentações em cada um ($n = 10$). O carregamento utilizado foi de 200 gf durante 15 segundos para cada indentação.

Figura 4.17 – Durômetro (A) e endentação realizada na amostra (B).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes de flexão biaxial e dureza foram analisados estatisticamente pelo método paramétrico ANOVA um critério com pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos.

Os resultados da flexão biaxial foram submetidos também à análise de Weibull pelo método de máxima probabilidade. O módulo de Weibull (m) e a resistência característica (σ_0) foram obtidos para cada grupo ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA

O tamanho médio das partículas de HA após as moagens foi de 400nm.

5.1.1 DRX

As Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 demonstram os resultados do DRX das amostras (JCPDS #01-074-0565). Os espectros estão representados de acordo com as porcentagens das nanoestruturas adicionadas à HA, sendo 1, 2 e 5%. Os principais picos característicos correspondentes à hidroxiapatita (HA) estão atribuídos com os respectivos planos de reflexão.

Figura 5.1 - Padrões de DRX dos grupos com 1, 2 e 5% de nanotubos de TiO₂ comparados à HA pura.

Figura 5.2 - Padrões de DRX dos grupos com 1, 2 e 5% de nanopartículas de TiO₂ comparados à HA pura.

Figura 5.3 - Padrões de DRX dos grupos com 1, 2 e 5% de nanopartículas de ZnO comparados à HA pura.

Os espectros de DRX mostraram uma certa desordem cristalográfica devido à adição dos nanomateriais, mas a predominância dos planos cristalográficos da HA foi mantida em todos os grupos. Picos característicos da HA hexagonal no eixo 2θ foram observados para todos os gráficos. Além disso, foi possível identificar a formação de fases secundárias (*), independentemente do tipo de nanomaterial. No caso do ZnO, a formação foi mais acentuada para a amostra de 5%. Em amostras com 1 e 2% de nanopartículas de ZnO nenhuma fase secundária foi identificada. No entanto, no caso dos nanotubos e nanopartículas de TiO_2 , mesmo com a adição em concentração de 1%, pode ser identificada a presença do $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TCP) e fase secundária de fosfato de titânio.

5.1.2 MEV

As imagens feitas no MEV (2.500 X de aumento) apresentadas na Figura 5.4 demonstram a HA pura (Figura 5.4A), que é a referência de comparação e na sequência as obtidas com adição de reforço. A amostra HA/ TiO_2 nt1% apresentou algumas regiões com maior crescimento de grãos, e com aparência que sugere fusão entre eles e também nesta região a presença de poros (Figura 5.4B). HA/ TiO_2 np1% (Figura 5.4C) apresentou um aspecto similar a HA/ TiO_2 nt1%, porém sem o aspecto de fusão e no geral com maior crescimento de grãos. HA/ZnOnp1% (Figura 5.4D), apresentou grãos maiores em relação à HA pura e defeitos volumétricos. Quando 2% dos nanomateriais foram utilizados, HA/ TiO_2 nt2% (Figura 5.4E) foram observados o mesmo padrão de grãos maiores visto em HA/ TiO_2 nt1% (Figura 5.4B). HA/ TiO_2 np2%, (Figura 5.4F) mostrou grãos maiores e a presença de alguns poros, enquanto HA/ZnOnp2% (Figura 5.4G) demonstrou aspecto similar ao de HA/ZnOnp1% (Figura 5.4D) com evidência de poros menores. Dentro da adição de 5% de nanomateriais, HA/ TiO_2 nt5% (Figura 5.4H) a tendência de crescimento de grãos com alguns poros e locais com aglomeração dos poros, o HA/ TiO_2 np5% (Figura 5.4I) parece ter mantido o mesmo tamanho dos grãos como nas concentrações menores, porém com menor delimitação e aparente fusão entre eles e também foram observados locais contendo vários aglomerados e alguns poros, enquanto HA/ZnOnp5% (Figura 5.4J) apresentou uma maior prevalência de grãos maiores comparado à HA pura e poucos poros.

Figura 5.4 - Imagens da superfície das amostras sinterizadas a 1300 °C, sequenciadas de acordo com as porcentagens dos grupos em 1, 2 e 5%. Sendo: A) HA pura; B, E e H) 1, 2 e 5% de nanotubos de TiO₂ respectivamente; C, F e I) 1, 2 e 5% de nanopartículas de TiO₂ respectivamente; D, G e J) 1, 2 e 5% de nanopartículas de ZnO respectivamente.

5.1.3 EDX

As análises do EDX feito nas amostras demonstraram traços de outros elementos químicos além dos principais.

A figura 5.5 representa o aspecto típico do espectro de EDX na HA pura, demonstrando diferentes elementos presentes na amostra.

Figura 5.5 – Espectro de EDX para amostra de HA pura.

A tabela 5.1 apresenta os elementos encontrados nos grupos e as respectivas porcentagens. Os valores estão representados pela média encontrada nas amostras sinterizadas.

Os elementos identificados pelos picos nos espectros das amostras foram: cálcio, fósforo, titânio, zinco, potássio, estrôncio, zircônio e silício.

Sendo a técnica de EDS uma técnica qualitativa e semi-quantitativa, o DRX acaba sendo uma técnica complementar para verificar se houve influência dos elementos identificados na estrutura da HA ou se são apenas deposições e / ou resquícios dos materiais utilizados para moagem.

Tabela 5.1 - Elementos químicos encontrados nos grupos por meio do EDX.

Grupos Elementos	HA	HA/ TiO ₂ nt1%	HA/ TiO ₂ nt2%	HA/ TiO ₂ nt5%	HA/ TiO ₂ np1%	HA/ TiO ₂ np2%	HA/ TiO ₂ np5%	HA/ ZnOnp1%	HA/ ZnOnp2%	HA/ ZnOnp5%
Ca (%)	49,899	49,28	49,011	45,632	48,71	48,4	46,133	49,994	47,581	46,72
P (%)	47,379	46,779	46,845	44,716	47,103	46,643	46,014	48,253	47,557	45,33
Si (%)	2,567	2,388	2,384	3,065	3,07	2,765	2,846	-	2,176	3,165
Zr (%)	0,095	0,085	0,083	0,081	0,079	0,075	0,074	0,043	0,054	0,062
Sr (%)	0,06	0,047	0,06	0,063	0,061	0,06	0,056	0,064	0,049	0,057
K (%)	-	0,282	-	0,333	-	0,279	0,275	0,325	0,296	0,303
TiO ₂	-	1	2	5	1	2	5	-	-	-
ZnO	-	-	-	-	-	-	-	1	2	5

5.2 TESTES MECÂNICOS

5.2.1 Resistência à flexão biaxial

O Cálculo da resistência à flexão biaxial (σ) foi realizado em MPa por meio da fórmula: $\sigma = -0,2387 P (X - Y) / b^2$. A média e desvio padrão dos valores encontrados estão representados no Gráfico 5.1, onde as diferenças estatísticas foram representadas por letras diferentes entre os grupos.

Gráfico 5.1 – Média e desvio padrão dos valores de resistência à flexão biaxial.

Os maiores valores encontrados no teste foram para os grupos HA ($235,19 \pm 36,48$) e HA/TiO₂np5% ($214,86 \pm 36,35$), sem diferença significativa entre eles, diferenciando estatisticamente dos demais ($p = 0,67$). Na ordem decrescente de valores estão os grupos HA/ZnOnp2% ($141,85 \pm 22,47$), HA/TiO₂np1% ($140,18 \pm 26,79$), HA/TiO₂nt1% ($129,35 \pm 33,44$), HA/ZnOnp1% ($125,19 \pm 24$), HA/TiO₂nt5% ($120,8 \pm 8,03$), HA/TiO₂nt2% ($119,86 \pm 25,09$). Os grupos HA/TiO₂np2% ($87,98 \pm 9,09$) e HA/ZnOnp5% ($86,4 \pm 12,54$) obtiveram os menores valores de resistência sem diferença estatística entre eles e diferindo dos demais grupos estatisticamente ($p = 1$).

5.2.1.1 Análise de Weibull

Os gráficos 5.2, 5.3 e 5.4 representam os resultados de confiabilidade dos valores encontrados no ensaio de resistência à flexão biaxial por meio da análise de Weibull para os grupos com nanotubos de TiO₂, nanopartículas de TiO₂ e nanopartículas de ZnO, respectivamente.

Gráfico 5.2 – Análise de Weibull dos grupos com 1% de nanomateriais comparados à HA pura.

Gráfico 5.3 – Análise de Weibull dos grupos com 2% de nanomateriais comparados à HA pura.

Gráfico 5.4 – Análise de Weibull dos grupos com 5% de nanomateriais comparados à HA pura.

A resistência característica (σ_0) da HA diminuiu nos grupos HA/TiO₂nt1%, HA/TiO₂nt2%, HA/TiO₂nt5%, HA/TiO₂np1%, HA/TiO₂np2%, HA/ZnOnp1%, HA/ZnOnp2% e HA/ZnOnp5%. No grupo HA/TiO₂np 5% o valor apresentou-se próximo à HA pura.

O módulo de Weibull (m) não sofreu alterações nos grupos HA/ZnOnp1%, HA/ZnOnp2%, HA/ZnOnp5%, HA/TiO₂np1% e HA/TiO₂np5%, aumentou nos grupos HA/TiO₂nt5% e HA/TiO₂np2%, e diminuiu nos grupos HA/TiO₂nt1%, HA/TiO₂nt2%.

5.2.2 Dureza

Os valores da dureza Vickers estão representados na Tabela 5.2 em HV, os quais correspondem as médias de 10 indentações realizadas para cada grupo.

Tabela 5.2 – Valores de dureza Vickers (HV).

Grupos	Média $\pm$ Desvio Padrão
HA/TiO ₂ np1%	455,4 $\pm$ 22,32 A
HA/TiO ₂ np2%	432,5 $\pm$ 18,22 A
HA/TiO ₂ np5%	399,6 $\pm$ 15,31 B
HA/ZnOnp5%	400,9 $\pm$ 15,17 B
HA/ZnOnp2%	376,3 $\pm$ 13,27 B
HA	335 $\pm$ 12,98 C
HA/TiO ₂ nt1%	317,4 $\pm$ 16,67 C
HA/TiO ₂ nt2%	310,2 $\pm$ 9,85 DC
HA/TiO ₂ nt5%	286,9 $\pm$ 28,72 D
HA/ZnOnp1%	260,5 $\pm$ 11,34 E

Os grupos HA/TiO₂np1% e HA/TiO₂np2% apresentaram os maiores valores dentre todos os grupos e foram semelhantes entre si ($p = 0,102$). Seguindo a sequência decrescente de valores os grupos HA/TiO₂np5%, HA/ZnOnp5% e HA/ZnOnp2% não apresentaram diferença entre si. HA, HA/TiO₂nt1% e HA/TiO₂nt2%, apresentaram valores intermediários, sem diferença entre eles ($p = 0,054$). HA/TiO₂nt5% foi o segundo grupo de menor valor e não apresentou diferença em relação ao grupo HA/TiO₂nt2% ($p = 0,089$). HA/ZnOnp1% apresentou os menores

valores dentre os grupos, com diferenças estatísticas significantes dos que apresentaram os maiores valores e os intermediários ($p = 1$).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O interesse por estudar a cerâmica de hidroxiapatita explica-se claramente por sua semelhança com a fase mineral do tecido ósseo, gerando tentativas como a inserção de reforços estruturais para tornar possível sua utilização em locais onde exigem grande suporte de cargas. Atualmente isso ainda não é possível devido às baixas propriedades mecânicas da HA quando comparadas a outros biomateriais aplicados nestas regiões, por exemplo, materiais para implantes dentários ou próteses ortopédicas como o titânio, alumina e a zircônia.

Estudos anteriores justificaram a escolha da temperatura para sinterização das amostras à 1300 °C, devido ao menor índice de decomposição da hidroxiapatita (AOKI, 1991; MURALITHRAN, RAMESH, 2000; MEIRA, 2014; PRAKASAM et al., 2015).

Foram observadas alterações de cor visíveis dos grupos com nanomateriais de TiO₂ (Figura 4.14), principalmente com nanotubos, caracterizando-se como uma desvantagem caso a utilização do material envolva a questão estética, isto é decorrente da instabilidade de cor que a adição de materiais metálicos pode gerar em altas temperaturas (CHEN et al., 2012).

A utilização de nanoestruturas para aumentar as propriedades mecânicas da HA é justificada pelo mecanismo de deflexão da trinca, mostrado por Fabert e Evans (1983). Este mecanismo é baseado no aumento da tenacidade à fratura devido à deflexão da trinca pelas nanopartículas. O perfil de trinca de materiais com nanopartículas adicionadas, mostra padrão de deflexão, correspondeu aproximadamente ao tamanho de grão das nanopartículas, enquanto materiais sem nanopartículas adicionados, mostram padrões de trincas bastante suaves comparados com os outros (FATHI, et al., 2014). No entanto, é importante notar que quanto maior a temperatura de queima das cerâmicas, maior a possibilidade de densificação e aglomeração de nanopartículas (FABERT, EVANS, 1983). O processo de aglomeração e densificação pode influenciar a microestrutura, diminuindo a resistência mecânica, gerando esforços internos localizados, resultando em trincas submicrométricas (críticas) (YOSHIDA et al., 2017).

Elementos químicos evidenciados pelo EDX nas amostras como potássio, estrôncio, zircônia possivelmente foram provenientes do processo de moagem por meio dos reagentes, jarros e esferas de zircônia.

Os padrões de DRX deste estudo evidenciaram os picos de maiores e menores intensidades comprovando que a hidroxiapatita se apresenta como fase majoritária e concordam com os dados encontrados em outros trabalhos (AMINZARE et al., 2013, RAMESH et al., 2013).

A ocorrência de fosfato de cálcio, observado na análise por DRX, é bastante comum durante o processamento da HA e não interfere na sua bioatividade, apesar da literatura apresentar menores valores de dureza (AOKI, 1991).

As fases anatase, rutila e brookita do TiO_2 , wurtzita, blenda de zinco e sal-gema do ZnO não puderam ser identificadas. Os padrões de espectros encontrados de fusão atômica entre os componentes de HA e nanopartículas / nanotubos, resultaram na uma formação de fases secundárias, caracterizando um novo material como uma solução sólida. Algumas soluções sólidas são mais fracas que outras.

As imagens do MEV mostram que a fusão atômica pode ter aumentado o tamanho dos grãos e causado alguns poros (Figura 5.4). Relatos na literatura abordaram sobre a redução da densidade no composto Y-TZP / TiO_2 através da adição de TiO_2 evidenciando a incorporação do TiO_2 como possível causa da formação de poros no material (MIRANDA et al., 2018). No entanto, existe a possibilidade de reduzir a quantidade de porosidade dentro do material, otimizando o tempo de sinterização e as temperaturas (MIAO et al., 2004; MIRANDA et al., 2018). Quanto maior o tamanho dos grãos, menor a força de coesão. Para o grupo HA/ TiO_2 np5% esta fusão não afetou as propriedades mecânicas, pois apresentou os melhores resultados de resistência à flexão e confiabilidade de Weibull, não havendo diferença com a HA pura e aumentando a dureza Vickers. Resultados anteriores apresentados por Magalhães et al. (2018) mostraram que a incorporação de nanotubos de TiO_2 em Y-TZP pode influenciar a estrutura do material. O aumento dos valores de m resultou em uma confiabilidade maior que a do Y-TZP comercial, apesar da diminuição na resistência à flexão. Resultados semelhantes foram encontrados ao adicionar TiO_2 como reforço na Y-TZP (QUE et al., 2008). No entanto, um maior m prediz maior previsibilidade no comportamento mecânico de materiais cerâmicos

(YOSHIMURA et al., 2007). Este fato reforça a teoria de que as nanopartículas de TiO_2 como nanoestruturas de reforço, é uma opção melhor, em comparação às outras nanoestruturas testadas em estudos anteriores (KALITA, QIU, VERMA, 2008; KALITA, SOMANI, 2010; REZAEI, KHOIE, LIU, 2011).

Para avaliar a resistência mecânica de materiais frágeis com as amostras em forma de disco, o teste de resistência à flexão biaxial tem sido o mais confiável (REZAEI, KHOIE, LIU, 2011).

De acordo com Anusavice, Shen e Rawls (2012), a dureza é uma resistência de um material a uma deformação plástica que é tipicamente produzida por uma força de endentação. Quanto à dureza do HA, os maiores valores de VH são representados por HA/ TiO_2 np1% e HA/ TiO_2 np2% sendo semelhantes entre si, mas diferentes dos demais materiais de maior valor HA/ZnOnp2%, HA/ZnOnp5% e HA/ TiO_2 np5%. Numericamente, pode-se observar que os grupos com adição de nanopartículas de TiO_2 apresentaram os maiores valores, tendo HA/ TiO_2 np1% e HA/ TiO_2 np2% os valores mais altos comparando com os demais. HA/ TiO_2 np5% apresentou resultado intermediário de dureza, porém, maior que a HA pura.

Estudos feitos por Kanazawa (1989) e Suchanek e Yoshimura (1998) encontraram valores de dureza para hidroxiapatita densa entre 3 e 7 GPa (305,9 e 713 HV). Os resultados obtidos no presente estudo permaneceram nessa faixa de valores, com exceção dos grupos com 5% de nanotubos de TiO_2 e 1% de nanopartículas de ZnO que demonstraram valores abaixo de 3 GPa.

Estudo anterior relatado por Shirdar et al. (2016) demonstrou que os nanotubos de TiO_2 adicionados em HA podem aumentar a dureza. Estes resultados foram semelhantes com outros estudos com incorporação de nanopartículas de TiO_2 em HA (OKTAR, 2006; QUE et al., 2008). Em confirmação à literatura, no presente estudo foram observados os melhores resultados de dureza nos materiais contendo nanopartículas de TiO_2 . Entretanto, os nanotubos de TiO_2 influenciaram em valores baixos comparados à HA pura, divergindo assim do estudo de Shirdar et al. (2016). Isto pode ser explicado pela formação de poros resultantes de uma fundição do TiO_2 em alta temperatura. Os resultados foram decrescentes ao aumentando a porcentagem de TiO_2 . Segundo Rempel et al. (2016), a diminuição do tamanho dos grãos influencia o aumento dos resultados de dureza. Esse resultado foi semelhante

aos apresentados pelo grupo experimental HA/TiO₂np5%, com tamanhos menores de grãos comparados aos outros grupos (Figura 5.4I).

A associação do zinco às cerâmicas de fosfato de cálcio tem sido relatada na literatura há mais de uma década e vem mostrando melhora nas propriedades biológicas (WEBSTER et al., 2002; KAWAMURA et al., 2003; WEBSTER, 2004; ITO et al., 2000; ITO et al., 2005; SHEPHERD, BEST, 2008; TANG et al., 2009). Neste estudo o aumento da concentração de ZnO demonstrou aumento nos valores da dureza (Tabela 5.2), porém isso não foi observado para os resultados da resistência à flexão biaxial, uma vez que dentre todos os grupos, aquele contendo 5% de nanopartículas de ZnO apresentou os menores valores junto ao grupo com 2% de nanopartículas de TiO₂.

O uso de nanopartículas de TiO₂ parece ser promissor uma vez que vem demonstrado o aumento de resultados mecânicos comparadas à outras nanoestruturas de reforço.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A incorporação de nanopartículas de TiO_2 na cerâmica densa de HA bovina melhorou os resultados, aumentando as propriedades mecânicas e preservando a estrutura cristalográfica da HA. A porcentagem de 5% de nanopartículas de TiO_2 demonstrou ser a melhor combinação, sendo o grupo experimental com menor tamanho de grãos e baixa quantidade de poros. Além disso, este grupo apresentou valores maiores de σ_0 e m , com maior previsibilidade aos materiais cerâmicos. Esses resultados preveem que o aumento na porcentagem de nanopartículas de TiO_2 pode ser promissor para novas pesquisas sobre a melhoria das propriedades mecânicas de cerâmicas à base de HA.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO 14001 – Sistema de gestão ambiental: requisitos com orientações para uso. 2 ed. Rio de Janeiro, 2004.

Alhoshan MS, BaQais AA, Al-Hazza MI, Al-Mayouf AM. Heat treatment and electrochemical activation of titanium oxide nanotubes: The effect of hydrogen doping on electrochemical behavior. *Electrochimica Acta*. 2012; 62: 390-95.

Altomare M, Dozzi MV, Chiarello GL, Di Paola A, Palmisano L, Selli E. High activity of brookite TiO₂ nanoparticles in the photocatalytic abatement of ammonia in water. *Catalysis Today* 2015; 252:184-89.

Alvarenga RL, Akaki E, Souza ACRA, Souza LN. Reabilitação de mandíbula atrofica com implantes curtos e placa de titânio: apresentação de um caso clínico. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*. 2013; 54(4): 217-21.

Aminzare M, Eskandari A, Baroonian MH, Berenov A, Razavi Hesabi Z, Taheri M, et al. Hydroxyapatite nanocomposites: Synthesis, sintering and mechanical properties. *Ceram Int*. 39 (2013; 39: 2197-206.

Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. *Phillips' Science of dental materials*, 12 ed. 2012.

Aoki H. *Science and Medical Applications of Hydroxyapatite*. Japanese Association of Apatite Science, Takayama Press System Centre, Tokyo, 1991; 214p.

Araújo PPP, Costa LP. Impactos ambientais nas atividades de abate de bovinos: um estudo no matadouro público municipal de Caicó-RN. *Holos* 2014; 1-20.

Arruda LB, Santos CM, Orlandi MO, Schreiner WH, Lisboa-Filho PN. Formation and evolution of TiO₂ nanotubes in alkaline synthesis. *Ceram Int* 2015; 41(2):2884-91.

Bagambisa FB, Joos U, Schilli W. Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* 1993; 27:1047-55.

Barros FD, Licca EA. A reciclagem de resíduos de origem animal: uma questão ambiental. *Revista Nacional da Carne*, São Paulo, 2007; 31(365): 166-72.

Baur WH. Atomabstfinde und Bindungswinkel im Brookit, TiO_2 . Acta Cryst 1961; 14: 214-16.

Bavykin DV, Friedrich JM, Walsh FC. Protonated Titanates and TiO_2 Nanostructured Materials: Synthesis, Properties, and Applications. Advanced Materials. 2006; 18(21): 2807-24.

Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics, past, present and for the future. J Eur Ceram Soc. 2008; 28:1319-27.

Binner,J, Vaydhianathan B. Processing of bulk nanostructured ceramics. J Eur Ceram Soc. 2008; 28: 1329-39.

Bousslama N, Ayed FB, Bouaziz J. Effect of fluorapatite additive on densification and mechanical properties of tricalcium phosphate. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. 2010; 3: 2-13.

Brammer KS, Frandsen CJ, Jin S. TiO_2 nanotubes for bone regeneration. Trends in Biotechnology. 2012; 30: 315-22.

Burns K, Yao C, Webster TJ. Increased chondrocyte adhesion on nanotubular anodized titanium. J Biomed Mater Res A. 2009 Mar 1;88(3):561-8.

Carrodeguas RG, Mondejar SP, Santos LA, Rigo ECS, Boschi AO. Cimentos de fosfato de cálcio. Biotecnologia 1999; 10:30-32.

Cao H, Liu X. Activating titanium oxide coatings for orthopedic implants. Surface & Coatings Technology. 2013; 233: 57-64.

Carter CB, Norton MG. Ceramic Materials: Science and Engineering. Springer Science & Business Media, New York, 2007.

Carús LA, Bento L, Bragança SR. Avaliação do comportamento reológico de suspensões de ossos bovinos calcinados. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Cerâmica 2013; 59: 539-44.

Chen L, Shen H, Suh I. Antibacterial dental restorative materials: a state-of-the-art review. Am J Dent 2012; 25(6): 337-46.

Chen X, Mao SS. Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications, and applications. Chemical Reviews 2007; 107(7): 2891-959.

Cheng LC, Jiang X, Wang J, Chen C, Liu RS. Nano-bio effects: interaction of nanomaterials with cells. *Nanoscale* 2013; 5: 3547–69.

Chiang TC, Fang CH, Shang WK, Yang FC. The effect of C₆₀ on the ZnO-nanorod surface in organic–inorganic hybrid photovoltaics. *Solar Energy Materials and Solar Cells* 2011, 95: 740.

Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24 Suppl:237-59.

Cibim DD, Saito MT, Giovani PQ, Borges AFS, Pecorari VGA, Gomes OP, Lisboa-Filho PN, Nociti-Junior FH, Puppini-Rontani RM, Kantovitz KR. Novel Nanotechnology of TiO₂ Improves Physical-Chemical and Biological Properties of Glass Ionomer Cement. *J Biomat* 2017; 1-11.

Diebold U. The surface science of titanium dioxide. *Surface Science Reports*, 2003; 48(5-8): 53–229.

Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev*. 2012; 41: 2740-79.

Dubok VA. Bioceramics ¾ yesterday, today, tomorrow. *Powder Metall. Metal Ceram*. 2000; 39: 7-8.

Eanes ED. Crystals growth of mineral phases in skeletal tissues. *Prog. Crystal Growth Character Mater*. 1980; 3:3-15.

Elliot JC. Structure and chemistry of the apatite and other calcium orthophosphates, Amsterdam, Ed. Elsevier, 1994.

Fabert KT, Evans AG. Crack deflection processes – I. Theory. *Acta Metallurgica* 1983; 31(4): 565-76.

Fang Z, Feng Q, Tan R. *In situ* grown hydroxyapatite whiskers reinforced porous HA bioceramic. *Ceram Int* 2013; 39: 8847-52.

Fathi H, Miller C, Stokes C, Johnson A. The effect of ZrO₂ and TiO₂ on solubility and strength of apatite–mullite glass–ceramics for dental applications. *J Mater Sci: Materials in Medicine*. 2014; 25(3): 583-94.

Feltre R. Química Geral. São Paulo: Editora Moderna, Vol 1; 6 Ed, 2004.

Fortulan, CA. Compósito alumina-zircônia: obtenção através de conformação coloidal e caracterização microestrutural. Relatório de Pós-doutorado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.82p.

Fortuny A, Bengoa C, Font J, Fabregat A. Bimetallic catalysts for continuous catalytic wet air oxidation of phenol. *J Hazard Mater* 1999; 64(2):181-93.

Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, Constantz BR, Ross J. “Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites”, *Biomaterials*. 2002; 23: 751-55.

Galdino AGS. Produção e Caracterização de Arcabouços Porosos de compósitos Hidroxiapatita-Titânia (HA-TiO₂) para Uso em Engenharia Tecidual Óssea. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Mecânica – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

Gao Q, Wu X, Fan Y. The effect of iron on the anatase–rutile phase transformation of titania (TiO₂) in mica–titania pigments. *Dyes and Pigments*, 2012; 95: 96-101.

Gleiter H. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta Mater*. 2000; 48: 1-29.

Gracis S, Thompson VT, Ferencz JL, Silva NFRA, Bonfante EA. A new classification system for all-ceramic and ceramic-like restorative materials. *J Prosthodont* 2015; 28:227–235.

Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Jallot E, Nedelec JM, Guenounou M, Laurent-Maquin D, et al. Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3195-200.

Haggerty JES, Schelhas LT, Kitchaev DA, Mangum JS, Garten LM, Sun W, et al. High-fraction brookite flms from amorphous precursors. *Scient Report* 2017; 7 (15232): 1-11.

Hanks T, Atkinson BL. Comparison of cell viability on anorganic bone matrix with or without P-15 cell binding peptide. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(19):4831-6.

Hench L. Bioceramics, from concept to clinic. *J Am Ceram Soc*. 1991; 74:1487-510.

Hench LL, Wilson J. Introduction to Bioceramics. World Scientific Publishing Co., 1ed. 1993.

Hench LL. An Introduction to bioceramics. World Scientific Publishing Co Pte Ltd; 2 Ed, 2013.

Hulbert SF, Cooke FW. J Biomed Mater Symp. 1970; 4:1.

Hulbert SF, Bokros JC, Hench LL, Wilson J, Heimke G. Ceramics in clinical applications past, present and future. High Tech Ceramics, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1987: 189-213.

Ito A, Ojima K, Naito H, Ichinose N, Tateishi T. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. J Biomed Mater Res. 2000 May;50(2):178-83.

Ito A, Otsuka M, Kawamura H, Ikeuchi M, Ohgushi H, Sogo Y et al. Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation. Current Applied Physics. 2005; 5:402-406.

Jabbour ABL, Jabbour CJC. Gestão ambiental nas organizações: fundamentos e tendências. São Paulo: Atlas, 2013.

Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg. 2012 Jan;41(1):114-20.

Jomini S, Labille J, Bauda P, Pagnout C. Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO₂ nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO₂-based nanocomposite. Toxicol Lett. 2012 Nov 23;215(1):54-61.

Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. FEMS Microbiol Lett 2008; 279:71–6.

Kalita SJ, Rokusek D, Bose S, Hosick HL, Bandyopadhyay A. Effects of MgO-CaO-P₂O₅-Na₂O-based additives on mechanical and biological properties of hydroxyapatite. J Biomed Mater Res A. 2004 Oct 1;71(1):35-44.

Kalita SJ, Bhatt HA. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: synthesis and characterization. Mater Sci Eng C. 2007; 27: 837-48.

Kalita SJ, Qiu S, Verma S. A quantitative study of the calcination and sintering of nanocrystalline titanium dioxide and its flexural strength properties. Mat Chem Phys. 2008;109(2):392-98.

Kalita SJ, Somani V. Al₂TiO₅–Al₂O₃–TiO₂ nanocomposite: Structure, mechanical property and bioactivity studies. *Mat Res Bul.* 2010; 45(12):1803-10.

Kanazawa T. Inorganic phosphate materials. 2 ed. Tokyo, Kodansha, 1989. 288p.

Kasuga T, Formation of titanium oxide nanotubes using chemical treatments and their characteristic properties, *Thin Solid Films.* 2006; 496: 141-45.

Kasuga T, Hiramatsu M, Hoson A, Sekino T, Niihara K. Formation of titanium oxide nanotube, *Langmuir.* 1998; 14: 3160-63.

Kawachi EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova* 2000; 23:518-22.

Kawamura H, Ito A, Muramatsu T, Miyakawa S, Ochiai N, Tateishi T. Long-term implantation of zinc-releasing calcium phosphate ceramics in rabbit femora. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Jun 15;65(4):468-74.

Kityakarn S, Worayingyong A, Suramitr A, Smith MF. Ce-doped nanoparticles of TiO₂: Rutile-to-brookite phase transition and evolution of Ce local-structure studied with XRD and XANES. *Materials Chemistry and Physics.* 2013; 139:543-49.

Khor KA, Gu YW, Pan D, Cheang P. Microstructure and mechanical properties of plasma sprayed HA/YSZ/Ti-6Al-4V composite coatings. *Biomater.* 2004; 25: 4009-17.

Kodama A, Bauer S, Komatsu A, Asoh H, Ono S, Schmuki P. Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO₂ nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite. *Acta Biomater.* 2009 Jul; 5(6):2322-30.

Kong Y-M, Bae C-J, Lee S-H, Kim H-W, Kim H-E. Improvement in biocompatibility of ZrO₂–Al₂O₃ nano-composite by addition of HA. *Biomaterials.* 2005; 26: 509-17.

Kramer FJ, Sinikovic B, Mueller M, Rahmstorf M, Schierle H. Experimental application of a biomaterial in bifocal transport osteogenesis for craniofacial reconstruction. *J Craniomaxillofac Surg.* 2008 Jun;36(4):218-26.

Kumar R, Prakash KH, Cheang P, Khor KA. Microstructure and mechanical properties of spark plasma sintered zirconia-hydroxyapatite nano-composite powders. *Acta Mater.* 2005; 53: 2327-35.

Kwon YJ, Kim HK, Lim CS, Shim KB. Characterization of ZnO nanopowders synthesized by the polymerized complex method via an organochemical route. *J Ceram Process Res* 2002; 3(3): 146-49.

Lacout, JL. "Calcium phosphate as bioceramics" in *Biomaterials-Hard Tissue Repair and Replacement*. Elsevier Science Publishers, 1992: 81-95.

Liu DM. Control of pore geometry on influencing the mechanical property of porous hydroxyapatite bioceramic. *J Mater Sci Lett*. 1996; 15: 419-21.

Liu C, Wang W, Shen W, Chen T, Hu L, Chen Z. Evaluation of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite, *J of Endodontics*. 1997; 23(8): 490-93.

Ma Q, Li M, Hu Z, Chen Q, Hu W. Enhancement of the bioactivity of titanium oxide nanotubes by precalcification. *Materials Letters*. 2008; 62(17-18): 3035-38.

Magalhães APR, Fortulan CA, Lisboa-Filho PN, Ramos-Tonello CM, Gomes OP, Cesar PF, Fukushima KA, Mondelli RFL, Borges AFS. Effects of Y-TZP blank manufacturing control and addition of TiO₂ nanotubes on structural reliability of dental materials. *Ceramics International*. 2018; 44(3):2959-67.

Makumire S, Chakravadhanula VSK, Köllisch G, Redel E, Shonhai A. Immunomodulatory activity of zinc peroxide (ZnO₂) and titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles and their effects on DNA and protein integrity *Toxicology Letters*, 2014; 227:56-64.

Mattar EPL, Frade-Júnior EF, Oliveira E. Caracterização físico-química de cinza de osso bovino para avaliação do seu potencial uso agrícola. *Pesq Agropec Trop*, Goiânia, jan/mar 2014; 44 (1): 65-70.

Meira, CR. Processamento de hidroxiapatita bovina associada com prototipagem rápida visando implantes ósseos. Tese de Doutorado em Engenharia Mecânica – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2014.

Metsger DS, Rieger MR, Foreman DW. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic. *J Mater Sci Mater Med*. 1999 Jan;10(1):9-17.

Miao X, Sun D, Hoo PW, Liu J, Hu Y, Chen, Y. Effect of titania addition on yttria-stabilised tetragonal zirconia ceramics sintered at high temperatures. *Ceram Intern*. 2004; 30(6):1041-47.

Miranda RBP, Miranda WG, Lazar DRR, Ussui V, Marchi J, Cesar PF. Effect of titania content and biomimetic coating on the mechanical properties of the Y-TZP/TiO₂ composite. *Dent Mater*. 2018; 34(2): 238-45.

Moonga BS, Dempster DW. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res*. 1995 Mar;10(3):453-7.

Mor GK, Shankar K, Paulose M, Varghese OK, Grimes CA. Use of highly-ordered TiO₂ nanotube arrays in dye-sensitized solar cells. *Nano Lett*. 2006 Feb;6(2):215-8.

Muralithran K, Ramesh S. The Effects of Sintering Temperature on the Properties of Hydroxyapatite. *Ceram Int*. 2000; 26(2):221-30.

Nair S, Sasidharan A, Divya Rani VV, Menon D, Nair S, Manzoor K, et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J Mater Sci Mater Med* 2009 Dec; 20 Suppl 1: 235-41.

Nath S, Dey A, Mukhopadhyay AK, Basu B. Nanoindentation response of novel hydroxyapatite-mullite composites. *Mater Sci Eng A*. 2009; 513-514: 197-20.

Nevins ML, Camelo M, Lynch SE, Schenk RK, Nevins M. Evaluation of periodontal regeneration following grafting intrabony defects with bio-oss collagen: a human histologic report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003 Feb;23(1):9-17.

Niinomi M. Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2003; 4: 445-54.

Ning CQ, Zhou Y. On the microstructure of biocomposites sintered from Ti, HA and bioactive glass. *Biomaterials*. 2004; 25(17):3379-87.

Oktar FN. Hydroxyapatite TiO₂ composites. *Mater Lett*. 2006; 60(17-18):2207-10.

Oguchi H, Ishikawa K, Mizoue K, Seto K, Eguchi G. Long term histological evaluation of hydroxyapatite ceramics in humans. *Biomaterials* 1995; 16 (1):33-8.

Oréfice RL, Pereira MM, Mansur HS. *Biomateriais: fundamentos e aplicações*, Cultura Médica, São Paulo, 2006.

Pacheco JW. *Guia técnico ambiental de frigoríficos – industrialização de carnes (bovina e suína)*. São Paulo: CETESB, 2008.

Pacheco JW; Yamanaka HT. Guia técnico ambiental de abates (bovino e suíno). São Paulo: CETESB, 2006.

Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. Sci Technol Adv Mater 2008 Sep 1; 9(3): 035004.

Parcharoen Y, Kajitvichyanukul P, Sirivisoot S, Termsuksawad P. Hydroxyapatite electrodeposition on anodized titanium nanotubes for orthopedic applications. Appl Surf Sci. 2014; 311:54-61.

Perez-Lopes OW, Faria AC, Marcilio NR, Bueno JMC. The catalytic behavior of zinc oxide prepared from various precursors and by different methods. Materials Research Bulletin. 2005; 40(12):2089-99.

Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Aldini NN, Fini M, Parrilli A, et al. Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. Biomaterials. 2010 May;31(13):3527-35.

Pires LA. Resposta *in vitro* de células pré-osteoblásticas em cerâmica de Hidroxiapatita. Dissertação de mestrado – Faculdade de odontologia de Bauru, Universidade Federal de São Paulo, Bauru. 2015: 67- 81.

Prakasam M, Locs J, Salma-Ancane K, Loca D, Largeau A, Berzina-Cimdina L. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. 2015; J Funct Biomater. 2015; 6:1099-140.

Que W, Khor KA, Xu JL, Yu LG. Hydroxyapatite/titania nanocomposites derived by combining high-energy ball milling with spark plasma sintering processes. J Eur Ceram Soc. 2008; 28(16):3083-90.

Rabelo MHS, Silva EK, Peres AP. Análise de modos e efeitos de falha na avaliação dos impactos ambientais provenientes do abate animal. Eng Sanit Ambient 2014; 19(1): 79-86.

Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. Langmuir 2011 Apr 5; 27(7): 4020-8.

Ramalho MAF. Avaliação da proporção de ácido cítrico/metálico no tamanho da partícula de ZnO preparados pelo método de Pechini. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Engenharia de Materiais, 2004.

Ramesh S, Tan CY, Tolouei R, Amiriyani M, Purbolaksono J, Sopyan I, Teng WD. Sintering behavior of hydroxyapatite prepared from different routes. *Mater Des* 2012; 34:148-54.

Ramesh S, Aw KL, Tolouei R, Amiriyani M, Tan CY, Hamdi M, et al. Sintering properties of hydroxyapatite powders prepared using different methods. *Ceram Int*. 2013; 39(1): 111-19.

Ramos-Tonello CM, Lisboa-Filho PN, Arruda LB, Tokuhara CK, Oliveira RC, Furuse AY, Rubo JH, Borges AFS. Titanium dioxide nanotubes addition to self-adhesive resin cement: Effect on physical and biological properties. *Dent Mat* 2017; 33: 866–75.

Rana S, Rawat J, Sorensson MM, Misra RDK. Antimicrobial function of Nd³⁺-doped anatase titania-coated nickel ferrite composite nanoparticles: a biomaterial system. *Acta Biomater* 2006; 2(4): 421-32.

Ravarian R, Moztaezadeh F, Solati Hashjin M, Rabiee SM, Khoshakhlagh P, Tahriri M. Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceram Int* 2010; 36 (1): 291-97.

Ravi V, Pasricha R, Dhage SR. Synthesis of fine particles of ZnO at 100 °C. *Materials Letters* 2004; 59: 779-81.

Rempel SV, Bogdanova EA, Valeeva AA, Schroettner H, Sabirzyanov NA, Rempel AA. Microhardness and phase composition of TiO₂/hydroxyapatite nanocomposites synthesized under low-temperature annealing conditions. *Inorg Mat*. 2016; 52(5):476-82.

Rezaee M, Khoie SMM, Liu KH. The role of brookite in mechanical activation of anatase-to-rutile transformation of nanocrystalline TiO₂: An XRD and Raman spectroscopy investigation. *Cryst Eng Comm J*. 2011; 13(16): 5055-61.

Riminucci M, Bianco P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Aug;36(8):1027-36.

Rodrigues CVM, et al. Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2003; 4987-97.

Roy P, Berger S, Schmuki P. TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011; 50(13): 2904-39.

Salman S, Gunduz O, Yiumaz S, Oveçoglu ML, Snyder RL, Agathopoulos S, et al. Sintering effect on mechanical properties of composites of natural hydroxyapatites and titanium. *Ceram Int*. 2009; 35: 2965-71.

Sebdani MM, Fathi MH. Preparation and characterization of hydroxyapatite–forsterite–bioactive glass nanocomposite coatings for biomedical applications. *Ceram Int* 2012; 38: 1325-30.

Shepherd D, Best S. Production and characterization of zinc substituted hydroxyapatite. *Key Eng Mater*. 2008; 361-363: 159-62.

Shirdar MR, Taheri MM, Sudin I, Shafaghat A, Keyvanfar A, Abd. Majid MZ. In situ synthesis of hydroxyapatite grafted titanium nanotube composite. *J Experim Nanosc*. 2016; 11(10): 816-22.

Siddigi A, Khan AS, Zafar S. Thirty Years of Translational Research in Zirconia Dental Implants: A Systematic Review of the Literature. *J Oral Implantol* 2017 Aug;43(4):314-325.

Simoni GM, Silva AW. As características físico-químico-biológicas dos biomateriais e suas consequências na saúde humana em aplicações de próteses dentárias. *Revista Técnico - Científica do IFSC*. 2013; 2: 231-40.

Soares DGS, Basso FG, Hebling J, Souza PPC, Costa CAS. Teste de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. Em: Estrela C. *Metodologia Científica: Ciência, ensino, pesquisa*. 3 ed. Artes Médicas. 2018; 436p.

Sopyan I, Ramesh S, Nawawi NA, Tampieri A, Sprio S. Effects of manganese doping on properties of sol-gel derived biphasic calcium phosphate ceramics. *Ceram Int*. 2011; 37: 3703-15.

Storrie H, Stupp SI. Cellular response to zinc-containing organoapatite: an in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5492-9.

Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res*. 1998; 13: 94-117.

Takahashi K, Yoshikawa A, Sandhu A. *Wide Bandgap Semiconductors: Fundamental Properties and Modern Photonic and Electronic Devices*. Springer, 2007.

Tang Y, Chappell HF, Dove MT, Reeder RJ, Lee YJ. Zinc incorporation into hydroxylapatite. *Biomaterials*. 2009 May;30(15):2864-72.

Tong DC, Rioux K, Drangsholt M, Beirne OR. A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis. *Int J Ora Maxillofac Implants*. 1998; 13:175-82.

Uemura T, Dong J, Wang Y, Kojima H, Saito T, Iejima D, et al. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. *Biomaterials*. 2003 Jun;24(13):2277-86.

Vallet-Regí M, González-Calbet JM. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry*. 2004; 32(1-2):1-31.

Wang Y, Herron N. Chemical effects on the optical properties of semiconductor particles. *The J Phys Chem*. 1987, 91, 5005.

Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 2003 Jun;24(13):2133-51.

Wang N, Li H, Lü W, Li J, Wang J, Zhang Z, et al. Effects of TiO₂ nanotubes with different diameters on gene expression and osseointegration of implants in minipigs. *Biomaterials*. 2011 Oct;32(29):6900-11.

Wang T, Jiang H, Wan L, Zhao Q, Jiang T, Wang B, et al. Potential application of functional porous TiO₂ nanoparticles in light-controlled drug release and targeted drug delivery. *Acta Biomater* 2015; 13:354-63.

Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Bizios R. Hydroxyapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium II: mechanisms of osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res Part A*. 2002; 59(2): 312-17.

Webster TJ1, Massa-Schlueter EA, Smith JL, Slamovich EB. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations. *Biomaterials*. 2004 May; 25(11):2111-21.

Wei X, Yang Z, Tay SL, Gao W. Photocatalytic TiO₂ nanoparticles enhanced polymer antimicrobial coating. *Appl Surf Sci*. 2014; 290:274-79.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008; 29(20):2941-53.

Yelten A, Yilmaz S, Oktar FN. Sol-gel derived alumina-hydroxyapatite-tricalcium phosphate porous composite powders. *Ceram Int.* 2012; 38: 2659-65.

Yoshida K, Nishiyama N, Shinoda Y, Akatsu T, Wakai F. Evaluation of effects of crack deflection and grain bridging on toughening of nanocrystalline SiO₂ stishovite. *J Euro Cer Soc.* 2017; 37(15): 5113-17.

Yoshimura HN, Molisani AL, Narita NE, Cesar PF, Goldenstein H. Porosity Dependence of Elastic Constants in Aluminum Nitride Ceramics. *Mater Research.* 2007;10(2):127-33.

Zarbin AJG. Química de (nano)materiais. *Quim Nova* 2007; 30(6): 1469-79.

Zwilling V, Darque-Ceretti E, Boutry-Forveille A, David D, Perrin MY, Aucouturier M. Structure and physicochemistry of anodic oxide films on titanium and TA6V alloy. *Surface and Interface Analysis.* 1999; 27(7): 629-37.

ANEXOS

ANEXO A

DECLARAÇÃO

PRT 05/2015

Declaramos que o projeto intitulado: "Estudo comparativo da qualidade óssea de bovinos das raças Canchim e Nelore, baseado na estrutura cristalina da hidroxiapatita", usando animais *Bos taurus indicus* e mestiços com *B. t. taurus*, sob responsabilidade da pesquisador científico Rymer Ramiz Tullio, está de acordo com os princípios éticos e de experimentação animal da Embrapa Pecuária Sudeste e foi aprovado pela referida instituição (We hereby declare that the research: "Comparative study of bone quality of Canchim and Nelore beef cattle, based on the crystal structure of hydroxyapatite", utilizing *Bos taurus indicus* and crossbred with *B. t. taurus* species, under the responsibility of the scientific researcher Rymer Ramiz Tullio, is in agreement with ethical principles of animal experimentation of Embrapa Southeast Livestock and was approved to be carried out at that institution).

São Carlos, 10 de setembro de 2015.

Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rod. Washington Luiz, km 234 Caixa Postal 339 13560-970 São Carlos, SP
Telefone (16) 3411-56100 - Fax (16) 3361-6754

Pecuária Sudeste

CEUA -PRT 05/2015

Nome do projeto: "Estudo comparativo da qualidade óssea de bovinos das raças Canchim e Nelore, baseado na estrutura cristalina da hidroxiapatita".

PARECER DO RELATOR 1

APROVADO (X) APROVADO COM RESTRIÇÕES () REPROVADO ()

Justificativa: No projeto descrito serão retiradas 20 amostras, 10 da raça Canchim e 10 da raça Nelore, do osso metatarso trabecular seco, de animais abatidos aos 24 meses de idade. Análises posteriores desse material serão realizadas em microscopia e demais técnicas descritas. As amostras serão coletadas de animais cujos abates já estavam previstos e autorizados em outros dois projetos 02.12.02.008.00.00 (projeto ADAPT+, para animais da raça Canchim) e projeto BASF.

O projeto pode ser classificado como G11 = Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse e ainda poderá proporcionar a produção em escala comercial de hidroxiapatita orgânica, contribuindo na área médica e odontológica.

Nome: Ana Carolina de Souza Chagas

Assinatura: Ana Carolina Chagas

Data: 21/08/2015

PARECER DO RELATOR 2

APROVADO (X) APROVADO COM RESTRIÇÕES () REPROVADO ()

Justificativa: O projeto propõe o aproveitamento de mais um tecido (ossos) após o abate dos bovinos, além dos tecidos previamente previstos e aprovados em outros projetos pela CEUA, que também aprovou as condições de criação e abate dos animais.

Nome: Simone Cristina Méo Niciura

Assinatura: Simone Cristina Méo Niciura

Data: 10/09/2015

PARECER DA CEUA da Embrapa Pecuária Sudeste

APROVADO (X) APROVADO COM RESTRIÇÕES () REPROVADO ()

Justificativa: Acato os pareceres apresentados pelos consultores.

Nome: Márcia Cristina de Sena Oliveira

Assinatura da Presidente da Comissão: Márcia Cristina de Sena Oliveira

Data: 10/09/2015