UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
MATERIAIS

KÁTIA HELENA DOS SANTOS

**Estudo da adesão e uniformidade do revestimento de fosfato de cálcio no
nanocompósito de alumina-zircônia**

KÁTIA HELENA DOS SANTOS

**Estudo da adesão e uniformidade do revestimento de fosfato de cálcio
nanocompósito de alumina-zircônia**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais Voltados à Agroindústria.

Orientador: Profa. Dra. Eliria M. J. Agnolon Pallone.

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S194e Santos, Kátia Helena dos
Estudo da adesão e uniformidade do revestimento
de fosfato de cálcio no nanocompósito de alumina-
zircônia / Kátia Helena dos Santos ; orientadora
Eliria Maria de Jesus Agnolon Pallone. --
Pirassununga, 2016.
153 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia e Ciência de Materiais) -- Faculdade
de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo.

1. tratamentos superficiais. 2. nanocompósitos.
3. alumina-zircônia. 4. fosfatos de cálcio. 5.
recobrimento biomimético. I. Pallone, Eliria Maria
de Jesus Agnolon , orient. II. Título.

KÁTIA HELENA DOS SANTOS

**Estudo da adesão e uniformidade do revestimento de fosfato de cálcio no
nanocompósito de alumina-zircônia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais Voltados à Agroindústria.

Data de aprovação: 12/08/2015

Banca Examinadora:

Eliria Maria de Jesus Agnolon Pallone – Presidente da Banca Examinadora
Profa. Dra. Eliria Maria de Jesus Agnolon Pallone - Orientador(a)

Dr. Anderson de Oliveira Lobo
Prof. Universidade do Vale do Paraíba

Dr. Clodomiro Alves Júnior
Prof. Universidade Federal Rural do Semi-árido

Dra. Vera Lúcia Arantes
Profa. Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha saúde, sabedoria, discernimento e principalmente pelo seu amparo nos momentos difíceis.

À orientadora Professora Dra. Eliria Maria de Jesus Agnolon Pallone, pela paciência, dinamismo, incentivo na busca de conhecimento e amizade conquistada ao longo do trabalho.

À Dra. Julieta Adriana Ferreira, pelo grande incentivo no ingresso da carreira acadêmica e seu grande e generoso apoio no desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Denise Osiro, que também foi uma grande incentivadora do meu ingresso na carreira acadêmica.

Ao Professor Dr. Gelson José Andrade da Conceição, pela acessibilidade ao Laboratório Integrado de Biocatálise e Síntese, e pela amizade construída ao longo do trabalho.

Ao Professor Dr. Anderson de Oliveira Lobo, da Universidade do Vale do Paraíba, pela presteza e colaboração quanto ao método de recobrimento biomimético.

Ao Professor Dr. Clodomiro Alves Júnior, da Universidade Federal Rural do Semiárido, pela presteza e colaboração quanto ao método de tratamento superficial por plasma.

Ao Laboratório de Caracterização Microestrutural de Materiais (DEMA), da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), pela colaboração nos ensaios de caracterização.

Aos Drs. Rubens Bernardes Filho e Luiz Alberto Colnago da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela presteza e contribuição nas pesquisas.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela contribuição nas análises.

Às minhas amigas Laís Ribeiro Rodrigues Alecrim e Thauane Aparecida Inácio da Costa Sartori, pelo companheirismo, apoio, incentivo e pela grande amizade conquistada ao longo do trabalho.

Aos amigos João Vitor Campos e Isabella Reis Lavagnini, pela amizade adquirida ao longo do trajeto.

Ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FZEA, de modo especial ao técnico Rodrigo, pela atenção e disponibilidade quanto às caracterizações microestruturais realizadas.

Ao Laboratório Multiusuário de Análise de Alimentos da FZEA e a técnica Carla pela presteza.

Ao Laboratório Constrambi e aos técnicos: Diego, Mariana e Zaqueu pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À aluna de iniciação científica Ludmila Ionara dos Santos Nascimento, pelo apoio no desenvolvimento experimental deste trabalho.

Aos meus padrinhos João Rodrigues da Silva e Sueli dos Santos Silva, pelo incentivo no início da minha carreira como química e no ingresso da carreira acadêmica.

Aos meus pais, Reginaldo Alberto dos Santos e Maria Cristina de Oliveira, pelo apoio e incentivo imensurável, no qual eu jamais alcançaria meus objetivos.

Ao meu noivo Flavio Henrique Mauricio, que de modo especial e carinhoso me deu força e coragem, me apoiando nos momentos mais difíceis, me incentivando a nunca desistir, respeitando e apoiando minhas escolhas, e sempre disposto a me ajudar.

Por último, porém não menos importante, à FAPESP pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado concedida – Processo nº 2014/11100-9.

*“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança:
Todo o mundo é composto de mudança,
Tornando sempre novas qualidades.”*

(Luís de Camões)

RESUMO

SANTOS, K.H. **Estudo da adesão e uniformidade do revestimento de fosfato de cálcio em nanocompósito de alumina-zircônia**, 2016. 153f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2016.

Nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$ apresentam-se promissores para serem utilizados como biomateriais, por promoverem melhorias significativas quanto à homogeneidade microestrutural, propriedades mecânicas e serem biologicamente inerte. Dentre as técnicas capazes de tornar seu desempenho biológico mais adequado, o recobrimento biomimético tem se destacado, sendo que sua eficiência pode ser melhorada a partir de prévios tratamentos superficiais. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi estudar a adesão e a uniformidade do revestimento de fosfato de cálcio em nanocompósitos de Al_2O_3 contendo 5% em volume de inclusões nanométricas de ZrO_2 . Para isso, nanocompósitos foram conformados, sinterizados, tratados quimicamente com soluções de H_3PO_4 , HNO_3 e NaOH e por plasma em diferentes condições de processo: 20% N_2 -80% H_2 , 40% N_2 -60% H_2 , 40% N_2 -40% H_2 -20% O_2 , 30% N_2 -50% H_2 -20% O_2 , 100% N_2 e 100% O_2 e recobertos biomimeticamente com soluções que simulam o plasma sanguíneo (SBF 1,5x e 5,0x) nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias de incubação. A partir dos resultados obtidos pode-se observar que os prévios tratamentos superficiais promoveram variações na rugosidade média superficial (R_a) entre 0,045 e 0,079 μm . Além disso, independentemente do tratamento superficial, observou-se a formação de apenas três fases de fosfatos de cálcio: hidroxiapatita (HA), α -fosfato tricálcico (α -TCP) e β -fosfato tricálcico (β -TCP). Observou-se ainda, que o percentual das fases formadas variou de acordo com o tratamento, sugerindo a possibilidade de controlar a razão TCP:HA. Nos resultados obtidos pelo teste de riscamento observou-se que tratamentos realizados com plasma, H_3PO_4 e HNO_3 aumentaram a carga crítica (L_c) entre 2,0 e 2,9N, melhorando assim a aderência da camada de fosfato de cálcio formada. Os testes de proliferação celular utilizando linhagem de células de hamster chinês (CHO) demonstraram que os nanocompósitos tratados com H_3PO_4 , HNO_3 e NaOH e recobertos biomimeticamente com SBF 5,0x são biocompatíveis.

Palavras-chave: tratamentos superficiais, nanocompósitos, alumina-zircônia, fosfatos de cálcio, recobrimento biomimético.

ABSTRACT

SANTOS, K.H. **Study of the adhesion and uniformity of calcium phosphate nanocomposite coating alumina-zirconia**, 2016. 153f. Dissertation (Masters in Engineering and Materials Science) - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil.

Nanocomposite $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$ have to be promising to be used as biomaterials for promoting significant improvements in the microstructural homogeneity, mechanical properties and be biologically inert. Among the techniques to make it more useful biological performance, the biomimetic coating has been highlighted, and its efficiency can be improved from previous surface treatments. In this sense, the objective of this work was to study the adhesion and uniformity of calcium phosphate nanocomposite coating of Al_2O_3 containing 5% by volume of nanometric inclusions of ZrO_2 . For this nanocomposites were shaped, sintered, chemically treated with solutions of H_3PO_4 , HNO_3 and NaOH , and plasma in different process conditions: 20% N_2 -80% H_2 , 40% N_2 -60% H_2 , 40% N_2 -40% H_2 -20% O_2 , 30% N_2 -50% H_2 -20% O_2 , 100% N_2 and 100% O_2 and covered with solutions biomimetic that simulate the blood plasma (SBF 1.5x and 5.0x) in the times of 7, 14, 21 and 28 days of incubation. From the results obtained it can be seen that prior surface treatments promoted variations in average surface roughness (R_a) from 0.045 to 0.079 micrometers. Furthermore, regardless of surface treatment, formation of the observed only three-phase calcium phosphate: hydroxyapatite (HA), tricalcium α -phosphate (α -TCP) and β -tricalcium phosphate (β -TCP). It was also observed that the percentage of phases formed varied according to the treatment, suggesting the possibility of controlling the ratio TCP:HA. In the results obtained by scratching test was observed that plasma treatments performed, HNO_3 and H_3PO_4 increased the critical load (L_c) between 2.0 and 2,9N, thereby improving the adhesion of the calcium phosphate layer is formed. Cell proliferation assays The strain using chinese hamster cells (CHO) have demonstrated that nanocomposites treated with H_3PO_4 , HNO_3 and NaOH , and coated with solution biomimetic SBF 5.0x are biocompatible.

Keywords: surface treatments, nanocomposites, alumina-zirconia, calcium phosphate, biomimetic coating.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Dentes artificiais feitos de concha, Mão protética feita de madeira, Sutura feita de linho.....	18
Figura 3.2 – Representação esquemática da estrutura <i>corundum</i> α - Al_2O_3	21
Figura 3.3 – Representação esquemática da estrutura cristalina da ZrO_2	22
Figura 3.4 – Esquema de classificação dos nanocompósitos de acordo com a dispersão das partículas na matriz	24
Figura 3.5 – Aplicação dos fosfatos de cálcio	27
Figura 3.6 – Representação esquemática da estrutura cristalina da HA	28
Figura 3.7 – Representação esquemática da estrutura cristalina das fases do TCP (a) α -TCP projetado ao longo do eixo a (b) β -TCP projetado ao longo do eixo b.....	30
Figura 3.8 – Representação esquemática das interações do plasma com a superfície.....	34
Figura 3.9 – Representação esquemática do teste de riscamento	40
Figura 3.10 – Mecanismos de falhas de adesão	42
Figura 4.1 – Fluxograma da metodologia utilizada na preparação, conformação e caracterização dos nanocompósitos	47
Figura 5.1 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos (a) visão geral da superfície polida e atacada termicamente e (b) localização dos grãos de ZrO_2 na matriz de Al_2O_3	63
Figura 5.2 – Difratoograma de raios-X da superfície dos nanocompósitos.....	63
Figura 5.3 – Micrografias obtidas por microscopia confocal da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos.....	65
Figura 5.4 – Segunda derivada dos espectros de absorbância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos.....	66
Figura 5.5 – Espectros de absorbância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	69
Figura 5.6 – Difratoogramas de raios-X da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	74
Figura 5.7 – Área total calculada pelos espectros de absorbância de FTIR e as porcentagens das fases calculadas por DRX dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	78

Figura 5.8 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos sem tratamento químico superficial após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	80
Figura 5.9 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos de tratados superficialmente com H_3PO_4 após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	81
Figura 5.10 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com HNO_3 após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	82
Figura 5.11 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com NaOH após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	83
Figura 5.12 – Micrografias obtidas por AFM da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	85
Figura 5.13 – Espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14,21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	87
Figura 5.14 – Espectros de absorbância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.....	89
Figura 5.15 – Difractogramas de raios-X da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	93
Figura 5.16 – Área total calculada pelos espectros de absorbância de FTIR e as porcentagens das fases calculadas por DRX dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	96
Figura 5.17 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos sem tratamento químico superficial após 7 dias, 14 dias e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.....	97
Figura 5.18 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com H_3PO_4 após 7 dias, 14 dias e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.....	98

Figura 5.19 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com HNO_3 após 7 dias, 14 dias e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.....	99
Figura 5.20 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com NaOH após 7 dias, 14 dias e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.....	100
Figura 5.21 – Micrografias obtidas por AFM da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	102
Figura 5.22 – Espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.....	104
Figura 5.23 – Micrografias obtidas por microscopia confocal da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma.....	106
Figura 5.24 – Segunda derivada dos espectros de absorbância de FTIR da superfície dos nanocompósitos com tratamentos superficiais por plasma composto por N_2 , H_2 e O_2	107
Figura 5.25 – Segunda derivada dos espectros de absorbância de FTIR da superfície dos nanocompósitos com tratamentos superficiais por plasma composto por N_2 e O_2	108
Figura 5.26 – Segunda derivada dos espectros de absorbância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma.....	110
Figura 5.27 – Difractogramas de raios-X da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	114
Figura 5.28 – Área total calculada pelos espectros de absorbância de FTIR e as porcentagens das fases calculadas por DRX dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.....	117
Figura 5.29 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x ...	119
Figura 5.30 – Micrografias obtidas por AFM da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	120
Figura 5.31 – Trilha do risco e a ampliação da falha na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	122
Figura 5.32 – Carga crítica (L_c) da trilha formada na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	123

Figura 5.33 – Trilha do risco e a ampliação da falha na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	125
Figura 5.34 – Carga crítica (Lc) da trilha formada na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	126
Figura 5.35 – Trilha do risco e a ampliação da falha na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	128
Figura 5.36 – Carga crítica (Lc) da trilha formada na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	130
Figura 5.37 – Fotomicrografias obtidas por microscopia óptica das células CHO sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e recobertos biomimeticamente com solução de SBF 5,0x após 72 horas de cultivo	132
Figura 5.38 – Micrografias obtidas por MEV das células CHO sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e recobertos biomimeticamente com solução de SBF 5,0x, após 72 horas de cultivo	134
Figura 5.39 – Percentual da viabilidade celular sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e recobertos biomimeticamente com solução de SBF 5,0x, após 72 horas de cultivo.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Tipos de fosfatos de cálcio e suas razões Ca/P	26
Tabela 3.2 – Composição iônica do plasma sanguíneo e da solução de SBF (mMol.dm ³)....	36
Tabela 3.3 – Composição vidro G em % peso	37
Tabela 4.1 – Reagentes utilizados na preparação, conformação e caracterização dos nanocompósitos.....	48
Tabela 4.2 – Reagentes e quantidades necessárias para o preparo da solução de SBF 1,5x...	55
Tabela 4.3 – Reagentes necessários para o preparo da solução de SBF 5,0x	56
Tabela 5.1 – Área percentual sob as curvas de deconvolução observadas nos espectros de absorvância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	70
Tabela 5.2 – Bandas de absorção dos picos (cm ⁻¹) observadas nos espectros de absorvância de FTIR e suas atribuições segundo a literatura	71
Tabela 5.3 – Porcentagens das diferentes fases formadas sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	75
Tabela 5.4 – Valores obtidos com auxílio do FRX para medir a espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14,21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x	86
Tabela 5.5 – Área percentual sob as curvas de deconvolução observadas nos espectros de absorvância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	90
Tabela 5.6 – Bandas de absorção dos picos (cm ⁻¹) observadas nos espectros de absorvância de FTIR e suas atribuições segundo a literatura	91
Tabela 5.7 – Porcentagens das diferentes fases formadas sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.....	94
Tabela 5.8 – Valores obtidos com auxílio do FRX para medir a espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	104
Tabela 5.9 – Área percentual sob as curvas de deconvolução observadas nos espectros de absorvância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x	111

Tabela 5.10 – Bandas de absorção dos picos (cm^{-1}) observadas nos espectros de absorbância de FTIR e suas atribuições segundo a literatura	112
Tabela 5.11 – Porcentagens das diferentes fases formadas sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.....	115

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. Biomateriais.....	18
3.2. Materiais nanoestruturados e nanocompósitos de matriz cerâmica.....	23
3.3. Fosfatos de cálcio	25
3.3.1. Hidroxiapatita.....	27
3.3.2. Fosfato tricálcico	29
3.4. Tratamentos superficiais de materiais cerâmicos	31
3.4.1. Tratamento químico	31
3.4.2. Tratamento por plasma.....	33
3.5. Recobrimento com fosfato de cálcio	35
3.6. Adesão do recobrimento.....	38
3.7. Ensaio <i>in vitro</i>	43
3.8. Mercado dos biomateriais.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1. Preparação dos pós de Al_2O_3 com inclusões nanométricas de ZrO_2	48
4.2. Conformação e sinterização dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	49
4.3. Caracterizações dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	49
i. Densidade a verde	49
ii. Densidade aparente	50
iii. Microscopia eletrônica de varredura.....	51
iv. Difractometria de raios-X	51
4.4. Tratamentos superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	52
4.4.1. Tratamento químico	52
4.4.2. Tratamento por plasma.....	53
4.4.3. Caracterizações superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	53
4.5. Recobrimento biomimético dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	54

4.5.2. Recobrimento com solução de SBF 5,0x	55
4.5.3. Caracterizações dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ recobertos	56
4.6. Adesão do recobrimento biomimético nos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	58
4.7. Ensaios biológicos <i>in vitro</i> dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	59
4.7.1. Análise de citotoxicidade	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
5.1. Caracterização física e microestrutural dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	62
i. Densidade a verde	62
ii. Densidade aparente	62
iii. Microscopia eletrônica de varredura	62
iv. Difratomia de raios-X	63
5.2. Caracterizações superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ tratados	64
i. Microscopia confocal	64
ii. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	65
5.3. Recobrimento biomimético dos nanocompósitos tratados quimicamente	67
5.3.1. Recobrimento com solução de SBF 1,5x	68
i. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	68
ii. Difratomia de raios-X	73
iii. Microscopia eletrônica de varredura	79
iv. Microscopia de força atômica	85
v. Fluorescência de raios-X	86
5.3.2. Recobrimento com solução de SBF 5,0x	88
i. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	88
ii. Difratomia de raios-X	92
iii. Microscopia eletrônica de varredura	96
iv. Microscopia de força atômica	101
v. Fluorescência de raios-X	103
5.4. Caracterizações superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ tratados por plasma	105
i. Microscopia confocal	105
ii. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	107

5.5. Recobrimento biomimético dos nanocompósitos tratados por plasma.....	109
5.5.1. Recobrimento com solução de SBF 5,0x	109
5.6. Adesão do recobrimento biomimético nos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	121
5.6.1. Adesão do recobrimento nos nanocompósitos tratados quimicamente	121
5.6.2. Adesão do recobrimento biomimético nos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	127
5.7. Ensaio biológico <i>in vitro</i> dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$	130
5.7.1. Análise de citotoxicidade	131
5.8. Considerações gerais	136
6. CONCLUSÕES	138
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos foram realizados inúmeros avanços no desenvolvimento de novos materiais sintéticos visando o aperfeiçoamento e/ou soluções relacionadas às recuperações estruturais ósseas, enxertos, implantes, cirurgias ortopédicas entre outros (RATNER et al., 2009; VALLET-REGÍ, 2010; KAI, 2012, VIEIRA, 2013). Os materiais utilizados para tal finalidade são denominados biomateriais e devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros de modo a estimular uma resposta apropriada dos mesmos (TABATA, 2009; GUASTALDI, APARECIDA, 2010, AGUIAR, 2013).

Nesse sentido, cerâmicas a base de fosfatos de cálcio destacam-se como biomateriais, uma vez que apresentam características desejáveis tais como, composição química semelhante à fase mineral dos tecidos ósseos, biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade local ou sistêmica e capacidade de se ligar ao tecido hospedeiro ou ser absorvida pelo tecido vivo (RODRIGUES, et al., 2012, SOUZA OLIVEIRA, 2013). No entanto, um aspecto desfavorável dos materiais cerâmicos a base de fosfatos de cálcio é sua baixa resistência mecânica e tenacidade à fratura, o que as tornam impróprias até mesmo para aplicações de baixo esforço mecânico (VALLET-REGÍ, SALINAS, 2013; BONAN et al., 2014; COSTA, 2014).

Desse modo, para que essas cerâmicas de fosfatos de cálcio possam ser utilizadas, torna-se necessário o desenvolvimento de materiais que permitam melhorar essas propriedades e consequentemente o desempenho em aplicações biológicas. Uma perspectiva pode estar relacionada à incorporação do fosfato de cálcio em um material cerâmico, bioinerte, que apresente alta resistência mecânica.

Dentre esses se encontram os materiais nanoestruturados, os quais se incluem os nanocompósitos. O grande interesse por esses materiais foi despertado após o trabalho pioneiro realizado no Japão por Niihara e colaboradores (NIIHARA et al., 1989), onde verificaram que a adição de 5% em volume de carbetto de silício em uma matriz de alumina aumentou em torno de 300% a resistência a flexão e de 40% à tenacidade à fratura quando comparado com a alumina (NIIHARA et al., 1989). Apesar dos excelentes resultados obtidos, trabalhos posteriores não conseguiram reproduzir os realizados por eles. Contudo, a sociedade científica aborda que é de comum consenso que a inclusão de partículas de tamanho nanométrico em matriz micrométrica, influencia positivamente sobre as propriedades mecânicas e tribológicas desses materiais.

Trabalhos posteriores usando matriz de alumina com inclusões nanométricas de zircônia mostraram melhorias na resistência mecânica do material, quando comparadas com a alumina

sem inclusões (GUIMARÃES et al., 2009; PIERRI, 2011; CHINELATTO et al., 2012; OJAIMI, 2014). Em condições fisiológicas, este nanocompósito é praticamente inerte, causando pouca ou nenhuma resposta dos tecidos circundantes e mantendo-se essencialmente inalterado (DENRY, KELLY, 2008; CHEVALIER, GREMILLARD, 2009).

Em 1991 Kokubo propôs que o requerimento essencial para um material sintético aderir ao osso é a formação de uma camada superficial de apatita com características semelhantes ao osso natural, quando implantado no organismo (KOKUBO, 1991). A formação dessa camada pode ser reproduzida em um fluido, denominado *Synthetic Body Fluid* (SBF), que simula a atuação no corpo humano, com concentrações de íons iguais a do plasma sanguíneo (KOKUBO, TAKADAMA, 2006). Uma vez formada a apatita, a justaposição osso/implante aumenta a osseointegração, termo este definido como sendo o contato estabelecido entre o osso normal e remodelado com a superfície do implante, sem a interposição de tecidos conectivos que não sejam de células ósseas, promovendo uma camada bioativa em cerâmicas bioinertes (VERCIK et al., 2003).

Em aplicações práticas, a superfície de um material está sujeita à influência de diferentes fatores que podem levar a um desempenho ruim como, por exemplo, desgaste e fadiga. Afrouxamento de implante devido ao desgaste, associado à fraca adesão são algumas das razões atribuídas ao fracasso de implantes em meio biológico (PARK, BRONZINO, KIM, 2003; AGUIAR, 2013). Assim, a adesão de uma camada bioativa formada sobre a superfície de um material bioinerte, como por exemplo, nanocompósitos de alumina/zircônia é essencial para a interação com o meio biológico, uma vez que, a qualidade dessa adesão influenciará na morfologia e a capacidade futura de osseointegração desse material quando implantado.

A obtenção de materiais que satisfaçam todas as exigências para uma determinada aplicação é difícil. Por exemplo, um material candidato a implante pode ter propriedades mecânicas adequadas, porém ser incompatível com o meio biológico ou vice-versa. Dessa forma, faz-se necessário encontrar um equilíbrio na escolha dos mesmos. Esta é a principal razão pelas quais novas técnicas estão sendo investigadas para melhorar o desempenho biológico dos materiais cerâmicos (CHEVALIER, GREMILLARD, 2009; FAGA, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo do presente trabalho foi estudar a formação, adesão e a uniformidade do revestimento de fosfato de cálcio em nanocompósito de alumina contendo 5% em volume de inclusões nanométricas de zircônia visando contribuir com o desenvolvimento de substitutos ósseos com melhores propriedades.

2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar a influência de diferentes tratamentos (químico e por plasma) na superfície do nanocompósito de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$;
- ❖ Avaliar a adesão entre a camada de fosfato de cálcio formada e a superfície do nanocompósito de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ em função do tratamento superficial recebido;
- ❖ Avaliar a biocompatibilidade e proliferação celular do nanocompósito de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ utilizando linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO);
- ❖ Comparar as diferentes técnicas utilizadas na caracterização da superfície do nanocompósito de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ após a realização dos tratamentos (químico e por plasma) e formação da camada de fosfatos de cálcio.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biomateriais

Baseando-se em novas substâncias e tecnologias médicas utilizadas, os biomateriais podem ser definidos como (WILLIANS, 2009):

“Toda substância projetada para assumir uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo é usada para direcionar a partir do monitoramento de interações com componentes biológicos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico em medicina humana ou veterinária” (WILLIANS, 2009).

De modo geral, pode-se classificar como biomateriais todos os materiais empregados na medicina, odontologia, medicina veterinária e farmacológica, além daqueles que entram na forma de implantes em contato direto com o tecido do corpo (LOBO, 2011).

A utilização de materiais data antes das civilizações antigas. Olhos, orelhas, dentes e narizes artificiais foram encontrados em múmias egípcias. Chineses e indianos utilizavam ceras, colas e tecidos na reconstrução de partes perdidas e/ou defeituosas do corpo (RATNER et al., 2004). Há registros ainda do uso de suturas de linho e ouro no Antigo Egito, e de intestino de gatos na Europa, durante a Idade Média. Substitutos ósseos feitos de madeira também foram encontrados no Antigo Egito e na Europa, na Idade Média (RATNER et al., 2013, PIRES et al., 2015). A Figura 3.1 apresenta alguns exemplos de materiais utilizados na antiguidade.

Figura 3.1 – Dentes artificiais feitos de concha, Mão protética feita de madeira, Sutura feita de linho

FONTE: THIRÉ, 2015; <http://www.tudointeressante.com.br/2014/03/amedicinadopassado> (2014).

No entanto, para que um material possa ser classificado como biomaterial ele deve apresentar duas propriedades fundamentais: biocompatibilidade e biofuncionalidade. A biocompatibilidade é definida como a capacidade que o material possui de desempenhar sua função com uma resposta apropriada do tecido hospedeiro. Enquanto a biofuncionalidade é definida como a capacidade que um material implantado possui em atender às características mecânicas necessárias para cumprir a função desejada pelo tempo que for necessário (RATNER et al., 2004). Os materiais utilizados para esse fim podem ser: metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos.

De acordo com o seu comportamento em meio biológico, os biomateriais podem ser classificados como (HENCH, WILSON, 1993):

Biotoleráveis, materiais caracterizados pela presença de tecido conjuntivo fibroso entre o implante e o tecido ósseo. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formado, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os biomateriais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos, assim como grande parte dos metais (HENCH, WILSON, 1993).

Bioativos, materiais que promovem ligações de natureza química entre o material e o tecido ósseo (osteointegração), sem a presença de encapsulamento fibroso. Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio de recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os biovidros, as vitrocerâmicas e os fosfatos de cálcio (HENCH, WILSON, 1993).

Bioinertes, materiais caracterizados por não provocarem qualquer tipo de reação de corpo estranho no organismo. No entanto, esses materiais tendem a ser envolvidos por uma camada envoltória de tecido fibroso que tendem a isolá-lo dos tecidos adjacentes. A espessura da camada fibrosa depende de muitos fatores como as condições do implante, tecido e carga mecânica existente na interface. Dentre os materiais bioinertes mais utilizados encontram-se: a alumina, zircônia, carbono, titânio e suas ligas (HENCH, WILSON, 1993; CASTNER, RATNER, 2002).

Porém, é importante ressaltar que nenhum biomaterial implantado em tecido vivo é considerado totalmente inerte, pois esses podem emitir alguma resposta ao organismo (RATNER et al., 2004).

Reabsorvíveis, materiais que após certo período de tempo em contato com os tecidos são degradados, sendo, posteriormente, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Esses materiais são muito importantes em aplicações em função de serem desnecessárias novas

intervenções cirúrgicas para a remoção do material implantado. São exemplos desses tipos de materiais os fosfatos tricálcico (α e β), ácidos poliláticos e poliglicólicos (HENCH, WILSON, 1993).

No entanto, é essencial reconhecer também que nenhum material é apropriado para todas as aplicações médicas. O sucesso desses materiais depende de uma fixação estável ao tecido conectivo. O mecanismo da fixação no tecido está diretamente ligado ao tipo de resposta do tecido na interface implante/tecido. Além disso, o critério de seleção dos biomateriais está baseado principalmente na aplicação a que se destinam (ZENÓBIO, 2011).

Os materiais cerâmicos, por sua vez, destacam-se como biomateriais por demonstrarem melhor estabilidade química superficial e biocompatibilidade quando comparados a outros grupos de materiais utilizados como implantes (BOCH, NIEPCE, 2007).

Dessa forma, tem despertado ao longo dos anos um grande interesse na comunidade científica em estudar os materiais cerâmicos altamente porosos e densos, que exibem boa biocompatibilidade depois de implantados no organismo. Porém, a aplicação do material cerâmico poroso é restrita, devido a sua fragilidade e baixa resistência mecânica. Em contrapartida, o formato denso é preferível por exibir pouca ou nenhuma biodegradação quando implantado (GOMIDE, 2005).

O formato denso, também chamado de microporoso, é caracterizado em função de uma microporosidade máxima de 5% em volume, com microporos de aproximadamente 1 μm de diâmetro e cristais de tamanho superior a 2000 Å (RIBEIRO, 2003). Exemplos de tais aplicações incluem a substituição de implantes para artroplastia femoral ou joelho, reconstrução maxilofacial, implantes dentários, próteses ósseas etc. (BUDDY et al., 1996). Entre os materiais cerâmicos densos mais utilizados, se encontram a alumina e a zircônia que são consideradas materiais bioinertes, uma vez que, não desenvolvem ligações químicas com o osso (LECOEUR, OUHAYOUN, 1997).

A alumina, ou óxido de alumínio, é um composto de fórmula molecular Al_2O_3 e está presente na natureza em abundância nas argilas, caulim e feldspatos. A principal fonte de Al_2O_3 isolada na natureza, ou seja, sem a presença de outros óxidos, são os minérios de bauxita, nos quais ele aparece na forma hidratada, isto é, como um hidróxido de alumínio do qual se extrai a Al_2O_3 por meio do seu beneficiamento fundamentado no processo Bayer de refinamento do alumínio (HUBNER, DORRE, 1984; LEE, RAINFORTH, 1994).

A Al_2O_3 pode apresentar diferentes formas cristalinas. No entanto a alfa alumina (α - Al_2O_3) é a forma mais termodinamicamente estável em todas as temperaturas e apresenta uma estrutura cristalina hexagonal compacta conhecida como *corundum*, como mostrado na Figura

3.2. A estrutura *corundum* é caracterizada por um empacotamento hexagonal dos ânions O^{2-} , no qual dois terços dos sítios octaédricos são ocupados por cátions de Al^{+3} , de forma que apresentem seis íons de oxigênio equidistantes (WELLS, 1986; SARTORI, 2015).

Figura 3.2 – Representação esquemática da estrutura *corundum* α - Al_2O_3

FONTE: BESSE, 2014.

Como biomaterial a Al_2O_3 é um material inerte e resistente à maioria dos ambientes corrosivos, incluindo também um ambiente dinâmico como, por exemplo, o corpo humano, causando pouca ou nenhuma resposta dos tecidos em volta e mantendo-se essencialmente inalterado. No entanto, o corpo a reconhece como material estranho e procura isolá-la formando uma fina camada de tecido fibroso não aderente em volta do implante (KRIEGER, 2003).

A Al_2O_3 é utilizada principalmente em regiões que estão sujeitas a grandes desgastes como articulações, incluindo prótese de joelho e quadril, ligação de tornozelo, cotovelo, ombros, pulsos, dedos e também para preenchimento de defeitos ósseos (FOOK, 2008; SOUZA, 2009; REIS, 2012).

A zircônia, ou óxido de zircônio, é um composto de fórmula molecular ZrO_2 , é encontrado na natureza na forma pura ou formando diferentes compostos minerais. A principal fonte de zircônio é proveniente do zircão (silicato de zircônio, $ZrSiO_4$), contudo, pode ser encontrado em outros minerais, como a badeleíta. O metal é obtido principalmente de uma cloração redutiva através do processo denominado Kroll: primeiro se prepara o cloreto para depois reduzi-lo com magnésio. Num processo semi-industrial pode-se realizar a eletrólise de sais fundidos, obtendo-se a ZrO_2 em pó (STEVENS, 1986).

A ZrO_2 exibe três fases polimórficas distintas: monoclinica, tetragonal e cúbica, como mostrado na Figura 3.3, sendo que há existência de uma fase ortorrômbica, estável a altas pressões (STEVENSON, 1986).

Figura 3.3 – Representação esquemática da estrutura cristalina da ZrO_2

FONTE: Adaptado de HIRSCHMANN, 2008; ARAÚJO, J., 2015.

A fase monoclinica é estável à pressão atmosférica, até temperaturas próximas de 1170°C , quando sofre uma transformação reversível para a fase tetragonal. A fase tetragonal, por sua vez, é estável até temperaturas de 2370°C . A partir daí, ocorre a transformação para a fase cúbica, que se mantém até o ponto de fusão da zircônia 2680°C (STEVENSON, 1986).

A transformação tetragonal - monoclinica ($t \rightarrow m$) tem sido intensamente estudada, a fim de se entender os mecanismos que geram tal transformação. Essa transformação é do tipo martensítica, ou seja, é uma transformação induzida por cisalhamento, sem a ocorrência de difusão (EVANS, HEUER, 1980; STEVENSON, 1986), isto é, ocorre uma distorção da estrutura cristalina, sem ruptura de ligações, ocorrendo um aumento de 3 a 5% em volume da peça. A transformação ocorre instantaneamente, e não se realiza numa temperatura fixa, mas numa faixa de temperatura. O fenômeno da transformação martensítica na ZrO_2 é um dos principais responsáveis pelo efeito de tenacificação nos materiais onde participa como segunda fase (EVANS, HEUER, 1980).

Na odontologia, a ZrO_2 substitui as restaurações metálicas assim como as metalocerâmicas onde são usados metal e porcelana. Se utilizada em próteses dentárias de modo a não ficar exposta a grandes tensões de tração podendo durar anos. Na medicina é empregada na confecção de próteses ortopédicas como, por exemplo, confecção de cabeças de fêmur e acetábulo para implantes coxofemorais, pois esse par possui menor coeficiente de

atrito e menor taxa de desgaste do que os outros pares usuais, como: (cabeça de aço inoxidável austenítico com acetábulo de polietileno de ultra-alta massa molar, cabeça de liga Co-Cr com acetábulo de polietileno de ultra-alta massa molar, cabeça de liga Co-Cr com acetábulo de liga Co-Cr) (RASHAD, BAJOUMY, 2008).

Apesar de todas as qualidades apresentadas pelos materiais cerâmicos, um aspecto desfavorável, é a sua baixa resistência mecânica e tenacidade à fratura (MORAES et al., 2004). Nesse sentido, uma perspectiva para melhorar suas propriedades mecânicas foi visualizada em estudos de inclusões nanométricas de carbetos de silício (SiC) em matriz de Al_2O_3 , realizados no Japão nos anos 90 (NIIHARA et al., 1989; NIIHARA, NAKAHIRA, 1990, NIIHARA, 1991). Desde então, diversos pesquisadores tem demonstrado significativo interesse nos materiais cerâmicos nanoestruturados, sistemas que contêm pelo menos uma característica microestrutural com dimensões nanométricas responsável por características peculiares em suas propriedades, onde se incluem os nanocompósitos (GLEITER, 1995).

3.2. Materiais nanoestruturados e nanocompósitos de matriz cerâmica

Os materiais nanocompósitos compreendem uma combinação de duas ou mais substâncias que diferem entre si no tamanho nanométrico (CHEN et al., 2010; OJAIMI, 2014), podendo ser classificados de acordo com a dispersão das partículas na matriz, como mostrado na Figura 3.4, (NIIHARA, 1991).

- **Intraganular**, as partículas nanométricas estão dispersas dentro dos grãos da matriz;
- **Intergranular**, as partículas nanométricas estão dispersas nos contornos dos grãos da matriz;
- **Intra/intergranular**, as partículas estão tanto nos contornos como dentro dos grãos da matriz;
- **Nano/nano**, tanto a matriz como as inclusões possuem grãos de tamanhos nanométricos.

Figura 3.4 – Esquema de classificação dos nanocompósitos de acordo com a dispersão das partículas na matriz

FONTE: NIIHARA, 1991.

O interesse na utilização de materiais nanoestruturados na medicina surgiu a partir de alguns fatores como (NARAYAN, et al., 2004): a evolução nas técnicas de processamentos e caracterização dos materiais; melhor conhecimento do comportamento físico dos materiais em meio biológico; melhor conhecimento das propriedades fisiológicas das biomoléculas, como proteínas, vírus e DNA; melhor entendimento da interação dos materiais nanoestruturados com as biomoléculas (SARTORI, 2015). Além disso, esses materiais apresentam ainda características de biomimetismo. A expressão biomimetismo surge da potencialidade de se reproduzir partes do corpo humano tanto no domínio macroscópico, quanto no microscópico, as propriedades físicas, químicas e biológicas dos biomateriais (HASIRCI et al., 2005; TABATA, 2009).

Atualmente o sistema $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$ é um dos sistemas cerâmicos mais estudados quanto a sua aplicação tanto na área da engenharia quanto na cerâmica estrutural. A sua utilização na medicina (ortopédica e odontológica) é devido às suas propriedades mecânicas e biológicas (KERN, PALMERO, 2013), sendo os estudos direcionados na redução do tamanho de partículas, morfologia final do grão e aumento na dispersão das fases (ARÁUJO, 2012).

Liu e colaboradores (1998) foram os primeiros a investigar o efeito das inclusões nanométricas de ZrO_2 em matriz de Al_2O_3 . Eles utilizaram a composição de Al_2O_3 contendo 5% de ZrO_2 . Os resultados obtidos mostraram um ganho nas propriedades mecânicas do nanocompósito, acompanhados da diminuição na sinterabilidade do sistema. Esse aspecto foi

elucidado por uma dificuldade de arranjo das inclusões de ZrO_2 na matriz durante os estágios iniciais da etapa de sinterização (LIU et al., 1998).

Em estudos realizados por Guimarães e colaboradores (GUIMARÃES et al., 2009) o uso de inclusões nanométricas de ZrO_2 na matriz de Al_2O_3 apresentou melhorias na resistência mecânica do nanocompósito quando comparado com Al_2O_3 sem inclusões. Em condições fisiológicas, este nanocompósito é praticamente inerte, causando pouca ou nenhuma resposta dos tecidos circundantes e mantendo-se essencialmente inalterada.

Dessa forma, a sua natureza bioinerte, tem estimulado o desenvolvimento de novas técnicas, a fim de tornar o desempenho biológico destas cerâmicas mais adequadas (CHEVALIER, GREMILLARD, 2009). Dentre as técnicas capazes de tornar o desempenho biológico dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$ mais adequado, o recobrimento com fosfatos de cálcio tem se destacado.

3.3. Fosfatos de cálcio

As cerâmicas à base de fosfato de cálcio se destacam entre as biocerâmicas, uma vez que apresentam boas características de biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, taxas de degradação variáveis e osteocondutividade (GUASTALDI, APARECEIDA, 2010).

De acordo com Vallet-Regí e González-Calbet (2004), os fosfatos de cálcio são formados basicamente por íons de cálcio e fósforo, similares aos minerais dos ossos e dentes, permitindo que essas biocerâmicas participem efetivamente no equilíbrio iônico com o fluido biológico, possibilitando a remodelação óssea no sítio do implante (VALLET-REGÍ, GONZÁLEZ-CALBET, 2004).

Os fosfatos de cálcio podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções que contenham íons de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , sendo que, aqueles que apresentam elevada razão Ca/P são precipitados em meio alcalino, enquanto que os que apresentam valores baixos para essa razão são precipitados em meio ácido (AOKI, 1991).

Entre os possíveis fosfatos de cálcio a serem obtidos, destacam-se a hidroxiapatita e o fosfato tricálcico (KALITA, BHARDWAJ, BAHTT, 2007). Entretanto, as fases a serem obtidas pelo material irão depender do método e parâmetros de fabricação (LOBO, 2011).

Os fosfatos de cálcio são comumente classificados a partir de sua razão molar entre os átomos de cálcio (Ca) e fósforo (P) razão Ca/P, como mostrado na Tabela 3.1. Os fosfatos de cálcio possuem razão Ca/P que varia entre 0,5 e 2,0.

Tabela 3.1 – Tipos de fosfatos de cálcio e suas razões Ca/P

Razão Ca/P	Fórmula química	Composto	Abreviação
2,0	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	Fosfato Tetracálcico	TTCP
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita	HA
1,5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato Tricálcico (α , β , g)	TCP
1,4	$\text{Ca}_{10}\text{H}(\text{PO}_4)(\text{PO}_4)_6$	Whitlockite	---
1,3	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato Octacálcico	OCP
1,0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato Bicálcico Dihidratado (Brushita)	DCPD
1,0	CaHPO_4	Fosfato Bicálcico (Monetita)	DCP
1,0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Pirofosfato de Cálcio (α , β , g)	CPP
1,0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Pirofosfato de Cálcio Dihidratado	CPPD
0,7	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	Fosfato Heptacálcico	HCP
0,6	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	Fosfato Dihidrogeno Tetracálcico	TDHP
0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato Monocálcico Monohidratado	MCPM
0,5	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	Metafosfato de Cálcio	CMP

FONTE: Adaptado de AOKI, 1991.

Uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio, a qual é explorada nas diversas aplicações e que pode prever o seu comportamento *in vivo*, é a solubilidade. De forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade. Isso reflete o fato de que todos os compostos são mais solúveis conforme o pH diminui. Na região alcalina, a concentração de cálcio aumenta com o aumento do pH (GUASTALDI, APARECIDA, 2010; PAVINATO, 2012).

Dessa forma, em pH fisiológico, a solubilidade dos fosfatos de cálcio e, conseqüentemente, sua degradação *in vivo*, é dada pela seguinte ordem: MCPM > α -TCP > DCPD > DCP > OCP > β -TCP > HA (SANTOS, L., 2002).

No entanto, os fosfatos de cálcio apresentam algumas desvantagens como baixa resistência mecânica e fragilidade, de forma que não podem ser utilizados em regiões que demandem grande esforço mecânico. Embora estas desvantagens pareçam ser um requisito eliminatório, elas apenas estabelecem limitações ao seu uso, mas não impede a sua aplicação (FOOK, APARECIDA, FOOK, 2010). Nesse sentido, os fosfatos de cálcio são adequados para diferentes aplicações, incluindo o preenchimento de defeitos ósseos, reconstrução óssea (especialmente em cirurgia maxilofacial), substituições ósseas, transportadores de fármacos

(antibióticos, fármacos anticancerígenos, fatores de crescimento) e revestimentos de próteses metálicas como mostrado na Figura 3.5 (KAWACHI et al., 2000; GUASTALDI, APARECIDA, 2010). Dentre os fosfatos de cálcio mais utilizados como implantes ósseos, a HA e o TCP se destacam.

Figura 3.5 – Aplicação dos fosfatos de cálcio

FONTE: Adaptado de HENCH, WILSON, 1993; VAZ, 2007.

3.3.1. Hidroxiapatita

A HA apresenta fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e representa a principal fase mineral constituinte dos ossos e dentes humanos cerca de 90%, o que significa 5% da massa total de um indivíduo, sendo a fase de apatita mais estudada na área de biomateriais devido a essa similaridade com parte do corpo humano além de ser biocompatível e bioativa (DOROZHKIN, 2009).

As apatitas referem-se a uma família de cerâmicos que obedecem à fórmula $M_{10}(RO_4)_6X_2$, onde M é o cálcio (Ca), R é o fósforo (P) e X é uma hidroxila (OH^-), carbonato (CO_3^{2-}) ou um composto halogenado (VALLESPER, 2001). Além disso, são as fases mais termodinamicamente estáveis dos fosfatos de cálcio e por isso podem ser consideradas como produto final em muitas reações envolvendo os fosfatos de cálcio (HENCH, 1998, LOBO, 2011).

A HA é um composto de cristalografia definida, pertencendo ao sistema hexagonal, com grupo espacial $P6_3/m$, que é caracterizado por uma simetria perpendicular a três eixos “a” equivalentes (a_1, a_2, a_3), formando ângulos de 120° entre si. A sua célula unitária contém uma representação completa do cristal da apatita, consistindo em íons de cálcio (Ca^{2+}), fosfatos (PO_4^{3-}) e hidroxilas (OH^-) empacotados juntos em um arranjo como mostrado na Figura 3.6 (PAVINATO, 2012).

Figura 3.6 – Representação esquemática da estrutura cristalina da HA

FONTE: KAY et al., 1964.

Assim como as outras fases de apatitas a HA pode sofrer uma grande quantidade de substituições catiônicas e aniônicas sendo capaz de incorporar quase metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura. Íons de cálcio (Ca^{2+}) podem ser substituídos por um grande número de cátions metálicos mono e divalentes, sendo que o mais comum é o sódio (Na^+). A

diferença de valência causada por qualquer substituição requer uma redução na carga aniônica para manter o balanço de carga. Os íons fosfatos (PO_4^{3-}) podem ser substituídos por íons arseniatos (AsO_4^{3-}), sulfatos (SO_4^{2-}), carbonatos (CO_3^{2-}), silicatos (SiO_4^{4-}), vanadatos (VO_4^{3-}), e os íons hidroxila (OH^-) por carbonatos (CO_3^{2-}), fluoretos (F^-) e cloretos (Cl^-). Essa facilidade de trocas faz com que a HA atue como um sistema regulador de diferentes íons nos líquidos corporais através de sua liberação ou armazenamento. Todas as substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da HA, que por sua vez alteram a degradação e o seu comportamento *in vivo* (GUASTALDI, APARECIDA, 2010).

Biologicamente, a HA é encontrada nos tecidos mineralizados, tais como, esmalte, dentina e osso. A HA sintética é uma cerâmica biocompatível, o que favorece a troca entre os íons e o meio fisiológico e o crescimento ósseo para os locais em que se encontra (VALLET-REGÍ, GONZÁLEZ-CALBET, 2004). Além disso, a superfície da HA permite a interação de ligações do tipo dipolo-dipolo, fazendo com que moléculas de água e, também proteínas e colágeno sejam adsorvidos na sua superfície induzindo a regeneração tecidual (SANTOS, L., 2002, SARTORI, 2015).

Apesar das vantagens apresentadas pela HA, seu uso é limitado por possuir uma lenta velocidade de degradação no meio biológico, nesse caso o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação assim a formação de um novo tecido ósseo é lento, porém, estudos mostram que essa lenta degradação da HA é uma vantagem para que ela atue como plataforma para liberação controlada de fármacos já que o tempo de liberação do medicamento depende do tempo de liberação da matriz inorgânica (SUN, 2009, PAVINATO, 2012).

Além disso, nos últimos anos pesquisas tem se concentrado na modificação da estrutura cristalina da HA, substituindo os íons de (Ca^{2+}) por íons de estrôncio (Sr^{2+}). O Sr^{2+} está presente na fase mineral óssea, principalmente, nas regiões onde ocorre o processo de renovação e substituição das células ósseas (LI et al., 2007; ZREIQAT et al., 2010, MOREIRA et al., 2012).

3.3.2. Fosfato tricálcico

O TCP apresenta fórmula molecular $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, com razão Ca/P igual a 1,5 (ELLIOT, 1994). O TCP é geralmente solúvel na presença de fluídos biológicos, com solubilidade maior que a da HA (HENCH, WILSON, 1993). Essa solubilidade se deve à sua estrutura cristalina e a velocidade de biodegradação que é maior que a HA (JARCHO, 1992). O TCP se cristaliza

em dois tipos de sistema cristalino: a fase alfa (α) e beta (β), sendo esta última mais estável. A Figura 3.7 mostra a estrutura cristalina da fase α -TCP e β -TCP (MAIA, 2009).

Figura 3.7 – Representação esquemática da estrutura cristalina das fases do TCP (a) α -TCP projetado ao longo do eixo a (b) β -TCP projetado ao longo do eixo b

FONTE: KAI, 2012.

Com relação às possibilidades de substituições na estrutura do TCP a presença de magnésio (Mg^{2+}) favorece a formação da fase β tornando-a mais estável. O efeito da incorporação de íons monovalentes como potássio (K^+), sódio (Na^+) e lítio (Li^+), também foi encontrada na estabilização do β -TCP examinando a diminuição no valor da constante de velocidade da transformação para essa fase (MATSUMOTO, 2009; PAVINATO, 2012).

A bioatividade do TCP pode ser caracterizada por sua capacidade osteocondutora, servindo como substrato para o crescimento do novo osso. Apesar de boa parte de o TCP ser rapidamente absorvido, a parte restante permanece no sítio hospedeiro por um longo período de tempo até ser totalmente incorporado dentro da estrutura do osso formado (GONZÁLEZ, GUERRA-LOPEZ, 1993; MAIA, 2009).

O fosfato tricálcico possui excelente velocidade de degradação no meio biológico, característica importante para aplicações como regeneração óssea, na qual a utilização deste com hidroxiapatita se torna uma alternativa viável aumentando a velocidade de degradação da HA. Nesses casos a velocidade de degradação é controlada pela quantidade de TCP utilizado. A dificuldade adotada na síntese desses fosfatos na forma pura também faz com que seja muito comum a utilização dessas duas fases em conjunto (GUASTALDI, APARECIDA, 2010).

Devido a sua biocompatibilidade e reabsorção, o TCP é utilizado para o preenchimento de cavidades onde uma rápida absorção é desejada. Cerâmicas bifásicas de HA e β -TCP têm sido consideradas como potenciais substitutos ósseos devido às suas propriedades de dissolução (HA não reabsorvível e β -TCP reabsorvível), rápida formação óssea e comportamento semelhante ao da fase inorgânica do osso (MAIA, 2009).

Os fosfatos de cálcio são frágeis e apresentam baixa resistência à fratura limitando a sua utilização como implante. Por outro lado, embora os materiais cerâmicos como Al_2O_3 e ZrO_2 tenham propriedades mecânicas superiores, não se ligam ao osso, nesse sentido pesquisas tem sido propostas com a finalidade de recobrir um substrato não bioativo com fosfatos de cálcio, uma vez que, esses possuem propriedades osteocondutoras e habilidade de se ligar quimicamente ao osso (DHERT, 1992). No entanto, um ponto crítico consiste em obter uma boa união interfacial da camada bioativa com a superfície bioinerte (VIEIRA, 2013). Uma possibilidade para melhorar essa união, inclui a utilização de diferentes tratamentos superficiais. Dentre esses, encontram-se os tratamentos químicos com soluções ácidas e tratamentos por plasma.

3.4. Tratamentos superficiais de materiais cerâmicos

3.4.1. Tratamento químico

A adesão dos fosfatos de cálcio na superfície do material é essencial para interação com o meio biológico. A qualidade desta adesão influenciará na morfologia e a capacidade futura de osseointegração do material implantado (AGUIAR, 2013).

A adesão entre a camada bioativa formada e o material, bem como sua morfologia, depende das propriedades de superfície. Estudos anteriores mostraram que estas características superficiais dependem da química de superfície (SIOHANSI, TOBIN, 1996), energia de superfície (PICONI, MACCAURO, 1999) e topografia de superfície (CHEVALIER et al., 2004). Além disso, a reatividade de superfície também pode ser

influenciada pelas características de molhabilidade, influenciando no desempenho dos biomateriais, assim como na adesão e no crescimento da camada de fosfatos de cálcio (KIM et al., 2003).

Dentre os trabalhos publicados sobre tratamento de superfície em materiais cerâmicos a base de Al_2O_3 e ZrO_2 para aplicação como biomaterial, destaca-se o trabalho de Uchida e colaboradores (UCHIDA et al., 2002). Eles realizaram tratamentos químicos em nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$ com diferentes soluções: ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH). Nas duas primeiras soluções foi utilizada a concentração de 5 mol/L e nas duas últimas 15 mol/L, a temperatura de 90°C. O estudo mostrou que o tratamento com todas as soluções utilizadas facilitou a formação da apatita sobre a superfície do nanocompósito após imersão em solução de SBF 1,5x. Após a imersão a capacidade de formação da apatita sobre a superfície foi influenciada pelo tipo de solução em que o material foi tratado.

Kokubo e colaboradores (2009) realizaram tratamentos químicos superficiais em compósitos cerâmicos contendo 70% em vol. de ZrO_2 e 30% em vol. de Al_2O_3 com soluções de ácido fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de sódio (NaOH), ambas com concentração de 15 mol/L. Os resultados obtidos indicaram que o tratamento auxiliou a formação de uma camada de apatita sobre a superfície dos compósitos após imersão em solução de SBF 1,5x (KOKUBO et al., 2009).

Faga e colaboradores (2012) realizaram tratamentos químicos superficiais em compósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$ com soluções de ácido fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de sódio (NaOH) em concentração, temperatura e tempo distintos. Os resultados obtidos demonstraram que somente os compósitos tratados com solução ácida levaram a formação de grupamentos fosfatos após o período de 28 dias de imersão em solução de SBF 1,5x (FAGA et al., 2012).

Sartori (2015) realizou tratamento químico superficial em nanocompósitos porosos de Al_2O_3 e de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ em solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) com concentração de 5 mol/L. Os resultados obtidos demonstraram que tanto os nanocompósitos de Al_2O_3 quanto os de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ apresentaram a formação de uma camada uniforme de apatita sobre a superfície dos nanocompósitos após imersão em solução de SBF 5,0x (SARTORI, 2015).

Além dos tratamentos químicos superficiais, o tratamento por plasma também tem se mostrado uma técnica promissora para o tratamento de biomateriais, por apresentar algumas vantagens como a utilização de pouca energia durante o processo, possibilidade de reduzir o tempo de tratamento, possibilidade de melhorar a eficiência e a deposição de materiais bioativos, como por exemplo, os fosfatos de cálcio sobre a superfície do biomaterial tratado.

3.4.2. Tratamento por plasma

Os estudos sobre o plasma tiveram início no ano de 1929 pelo físico-químico Irving Langmuir, quando o cientista analisava descargas elétricas em gases. Desde então inúmeras propriedades particulares do plasma têm sido investigadas (BARBOSA, 2011b).

O plasma é considerado o 4º estado da matéria. Sua composição é uma mistura de elétrons livres, íons atômicos e moleculares, átomos e moléculas neutras, ainda que, no volume total, seja eletricamente neutro, onde a quantidade de partículas positivas é igual a das partículas negativas (CHEN, CHANG, 2002; ARAÚJO FILHO, 2013).

Num processo artificial, o plasma é formado quando um gás é submetido a uma diferença de potencial que gera um campo elétrico, provocando a aceleração de elétrons livres. Esses elétrons ganham energia cinética e colidem com partículas neutras que cruzam o seu caminho transferindo sua energia. Esse impacto provoca a liberação de mais elétrons, que novamente são influenciados pelo campo elétrico e por sua vez colidem com outras partículas, ocasionando a ionização do gás. Esse efeito pode ser representado pela equação 3.1 (ALVES JR, 2001):

onde:

G = partícula neutra do gás;

G^{+} = o íon do gás;

e^{-} = elétron;

A atividade do plasma sobre a superfície de um material pode ser distinguida por dois processos de interação: químico e físico. No primeiro, o plasma é composto por um gás reativo, isto é, capaz de se ligar quimicamente com os elementos de um material e assim gerar a modificação na sua superfície, podendo também ocorrer à formação de grupos funcionais antes mesmo de atingir uma determinada região do material em tratamento. Já o processo de interação físico é atribuído aos impactos de íons presentes na descarga que são forçosamente endereçados à superfície devido ao campo elétrico originado da diferença de potencial entre o material e uma referência positivamente eletrizada. Dessa forma, os dois efeitos podem acontecer simultaneamente, já que a erosão da superfície é motivada pelo ataque químico da molécula e/ou átomo reativo e a colisão dos íons que resulta em arrancamento de átomos da superfície do material em tratamento, como mostra a Figura 3.8 (BARBOSA, 2011b).

Figura 3.8 – Representação esquemática das interações do plasma com a superfície

FONTE: BARBOSA, 2011b.

Além destes, outros fatores também podem contribuir para a formação do plasma como: tipo, fluxo e pressão dos gases, tensão e correntes elétricas (contínua ou pulsada), tempo de tratamento e o tipo de material a ser tratado. Sendo que, a variação ocorrente entre esses fatores poderá provocar diferentes mudanças tanto nas propriedades físicas quanto químicas na superfície do material em tratamento (ARAÚJO FILHO, 2013).

O tratamento de materiais por plasma é uma técnica conveniente na modificação de superfície devido ao fato de utilizar gases poucos nocivos ao meio ambiente e também por apresentar custos baixos como: energia, tempo e dinheiro (ALVES JR, 2001).

Os processos de modificação superficial de materiais por plasma têm cada vez mais sido realizados por misturas gasosas ao invés de plasmas puros, tendo em vista o aumento em sua eficiência (ZIJLMANS et al., 2006).

A mistura gasosa de plasma comumente utilizada na nitretação, por exemplo, é a mistura de nitrogênio e hidrogênio (N_2-H_2) (HIROHATA, TSUCHIYA, HINO, 2001). Nesse caso, a presença do H_2 atua como um agente que aumenta a energia cinética média das partículas envolvidas no processo (BARBOSA, 2007a).

No presente trabalho foi utilizada a mistura $N_2-H_2-O_2$, em diferentes porcentagens de concentração, bem como a utilização do plasma puro composto por N_2 e O_2 , a fim de avaliar quais as melhores condições para o tratamento de superfície de materiais cerâmicos.

Dentre os trabalhos reportados na literatura sobre modificações superficiais de biomateriais por plasma, se encontra o trabalho de Borges e colaboradores (2011) que realizaram tratamento com plasma de oxigênio na superfície de polímeros de poliestireno (PS) e poli(metacrilato) de metila (PMMA). O estudo mostrou que o tratamento proporcionou modificações na rugosidade média (Ra) da superfície dos materiais, uma vez que as amostras que receberam tratamento por plasma apresentaram maior rugosidade quando comparadas as amostras sem tratamento. Além disso, os autores observaram a formação de grupos funcionais hidrofílicos na superfície das amostras que atuaram como sítios ativos para a deposição biomimética de fosfatos de cálcio (BORGES et al., 2011).

Nunes e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos do tratamento por plasma de argônio na superfície de titânio puro. O estudo mostrou que o tratamento melhorou a molhabilidade superficial, aumentou a rugosidade e contribuiu na adesão da camada de fosfatos depositada sobre a superfície (NUNES et al., 2015).

Oliveira e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos do tratamento com plasma de argônio na superfície de materiais cerâmicos vítreos (dissilicato de lítio) e feldspáticos. O estudo mostrou que o tratamento promoveu modificações na Ra do material, sendo observado que as amostras tratadas apresentaram Ra superior quando comparadas as que não receberam tratamento. Observou-se ainda uma melhora na resistência da união de cimentação adesiva do material (OLIVEIRA et al., 2015).

A utilização de um processo prévio de ativação da superfície se apoia no fato de assegurar uma união interfacial adequada entre o material bioinerte e a camada bioativa a ser formada. A integração entre a superfície do material previamente tratado e a camada formada pode ser otimizada pelo desenvolvimento de espécies reativas na superfície, com afinidade para íons de cálcio (Ca) e fósforo (P) presentes na solução de SBF. A natureza da ligação, neste caso, não é simplesmente mecânica, mas também promove uma melhora na resistência da interface. Há evidências de interações íntimas entre a camada formada e o material ao se adotar tal procedimento, do contrário, os recobrimentos obtidos podem apresentar um comportamento frágil, falhando quando submetidos a cargas mecânicas (KOKUBO, 1991; AGUIAR, 2013).

3.5. Recobrimento com fosfato de cálcio

Dentre as várias técnicas capazes de promover a formação de diferentes fases de fosfatos de cálcio, encontram-se os recobrimentos por métodos físicos (deposição por plasma,

ion sputtering, chemical vapor deposition - CVD, eletroforese, sol-gel), os quais produzem recobrimentos de alta qualidade e filmes com alta densidade. No entanto, estas técnicas possuem algumas desvantagens como a utilização de equipamentos sofisticados de alto custo (LUZ, MANO, 2010). Em contrapartida, os métodos químicos apresentam-se como alternativa a ser utilizada, devido à facilidade de promover o desenvolvimento de uma superfície bioativa sobre materiais bionertes, após serem recobertos com um material bioativo. Dentre estes métodos destaca-se o método de recobrimento biomimético (ABE, KOKUBO, YAMAMURO, 1990) que apresenta como principais vantagens o baixo custo e a possibilidade de recobrir a superfície de diferentes materiais (GUASTALDI, APARECIDA, 2010).

O método de recobrimento biomimético foi introduzido por Abe e colaboradores (ABE, KOKUBO, YAMAMURO, 1990) e é caracterizado pela obtenção de uma fase cerâmica sintética similar a fase cerâmica que constitui o osso, através da imersão dos materiais em solução de SBF, de concentração iônica e pH similares aos fluidos corpóreos, para geração dos núcleos que proporcionarão o crescimento apropriado de uma camada de apatita *in vitro*. A composição iônica do plasma sanguíneo e da solução SBF é apresentada na Tabela 3.2 (ABE, KOKUBO, YAMAMURO, 1990).

Tabela 3.2 – Composição iônica do plasma sanguíneo e da solução de SBF (mMol.dm³)

mMol dm ³	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
Plasma sanguíneo	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	1,0	0,5	27,0
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	1,0	0,5	4,2

FONTE: ABE, KOKUBO, YAMAMURO, 1990.

O método inicialmente proposto consistia em colocar o material a ser recoberto juntamente com um vidro bioativo de composição em peso (%) em SBF, como apresentado na Tabela 3.3. O sistema era mantido a 37°C por sete dias, formando-se uma camada homogênea de 1µm de espessura, composta por HA carbonatada de baixa cristalinidade semelhante à HA biológica presente no tecido ósseo. Em seguida, o substrato era colocado em uma solução SBF 1,5x mais concentrada, obtendo-se um recobrimento com a mesma composição, porém com cerca de 15 µm de espessura (ABE, KOKUBO, YAMAMURO, 1990; GUASTALDI, APARECIDA, 2010).

Tabela 3.3 – Composição vidro G em % peso

Composição	Fórmula química	% peso
Óxido de magnésio	MgO	4,6
Óxido de cálcio	CaO	44,7
Dióxido de silício (Sílica)	SiO ₂	34,0
Pentóxido de fósforo	P ₂ O ₅	16,2
Fluoreto de cálcio	CaF ₂	0,5

FONTE: Adaptado de ABE, KOKUBO, YAMAMURO, 1990.

O mecanismo proposto por Abe e colaboradores (ABE, KOKUBO, YAMAMURO, 1990), considera que os íons de silicato presentes no vidro G dissolvem-se e adsorvem-se sobre o substrato, onde ocorre a nucleação de HA sobre os íons silicatos adsorvidos. Posteriormente, os núcleos de HA crescem à custa da solução de SBF supersaturada com relação a HA, produzindo-se o recobrimento do substrato, com espessura em torno de 1µm.

Desde a sua primeira formulação, o método de recobrimento biomimético sofreu significantes variações, visando acelerar o processo de formação e alterações na cristalinidade do recobrimento (BARRERE et al, 2002; GUASTALDI, APARECIDA, 2010).

Barrere e colaboradores (2002) avaliaram alterações na concentração da solução de SBF originalmente 1,5x mais concentrada para SBF 5,0x mais concentrada em placas metálicas de Ti-6Al-4V. O estudo verificou que o recobrimento formado na superfície das placas metálicas apresentou maior espessura para os substratos submetidos ao recobrimento de maior concentração, quando comparado ao recobrimento obtido para a solução de SBF 1,5x mais concentrada (BARRERE et al., 2002).

Cortes e colaboradores (2005) utilizaram o método biomimético para recobrir o compósito Mg-PSZ/Al₂O₃ na sua forma densa. Para isso utilizaram duas rotas de tratamento: na primeira as amostras foram imersas em SBF durante 21 dias, sem reposição da solução, enquanto na segunda rota, as amostras foram imersas por 7 dias em solução de SBF e então, imersas novamente em solução de SBF 1,4x por 14 dias, a qual foi trocada a cada 7 dias. Os resultados mostraram que não houve a formação de uma camada de apatita nas amostras que ficaram imersas durante 21 dias na solução de SBF. Entretanto, os substratos imersos em solução de SBF mais concentrada ocorreu a deposição de uma camada densa e homogênea de espessura de 20µm sobre o substrato (CORTES et al., 2005).

Pierre e colaboradores (2006) utilizaram o método biomimético modificado para a obtenção de uma camada de material bioativo sobre a superfície de compósitos densos de alumina tenacificada com zircônia (ZTA). Após a imersão do compósito em solução de SBF 1,5x durante 6 dias, observou-se a formação de uma camada de apatita de morfologia homogênea, composta por pequenos glóbulos, com tamanhos menores que 2 μm (PIERRE et al., 2006).

Rigo e colaboradores (2007) utilizaram o método de recobrimento biomimético modificado para recobrir aços inoxidáveis austeníticos e constataram que a utilização da solução de silicato de sódio em substituição ao vidro bioativo atuou como agente fornecedor de íons de silício (Si) posteriormente adsorvidos sobre a superfície do substrato, os resultados demonstraram os íons silicatos desempenharam sua função e contribuíram para a formação dos grupos silanóis (Si-OH), os responsáveis pela nucleação da camada de apatita (RIGO et al., 2007).

Investigações recentes sobre o método de recobrimento biomimético concentram-se na projeção de revestimentos bioativos com camadas de HA depositadas em substratos orgânicos e inorgânicos, utilizando SBF. O que pode permitir uma indução eficaz de HA na nucleação, tal como ocorre no organismo vivo, durante a formação dos ossos e dentes (BRAZIL et al., 2013; ČOLOVIĆ et al., 2014).

As propriedades de um recobrimento podem ser determinadas pelas características físicas e químicas da superfície do material a ser recoberto. Desse modo, estudos sobre a adesão tem recebido especial atenção da comunidade científica dependendo o tipo de aplicação a qual um biomaterial se destina (TAVARES, 2002).

3.6. Adesão do recobrimento

A adesão de um recobrimento a um substrato foi inicialmente definida como a atração molecular exercida entre duas superfícies em contato. Segundo Hardy (1920) o atrito é devido primeiramente à atração molecular agindo através da interface (HARDY, 1920). Já a norma ASTM D907-08a (2008) define adesão “como um estado em que duas superfícies são mantidas juntas por forças interfaciais que podem consistir de forças de valência (forças interatômicas), de forças de intertravamento (ancoramento mecânico) ou de ambas” (ASTM D907-08a, 2008).

Quando duas superfícies são colocadas em contato, a adesão entre as moléculas é responsável pela maior parte do atrito. Quando o deslizamento começa, as ligações são

continuamente quebradas e refeitas quando novos contatos são estabelecidos (PULKER, 1984; AWAJA et al., 2009; BHARATI et al., 2009; ALVES, R., 2010).

Para Mattox (1987), a adesão é determinada pela natureza da tensão que surge na interface e pela energia necessária para se propagar uma fratura através dela. Uma boa adesão pode ser promovida pela alta resistência a fratura do material, baixa concentração de falhas através da interface, baixas tensões na interface, baixos gradientes de tensão e ausência de mecanismos de degradação. Contrariamente, uma baixa adesão pode ser atribuída ao baixo grau de ligação química, baixo contato superficial, altas tensões intrínsecas ou a presença de mecanismos de degradação interfacial (MATTOX, 1987, ALVES, R., 2010).

O teste de riscamento usado para medir a adesão de um recobrimento a um substrato consiste em arrastar um penetrador, em formato esférico ou piramidal, ao longo da superfície do recobrimento, aplicando-se uma força normal a esta superfície com uma aplicação de carga progressiva, até que o deslocamento do recobrimento aconteça. A carga correspondente a esta falha dá uma referência em relação à força de adesão e geralmente é denominada como carga crítica (MATTHEWS, 1991).

Em 1991, Matthews utilizou o teste de riscamento para investigar a adesão de um recobrimento de prata depositado por PVD em materiais metálicos (aço temperado e cobre), tendo utilizado penetradores esféricos e piramidais (MATTHEWS, 1991).

A partir da década de 90, a versão mais utilizada do teste de riscamento envolve a utilização de penetradores do tipo Rockwell C, com raio de 200 μm . A perda de adesão de um recobrimento pode envolver diferentes tipos de falhas como (TAVARES, 2002; MATTOX, 1987).

- Trincas em volta do penetrador;
- Escamamento da camada formada;
- Produção de um entalhe, onde diferentes tipos de trincas podem ser identificados no seu interior e em suas bordas até chegar ao ponto onde todo o recobrimento no interior da trilha formada é removido.

O tipo de falha dependerá entre outros fatores da ductilidade ou fragilidade do recobrimento e do material recoberto (MATTHEWS, 1991).

A força tangencial, força de fricção, entre dois materiais é uma combinação complexa das constantes elásticas destes materiais aliados aos seus coeficientes de fricção, ambos influenciados pela distribuição da pressão de contato na determinação das características dos materiais, uma vez que as partes referentes às constantes elásticas e coeficiente de fricção

raramente ultrapassam valores superiores a 1N (MATTHEWS, 1991). Nesse sentido, pode-se dizer que no teste de riscamento é possível obter informações sobre as propriedades elásticas e dos campos de tensões e deslizamento de um recobrimento. A Figura 3.9 mostra o esquema de um teste de riscamento.

Figura 3.9 – Representação esquemática do teste de riscamento

FONTE: <http://www.geocities.ws/analisedesuperficies/riscamento.html> (2016).

O teste de riscamento é um método quantitativo e fornece parâmetros que representam o estado de adesão na interface, mas não pode ser relacionado com outras propriedades do sistema recobrimento/material como, por exemplo, a dureza. A adesão de um recobrimento é caracterizada pela liberação de tensões por unidade de área delaminada, o que em alguns casos pode representar a energia de fratura interfacial e ser usada para gerar uma tenacidade à fratura interfacial (ALVES, R., 2010).

Existe uma grande quantidade de fatores que influenciam diretamente no resultado do teste de riscamento, alguns relacionados ao próprio ensaio (fatores intrínsecos) e outros relacionados aos materiais a serem ensaiados (fatores extrínsecos) (TAVARES, 2002; ALVES, R., 2010; ROSA, 2013):

Fatores Intrínsecos	{	Taxa de carregamento;	Fatores Extrínsecos	{	Propriedades do material recoberto;
		Velocidade de riscamento;			Propriedades do recobrimento;
		Raio do penetrador;			Coefficiente de fricção;
		Desgaste do penetrador;			Rugosidade superficial
		Design do aparelho de ensaio.			

Os tipos de falhas que surgem durante o teste de riscamento podem ainda ser classificados em quatro categorias (TAVARES, 2002; ALVES, R., 2010):

Trincas através da espessura se estendem dentro do material recoberto caso ele seja frágil. O mais comum é as trincas pararem na interface do recobrimento/material. Estes tipos incluem as trincas de tensão e de conformação;

Destacamento do material geralmente ocorre à frente do penetrador ou por recuperação induzida atrás do penetrador (*recovery-induced spallation*);

Lascamento dentro do recobrimento é típica em recobrimentos espessos, porém em recobrimentos com espessuras superiores a 50 μm seja possível atingir tensões suficientes antes da interface, produzindo lascamentos em recobrimentos duros;

Lascamento dentro do material recoberto geralmente ocorre em recobrimentos frágeis sobre superfícies de materiais que também apresentam fragilidade, onde a adesão é boa o suficiente para que o sistema tende a se comportar como o “material bruto”, e a menos que o recobrimento seja espesso o suficiente, lascamentos no material recoberto podem acontecer.

Além dessas existem ainda as falhas do tipo “*buckling*”, que são comumente encontradas em recobrimentos finos, com espessura inferior a 10 μm . A falha, como resposta a tensões de compressão geradas a frente do penetrador, aparece como trincas curvas que se estendem de uma borda à outra do sulco. São delimitadas por empilhamento de fragmentos perpendiculares às trincas (WONG et al., 2004, BULL, BERASETEGUI, 2005, ALVES, R., 2010).

As falhas do tipo “*spallation*” são mais comuns em recobrimentos espessos. O processo de formação dessas falhas envolve trincas de cisalhamento que são formadas a alguma distância à frente do penetrador e através do recobrimento. Esta propagação é realizada em ângulo em relação à interface e comporta-se como fronteira. O movimento do penetrador leva os campos de tensões para além dessas fronteiras, gerando uma trinca interfacial. O aumento dessas trincas interfaciais, por sua vez, amplia os limites de levantamento do recobrimento, culminando com o deslocamento do recobrimento a frente do penetrador (WONG et al., 2004, BULL, BERASETEGUI, 2005, ALVES, R., 2010).

As falhas do tipo “*conformal cracking*” são caracterizadas somente por fraturas no fundo da pista. Estas fissuras formam trajetórias semicirculares paralelas à superfície de contato da ponta do penetrador e no sentido desta. São originadas por ação direta da deformação do recobrimento e substrato pelo penetrador, resultando em momentos de

deformação tênsil dentro do recobrimento à medida que é pressionado pela ponta no sentido do seu avanço (TAVARES, 2002).

As falhas do tipo “*tensile cracking*” também são caracterizadas somente por fraturas no fundo da pista, no entanto as fissuras semicirculares são agora paralelas à superfície traseira de contato do penetrador e no sentido desta; i.e., simétricas das conformais. São criadas por tensões friccionais de tração presentes na parte traseira do avanço da ponta.

A Figura 3.10 mostra os principais mecanismos de falhas de adesão entre um recobrimento e o substrato (TAVARES, 2002).

Figura 3.10 – Mecanismos de falhas de adesão

FONTE: TAVARES, 2002.

3.7. Ensaios *in vitro*

Para avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais utilizam-se os testes *in vitro* que possuem a vantagem de fornecerem resultados rápidos a respeito das interações do material em meios biológico e diminuírem os ensaios em animais (SANTOS et al., 2002; KAI, 2012). A detecção de efeitos tóxicos (morte celular, alterações de adesão celular, proliferação celular e atividade biosintética) dos biomateriais numa fase preliminar é uma das funções dos testes *in vitro* (MATSUI, 2007).

A utilização de cultura celular enquanto teste *in vitro* iniciou-se com estudos de materiais dentários na década de 50, testando a citotoxicidade de metais, cimentos e plásticos (KAWAHARA *et al.*, 1968). Já na década de 70, Leiskar e Helgeland (1972) desenvolveram o primeiro estudo envolvendo crescimento de células sobre e ao redor de discos padronizados de materiais dentários, tais como amalgamas, resinas, cimentos e ligas a base de ouro. Na mesma época, deu-se início aos testes *in vitro* quantitativos, com o objetivo de avaliar o número de células mortas na cultura na presença de um material sintético (DICKSON, 1970; KAI, 2012).

Somente após a confirmação de biocompatibilidade do biomaterial a partir dos testes *in vitro*, que se prossegue a realização dos ensaios *in vivo* em animais para estudar reações adversas em tecidos moles e/ou ossos e sobre a toxicidade sistêmica (PIZZOFERRATO et al. 1994; BEN-NISSAN, 2014). A *International Organization for Standardization* (ISO 10993-5, 2009) padroniza os testes de citotoxicidade *in vitro* de biomateriais, que se baseiam em análises quantitativas e qualitativas no desenvolvimento de células em contato direto ou indireto com o material avaliado. A quantificação das células pode ser realizada de forma direta (número de colônias formadas) ou indireta (por exemplo, a partir da determinação de componentes celulares ou de produto do metabolismo celular) (ISO 10993-5, 2009). A avaliação qualitativa é normalmente feita por microscopia (microscópios ópticos e eletrônicos) analisando a morfologia e/ou a adesão celular (ROGERO, 2003).

Dentre os mais utilizados na literatura estão o brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e a liberação da *lactato desidrogenase* (LDH). Onde em ambos os casos, a partir da absorção óptica se obtêm a redução de produtos de enzimas específicas, sendo consequentemente correlacionadas com avaliações de funções celulares, determinando atividades fisiológicas vitais (LOBO, 2008; ALMEIDA, 2012). O teste por MTT consiste na absorção do sal MTT pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazana. Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído através da adição

de um solvente apropriado. Sendo assim, sua intensidade de coloração (azul) é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

O teste de LDH-liberado analisa o dano sofrido pela membrana celular em contato com o biomaterial. Sendo que o LDH é uma enzima citosólica encontrada no interior das células sendo liberada apenas quando agentes citotóxicos causam aumento da permeabilidade da membrana ou dano irreversível a mesma. A percentagem LDH-liberado a partir de células fornece uma análise extremamente precisa de citotoxicidade do material (CUI, LI, 2000). O LDH permite avaliar o número total de células viáveis relacionando com a proliferação (ALMEIDA, 2012).

A avaliação da citotoxicidade do material pode ser feita também através de métodos qualitativos, através da análise da morfologia celular, proliferação e adesão celular, com o auxílio de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (SCHMALZ, 1994; LOBO et al., 2009; ALMEIDA, 2012).

Outro método qualitativo é a Microscopia Óptica por Fluorescência, onde o mecanismo utilizado é através de indicadores de fluorescência, os fluoróforos, que produzem fluorescência no material de estudo, através da absorção da luz num determinado comprimento de onda. Ajudando a visualizar com maior nitidez estruturas e processos celulares (ALBERTS et al., 1997).

3.8. Mercado dos biomateriais

O mercado relacionado à área de biomateriais é expressivo tanto do ponto de vista do número de unidades comercializadas anualmente quanto o relacionado à movimentação financeira observada, podendo ser segmentado convenientemente com base em dois diferentes critérios (MARKETS AND MARKETS, 2014). O primeiro refere-se aos tipos de compostos a partir dos quais os biomateriais são constituídos, como metais, cerâmicas, polímeros e materiais de origem natural. O segundo critério baseia-se na forma de aplicação do biomaterial, como ortopédico, cardiovascular, odontológico, oftalmológico, para cirurgia plástica, engenharia tecidual, tratamento de lesões, distúrbios neurológicos e do sistema nervoso central, além de incluir também dispositivos com outras aplicações, como gastrointestinais e urinárias, ou como sistemas de liberação de fármacos e para cirurgia bariátrica (PIRES et al., 2015).

Com relação ao número de unidades dos diferentes tipos de biomateriais utilizados anualmente, de acordo com Ratner e colaboradores (RATNER et al. 2013) é estimado, por exemplo, o emprego de cerca de 1 bilhão de cateteres, 150 milhões de lentes de contato e 7

milhões de lentes intraoculares por ano. Na faixa de 1 a 2,5 milhões de unidades por ano destacam-se as próteses de quadril, joelho e ombro, dispositivos para hemodiálise e oxigenação sanguínea, *stents* cardiovasculares, parafusos e placas de fixação óssea, tubos auriculares e dispositivos intrauterinos. Marca-passos, implantes de mama, válvulas cardíacas, próteses para vasos sanguíneos, discos e dispositivos de fusão para coluna vertebral, desfibriladores implantáveis, prótese coclear e telas para cirurgia de hérnia, por exemplo, são utilizados na ordem de magnitude de 2 a 7 centenas de milhares de unidades anualmente (PIRES et al., 2015).

Nota-se expressiva expansão ao longo dos últimos anos no mercado global de biomateriais. Em 2008, este mercado movimentou US\$ 25.6 bilhões mundialmente, tendo a seguinte distribuição: 43% nos EUA, 33% na Europa, 3% na Ásia (Pacífico), 2% no Brasil e 19% no restante do mundo (MARKETS AND MARKETS, 2014). Em 2012, este mercado atingiu a cifra de US\$ 44 bilhões, tendo-se previsões de que atinja, em 2017, o total de US\$ 88,4 bilhões, com uma taxa de crescimento de 22,1% ao ano. Supostamente, este mercado continuará sendo liderado nos próximos anos pela América do Norte, Europa e Ásia (PIRES et al., 2015).

Globalmente, o segmento de maior sucesso em vendas é o de implantes ortopédicos, com perspectivas de atingir US\$ 57,9 bilhões em 2016 (MARKETS AND MARKETS, 2014). Apesar de haver registro conflitante de previsão com relação a este segmento, a expectativa de gastos em 2019 deverá exceder US\$ 33 bilhões, com a categoria de biomateriais implantáveis de maneira geral, (MARKETS AND MARKETS, 2014; PIRES et al., 2015).

Outro ramo de destaque é o de biomateriais para aplicações cardiovasculares, com fração de mercado estimada em 34,5% (dados de 2012) (MARKETS AND MARKETS, 2014). Apesar de atualmente os biomateriais metálicos dominarem o mercado mundial em cerca de 50%, esperasse no futuro próximo o crescimento acentuado do mercado de biomateriais poliméricos, em decorrência de características mais apropriadas quanto à flexibilidade, elasticidade, inércia biológica, biocompatibilidade e longevidade.

No Brasil, o mercado de biomateriais foi de US\$ 690 milhões em 2010 e de US\$ 1,7 bilhões em 2015 (crescimento de 20%) (MARKETS AND MARKETS, 2014). Neste país, o ramo de maior movimento econômico é o de produtos ortopédicos (37,5% do mercado total em 2009), seguido do de biomateriais de uso cardiovascular (36% do total). Já em 2011 as cirurgias ortopédicas chegavam, no Brasil, a quase 300 mil por ano, de acordo com dados do Sistema Único de Saúde reportados no Portal Brasil, (MARKETS AND MARKETS, 2014) um número muito menor, entretanto, do que o dos procedimentos observados em adultos nos

EUA, estimado em US\$ 1,9 milhões (MARKETS AND MARKETS, 2014) possivelmente por limitação do acesso dos pacientes e hospitais a muitos dos dispositivos implantáveis em razão do alto custo. A área de tratamento de lesões teve crescimento em torno de 24% entre os anos de 2010 a 2015 (PIRES et al., 2015).

O intenso crescimento observado no mercado de biomateriais é atribuído a três motivos principais: o envelhecimento da população mundial, com a elevação da expectativa de vida; o aumento do poder aquisitivo e do padrão de vida nos países em desenvolvimento, que facilitam o acesso ao tratamento de diversos tipos de enfermidades; e as melhorias tecnológicas na abordagem de doenças anteriormente vistas como não tratáveis. O aspecto do envelhecimento populacional demanda particular atenção, visto que, com base nas estimativas de que, no ano 2050, uma fração igual a 21,1% da população global terá mais que 60 anos, correspondendo a mais de 2 bilhões de pessoas (MARKETS AND MARKETS, 2014), pode-se esperar, nos próximos anos, um aumento ainda mais apreciável da demanda de biomateriais e mesmo de novas e mais consolidadas abordagens terapêuticas para atender às necessidades destas pessoas (PIRES et al., 2015).

Além disso, o aumento no número de pacientes submetidos a cirurgias produz um impacto financeiro nos sistemas de saúde, pois os implantes ortopédicos geralmente são produzidos com materiais de alto custo. Este fato motiva a busca por materiais com menores custos e que agreguem as características de um material biocompatível e propriedades mecânicas necessárias para suportar os esforços aos quais podem vir a ser submetidos. Nesse sentido, esse trabalho objetivou a produção de um nanocompósito cerâmico que favoreça a integração óssea que possua características mecânicas adequadas e que seja de baixo custo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada na preparação, conformação e caracterização dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$, é apresentada de forma resumida na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Fluxograma da metodologia utilizada na preparação, conformação e caracterização dos nanocompósitos

Os reagentes utilizados na preparação, conformação e caracterização dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$, estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Reagentes utilizados na preparação, conformação e caracterização dos nanocompósitos

Reagentes	Marca
Alumina AKP-53	Sumimoto Chemical
Zircônia-ítria 3%	Nanostructured Materials Inc
Ácido 4-aminobenzóico (PABA)	Vetec Química Fina Ltda.
Ácido oleico	Vetec Química Fina Ltda.
Ácido clorídrico P.A. 37%	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.
Álcool etílico P.A. 99,5%	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.
Ácido fosfórico P.A. 85%	Nuclear - Biotec Produtos Químicos
Ácido nítrico P.A. 68%	Vetec Química Fina Ltda.
Carbonato de sódio anidro	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.
Cloreto de cálcio	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.
Cloreto de magnésio	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.
Cloreto de sódio	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.
Cloreto de potássio	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.
Fosfato de sódio bifásico heptahidratado	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.
Fosfato de potássio bibásico anidro	J.T. Baker Macron Fine Chemicals.
Hidróxido de sódio	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.
Sulfato de sódio	Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.

FONTE: Própria autoria.

4.1. Preparação dos pós de Al_2O_3 com inclusões nanométricas de ZrO_2

O procedimento para a obtenção dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ foram realizados baseando-se em estudos anteriores (PIERRI et al., 2005; CHINELATTO et al., 2012). Para isso, foram preparadas suspensões de Al_2O_3 e ZrO_2 separadamente.

A suspensão de Al_2O_3 foi preparada em um moinho de bolas convencional usando a relação bola/material 5:1, em um frasco de polipropileno com 0,2% em peso de PABA em meio alcoólico, por 1 hora. Simultaneamente foi preparada uma suspensão de ZrO_2 em moinho de bolas usando a relação bola/material 4:1, em frasco de polipropileno com 0,5% em

peso de PABA em meio alcoólico, por 12 horas. Em seguida, foi realizada a mistura das duas suspensões na proporção de 5% em volume de ZrO_2 , sob agitação contínua. A suspensão resultante foi levada ao moinho por 22 horas. Por fim, 0,5% em peso de ácido oleico foi adicionado à suspensão e a mesma foi misturada por mais 2 horas. Em seguida, a suspensão foi seca a temperatura ambiente sob fluxo de ar.

4.2. Conformação e sinterização dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$

A partir dos pós de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ obtidos no item 4.1, foi realizada a conformação dos nanocompósitos em formato de pastilhas de 10 mm de diâmetro e 5 mm de altura, por prensagem uniaxial a 50 MPa utilizando prensa hidráulica manual Marcon, modelo MPH-10, seguida por prensagem isostática a frio a 200 MPa utilizando prensa isostática AIP, modelo CP-360.

Para a eliminação dos resíduos orgânicos incorporados durante a preparação dos pós, os nanocompósitos foram calcinados usando taxa de aquecimento de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ até 400°C por 1 hora em mufla EDG 3PS, modelo 7000. Posteriormente, foram sinterizados em forno MAITEC, modelo FE50RD, usando taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ em dois patamares de temperatura, sendo o primeiro a 1050°C por 1 hora e o segundo a 1500°C por 2 horas. Os parâmetros de sinterização utilizados visam uma maior densificação dos nanocompósitos. A opção pela utilização do patamar a 1050°C foi realizada em função do início de retração dos nanocompósitos, pois a adoção de um patamar de queima anterior ao início da densificação da peça cerâmica, proporciona diminuição e homogeneização nos tamanhos de grãos (SILVA 2011, CHINELATTO et al., 2010, 2012, 2014).

4.3. Caracterizações dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$

Os nanocompósitos foram caracterizados quanto à densidade, antes e após a sinterização. A caracterização microestrutural da superfície polida, após sinterização, foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a caracterização estrutural foi realizada por difratometria de raios-X.

i. Densidade a verde

A medida da densidade a verde (δ) dos nanocompósitos antes da sinterização foi efetuada geometricamente, de acordo com a equação 4.1:

$$\delta = \frac{m}{v} \quad (4.1)$$

onde:

m = massa do nanocompósito em (g);

v = volume do nanocompósito em (cm³), obtido a partir da medida de suas dimensões;

Desta forma, a porcentagem da densidade teórica (% DT) foi determinada a partir da equação 4.2, que relaciona a densidade do nanocompósito com a densidade teórica:

$$\%DT = \frac{\delta}{\delta_t} \times 100 \quad (4.2)$$

onde:

δ = densidade a verde (g/cm³);

$$\delta_t = \text{densidade teórica} \left(\frac{1}{\delta_t} = \frac{XA}{\rho_A} + \frac{XB}{\rho_B} \right), \quad (4.3)$$

XA e XB = porcentagem do material sólido A e B, respectivamente;

ρ_A e ρ_B = densidade do material sólido A e B, respectivamente;

Para tal, o valor de densidade teórica (DT) utilizado para a determinação da Al₂O₃ pura foi de 3,98g/cm³, enquanto que o valor de densidade teórica para a ZrO₂ pura foi de 5,98g/cm³.

ii. Densidade aparente

A densidade aparente (DA) dos nanocompósitos após a sinterização foi calculada de acordo com a equação 4.4, baseada no Princípio de Arquimedes (ASTM C373-88, 1999), no qual o nanocompósito fica submerso em água destilada pelo período de 24 horas à temperatura ambiente.

$$DA = \left(\frac{M_s}{M_u - M_i} \right) \rho_a \quad (4.4)$$

onde:

M_s = massa seca do nanocompósito (g);

M_u = massa úmida do nanocompósito após permanência em água durante 24 horas (g);

M_i = massa do nanocompósito imerso em água (g);

ρ_a = densidade da água na temperatura de trabalho (g/cm³).

Os resultados de densidade aparente, da mesma forma que a descrita no item 4.3.i, foram calculados em termos de porcentagem da densidade teórica (%DT).

iii. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) consiste na focalização de um feixe de elétrons que varre e penetra na superfície do material, interagindo com os átomos presentes, produzindo diferentes sinais como: elétrons secundários, elétrons retro espalhados, elétrons Auger (AZEVEDO, 2006).

Os elétrons secundários revelam a topografia superficial do material, e são os principais responsáveis pela formação da imagem da superfície do material analisado. Enquanto os elétrons retro espalhados, elétrons Auger revelam a composição do material (CANEVAROLO, 2004; AZEVEDO, 2006, SILVA, L., 2011).

A caracterização microestrutural foi realizada na superfície polida dos nanocompósitos. Para isso, foram embutidos em resina epóxi e polidos em politriz automática Buheler, modelo Minimet, com pasta diamantada nas sequências de granulometrias de 9, 6, 3 e 1 μm . Após essa etapa, foram extraídos do embutimento e submetidos a um tratamento térmico usando taxa de aquecimento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até 1450°C por 10 minutos, a fim de revelar os contornos de grãos.

Para a observação no MEV, os nanocompósitos polidos e atacados termicamente foram recobertos com uma fina camada de ouro, depositada por meio de uma evaporadora Balzers, modelo SCD-004, e observados em um microscópio de alta resolução Philips, modelo XL-30 FEG.

iv. Difratometria de raios-X

A difratometria de raios-X (DRX) baseia-se na lei de Bragg que expressa uma relação simples entre a distância das camadas adjacentes de átomos, o comprimento de onda da radiação X e o ângulo de difração, a partir da equação 4.5 (BRAGG, 1913):

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad (4.5)$$

onde:

n = número inteiro;

λ = comprimento de onda dos raios-X;

d = distância interplanar;

Θ = ângulo de incidência dos raios-X.

Para a caracterização estrutural dos nanocompósitos sinterizados foi utilizado um difratômetro Rigaku, modelo Miniflex 600, com radiação $K_{\beta(Cu)} = 1,5405 \text{ \AA}$, operando com tensão de 40 kV e corrente de 15 mA. A velocidade do goniômetro utilizada foi de $0,05^\circ/\text{min}$, variando de 20° a 80° .

4.4. Tratamentos superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$

A melhora da interação entre a camada de fosfatos de cálcio formada e a superfície do material pode ser obtida a partir de prévios tratamentos ao recobrimento biomimético. Nesse sentido, a realização de um processo prévio de ativação da superfície como tratamentos químicos com soluções ácidas e alcalinas ou por plasma se apoiam no fato de assegurar uma união interfacial adequada entre o material bioinerte e a camada bioativa formada sobre sua superfície.

Na realização dessa etapa, os nanocompósitos foram divididos em três grupos.

- * grupo I: nanocompósitos sem tratamentos superficiais;
- * grupo II: nanocompósitos tratados quimicamente;
- * grupo III: nanocompósitos tratados por plasma.

4.4.1. Tratamento químico

O tratamento superficial químico foi realizado baseando-se em estudos anteriores (UCHIDA et al., 2002). Para isso, os nanocompósitos foram imersos em 35 mL de solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 5 mol/L) e 35 mL de solução de ácido nítrico (HNO_3 5 mol/L) para tratamento ácido, e em 35 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH 15 mol/L) para tratamento alcalino, à temperatura de 90°C durante 4 dias, em banho termostático, sob refluxo. O volume adequado para imersão dos nanocompósitos foi calculado de acordo com a equação 4.6 (ISO FDIS 23.317, 2005):

$$V_s = \frac{Sa}{10} \quad (4.6)$$

onde:

V_s = volume solução (mL);

Sa = área superficial do nanocompósito (m^2);

Após os tratamentos superficiais, os nanocompósitos foram lavados em água destilada, secos à temperatura ambiente e armazenados em dessecador por 72 horas.

4.4.2. Tratamento por plasma

Os nanocompósitos foram expostos a atmosferas diferentes de plasma: nitrogênio (N_2), hidrogênio (H_2) e oxigênio (O_2). O plasma foi produzido com auxílio de uma fonte de tensão pulsada, potência de 1kW e tensão máxima de 900 V. O processo ocorreu num reator de vidro de borossilicato, com 180 mm x 300 mm (diâmetro x altura), fechado por dois flanges de aço inox. Pelo flange superior (eletricamente aterrado) foram inseridos os gases de trabalho. Pelo flange inferior, eletricamente isolado, passa o termopar. Nesse mesmo flange encontra-se acoplado uma bomba mecânica e um manômetro. A bomba mecânica foi usada para evacuar o sistema a aproximadamente 10^{-3} mbar. A pressão do reator foi medida por um sensor de membrana capacitiva, através de um mostrador digital. A temperatura do tratamento foi medida utilizando um termopar do tipo alumel-cromel que está fixado na parte inferior do cátodo. O fluxo de gás foi regulado por um controlador de fluxo e introduzido no reator por orifícios situados no flange superior. Para todas as condições foram fixadas a temperatura ($400^\circ C$), pressão (2 mbar), fluxo de gás (20 sccm) e razão ton:toff (100:50). Testes preliminares foram realizados utilizando as seguintes atmosferas e condições de processo: 20% N_2 -80% H_2 ; 40% N_2 -60% H_2 ; 40% N_2 -40% H_2 -20% O_2 ; 30% N_2 -50% H_2 -20% O_2 ; 100% N_2 e 100% O_2 .

4.4.3. Caracterizações superficiais dos nanocompósitos de $Al_2O_3/5\%ZrO_2$

Após a realização dos tratamentos superficiais químicos e por plasma, os nanocompósitos foram lavados em água destilada, secos à temperatura ambiente e armazenados em dessecador por 72 horas e em seguida caracterizados por microscopia confocal e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

i. Microscopia confocal

A microscopia confocal consiste na caracterização topográfica de superfícies. A superfície do material é varrida por um feixe a laser, e sua imagem é virtualmente montada ponto a ponto pela detecção da intensidade da reflexão da luz na superfície do mesmo. A microscopia confocal se caracteriza pela utilização de uma abertura circular no caminho óptico, este tem a função de eliminar a luz refletida que esteja fora do plano focal (OLIVEIRA, A., 2012).

Os parâmetros topográficos possuem a capacidade de descrever uma superfície a partir de valores numéricos. Estes são calculados utilizando fórmulas, filtros matemáticos e estatísticos, preestabelecidas em normas técnicas. Por convenção, todos os parâmetros de rugosidade bidimensionais (2D) são representados pela letra *R* seguido por caracteres adicionais ao índice, enquanto que para os parâmetros tridimensionais usa-se o prefixo *S*. O índice identifica o parâmetro, por exemplo: rugosidade da superfície (*Ra*) que é a média aritmética do perfil de rugosidade (OLIVEIRA, A., 2012).

Para medir a *Ra* dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e por plasma foi utilizado um microscópio confocal a laser OLYMPUS, modelo LEXT-OLS4100. A *Ra* foi calculada a partir de 4 pontos de cada amostra ($n=6$), totalizando 24 valores de *Ra* para cada condição de tratamento. Além disso, foi possível ainda obter micrografias representativas da superfície dos nanocompósitos.

ii. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de análise para obter um espectro de infravermelho mais rapidamente. Em vez de se coletar os dados variando-se a frequência da luz infravermelha monocromática, a luz infravermelha (com todos os comprimentos de onda da faixa usada) é guiada através de um interferômetro. Depois de passar pela material o sinal é medido em um interferograma, realizando-se uma transformada de Fourier no sinal resultando em um espectro idêntico ao da espectroscopia no infravermelho convencional dispersiva (GADALETA et al., 1996. ; BERZINA-CIMDINA, BORODAJENKO, 2012).

Para a caracterização dos grupos funcionais presentes na superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e por plasma foram obtidos espectros de infravermelho utilizando espectrômetro de infravermelho médio com transformada de Fourier, Bruker, modelo Vertex 70, utilizando o acessório de refletância difusa (DRIFT) com 32 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de absorbância de FTIR obtidos foram tratados matematicamente utilizando uma função Gaussiana, sendo suas linhas de base corrigidas e segunda derivada calculada.

4.5. Recobrimento biomimético dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$

As composições escolhidas para a elaboração das soluções de SBF foram às propostas por Barrere e colaboradores, SBF 5,0x (BARRERE et al., 2002) e por Abe e colaboradores SBF 1,5x (ABE et al., 1990).

4.5.1. Recobrimento com solução de SBF 1,5x

Para o preparo da solução de SBF 1,5x os reagentes e suas quantidades, mostrados na Tabela 4.2 foram dissolvidos em meio aquoso e o pH da solução foi ajustado para 7,25 à temperatura ambiente pela adição de ácido clorídrico (HCl 1 mol/L). Após o preparo, as soluções foram acondicionadas em frasco de polietileno e mantidas em refrigeração, até o momento de sua utilização.

Tabela 4.2 – Reagentes e quantidades necessárias para o preparo da solução de SBF 1,5x

Reagentes	NaCl	KCl	K ₂ HPO ₄	CaCl ₂ .2H ₂ O	MgCl ₂ .2H ₂ O	NaHCO ₃	Na ₂ SO ₄
Quantidade (g/L)	11,99	0,33	0,26	0,55	0,45	0,52	0,10

FONTE: ABE et al., 1990.

Para o recobrimento da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos, os mesmos foram imersos em 35 mL de solução de SBF 1,5x. O volume adequado para imersão foi calculado de acordo com a equação apresentada no item 4.4.1, sendo colocado um nanocompósito por frasco de polipropileno e acondicionados em incubadora refrigerada de bancada Marconi, modelo MA420, a temperatura de 36,5°C e sob agitação de 60 rpm. Após o período de 7,14, 21 e 28 dias de incubação, foram retirados da solução de SBF, lavados em água destilada, secos à temperatura ambiente e armazenados em dessecador por 72 horas.

4.5.2. Recobrimento com solução de SBF 5,0x

No preparo da solução de SBF 5,0x os reagentes mostrados na Tabela 4.3 foram dissolvidos em meio aquoso e o pH da solução foi ajustado para 6,10 à temperatura ambiente pela adição de ácido clorídrico (HCl 1 mol/L). Após o preparo, as soluções foram acondicionadas em frasco de polietileno e mantidas em refrigeração, até o momento de sua utilização. Ressalta-se ainda, que a solução de SBF apresenta um prazo máximo de validade de 30 dias (LOBO, 2011).

Tabela 4.3 – Reagentes necessários para o preparo da solução de SBF 5,0x

Reagentes	NaCl	MgCl ₂ .2H ₂ O	CaCl ₂ .2H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	NaHCO ₃
Quantidade (g/L)	40,00	1,52	1,84	0,89	1,76

FONTE: BARRERE et al., 2002.

Para o recobrimento da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e por plasma, os mesmos foram imersos em 35 mL de solução de SBF 5,0x. O volume adequado para imersão foi calculado de acordo com a equação apresentada no item 4.4.1, sendo colocado um nanocompósito por frasco de polipropileno e acondicionados no mesmo equipamento apresentado no item 4.5.1, a temperatura de 36,5°C e sob agitação de 60 rpm. Após o período de 7, 14 e 21 dias de incubação, foram retirados da solução de SBF, lavados em água destilada, secos à temperatura ambiente e armazenados em dessecador por 72 horas.

4.5.3. Caracterizações dos nanocompósitos de Al₂O₃/5%ZrO₂ recobertos

Após a realização dos recobrimentos superficiais usando soluções de SBF 1,5x e 5,0x, os nanocompósitos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, difratometria e fluorescência de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e força atômica.

i. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Para a caracterização dos grupos funcionais presentes na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e por plasma, e recobertos biomimeticamente com soluções de SBF 1,5x e 5,0x foram obtidos espectros de infravermelho utilizando o mesmo equipamento apresentado no item 4.4.3.ii.

ii. Difratometria de raios-X

A caracterização da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e por plasma, e recobertos biomimeticamente com soluções de SBF 1,5x e 5,0x foi realizada por DRX utilizando o mesmo equipamento apresentado no item 4.3.iv. A velocidade do goniômetro utilizada foi de 0,5°/min. variando de 30,5° a 35°. Os difratogramas obtidos foram tratados matematicamente utilizando uma função Gaussiana, para deconvolução das curvas analíticas (valores de R maiores que 0,98). As correlações entre as diferentes fases de

fosfatos de cálcio observadas foram realizadas usando o Coeficiente de Correlação de Pearson (r) (valores de significância estatística menor que 0,07).

iii. Microscopia eletrônica de varredura

A caracterização da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e por plasma, e recobertos biomimeticamente com soluções de SBF 1,5x e 5,0x, foi realizada por MEV utilizando o microscópio eletrônico de varredura HITACHI TM 3000, que permitiu avaliar a distribuição da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos.

iv. Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM) trata-se de outra técnica de caracterização de superfície por varredura. Esta técnica utiliza uma sonda de varredura de altíssima resolução vertical, da ordem de frações de um nanômetro. O microscópio de força atômica é uma das ferramentas mais importantes para geração de imagens e manipulação da matéria em escala nanométrica (OLIVEIRA, A., 2012).

As informações são obtidas pela varredura de um *cantilever*, este possui uma sonda em sua extremidade constituída tipicamente de silício ou nitreto de silício. A sonda possui uma ponta de raio de curvatura da ordem de 10 nanômetros. Quando esta é colocada próximo à superfície do material a ser analisado, forças entre a ponta e o material levam a um desvio do *cantilever*, a qual é medida através de um sensor óptico. Para a construção de uma imagem o AFM utiliza o mapeamento das deflexões do *cantilever*, o sinal do feixe de laser reflete na parte superior do mesmo e este é captado por uma matriz de fotodiodos (OLIVEIRA, A., 2012).

Para a caracterização do formato da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e por plasma, e recobertos biomimeticamente com soluções de SBF 1,5x e 5,0x foi utilizado um microscópio de força atômica NanoSurf, modelo Flex com scanner de 100 micra, sendo as imagens obtidas no modo *tapping*.

v. Fluorescência de raios-X

A análise por fluorescência de raios-X (FRX) é um método quali-quantitativo de maiores e menores constituintes e traços em diferentes tipos de materiais, e consiste em incidir um feixe de raios-X no material em análise e produzir radiações fluorescentes

(transições eletrônicas dos elétrons das camadas mais internas dos átomos), que são características para cada elemento químico. Estas radiações são difratadas por um cristal analisador (de acordo com a lei de Bragg) e captadas por um detector (AGUIAR, 2007, 2013).

Para medir a espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e por plasma, e recobertos biomimeticamente com soluções de SBF 1,5x e 5,0x foi utilizado um espectrômetro de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (FRX) Shimadzu, modelo EDX-720. Para isso, foram analisados sob atmosfera de vácuo pelo método quali-quantitativo, utilizando colimador de 3 mm, operando com tensão de 50 kV e corrente de 1000 μ A.

4.6. Adesão do recobrimento biomimético nos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$

A adesão é uma das principais propriedades que uma camada depositada sobre a superfície de um material deve apresentar. Uma adesão fraca pode levar a falhas prematuras devido à fratura interfaciais (TAVARES, 2002, ALVES, R., 2010, AGUIAR, 2013). Nesse sentido, o teste de riscamento “*scratch test*” é utilizado para avaliar esta propriedade em materiais cerâmicos recobertos biomimeticamente. É um método relativamente rápido e eficiente para adquirir informações sobre os mecanismos de dano de uma camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície do material.

Para avaliar a aderência da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e por plasma, e recobertos biomimeticamente com soluções de SBF 1,5x e 5,0x foi utilizado um tribômetro CETR, modelo UMT-2. Para isso, os nanocompósitos foram fixados num porta amostras com uma fita dupla-face, a fim de evitar a movimentação do mesmo durante o teste. Foi utilizada uma ponta de diamante do tipo cônico de 120° do tipo Rockwell C com ponta arredondada com raio de 200 μ m, conforme a norma ASTM (2010) C1624-05. A carga utilizada foi de 0 a 3N, variando linearmente em função do deslocamento (0 a 6 mm) da ponta sobre o nanocompósito, com velocidade constante de 0,02mm/seg. A adesão da camada formada sobre a superfície foi quantitativamente avaliada pela observação do rompimento da mesma a partir da variação do coeficiente de atrito (COF) e da emissão acústica (AE). O ponto onde ocorreu a primeira trinca foi determinado como a carga crítica (AGUIAR, 2013).

A carga crítica foi determinada a partir da equação proposta por Darbeida e Stebut e citada no trabalho de Nouevau e colaboradores (NOUEVAU et al., 2005).

$$L_c = L_{máx} - L_r \cdot \frac{D}{T_s} \quad (4.7)$$

onde:

L_c = carga crítica (N);

$L_{máx}$ = carga máxima adquirida no final do teste (N);

L_r = taxa de carga indentada durante o risco (N/min);

D = distância entre a carga crítica e o final do ensaio (mm);

T_s = velocidade de translação do indentador (mm/min).

Após a realização do teste de riscamento, a caracterização da superfície foi realizada por MEV utilizando o mesmo equipamento apresentado no item 4.5.3.iii.

4.7. Ensaaios biológicos *in vitro* dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$

No desenvolvimento de um biomaterial, antes de ser testado como implante, o material deve ser avaliado quanto à citotoxicidade. Dessa forma, um biomaterial é inicialmente avaliado por testes *in vitro*, que são caracterizados por apresentarem um fácil controle e alta reprodutibilidade, fornecerem dados de maneira rápida e precisa sobre as interações biológicas, além da vantagem de serem mais acessíveis financeiramente e eliminarem a necessidade de animais em pesquisa (LOBO, 2011).

Os testes *in vitro* a partir de métodos indiretos utilizados neste trabalho tiveram por finalidade a avaliação da citotoxicidade e da proliferação celular na superfície dos nanocompósitos. Foram utilizadas linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO). Essas células apresentam grande versatilidade para adaptação de formas de cultivo. É uma célula de origem epitelial, tipicamente aderente, mas também muito bem adaptável ao crescimento em suspensão. Adicionalmente as células CHO podem ser adaptadas ao cultivo celular em meio completamente livre de soro (ROSSER et al., 2005; SOUZA, T., 2006). No entanto, o uso de soro no meio de cultivo de células aderentes ajuda no crescimento celular, uma vez que é fonte de fatores de crescimento.

4.7.1. Análise de citotoxicidade

A biocompatibilidade dos nanocompósitos foi avaliada de acordo com a norma ISO 10993-5 (2009) para biomateriais, utilizando linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO). As células de CHO foram cultivadas em garrafa para cultura com meio de cultura

celular de mamíferos RPMI 1640-Gibco, com 10% de SFB (soro fetal bovino), 2% de glutamax e 1% de antibiótico, a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂.

Foram testadas a citotoxicidade dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e recobertos biomimeticamente com solução de SBF 5,0x. Foram utilizadas como controle positivo e negativo, pedaços com diâmetro aproximado de 10 mm de látex e papel de filtro, respectivamente. Os nanocompósitos recobertos foram esterilizados em autoclaves e os controles positivos (látex) e negativos (papel filtro) por exposição na luz ultravioleta por 24 horas.

Os testes de citotoxicidade foram realizados em placas para cultura de células com 24 poços estéreis. Os nanocompósitos foram testados em triplicatas e, após serem colocados nos poços da placa de cultura, foi depositado sobre os mesmos 0,5 mL de solução de 10⁴ células/mL. Em seguida as células de CHO foram cultivadas em estufa por 72 horas a 37° C sob atmosfera úmida de 5% de CO₂.

i. Testes colorimétrico para determinar a toxicidade *in vitro*

Após 72 horas de crescimento celular, os nanocompósitos e os controles positivos e negativos foram retirados da placa de cultura e as células cultivadas nos poços foram quantificadas para determinar a viabilidade celular.

A quantificação das células foi realizada adicionando solução de MTT na concentração de 5mg/mL em cada poço e incubando novamente por 2 horas na estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, todo o meio de cultura foi removido e os cristais roxo de formazal foram solubilizados com solução de álcool isopropílico (C₃H₈O) com ácido clorídrico (HCl 0,04N). A absorbância da solução nos poços foi medida utilizando o mesmo equipamento apresentado no item 4.4.3.ii em comprimento de onda de 570nm. A quantificação foi feita utilizando o valor médio de absorbância dos nanocompósitos e controles, sendo subtraído o branco (medida do poço contendo apenas solução de álcool isopropílico com ácido clorídrico 0,04N). A viabilidade celular foi feita considerando o controle positivo (papel de filtro) como 100% de células viáveis.

ii. Análise morfológica e proliferação celular por microscopia óptica e eletrônica de varredura

O desenvolvimento celular foi monitorado à cada 24 horas por microscopia óptica e, após 72 horas de crescimento, os nanocompósitos foram retirados dos poços de cultura e tiveram a superfície avaliada por MEV para determinar a proliferação celular.

Para análises no MEV, os nanocompósitos foram mergulhados em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 mol/L a pH 7,3) para fixação celular durante 24 horas. Posteriormente, os nanocompósitos foram lavados 2 vezes durante 10 minutos em solução tampão de fosfato 0,1 mol/L. Dando sequência, foi realizada a desidratação, que consiste em mergulhar os nanocompósitos por 10 minutos em soluções de acetona (grau espectroscópico) com concentração crescente de 30%, 50%, 70% e 90% e novamente mergulhados por 3 vezes durante 10 minutos em acetona pura. Em seguida, os nanocompósitos foram mergulhados em solução de 1:1 de acetona e hexadimetilsulfóxido (HMDS) durante 30 minutos e depois novamente mergulhados em pequena quantidade de HMDS puro, secos à temperatura ambiente. Por fim, os nanocompósitos foram cobertos com uma fina camada de ouro e analisados por MEV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos a partir das caracterizações físicas, microestruturais e superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ antes da realização dos tratamentos superficiais químicos e por plasma, são apresentados a seguir.

5.1. Caracterização física e microestrutural dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$

i. Densidade a verde

Os nanocompósitos foram caracterizados por medidas de densidade à verde. A densidade a verde dos nanocompósitos ($n=10$) antes da sinterização foi calculada geometricamente, conforme equação 4.1.

Os resultados obtidos foram de $58,75 \pm 0,82\%$ e representam o valor médio e desvio padrão e são apresentados em percentual da densidade teórica (%DT), calculada de acordo com a equação 4.2. E esse resultado para material cerâmico sugere um bom empacotamento das partículas do material durante o processo de prensagem.

Valores elevados de densidade à verde também está intimamente relacionada com altos valores de resistência mecânica (ARAÚJO, 2012).

ii. Densidade aparente

Os nanocompósitos ($n=10$) foram caracterizados por medidas de densidade aparente.

Os resultados obtidos foram de $97,20 \pm 0,92\%$ e representam o valor médio e desvio padrão e são apresentados em percentual da densidade teórica (%DT) calculada de acordo com a equação 4.2, indicando assim uma boa consolidação do material durante o processo de sinterização.

A densidade aparente é um parâmetro de avaliação da eficiência no processamento do pó assim como da sinterização. Quanto mais próxima do valor teórico, melhor consolidado foi o material, apresentando menor porção de vazios ou poros (SILVA, 2011).

iii. Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 5.1 (a) e (b) apresenta, respectivamente, micrografias obtidas por MEV da superfície polida e atacada termicamente dos nanocompósitos, mostrando uma visão geral e detalhes dos grãos.

A partir dessas micrografias é possível observar uma boa dispersão das nanopartículas de ZrO_2 (regiões mais claras) na matriz, sendo que a maior parte se encontram nos contornos

de grãos e em pontos tríplices da matriz de Al_2O_3 , indicando que o processamento usado foi adequado. As inclusões da ZrO_2 nessas posições favorecem o efeito *pinning* (ancoramento) dos contornos de grãos da Al_2O_3 , inibindo assim o crescimento de grão da matriz (GUIMARÃES et al., 2009).

Figura 5.1 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos (a) visão geral da superfície polida e atacada termicamente e (b) localização dos grãos de ZrO_2 na matriz de Al_2O_3

iv. Difratometria de raios-X

A Figura 5.2 apresenta o DRX do nanocompósito sinterizado, onde se pode observar picos referentes à Al_2O_3 e a ZrO_2 tetragonal, identificados de acordo com as fichas padrões JCPDS (89-7717 e 17-0923), respectivamente.

Figura 5.2 – Difratograma de raios-X da superfície dos nanocompósitos

5.2. Caracterizações superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ tratados

Os resultados obtidos a partir das caracterizações superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ após a realização dos tratamentos superficiais químicos e por plasma, estão dispostos individualmente. Assim, primeiramente são apresentados os resultados obtidos para os nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos.

i. Microscopia confocal

A Figura 5.3 apresenta micrografias representativas obtidas por microscopia confocal da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente. A partir dessas micrografias foi possível observar uma variação na rugosidade média (R_a) superficial dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente.

As superfícies que não receberam tratamentos apresentaram R_a igual a $0,045 \pm 0,002 \mu\text{m}$, enquanto as superfícies tratadas com NaOH , HNO_3 e H_3PO_4 apresentaram R_a igual a $0,054 \pm 0,010 \mu\text{m}$, $0,045 \pm 0,003 \mu\text{m}$ e $0,059 \pm 0,008 \mu\text{m}$, respectivamente. A R_a pode ser associada ao conjunto de desvios microgeométricos caracterizados por saliências presentes nas superfícies (BRUNETTE, 1988; RIBEIRO et al., 2014).

A presença de defeitos, definidos em termos de rugosidade superficial, pode atuar como sítios iniciantes para nucleação e posterior crescimento de cristais de fosfatos de cálcio, uma vez que características dessa natureza são extremamente interessantes, podendo garantir uma adesão mais homogênea e efetiva quando se idealiza o recobrimento superficial de um material (UCHIDA et al, 2002).

Além disso, tem se observado que existem diferenças na molhabilidade de superfícies lisas e rugosas. A influência da rugosidade na molhabilidade começou a ser estudada em 1936 por Wenzel (WENZEL, 1936) e, desde então, os resultados têm demonstrado que a rugosidade afeta diretamente a forma como a superfície pode ser molhada (OLIVEIRA, L., 2010). Se a superfície de um material possuir rugosidade muito baixa, poderá ocorrer ausência dos sítios de fixação da camada formada. Por outro lado, se o substrato possuir grandes picos ou vales, a camada formada não poderá se fixar na superfície, comprometendo o bom desempenho do material (BRUNETTE, 1988; LAMPIN et al., 1997; RIBEIRO et al., 2014).

Figura 5.3 – Micrografias obtidas por microscopia confocal da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos

ii. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A Figura 5.4 apresenta a segunda derivada dos espectros de absorbância obtidos por FTIR da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente. O gráfico menor inserido na Figura apresenta as áreas relativas dos espectros de FTIR no intervalo entre 400 - 4000 cm^{-1} (região do infravermelho médio) para todos os tratamentos superficiais químicos realizados.

Figura 5.4 – Segunda derivada dos espectros de absorbância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos

Bandas de absorção acima da região espectral de 1000 cm^{-1} não foram observadas para todas as condições estudadas.

As ausências das bandas de absorção nas regiões espectrais em torno de 3656 cm^{-1} (vibração de estiramento do grupo OH) fisicamente adsorvido com Al^{+3} , em 3447 cm^{-1} (vibrações de estiramento do grupo OH), em torno de 1638 cm^{-1} (vibrações de deformação de moléculas de H_2O), em torno de 1070 cm^{-1} (vibrações de deformação do grupo Al-OH) e em $\sim 1764/\sim 1634/\sim 1385\text{ cm}^{-1}$ (vibrações de deformação do grupo Zr-OH) podem ser explicadas pela eliminação da água superficial dos nanocompósitos, resultando em uma estrutura cristalina totalmente anidra (ZHANG, GLASSER, 1993; SARKAR et al, 2007). Já os picos em $878, 640$ e 580 cm^{-1} observados nos espectros de segunda derivada dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos, podem ser atribuídos às bandas de absorção do grupo Al-O; enquanto que os picos em $621, 475$ e 445 cm^{-1} , observados nos mesmos espectros de segunda derivada, podem ser atribuídos às bandas de absorção do grupo Zr-O.

Esperava-se que todos os espectros de absorbância de FTIR apresentassem a mesma intensidade e/ou área relativa das bandas de absorção características do material Al_2O_3 e ZrO_2 . No entanto, observou-se que as áreas relativas dessas bandas de absorção aparentemente dependem do tipo de tratamento superficial químico realizado.

A área relativa do espectro dos nanocompósitos que receberam tratamento químico com H_3PO_4 foi menor quando comparado às demais condições de tratamentos químicos realizados. É importante ressaltar, que esse comportamento também pode ser observado pela diferença de intensidade apresentada pelas bandas de absorção em 475 cm^{-1} atribuída à vibração do grupo Zr-O do material (BERZINA-CIMDINA; BORODAJENKO, 2012).

Nos processos de tratamentos superficiais pode-se considerar as interações ocorrentes entre as moléculas do meio aquoso com a superfície do sólido. O líquido é composto por moléculas que podem se mover livremente, procurando ocupar a posição de menor energia potencial, ou seja, o lugar onde a soma de todas as forças, tanto atrativas quanto repulsivas, sobre elas seja minimizada. Estudos realizados por Brandão e colaboradores (BRANDÃO et al., 2010) relatam que uma alta energia de superfície apresenta melhor molhabilidade e uma melhor afinidade por adsorção, o que poderia determinar o tipo de comportamento apresentado por essa superfície, hidrofílico ou hidrofóbico (OLIVEIRA, L., 2010).

Outra característica interessante observada nos espectros de absorbância de FTIR (Figura 5.4) é a ausência da banda de absorção das vibrações de estiramento e deformação de OH do grupo Me-OH na região de $2300\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$ (HENCH, 1998).

Estudos realizados por Uchida e colaboradores (UCHIDA et al., 2002) observaram que compósitos de Ce-TZP/ Al_2O_3 tratados quimicamente com H_3PO_4 e NaOH apresentaram a formação de grupos Zr-OH e/ou Al-OH sobre a sua superfície. No entanto, a não observação de vibrações do grupo Me-OH na superfície dos nanocompósitos é um indicativo de que os diferentes tratamentos superficiais químicos realizados não formaram grupos do tipo Zr-OH ou Al-OH sobre a sua superfície. Nesse sentido, a afirmação de Uchida e colaboradores (UCHIDA et al., 2002) de que somente os grupos Zr-OH formados na superfície do compósito seriam os responsáveis pela nucleação e formação de fosfatos de cálcio (na presença de SBF) não explicaria a eficácia do recobrimento biomimético para os nanocompósitos.

5.3. Recobrimento biomimético dos nanocompósitos tratados quimicamente

Salienta-se que o recobrimento biomimético dos nanocompósitos usando solução de SBF 1,5x não estava inicialmente previsto. No entanto, a escolha em realizar essa condição de recobrimento foi para avaliar a influência da concentração de SBF na formação das diferentes fases de fosfatos de cálcio sobre a superfície do material, uma vez que a literatura relata que a utilização da solução de SBF 5,0x mais concentrada influencia apenas no menor tempo de incubação. Nesse sentido, a utilização das duas condições visou correlacionar os tipos de fases

de fosfatos de cálcio e o tempo de incubação. Os resultados obtidos a partir das caracterizações superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ sem e com tratamentos químicos e por plasma após o recobrimento biomimético estão dispostos individualmente. Dessa forma, primeiramente são apresentados os resultados obtidos para os nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e recobertos usando soluções de SBF 1,5x e 5,0x.

5.3.1. Recobrimento com solução de SBF 1,5x

i. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A Figura 5.5 apresenta os espectros de absorbância da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x. Os gráficos menores inseridos apresentam uma ampliação no intervalo entre 1020 - 1200 cm^{-1} , uma vez que essa região não apresenta bandas de absorção referentes aos grupos funcionais do substrato, sendo observadas apenas bandas de absorção característica dos grupos funcionais dos fosfatos.

A Tabela 5.1 apresenta a área percentual sob as curvas de deconvolução nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x.

Figura 5.5 – Espectros de absorvância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Tabela 5.1 – Área percentual sob as curvas de deconvolução observadas nos espectros de absorvância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Condições de tratamento															
Sem tratamento				H ₃ PO ₄				HNO ₃				NaOH			
21 dias		28 dias		21 dias		28 dias		21 dias		28 dias		21 dias		28 dias	
Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)
9,89	996	1,61	977	23,66	990	0,00	990	2,61	982	4,59	980	1,20	986	0,42	986
3,40	1013	4,15	1015	3,58	1002	5,81	1003	5,75	1023	4,10	1023	25,45	1001	6,17	1015
20,96	1029	15,70	1030	4,33	1043	13,23	1024	18,65	1037	15,57	1037	1,38	1035	32,10	1036
45,21	1062	32,71	1051	10,57	1061	23,76	1041	36,84	1060	41,29	1063	0,91	1052	25,27	1065
0,00	1079	22,94	1079	39,48	1090	31,76	1067	0,00	1067	0,00	1067	2,26	1076	0,00	1097
10,54	1104	13,74	1108	0,00	1108	0,00	1108	28,25	1102	23,63	1105	23,15	1101	20,20	1101
10,00	1126	6,57	1126	17,06	1133	25,44	1129	7,45	1124	7,80	1125	37,65	1119	15,84	1125
0,00	1176	2,58	1176	1,32	1192	0,00	1192	0,45	1165	3,02	1180	8,00	1164	0,00	1164

Após os períodos de 14 e 21 dias de incubação, pode-se observar na Figura 5.5, bandas de absorção características dos grupamentos fosfatos $(\text{PO}_4)^{3-}$ na região entre 970 a 1200 cm^{-1} . Sendo observadas bandas de absorção em $\sim 977 \text{ cm}^{-1}$ que podem ser atribuídas modo de estiramento do grupo PO_4^{3-} e modo de estiramento da fase β -TCP, enquanto as observadas em $\sim 980/ \sim 982/ \sim 986 \text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas grupo PO_4^{3-} em HA. Já as bandas de absorção observadas em $\sim 990 \text{ cm}^{-1}/\sim 996 \text{ cm}^{-1}$ ao modo de estiramento assimétrico da ligação P-O do grupo PO_4^{3-} . As bandas de absorção observadas na região entre 1001-1024 cm^{-1} são atribuídas ao grupo HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica. Já as bandas de absorção observadas na região entre 1029-1037 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação P-O do grupo PO_4^{3-} . Enquanto as bandas de absorção observadas na região entre 1041-1065 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação do grupo PO_4^{3-} e da fase α -TCP. As bandas de absorção observadas na região entre 1067-1097 cm^{-1} podem ser atribuídas ao grupo HPO_4^{2-} . Já as bandas de absorção na região entre 1101-1108 cm^{-1} são atribuídas ao grupo HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica. As observadas na região entre 1119-1126 cm^{-1} são também atribuídas ao grupo HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica e modo de estiramento da fase β -TCP. A banda de absorção em $\sim 1133 \text{ cm}^{-1}$ é atribuída ao modo de estiramento assimétrico do grupo PO_4^{3-} . Finalmente, as bandas de absorção observadas nas regiões entre 1164-1192 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento do grupo PO_4^{3-} (GADALETA et al., 1996; KOUTSOPOLOUS, 2002; BERZINA-CIMDINA, BORODAJENKO, 2012; ALMEIDA FILHO et al., 2013). As posições dos picos observadas nos espectros de absorbância nas regiões dos fosfatos (970 a 1200 cm^{-1}) estudadas, assim como suas atribuições segundo a literatura, estão resumidas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Bandas de absorção dos picos (cm^{-1}) observadas nos espectros de absorbância de FTIR e suas atribuições segundo a literatura

Regiões (cm^{-1})	Atribuições
~977	Estiramento do grupo PO_4^{3-} e modo de estiramento da fase β -TCP
~980, 982, 986	Grupo PO_4^{3-} em HA
~990, 996	Estiramento assimétrico da ligação P-O do grupo PO_4^{3-}
1001-1024	Grupo HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica
1029-1037	Estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação P-O do grupo PO_4^{3-}
1041-1065	Estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação do grupo PO_4^{3-} e da fase α -TCP
1067-1097	Grupo HPO_4^{2-}
1101-1108	Grupo HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica
1119-1126	Grupo HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica e modo de estiramento da fase β -TCP
~1133	Estiramento assimétrico do grupo PO_4^{3-}
1164-1192	Estiramento do grupo PO_4^{3-}

FONTE: GADALETA et al., 1996; KOUTSOPOULOS, 2002; BERZINA-CIMDINA, BORODAJENKO, 2012; ALMEIDA FILHO et al., 2013.

De forma geral, após o período de 28 dias de incubação, pode-se observar que as porcentagens das áreas das bandas de absorção nas regiões entre 1029-1037 cm^{-1} aumentaram nos nanocompósitos que receberam tratamento químico com NaOH. Já na região entre 1041-1065 cm^{-1} pode-se observar um aumento nas porcentagens das áreas de absorção nos que receberam tratamento químico com H_3PO_4 , HNO_3 e NaOH. Enquanto na região 1101-1108 cm^{-1} observou-se um decréscimo nas porcentagens das áreas das bandas de absorção para os que receberam tratamento químico com H_3PO_4 , HNO_3 e NaOH (Tabela 5.1).

Nesse sentido, o simultâneo decréscimo das porcentagens das áreas da banda de absorção atribuída à formação da fase α -TCP com o aumento das porcentagens das áreas da banda de absorção, atribuída à formação fase HA, pode sugerir que a fase α -TCP está contribuindo na formação da fase HA, que é mais estável, após o período de 21 dias de incubação.

Além disso, é importante ressaltar, que esse mesmo comportamento também foi observado nos nanocompósitos que receberam o mesmo tratamento superficial e posteriormente foram recobertos com solução de SBF 5,0x (Figura 5.14).

Pode-se observar ainda que os nanocompósitos tratados com NaOH apresentaram um aumento nas porcentagens das áreas das bandas de absorção nas regiões entre 1029-1037 cm^{-1}

e em 1049-1065 cm^{-1} . Observou-se ainda, nessas mesmas condições, uma diminuição da área da banda de absorção em 1100-1008 cm^{-1} , refletindo no aumento da quantidade de HA e na diminuição da quantidade de α -TCP formado sobre as suas superfícies durante o maior período de incubação, contrariamente ao comportamento observado em SBF 5,0x, sugerindo assim a efetividade do tratamento para promover a formação de fosfatos de cálcio sobre a superfície do material.

Ressalta-se ainda, que os resultados observados para esse tratamento (NaOH) são contrários ao reportado na literatura. Em 2007 Aguiar realizou tratamentos químicos superficiais em compósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ com soluções de H_3PO_4 5 mol/L e NaOH 15 mol/L e o recobrimento com solução de SBF 1,5x. Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com NaOH promoveu um aumento na quantidade de ZrO_2 monoclinica e consequentemente a formação de trincas, inviabilizando o material (AGUIAR, 2007). Fato este que também não foi observado neste trabalho.

ii. Difratometria de raios-X

A Figura 5.6 e a Tabela 5.3 apresentam, respectivamente, os difratogramas de raios-X e as porcentagens de fosfatos de cálcio presentes na camada formada sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF, no intervalo entre 31,0° a 34,0°, uma vez que essa região não apresenta picos referentes ao substrato, sendo observados apenas picos característicos dos fosfatos de cálcio formados da superfície dos anocompósitos. Os deslocamentos das curvas de deconvolução foram analisados baseando-se nos Índices de Miller (hkl) padrões de cada fase dos fosfatos de cálcio.

Figura 5.6 – Difratomogramas de raios-X da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Tabela 5.3 – Porcentagens das diferentes fases formadas sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Condições de tratamento		Sem tratamento			H ₃ PO ₄			HNO ₃			NaOH		
Período de incubação (dias)		14	21	28	14	21	28	14	21	28	14	21	28
^a hkl reflexão	(511)	17,54	26,71	27,75	8,35	8,51	15,63	19,74	15,85	14,64	18,45	2,94	15,36
	(211)	39,98	43,14	44,50	12,37	13,60	6,66	27,73	65,88	58,65	7,95	81,75	67,77
	(112)	5,48	5,90	6,45	69,80	69,84	43,20	23,75	5,23	5,30	24,70	2,11	10,72
	(128)	37,00	24,25	21,30	9,48	8,05	34,51	28,78	13,04	21,41	48,90	13,20	6,15

^a índices de Miller referente ao planos cristalinos segundo JCPDS.

A partir das curvas de deconvolução sob o difratograma de DRX (Figura 5.6), pode-se observar a formação de fases distintas de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente. Assim, foi possível distinguir o crescimento de cristais das fases de α -TCP no plano (511) (JCPDS n°: 09-348), β -TCP no plano (128) (JCPDS n°: 09-169) e HA nos planos (211)/(112) (JCPDS n°: 09-432 e 73-1731). É importante ressaltar que as fases de fosfatos de cálcio foram observadas em todos os períodos de incubação e em todas as condições de tratamentos superficiais químicos em que foram submetidos.

Após o período de 14 dias de incubação, pode-se observar uma maior quantidade da fase α -TCP formada sobre a superfície dos nanocompósitos que receberam tratamento com H_3PO_4 (19,74%). No entanto, para o mesmo período os tratados com HNO_3 exibiram menor percentual de formação dessa fase (8,35%). Aos 21 dias de incubação, observou-se uma diminuição na fase α -TCP formada sobre a superfície dos tratados com H_3PO_4 (decréscimo de 19,71%) e com NaOH (decréscimo de 86,80%); ao contrário do observado nos tratados com HNO_3 (aumento de 1,90%). Nos que não receberam tratamento observou-se um aumento de 52,30% dessa fase. Após os 28 dias de incubação, pode-se observar um aumento significativo na quantidade da fase α -TCP formada sobre a superfície dos tratados com HNO_3 (83,66%); contrariamente ao observado nos tratados com H_3PO_4 (decréscimo 7,60%).

Após o período de 14 dias de incubação, pode-se observar uma maior quantidade da fase β -TCP formada sobre a superfície dos tratados com NaOH (48,90%), enquanto os tratados com HNO_3 exibiram menor percentual de formação dessa fase sobre sua superfície (9,50%). Já aos 21 dias de incubação, observou-se uma diminuição significativa na fase β -TCP formada sobre a superfície dos tratados com NaOH (73,00%). Nas demais condições de tratamento, a diminuição dessa fase foi 54,70% nos tratados com H_3PO_4 e 15,10% para os tratados com HNO_3 . Nos que não receberam tratamento observou uma diminuição de 34,50% na formação dessa fase. Aos 28 dias de incubação, pode-se observar maior formação da fase β -TCP sobre a superfície dos tratados com H_3PO_4 (aumento 64,20%); ao contrário do observado nos tratados com NaOH (decréscimo 53,40%).

O fosfato tricálcico (TCP) apresenta um papel importante durante o processo de biomineralização óssea, sendo o precursor direto da HA natural (ELLIOT, 1994). As formas alotrópicas α e β -TCP podem exibir a mesma habilidade de osteocondução, contudo a fase α -TCP apresenta maior bioatividade, devido ao seu arranjo estrutural. Já o β -TCP permite substituições iônicas de cálcio (Ca^{2+}) por magnésio (Mg^{2+}), sem alterar essencialmente sua

estrutura, de forma a estabilizá-la (XIN et al., 2005). Este íon tem sido reportado como responsável pelo distúrbio na cristalização das apatitas, favorecendo a formação de TCP substituído por Mg^{2+} , também chamado β -TCMP (LEGEROS, 1991a, ELLIOT, 1994). A estabilidade estrutural deste fosfato de cálcio é responsável pela ocorrência de cálculos dentários, pedras urinárias, cartilagens artríticas e alguns depósitos de tecidos moles (DOROZHKIN, 2009).

Além das fases de fosfatos de cálcio α e β -TCP, observou também a formação da fase HA sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente. Após o período de 14 dias de incubação, pode-se observar uma maior quantidade da fase HA sobre a superfície dos que não receberam tratamento (40,00%), enquanto para o mesmo período os tratados com NaOH exibiram menor percentual de formação dessa fase (8,00%). Aos 21 dias de incubação, observou-se um aumento significativo da fase HA sobre a superfície dos tratados com H_3PO_4 (215,60%); ao contrário do observado nos não tratados (15,60%). Já aos 28 dias, observou-se diminuição significativa na fase na fase HA formada sobre a superfície dos tratados com HNO_3 (decrécimo de 40,30%). Nas demais condições de tratamento, a diminuição dessa fase foi 10,00% nos tratados com H_3PO_4 e 6,50% para os tratados com NaOH. Enquanto que nos que não receberam tratamento observou-se um aumento na formação da HA de 3,90% nesse mesmo período.

A partir dos resultados, foi possível correlacionar as fases α -TCP, β -TCP e HA determinadas pelas técnicas de FTIR e DRX, em função do período de incubação. Observou-se uma moderada correlação da fase α -TCP determinada pelas duas técnicas aos 21 dias de incubação, evidenciada pelo coeficiente de correlação de Pearson ($r_{FTIR_{\alpha-TCP\ 21\ dias} / DRX_{\alpha-TCP\ 21\ dias}} = 0,70$). No mesmo período de incubação, observou-se também uma forte correlação na formação da fase β -TCP determinada por FTIR e DRX ($r_{FTIR_{\alpha-TCP\ 21\ dias} / DRX_{\alpha-TCP\ 21\ dias}} = 0,94$). Já uma moderada correlação da fase HA determinada pelas técnicas de FTIR e DRX foi observada aos 28 dias de incubação ($r_{FTIR_{HA\ 28\ dias} / DRX_{HA\ 28\ dias}} = 0,74$).

Além disso, foram observadas também fortes correlações entre as fases α -TCP, β -TCP e HA nos períodos de 14 e 21 dias de incubação ($r_{FTIR_{HA\ 21\ dias} / DRX_{\beta TCP\ 14\ dias}} = 0,91$; $r_{FTIR_{\alpha TCP\ 21\ dias} / DRX_{HA\ 14\ dias}} = 0,98$; $r_{FTIR_{\alpha TCP\ 21\ dias} / DRX_{\beta TCP\ 14\ dias}} = 0,91$) e moderadas correlações nos períodos de 21 e 28 dias de incubação ($r_{FTIR_{\beta TCP\ 28\ dias} / DRX_{HA\ 21\ dias}} = 0,77$; $r_{FTIR_{\beta TCP\ 28\ dias} / DRX_{\alpha TCP\ 21\ dias}} = 0,78$). As fortes correlações positivas observadas entre as fases de fosfato de cálcio nos períodos iniciais de incubação (14 e 21 dias) sugerem que, a princípio, a principal

tendência é a formação simultânea dessas fases. A partir dos 21 dias de incubação, as correlações moderadas podem indicar o início de um equilíbrio na formação dessas fases α -TCP, β -TCP e HA ao longo do recobrimento biomimético.

A Figura 5.7 apresenta as áreas calculadas pelos espectros de absorvância dos fosfatos de cálcio (obtidas por FTIR) e as porcentagens de fases dos fosfatos de cálcio formadas (obtidas por DRX), sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x.

Figura 5.7 – Área total calculada pelos espectros de absorvância de FTIR e as porcentagens das fases calculadas por DRX dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

A partir dos resultados observados, é possível determinar a quantidade dos fosfatos de cálcio formados sobre a superfície dos nanocompósitos, assim como estimar o tempo mínimo de recobrimento necessário para uma condição desejada. Aos 21 dias de incubação, pode-se observar que a superfície dos tratados com NaOH apresentaram maior quantidade da fase HA (95,85%), diferentemente do comportamento observado nesses quando recobertos com solução de SBF 5,0x no mesmo tempo de incubação, onde foram observados o deslocamento da camada de fosfatos de cálcio formado sobre a sua superfície. Além disso, pode-se observar ainda a possibilidade de escolha nas porcentagens das fases de fosfatos de cálcio. Por

exemplo, quando se deseja que a camada formada sobre a superfície do material possua maior quantidade da fase TCP, o tempo de 21 dias de incubação seria suficiente, visto que os nanocompósitos que não receberam tratamento forneceriam 50,95% de TCP e 49,05% de HA. No entanto, se for necessário que a fase HA seja predominante, essa condição poderia ser alcançada aos 28 dias de incubação, uma vez que os nanocompósitos tratados com H_3PO_4 e NaOH forneceriam 83,85% de HA e 16,15% de TCP.

De modo geral, pode-se observar que os tratamentos superficiais químicos contribuíram para a formação da camada de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos. Dentre todas as condições estudadas, observou-se que os nanocompósitos que receberam tratamentos superficiais químicos com H_3PO_4 e NaOH se destacaram, promovendo a maior porcentagem de formação da fase α -TCP e HA sobre a superfície do material após o período de 21 dias de incubação.

iii. Microscopia eletrônica de varredura

As Figuras 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11 apresentam, respectivamente, as micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x.

Figura 5.8 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos sem tratamento químico superficial após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Figura 5.9 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com H_3PO_4 após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Figura 5.10 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com HNO_3 após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Figura 5.11 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com NaOH após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Após o período de 7 dias de incubação como mostrado nas Figuras 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11, é possível observar que a primeira etapa de formação da camada de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos em todas as condições, inicia-se pela formação de pequenos núcleos.

Após 14 dias de incubação, pode-se observar maior formação desses núcleos de fosfatos de cálcio. Observa-se ainda que a superfície dos nanocompósitos em todas as condições foi quase toda recoberta.

Aos 21 dias de incubação, pode-se observar que os nanocompósitos em todas as condições tiveram sua superfície totalmente recoberta por uma camada uniforme de fosfatos de cálcio.

Já aos 28 dias de incubação, foi possível observar a formação de pequenos novos núcleos de fosfatos de cálcio sobre a camada anteriormente formada, sugerindo que há a possibilidade de formação de uma nova camada sobre a superfície dos nanocompósitos. Além disso, pode-se observar também o surgimento de trincas ao longo de toda a camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos que receberam tratamento com HNO_3 (Figura 5.10).

Os mecanismos para a formação de uma camada de fosfatos de cálcio sobre a superfície de um material têm sido explicados com base na composição de vidros e vitrocerâmicas, tendo em vista a não existência de um mecanismo de formação em materiais cerâmicos.

De acordo com Hench (1998) primeiramente ocorre à dissolução dos íons de silicato presentes no vidro e adsorção destes ao material, seguidamente da troca iônica entre a solução e a superfície do vidro, levando à liberação de íons como Na^+ , Ca^{2+} e PO_4^{3-} . A partir desse momento, os grupos silanóis sofrem uma reação de policondensação dando origem a uma camada rica em sílica, que passa a agir como fonte de sítios para a nucleação heterogênea de fosfatos amorfos e então se cristaliza em uma camada de fosfato de cálcio pela incorporação de ânions OH^- e CO_3^{2-} presentes na solução de SBF (HENCH, 1998).

Em estudos realizados nos últimos anos (UCHIDA et al., 2002; KOKUBO et al., 2009b; FAGA et al., 2012), tem-se observado que a formação de fosfatos de cálcio sobre a superfície de diferentes materiais utilizando o método de recobrimento biomimético pode ser induzida pela presença de grupos funcionais hidroxilas (OH^-) e não apenas com composições vítreas. Nesse sentido, sugere-se que a fase de nucleação dos fosfatos de cálcio sobre a superfície de um material cerâmico como Al_2O_3 e ZrO_2 pode ser favorecida pelos tratamentos superficiais químicos realizados.

Pela morfologia da camada formada sobre a superfície como mostrado nas Figuras 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11, pode se observar que os glóbulos são constituídos de um arranjo de camadas sobrepostas, permitindo assim a continuidade para os processos de dissolução e precipitação, quando em presença do meio simulado, SBF. De acordo com Legeros e colaboradores (LEGEROS et al., 2006b) e Ribeiro (RIBEIRO, C., 2003) quanto maior o período de imersão em solução de SBF 1,5x, maior será a modificação morfológica dos precipitados, nesta etapa, apresentando aspecto mais globular. Ainda de acordo com Legeros e colaboradores (LEGEROS et al., 2006b) o surgimento de trincas como observado na Figura 5.10 é comum, sendo muitas vezes decorrentes do aumento na espessura da camada formada sobre a superfície do material.

iv. Microscopia de força atômica

A Figura 5.12 apresenta micrografias obtidas por AFM da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x.

Figura 5.12 – Micrografias obtidas por AFM da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

De maneira geral, após o período de 28 dias pode-se observar que a distribuição dos glóbulos de fosfatos de cálcio na camada formada sobre a superfície dos nanocompósitos foi diferente para cada condição de tratamento. Dentre as condições utilizadas, observou-se que o tamanho desses glóbulos aparentemente foi menor na superfície dos nanocompósitos tratados com H_3PO_4 e NaOH . A relação observada entre as distribuições dos glóbulos de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos se mostra promissor, uma vez que, a interação celular, tecidual entre o implante e o organismo pode ser afetada pela área superficial do implante.

v. Fluorescência de raios-X

A Tabela 5.4 e a Figura 5.13 apresentam, respectivamente, os valores obtidos com o auxílio do FRX para medir a espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 14, 21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x.

Tabela 5.4 – Valores obtidos com auxílio do FRX para medir a espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14,21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Período de incubação		14 dias (μm)	21 dias (μm)	28 dias (μm)
Condições de tratamento	Sem tratamento	9,24	10,18	11,43
	H_3PO_4	8,57	11,07	10,22
	HNO_3	8,75	9,78	9,06
	NaOH	9,32	10,77	9,02

Figura 5.13 – Espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14,21 e 28 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Após o período de 14 dias de incubação, pode-se observar a formação de uma fina camada de fosfatos de cálcio ($<10 \mu\text{m}$), sobre a superfície dos nanocompósitos que não receberam tratamento e sobre a superfície dos tratados quimicamente conforme mostrado na Tabela 5.2 e Figura 5.13. Já aos 21 dias, é possível observar que os que receberam tratamento com H_3PO_4 apresentaram a formação de uma camada um pouco mais espessa ($\sim 11,75 \mu\text{m}$), contrariamente ao observado nos tratados com HNO_3 ($\sim 9,78 \mu\text{m}$) que continuaram a apresentar a formação de uma fina camada sobre a superfície do material. Aos 28 dias, pode-se observar que os que não receberam tratamento apresentaram-se um pouco mais espessos ($\sim 11,43 \mu\text{m}$). Além disso, pode-se observar ainda que os tratados com H_3PO_4 , HNO_3 e NaOH apresentaram uma diminuição na espessura da camada. Ressalta-se ainda, que essa diminuição foi maior nos tratados com NaOH , como observado na Figura 5.13, o que pode sugerir que os campos de tensões induzidos ao longo da trilha não atuam paralelamente à superfície e a interface recobrimento/substrato durante o teste de riscamento. Dessa forma, o campo de tensões pode mover-se em torno do penetrador, e, portanto, deslocar-se proporcionalmente a cada nova profundidade do penetrador, fato este que desloca o campo de tensões para mais próximo da interface recobrimento/substrato, tendo com isto que propagar-

se sob um volume muito maior de material à medida que o risco é realizado na camada, podendo mesmo atingir profundidades nas quais os campos de tensões gerados não emergem na superfície da camada, ficando aprisionados na espessura da camada formada, não provocando falhas visíveis (LIMA, KUCUK, BERDNT, 2001; KIM et al., 2004; YANG, LUI, CHEN, 2009).

De modo geral, pode-se observar que os tratamentos químicos realizados na superfície dos nanocompósitos influenciaram na espessura da camada de fosfatos de cálcio formada. Além disso, observou-se ainda que o tempo de 21 dias de incubação em solução de SBF 1,5x mostrou-se suficiente para promover a formação da camada de fosfatos de cálcio, uma vez que, após 28 dias de incubação percebe-se uma diminuição significativa na espessura da camada formada sobre a superfície dos nanocompósitos com diferentes tratamentos químicos.

5.3.2. Recobrimento com solução de SBF 5,0x

A seguir são apresentados os resultados obtidos a partir das caracterizações superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ sem e com tratamentos superficiais químicos e recobertos usando solução de SBF 5,0x.

i. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A Figura 5.14 e a Tabela 5.5 apresentam, respectivamente, os espectros de absorbância e a área percentual sob as curvas de deconvolução, da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x. Os gráficos menores inseridos apresentam uma ampliação no intervalo entre $1020 - 1200 \text{ cm}^{-1}$.

Figura 5.14 – Espectros de absorvância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Tabela 5.5 – Área percentual sob as curvas de deconvolução observadas nos espectros de absorvância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Condições de tratamento															
Sem tratamento				H ₃ PO ₄				HNO ₃				NaOH			
14 dias		21 dias		14 dias		21 dias		14 dias		21 dias		14 dias		21 dias	
Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)	Área (%)	Banda (cm ⁻¹)
7,26	1127	5,54	1126	8,92	1128	5,87	1126	17,41	1125	7,99	1125	5,92	1126	10,94	1127
10,95	1108	17,65	1101	12,35	1107	13,05	1108	6,61	1104	20,20	1106	20,93	1100	16,95	1102
40,85	1067	8,67	1052	48,21	1065	50,42	1063	69,98	1049	47,05	1060	24,55	1056	49,33	1065
38,68	1033	68,14	1042	28,76	1029	28,33	1030	6,00	1031	23,99	1031	48,60	1032	22,78	1035
2,26	991	0,00	991	1,76	999	2,33	1003	0,00	1006	0,77	1006	0,00	990	0,00	990

Após os períodos de 14 e 21 dias de incubação, pode-se observar na Figura 5.12, bandas de absorção características dos grupamentos fosfatos (PO_4^{3-}) na região entre 970 a 1200 cm^{-1} . Sendo observadas bandas de absorção entre 990-991 cm^{-1} atribuídas ao modo de estiramento simétrico da ligação P-O do grupo PO_4^{3-} . Já as observadas na região de 1029-1035 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação P-O do grupo PO_4^{3-} . As observadas em 1049-1065 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação do grupo PO_4^{3-} e da fase α -TCP. Enquanto as bandas de absorção na região entre 1100-1108 cm^{-1} são atribuídas aos grupos HPO_4^{2-} da HA não estequiométrico. Por fim, as observadas nas regiões entre 1125-1128 cm^{-1} são também atribuídas aos grupos HPO_4^{2-} da HA não estequiométrico e da fase β -TCP (GADALETA et al., 1996; KOUTSOPOLOUS, 2002; BERZINA-CIMDINA, BORODAJENKO, 2012). As posições dos picos observadas nos espectros nas regiões dos fosfatos (970 a 1200 cm^{-1}) estudadas, assim como suas atribuições segundo a literatura, estão resumidas na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Bandas de absorção dos picos (cm^{-1}) observadas nos espectros de absorbância de FTIR e suas atribuições segundo a literatura

Região (cm^{-1})	Atribuições
990-991	PO_4^{3-} , estiramento simétrico da ligação P-O do grupo PO_4^{3-}
1029-1035	ν_{3c} , PO_4^{3-} , estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação P-O do grupo PO_4^{3-}
1049 – 1065	ν_{3b} , PO_4^{3-} , estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação do grupo PO_4^{3-} e estiramento da fase α -TCP
~1081	ν_{3a} , PO_4^{3-} , tripla dos grupos fosfatos
1100 - 1108	Grupos HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica
1125-1128	Grupos HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica e estiramento da fase β -TCP

FONTE: GADALETA et al., 1996; KOUTSOPOULOS, 2002; BERZINA-CIMDINA, BORODAJENKO, 2012).

De forma geral, após 21 dias de incubação, pode-se observar que as porcentagens das áreas das bandas de absorção nas regiões entre 1029-1035 cm^{-1} e entre 1100-1108 cm^{-1} aumentaram nos nanocompósitos que não receberam tratamento, bem como nos que foram tratados com H_3PO_4 e HNO_3 . Observou-se ainda no mesmo período, uma diminuição nas

porcentagens das áreas das bandas de absorção entre 1049-1065 cm^{-1} nos não tratados, assim como nos que receberam tratamento com H_3PO_4 e HNO_3 (Tabela 5.6).

O simultâneo decréscimo das porcentagens das áreas da banda de absorção atribuída à formação da fase α -TCP com o aumento das porcentagens das áreas da banda de absorção, atribuída à formação fase HA, sugere que a fase α -TCP pode estar contribuindo na formação da fase HA, que é mais estável, após o período de 21 dias de recobrimento. Ao contrário do observado nos tratados com NaOH que apresentaram uma diminuição nas porcentagens das áreas das bandas de absorção nas regiões entre 1029-1035 cm^{-1} e 1100-1008 cm^{-1} . Observou-se ainda, nessas mesmas condições, um aumento na porcentagem da área da banda de absorção em 1049-1065 cm^{-1} . Ressalta-se ainda que os tratados com NaOH apresentaram falhas de recobrimento nas suas superfícies após esse período, refletindo na diminuição da quantidade de HA e no aumento da quantidade de α -TCP formado sobre as suas superfícies, durante o maior período de incubação.

ii. Difratometria de raios-X

A Figura 5.15 e a Tabela 5.7 apresentam, respectivamente, os difratogramas de raios-X e as porcentagens das fases no intervalo entre 31,0° a 34,0° da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x. O gráfico menor inserido apresenta uma ampliação no intervalo entre 31,2° – 33,6°.

Figura 5.15 – Difratomogramas de raios-X da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Tabela 5.7 – Porcentagens das diferentes fases formadas sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Condições de tratamento		Sem tratamento		H ₃ PO ₄		HNO ₃		NaOH	
Período de recobrimento (dias)		14	21	14	21	14	21	14	21
^a hkl reflexão	(511)	32,82	15,91	23,19	11,75	22,14	15,31	10,40	24,74
	(211)	7,24	17,81	5,28	8,70	3,73	11,43	13,88	49,92
	(112)	38,67	38,80	65,81	65,53	59,78	58,53	52,05	1,39
	(128)	21,27	27,47	5,71	14,02	14,35	14,73	23,66	23,94

^a índices de Miller referente aos planos cristalográficos segundo JCPDS

A partir das curvas de deconvolução sob o difratograma de DRX (Figura 5.15), pode-se observar a formação de fases distintas de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente. Assim, foi possível distinguir o crescimento de cristais das fases de α -TCP no plano (511), β -TCP no plano (128) e HA nos planos (211)/(112). Ressalta-se ainda que, todas as fases do fosfato de cálcio foram observadas em todos os períodos de incubação e em todas as condições de tratamentos superficiais químicos em que foram submetidos.

Após o período de 14 dias de incubação, pode-se observar uma maior quantidade da fase α -TCP formada nos que não receberam tratamento (32,82%). No entanto, para o mesmo período os tratados com NaOH exibiram menor percentual de formação dessa fase (10,40%). Aos 21 dias de incubação, observou-se uma diminuição na fase α -TCP nos nanocompósitos sem tratamento (51,50%) e nos tratados com H₃PO₄ (49,730%) e com HNO₃ (69,20%). Nos tratados com NaOH, pode-se observar um aumento de 137,90% da fase α -TCP formada sobre a superfície.

Após 21 dias de incubação, a formação da fase β -TCP aumentou significativamente nos tratados com H₃PO₄ (145,50%); ao contrário do observado nos que não receberam tratamento (29,20%). Nas demais condições de tratamento, o aumento da formação da fase β -TCP ao longo do tempo de recobrimento foi 2,60% nos tratados com HNO₃ e 1,20% nos tratados com NaOH.

A maior porcentagem da fase β -TCP observada, independentemente do tratamento químico ou do período de incubação, se deve ao fato dessa fase ser termodinamicamente mais estável que a fase α -TCP (ELLIOT, 1994). Além disso, a formação da fase β -TCP é favorecida quando a razão molar de Mg/Ca em uma solução for maior que 0,05, ocorrendo a formação da fase beta fosfato tricálcico de magnésio (β -Mg-TCP) (LEGEROS, 1991; ELLIOT, 1994). Dessa forma, o aumento na formação da fase β -TCP sobre as superfícies dos nanocompósitos ao longo dos diferentes períodos de incubação são explicados pela alta razão Mg/Ca 0,83 presente na SBF utilizada.

De maneira geral, após 21 dias de incubação, a fase HA formada sobre a superfície dos nanocompósitos variou entre 51,0 a 74,0% (exceto nos tratados com NaOH). Destaca-se ainda, que esse aumento (23,30%) foi maior nos que não receberam tratamento. Além disso, foram observados também aumentos na formação da fase HA, embora com menor quantidade, nos tratados com HNO_3 (10,20%) e H_3PO_4 (2,70%). Enquanto nos tratados com NaOH foi observado um decréscimo de 22,70% na formação da HA nesse mesmo período.

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar uma forte correlação entre o consumo da fase α -TCP (observada nas bandas de absorbância de FTIR) e a formação da fase HA, (observada nos difratogramas de DRX) evidenciado pelo coeficiente de correlação de Pearson ($r_{\text{FTIR}_{\alpha\text{TCP}} / \text{DRX}_{\text{HA}}} = 0,78$). Outra correlação bastante interessante foi observada entre o decréscimo da porcentagem da fase α -TCP (observada nos difratogramas de DRX) em função do aumento da formação da fase β -TCP (observada nas bandas de absorbância de FTIR) após 21 dias de recobrimento ($r_{\text{FTIR}_{\alpha\text{TCP}} / \text{DRX}_{\beta\text{TCP}}} = 0,87$).

A Figura 5.16 apresenta as áreas calculadas pelos espectros de absorbância dos fosfatos de cálcio e as porcentagens de fases dos fosfatos de cálcio formadas (obtidas por DRX) sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.

Figura 5.16 – Área total calculada pelos espectros de absorvância de FTIR e as porcentagens das fases calculadas por DRX dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Aos 21 dias de incubação, observou-se que os nanocompósitos tratados com NaOH apresentaram menor quantidade da fase HA (95,85%) formada sobre sua superfície, sugerindo que o período de 14 dias de incubação para esses seja adequado. Além disso, observou-se ainda que quando se deseja que a camada formada apresente maior quantidade da fase TCP, o tempo de 14 dias de incubação seria suficiente, visto que os nanocompósitos sem tratamento forneceriam 54,10% de TCP e 45,90% de HA. No entanto, se for necessário que a fase HA seja predominante, essa condição poderia ser alcançada aos 21 dias de incubação nos tratados com H₃PO₄ uma vez que forneceriam 74,20% de HA e 25,80% de TCP.

iii. Microscopia eletrônica de varredura

As Figuras 5.17, 5.18, 5.19 e 5.20 apresentam, respectivamente, as micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 7, 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.

Figura 5.17 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos sem tratamento químico superficial após 7 dias, 14 dias e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Figura 5.18 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com H_3PO_4 após 7 dias, 14 dias e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Figura 5.19 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com HNO_3 após 7 dias, 14 dias e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Figura 5.20 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos tratados superficialmente com NaOH após 7 dias, 14 dias e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Após o período de 7 dias de incubação como mostrado nas Figuras 5.17, 5.18, 5.19 e 5.20, é possível observar que a primeira etapa da formação da camada de fosfatos de cálcio inicia-se pela formação de pequenos núcleos sobre a superfície dos nanocompósitos que não receberam tratamento e nos tratados com H_3PO_4 e HNO_3 . Já nos tratados com NaOH , como mostrado na Figura 5.18 não foi observada essa primeira etapa de formação, indicando assim uma possível influência do tipo de solução utilizada no tratamento superficial.

Aos 14 dias de incubação, é possível observar a formação dos núcleos de fosfatos de cálcio na superfície dos nanocompósitos em todas as condições.

Já aos 21 dias de incubação, pode-se observar que nanocompósitos em todas as condições tiveram sua superfície totalmente recoberta por uma camada uniforme de fosfatos de cálcio. Observa-se ainda, que nos tratados com NaOH (Figura 5.20) começa a ocorrer o desprendimento da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície. O que poderia explicar a diminuição na porcentagem da fase de HA observada na Figura 5.15 e Tabela 5.8, sugerindo que o período de 14 dias de incubação para esses nanocompósitos seja adequado.

iv. Microscopia de força atômica

A Figura 5.21 apresenta micrografias obtidas por AFM da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.

Figura 5.21 – Micrografias obtidas por AFM da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Pode-se observar que um prévio tratamento superficial químico afeta diretamente o formato da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos. Segundo Uchida e colaboradores (UCHIDA et al., 2002) a capacidade de formação de fosfatos de cálcio sobre a superfície de um material pode ser influenciada pelo tipo de solução em que o material foi tratado e com isso apresentar diferentes formatos.

De modo geral, pode-se observar uma homogeneidade na distribuição dos glóbulos de fosfatos de cálcio na camada formada sobre a superfície dos nanocompósitos. Dentre os diferentes tratamentos superficiais, observou-se que o tamanho dos glóbulos formados na superfície dos tratados com H_3PO_4 foi menor do que os formados nas demais condições de tratamentos. Observou-se ainda, que o menor tamanho do glóbulo possibilitou uma aparência mais rugosa da camada de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos tratados com H_3PO_4 , sugerindo que esse comportamento pode estar associado à maior rugosidade ($R_a = 0,059 \pm 0,008 \mu\text{m}$), bem como o caráter hidrofílico apresentado pelos tratados com esse tipo de solução.

Em estudos realizados por Dorozhkin (2009) observou-se que o meio ácido é o ambiente mais favorável à precipitação dos fosfatos de cálcio, sugerindo que as alterações na camada formada são decorrentes da nucleação de íons de cálcio (Ca) e fósforo (P) presentes na solução de SBF, sobre a superfície dos cristais inicialmente formados (DOROZHKIN, 2009). Já Dehestani e colaboradores (DEHESTANI *et al.*, 2012) sugerem que o H_3PO_4 poderia exercer outros possíveis impactos sobre a formação dos fosfatos de cálcio, como por exemplo, as espécies químicas como fosfato (PO_4)³⁻ e hidrogenofosfato (HPO_4)²⁻ presentes na solução de H_3PO_4 , poderiam desempenhar um papel importante durante o processo de biomineralização devido sua química de superfície.

Segundo Wu e Nancollas (1996), durante o processo de precipitação ou cristalização de uma fase sólida a partir de uma solução, podem existir uma competição entre as etapas de nucleação e crescimento dos cristais, sendo que a concorrência entre estas duas etapas, em diferentes estados de saturação podem determinar o tamanho e o formato do cristal (WU, NANCOLLAS, 1996b).

Espera-se, a princípio, que quanto maior a rugosidade da superfície do implante, maior o número de sítios disponíveis para ligação das células, facilitando assim o crescimento dos tecidos ao longo dessa superfície. Por outro lado, o nível de rugosidade deve ser controlado devido à necessidade de pontos de ancoragem na superfície do implante para o início da proliferação das células, garantindo assim sua biofixação. No entanto, se a rugosidade dessa superfície for muito menor do que o tamanho das células, sítios de fixação poderão estar ausentes, afetando assim o tipo de proliferação celular (RIBEIRO, C., et al., 2014).

Por exemplo, células epiteliais, osteoblásticas e macrofágicas se aderem com maior facilidade em superfícies rugosas; já as células fibroblásticas se acumulam em regiões mais lisas (WENNNENBERG, ALBREKTSSON, 2000; ALBREKTSSON, WENNNENBERG, 2004; NOVAES JÚNIOR et al., 2010). Dessa forma, o tratamento superficial químico que os nanocompósitos receberam previamente ao recobrimento biomimético aparentemente pode contribuir de forma efetiva na adesão, proliferação e biofixação do tipo de célula desejada sobre o implante ósseo.

v. Fluorescência de raios-X

A Tabela 5.8 e a Figura 5.22 apresentam, respectivamente, os valores obtidos com auxílio de FRX para medir a espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.

Tabela 5.8 – Valores obtidos com auxílio de FRX para medir a espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Período de incubação		14 dias (μm)	21 dias (μm)
Condições de tratamento	Sem tratamento	16,50	10,28
	H_3PO_4	9,37	8,67
	HNO_3	10,52	10,23
	NaOH	7,58	11,55

Figura 5.22 – Espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Após o período de 14 dias de incubação, pode-se observar que os nanocompósitos que não receberam tratamentos superficiais apresentaram a formação de uma camada de fosfatos de cálcio mais espessa ($\sim 16,50 \mu\text{m}$), contrariamente ao observado nos tratados com H_3PO_4 , HNO_3 e NaOH . Uma possível explicação para esse fato é que durante os processos de precipitação e/ou cristalização de uma fase sólida a partir de uma solução, pode existir uma

competição entre os fenômenos de nucleação e crescimento dos cristais. A concorrência entre estes dois fenômenos, em diferentes estados de saturação pode determinar o tamanho e a morfologia do cristal.

Já aos 21 dias, é possível observar que os nanocompósitos tratados com NaOH apresentaram a formação de uma camada um pouco mais espessa ($\sim 11,75 \mu\text{m}$) do que as demais condições de tratamento em que foram submetidos.

De modo geral, pode-se observar que os tratamentos influenciaram na espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos. Além disso, sugerem que o tempo de 14 dias de incubação é suficiente para a formação da camada de fosfatos de cálcio sobre a superfície do material, uma vez que se percebe uma diminuição considerável aos 21 dias de incubação.

5.4. Caracterizações superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ tratados por plasma

Os resultados obtidos a partir das caracterizações superficiais dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ após a realização dos tratamentos superficiais por plasma são apresentados a seguir.

i. Microscopia confocal

A Figura 5.23 apresenta micrografias representativas obtidas por microscopia confocal da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma. A partir dessas micrografias foi possível observar uma variação na rugosidade média (R_a) superficial dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma.

Os valores de R_a da superfície dos nanocompósitos tratados por plasma foram iguais a $R_a = 0,079 \pm 0,008 \mu\text{m}$ ($100\%\text{O}_2$), $R_a = 0,074 \pm 0,005 \mu\text{m}$ ($100\%\text{N}_2$), $R_a = 0,060 \pm 0,017 \mu\text{m}$ ($40\%\text{N}_2$ - $60\%\text{H}_2$), $R_a = 0,054 \pm 0,006 \mu\text{m}$ ($30\%\text{N}_2$ - $50\%\text{H}_2$ - $20\%\text{O}_2$), $R_a = 0,049 \pm 0,012 \mu\text{m}$ ($40\%\text{N}_2$ - $40\%\text{H}_2$ - $20\%\text{O}_2$) e $R_a = 0,045 \pm 0,002 \mu\text{m}$ ($20\%\text{N}_2$ - $80\%\text{H}_2$). que não receberam tratamento apresentaram $R_a = 0,045 \pm 0,002 \mu\text{m}$.

De modo geral, pode-se observar que o tratamento por plasma aumentou a R_a superficial dos nanocompósitos tratados quando comparado aos que não receberam tratamento. Além disso, pode-se observar ainda que esse aumento foi maior nos que receberam tratamento por plasma com $100\%\text{O}_2$.

Figura 5.23 – Micrografias obtidas por microscopia confocal da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma

Em estudos realizados por Santos (2012) avaliou os efeitos do tratamento por plasma com nitrogênio (N_2), variando-se o número de pulsos de descargas na superfície de materiais cerâmicos de alumina (Al_2O_3) e carbetto de silício (SiC). Os resultados indicaram que o aumento na R_a observada no material pode ser explicado pelo bombardeamento de íons sobre a superfície (SANTOS, C., 2012). Os íons de N_2 ao colidirem com a superfície do material podem transferir a sua energia provocando o efeito denominado “*sputtering*” que é o bombardeamento superficial que resulta na extração de espécies pertencentes ao material atingido. Essa propriedade favorece a formação de mais ligações químicas posteriores entre as partículas arrancadas e as espécies do nitrogênio (BARBOSA, 2011, SANTOS, C., 2012).

ii. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A Figura 5.24 apresenta a segunda derivada dos espectros de absorvância obtidos por FTIR da superfície dos nanocompósitos tratados por plasma com 20% N_2 -80% H_2 , 40% N_2 -60% H_2 , 40% N_2 -40% H_2 -20% O_2 , 30% N_2 -50% H_2 . O gráfico menor inserido na Figura apresenta as áreas relativas dos espectros de FTIR no intervalo entre 400 - 4000 cm^{-1} , para todos os tratamentos superficiais realizados.

Figura 5.24 – Segunda derivada dos espectros de absorvância de FTIR da superfície dos nanocompósitos com tratamentos superficiais por plasma composto por N_2 , H_2 e O_2

A Figura 5.25 apresenta a segunda derivada dos espectros de absorvância obtidos por FTIR da superfície dos nanocompósitos com tratados por plasma com N_2 e O_2 . O gráfico menor inserido na Figura apresenta as áreas relativas dos espectros de FTIR no intervalo entre 400 - 4000 cm^{-1} , para todos os tratamentos superficiais realizados.

Figura 5.25 – Segunda derivada dos espectros de absorvância de FTIR da superfície dos nanocompósitos com tratamentos superficiais por plasma composto por N_2 e O_2

Bandas de absorção acima da região espectral de 1000 cm^{-1} não foram observadas nos nanocompósitos que receberam diferentes tratamentos superficiais por plasma (Figuras 5.24 e 5.25), assim como também não foram observadas nos tratados quimicamente (Figura 5.4).

Além disso, pode-se observar também a ausência das bandas de absorção nas regiões espectrais em torno de 3656 cm^{-1} (vibração de estiramento do grupo (OH) fisicamente adsorvido com Al^{+3}), em 3447 cm^{-1} (vibrações de estiramento do grupo OH), em torno de 1638 cm^{-1} (vibrações de deformação de moléculas de H_2O), em torno de 1070 cm^{-1} (vibrações de deformação do grupo Al-OH) e em ~1764/ ~1634/~1385 cm^{-1} (vibrações de deformação do grupo Zr-OH) o que pode sugerir, que a eliminação da água superficial dos nanocompósitos resultou em uma estrutura cristalina totalmente anidra (ZHANG, GLASSER, 1993; SARKAR et al., 2007). Os picos observados em 878, 640 e 580 cm^{-1} (Figura 5.24), podem ser atribuídos às bandas de absorção do grupo Al-O; enquanto os picos observados em

621, 475 e 445 cm^{-1} podem ser atribuídos às bandas de absorção do grupo Zr-O. Já o pico observado em torno $\sim 925\text{ cm}^{-1}$ (Figura 5.25) também pode ser atribuída as bandas de absorção do grupo Al-O (SARKAR et al., 2007).

De modo geral, pode-se observar que a área relativa do espectro de FTIR dos nanocompósitos tratados com 20%N₂-80%H₂ foi menor quando comparado a área relativa do espectro de FTIR dos tratados com 40% N₂-60%H₂ (Figura 5.24). Comparando-se a área relativa do espectro de FTIR dos tratados com 100%N₂ e 100%O₂, pode-se observar que a área relativa do espectro de FTIR dos tratados com 100%O₂ foi menor do que a área relativa do espectro de FTIR dos tratados com 100%N₂ (Figura 5.25). Ressalta-se ainda, que a área relativa do espectro de FTIR dos tratados com 20%N₂-80%H₂ foi menor quando comparada a área relativa do espectro de FTIR das demais condições de tratamentos em que foram submetidos.

5.5. Recobrimento biomimético dos nanocompósitos tratados por plasma

Diante os resultados obtidos para os nanocompósitos tratados quimicamente nos tempos de 14 e 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x, optou-se por recobrir os tratados por plasma no tempo de 14 dias, uma vez que esse período se mostrou adequado para promover a formação de uma camada homogênea de fosfatos de cálcio sobre a superfície do material.

Dessa forma, os resultados obtidos a partir das caracterizações superficiais dos nanocompósitos de Al₂O₃/5%ZrO₂ sem e com tratamentos superficiais por plasma e recobertos biomimeticamente usando solução de SBF 5,0x são apresentados a seguir.

5.5.1. Recobrimento com solução de SBF 5,0x

i. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A Figura 5.26 e a Tabela 5.9 apresentam, respectivamente, os espectros de absorbância e a área percentual sob as curvas de deconvolução, da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x. Os gráficos menores inseridos apresentam uma ampliação no intervalo entre $1020 - 1200\text{ cm}^{-1}$.

Figura 5.26 – Segunda derivada dos espectros de absorbância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma

Tabela 5.9 – Área percentual sob as curvas de deconvolução observadas nos espectros de absorvância de FTIR da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Condições de tratamento													
Sem tratamento		20%N ₂ -80%O ₂		40%N ₂ -60%H ₂		40%N ₂ -40%H ₂ -20%O ₂		30%N ₂ -50%H ₂ -20% O ₂		100%N ₂		100%O ₂	
Área	Banda	Área	Banda	Área	Banda	Área	Banda	Área	Banda	Área	Banda	Área	Banda
(%)	(cm ⁻¹)	(%)	(cm ⁻¹)	(%)	(cm ⁻¹)	(%)	(cm ⁻¹)	(%)	(cm ⁻¹)	(%)	(cm ⁻¹)	(%)	(cm ⁻¹)
7,26	1127	10,35	1132	7,71	1121	6,71	1122	4,30	1131	29,60	1137	9,40	1132
10,95	1108	1,80	1112	30,57	1078	24,27	1069	20,22	1102	2,78	1119	12,04	1107
40,85	1067	33,32	1075	34,30	1053	11,74	1055	44,23	1052	11,94	1097	54,28	1056
38,68	1033	41,92	1039	18,80	1035	48,78	1035	19,30	1023	44,44	1056	19,79	1023
0,00	1003	6,08	1015	5,81	1022	0,00	1003	4,44	1003	8,94	1035	0,00	1003
2,26	991	6,53	994	2,81	981	8,50	985	7,51	987	2,30	1020	4,49	999

Após o período de 14 dias de incubação, pode-se observar bandas de absorção características dos grupamentos fosfatos na região espectral de 970 a 1200 cm^{-1} . As bandas de absorção entre 981-1003 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico da ligação P-O do grupo PO_4^{3-} . Já a banda de absorção observada em 1022 cm^{-1} é atribuída ao grupo HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica. As bandas de absorção observadas na região entre 1033-1039 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação P-O do grupo PO_4^{3-} . As bandas de absorção observadas em 1052-1069 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação do grupo PO_4^{3-} e modo de estiramento da fase α -TCP. Já as bandas de absorção na região entre 1075-1078 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento triplo dos grupos dos grupos PO_4^{3-} . A banda de absorção observada em 1097 cm^{-1} é atribuída ao modo de estiramento do grupo PO_4^{3-} . Já as bandas de absorção entre 1102-1108 são atribuídas aos grupos HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica. As bandas de absorção observadas nas regiões entre 1121-1127 cm^{-1} são também atribuídas aos grupos HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica e modo de estiramento da fase β -TCP. Por fim, as bandas de absorção observadas entre 1131-1137 cm^{-1} também são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico do grupo PO_4^{3-} (GDALETA et al., 1996; KOUTSOPOLOUS, 2002; BERZINA-CIMDINA, BORODAJENKO, 2012). As posições dos picos observadas nos espectros nas regiões dos fosfatos (970 a 1200 cm^{-1}) estudadas, assim como suas atribuições segundo a literatura, estão resumidas na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 – Bandas de absorção dos picos (cm^{-1}) observadas nos espectros de absorbância de FTIR e suas atribuições segundo a literatura

Regiões (cm^{-1})	Atribuições
981-1003	PO_4^{3-} , estiramento assimétrico da ligação P-O do grupo PO_4^{3-}
1022	Grupos HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica
1033-1039	ν_{3c} , PO_4^{3-} , estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação P-O do grupo PO_4^{3-}
1052-1069	ν_{3b} , PO_4^{3-} , estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação do grupo PO_4^{3-} e estiramento da fase α -TCP
1075,1078	ν_{3a} , PO_4^{3-} , tripla dos grupos fosfatos
1102-1108	Grupos HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica
1112,1119	HA pouco cristalina
1121-1127	Grupos HPO_4^{2-} da HA não estequiométrica e estiramento da fase β -TCP
1131-1137	Estiramento assimétrico do grupo PO_4^{3-}

FONTE: GDALETA et al., 1996; KOUTSOPOULOS, 2002; BERZINA-CIMDINA, BORODAJENKO, 2012.

Após o período de 14 dias de incubação, pode-se observar que as porcentagens das áreas das bandas de absorção nas regiões entre $981-1003\text{ cm}^{-1}$ foram maiores para os nanocompósitos que receberam tratamentos com $20\%\text{N}_2-80\%\text{O}_2$, $30\%\text{N}_2-50\%\text{H}_2-20\%\text{O}_2$ e $40\%\text{N}_2-40\%\text{H}_2-20\%\text{O}_2$. Enquanto, na região entre $1033-1039\text{ cm}^{-1}$ as porcentagens das áreas das bandas de absorção foram maiores nos que não receberam tratamento e nos tratados com $20\%\text{N}_2-80\%\text{O}_2$ e $40\%\text{N}_2-40\%\text{H}_2-20\%\text{O}_2$. Na região entre $1052-1069\text{ cm}^{-1}$ os que não receberam tratamento e nos tratados com $40\%\text{N}_2-60\%\text{H}_2$, $30\%\text{N}_2-50\%\text{H}_2-20\%\text{O}_2$ e $100\%\text{O}_2$. Já na região entre $1102-1108\text{ cm}^{-1}$ os tratados com $30\%\text{N}_2-50\%\text{H}_2-20\%\text{O}_2$ apresentaram maior porcentagem de área das bandas de absorção. Na região entre $1121-1127\text{ cm}^{-1}$ os tratados com $40\%\text{N}_2-60\%\text{H}_2$ apresentaram 7,71% de área das bandas de absorção. As porcentagens das áreas das bandas de absorção nas regiões entre $1131-1137\text{ cm}^{-1}$ foram maiores para os tratados com $100\%\text{N}_2$, $20\%\text{N}_2-80\%\text{O}_2$ e $100\%\text{O}_2$.

Comparando-se os valores percentuais das áreas das bandas de absorção nas regiões entre $1029-1035\text{ cm}^{-1}$ nos nanocompósitos que receberam tratamentos químicos e entre $1033-1039\text{ cm}^{-1}$ nos tratados por plasma, pode-se observar que os tratados por plasma apresentaram maior porcentagem de área das bandas de absorção nesse mesmo período de incubação. Enquanto nas regiões entre $1100-1108\text{ cm}^{-1}$ e entre $1049-1069\text{ cm}^{-1}$ nos que receberam tratamentos (químicos e por plasma) pode-se observar que todas as condições de tratamentos apresentaram porcentagens de áreas de absorção altas, sugerindo a efetividade de ambos na formação da fase α -TCP, característica desse período de incubação.

ii. Difratometria de raios-X

A Figura 5.27 e a Tabela 5.11 apresentam, respectivamente, os difratogramas de raios-X e as porcentagens das fases no intervalo entre $31,0^\circ$ a $34,0^\circ$ da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma após 14 dias incubação em solução de SBF 5,0x.

Figura 5.27 – Difratogramas de raios-X da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF5,0x

Tabela 5.11 – Porcentagens das diferentes fases formadas sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Condições de tratamento		Sem tratamento	20%N ₂ -80%O ₂	40%N ₂ -60%H ₂	40%N ₂ -40%H ₂ -20%O ₂	30%N ₂ -50%H ₂ -20%O ₂	100%N ₂	100%O ₂
^a hkl reflexão	(511)	32,82	29,34	13,56	7,93	7,18	16,30	7,06
	(211)	7,24	5,66	6,62	9,10	10,60	36,12	22,82
	(112)	38,67	36,53	44,20	51,65	63,52	30,52	32,32
	(128)	21,27	28,47	35,62	31,32	18,70	17,06	37,80

A partir das curvas de deconvolução sob o difratograma de DRX (Figura 5.27), pode-se observar a formação de fases distintas de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma. Dessa forma, foi possível distinguir o crescimento de cristais das fases de α -TCP no plano (511), β -TCP no plano (128) e HA nos planos (211)/(112) observadas em todas as condições de tratamentos por plasma realizados na superfície.

Após o período de 14 dias de incubação, foi possível observar uma maior quantidade da fase α -TCP formada sobre a superfície dos nanocompósitos que não receberam tratamento (32,82%) e nos tratados com 20%N₂-80%O₂ (29,34%). Nas demais condições de tratamento, pode-se observar uma variação entre 7,00 e 14,00% na formação dessa fase.

Além da fase α -TCP observou-se ainda a formação da fase β -TCP sobre a superfície dos tratados com 100%O₂ (37,80%); e de maneira menos acentuada nos tratados com 100%N₂ (29,20%). Já nos demais condições de tratamento, a formação da fase β -TCP durante o tempo de incubação variou entre 18,00 e 36,00%. Nos que não receberam tratamento, pode-se observar a formação de 21,27% da fase β -TCP sobre a sua superfície.

Pode-se observar também a formação da fase HA sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados. De modo geral, a fase HA formada sobre a superfície variou entre 42,00 e 74,00%, sendo a maior porcentagem de formação observada nos que receberam tratamento com 30%N₂-50%H₂-20%O₂.

A partir dos resultados observados, foi possível fazer uma correlação na formação das fases HA e α -TCP (observada nos difratogramas de DRX) evidenciado pelo coeficiente de correlação de Pearson ($r_{\text{DRX}_{\alpha\text{TCP}} / \text{DRX}_{\text{HA}}} = -0,72$) e ($p = 0,07$), indicando que existe uma correlação inversa entre as fases HA e α -TCP, ou seja, quanto maior a quantidade da fase de HA, menor será a quantidade da fase α -TCP formada após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x. O valor (p) mencionado é a significância estatística.

Outra correlação interessante observada foi na formação da fase β -TCP (observada nas bandas de absorbância de FTIR) e na formação da fase HA (observada nos difratogramas de DRX) evidenciado pelo coeficiente de correlação de Pearson ($r_{\text{FTIR}_{\beta\text{-TCP}} / \text{DRX}_{\text{HA}}} = -0,75$) e ($p = 0,05$), indicando que quanto maior a quantidade da fase HA, menor será a quantidade da fase β -TCP formada (tendência negativa de formação).

Pode-se observar ainda uma correlação na formação da fase β -TCP (observada nas bandas de absorbância de FTIR) e na formação dessa mesma fase (observada nos difratogramas de raios-X) evidenciado pelo coeficiente de correlação de Pearson ($r_{\text{FTIR}_{\beta\text{-TCP}} /$

$DRX_{\beta TCP} = -0,73$) e ($p = 0,06$), indicando uma tendência positiva de formação da fase β -TCP em ambos os resultados.

A Figura 5.28 apresenta as áreas calculadas pelos espectros de absorvância dos fosfatos de cálcio e as porcentagens de fases dos fosfatos de cálcio formadas (obtidas por DRX), sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma após 14 dias incubação em solução de SBF 5,0x.

Figura 5.28 – Área total calculada pelos espectros de absorvância de FTIR e as porcentagens das fases calculadas por DRX dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Assim como observado anteriormente nos nanocompósitos tratados quimicamente, o crescimento dos cristais das fases α -TCP, β -TCP e HA sobre a superfície dependeu do tipo de tratamento por plasma realizado.

Além disso, foi possível observar ainda que se for necessário que o nanocompósito apresente maior quantidade de TCP, os tratados com 20%N₂-80%H₂ forneceriam 57,80% de TCP e 42,20% de HA. No entanto, se for necessário que a fase HA predomine os tratados com 30%N₂-50%H₂-20%O₂ forneceriam 74,10% de HA e 25,90% de TCP. Após esse período de incubação é possível observar ainda que os tratados com 30%N₂-50%H₂-20%O₂

apresentaram maior quantidade de fosfatos de cálcio formado sobre a sua superfície com um aumento de 194,40%.

iii. Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 5.29 apresenta micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.

A partir dessas micrografias pode-se observar a formação de uma camada homogênea de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos após o período de 14 dias de incubação. Além disso, foi possível observar que os tratados com 40% N₂-40% H₂-20% O₂, apresentaram trincas na camada formada, sendo essas trincas características em recobrimentos utilizando solução de SBF 5,0x. De acordo com Legeros e colaboradores (2006) o surgimento dessas trincas é comum, sendo muitas vezes decorrentes do aumento na espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície do material (LEGEROS et al., 2006).

Pela morfologia da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos (Figura 5.29), pode-se observar ainda que os glóbulos são constituídos de um arranjo de camadas sobrepostas, o que pode sugerir uma continuidade nos processos de dissolução e cristalização, quando em presença do meio simulado, SBF. Sendo que, quanto maior o período de incubação em solução SBF, maior será a modificação morfológica dos precipitados (RIBEIRO, C., 2003; LEGEROS et al., 2006).

Figura 5.29 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

iv. Microscopia de força atômica

A Figura 5.30 apresenta micrografias obtidas por AFM da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.

Figura 5.30 – Micrografias obtidas por AFM da superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF5,0x

De maneira geral, pode-se observar uma homogeneidade na distribuição dos glóbulos de fosfatos de cálcio na camada formada sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma. Observou-se ainda, que os formatos dos glóbulos são semelhantes, o que pode sugerir que o tratamento aparentemente não influenciou na formação desses, contrariamente ao observado nos nanocompósitos tratados quimicamente. No entanto, é importante ressaltar que os glóbulos formados na camada sobre a superfície dos tratados por plasma é similar aos glóbulos formados nas superfícies daqueles que receberam tratamento com H₃PO₄, apresentando uma aparência mais rugosa da camada de fosfatos de cálcio sobre a superfície.

v. Fluorescência de raios-X

Os valores obtidos com o auxílio do FRX para medir a espessura da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x, não foram apresentados, uma vez que, os resultados obtidos não são satisfatórios, indicando a necessidade de se realizar novamente a análise, a fim de obter valores mais apreciáveis.

5.6. Adesão do recobrimento biomimético nos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$

Os resultados obtidos a partir do teste de riscamento “*scratch test*” realizado na superfície dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ sem e com tratamentos superficiais (químicos e por plasma) e recobertos biomimeticamente estão dispostos individualmente. Dessa forma, primeiramente são apresentados os resultados obtidos para os nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e recobertos biomimeticamente usando soluções de SBF 1,5x e 5,0x.

5.6.1. Adesão do recobrimento nos nanocompósitos tratados quimicamente

i. Recobrimento biomimético com solução de SBF 1,5x

A Figura 5.31 apresenta micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 21 dias de incubação em solução SBF 1,5x. A partir dessas micrografias, é possível observar a trilha do risco e a ampliação da falha na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície.

Figura 5.31 – Trilha do risco e a ampliação da falha na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

A partir da Figura 5.31 é possível observar um destacamento coesivo na lateral da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos que receberam tratamento com H_3PO_4 , porém, fora da região central do risco, ou seja, nas bordas do risco, além disso, observa-se dentro da trilha formada que a camada esta sendo esmagada pelo penetrador, e mesmo assim, permaneceu aderida a superfície apesar do surgimento de trincas perpendiculares à direção do riscamento. Já nos que receberam tratamento com HNO_3 pode-se observar uma região de provável falha adesiva, uma vez que ocorrem destacamentos na lateral da trilha, o que pode sugerir que uma tensão esta acumulada logo abaixo do risco formado, observa-se ainda que a camada de fosfatos de cálcio foi esmagada ao decorrer do teste. Nos que receberam tratamento com NaOH é possível observar que a camada de fosfatos de cálcio foi esmagada pelo penetrador ao longo da trilha, porém, permaneceu aderida a superfície. Já nos que não receberam tratamento pode-se observar um destacamento coesivo parcial na região central da trilha formada sobre a superfície, além disso, observa-se ainda o esmagamento da camada de fosfatos ao decorrer do teste. Na Figura 5.32 são apresentados os valores de cargas críticas (L_c) da trilha formada na camada de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 21 dias de incubação em solução de SBF 1,5x, calculadas de acordo com a equação 4.7.

Figura 5.32 – Carga crítica (L_c) da trilha formada na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 1,5x

Conforme visualizado na Figura 5.32, é possível observar que nos nanocompósitos que receberam tratamento com H_3PO_4 a carga crítica de falha coesiva foi superior ($\sim 2,9\text{N}$), o que pode sugerir uma boa aderência entre a camada de fosfatos de cálcio formada e a superfície do material, uma vez que, quanto maior a carga crítica, melhor é a aderência. Uma possível explicação para esse fato é que esse comportamento pode estar associado à maior rugosidade (maior valor R_a) e maior caráter hidrofílico conforme observado anteriormente (Figura 5.4), influenciando na distribuição dos glóbulos de fosfato de cálcio (Figura 5.10) da camada formada sobre a superfície. Além disso, pode-se observar ainda que os que não receberam tratamento e aqueles que receberam tratamento com HNO_3 também apresentaram influência na carga crítica, observando um aumento nos valores de carga crítica. No entanto, nos que receberam tratamento com NaOH , observa-se um aumento nos valores de carga crítica, embora com menor ênfase ($\sim 1,5\text{N}$).

De acordo com Tavares (2002) outro fator que também pode contribuir para o aumento nos valores da carga crítica apresentada por um recobrimento é a espessura da camada formada sobre a superfície de um material, uma vez que, o aumento na espessura da camada, conforme observado na Tabela 5.2, contribui para o decréscimo das tensões residuais internas, visto que a estrutura do recobrimento torna-se mais aberta à medida que se aproxima da superfície (TAVARES, 2002).

ii. Recobrimento biomimético com solução de SBF 5,0x

A Figura 5.33 apresenta micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 21 dias de incubação em solução SBF 5,0x. A partir dessas micrografias, é possível observar a trilha do risco e a ampliação da falha na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície.

Figura 5.33 – Trilha do risco e a ampliação da falha na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

A partir da Figura 5.33 é possível observar que a camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos que não receberam tratamento foi esmagada pelo penetrador ao longo da trilha, porém, permaneceu aderida, mesmo com o surgimento de pequenas trincas perpendiculares à direção do riscamento. Já nos que receberam tratamento com H_3PO_4 e HNO_3 pode-se observar também, que a camada de fosfatos de cálcio foi esmagada pelo penetrador ao longo da trilha, porém, permaneceu aderida. Além disso, observa-se ainda que a camada de fosfatos formada sobre a superfície dos tratados com HNO_3 apresentou trincas fora da região central do risco, ou seja, nas bordas do risco, no entanto, destacamentos não foram visualizados. Nos que receberam tratamento com NaOH é possível observar que a camada de fosfatos de cálcio foi esmagada pelo penetrador ao longo da trilha, porém, é importante ressaltar, que as falhas visualizadas fora da região central do risco, caracterizadas por trincas e desprendimentos se deve ao fato do período de 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x exceder o tempo necessário de recobrimento para essa condição de tratamento, não sendo provenientes do teste. Na Figura 5.34 são apresentados os valores de cargas críticas (L_c) da trilha formada na camada de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x, calculadas de acordo com a equação 4.7.

Figura 5.34 – Carga crítica (L_c) da trilha formada na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 21 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Conforme visualizado na Figura 5.34, é possível observar que nos nanocompósitos que receberam tratamento com H_3PO_4 a carga crítica de falha coesiva também se mostrou superior ($\sim 2,9\text{N}$), sugerindo uma boa aderência entre a camada de fosfatos de cálcio formada e a superfície do material. Além disso, pode-se observar ainda que nos não tratados e aqueles que receberam tratamento com HNO_3 também apresentaram influência na carga crítica, observando um aumento nos valores de carga crítica. No entanto, nos que receberam tratamento com NaOH , observa-se um aumento nos valores de carga crítica, embora com menor ênfase ($\sim 1,5\text{N}$).

De modo geral, pode-se observar que a camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente apresentam características de falhas abruptas que podem ser atribuídas a fenômenos de “lascamentos” laterais, o que sugere a ocorrência de falhas adesivas por delaminação, uma vez que em algumas condições de tratamentos foram observadas o destacamento da camada. De acordo com Hoy e colaboradores (2005) e Alves (2010) quando recobrimentos apresentam espessura fina, apesar de as trincas se estenderem para a área externa do risco e cruzarem toda a sua largura, os desprendimentos são raros. Contrariamente aos recobrimentos espessos onde os desprendimentos são observados tanto nas bordas como na região central dos riscos (HOY et al, 2005; ALVES, R., 2010). Para Bull (1997) os desprendimentos geralmente observados em recobrimentos espessos são devido a um maior acúmulo de energia elástica nesses recobrimentos (BULL, 1997, ALVES, R., 2010).

5.6.2. Adesão do recobrimento biomimético nos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$

Os resultados obtidos a partir do teste de riscamento “*scratch test*” realizado na superfície dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$ sem e com tratamentos superficiais por plasma e recobertos biomimeticamente usando solução de SBF 5,0x, são apresentados a seguir.

i. Recobrimento biomimético com solução de SBF 5,0x

A Figura 5.35 apresenta micrografias obtidas por MEV da superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x. A partir dessas micrografias, é possível observar a trilha do risco e a ampliação da falha na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície.

Figura 5.35 – Trilha do risco e a ampliação da falha na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

A partir da Figura 5.35 é possível observar que a camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos que não receberam tratamento foi esmagada pelo penetrador ao longo da trilha, porém, permaneceu aderida, mesmo com o surgimento de pequenas trincas perpendiculares à direção do riscamento. Já nos que receberam tratamento com 20%N₂-80%H₂ e 40%N₂-60%H₂ pode-se observar também, que a camada de fosfatos de cálcio foi esmagada pelo penetrador ao longo da trilha, porém, permaneceu aderida, além disso, é possível observar ainda que a camada de fosfatos formada sobre a superfície apresentou trincas na região central do risco, porém, destacamentos não foram visualizados. Nos que receberam tratamento com 40%N₂-40%H₂-20%O₂ pode-se observar uma região de provável falha adesiva, uma vez que ocorrem destacamentos na lateral da trilha, o que pode sugerir que uma tensão esta acumulada logo abaixo do risco formado, observa-se ainda que a camada de fosfatos de cálcio foi esmagada ao decorrer do teste. Os que receberam tratamento com 30%N₂-50%H₂-20%O₂ pode-se observar também, que a camada de fosfatos de cálcio foi esmagada pelo penetrador ao longo da trilha, porém, permaneceu aderida, além disso, é possível observar que a camada de fosfatos formada sobre a superfície apresentou trincas na região central do risco, no entanto, destacamentos não foram visualizados. Já nos que receberam tratamento com 100%N₂ e 100%O₂ pode-se observar também, que a camada de fosfatos de cálcio foi esmagada pelo penetrador ao longo da trilha, porém, permaneceu aderida.

De maneira geral, as falhas observadas na superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma são as mesmas observadas para recobrimentos com fina camada (BULL, 1997). No início do riscamento a primeira resistência encontrada pelo penetrador pode ser um pico ou um vale, criando duas situações possíveis, a primeira é que o penetrador esmague o topo de um pico e logo em seguida comece o deslocamento horizontal com a aplicação de cargas progressivas, e, portanto, lentamente esmagando o recobrimento a sua frente; já a segunda situação é aquela onde o penetrador esteja alojado em um pico/vale do recobrimento. Nesta situação o penetrador além de provocar um esmagamento inicial, pode cisalhar o topo e somente em seguida começar o processo de esmagamento do recobrimento (TAVARES, 2002; ALVES, R., 2010, 2010; AGUIAR, 2013).

Na Figura 5.36 são apresentados os valores de cargas críticas (Lc) da trilha formada na camada de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x, calculadas de acordo com a equação 4.7.

Figura 5.36 – Carga crítica (L_c) da trilha formada na camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais por plasma após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x

Conforme visualizado na Figura 5.34, é possível observar que nos nanocompósitos que receberam tratamentos por plasma a carga crítica de falha coesiva se mostrou superior ($\sim 2,9\text{N}$) quando comparada aos que não receberam tratamento ($\sim 2,0\text{N}$), sugerindo uma boa aderência entre a camada de fosfatos de cálcio formada e a superfície do material tratado. Além disso, pode-se observar ainda que os que receberam tratamento com 20%N₂-80%H₂ e com 40%N₂-40%H₂-20%O₂ apresentaram maior diferença nos valores de carga crítica.

De modo geral, é possível observar que a aderência da camada de fosfatos de cálcio e a superfície dos nanocompósitos pode ser significativamente melhorada por tratamentos por plasma, uma vez que, todas as condições estudadas apresentaram resultados satisfatórios, além disso, destaca-se ainda a ausência de destacamentos da camada (exceto nos tratados com 40%N₂-40%H₂-20%O₂).

5.7. Ensaio biológicos *in vitro* dos nanocompósitos de Al₂O₃/5%ZrO₂

De acordo com os resultados obtidos para os nanocompósitos de Al₂O₃/5%ZrO₂, os tempos de 14 e 21 dias se mostraram mais adequados para a formação de uma camada homogênea de fosfatos de cálcio sobre a sua superfície. No entanto, optou-se por avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x. Salienta-se ainda, que não foram apresentados

os resultados para os tratados por plasma e recobertos biomimeticamente utilizando solução de SBF 5,0x, assim como os tratados quimicamente e recobertos biomimeticamente utilizando solução de SBF 1,5x, uma vez que não estavam inicialmente previstos, conforme descrito anteriormente.

5.7.1. Análise de citotoxicidade

A Figura 5.37 apresenta fotomicrografias obtidas por microscopia óptica das células CHO cultivadas por 72 horas sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x.

Figura 5.37 – Fotomicrografias obtidas por microscopia óptica das células CHO sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e recobertos biomimeticamente com solução de SBF 5,0x após 72 horas de cultivo

Em estudos realizados por Porter e colaboradores (1973) relata que essas estruturas são características de mudanças morfológicas na superfície das células CHO durante o ciclo de vida. Neste estudo, Porter e colaboradores descreveram o ciclo de vida das células em quatro etapas, denominadas como G1, S, G2 e D. No primeiro estágio do ciclo de vida celular (G1), observou que as células CHO apresentavam morfologia arredondada, com aproximadamente 12 μm , cobertas com numerosos microvilosidades e outros glóbulos lisos (2 - 4 μm), descritos como fragmentos de células lisadas durante a mitose. Na etapa seguinte (S), as células começam a aumentar o tamanho, perdendo seu formato globular e adquirindo uma forma estendida, com pequenas bolhas entremeadas com numerosas microvilosidades. Nas demais etapas (G2) e (D), até atingir a confluência, as células tendem a perder as microvilosidades e as bolhas começam a apresentar um aspecto estendido e assimétrico (PORTER, PRESCOTT, FRYE, 1973).

Desta forma, pode-se presumir que, após o período de 72 horas de cultivo (Figura 5.37), as células CHO na superfície dos nanocompósitos estão atingindo a etapa de confluência (final do estágio de crescimento), uma vez que se observa que as células apresentam um formato mais estendido, com pouca presença de glóbulos e microvilosidades. Além disso, pode-se observar ainda na Figura 5.37 pequenos fragmentos que se desprenderam da superfície. Ressalta-se que esses fragmentos não podem ser considerados como estruturas celulares, uma vez que foram observados desde o início do cultivo.

A Figura 5.38 apresenta micrografias obtidas por MEV das células CHO cultivadas por 72 horas sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x. A partir dessas micrografias, pode-se observar estruturas celulares CHO em formato circular com dimensões entre 10 e 12 μm , além da presença de pequenos glóbulos.

Figura 5.38 – Micrografias obtidas por MEV das células CHO sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e recobertos biomimeticamente com solução de SBF 5,0x, após 72 horas de cultivo

Por outro lado, pode-se observar na Figura 5.38 que as células CHO apresentaram uma morfologia arredondada sobre a superfície dos nanocompósitos característica do estágio inicial do ciclo de vida da célula, com a presença de pequenas estruturas em formatos circulares e microvilosidades, o que pode sugerir, que as células tiveram inicialmente um estágio de adaptação na superfície do material, retardando o início da sua proliferação. Após essa etapa de adaptação, as células passaram a se desenvolver normalmente. Devido à mudança de condição de cultivo, o tempo de adaptação é totalmente justificado, característico das células em geral, e não representa toxicidade dos nanocompósitos às células.

Diferentes tipos de ensaios têm sido realizados para avaliar a viabilidade e citotoxicidade de um material, dentre eles o ensaio de MTT. Nesse sentido, a Figura 5.39 apresenta o percentual de viabilidade celular sobre a superfície dos nanocompósitos não tratados e tratados quimicamente após 14 dias de incubação em solução de SBF 5,0x, obtidos a partir do ensaio de MTT.

Figura 5.39 – Percentual da viabilidade celular sobre a superfície dos nanocompósitos sem e com tratamentos superficiais químicos e recobertos biomimeticamente com solução de SBF 5,0x, após 72 horas de cultivo

5.8. Considerações gerais

De forma geral, observou-se nos sistemas aqui estudados que o prévio tratamento superficial (químico e plasma) é uma etapa que pode influenciar na rugosidade das superfícies dos nanocompósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/5\%\text{ZrO}_2$. Consequentemente, essas diferenças de rugosidade podem atuar como sítios de nucleação e crescimento de cristais a partir do recobrimento biomimético, favorecendo assim a formação dos fosfatos de cálcio sobre as superfícies tratadas dos nanocompósitos.

Além disso, independentemente do tratamento superficial, assim como as concentrações das soluções de SBF (1,5x e 5x) utilizadas, foram observadas apenas 3 fases distintas dos fosfatos de cálcio formados sobre as superfícies dos nanocompósitos: HA, α -TCP e β -TCP.

Ressalta-se, no entanto, que a quantidade dessas fases formadas é dependente do prévio tratamento superficial recebido pelo nanocompósito, assim como do tempo de incubação. Observou-se, por exemplo, maior favorecimento da formação de HA nas superfícies tratadas com NaOH aos 21 e 28 dias de recobrimento biomimético com SBF 1,5x. Por outro, quando se utilizou uma concentração maior de SBF 5x, observou-se que o tratamento com H_3PO_4 favoreceu, em torno de 180 vezes, maior formação de HA aos 21 dias de incubação. Já nas superfícies tratadas com 30% N_2 -50% H_2 -20% O_2 observou-se em torno de 7000 vezes maior quantidade de HA aos 14 dias de incubação.

Apesar de ser observada maior quantidade de HA, por exemplo, formada sobre as superfícies dos nanocompósitos tratados por plasma, é preciso considerar a efetividade da adesão desses fosfatos de cálcio formados. Mesmo que se observe uma quantidade significativamente pequena (em torno de 29000 vezes menor) de fosfato de cálcio formada sobre as superfícies dos nanocompósitos tratados com H_3PO_4 e recobertas biomimeticamente com SBF 1,5x, quando comparada com a quantidade de fosfatos formados sobre as superfícies tratadas com 30% N_2 -50% H_2 -20% O_2 , a força de adesão dos fosfatos de cálcio formados nas superfícies tratadas quimicamente é em torno de 45 vezes mais efetiva. Dentre as superfícies recobertas, destacam-se aquelas que foram tratadas com 100% de O_2 , pois além da adesão dos fosfatos de cálcio sobre as superfícies dos nanocompósitos ser tão efetiva quanto às superfícies tratadas com H_3PO_4 , observou-se maior quantidade de fosfatos de cálcio formada (em torno de 1100 vezes maior) quando comparada com a superfície tratada com H_3PO_4 (SBF 5x).

Já os testes *in vitro* foram realizados para determinar a citotoxicidade das superfícies dos nanocompósitos recobertos. Os testes de MTT mostraram resultados bastante promissores, com valores acima de 90% de viabilidade celular sobre as superfícies recobertas.

Além disso, análises de proliferação celular sobre os nanocompósitos recobertos demonstraram baixa toxicidade e significativa biocompatibilidade.

Dessa forma, os resultados aqui apresentados sugerem que os tratamentos prévios superficiais dos nanocompósitos recobertos biomimeticamente, além de favorecer a formação e quantidade desejada de diferentes fases de fosfatos de cálcio em função do tempo de incubação, podem contribuir de forma efetiva na proliferação e biofixação celular desejada sobre o implante ósseo.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, consideram-se as seguintes conclusões:

- ❖ Os tratamentos superficiais químicos utilizando soluções ácidas e alcalina influenciaram na rugosidade dos nanocompósitos e consequentemente na formação de diferentes fases de fosfato de cálcio em função da concentração da SBF usada e tempo de recobrimento:
 - usando solução de SBF 5,0x observou uma maior formação de fosfato de cálcio nos tratados com H_3PO_4 , obtendo 95,85% da fase de HA após 21 dias de recobrimento;
 - usando solução de SBF 1,5x observou uma maior formação de fosfato de cálcio nos tratados com NaOH, obtendo 74,20% da fase de HA após 21 dias de recobrimento;
 - observou-se maior formação de fosfatos de cálcio sobre as superfícies dos nanocompósitos recobertos biomimeticamente com solução de SBF 5,0x após 21 dias quando comparados com os nanocompósitos recobertos com solução de SBF 1,5x no mesmo período;
- ❖ Os tratamentos superficiais por plasma utilizando N_2 , H_2 e O_2 em diferentes condições de processo, influenciaram na rugosidade dos nanocompósitos e consequentemente na formação de diferentes fases de fosfato de cálcio formada após o recobrimento biomimético. A quantidade de fosfato de cálcio foi maior quando utilizou-se a condição de 30% N_2 -50% H_2 -20% O_2 seguido por 40% N_2 -60% H_2 , O_2 , 20% N_2 -80% H_2 , 40% N_2 -40% H_2 -20% O_2 e N_2 .
- ❖ Os tratamentos superficiais (químico e por plasma) influenciaram na adesão da camada de fosfatos de cálcio formada sobre a superfície dos nanocompósitos.
- ❖ Os testes de proliferação celular demonstraram que os nanocompósitos tratados quimicamente e recobertos biomimeticamente com solução de SBF 5,0x são biocompatíveis.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros têm-se:

- ❖ Estudar outras condições de tratamentos superficiais por plasma em nanocompósitos e analisar a resposta na formação da camada de fosfatos de cálcio.
- ❖ Avaliar a biocompatibilidade, citotoxicidade, proliferação e adesão celular nos nanocompósitos tratados superficialmente por plasma.
- ❖ Estudar a formação óssea *in vitro*, utilizando os nanocompósitos tratados superficialmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. *Journal of materials science: Materials in medicine*, v. 1, p.233-238, 1990.

AGUIAR, A.A. Avaliação de tratamentos químicos e recobrimento biomimético em cerâmicas de alumina-zircônia. 2007. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2007.

AGUIAR A.A. Avaliação do recobrimento biomimético em compósitos de alumina-zircônia texturizadas superficialmente com laser de femtossegundo. 2013. 152p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Autarquia associada à Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2013.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Biologia molecular da célula. 3ª edição. Porto Alegre: Artes Médicas, p.1291, 1997.

ALBREKTSSON, T.; WENNNENBERG, A. Oral implant surfaces: Part 1: review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *International Journal Prosthodontics*, v.1, n.5, p.536-543, 2004.

ALMEIDA, C.N. Produção e biocompatibilidade de filmes de carbono-tipo diamante contendo nanopartículas de diamante incorporadas visando recobrimento de fixadores externos. 2012. 56p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, São José dos Campos, 2012.

ALVES, H.R. Avaliação da aderência de recobrimentos de biomateriais produzidos por aspersão térmica a plasma atmosférico em aço inoxidável AISI 316L utilizando ensaio de riscamento e ensaio de tração. 2010. 304p. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, 2010.

ALVES JR, C. Nitretação a plasma - Fundamentos e Aplicações. Rio Grande do Norte: Editora UFRN, 2001.

ARÁUJO FILHO, L. Desenvolvimento e teste de um protótipo de reator de plasma com gaiola catódica rotatória para nitretação em lote de pequenas peças. 2013. 58p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, 2013.

ARAÚJO, J.C.S. Produção e caracterização de revestimento cerâmico $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ZrO}_2\text{-Y}_2\text{O}_3$ inerte ao petróleo cru por processo de aspersão térmica para indústria petrolífera. 2015. 126p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, 2015.

ARAÚJO, S.M.S.O. Obtenção e caracterização de corpos densos e porosos de compósitos de alumina e zircônia para utilização como biomaterial. 2012. 144p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2012.

ASTM D907-08a, Standard Terminology of Adhesives. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2008.

ASTM C373-88 (1999), Standard Test Method for Water Absorption, Bulk Density, Apparent Porosity, and Apparent Specific Gravity of Fired Whiteware Products. ASTM International, West Conshohocken, PA, 1999.

AOKI, H. Science and medical applications of hydroxyapatite. Tokyo: Takayama Press System Center, p.230, 1991.

AZEVEDO, R.B. Microscopia eletrônica. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber, p.101-109, 2006.

AWJA, F.; GILBERT, M.; KELLY, G.; FOX, B.; PIGRAM, P.J. Adhesion of polymers. *Progress in Polymer Science*, v.34, p.948-968, 2009.

BARBOSA, J.C.P. Análise por meio de espectroscopia de emissão óptica das espécies ativas em nitretação iônica e gaiola catódica. 2007. 96p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, 2007.

BARBOSA, J.C.P. Diagnóstico das espécies ativas do plasma usado em tratamentos termoquímicos do titânio. 2011. 142p. Tese (Doutorado Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, 2011.

BARRERE F.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; GROOT, K.; LAYROLLE, P. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBF×5 solution. *Biomaterials*, v.23, n.29, p.1921-1930, 2002.

BEN-NISSAN, B. Advances in calcium phosphate biomaterials. In: Biomaterials Science And Engineering. *Springer*, p.1-511, 2014.

BERZINA-CIMDINA, L.; BORODAJENKO, N. Research of calcium phosphates using fourier transform infrared spectroscopy. *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, Prof. Theophanides Theophile, p.123-149, 2012.

BESSE, M.R. Preparação de soluções sólidas superficiais à base de alumina como catalisadores para síntese do biodiesel via rota etílica. 2014. 105p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Araraquara, UNESP, São José do Rio Preto, 2014.

BHARATI, S.; SOUNDRAPANDIAN, C.; BASU, D.; DATTA, S. Studies on a novel bioactive glass and composite coating with hydroxyapatite on titanium based alloys: Effect of sterilization on coating. *Journal of European Ceramic Society*, v.29, p.2527-2535, 2009.

BOCH, P.; NIEPCE, J.C. Ceramic Materials: Processes, properties and Applications. London: ISTE, p.59, 2007.

BONAN, R.F.; BONAN, P.R.F.; BATISTA, U.D.; OLIVEIRA, J.E.; MENEZES, R.R. MEDEIROS, E.S. Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita. *Cerâmica*, v.60, p.402-410, 2014.

BORGES, A.M.G; BENETOLI, L.O.B.; LICINIO, M.A.; SILVA, M.C.S.; ASSREUY, J.; DEBACHER, N.A.; SOLDI, V. Efeito da modificação da superfície de polímeros por plasma frio na adesão de fibroblastos L-929. In: 11º Congresso Brasileiro de Polímeros, Brasil, 2011.

BRANDÃO, M.L.; ESPOSTI, T.B.D.; BISOGNIN, E.D.; HARARI, N.D.; VIDIGAL JÚNIOR, G.M.; CONZ, M.B. Surface of dental implants x biological response. *Implant News Magazine*, v.7, n.1, p.95-101, 2010.

BRAZIL, T.R.; NEVES, M.F.; REGIANI, I.; MARCIANO, F.R.; LOBO, A.O. Proposed model for biomineralization of novel nanohydroxyapatite/vertically aligned multiwalled carbon nanotube scaffolds. *Materials Research*, v.16, n.3, p.661-667, 2013.

BRUNETTE, D.M. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *International Journal of Oral and maxillofacial implants*, v.3 p.124-131, 1988.

BULL, S.J.; BERASETEGUI, E.G. An overview of the potential of quantitative coating adhesion measurement by scratch test. *Tribology International*, v.39, p.99-114, 2006.

CANEVAROLO JÚNIOR, S.V. Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: Editora Artliber, 2004.

CASTNER, D.G.; RATNER, B.D. Biomedical surface science: foundations to frontiers. *Surface Science*, v.500, n.1-3, p.28-60, 2002.

CHENG, H.C.; CHIOU, S.Y.; LIU, C.M., LIN, M.H.; CHEN, C.C.; OU, K.L. Effect of plasma energy on enhancing biocompatibility and hemocompatibility of diamond-like carbon film with various titanium concentrations. *Journal of Alloys Compounds*, v.477, p.931-935, 2009.

CHEN, F.F.; CHANG, J.P. Principles of plasma processing. Los Angeles: Plenum/Kluwer Publishers, 2002.

CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L. Ceramics for medical applications: a picture for the next 20 years. *Journal of the European Ceramic Society*, v.29, p.1245-1255, 2009.

CHINELATTO, A.S.A.; MANOSSO, M.K.; PALLONE, E.M.J.A.; SOUZA, A.M.; CHINELATTO, A.L. Effect of the Two-Step Sintering in the Microstructure of Ultrafine Alumina. *Advances in Science and Technology (Online)*, v.62, p.221-226, 2010.

CHINELATTO, A.S.A.; PALLONE, E.M.J.A.; SOUZA, A.M.S.; MANOSSO, M.K.; CHINELATTO, A.L; TOMASI, R. Mechanisms of Microstructure Control in Conventional Sintering. In: LAKSHMANAN, A. (Ed.) Sintering of ceramics-new emerging techniques. Intech, p.401-422, 2012.

CHINELATTO, A.S.A.; CHINELATTO, A.L.; OJAIMI, C.L.; FERREIRA, J.A.; PALLONE, E.M.J.A. Effect of sintering curves on the microstructure of alumina–zirconia nanocomposites. *Ceramics International*, v.40, p.14669-14676, 2014.

ČOLOVIĆ, B.; JOKANOVIĆ, V.; JOKANOVIĆ, B.; JOVIĆ, N. Biomimetic deposition of hydroxyapatite on the surface of silica thin film covered steel tape. *Ceramics International*, v.40, n.5, p.6949-6955, 2014.

CORTES, D.A.; NOGIWA, A.A.; ALMANZA, J.M.; ORTEGA, S. Biomimetic apatite coating on Mg-PSZ/ Al_2O_3 composites. Effect of the immersion method. *Materials Letter*, v.59, p.1352-1355, 2005.

COSTA, C.M. Efeito da adição de alumina nas propriedades químicas e mecânicas de biocerâmicas de apatitas nanométricas sintetizadas via sol-gel. 2014. 80p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, 2014.

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

DEHESTANI, M.; ILVER, L.; ADOLFSSON, E. Enhancing the bioactivity of zirconia and zirconia composites by surface modification. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, p.832-840, 2012.

DHERT, W.J.A. Plasma-sprayed coatings and hard-tissue compatibility: a comparative study. In: Fluorapatite, magnesium whitlockite and hydroxyapatite. *Ablasterdam*, p.4-6, 1992.

DENRY, I.; KELLY, J.R. State of the art of zirconia for dental applications. *Dental Materials*, v.24, p.299-307, 2008.

DICKSON J.A. The uptake of non-metabolizable amino acids as an index of cell viability *in vitro*. *Experimental Cell Research*, v.61, n.2-3, p.235-245, 1970.

DOROZHUKIN, S.V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials*, v.2, p.399-498, 2009.

ELLIOT, J.C. Structure and Chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Studies in inorganic chemistry. *Elsevier Science*, 1994.

EVANS, A.G.; HEUER, A.H. Transformation toughening in ceramics: martensity transformation in crack-tip stress fields. *Journal of The American Ceramic Society*, v.63, n.5-6, p.241-248, 1980.

FAGA, M.G.; VALLÉE, A.; BELLOSI, A.; MAZZOCCHI, M.; THINH, N.N.; MARTRA, G.; COLUCCIA, S. Chemical treatment on alumina-zirconia composites inducing apatite formation with maintained mechanical properties. *Journal of the European Ceramic Society*, v.32, p.2113-2120, 2012.

FIGUEIREDO FILHO, D.B.; SILVA JÚNIOR, J.A. Desvendando os mistérios da correlação (r). *Revista Política Hoje*, v.18, n.1, 2009, p.1-38.

FOOK, A.C.B.M. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas para regeneração óssea. 2008. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Campina Grande, 2008.

FOOK, A.C.B.M.; APARECIDA, A.H.; FOOK, M.V.L. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como *scaffolds* para regeneração óssea. *Revista Matéria*, v.15, n.3, p.392-399, 2010.

GADALETA, S.J.; PASCHALIS, E.P.; BETTS, F.; MENDELSON, R.; BOSKEY, A.L. Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: new correlations between x-ray diffraction and infrared data. *Calcified Tissue International*, v.58, p.9-16, 1996.

GLEITER, H. Nano Presented. In: 2nd International Conference on Nanostructured Materials, Germany, 1995.

GOMIDE, V.S. Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos. 2005. 142p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2005.

GONZÁLEZ, R.; GUERRA-LOPEZ, J.G. Materiales bioactivos para implantes óseos. Características y aplicaciones. Laboratorio de Biomateriales, Centro Investigaciones científicas, Cuba, 1993.

GRAEME, K.H. “Light is a messenger: the life and science of William Lawrence Bragg” 2004 e “Great solid state physicists of the 20th century”, Julio Antonio Gonzalo, Carmen Aragón-López, 2004.

GUASTALDI, A.C.; APARECIDA, A.H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova*, v.33, n.6, p.1352-1358, 2010.

GUIMARÃES, F.A.T.; SILVA, K.L.; TROMBINI, A. V.; PIERRI, J.J.; RODRIGUES, J.A., TOMASI, R.; PALLONE, E.M.J.A. Correlation between microstructure and mechanical properties of Al₂O₃-ZrO₂ nanocomposites. *Ceramics International*, v.35, n.2, p.741-745, 2009.

HARDY, W.B. Scientific problems of cold storage industries. *Journal of the Franklin Institute*, v.190, p.270, 1920.

HASIRCI, V.; VRANA, E.; ZORLUTUNA, P.; NDREU, A.; YILGOR, P.; BASMANAV, F.; AYDIN, E. Nanobiomaterials: a review of the existing science and technology, and new approaches. *Journal Biomaterials Science*, v.17, p.1241-1268, 2006.

HENCH, L.L., WILSON, J. Introduction to bioceramics. Singapore: Word Scientific Publishing, p.402, 1993.

HIRSCHMANN, A.C.O. Compósitos cerâmicos porosos de alumina-zircônia para aplicação em sistemas de controle térmico para satélites: obtenção e caracterização. 2008. 140 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), São José dos Campos, 2008.

HIROHATA Y.; TSUCHIYA N.; HINO T. Effect of mixing of hydrogen into nitrogen plasma. *Applied Surface Science*, v.169-170, p.612-616, 2001.

HUBNER, H.; DORRE, A. Alumina. Heidelberg: Springer-Verlag, 1984.

<<http://www.tudointeressante.com.br/2014/03/amedicinadopassado> (2014)>. Acesso em 25 de junho de 2016.

<<http://www.geocities.ws/analisedesuperficies/riscamento.html> (2016)>. Acesso em 25 de junho de 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO FDIS 23317: Implants for surgery-In vitro evaluation for apatite-coating ability of implants materials, 2005.

KAI, K.C. Síntese, caracterização físico-química e avaliação biológica in vitro de cerâmicas de fosfato de cálcio dopadas com magnésio e zinco. 94p. 2012. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Materiais Avançados) - Universidade Federal do ABC, UFABC, Santo André, 2012.

KALITA, S. J. E H. A. BHATT. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: synthesis and characterization. *Materials Science Engineering C*, v.27, p.837-48. 2007.

KAWAHARA, H.; YAMAGAMI, A.; NAKAMURA, M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *International Dental Journal*, v.18, p.443-467, 1968.

KAY, M. I. YOUNG, R.A.; POSNER, A.S. Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature*, v.204, p.1050-1055, 1964.

KAWACHI, E.Y.; BERTRAN, C.A.; REIS, R.R.; ALVES, O.L. Biocerâmicas, tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, v.23, n.4, p.518-522.

KERN, F.; PALMERO, P. Microstructure and mechanical proprieties of alumina 5% vol. zirconia nanocomposites prepared by powder coating and power mixing routes. *Ceramics International*, v.39, p.673-682, 2013.

KIM, Y.H.; KOAK, J.Y.; CHANG, I.T.; WENNERBERG, A.; HEO, S.J. A histomorphometric analysis of the effects of various surface treatment methods on osseointegration. *International Journal Oral Maxillofacial Implants*, v.18, n.3, p.349-356, 2003.

KRIEGER, S. Biocerâmica: fundamentos de mineralogia aplicada. Instituto de Geociências, USP-SP, p.1-6, 2003.

KOKUBO, T. Bioactive glass-ceramics: properties and applications. *Biomaterials*, v.12, p.155-163, 1991.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting “*in vivo*” bone bioactivity. *Biomaterials*, v.27, p.2907-2915, 2006.

LAMPIN, M.; WAROCQUIER-CLEROUT, R.; LEGRIS, C.; DEGRANGE, M.; SIGOTLUIZARD, M.F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion and cell migration. *Journal Biomedical Materials Research*, v.36, n.1, p.99-108, 1997.

LECOEUR, L.; OUHAYOUN, J.P. In vitro induction of osteogenic differentiation from non-osteogenic mesenchymal cells. *Biomaterials*, v.18, p.989-993, 1997.

LEE, W. E.; RAINFORTH, W. M. Ceramic microstructures: property control by processing. 1st edition. Chapman and Hall: London, 1994.

LI, Z.A.; LAM, W.M.; YANG, C.; XU, B.; NI, G.X.; ABBAH, S.A.; CHEUNG, K.M.C.; LUK, K.D.K.; LU, W.W. Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials*, v.28, p.1452-1460, 2007.

LIMA, R.S.; KUCUK, A.; BERNDT, C.C. Evaluation of microhardness and elastic modulus of thermally sprayed nanostructural zirconia coatings. *Surface and Coatings Technology*, v. 135, p.166-172, 2001.

LIU, G.J.; QUI, H.B.; TODD, R.; BROOK, R.J.; GUO, J.K. Processing and mechanical behavior of Al₂O₃-ZrO₂ nanocomposite. *Materials Research Bulletin*, v.33, n.2, p.281-288, 1998.

LOBO, A.O. Biocompatibilidade de superfícies recobertas por nanotubos de carbono. 2008. 175p. Dissertação (Mestrado em Física e Química dos Materiais Aeroespaciais) - Instituto Tecnológico de Aeronáutica, (ITA), São José dos Campos, 2008.

LOBO, A.O.; ANTUNES, E.F.; PALMA, M.B.S.; PACHECO-SOARES, C.; CORAT, M.A.F.; TRAVA-AIROLDI, V.J.; CORAT, E.J. Biocompatibility differences between dispersed and vertically-aligned carbon nanotubes: an in vitro assays review. In: OTTENHOUSE, A.P. Carbon nanotubes: new research. *Nova Science Publishers*, p.1-37, 2009.

LOBO, A.O. Obtenção de super-hidrofiliabilidade em nanotubos de carbono alinhados e sua aplicação como nanobiomaterial. 2011. 209p. Tese (Doutorado em Engenharia Aeronáutica e Mecânica) - Instituto Tecnológico de Aeronáutica, (ITA), São José dos Campos, 2011.

LUZ, G.M.; MANO, J.F. Mineralized structures in nature: examples and inspirations for the design of new composite materials and biomaterials. *Composites Science and Technology*, v.70, p.1777-1788, 2010.

MAIA, M.D.C. A hidroxiapatita contendo zinco a 0,5% como substituto ósseo. Caracterização físico-química e análise normatizada da biocompatibilidade. 2009. 240p. Tese (Doutorado em Patologia Bucodental) - Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, 2009.

MARKETS AND MARKETS. Biomaterials Market [By Products (Polymers, Metals, Ceramics, Natural Biomaterials) & Applications (Cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic Surgery, Wound Healing, Tissue Engineering, Ophthalmology, Neurology Disorders) - Global Forecasts to 2017. 2013. Disponível em <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterials-393.html>. Acesso em 26 de junho de 2016.

MATSUI, M. Correlações entre estrutura química, superestrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano. 2007. 136p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2007.

MATSUMOTO, N.; YOSHIDA, K.; HASHIMOTO, K.; TODA, Y. Thermal stability of β -tricalcium phosphate doped with monovalent ions. *Materials Research Bulletin*, v.44, n.9, p.1889-1894, 2009.

MATTHEWS, A. Advanced Surface Coatings: a Handbook of Surface Engineering. Chapman and Hall, p.1-368, 1991.

MATTOX, D.M. Properties technological surface: in surface modification engineering. *CRC*, v.1, p.3-23, 1987.

MOREIRA, A.P.D.; SOARES, G.D.A.; LEÃO, M.H.M.R. Incorporação de estrôncio em microcápsulas de alginato/ β -fosfato tricálcico para liberação controlada de fármaco. In: 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Brasil, 2012.

MORAES, M.C.C.S.B.; ELIAS, C.N.; FILHO, J.D.; OLIVEIRA, L.G. Mechanical properties of alumina-zirconia composhes for ceramic abutments. *Materials Research*, v.7, n.4, p.643-649, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunological Methods*, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

NARAYAN, R.J.; KUMTA, P.N.; SFEIR, C.; LEE, D.H.; OLTON, D.; CHOI, D. Nanostructured ceramics in medical devices: applications and prospects. *JOM*, v.56, n.10, p.38-43, 2004.

NIIHARA, K.; NAKAHIRA, A.; SASAKI, G.; HIRABAYASHI, M. Development of strong Al_2O_3 -SiC composites. In: Materials Research Society Symposium Proceedings on International Meeting on advanced Materials. *Materials Research*, v.4, p.129-134, 1989.

NIIHARA, K.; NAKAHIRA, A. Particulate strengthened oxide nanocomposites. In: Advanced Structural Inorganic Composites. *Elsevier Science Publishers*, p.637-664, 1990.

NIIHARA, K. New design concept of structural ceramics: ceramic nanocomposites. *The Centennial Memorial Issue of the Ceramic Society of Japan*, v.99, n.10, p.974-982, 1991.

NOUVEAU, C.; JORAND, E.; DECES-PETIT, C.; C. LABIDI, DJOUADI, M.A. Influence of carbide substrates on tribological properties of chromium and chromium nitride coatings: application to wood machining. *Wear*, v.258, p.157-165, 2005.

NOVAES JÚNIOR, S.L.S.; SOUZA, R.R. M.; BARROS, K.K.Y.; PEREIRA, G.; IEZZI, A. P. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Brazilian Dental Journal*, v.21, n.6, p.471-481, 2010.

NUNES, T.N.B.; PONTES, K.M.F.; VERDE, M.A.L.; GARCIA, B.A.; FROTA, B.M.D.; MESQUITA, H.W. Efeitos do tratamento de argônio na superfície do titânio puro. In: 32º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica Reunião, Brasil, 2015.

OJAIMI, C.L. Compósito nanoestruturados de alumina-zircônia para prótese odontológica. 2014. 132p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, 2014.

OLIVEIRA, L.R. Modelagem bidimensional de hidrofobicidade e superhidrofobicidade em superfície de pilares, 2010. 96p. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, 2010.

OLIVEIRA, A.R.F. Desenvolvimento de um microscópio confocal de varredura laser para caracterização topográfica de superfícies. 2012. 90p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Uberlândia, UFU, 2012.

OLIVEIRA SOUZA, A.P. Avaliação da associação de uma biocerâmica de fosfato de cálcio com células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano na bioengenharia do tecido ósseo. 2013. 58p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2013.

OLIVEIRA, R.T.; NUNES, T.N.B.; MESQUITA, H.W.; GARCIA, B.A.; FROTA, B.M.D.; LOIOLA, D.C.; NEGREIROS, W.A.; PONTES, K.M.F. Efeitos do tratamento de superfície de dentes artificiais com plasma de argônio e sua resistência de união à base de resina acrílica. In: 32º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Brasil, 2015.

PARK, J.B.; BRONZINO, J.D.; KIM, Y.K. Metallic biomaterials ceramic biomaterial In: Park, J.B. and Bronzino, J.D. (eds). *Biomaterials principals and applications*, p.1-45, 2003.

PARK, J.B.; BRONZINO, J.D. Biomateriais: princípios e aplicações. *CRC Press*, 2003.

PAVINATO, V.P. Estudo da solubilidade de apatitas em meios de interesse biológico. 2012. 81p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, 2012.

PICONI, C.; MACCAURO, G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*, v.20, p.1-25, 1999.

PIERRE, J.; ROSLINDO, E.B.; TOMASI, R.; PALLONE, E.M.J.A.; RIGO, E.C.S. Alumina-zirconia composite coated by biomimetic method. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.352, p.5279-5283, 2006.

PIERRE, J. Determinação da dureza, da tenacidade e da fadiga flexural de infraestruturas para prótese odontológicas livres de metal reforçadas com zircônia nanométrica. 2011. 106p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, 2011.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K. ; MORAES, A.M. Biomateriais, tipos, aplicações e mercado. *Química Nova*, p.1-38, 2015.

PIZZOFERRATO, A.; CIAPETTI, G.; STEA, S.; CENNI, E.; ARCIOLA, C.R.; GRANCHI, D.; SAVARINO, L. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clinical Materials*, v.15, p.173-190, 1994.

PORTER, K.; PRESCOTT, D.; FRYE, J. Changes in surface morphology of chinese hamster ovary cells during the cell cycle. *The Journal of Cell Biology*, v.57, p.815-836, 1973.

PULKER, H.K. Coatings on Glass, 1st edition. *Elsevier*, 1984.

RASHAD, M.M.; BAJOUMY, H.M. Effect of thermal treatment on the crystal structure and morphology of zirconia nanopowders produced by three different routes, *Journal of Materials Processing Technology*, v.195, p.178-185, 2008.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. Biomateriais Science: an introduction to materials in medicine, 2nd edition. *Academic Press*, 1996.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMON, J.E. Biomaterials science: a multidisciplinary endeavor. In: Ratner B.D, Hoffman A.S, Schoen F.J, Lemons J.E (Eds). Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. *Elsevier*, 2004.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E; JOSEPH DYRO, B.S. Biomedical engineering desk reference, 1st edition. *Elsevier*, 2009.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. Biomaterials science an introduction to materials in medicine, 3rd edition. *Elsevier*, 2013.

REIS, F.H.S. Cerâmicas porosas à base de alumina incorporadas com biovidro. 2012. 139p. Tese (Doutorado em Ciências - Materiais Metálicos, Cerâmicos e Poliméricos) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, USP, Lorena, 2012.

RIBEIRO C. Processamento e caracterização de cerâmicas a base de hidroxiapatita e fosfato de cálcio. 2003. 112p. Dissertação (Mestre em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Autarquia associada à Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2003.

RIBEIRO, C.; BARROS, G.S.; BRESSANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. Avaliação das propriedades superficiais de cerâmicas biocompatíveis a base de fosfatos de cálcio. In: 58º Congresso Brasileiro de Cerâmica, Brasil, 2014.

RODRIGUES, P.L.; ALMEIDA, F.S.; MOTISUKE, M.; SOUZA, E. Efeito da adição de alumina nas propriedades físicas e mecânicas do β -fosfato tricálcico. *Cerâmica*, v.58, n.347, p.368-373, 2012.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, Á.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v.6, n.3, p.317-320, 2003.

ROSA, S.N. Avaliação da superfície modificada de brocas de metal duro revestidas pelo processo de deposição física de vapor. 2013. 175p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2013.

ROSSER, M.P.; XIA, W.; HARTSELL, S.; MCCAMAN, M.; ZHU, Y.; WANG, S.; HARVEY, S.; BRINGMANN, P.; COBB, R.R. Transient transfection of CHO-kl using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system. *Protein Expression and Purification*, v.40, n.2, p.237-243, 2005.

SANTOS, C.N. Estudo de cerâmicas de SiC e Al₂O₃ tratadas por expansor de plasma de nitrogênio, 2012. 120p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Guaratinguetá, 2012.

SANTOS, L.A.; CARRODÉGUAS, R.G.; ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; BOSCHI, A.O.; ARRUDA, A.C.F. α -Tricalcium phosphate cement: “*in vitro*” cytotoxicity. *Biomaterials*, v.23, n.9, p.2035-2042, 2002.

SANTOS, L.A. Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras par uso na área médico-odontológica. 2002. 274p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2002.

SARKAR, D.; MOHAPATRA, D.; RAY, S.; BHATTACHARYYA, S.; ADAK, S.; MITRA, N. Nanostructured Al₂O₃-ZrO₂ composite synthesized by sol-gel technique: powder processing and microstructure. *Journal of Materials Science*, v.42, n.5, p.1847-1855, 2007.

SARTORI, T.A.I.C. Biocerâmicas porosas de alumina e alumina-zircônia recobertas com fosfato de cálcio para implantes ósseos. 2015. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, USP, Pirassununga, 2015.

SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. *Journal Dentistry*, v.22, n.2, p.6-11, 1994.

SILVA, K.L. Obtenção de nanocompósitos de alumina- zircônia para aplicação como Biomaterial. 2011. 76p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2011.

SIOSHANSI, P.; TOBIN, E.J. Surface treatment of biomaterials by ion beam process. *Surface and Coatings Technology*, v.83, n.1-3, p.175-182, 1996.

SOUZA, A.P.O. Avaliação da associação de uma biocerâmica de fosfato de cálcio com células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano na bioengenharia do tecido ósseo. 2013. 58p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, 2013.

SOUZA, T.H.S. Projeto conceitual de implante bioativo com gradiente de estrutura funcional em poli (metacrilato de metila) e hidroxiapatita. Análises *in vitro* e *in vivo*. 2009. 152p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, 2009.

SOUZA, T.M.M. Produção de proteínas de interesse terapêutico em celular de mamíferos em cultura. 2006. 135p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, UNB, Brasília, 2006.

STEVENS, R. Engineering properties of zirconia and zirconia ceramics. In: An introduction to zirconia, magnesium elektron. *Magnesium Elektron Publication*, n.113. p.1-56, 1986.

UCHIDA, M.; KIM, H.M.; KOKUBO, T.; NAWA, M.; ASANO, T.; TANAKA, K.; NAKAMURA, T. Apatite-forming ability of a zirconia-alumina nanocomposite induced by chemical treatment. *Journal Biomedical Materials Research*, v.60, p.277-282, 2002.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal Royal Society Interface*, n.6, p.311-324, 2009.

TAVARES, C.J.M. Produção e caracterização de revestimentos nanoestruturados em multicamadas de TiAlN/Mo. 2002. 198p. Tese (Doutorado em Física) - Universidade do Minho, Portugal, 2002.

VALLESPÍR, G.P. Clavos de fijación externa recubiertos de hidroxiapatita. Estudio clínico en alargamientos de extremidades. 2001. 388p. Tese (Doutorado em Medicina e Cirurgia) - Universitat Autònoma de Barcelona, UAB, Departamento de cirurgia, Barcelona, 2001.

VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J.M. Calcium phosphate as substitution of bone tissues. *Progress in Solid state Chemistry*, v.32, p.1-31, 2004.

VALLET-REGÍ, M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *CRC Press*, n.13, p. 174-18, 2010.

VALLET-REGÍ, M, SALINAS, A.J. Bioactive ceramics: from bone grafts to tissue Engineering. *RSC Advances*, v.3, p.11.116-11.131, 2013.

VERCIK, L.C.; ASSIS, C.M.; FOOK, M.V.L.; SANTOS, M.L.; GUASTALDI, A.C. Recobrimento de apatitas “*in vitro*” sobre titânio - Influência do tratamento térmico. *Eclética Química*, v.28, n.1, p.25-31, 2003.

VIEIRA, J.O. Recobrimento biomimético de HA dopado com Ag sobre superfície de Tcip. 2013. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, 2013.

XIN, R.; LENG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Q. A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo. *Biomaterials*, n.26, p.6477-6486, 2005.

WELLS, A. F. Structural organic chemistry, 5th edition. *Oxford Science Publishing*, 1986.

WENNNENBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surface. *International Journal Oral Maxillofacial Implants*, v.15, n.3, p.331-344, 2000.

WENZEL, N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial and Engineering Chemistry*, v.28, p.988-994, 1936.

WILLIAMS, DAVID F. On the nature of biomaterial. *Biomaterials*, n.30, p.5897- 5909, 2009.

WONG, M.G.T.; LIM, G.T.; MOYSE, A.; REDDY, J.N.; SUE, H.J. A new test methodology for evaluating scratch resistance of polymers. *Wear*, v.256, p.1214-1227, 2004.

WU, W.; NANCOLLAS, G.H. Interfacial free energies and crystallizations in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.182, p.365-373, 1996.

YANG, C.W.; LUI, T.S.; CHEN, L.H. Hydrothermal crystallization effect on the improvement of erosion resistance and reliability of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *Thin Solid Films*, v.517, p.5380-5385, 2009.

ZENÓBIO, E. Biomateriais substitutos de osso: de onde viemos, onde estamos, para onde vamos. *Revista PerioNews*, v.5, n.4, p.344-50, 2011.

ZHANG, W.; GLASSER, F.P. The structure and decomposition of $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ZrO}_2$ gels. *Journal of European Society*, p.149-155, 1993.

ZIJLMANS, R. A.B.; GABRIEL, O.; WELZEL, S.; HEMPEL, F.; ROPCKE, J.; ENGELN, R.; SCHRAM, D.C. Molecule synthesis in an $\text{Ar-CH}_4\text{-O}_2\text{-N}_2$ microwave plasma. *Plasma Sources Science Technology*, v.15, n.3, p.564-573, 2006.

ZREIQAT, H.; RAMASWAMY, Y.; WU, C.; PASCHALIDIS, A.; LU, Z.; JAMES, B. ; BIRKE, O. ; MCDONALD, M. ; LITTLE, D.; DUNSTAN, C.R. The incorporation of strontium and zinc into a calcium–silicon ceramic for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v.31, p.3175-3184, 2010.