



**Inês João Goulão Dias**

Licenciada em Engenharia Biomédica – Ramo de Bioeletrónica

**Estudo da eficiência da deposição de carga superficial em  
revestimentos à base de hidroxiapatite**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

**Orientadora:** Doutora Maria do Carmo Lança, Professora Auxiliar da Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Co-orientador:** Doutor João Paulo Borges, Professor Auxiliar da Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Júri:**

**Presidente:** Doutora Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar da Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Vogal:** Doutora Maria do Carmo Lança, Professora Auxiliar da Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Arguente:** Doutor Rui Alberto Garção Barreira do Nascimento Igreja, Professor Auxiliar da Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia



**Estudo da eficiência da deposição de carga superficial em revestimentos à base de hidróxi-apatite.**

Copyright © Inês João Goulão Dias, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”*

***Fernando Pessoa***



## Agradecimentos

O trabalho de investigação científica é caracterizado por constantes dificuldades e obstáculos, acompanhado de pequenos sucessos. Sem a colaboração, incentivo e empenho de um conjunto de pessoas este trabalho não teria sido possível.

Em primeiro lugar, quero deixar os meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora, Professora Doutora Maria do Carmo Lança, e co-orientador, Professor Doutor João Paulo Borges, por me terem permitido trabalhar e apresentar o presente trabalho e pela constante dedicação e empenho que prestaram durante todo o percurso. Quero também deixar um agradecimento especial à minha orientadora por toda a preocupação, apoio e compreensão, que sempre mostrou, perante os meus problemas pessoais que surgiram paralelamente ao desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos Engenheiros Ana Oliveira e André Baião da Ceramed pelo apoio e orientação prestada num ambiente desconhecido, para a produção dos revestimentos, sem os quais este projeto não podia evoluir. Ao Professor Doutor Jorge Carvalho Silva, por toda a paciência, dedicação e incentivo que mostrou durante o trabalho de cultura celular. À Doutora Rita Branquinho e Doutora Daniela Gomes pela disponibilidade para realização das análises de caracterização das amostras e esclarecimentos adicionais.

O meu obrigado ao colega de laboratório e, agora, Engenheiro Erikson Ribeiro por toda a ajuda prestada com os equipamentos do laboratório e constante partilha de ideias e apoio. Desejo-lhe muito sucesso nesta nova fase da sua vida!

À minha melhor amiga, Catarina Sousa, um obrigado do fundo do coração por todos os momentos que vivemos juntas desde que embarcámos nesta aventura, apoio e palavras de conforto nos momentos mais difíceis. Para ela, a maior sorte do mundo na sua vida pessoal e profissional! Aos futuros engenheiros e amigos que levo no coração, Ruy Rodrigues, Sara Serrano e Bárbara Rodrigues.

Ao meu melhor amigo, Gonçalo Proença, pelo apoio, carinho e entusiasmo e, principalmente, por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, não há palavras que descrevam o que tem feito por mim.

Por último, o meu agradecimento vai para os meus pais porque me permitiram que chegasse até aqui e ser o que sou hoje. Às palavras sábias do meu avô Domingos, por sempre acreditar no meu trabalho.

O mais emocionado agradecimento vai para a minha mãe que nunca deixou de acreditar em mim e valorizar tanto o meu trabalho, por todo o amor que me deu e que só uma mãe sabe dar e por todo o apoio, que mesmo à distância, é indispensável. E, como o céu é o limite, um agradecimento ao meu irmão e avó por serem as estrelas que me guiam e que brilham nos momentos mais difíceis.



A implantologia destaca-se como o método moderno de reabilitação oral para pacientes edêntulos totais ou parciais. Para que este método se desenvolva adequadamente é necessário que o implante se osseointegre rapidamente ao tecido ósseo recetor, já que a integração óssea é a chave do sucesso clínico cirúrgico.

Este trabalho dedica-se ao estudo da deposição de carga superficial em diferentes revestimentos à base de hidroxiapatite (HAp), produzidos por *CoBlast<sup>TM</sup>*, por comparação com revestimentos de HAp produzidos por *Plasma Spray*, para que se aumente a osteointegração.

Foram revestidas placas de Ti-6Al-4V por *CoBlast<sup>TM</sup>* com 3 misturas HAp, HAp, 80%/20% (m/m) de HAp/ BaTiO<sub>3</sub> de nanopós de estrutura cúbica (mistura A) e micropós de estrutura tetragonal (mistura B) e, para comparação, revestimentos de HAp produzidos por *Plasma Spray*. Os revestimentos produziram-se na empresa Ceramed e, posteriormente, analisaram-se pelas técnicas de DRX, FTIR e SEM, para estudo, respetivamente, da composição estrutural, química e morfológica dos revestimentos. Efetuaram-se testes com polarização elétrica DC e por descarga de corona, ensaios de rugosidade, de citotoxicidade, de bioatividade, de adesão, proliferação, metabolismo e morfologia celular. Perante os resultados de citotoxicidade todos os materiais podem ser usados como revestimento. Para os ensaios de polarização também foram usadas amostras com revestimentos de 20%/80% e 35%/65% (m/m) de vidro bioativo (45S5)/HAp, produzidas anteriormente por *CoBlast<sup>TM</sup>*. Quanto aos ensaios de polarização por corona, todos os valores de potencial de superfície obtidos foram baixos e para a polarização por contacto obtém-se maior carga, tanto em campo elétrico aplicado positivo como negativo, sendo os valores mais elevados para revestimentos por *Plasma Spray*. Para amostras sem polarização e, comparativamente com amostras sem revestimento, os revestimentos produzidos por *Plasma Spray* mostram ser os mais bioativos e os menos biocompatíveis, enquanto os revestimentos com a mistura A e B são os mais biocompatíveis.

**Palavras-chave:** *CoBlast<sup>TM</sup>*; *Plasma Spray*; hidroxiapatite; Ti-6Al-4V; Polarização elétrica DC; Descarga de Corona.

---



# Abstract

---

Implantology stands out as the modern method for oral rehabilitation for full or partial edentulous patients. For this method to properly develop, we need the implant to quickly osseointegrate with the receptor bone tissue as bone integration is key for the success of clinical surgery.

This thesis is dedicated to the study of the deposition of superficial charge in different coatings based on hydroxyapatite (HAp), produced by *CoBlast<sup>TM</sup>*, in comparison with coatings of HAp produced by *Plasma Spray*, viewing longer osseointegration.

Ti-6Al-4V plates were coated with *CoBlast<sup>TM</sup>* with 3 mixtures HAp, HAp 80%/20% (m/m) of HAp/BaTiO<sub>3</sub> of nanopowders of cubic structure (mixture A) and micropowders of tetragonal structure (mixture B) and for comparative purposes, HAp coatings produced by *Plasma Spray*. The coatings were produced at the Company Ceramed, and were afterwards analyzed using the DRX, FTIR and SEM techniques to study the structural, chemical and morphologic composition of the coatings. Trials were conducted using DC electric polarization and corona discharge, being tested the roughness, cytotoxicity, bioactivity, adherence, proliferation, metabolism and cellular morphology. Cytotoxicity tests evidence that all materials may be used for coating. For the polarization trials with corona we also used samples of 20%/80% and 35%/65% (m/m) of bioactive glass (45S5)/Hap, previously produced by *CoBlast<sup>TM</sup>*. Regarding the trial with corona, all the values of surface potential were low, being obtained a higher charge when using polarization by contact, both in positive and negative electrical field, with higher results for *plasma spray* coatings. For samples without polarization and by comparison with samples without coating, the coatings produced with *plasma spray* were the most bioactive, and the least biocompatible, whilst the coatings with mixture A and B were the most biocompatible.

**Keywords:** *CoBlast<sup>TM</sup>*; *Plasma Spray*; -Hydroxyapatite; Ti-6Al-4V; DC electrical polarization; Corona discharge.

---



# Índice

<b>Índice de Figuras</b> .....	xvii
<b>Índice de Tabelas</b> .....	xxi
<b>Lista de siglas, símbolos e acrónimos</b> .....	xxiii
<b>Enquadramento, objetivos e estrutura da dissertação</b> .....	xxv
<b>1. Introdução geral</b> .....	<b>1</b>
1.1. Osso .....	1
1.2. Biomaterial .....	1
1.2.1. Liga de titânio – Ti-6Al-4V .....	2
1.2.2. Hidroxiapatite – Material biocerâmico.....	3
1.2.3. Titanato de bário – Material cerâmico piezoelétrico .....	5
1.2.4. Biovidro 45S5.....	6
1.2.5. Efeito piezoelétrico.....	7
1.3. Precipitação de cristais apatíticos na superfície dos revestimentos, imersos em soluções simuladoras do fluido corporal .....	8
1.4. Biocompatibilidade - Ensaios de cultura celular .....	8
<b>2. Técnicas de produção de revestimentos</b> .....	<b>11</b>
2.1. <i>Plasma Spray</i> .....	11
2.2. <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> .....	12
2.3. Comparação entre técnicas: <i>Plasma Spray</i> e <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> .....	13
<b>3. Técnicas de caracterização das amostras</b> .....	<b>15</b>
3.1. Técnicas de caracterização físico-química e estrutural.....	15
3.1.1. Espectrometria de Fluorescência de Raios-X (XRF) .....	15
3.1.2. Difração de Raios-X (DRX).....	15
3.1.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	16

3.2. Técnicas de caracterização morfológica .....	16
3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM).....	16
3.2.2. Avaliação da rugosidade.....	17
3.3. Técnicas de caracterização elétrica.....	18
3.3.1. Correntes de Descarga Termicamente Estimuladas (TSDC) .....	18
3.3.2. Potencial de superfície por descarga de corona.....	19
<b>4. Materiais e Métodos.....</b>	<b>21</b>
4.1. Materiais .....	21
4.2. Métodos .....	21
4.2.1. Produção de revestimentos .....	21
4.2.2. Caracterização das amostras.....	25
4.2.3. Ensaios de citotoxicidade .....	28
4.2.4. Ensaios de bioatividade .....	29
4.2.5. Cultura celular .....	30
<b>5. Análise e Discussão de resultados .....</b>	<b>35</b>
5.1. Caracterização química de Ti-6Al-4V .....	35
5.1.1. XRF .....	35
5.2. Caracterização estrutural e morfológica das amostras antes e após revestimento .....	35
5.2.1. DRX .....	35
5.2.2. FTIR .....	46
5.2.3. SEM/EDS .....	49
5.3. Polarização por descarga de corona.....	58
5.4. TSDC .....	63
5.5. Rugosidade .....	70
5.6. Ensaios de citotoxicidade .....	73
5.7. Ensaios de bioatividade .....	74
5.8. Adesão e proliferação celular .....	87

5.9. Metabolismo celular .....	90
5.10. Morfologia celular .....	94
<b>6. Conclusões e perspectivas futuras .....</b>	<b>101</b>
6.1. Conclusões .....	101
6.2. Perspetivas futuras .....	103
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>105</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>111</b>
8.1. Anexo 1 - Protocolo para preparação da solução de SBF.....	111



# Índice de Figuras

Figura 1.1: Estrutura molecular da hidroxiapatite: célula unitária (a) e ao longo do eixo c (b) [12]. ....	4
Figura 1.2: Representação esquemática do BaTiO <sub>3</sub> na sua fase cúbica acima da temperatura de <i>Curie</i> e na forma tetragonal abaixo da temperatura de <i>Curie</i> [16]......	6
Figura 2.1: Esquema representativo do processo de Plasma <i>Spray</i> . (Adapt. [27]) .....	12
Figura 2.2: Esquema representativo do processo <i>single-nozzle</i> de <i>CoBlast</i> <sup>TM</sup> . (Adapt. [29]) .....	13
Figura 3.1: Representação do procedimento para aquisição de um espectro por TSDC [13]......	18
Figura 4.1: Suportes das placas de Ti-6Al-4V: a) Técnica <i>CoBlast</i> <sup>TM</sup> e b) Técnica <i>Plasma Spray</i> . ....	22
Figura 4.2: Equipamento utilizado no processo de revestimento por <i>Plasma Spray</i> . .....	23
Figura 4.3: Equipamento utilizado no processo de revestimento por <i>CoBlast</i> <sup>TM</sup> . .....	24
Figura 4.4: Representação esquemática do sistema de descarga de corona, com os diferentes componentes e equipamentos. ....	28
Figura 5.1: Difractograma obtido por DRX da amostra de Liga de Titânio (Ti-6Al-4V) sem revestimento. ....	36
Figura 5.2: Difractograma obtido por DRX da amostra com substrato revestido de HAp, pela técnica de <i>Plasma Spray</i> . ....	37
Figura 5.3: Difractograma obtido por DRX da amostra com substrato revestido de HAp, pela técnica de <i>CoBlast</i> <sup>TM</sup> . ....	37
Figura 5.4: Sobreposição dos difractogramas da liga de Titânio sem revestimento, do pó de HAp e da amostra com revestimento de HAp produzida por <i>Plasma Spray</i> (figura 5.2). ....	38
Figura 5.5: Sobreposição dos difractogramas da liga de Titânio sem revestimento, do pó de HAp e Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> e da amostra com revestimento de HAp produzida por <i>CoBlast</i> <sup>TM</sup> (figura 5.3). ....	39
Figura 5.6: Difractograma obtido por DRX da amostra revestida com a mistura A, pela técnica de <i>CoBlast</i> <sup>TM</sup> . ....	41
Figura 5.7: Difractograma obtido por DRX da amostra revestida com a mistura B, pela técnica de <i>CoBlast</i> <sup>TM</sup> . ....	42
Figura 5.8: Sobreposição dos difractogramas da liga de Titânio sem revestimento, do pó de HAp, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , BaTiO <sub>3</sub> e da amostra revestida com a mistura A (figura 5.6). ....	43
Figura 5.9: Sobreposição dos difractogramas da liga de Titânio sem revestimento, do pó de HAp, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , BaTiO <sub>3</sub> e da amostra revestida com a mistura B (figura 5.7). ....	44

Figura 5.10: Espectro de FTIR obtido para a amostra com revestimento de HAp, por <i>Plasma Spray</i> , com ampliação do espectro nas zonas de interesse (A) e (B).....	46
Figura 5.11: Espectro de FTIR obtido para a amostra com revestimento de HAp, por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , com ampliação do espectro na zona de interesse (A).....	47
Figura 5.12: Espectro de FTIR obtido para a amostra revestida com a mistura A, por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , com ampliação do espectro na zona de interesse (A).....	48
Figura 5.13: Espectro de FTIR obtido para a amostra revestida com a mistura B, por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , com ampliação do espectro na zona de interesse (A).....	49
Figura 5.14: Imagens de SEM obtidas para as amostras sem revestimento, com diferentes ampliações: A) 300X e B)1000x. ....	50
Figura 5.15: Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas de HAp, pela técnica de <i>Plasma Spray</i> , com diferentes ampliações. ....	51
Figura 5.16: Espectros de EDS de duas zonas distintas da superfície, assinaladas na imagem D da figura 5.15. ....	51
Figura 5.17: Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas de HAp, pela técnica de <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , com diferentes ampliações. ....	53
Figura 5.18: Espectros de EDS resultantes da análise a zonas distintas da amostra. ....	54
Figura 5.19: Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas com a mistura A, pela técnica de <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> . ....	55
Figura 5.20: Espectros de EDS de duas zonas distintas da superfície. ....	55
Figura 5.21: Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas com a mistura B, pela técnica de <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , com diferentes ampliações. ....	57
Figura 5.22: Espectros de EDS resultantes da análise a zonas distintas da amostra. ....	58
Figura 5.23: Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras com revestimento de HAp por <i>Plasma Spray</i> . ....	64
Figura 5.24: Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras com revestimento de HAp por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> . ....	65
Figura 5.25: Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras revestidas com 80%/20% (m/m) de HAp/BG por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> . ....	66
Figura 5.26: Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras revestidas com 65%/35% (m/m) de HAp/BG por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> . ....	67
Figura 5.27: Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras revestidas com a mistura A por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> . ....	68
Figura 5.28: Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras revestidas com a mistura B por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> . ....	69
Figura 5.29: Imagens da topografia superficial das amostras com e sem revestimento. ....	71

Figura 5.30: Imagens de SEM obtidas para as amostras de Ti-6Al-4V sem revestimento, com diferentes ampliações, imersas em SBF. ....	75
Figura 5.31: Imagem de SEM da superfície do substrato sem revestimento imerso 7 dias em SBF e os respectivos espectros EDS. ....	76
Figura 5.32: Imagens de SEM, com diferentes ampliações, obtidas para as amostras revestidas com HAp pela técnica de <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , imersas em SBF. ....	77
Figura 5.33: Imagens de SEM da amostra com revestimento de HAp, produzido por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , imersa 36 horas em SBF e os respectivos espectros EDS ....	78
Figura 5.34: Imagens de SEM, com diferentes ampliações, obtidas para as amostras revestidas com HAp pela técnica de <i>Plasma Spray</i> , imersas em SBF. ....	79
Figura 5.35: Imagens de SEM do revestimento de HAp, produzido por <i>Plasma Spray</i> , imerso 36 horas em SBF e os respectivos espectros EDS. ....	80
Figura 5.36: Imagens de SEM, com diferentes ampliações, obtidas para as amostras revestidas com a mistura A (80% de HAp e 20% de BaTiO <sub>3</sub> estrutura cúbica) pela técnica de <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , imersas em SBF. ....	81
Figura 5.37: Imagens de SEM do revestimento A, produzido por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , imerso 36 horas em SBF e os respectivos espectros EDS. ....	82
Figura 5.38: Imagens de SEM, com diferentes ampliações, obtidas para as amostras revestidas com a mistura B (80% de HAp e 20% de BaTiO <sub>3</sub> estrutura tetragonal) pela técnica de <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , imersas em SBF. ....	84
Figura 5.39: Imagens de SEM do revestimento B, produzido por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> , imerso 36h, 3d e 7d em SBF e os respectivos espectros EDS. ....	85
Figura 5.40: Imagem de SEM da amostra com revestimento de HAp, por <i>Plasma Spray</i> , com ampliação de 20000x e ao fim de 7d de imersão em SBF. ....	87
Figura 5.41: Representação gráfica dos valores populacionais celulares incluindo o respetivo controlo de células, para todos os tipos de amostras e durante os 5 dias de ensaios de proliferação. ....	89
Figura 5.42: Amostras com e sem marcação ALP: A) Ti-6Al-4V; B) <i>Plasma Spray</i> : HAp; C) <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> : HAp; D) <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> : mistura A e E) <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> : mistura B. ....	91
Figura 5.43: Imagens do substrato de Ti-6Al-4V: sem marcação ALP (A) e com marcação ALP (B). ....	91
Figura 5.44: Imagens do revestimento de HAp produzido por <i>Plasma Spray</i> : sem marcação ALP (A) e com marcação ALP (B). ....	92
Figura 5.45: Imagens do revestimento de HAp produzido por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> : sem marcação ALP (A) e com marcação ALP (B). ....	92
Figura 5.46: Imagens do revestimento com a mistura A (20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO <sub>3</sub> de estrutura cúbica), produzido por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> : sem marcação ALP (A) e com marcação ALP (B). ....	92
Figura 5.47: Imagens do revestimento com a mistura B (20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO <sub>3</sub> de estrutura tetragonal), produzido por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> : sem marcação ALP (A) e com marcação ALP (B). ....	93



# Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Concentrações iônicas, em mM, da solução SBF e do plasma sanguíneo humano [Adapt. de [22]].....	8
Tabela 4.1: Lista de reagentes utilizados na produção de 1L de solução SBF [22]. .....	30
Tabela 5.1: Medidas de potencial de superfície com tempo e temperatura de polarização variáveis, para as amostras com revestimento de HAp, produzidas por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> . .....	59
Tabela 5.2: Medidas de potencial de superfície com tempo e temperatura de polarização variáveis, para as amostras com revestimento de HAp, produzidas por <i>Plasma Spray</i> .....	60
Tabela 5.3: Medidas de potencial de superfície para as amostras revestidas com BG e HAp, produzidas por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> . .....	61
Tabela 5.4: Medidas de potencial de superfície com tempo e temperatura de polarização variáveis, para as amostras revestidas com 80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO <sub>3</sub> de estrutura cúbica, produzidas por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> . .....	61
Tabela 5.5: Medidas de potencial de superfície com tempo e temperatura de polarização variáveis, para as amostras revestidas com 80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO <sub>3</sub> de estrutura tetragonal, produzidas por <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> . .....	62
Tabela 5.6: Valores de densidade de carga total, em C/m <sup>2</sup> , obtidos para cada um dos ensaios em todos os tipos de revestimento. ....	69
Tabela 5.7: Medidas de rugosidade média (WSq) das amostras com e sem revestimento. ....	72
Tabela 5.8: Resultados dos ensaios de citotoxicidade das amostras com e sem revestimento.....	73
Tabela 5.9: População de células que aderiu à superfície das 5 amostras analisadas e respectivas incertezas padrão combinada.....	88
Tabela 5.10: Valores de população de células que proliferaram em cada amostra, ao longo dos 4 dias de ensaios e respectivas incertezas padrão combinada. ....	89
Tabela 5.11: Imagens de cada um dos canais que formaram a imagem RGB, para amostras com e sem revestimento, com marcação do anticorpo primário, secundário e DAPI. ....	95
Tabela 5.12: Imagens RGB da morfologia das células para a superfície de todos os tipos de amostras: A)Ti-6Al-4V; B) <i>Plasma Spray</i> : HAp; C) <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> : HAp; D) <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> : 20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO <sub>3</sub> estrutura cúbica e E) <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> : 20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO <sub>3</sub> estrutura tetragonal. 96	
Tabela 5.13: Imagens de cada um dos canais que formaram a imagem RGB, para amostras com e sem revestimento, com marcação do anticorpo secundário e DAPI.....	98
Tabela 5.14: Imagens RGB da morfologia das células, sem marcação do anticorpo primário, para a superfície de todos os tipos de amostras: A)Ti-6Al-4V; B) <i>Plasma Spray</i> : HAp; C) <i>CoBlast<sup>TM</sup></i> : HAp;	

D)*CoBlast*<sup>TM</sup>: 20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> estrutura cúbica e E)*CoBlast*<sup>TM</sup>: 20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> estrutura tetragonal. .... 99

## Lista de siglas, símbolos e acrónimos

ACP: Fosfato de Cálcio Amorfo	T <sub>c</sub> : Temperatura de <i>Curie</i>
ALP: <i>Alkaline Phosphatase</i>	E <sub>p</sub> : Campo elétrico de polarização
BG: <i>Bioglass 45S5</i> – Biovidro 45S5	t <sub>p</sub> : Tempo de polarização
BSA: Albumina do Soro Bovino	T <sub>p</sub> : Temperatura de polarização
CaP: Fosfato de Cálcio	β: Taxa de aquecimento
CB: <i>CoBlast™</i>	V <sub>c</sub> : Tensão de descarga de corona
DC: <i>Direct Current</i> – Corrente Contínua	V <sub>g</sub> : Tensão na rede metálica
DRX: <i>X-ray Diffraction</i>	C-: Controlo negativo
EDS: <i>Energy Dispersive X-Ray</i>	C+: Controlo positivo
FBS: <i>Fetal Bovine Serum</i>	<i>j</i> : densidade de corrente
FTIR: <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>	Q: Carga
HAp: Hidroxiapatite	CC: Controlo de células
JCPDS: <i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>	I <sub>d</sub> : Corrente de despolarização
OCP: Fosfato Octacálcico	<i>n</i> : Ordem de difracção
PBS: <i>Phosphate Buffer Solution</i>	λ: Comprimento de onda de raios-X
Pol-: Polarização negativa	<i>d</i> : Distância entre os planos cristalográficos
Pol+: Polarização positiva	θ: Ângulo que o raio incidente faz com os planos de reflexão
SBF: <i>Simulated Body Fluid</i>	t <sub>0</sub> : Tempo de espera desde a remoção do campo elétrico e o início de TSDC.

SEM: *Scanning Electron Microscope*

sTT: Amostra virgem

TT: Tratamento Térmico

TeCP: Fosfato Tetracálcico

TCP: Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ ,  $\beta$ )

TSDC: *Thermally Stimulated Discharge Current*

XRF: *X-ray Fluorescence*

Wsq: *Root Mean Square Deviation*

WSsk: *Skewness*

WSsu: *Kurtosis*

FCT/UNL: Faculdade de Ciências e Tecnologias  
da Universidade Nova de Lisboa

cdo: Comprimento de onda

# Enquadramento, objetivos e estrutura da dissertação

Em 1952, Per-Ingvar Brånemark descobre a osteointegração após a tentativa de tirar uma peça de titânio colocada numa tíbia. A partir desse ano, muitos foram os estudos focados nessa área e o conceito de osteointegração abriu uma nova era no tratamento clínico. Visando acelerar o processo de osteointegração de implantes e de modo a melhorar a conexão estrutural e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante, testam-se novos revestimentos e novas técnicas para a sua produção.

Nas últimas décadas com o envelhecimento da população e avanços científicos da Medicina Dentária, tem-se recorrido cada vez mais a implantes dentários e, actualmente, a implantologia é considerada o melhor tratamento reabilitador [1]. Assim, a fixação do implante depende de vários fatores, sendo um deles a topografia da superfície, que requer propriedades importantes durante a fase de regeneração do osso. O grande desafio é produzir a superfície dos implantes, uma vez que a adesão, crescimento e diferenciação de osteoblastos dependem da energia e rugosidade da mesma.

Materiais para implantes são chamados de biomateriais, devido ao fato de serem introduzidos em meio biológico (adaptando-se à função desejada e não causando reacções adversas) [2]. O titânio comercialmente puro e algumas das suas ligas são materiais que, pela sua excelente biocompatibilidade, propriedades ferromagnéticas e de elasticidade, são muito utilizados na fabricação de implantes dentários e ortopédicos. A hidroxiapatite (HAp) é a mais usada no revestimento de implantes ósseos devido à sua biocompatibilidade, bioactividade e semelhança com a fase mineral do osso. Recentemente, investigações demonstraram que polarizando a HAp sintética, criando uma carga superficial permanente, é possível melhorar a proliferação celular e a resposta das células envolventes ao material, permitindo um aumento na integração e cicatrização do implante [3]. O titanato de bário ( $\text{BaTiO}_3$ ) é também um biomaterial piezoelétrico que possui polarização espontânea e elevado valor de constante piezoelétrica pelo que pode ajudar na criação da carga eléctrica superficial no implante. Os biovidros apresentam capacidades de osteointegração, anti-microbianas e anti-inflamatórias

A técnica mais recente de produção de revestimentos é a de *CoBlast<sup>TM</sup>* que permite obter filmes à temperatura ambiente. Ao aliar esta técnica com a deposição de carga superficial em revestimentos de implantes ósseos é possível melhorar o comportamento dos mesmos no que respeita à sua integração óssea.

Tendo em conta que, até à data, nenhum estudo de propriedades eléctricas de revestimentos produzidos por *CoBlast<sup>TM</sup>* se realizou, foi objetivo principal deste trabalho fazer um estudo da deposição

de carga superficial em diferentes revestimentos à base de HAp, produzidos por *CoBlast<sup>TM</sup>* e depositados sob substratos da liga de Ti-6Al-4V, por comparação com revestimentos de HAp produzidos por *Plasma Spray*.

O presente trabalho é resultado de investigação no Departamento de Ciência dos Materiais e de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL), no CENIMAT/I3N e na empresa CERAMED. Encontra-se estruturado em oito capítulos, apresentando o 1º capítulo uma introdução geral de modo a proporcionar uma melhor compreensão dos conceitos associados a este tema e o 2º e 3º capítulos uma breve descrição dos princípios físicos associados às técnicas de produção de revestimentos e caracterização das amostras, respetivamente. No 4º capítulo, por sua vez, encontram-se enunciados os materiais e métodos utilizados para este trabalho. Durante o 5º capítulo apresentam-se, analisam-se e discutem-se os principais resultados obtidos e, por fim, revelam-se as conclusões mais relevantes, perspectivando-se algumas futuras importantes investigações na área.

# 1. Introdução geral

## 1.1. Osso

O osso é um tipo de tecido conjuntivo complexo, altamente especializado e organizado, constituído por células ósseas e por uma matriz extracelular mineralizada (hidroxiapatite natural) [4]. Morfologicamente o osso classifica-se como cortical, ou compacto, e trabecular, ou esponjoso. O osso cortical constitui cerca de 90% da massa óssea total, caracteriza-se por ter uma baixa porosidade e localiza-se na região exterior do osso. O osso trabecular localiza-se na região interna do osso e contém medula óssea nos seus poros [4].

As funções do osso são o suporte muscular, a produção de células sanguíneas e imunitárias e funciona como um reservatório mineral, de modo a manter o equilíbrio de eletrólitos no corpo [4].

O tecido ósseo é constituído por três tipos de células, que interatuam para permitir a remodelação óssea, os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos. Os osteoblastos são as células usadas nos testes de biocompatibilidade, são células com alguma polaridade, localizadas na superfície do osso, que atuam durante o desenvolvimento ou reparação óssea. A sua função principal é a formação e organização da matriz extracelular óssea e, conseqüentemente, a sua mineralização. Os osteoclastos são células que derivam do sistema hematopoético e que fazem a reabsorção da matriz óssea e os osteócitos derivam de células mesenquimatosas, os osteoblastos, que se fixam, de forma latente, nas lacunas da matriz extracelular após atingirem a maturidade [4].

## 1.2. Biomaterial

Desde a pré-história que o corpo humano tolera implantes, no entanto, de forma não propositada. Assim, a aplicação dos biomateriais, como se conhece atualmente, iniciou-se no início da década de 1960 e, a partir daí, várias melhorias foram registadas em áreas como a Medicina, Odontologia e Biomédica [5].

Por definição, considera-se que um biomaterial corresponde a qualquer tipo de material ou combinação de materiais, de origem natural ou sintética, que não sejam drogas ou fármacos, destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qual-

quer tecido, órgão ou função do organismo [6]. Podem, também, associar-se a implantes temporários ou permanentes de dispositivos médicos no corpo humano, que se diferenciam pelas suas propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas [7]. No entanto, a aplicação de biomateriais deve salvaguardar a manutenção das suas propriedades e características estruturais enquanto, simultaneamente, substitui a função para a qual foi criado. Deve possuir resistência mecânica adequada, ser esterilizável, permitir uma boa adesão celular à sua superfície e não apresentar características oncogénicas [6].

As respostas biológicas do organismo dependem do tipo de materiais utilizados nos diversos implantes, já que se podem classificar em bioabsorvíveis, bioinertes, biotoleráveis e bioativos [8]. Os materiais bioabsorvíveis degradam-se quando inseridos no corpo humano; os bioinertes não formam ligações bioquímicas interfaciais com os tecidos em contacto, o que não suscita resposta local com o sistema imunológico, como o caso da alumina, do carbono, da zircónia e do titânio; os biotoleráveis são suportados pelo organismo, provocando uma resposta mínima, é o caso dos aços inoxidáveis e, por fim, os materiais bioativos que originam uma resposta biológica específica que se traduz numa interação química entre a superfície do implante e o tecido. São exemplos de materiais bioativos a HAp e os biovidros [8], [9].

O objetivo da engenharia é possibilitar a integração entre o implante/prótese e o tecido ósseo, para que ocorra uma funcionalidade conjunta de ambos os sistemas. Portanto, de forma a criar novos materiais e alcançar propriedades superficiais que não se verificam naturalmente, criaram-se os revestimentos. O biovidro e a HAp são as duas cerâmicas bioativas mais utilizadas em implantes para reparação de tecidos duros e associam-se em várias aplicações clínicas, incluindo implantes dentários, reconstrução ossicular em cirurgia otorrinolaringológica, restauração óssea em cirurgia maxilofacial e próteses de vertebrae em cirurgias espinhais [10].

As experiências com os novos materiais são normalmente efetuadas *in vitro* e correspondem à reprodução, em laboratório, das condições do ambiente biológico o mais idênticas possível à realidade, para que se compreendam os resultados da interação do organismo com o material, colocando maior ênfase na interface tecido-meio [7].

Nos revestimentos, o filme fino corresponde ao componente que é depositado sobre um outro, designado por substrato.

### **1.2.1. Liga de titânio – Ti-6Al-4V**

O titânio possui uma elevada resistência mecânica, isto é, elevada resistência à corrosão aliada a uma resposta biológica favorável, tornando-se, atualmente, o metal mais usado como

biomaterial em aplicações biomédicas, assim como a liga de titânio (Ti), alumínio (Al) e vanádio (V) (Ti-6Al-4V) [8].

O substrato usado neste estudo foi a liga Ti-6Al-4V devido às suas excelentes propriedades mecânicas. Esta característica deve-se à formação de duas fases,  $\alpha$  e  $\beta$ , à temperatura ambiente, ao contrário do que ocorre com o titânio comercialmente puro. A melhoria das propriedades é devida ao facto do Al ser um estabilizador da fase alfa, aumentando a resistência e diminuindo o peso da liga, e o V um estabilizador da fase beta [11].

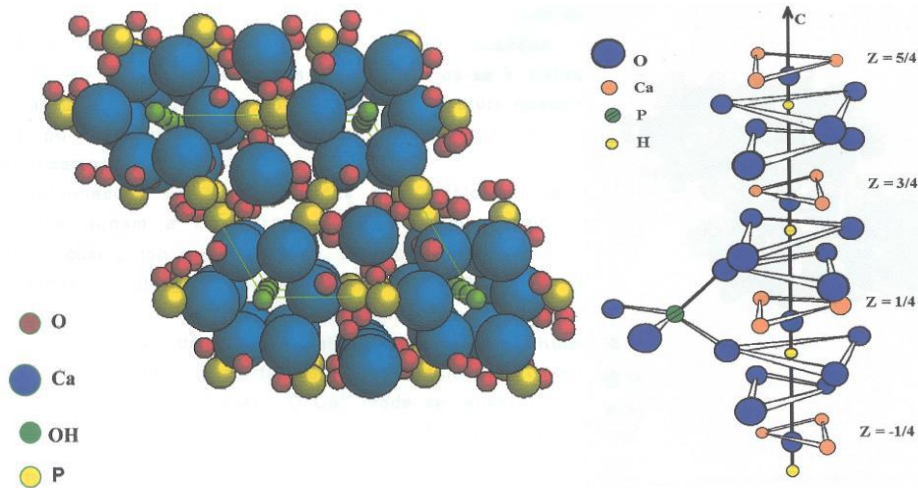
A concentração de Al e V é relativamente pequena para a liga em estudo mas as mudanças são consideráveis. Apresenta o dobro da resistência à tração e dureza, melhorias do limite de escoamento, dureza, microestrutura, padrão de fratura e alongamento. Contudo, o módulo de elasticidade permanece quase inalterado em relação ao titânio comercialmente puro [11]. Estas características fazem da Ti-6Al-4V, a liga  $\alpha$  e  $\beta$  mais investigada atualmente, que é também a mais indicada para a produção de dispositivos protéticos onde é necessária alta resistência, em substituição ao titânio comercialmente puro [11].

### **1.2.2. Hidroxiapatite – Material biocerâmico**

Os materiais biocerâmicos são cerâmicos biocompatíveis, pelo facto de conterem iões coincidentes com os existentes no meio fisiológico e por conterem iões com toxicidade limitada para os tecidos. Estes materiais caracterizam-se como compostos policristalinos refratários, que podem conter compostos metálicos, como é o caso dos fosfatos de cálcio [4].

Um dos biocerâmicos usados, neste trabalho, é a hidroxiapatite. A sua composição química representa 30-70% da massa dos ossos e dentes, o que concede um alto grau de biocompatibilidade e rigidez aos biocerâmicos à base de cálcio [8], [12]. Assim, a hidroxiapatite sintética é um fosfato de cálcio utilizado em implantes para substituição do osso, porque é um material biocompatível e bioativo, além de possuir elevada probabilidade de ser biodegradável e osteointegrável [12].

A sua composição molecular é representada por  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , o coeficiente Ca/P é de 1,67 e a estrutura da molécula está representada na figura 1.1, onde os iões fosfato e iões hidróxido rodeiam os iões de cálcio [8], [9], [12]. A estrutura cristalina é hexagonal por ser a mais estável a nível termodinâmico entre os vários tipos de fosfato de cálcio e apresenta como parâmetros de rede  $a=b=9,4210\text{Å}$  e  $c=6,8970\text{Å}$  [9].



**Figura 1.1: Estrutura molecular da hidroxiapatite: célula unitária (a) e ao longo do eixo c (b) [12].**

Existem vários fatores que condicionam o comportamento da molécula in vivo, são eles o coeficiente Ca/P, a estrutura cristalográfica, cristalinidade, porosidade e o ambiente fisiológico [12]. Alguns desequilíbrios na relação Ca/P podem conduzir a estágios diferentes que afetam o comportamento entre o implante e o tecido biológico, se a relação for menor que 1,67 pode aparecer o alfa ou beta-fosfato tricálcico, se for maior, o óxido de cálcio pode apresentar-se em conjunto com HAp [9]. Ainda assim, não é invulgar existir HAp não estequiométricas porque a natureza física deste material permite a alteração da sua estrutura [12].

A HAp quando sintetizada a altas temperaturas apresenta boa cristalinidade e cristais grandes, que está inerente a reabsorção mais lenta e, conseqüentemente, uma osteointegração mais lenta. A baixas temperaturas continua a verificar-se uma boa cristalinidade, no entanto, os cristais apresentam um tamanho inferior, logo a reabsorção é mais rápida, o que evita uma resposta inflamatória considerável. É através da sintetização a baixa temperatura que se obtém a HAp com propriedades semelhantes às do tecido ósseo [12].

O estudo da piezoelectricidade na HAp permite entender a sua bioatividade. Um material exhibe efeito piezoelétrico quando sujeito a uma força mecânica e este fenómeno observa-se em materiais cristalinos que não possuem centro de simetria (para a inversão) [13].

Existem muitas vantagens no uso deste material em implantes, entre as quais: alta atividade e biocompatibilidade com tecidos moles e duros, baixa degradação, rapidez na adesão osso/implante, boa osteocondutividade (uma vez que os osteoblastos são capazes de se ligar, crescer e diferenciar), bioatividade (levando ao crescimento ósseo e à osteointegração), não tóxico, características mecânicas semelhantes às do tecido ósseo, adsorção de biomoléculas, resistência à compressão, rigidez, condução mínima de calor e alta resistência ao desgaste [8], [10], [12].

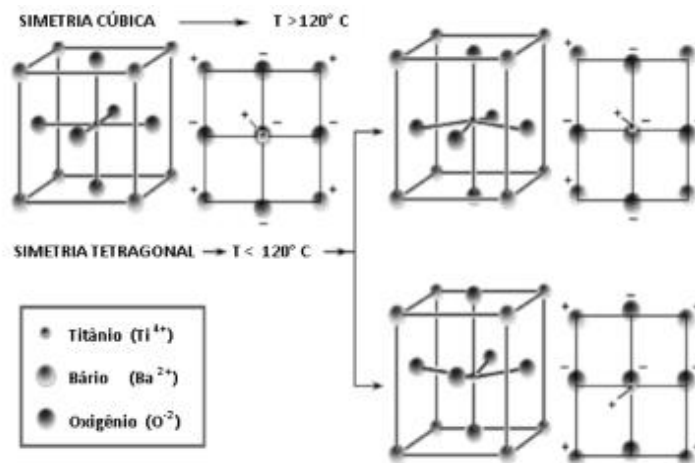
A utilização de materiais biocerâmicos para revestimento de metais e/ou das suas ligas tem aumentado muito nos últimos anos, já que através da combinação de ambas as características é possível obter um bom revestimento, isto é, com altas propriedades mecânicas e de osteointegração [12].

### **1.2.3. Titanato de bário – Material cerâmico piezoelétrico**

Os materiais cerâmicos piezoelétricos para efeitos de implantação óssea, têm-se focado essencialmente em materiais que possuem titanato de bário ( $\text{BaTiO}_3$ ) na sua constituição. Conhecido como um cerâmico ferroelétrico a temperaturas inferiores a  $120^\circ\text{C}$ , os seus iões orientam-se em conformidade com um campo elétrico externo suficientemente forte que lhe seja aplicado, permanecendo estes alinhados consoante o seu sinal de carga após a remoção do mesmo [14].

Os óxidos metálicos do tipo perovskita, com estrutura  $\text{ABO}_3$ , possuem estrutura cúbica de face centrada definida pelos iões  $\text{A}^{2+}$  e  $\text{O}^{2-}$ . O átomo B ocupa o centro do interstício octaédrico definido pelos iões óxido [15].

Quando A possui um grande raio iónico, como é o caso do bário, os óxidos apresentam propriedades ferroelétricas devido ao grande momento de dipolo elétrico da estrutura [15]. A forma ferroelétrica (tetragonal), de interesse para aplicações, é estável entre  $5$  e  $120^\circ\text{C}$ . Acima de  $120^\circ\text{C}$ , temperatura de *Curie* ( $T_c$ ), as vibrações da rede na estrutura  $\text{BaTiO}_3$ , promovem o deslocamento aleatório do ião  $\text{Ti}^{4+}$  em torno da sua posição central, que não resulta em assimetria ou polarização. Esse comportamento caracteriza a estrutura cúbica, que é paraelétrica e não apresenta um dipolo elétrico, pelo que não é ferroelétrica nem piezoelétrica. Contudo, abaixo de  $120^\circ\text{C}$ , o ião  $\text{Ti}^{4+}$  e o arranjo octaédrico de iões  $\text{O}^{2-}$  deslocam-se assimetricamente, associado a uma polarização espontânea que causa uma concentração de cargas positivas/negativas em posições opostas do cristal, formando-se um dipolo elétrico. Neste tipo de estrutura, o ião central  $\text{Ti}^{4+}$  pode encontrar-se em duas posições distintas, sem que nenhuma delas seja o centro da célula unitária, o que faz com que os centroides de cargas positivas não coincidam com o das cargas negativas, como se mostra na figura 1.2 [14]–[16].



**Figura 1.2: Representação esquemática do BaTiO<sub>3</sub> na sua fase cúbica acima da temperatura de Curie e na forma tetragonal abaixo da temperatura de Curie [16].**

O BaTiO<sub>3</sub> também possui propriedades piezoelétricas, ou seja, é capaz de desenvolver uma diferença de potencial quando submetido a tensões de compressão ou expansão. Além da dependência com a temperatura, campo elétrico e tensão mecânica, as suas propriedades elétricas também dependem do tamanho de partícula. A diminuição da constante dielétrica e a inesperada estabilização da fase paraelétrica, à temperatura ambiente, em pequenas partículas é conhecida como efeito de tamanho [17].

Os nanopós de BaTiO<sub>3</sub> de estrutura cúbica que foram utilizados neste trabalho apresentam sempre estrutura cúbica e não possuem momento dipolar, enquanto os micropós de estrutura tetragonal formam um dipolo elétrico. Os pós que possuem menores dimensões (nanopós) influenciam a T<sub>c</sub>, que passa a ser à temperatura ambiente (27°C) tornando inviável, em termos biológicos, a sua polarização [18].

#### 1.2.4. Biovidro 45S5

Na década de 60 foram descobertas algumas composições de vidro com excelentes características de biocompatibilidade, bioatividade e propriedades mecânicas, para aplicação *in vivo* [5], [10].

Assim, a primeira composição de biovidro, 45S5 *Bioglass* (BG), foi descoberta, há 40 anos, por *Larry Hench*, tornando a utilização de biovidro um outro reforço à HAp, utilizados principalmente no revestimento de implantes [10]. O biovidro é altamente bioativo por corresponder a um conjunto de composições de vidros baseados no sistema Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>, e a melhoria nas propriedades mecânicas está relacionada com a redução de porosidade, que depende da temperatura de síntese e da quantidade acrescentada de vidro [9].

Pelo facto de os vidros bioativos apresentarem na sua composição silício, cálcio e fósforo em contacto com o tecido ósseo, não se geram respostas imunológicas ou fibroses na interface entre os dois sistemas. As partículas de silício também favorecem o crescimento ósseo, uma vez que atuam sobre os genes que controlam a osteogénese e a formação de fatores de crescimento [5].

No campo da cirurgia ortopédica, o biovidro é normalmente usado como enxerto ósseo, em locais não sujeitos a cargas mecânicas. Além das suas características anti-inflamatórias e anti-microbianas, é um osteoestimulante e osteocondutor [10].

### **1.2.5. Efeito piezoelétrico**

A piezoelectricidade consiste na acumulação de carga elétrica resultante da resposta à aplicação de uma força mecânica sobre o material (efeito direto) ou vice-versa (efeito inverso). Os materiais piezoelétricos podem ser alvo de alguma deformação quando sujeitos à acção de um campo elétrico e, portanto, o efeito piezoelétrico é reversível [19]. Dado que é uma propriedade do osso, tem sido estudada para a HAp com o intuito de compreender as suas características bioativas.

Atualmente sabe-se que a HAp possui uma fraca capacidade osteogénica quando comparada com a apresentada pelo tecido ósseo. Após a sua implantação, a HAp sintética pode levar semanas para começar o processo de mineralização do tecido ósseo e, como consequência disso, podem surgir lesões. Existe, portanto, um interesse em desenvolver novos materiais cerâmicos de HAp que estimulem o crescimento do novo osso a uma taxa mais acelerada e, consequente, recuperação mais rápida do paciente [20].

Estudos efetuados por correntes termicamente estimuladas revelaram que a polarização da HAp origina a reorientação dos momentos dipolares existentes entre os iões  $O^{2-}$  e  $H^+$  da rede de iões OH [13]. O estudo da polarização demonstrou que a HAp, uma vez polarizada, mantém a densidade de corrente praticamente inalterada durante um longo período de tempo, dado o lento processo de relaxação deste biocerâmico à temperatura biológica além de que promove um aumento no crescimento ósseo nas superfícies de HAp carregadas, independentemente da polaridade da carga [3].

Assim, se por um lado a HAp é capaz de produzir e de reter uma carga superficial após polarização, os materiais piezoelétricos são capazes de produzir/reter um campo elétrico quando sujeitos a polarização externa. Devido a estas características, este tipo de material é susceptível de ser utilizado para mimetizar o comportamento do osso, uma vez que possui características

piezoelétricas. A propriedade piezoelétrica do BaTiO<sub>3</sub> advém da formação de um dipolo elétrico devido a uma distribuição assimétrica das cargas elétricas [14].

Portanto, um dos estudos deste trabalho é focado na tentativa de aliar as propriedades piezoelétricas da HAp às do BaTiO<sub>3</sub> num revestimento único, que poderá trazer melhorias da capacidade osteogénica do implante.

### 1.3. Precipitação de cristais apatíticos na superfície dos revestimentos, imersos em soluções simuladoras do fluido corporal

O requisito essencial para que um biomaterial se ligue ao osso vivo consiste na possibilidade que apresenta para formar, à sua superfície, apatites semelhantes ao osso [13]. A exploração do uso de soluções que simulam o fluido corporal para o estudo da bioatividade tem sido feita desde a década de 1980, com o objetivo de simular condições *in vivo* em ambientes *in vitro*. Através destas soluções torna-se possível prever a formação de apatites que ocorrem em processos *in vivo* e, conseqüentemente, a bioatividade óssea de um determinado material [21].

Quando um dado material é imerso em soluções idênticas ao plasma sanguíneo, inicia o seu processo de dissolução, promovendo a precipitação de cristais apatíticos na sua superfície. Para a realização dos testes foi preparada uma solução simuladora de fluido corporal (SBF - *Simulated Body Fluid*) de 1,5x. Na tabela 1.1 encontram-se as concentrações, em mM, dos iões presentes no plasma sanguíneo e na solução SBF de 1,0x, utilizada para os testes de bioatividade realizados no presente trabalho de investigação.

**Tabela 1.1: Concentrações iónicas, em mM, da solução SBF e do plasma sanguíneo humano [Adapt. de [22]]**

Iões	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sup>3-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>SBF (mM)</b>	142,0	5,0	2,5	1,5	125,0	27,0	1,0	0,5
<b>Plasma Sanguíneo (mM)</b>	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5

### 1.4. Biocompatibilidade - Ensaio de cultura celular

Os testes de biocompatibilidade podem ser realizados *in vivo*, em animais, ou *in vitro*, por meio de culturas celulares. A tentativa de reduzir ao máximo a experimentação em animais, levou a um grande avanço nas técnicas de cultura celular.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* devem ser realizados inicialmente para avaliar os materiais e identificar aqueles que apresentam comportamento citotóxico. Desta maneira, é possível selecionar apenas os materiais mais adequados para a aplicação *in vivo*.

Na avaliação da biocompatibilidade dos materiais *in vitro* utilizam-se células de um tecido humano ou animal [23]. Algumas das vantagens dos testes *in vitro* são o controlo das condições ambientais físico-químicas e fisiológicas, bem como o estudo da morfologia e metabolismo celular, a baixo custo, comparativamente com os testes *in vivo*.



## 2. Técnicas de produção de revestimentos

Para melhorar a resposta dos tecidos, novas técnicas de revestimento têm vindo a ser investigadas, visando a otimização das propriedades do revestimento, reduzindo o atrito entre as camadas e melhorando a adesão do filme ao substrato.

A disparidade na estrutura, elasticidade e coeficiente de expansão do substrato e do filme, tornam a fraca adesão um dos problemas no uso de revestimentos à base de HAp [12]. Os tipos de metais que se destacam como substrato, para revestimentos à base de hidroxiapatite, são o titânio e as suas ligas (Ti-6Al-4V) [8], [24]. O uso de um destes metais como substrato, permite aliar a biocompatibilidade à resistência mecânica e tenacidade à fratura dos metais, o que possibilita uma estabilização mais rápida do implante no tecido ósseo hospedeiro e aumento da sua vida funcional [24].

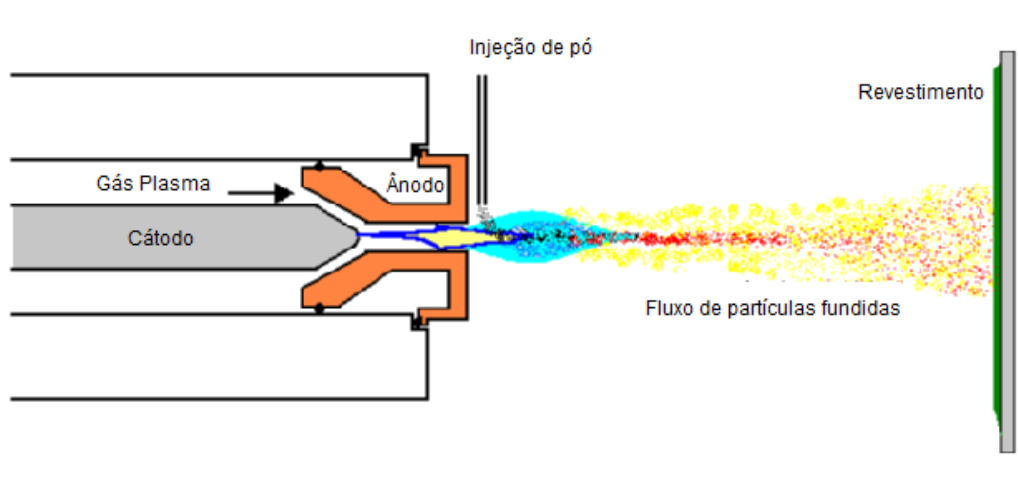
Existem diversas técnicas para revestir os metais à base de hidroxiapatite, as mais conhecidas são *Plasma Spray*, HVOF (*High velocity oxy-fuel*), Deposição Eletroforética (“*Electrophoretic Deposition*” - EPD), *Sputtering*, Prensagem Isostática Quente, *Spray Térmico*, Revestimento por Imersão (*Dip coating*), Deposição por Laser Pulsado (“*Pulsed Laser Deposition*” - PLD), Sol-Gel e Deposição Assistida por Feixe de Iões (“*Ion Beam-Assisted Deposition*” - IBAD) [12], [24], [25]. No entanto, a escolha da técnica deve ter em consideração as alterações na composição e nas propriedades do revestimento, durante o processamento, para perceber o seu comportamento *in vivo* [24].

Actualmente, a técnica mais utilizada para a deposição de filmes em implantes é a de *Plasma Spray*, uma vez que possui alta taxa de deposição [12], [25]. Contudo, uma técnica recente e bastante promissora para a produção de revestimentos - *CoBlast™* - cria revestimentos à base de HAp sobre substratos de Titânio com excelente osteocondutividade *in vitro* e osseointegração *in vivo* [10].

### 2.1. *Plasma Spray*

O método de *Plasma Spray*, representado na figura 2.1, usa um arco dielétrico como fonte de calor e resulta de uma rutura dielétrica de um gás, produzindo uma descarga de plasma [12]. O plasma, eletricamente neutro, é composto por eletrões, iões positivos e negativos na mesma proporção, além de, radicais livres e fotões com uma grande variação de energia [26]. A

descarga de plasma ocorre no espaço preenchido pelo gás (árgon e azoto), que atinge altas temperaturas pela passagem de corrente através do plasma. A elevação de temperatura provoca a dissociação de moléculas e átomos, a ionização do gás e a chama de gás que se forma é capaz de fundir ou vaporizar praticamente qualquer substância [12], [26]



**Figura 2.1: Esquema representativo do processo de Plasma Spray. (Adapt. [27])**

No entanto, o processo é realizado a temperaturas bastante elevadas o que, consequentemente, induz a um aumento significativo dos gastos energéticos e, para o qual, são necessários equipamentos específicos e instalações apropriadas com um custo associado elevado. Por outro lado, investigações já provaram que este método induz a uma fraca aderência entre revestimento e revestimento-substrato [28]. Sendo, por isto, uma técnica que possui alguns problemas.

## **2.2. CoBlast<sup>TM</sup>**

O processo *CoBlast<sup>TM</sup>* é uma técnica recente de produção de revestimentos e foi desenvolvido pela EnBIO em 2011. Permite obter filmes à temperatura ambiente e, portanto, é um processo denominado não-térmico. Assim, esta característica vem colmatar os problemas associados ao método de processamento mais utilizado – *Plasma Spray*.

Neste método, como se mostra no esquema da figura 2.2, os materiais (componentes+pó abrasivo) que se pretendem depositar para formar os revestimentos são bombardeados de forma contínua para o substrato através de um único *nozzle*.

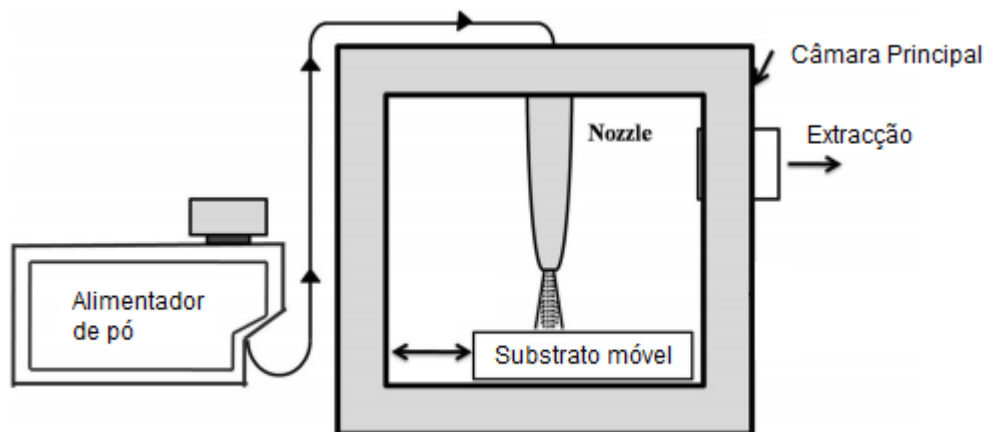


Figura 2.2: Esquema representativo do processo *single-nozzle* de *CoBlast™*. (Adapt. [29])

O pó abrasivo elimina os óxidos à superfície do metal, tornando-a mais reactiva, permitindo que as partículas do revestimento adiram rapidamente ao substrato e de forma coesa. Para que o revestimento tenha uma elevada taxa de cobertura, sem contaminações, o pó abrasivo também deve ser inerte, para que não se estabeleçam ligações químicas com o substrato. Os parâmetros de controlo da técnica são o tamanho da partícula, o ângulo do *nozzle* e a altura a que se encontram do substrato, a pressão e a direcção impostas no bombardeamento de partículas. Após revestimento, os substratos são limpos através de jactos de ar, para que sejam removidas as partículas remanescentes não aderidas à amostra [29].

### 2.3. Comparação entre técnicas: *Plasma Spray* e *CoBlast™*

Actualmente temos disponíveis diversos métodos de revestimento, no entanto, o presente trabalho possui o foco no desenvolvimento de revestimentos à base de HAP segundo o processo de *CoBlast™*.

As vantagens do processo *CoBlast™* em relação ao *Plasma Spray* são as ligações químicas mais fortes entre o revestimento e substrato-revestimento, superfície com poros de tamanhos definidos e uniformes e baixa temperatura no processo, uma vez que minimiza a formação de fases apatíticas de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e fosfato tricálcico  $\beta$  ( $\beta$ -TCP). [14], [16]-[19] Por outro lado, os revestimentos produzidos a elevadas temperaturas retêm níveis significativos de abrasivo no seu interior, resultante do pré-processamento que introduz rugosidade na superfície da amostra, o que confere mais uma vantagem ao processo *CoBlast™*, que é realizado à temperatura ambiente [31].

Uma característica significativa para revestimentos de espessura reduzida por *CoBlast™* é a ausência de fissuras dentro do revestimento, em comparação com a deposição por *Plasma*

*Spray* [31]. Assim, a combinação da redução de fissuras com a conservação de cristalinidade da HAp original, vai levar a taxas reduzidas de dissolução do revestimento *in vivo*, que atribui mais uma vantagem para a sua aplicação em implantes [31].

Portanto, pode concluir-se que a técnica *CoBlast<sup>TM</sup>* exibe elevada capacidade para deposições à base de HAp em implantes médicos, sem afetar a cristalinidade ou as propriedades mecânicas do substrato, preservando ou melhorando a resposta celular relativamente ao *Plasma Spray* [31]. Além de proporcionar mais oportunidades de produção de revestimentos à base de HAp, para dispositivos pequenos e sensíveis à temperatura [31].

## 3. Técnicas de caracterização das amostras

### 3.1. Técnicas de caracterização físico-química e estrutural

#### 3.1.1. Espectrometria de Fluorescência de Raios-X (XRF)

A análise XRF (*X-ray Fluorescence*) é uma técnica que permite fazer a análise qualitativa assim como estabelecer a proporção em que cada elemento se encontra presente na amostra. Esta análise baseia-se no facto de que os elementos químicos emitem radiações características quando submetidos a uma excitação adequada. A emissão de espectros de linha característica pode ser induzida pelo impacto de partículas aceleradas e de radiações de alta energia a partir de um tubo de raios-X ou de uma fonte radioativa. Quando um átomo no estado fundamental fica sob a acção de uma descarga de raios-X, ele absorve esta energia, promovendo eletrões a níveis mais energéticos que se encontram num estado excitado. O átomo excitado tende a voltar ao seu estado fundamental, ocorrendo uma emissão de energia que é característica específica de cada elemento químico, permitindo a sua identificação e quantificação [32].

#### 3.1.2. Difração de Raios-X (DRX)

A análise DRX (*X-ray Diffraction*) é uma técnica de caracterização estrutural, não destrutiva, utilizada para caracterizar as fases cristalográficas dos filmes depositados e determinar a composição química e propriedades físicas do material constituinte do revestimento. Sabe-se que o material pode ser cristalino (arranjo periódico dos iões, átomos ou moléculas) ou amorfo (arranjo não periódico dos iões, átomos ou moléculas) [5], [12], [13], [33].

O seu princípio é descrito como um feixe de raios-X que incide sobre a amostra, ao penetrar na rede cristalina interage com os eletrões e é difratado. Quando ocorre a colisão do feixe de raio-X com o sólido cristalino, como os comprimentos de onda dos raios-X são aproximadamente iguais às distâncias interplanares dos sólidos cristalinos, produzem-se picos de radiação de diferentes intensidades. Ou seja, há uma deteção dos feixes difratados e um processamento dos respetivos ângulos, o que permite obter um desenho da rede e da estrutura cristalina produzida [12], [13].

A relação entre a distância que separa as camadas de átomos, o comprimento de onda radiação X incidente e o ângulo de difração ficou conhecida pela Lei de *Bragg* –  $n\lambda = 2d\sin\theta$ ,  $n$  é

normalmente 1 (difração de primeira ordem),  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios-X,  $d$  a distância entre os planos cristalográficos e  $\theta$  o ângulo que o raio incidente faz com os planos de reflexão. Cada substância cristalina possui características específicas e únicas, é o caso dos planos de difração, das distâncias interplanares, das densidades dos átomos ao longo de cada plano e do padrão de difração gerado [4], [13].

Assim, com este estudo, é possível detetar transformações de fase e identificar através da posição, intensidade e forma do pico de difração a estrutura do revestimento [5], [12].

### **3.1.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

A análise de FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é um método de caracterização química que tem como objetivo o reconhecimento de grupos funcionais presentes numa amostra e, conseqüentemente, de compostos químicos orgânicos ou inorgânicos em qualquer um dos estados físicos da matéria, além de quantificar componentes de misturas desconhecidas [5], [13]. Desta técnica, resultam espectros características de cada composto, que permitem conhecer a composição da amostra por comparação com espectros de referência ou através de ligações presentes [4], [5].

No seu princípio físico, a radiação infravermelha atinge a amostra e a energia absorvida provoca uma alteração nos estados vibracionais das ligações covalentes entre os átomos ou moléculas, já que podem efetuar movimentos de translação, rotação e vibração molecular e cada tipo de ligação covalente absorve uma frequência característica de radiação infravermelha [5], [13].

Logo, “a aquisição do espectro de FTIR pode ser feita no modo de transmissão, detetando a irradiância que atravessa a amostra, ou no modo de absorção, medindo a irradiância absorvida pela amostra. Efetuando um varrimento em frequência da radiação eletromagnética, obtém-se um espectro de transmissão, ou absorção, que evidencia as zonas de absorção dos grupos funcionais na forma de picos ascendentes, ou invertidos, respetivamente” [4], [13].

## **3.2. Técnicas de caracterização morfológica**

### **3.2.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)**

A técnica de SEM (*scanning electron microscopy*) permite caracterizar a morfologia e a topografia da superfície da amostra a analisar [12], [33]. O microscópio de varrimento é consti-

tuído por uma câmara em vácuo, um tubo onde ocorre a aceleração dos elétrons e por dois detectores de elétrons, os elétrons secundários e os retrodifundidos [12].

Associada ao SEM, existe uma ferramenta de análise EDS (*Energy Dispersive X-Ray analyse*) que possibilita a visualização de imagens tridimensionais da amostra e a determinação da composição química elementar de uma área definida na sua superfície [4], [33].

O seu princípio de funcionamento baseia-se na incidência de um feixe de elétrons acelerados num ponto da superfície da amostra-alvo e a posterior recolha dos sinais eletrónicos emitidos pela mesma. Estas amostras são percorridas pelo feixe de elétrons acelerado, que possui uma tensão que varia entre 0 e 40 kV, o qual é focado finamente por um sistema de lentes eletromagnéticas. Desta interação, ocorre a emissão de diversos tipos de radiação e elétrons, como elétrons secundários, elétrons retrodifundidos, elétrons de *Auger*, raio-X característicos, além de fótons de várias energias. Este conjunto de sinais é captado por detectores específicos que convertem os sinais em sinais elétricos, com diferentes intensidades. Dos elétrons gerados, os elétrons secundários contribuem para a formação da imagem detalhada da topografia da amostra, enquanto a deteção dos elétrons retrodifundidos, através da ferramenta de análise EDS, é usada para determinar a diferença entre os elementos que constituem a amostra, além de permitir a observação clara da sua rugosidade, devido ao efeito de sombra. Tornando-se, por isto, os elétrons mais relevantes na formação de imagem, uma vez que interagem na zona superficial da amostra [4], [5], [12], [33].

No caso de amostras com materiais isolantes elétricos, como cerâmicos ou polímeros, é necessário cobrir a amostra com finas películas de metal (altamente condutor), porque as ligações entre elétrons são fracas, para que exista uma melhor emissão em amostras de natureza não-metálica [4].

Assim, esta técnica é necessária neste trabalho porque através da análise simultânea dos sinais recolhidos pelos detectores é possível caracterizar cada ponto da amostra em termos de topografia, número atómico, propriedades cristalinas, composição química elementar, campos magnéticos e orientação cristalina local da amostra [33].

### **3.2.2. Avaliação da rugosidade**

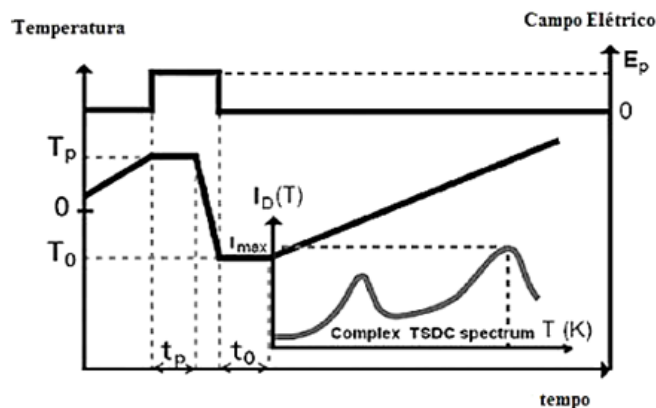
O LSM 700 (*laser scanning microscope*) é um sistema de microscopia de luz que usa luz laser através de um feixe confocal, de modo a capturar secções ópticas definidas do material da amostra e a combiná-las para construir uma imagem tridimensional. O princípio básico da microscopia confocal baseia-se no uso de filtragem espacial para gerar um ponto focado de ilumi-

nação combinado com um pequeno orifício, chamado *pinhole*, capaz de separar a luz proveniente do ponto focado e eliminar a luz emitida por pontos fora de foco. Estes sinais gerados com a ajuda de tubos fotomultiplicadores são processados por um computador e, assim, imagens bidimensionais precisas podem ser construídas. A obtenção de imagens sucessivas de diferentes planos da mesma amostra possibilita também a construção de imagens tridimensionais [34]. Neste trabalho, esta técnica é realizada de forma a avaliar os parâmetros de rugosidade associados a cada tipo de amostra.

### 3.3. Técnicas de caracterização elétrica

#### 3.3.1. Correntes de Descarga Termicamente Estimuladas (TSDC)

A técnica de corrente de despolarização termicamente estimulada (*thermally stimulated discharge currents*) é utilizada para estudar as propriedades e características elétricas dos materiais isolantes [4]. Utiliza a mobilidade molecular como sonda de medição e, por isso, é particularmente adequada para materiais de carácter polar [4], [13], [35].



**Figura 3.1:** Representação do procedimento para aquisição de um espectro por TSDC [13].

De acordo com a figura 3.1, na aplicação do método, polariza-se a amostra de forma uniforme com a aplicação de um campo elétrico com intensidades entre  $10^1$ - $10^4$  kV/m,  $E_p$ , a uma temperatura constante,  $T_p$ , durante um período de tempo,  $t_p$ , suficientemente grande para permitir a orientação das unidades móveis do material sob a ação do campo elétrico DC. Devido a uma queda abrupta da temperatura,  $T_0$ , mantendo o campo elétrico aplicado, a configuração de polarização é congelada, para que a mobilidade das moléculas se considere nula. A esta temperatura o campo é desligado e a amostra é curto-circuitada durante um período de tempo,  $t_0$ , para

que se possa eliminar a carga espacial de rápida relaxação e estabilizar a amostra a esta temperatura. Por fim, durante o aumento linear de temperatura, volta a estabelecer-se o equilíbrio, gerando uma corrente de despolarização,  $I_d$ , que é registada com um eletrómetro de alta sensibilidade, em função da temperatura [4], [13], [35].

### 3.3.2. Potencial de superfície por descarga de corona

Este processo de polarização é, fundamentalmente, uma descarga elétrica auto-sustentável e não-disruptiva que se manifesta quando ocorre uma diferença de potencial suficientemente alta entre elétrodos assimétricos, isto é, um fio fino ou um ponto (emissor) e uma placa ou cilindro (receptor). Quando um campo elétrico forte se aproxima do emissor, o ar, que funciona como isolante, é ionizado e os iões resultantes são direcionados para o eletrodo receptor, que possui um campo elétrico fraco [36].

O limiar para que ocorra descarga de corona depende dos eletrões disponíveis para desencadear uma avalanche, responsável pela ionização do gás, já que, aquando do impacto, transferem toda a sua energia adquirida do campo elétrico para as moléculas de gás [36].

Podem ser definidos diferentes regimes, de acordo com a tensão aplicada, para a descarga de corona. Assim que se atinge um limiar, gera-se uma avalanche de eletrões e iões, o qual se denomina por regime de auto-estabilização. Ao aumentar a tensão de corona, se a tensão é positiva transforma-se numa descarga contínua incandescente (*continuous glow discharge*), ao passo que, se a tensão for negativa atinge o regime de pulsos de *Trichel* [36]. Para tensões de corona altas, a tensão negativa também se transforma em '*continuous glow discharge*', enquanto para tensões muito elevadas se formam '*streamers*' tanto para as tensões positivas como negativas, até ocorrer rotura dielétrica [36].

Depois da polarização por descarga de corona, a não uniformidade da carga de corona e o seu rápido decaimento com o tempo, em condições normais de funcionamento, são dois dos inconvenientes das tecnologias existentes. Por isso, a medição do potencial de superfície, medido usando uma sonda capacitiva acoplada a um voltímetro eletrostático, torna-se importante para se avaliar a eficiência do processo de corona, se otimizar o condicionamento térmico das amostras e para se aferir o efeito das condições ambientais sobre a eficiência do processo de descarga por corona [37].



## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Materiais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas placas de liga de titânio (Ti-6Al-4V) Grade 5 ASTM B265 de  $15 \times 15 \times 2$  mm com corte a jacto de água, pela empresa Jacquet Portugal, micropós de hidroxiapatite de origem comercial, produzida pela empresa Altakitin, abrasivo *corindon* F20 para as amostras produzidas por *Plasma Spray* e o abrasivo *corindon* F120 para as amostras produzidas por *CoBlast<sup>TM</sup>*, isto é, óxido de alumínio fundido ou Alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), da empresa Blasqem.

Houve a necessidade de produzir novos revestimentos para as placas de Ti-6Al-4V, constituídos pelos mesmos materiais enumerados no parágrafo anterior e, aos quais, se juntou uma cerâmica piezoelétrica, titanato de bário ( $\text{BaTiO}_3$ ), produzida pela empresa *Sigma-Aldrich*. Foram produzidos dois revestimentos com 80%/20% (m/m) de HAp/ $\text{BaTiO}_3$  de estrutura cristalina diferente, o primeiro de nanopós de estrutura cúbica e o segundo de micropós de estrutura tetragonal.

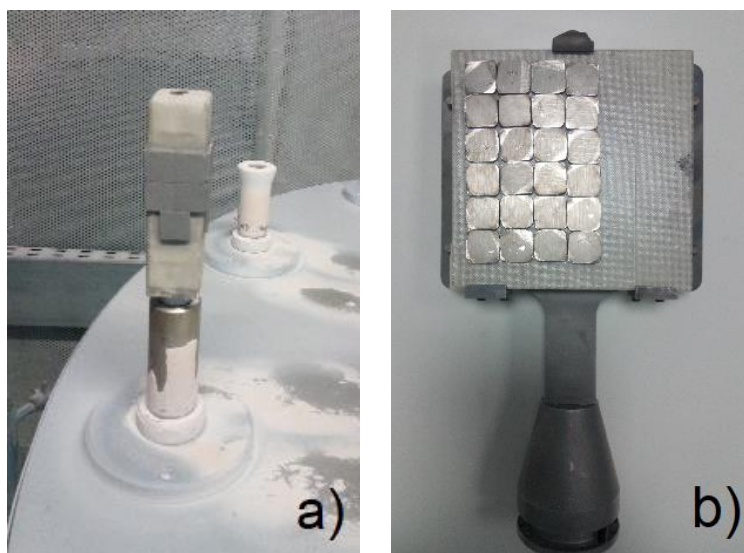
Também se utilizou Bioglass 45S5 (BG, com base em  $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ ), que foi produzido pelo método sol-gel com os precursores  $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$ ,  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em solução de  $\text{HNO}_3$ . As amostras revestidas com 80%/20% e 65%/35% (m/m) de HAp/BG por *CoBlast<sup>TM</sup>* foram produzidas anteriormente [38]. Durante a realização dos ensaios, o número de amostras ao qual se teve acesso foi bastante reduzido e, por este motivo, apresentam-se menos resultados comparativamente com todos os outros tipos de revestimento.

### 4.2. Métodos

#### 4.2.1. Produção de revestimentos

Os processos de revestimento foram efetuados na CERAMED. Numa primeira fase, foi necessário polir as arestas e vértices das amostras, para que, posteriormente, não ocorressem descargas nesses pontos. Prosseguiu-se com o processo de limpeza dos substratos, colocando as amostras durante 15 minutos num banho de ultrassons (*VWR Ultrasonic Cleaner USC – TH*) a  $50^\circ\text{C}$  e imersas num detergente específico anti-corrosivo (*Surfaclean 995*), de forma a retirar sujidades, óleos ou pastas de polir da maquinaria, uma vez que são consideradas as principais

formas de contaminação. Retiradas da limpeza por ultrassons, foram passadas por água corrente e imersas em metanol, durante 2 minutos. De seguida, passou-se à etapa da decapagem, as amostras para revestir por *Plasma Spray* sofrem uma projeção mecânica com o abrasivo *corindon* F20, com partícula média de cerca de 1000  $\mu\text{m}$ , de forma a introduzir alguma rugosidade na superfície da amostra. No entanto, as amostras com revestimento por *CoBlast<sup>TM</sup>* não necessitam desta etapa já que o abrasivo *corindon* F120 é introduzido na mistura e possui um objetivo similar aquando do processo de revestimento. Assim, depois de concluir cada um destes processos, preparou-se o substrato para deposição e colocou-se no equipamento de revestimento. Segundo a imagem a) e b) da figura 4.1, os suportes para *CoBlast<sup>TM</sup>* e *Plasma Spray* têm forma quadrangular e retangular, respetivamente, aos quais se colaram fitas adesivas de dupla face, igualmente espaçadas entre si, para se colocarem as placas a revestir.



**Figura 4.1:** Suportes das placas de Ti-6Al-4V: a) Técnica *CoBlast<sup>TM</sup>* e b) Técnica *Plasma Spray*.

#### 4.2.1.1. *Plasma Spray*

Como se pode observar pela figura 4.2, a técnica de *Plasma Spray* requer um sistema de movimentação robotizado para manipular a pistola de pulverização num padrão controlável e reproduzível e encontra-se dentro de uma cabine de pulverização acústica. Associada a este sistema está, também, uma plataforma rotativa giratória de dois eixos composta por várias estações para produção em série.

Para a produção dos revestimentos por *Plasma Spray* utilizou-se unicamente HAp, que possui partícula média de cerca de 140  $\mu\text{m}$  e, uma vez que, o processo é térmico, a partícula é sinterizada e projetada contra a superfície da amostra.

Para cada tipo de substrato é preciso calibrar o *Elcometer*, calibre grosso e fino, e realizar várias medições, para que se reduza o erro associado. Logo, a gama *Elcometer*, de medidores digitais de espessura de revestimento, foi especificamente usado para indicar as medições da espessura do revestimento. Assim, depois de produzir o revestimento e executar as várias medições com o *Elcometer*, o valor médio encontrado para a espessura do revestimento de *Plasma Spray* foi de  $(13 \pm 6) \mu\text{m}$ .

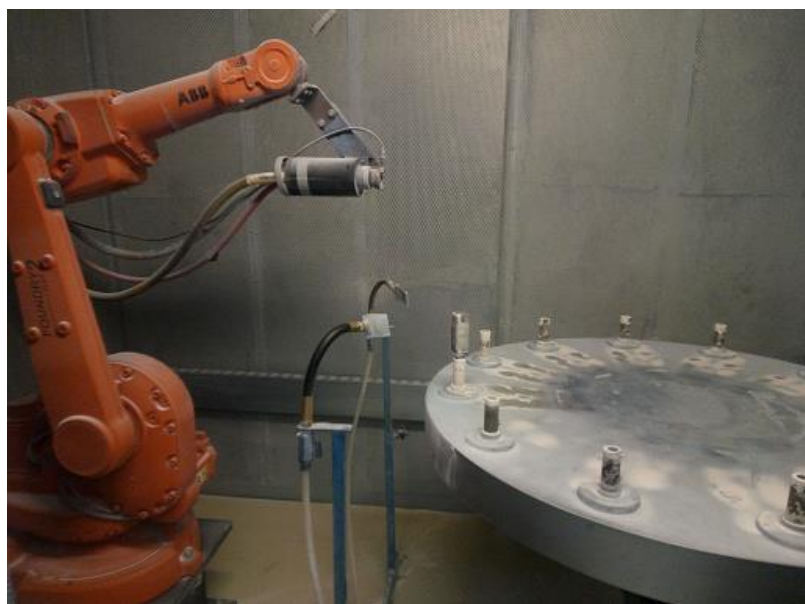
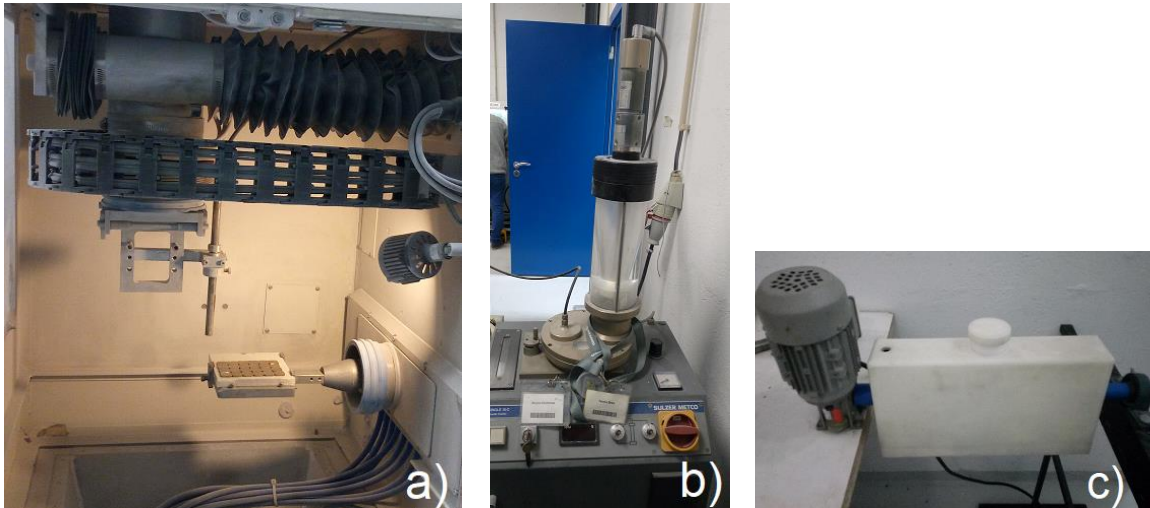


Figura 4.2: Equipamento utilizado no processo de revestimento por *Plasma Spray*.

#### 4.2.1.2. *CoBlast<sup>TM</sup>*

Para a realização da técnica foi utilizado um dispositivo de *micro-blasting* (EnBIO Cork, Irlanda). O equipamento utilizado é dividido em 3 componentes. Como mostra a imagem a) da figura 4.3, uma primeira secção é destinada ao revestimento propriamente dito, onde se coloca o suporte com as amostras e se encontra um único *nozzle* robotizado para depositar a mistura pretendida. A esta secção estão ligados mais dois componentes: um aspirador que é ligado à zona de revestimento para que se possa extrair continuamente o pó desperdiçado durante o processo e uma misturadora onde se coloca a mistura e se definem a velocidade de alimentação e a pressão a que é fornecida, ilustrada na imagem b) da figura 4.3. Esta misturadora (*Sulzer Metco Single 10-C Powder Feeder*) é programada manualmente e contém um depósito onde é colocada a mistura (600mL) e um disco rotativo que a recebe e transporta continuamente até ao tubo que liga a misturadora ao *nozzle*. Todas as misturas, antes de chegarem ao depósito da misturadora são colocadas no misturador em V (imagem c) da figura 4.3) colocado em rotação constante, durante 5 minutos.



**Figura 4.3: Equipamento utilizado no processo de revestimento por *CoBlast™*: a) área principal onde se produz o revestimento; b) depósito onde se coloca a mistura usada durante o revestimento e c) misturador em V onde se misturam os componentes do revestimento.**

A velocidade de rotação da misturadora foi de 60 rpm e a pressão de 6 bar. O movimento do *nozzle* foi previamente programado através do computador incorporado no equipamento e tendo em conta as posições das placas a revestir no substrato. Por último, as misturas foram preparadas usando um rácio de 50%/50% (m/m) de mistura/pó abrasivo e colocadas no depósito da misturadora, após limpeza automatizada do mesmo para que não se contamine a nova mistura a utilizar para revestimento.

No primeiro revestimento, misturaram-se 250 g de HAp com 250 g de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , de partículas médias de cerca de 35  $\mu\text{m}$  e 106  $\mu\text{m}$ , respetivamente. Para o segundo e terceiro revestimentos, misturaram-se, durante o mesmo tempo, 250 g de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 200 g de HAp e 50 g de  $\text{BaTiO}_3$ , isto é, amostras com 80%/20% (m/m) de Hap/ $\text{BaTiO}_3$ . A diferença esteve na estrutura dos pós, uma vez que, para o 2º revestimento (mistura A) os pós de  $\text{BaTiO}_3$  eram nanométricos e de estrutura cúbica (partícula média  $\leq 100$  nm), enquanto para o 3º revestimento (mistura B) micro-métricos e de estrutura tetragonal (partícula média  $\leq 3$   $\mu\text{m}$ ).

Para dar início ao processo acciona-se o vácuo, escolhe-se o programa e o processo segue automaticamente. Por fim, o equipamento, o suporte e as placas revestidas são limpas com jatos de ar comprimido.

Assim, em todas as deposições produzidas por *CoBlast™*, o valor da espessura do revestimento encontrado foi de  $(5 \pm 1)$   $\mu\text{m}$ .

## 4.2.2. Caracterização das amostras

A caracterização físico-química, estrutural e morfológica foi realizada no CENIMAT/I3N e a caracterização elétrica no Departamento de Ciência dos Materiais da FCT/UNL.

### 4.2.2.1. Caracterização físico-química e estrutural

#### 4.2.2.1.1. XRD

Para se identificarem e determinarem as concentrações dos elementos presentes na amostra de Ti-6Al-4V recorreu-se à técnica de Fluorescência de Raios-X. O equipamento é constituído por um espectrómetro de fluorescência de Raio-X sequencial com um sistema dispersivo de comprimento de onda (WD-XRF) Axios 4.0 kW, 20-60 kV, 10-125 mA, equipado com cinco cristais e com um *software* de análise qualitativa e quantitativa.

#### 4.2.2.1.2. DRX

Recorreu-se à técnica de Difração de Raios-X de forma a identificar a composição química e propriedades físicas do material constituinte dos revestimentos, identificando através da posição, intensidade e forma do pico de difração a estrutura do revestimento.

A técnica de DRX foi realizada num difractómetro X'Pert Pro da *Panalytical* com Raios-X gerados a partir de uma ampola de cobre sob um potencial de aceleração de 45 kV e um feixe de corrente de 40 mA. Os ângulos de varrimento utilizados na técnica,  $10^\circ < 2\theta < 90^\circ$ , foram definidos tendo em atenção a posição dos picos de maior intensidade para ambas as amostras, com revestimento por *CoBlast<sup>TM</sup>* e *Plasma Spray*. Assim, tendo em conta os 4 tipos de revestimento, os picos das diferentes amostras foram indexados com base nas fichas padrões *Joint Committe on Powder Diffraction Standards - JCPDS* - (#09-0432, #044-1294, #046-1212, #79-2263 e #89-1428).

#### 4.2.2.1.3. FTIR

De modo a identificar os grupos funcionais presentes nas amostras de Ti-6Al-4V com diferentes revestimentos e produzidos pelas técnicas de produção de *Plasma Spray* e *CoBlast<sup>TM</sup>*, recorreu-se à técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada. O equipamento utilizado foi um espectrofotómetro *Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR*. A análise foi realizada num intervalo espectral de  $5000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$  e com os resultados obtidos construíram-se gráficos que refletem a transmitância em função do número de onda.

#### **4.2.2.2. Caracterização morfológica**

##### **4.2.2.2.1. SEM-EDS**

Para caracterizar morfológicamente a superfície das amostras recorreu-se a Microscopia Eletrónica de Varrimento, por ser uma técnica que permite uma análise de elevada resolução. Antes da execução da técnica foi depositada, em ambas as amostras, uma camada de 60 % de ouro e 40 % de paládio, por pulverização catódica ou *Sputtering*, utilizando, para tal, o equipamento *Quorum Q150T ES*. Estas análises realizaram-se através de um Microscópio Eletrónico de Varrimento *Zeiss*, modelo *Auriga*.

##### **4.2.2.2.2. Microscopia confocal de varrimento laser**

A rugosidade e a topografia da superfície dos revestimentos produzidos pela técnica de *CoBlast™* e *Plasma Spray* foram analisadas por meio de um microscópio confocal (*Zeiss LSM 700*), com laser de 405 nm e passo z de 2,12  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, a análise da imagem foi realizada usando o *software ZEN 2.1* (*Carl Zeiss*). Além da imagem topográfica o equipamento fornece, entre outros, o parâmetro *WSq* (média aritmética dos valores absolutos dos desvios da superfície com relação ao plano médio) que se trata de uma medida da rugosidade de uma área da superfície. Os parâmetros *skewness* (*WSsk*) e *kurtosis* (*WSsu*) são parâmetros estatísticos da distribuição gaussiana e traduzem os valores de assimetria e de curtose (achatamento) dos dados.

##### **4.2.2.3. Caracterização elétrica**

###### **4.2.2.3.1. TSDC**

O método das correntes de descarga termoestimuladas é utilizado para identificar e medir as características dos dipolos elétricos para a carga espacial. Durante o processo, a amostra sofre variações de temperatura (aquecimento ou arrefecimento) a uma taxa constante enquanto a corrente é medida. Se a amostra for polar, surgem picos de corrente a determinadas temperaturas, devidos aos dipolos (ou carga espacial). Caso exista carga espacial, os picos serão, normalmente, mais largos, podendo aparecer picos originados pela contribuição de vários picos individuais com temperaturas máximas próximas.

Esta técnica foi realizada no Departamento de Ciências dos Materiais, o equipamento é constituído por uma câmara que possui um porta-amostras e uma resistência de aquecimento que permitiu controlar a temperatura e a sua variação, juntamente com o controlador de temperatura, um eletrómetro e uma fonte de alimentação. O eletrómetro *KEITHLEY 617* e o contro-

lador encontram-se ligados por uma porta GPIB a um computador, o que permitiu controlar o(a) aumento/diminuição da temperatura a uma taxa constante ( $\beta$ ) e registrar simultaneamente os valores da temperatura e da corrente.

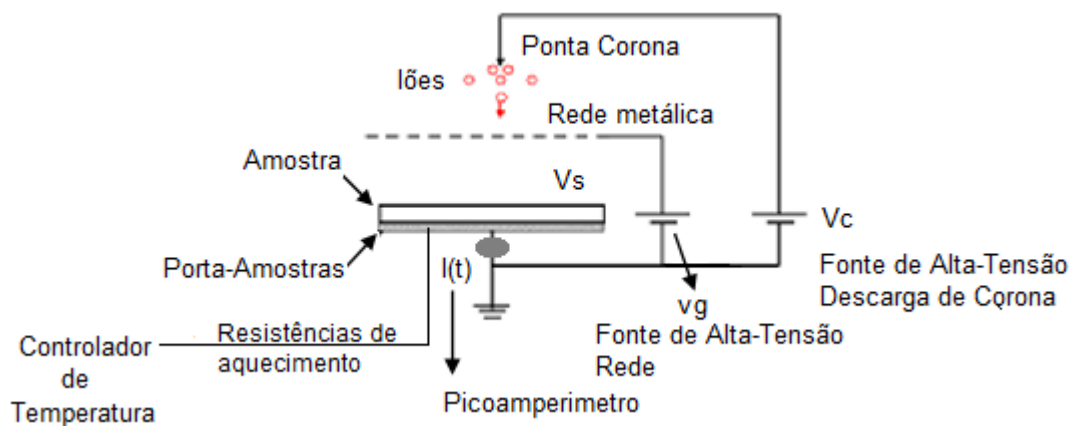
Assim, de modo a estudar a eficiência da deposição de carga superficial em revestimentos à base de HAp, realizaram-se estudos de TSDC a 250°C e com taxa de aquecimento ( $\beta$ ) de 5°C/minuto, sem aplicação de campo elétrico e sem tratamento térmico considerada como amostra virgem (sTT), sem aplicação de campo elétrico e com tratamento térmico (TT) e com aplicação de campo elétrico DC positivo e negativo (Pol+/Pol-), em atmosfera de ar e vácuo até aos 100°C. Nos ensaios com TT as amostras sofreram um aumento de temperatura que se iniciou à temperatura ambiente e que atingiu os 200°C com  $\beta = 10$  °C/min, temperatura à qual se submeteram as amostras, durante 1h. Para os ensaios com Pol+ e Pol-, as amostras também sofreram um aumento de temperatura até aos 200°C com  $\beta = 10$ °C/min e, a essa temperatura, aplicou-se um campo elétrico DC de  $\pm 10$  kV/cm, durante 1h. Decorrida 1h, ambos os testes (TT, sTT, Pol+ ou Pol-) sofreram um arrefecimento rápido até atingir a temperatura ambiente. O tempo de espera,  $t_0$ , entre a remoção do campo elétrico foi de 1h.

As técnicas descritas permitiram observar e analisar os gráficos da densidade de corrente ( $j$ ) em função da temperatura ( $T$ ) e calcular a carga armazenada pelas amostras ( $Q$ ). Algumas das curvas de TSDC representadas nos gráficos da discussão de resultados foram obtidas a partir de médias de vários ensaios realizados para réplicas de amostras sob as mesmas condições. Todos os ensaios foram realizados com o revestimento da amostra em contato com o eletrodo ligado à terra, por meio do eletrómetro.

#### **4.2.2.3.2. Medida de potencial de superfície por descarga de corona**

A polarização termoelétrica dos revestimentos, com o objetivo de potenciar a sua bioatividade e osteointegração, será feita pelo método de trípode de corona.

A figura 4.4 mostra uma representação esquemática do sistema de descarga de corona utilizado. Estão representadas a ponta de descarga, a rede metálica, o porta-amostras, a fonte de alta tensão de descarga de corona (com controlo de tensão da descarga ( $V_c$ )), a fonte de alta-tensão que irá controlar a tensão na rede metálica ( $V_g$ ), o picoamperímetro para monitorização da corrente no porta-amostras e um sistema de controlo de temperatura do porta-amostras, equipado com um sensor de temperatura e resistências de aquecimento. O controlador de temperatura da amostra permitiu efectuar ensaios de polarização controlando a temperatura na amostra e as distâncias ponta da agulha-grelha e grelha-amostra foram de 2 cm e 1 cm, respetivamente, mantendo-se constantes para todos os ensaios.



**Figura 4.4: Representação esquemática do sistema de descarga de corona, com os diferentes componentes e equipamentos.**

A medição do potencial de superfície por descarga de corona foi medida por meio de uma sonda capacitiva acoplada a um voltímetro eletrostático (*Trek Model 344-3 ESVM*).

Na prática, o método utilizado para determinar a densidade de cargas presas na superfície do revestimento, contém uma base onde se coloca a amostra e, a qual, possui uma distância fixa até à sonda capacitiva, um voltímetro eletrostático e uma placa de aquisição de dados. As medições de potencial adquiridas pela sonda capacitiva, assim como, as respectivas posições da mesma, são guardadas num ficheiro *Excel* à medida que se inicia a medição e que se vai reposicionando a sonda sob a superfície do revestimento, durante 2 minutos, através de um programa já desenvolvido. O ficheiro é analisado e, posteriormente, seleciona-se a zona da amostra com maior potencial de superfície. Estes foram os procedimentos adotados uma vez que, depois da polarização por descarga de corona, a não uniformidade da carga de corona e o seu rápido decaimento com o tempo, em condições normais de funcionamento, são dois dos inconvenientes das amostras testadas.

### 4.2.3. Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade das amostras com e sem revestimento foram realizados no laboratório de cultura celular do Departamento de Física da FCT/UNL, sob orientação do Professor Jorge Carvalho Silva.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados usando o método do extrato e células Vero (células epiteliais de rim de macaco).

Para a realização deste ensaio, as amostras foram colocadas em meio de cultura (não contendo o soro fetal bovino (FBS)) e aí foram mantidas durante 48h. Foi preparada uma placa de

cultura de 96 poços com células Vero semeadas com uma densidade de 20 k células por cm<sup>2</sup>. A placa foi colocada, durante 24h, na incubadora a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h o meio de cultura foi substituído pelos extractos e, aos quais, foi adicionado o FBS. Para cada uma das amostras, fizeram-se 2 diluições do meio que esteve em contacto com a mesma e cada uma das 3 concentrações (C<sub>0</sub>, C<sub>0</sub>/2 e C<sub>0</sub>/4) foi replicada 5 vezes. Na mesma placa foi também efetuado o controlo positivo (C+), adicionando-se 10 µL de DMSO, composto extremamente citotóxico, o controlo negativo (C-), sem qualquer alteração do meio e o controlo de meio (CM) que corresponde aos 6 poços com meio e sem células semeadas. A placa colocou-se novamente na incubadora por 48 horas. Decorrido esse tempo, retirou-se o meio contido em cada poço e usou-se a resazurina (corante azul) para determinar a viabilidade celular. Em cada um dos poços colocou-se uma solução de 90% de meio completo e 10% de resazurina. A resazurina é reduzida a resorufina, composto cor-de-rosa e fluorescente, pelas células metabolicamente ativas. Por fim, a placa foi incubada durante 4 horas e mediram-se as absorvâncias a 570 nm (comprimento de onda (cdo) de absorvância máxima da resorufina) e 600 nm (cdo de absorvância máxima da resazurina) de cada poço, num leitor de placas *Biotek ELX800*.

Para os cálculos de viabilidade celular, segundo a equação 4.1, calcularam-se os valores médios de absorvância para as 5 réplicas de cada amostra ( $A_{amostra}$ ) e dividiram-se pelo valor de absorvância do C- ( $A_{c-}$ ). Cada um dos valores de viabilidade celular encontrados têm associada uma incerteza padrão combinada.

#### **Equação 4.1-Cálculo de viabilidade celular.**

$$Viabilidade\ celular = \frac{A_{amostra}}{A_{c-}}$$

Para analisar os resultados de viabilidade celular é necessário ter em consideração quatro denominações, consoante a percentagem de viabilidade celular que se obtém [38]. Para valores de viabilidade celular superiores a 90% o material é considerado não citotóxico, entre 80% e 89% considera-se levemente citotóxico, entre 50% e 79% é moderadamente citotóxico e em casos em que se mostre inferior a 50% então assume-se como severamente citotóxico.

#### **4.2.4. Ensaios de bioatividade**

Os ensaios de bioatividade foram realizados a todo o tipo de amostras com e sem revestimento, não polarizadas, no Departamento de Ciência dos Materiais da FCT/UNL, com o intuito de se aferir sobre a capacidade de precipitação de apatites por parte das mesmas. As amostras foram colocadas dentro de uma estufa a 37°C, num frasco com tampa e, de acordo com a equa-

ção 4.2, calculou-se a quantidade de solução simuladora de fluido corporal (SBF) que se colocou em cada uma das amostras, de concentração iônica 1,5x a do plasma sanguíneo. As amostras permaneceram na solução por períodos de 6h, 12h, 36h, 3 dias, 5 dias e 7 dias. Decorrido cada um dos períodos pré-definidos, as amostras foram retiradas da estufa, lavadas abundantemente com água destilada e conservadas num exsiccador a vácuo até à observação das superfícies das amostras por SEM e EDS.

**Equação 4.2-Cálculo do volume de solução de SBF [4] .**

$$\text{Volume de solução de SBF} = \frac{\text{Área superficial da amostra}}{0,1 \text{ cm}^{-1}}$$

#### 4.2.4.1. Produção da solução SBF (*Simulated Body Fluid*)

A produção da solução SBF 1,5x usada para os testes de bioatividade foi preparada utilizando nove reagentes que se apresentam na tabela 4.1. Encontra-se uma descrição mais detalhada para preparar a solução SBF no anexo 8.1.

**Tabela 4.1: Lista de reagentes utilizados na produção de 1L de solução SBF [22].**

Ordem	Reagente	Quantidade
1	Cloreto de cálcio (NaCl)	9,81g
2	Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	3,40g
3	Cloreto de potássio (KCl)	0,56g
4	Hidrogenofosfato dissódico Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,21g
5	Cloreto de Magnésio hexahidratado (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0,46g
6	Ácido clorídrico (1M HCl)	15 mL
7	Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,58g
8	Sulfato de Sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,11g
9	Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)	9,09g

#### 4.2.5. Cultura celular

Os ensaios de adesão, proliferação, metabolismo e morfologia celular nas amostras revestidas e não revestidas de Ti-6Al-4V sem polarização, foram realizados no laboratório de Cultura Celular do Departamento de Física da FCT/UNL, sob orientação do Professor Jorge Carvalho Silva.

##### 4.2.5.1. Ensaios de adesão e proliferação celular

Nos ensaios de adesão e proliferação celular foram semeadas 20 k células do tipo Saos-2 (linha celular derivada de um osteossarcoma) por cm<sup>2</sup>. Estas células possuem várias caracte-

rísticas osteoblásticas e, neste estudo, são úteis por serem células semelhantes a osteoblastos humanos [39].

Foram colocadas 4 amostras de cada um dos 5 tipos (Ti-6Al-4V sem revestimento, revestida com HAp por *Plasma Spray* e revestidas por *CoBlast<sup>TM</sup>*, com HAp, com a mistura A e B) em placas de 12 poços.

Iniciaram-se os procedimentos com a esterilização das amostras, neste processo colocou-se etanol a 70% até cobrir na totalidade os revestimentos. Passados 5 minutos, aspirou-se o etanol e as amostras foram deixadas ao ar para secar. As células Saos-2 foram lavadas com *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e, posteriormente, desagregadas com tripsina. Para a contagem do número de células num hemocitômetro, misturaram-se 50 µL da suspensão de células com 50 µL de azul tripano. Colocaram-se 1,6 mL de meio com células em quatro dos poços de cada uma das placas (3 poços com amostra e 1 controlo de células (CC)) e para o controlo de meio material e de meio colocou-se o meio sem células. Após 24h de incubação (1º dia), analogamente ao procedimento dos ensaios de citotoxicidade, retirou-se o meio contido em cada poço e usou-se a solução de resazurina. Após 4h de incubação, foram retiradas 5 réplicas de 200µL de cada um dos poços e lidas as absorvâncias no leitor de placas *Biotek ELX800*.

O ensaio durou 9 dias, no 1º dia avaliou-se o número de células que aderiram ao fundo do poço e calculou-se a população de células que aderiu a cada tipo de amostra, enquanto nos restantes 3º, 5º, 7º e 9º dia se calculou a população que proliferou.

Segundo a equação 4.3, a população de células que aderiu à amostra foi calculada através de uma razão entre a absorvância média medida nos poços para cada amostra ( $A_{amostra}$ ) e a absorvância do controlo de células ( $A_{cc}$ ). Como durante a sementeira se perdem algumas células que aderem ao fundo do poço ( $A_{FP}$ ), esse valor é subtraído ao controlo de células. A população de células que proliferou sob o revestimento é calculada como a razão entre a absorvância média medida no dia em questão ( $A_{amostra}$ ) e o controlo de células no 1º dia, como se mostra na equação 4.4.

**Equação 4.3- População de células que aderiu à amostra.**

$$Adesão = \frac{A_{amostra}}{A_{CC} - A_{FP}}$$

#### **Equação 4.4-População de células que proliferou na amostra.**

$$Proliferação = \frac{A_{amostra(dia x)}}{A_{cc\ dia\ 1} - A_{FP\ dia\ 1}}$$

#### **4.2.5.2. Metabolismo celular**

O protocolo para coloração da fosfatase alcalina (ALP) em culturas celulares utiliza as duas soluções e os respectivos reagentes que se apresentam de seguida:

-solução naphthol AS-MX fosfato, constituída por naphthol AS-MX fosfato e N,N dimetilformamida;

-solução tris-ácido clorídrico, formada pela mistura de Tris 0,2 M, ácido clorídrico 0,1 M e água destilada.

De modo a preparar 1 ml de solução de trabalho pesaram-se 0,6 mg de sal diazónio (*fastredviolet LB salt*), aos quais se adicionaram 0,5 ml de solução Tris, 0,5 ml de água destilada e 5 µl de solução Naphthol. A solução final torna-se amarela e ligeiramente turva.

De forma a marcar as células, primeiro lavaram-se as amostras duas vezes com PBS, prosseguiu-se com a fixação com paraformaldeído, durante 10 minutos, lavaram-se novamente as amostras com PBS e, por fim, adicionaram-se 200 µl de solução de trabalho a cada poço e incubou-se a cultura por 15 minutos, a 37°C.

Os resultados obtidos, observados pelo microscópio Nikon Eclipse LV 100D, revelam a atividade metabólica por parte das células e a cor das células evidencia-se cor-de-rosa a avermelhada.

#### **4.2.5.3. Morfologia celular**

Para a marcação da vinculina, o primeiro processo foi fixar as células com paraformaldeído, durante 20 minutos, para que depois da lavagem com PBS se permeabilizassem as mesmas. No processo de permeabilização incubaram-se as células em 0,1% de Triton X-100 em PBS, durante 15 minutos, tempo ao fim do qual, se lavam novamente as amostras em PBS. De seguida, preparou-se 1% de albumina do soro bovino (BSA) ao qual se juntou o anticorpo primário e glicina, marcaram-se as células e colocaram-se na incubadora durante a noite. No dia seguinte, incubaram-se as células com o anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (5µg/mL) e 1mL de BSA, durante 2h sem luz.

Para a marcação da actina, lavaram-se as amostras em PBS e marcaram-se as células com faloidina (*phalloidin Acti-stain*™ 555). Passados 30 minutos, lavaram-se novamente as amostras em PBS e fez-se a marcação DAPI (núcleos). Diluiu-se o DAPI a 300ng/mL em 1% PBS e incubaram-se as células, longe da luz, durante 10 minutos.

Para a marcação de imunofluorescência, o anticorpo primário foi adquirido à empresa *Sigma-Aldrich*, o anticorpo secundário e o DAPI à empresa *ThermoFisher Scientific* e a faloidina à empresa *Cytoskeleton*.

A actina, a vinculina e os núcleos das células foram visualizados, posteriormente, através de um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti-S, equipado com os filtros apropriados e as imagens foram obtidas com a objetiva de 40x.



## **5. Análise e Discussão de resultados**

Os resultados experimentais obtidos serão apresentados no capítulo seguinte, a caracterização físico-química, morfológica e estrutural das amostras com e sem revestimentos, os ensaios de polarização por descarga de corona e polarização por contacto, processos de imersão em SBF e de cultura celular e correspondente análise e discussão de resultados.

### **5.1. Caracterização química de Ti-6Al-4V**

#### **5.1.1. XRF**

De forma a identificar os elementos maioritariamente presentes nas amostras da liga de Titânio utilizada neste estudo, foi realizada a análise por Espectrometria de Fluorescência de Raio-X a uma das réplicas. Tendo em conta que esta análise quantitativa se encontra como percentagem em peso, os resultados mostraram que a liga apresenta uma composição final de 89,6% de Titânio, 5,49% de Alumínio, 4,59% de Vanádio, 0,125% de Ferro e 0,12% de Silício.

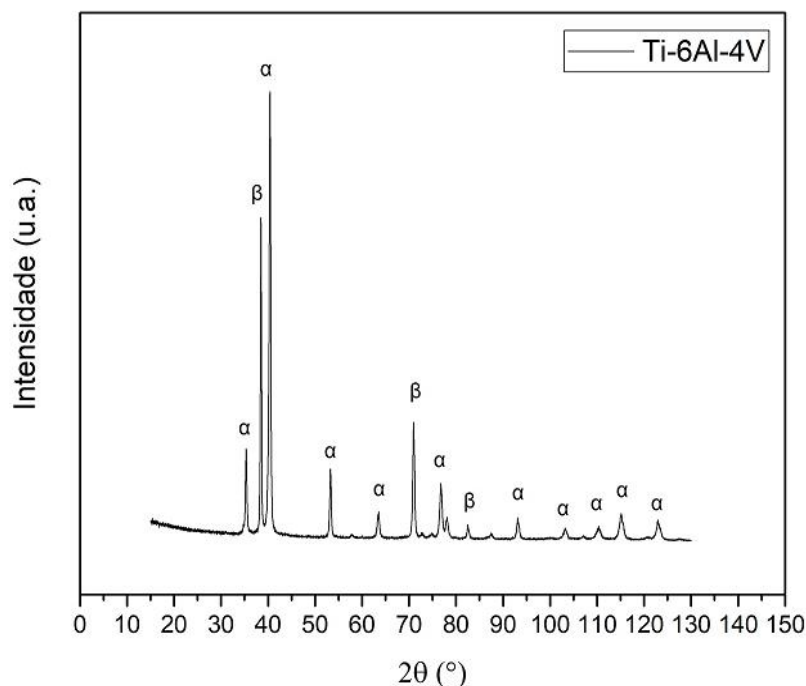
Assim, perante os resultados é possível afirmar que as amostras são liga de Ti-6Al-4V e que a composição deste substrato está de acordo com as normas ASTM (F1108-88) [40] e (F 136) [41], que especificam as faixas de concentração máxima permitida para cada componente da liga, relativamente aos implantes médicos.

### **5.2. Caracterização estrutural e morfológica das amostras antes e após revestimento**

#### **5.2.1. DRX**

Como já demonstrado em estudos anteriores, a liga de Ti-6Al-4V é conhecida por possuir estruturas cristalinas hexagonal compacta ( $\alpha$ -Ti) e cúbica de corpo centrado ( $\beta$ -Ti), presentes à temperatura ambiente [26][42].

Na figura 5.1 encontra-se exposto o difractograma de Raios-X da liga comercial Ti-6Al-4V, isto é, do substrato sem revestimento, para que se consigam identificar os picos referentes aquando da análise às amostras com revestimento.



**Figura 5.1: Difractograma obtido por DRX da amostra de Liga de Titânio (Ti-6Al-4V) sem revestimento.**

Através da interpretação da figura 5.1, é possível identificar a presença das duas fases  $\alpha$  e  $\beta$  para o Titânio e observar 14 picos com intensidades distintas. Após análise e confronto com a literatura e banco de dados das fichas do JCPDS, determinou-se a presença da fase  $\beta$  para três dos picos e os planos de reflexão para a identificação da fase  $\beta$  são: (110), (211) e (220), respectivamente [43] [44] [45]. Os picos de alumínio e vanádio encontram-se sobrepostos com alguns destes picos de Titânio, o que torna complicada a análise do espectro. Este foi um dos problemas que levou à realização da análise XRF, para assegurar a presença dos outros componentes na liga.

Nas figuras 5.2 e 5.3 estão representados os difractogramas de raios-X dos revestimentos de HAp na liga de titânio, pela técnica de *Plasma Spray* e *CoBlast™*. Através da análise aos difractogramas é perceptível a cristalinidade dos micropós de HAp, uma vez que os picos evidenciados nos correspondentes ângulos de difração se encontram definidos. Quando comparados com as fichas JCPDS, mencionadas anteriormente no subcapítulo 4.2.2., para a HAp, Titânio e Alumina pode aferir-se que não se encontram subprodutos nas amostras, depois do revestimento. No entanto, podem existir picos com componentes sobrepostos e torna-se necessário fazer comparações com os difractogramas dos componentes utilizados, para que a análise seja mais precisa.

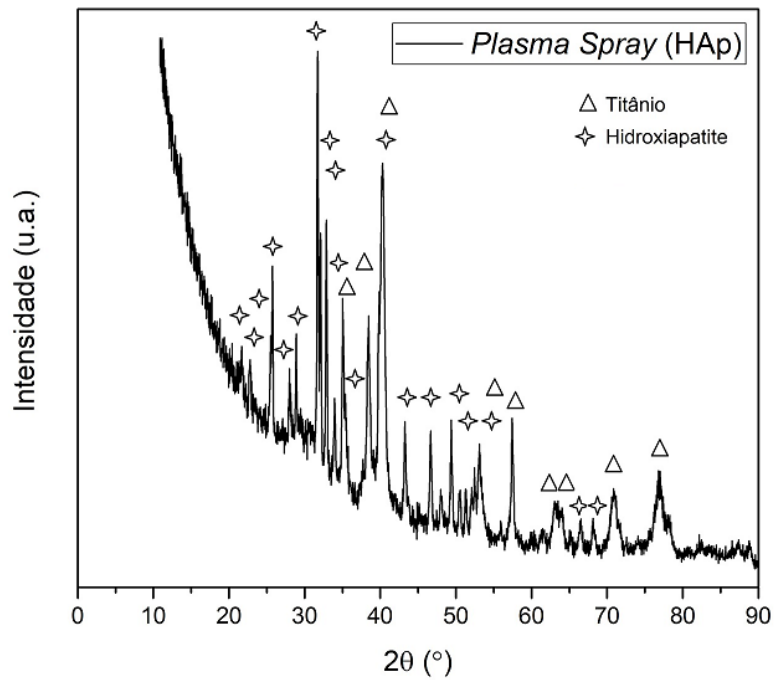


Figura 5.2: Difractograma obtido por DRX da amostra com substrato revestido de HAp, pela técnica de *Plasma Spray*.

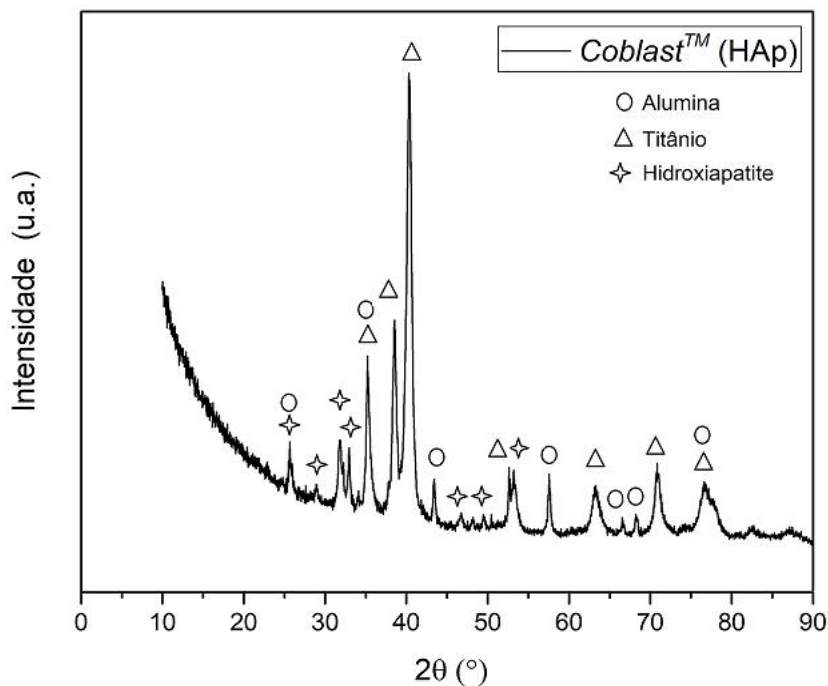
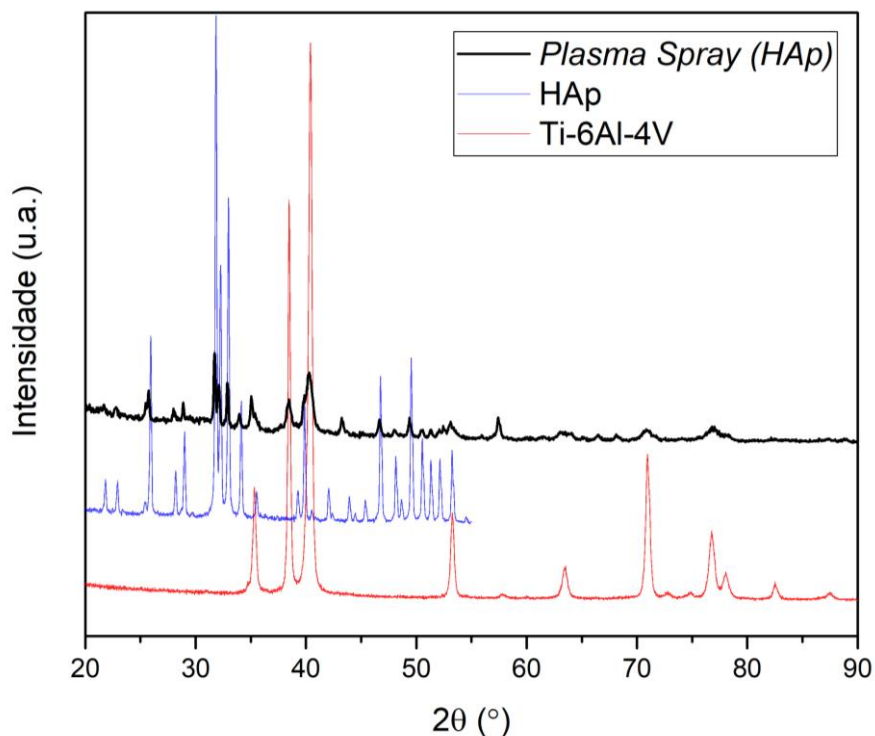


Figura 5.3: Difractograma obtido por DRX da amostra com substrato revestido de HAp, pela técnica de *CoBlast™*.

Assim, para se obterem conclusões mais sólidas e de forma a provar o que se analisou com as fichas JCPDS, fez-se a análise DRX ao pó de Alumina e aos dois pós de HAp, um deles utilizado para o processo de *Plasma Spray* e outro para o de *CoBlast™*.

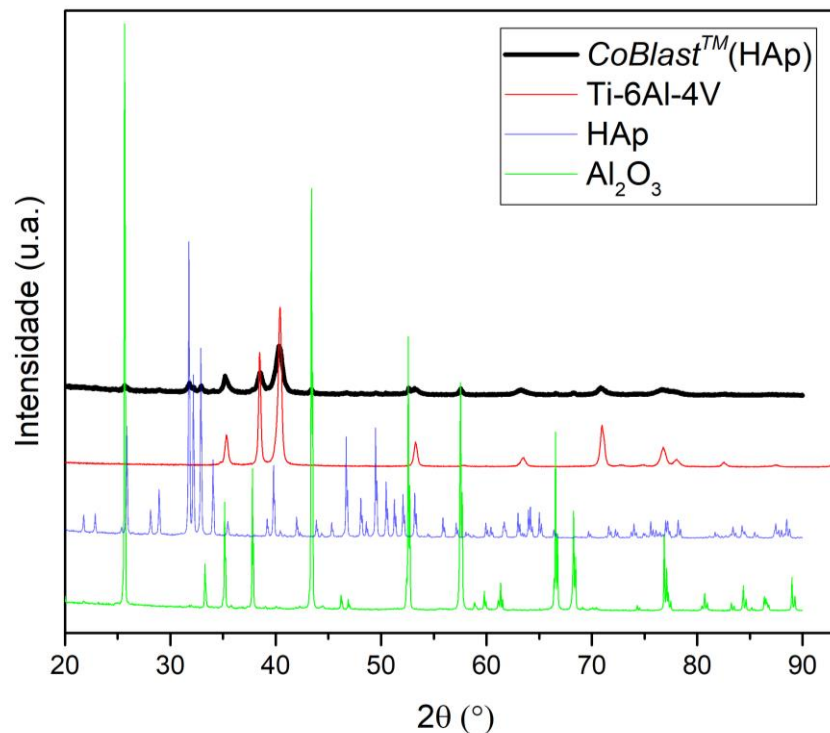
Na figura 5.4 é possível fazer uma comparação de picos ao sobrepor o difractograma da amostra revestida com HAp pela técnica de *Plasma Spray* com os difractogramas do pó de HAp utilizado neste processo e do substrato de liga de Titânio sem revestimento.



**Figura 5.4:** Sobreposição dos difractogramas da liga de Titânio sem revestimento, do pó de HAp e da amostra com revestimento de HAp produzida por *Plasma Spray* (figura 5.2).

Tal como na figura 5.4, na figura 5.5 também é possível fazer uma comparação de picos, com a sobreposição dos difractogramas do pó de HAp utilizado em *CoBlast*<sup>TM</sup>, da liga de Titânio sem revestimento e também do pó de alumina, ao difractograma da amostra revestida com HAp pela técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup>.

O difractograma 5.5 evidencia a presença de todos os compostos, enquanto o difractograma 5.4 apenas ostenta HAp e os componentes da liga de Titânio, já que o abrasivo é utilizado antes do revestimento, como projeção mecânica, e não é inserido na mistura como acontece para o revestimento pela técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup>.



**Figura 5.5:** Sobreposição dos difractogramas da liga de Titânio sem revestimento, do pó de HAp e  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e da amostra com revestimento de HAp produzida por *CoBlast*<sup>TM</sup> (figura 5.3).

Ao avaliar os gráficos da figura 5.4 e 5.5, repara-se para todos os picos dos gráficos das amostras com revestimento uma intensidade consideravelmente inferior, comparativamente com os difractogramas de cada um dos componentes. No entanto, em todos os picos existe uma correlação com os picos dos difractogramas dos componentes utilizados e, portanto, exclui-se a hipótese de formação de subprodutos, confirmando o que se tinha concluído anteriormente.

Ainda da análise dos difractogramas 5.4 e 5.5, é possível determinar o tamanho dos grãos dos cristalitos da HAp para os dois tipos de revestimento em estudo. Recorreu-se, para tal, à equação de Scherrer:

**Equação 5.1-Cálculo do diâmetro do cristalito.**

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta \sin \Theta}$$

Na equação 5.1,  $D_{hkl}$  representa o diâmetro médio do cristalito,  $k$  é uma constante de proporcionalidade que depende da forma das partículas (esfera = 0,9),  $\lambda$  o comprimento de onda dos raios-X ( $\lambda(\text{CuK}\alpha) = 1,5418 \times 10^{-10}$  m),  $\beta$  a largura a meia altura do pico de difração de maior intensidade e o  $\theta$  o ângulo que corresponde ao pico de maior intensidade [46], [47].

Assim, neste contexto, os tamanhos médios dos cristalitos que se determinaram para os revestimentos de HAp por *Plasma Spray* e *CoBlast*<sup>TM</sup> foram de aproximadamente 41,62 nm e 28,03 nm, respectivamente.

A partir dos difractogramas da análise anterior também foi possível calcular os parâmetros de rede “a” = “b” e “c” da estrutura cristalina da HAp, em relação aos planos perpendiculares (002) e (300) [48]. Para tal, e de forma a perceber se não ocorreram alterações na estrutura cristalina da rede após revestimento, recorreu-se inicialmente à Lei de Bragg:

**Equação 5.2- Lei de Bragg** [13].

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl}$$

De acordo com a equação 5.2, n é um número natural (n=1 para elétrons deslocados para a camada K), λ o comprimento de onda da radiação incidente ( $\lambda(\text{CuK}\alpha) = 1,5418 \times 10^{-10}$  m),  $d_{hkl}$  é a distância entre planos atômicos e θ o ângulo de incidência em relação ao plano considerado.

Conhecendo os parâmetros de rede (a = b = 9,4210 Å e c = 6,8970 Å) e a relação padrão entre as distâncias interplanares, definida pela equação 5.3, para uma célula unitária de um sistema hexagonal, assim como a distância entre planos atômicos, a partir da equação 5.2, torna-se possível calcular os parâmetros de rede do revestimento.

**Equação 5.3-Relação padrão entre distâncias interplanares de uma célula unitária, de um sistema hexagonal** [49].

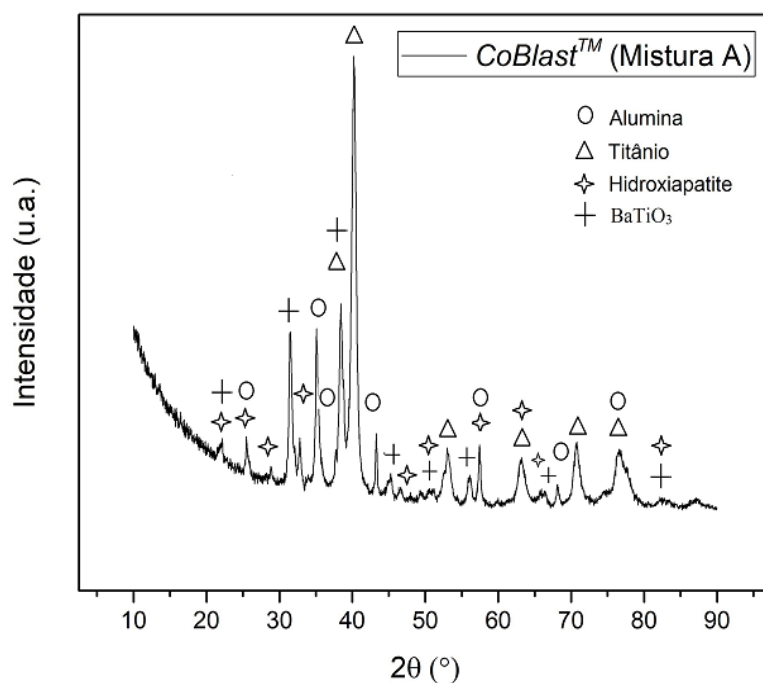
$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left( \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) \frac{l^2}{c^2}, \quad d = d_{hkl}$$

Conforme a equação anterior, d é a distância entre planos adjacentes definidos pelos índices de Miller (h k l) e os termos “a” e “c” representam os parâmetros de rede da célula unitária [47], [48], [49].

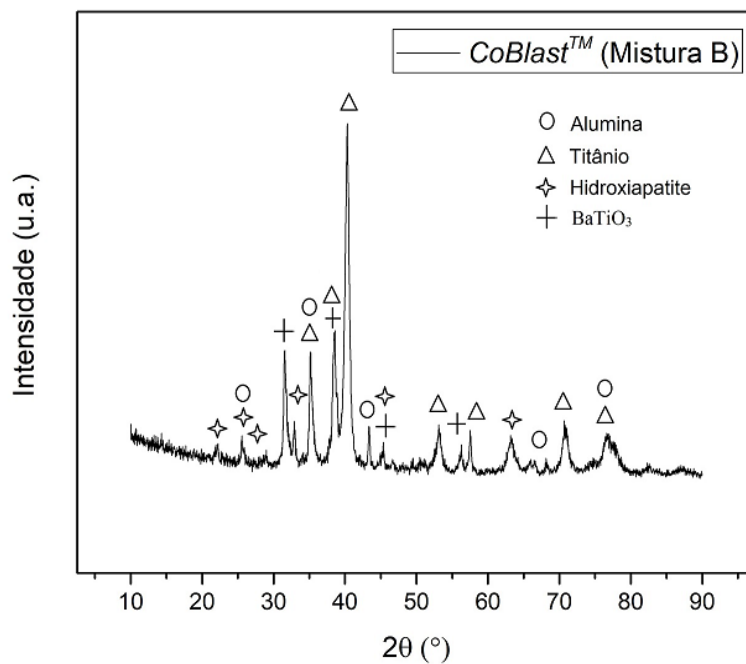
No caso de o revestimento ter sido produzido por *Plasma Spray*, os novos valores que se encontraram como parâmetros de rede foram a = b = 9,4404 Å e c = 6,9208 Å. Comparativamente com os parâmetros tabelados, estes valores sofreram um ligeiro aumento, no entanto torna-se insignificante pela sua baixa relevância. Para o *CoBlast*<sup>TM</sup>, os valores a = b = 9,7196 Å e c = 6,9472 Å são bastante idênticos aos tabelados, verificando-se novamente um ligeiro aumento em ambos os parâmetros de rede.

Logo, poderá ter ocorrido um pequeno rearranjo dos átomos mantendo-se a mesma estrutura cristalina da HAp, com ligeira alteração nos parâmetros de rede, em ambos os tipos de revestimento.

Nas figuras 5.6 e 5.7 estão representados os difractogramas de raios-X dos revestimentos de 80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de nanopós de estrutura cúbica (mistura A) e micropós de estrutura tetragonal (mistura B) na liga de titânio, pela técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup>. Através da análise aos difractogramas é perceptível a cristalinidade dos micropós de HAp e micro e nanopós de BaTiO<sub>3</sub>, uma vez que os picos evidenciados nos correspondentes ângulos de difração se encontram definidos. Quando comparados com as fichas JCPDS, mencionadas anteriormente no subcapítulo 4.2.2, para a HAp, Titânio, Alumina, BaTiO<sub>3</sub> de estrutura cúbica e tetragonal pode aferir-se que não se encontram subprodutos nas amostras, após revestimento. Contudo, existem picos com componentes sobrepostos e torna-se necessário fazer comparações com os difractogramas dos componentes utilizados, para que a análise seja mais precisa.

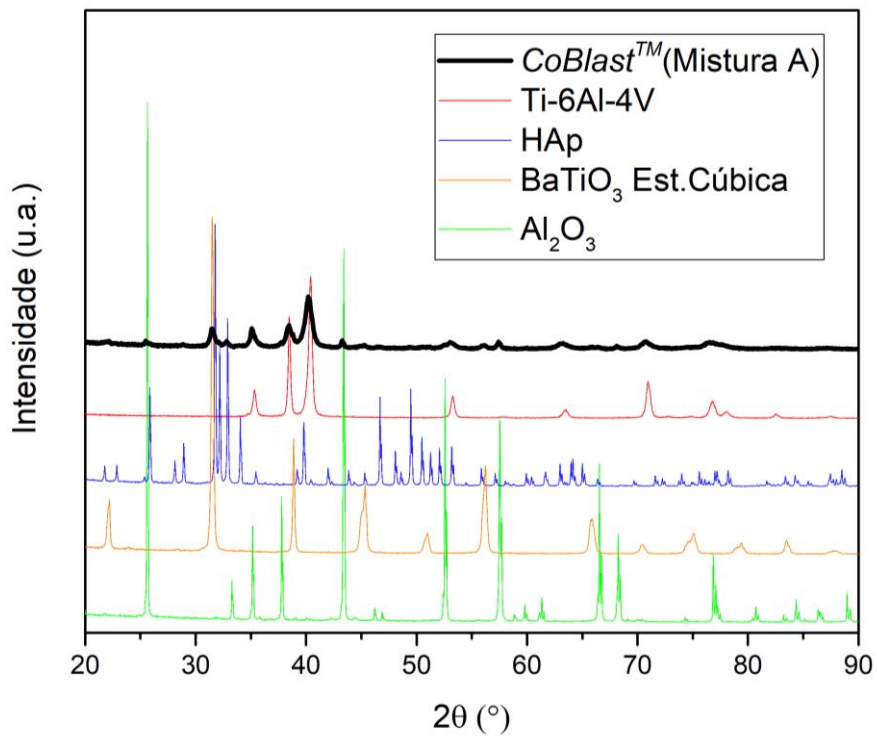


**Figura 5.6:** Difractograma obtido por DRX da amostra revestida com a mistura A, pela técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup>.



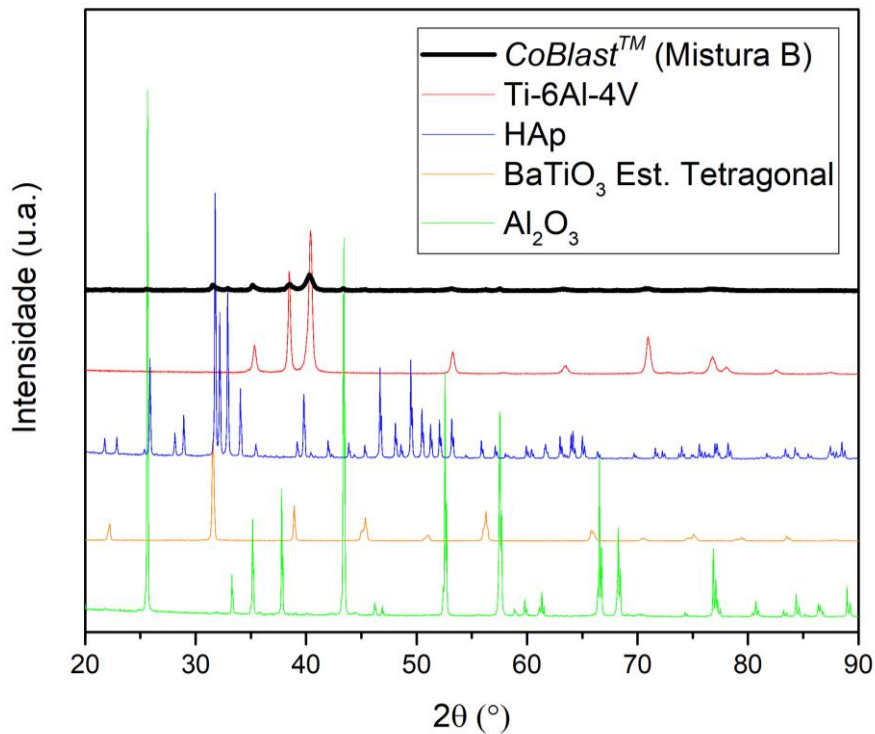
**Figura 5.7: Difractograma obtido por DRX da amostra revestida com a mistura B, pela técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup>.**

Com o objetivo de se obterem conclusões mais consistentes e de forma a provar o que se analisou com as fichas JCPDS, além das análises já realizadas ao pó de HAp e Alumina, fez-se a análise aos nanopós de BaTiO<sub>3</sub> de estrutura cúbica e aos micropós de estrutura tetragonal. Na figura 5.8 faz-se uma comparação de picos ao sobrepor o difractograma da amostra revestida com a mistura A, pela técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup>, com os difractogramas do pó de HAp, Alumina, BaTiO<sub>3</sub> de estrutura cúbica e do substrato da liga de Ti-6Al-4V.



— Figura 5.8: Sobreposição dos difractogramas da liga de Titânio sem revestimento, do pó de HAp,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{BaTiO}_3$  e da amostra revestida com a mistura A (figura 5.6).

Na figura 5.9 a comparação de picos é equivalente à da figura 5.8, uma vez que a diferença reside no difractograma do pó de  $\text{BaTiO}_3$ , que corresponde à estrutura tetragonal.



**Figura 5.9:** Sobreposição dos difractogramas da liga de Titânio sem revestimento, do pó de HAp, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, BaTiO<sub>3</sub> e da amostra revestida com a mistura B (figura 5.7).

Durante esta análise, volta a verifica-se, para todos os picos do gráfico da amostra revestida, uma intensidade consideravelmente inferior mas, qualquer que seja o pico, possui uma correlação com picos dos difractogramas dos componentes usados. Conclui-se, após produção de cada um dos quatro tipos de revestimento e análise DRX, a ausência de formação de subprodutos.

Prossegue-se a análise aos difractogramas 5.8 e 5.9, onde se determina o diâmetro médio dos grãos dos cristalitos de HAp e de BaTiO<sub>3</sub> para os dois novos tipos de revestimento sob investigação. Recorreu-se, para tal, à equação de *Scherrer* (Equação 5.1). Assim sendo, para o revestimento com a mistura A por *CoBlast*<sup>TM</sup>, os tamanhos médios dos cristalitos que se calcularam foram de, aproximadamente, 21,03 nm para grãos de HAp e 17,14 nm para grãos de nanopós de BaTiO<sub>3</sub> com estrutura cúbica. Quanto ao revestimento com a mistura B, determinaram-se diâmetros médios para os grãos de HAp de 12,94 nm e para os grãos de micropós de BaTiO<sub>3</sub> com estrutura tetragonal de 18,40 nm.

Sabendo que quanto maior o tamanho do cristalito maior o grau de cristalinidade [50], pode afirmar-se que o revestimento produzido por *Plasma Spray* apresenta um grau de cristalinidade superior aos revestimentos produzidos por *CoBlast*<sup>TM</sup>. Isto pode dever-se ao facto da

técnica de *Plasma Spray* se aplicar a altas temperaturas, fazendo com que ocorra um aumento do tamanho dos cristalitos, por coalescência, com o aumento da temperatura.

Comparando apenas os revestimentos por *CoBlast*<sup>TM</sup>, verifica-se para amostras revestidas apenas com HAp maior cristalinidade, seguindo-se as amostras revestidas com a mistura A e, por fim, com a mistura B. Quanto aos grãos de BaTiO<sub>3</sub>, como era expectável, atingem dimensões superiores para a mistura B, isto porque, se utilizaram micropós para a mistura B e nanopós para a mistura A.

A partir dos difractogramas 5.6 e 5.7 e, tal como, para os difractogramas 5.2 e 5.3, também foi possível calcular os parâmetros de rede “a” = “b” e “c” da estrutura cristalina da HAp, em relação aos planos perpendiculares (002) e (300) [48]. Para a estrutura cristalina do BaTiO<sub>3</sub> de estrutura cubica calcularam-se os parâmetros “a” = “b” = “c” em relação ao plano (110) e para a estrutura tetragonal os parâmetros “a” = “b” e “c” em relação aos planos (110) e (002).

Ao identificar os parâmetros de rede da HAp (a = b = 9,4210 Å e c = 6,8970 Å) e do BaTiO<sub>3</sub> de estrutura cúbica (a = b = c = 4,006(2) Å) e de estrutura tetragonal (a = b = 4,0065 Å e c = 4,017 Å), a relação padrão entre as distâncias interplanares (equações 5.3-5.5), assim como a distância entre planos atômicos (equação 5.2), torna-se possível calcular os parâmetros de rede de cada revestimento.

**Equação 5.4 -Relação padrão entre distâncias interplanares de uma célula unitária, de um sistema cúbico [49].**

$$\frac{1}{d^2} = \frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2}, \quad d = d_{hkl}$$

**Equação 5.5-Relação padrão entre distâncias interplanares de uma célula unitária, de um sistema tetragonal [49].**

$$\frac{1}{d^2} = \frac{h^2 + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2}, \quad d = d_{hkl}$$

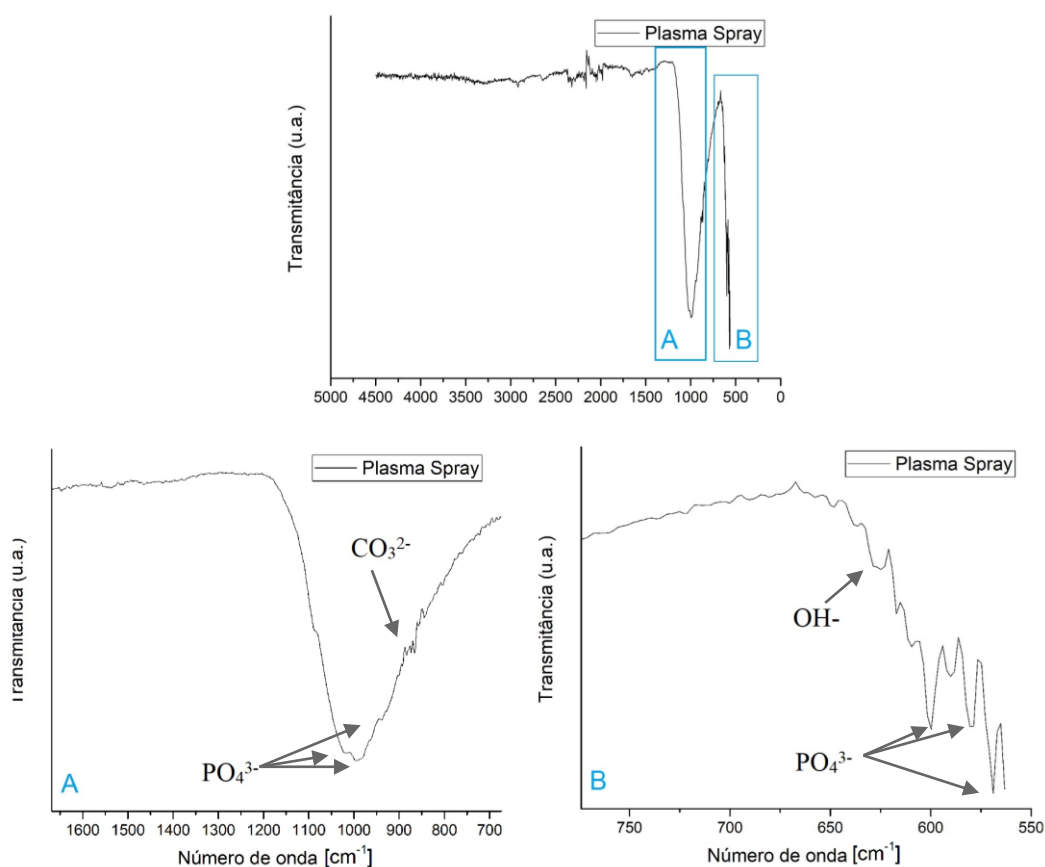
No caso do revestimento com a mistura A, os novos valores que se encontraram como parâmetros de rede da HAp foram a = b = 9,4552 Å e c = 6,9929 Å e a = b = 9,4237 Å e c = 6,8804 Å para o revestimento com a mistura B. Para o BaTiO<sub>3</sub> de estrutura cúbica e tetragonal determinou-se que a = b = c = 4,0099 Å e que a = b = 4,0059 Å e c = 3,9953 Å, respetivamente. Comparativamente com os parâmetros tabelados, pode afirmar-se que os parâmetros sofreram ligeiros aumentos para a mistura A e leves decréscimos para a mistura B.

Logo, poderá ter ocorrido um pequeno rearranjo dos átomos de HAp e de BaTiO<sub>3</sub> conservando a mesma estrutura cristalina inicial, com ligeira alteração nos parâmetros de rede, em ambos os tipos de revestimento.

### 5.2.2. FTIR

Com o objetivo de se identificar a presença dos grupos funcionais característicos dos diferentes revestimentos das amostras de Ti-6Al-4V, procedeu-se à análise do espectro de infravermelho por transformada de Fourier. Nas figuras 5.10 a 5.13 encontram-se representados os espectros resultantes das análises FTIR aos quatro tipos de revestimentos produzidos. As identificações dos materiais nas figuras apresentadas foram efetuadas de acordo com modos de vibração de FTIR específicos e tabelados para cada um dos materiais [13], [14], [38], [51]–[54].

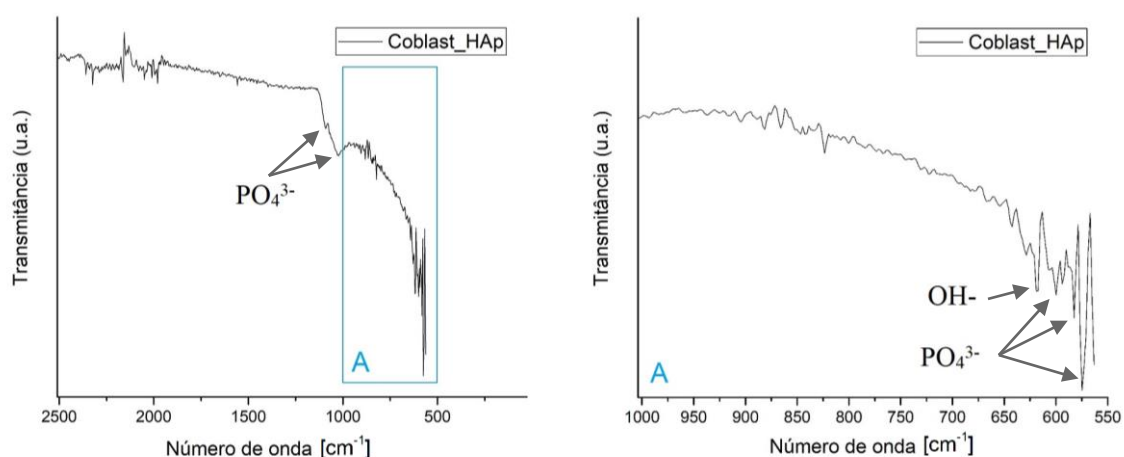
O espectro FTIR do revestimento de HAp produzido por *Plasma Spray* encontra-se representado na figura 5.10 com a respetiva identificação dos modos de vibração FTIR característicos desta cerâmica.



**Figura 5.10:** Espectro de FTIR obtido para a amostra com revestimento de HAp, por *Plasma Spray*, com ampliação do espectro nas zonas de interesse (A) e (B).

Ao analisar o espectro obtido para o revestimento de HAp, é possível identificar os picos mais intensos da HAp cristalina que são atribuídos a vibrações do grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Estes picos encontram-se numa banda larga centrada em números de onda da ordem dos  $1000\text{cm}^{-1}$  e  $1100\text{cm}^{-1}$  e dão a indicação de formação de uma estrutura apatítica. Uma das bandas atribuídas ao modo de *stretching* de grupos  $\text{OH}^-$  na HAp é observada no pico a  $630\text{cm}^{-1}$  do espectro. A banda com números de onda na região de  $1000\text{cm}^{-1}$  corresponde ao *stretching* simétrico dos iões  $\text{PO}_4^{3-}$ , surgindo na região entre  $960\text{cm}^{-1}$  e  $1100\text{cm}^{-1}$  o pico de vibração de maior intensidade deste grupo. As bandas centradas em números de onda de  $570\text{cm}^{-1}$ ,  $580\text{cm}^{-1}$  e  $600\text{cm}^{-1}$  correspondem ao *stretching* assimétrico dos iões  $\text{PO}_4^{3-}$ . O modo de vibração  $\text{CO}_3^{2-}$  que se observa na banda a  $870\text{cm}^{-1}$  sugere a presença de hidroxiapatite carbonatada do tipo B, que é caracterizada pela substituição de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  por grupos de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) [13], [14], [54], [55]. Assim, de um modo geral, pode constatar-se que este revestimento não possui impurezas, apresentando todos os picos de transmitância característicos desta biocerâmica na sua forma estequiométrica.

Na figura 5.11 expõe-se o espectro de FTIR do revestimento de HAp produzido por *CoBlast™*.

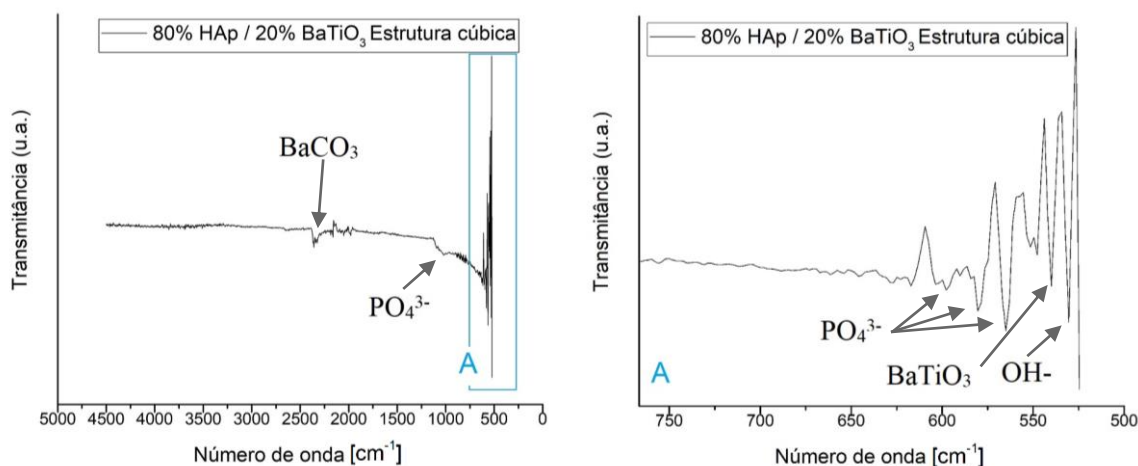


**Figura 5.11: Espectro de FTIR obtido para a amostra com revestimento de HAp, por *CoBlast™*, com ampliação do espectro na zona de interesse (A).**

Através da análise dos espectros da figura 5.11, observa-se a formação do pico principal do grupo fosfato centrado em  $1025\text{cm}^{-1}$ , na banda com números de onda entre  $960\text{cm}^{-1}$  e  $1100\text{cm}^{-1}$ , que é o pico mais intenso de entre os modos de vibração dos grupos fosfato. Verifica-se também a presença de outros três picos, a  $575\text{cm}^{-1}$ ,  $580\text{cm}^{-1}$  e  $600\text{cm}^{-1}$  pertencentes ao *stretching* assimétrico dos iões  $\text{PO}_4^{3-}$ . A banda atribuída ao modo de *stretching* de grupos  $\text{OH}^-$  na HAp é observada no pico a  $620\text{cm}^{-1}$  do espectro. Logo, o espectro de FTIR da amostra após revestimento apresenta todos os picos de absorção característicos da HAp estequiométrica. No entanto, ao comparar os picos de vibração de maior intensidade do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  para ambos os

revestimentos de HAp, verifica-se uma diminuição da sua intensidade para os revestimentos por *CoBlast*<sup>TM</sup>.

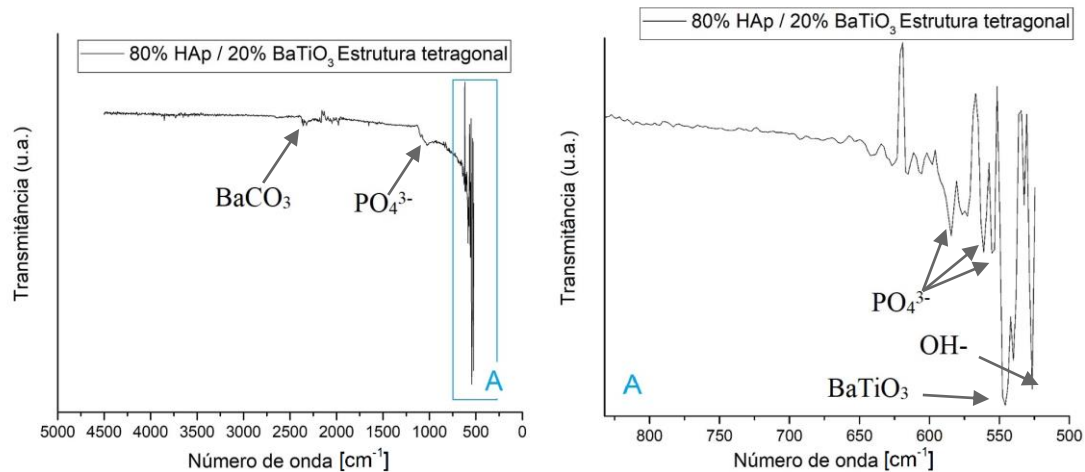
O espectro de FTIR da amostra revestida com 80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de nanopós de estrutura cúbica, produzido por *CoBlast*<sup>TM</sup>, encontra-se representado na figura 5.12.



**Figura 5.12:** Espectro de FTIR obtido para a amostra revestida com a mistura A, por *CoBlast*<sup>TM</sup>, com ampliação do espectro na zona de interesse (A).

A banda com números de onda na região de  $1000\text{cm}^{-1}$  corresponde ao *stretching* simétrico dos iões  $\text{PO}_4^{3-}$ , surgindo na região entre  $960\text{cm}^{-1}$  e  $1100\text{cm}^{-1}$  o pico de vibração de maior intensidade deste grupo. As bandas centradas em números de onda de  $565\text{cm}^{-1}$ ,  $580\text{cm}^{-1}$  e  $600\text{cm}^{-1}$  correspondem ao *stretching* assimétrico dos iões  $\text{PO}_4^{3-}$ . Uma das bandas atribuídas ao modo de *stretching* de grupos  $\text{OH}^-$  é observada no pico a  $530\text{cm}^{-1}$  do espectro e a banda de absorção a  $540\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída a  $\text{BaTiO}_3$  cristalino. O pico com valores de número de onda na região de  $2400\text{cm}^{-1}$  pode estar relacionado com um dos picos característicos de vibrações de carbonatos, que é um indício do problema na síntese do  $\text{BaTiO}_3$  que é o carbonato residual.

O espectro de FTIR da amostra revestida com 80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de micropós de estrutura tetragonal, produzido por *CoBlast*<sup>TM</sup>, encontra-se representado na figura 5.13.



**Figura 5.13: Espectro de FTIR obtido para a amostra revestida com a mistura B, por *CoBlast™*, com ampliação do espectro na zona de interesse (A).**

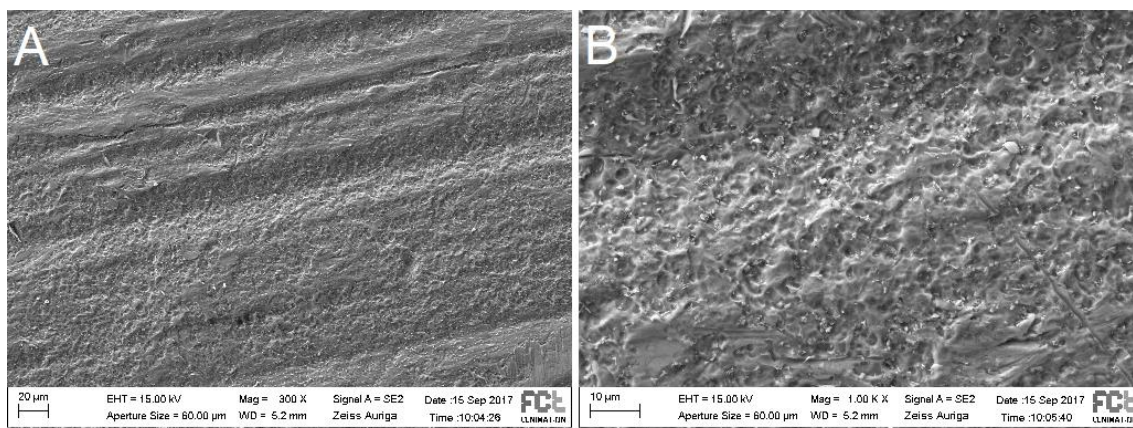
A formação do pico principal do grupo fosfato encontra-se centrado em  $1025\text{cm}^{-1}$ , na banda com números de onda entre  $960\text{cm}^{-1}$  e  $1100\text{cm}^{-1}$ , que é o pico mais intenso de entre os modos de vibração dos grupos fosfato. Verifica-se também a presença de outros três picos, a  $555\text{cm}^{-1}$ ,  $560\text{cm}^{-1}$  e  $584\text{cm}^{-1}$  pertencentes ao *stretching* assimétrico dos iões  $\text{PO}_4^{3-}$ . Uma das bandas atribuídas ao modo de *stretching* de grupos  $\text{OH}^-$  é observada no pico a  $526\text{cm}^{-1}$  do espectro e a banda de absorção a  $545\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída a  $\text{BaTiO}_3$  cristalino. O pico com valores de número de onda na região de  $2400\text{cm}^{-1}$  volta a manifestar-se e pode estar relacionado com um dos picos característicos de vibrações de carbonato, no entanto, a sua intensidade diminui, o que sugere que para micropós de  $\text{BaTiO}_3$  com estrutura tetragonal a quantidade total de carbonato diminui.

Pelas observações dos espectros de FTIR das figuras 5.12 e 5.13, é também possível verificar que não há deslocamento das bandas características da HAp ou do  $\text{BaTiO}_3$ , o que pressupõe a não existência de qualquer interação física entre os dois materiais. Assim, as misturas são capaz de incorporar as características específicas de cada um dos componentes sem alterações.

## 5.2.3. SEM/EDS

### 5.2.3.1. Substrato metálico de Ti-6Al-4V

Na figura 5.14 estão expostas duas imagens de SEM da superfície da amostra de Ti-6Al-4V, sem revestimento, de modo a se meio de comparação para com as superfícies das amostras com revestimento.

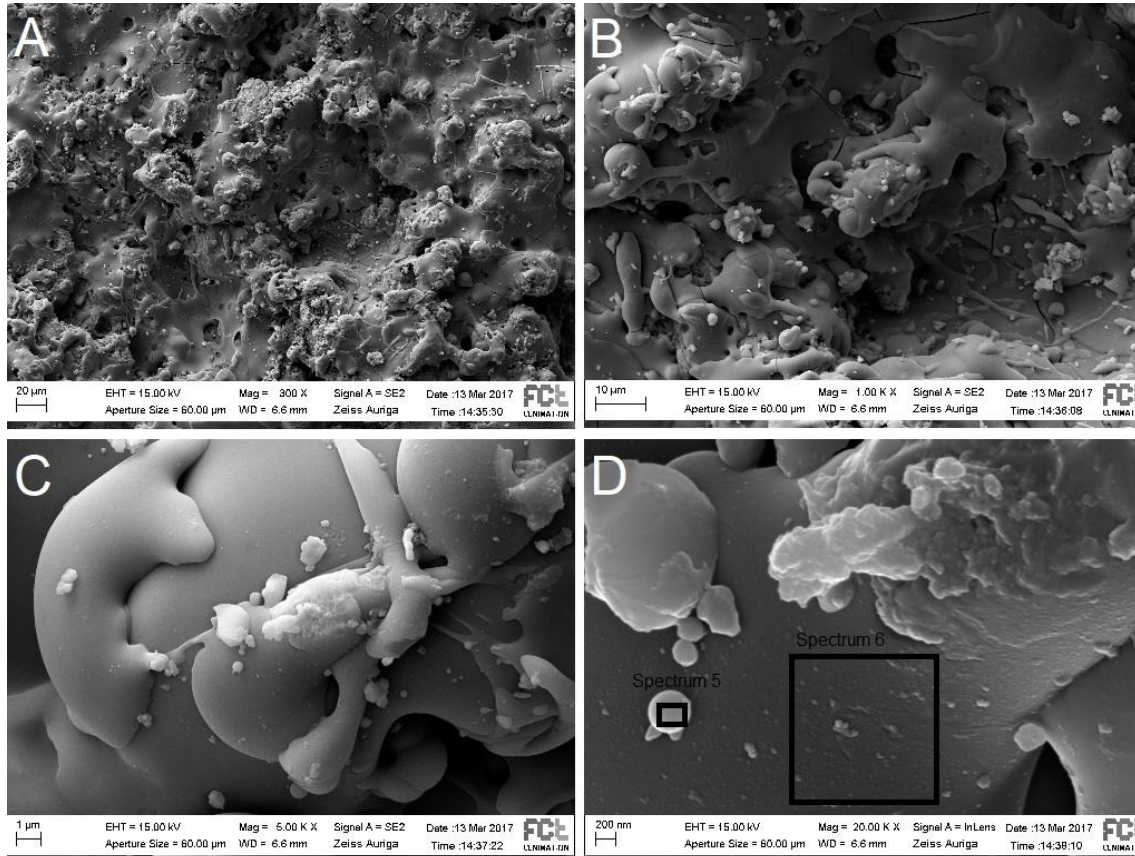


**Figura 5.14: Imagens de SEM obtidas para as amostras sem revestimento, com diferentes ampliações: A) 300X e B) 1000x.**

Ao analisar cada uma das imagens da figura 5.14, é possível observar-se uma superfície regular e um grau de rugosidade, relativamente, baixo. Através da análise EDS por mapeamento e, como verificado na análise química, o substrato é constituído por Titânio, Alumínio, Vanádio, Silício e Ferro.

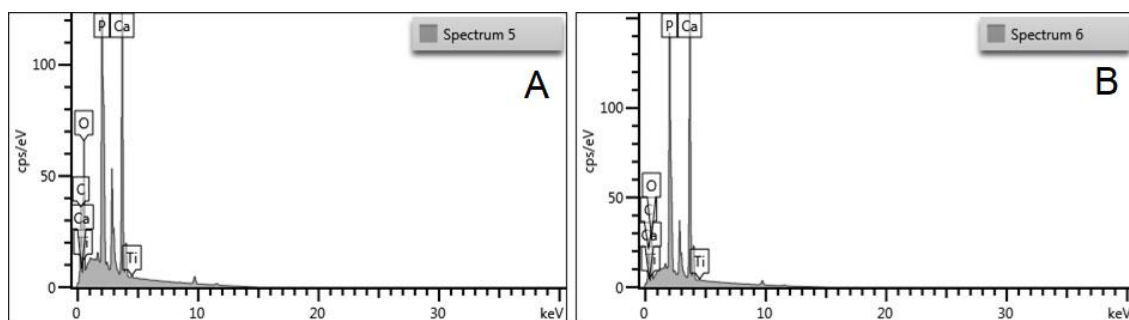
### **5.2.3.2. Revestimento de HAp por *Plasma Spray***

As imagens de SEM da figura 5.15 representam o revestimento de HAp produzido pela técnica de *Plasma Spray* e mostram 4 níveis de detalhe da sua superfície. Em relação às imagens com menor detalhe, pode afirmar-se que a superfície apresenta morfologia irregular, rugosidade e partículas de HAp depositadas como gotículas sobre o substrato. Pela análise das imagens C e D, percebe-se que as partículas de HAp depositadas como gotículas na superfície do substrato são abundantes e formam uma camada com pequenos fragmentos e “salpicos” arredondados. Isto significa que os micropós de HAp atingem o substrato de Ti-6Al-4V na forma líquida ou em estado pastoso, para que na etapa de transferência vão solidificando e ao atingir o substrato adquiram forma plana. Observa-se também na figura B que o revestimento contém fissuras que, embora não apresentem problemas à osseointegração, podem diminuir a aderência e a coesão das camadas de HAp. As fissuras ocorrem devido ao aquecimento do substrato pelo calor transferido pelo plasma, produzindo dilatação do substrato e diferenças de tensões que lhes dão origem, durante a solidificação das partículas [56].



**Figura 5.15:** Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas de HAp, pela técnica de *Plasma Spray*, com diferentes ampliações: A) 300x; B) 1000x; C) 5000x e D) 20000x.

Na figura 5.16 mostram-se os espectros EDS de duas zonas da amostra, representadas na imagem D da figura 5.15. O espectro A (*Spectrum 5*) corresponde à zona de uma partícula de HAp e o espectro B (*Spectrum 6*) corresponde a uma zona com camada contínua de revestimento com pequenos “salpicos”.



**Figura 5.16:** Espectros de EDS de duas zonas distintas da superfície, assinaladas na imagem D da figura 5.15: A) partícula de HAp e B) camada de revestimento com pequenos “salpicos”.

Na análise dos espectros A e B identifica-se maioritariamente HAp, devido aos picos de maior intensidade de Ca, P e O e Ca/P igual a 1,67, ao passo que, os picos de Ti correspondem ao substrato.

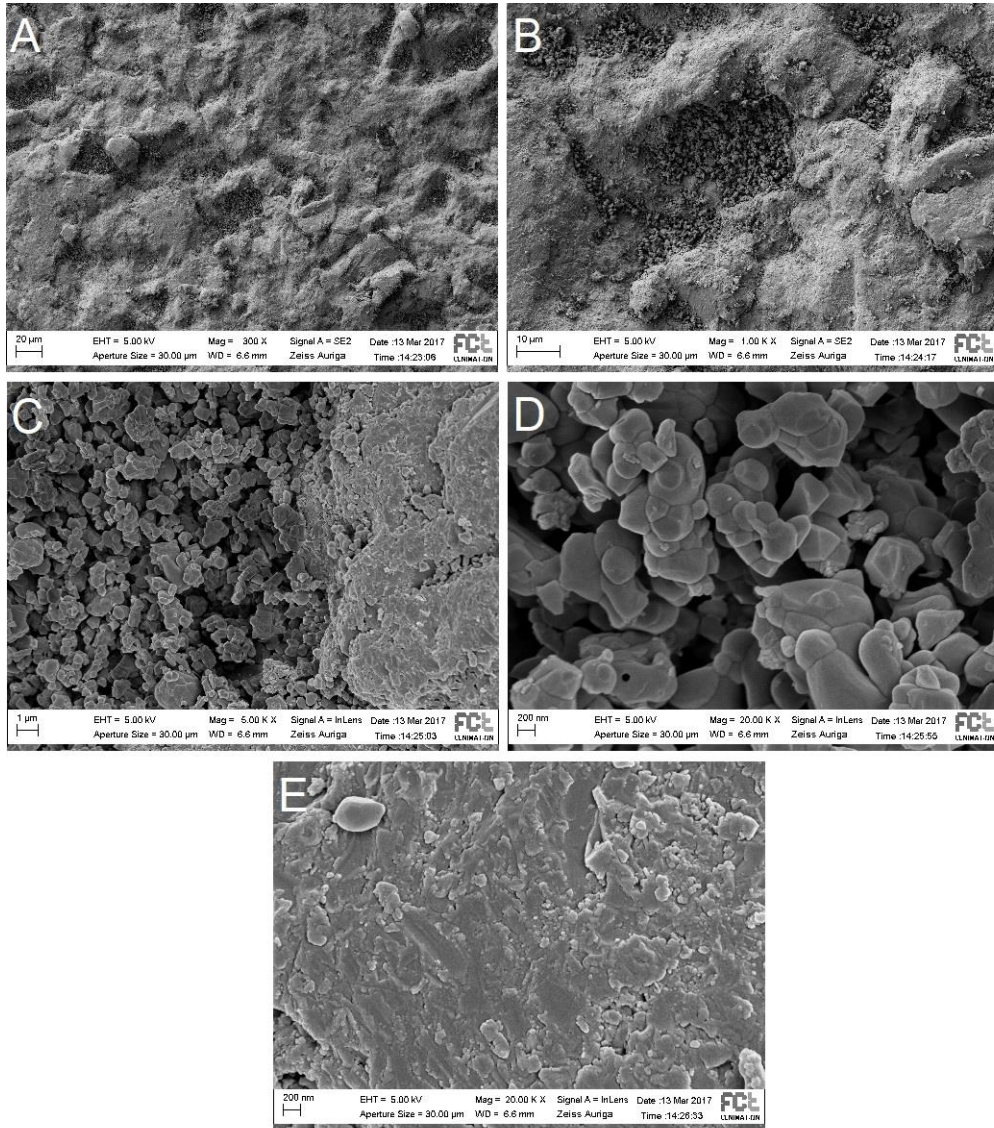
Espera-se que as superfícies obtidas e apresentadas na figura 5.15 apresentem uma boa resposta biológica porque possuem sulcos em grande número, com diferentes profundidades e larguras [57].

### **5.2.3.3. Revestimentos por *CoBlast*<sup>TM</sup>**

A técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup> foi desenvolvida para resolver problemas associados com técnicas de revestimento de alta temperatura, como a formação de fases indesejadas, amorfização e baixa adesão do revestimento[58].

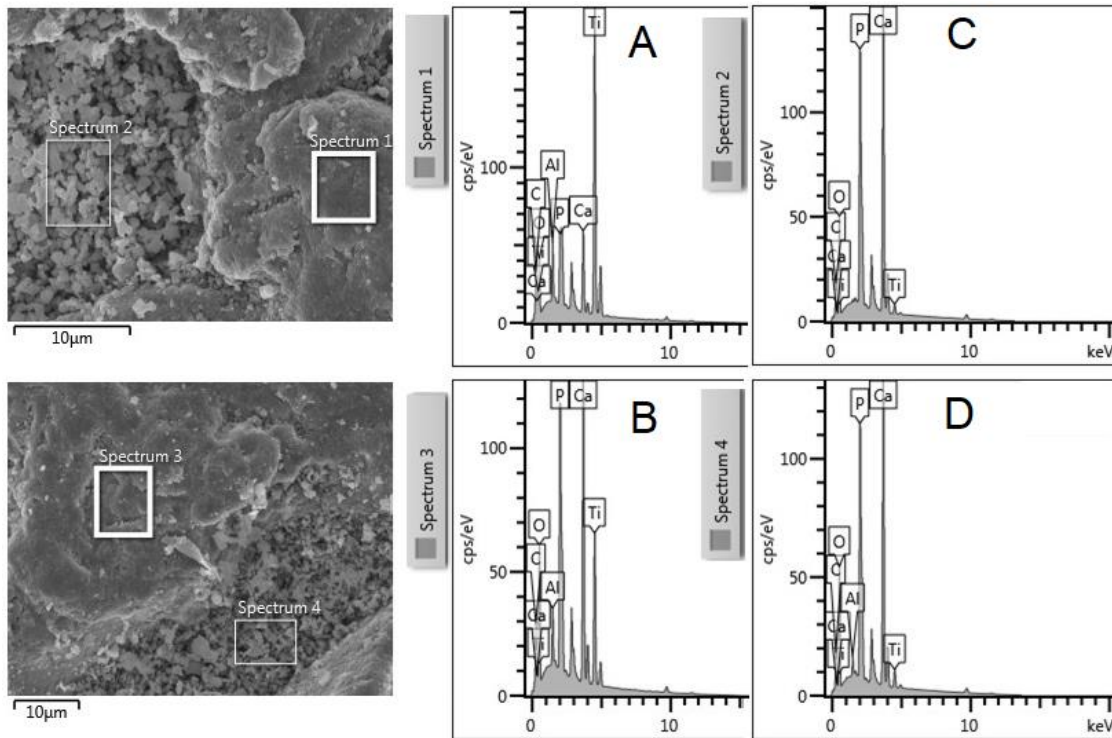
#### **5.2.3.3.1. Hidroxiapatite**

Na figura 5.17 observam-se as imagens de SEM resultantes da análise da superfície do revestimento de HAp, produzido por *CoBlast*<sup>TM</sup>, com diferentes resoluções. Analisando as imagens A e B, com menores ampliações, verifica-se que a superfície é menos rugosa, comparativamente com o revestimento de *Plasma Spray*, imagens A e B da figura 5.15. O revestimento mostra ser menos compacto e com bastantes grânulos na superfície. De forma mais detalhada, consegue perceber-se que o revestimento possui zonas com grandes aglomerados de partículas que formam praticamente uma zona plana de revestimento, mas também possui zonas com várias partículas depositadas umas sobre as outras que criam espaços vazios entre elas, uma vez que não se fundem para formar uma única camada, como se pode observar pelas imagens D e E. As partículas que se observam podem ser de HAp ou de alumina, usada para remover a camada de óxido de titânio do substrato metálico, e as suas fragmentações são aparentes porque não se visualizam grãos grandes a formar o revestimento.



**Figura 5.17: Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas de HAp, pela técnica de *CoBlas-t<sup>TM</sup>*, com diferentes ampliações: A) 300x; B) 1000x; C) 5000x; D) Superfície granulosa a 20000x e E) Superfície plana a 20000x.**

Perante a análise EDS, de diferentes regiões da amostra, é possível apurar se ocorreu ou não a formação de novas fases para a HAp. Na figura 5.18 analisaram-se quatro espectros, o espectro A e B (*Spectrum 1 e 3*) correspondem a zonas em que o revestimento é, consideravelmente, mais uniforme e os espectros C e D (*Spectrum 2 e 4*) a zonas em que ocorrem deposições de partículas granulosas e pouco aglomeradas.

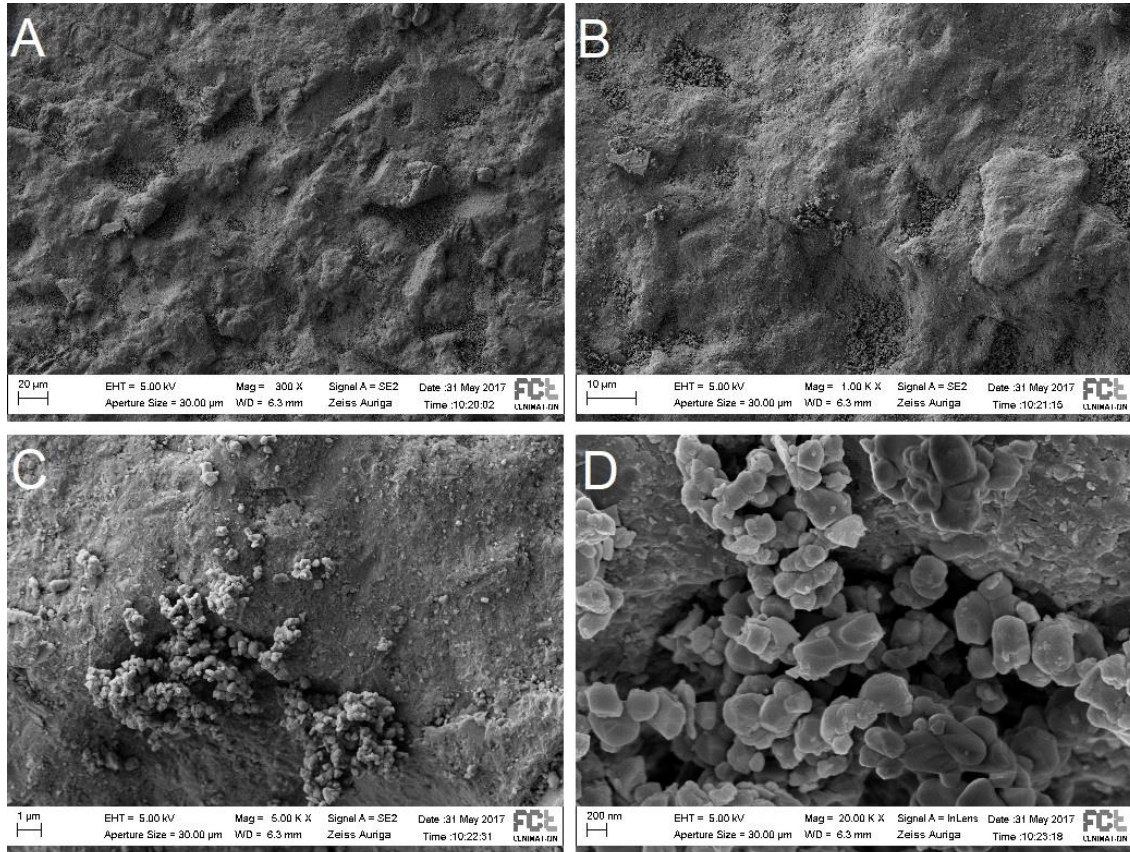


**Figura 5.18:** Espectros de EDS resultantes da análise a zonas distintas da amostra, o espectro A e B são de zonas de revestimento consideravelmente mais uniformes, enquanto o espectro C e D de zonas com deposições granulosas e pouco aglomeradas.

Calcularam-se, para cada um dos espectros, as proporções Ca/P e todos mostraram a existência de HAp, exceto para o espectro A, que revelou a formação de fosfato tetracálcico (TeCP). A detecção de Al, Ti e O referem-se ao substrato de titânio de grau 5 e ao abrasivo ( $Al_2O_3$ ).

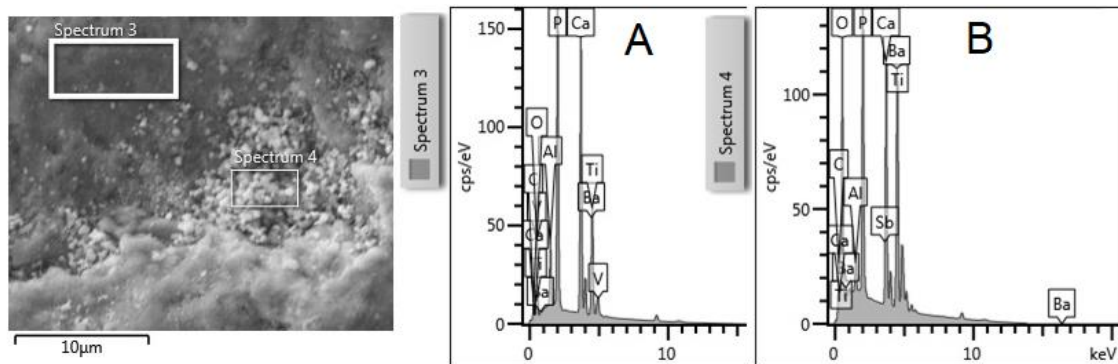
#### 5.2.3.3.2. Mistura A: Revestimento de 80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de nanopós de estrutura cúbica

As imagens de SEM da figura 5.19 representam a superfície das amostras revestidas com a mistura A (80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de nanopós de estrutura cúbica), produzida por *CoBlast™*, e apresentam-se com 4 ampliações distintas. A morfologia das superfícies com menores ampliações, imagens A e B, é equivalente à que se observa para o revestimento de HAp produzido pela mesma técnica. Para as imagens C e D, verifica-se novamente regiões da superfície do revestimento em que ocorrem deposições de partículas granulosas e pouco aglomeradas, mesmo que, em menor quantidade.



**Figura 5.19:** Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas com a mistura A, pela técnica de *CoBlast™*, com diferentes ampliações: A) 300x; B) 1000x; C) 5000x e D) 20000x.

Face à análise EDS, de diferentes regiões da amostra, é possível apurar se ocorreu ou não a formação de novas fases para a HAp, mediante esta nova mistura. Na figura 5.20 analisaram-se dois espectros, o espectro A (*Spectrum 3*) corresponde a uma das zonas em que o revestimento é mais uniforme e o espectro B (*Spectrum 4*) à zona em que ocorrem deposições de partículas granulosas.

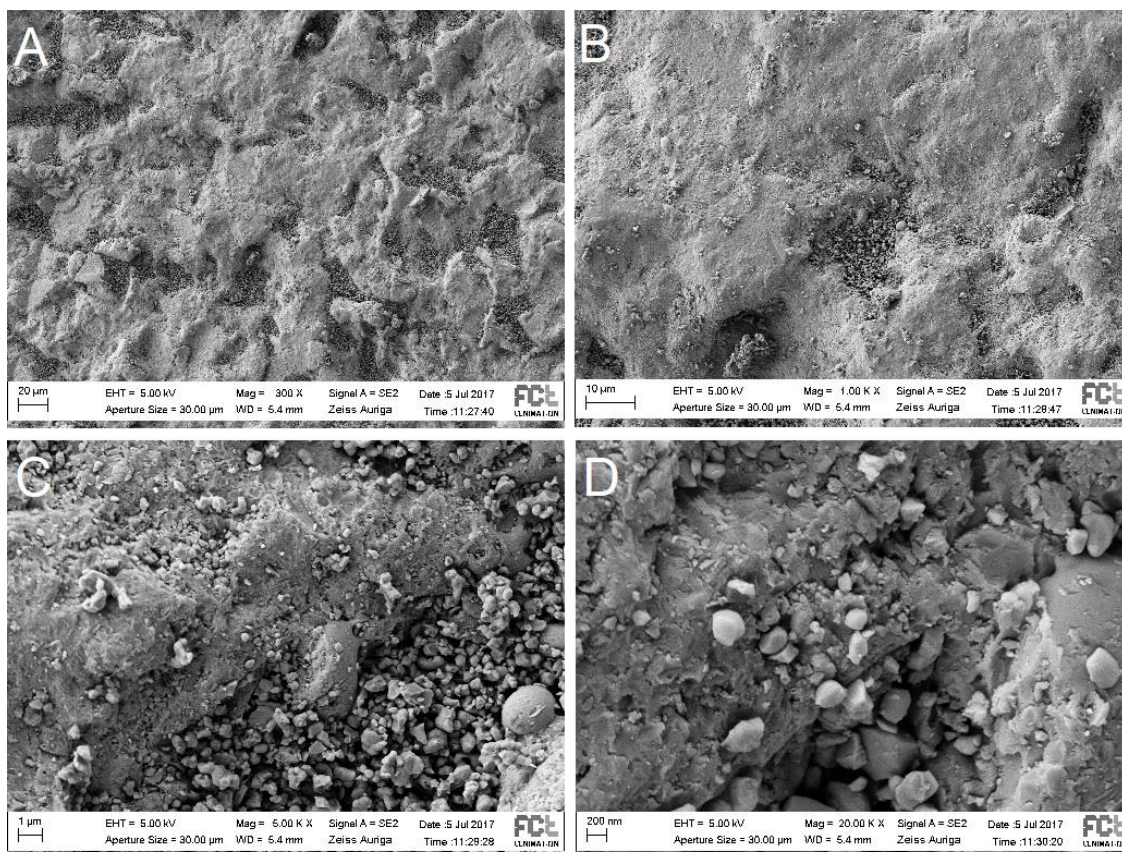


**Figura 5.20:** Espectros de EDS de duas zonas distintas da superfície, o espectro A é de uma zona de revestimento mais uniforme, enquanto o espectro B de uma zona com deposições granulosas.

As razões molares Ca/P que se calcularam para os dois espectros foram aproximadamente de 1 o que significa que as apatites que se formaram, após revestimento, foram uma ou mais das seguintes: Mono-hidrogénio fosfato de cálcio dihidratado, Mono-hidrogénio fosfato de cálcio, Pirofosfato de cálcio e/ou Pirofosfato de cálcio dihidratado [59]. As partículas que se observam de forma detalhada na imagem D da figura 5.19 podem ser apatites (enumeradas anteriormente), de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e nanopós de  $\text{BaTiO}_3$ . A deteção de outros elementos como V, Al, Ti e O refere-se ao substrato de Ti-6Al-4V e à alumina.

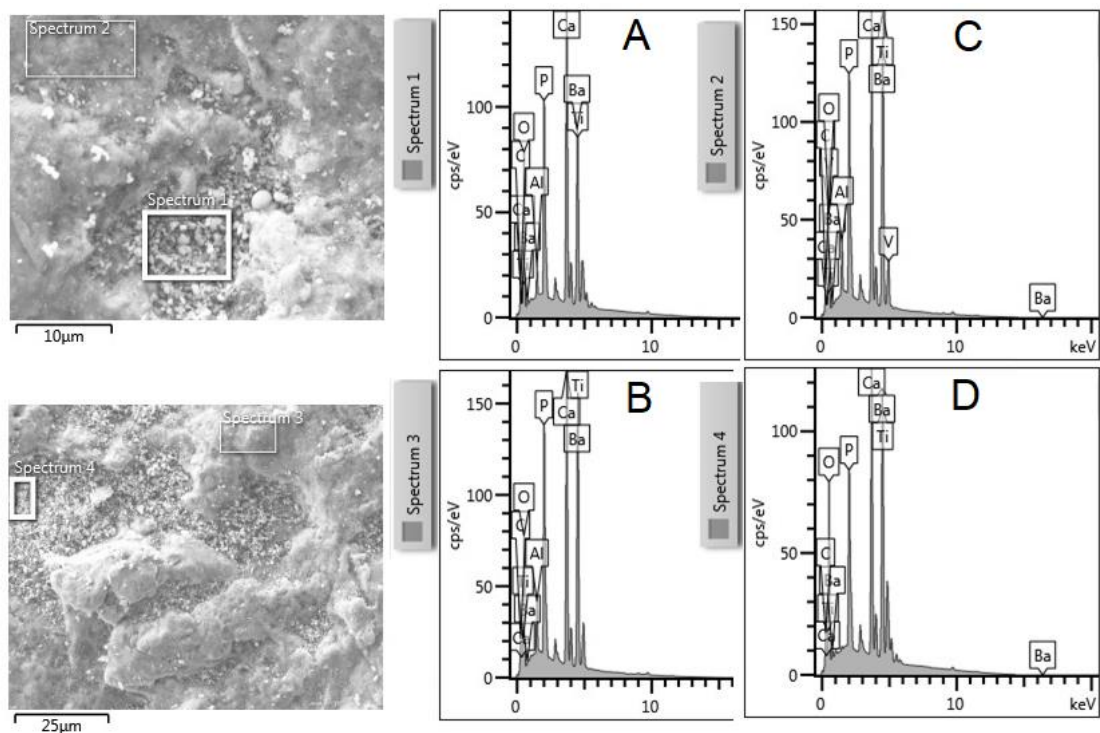
#### **5.2.3.3.3. Mistura B: Revestimento de 80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de micropós de estrutura tetragonal**

Nas imagens de SEM da figura 5.21 revela-se a superfície do revestimento das amostras revestidas com a mistura B (80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de micropós de estrutura tetragonal), por *CoBlast<sup>TM</sup>*, e expõem-se 4 resoluções diferentes. A morfologia das superfícies com menores ampliações, imagens A e B, é equivalente à que se observa para os revestimentos com HAp e com a mistura A, produzidos pela mesma técnica. Para as imagens C e D, tal como nos dois revestimentos anteriores, observam-se regiões da superfície do revestimento em que ocorrem deposições de partículas granulosas e pouco aglomeradas, no entanto, a diferença que se destaca é a existência de partículas esbranquiçadas espalhadas pela superfície do revestimento.



**Figura 5.21: Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas com a mistura B, pela técnica de *CoBlast™*, com diferentes ampliações: A) 300x; B) 1000x; C) 5000x e D) 20000x.**

Considerando a análise EDS, de diferentes regiões da amostra, é possível apurar se ocorreu ou não a formação de novas fases para a HAp, após deposição da mistura B. Na figura 5.22 analisaram-se quatro espectros, o espectro A e D (*Spectrum 1 e 4*) correspondem a zonas em que surgem deposições de partículas granulosas e os espetros B e C (*Spectrum 2 e 3*) às zonas mais uniformes de revestimento.



**Figura 5.22: Espectros de EDS resultantes da análise a zonas distintas da amostra e de diferentes ampliações, o espectro A e D correspondem a zonas com deposições granulosas e pouco aglomeradas, enquanto o espectro B e C a zonas de revestimento mais uniformes.**

Calcularam-se, para cada um dos espectros, as razões molares Ca/P e os espectros B e C indicaram a formação de HAp, ao passo que os espectros A e D a formação de TeCP. As partículas que se observam detalhadamente na imagem D da figura 5.21 podem ser de TeCP,  $Al_2O_3$  e  $BaTiO_3$ . Tal como para as análises EDS anteriores, a deteção de Al, Ti e O referem-se ao substrato de Ti-6Al-4V e  $Al_2O_3$ .

Depois de analisar todas as superfícies das amostras produzidas, chega-se à conclusão que as amostras produzidas por *Plasma Spray* apresentam um grau de rugosidade superior e as deposições deste revestimento ostentam uma maior fusão das partículas, comparativamente com os revestimentos por *CoBlast™*, que apresentam uma morfologia granular para qualquer que seja a sua composição.

### 5.3. Polarização por descarga de corona

Nas tabelas 5.1 a 5.5 indicam-se, para as amostras com revestimento as condições de polarização (temperatura e tempo de aplicação do campo elétrico), e os resultados das medidas de potencial de superfície. Para qualquer uma das medidas realizadas, o tempo que decorre desde que se desligam as fontes de tensão até que se começa a medir o potencial de superfície é de, aproximadamente, dois minutos. Assim que as fontes de tensão são desligadas, os valores ele-

vados de tensão não descem a zero instantaneamente e, como tal, poderão ocorrer descargas se a amostra for retirada imediatamente do porta-amostras. Portanto, por questões de segurança, em todos os testes se cumpriu com o tempo necessário para que isso não acontecesse.

Quanto às condições que se aplicaram, para os testes que se realizaram a temperaturas mais elevadas, a temperatura aumentou a partir da temperatura ambiente do laboratório e demorou 15 a 20 minutos até atingir os 250°C e quanto ao arrefecimento, ocorreu com o campo elétrico aplicado e o tempo que demorou a decrescer até à temperatura ambiente foi de 35 a 40 minutos (no caso de a temperatura 300 °C, os tempos de aquecimento e arrefecimento foram, respectivamente, 20-25 e 40-45 minutos). As tensões que se aplicaram, durante 1 ou 5 minutos, na ponta da agulha (tensão de descarga de corona) e na grelha (tensão de grelha) foram para todos os testes, respetivamente,  $V_c = -5$  kV e  $V_g = -1$  kV.

Para todos os ensaios mantiveram-se as distâncias ponta da agulha-grelha e grelha-amostra que são, respetivamente, 2 e 1 cm, já que o equipamento utilizado apresentou limitações para se alterarem estas condições.

**Tabela 5.1: Medidas de potencial de superfície com tempo e temperatura de polarização variáveis, para as amostras com revestimento de HAp, produzidas por *CoBlast™*.**

<i>CoBlast™</i>	Tempo Polarização (minutos)	Temperatura Polarização (°C)	Potencial de Superfície (kV)
HAp		Sem Polarização	-0,06±0,02
		Temperatura ambiente	-0,09±0,003
	1	250	-0,07±0,02 (1ª Polarização) -0,06±0,01 (2ª Polarização)
		5	250
	5	300	-0,07

Através da análise da tabela 5.1, consegue perceber-se que as amostras sem polarização apresentam valores menores de potencial de superfície e que aumentar a temperatura e/ou o tempo em que se aplica a polarização não se justifica, porque o potencial medido é menor ou equivalente. Por este motivo, apenas se realizou um teste para cada uma das situações, 5 minutos a 250°C e a 300°C.

Por outro lado, também não se justifica polarizar mais do que uma vez a mesma amostra porque para as 4 amostras que se polarizaram duas vezes durante um minuto a 250°C, com a segunda polarização passadas 48 horas, o potencial medido é menor.

Logo, para o revestimento de HAp produzido por *CoBlast™*, a melhor situação de polarização que se verificou foi à temperatura ambiente durante um minuto, com um potencial de su-

perfície de  $-0,09 \pm 0,003$  kV, porque se aumenta a condutividade superficial do revestimento com o aumento da temperatura.

**Tabela 5.2: Medidas de potencial de superfície com tempo e temperatura de polarização variáveis, para as amostras com revestimento de HAp, produzidas por *Plasma Spray*.**

<i>Plasma Spray</i>	Tempo Polarização (minutos)	Temperatura Polarização (°C)	Potencial de Superfície (kV)
<b>HAp</b>	1	Sem Polarização	-0,04
		Temperatura ambiente	-0,14
		250	-0,14(arrefecimento natural) -0,05(arrefecimento forçado)
		300	-0,25
	5	Temperatura ambiente	-0,12
		250	-0,21
		300	-2,00

A análise da tabela 5.2 mostra que as amostras sem polarização possuem um valor inferior de potencial de superfície, comparativamente com os valores das amostras que foram submetidas a polarização. Assim, ao comparar os ensaios com polarização, verifica-se para os testes realizados à temperatura ambiente ou a 250°C, durante 1 ou 5 minutos, valores menores de potencial de superfície. Além de que, ensaios que sejam sujeitos a arrefecimento forçado manifestam valores consideravelmente menores do que com arrefecimento natural. Porque, possivelmente, a corrente de ar gerada ajuda a mover as cargas elétricas depositadas na superfície tornando as descargas mais rápidas.

De um modo geral, para amostras com revestimento de HAp produzido por *Plasma Spray*, se a polarização por descarga de corona for executada a alta temperatura (300°C) obtêm-se valores de potencial de superfície mais elevados, em particular  $t=5$  min obtém-se um maior potencial de superfície (-2 kV) uma ordem de grandeza acima de todos os outros resultados registados. Neste caso parece que se atingiu uma temperatura de activação de *traps* ou de orientação de dipolos com maior energia de activação e, portanto, mais profundas e com maiores tempos de relaxação, o que permite obter este valor do potencial de superfície consideravelmente mais elevado. Esta tendência com a temperatura é a contrária da que se registou com o revestimento de HAp por *CoBlast<sup>TM</sup>*.

**Tabela 5.3: Medidas de potencial de superfície para as amostras revestidas com BG e HAp, produzidas por *CoBlast<sup>TM</sup>*.**

<i>CoBlast<sup>TM</sup></i>	Tempo Polarização (minutos)	Temperatura Polarização (°C)	Potencial de Superfície (kV)
<b>80%/20% (m/m) HAp/BG</b>		Sem Polarização	-0,04
	1	250°C	-0,10
<b>65%/35% (m/m) HAp/BG</b>		Sem Polarização	-0,07
	1	250°C	-0,13

Relativamente às amostras com revestimento constituído por 80%/20% de HAp/BG (m/m) ou 65%/35% (m/m) de HAp/BG, observam-se valores de potencial de superfície superiores para os ensaios com polarização a 250°C, durante 1 minuto, como se mostra na tabela 5.3. No entanto, a amostra que possui no seu revestimento uma maior percentagem de BG manifesta um potencial superior, igual a -0,13 kV.

**Tabela 5.4: Medidas de potencial de superfície com tempo e temperatura de polarização variáveis, para as amostras revestidas com 80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de estrutura cúbica, produzidas por *CoBlast<sup>TM</sup>*.**

<i>CoBlast<sup>TM</sup></i>	Tempo Polarização (minutos)	Temperatura Polarização °C)	Potencial de Superfície (kV)
<b>Mistura A</b> <b>80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub></b> Estrutura cúbica		Sem Polarização	-0,08±0,01
	1	Temperatura ambiente	-0,12±0,01
		250°C	-0,10±0,02
	5	Temperatura ambiente	-0,09±0,03
		250°C	-0,18

Considerando a tabela 5.4, constata-se que os ensaios com polarização ostentam medidas de potencial de superfície superiores, comparativamente com as medidas sem polarização. Nos ensaios em que a polarização por descarga de corona se aplica durante 1 minuto, os testes à temperatura ambiente apresentam maior potencial, inversamente com o que se verifica em ensaios durante 5 minutos.

Assim, para as amostras revestidas com a mistura A e comparando os resultados obtidos, a polarização a 250°C durante 5 minutos são as condições necessárias para que se maximize o valor do potencial de superfície. Para o teste realizado nestas condições o valor encontrado foi de -0,18 kV.

**Tabela 5.5: Medidas de potencial de superfície com tempo e temperatura de polarização variáveis, para as amostras revestidas com 80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de estrutura tetragonal, produzidas por *CoBlast*<sup>TM</sup>.**

<i>CoBlast</i> <sup>TM</sup>	Tempo (minutos)	Polarização	Potencial de Superfície (kV)
80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO <sub>3</sub> Estrutura tetragonal	1	Sem Polarização	-0,14±0,03
		Temperatura ambiente	-0,12
		250°C	-0,21
	5	Temperatura ambiente	-0,12
		250°C	-0,21

Ao observar a tabela 5.5, conclui-se que os dois ensaios com polarização à temperatura ambiente exibem medidas de potencial de superfície inferiores, comparativamente com as medidas sem polarização. Para os ensaios em que a polarização por descarga de corona se aplica a 250°C, durante 1 ou 5 minutos, o valor encontrado é equivalente e superior a todos os outros.

Assim, para as amostras revestidas com a mistura B e comparando os resultados obtidos, polarizar a amostra a 250°C durante 1 ou 5 minutos são as condições necessárias para que se maximize o valor do potencial de superfície. Para os testes realizados nestas condições o valor encontrado foi de -0,21 kV.

Não foi possível realizar os ensaios a 300°C para todas as amostras, nem sempre que se pretendia, porque o equipamento apresenta limitações para temperaturas superiores a 250°C. Consequentemente, quando se realizam testes a temperaturas mais elevadas, torna-se necessário interrompê-los devido a descargas que se geram nas ligações do equipamento (isolados com Teflon) e que, por questões de segurança da fonte de alta tensão, a mesma cessa a aplicação de tensão na ponta da agulha.

Ao comparar todos os resultados encontrados para as amostras polarizadas, considerando os testes a 250°C e tempo de polarização de 1 minuto, apresentam-se os revestimentos por ordem crescente de deposição de potencial de superfície: *CoBlast*<sup>TM</sup>: HAp < *CoBlast*<sup>TM</sup>: 80%/20% (m/m) de HAp/BG < *CoBlast*<sup>TM</sup>: mistura A < *CoBlast*<sup>TM</sup>: 65%/35% de HAp/BG < *Plasma Spray*: HAp < *CoBlast*<sup>TM</sup>: mistura B. Ao considerar os testes a 250°C e tempo de polarização de 5 minutos, que não se realizaram para os revestimentos com BG, a ordem seria a seguinte: *CoBlast*<sup>TM</sup>: HAp < *CoBlast*<sup>TM</sup>: mistura A < *Plasma Spray*: HAp = *CoBlast*<sup>TM</sup>: mistura B. Logo, é possível verificar uma tendência de resultados de potencial de superfície que não se altera com o aumento do tempo de aplicação do campo.

De referir nos resultados do *CoBlast*<sup>TM</sup> com HAp, o facto dos valores mais elevados obtidos corresponderem à polarização à temperatura ambiente, o que está, como referido anteriormente, provavelmente relacionado com a condutividade elétrica na superfície destes revestimen-

tos, o que dá azo a um menor eficiência na deposição de carga ao acelerar o decaimento da carga despositada.

Também se avaliou a variação do potencial de superfície, com o tempo, colocando a sonda capacitiva na mesma região de determinada amostra, durante 3 minutos. Concluiu-se por cada 3 minutos que a sonda fica estática, um decaimento do potencial de cerca de 30 a 40%, em todas as amostras.

Este estudo mostra, para além de se depositarem pequenas quantidades de carga na amostra, que também apresentam um decaimento rápido. Com base nestes resultados, optou-se por não realizar testes de bioatividade e cultura celular às amostras polarizadas por descarga de corona, uma vez que, passado relativamente pouco tempo, a carga que as amostras conseguem conservar é muitíssimo baixa.

## 5.4. TSDC

Os termogramas de TSDC dos gráficos 5.23 a 5.28 são representados com cores distintas consoante as condições de realização. Os ensaios realizados a amostras virgem, sem polarização e sem tratamento térmico (sTT), representam-se a verde, com tratamento térmico e sem polarização (TT), a preto, com tratamento térmico e polarização positiva (Pol+) e negativa (Pol-), a azul e vermelho, respetivamente.

A partir dos termogramas de TSDC também se calculou a carga de polarização,  $Q$ , relativa aos diferentes ensaios realizados, utilizando para tal a equação 5.6, em que  $J(T)$  corresponde à densidade de corrente, medida à temperatura  $T$ , e  $\beta$  à taxa de aquecimento.

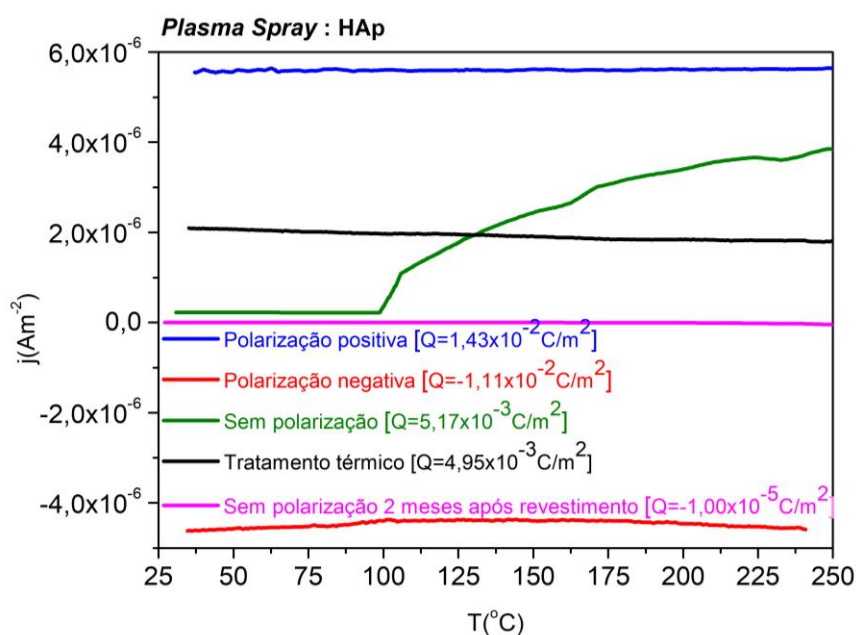
**Equação 5.6: Densidade de carga total**

$$Q = \frac{1}{\beta} \int_{T_{\text{inicial}}}^{T_{\text{final}}} J(T) d(T)$$

Na figura 5.23 mostram-se as curvas de TSDC obtidas para as amostras com revestimento de HAp por *Plasma Spray*. Ao analisar o gráfico pode observar-se que a densidade de corrente para os ensaios com Pol+ e Pol- têm a mesma ordem de grandeza e apresentam valores superiores que para ensaios sTT e TT. Para todas as curvas se verifica um perfil de densidade de corrente praticamente constante, exceto para a curva de TSDC sTT, que se mantém constante até 100°C e, a partir deste valor, apresenta um aumento gradual com o aumento da temperatura. As

amostras sTT apresentaram carga total de  $5,17 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$ , com TT de  $4,95 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$  e Pol+ e Pol- de  $1,43 \times 10^{-2} \text{ C/m}^2$  e  $-1,11 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$ , respetivamente.

Deste modo, conclui-se que é possível reter carga na superfície das amostras produzidas por *Plasma Spray*. Além disto, verifica-se para ensaios sem polarização uma densidade de corrente superior do que para tratamento térmico, o que indica que durante o processo de deposição há cargas que se geram/depositam na superfície da amostra e se perdem aquando dos ensaios com TT. Em contrapartida, 2 meses após revestimento das amostras quando se realizam ensaios sTT é notório um decréscimo acentuado da densidade de corrente. Este facto mostra que com o passar do tempo as cargas que se geraram na superfície da amostra aquando do processo de revestimento se perdem e, portanto, ocorre uma desorientação dos dipolos. Além disso, também devem existir, resultantes do processamento, cargas electrostáticas que entretanto se descarregam com o tempo. Por outro lado, a presença destas cargas electrostáticas e dipolos antes da polarização podem justificar o facto de as duas correntes (Pol+ e Pol-) não serem iguais. A positiva é maior porque tem o acréscimo do que já existia.



**Figura 5.23: Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras com revestimento de HAp por *Plasma Spray*.**

O estudo das correntes termoestimuladas realizado às amostras revestidas com HAp por *CoBlast<sup>TM</sup>* é apresentado na figura 5.24. Através da análise ao gráfico é possível perceber que a densidade de corrente para os ensaios com Pol+ e Pol- voltam a ter a mesma ordem de grandeza entre si, tal como para os de *Plasma Spray* (mas que, comparativamente com o CB, apresentam valores maiores), e apresentam valores superiores que os ensaios de TT. Contudo, o ensaio sTT

revelou valores superiores de densidade de corrente, que aumentam, mais uma vez, com a temperatura a partir dos 100°C.

Para o ensaio com Pol+ a densidade de corrente aumenta com a temperatura a partir, aproximadamente, dos 140°C e são visíveis alguns picos. Até este valor da temperatura não existem diferenças significativas com os resultados de TT e as cargas totais calculadas são muito semelhantes. Tanto nas curvas de TT como nas de Pol, o perfil de densidade de corrente é quase constante. A densidade de carga total, em módulo, é de  $1,77 \times 10^{-2} \text{ C/m}^2$  para amostras sTT, de  $5,01 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$  para amostras com TT, de  $-5,09 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$  para amostras Pol e de  $5,20 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$  para amostras Pol+. Em módulo, as 3 curvas TT, Pol+ e Pol- têm valores de carga muito semelhantes, o que pode ser indicativo de haver dipólos que já se encontram orientados devido ao processo de CB e cuja orientação é a mesma que seria obtida quando se aplica Pol+ e que não desaparecem por aplicação de temperatura de 200°C (TT). Só na polarização negativa os dipolos são re-orientados por aplicação do campo eléctrico. Isto implica que as amostras já possuem inicialmente cargas eléctricas superficiais positivas.

Realizou-se, ainda, um teste sTT 2 meses após revestimento da amostra e verificou-se que a densidade de corrente decresceu acentuadamente, à semelhança do que aconteceu com as amostras revestidas por *Plasma Spray*, encontrando-se os valores de densidade de corrente próximos do teste com TT. Conclui-se, assim, que após dois meses de revestimento as amostras perdem todas as cargas/dipolos que se possam ter gerado durante o processo de revestimento.

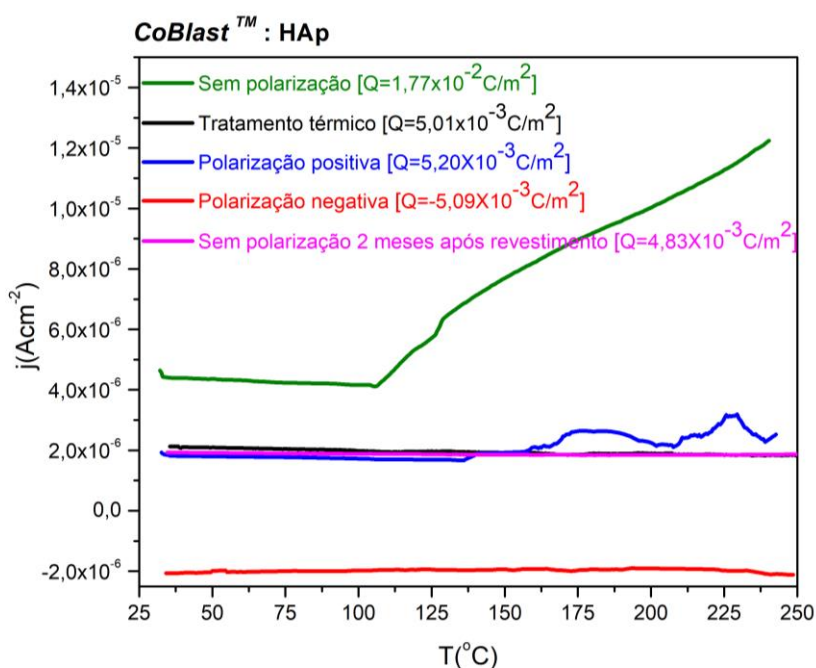
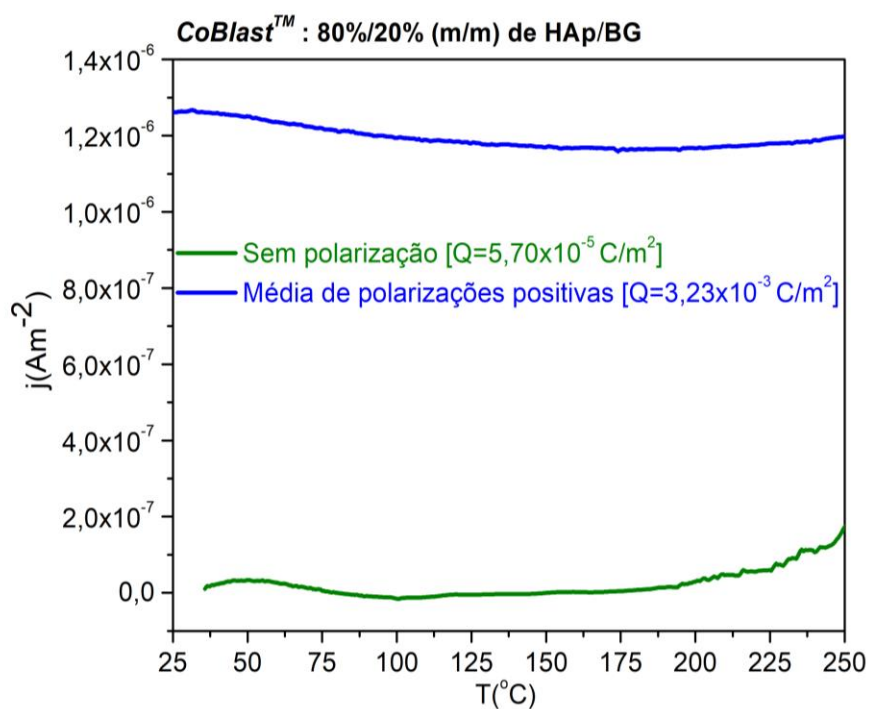


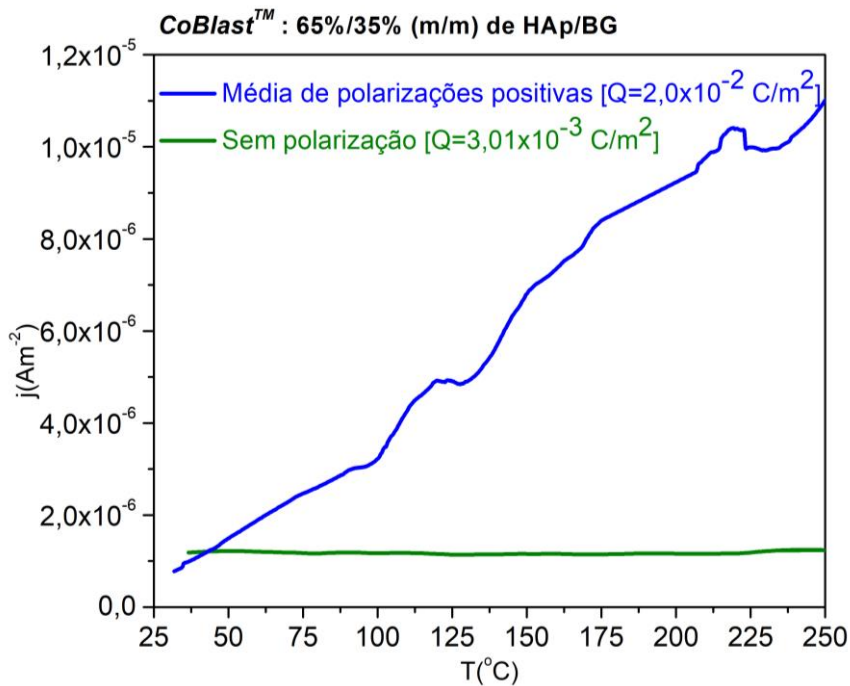
Figura 5.24: Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras com revestimento de HAp por *CoBlast™*.

Nas figuras 5.25 e 5.26 estão representados os termogramas dos ensaios de TSDC efetuados às amostras revestidas de 80%/20% e 65%/35% (m/m) de HAp/BG, sTT e com Pol+. O perfil da densidade de carga é praticamente constante ao longo de toda a gama de temperaturas, exceto para as amostras Pol+ com 65%/35% (m/m) de HAp/BG, onde a carga aumenta com a temperatura e surgem alguns picos. Para as amostras sTT com 20% e 35% de BG, respetivamente, a densidade de carga total, em módulo, é de  $5,70 \times 10^{-5} \text{ C/m}^2$  e  $3,01 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$  e de  $3,23 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$  e  $2,0 \times 10^{-2} \text{ C/m}^2$  para amostras Pol+.

Os resultados mostram para as amostras revestidas com maior quantidade de BG densidades de correntes superiores e, portanto, mais carga retida na superfície da amostra. O aumento do conteúdo de BG leva a aumento da corrente medida e a maior deposição de carga durante a Pol+, o vidro deve possuir uma maior capacidade de reter cargas superficiais que a HAp.



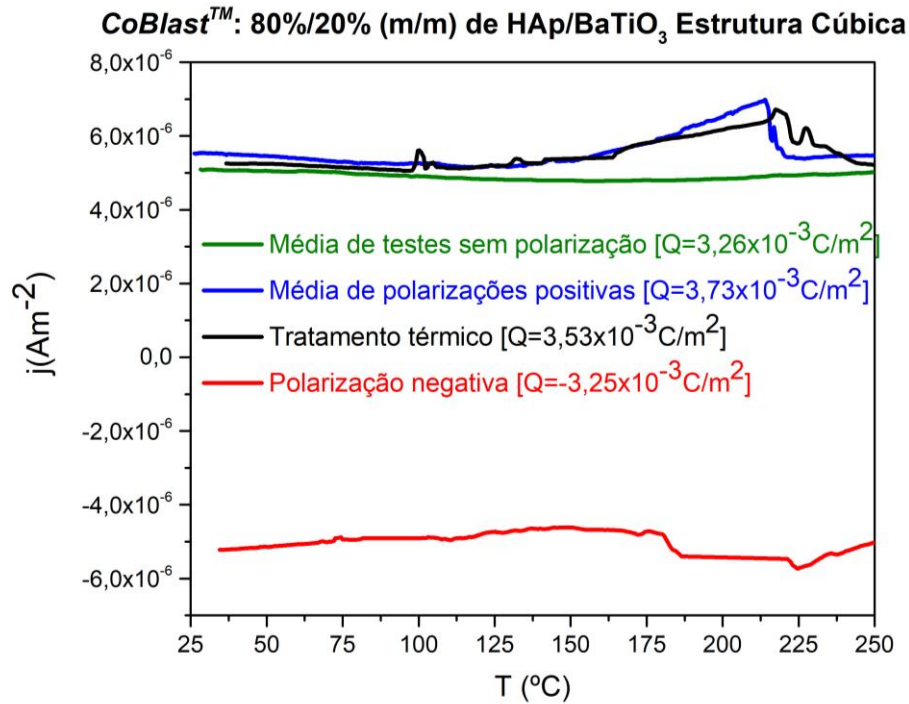
**Figura 5.25: Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras revestidas com 80%/20% (m/m) de HAp/BG por CoBlast™.**



**Figura 5.26:** Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras revestidas com 65%/35% (m/m) de HAp/BG por *CoBlast™*.

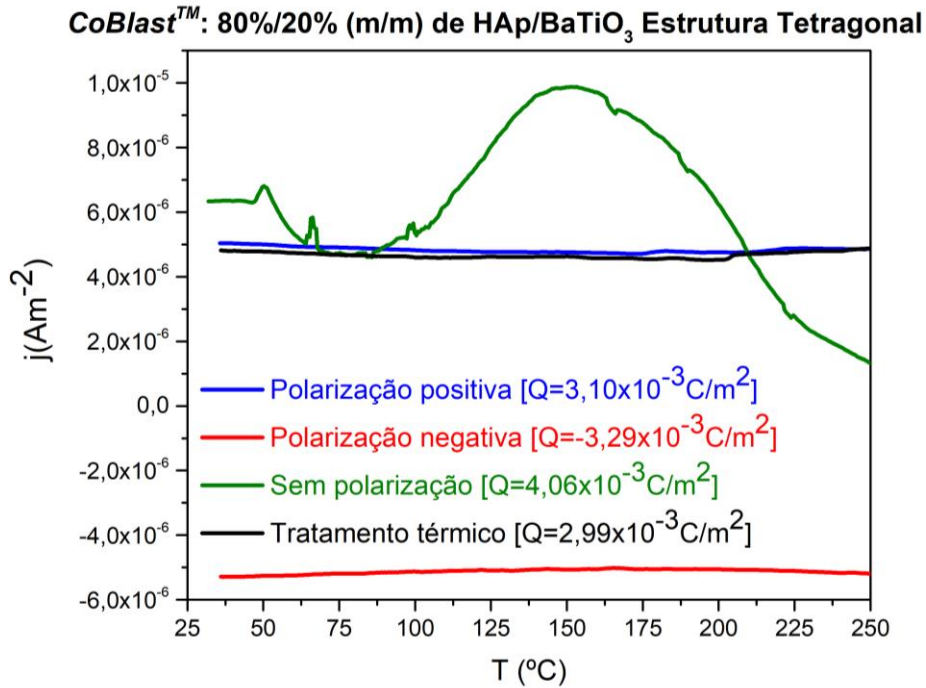
Avaliaram-se, também, as deposições de carga superficial em revestimentos com 80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de nanopós de estrutura cúbica (mistura A) e micropós de estrutura tetragonal (mistura B), por *CoBlast™*, como se mostra nas figuras 5.27 e 5.28.

Em todos os ensaios (sTT, TT e Pol+ e Pol-), para ambos os tipos de revestimento, se verificam valores de carga total da mesma ordem de grandeza e para os testes com Pol+ e Pol- esses valores em módulo são muito próximos. Para revestimentos com a mistura A, comparativamente com revestimentos com a mistura B, o valor de densidade de carga total em testes com TT é superior e para testes sTT é inferior. O perfil da densidade de corrente é crescente com a temperatura a partir dos 100°C e ostenta alguns picos, para ensaios com TT e Pol+.



**Figura 5.27: Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras revestidas com a mistura A por CoBlast™.**

Quando se analisam os gráficos da figura 5.28, tem-se claramente um pico na zona corresponde à temperatura de *Curie* do BaTiO<sub>3</sub> (120°C) para o espectro sTT, que desaparece com o TT. Devido a esse facto, mais uma vez, se vem provar que há polarização durante o CB e tal como se verifica para a HAp depositada por CB, as curvas de TT e Pol+ apresentam valores muito semelhantes, sendo ainda mais acentuada neste caso.



**Figura 5.28:** Termogramas de TSDC obtidos, em atmosfera de ar, para amostras revestidas com a mistura B por *CoBlast™*.

Os valores de densidade de carga total para todos os tipos de ensaios e revestimentos encontram-se representados na tabela 5.6. De um modo geral, conclui-se que os revestimentos de HAp produzidos por *Plasma Spray* conservam, em módulo, cargas superiores para ensaios com Pol- e, com a mesma ordem de grandeza, na Pol+ só se encontra a amostra revestida com 65%/35% (m/m) de HAp/BG, produzida por *CB*. Para ensaios sTT, as amostras de HAp por *CoBlast™* e *Plasma Spray* apontam para os resultados mais altos, tal como para TT.

**Tabela 5.6:** Valores de densidade de carga total, em  $\text{C}/\text{m}^2$ , obtidos para cada um dos ensaios em todos os tipos de revestimento.

Material	Pol-	Pol+	sTT	TT
	Carga ( $\text{C}/\text{m}^2$ )			
<i>Plasma Spray</i>				
HAp	$-1,11\times 10^{-2}$	$1,43\times 10^{-2}$	$5,17\times 10^{-3}$	$4,95\times 10^{-3}$
<i>CoBlast™</i>				
HAp	$-5,09\times 10^{-3}$	$5,20\times 10^{-3}$	$1,77\times 10^{-2}$	$5,01\times 10^{-3}$
80%/20% (m/m) HAp/BG	-	$3,23\times 10^{-3}$	$5,70\times 10^{-5}$	-
65%/35% (m/m) HAp/BG	-	$2,0\times 10^{-2}$	$3,01\times 10^{-3}$	-
80%/20% (m/m) HAp/BaTiO <sub>3</sub> Estrutura cúbica	$-3,25\times 10^{-3}$	$3,73\times 10^{-3}$	$3,26\times 10^{-3}$	$3,53\times 10^{-3}$
80%/20% (m/m) HAp/BaTiO <sub>3</sub> Estrutura tetragonal	$-3,29\times 10^{-3}$	$3,10\times 10^{-3}$	$4,06\times 10^{-3}$	$2,99\times 10^{-3}$

## 5.5. Rugosidade

Na figura 5.29 encontram-se as imagens da topografia superficial da placa Ti-6Al-4V com e sem revestimento. A escala de cada uma das imagens é definida de 0 a 45  $\mu\text{m}$  e a cor vai clareando gradualmente de 5 em 5  $\mu\text{m}$ , em que 0  $\mu\text{m}$  corresponde a zonas pretas e 45  $\mu\text{m}$  a zonas brancas no gráfico.

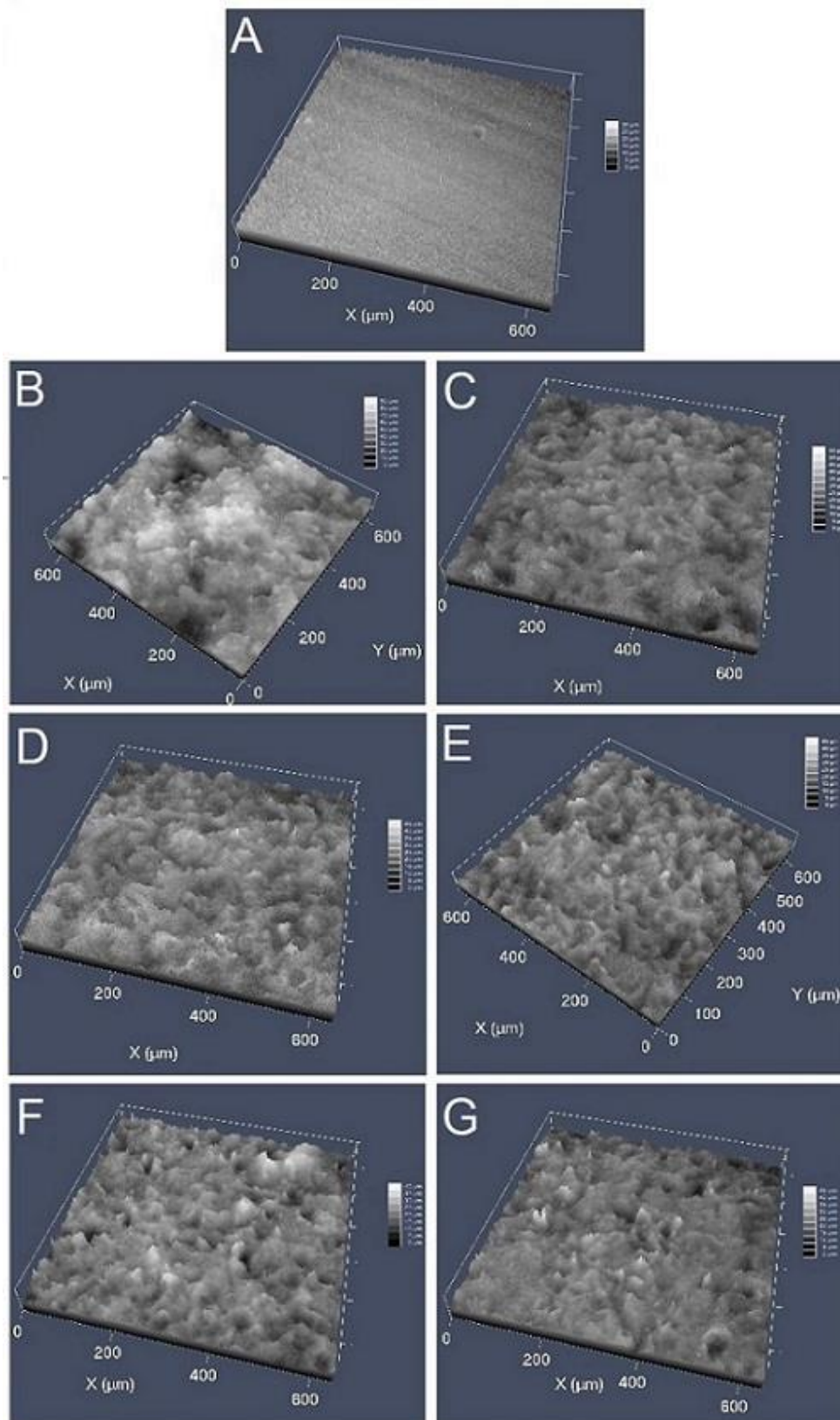


Figura 5.29: Imagens da topografia superficial da placa de Ti-6Al-4V (A), do revestimento produzido por *Plasma Spray* (B-HAp) e dos revestimentos produzidos por *CoBlast™* (C-HAp, D-80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> estrutura cúbica; E-80%/20% (m/m) de HAp/ BaTiO<sub>3</sub> estrutura tetragonal; F-80%/20% (m/m) de HAp/BG e G-65%/35% (m/m) de HAp/BG), obtidas com um microscópio confocal a laser.

Na tabela 5.7 apresentam-se as medidas de rugosidade média (WSq) das amostras com e sem revestimento. Os parâmetros estatísticos da distribuição gaussiana, *skewness* (WSsk) e *kurtosis* (WSsu), traduzem os valores de assimetria e de curtose dos dados e, portanto, descrevem os desvios associados aos dados de rugosidade. Para as amostras sem revestimento, com revestimento de HAp por *Plasma Spray* e *CoBlast<sup>TM</sup>* e com a mistura D a distribuição é assimétrica negativa e, para as restantes, assimétrica positiva. Quanto aos valores de curtose pode afirmar-se que todos os valores são superiores a 3, logo as funções probabilidade são leptocúrticas e as distribuições são mais altas e concentradas (afuniladas) que a distribuição normal. O filtro que se aplicou a cada uma das imagens foi o filtro passa-baixo (W) que, por ser um filtro linear, suaviza, realça detalhes da imagem e minimiza efeitos de ruído, sem alterar o nível médio de cinza da imagem (valor de rugosidade).

**Tabela 5.7: Medidas de rugosidade média (WSq) das amostras com e sem revestimento.**

Amostras	Wsq ( $\mu\text{m}$ )
<b>Ti-6Al-4V</b>	2,974
<i>Plasma Spray</i>	
<b>HAp</b>	12,865
<i>CoBlast<sup>TM</sup></i>	
<b>HAp</b>	4,522
<b>Mistura A (80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> Estrutura cúbica)</b>	4,912
<b>Mistura B (80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> Estrutura tetragonal)</b>	4,453
<b>Mistura C (20%/80% (m/m) de HAp/BG)</b>	4,195
<b>Mistura D (35%/65% (m/m) de HAp/BG)</b>	4,135

De acordo com a figura 5.29 e com as medidas da tabela 5.7, para as amostras com revestimento produzido por *CoBlast<sup>TM</sup>*, a rugosidade da superfície não revela uma alteração relevante para revestimentos com diferentes misturas e a sua ordem de grandeza é equivalente à da espessura deste tipo de revestimento ( $\approx 4\mu\text{m}$ ), tal como acontece com a ordem de grandeza da rugosidade e espessura do revestimento produzido por *Plasma Spray* ( $\approx 13\mu\text{m}$ ).

As amostras que apresentam maior e menor rugosidade são, respetivamente, as amostras com revestimento de HAp por *Plasma Spray* e com a mistura D por *CoBlast<sup>TM</sup>*.

Concluiu-se, com esta análise, que existe uma correlação entre os resultados de rugosidade e os resultados de polarização por corona e contacto. Sabe-se, para a técnica de *CoBlast<sup>TM</sup>*, que os valores de carga superficial são os mais baixos, isto porque, apresenta uma camada de revestimento mais fina do que a técnica de *Plasma Spray*. Assim, quando se comparam os valores da espessura da camada do revestimento com os de rugosidade, confirma-se que os valores de WSq são bastante elevados, o que dará origem a áreas do revestimento com camadas demasiado finas, ou praticamente, sem revestimento. Estas constatações justificam, o facto de, não se

conseguir conservar grandes quantidades de carga nos revestimentos e a existência de ruído nos gráficos, antes do tratamento com o filtro de suavização “*adjacente-averaging*”.

Por outro lado, a polarização por corona revela que a superfície deve conduzir alguma da carga elétrica, depositada, que se vai “escoar” rapidamente para o eletrodo ligado à terra nas áreas mais finas da amostra, ficando esta com valores baixos de carga superficial. Na polarização por contacto a rugosidade elevada leva a mau contacto com os eletrodos, tanto durante a aplicação do campo elétrico como durante as medidas da corrente termoestimuladas, resultando numa polarização menos eficiente e na existência de ruído na corrente medida.

No entanto, a presença de microrugosidade é benéfica em termos de osteointegração, já que facilitará a adesão e proliferação celulares após colocação dos implantes.

## 5.6. Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade das amostras com diferentes tipos de revestimento, torna perceptível a existência de substâncias citotóxicas que determinado revestimento possa lixiviar para o meio. Esta análise determina se o material ou mistura de materiais utilizados podem ou não ser aplicados como revestimento e, conseqüentemente, colocados em contato com o organismo.

Na tabela 5.8 encontram-se os resultados obtidos com o respetivo cálculo de viabilidade celular, assim como as incertezas correspondentes.  $C_0$  corresponde à concentração inicial do meio colocado em contacto com a amostra revestida,  $C_0/2$  a uma diluição para metade da concentração do meio e  $C_0/4$  a uma diluição para  $1/4$  da concentração inicial do meio.

**Tabela 5.8: Resultados dos ensaios de citotoxicidade das amostras com e sem revestimento.**

Amostras	Viabilidade Relativa (%)		
	$C_0$	$C_0/2$	$C_0/4$
<b>Ti-6Al-4V</b>	107±3	104±3	105±3
<i>Plasma Spray</i>			
<b>HAp</b>	112±3	106±4	107±3
<i>CoBlast™</i>			
<b>HAp</b>	112±3	110±3	110±3
<b>80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> Estrutura Cúbica</b>	111±3	110±4	110±3
<b>80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> Estrutura Tetragonal</b>	107±3	109±3	108±3
<b>Controlos</b>			
<b>C+</b>	2 ± 2		
<b>C-</b>	100 ± 3		

Analisando os resultados, verifica-se que todos os valores de viabilidade relativa são superiores a 90% com incertezas entre 3% e 4%. Assim, pode afirmar-se, para todas as concentrações testadas, que os revestimentos utilizados são não citotóxicos. Conclui-se, portanto, que os materiais usados apresentam características apropriadas para o seu uso como revestimento, sem provocar problemas a nível citotóxico.

## **5.7. Ensaios de bioatividade**

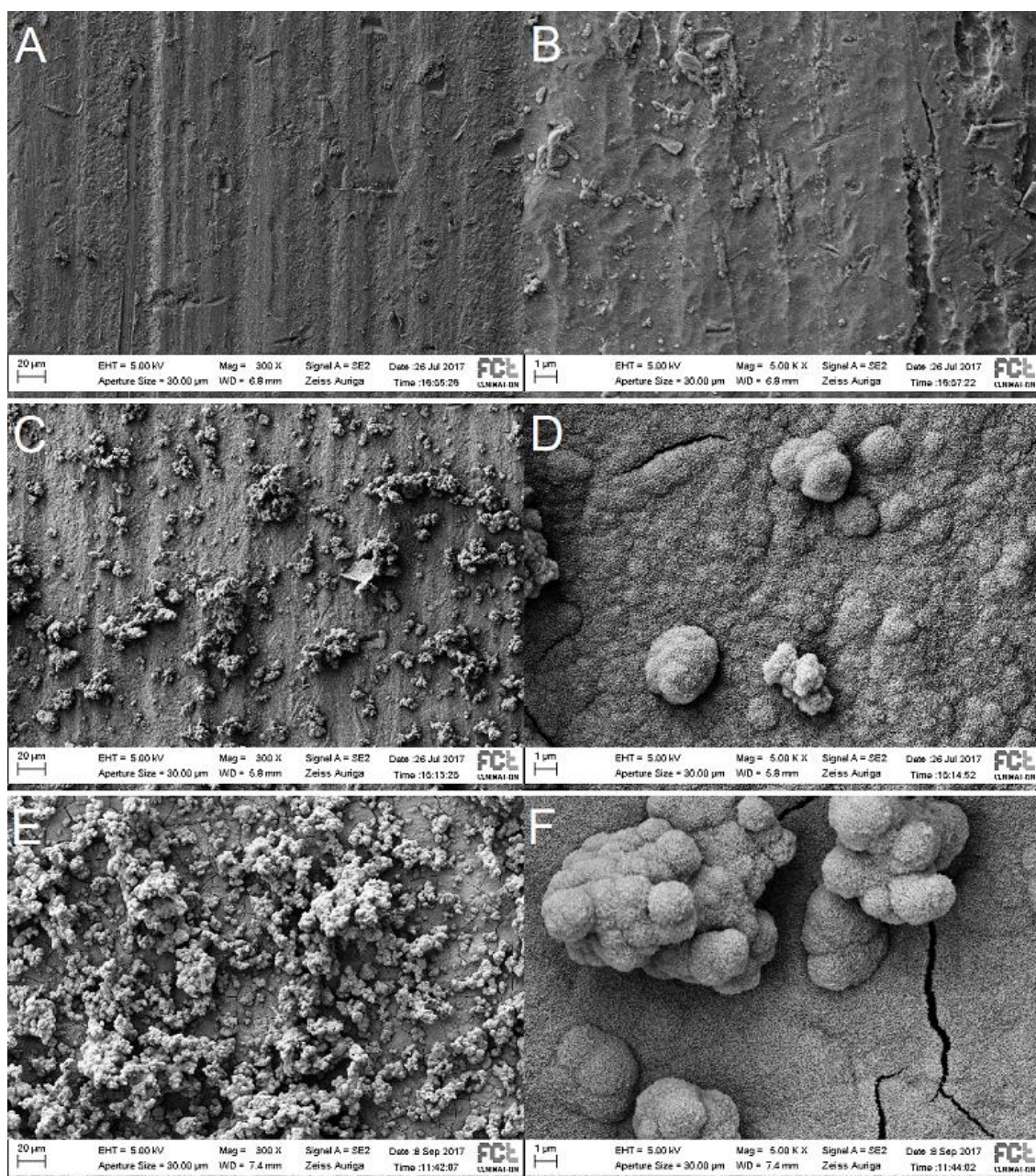
Todos os tipos de amostras, com ou sem revestimento e não polarizadas, foram imersas em SBF por períodos de tempo de 6, 12 e 36 horas e, ainda, 3, 5 e 7 dias. Decorrido o tempo estipulado para os ensaios de bioatividade, lavagem e secagem, as amostras foram caracterizadas recorrendo-se à técnica de SEM de modo a observar a estrutura morfológica e à análise EDS para analisar a composição química elementar da superfície da amostra.

As alterações nas superfícies de algumas das amostras e a deteção dos elementos (Ca, P) ajudam na interpretação dos dados para a formação da camada de fosfato de cálcio (CaP).

Por outro lado, sabe-se que a análise EDS analisa até 1  $\mu\text{m}$  de profundidade da amostra. Assim, torna-se possível interpretar a quantidade de Ti que se deteta na análise e determinar em que zona da amostra ou que tipo de revestimento apresenta uma maior camada de CaP.

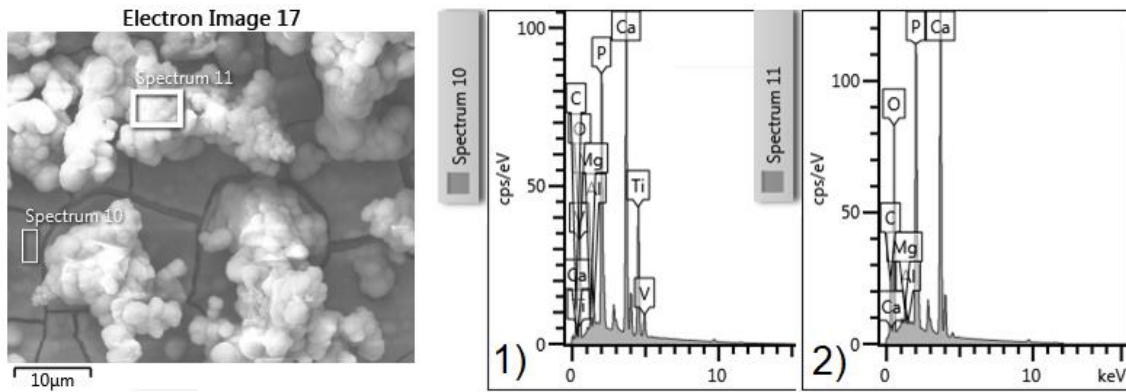
Para todas as figuras apresentadas, exceto para a figura 5.30, as imagens A e B, C e D e E e F correspondem a imersões em SBF durante 36 horas, 3 dias e 7 dias, respetivamente, enquanto para a figura 5.30, por evidenciar deposições de CaP mais cedo que todas as outras amostras, considerou-se necessário expor imagens de SEM de imersões com 12 horas, nas imagens A e B, além de 36h e 3 dias de imersão em SBF, nas imagens C e D e E e F, respetivamente. Para cada um dos tempos de imersão expostos, apresentam-se duas imagens com ampliações distintas, a 300x e 5000x.

Na figura 5.30, mostram-se algumas imagens de SEM captadas das superfícies das amostras de Ti-6Al-4V sem revestimento, após ensaios de bioatividade.



**Figura 5.30:** Imagens de SEM obtidas para as amostras de Ti-6Al-4V sem revestimento, com diferentes ampliações, imersas em SBF durante 36 horas (A,B), 3 dias (C,D) e 7 dias (E,F).

Relativamente às imagens de SEM expostas na figura 5.30, pode aferir-se que decorridas 36 horas de imersão em SBF, as amostras não apresentam cristais de CaP na sua superfície. No entanto, após 3 e 7 dias de imersão em SBF já se identificam diferentes camadas de precipitados de CaP e aglomerados de cristais em determinadas regiões da superfície da amostra.

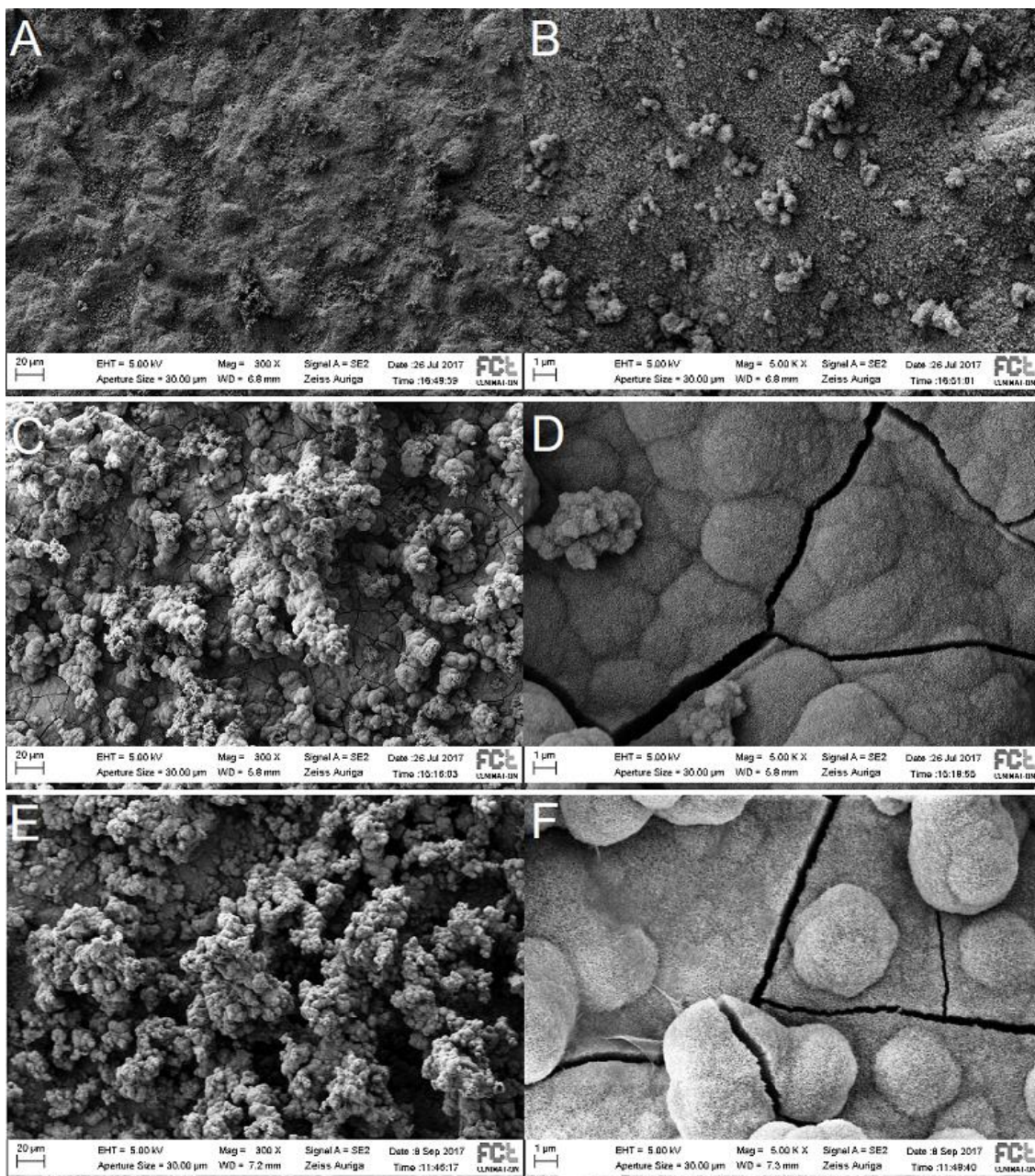


**Figura 5.31: Imagem de SEM da superfície do substrato sem revestimento imerso 7 dias em SBF e os respetivos espetros EDS: 1) zona com aglomerados; 2) zona com camada contínua.**

A figura 5.31 mostra a análise EDS de duas zonas distintas da superfície da amostra, imersa 7 dias em SBF, uma zona com aglomerados de CaP (1) e outra com uma camada contínua de CaP (2) que precipitou sob o substrato, confirmou-se a presença de íões cálcio e fosfato em maior quantidade para o espetro 2, zona com aglomerados, apesar de se verificar uma quantidade suficientemente elevada para a espetro 1, camada contínua depositada sobre o substrato. Para a camada contínua da amostra, pode afirmar-se que os precipitados que se formam são HAp porque possuem uma razão molar Ca/P igual a 1,67, contudo, para a região com aglomerados a razão é de 1,5, o que significa que as apatites que se depositaram para formar os aglomerados são ACP ou TCP, e como o valor é inferior a 1,67, apresentam uma taxa de dissolução superior à apresentada pela HAp [59].

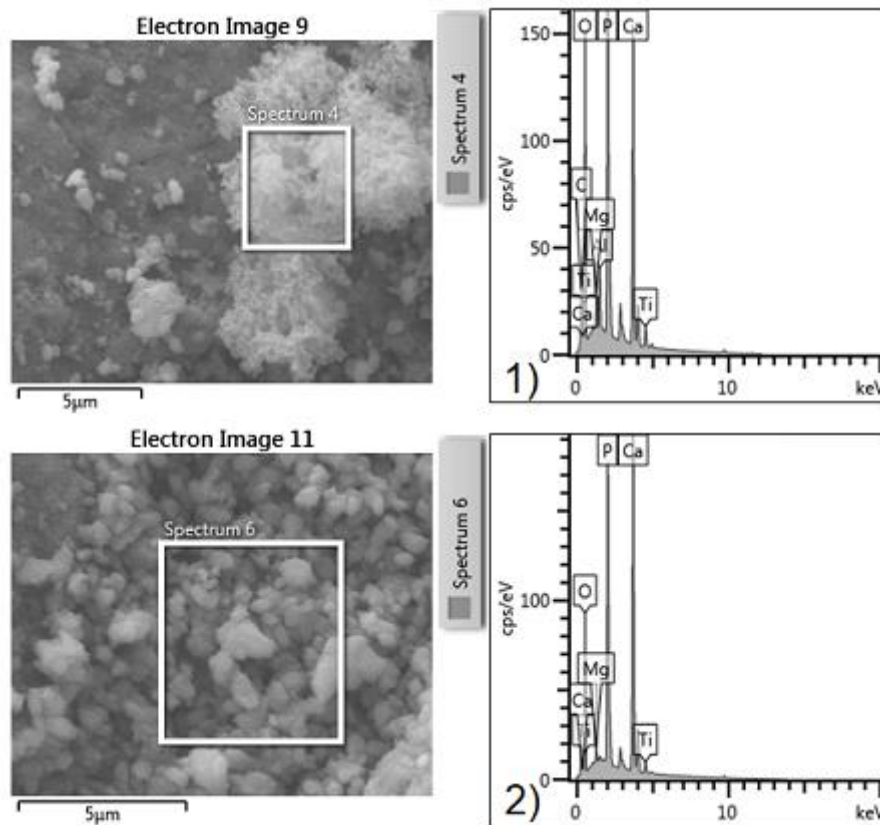
Por outro lado, é possível constatar-se na análise EDS da camada contínua de CaP uma quantidade de Ti significativa além de quantidades reduzidas de Al e V, contrariamente à zona com aglomerados. Isto prova que a camada contínua de CaP que se formou ao fim dos 7 dias de imersão apresenta uma profundidade menor que a da análise do método.

Na figura 5.32, expõem-se algumas imagens de SEM captadas da superfície das amostras revestidas por HAp, pela técnica de *CoBlast™*, após ensaio de bioatividade.



**Figura 5.32:** Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas com HAp, com diferentes ampliações, pela técnica de *CoBlast™*, imersas em SBF durante 36 horas (A,B), 3 dias (C,D) e 7 dias (E,F).

Para as imagens de SEM que se observam na figura 5.32, verificou-se, decorridas 36 horas de imersão em SBF, que as amostras já apresentam cristais de CaP na sua superfície. Pela análise das imagens de maior ampliação, após 3 e 7 dias de imersão em SBF identificaram-se grandes aglomerados sob camadas contínuas de CaP. Ainda assim, a camada de CaP da imagem F aparenta ter maior espessura que a da imagem D, uma vez que muitos dos aglomerados formados durante a imersão dos 7 dias já se depositaram e formaram uma camada mais densa, sob a qual se formam novamente novos aglomerados.

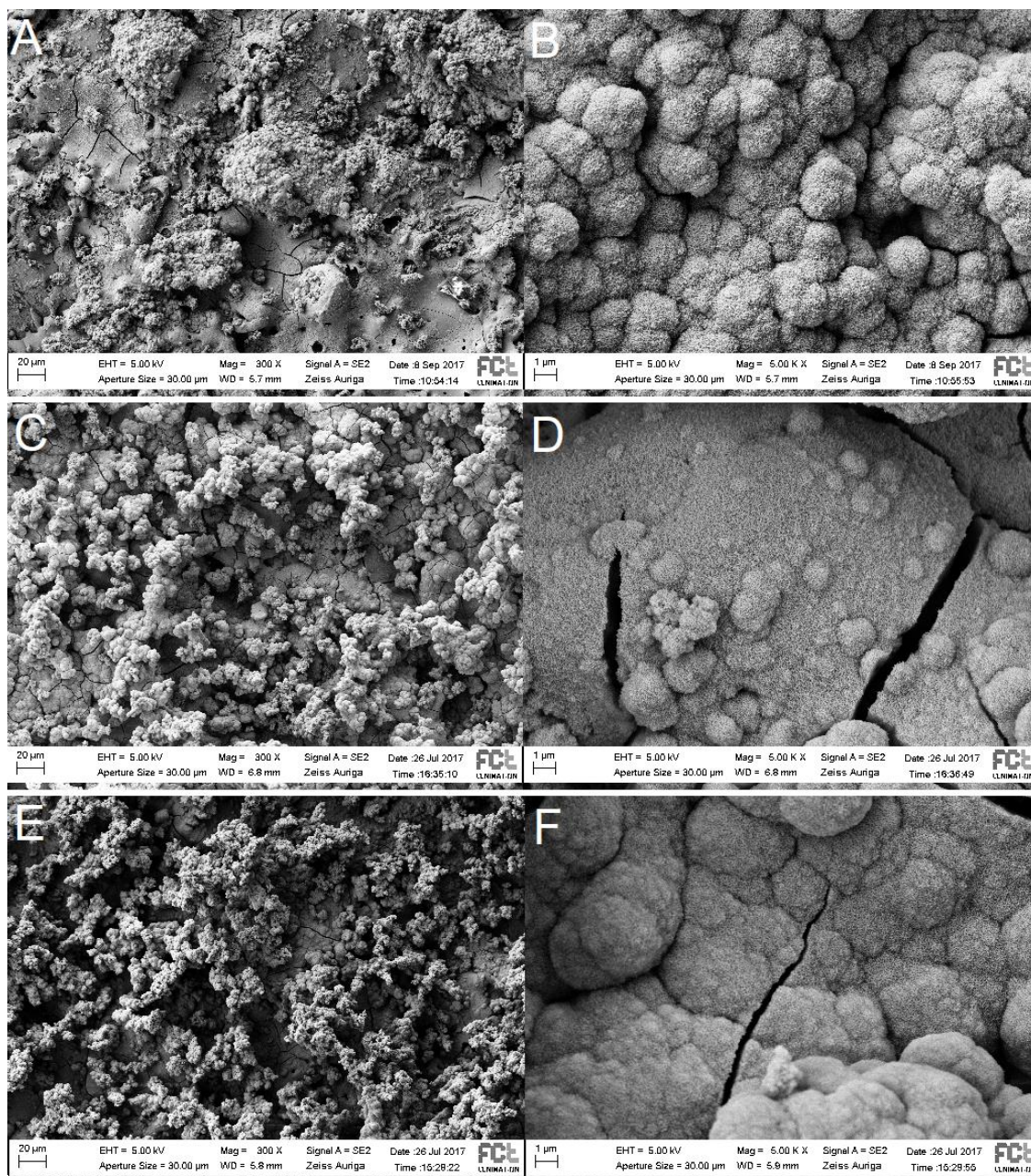


**Figura 5.33: Imagens de SEM da amostra com revestimento de HAp, produzido por CoBlast™, imersa 36 horas em SBF e os respectivos espectros EDS: 1) zona com aglomerado de grandes dimensões; 2) zona com pequenos aglomerados.**

De acordo com a figura 5.33 e relativamente à análise EDS das duas zonas distintas da superfície da amostra, imersa 36 horas em SBF (uma zona num aglomerado de grandes dimensões (1) e outra numa região da amostra com vários aglomerados de pequenas dimensões (2)), verificou-se a presença de iões cálcio e fosfato em maior quantidade no espectro 2, apesar de se verificar uma quantidade suficientemente elevada também no espectro 1. Depois de calcular as razões molares Ca/P para ambas as regiões, verificou-se que os precipitados que se formam na superfície do revestimento da amostra possuem razões molares Ca/P inferiores a 1,67. Para a zona 1, com razão molar igual a 1,31, formaram-se apatites de fosfato octacálcico (OCP) e para a zona 2, com razão molar de 1,5, apatites de ACP ou TCP [59].

A análise EDS também mostrou para as duas regiões da amostra pequenas quantidades de Ti, o que significa que a cobertura CaP que se formou durante as 36h de imersão não é suficientemente espessa relativamente à profundidade do método. No entanto, a quantidade de Ti que se deteta durante esta análise, para a amostra com revestimento de HAp apenas com 36h de imersão, é muito menor que a detetada para a camada contínua de CaP precipitada na amostra de Ti-6Al-4V imersa durante 7 dias na solução SBF, confirmando a hipótese anterior da camada ser mais espessa no revestimento com HAp.

Na figura 5.34, expõem-se algumas imagens de SEM captadas da superfície das amostras revestidas por HAp, pela técnica de *Plasma Spray*, após ensaio de bioatividade.

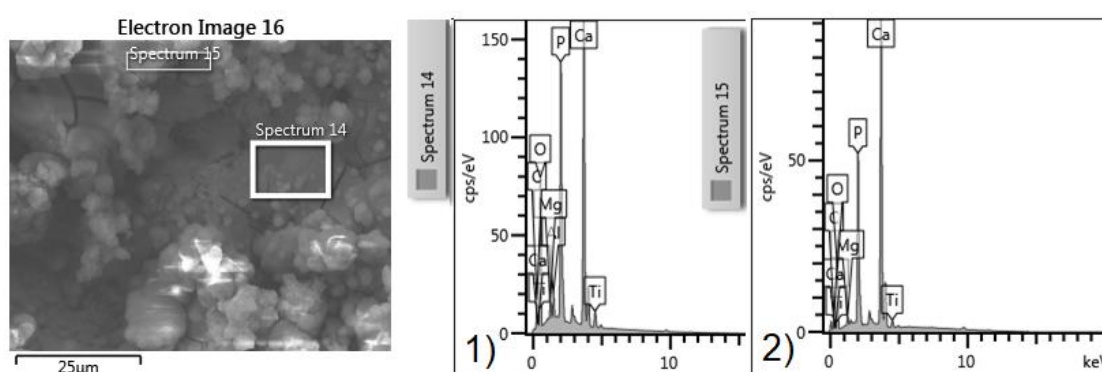


**Figura 5.34: Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas com HAp, com diferentes ampliações, pela técnica de *Plasma Spray*, imersas em SBF durante 12 horas (A,B), 36 horas (C,D) e 3 dias (E,F).**

De acordo com as imagens SEM que se apresentam na figura 5.34, é possível constatar-se que as deposições de fosfatos de cálcio para a amostra com revestimento de HAp, produzido por *Plasma Spray*, aparecem previamente, em comparação com todas as outras amostras testadas. Nas imagens em que a amostra esteve imersa por um período de 12h, a morfologia da superfície da amostra está significativamente alterada, já se distinguem bastantes deposições esféricas de

CaP que começam a formar camadas distintas de precipitado. O mecanismo principal de recristalização destas esferas é a nucleação heterogénea e, conseqüentemente, a sua expansão após tempos de imersão mais longos [59], como se pode verificar pelas imagens D e F com tempos de imersão de 36h e 3 dias. A formação desses locais de nucleação deve-se à rápida dissolução da hidroxiapatite amorfa, presente nos revestimentos produzidos pela técnica de *Plasma Spray*, levando a um desequilíbrio significativo de iões na solução SBF [59].

Quando se analisa a imagem D e F, com maiores tempos de imersão em SBF e maiores ampliações, a espessura das camadas depositadas parecem ter atingido uma espessura considerável e novos aglomerados de CaP continuam a formar-se sob a(s) camada(s) anterior(es).

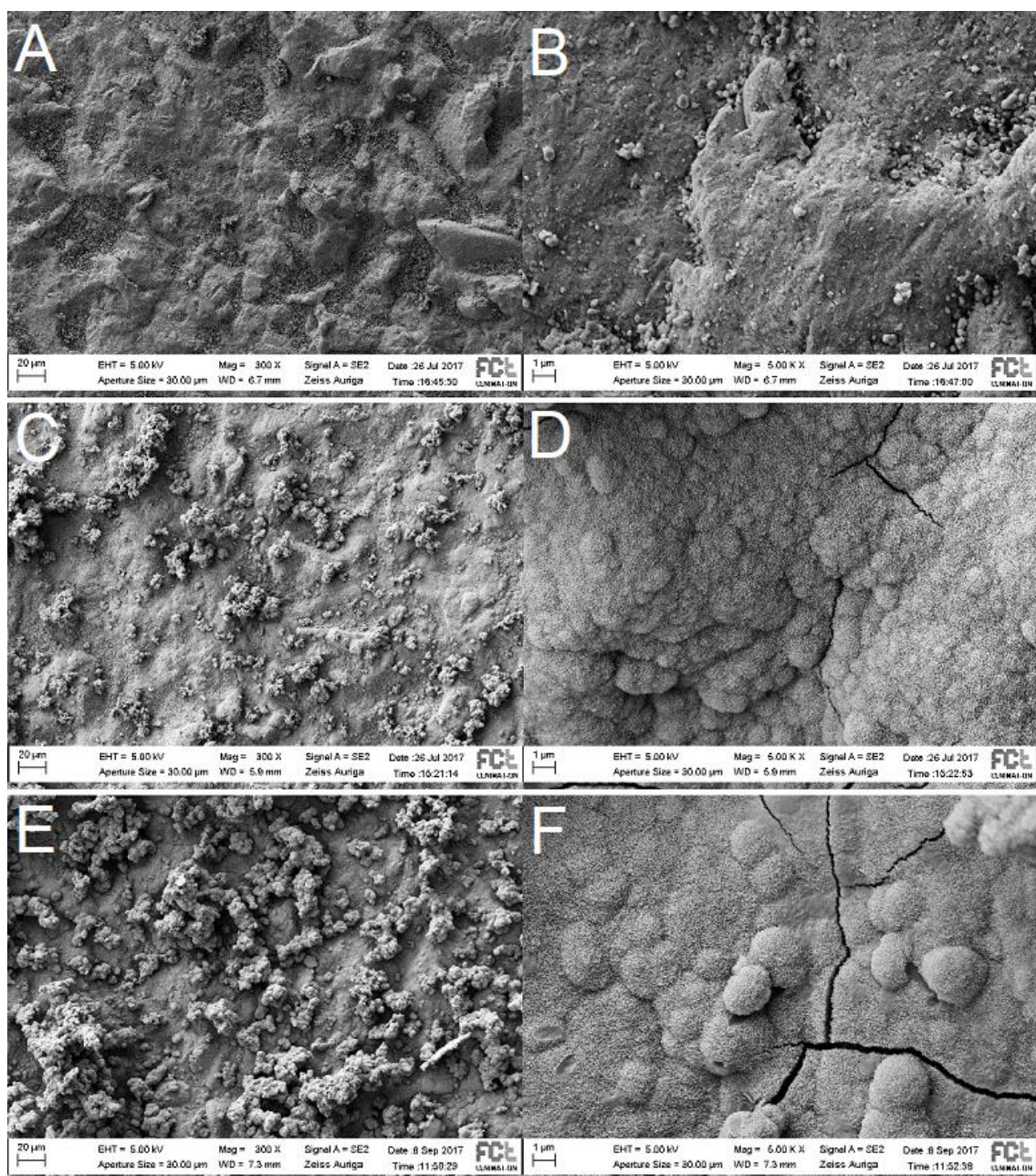


**Figura 5.35: Imagens de SEM do revestimento de HAp, produzido por *Plasma Spray*, imerso 36 horas em SBF e os respetivos espectros EDS: 1) zona com deposição contínua; 2) zona com aglomerados.**

Ao analisar a imagem e os espectros da figura 5.35, o espectro 1 que corresponde à zona da amostra com uma camada contínua de CaP, apresenta uma maior concentração de iões cálcio e fosforo, comparativamente com o espectro 2, de uma zona com aglomerados esféricos. Assim, calcularam-se as razões molares Ca/P para as duas regiões e apurou-se para os precipitados que se formam na superfície do revestimento da zona 1, razão molar Ca/P inferior a 1,67 e para a zona 2 superior a 1,67. Para a zona 1, a razão molar foi de 1,51 e, portanto, formaram-se apatites de ACP ou TCP e para a zona 2, com razão molar de 2,32, apatites de TeCP [59].

A análise EDS também revelou quantidades mínimas de Ti, para ambos os espectros, o que significa que a camada de fosfato de cálcio que se depositou depois da imersão da amostra por um período de 36h já possui uma espessura de CaP considerável.

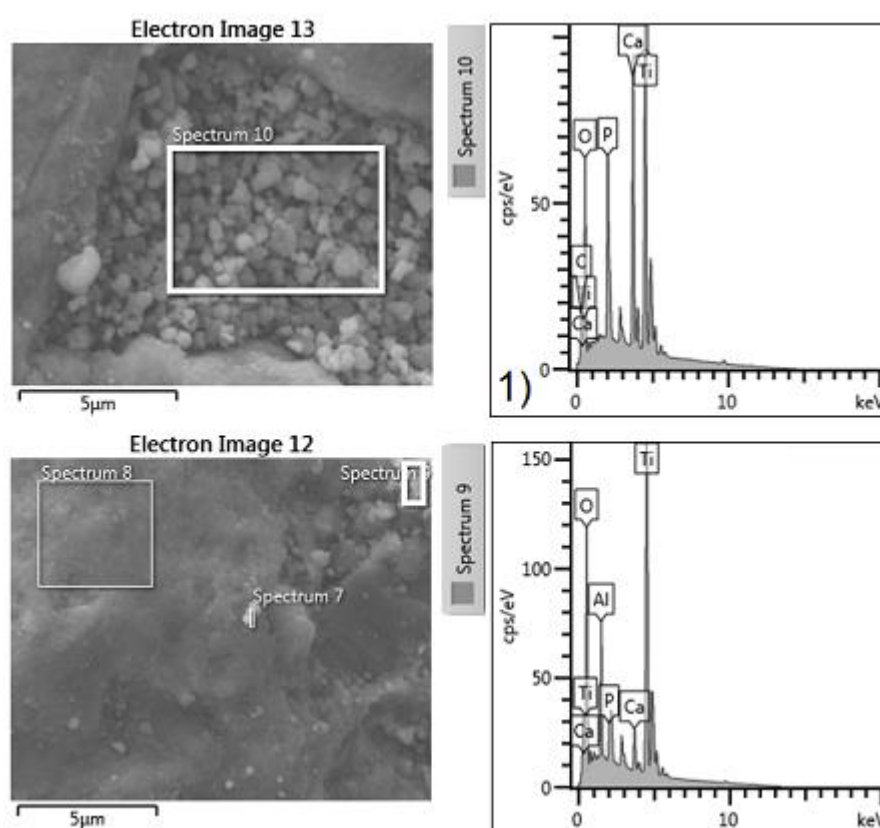
Na figura 3.26, expõem-se algumas imagens de SEM captadas da superfície das amostras revestidas pela mistura A, pela técnica de *CoBlasi<sup>TM</sup>*, após ensaio de bioatividade.



**Figura 5.36:** Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas com a mistura A (80% de HAp e 20% de BaTiO<sub>3</sub> estrutura cúbica), com diferentes ampliações, pela técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup>, imersas em SBF durante 36 horas (A,B), 3 dias (C,D) e 7 dias (E,F).

Ao analisar as imagens SEM que se apresentam na figura 5.36, dos revestimentos constituídos pela mistura A produzidos pela técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup>, relativamente à amostra imersa 36h na solução SBF, constata-se que a superfície se mantém praticamente inalterada comparativamente com a superfície que se analisou antes da imersão na solução SBF (imagens B e C da figura 4.10). Analisando imagens com ampliação de 20000x, começam a notar-se pequenas deposições esféricas que se formam sob o revestimento.

Ao analisar as imagens com maiores tempos de imersão, conseguem já identificar-se bastantes aglomerados sob o revestimento. Através da imagem C e D percebe-se que a formação de aglomerados aumentou consideravelmente tanto de 36h para 3 dias como de 3 para 7 dias de imersão em SBF. Porém, apenas perante imagens de maior ampliação se consegue ter a percepção se existe, na realidade, uma camada contínua de CaP depositada à superfície. Assim, ao analisar as imagens D e F, comprova-se, tanto para 3 como para 7 dias de imersão, a formação de uma camada contínua de CaP que se estende por toda a superfície da amostra. Mas, como previsível, passados 7 dias de imersão em SBF a camada que se observa aparenta ser mais uniforme e de maior espessura, enquanto passados 3 dias, existem um relevo entre as várias camadas menos espessas que se formam sob o revestimento.

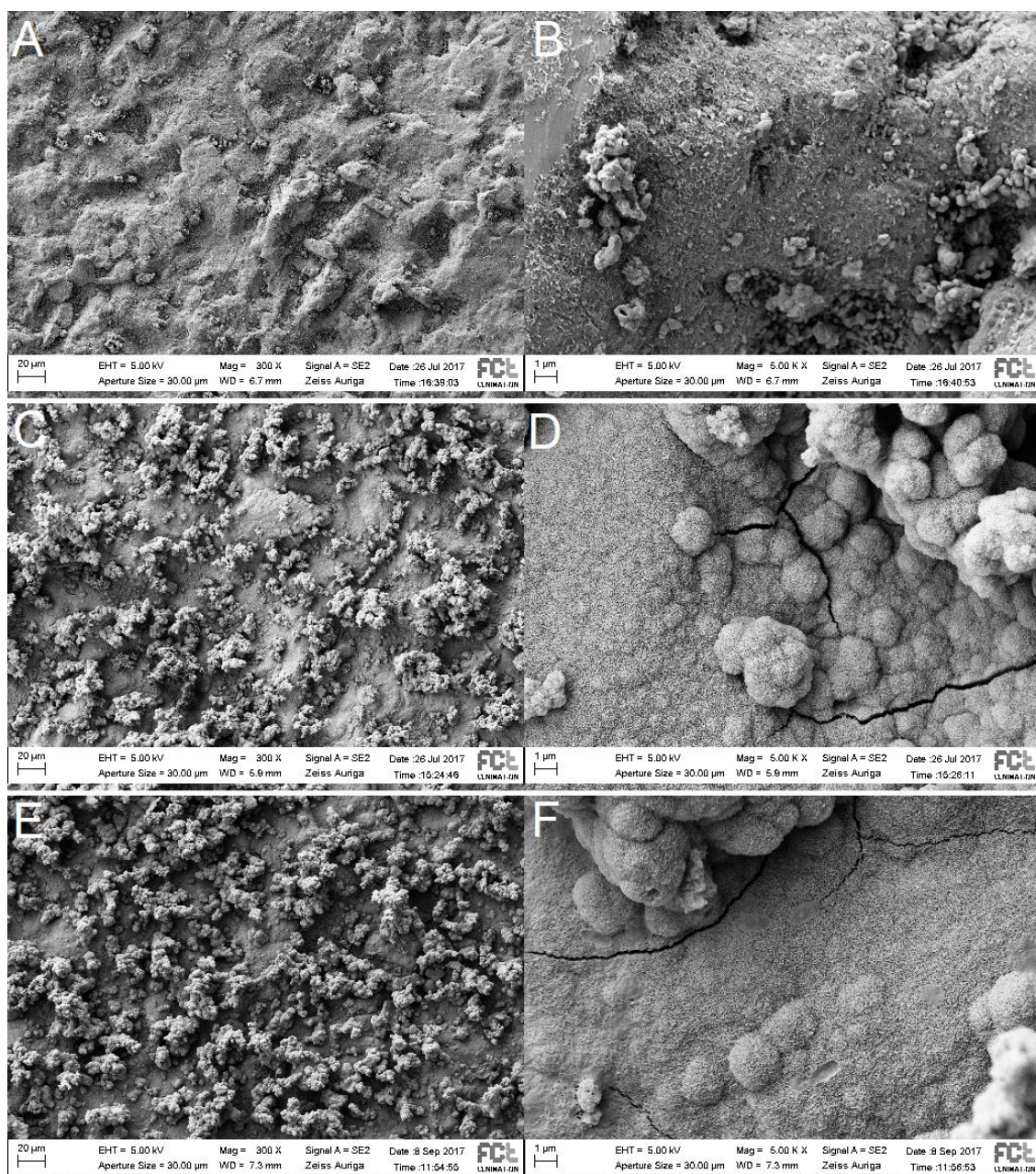


**Figura 5.37: Imagens de SEM do revestimento A, produzido por CoBlast™, imerso 36 horas em SBF e os respetivos espetros EDS: 1) zona com deposição de partículas de pequenas dimensões; 2) zona contínua de revestimento.**

Em relação às imagens da figura 5.37, o espectro 1 que corresponde a uma zona da amostra com uma deposição de partículas de pequenas dimensões, apresenta uma maior concentração de iões cálcio e fosforo, comparativamente com o espectro 2, de uma zona com uma camada contínua de revestimento. Os valores de razão molar Ca/P calculados foram superiores a 1,67, para o espectro 1 foi de 2,16 e para o espectro 2 de 3,78 o que significa que as apatites que se formaram à superfície do revestimento foram de TeCP [59].

Quanto às quantidades de Ti detetadas pela análise EDS, é possível observar-se, através do espectro, concentrações significativas deste composto. Conclui-se, portanto, que a camada de CaP que se possa ter formado, durante 36h de imersão em SBF, possui uma espessura reduzida comparativamente com as outras amostras testadas.

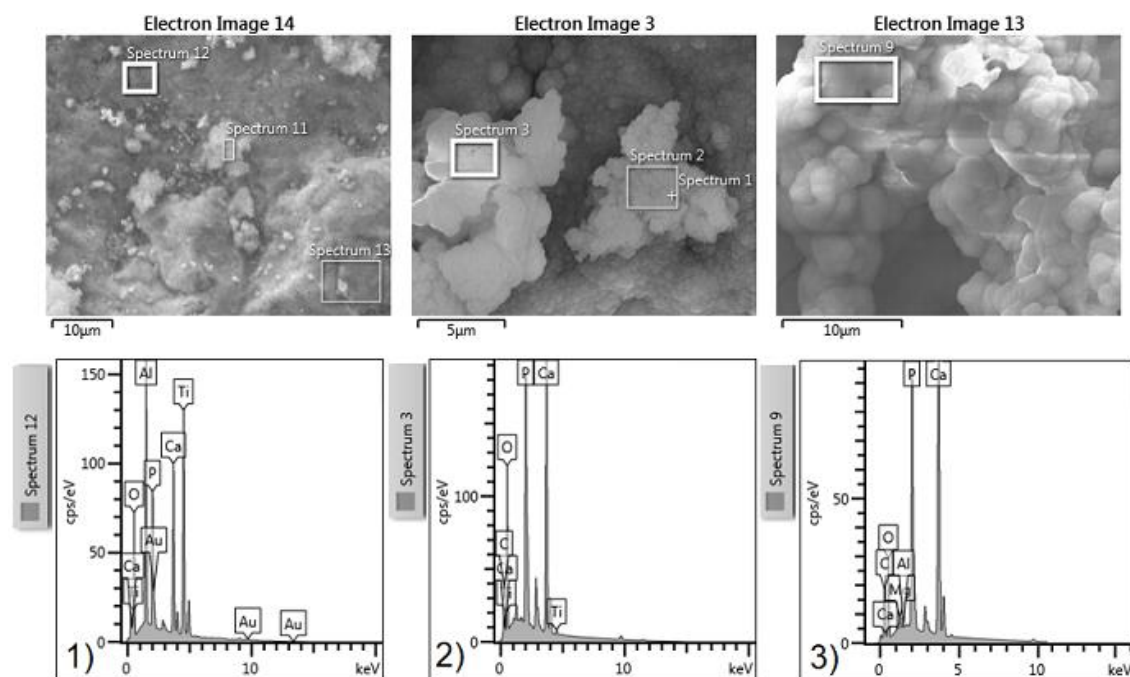
Na figura 5.38, expõem-se algumas imagens de SEM captadas da superfície das amostras revestidas pela mistura B, pela técnica de *CoBlast<sup>TM</sup>*, após ensaio de bioatividade.



**Figura 5.38:** Imagens de SEM obtidas para as amostras revestidas com a mistura B (80% de HAp e 20% de BaTiO<sub>3</sub> estrutura tetragonal), com diferentes ampliações, pela técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup>, imersas em SBF durante 36 horas (A,B), 3 dias (C,D) e 7 dias (E,F).

Segundo as imagens apresentadas na figura 5.38, após ensaios de bioatividade, referentes às amostras revestidas pela técnica de *CoBlast*<sup>TM</sup> com a mistura B, não são notórias diferenças significativas na superfície do revestimento que se submeteu a 36h de imersão em SBF. Comparativamente com as imagens do revestimento antes dos ensaios de bioatividade (imagens A e C da figura 4.12) conseguem notar-se pequenas diferenças apenas para as imagens de maiores ampliações. Começam a formar-se pequenas deposições esféricas sobre o revestimento que, por sua vez, também apresenta bastantes grânulos que não aglomeraram aquando da sua projeção. Ao comparar as imagens com maiores tempos de imersão, as alterações da superfície do reves-

timento já são significativas. Como seria de esperar, a quantidade de aglomerados que se forma aquando da imersão por um período de 7 dias é superior à de 3 dias. Observam-se, nas imagens de maior ampliação, camadas contínuas de precipitados de CaP, com um maior número de agregados esféricos na superfície D. Contudo, não se consegue distinguir, através das imagens apresentadas, qual das imersões deposita à superfície uma camada mais espessa de fosfato de cálcio.



**Figura 5.39: Imagens de SEM do revestimento B, produzido por CoBlast™, imerso 36h, 3d e 7d em SBF e os respetivos espectros EDS: 1) zona contínua de revestimento, após 36h de imersão; 2) aglomerado superficial, após 3 dias de imersão e 3) aglomerado de grandes dimensões, após 7 dias de imersão.**

Na presença da análise EDS das diferentes amostras, imersas por tempos distintos na solução SBF, torna-se possível avaliar as formações de CaP e perceber a evolução da sua deposição, consoante concentrações de Ti que cada análise detete.

De acordo com os espectros da figura 5.39, calculou-se a razão molar Ca/P das diferentes regiões e os valores encontrados foram, aproximadamente, de 1,5. Assim, perante este valor, as apatites que se formaram sob o revestimento, em todas as imersões, foram de ACP ou TCP. Por outro lado, também é possível observar que a maior concentração de íões cálcio e fosforo ocorre para a amostra imersa por um período de 3 dias [59].

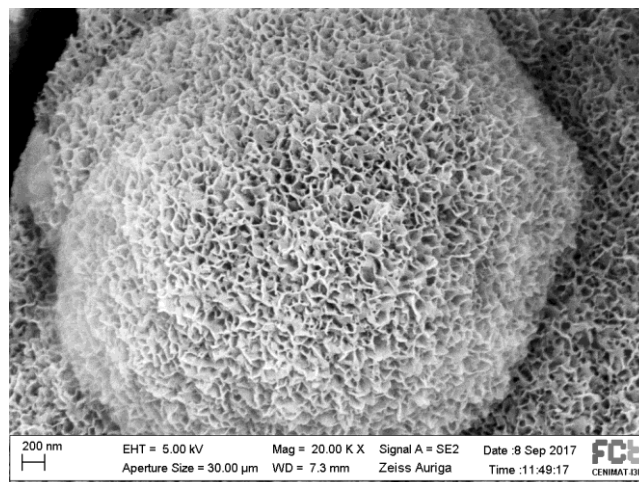
Por comparação dos três espectros, é evidente o decréscimo na concentração de Ti à medida que se aumenta o tempo de imersão em SBF. Conclui-se, portanto, que a camada de CaP que

se formou, durante os 7 dias de ensaios de bioatividade, aumentou gradualmente a sua espessura.

Para todas as amostras com e sem revestimento, com imersões na solução SBF durante 3 e 7 dias, se verificam fissuras na camada de CaP que se depositou. Porém, para amostras produzidas por *Plasma Spray* estas fissuras aparecem também para imersões durante 36h. Estas fissuras podem ter derivado de tensões após a secagem [55].

Relativamente a todas as amostra com revestimento, imersas 36h na solução SBF e analisando as quantidades de Ti que se detetaram em análises EDS pontuais da superfície do revestimento (zona contínua e com aglomerados), apura-se que o amostra que apresenta a camada de CaP mais espessa e, portanto, considerando-a a mais bioativa, é revestida por HAp pela técnica de *Plasma Spray*. Para comprovar o que se conclui e para acrescentar ao argumento anterior, relativamente à deteção de Ti, também se junta o facto de apresentar, com apenas 12h de imersão em SBF, cristais de CaP a formarem camada na superfície do revestimento, contrariamente a todos os outros revestimentos.

Por outra análise, ao analisar todas os mapas executados por análise EDS à superfície das amostras, com e sem revestimento, depois de 7 dias de imersão em SBF, constata-se que a amostra sem revestimento é a menos bioativa porque possui a camada menos espessa de CaP já que é possível detetar Titânio, Alumínio e Vanádio durante a análise. Quanto à deteção de Titânio, em todas as amostras com revestimento produzido por *CoBlast<sup>TM</sup>* se deteta Titânio, contrariamente ao que se verifica para a amostra com revestimento produzido por *Plasma Spray*. Logo, paralelamente com o que se tinha concluído para as análises pontuais passadas 36h de imersão em SBF, a amostra revestida por *Plasma Spray* volta a mostrar ser a mais bioativa. Assim, tendo em conta que não se deteta Titânio e que a análise EDS é efetuada até 1  $\mu\text{m}$  de profundidade, afere-se para a amostra mais bioativa uma espessura da camada de CaP superior ou igual a 1  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5.40:** Imagem de SEM da amostra com revestimento de HAp, por *Plasma Spray*, com ampliação de 20000x e ao fim de 7d de imersão em SBF.

Como se pode observar na figura 5.40 e por observação dos cristais de CaP em todas as imagens com ampliação 20000x das amostras testadas, essencialmente ao fim de 7 dias de imersão em SBF, descreve-se a aparência de um cristal de CaP como esférica e em forma de flor (*flower-like structures*). Estes cristais, com o passar do tempo, tornam-se mais densos e tendem a formar, progressivamente, aglomerados cada vez mais compactos.

## 5.8. Adesão e proliferação celular

De forma a avaliar o comportamento das amostras, com e sem revestimentos, em meio biológico, foram realizados ensaios de adesão e proliferação celular. Os ensaios de adesão celular mostram a biocompatibilidade dos materiais utilizados e os ensaios de proliferação celular avaliam se, com o passar do tempo, as células (osteoblastos) são capazes de se reproduzir tendo em conta as reações que ocorrem entre o meio e o revestimento.

Para se avaliar a adesão celular, foi calculada a taxa de adesão em relação ao controlo de células (CC) para cada uma das 5 amostras (sem revestimento, revestida com HAp por *Plasma Spray* e revestidas com HAp, com a mistura A (20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de nanopós de estrutura cúbica) e com a mistura B (20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de micropós de estrutura tetragonal), por *CoBlast*<sup>TM</sup>.

Na tabela 5.9 encontram-se expostos os valores da população de células e respetivas incertezas padrão combinada.

**Tabela 5.9: População de células que aderiu à superfície das 5 amostras analisadas e respectivas incertezas padrão combinada.**

Amostras	População de células(%)
<b>Ti-6Al-4V</b>	96±3
<i>Plasma Spray</i>	
<b>HAp</b>	72±3
<i>CoBlast<sup>TM</sup></i>	
<b>HAp</b>	73±5
<b>Mistura A</b>	96±1
<b>Mistura B</b>	83±7

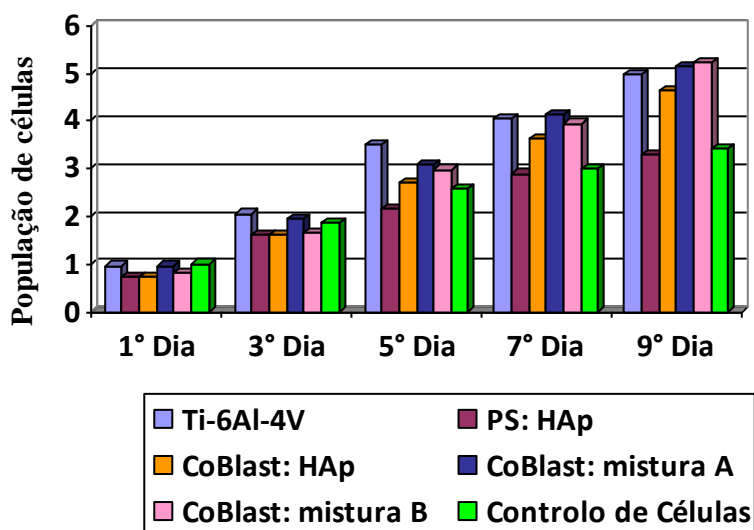
A tabela 5.9 possui os valores da população de células que aderiu à superfície da amostra calculados relativamente à população do controlo de células, isto é, o número de células que se deposita na amostra e que consegue aderir ao material, permanecendo viável, relativamente ao número de células inicialmente colocado no poço. Assim, as populações de células que aderiram à superfície de cada uma das amostras testadas compreendem valores maiores ou menores tendo em conta uma maior ou menor adesão ao substrato, com ou sem revestimento.

Através da análise dos resultados da tabela 5.9, constatam-se os mesmos valores de população de células aderentes tanto para o substrato de Ti-6Al-4V, sem revestimento, como para a amostra revestida com a mistura A, pela técnica de *CoBlast<sup>TM</sup>*. Os resultados foram 96±3% para a amostra sem revestimento e 96±1% para o revestimento com a mistura A. Isto significa que 96% das células que se colocaram inicialmente em cada um dos poços aderiu à superfície destes dois tipos de amostras. Para as amostras com revestimento produzido por *Plasma Spray*, verifica-se o menor valor de população de células aderentes ao revestimento. Este facto indica que todos os revestimentos produzidos por *CoBlast<sup>TM</sup>* apresentam superfícies com condições mais propícias à adesão das células.

Assim, perante os resultados obtidos para a técnica de *CoBlast<sup>TM</sup>* verificam-se valores superiores de populações de células para o revestimento com a mistura A seguindo-se o revestimento com a mistura B e, por fim, com HAp.

Uma possível explicação para uma melhor adesão dos osteoblastos em superfícies revestidas por *CoBlast<sup>TM</sup>* é que essas amostras possuem um maior número de grãos na superfície devido à projeção do revestimento a baixa temperatura e, conseqüentemente, uma maior quantidade de contornos de grãos, quando comparados com a superfície de um revestimento produzido por *Plasma Spray*. Como a adesão dos osteoblastos ocorre nos contornos dos grãos, estes revestimentos dão origem a uma maior e melhor adesão dos osteoblastos em materiais com superfícies granuladas [47]. Estas afirmações também justificam o facto de a amostra revestida com a mistura A apresentar maior valor de adesão, uma vez que é a única que possui nanopós na sua composição, dando origem à superfície com maior quantidade de grânulos.

Na figura 5.41 faz-se uma representação gráfica dos valores de população celular e dos respectivos controlos de células, obtidos para os 5 dias de ensaio em 9 dias de cultura celular.



**Figura 5.41:** Representação gráfica dos valores populacionais celulares incluindo o respetivo controlo de células, para todos os tipos de amostras e durante os 5 dias de ensaios de proliferação.

Na tabela 5.10 encontram-se os resultados dos ensaios de proliferação celular, que foram calculados tendo em conta o número de células que aderiu à amostra no 1º dia da cultura celular.

**Tabela 5.10:** Valores de população de células que proliferaram em cada amostra, ao longo dos 4 dias de ensaios e respetivas incertezas padrão combinada.

Amostra	População de células (%)			
	3º dia	5º dia	7º dia	9º dia
<b>Ti-6Al-4V</b>	205±8	352±10	406±13	499±15
<i>Plasma Spray</i>				
<b>HAp</b>	162±5	216±3	290±8	331±8
<i>CoBlast™</i>				
<b>HAp</b>	160±7	269±13	362±5	463±12
<b>Mistura A</b>	194±5	307±5	413±9	514±15
<b>Mistura B</b>	167±12	298±27	395±39	522±56

Analisando os resultados da tabela 5.10, pode constatar-se para a amostra revestida com a mistura B, apesar de revelar uma menor adesão celular, que a população de células aumenta a um ritmo ligeiramente superior ao das amostras de Ti-6Al-4V e revestidas com a mistura A e, dado isso, passados os 9 dias de cultura celular as populações equivalem-se.

Por outro lado, paralelamente ao que se concluiu para os ensaios de adesão celular, a amostra com revestimento de HAp produzido por *Plasma Spray* apresenta, para qualquer um

dos dias de ensaio, valores de população celular inferiores, comparativamente, a todos os outros tipos de revestimento. Além disso, também se confirma um aumento menos significativo da população de células entre cada um dos dias de ensaio, que é mais evidente entre o 7º e o 9º dia. Na superfície do revestimento pode estar a iniciar-se uma possível saturação celular e a renovação celular começa a ficar comprometida.

Através da análise da representação gráfica da figura 5.41 e da tabela 5.10, observa-se um crescimento progressivo da população celular, ao longo dos 5 ensaios, para todas as amostras sem revestimentos e com revestimento produzido por *CoBlast<sup>TM</sup>* e *Plasma Spray*. Contudo, apenas para o primeiro dia de ensaios o valor de população celular deste controlo se encontra acima dos valores que retratam a adesão para as amostras em teste. Logo, ocorreu maior multiplicação celular na superfície do revestimento das amostras que no fundo do poço da placa de poliestireno.

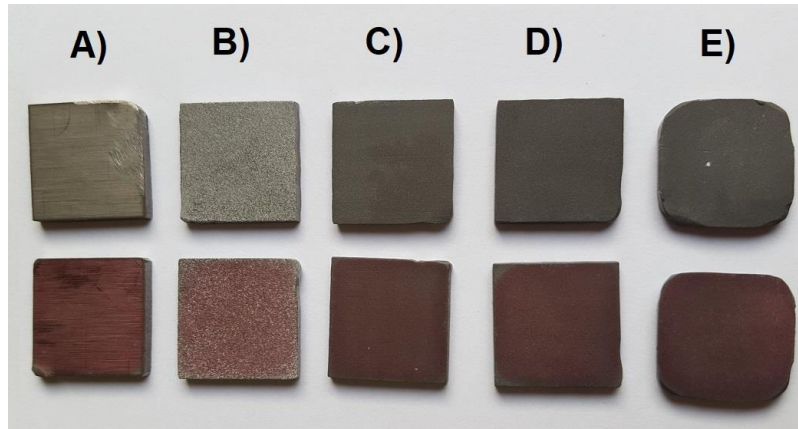
Assim, em termos de resultado final e tendo em consideração resultados experimentais indissociáveis das suas incertezas, conclui-se para as amostras sem revestimento ( $499\pm 15\%$ ) e revestidas com a mistura A ( $514\pm 15\%$ ) e B ( $522\pm 56\%$ ) resultados equivalentes. Assim, comparando apenas as amostras com revestimento, alcançam-se melhores resultados para as amostras revestidas com as misturas A e B.

Com este trabalho foi possível verificar que as diferentes superfícies implantares proporcionam condições favoráveis para o crescimento celular, embora com graus distintos. Logo todas as superfícies são susceptíveis de induzir a formação óssea e a consequente osteointegração, *in vivo*.

## **5.9. Metabolismo celular**

Os marcadores de formação óssea, fosfatase alcalina e osteocalcina, atualmente utilizados, refletem a atividade osteoblástica em diferentes estágios de diferenciação deste tipo celular. Durante a formação do osso, a produção da matriz óssea coincide com um aumento na produção de fosfatase alcalina e precede a mineralização, fase em que a osteocalcina é secretada pelos osteoblastos maduros[39]. As imagens obtidas neste trabalho permitem identificar a produção de ALP nos diferentes tipos de amostras e a sua análise torna possível a identificação de qual ou quais das amostras apresentam uma coloração avermelhada mais intensa e, portanto, maior produção de ALP.

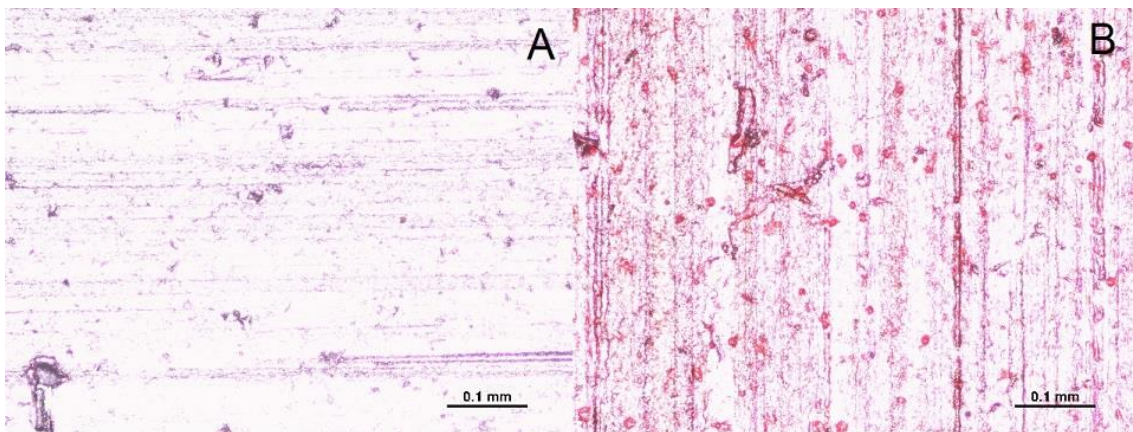
Na figura 5.42 mostram-se as imagens macroscópicas das amostras sem e com marcação ALP, a imagem superior apresenta a amostra que serviu para controle e a imagem inferior a amostra sobre a qual se realizou a marcação ALP.



**Figura 5.42:** Amostras com e sem marcação ALP: A) Ti-6Al-4V; B) *Plasma Spray*: HAp; C) *CoBlast™*: HAp; D) *CoBlast™*: mistura A e E) *CoBlast™*: mistura B.

Através da observação das amostras da figura 5.42, vê-se que a superfície das amostras ficou totalmente marcada e, portanto, apresenta uma coloração avermelhada na sua totalidade.

Nas figuras 5.43 a 5.47 expõem-se as imagens microscópicas, captadas nas mesmas condições, das amostras da figura 5.42 e são uma segunda forma de mostrar a marcação ALP. As imagens A e B mostram a superfície da amostra sem e com marcação ALP, respetivamente.



**Figura 5.43:** Imagens do substrato de Ti-6Al-4V: sem marcação ALP (A) e com marcação ALP (B).

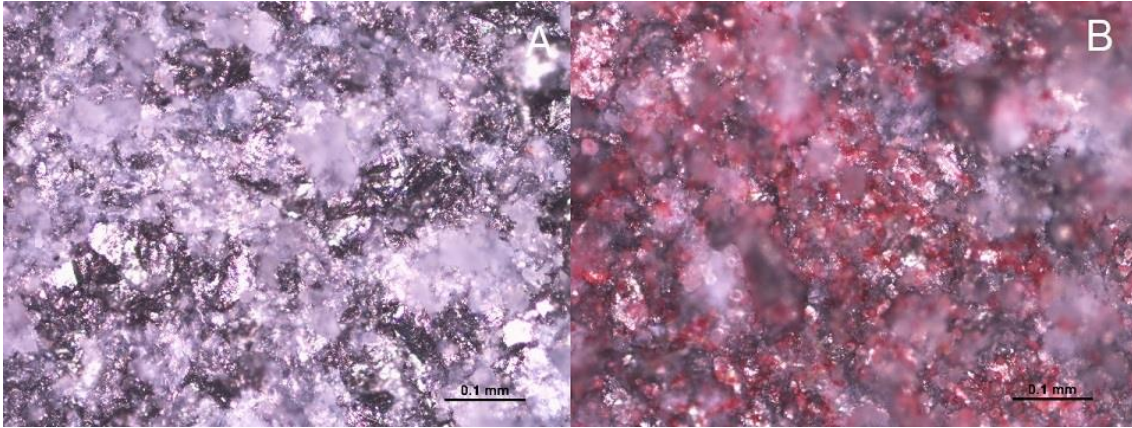


Figura 5.44: Imagens do revestimento de HAp produzido por *Plasma Spray*: sem marcação ALP (A) e com marcação ALP (B).

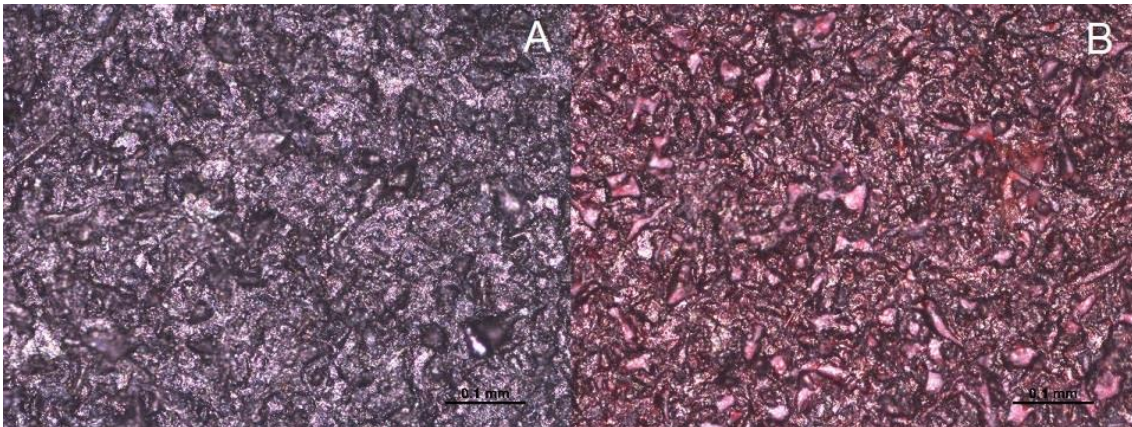


Figura 5.45: Imagens do revestimento de HAp produzido por *CoBlast™*: sem marcação ALP (A) e com marcação ALP (B).

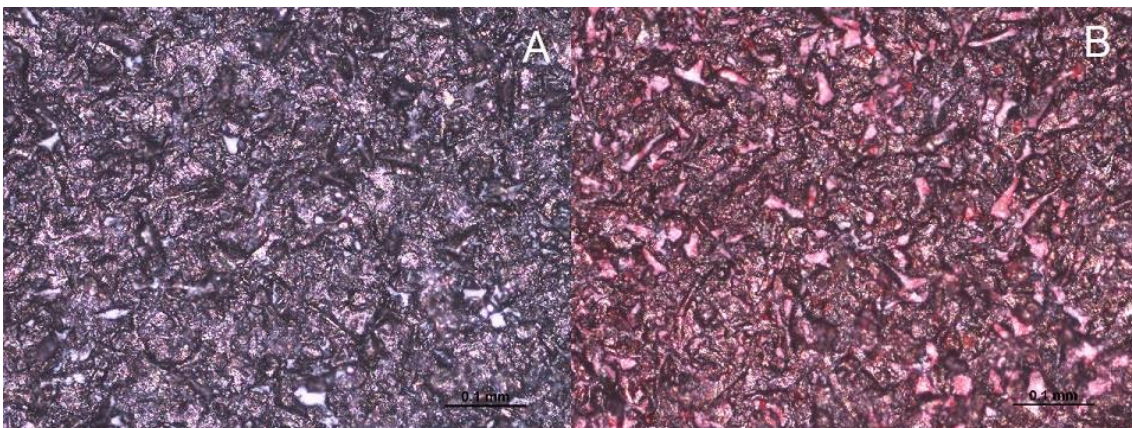
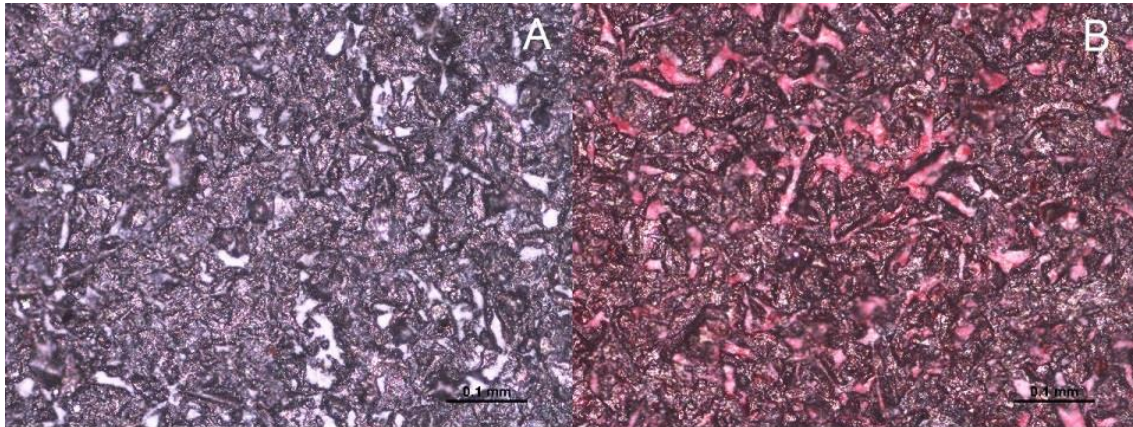


Figura 5.46: Imagens do revestimento com a mistura A (20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de estrutura cúbica), produzido por *CoBlast™*: sem marcação ALP (A) e com marcação ALP (B).



**Figura 5.47: Imagens do revestimento com a mistura B (20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de estrutura tetragonal), produzido por *CoBlast*<sup>TM</sup>: sem marcação ALP (A) e com marcação ALP (B).**

Depois de observar cuidadosamente todas as imagens B comparativamente com a respectiva imagem A, constata-se que as figuras 5.45 a 5.47, todas produzidas por *CoBlast*<sup>TM</sup>, apresentam as colorações mais intensas das marcações de ALP. Para as imagens com revestimento produzido por *Plasma Spray*, a imagem não é nítida embora apresente zonas avermelhadas intensas, além de possuir zonas da superfície bastante desfocadas devido, provavelmente, à elevada rugosidade da superfície da amostra.

Como esta análise é meramente qualitativa, de modo a comprovar quantitativamente o que se observa, recorreu-se à intensidade média dos *pixels* do canal R e do canal B (como referência) para cada uma das imagens, com e sem marcação ALP. Para isso, usou-se a análise por histograma que é disponibilizado no programa de imagem *ImageJ*. Foi calculada a razão entre a intensidade do canal R e do canal B para cada uma das imagens e, por fim, para se conseguir comparar as amostras com e sem revestimentos a nível de intensidade de marcação, calculou-se a razão entre a intensidade dos *pixels* da imagem com marcação ALP e de controlo. Os resultados que se obtiveram para um conjunto de 7 testes foram  $1,061 \pm 0,005$  para amostras sem revestimento (figura 5.43),  $1,172 \pm 0,013$  para revestimentos de HAp produzidos por *Plasma Spray* (figura 5.44) e, quanto aos revestimentos produzidos por *CoBlast*<sup>TM</sup>,  $1,262 \pm 0,008$  para HAp (figura 5.45),  $1,260 \pm 0,008$  para a mistura A (figura 5.46) e  $1,249 \pm 0,012$  para a mistura B (figura 5.47).

Logo, para os revestimentos produzidos por *CoBlast*<sup>TM</sup> e, mais especificamente, para os revestimentos de HAp e com 20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de nanopós de estrutura cúbica (mistura A), apura-se a maior produção de fosfatase alcalina. Significa que, para estes tipos de revestimento, porque aumenta a eficiência na formação da matriz óssea, por observação da produção de ALP, é expectável que haja um aumento da osteointegração para implantes revestidos por *CoBlast*<sup>TM</sup>.

## 5.10. Morfologia celular

A análise da morfologia das células é essencial para identificar a forma, estrutura e tamanho das células. Além de confirmar o estado saudável das células, é possível visualizar o citoesqueleto, as adesões focais e os núcleos das células.

A análise do citoesqueleto das células SAOS-2 foi realizada utilizando a marcação dos microfilamentos (actina), a análise das junções célula-matriz efetuou-se com a marcação das adesões focais (vinculina) e a marcação com DAPI (azul) permitiu avaliar a morfologia nuclear.

Nas figuras da tabela 5.11 estão representados os 3 canais RGB para cada uma das imagens RGB representadas na tabela 5.12. As imagens da tabela 5.12 apresentam a morfologia das células na superfície de cada um dos tipos de amostra, constituídas pelas imagens da marcação da actina (canal R), da vinculina (canal G) e do DAPI (canal B).

Utilizou-se o programa de imagem *ImageJ* para definir e tratar cada um dos canais RGB. Todas as imagens possuem as mesmas dimensões 3436x2124 *pixels* e, sempre que necessário, os canais sofreram um ajuste de brilho/contraste para que a imagem final se tornasse a mais definida possível. Essencialmente para as imagens de *Plasma Spray*, devido à rugosidade da superfície, foi necessário processar várias imagens, captadas exatamente da mesma zona da superfície, para gerar uma única imagem com um maior número de células focadas. Para isso, recorreu-se a um dos *plugins* que o programa disponibiliza - “*Extended Depth of Field*”[60].

Desta forma, as culturas celulares podem ser descritas com base na sua morfologia (forma e aspeto), através das figuras da tabela 5.12.

Tabela 5.11: Imagens de cada um dos canais que formaram a imagem RGB, para amostras com e sem revestimento, com marcação do anticorpo primário, secundário e DAPI.

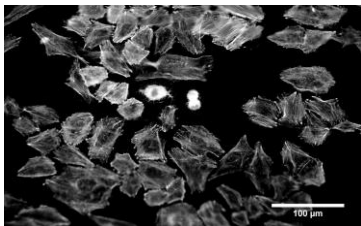
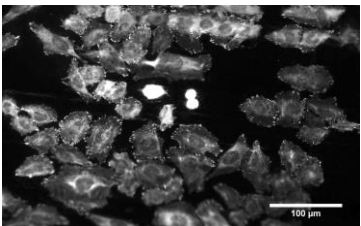
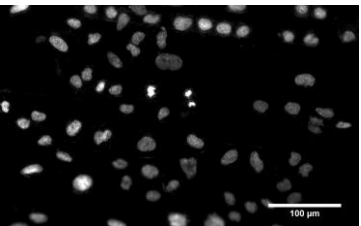
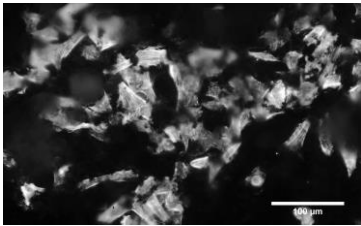
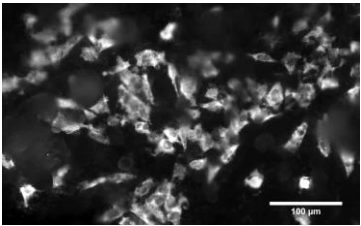
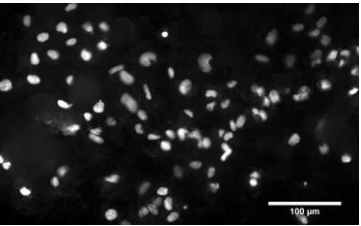
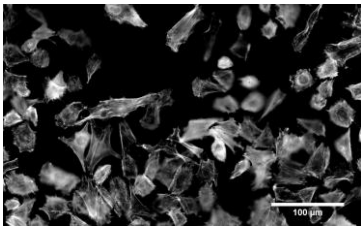
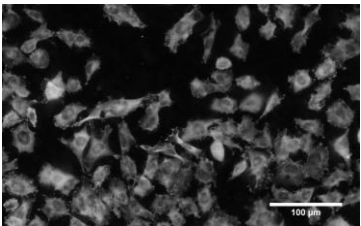
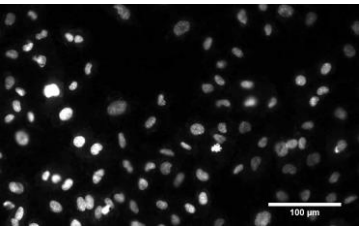
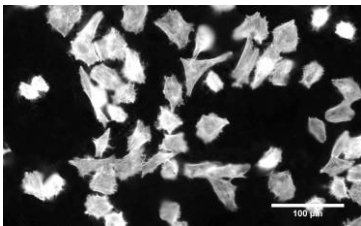
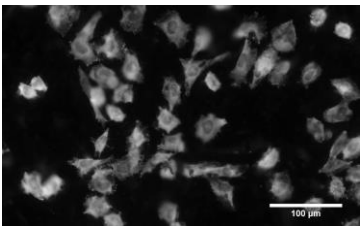
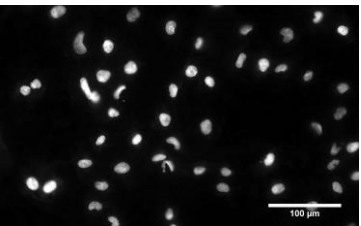
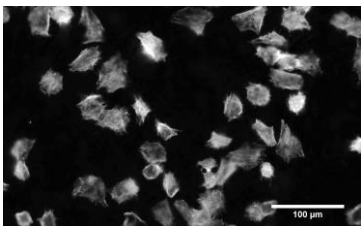
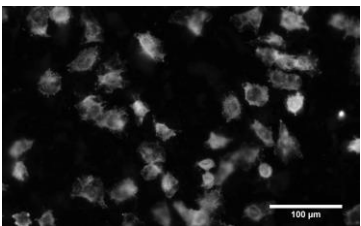
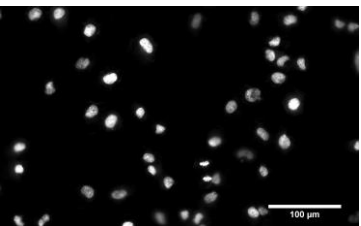
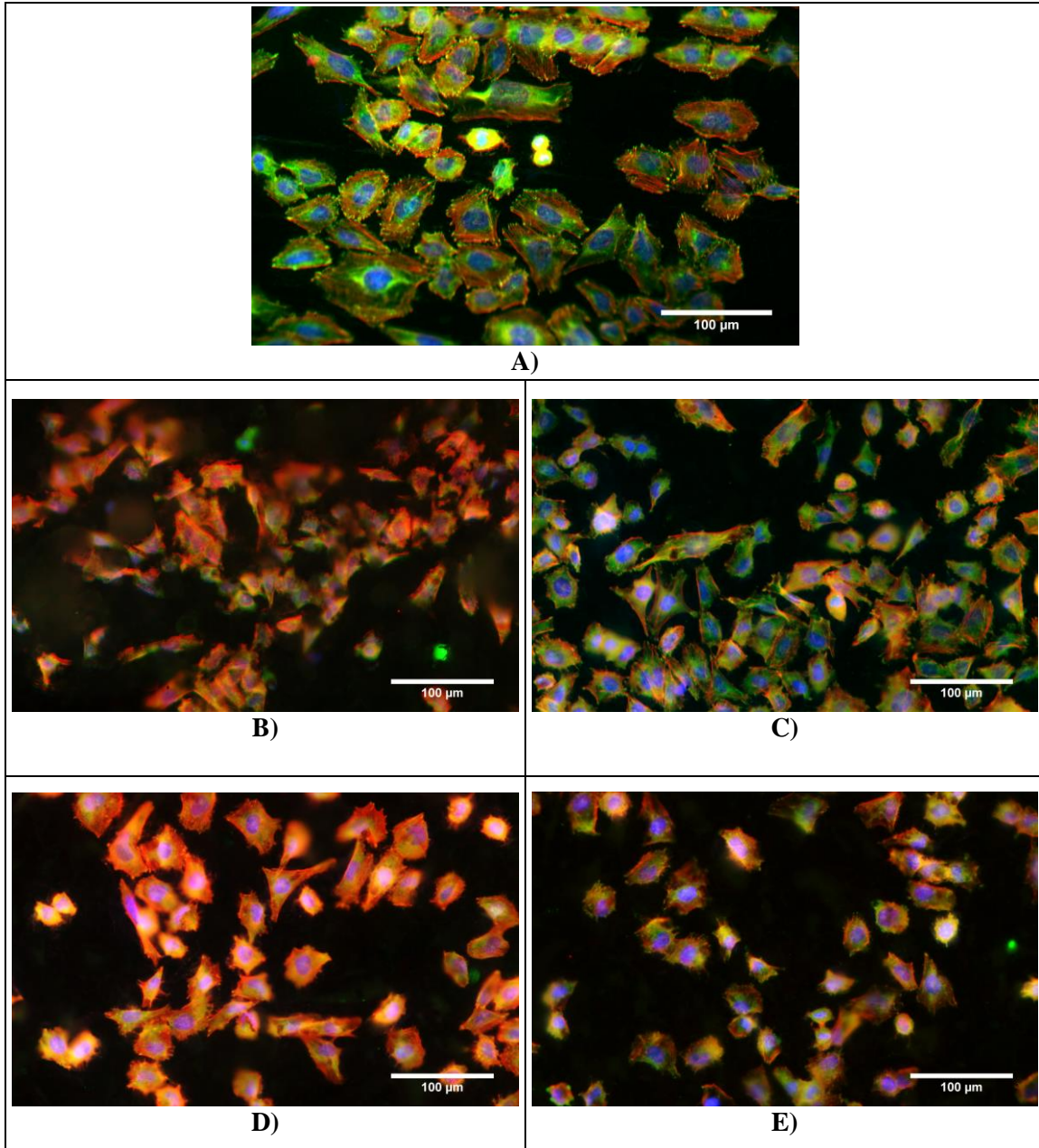
Canal R: Actina	Canal G: Vinculina	Canal B: DAPI
<b>Ti-6Al-4V</b>		
		
<b>Plasma Spray: HAp</b>		
		
<b>CoBlast™: HAp</b>		
		
<b>CoBlast™: Mistura A</b>		
		
<b>CoBlast™: Mistura B</b>		
		

Tabela 5.12: Imagens RGB da morfologia das células para a superfície de todos os tipos de amostras: A)Ti-6Al-4V; B)*Plasma Spray*: HAp; C)*CoBlast™*: HAp; D)*CoBlast™*: 20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> estrutura cúbica e E)*CoBlast™*: 20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> estrutura tetragonal.



O primeiro sinal de que algo não está bem na cultura de células ocorre quando, ao serem examinadas ao microscópio, as células apresentam padrões de crescimento pobres ou pouco usuais [61]. Assim, ao analisar cada uma das imagens da tabela 5.12 não se encontram padrões distintos de crescimento celular. Observam-se nitidamente para as células da superfície da

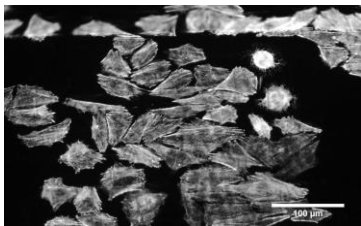
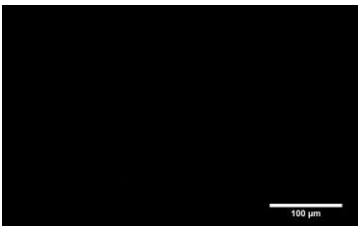
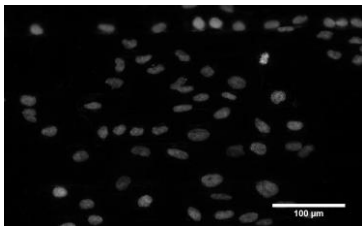
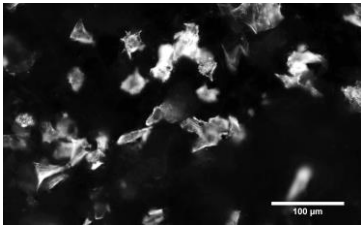

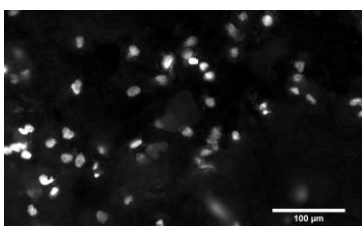
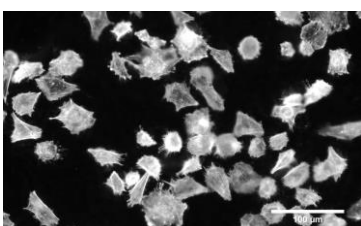

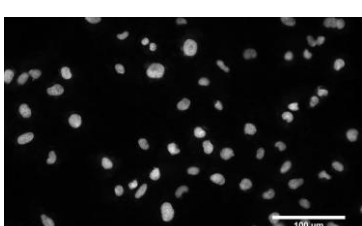
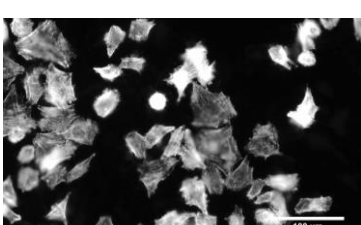

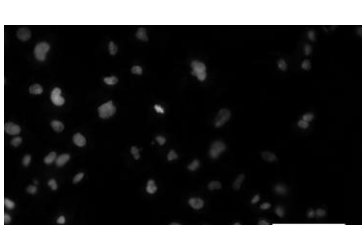
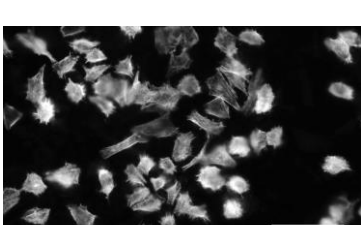
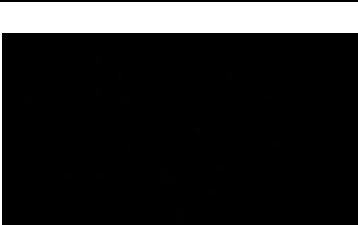
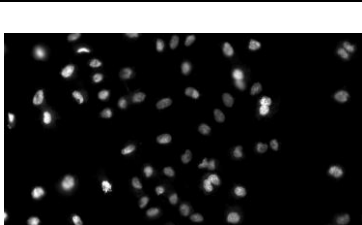
amostra de Ti-6Al-4V muitas adesões focais e para a área que se analisou da superfície do revestimento com a mistura B um menor número de células.

Ao comparar as imagens da morfologia das células para as superfícies das amostras com e sem revestimento, verifica-se que para o substrato de Ti-6Al-4V existe um nível de nitidez superior comparativamente com todas as outras imagens. Este facto, deve-se à rugosidade presente em cada uma das amostras com revestimento e, como se pode observar pela imagem B, revela ser superior para revestimentos de *Plasma Spray*. Ao analisar a morfologia nuclear do revestimento de Ti-6Al-4V, consegue perceber-se que está a ocorrer divisão celular para um dos núcleos.

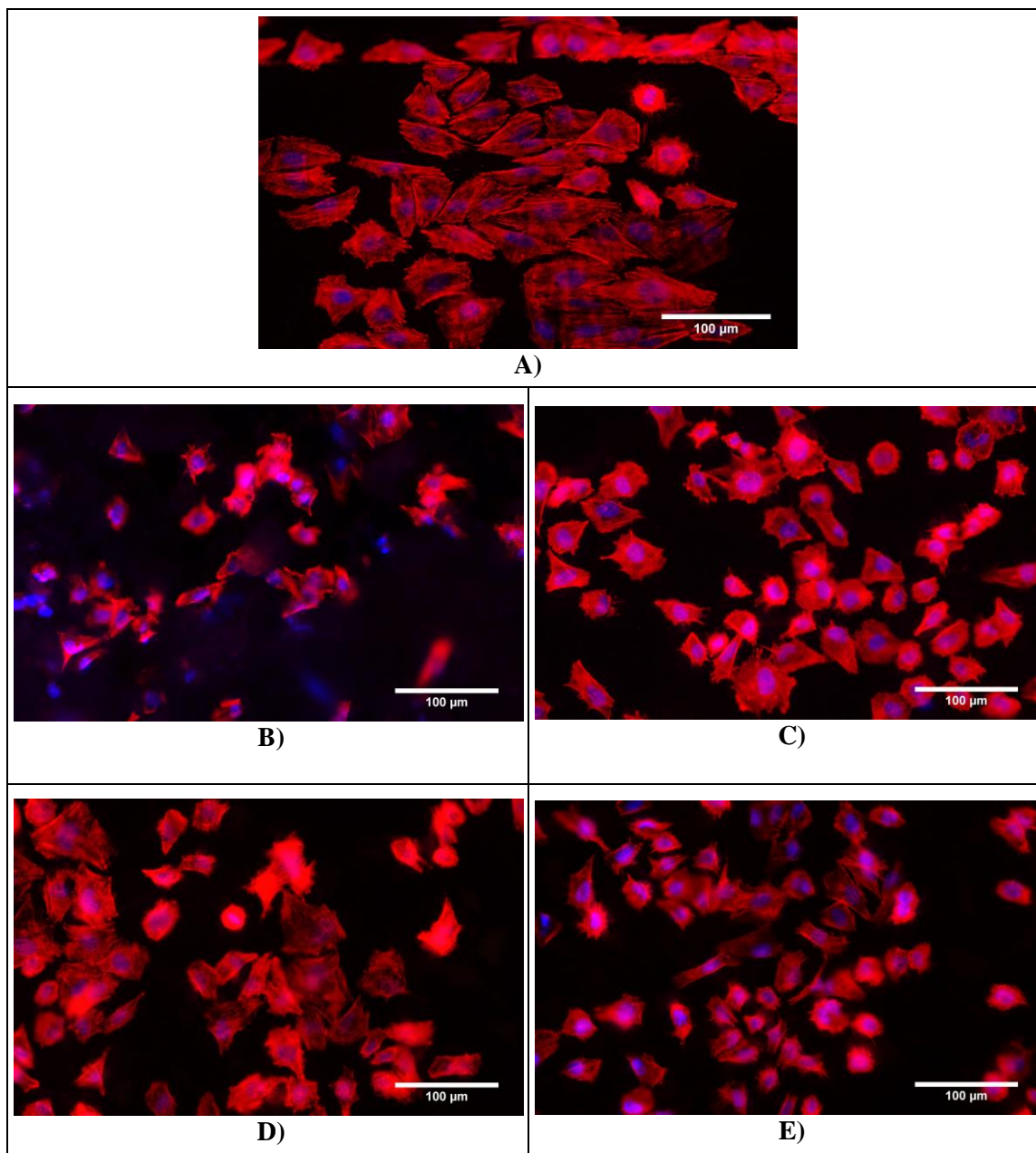
No entanto, apesar das alterações da morfologia celular que possam existir é difícil quantificar essas alterações e, portanto, as observações são somente qualitativas.

A fim de provar que as marcações da vinculina se devem, exclusivamente, à ligação do anticorpo secundário ao anticorpo primário e deste à vinculina, os procedimentos também foram efetuados sem adicionar o anticorpo primário, como se pode observar nas figuras da tabela 5.13. Neste caso, qualquer fluorescência verde intensa que se observe, nas imagens da tabela 5.14, não poderá ser devida à ligação específica do anticorpo secundário ao primário.

Tabela 5.13: Imagens de cada um dos canais que formaram a imagem RGB, para amostras com e sem revestimento, com marcação do anticorpo secundário e DAPI.

Canal R: Actina	Canal G: Vinculina	Canal B: DAPI
<b>Ti-6Al-4V</b>		
		
<b>Plasma Spray: HAp</b>		
		
<b>CoBlast™: HAp</b>		
		
<b>CoBlast™: Mistura A</b>		
		
<b>CoBlast™: Mistura B</b>		
		

**Tabela 5.14: Imagens RGB da morfologia das células, sem marcação do anticorpo primário, para a superfície de todos os tipos de amostras: A)Ti-6Al-4V; B)Plasma Spray: HAp; C)CoBlast<sup>TM</sup>: HAp; D)CoBlast<sup>TM</sup>: 20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> estrutura cúbica e E)CoBlast<sup>TM</sup>: 20%/80% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> estrutura tetragonal.**



Pela análise das figuras da tabela 5.14, são visíveis imagens do citoesqueleto (actina) e dos núcleos, mas não se obtêm imagens da vinculina, já que o anticorpo secundário não se consegue ligar ao anticorpo primário, que está ausente, e não se liga inespecificamente a outras proteínas ou estruturas da célula.



## 6. Conclusões e perspectivas futuras

### 6.1. Conclusões

A presente dissertação foi desenvolvida com o intuito de estudar a eficiência da deposição de carga superficial em revestimentos à base de hidroxiapatite, tendo em consideração estudos anteriores, em que superfícies carregadas de HAp apresentam uma mais rápida osseointegração.

Considerando o objetivo final, iniciou-se o projeto com a produção de revestimentos à base de HAp recorrendo ao equipamento disponibilizado pela empresa Ceramed para revestir os substratos da liga de Titânio. Pela análise de XRF, foi possível verificar que a composição química da liga está de acordo com a norma ASTM (F136), relativamente aos implantes médicos.

Pela análise DRX efetuada aos pós e às amostras com HAp e HAp/BaTiO<sub>3</sub> antes e após revestimento verificou-se para os quatro tipos de revestimento que apresentam as estruturas cristalinas esperadas e a ausência de formação de subprodutos. Concluiu-se, através do cálculo do tamanho dos cristalitos de HAp, que as amostras revestidas por *Plasma Spray* apresentam um grau de cristalinidade superior aos revestimentos produzidos por *CoBlast<sup>TM</sup>*, enquanto os tamanhos dos cristalitos de BaTiO<sub>3</sub> mostraram ser superiores para amostras revestidas com micropós de estrutura tetragonal (mistura B). Quanto aos parâmetros de rede calculados, confirma-se a mesma estrutura cristalina inicial para cada um dos componentes, com um possível rearranjo dos átomos para as amostras revestidas com HAp e para as amostras revestidas com HAp e BaTiO<sub>3</sub>.

Com a observação dos espectros de FTIR, comprovou-se, para todos os revestimentos, a existência do pico característico do grupo fosfato na banda com números de onda entre 1000cm<sup>-1</sup> e 1100cm<sup>-1</sup>. Em relação ao estudo de FTIR, este permitiu ainda verificar que não há deslocamento das bandas características da HAp ou do BaTiO<sub>3</sub>, o que pressupõe que as misturas são capazes de incorporar as características específicas de cada um dos componentes sem alterações significativas.

A análise de SEM às superfícies das amostras revestidas mostrou que revestimentos produzidos por *CoBlast<sup>TM</sup>* apresentam morfologia granular, para qualquer que seja a sua composição, e por *Plasma Spray* um revestimento mais rugoso em que se observa a fusão das partículas

depositadas. No que respeita à análise EDS, após revestimento, verificou-se a possível formação de novas fases de HAp para revestimentos por *CoBlast<sup>TM</sup>* (CB) e a presença de Al, V e Ti refere-se ao substrato de Ti-6Al-4V e ao pó abrasivo ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

Mediante os resultados de polarização por descarga de corona, verificou-se para revestimentos por *Plasma Spray* maior deposição de potencial de superfície, em ensaios a 250°C e com tempo de polarização de 1 minuto, relativamente a todos os outros tipos de revestimento. Contudo, este estudo mostrou que se depositam pequenas quantidades de carga na amostra e o seu rápido decaimento leva, passado pouco tempo, a um valor de carga muitíssimo baixo.

Quanto ao estudo das correntes termoestimuladas, de um modo geral, conclui-se que os revestimentos de HAp produzidos por *Plasma Spray* conservam, em módulo, cargas superiores para ensaios com polarização negativa e positiva. Para ensaios sem polarização e sem tratamento térmico, as amostras de HAp por *CoBlast<sup>TM</sup>* e *Plasma Spray* apontam para os resultados mais altos, tal como para ensaios sem polarização e com tratamento térmico.

De forma a tentar perceber os problemas encontrados no processo de polarização, efectuou-se a análise da rugosidade dos revestimentos. Comparando os valores de espessura e as medidas de rugosidade média para cada revestimento, conclui-se que têm a ordem de grandeza equivalente, isto é, um grau de rugosidade bastante elevado. O que dará origem a áreas do revestimento com camadas demasiado finas ou, praticamente, sem revestimento. Assim, a polarização por corona revela, possivelmente, condução de carga elétrica depositada na superfície das amostras que rapidamente “escoa” para o eléctrodo ligado à terra, nas zonas mais finas do revestimento. Na polarização por contacto, a rugosidade elevada leva a um mau contacto com o eléctrodos, tanto durante a aplicação do campo eléctrico como durante as medidas das correntes termoestimuladas, que resulta numa polarização menos eficiente e corrente medida com ruído significativo.

Prosseguiu-se o estudo com ensaios de citotoxicidade, bioatividade e de cultura celular a todas as amostras não polarizadas com e sem revestimento, para se conseguir encontrar uma relação, em termos de bioatividade e biocompatibilidade, entre os revestimentos de *Plasma Spray* e *CoBlast<sup>TM</sup>*. Também é importante focar revestimentos com  $\text{BaTiO}_3$ , por serem uma inovação relativamente às técnicas estudadas. Os ensaios de citotoxicidade afirmaram, para todas as concentrações testadas, que os revestimentos utilizados são não citotóxicos. Após os ensaios de bioatividade foi possível, por análise SEM e EDS, concluir que a amostra que apresenta a camada de CaP mais espessa e, portanto, a mais bioativa é revestida por HAp por *Plasma Spray*. Perante os resultados de cultura celular, as amostras revestidas por CB com a mistura A (80%/20% (m/m) de HAp/ $\text{BaTiO}_3$  de estrutura cúbica) mostraram um nível superior de adesão

celular e, quanto à proliferação celular, tanto as amostras revestidas com a mistura A como com a mistura B (80%/20% (m/m) de HAp/BaTiO<sub>3</sub> de estrutura tetragonal) mostraram resultados equivalentes e, portanto, as suas superfícies proporcionam condições favoráveis para o crescimento celular.

Por fim, efetuaram-se testes para avaliar o metabolismo e a morfologia das células. Para os revestimentos produzidos por *CoBlast*<sup>TM</sup> e, mais especificamente, para o revestimento com a mistura B, apurou-se a maior produção de fosfatase alcalina. Logo, é expectável que haja um aumento da osteointegração para os implantes revestidos por *CB*, em particular com titanato de bário na sua fase piezoelétrica. Depois de analisar a morfologia celular em cada um dos revestimentos não se encontraram padrões distintos de crescimento celular.

Conclui-se que as amostras revestidas com hidroxiapatite por *Plasma Spray* são mais polarizáveis e capazes de reter durante mais tempo cargas superficiais que as amostras de *CoBlast*<sup>TM</sup>. Também se verifica que os revestimentos por *Plasma Spray* apresentam maior biocompatibilidade. No entanto, como demonstrado em estudos anteriores, a técnica de *CB* tem um nível de integração de revestimento/substrato superior, além de ser uma técnica com a possibilidade de se aplicar a qualquer geometria do substrato e a peças delicadas com problemas mecânicos ou térmicos. Pelo que se pode concluir que os revestimentos por *CoBlast*<sup>TM</sup> podem ser uma alternativa viável em casos em que existem problemas associados ao uso da técnica de *Plasma Spray*. Por outro lado, mostrou-se que é possível melhorar a biocompatibilidade ao adicionar uma cerâmica piezoelétrica (BaTiO<sub>3</sub>) aos revestimentos à base de HAp, produzidos por *CoBlast*<sup>TM</sup>, o que poderá fazer esta técnica mais competitiva face ao *Plasma Spray*.

## 6.2. Perspetivas futuras

Atendendo a que este trabalho representa um estudo inicial da influência da carga superficial eléctrica em revestimentos produzidos por *CB*, seria importante:

- Optimizar as condições do equipamento de polarização por descarga de corona, para que seja possível variar as distâncias ponta de descarga-grelha e grelha-porta-amostras e aumentar a tensão de descarga que se aplica na ponta da agulha;
- Na polarização DC, melhorar o contacto eléctrico no equipamento de polarização DC e polarizar as amostras a temperaturas mais elevadas, com o objetivo de se conseguir uma maior carga de polarização e maior densidade de corrente;

- Realizar ensaios de bioatividade e cultura celular das amostras polarizadas, comparando com os resultados obtidos sem polarização.

Tendo em conta que é possível melhorar a biocompatibilidade dos implantes ao adicionar titanato de bário, o que pode proporcionar uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes que recorram a implantologia, seria importante continuar a investigação da deposição de carga superficial neste tipo de revestimentos.

## 7. Referências bibliográficas

- [1] B. F. G. Nunes, “A colocação de implantes em medicina dentária.” Tese de Mestrado, Instituto superior de ciências da saúde egas moniz, 2014.
- [2] C. R. C. Braga, F. M. A. de Melo, I. F. Vitorino, M. V. L. Fook, and S. M. L. Silva, “Caracterização superficial da liga de titânio ao ser submetidos a tratamento de jateamento.” *Ceramics*, no. 1, pp. 1748–1755, 2010.
- [3] D. Kumar, J. P. Gittings, I. G. Turner, C. R. Bowen, A. Bastida-Hidalgo, and S. H. Cartmell, “Polarization of hydroxyapatite: Influence on osteoblast cell proliferation,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 4, pp. 1549–1554, 2010.
- [4] A. Esteves, M. do C. Lança, and J. P. Borges, “Estudo das Propriedades Elétricas de Filmes de Quitosano e Quitosano/Hidroxiapatite para Possíveis Aplicações em Implantes ósseos,” Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2016.
- [5] M. G. Schardosim, “Síntese e caracterização de compósitos tipo PLGA,” Tese de Doutorado, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2016.
- [6] M. Gutierrez, M. Ascensão Lopes, N. Sooraj Hussain, A. Trigo Cabral, L. Almeida, and J. Domingos Santos, “Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual,” *Arquivos de Medicina*, vol. 19, no. 4, Porto, pp. 153–162, 2005.
- [7] L. B. Rodrigues, “Aplicações de biomateriais em ortopedia,” Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, 2013.
- [8] F. V. de Aquino, “Recobrimento de Hidroxiapatite em substrato de Titânio,” Tese de Mestrado, Universidade Federal de Alfenas, 2015.
- [9] R. F. Bonan, P. R. F. Bonan, A. U. D. Batista, J. E. Oliveira, R. R. Menezes, and E. S. Medeiros, “Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita,” 2014.
- [10] F. Tan, M. Naciri, and M. Al-Rubeai, “Osteoconductivity and growth factor production by MG63 osteoblastic cells on bioglass-coated orthopedic implants,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, no. 2, pp. 454–464, 2011.
- [11] J. R. D. O. Bauer, “Propriedades mecânicas do Titânio comercialmente puro e da liga Ti-6Al-4V fundidos em diferentes ambientes.” Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2007.
- [12] A. P. C. da Silva, “Optimização da Deposição de Filmes de Hidroxiapatite para Revestimentos de Substratos de Titânio Poroso Optimização da Deposição de Filmes de Hidroxiapatite para Revestimentos de Substratos de Titânio Poroso,” Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2012.
- [13] A. Pedrosa, “Influência da polarização eléctrica no crescimento de Hidroxiapite para implantes ósseos,” Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2011.

- [14] R. Osório, “Estudo da influência na bioatividade da adição de materiais piezoelétricos ( BaTiO<sub>3</sub> ) a hidroxiapatite para implantes ósseos,” Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [15] L. V. Leonel, “Síntese e Caracterização de Compósitos Titanato de Bário-ferrita de cobalto preparados a partir de método sol-gel,” Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- [16] T. B. Wermuth, “Síntese de filmes finos dos óxidos BaTiO<sub>3</sub>, PbTiO<sub>3</sub> e (Ba,Pb)TiO<sub>3</sub> via sol-gel polimérico e sua caracterização microestrutural e de propriedades ópticas e elétricas,” Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.
- [17] M. Frey and D. Payne, “Grain-size effect on structure and phase transformations for barium titanate,” in *Physical Review B*, vol. 54, no. 5, Illinois, 1996, pp. 3158–3168.
- [18] S. W. Kwon and D. H. Yoon, “Dependence of the Crystal Structure on Particle Size in Barium Titanate,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 72, no. August, pp. 1555–58, 1989.
- [19] W. Callister and D. Rethwisch, *Materials science and engineering*, 8<sup>a</sup> edição., vol. 94. John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- [20] S. Bodhak, S. Bose, and A. Bandyopadhyay, “Role of surface charge and wettability on early stage mineralization and bone cell-materials interactions of polarized hydroxyapatite,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 6, pp. 2178–2188, 2009.
- [21] M. Bohner and J. Lemaitre, “Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 12, pp. 2175–2179, 2009.
- [22] A. Cüneyt Tas, “Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 14, pp. 1429–1438, 2000.
- [23] M. Coelho, “Modulação farmacológica da interação tecido ósseo/biomateriais. estudos,” Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, 2001.
- [24] R. Trommer, “Obtenção e caracterização de revestimentos de hidroxiapatita sobre substratos de aço inoxidável 316L utilizando a técnica de deposição química de vapor assistida,” pp. 1–143, 2006.
- [25] E. Mohseni, E. Zalnezhad, and A. R. Bushroa, “Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant: A review paper,” *Int. J. Adhes. Adhes.*, vol. 48, pp. 238–257, 2014.
- [26] A. Colombo and A. C. Guastald, “Estudo das modificações na superfície do Ti cp titânio comercialmente puro e da liga Ti-6Al-4V usados como biomateriais utilizando-se deposição por plasma spray,” Tese de Doutorado, Instituto de Química de Araraquara, 2002.
- [27] “Plasma Spray - Thermal Spray Coating Process.” [Online]. Available: <http://www.gordonengland.co.uk/ps.htm>. [Accessed: 26-Jan-2017].
- [28] C. F. Dunne, B. Twomey, L. O’Neill, and K. T. Stanton, “Co-blasting of titanium surfaces with an abrasive and hydroxyapatite to produce bioactive coatings: Substrate and coating characterisation,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 28, no. 5, pp. 767–778, 2014.

- [29] A. M. Oladoye, J. G. Carton, and A. G. Olabi, “Characterization of graphite coatings produced by coblast™ technology,” *Jom*, vol. 66, no. 4, pp. 602–607, 2014.
- [30] C. F. Dunne, B. Twomey, L. O’Neill, and K. T. Stanton, “Co-blasting of titanium surfaces with an abrasive and hydroxyapatite to produce bioactive coatings: substrate and coating characterisation.,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 28, no. 5, pp. 767–78, 2014.
- [31] J. N. Barry, B. Twomey, A. Cowley, L. O’Neill, P. J. McNally, and D. P. Dowling, “Evaluation and comparison of hydroxyapatite coatings deposited using both thermal and non-thermal techniques,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 226, pp. 82–91, 2013.
- [32] W. Conrad and U. B. Julius-maximilians, “Fundamentos teóricos da técnica de análise espectrométrica por fluorescência de raios-x,” in *Manual ARL9900*, no. 1896, 2007, pp. 44–57.
- [33] AJSC Monteiro, “Capítulo 4 – Técnicas de Caracterização de Revestimentos,” *Técnicas Caracter. Revestimentos*, pp. 26–56, 1982.
- [34] i3N-FCT, “Confocal Laser Scanning Microscope,” 1989.
- [35] V. M. Gun’ko *et al.*, “TSDC spectroscopy of relaxational and interfacial phenomena,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 131, no. 1–2, pp. 1–89, 2007.
- [36] J. A. Giacometti and O. N. Oliveira, “Corona Charging of Polymers,” *IEEE Trans. Electr. Insul.*, vol. 27, no. 5, pp. 924–943, 1992.
- [37] B. Tabti, L. Dascalescu, M. Plopeanu, A. Antoniu, and M. Mekideche, “Factors that influence the corona charging of fibrous dielectric materials,” *J. Electrostat.*, vol. 67, no. 2–3, pp. 193–197, 2009.
- [38] D. Ramos, “Desenvolvimento de Revestimentos de Vidro Bioativo por CoBlast™,” Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, 2016.
- [39] “Saos-2 cells.” [Online]. Available: [https://en.wikipedia.org/wiki/Saos-2\\_cells](https://en.wikipedia.org/wiki/Saos-2_cells). [Accessed: 12-Sep-2017].
- [40] A. C. Ramires, Ivan; Guastaldi, “Estudo do Biomaterial Ti-6Al-4V empregando-se técnicas eletroquímicas e XPS.” p. 18, 2011.
- [41] pxprecimet, “Chemical composition according to ASTM [%].” p. 1.
- [42] A. A. Couto; S. B. Faldini; G. F. C. Almeida; T. S. Sekeres; C. T. Kunioshi; A. E. Morcelli; N. B. Lima., “Caracterização microestrutural da liga Ti-6Al-4V comercial utilizada como biomaterial,” *17º CBECIMat*, pp. 4365–4376, 2006.
- [43] L. de M. Amorim, “Estudo de densificação, caracterização microestrutural e mecânica da liga Ti-6Al-4V obtida por moagem de pós e sinterização por corrente elétrica pulsada.,” 2016.
- [44] A. E. Morcelli, “Estudo dos Micromecanismos de deformação e fratura da liga de Titânio Ti-6Al-4V utilizando-se técnicas de microscopia eletrônica e difração de Raios-X.,” 2009.
- [45] C. R. C. Braga, F. M. A. de Melo, I. F. Vitorino, M. V. L. Fook, and S. M. L. Silva, “19º

- Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais,” *Ceramics*, no. 1, pp. 1748–1755, 2010.
- [46] M. H. Fathi, A. Hanifi, and V. Mortazavi, “Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 202, no. 1–3, pp. 536–542, 2008.
- [47] T. J. Webster, E. A. Massa-Schlueter, J. L. Smith, and E. B. Slamovich, “Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 11, pp. 2111–2121, 2004.
- [48] C. L. Camargo *et al.*, “Síntese De Hidroxiapatita Por Precipitação Em Diferentes Temperaturas,” Brasil, 2014.
- [49] “Cálculo das Distâncias Interplanares e do Volume de Celas Unitárias,” *Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química*. [Online]. Available: [http://lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia\\_lqes\\_index\\_distancias\\_interplanares.pdf](http://lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_index_distancias_interplanares.pdf).
- [50] D. C. Moreira, M. Strauss, and F. Sigoli, “Avaliação da influência da cristalinidade sobre a determinação do tamanho de cristalito do óxido semicondutor SnO,” Brasil.
- [51] G. Busca, V. Buscaglia, M. Leoni, and P. N., “Solid-state and Surface Spectroscopic Characterization of,” *Society*, no. 12, pp. 955–961, 1994.
- [52] S. L. Brito and D. Gouvêa, “Caracterização superficial de nanopartículas de BaTiO<sub>3</sub> preparado pelo método dos precursores poliméricos,” *Cerâmica*, vol. 56, pp. 228–236, 2010.
- [53] C. Blanco, G. Fourlaris, B. Rand, and F. L. Riley, “Characterization of Barium Titanate Powders : Barium Carbonate Identification,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 86, no. 7, pp. 1777–1786, 1999.
- [54] P. Q. Franco, J. Silva, and J. P. Borges, “Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofição,” *Ciências Tecnol. dos Mater.*, vol. 22, no. 1/2, pp. 57–64, 2010.
- [55] C. O’Sullivan, P. O’Hare, G. Byrne, L. O’Neill, K. B. Ryan, and A. M. Crean, “A Modified Surface on Titanium Deposited by a Blasting Process,” *Coatings*, vol. 1, no. 2, pp. 53–71, 2011.
- [56] J. C. Da Silva, “Estudo Comparativo De Superfícies De Titânio Utilizadas Em Implantes,” Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2006.
- [57] A. P. Vaz, “Morfologia dos revestimentos de titânio,” Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2007.
- [58] C. F. Dunne, B. Twomey, and K. T. Stanton, “Effect of a blast coating process on the macro- and microstructure of grade 5 titanium foam,” *Mater. Lett.*, vol. 147, pp. 75–78, 2015.
- [59] A. Costa, M. Lima, L. Lima, V. Cordeiro, and K. Viana, “Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações,” *Rev. Eletrônica Mater. e Process.*, vol. 3, pp. 29–38, 2009.
- [60] “Extended Depth of Field.” [Online]. Available: <http://bigwww.epfl.ch/demo/edf/>. [Accessed: 24-Sep-2017].

- [61] A. Tavares and J. Tavares, “Princípios gerais de culturas de células e citometria de fluxo para avaliação dos efeitos da radiação ionizante - Relatório Interno,” Porto, 2009.



## **8. Anexos**

### **8.1. Anexo 1 - Protocolo para preparação da solução de SBF**

Para a preparação de 1L de solução SBF, mediu-se com a ajuda de uma proveta graduada, 700 mL de água millipore para um copo de precipitação. Colocou-se um agitador magnético dentro do copo e colocou-se sob uma placa de agitação com uma velocidade de 100-300 rpm. Adicionaram-se à solução, pela ordem enunciada, com a ajuda de uma pipeta ou uma espátula e um vidro de relógio as quantidades dos reagentes indicados na tabela 4.1. Depois de aguardar a dissolução completa de todos os reagentes, adicionou-se gota a gota, com uma pipeta, 1M HCl à solução até o valor de pH estabilizar em 7,4. Por fim, passou-se a solução para um balão volumétrico e adicionou-se água millipore até perfazer 1L. Conservou-se a solução no frigorífico por limite máximo de 1 mês.