UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS - FÍSICA DE MATERIAIS

NÍVEL MESTRADO ACADÊMICO

DANIEL NILSON NICOMEDES



DEPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE REVESTIMENTOS DE HIDROXIAPATITA COM INCORPORAÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO

OURO PRETO 2017 **Daniel Nilson Nicomedes**

DEPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE REVESTIMENTOS DE HIDROXIAPATITA COM INCORPORAÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências -Física de Materiais da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP.

Orientador: Prof(a). Dra. Taíse Matte Manhabosco Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Júnio Campos Batista

Ouro Preto 2017

N541d Nicomedes, Daniel Nilson Nunes. Deposição e caracterização de revestimentos de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno [manuscrito] / Daniel Nilson Nunes Nicomedes. - 2017. 74f.: il.: color; grafs; tabs. Orientador: Profa. Dra. Taíse Matte Manhabosco. Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Júnio Campos Batista. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Física de Materiais. 1. Materiais biomédicos. 2. Hidroxiapatita. 3. Titânio. 4. Grafeno. I. Manhabosco, Taíse Matte. II. Batista, Ronaldo Júnio Campos. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Titulo. CDU: 606:61

Catalogação: www.sisbin.ufop.br



Ministério da Educação Universidade Federal de Ouro Preto Programa de Pós-graduação em Ciências - Física de Materiais ICEB - Campus – Morro do Cruzeiro Ouro Preto – MG – CEP 35.400-000 Fone: (031)3559-1669 E-mail: secretaria@fimat.ufop.br

"Deposição e caracterização em revestimentos de Hidroxiapatita com incorporação de Óxido de Grafeno"

Autor: Daniel Nilson Nunes Nicomedes

Dissertação defendida e aprovada, em 18 de agosto de 2017, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Professor Dr. Ronaldo Junio Campos Batista Universidade Federal de Ouro Preto

RATA

Professora Dra. Cláudia Karina Barbosa de Vasconcelos Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Professor Dr. Thiago Cazati Universidade Federal de Ouro Preto

A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade. "Júlio Verne"

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos a Deus por me conceder mais uma graça alcançada e por iluminar meus passos durante essa difícil jornada.

A Profa. Dr(a) Taíse Matte Manhabosco com muita amizade e gratidão pela devota dedicação empenhada para me passar o devido ensinamento e orientação e ao meu coorientador Prof.Dr. Ronaldo Júnio Campos Batista pelos ensinamentos e orientação para realização deste trabalho. A Profa. Dr(a) Jaqueline pela dedicação e esforço para que fossem feitos as análises de Raman.

Aos meus pais Ana e Roberto pelo esforço e dedicação, pelo incentivo na minha minha educação. Minha esposa Alexandra, minhas irmãs Janaína e Ana Roberta pela paciência e incentivo e por estar ao meu lado sempre nas horas difíceis.

Ao amigo Dr.Pr. José Benone do Nascimento pelo apoio e orações feitas quando mais precisei.

Aos colegas do grupo *Nanoescale Physics Group* e a todos os professores do *Fimat* pela partilha de conhecimento durante esses dois anos de muito estudo. A secretária Mariana pelo empenho e dedicação durante todo esse tempo que passei no *Fimat*.

Com muita amizade e gratidão aos meus Brothers Adelson Mister e Mario pelo apoio, incentivo e pela minha estadia em Ouro Preto nas horas em que mais precisei. A todos os amigos do LED Daiandra, Juninho e em especial minha amiga Laureana pela parceria, apoio e realização deste trabalho durante o período do mestrado.

Aos meus grandes parceiros e irmãos Celso Renato, Gilcimar, Rodrigo, Henrique Dr. Mauro, Dr.Anjelo Cesar, Dr. Alessandro, João Bosco e ao meu grande brother João Paulo Rosa, companheiro de todas as lutas e correrias de estudante de Pós Graduação.

Ao Laboratório de Engenharia de Superfície do SENAI-BH, *campus*-CETEC pela realização dos testes de desgaste e toda equipe em especial aos amigos Gean, Dra. Karine Campos Juste, Thiago, Lucas Henrique, Lucas engenheiro pelo trabalho realizado e pela amizade que pude fazer durante minha passagem pelo SENAI e ao Dr. Alexandre Martins pela parceria no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Laboratórios de Microscopia e Microanálise do DEGEO/EM, Laboratório de Espectroscopia Raman da UFMG em especial, NANOLAB REDEMAT do Departamento de Engenharia Metalúrgica da UFOP e ao IFMG - Ouro Preto pela realização das imagens de MEV, CETENE - Centro de Tecnologia Estratégica do Nordeste pela realização das medidas de difração de raios X, Laboratório de Nanobiotecnologia e Sinalização Celular da UFMG pela realização dos testes de biocompatibilidade. A FAPEMIG ,CNPq e UFOP pelo apoio financeiro. A todos os amigos da EE.Prof.Helvécio Dahae pelo apoio, paciência e incentivo para eu pudesse continuar a minha jornada.

A todos que de alguma forma contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética que podem ser utilizados para substituição total ou parcial de tecidos vivos danificados. Dentre os biomateriais utilizados em aplicações médicas, temos as cerâmicas a base de fosfato de cálcio. Um exemplo deste tipo de cerâmica é o mineral Hidroxiapatita HA $(Ca_5(OH)(PO_4)_3)$ que apresenta bastante similaridade com a fase mineral presente em nossos ossos e dentes. O uso desse mineral em implantes tem se mostrado de grande sucesso devido ao seu comportamento in vivo e por apresentar propriedades bioativas e osteocondutivas que favorecem o crescimento ósseo. Entretanto, a Hidroxiapatita, por ser uma material cerâmico, é um biomaterial frágil e susceptível a falha por fadiga. Seguindo a linha de outras pesquisas que têm incorporado uma segunda fase de reforço (nanotubos de carbono, talco, etc.), este trabalho propõe, realiza e analisa a incorporação de óxido de grafeno aos revestimentos de Hidroxiapatita depositados sobre titânio com o objetivo de melhoria nas propriedades mecânicas da HA sem prejudicar a biocompatibilidade. Os resultados mostram que a Hidroxiapatita obtida por eletrodeposição pulsada com incorporação de óxido de grafeno apresenta uma melhor resistência ao desgaste comparada à Hidroxiapatita pura sem comprometimento da biocompatibilidade, apresentando resistência à corrosão um pouco melhor quando comparado ao titânio puro.

Palavras-chaves: Biomateriais, Hidroxiapatita, Titânio, Óxido de grafeno.

ABSTRACT

Biomaterials are natural or synthetic substances used in parcial or total replacement of damage living tissue. Among biomaterials used in medical applications it is worth mentioning the calcium phosphate ceramics. Hydroxyapatite $(Ca_5(OH)(PO_4)_3)$, an example of this kind of ceramic, presents great similarity with the mineral phase present in our bones and teeth. Hydroxyapatite coatings have shown great deal of success because of bioactive and osteoconductive properties that induce bone growth. However, hydroxyapatite is fragil and prone to fatigue failure. Following other researches that have incorporated a second phase (carbon nanotubes, talc, etc.), in this work we propose, perform and analyze the incorporation of graphene oxide to hydroxyapatite coatings. Our aim is the improvement of hydroxyapatite mechanical properties maintaining its biocopatibility. Results have shown that graphene oxide incorporation increases the wear resistance without important decrease in biocompatibility. The corrosion resistance of composite coatings are slightly better than that presented by bare titanium.

Key-words: Biomaterials;Hydroxyapatite; Titanium; Graphene oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura Molecular da Hidroxiapatita	16
Figura 2 – Diagrama esquemático da articulação do quadril artificial (a) e do implante	
do joelho (b)	22
Figura 3 – Estrutura do óxido de grafeno proposta em 1998 com grupos funcionais.	23
Figura 4 – Microscópio eletrônico de varredura com EDS	25
Figura 5 – Componentes do microscópio eletrônico de varredura.	26
Figura 6 – Geometria da analogia de "reflexão" de Bragg	28
Figura 7 – Tribômetro	30
Figura 8 – Curva de Polarização	31
Figura 9 – Visão geral da metodologia utilizada.	33
Figura 10 – Célula eletroquímica	34
Figura 11 – Filmes de hidroxiapatita depositados com e sem tratamento com HF	35
Figura 12 – Filme de hidroxiapatita depositado com incorporação de óxido de grafeno	36
Figura 13 – Célula eletroquímica/PBS do Laboratório eletroquímico de Difusão DE-	
FIS/UFOP.	37
Figura 14 – Foto esquemática demonstrando a extração de osteoblastos de neonatos de	
ratos wistar. Ao lado fotomicrografia de osteoblastos primários em cultura.	
Aumento de 100X	39
Figura 15 – MEV dos filmes de hidroxiapatita depositadas a $-5V$ com <i>pH5</i> e adição de	
2% de H_2O_2	41
Figura 16 – MEV da amostra depositada durante 1 h a $-5V$, $pH4$, 19 e adição de 2% de	
H_2O_2	42
Figura 17 – MEV das amostras depositadas a $-4V$, pH5 e adição de 2% de H_2O_2	
durante $1h$	42
Figura 18 – MEV das amostras depositadas durante 1 <i>h</i> a $-5V$, <i>pH5</i> e 2% de H_2O_2	43
Figura 19 – MEV da amostra depositada durante $2h$ a $-5V$, $pH5$ e adição de 2% de	
H_2O_2	43
Figura 20 – MEV da amostra depositada a $-5V$, $pH4$, 19 e 2% de H_2O_2 durante 1 h .	44
Figura 21 – Imagem ao MEV da espessura do filme de hidroxiapatita depositada a $-5V$,	
$pH4$, 19 e adição de 2% de H_2O_2	45
Figura 22 – Espectro EDS de filme de hidroxiapatita	46
Figura 23 – Difratogramas de raios X de amostra depositada a $-5V$, frequência de pulso	
$0, 2Hz, pH, 4, 19$ e adição de 2% de H_2O_2	47
Figura 24 – Difratogramas de raios X de amostra depositada a $-5V$, frequência de pulso	
$0, 2H_z, pH, 5$ e adição de 2% de H_2O_2	48

Figura 25 – Difratogramas de raios X de amostra depositada a $-4V$ frequência de pulso	
$0, 2Hz, pH, 5$ e adição de 2% de H_2O_2	48
Figura 26 – Difratograma de raios X da amostra depositada a $-5V$ com a frequência do	
pulso em $0, 2Hz, pH, 5$ e adição de 2% de H_2O_2 tratada com ácido fluorídrico	. 49
Figura 27 – Difratograma de raios X de hidroxiapatita com incorporação de óxido de	
grafeno depositado a $-5V$, frequência de pulso $0, 2H_Z, pH, 4, 19$ e 2% de H_2O_Z	. 50
Figura 28 – Espectro Raman da amostra de hidroxiapatita depositado a $-5V$, 0 , $2Hz$	
$,pH4,19$ durante $4h$ e adição de 2% de H_2O_2	51
Figura 29 – Espectro Raman da amostra de de hidroxiapatita depositado a $-5V, 0, 2Hz, p$	H5
durante $4h$ e 2% de H_2O_2	51
Figura 30 – Espectro Raman da amostra de de hidroxiapatita com incorporação de	
óxido de grafeno depositado a $-5V, 0, 2Hz, pH4$ durante $2h$ e 2% de H_2O_2 .	52
Figura 31 – Variação do coeficiente de atrito do substrato sem revestimento em função	
tempo	53
Figura 32 – Imagem obtida por microscopia óptica para o substrato de titânio	54
Figura 33 – Variação do coeficiente de atrito do substrato de <i>Ti</i> puro revestido de <i>HA</i>	
pura e com incorporação GO em função tempo	54
Figura 34 – Imagem obtida por microscopia óptica para o substrato de titânio revestido	
com hidroxiapatita	55
Figura 35 – Imagem obtida por microscopia óptica para o substrato de titânio revestido	
de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno.	55
Figura 36 - Curvas de polarização em solução PBS de filmes depositados por 1h a	
$-5V$, 0,2 <i>Hz</i> , 2% de H_2O_2 a <i>pH</i> 4, 19 e <i>pH</i> 5. Velocidade de varredura de	
$0,167 mV/s$. Figura- $36 \dots \dots$	56
Figura 37 – Curvas de polarização em solução PBS de filmes depositados por $2h a -5V$,	
$0, 2Hz, 2\%$ de H_2O_2 a pH 4, 19 e pH5. Velocidade de varredura de $0, 167 mV/s$	s. 57
Figura 38 – Curvas de polarização referente as amostras depositadas por 1h e incorpora-	
ção de óxido de grafeno nos parâmetros $-5V$, $0, 2Hz$, pH 4, 19 e adição de	
$2\% \text{ de } H_2O_2$	57
Figura 39 – Viabilidade celular de osteoblastos nas amostras	59
Figura 40 – Produção de colágeno pelos Osteoblastos	60
Figura 41 –Produção de ALP pelos Osteoblastos	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Reagentes para o preparo do eletrólito	34
Tabela 2 –	Reagentes para o preparo da solução PBS	37
Tabela 3 –	Posicionamento dos picos obtidos e suas respectivas correspondências	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Deoxyribonucleic Acid	
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	
GO	Óxido de Grafeno	
НАр	Hidroxiapatita	
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura	
SAXS	Small-angle X-ray Scattering (Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo)	
SERS	Surface Enhanced Raman Scattering	
pН	Potencial de hidrogênio	
EDS	Espectro de energia dispersiva	
PBS	Solução tamponada com fosfato	
DRX	Difração de raios X	
ОН	Grupos hidroxilo	
cp Ti	Titânio puro de grau 2	
Ctr	Amostra de controle	
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Contexto	15
1.2	Objetivos	17
1.3	Justificativa	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Biomateriais	19
2.1.1	Hidroxiapatita	20
2.1.2	Titânio	21
2.2	Óxido de Grafeno	22
2.3	Eletrodeposição	23
3	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	25
3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dis-	
	persiva	25
3.2	Difração de Raios X	27
3.3	Espectroscopia Raman	29
3.4	Ensaios Tribológicos	29
3.5	Polarização Potenciodinâmica	30
3.6	Biocompatibilidade	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Preparação das Amostras de Titânio	33
4.2	Eletrodeposição de Hidroxiapatita	33
4.3	Deposição de Hidroxiapatita com Incorporação de Óxido de Grafeno	36
4.4	Caracterização do Filme	36
4.4.1	Morfologia, espessura e composição química dos filmes	36
4.4.2	Estrutura cristalina	37
4.4.3	Resistência à Corrosão	37
4.4.4	Espectroscopia Raman	38
4.4.5	Resistência ao Desgaste	38
4.4.6	Biocompatibilidade	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1	Morfologia e Espessura dos Filmes	41
5.2	Composição Química	45

5.3	Estrutura Cristalina
5.4	Espectroscopia Raman
5.5	Resistência ao Desgaste
5.6	Resistência à Corrosão
5.7	Biocompatibilidade
5.7.1	Viabilidade Celular
5.7.2	Produção de Colágeno pelos Osteoblastos
5.7.3	Produção de ALP pelos Osteoblastos
6	CONCLUSÃO 62
	REFERÊNCIAS 64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto

O campo de biomateriais é muito dinâmico e interdisciplinar. Quase todos os dias novas descobertas estão sendo feitas por pesquisadores de todo o mundo [1]. Em termos simples, biomateriais são materiais que podem ser utilizados no corpo humano e na fabricação de dispositivos para substituir a matéria viva cuja parte ou função foi perdida, tendo como função avaliar, tratar, aumentar ou substituir órgãos ou tecidos [2, 3, 4]. Os biomateriais podem ser classificados principalmente em:

- *Biometais:* são biomateriais baseados em metais assim como o titânio puro e suas ligas [5]. Embora sejam predominantemente utilizados para reconstrução óssea, resultados de pesquisas recentes permitiram que os biometais pudessem ser aplicados também em cirurgias não convencional para reconstrução de tecidos e órgãos [6];
- *Biopolímeros:* compreende os biomateriais constituídos por polímeros biocompatíveis tais como o silicone, o politetrafluoretileno e o polimetilmetacrilato. Atualmente, esses materiais movimentam aproximadamente 1 bilhão de dólares por ano em pesquisas e aplicações devido ao seu amplo espectro de propriedades físicas, mecânicas, químicas e excelente biocompatibilidade [7, 8];
- *Biocerâmicos*: biomateriais constituídos principalmente por materiais cerâmicos. As cerâmicas são definidas como materiais inorgânicos não metálicos [9]. São duras, de baixa densidade, apresentam grande rigidez e resistência ao desgaste e à corrosão, suportam grande forças de compressão e são isolantes elétricos e térmicos. Essas propriedades tornam as cerâmicas importantes no campo biomédico juntamente com outros fatores tais como: semelhança química com os ossos, estímulo ao crescimento ósseo, baixo coeficiente de atrito, durabilidade. [10, 11, 12];

Um exemplo de biocerâmica é o mineral Hidroxiapatita (*HA*) que apresenta em sua composição fosfato de cálcio cristalino puro $Ca_5(OH)(PO_4)_3$, assim como mostrado na Figura 1, o qual é um composto inorgânico similar às estruturas encontradas nos ossos e dentes.

O recobrimento de superfícies utilizando esse mineral foi introduzido em meados dos anos 80 para promover a fixação entre o osso e o implante [14]. Por ser um biomaterial que apresenta propriedades bioativas, o mesmo estabelece ligações de natureza química com o tecido humano e propicia o crescimento ósseo [15, 14]. O uso deste mineral tem sido bem sucedido em implantes devido ao seu favorável comportamento *in vivo* [16, 17].



Figura 1 – Estrutura da Hidroxiapatita. Fonte: ChemTube 3D [13]

Por outro lado, a *HA* também possuem propriedades mecânicas fracas tais como: baixa resistência a flexão e fragilidade . Por isso são menos utilizadas do que metais e polímeros [18, 9]. Estas propriedades tornam a *HA* susceptível a falha por fadiga, sendo pouco adequada para a utilização em implantes dentários e ortopédicos.

Afim de melhorar as propriedades mecânicas da Hidroxiapatita, alguns pesquisadores tem adicionado fases de reforço tais como: Al_2O_3 , TiO_2 , ZrO_2 e nanotubos de carbono [19, 20, 21, 22]. Recentemente [23, 24, 25] folhas de óxido de grafeno tem sido adicionadas à *HA* para atuarem como fases de reforço, sendo estes revestimentos produzidos através de vários métodos dentre os quais podemos citar: plasma spray [26], sol-gel [27], deposição eletroforética [16], deposição por feixe de íons [28] e eletrodeposição [29]. O óxido de grafeno tem despertado a atenção devido a excelentes propriedades que ele apresenta, dentre as quais podemos citar: o alto módulo de Young, alta hidrofilicidade, boa biocompatibilidade e bioestabilidade, baixa citoxidade além de além de apresentar excelentes propriedades antibacterianas [30, 31]. Sendo assim , este trabalho sugere a incorporação de óxido de grafeno utilizando a técnica de eletrodeposição pulsada.

1.2 Objetivos

Com o propósito de aperfeiçoar biomateriais cerâmicos, este trabalho propõe, realiza e analisa a melhora das propriedades mecânicas da Hidroxiapatita através da incorporação de nanoestruturas, mais especificamente, folhas de óxido de grafeno utilizando o titânio como substrato.

Para a obtenção de filmes de HA, utilizou-se a eletrodeposição pulsada devido à qualidade dos filmes obtidos e às vantagens da técnica tais como: utilização de mecanismos simples; processo de deposição a baixas temperaturas; baixo custo.

Especificamente esse trabalho tem os seguintes objetivos:

- a) melhorar as propriedades mecânicas da hidroxiapatita depositadas sobre titânio puro com a incorporação de óxido de grafeno;
- b) analisar o biomaterial produzido em relação à morfologia, cristalinidade, resistência ao desgaste e resistência à corrosão;
- c) estudo do biomaterial produzido quanto à sua biocompatibilidade, produção de colágeno e fosfatase alcalina.

1.3 Justificativa

O campo dos biomateriais atraiu um enorme número de pesquisadores nos últimos anos, os quais contribuíram para uma compreensão mais completa do comportamento celular, da mecânica da interação célula-material e para o desenvolvimento de técnicas de fabricação inovadoras. Este progresso permitiu aos biomateriais uma transição de simples materiais de substituição dos tecidos danificados para implantes que trabalham ativamente com um sistema biológico [32]. Como resultado, milhões de vidas foram salvas ou melhoradas por dispositivos tais como: *stents* vasculares, restaurações dentárias, articulações artificiais e lentes de contato [33].

No futuro, os biomateriais assumirão um papel ainda maior na medicina e encontrarão também uso em uma ampla variedade de aplicações não-médicas [1]. Biomateriais como a hidroxiapatita, que tem sido de grande interesse na engenharia de ossos e tecidos [34], têm um futuro promissor devido sua osteocondutividade, biocondutividade e bioatividade superior [35]. Estas propriedades tornam a *HA* um material de grande importância para a regeneração do tecido ósseo. Mesmo sendo um biomaterial promissor, estudos sobre a eletrodeposição pulsada com incorporação de óxido de grafeno ainda é insipiente [36, 37].

Esta dissertação apresenta os resultados de uma pesquisa voltada à produção de *HA* com incorporação de óxido de grafeno através da técnica de eletrodeposição pulsada utilizando o

titânio como substrato. A presente dissertação está estruturada em cinco capítulos como disposto abaixo:

- **Capítulo 2 Revisão da Bibliografia:** onde são apresentados os principais conceitos abordados durante a pesquisa;
- Capítulo 3 Técnicas de Caracterização: descrição das técnicas utilizadas;
- Capítulo 4 Metodologia: detalhamento dos métodos utilizados durante o trabalho;
- Capítulo 5 Resultados e Discussões: referente a morfologia, estrutura cristalina, resistência ao desgaste, resistência à corrosão e biocompatibilidade da hidroxiapatita pura e com incorporação de grafeno.

Capítulo 6 - conclusão

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais

Considera-se biomaterial toda substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética utilizadas para tratamento ou substituição total de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais [38, 39]. Os biomateriais podem ser classificados em biometálicos [5], biocerâmicos [4] ou biopolímeros [40]. Podemos citar inúmeras aplicações para os biomateriais tais como próteses dentárias, próteses de quadril e joelho, implantes de ouvido, pinos de fixação, etc [41].

Como biomateriais biometálicos podemos citar o titânio e suas ligas, o aço inoxidável e as ligas de cromo-cobalto. O titânio e suas ligas apresentam como vantagem uma ótima biocompatibilidade, além de possuir excelentes propriedades como a alta resistência à corrosão, alta resistência à fadiga e boa resistência mecânica [42]. Entretanto, apesar da biocompatibilidade, os biometais podem interagir com os tecidos e promover a liberação de íons por desgaste, corrosão e dissolução, o que pode levar a perda de sua função e falha completa com o passar do tempo [43, 44, 45].

Os biopolímeros estão dentre os biomateriais mais empregados na medicina [46]. As principais vantagens dos biopolímeros em relação aos biometais e biocerâmicos incluem, por exemplo, a facilidade de fabricação de formas variadas (partículas, filmes, fios, dentre outros), o processamento secundário, o custo razoável e a ampla faixa gama de propriedades mecânicas e físicas [7]. Por outro lado, apesar das propriedades funcionais, os biopolímeros geralmente não apresentam grupos químicos favoráveis para interação celular e podem ainda liberar subprodutos tóxicos na corrente sanguínea durante sua degradação, o que poderia desencadear reações inflamatórias no paciente ao longo de sua vida [46, 47].

Dentre os biomateriais, os baseados em cerâmica englobam as mais diversas áreas da medicina tais como os instrumentos de diagnóstico (termômetros, fibras para endoscopia), próteses ortopédicas, dispositivos para a reconstrução odontológica e maxilo-facial, válvulas cardíacas, traqueias artificiais e preenchimentos ósseos. O vasto campo de aplicação se deve, em grande parte, às propriedades cristalográficas e à superior compatibilidade química das cerâmicas com o meio fisiológico e com tecidos rígidos, tais como os ossos e dentes [48, 9, 49].

Outra divisão dos biomateriais relaciona-se à resposta biológica, classificando os em: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e reabsorvíveis. Os materiais biotoleráveis são apenas tolerados pelo organismo. Quando o material é implantado no organismo ocorre a formação de uma camada envoltória de tecido fibroso que é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros. Quanto mais fina a camada envoltória, maior é a tolerabilidade do organismo ao material. Como exemplo deste tipo de material temos a grande maioria dos metais e os polímeros sintéticos.

Nos materiais bioinertes também ocorre a formação de tecido envoltório mas a quantidade é praticamente inexistente. Como exemplos desta classe temos a alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono. Materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre o material e o tecido ósseo são denominados bioativos. Devido à similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução. Exemplos deste tipo de material são as vitrocerâmicas à base de fosfato de cálcio, os vidros e a hidroxiapatita.

Os materiais reabsorvíveis são assim classificados por serem, após um período de tempo em contato com o organismo, degradados, solubilizados ou fagocitados. Os principais exemplos são o fosfato tricálcio (TCP) e o poli(ácido lático).

2.1.1 Hidroxiapatita

Um exemplo de biocerâmica é o mineral Hidroxiapatita (HA). A Hidroxiapatita têm despertado grande interesse de pesquisadores pela sua similaridade aos tecidos duros do organismo humano e por ser ser bioativa, ou seja, realiza ligações químicas fortes com os tecidos adjacentes [50].

Devido a estas propriedades, a *HA* tem sido empregada em preenchimentos ósseos [51], reparos de tecidos [52] e cromatografia em coluna para fracionamento rápido de biomoléculas [53].

A *HA* pura é uma fase estequiométrica da apatita com uma relação molar Ca/P de 1,67 [54]. É o sal de fosfato de cálcio mais estável a temperatura ambiente e com um *pH* entre 4 e 12 [55]. A estrutura cristalina de *HA* mais frequentemente encontrada é hexagonal, a qual possui a simetria do grupo espacial $P6_3/m$ com parâmetros de rede a = b = 9,432, c = 6,881 Åe $\gamma = 120^{\circ}$. A estrutura consiste em uma matriz de tetraedros PO_4 mantidos juntos por íons *Ca* intercalados entre eles. Os íons *Ca* ocorrem em dois locais distintos, em colunas com precisamente alinhadas (*Ca*(*I*)), e os *OH* adjacentes apontam em direções opostas [56]. Na forma $P6_3/m$, as células unitárias de *HA* estão dispostas ao longo do eixo *c*. Isto justificaria uma orientação ao longo do eixo c e uma morfologia tipo agulha [57].

A *HA* pode existir também na forma monoclínica com o grupo espacial $P2_1/b$ e parâmetros de rede a = 9,4214(8), $b = 2^a$, c = 6,8814(7) Å, $\gamma = 120^\circ$. A principal diferença entre o *HA* monoclínica e hexagonal são as orientações dos grupos hidroxilo (*OHs*). Na *HAp* monoclínico, todos os *OHs* em uma determinada coluna estão apontados na mesma direção. Na próxima coluna a direção inverte. Na *HAp* hexagonal os *OHs* adjacentes apontam em direções opostas como mencionado acima [56]. A *HA* hexagonal é normalmente formado por precipitação a partir de soluções supersaturadas a $25 - 100^\circ C$, enquanto o *HA* monoclínico é formado principalmente por aquecimento da forma hexagonal a $850^{\circ}C$ e depois submetido a um processo de arrefecimento até a temperatura ambiente [58].

A composição química, cristalinidade, tamanho e morfologia dos cristais de HA e seus agregados desempenham papéis críticos na determinação de suas propriedades e aplicações [51, 59]. Por exemplo, cristais nanométricos de *HA* possuem excelente capacidade de sinterização devido à sua elevada energia de superfície [60] e podem ser utilizados como matéria-prima para produção de *HA* nano-biocerâmica com propriedades mecânicas aprimoradas. Além disso, as nano biocerâmicas de *HA* exibem uma melhor bioatividade e maior capacidade de reabsorção do que aquelas em tamanhos de microscópico [61].

Entretanto, a *HA* não é um biomaterial perfeito e apresenta algumas fraquezas tais como: biodegradação, baixa resistência a flexão, pobre capacidade de suporte de carga e baixa resistência ao desgaste [62, 63]. A fim de melhorar as propriedades mecânicas da *HA*, pesquisadores vem adicionando uma fase de reforço. Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas da hidroxiapatita, pesquisas recentes tem apontado como solução a adição de fases de reforço tais como: Al_2O_3 , TiO_2 , ZrO_2 e nanotubos de carbono [19, 20, 21, 22]. Recentemente [23, 24, 25] utilizaram folhas de óxido de grafeno à *HA* para atuarem como revestimento.

2.1.2 Titânio

O titânio foi descoberto na Inglaterra por William Gregor em 1790. Este metal combina uma série de propriedades únicas tais como [64]:

- i) baixa densidade;
- ii) alta relação resistência/peso;
- iii) boa biocompatibilidade;
- iv) resistência à corrosão;
- v) boa plasticidade.

Essas e outras propriedades mecânicas determinam as aplicações do titânio e suas ligas nos mais diversos campos tecnológicos tais como a aviação, industria automotiva, setores de energia e construção naval ou arquitetura, medicina e equipamentos esportivos [65]. Como biomaterial, o titânio e suas ligas, tal como a liga Ti-6Al-4V (grau 5), têm sido empregados em pinos de fixação, próteses dentárias, de joelho e quadril (Figura 2). Como substituto de tecido duro, o baixo módulo de elasticidade do titânio e das suas ligas é geralmente visto como uma vantagem biomecânica porque o menor módulo de elasticidade pode resultar em menor blindagem de tensão [66]. Considerando suas propriedades superficiais, a fina e aderente camada de óxido formada na sua superfície (TiO_2) confere ao metal uma ótima resistência à corrosão e sua biocompatibilidade, o que possibilita sua aplicação em dispositivos biomédicos.

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Apesar de suas propriedades favoráveis, o titânio apresenta uma baixa resistência ao desgaste e não forma ligações químicas com os ossos, sendo apenas tolerado pelo organismo. Para contornar estes problemas, tratamentos termoquímicos, revestimentos e inclusão de elementos de liga vem sendo aplicados [67]. Como tratamento termoquímico podemos citar a nitretação, a qual melhora expressivamente a resistência ao desgaste [68]. Para a melhora da biocompatibilidade, revestimentos a base de fosfatos de cálcio tem sido utilizados [69].



Figura 2 – Diagrama esquemático da articulação do quadril artificial (a) e do implante do joelho (b).

Fonte: Adaptado pelo autor.

2.2 Óxido de Grafeno

Como já explicitado, a HA apresenta pobres propriedades mecânicas e para solucionar este problema compósitos de *HA* mais uma fase de reforço são produzidos. Pesquisas recentes indicam que a incorporação do óxido de grafeno melhora significativamente as propriedades mecânicas *HA* [24,25]. Também foi relatado que *GO* promove a adesão e proliferação de osteoblastos [70, 31, 26] e que tem potencial antibacteriano [28, 30]. Além disso, o estudo de Liu et al [71] indica que o óxido de grafeno induz a nucleação de apatita.

Aplicado em materiais como a *HA*, o *GO* pode melhorar a resistência à flexão e o módulo de *Young*, uma vez que possui características estruturais únicas e propriedades eletrônicas, térmicas e mecânicas excepcionais. Estudos sobre aplicações biomédicas indicaram ainda que o reforço de óxido de grafeno conduz a um composto com biocompatibilidade e a bioestabilidade superiores [72, 73, 74, 75, 76].

Comparado aos CNTs, o grafeno e seus derivados podem ser produzidos de forma relativamente pura com pouca citotoxicidade [78], e também demostram características mecânicas e bioatividade melhores quando incorporados em *HA* [79, 80].O óxido de grafeno (*GO*) é o derivado oxigenado do grafeno, que contém os grupos carboxilo, hidroxilo e epóxido, assim como ilustrado na Figura 3 [81].



Figura 3 – Estrutura do óxido de grafeno proposta em 1998 com grupos funcionais: grupos epóxido (a), grupos hidroxilo (b) e grupos carboxilo (c) emparelhados Fonte: Elaborado em [77].

2.3 Eletrodeposição

A eletrodeposição, é o processo eletroquímico em que, através de uma reação química induzida por corrente, ocorre a deposição de um revestimento (filme) [82]. Atualmente é um processo bastante consolidado para a obtenção de revestimentos metálicos e apresenta vantagens de requerer baixo investimento, utilizando equipamentos simples e poder ser realizada a temperaturas relativamente baixas [82].

No processo de eletrodeposição, o substrato no qual o revestimento será depositado é posicionado no catodo (eletrodo de trabalho), e o material a ser utilizado como contra eletrodo para fechar o circuito elétrico é posicionado no anodo [83]. A célula eletroquímica é constituída, geralmente, por três eletrodos (eletrodo de trabalho, conta-eletrodo e eletrodo de referência) e eletrólito. O eletrólito é uma solução que fornece os elementos do material a ser depositado, assegurando a condução de íons através da célula [84].

Existem diferentes métodos para a deposição dos revestimentos tais como a deposição galvanostática, deposição potenciostática e a variação destas deposições através da técnica pulsada. Na deposição galvanostática aplica-se uma corrente constante ao sistema e o potencial varia de acordo com as requisições do sistema de eletrodeposição. Na deposição potenciostática aplica-se um potencial constante e é permitido que a corrente varie. Nas deposições pulsadas aplica-se pulsos de corrente ou potencial com uma determinada frequência pré-estabelecida. Trabalhos da literatura [85, 86, 87] mostram que revestimentos obtidos por eletrodeposição

pulsada apresentam uma melhor qualidade devido a possibilidade de o hidrogênio formado durante as deposições se esvair. O não aprisionamento de bolhas de hidrogênio durante a deposição permite a formação de revestimentos sem descontinuidades. Vários trabalhos tais como: [88, 89, 90], obtiveram através da técnica pulsada revestimentos de *HA* mais uniformes, cristalinos e com maior aderência. Além disso, os revestimentos apresentaram uma maior estabilidade a longo prazo e uma forte interface filme-substrato, parâmetros que podem definir o sucesso de um implante.

3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva

Em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), a imagem é formada em um tubo de raio catódico sincronizado com uma sonda de elétrons à medida que escaneia a superfície de uma amostra [91]. O (MEV) usa um feixe focado de elétrons de alta energia para gerar uma variedade de sinais na superfície de materiais sólidos [92]. Os sinais que derivam de interações de amostras com o feixe de elétrons revelam propriedades sobre a amostra, incluindo morfologia externa (textura), composição química, estrutura cristalina e orientação dos materiais que compõem a amostra. Na maioria das aplicações, os dados são coletados sobre uma área selecionada da superfície da amostra a partir dos quais uma imagem bidimensional é gerada demonstrando aquelas propriedades. Na Figura 4 é mostrado o MEV utilizado nessa pesquisa.



Figura 4 – Microscópio eletrônico de varredura com EDS (UFOP)

A estrutura típica do *MEV* consiste basicamente de uma coluna ótico-eletrônica onde se encontra um canhão que emite elétrons, sistema de demagnificação, câmara da amostra, unidade de varredura, sistema de detectores e o sistema de visualização da imagem [93], assim como mostrado na Figura 5).

Os elétrons são emitidos a partir de um cátodo de tungstênio ou hexaboreto de lantânio (LaB_6) e acelerados através de um ânodo, sendo também possível obter elétrons por efeito de emissão de campo. O tungstênio é tipicamente usado por ser o metal com mais alto ponto de fusão e mais baixa pressão de vapor, permitindo que seja aquecido para a emissão de elétrons. O feixe de elétrons, o qual normalmente têm uma energia que vai desde as algumas centenas de eV até 100 keV, é focalizado por uma ou duas lentes condensadoras, em um feixe com um ponto



Figura 5 - Representação dos Componentes do Microscópio Eletrônico de Varredura [93].

focal muito fino, com tamanho variando de 0,4 a 0,5 *nm* [94]. Este feixe passa através de pares de bobinas de varredura e pares de placas de deflexão na coluna do microscópio.

Quando o feixe primário interage com a amostra, os elétrons perdem energia por dispersão e absorção em um volume em forma de gota, conhecido como *volume de interação*, o qual se estende de menos de 100 *nm* até em torno de 5 μ *m* para dentro da superfície da amostra. O tamanho do volume de interação depende da energia dos elétrons, do número atômico dos átomos da amostra e da densidade da amostra. A interação entre o feixe de elétrons e a amostra resulta na emissão de elétrons secundários, elétrons *retroespalhados*, elétrons *Auger*, raios-x *Bremstralung*, raios-x característicos, radiação eletromagnética na região do infravermelho, do visível e do ultravioleta, fônons além de causar aquecimento da amostra.

Imagens de elétrons retransmitidas no *MEV* apresentam um contraste composicional que resulta de diferentes elementos de números atômicos e sua distribuição. A Espectroscopia Dispersiva de Energia (*EDS*) permite identificar quais são esses elementos particulares e suas proporções relativas (razão molar, por exemplo) [95].

3.2 Difração de Raios X

A difração de *raios X* é uma técnica utilizada para determinar a estrutura atômica e molecular de um cristal, na qual os átomos do material fazem com que um feixe de raios-X incidente sofra difração em muitas direções específicas. Medindo os ângulos e intensidades destes feixes difratados, um cristalógrafo pode produzir uma imagem tridimensional da densidade de elétrons dentro do cristal [96]. A partir desta densidade de elétrons, as posições médias dos átomos no cristal podem ser determinadas, bem como suas ligações químicas, sua desordem e várias outras informações.

Uma vez que muitos materiais podem formar cristais, tais como: sais, metais, minerais, semicondutores, bem como várias moléculas inorgânicas, orgânicas e biológicas - a cristalografia de *raios X* tem sido fundamental no desenvolvimento de muitos campos científicos [96]. Em suas primeiras décadas de uso, este método determinou o tamanho dos átomos, os comprimentos e tipos de ligações químicas, e as diferenças de escala atômica entre vários materiais, especialmente minerais e ligas. O método também revelou a estrutura e função de muitas moléculas biológicas, incluindo vitaminas, drogas, proteínas e ácidos nucleicos como o *DNA*. A cristalografia de *raios X* ainda é o método principal para caracterizar a estrutura atômica de novos biomateriais [97].

Numa medida de difração de *raios X* de um único cristal, um cristal é montado num goniómetro¹. O goniómetro é utilizado para posicionar o cristal em orientações selecionadas. O cristal é iluminado com um feixe monocromático finamente focalizado de *raios X*, produzindo um padrão de difração de pontos regularmente espaçados conhecidos como *reflexos*. As imagens bidimensionais tomadas em diferentes orientações são convertidas em um modelo tridimensional da densidade de elétrons dentro do cristal usando o método matemático de *Transformadas de Fourier* [98], combinado com dados químicos conhecidos para a amostra. Uma resolução pobre (*fuzziness*) ou mesmo erros podem resultar se os cristais são muito pequenos, ou não uniforme o suficiente em sua composição interna.

Os cristais são estruturas regulares dos átomos, e os *raios X* podem ser considerados ondas da radiação eletromagnética. Os átomos dispersam ondas de *raios X*, principalmente através dos elétrons dos átomos. Assim como uma onda oceânica que atinge um farol produz ondas circulares secundárias que emanam do farol, de modo similar o raio X que atinge um elétron produz ondas esféricas secundárias que emanam do elétron. Esse fenômeno é conhecido como espalhamento elástico, e o elétron (ou farol) é conhecido como o espalhador. Um conjunto regular de dispersores produz um conjunto regular de ondas esféricas. Embora essas ondas se anulem na maioria das direções através de interferência destrutiva, elas acrescentam construtivamente em

¹ Goniómetro é um instrumento utilizado para medir ângulos de cristais, de partes anatômicas, de distâncias angulares em topografia, astronomia, navegação etc.

algumas direções específicas, determinadas pela lei de Bragg [99]:

$$2d\sin\theta = n\lambda\tag{1}$$

Em que, d é o espaçamento entre planos de difração, θ é o ângulo de incidência, n é um inteiro qualquer, e λ é o comprimento de onda do feixe. Essas direções específicas aparecem como manchas no padrão de difração chamadas reflexões. Assim, a difração de *raios X* resulta de uma onda eletromagnética (o raio X) que colide com um arranjo regular de dispersores (o arranjo repetitivo de átomos dentro do cristal).

Os *raios X* são utilizados para produzir o padrão de difração porque o seu comprimento de onda λ é tipicamente da mesma ordem de grandeza (1-100 angstroms) como o espaçamento *d* entre os planos no cristal. Em princípio, qualquer onda que colide com um conjunto regular de dispersores produz difração, como previsto pela primeira vez por Francesco Maria Grimaldi em 1665 [100]. Para produzir difração significativa, o espaçamento entre os espalhadores e o comprimento de onda da onda incidente deve ser semelhante em tamanho.



Figura 6 – Geometria da analogia de "reflexão" de Bragg. Fonte: Adaptado pelo autor.

A Figura 6 mostra um feixe de entrada (vindo da parte superior esquerda) faz com que cada espalhador re-irradie uma pequena porção de sua intensidade como uma onda esférica. Se os dispersores estiverem dispostos simetricamente com uma separação *d*, estas ondas esféricas estarão sincronizadas (adicione construtivamente) apenas em direções onde sua diferença de comprimento de caminho $2d \sin \theta$ for igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda λ . Nesse caso, uma parte do feixe de entrada é defletida por um ângulo 2θ , produzindo um ponto de reflexão no padrão de difração.

3.3 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional que fornece informações detalhadas sobre composição molecular e estrutura molecular de uma amostra. Quando a luz interage com as moléculas de uma amostra, parte da energia é absorvida e parte é espalhada. A maioria dos fótons são espalhados elasticamente com a mesma energia e comprimento de onda que a luz incidente (*dispersão de Rayleigh*). Uma pequena fração, aproximadamente 1 em 10 milhões de fótons, é espalhada inelásticamente, com os fotóns dispersos com uma freqüência diferente da luz incidente (e geralmente menor). Esta fração é chamada de *Espalhamento Raman* [101].

Graças ao progresso técnico nos últimos anos, a caracterização de amostras pela espectroscopia Raman recebeu atenção crescente. Na última década, a técnica tornou-se um método de rotina in vitro, e a análise in vivo tornou-se uma realidade [102]. A espectroscopia Raman é complementar à espectroscopia Infra Vermelha (IR), que analisa a fração de luz absorvida. Ambas as técnicas induzem mudanças específicas nos modos vibratórios de estruturas moleculares:

- i) as ligações IR-ativas são aquelas que mudam seu momento dipolo após a absorção de radiação eletromagnética;
- ii) as ligações Raman-ativas são aquelas que alteram sua polarização.

Isso torna a espectroscopia Raman particularmente atraente para o tecido vivo, onde o forte sinal de IR da água pode facilmente dominar os de outros componentes do tecido. As estruturas lipídicas e lipofílicas são particularmente adequadas para a análise por espectroscopia Raman, de modo que a técnica Raman é capaz de fornecer informações particularmente valiosas sobre a estrutura e composição do estrato córneo [103].

3.4 Ensaios Tribológicos

O estudo de características como o coeficiente de atrito e desgaste são importantes ao certificar a qualidade de novos materiais. Essas características são definidas através dos ensaios tribológicos realizados através de um equipamento conhecido como tribômetro mostrado na Figura 7.

Tribologia vem do grego *Tribos*, que significa atrito, e *Logos*, que significa estudo. [104]. A tribologia se dedica ao estudo do desgaste, do atrito e da lubrificação. O atrito, o desgaste e a lubrificação são conceitos de grande relevância ao analisar o movimento entre duas superfícies.

O atrito é definido como sendo a resistência ao movimento quando uma superfície desliza sobre outra tangencialmente. O atrito depende da rugosidade da superfície e da força normal aplicada sobre o corpo.[105]. No degaste, temos a perda progressiva de matéria da superfície de um corpo resultante ao deslizar uma superfície em outra.



Figura 7 – Tribômetro /Bruker.

Os ensaios tribológicos mais comuns são os testes de desgaste, que podem ser do tipo pino sobre disco [106], onde é feito um risco circular sobre o disco devido ao movimento circular entre o pino e o disco e pino sobre chapa [107] onde o movimento entre o pino (indentador) forma uma trilha de desgaste devido a um movimento recíproco. Este ensaio também é conhecido como reciprocate.

Para realizar os ensaios são necessários estimar alguns parâmetros como carga inicial, velocidade, duração dos ensaios, frequência e tamanho da trilha [108].

A importância de se realizar ensaios tribológicos em materiais sujeitos a ação de agentes mecânicos é que através de informações obtidas como coeficiente de atrito, início e tempo de desgaste é possível estimar o tempo de vida do material e e fazer previsão de futuras falhas que podem ocorrer. [109].

3.5 Polarização Potenciodinâmica

Embora todos os testes de corrosão em laboratório exijam processos de corrosão acelerados, apenas testes eletroquímicos podem ampliar diretamente o impacto dos processos de corrosão. As principais razões pelas quais isso é possível é que todos os testes eletroquímicos usam algum modelo fundamental da cinética de eletrodos associados aos processos de corrosão para quantificar as taxas de corrosão. A amplificação dos sinais elétricos gerados durante estes ensaios permite realizar medições muito precisas e sensíveis.

Métodos de polarização, tais como polarização potenciodinâmica são frequentemente usados para testes de corrosão em laboratório. Estas técnicas podem fornecer informações significativas sobre os mecanismos de corrosão, taxa de corrosão e susceptibilidade de materiais específicos à corrosão em determinados ambientes. Os métodos de polarização envolvem a alteração do potencial do eletrodo de trabalho e a monitorização da corrente que é produzida em função do tempo ou do potencial.

A polarização potenciodinâmica pode ser caracterizada em três tipos básicos:

- *polarização anódica:* o potencial é alterado na direção anódica de forma que o eletrodo de trabalho se torne o ânodo e fazendo com que os elétrons sejam retirados dele.
- *polarização catódica:* o eletrodo de trabalho torna-se mais negativo e os elétrons são adicionados à superfície, em alguns casos causando eletrodeposição.

polarização cíclica: a polarização tanto anódica como catódica são realizadas de forma cíclica.



Figura 8 – Exemplo de curva de polarização[110].

A técnica de polarização potenciodinâmica consiste em uma varredura contínua do potencial e o registro da corrente gerada, permitindo o estudo do comportamento eletroquímico do material [111].A partir deste ensaio obtém-se o perfil de corrosão de um material mais conhecido como curva de polarização (Figura 8).

A curva de polarização permite prever o potencial de corrosão que é basicamente a característica ou propriedade de superfícies metálicas ou não metálicas perderem elétrons na presença de um eletrólito. O potencial de corrosão de um material é um parâmetro útil para estimar ou detectar o dano devido à corrosão.

A velocidade de varredura, a composição da solução, o tempo de imersão anterior a varredura de potencial e a temperatura de ensaio podem influenciar a forma das curvas de polarização [111].

Com a utilização desta técnica, é possível obter informações importantes como o potencial de corrosão, passivação, taxa de corrosão, etc, os quais permitem um estudo detalhado do material sujeito ao processo de corrosão.

3.6 Biocompatibilidade

A interação dos biomateriais com o sistema biológico sempre produz respostas biológicas [112, 113]. Nesse contexto, biocompatibilidade refere-se à capacidade de um material implantado in vivo induzir respostas biológicas apropriadas [114, 115]. Muitos implantes desenvolvidos antes de 1950 não tiveram êxito devido a uma má compreensão da biocompatibilidade [42]. Esta compreensão está cada vez melhor devido à pesquisas científicas na área que envolvem um estudo interdisciplinar baseado no conhecimento da biologia, ciência dos materiais, biomecânica, engenharia e medicina.

Embora exista um histórico da biocompatibilidade de biomateriais pode-se dizer que testes in vivo são bastante recente pois a biocompatibilidade passou a ser interpretada como um problema crítico na limitação da longevidade e da funcionalidade do dispositivo [116]. De fato, o uso de novos materiais em seres humanos sem testes preliminares é considerado antiético [117].

Além disso, como nenhum biomaterial é absolutamente livre do risco de causar danos, testes de biocompatibilidade são listados como primeira prioridade no desenvolvimento de novos biomateriais. O objetivo principal dos testes de biocompatibilidade é proteger e zelar pela integridade dos pacientes [118]. A biocompatibilidade de depende de muitos fatores tais como [114, 112]:

- a) a natureza química dos componentes do material;
- b) a natureza física dos componentes do material;
- c) os tipos e locais dos tecidos do paciente que serão expostos ao material;
- d) a duração da exposição;
- e) as características de superfície do material;
- f) as forças e condições sobre o material;
- g) a função física para a qual o material será utilizado;
- h) o design do dispositivo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia desse trabalho está estruturada em 4 etapas, assim como ilustrado pela Figura 9. Cabe expor que todos os ensaios realizados neste trabalho foram feitos, ao menos, em triplicada. Na seções seguintes são detalhadas cada uma dessas etapas.



Figura 9 – Visão geral da metodologia utilizada.

4.1 Preparação das Amostras de Titânio

As amostras de titânio de grau 2 foram cortadas em dimensões de 1,2 mm de espessura no equipamento *ISOMET* 1000. Em seguida, as amostras foram lixadas manualmente utilizando lixas de carbeto de silício nas granas 220, 320, 600 e 1200. Durante o processo de lixamento utilizou-se detergente e água afim de diminuir o atrito entre a amostra de titânio e a superfície da lixa. As amostras foram lixadas até apresentarem um brilho característico na superfície. Depois de cortadas e lixadas, as amostras foram limpas com acetona e álcool em um banho ultrassônico durante 6 minutos. Em seguida foram limpas com água destilada para a remoção do álcool.

4.2 Eletrodeposição de Hidroxiapatita

Os revestimentos foram depositados por deposição eletroquímica pulsada já que este método tem apresentado revestimentos mais compactos e com melhor uniformidade[16].

Para a deposição de revestimentos de HA foi utilizada a solução eletroquímica preparada por dissolução utilizando os reagentes apresentados na Tabela 1. Diferentes parâmetros foram alterados para a produção dos filmes tais como tensão, pH e quantidade de H_2O_2 e tempo.

Reagente	Quantidade em mols
$Ca(NO_3)_2$	0,042mol
$NH_4H_2PO_4$	0,025mol
NaNO ₃	0,15 <i>mol</i>

Tabela 1 – Reagentes para o preparo do eletrólito

Para a deposição, pulsos com tensão variando entre 0 V, 4 e -5 V foram aplicados a uma frequência de 0, 2 *Hz*. O tempo de deposição foi de 1 e 4 horas com a temperatura mantida em 65 °C através de um banho termostático. Para manter a concentração da solução uniforme na superfície da amostra utilizou-se um agitador magnético com uma velocidade constante.

Durante o processo de eletrodeposição é comum a formação de bolhas de hidrogênio que são responsáveis pela formação de defeitos no revestimento, podendo inibir a formação de um filme mais uniforme. Afim de diminuir a quantidade de bolhas foi adicionado peróxido de hidrogênio H_2O_2 com as concentrações de 2% e 6% ao eletrólito [31].

A célula eletroquímica utilizada para realizar a eletrodeposição Figura-10, era composta por um eletrodo de grafite (anodo), um eletrodo de trabalho (catodo) e um eletrodo de calomelano utilizado como eletrodo de referência.



Figura 10 - Célula Eletroquímica Laboratório Eletroquímico de Difusão DEFIS/UFOP

A eletrodeposição de Hidroxiapatita foi realizada utilizando-se os seguintes parâmetros experimentais:

- Potencial de -5V com a frequência do pulso em 0,2Hz, pH 4,19 e adição de 2% de H₂O₂;
- Potencial de -5V com a frequência do pulso em 0, 2Hz, pH 5 e adição de 2% de H_2O_2 ;
- Potencial de -4V com a frequência do pulso em 0, 2Hz, pH 5 e adição de 2% de H_2O_2 ;
- Potencial de -5V com a frequência do pulso em 0, 2Hz, pH 5 e adição de 6% de H_2O_2 ;

Para aumentar a adesão dos revestimentos de hidroxiapatita ao substrato, o titânio puro recebeu tratamento em ácido fluorídrico (HF), tornando os filmes mais aderentes ao substrato [119]. Em seguida as amostras foram novamente limpas com acetona, álcool e água bidestilada em banho ultrassônico durante 15*min*.

As Figuras 11 (a) e 11(b) mostram os filmes de hidroxiapatita depositados sobre titânio puro sem tratamento e titânio tratado com *HF*. Visualmente percebe-se uma melhora na aderência do filme.



(a)

(b)

Figura 11 – (a) Imagem do filme de hidroxiapatita depositado sobre TI puro sem tratamento com HF. (b) Imagem do filme de hidroxiapatita depositado após tratamento com HF
4.3 Deposição de Hidroxiapatita com Incorporação de Óxido de Grafeno

Determinadas as condições para a obtenção dos melhores filmes de hidroxiapatita, a estes foram incorporados óxido de grafeno. Para a incorporação do óxido de grafeno aos filmes de HA, os mesmos foram suspensos na solução eletroquímica através de agitação e utilização de banho ultrassônico por 2*h*. Adicionou-se $400\mu g$ de óxido de grafeno para cada 100ml de solução.

Após o preparo da solução foi realizada eletrodeposição pulsada a um potencial de -5V, frequência de 0, 2Hz, *pH* 4, 19 e adição de 2% de H_2O_2 , pois neste parâmetro obteve-se filmes mais compactos e uniformes.

O filme obtido apresentou, visualmente, as mesmas características em relação as deposições de hidroxiapatita pura, mas com uma coloração um pouco mais escura devido a incorporação do óxido de grafeno- Figura 12.



Figura 12 - Imagem do filme de hidroxiapatita depositado com incorporação de óxido de grafeno

4.4 Caracterização do Filme

Após a obtenção dos revestimentos, os mesmos foram caracterizadas segundo descrito nos tópicos a seguir:

4.4.1 Morfologia, espessura e composição química dos filmes

Para a análise morfológica, obtenção da espessura e composição química dos filmes utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura modelo *Vega3Tescan* do laboratório NANO-LAB localizado no Departamento de Engenharia Metalúrgica da UFOP e também o microscópio do Instituto Federal de Minas Gerais (Campus Ouro Preto). A fim de se obter uma superfície condutora, necessária para a realização das medidas, as amostras de HA foram metalizadas com uma fina camada de ouro. As imagens foram realizadas a uma tensão de 5 *KV*, 15 *KV* 20 *KV*.

4.4.2 Estrutura cristalina

A identificação das fases cristalinas presentes nos filmes foi feita através da técnica de difração de raios X. Os difratogramas foram obtidos no Centro de Tecnologia Estratégica do Nordeste-CETENE . Utilizou-se radiação $Cu - K\alpha \operatorname{com} (\alpha = 1.5406 \text{ Å})$, com uma faixa de varredura de 20° a 80° e passo angular de $0.02^{\circ}/\mathrm{s}$.

Para identificar as fases cristalinas da hidroxiapatita nas amostras sintetizadas utilizou-se o software X'Pert HighScorePlus .

4.4.3 Resistência à Corrosão

O potenciostato modelo MQPG - 01 da marca Microquímica automação LTDA do Laboratório Eletroquímico de Difusão do DEFIS/UFOP foi utilizado para a obtenção de curvas de polarização. Os ensaios foram realizados utilizando uma célula eletroquímica Figura -13 que era composta de um eletrodo de platina (contra-eletrodo), um eletrodo de trabalho (amostras de titânio com revestimento de HA) e eletrodo de referência de calomelano saturado [120]. Como solução eletrolítica, utilizou-se solução tamponada de fosfato(*PBS*) a fim de simular a presença de fluídos corporais. A solução foi preparada por dissolução dos reagentes apresentados na Tabela-4.

Tabela 2 – Reagentes para o preparo da solução PBS

Reagente	Quantidade em g/l
NaCL	8
KCL	0,2
Na ₂ HPO ₄	0,5
KH_2PO_4	0,2

Afim de estabilizar o potencial de corrosão o sistema foi mantido 1*h* em solução antes da realização dos experimentos. As curvas de polarização foram obtidas utilizando-se uma taxa de varredura de 0,167mV/s em uma faixa de potencial de -400mV até 1000mV.



Figura 13 - Célula eletroquímica/PBS do Laboratório eletroquímico de Difusão DEFIS/UFOP.

4.4.4 Espectroscopia Raman

A fim de avaliar a estrutura dos revestimentos de hidroxiapatita e a presença do óxido de grafeno a técnica de espectroscopia Raman foi empregada. As medidas foram realizadas no Laboratório de espectroscopia Raman da Universidade Federal de Minas Gerais no equipamento *WitecAlpha*300. Utilizou-se um laser de comprimento de onda de 532*nm*, potência de 5*mW* e uma lente objetiva ajustada em 100*x*.

4.4.5 Resistência ao Desgaste

Para avaliar a resistência ao desgaste dos filmes foi utilizado o tribômetro *UMT TRIBOLAB* TL - 48279 - 3 *MultiSpecimenTestsystem* reciprocate do laboratório de Engenharia de Superfície localizado no SENAI-BH *campus* CETEC-MG. Os testes foram realizados à seco utilizando uma esfera de alumina como contra-corpo. Os ensaios foram realizados com a uma carga normal de 2 N, velocidade de deslizamento de 2 *mm/s* perfazendo uma trilha de 2 *mm*. Os ensaios foram realizados em triplicata por um tempo de 10 *min*.

O coeficiente de atrito obtido durante os ensaios foi registrado pelo equipamento. Após o desgaste, imagens das trilhas foram feitas ao microscópio óptico *ZEISS Imager.Z2m*.

4.4.6 Biocompatibilidade

Essa seção demonstra a metodologia utilizada para mensurar a biocompatibilidade das amostras produzidas.

Os testes foram realizados no Laboratório de de Nanobiotecnologia e Sinalização Celular da Universidade Federal de Minas Gerais onde foram avaliados a viabilidade celular dos revestimentos, produção de colágeno e produção de *ALP*.

a) Extração de Osteoblastos Primários

Foram utilizados neonatos de ratos wistar que foram sacrificados com aplicação de anestésico em dose letal intraperitoneal (Cloridrato de Lidocaína a 2% sem vaso constritor). Após limpeza dos animais com iodopovidona estes foram levados para o fluxo laminar, sendo que todos os procedimentos procederam-se dentro do fluxo laminar. Foi realizado o escalpo do espécime com um corte partindo da rima ocular até o ouvido e unindo-se na parte frontal. O retalho foi deslizado para região posterior expondo a calvária. Foi introduzida a tesoura na sutura mediana e na parieto-occipital destacando-se a parte óssea. Os fragmentos foram recolhidos num tubo falcon contendo *PBS* estéril. O *PBS* contendo os fragmentos foi colocado numa placa de petri e os mesmos foram limpos e reduzidos a pequenas partículas, que foram submetidas à digestão enzimática sequencial, assim como mostrado na Figura 14.

Os fragmentos receberam um primeiro banho por 15 min de tripsina 1% (em estufa de CO_2 a 37°C). Após remoção da tripsina, as amostras foram submetidas a quatro banhos sequenciais de 20 min em colagenase/PBS 0,02% (em estufa de CO2 a 37°C). O sobrenadante do



Figura 14 – Foto esquemática demonstrando a extração de osteoblastos de neonatos de ratos wistar. Ao lado fotomicrografia de osteoblastos primários em cultura. Aumento de 100x.

banho de tripsina e do primeiro banho de colagenase foram descartados por conter alta proporção de fibroblasto. O sobrenadante dos outros 3 banhos foram recolhidos, centrifugados a 250g por 5 minutos. Cada pellet formado após centrifugação foi ressuspendido em 5 mL de meio de cultura DMEM acrescido de 10% de SFB e plaqueado em caixa de cultura T25. As caixas de cultura foram incubadas em estufa de CO2 a 37°C umidificada até atingir a confluência. Os experimentos foram realizados quando as células estavam na segunda para terceira passagem.

b) Atividade da Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato dentro de um ambiente alcalino, tendo por resultado a formação de um radical orgânico e fosfato inorgânico. A ALP é uma enzima chave no processo de mineralização óssea e em osteoblastos maduros ela é produzida intensamente. O método utiliza o fosfato de p-nitrofenil, que ao hidrolisar a ALP em um produto de cor azul, por absorbância a taxa da reação é diretamente proporcional à atividade de enzima.

Foi utilizado para dosagem da produção de fosfatase alcalina pelos osteoblastos estimulados com ATP e análogos, para verificarmos se tais afetam a metabolização/diferenciação dos osteoblastos. A determinação da produção de fosfatase alcalina foi através de espectrofotometria e a leitura procedeu em 540nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific Varioskan ®Flash).

c) Cultura de Osteoblastos primários sobre *implantes metálicos biodegradáveis revestidos* com hidroxiapatita

Após colocarmos uma amostra por poço em placa de 24 poços, as células foram plaquea-

das (1 × 105 células por poço/amostra) e mantidas em estufa de CO_2 a 37°C. Foi aguardado 24 horas após o plaqueamento para verificação da adesão celular por microscópio. Foi realizado troca de meio de cultura nos 3°, 7°, 10° e 14° dias de cultura. O sobrenadante foi recolhido em *eppendorf* contendo inibidor de protease e armazenado em freezer -80° C.

d) Viabilidade celular

Para testarmos a viabilidade osteoblástica frente aos materiais foi utilizado o reagente alamarBlue® (*Thermo Fisher Scientific*) de acordo com as informações do fabricante. O ensaio foi realizado nos 1°, 7° e 14° dias após plaqueamento celular nas amostras. Foi adicionado 40ul do reagente alamarBlue em 360 *ul* de meio de cultura, as placas foram mantidas em estufa de CO_2 a 37°C por 3 horas. Após o tempo de reação, o sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços para leitura da absorbância a 570nm.

e) Quantificação de colágeno

Utilizou-se os sobrenadantes recolhidos nos 3° , 7° , 10° e 14° dias de cultura dos osteoblastos. Em tubo *eppendorf* de 1,5 *ml* foi adicionado 25 *ul* de amostra (meio de cultura das células), sendo o grupo controle (branco) utilizado meio de cultura puro. Foi adicionado em cada tubo 250 *ul* de *DyeReagent*, mantido sob agitação por 30 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados a 12.000 *rpm* por 10 minutos em temperatura ambiente 24 – 25°C. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente para que não houvesse perda do pellet formado. Após, o pellet foi lavado com 300 *ul* de Acid-salt Wash gelado, sendo aspirado em seguida. O pellet foi ressuspendido em 125 *uL* de Alkali Reagent. Foi adicionado 100 *ul* da solução em poços de placa de 96 poços para leitura da absorbância no comprimento de onda de 555 *nm*. Para fazer a curva padrão foi utilizado adicione *5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 ug* de colágeno (Collagen Reference Standart).

F) Tratamento de dados

Para realizar o tratamento estatístico dos dados, utilizou-se o software GraphPad Prism®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas próximas seções serão apresentados os resultados da caracterização dos filmes enunciadas na Seção 4.4 do Capítulo 4.

5.1 Morfologia e Espessura dos Filmes

Imagens ao MEV de depósito obtido a $-5V \operatorname{com} pH5$ e adição 2% de H_2O_2 durante 1*h* são apresentadas nas Figuras-15 [(*a*), (*b*) e (*c*)]. Observa-se que o depósito é composto por núcleos que apresentam, no seu topo, uma estrutura do tipo coral [15 (*a*) e (*b*)]. Ainda, verifica-se a presença de trincas no revestimento Figura-[15(*c*)], o que certamente afeta a resistência à corrosão e a resistência mecânica do filme.





Figura 15 – MEV dos filmes de hidroxiapatita depositados a -5V com pH5 e 2% de H_2O_2 . Ampliações:(*a*) 1.60 Kx, (*b*) 6.0 Kx e (*c*) 1.60 kx.

Depósitos mais uniformes e compactos, com núcleos de tamanhos diferenciados, foram obtidos a -5V, pH4, 19 e adição de 2% de H_2O_2 Figura-16 [(D)]. Para estes revestimentos mais compactos não foram observadas trincas, o que pode sugerir uma melhor resistência à corrosão.



(D)

Figura 16 – MEV da amostra depositada durante 1*h* a –5*V*, *pH*4, 19 e adição de 2% de H_2O_2 . Ampliação: 2.60 *kx*.

Imagens correspondentes a amostra depositada a -4V, pH5 e adição de 2% de H_2O_2 depositados por 1*h*, são apresentadas na Figura-17 [(*e*), (*f*) e (*g*)]. Nota-se, pelas micrografias, a formação de um depósito mais escasso com núcleos menores e estrutura do tipo coral.



Figura 17 – MEV dos filmes de hidroxiapatita depositados a -4V, *pH5* e adição de 2% de H_2O_2 . Ampliações:(*e*) 2.60 *kx*, (*f*) 6.0 *kx* e (*g*) 500 *x*.

Amostras cuja deposição foi realizada durante 1h = -5V, pH5 e com adição de 6% de H_2O_2 são apresentadas nas Figuras -18 [(h) e (i)]. Similarmente aos revestimentos depositados a -4V, pH5 e adição de 2% de H_2O_2 Figura-17 [(g)] e 17 [(f)]), o depósito apresenta-se pouco compacto e com estrutura do tipo coral.



Figura 18 – MEV dos filmes de Hidroxiapatita depositados a $-4V \operatorname{com} pH5$ e 6% de H_2O_2 . Ampliações:(h) 500 x, (i) 6.0 kx.

Na imagem 19 referente a amostra depositada durante 2*h* realizada a -5V, *pH5* e adição de 2% de H_2O_2 é possível observar que o filme apresenta estrutura do tipo coral e presença de trincas no revestimento, o que pode prejudicar a resistência a corrosão.



Figura 19 – MEV do filme de Hidroxiapatita depositado durante 2h = -5V, pH5 e adição de 2% de H_2O_2 . Ampliação: 6 kx.

Devido à uniformidade e compacidade dos filmes obtidos a -5V, pH4, 19 com adição de 2% de H_2O_2 , os referidos parâmetros foram utilizados para a obtenção de filmes compósitos de HA com óxido de grafeno. Imagens apresentadas nas Figura- 20 são características dos filmes formados.



Figura 20 – MEV do filme de Hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno depositado a -5V, pH4, 19 e 2% de H_2O_2 . Ampliação: 2.0 kx, 5.0 kx, 14 kx.

Observa-se a formação de um filme mais uniforme e com ausência de núcleos possivelmente devido à influência do óxido de grafeno durante a deposição. Entretanto, as imagens apresentadas na Figura-20 evidencia a presença de poros e de algumas descontinuidades ou dobras que podem comprometer a resistência à corrosão do revestimento.

A formação de dobras na superfície é típica em revestimentos de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno, assim como observado em outros trabalhos[121, 122, 123, 124].

Espessura típica dos filmes de *HA* depositados durante 1*h* é apresentada na Figura 21. Das medidas realizadas, obteve-se uma média de espessura de $34,90\mu m$.



Figura 21 – Imagem ao MEV da espessura do Filme de hidroxiapatita depositada a -5V, pH4, 19 e adição de 2% de H_2O_2 .

5.2 Composição Química

Utilizando-se da técnica de energia dispersiva (EDS) obteve-se a composição química pontual da hidroxiapatita sintetizada e a razão Ca/P. Figura-22 [125].

A microanálise de EDS, identificou a presença de 8 picos: dois deles referente ao titânio e outros picos referentes aos elementos *C*, *Al* que se referem ao material *Cianoacrilato* "*SuperBonder*" utilizado para embutir as amostras. Os picos de *P*, *Ca* e *O* confirmam a presença dos principais elementos da fase de hidroxiapatita[126, 125].

O valor referente a razão Ca/P calculado foi de 2,7, sendo maior quando comparado ao da hidroxiapatita estequiométrica que apresenta um valor padrão de 1,67 encontrado na literatura

[127, 128, 129]. Este aumento pode está relacionado com a presença *CaO* formado durante o processo de eletrodeposição [130, 131, 128].



Figura 22 – (a) Imagem MEV identificação dos elementos químicos/ (b) Gráfico de EDS.

5.3 Estrutura Cristalina

Os difratogramas das Figuras-23, 24 e 25 são referentes as amostras depositadas sobre Ti puro sem tratamento em ácido fluorídrico. Na Figura- 23 temos o difratograma de amostra depositada a -5V, frequência de 0, $2H_Z$, pH 4, 19 e 2% de H_2O_2 enquanto que na Figura- 24 apresenta-se o difratograma de amostra depositada a mesmo potencial, frequência e quantidade de H_2O_2 , alterando-se apenas o pH para 5. A Figura -25 apresenta difratograma de amostra depositada a -4V, 0, $2H_Z$, pH 5 e adição de 2% de H_2O_2 . Tempos maiores de deposição foram utilizados a fim de se obter difratogramas com picos mais definidos e diminuir a intensidade do pico de titânio.



Figura 23 – Difratogramas de raios X de amostra depositada a -5V, frequência de pulso 0, 2Hz, *pH* 4, 19 e adição de 2% de H_2O_2 .



Figura 24 – Difratogramas de raios X de amostra depositada a -5V, frequência de pulso 0, 2Hz, *pH* 5 e adição de e 2% de H_2O_2 .



Figura 25 – Difratogramas de raios X de amostra depositada a -4V frequência de pulso 0, 2Hz, *pH* 5 e adição de e 2% de H_2O_2 .

Analisando os difratogramas apresentados nas Figuras-23, 24 25, verifica-se que a fase predominante constitui-se de Hidroxiapatita (*HA*) identificada através da ficha cristalográfica PDF 09-0432. Como já sugerido por EDS, confirmou-se a presença do óxido de cálcio (*CaO*) (PDF 17-0912). O titânio foi identificado através da ficha cristalográfica PDF 44-1294. Os

difratogramas indicam que não houveram diferenças significativas entre os depósitos obtidos a diferentes parâmetros, apenas as intensidades relativas entre os picos variam. A quantificação das fases presentes será realizada em um momento posterior.

Na Figura-26 está apresentado o difratograma da amostra depositada a -5V, frequência de 0, 2*Hz*, *pH* 4, 19, 2% de H_2O_2 tratada com ácido fluorídrico. Observa-se que após o tratamento com ácido fluorídrico a intensidade relativa dos picos de *HA* com relação aos picos de óxido de cálcio aumentou bastante, indicando uma diminuição na quantidade relativa de óxido de cálcio presente na amostra.



Figura 26 – Difratograma de raios X da amostra depositada a -5V com a frequência do pulso em 0,2*Hz*, *pH* 5 e adição de e 2% de H_2O_2 tratada com ácido fluorídrico.

O difratograma apresentado na Figura-27 é referente ao revestimento de Hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno depositado a -5V, frequência 0, 2Hz, pH 4, 19 e 2% de H_2O_2 . Para a obtenção destes revestimentos realizou-se tratamento da superfície de titânio com ácido fluorídrico. Verifica-se que a intensidade relativa da hidroxiapatita com relação ao óxido de cálcio é ainda maior, consequentemente uma menor quantidade de óxido de cálcio está presente na amostra.



Figura 27 – Difratograma de raios X de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno depositado a -5V, frequência de pulso 0, 2Hz, pH 4, 19 e 2% de H_2O_2 .

Segundo os autores *Stobinski et al* [132], o óxido de grafeno apresenta um pico intenso em $2\theta = 9.98^{\circ}$ e outro pouco intenso em $2\theta = 42.26^{\circ}$. Nas nossas amostras, como o espectro de raios X foi realizado a partir de 20°, não foi possível identificar o pico mais intenso e o pico menos intenso que não apareceu possivelmente devido à baixa quantidade desta nanoestrutura presente nos revestimentos [119].

5.4 Espectroscopia Raman

O espectro Ramam apresentado na Figura-28 refere-se a uma amostra de *HA* depositada a -5V, 0, 2*Hz*, *pH*4, 19 e adição de 2% de H_2O_2 . Foram obtidos outros espectros vibracionais em diferentes pontos da amostra e todos apresentaram-se semelhantes. Este fato está relacionado a obtenção de um filme uniforme e homogêneo.

O espectro Raman apresentado na Figura-29 é referente a uma amostra depositada a -5V, 0,2*Hz*, *pH5* e adição de 2% de H_2O_2 . Diferentes espectros vibracionais foram obtidos ao longo



Figura 28 – Espectro Raman das amostras de hidroxiapatita depositados a -5V, 0, 2Hz, pH4, 19 durante 4h e adição de 2% de H_2O_2 .

da amostra e os mesmos não apresentaram a mesma configuração. Diante disto, podemos concluir que ao alterar o pH para 5, os filmes produzidos não apresentaram a mesma homogeneidade observada nas amostras depositadas a pH4, 19.



Figura 29 – Espectro Raman das amostra de hidroxiapatita depositado a -5V, 0, 2Hz, pH5 durante 4h e 2% de H_2O_2 .

A tabela abaixo apresenta o posicionamento dos picos obtidos para os dois parâmetros de deposição e suas respectivas correspondências:

Deslocamento Raman (cm^{-1})	Respectivas correspondências
424 - 426	Flexão simétrica da ligação O-P-O do grupo fosfato PO ₄
583 - 590	Flexão Assimétrica da ligação O-P-O do grupo fosfato PO ₄
957 - 960	Alongamento simétrico da ligação O-P do grupo fosfato PO ₄
1045 - 1070	Alongamento simétrico da ligação O-P do grupo fosfato PO ₄

Tabela 3 – Posicionamento dos picos obtidos e suas respectivas correspondências

De acordo com a tabela, ambos os espectros apresentam picos característicos de hidroxiapatita em $957cm^{-1}$ 960 cm^{-1} [133, 134, 135, 136].

O espectro apresentado na Figura-30 corresponde ao revestimento de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno. É possível identificar os picos referentes à hidroxiapatita bem como os picos referentes ao óxido de grafeno (bandas D e G). A banda D localizada no ponto $1347cm^{-1}$, está relacionada a defeitos estruturais e desordem. A banda G do óxido de grafeno localizada em $1592cm^{-1}$ é correspondente a vibração tangencial de átomos de carbono. A baixa intensidade dos picos está relacionada a baixa concentração de óxido de grafeno no revestimento. [70, 23, 137, 138].



Figura 30 – Espectro Raman da amostra de de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno depositado a -5V,0,2Hz,pH4 durante 2h e 2% de H_2O_2 .

5.5 Resistência ao Desgaste

A Figura-31 apresenta o coeficiente de atrito em função do tempo para o substrato de titânio puro. Observa-se que as curvas apresentam uma oscilação em torno de um valor médio. Esta oscilação é devida à formação e injeção de uma grande quantidade de particulados (terceiro corpo) na região de contato entre os corpos [139, 140]. O coeficiente de atrito médio obtido para o titânio foi de 0,58, estando próximos aos valores encontrados em outros trabalhos, onde apresentaram uma variação entre 0,3 e 0,6 [141, 142].



Figura 31 – Variação do coeficiente de atrito do substrato sem revestimento em função tempo.



A largura da trilha obtida no desgaste apresentada na Figura 32 foi de $1001,91\mu m$.

Figura 32 – Imagem obtida por microscopia óptica para o substrato de titânio.

O valor do coeficiente de atrito elevado e a largura da trilha, mostram que o substrato de titânio puro apresenta baixa resistência ao desgaste, como já apresentado na literatura [143].

O coeficiente de atrito em função do tempo para o titânio revestido de hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno, está representado na Figura-33. Nota-se que o coeficiente de atrito médio apresentou um valor médio em torno de 0,7, maior que o titânio, o que pode estar relacionado à maior rugosidade da amostra. A adição de óxido de grafeno à hidroxiapatita promove uma queda significativa no coeficiente de atrito, reduzindo o coeficiente para uma valor médio em torno de 0.4.



Figura 33 – Variação do coeficiente de atrito do substrato de *Ti* puro revestido de *HA* e com incorporação *GO* em função tempo .

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A fim de qualificar o dano sofrido pelas amostras nos ensaios de desgaste, imagens ao microscópio ótico foram realizadas para quantificação da largura das trilhas. As Figuras-34 e 35 apresentam imagem da largura das trilhas para a hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno, respectivamente.

A aplicação de revestimento de hidroxiapatita promove uma redução significativa na largura da trilha que apresenta-se agora com uma largura de $438,8\mu m$. Trabalhos na literatura [144] que mostram desgaste de *HA* também obtiveram melhora de resistência ao desgaste em biomateriais ao revesti-lo com hidroxiapatita.



Figura 34 – Imagem obtida por microscopia óptica para o substrato de titânio revestido com hidroxiapatita.



Figura 35 – Imagem obtida por microscopia óptica para o substrato de titânio revestido de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno.

A incorporação de óxido de grafeno à hidroxiapatita, como esperado dado as propriedades do óxido de grafeno, promove um aumento na resistência ao desgaste. A trilha formada no revestimento compósito (HA + GO) apresenta uma largura de 304,69 μ m, o que representa uma redução na largura da trilha de 30% comparada à HA pura. Estes resultados indicam que ocorre uma boa ligação interfacial entre a HA e o GO, condição essencial para uma melhora nas propriedades mecânicas.

5.6 Resistência à Corrosão

Curvas de polarização realizadas em solução PBS para os revestimentos mais compactos estão apresentadas na Figura- 36 (a) e (b). A título de comparação, a curva do titânio puro foi adicionada. Os revestimentos avaliados foram depositados durante 1h e 2h a -5V, 0, 2Hz com adição de 2% de H_2O_2 alterando-se apenas o pH (*pH* 4, 19 e *pH* 5).



Figura 36 – Curvas de polarização em solução PBS de filmes depositados por 1h a -5V, 0, 2Hz, 2% de H_2O_2 a pH4, 19 e pH5. Velocidade de varredura de 0, 167mV/s.

Analisando as curvas de polarização representadas nas Figura -36, é possível constatar que o potencial de corrosão do filme de hidroxiapatita mostrou-se mais nobre em relação ao substrato e as densidades de corrente anódicas desenvolvidas foram menores que as apresentadas pelo titânio puro até o potencial de 1V, o que indica uma maior proteção à corrosão devido a presença do revestimento. Os resultados obtidos neste trabalho apresentam-se mais promissores, em termos de resistência à corrosão, aos apresentados por *Li et al* [24] e *Huang et al* [145] que obtiveram potenciais de corrosão iguais a -0,0197V e -0,3V respectivamente.

As curvas de polarização representadas na Figura- 37 (a) e (b), são referentes as amostras depositadas por 2h nos mesmos parâmetros depositados anteriormente. Verifica-se que as curvas de polarização dos revestimentos depositados a um tempo maior apresentam comportamento muito similar ao do titânio, o que possivelmente está relacionado ao surgimento de trincas no revestimento Figura- 19 decorrentes do crescimento do filme já que à medida que o filme cresce, aumentam as tensões internas no mesmo. Sendo assim, não é possível obter uma melhora na resistência à corrosão para os revestimentos produzidos durante 2h.



Figura 37 – Curvas de polarização em solução PBS de filmes depositados por 2h a -5V, 0, 2Hz, 2% de H_2O_2 a pH 4, 19 e pH5. Velocidade de varredura de 0, 167mV/s.

A Figura- 38 apresenta curvas de polarização para amostras de *HA* depositadas por 1h a -5V, 0, 2*Hz*, *pH* 4, 19, 2% de H_2O_2 com e sem a incorporação de grafeno. Verifica-se que o potencial de corrosão do revestimento de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno é mais nobre em relação ao substrato de titânio puro, entretanto, menor que o da hidroxiapatita pura. O mesmo verifica-se para as densidades de corrente anódicas; revestimentos com óxido de grafeno são mais resistentes à corrosão que o titânio puro, entretanto, menos resistentes que a HA pura. Este fato pode estar relacionado à presença das descontinuidades observadas ao MEV.



Figura 38 – Curvas de polarização referente as amostras por 1*h* e incorporação de óxido de grafeno nos parâmetros -5V, 0, 2Hz, pH 4, 19 e adição de 2% de H_2O_2 .

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através dos resultados obtidos para as curvas mostradas na Figura-38, observa-se que ao incorporar óxido de grafeno aos revestimentos de hidroxiapatita houve uma diminuição da resistência à corrosão comparada à *HA* pura. Entretanto, o revestimento conferiu alguma proteção à corrosão quando comparado ao titânio puro já que o filme apresentou superior potencial de corrosão e correntes anódicas inferiores. *Li et al* [24] obtiveram depósitos de HA com incorporação de óxido de grafeno através de deposição eletroforética sobre substrato de titânio e observaram uma melhora na resistência à corrosão apensar da presença de trincas no revestimento. Depósitos de HA pura e HA com incorporação de óxido de grafeno apresentaram similar resistência à corrosão.

5.7 Biocompatibilidade

Assim como em outras pesquisas [146], os resultados referentes à biocompatibilidade são mostrados em relação aos seguintes atributos:

viabilidade dos osteoblastos: é um indicador da citotoxicidade e proliferação celular;

- **produção de colágeno:** indicador de diferenciação entre osteoblastos que não depositam cálcio e células depositantes de cálcio.
- **produção de** *ALP*: é um importante indicador de propriedades de citocompatibilidade de implantes ósseos.

5.7.1 Viabilidade Celular

A Figura- 39 mostra a viabilidade de osteoblastos nas amostras sem fosfatos de cálcio (Ctr), de titânio sem revestimento (Ti), de revestimento de hidroxiapatita pura (HA) e de revestimento de hidroxiapatita com incorporação de grafeno (GO), em um período de 7 e 14 dias.



Figura 39 – Viabilidade celular de osteoblastos nas amostras em 7 e 14 dias de incubação.

Como esperado ao avaliar o gráfico da Figura-39, o substrato de titânio apresenta maior viabilidade do que os revestimentos. Além disso, o revestimento de hidroxiapatita pura apresentou um aumento da viabilidade celular após 14 dias, enquanto que o revestimento com incorporação de grafeno mostrou indícios consideráveis de viabilidade celular após 7 dias, mesmo não apresentando sinais consideráveis após um período maior de incubação. Isso indica baixo metabolismo celular, condição necessária à fixação, crescimento e sobrevivência da célula.

5.7.2 Produção de Colágeno pelos Osteoblastos

A Figura-40 demonstra a produção de colágeno pelo osteoblastos nas amostras sem fosfatos de cálcio (Ctr), de titânio sem revestimento (Ti), de revestimento de hidroxiapatita pura (HA) e de revestimento de hidroxiapatita com incorporação de grafeno (GO), em um período de 3, 7, 10 e 14 dias.



Figura 40 - Produção de colágeno pelos Osteoblastos.

Os resultados demonstraram uma produção de colágeno ligeiramente menor por osteoblastos cultivados com GO do que os controles (células em cultura sem fosfatos de cálcio). Osteoblastos cultivados com o revestimento de GO obtiveram a produção de colágeno estatisticamente semelhante ao controle. Uma vez que foram observados menor números de células viáveis em GO, estes resultados sugerem menos síntese de colágeno por célula nesses substratos.

5.7.3 Produção de ALP pelos Osteoblastos

Na Figura-41 é exibido os resultados referentes a produção de *ALP* pelos osteoblastos nas amostras sem fosfatos de cálcio (Ctr), de titânio sem revestimento (Ti), de revestimento de hidroxiapatita pura (HA) e de revestimento de hidroxiapatita com incorporação de grafeno (GO),em um período de 3, 7, 10 e 14 dias.



Figura 41 – Produção de ALP pelos Osteoblastos.

Uma vez que foram observados maiores números de células viáveis em Ctr, Ti e HA foi natural encontrar menor atividade de fosfatase alcalina em GO. Entretanto, novamente não há diferença estatística entre o revestimento GO e as células cultivadas em Ctr.

6 CONCLUSÃO

Com o propósito de melhorar as propriedades mecânicas da hidroxiapatita, esse trabalho propôs, realizou e analisou filmes de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno. Esses filmes, depositados sobre substrato de titânio puro foram avaliados por diferentes técnicas quanto à sua morfologia, resistência à corrosão, resistência ao desgaste e biocompatibilidade.

As micrografias obtidas pelo *MEV* mostraram os parâmetros mais adequados para realizar a eletrodeposição pulsada e incorporar óxido de grafeno . Dentre os diferentes parâmetros utilizados, filmes depositados a Potencial de -5V com a frequência do pulso em 0, 2Hz, pH 4, 19 e adição de 2% de H_2O_2 depositados durante 1*h*, apresentaram a morfologia mais compacta e uniforme. A incorporação de óxido de grafeno ao filme de HA promoveu a formação de revestimentos mais contínuos e homogêneos, entretanto houve a ocorrência de pequenas e poucas descontinuidades no filme. A técnica de energia dispersiva indicou a formação de hidroxiapatita com razão molar Ca/P=2,7.

Através da técnica de difração raios X foram identificadas a presença de hidroxiapatita e óxido de cálcio. Depósitos com incorporação de óxido de grafeno não apresentaram pico característico. A presença de óxido de grafeno foi confirmada por espectroscopia Raman, a qual também confirmou a presença de hidroxiapatita.

Curvas de polarização potenciodinâmica realizadas na presença de solução salina tamponada com fosfato (*PBS*), mostraram que os filmes de hidroxiapatita depositados durante 1 a um Potencial de -5V com a frequência do pulso em 0, 2Hz, *pH* 4, 19 e adição de 2% de H_2O_2 , aumentaram a resistência a corrosão do titânio puro. A incorporação de óxido de grafeno aos revestimentos promoveu uma diminuição da resistência à corrosão se compararmos ao revestimento puro, entretanto ainda houve melhora em relação ao titânio puro. Esta diminuição da resistência à corrosão está ligada a pequenas descontinuidades observadas nos filmes.

Os Ensaios de desgaste demonstraram que os revestimentos de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno apresentaram-se os mais resistentes ao desgaste quando comparado aos revestimentos de hidroxiapatita pura e substrato de titânio, o que confirma uma melhora nas propriedades mecânicas com a incorporação da nanoestrutura.

Por fim, os resultados da biocompatibilidade mostram que mesmo nos revestimentos de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno, a amostra se manteve biocompatível apresentando atividades de ALP, produção de colágeno e viabilidade celular com um comportamento bem próximo das amostras de controle. Resultados desta pesquisa apontam a hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno como um potencial revestimento para aplicações médicas. Entretanto mais pesquisas são necessárias, tais como ensaios in vivo, antes da indicação deste revestimento para aplicações médicas.

REFERÊNCIAS

1 BOSE, S.; BANERJEE, D.; BANDYOPADHYAY, A. Chapter 1 - introduction to biomaterials and devices for bone disorders. In: BOSE, S.; BANDYOPADHYAY, A. (Ed.). *Materials for Bone Disorders*. [S.1.]: Academic Press, 2017. p. 1 – 27. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 17.

2 OLIVEIRA, L. S. d. A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea-método de análise e perspectivas futuras. 2010. Citado na página 15.

3 CHAKRAVORTY, N. et al. Implant surface modifications and osseointegration. In: LI, Q.; MAI, Y.-W. (Ed.). *Biomaterials for Implants and Scaffolds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 107–131. ISBN 978-3-662-53574-5. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-53574-5_4. Citado na página 15.

4 BEN-NISSAN, B.; CHOI, A. H.; MACHA, I. Advances in bioglass and glass ceramics for biomedical applications. In: LI, Q.; MAI, Y.-W. (Ed.). *Biomaterials for Implants and Scaffolds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 133–161. ISBN 978-3-662-53574-5. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-53574-5_5. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 19.

5 NARUSHIMA, T.; UEDA, K.; ALFIRANO. Co-cr alloys as effective metallic biomaterials. In: NIINOMI, M.; NARUSHIMA, T.; NAKAI, M. (Ed.). *Advances in Metallic Biomaterials: Tissues, Materials and Biological Reactions*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 157–178. ISBN 978-3-662-46836-4. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-46836-4_7>. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 19.

6 CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v. 87, p. 1 – 57, 2015. Citado na página 15.

7 SONAWANE, V. C. et al. Fabrication and characterization of shape memory polymers based bioabsorbable biomedical drug eluting stent. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, Informa UK Limited, p. 1–14, jan 2017. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 19.

8 HE, W.; BENSON, R. 8 - polymeric biomaterials. In: KUTZ, M. (Ed.). *Applied Plastics Engineering Handbook (Second Edition)*. Second edition. [S.1.]: William Andrew Publishing, 2017. p. 145 – 164. Citado na página 15.

9 QUEIROZ, T. P. et al. In vivo evaluation of cp ti implants with modified surfaces by laser beam with and without hydroxyapatite chemical deposition and without and with thermal treatment: topographic characterization and histomorphometric analysis in rabbits. *Clinical Oral Investigations*, v. 21, n. 2, p. 685–699, 2017. Citado 3 vezes nas páginas 15, 16 e 19.

10 VIVANCO, J. F.; SLANE, J.; AIYANGAR, A. Chapter 13 - multiscale biomechanical characterization of bioceramic bone scaffolds. In: ZDERO, R. (Ed.). *Experimental Methods in Orthopaedic Biomechanics*. [S.l.]: Academic Press, 2017. p. 201 – 216. Citado na página 15.

11 EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M. G.; DOROZHKIN, S. V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (ha/tcp): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering: C*, v. 71, p. 1293 – 1312, 2017. Citado na página 15.

12 HERMANSSON, L. 1 - nanostructured ceramics. In: NARAYAN, R. J. (Ed.). *Monitoring and Evaluation of Biomaterials and their Performance in Vivo*. [S.1.]: Woodhead Publishing, 2017. p. 3 – 18. Citado na página 15.

13 UNIVERSITY, L. *Hydroxyapatite*. 2017. Disponível em <http://www.chemtube3d.com/ solidstate/SShydroxyapatite.htm>. Acesso em: 22 fev. 2017. Citado na página 16.

14 MEAH, F. et al. Hypophosphatasia: Review of bone mineral metabolism, pathophysiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, v. 15, n. 1, p. 24–36, 2017. Citado na página 15.

15 ALVES, H. R. Avaliação da aderência de recobrimentos de biomateriais produzidos por aspersão térmica a plasma atmosférico em aço inoxidável aisi 3161 utilizando-se ensaio de riscamento e ensaio de tração. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais. Rede Temática em Engenharia de Materiais, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Ouro Preto., 2010. Citado na página 15.

16 CHU, T.-M. G. et al. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials*, Elsevier, v. 23, n. 5, p. 1283–1293, 2002. Citado 3 vezes nas páginas 15, 16 e 33.

17 TAN, F. et al. In vitro and in vivo bioactivity of coblast hydroxyapatite coating and the effect of impaction on its osteoconductivity. *Biotechnology advances*, Elsevier, v. 30, n. 1, p. 352–362, 2012. Citado na página 15.

18 D'MELLO, S. et al. Bone regeneration using gene-activated matrices. *The AAPS Journal*, v. 19, n. 1, p. 43–53, 2017. Citado na página 16.

19 WANG, H. et al. Early bone apposition in vivo on plasma-sprayed and electrochemically deposited hydroxyapatite coatings on titanium alloy. *Biomaterials*, v. 27, n. 23, p. 4192 – 4203, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 21.

20 EPURE, L. et al. The effect of varying al2o3 percentage in hydroxyapatite/al2o3 composite materials: Morphological, chemical and cytotoxic evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Wiley Online Library, v. 83, n. 4, p. 1009–1023, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 21.

21 KHOR, K. et al. Microstructure and mechanical properties of plasma sprayed ha/ysz/ti–6al–4v composite coatings. *Biomaterials*, v. 25, n. 18, p. 4009 – 4017, 2004. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 21.

22 LOBO, A. O. et al. Fast preparation of hydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned multiwalled carbon nanotube composites for bioactive application. *Langmuir*, ACS Publications, v. 26, n. 23, p. 18308–18314, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 21.

23 ZENG, Y. et al. Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrochemical deposition. *Surface and Coatings Technology*, Elsevier, v. 286, p. 72–79, 2016. Citado 3 vezes nas páginas 16, 21 e 52.

24 LI, M. et al. Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications. *Carbon*, Elsevier, v. 67, p. 185–197, 2014. Citado 4 vezes nas páginas 16, 21, 56 e 58.

LIU, H. et al. Simultaneous reduction and surface functionalization of graphene oxide for hydroxyapatite mineralization. *The Journal of Physical Chemistry C*, ACS Publications, v. 116, n. 5, p. 3334–3341, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 21.

26 ZHANG, X. et al. Toughening of calcium hydroxyapatite with silver particles. *Journal of materials science*, Springer, v. 32, n. 1, p. 235–243, 1997. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 22.

27 ZAKERI, M.; HASANI, E.; TAMIZIFAR, M. Mechanical properties of tio2-hydroxyapatite nanostructured coatings on ti-6al-4v substrates by aps method. *International Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials*, Springer, v. 20, n. 4, p. 397–402, 2013. Citado na página 16.

28 BONARD, J.-M. et al. Carbon nanotube films as electron field emitters. *Carbon*, Elsevier, v. 40, n. 10, p. 1715–1728, 2002. Citado na página 16.

29 WANG, H. et al. In vitro degradation and mechanical integrity of mg–zn–ca alloy coated with ca-deficient hydroxyapatite by the pulse electrodeposition process. *Acta Biomaterialia*, Elsevier, v. 6, n. 5, p. 1743–1748, 2010. Citado na página 16.

30 KALBACOVA, M. et al. Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. *Carbon*, Elsevier, v. 48, n. 15, p. 4323–4329, 2010. Citado na página 16.

31 ZENG, Y. et al. Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrochemical deposition. *Surface and Coatings Technology*, Elsevier, v. 286, p. 72–79, 2016. Citado 3 vezes nas páginas 16, 22 e 34.

32 HEATH, D. E.; COOPER, S. L. The development of polymeric biomaterials inspired by the extracellular matrix. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 1, n. 1, p. 1–19, 2017. Citado na página 17.

33 HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*, Springer Nature, v. 462, n. 7272, p. 426–432, nov 2009. Citado na página 17.

34 LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 108, n. 11, p. 4742–4753, 2008. Citado na página 17.

35 O'HARE, P. et al. Biological responses to hydroxyapatite surfaces deposited via a co-incident microblasting technique. *Biomaterials*, Elsevier, v. 31, n. 3, p. 515–522, 2010. Citado na página 17.

36 LI, B. et al. Corrosion resistance and mechanical properties of titanium with hierarchical micro-nanostructure. *Materials Letters*, v. 182, p. 43 – 46, 2016. Citado na página 17.

37 SHI, Y. Y. et al. Electrophoretic deposition of graphene oxide reinforced chitosanhydroxyapatite nanocomposite coatings on ti substrate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 27, n. 3, p. 48, Jan 2016. Citado na página 17.

38 HOFFMAN, A. S. Chapter i.2.1 - introduction: The diversity and versatility of biomaterials. In: RATNER, B. D. et al. (Ed.). *Biomaterials Science (Third Edition)*. Third edition. [S.1.]: Academic Press, 2013. p. 63 – 64. Citado na página 19.

39 PARK, J. B. *Biomaterials: an introduction*. [S.l.]: Plenum Publishing Corporation, 1979. Citado na página 19.

40 LIN, S. T.; KIMBLE, L.; BHATTACHARYYA, D. Polymer blends and composites for biomedical applications. In: LI, Q.; MAI, Y.-W. (Ed.). *Biomaterials for Implants and Scaffolds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 195–235. ISBN 978-3-662-53574-5. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-53574-5_7. Citado na página 19.

41 PAITAL, S. R.; DAHOTRE, N. B. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, Elsevier, v. 66, n. 1, p. 1–70, 2009. Citado na página 19.

42 RATNER, B. D. et al. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. [S.l.]: Academic press, 2004. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 32.

43 SUZUKI, A. et al. Orthodontic buccal tooth movement by nickel-free titanium-based shape memory and superelastic alloy wire. *The angle orthodontist*, v. 76, n. 6, p. 1041–1046, 2006. Citado na página 19.

44 LIU, Y. et al. Hydroxyapatite/graphene-nanosheet composite coatings deposited by vacuum cold spraying for biomedical applications: Inherited nanostructures and enhanced properties. *Carbon*, Elsevier, v. 67, p. 250–259, 2014. Citado na página 19.

45 MANIVASAGAM, G.; DHINASEKARAN, D.; RAJAMANICKAM, A. Biomedical implants: Corrosion and its prevention-a review. *Recent Patents on Corrosion Science*, v. 2, n. 1, p. 40–54, 2010. Citado na página 19.

46 HEATH, D. E.; COOPER, S. L. Polymers: Basic principles. In: RATNER, B. D. et al. (Ed.). *Biomaterials Science (Third Edition)*. Third edition. [S.1.]: Academic Press, 2013. p. 64 – 79. Citado na página 19.

47 ANGELOVA, N.; HUNKELER, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends in biotechnology*, Elsevier, v. 17, n. 10, p. 409–421, 1999. Citado na página 19.

48 SMITH, W. *Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais*. Porto Alegre: Grupo A - AMGH, 2012. ISBN 8580551145. Citado na página 19.

49 HENCH, L. L.; BEST, S. M. Ceramics, glasses, and glass-ceramics: Basic principles. In: RATNER, B. D. et al. (Ed.). *Biomaterials Science (Third Edition)*. Third edition. [S.1.]: Academic Press, 2013. p. 128 – 151. Citado na página 19.

50 BABU, N. R. et al. Bioactive coatings on 316l stainless steel implants. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 17, n. 2, p. 43–47, 2004. Citado na página 20.

51 XIA, L. et al. Enhanced osteogenesis through nano-structured surface design of macroporous hydroxyapatite bioceramic scaffolds via activation of erk and p38 mapk signaling pathways. *J. Mater. Chem. B*, The Royal Society of Chemistry, v. 1, p. 5403–5416, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 21.

52 LIU, M. et al. Effect of nano-hydroxyapatite on the axonal guidance growth of rat cortical neurons. *Nanoscale*, The Royal Society of Chemistry, v. 4, p. 3201–3207, 2012. Citado na página 20.

53 HILBRIG, F.; FREITAG, R. Isolation and purification of recombinant proteins, antibodies and plasmid DNA with hydroxyapatite chromatography. *Biotechnology Journal*, Wiley-Blackwell, v. 7, n. 1, p. 90–102, dec 2012. Citado na página 20.

54 LACERDA, K. A.; LAMEIRAS, F. S.; SILVA, V. V. Avaliação da biodegradação de matrizes porosas à base de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. *Quim. Nova*, v. 32, n. 5, p. 1216–1221, 2009. Citado na página 20.

55 KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research*, Wiley-Blackwell, v. 62, n. 4, p. 600–612, sep 2002. Citado na página 20.

56 MA, G.; LIU, X. Y. Hydroxyapatite: Hexagonal or monoclinic? *Crystal Growth & Design*, American Chemical Society (ACS), v. 9, n. 7, p. 2991–2994, jul 2009. Citado na página 20.

57 VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry*, Elsevier, v. 32, n. 1, p. 1–31, 2004. Citado na página 20.

58 MARKOVIC, M.; FOWLER, B. O.; TUNG, M. S. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*, National Institute of Standards and Technology, v. 109, n. 6, p. 553, 2004. Citado na página 21.

59 LIN, K. et al. Strontium substituted hydroxyapatite porous microspheres: Surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced biological response and sustained drug release. *Chemical Engineering Journal*, v. 222, p. 49 – 59, 2013. Citado na página 21.

60 LIN, K.; CHEN, L.; CHANG, J. Fabrication of dense hydroxyapatite nanobioceramics with enhanced mechanical properties via two-step sintering process. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, Wiley Online Library, v. 9, n. 3, p. 479–485, 2012. Citado na página 21.

61 SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 8, p. 7591 – 7621, 2013. Citado na página 21.

62 RODRIGUES, L. R. et al. Síntese de hidroxiapatita nanoestruturada para compósitos utilizados na fabricação de scaffolds. *alternativa*, v. 3, p. 5. Citado na página 21.

63 CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. *Materials science and engineering: an introduction*. [S.l.]: Wiley New York, 2007. v. 7. Citado na página 21.

64 KHODAEI, M. et al. Surface and mechanical properties of modified porous titanium scaffold. *Surface and Coatings Technology*, v. 315, p. 61–66, 2017. Citado na página 21.

65 DONACHIE, M. J. *Titanium: a technical guide*. [S.l.]: ASM international, 2000. Citado na página 21.

66 VITERI, V. S. D.; FUENTES, E.; GEGNER, J. Titanium and titanium alloys as biomaterials. *Tribology—Fundamentals and advancements. InTech*, p. 155–181, 2013. Citado na página 21.

67 GOMES, L. S. M. et al. Biomateriais em artroplastia de quadril: Propriedades, estrutura e composição. *O Quadril. São Paulo: Atheneu*, p. 121–143, 2010. Citado na página 22.

68 KAO, W.; SU, Y.; HSIEH, Y. Effects of duplex nitriding and tin coating treatment on wear resistance, corrosion resistance and biocompatibility of ti6al4v alloy. *Journal of Materials Engineering and Performance*, Springer, p. 1–12, 2017. Citado na página 22.

69 MAEDA, H.; TAMURA, T.; KASUGA, T. Improving the biocompatibility of tobermorite by incorporating calcium phosphate clusters. *Bio-Medical Materials and Engineering*, IOS Press, v. 28, n. 1, p. 31–36, 2017. Citado na página 22.

70 LI, M. et al. Electrophoretic deposition and electrochemical behavior of novel graphene oxide-hyaluronic acid-hydroxyapatite nanocomposite coatings. *Applied Surface Science*, Elsevier, v. 284, p. 804–810, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 52.

71 LIU, H. et al. Biomimetic and cell-mediated mineralization of hydroxyapatite by carrageenan functionalized graphene oxide. *ACS applied materials & interfaces*, ACS Publications, v. 6, n. 5, p. 3132–3140, 2014. Citado na página 22.

72 FENG, L. et al. A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells. *Biomaterials*, v. 32, n. 11, p. 2930 – 2937, 2011. Citado na página 22.

73 HE, S. et al. A graphene nanoprobe for rapid, sensitive, and multicolor fluorescent dna analysis. *Advanced Functional Materials*, Wiley Online Library, v. 20, n. 3, p. 453–459, 2010. Citado na página 22.

74 WANG, Y. et al. Aptamer/graphene oxide nanocomplex for in situ molecular probing in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 132, n. 27, p. 9274–9276, 2010. Citado na página 22.

75 SUN, X. et al. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano research*, Springer, v. 1, n. 3, p. 203–212, 2008. Citado na página 22.

76 YANG, X. et al. High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide. *The Journal of Physical Chemistry C*, ACS Publications, v. 112, n. 45, p. 17554–17558, 2008. Citado na página 22.

HE, H. et al. A new structural model for graphite oxide. *Chemical Physics Letters*, v. 287, n.
1–2, p. 53 – 56, 1998. Citado na página 23.

78 PARK, S.; RUOFF, R. S. Chemical methods for the production of graphenes. *Nature nanotechnology*, Nature Publishing Group, v. 4, n. 4, p. 217–224, 2009. Citado na página 22.

79 DEEPACHITRA, R. et al. Osteo mineralization of fibrin-decorated graphene oxide. *Carbon*, v. 56, p. 64 – 76, 2013. Citado na página 22.

80 NEELGUND, G. M.; OKI, A.; LUO, Z. In situ deposition of hydroxyapatite on graphene nanosheets. *Materials Research Bulletin*, v. 48, n. 2, p. 175 – 179, 2013. Citado na página 22.

81 LIU, Y. et al. Hydroxyapatite/graphene-nanosheet composite coatings deposited by vacuum cold spraying for biomedical applications: Inherited nanostructures and enhanced properties. *Carbon*, v. 67, p. 250 – 259, 2014. Citado na página 22.

82 KAWASHITA, M. et al. Electrodeposition of apatite onto titanium substrates under pulse current. In: _____. *Interface Oral Health Science 2009*. Tokyo: Springer Japan, 2010. p. 305–307. Citado na página 23.

83 BARBOSA, M. C. Estudo de parâmetros termodinâmicos na eletrodeposição de hidroxiapatita em nanotubos de carbono verticalmente alinhados. 2013. Citado na página 23.

84 MELO, R. L. *Eletrodeposição, caracterização e estudos de corrosão de camadas de Ni-Mo-P*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Ceará, 2009. Citado na página 23.

85 CHAKRABORTY, R. et al. Mwcnt reinforced bone like calcium phosphate—hydroxyapatite composite coating developed through pulsed electrodeposition with varying amount of apatite phase and crystallinity to promote superior osteoconduction, cytocompatibility and corrosion protection performance compared to bare metallic implant surface. *Surface and Coatings Technology*, Elsevier, 2017. Citado na página 23.

86 LIU, S. et al. In simulated body fluid performance of polymorphic apatite coatings synthesized by pulsed electrodeposition. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 79, p. 100–107, 2017. Citado na página 23.

87 PARK, K. H. et al. Pulse electrodeposition of hydroxyapatite/chitosan coatings on titanium substrate for dental implant. *Colloid and Polymer Science*, Springer, p. 1–7, 2017. Citado na página 23.

88 ETMINANFAR, M.; KHALIL-ALLAFI, J.; PARSA, A. On the electrocrystallization of pure hydroxyapatite nanowalls on nitinol alloy using a bipolar pulsed current. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 678, p. 549 – 555, 2016. Citado na página 24.

89 DREVET, R. et al. Effects of pulsed current and h2o2 amount on the composition of electrodeposited calcium phosphate coatings. *Materials Characterization*, v. 61, n. 8, p. 786 – 795, 2010. Citado na página 24.

90 CHEN, X. yu et al. Pulsed electrodeposition of hydroxyapatite on titanium substrate in solution containing hydrogen peroxide. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, v. 17, n. 3, p. 617 – 621, 2007. Citado na página 24.

91 ROCHOW, T. G.; ROCHOW, E. G. Scanning electron microscopy. In: *An Introduction to Microscopy by Means of Light, Electrons, X-Rays, or Ultrasound*. [S.1.]: Springer, 1978. p. 273–298. Citado na página 25.

92 NOMENCLATURE, M. C. E.-. on; DEFINITIONS. Compilation of astm standard definitions. In: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. [S.I.], 1976. Citado na página 25.

93 KLAUSS, P. et al. Estudo da obtenção de imagens no microscópio eletrônico de varredura e espectros na microanálise por energia dispersiva. 2003. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 26.

94 ROCHOW, T. G.; ROCHOW, E. G. Scanning electron microscopy. In: _____. *An Introduction to Microscopy by Means of Light, Electrons, X-Rays, or Ultrasound*. Boston, MA: Springer US, 1978. p. 273–298. Citado na página 26.

95 SALEH, I. M. et al. Adhesion of endodontic sealers: scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy. *Journal of endodontics*, Elsevier, v. 29, n. 9, p. 595–601, 2003. Citado na página 26.

96 LOTZ, B. Crystal polymorphism and morphology of polylactides. In: *Advances in Polymer Science*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 1–30. Citado na página 27.

97 ATTWOOD, D.; SAKDINAWAT, A. *X-rays and Extreme Ultraviolet Radiation: Principles and Applications*. [S.l.]: Cambridge university press, 2016. Citado na página 27.

98 FIGUEIREDO, D. G. de. *Análise de Fourier e Equações Diferenciais Parciais*. [S.1.]: IMPA, 2014. Citado na página 27.

99 HOU, S. Y. E.; REHFELD, S. J. X-ray diffraction and electron paramagnetic resonance spec-troscopy of mammalian stratum corneum lipid domains. *Advances in Lipid Research: Skin Lipids*, Elsevier, v. 24, p. 141, 2016. Citado na página 28.

100 MOTTANA, A.; FERRARIS, G.; BRUNORI, M. The centennial of x-ray diffraction (1912–2012). *Rendiconti Lincei*, v. 24, n. 1, p. 1–5, 2013. Citado na página 28.

101 CHENG, J.-X.; XIE, X. S. *Coherent Raman scattering microscopy*. [S.l.]: CRC press, 2016. Citado na página 29.

102 CASPERS, P. J. et al. In vivo confocal raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *Journal of investigative dermatology*, Elsevier, v. 116, n. 3, p. 434–442, 2001. Citado na página 29.

103 SIEG, A. Raman spectroscopy. In: _____. *Non Invasive Diagnostic Techniques in Clinical Dermatology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 217–223. Citado na página 29.

104 ADDY, M. Tooth brushing, tooth wear and dentine hypersensitivity—are they associated? *International dental journal*, Wiley Online Library, v. 55, n. S4, p. 261–267, 2005. Citado na página 29.

105 HIBBELER, R. C. *Dinâmica: mecânica para engenharia*. [S.l.]: Pearson Education do Brasil, 2005. Citado na página 29.

106 BARROS, R. A. Influência da nitretação a plasma e carbonetação a laser nas propriedades tribológicas do par aço aisi/sae 4340 e liga bronze-alumínio 630. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2017. Citado na página 30.

107 FOLLE, L. F.; SCHAEFFER, L. Evaluation of the tribological conditions in sheet metal forming through bending under tension test. *Matéria (Rio de Janeiro)*, SciELO Brasil, v. 22, n. 2, 2017. Citado na página 30.

108 SANTOS, M. dos; COSTA, H.; MELLO, J. D. Potentiality of triboscopy to monitor friction and wear. *Wear*, Elsevier, v. 332, p. 1134–1144, 2015. Citado na página 30.

109 LEWIS, R.; DWYER-JOYCE, R. Wear of human teeth: a tribological perspective. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology*, SAGE Publications, v. 219, n. 1, p. 1–18, 2005. Citado na página 30.

110 WOLYNEC, S. *Técnicas Eletroquímicas em Corrosão Vol. 49*. [S.l.]: Edusp, 2003. Citado na página 31.

111 SEDRIKS, A. Plenary lecture-1986: Effects of alloy composition and microstructure on the passivity of stainless steels. *Corrosion*, v. 42, n. 7, p. 376–389, 1986. Citado na página 31.

112 WATAHA, J. C. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of prosthetic dentistry*, Elsevier, v. 86, n. 2, p. 203–209, 2001. Citado na página 32.

113 ANDERSON, J. M. Biological responses to materials. *Annual review of materials research*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 31, n. 1, p. 81–110, 2001. Citado na página 32.
114 SAKAGUCHI, R. L.; POWERS, J. M. *Craig's restorative dental materials*. [S.l.]: Elsevier Health Sciences, 2012. Citado na página 32.

115 MATINLINNA, J. P. *Handbook of oral biomaterials*. [S.l.]: Pan Stanford Publishing, 2014. Citado na página 32.

116 ONUKI, Y. et al. A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *Journal of diabetes science and technology*, SAGE Publications, v. 2, n. 6, p. 1003–1015, 2008. Citado na página 32.

117 ANUSAVICE, K. J.; SHEN, C.; RAWLS, H. R. *Phillips' science of dental materials*. [S.l.]: Elsevier Health Sciences, 2013. Citado na página 32.

118 FRIES, R. Biomaterials-the intersection of biology and materials science (temenoff, js et al.; 2008)[book reviews]. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, IEEE, v. 28, n. 4, p. 94–94, 2009. Citado na página 32.

119 PEI, X. et al. Single-walled carbon nanotubes/hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition. *Applied Surface Science*, Elsevier, v. 295, p. 71–80, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 35 e 50.

120 MANHABOSCO, T. M.; MÜLLER, I. L. Deposition of thin cobalt films onto silicon by galvanostatic and potentiostatic techniques. *Journal of materials science*, Springer, v. 44, n. 11, p. 2931–2937, 2009. Citado na página 37.

121 JANKOVIĆ, A. et al. Bioactive hydroxyapatite/graphene composite coating and its corrosion stability in simulated body fluid. *Journal of Alloys and Compounds*, Elsevier, v. 624, p. 148–157, 2015. Citado na página 44.

122 ZANIN, H. et al. Fast preparation of nano-hydroxyapatite/superhydrophilic reduced graphene oxide composites for bioactive applications. *Journal of Materials Chemistry B*, Royal Society of Chemistry, v. 1, n. 38, p. 4947–4955, 2013. Citado na página 44.

123 CHEN, D.; FENG, H.; LI, J. Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 112, n. 11, p. 6027–6053, 2012. Citado na página 44.

124 XIONG, G. et al. Novel porous graphene oxide and hydroxyapatite nanosheets-reinforced sodium alginate hybrid nanocomposites for medical applications. *Materials Characterization*, Elsevier, v. 107, p. 419–425, 2015. Citado na página 44.

125 SILVAA, C. L. A. da et al. Caracterização microestrutural do compósito hidroxiapatita bovina-biovidro. *Ciência e Tecnologia*, p. 8. Citado na página 45.

126 BET MARCOS ROBERTO E GOISSIS, G. e. d. G. P. A. M. Compósitos colageno anionico: Fosfato de calcio. preparacao e caracterização. *QU 'I MICA NOVA*, v. 20, n. 5, p. 475, 1997. Citado na página 45.

127 WANG, M.-C. et al. Characterization of calcium phosphate apatite with variable ca/p ratios sintered at low temperature. *Ceramics International*, Elsevier, v. 41, n. 1, p. 1223–1233, 2015. Citado na página 46.

128 ERGUN, C. et al. Increased osteoblast adhesion on nanoparticulate calcium phosphates with higher ca/p ratios. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Wiley Online Library, v. 85, n. 1, p. 236–241, 2008. Citado na página 46.

129 COSTA, A. C. F. de M. et al. 4. hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista eletrônica de Materiais e Processos*, v. 4, n. 3, 2009. Citado na página 46.

130 CATAURO, M. et al. Biological influence of ca/p ratio on calcium phosphate coatings by sol-gel processing. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 65, p. 188–193, 2016. Citado na página 46.

131 LEE, I.-S. et al. Various ca/p ratios of thin calcium phosphate films. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 22, n. 1, p. 15–20, 2002. Citado na página 46.

132 STOBINSKI, L. et al. Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the xrd, tem and electron spectroscopy methods. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, Elsevier, v. 195, p. 145–154, 2014. Citado na página 50.

133 MACHADO, A. C. P. Biocompatilibidade in vivo de implantes de titânio submetidos ao processo biomimético. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2002. Citado na página 52.

134 MONTEIRO, T. F. *Caracterização de biocerâmicos à base de hidroxiapatite*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de Aveiro, 2015. Citado na página 52.

135 KUROMOTO, N. K. Setor de Ciências Exatas Departamento de Física Memorial Descritivo. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2015. Citado na página 52.

136 GAO, C. et al. Enhanced sintering ability of biphasic calcium phosphate by polymers used for bone scaffold fabrication. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 33, n. 7, p. 3802–3810, 2013. Citado na página 52.

137 RAMESHA, G. K.; SAMPATH, S. Electrochemical reduction of oriented graphene oxide films: an in situ raman spectroelectrochemical study. *The Journal of Physical Chemistry C*, ACS Publications, v. 113, n. 19, p. 7985–7989, 2009. Citado na página 52.

138 STANKOVICH, S. et al. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *carbon*, Elsevier, v. 45, n. 7, p. 1558–1565, 2007. Citado na página 52.

139 HOLMBERG, K. et al. Friction and wear of coated surfaces—scales, modelling and simulation of tribomechanisms. *Surface and Coatings Technology*, Elsevier, v. 202, n. 4, p. 1034–1049, 2007. Citado na página 53.

140 BUDZYNSKI, P.; YOUSSEF, A.; SIELANKO, J. Surface modification of ti–6al–4v alloy by nitrogen ion implantation. *Wear*, Elsevier, v. 261, n. 11, p. 1271–1276, 2006. Citado na página 53.

141 MIURA-FUJIWARA, E.; OKUMURA, T.; YAMASAKI, T. Frictional and wear behavior of commercially pure ti, ti-6al-7nb, and sus316l stainless steel in artificial saliva at 310 k. *Materials transactions*, The Japan Institute of Metals and Materials, v. 56, n. 10, p. 1648–1657, 2015. Citado na página 53.

142 CHOUBEY, A.; BASU, B.; BALASUBRAMANIAM, R. Tribological behaviour of ti-based alloys in simulated body fluid solution at fretting contacts. *Materials Science and Engineering: A*, Elsevier, v. 379, n. 1, p. 234–239, 2004. Citado na página 53.

143 LISIECKI, A.; PIWNIK, J. Tribological characteristic of titanium alloy surface layers produced by diode laser gas nitriding. *Archives of Metallurgy and Materials*, v. 61, n. 2, p. 543–552, 2016. Citado na página 54.

144 BUCIUMEANU, M. et al. Study of the tribocorrosion behaviour of ti6al4v–ha biocomposites. *Tribology International*, Elsevier, v. 107, p. 77–84, 2017. Citado na página 55.

145 HUANG, J. et al. Development and characterization of titanium-containing hydroxyapatite for medical applications. *Acta biomaterialia*, Elsevier, v. 6, n. 1, p. 241–249, 2010. Citado na página 56.

146 LIU, H. et al. An in vitro evaluation of the ca/p ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, v. 4, n. 5, p. 1472 – 1479, 2008. Citado na página 59.