



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS - ICEB

DEPARTAMENTO DE FÍSICA - DEFIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS COM ÊNFASE

EM FÍSICA DOS MATERIAIS - FIMAT

ANA BÁRBARA BATISTA

**Eletrodeposição de hidroxiapatita com incorporação
de nanocamadas de talco pedra-sabão obtidas por
esfoliação em fase líquida**

**OURO PRETO - MG
2019**

Eletrodeposição de hidroxiapatita com incorporação de nanocamadas de talco pedra-sabão obtidas por esfoliação em fase líquida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Física de Materiais da Universidade Federal de Ouro Preto como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências.

Professora orientadora: Dra. Taíse Matte Manhadosco

Professora coorientadora: Dra. Ana Paula Moreira Barboza

**OURO PRETO – MG
2019**

B333e Batista, Ana Bárbara.
Eletrodeposição de hidroxiapatita com incorporação de nanocamadas de talco pedra-sabão obtidas por esfoliação em fase líquida [manuscrito] / Ana Bárbara Batista. - 2019.
103f.: il.: color; grafis; tabs.

Orientadora: Prof. Dr. Taise Matte Manhobosco.
Coorientadora: Prof. Dr. Ana Paula Moreira Barboza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Ciências.
Area de Concentração: Física de Materiais.

1. Titânio. 2. Hidroxiapatita. 3. Talco. I. Manhobosco, Taise Matte. II. Barboza, Ana Paula Moreira. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 621.357

Catálogo: www.sisbin.ufop.br

	<p>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</p>
---	---

“Eletrodeposição de hidroxiapatita com incorporação de nanocamadas de talco pedra-sabão obtidas por esfoliação em fase líquida”

Autora: Ana Bárbara Batista

Dissertação defendida e aprovada, em 19 de julho de 2019, pela banca examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Taise Matte Manhobosco
Universidade Federal de Ouro Preto



Prof. Dr. Luiz Orlando Ladeira
Universidade Federal de Minas Gerais



Profa. Dra. Jaqueline dos Santos Soares
Universidade Federal de Ouro Preto

Dedico este trabalho à minha avó, Dona Fiota, pela despedida que não tivemos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Ao meu pai, José Geraldo e à minha mãe, Silvânia, por toda a dedicação, empenho e esforço dedicados à minha educação, além de toda o apoio e amor incondicional. Se não fosse vocês, não teria chegado aqui!

Ao Raphael Marques, por todo o companheirismo nessa reta final, por tornar meus dias mais alegres e os fins de semana cheios de dança!

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dra. Taíse Matte Manhabosco por todos os ensinamentos, auxílio e paciência durante este tempo de mestrado.

Agradeço também à minha co-orientadora, Prof.^a Dra. Ana Paula Moreira Barboza por todo o apoio, aprendizado e auxílio na realização da esfoliação e das medidas SPM.

Aos colegas do mestrado/Laboratório José Agenor, Thiago, Wflander, Daiandra, Felipe e Antônio pela amizade e/ou por toda a ajuda durante o mestrado.

Agradeço ao Henrique Carvalho da Silva Coelho pelas medidas de DRX e pela disposição em me ajudar com o resultado das análises. Nossas discussões foram tão produtivas que você se tornou um amigo (por isso e pelas aulas de dança!).

Pelo auxílio na realização da esfoliação do talco para este trabalho, agradeço à aluna Tamara Teixeira.

Agradeço também ao professor Dr. Fernando Gabriel da Silva Araújo que disponibilizou o Nanolab - laboratório associado à REDEMAT/UFOP - para realização dos ensaios de DRX e AFM.

À Prof.^a Dra. Giovanna Machado e aos técnicos Gian Duarte e Thiago Soares do CETENE, agradeço por também terem realizado ensaios de DRX para este trabalho.

À Prof.^a Dra. Cláudia Vasconcelos, agradeço pelas imagens ao MEV, pela realização das análises EDS e pelo ensaio de desgaste. Para realização do ensaio de desgaste devo agradecer também aos alunos Mário Jose Bueno e Anderson Junior dos Santos pelas medidas realizadas e à Prof.^a Dra. Geralda Cristina Godoy por ceder os equipamentos do laboratório Nanotech Tribologia do Departamento de Engenharia Metalúrgica da UFMG.

Agradeço à Prof.^a Dra. Érika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga e ao seu aluno Nathanael Vieira Medrado pelos ensaios de biocompatibilidade e ao Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro por disponibilizar o laboratório de Sinalização Celular da UFMG para realização desses ensaios.

Ao prof. Dr. Bernardo Neves, do departamento de Física da UFMG, pela disponibilização do Laboratório de Nanoscopia, para realização de algumas medidas de AFM utilizando a técnica PFQNM. Pelo auxílio nas medidas de AFM, agradeço à doutoranda da REDEMAT Ana Carolina Brito.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos.

Ao Programa FIMAT e à todos os professores da UFOP que passaram pela minha jornada acadêmica.

Por fim, agradeço à FAPEMIG Processo No. TEC - RED-00282-16 e à L'Óreal-UNESCO-ABC Para Mulheres na Ciência pelo reconhecimento deste trabalho, agraciando a Prof^a Dra. Jaqueline Soares com o PRÊMIO L'ORÉAL-UNESCO-ABC PARA MULHERES NA CIÊNCIA 2018 na categoria "Física".

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor. Mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos”.

Martin Luther King

RESUMO

O ramo de biomateriais, ou seja, o ramo de materiais designados a interagir com sistemas biológicos é de suma importância no desenvolvimento de próteses ortopédicas e/ou dentárias. Nesse contexto, o titânio (Ti) é um dos metais mais utilizados para tal fim devido à sua alta resistência à corrosão, o que faz com que o Ti possua baixa toxicidade se comparado a outros biometais. Além disso, seu módulo de elasticidade é próximo ao do osso. Entretanto, o Ti apresenta desvantagens com relação à sua aplicação no ramo ortopédico e dentário, destacando-se a ligação química fraca formada entre ele e os ossos do corpo humano. Revestir o Ti com um filme de hidroxiapatita (HA) é uma opção vantajosa, uma vez que a HA é o componente mineral de maior abundância nos ossos e dentes sendo, portanto, um material de alta biocompatibilidade. Porém, por ser uma cerâmica, a hidroxiapatita apresenta algumas características que restringem seu uso como biomaterial, sendo elas a baixa tenacidade, a fragilidade e a baixa resistência mecânica. Com a finalidade de aprimorar tais propriedades e tornar a HA uma boa opção para reparo ósseo e dentário, pesquisadores vêm adicionando materiais de reforço tais como nanotubos de carbono, óxido de grafeno, entre outros. Pesquisas recentes demonstraram que o talco é um material bidimensional passível de esfoliação com propriedades similares às do grafeno, tais como baixa energia de ligação entre camadas e alta resistência à ruptura. Para obtenção de nanocamadas de talco, empregou-se a esfoliação em fase líquida, uma vez que é um dos métodos de esfoliação que apresenta maior rendimento no que se refere à quantidade de material esfoliado. Desse modo, vários solventes foram testados em diferentes parâmetros de esfoliação para obtenção do talco esfoliado. Para deposição tanto da HA pura, quanto da HA com incorporação de talco, utilizou-se a eletrodeposição pulsada, onde pulsos de tensão foram aplicados à célula eletroquímica, promovendo a formação de HA mais aderente ao substrato. As técnicas utilizadas para avaliação dos filmes depositados foram a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*), ensaios de desgaste, polarização potenciodinâmica, difração de raios X (DRX), ensaios de biocompatibilidade e técnicas de Microscopia de Varredura por Sonda. Com este trabalho, pretende-se obter uma melhoria nas propriedades mecânicas dos revestimentos de HA pela incorporação das nanocamadas de talco sem afetar a biocompatibilidade da HA. Como resultado, obteve-se que HA com incorporação de nanocamadas de talco na concentração de 0,90 g/L apresentou resultados superiores às demais condições analisadas (HA pura, HA +

talco na concentração de 0,07 g/L e HA + nanocamadas de talco na concentração de 1,80 g/L) de acordo com as técnicas de avaliação dos depósitos utilizadas.

Palavras-chave: titânio, hidroxiapatita, eletrodeposição pulsada, talco, esfoliação em fase líquida, nanocamadas.

ABSTRACT

Biomaterials, that is, materials designed to interact with biological systems, are very important for the development of orthopedic and/or dental prostheses. Among known biomaterials, titanium (Ti) is one of the most used for this purpose because of its high corrosion resistance, which makes Ti low toxicity when compared to other biometals. Besides, its elasticity modulus is close to that of bone. However, Ti has also disadvantages when applied in orthopedic and dental prosthesis, in especial the weak chemical bond between it and the bones of the human body. An advantageous option is to coat the Ti with hydroxyapatite (HA) film because HA is the mineral bones and teeth being, therefore, a high biocompatible material. However, HA is a ceramic and possess some characteristics that restrict its use as biomaterial, i.e., low tenacity, fragility and low mechanical resistance. In order to improve such properties and make HA a good option for bone and dental repair, researchers have been adding reinforcement materials such as carbon nanotubes, graphene oxide, among others. Recent research on talc indicates that it is a two-dimensional exfoliative material with properties similar to graphene, such as low bond strength between layers and high breaking strength. To obtain talc nano-layers, liquid phase exfoliation was used, as it is one of the exfoliation methods that presents greater yield with regard to the amount of exfoliated material. Thus, several solvents were tested in different exfoliation parameters to obtain the exfoliated talc. For deposition of both pure HA and HA with talc incorporation, pulsed electrodeposition was used. In this technique, tension pulses were applied to the electrochemical cell, promoting the formation of more adherent HA films to the substrate. To evaluate the HA films it was used Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), wear tests, potentiodynamic polarization, X-ray diffraction (XRD), biocompatibility tests and Scanning Probe Microscopy techniques. This work aim is to obtain an improvement in the mechanical properties of the HA coatings by the incorporation of the talc nano-layers without affecting HA biocompatibility. As result, it was obtain that HA with talc nano-layers incorporation at a 0.90 g/L concentration presented better results than the other conditions analyzed (pure HA, HA + talc at 0.07 g/L and HA + talc nano-layers at 1,80 g/L) according to the deposit evaluation techniques. **Key-words:** titanium, hydroxyapatite, pulsed electrodeposition, talc, liquid phase exfoliation, nano-layers.

Lista de Figuras

Figura 1 - Interface entre o implante de titânio e o biolíquido [3].	23
Figura 2 - Célula unitária da HA hexagonal: (a) vista lateral; (b) vista superior [27]....	26
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura "tipo sanduíche" do talco [32].....	27
Figura 4 - Representação esquemática da esfoliação líquida a partir da exposição do material 2D à ondas ultrassônicas, sendo (a) material esfoliado e (b) reagregação das lamelas devido à escolha inadequada do solvente [38].	29
Figura 5 - Ilustração de uma célula eletroquímica de três eletrodos e o potenciostato/galvanostato [45].	30
Figura 6 - Ilustração dos pulsos de corrente ou tensão aplicados à célula eletroquímica na eletrodeposição pulsada [46].	31
Figura 7 - Esquema simplificado dos constituintes de um MEV [51].....	33
Figura 8 - Difração de raio X [54].	35
Figura 9 - Esquema simplificado de um difratômetro mostrando a relação entre o ângulo de Bragg e o ângulo de difração [55].	36
Figura 10 - Exemplo de um difratograma [57].	37
Figura 11 - Representação do ensaio pino-disco. Na imagem, W: rotação; D: espessura disco; d: diâmetro do pino; F: força normal aplicada no pino; R: raio do risco circular [62].	39
Figura 12 - Sistema utilizado para obtenção das curvas de polarização, sendo ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência e CE: contra-eletrodo [64].	40
Figura 13 - Curva de polarização típica de aços inoxidáveis em meio ácido sendo E*: potencial de corrosão; Epp: potencial inicial de passivação e Etrans: potencial inicial de transpassivação [65].	41
Figura 14 - Desenho esquemático dos componentes de um microscópio de varredura por sonda, sendo A: sonda; B: cerâmicas piezoelétricas (<i>scanner</i>); C: sistema de monitoramento da interação sonda-amostra; D: sistema de aproximação manual; E: computador; F: amostra; G: fotodetector; H: <i>laser</i> [74].	43
Figura 15 - (a) Deflexão da alavanca Δz (proporcional a F) em função da distância sonda-amostra (z). Em vermelho: curva de aproximação. Em azul: curva de retração. (b) Camada de contaminação na superfície da amostra causando a força de adesão [74], [76].	44

Figura 16 - Imagem da adesão de uma amostra de β -caroteno em substrato de grafite [81].	45
Figura 17 - Gráfico da força em função da separação ponta/amostra, ilustrando as informações que podem ser obtidas a partir desta curva [83].	46
Figura 18 - Célula eletrolítica de três eletrodos utilizada na eletrodeposição.	48
Figura 19 - Formatos de talco utilizados e representação de uma régua para indicar a dimensão de (a) e (b), sendo que em (a) têm-se flocos de talco e em (b), pó de talco peneirado sobre papel alumínio.....	49
Figura 20 - Disposição dos eletrodos para realização da polarização potenciodinâmica.	52
Figura 21 - Imagens de microscopia ótica referentes aos testes especificados na Tabela 4, sendo (a): Ensaio 1; (b) Ensaio 2; (c): Ensaio 3 e (d) Ensaio 4.	56
Figura 22 - Imagem de microscopia ótica referente a um teste com baixa concentração de material esfoliado. Parâmetros do teste: flocos de talco como soluto e NMP como solvente na concentração 0,2 g/L, solução sonicada por 3 horas.	57
Figura 23 - Imagens de microscopia ótica referentes aos ensaios especificados na Tabela 5, sendo (a): Ensaio 1; (b) Ensaio 2; (c): Ensaio 3.	59
Figura 24 - Medida AFM e imagem ótica (OM: <i>optical microscopy</i>) do talco esfoliado na solução eletrolítica da HA, sendo: (a) floco de altura igual a 77 nm; (b) floco de altura igual a 153 nm; (c) floco de altura igual a 61 nm e (d) floco de altura igual a 20 nm. ..	60
Figura 25 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA pura. Em destaque, trincas da amostra.....	61
Figura 26 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA com talco na concentração de 0,07 g/L. Em destaque, trincas da amostra.	61
Figura 27 - Micrografias ao MEV ampliadas 2500 vezes de HA pura.	62
Figura 28 - Micrografias ao MEV ampliadas 2500 vezes de HA com talco na concentração de 0,07 g/L. Em destaque, comprimentos de possíveis flocos de talco....	63
Figura 29 - Espectro EDS mostrando os elementos identificados nas amostras de hidroxiapatita pura.	63
Figura 30 - Espectro EDS mostrando os elementos identificados nas amostras de hidroxiapatita com talco na concentração de 0,07 g/L	64
Figura 31 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA pura. Em destaque, trincas presentes na amostra.	65

Figura 32 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA com nanocamadas de talco na concentração de 0,90 g/L.	65
Figura 33 - Espectro EDS mostrando os elementos identificados nas amostras de hidroxiapatita com incorporação de nanocamadas de talco na concentração de 0,90 g/L.	66
Figura 34 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA com nanocamadas de talco com concentração 1,80 g/L de estrutura irregular e rugosa. Trincas em destaque na imagem.	67
Figura 35 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA com nanocamadas de talco com concentração 1,80 g/L de estrutura variante entre irregular/ rugosa e a compacta/ rugosa. Em destaque na imagem: trincas (em vermelho) e um possível floco de talco (em azul).	67
Figura 36 - Micrografia ao MEV ampliada 2500 vezes de HA com nanocamadas de talco na concentração de 1,80 g/L. Em destaque, possíveis flocos de talco.	69
Figura 37 - Imagem ao MEV da espessura do depósito de HA+talco esfoliado na concentração de 1,80 g/L.....	70
Figura 38 – Espectro de DRX das amostras de hidroxiapatita pura.....	71
Figura 39 - Espectro de DRX das amostras de talco em pó da pedra-sabão.	71
Figura 40 - Coeficiente de atrito da hidroxiapatita pura (curva preta) e do substrato de titânio (curva vermelha) em função do tempo (em segundos).	73
Figura 41 - Imagem ao MEV da trilha de desgaste de: (a) Ti; (b) HA.....	74
Figura 42 - (a) Imagem ao MEV da HA; (b) EDS da HA.....	75
Figura 43 - Coeficiente de atrito em função do tempo dos filmes de hidroxiapatita pura (curva preta) e de HA com incorporação de talco nas concentrações: 0,90 g/L (curva verde), 1,80 g/L (curva vermelha) e 0,07 g/L (curva azul).	76
Figura 44 - Imagens ao MEV das trilhas de desgaste dos filmes de HA com diferentes concentrações de talco, sendo: (a) 0,07 g/L de talco não-esfoliado; (b) 0,90 g/L de talco esfoliado e (c) 1,80 g/L de talco esfoliado.....	78
Figura 45 - Análise EDS da trilha de desgaste da Figura 44 (c) composta por HA com incorporação de talco esfoliado na concentração de 1,80 g/L.....	79
Figura 46 - Curvas de polarização das amostras de Ti puro (curva preta) e HA pura com os seguintes parâmetros: solução de 5×10^{-3} M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 3×10^{-3} M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 2% H_2O_2 , 15 minutos de eletrodeposição e pH= 4,62 (curva vermelha).	80
Figura 47 - Curvas de polarização das amostras de HA pura (curva vermelha), HA com incorporação de talco não-esfoliado na concentração 0,07 g/L (curva verde), HA com	

nanocamadas de talco nas concentrações 0,90 g/L (curva azul) e 1,80 g/L (curva preta).
..... 81

Figura 48 - Viabilidade celular de osteoblastos das amostras de controle (em branco), de titânio (em preto), de HA pura (em azul) e de HA + talco nas concentrações 1,80 g/L (em vermelho) e 0,90 g/L (em verde). A concentração de talco não esfoliado igual a 0,07 g/L também é apresentada em amarelo. Períodos de incubação: 3 dias e 7 dias. 82

Figura 49 - Atividade de ALP das amostras de controle (em branco), de titânio (em preto), de HA pura (em azul) e de HA + talco nas concentrações 1,80 g/L (em vermelho) e 0,90 g/L (em verde). A concentração de talco não esfoliado igual a 0,07 g/L também é apresentada em amarelo. Períodos de incubação: 3 dias e 7 dias..... 83

Figura 50 - Curva de força da HA pura (em preto) e da HA com incorporação de nanocamadas de pó de talco na concentração 0,90 g/L (em vermelho). 85

Figura 51 - Imagens de adesão obtidas no modo *PeakForce* QNM, sendo: (a) HA pura; (b) HA com incorporação de nanocamadas de talco na concentração 0,90 g/L..... 86

Figura 52 - Imagens de deformação obtidas no modo *PeakForce* QNM, sendo: (a) HA pura; (b) HA com incorporação de nanocamadas de talco na concentração 0,90 g/L. .. 86

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição química do Ti puro [3]......	22
Tabela 2 - Valores médios das propriedades mecânicas de metais tipicamente utilizados em implantes [9], [6].	23
Tabela 3 - Parâmetros dos ensaios de desgaste.	51
Tabela 4 - Parâmetros da esfoliação em fase líquida do talco (em pó ou em flocos).....	55
Tabela 5 - Diferentes concentrações de talco.	58

Sumário

1. Introdução.....	19
1.1 Objetivos.....	21
1.1.1 Objetivo geral.....	21
1.1.2 Objetivos específicos.....	21
2. Revisão Bibliográfica.....	22
2.1 Titânio.....	22
2.2 Hidroxiapatita.....	24
2.3 Talco.....	26
2.4 Esfoliação em fase líquida.....	28
2.5 Eletrodeposição.....	30
2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e EDS (<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>).....	33
2.7 Difração de Raios X (DRX).....	34
2.8 Ensaio de desgaste.....	37
2.9 Polarização Potenciodinâmica.....	39
2.10 Ensaio de biocompatibilidade.....	42
2.11 Espectroscopia de força.....	42
3. Materiais e métodos.....	46
3.1 Preparação dos substratos.....	47
3.2 Procedimento para Eletrodeposição.....	47
3.2.1 Solução eletrolítica.....	48
3.3 Procedimento para esfoliação do talco em fase líquida.....	49
3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e EDS (<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>).....	50
3.5 Difração de Raios X (DRX).....	50
3.6 Ensaio de desgaste.....	51
3.7 Polarização potenciodinâmica.....	51
3.8 Ensaio de biocompatibilidade.....	53
3.8.1 Extração de osteoblastos primários.....	53
3.8.2 Atividade da Fosfatase Alcalina.....	54
3.8.3 Cultura de Osteoblastos primários sobre os revestimentos.....	54
3.8.4 Viabilidade celular.....	54

4. Resultados e discussões.....	55
4.1 Esfoliação em fase líquida	55
4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	60
4.3 Difração de Raios X (DRX).....	70
4.4 Ensaio de desgaste.....	72
4.5 Polarização potenciodinâmica	79
4.6 Ensaio de biocompatibilidade	82
4.7 Espectroscopia de Força	84
5. Conclusões	88
Referências Bibliográficas.....	90

1. Introdução

Doenças musculoesqueléticas tais como artrite, osteoporose, fratura óssea, tumor ósseo, dor nas costas e outros distúrbios da coluna afetam centenas de milhões de pessoas em todo o mundo, de tal forma que os anos 2000-2010 foram considerados globalmente como a “Década do Osso e da Articulação” [1]. Desse modo, existe a crescente necessidade de desenvolvimento de biomateriais para suplantiar esse problema [2]. Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias (por exceção de drogas), sintéticas ou de origem natural, que podem ser usadas por qualquer período de tempo, como um todo ou como parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo [3].

A utilização de biomateriais em próteses ortopédicas teve início em 1912, quando a primeira liga metálica foi desenvolvida especificamente para utilização em seres humanos: o aço vanádio, o qual foi usado para fabricar placas de fratura óssea (placas Sherman) e parafusos [3]. Desde então, alguns materiais tais como o titânio e suas ligas, o aço inoxidável e as ligas de cobalto-cromo têm sido utilizados como próteses ortopédicas por possuírem propriedades mecânicas próximas às encontradas nos ossos [4].

Entre os materiais citados, destaca-se o titânio e suas ligas. Devido às propriedades como baixa densidade ($\rho = 4,5 \text{ g/cm}^3$) - que garante mobilidade das articulações do corpo humano, biocompatibilidade, resistência à corrosão, baixa toxicidade e módulo de elasticidade (E) próximo ao módulo de elasticidade do osso no corpo humano quando comparado à outros biometais ($E_{\text{osso}} = 20 \text{ GPa}$ e $E_{\text{Ti}} = 105 \text{ GPa}$, aproximadamente), o titânio e suas ligas são cada vez mais utilizados em próteses ortopédicas [3], [5], [6].

Porém, a desvantagem na utilização do titânio como biomaterial se refere à ligação química fraca que ele forma com os ossos no corpo [7]. Além disso, o filme de óxido formado na superfície do titânio e responsável pela sua alta resistência à corrosão pode ser prejudicado quando submetido à tensões mecânicas, o que causa uma corrosão mais acelerada do material [5]. Por isso, faz-se necessária a pesquisa na área de revestimentos bioativos-inertes para utilização em próteses metálicas para encontrar materiais com maior bioatividade, ou seja, materiais capazes de induzir uma atividade biológica específica no corpo humano [1], [7].

Dentre esses materiais, destaca-se a hidroxiapatita (HA) devido à sua alta biocompatibilidade, osteocondutividade e semelhança química com o tecido ósseo do corpo humano [8]. Define-se biocompatibilidade como sendo a capacidade de um biomaterial ser aceito e interagir como o tecido circundante, já a osteocondutividade se refere à propriedade de um material facilitar a formação de uma nova estrutura óssea [1], [9].

Entre os métodos de deposição de HA, tais como pulverização por plasma, sol-gel e deposição eletroforética, a eletrodeposição pulsada é a técnica utilizada que resulta em revestimentos mais uniformes e cristalinos de hidroxiapatita [10], [11]. No processo de eletrodeposição pulsada, pulsos de corrente ou tensão são aplicados à célula eletroquímica e há formação de depósitos devido às reações eletroquímicas que ocorrem na interface eletrodo-eletrólito [12].

No entanto, apesar das vantagens citadas, existem alguns problemas com os revestimentos de hidroxiapatita utilizados em implantes uma vez que a HA é uma cerâmica e, como tal, é um material frágil e de baixa resistência ao impacto [8]. Assim, uma das abordagens usadas para melhorar as propriedades mecânicas da hidroxiapatita é a incorporação de um segundo material na matriz de HA tal como TiO_2 , ZrO_2 , nanotubos de carbono e óxido de grafeno [5]. Para este trabalho, o material de incorporação testado é o talco.

O talco, principal componente da pedra-sabão, é um mineral amplamente utilizado como matéria-prima na fabricação de tintas, papéis, cosméticos e produtos farmacêuticos sendo, ainda, um material bidimensional (2D) [13], [14], [15], [16]. Pesquisas recentes demonstraram que o talco é um nanomaterial com propriedades mecânicas próximas às do grafeno, tais como baixa energia de ligação entre camadas e alta resistência à ruptura [15].

Para estudar ou utilizar nanomateriais bidimensionais, a técnica mais utilizada é a esfoliação mecânica. Porém, com o progresso na área de materiais 2D, tornou-se necessário utilizar processos mais escalonáveis. Nesse contexto, a esfoliação em fase líquida se tornou um método importante para a produção de grandes quantidades de nanomateriais, uma vez que é um método versátil e capaz de produzir dezenas de materiais 2D em uma variedade de líquidos [17].

Este trabalho propõe a eletrodeposição pulsada de hidroxiapatita em substrato de titânio com incorporação de nanocamadas de talco obtidas pelo método de esfoliação em fase líquida. Pretende-se obter uma melhora nas propriedades dos revestimentos de HA pela incorporação das nanocamadas de talco, o qual foi selecionado como material de reforço.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver e aprimorar revestimentos de hidroxiapatita com incorporação de nanocamadas de talco destinados a implantes metálicos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Produzir revestimentos de hidroxiapatita sobre substrato de titânio com propriedades mecânicas adequadas a implantes sujeitos à fadiga;
- Produzir nanocamadas de talco a partir da esfoliação em fase líquida;
- Incorporar nanocamadas de talco como reforço à hidroxiapatita;
- Caracterizar os filmes depositados quanto à sua morfologia, resistência à corrosão, resistência ao desgaste, adesão e biocompatibilidade.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Titânio

Devido às propriedades tais como baixa densidade, biocompatibilidade, resistência à corrosão, baixa toxicidade e módulo de elasticidade mais próximo ao do osso humano (se comparado aos outros biometais), o titânio e suas ligas têm sido extensamente utilizados para reconstrução e ancoragem óssea nos ramos ortopédicos e odontológicos desde a década de 1930 [3], [5], [18].

O titânio é um material alotrópico, apresentando estrutura hexagonal compacta (HC) para temperaturas até 882°C e cúbica de corpo centrado (CCC) para temperaturas superiores [3]. Esses dois arranjos cristalinos são comumente chamados de fase alfa (α) e beta (β). A fase α se refere à estrutura cristalina HC e a β , ao arranjo CCC [19].

O Ti comercializado como puro apresenta estrutura α e possui, na realidade, grau de pureza em torno de 98 a 99,5% e é classificado em quatro graus distintos, sendo eles grau 1, 2, 3 e 4. A diferença entre os quatro tipos de titânio se deve à quantidade de impurezas apresentada por cada grau [3], [9], [19]. A Tabela 1 apresenta a variação de tais impurezas presentes do titânio de acordo com o grau do mesmo.

Tabela 1 – Composição química do Ti puro [3].

Elemento	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Nitrogênio	0,03	0,03	0,05	0,05
Carbono	0,10	0,10	0,10	0,10
Hidrogênio	0,015	0,015	0,015	0,015
Ferro	0,20	0,30	0,30	0,50
Oxigênio	0,18	0,25	0,35	0,40
Titânio	Balanço			

Entre os tipos de titânio comercializados como puros, Ti de grau 1 possui a maior resistência à corrosão, ductilidade e a menor resistência à tração, enquanto Ti de grau 4 apresenta a menor ductilidade e a maior resistência à tração [20]. A Tabela 2 compara as propriedades mecânicas médias do Ti comercialmente puro com o aço inoxidável e a liga

de cobalto-cromo (Co-Cr), ligas metálicas também utilizadas como biomateriais em implantes.

Tabela 2 - Valores médios das propriedades mecânicas de metais tipicamente utilizados em implantes [9], [6].

Biometal	Módulo de elasticidade (GPa)	Resistência à tração (MPa)	Resistência à compressão (MPa)	Limite de resistência à fadiga (MPa)
Titânio	105	485	760	300
Aço inoxidável	190	221	483	221-280
Liga Co-Cr	210	448-517	655-889	207-310

Como pode-se observar pela Tabela 2, entre os biometais mais utilizados, o titânio é o que possui o módulo de elasticidade mais aproximado do módulo de elasticidade do osso no corpo humano (cerca de 20 GPa) [7]. Além disso, percebe-se também que a resistência à tração, à compressão e o limite de resistência à fadiga da liga Co-Cr podem ultrapassar os valores encontrados de tais propriedades para o titânio. Porém, quando dividido pela densidade, o titânio apresenta valores superiores para as propriedades mecânicas citadas na Tabela 2, uma vez que $\rho = 4,5 \text{ g/cm}^3$ para o Ti e $\rho = 8,8 \text{ g/cm}^3$ para a liga Co-Cr, aproximadamente [3], [21].

A alta resistência à corrosão do Ti *in vivo* se deve à formação de uma camada sólida e compacta de dióxido de titânio (TiO_2) na superfície do mesmo, com espessura de aproximadamente 10 nm. Além do revestimento de TiO_2 , o titânio implantado no corpo humano é recoberto por um fluido biológico composto por água, íons dissolvidos e biomoléculas (proteínas cercadas por moléculas de água), como mostrado na Figura 1 [3].

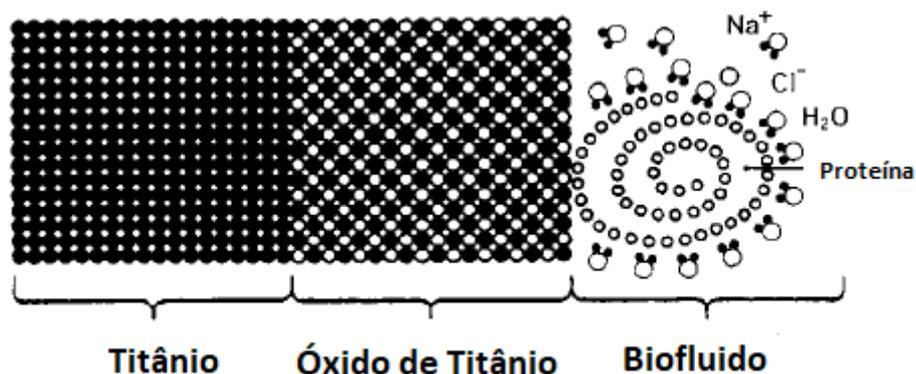


Figura 1 - Interface entre o implante de titânio e o biofluido [3].

Durante os primeiros segundos após a implantação do Ti no corpo humano, sua superfície será composta pelos elementos representados na Figura 1, ou seja, água, íons dissolvidos, biomoléculas e a camada de TiO_2 . Devido ao processo inflamatório e de cicatrização, a composição do biofluido se modificará e, eventualmente, células e tecidos se aproximarão da superfície do biomaterial [3].

Porém, a utilização do Ti como biomaterial apresenta algumas desvantagens, sendo elas a ligação química fraca que o titânio forma com os ossos no corpo e a baixa osteoindução, sendo a mesma definida como a capacidade do biomaterial induzir a formação de tecido ósseo [1], [7], [18]. Além disso, o filme de TiO_2 formado na superfície do Ti é prejudicado quando o mesmo é submetido à tensões mecânicas, o que causa um aumento da corrosão do material [5].

Assim, revestimentos de hidroxiapatita (HA) são utilizados em implantes metálicos a fim de se obter propriedades biológicas mais promissoras para aplicações na ortopedia e odontologia [5]. Pesquisas precedentes demonstraram que implantes metálicos de titânio revestidos com HA favoreceram a proliferação e adesão celular, induzindo o crescimento de osteoblastos, responsáveis pela mineralização da matriz óssea [1], [10], [22].

2.2 Hidroxiapatita

Entre as cerâmicas utilizadas como biomateriais, ou seja, as biocerâmicas, os fosfatos de cálcio são uns dos materiais mais utilizados na indústria ortopédica e odontológica devido à sua versatilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e composição semelhante ao tecido ósseo [1], [23]. Os fosfatos de cálcio incluem uma ampla variedade de compostos com diferentes razões estequiométricas entre os elementos cálcio e fósforo (Ca/P) [24]. Estudos prévios demonstraram que, entre os fosfatos de cálcio a hidroxiapatita, Ca/P = 1,67, é a fase mais estável e biocompatível com os ossos e que quanto maior o grau de pureza da HA, maior estabilidade no processo de cicatrização do tecido ósseo [5], [25], [26].

Além da relação estequiométrica citada, a hidroxiapatita também é encontrada com outros valores de Ca/P: quando a razão Ca/P é menor que a razão estequiométrica, a hidroxiapatita é considerada como deficiente em cálcio ao passo que, para valores Ca/P

iguais ou maiores que 2,0, é possível encontrar a fase CaO em meio à matriz de HA [27], [28].

A hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é conhecida nos campos ortopédicos e odontológicos como um material de alto potencial para substituição óssea devido à sua biocompatibilidade, osteocondutividade e semelhança química com a matriz inorgânica dos ossos [1], [29]. O tecido ósseo é constituído por três componentes:

- i) a matriz orgânica, composta principalmente por colágeno e representando aproximadamente 22% da constituição óssea;
- ii) água, compondo cerca de 9% do tecido;
- iii) a matriz inorgânica, que corresponde à 69% do osso e é formada por HA dopada com pequenas quantidades de íons Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} - SO_4^{2-} [1], [29].

Além de substituto ósseo, a hidroxiapatita também é utilizada como um material “carregador de drogas”, uma vez que a HA é capaz de incorporar, reter, degradar e entregar agentes terapêuticos (tais como antibióticos, anti-inflamatórios e anticancerígenos) até os tecidos ósseos [1].

A hidroxiapatita pode se cristalizar no sistema hexagonal ou monoclinico. A forma hexagonal da HA apresenta estrutura mais regular, com parâmetros de rede $a = b = 9,423 \text{ \AA}$, $c = 6,885 \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$ e grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$. Já no sistema cristalino monoclinico, a hidroxiapatita possui maior estabilidade termodinâmica e parâmetros de rede $a = 9,421 \text{ \AA}$, $b = 2a$, $c = 6,8814 \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$, com simetria $\text{P2}_1/\text{b}$ [24], [30]. Porém, como descrito por Espanol e colaboradores [31] e Morgan e colaboradores [30] a hidroxiapatita comumente encontrada nos sistemas biológicos possui estrutura hexagonal e a HA monoclinica só é alcançada em processos que possuem alta temperatura (em torno de 900°C). Em vista do descrito anteriormente, a Figura 2 representa a célula unitária da hidroxiapatita hexagonal.

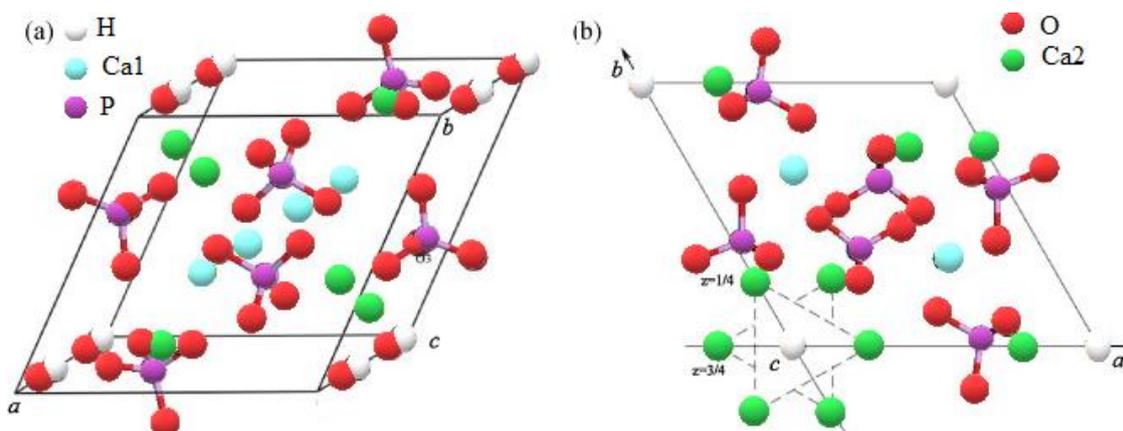


Figura 2 - Célula unitária da HA hexagonal: (a) vista lateral; (b) vista superior [27].

Na célula unitária da Figura 2, esferas vermelhas, roxas e brancas representam átomos de oxigênio, fósforo e hidrogênio, respectivamente. Os íons de cálcio situam-se em dois sítios diferentes, denotados como Ca1 (esferas azuis) e Ca2 (esferas verdes) sendo que Ca1 é coordenado à nove átomos de oxigênio e seis grupos fosfato, enquanto Ca2 é coordenado à seis átomos de oxigênio e cinco grupos fosfato [27].

Apesar das vantagens na utilização da hidroxiapatita como biomaterial, a HA apresenta certas propriedades que limitam seu uso irrestrito para fins ortopédicos e dentários, sendo elas a baixa tenacidade, a fragilidade e a baixa resistência mecânica [1]. Assim, a incorporação de um segundo material à matriz de hidroxiapatita (tal como TiO_2 , ZrO_2 , nanotubos de carbono e óxido de grafeno) se apresenta como uma alternativa para melhorar as características mecânicas da HA [5].

2.3 Talco

O mineral talco, principal componente da rocha esteatito (conhecida popularmente como pedra-sabão), é um filossilicato de magnésio hidratado de composição química $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ sendo, portanto, um silicato com estrutura em forma de folhas. Quando puro, o talco é encontrado em forma de placas ou lâminas, podendo ainda ser fibroso ou granular [31].

Devido às propriedades como untosidade ao tato, poder lubrificante e adsorvente de óleos e gorduras e hidrofobicidade natural, o talco é amplamente utilizado na indústria cerâmica e como matéria-prima para fabricação de tintas, papéis, cosméticos e produtos

farmacêuticos [15]. Além disso, existem outras características do talco que o faz atraente para utilização industrial, são elas: inércia química, brilho intenso, baixa condutividade elétrica e térmica, aplicação como material de carga e alta resistência ao choque térmico [31].

De estrutura monoclinica, o talco é formado pela superposição de duas folhas tetraédricas (t) envolvendo uma folha octaédrica (o), compondo uma estrutura “tipo sanduíche” ou “t-o-t”, como demonstrado na Figura 3 [31].

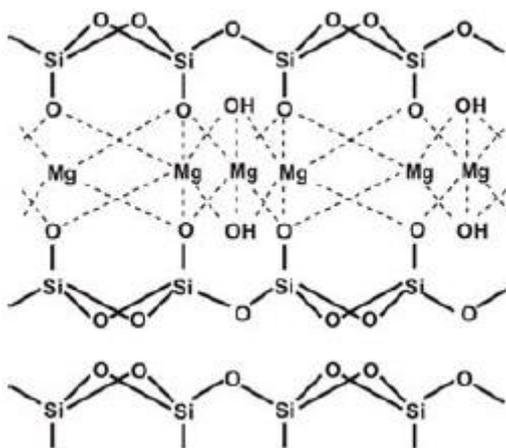


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura "tipo sanduíche" do talco [32].

Os tetraedros da Figura 3 são formados por átomos de silício e oxigênio, compondo a folha siloxana, a qual compartilha três oxigênios com tetraedros vizinhos. Já os sítios octaédricos são compostos por átomos de magnésio e hidroxila e formam a folha de brucita, em que o magnésio se encontra no centro do octaedro enquanto os vértices são ocupados pelas hidroxilas [31], [33].

As ligações de van der Waals entre as lamelas de talco podem ser facilmente superadas pelo cisalhamento, fazendo com que as camadas de brucita e siloxana deslizem umas sobre as outras, garantindo ao mineral propriedades mecânicas como baixa resistência ao cisalhamento e a menor dureza da escala de Mohs (valor absoluto igual a 1) [34], [35]. Porém, quando esfoliado, o talco apresenta características como alta resistência à ruptura, rigidez moderada e compressibilidade dinâmica negativa, sendo a mesma definida como uma expansão vertical, ou enrugamento, das camadas de um material submetido simultaneamente à forças de compressão e cisalhamento [15], [36].

Além das propriedades descritas, estudos recentes demonstraram que a incorporação de nanocamadas de talco à uma matriz polimérica resultou em melhorias na resistência mecânica do polímero poliamida. Assim, o talco foi descoberto como sendo um material passível de esfoliação, possuindo propriedades mecânicas similares às encontradas nos demais materiais bidimensionais, como o grafeno, h-BN e MoS₂ [15].

2.4 Esfoliação em fase líquida

O processo de esfoliação se refere à técnica capaz de quebrar as ligações de *van der Waals* entre as lamelas de estruturas bidimensionais (2D) [37]. Para tanto, um dos métodos utilizados é a esfoliação mecânica, em que uma fita adesiva é usada para alcançar nanocamadas de materiais 2D [17]. Porém, a desvantagem desse tipo de esfoliação é o baixo rendimento da mesma. Assim, a esfoliação líquida se apresenta como uma alternativa para produção de maiores quantidades de nanomateriais [38].

A esfoliação líquida é um processo composto por três etapas. Em um primeiro momento, a fraca atração entre as lamelas do material deve ser superada pela energia transmitida pelo processo de esfoliação. Em seguida, as nanocamadas devem ser estabilizadas por solventes apropriados, a fim de evitar reagregação das mesmas. Por último, dependendo da aplicação, pode-se aplicar um método para seleção de dimensões das camadas esfoliadas [17]. Uma das estratégias mais recentes para esfoliação líquida é colocar o material em um solvente apropriado e expor a solução a ondas ultrassônicas [37], [38], [39], como esquematizado pela Figura 4.

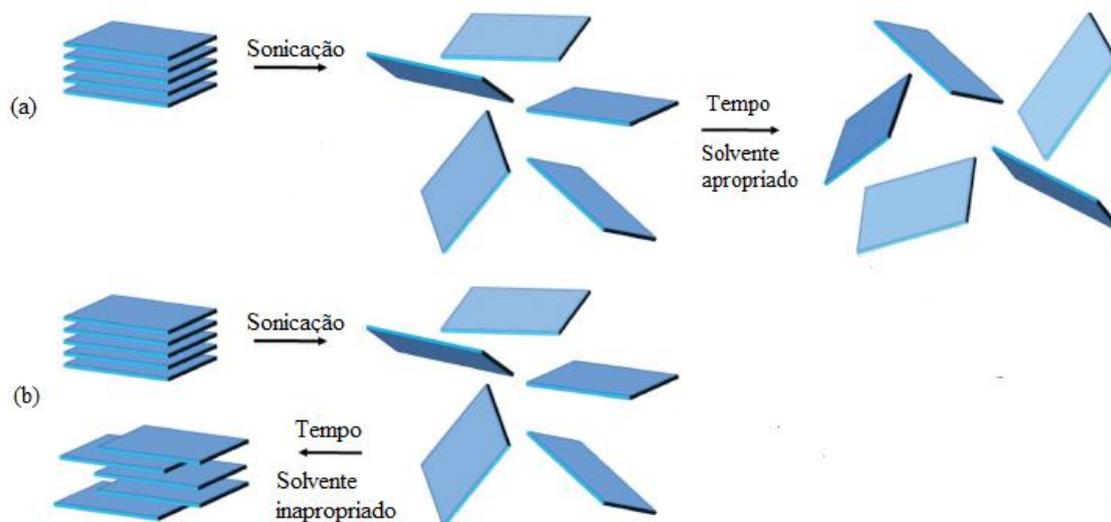


Figura 4 - Representação esquemática da esfoliação líquida a partir da exposição do material 2D à ondas ultrassônicas, sendo (a) material esfoliado e (b) reagregação das lamelas devido à escolha inadequada do solvente [38].

Estudos prévios demonstraram que, caso a energia de superfície do solvente e do material bidimensional sejam similares, a diferença de energia entre o estado esfoliado e reagregado será pequena, removendo a força de atração entre as camadas e, desse modo, impedindo a sua reagregação [37], [38]. A reagregação das lamelas e o material final esfoliado estão representados na Figura 4 como condição (b) e (a), respectivamente. N-metil-2-pirrolidona (NMP), dimetilformamida (DMF) e álcool isopropílico (IPA), são alguns exemplos de solventes típicos que geram dispersões estáveis [17].

Além do solvente selecionado, a eficiência do processo de esfoliação depende da correta escolha de alguns parâmetros, sendo eles: as dimensões da estrutura inicial e o tempo de sonicação. O tempo de sonicação depende do tipo de material que se deseja esfoliar, do solvente utilizado e da finalidade do processo, variando de 30 minutos até 168 horas. Tempos longos produzem concentrações mais elevadas de material esfoliado, porém, induzem defeitos de bordas e arestas nas nanolamelas. Quanto ao tamanho, sabe-se que quanto maior as dimensões da partícula inicial, menor será a concentração de nanocamadas esfoliadas [37]. Coleman e colaboradores [17] apontam também a concentração da solução (solvente mais material 2D) como importante variável no processo de esfoliação.

Após a sonicação, pode-se realizar a centrifugação da solução a fim de remover material não esfoliado e/ou selecionar as dimensões das nanocamadas, uma vez que a maior parte

do material disperso é composto por nanocamadas de diferentes dimensões [17], [40]. Assim, devido ao processo de centrifugação, as partículas de maiores dimensões se encontrarão na parte inferior da solução e o sobrenadante ocupará a parte superior do frasco de amostra podendo, então, ser recolhida e analisada [41].

2.5 Eletrodeposição

A eletrodeposição se refere ao processo de formação de um depósito sólido na superfície de um material condutivo a partir de reações eletroquímicas. Tais reações podem ser classificadas como redutoras (deposição catódica), em que a transferência de elétrons ocorre do eletrodo de trabalho para o eletrólito, ou oxidantes (deposição anódica), onde o fluxo de elétrons se dá do eletrólito para o eletrodo de trabalho [12], [42].

Eletrodepósitos são formados pela ação de uma corrente elétrica fluindo através de uma célula eletroquímica, a qual consiste em um dispositivo formado por dois eletrodos condutivos ou semi-condutivos imersos em um eletrólito. Os eletrodos são chamados de eletrodo de trabalho, referindo-se ao material onde o revestimento será depositado, e contra-eletrodo, necessário como material a ser corroído ou simplesmente para fechar o circuito elétrico da célula [42], [43]. Além disso, pode-se utilizar um terceiro componente na célula eletroquímica, chamado de eletrodo de referência, o qual é utilizado como ponto de referência para controle e medida do potencial aplicado na célula possuindo, para isso, um potencial estável e conhecido [44]. Geralmente, os eletrólitos (ou solução eletrolítica) utilizados na eletrodeposição são compostos por sais dissolvidos em soluções aquosas contendo íons positivos e negativos [42]. A Figura 5 ilustra uma célula eletroquímica composta por três eletrodos e o potenciostato.

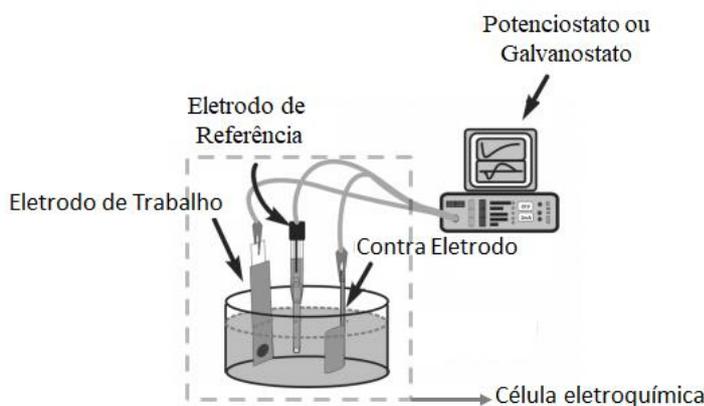


Figura 5 - Ilustração de uma célula eletroquímica de três eletrodos e o potenciostato/galvanostato [45].

Como demonstrado na Figura 5, a célula eletrolítica é conectada a um aparato eletrônico, sendo esse o galvanostato ou potenciostato [45]. Na deposição galvanostática, a corrente que circula na célula eletroquímica é mantida fixa, enquanto que na eletrodeposição potenciostática, a variante fixada é o potencial da célula.

Além dessas técnicas de eletrodeposição, há também a deposição espontânea e a pulsada. Na eletrodeposição espontânea, não há necessidade de aplicação de tensão ou corrente à célula, uma vez que a deposição ocorre a partir de reações eletroquímicas espontâneas. Já na eletrodeposição pulsada, aplica-se pulsos de tensão ou corrente à célula eletroquímica de modo que o sinal aplicado à célula varie conforme uma onda quadrada [12], [42], como esquematizado na Figura 6.

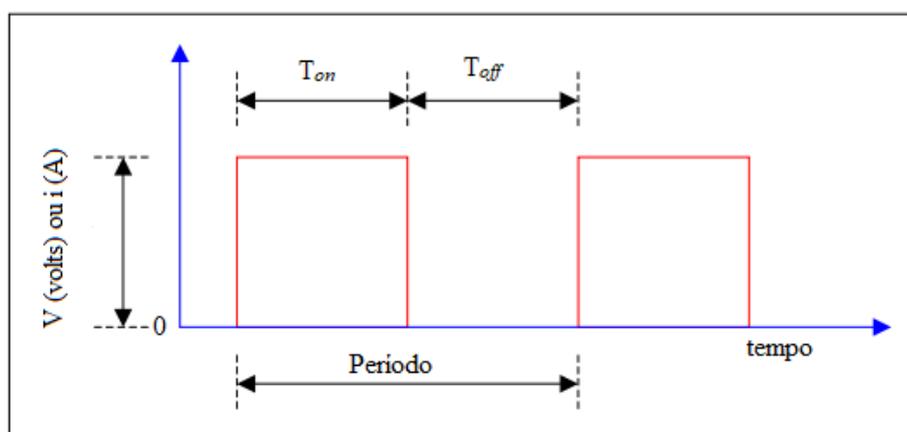
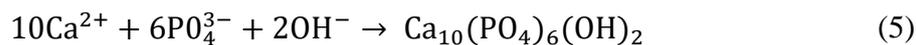
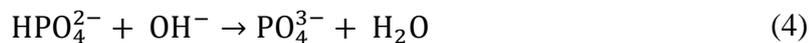
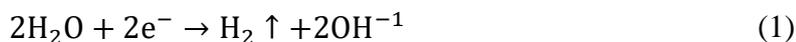


Figura 6 - Ilustração dos pulsos de corrente ou tensão aplicados à célula eletroquímica na eletrodeposição pulsada [46].

Na Figura 6, T_{on} (tempo *on*) se refere ao tempo durante o qual a corrente ou a tensão foram aplicadas à célula eletroquímica, T_{off} (tempo *off*) é o intervalo de tempo em que não há passagem de corrente ou potencial e o período é a soma do tempo *on* e *off* do potencial ou corrente aplicados no processo de eletrodeposição [46].

Entre as vantagens na sua utilização, destaca-se que o processo eletroquímico requer baixo investimento em equipamentos, pode ser utilizado como método para revestir superfícies irregulares, não utiliza altas temperaturas ou sistema de vácuo. Além disso, é uma técnica rápida para formação de depósitos e os conhecimentos científicos e tecnológicos necessários para sua aplicação estão bem desenvolvidos e disseminados nos campos científicos [43], [47].

Para formação da hidroxiapatita por eletrodeposição, as seguintes reações eletroquímicas ocorrem [48]:



O hidrogênio produzido na equação (1) gera bolhas próximas ao catodo. As equações (2) e (3) mostram a formação dos radicais hidroxila. Já as equações (3) e (4) apresentam a produção de íons hidrogenofosfato e fosfato. Simultaneamente à formação desses produtos, íons de cálcio se aproximam do catodo e reagem com grupos fosfato e radicais hidroxila para gerar HA (equação (5)) [48].

Apesar das vantagens na utilização da eletrodeposição, quando se trabalha com fosfatos de cálcio as bolhas de hidrogênio formadas na equação (1) podem se aderir ao substrato gerando, assim, depósitos pouco aderentes. Uma alternativa para solucionar tal problema é utilizar a eletrodeposição pulsada, a qual confere maior tempo para que: 1 - ocorra a eliminação das bolhas de hidrogênio quando aplicado o pulso *off*; 2 - os íons de cálcio e de fosfato da solução eletrolítica se difundam para o substrato, gerando condições mais favoráveis para o desenvolvimento de HA [11], [49]. Segundo Blackwood e Seah [49], a eletrodeposição pulsada é um método atrativo de deposição, uma vez que produz filmes mais contínuos e uniformes, com melhor aderência e propriedades mecânicas superiores.

Além da utilização da eletrodeposição pulsada, pode-se adicionar H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) aos eletrólitos para prevenir a formação de bolhas de hidrogênio a partir da reação:



Assim H_2O_2 , um forte reagente oxidativo, produzirá somente íons OH^- e restringirá a formação de bolhas de hidrogênio na superfície do substrato, como demonstrado pela equação (6).

2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*)

Na microscopia eletrônica de varredura, um feixe de elétrons de pequeno diâmetro é incidido sobre uma amostra [50], [51]. A interação entre o feixe incidente e a superfície analisada resulta na produção de imagens em alta ampliação e resolução, gerando informações com relação à composição, cristalografia e topografia da amostra medida [51]. A Figura 7 apresenta um esquema simplificado de um MEV.

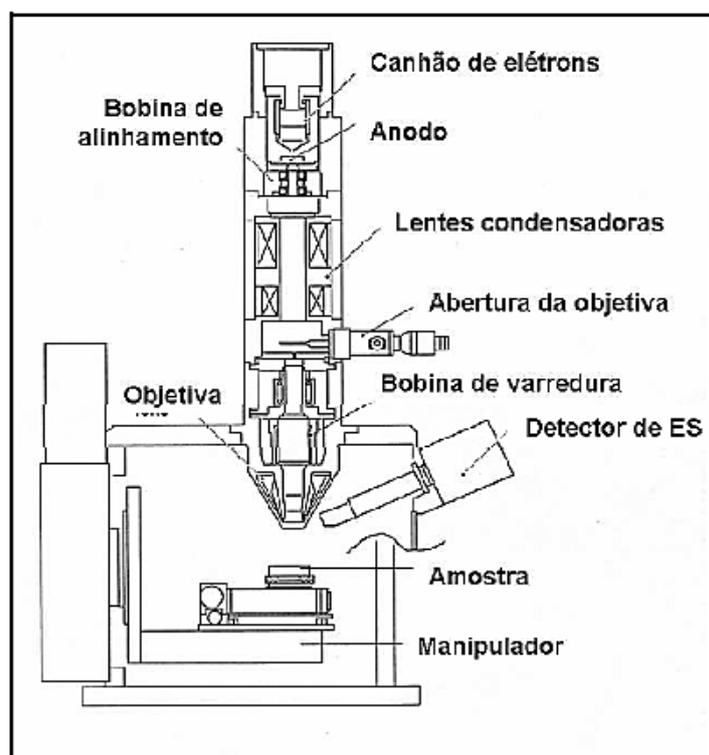


Figura 7 - Esquema simplificado dos constituintes de um MEV [51].

O canhão de elétrons mostrado na Figura 7 é responsável por acelerar os elétrons que incidem na amostra em uma faixa de 1-40 keV. Porém, o feixe de elétrons produzido pelo canhão convencional possui um diâmetro elevado impossibilitando, desse modo, a formação de uma imagem nítida em alta ampliação. Assim, as lentes condensadoras são utilizadas para reduzir o diâmetro dessa fonte de elétrons fazendo com que incida sobre a superfície analisada um pequeno feixe de elétrons focado na amostra [52]. A maioria dos equipamentos MEV utiliza um filamento de tungstênio (W) aquecido como fonte de elétrons [50].

Para produzir contraste em uma imagem, a intensidade do sinal da interação entre a amostra e o feixe deve ser medida ponto a ponto na superfície da amostra. Para tanto, existe um sistema de deflexão formado por bobinas de deflexão eletromagnética (bobinas de varredura) cuja função é varrer o feixe ao longo de uma linha e, em seguida, deslocar a posição da linha para a próxima varredura, de modo que uma varredura retangular seja gerada tanto na amostra quanto na tela de visualização da imagem [52].

As partículas resultantes da interação entre a amostra e o feixe de elétrons devem retornar à superfície da amostra para, assim, serem detectadas pelo detector do equipamento [50]. No MEV, os sinais mais importantes para a formação da imagem são os elétrons retroespalhados (ERE) e os secundários (ES) [51]. Os ERE são elétrons que sofreram numerosos eventos de espalhamento elástico que afetaram as trajetórias dos elétrons do feixe dentro da amostra sem alterar a energia cinética dos mesmos [52], [53]. ES são elétrons fracamente ligados aos elétrons da camada externa dos átomos da amostra, os quais receberam, durante a dispersão inelástica dos elétrons do feixe, energia cinética suficiente para serem ejetados de tal átomo. Os ES assim criados se propagam através do sólido, e alguns atravessam e escapam da superfície. ES são definidos com base em um valor arbitrário de energia cinética, ou seja, todos os elétrons emitidos da amostra com uma energia inferior a 50 eV, são considerados ES [52].

Além de formação de imagem, o MEV possibilita alinhar a análise microestrutural com a observação química, uma vez que é possível acoplar um detector de EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) no MEV a fim de identificar a emissão de raios X característicos [51], [52]. Com o EDS, os elétrons emitidos pelo canhão sofrem espalhamentos eletrônicos na superfície da amostra, emitindo fótons de raios X específicos dos elementos constituintes do material [51]. Os espectros obtidos relacionam a energia com a intensidade dos fótons detectados, determinando uma análise qualitativa ou semi-quantitativa da amostra, visto que diversos fatores podem influenciar a intensidade das linhas de raio X, como o número atômico dos elementos presentes, a absorção e fluorescência, a voltagem de aceleração e a abertura da objetiva, entre outros [50], [51].

2.7 Difração de Raios X (DRX)

Os raios X são radiações eletromagnéticas com pequenos comprimentos de onda e elevadas energias, tendo a ordem de grandeza dos espaçamentos atômicos dos sólidos

sendo, portanto, o tipo de radiação do espectro eletromagnético utilizado para caracterização de materiais cristalinos [54], [55].

Ao incidir sobre uma amostra um feixe de raios X com a mesma ordem de magnitude das distâncias atômicas do material, os raios X serão espalhados em todas as direções, gerando um padrão de interferência construtiva ou destrutiva. No caso da interferência construtiva, a radiação atinge planos cristalográficos adjacentes em ângulos específicos gerando, dessa forma, ondas espalhadas em fase - fenômeno este conhecido como difração [54], [55]. Caso contrário, ocorrerá a interferência destrutiva e, nesse caso, não haverá intensidade espalhada. A relação que demonstra a condição de difração é a Lei de Bragg (equação 2), a qual define que um número inteiro (n) de comprimentos de onda (λ) exprime a diferença de caminho entre os feixes de raios X adjacentes [55].

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (7)$$

sendo d a distância entre os planos cristalinos adjacentes (hkl) e θ , chamado de ângulo de Bragg, é o ângulo de incidência da radiação [54], [55]. A Figura 8 ilustra a Lei de Bragg.

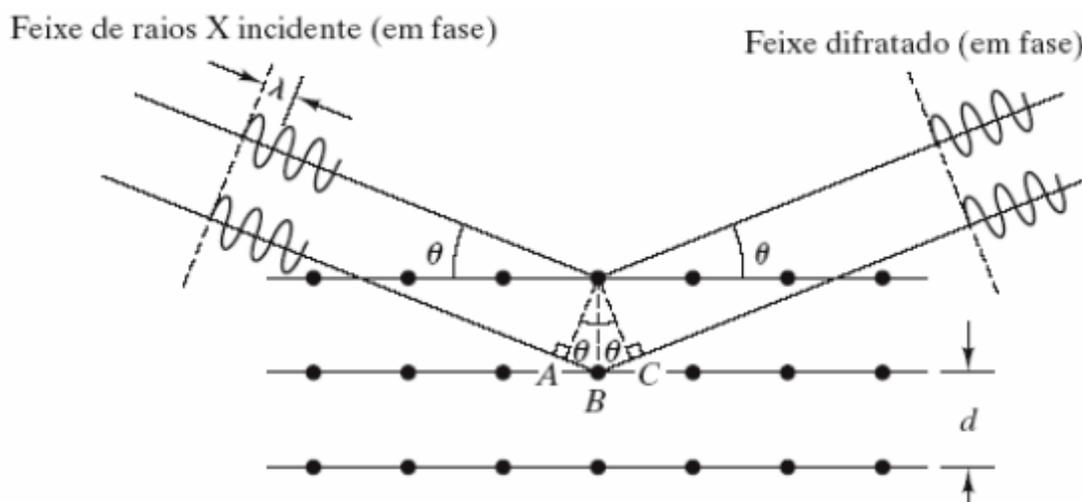


Figura 8 - Difração de raio X [54].

A Lei de Bragg é uma condição necessária, mas insuficiente para definir a ocorrência de difração em um material. Isso porque ela define as condições de difração para uma célula unitária primitiva, onde os átomos se encontram apenas nos vértices da célula. Quando a amostra apresenta célula unitária não-primitiva, os átomos localizados em locais

diferentes dos vértices (dentro de uma face, ou no interior da célula ou ao longo de uma aresta) atuam como centros adicionais de difração, podendo ocasionar interferência destrutiva. Como resultado, parte da difração descrita na Lei de Bragg não ocorrerá para materiais de estruturas cristalinas com células unitárias que não sejam primitivas [55].

Além de θ , mostrado na Figura 8, existe também o ângulo 2θ , conhecido como ângulo de difração, uma vez que é esse o ângulo medido experimentalmente [55], como ilustrado na Figura 9.

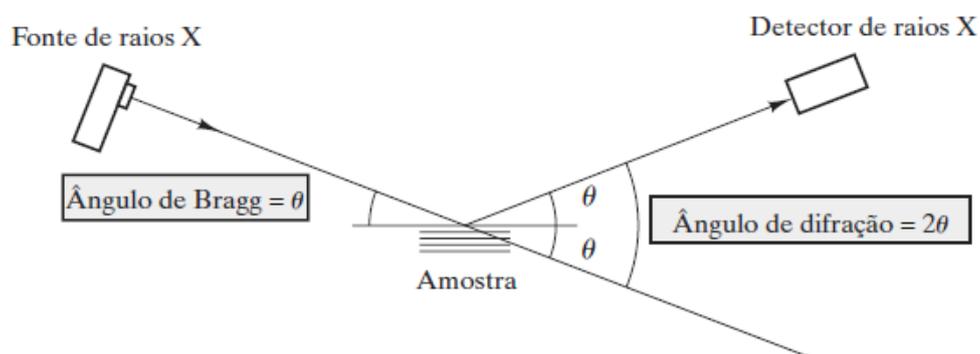


Figura 9 - Esquema simplificado de um difratômetro mostrando a relação entre o ângulo de Bragg e o ângulo de difração [55].

Além da relação entre os ângulos de Bragg e de difração, a Figura 9 apresenta um esquema simplificado do equipamento utilizado para detecção do feixe de raios X, o difratômetro [55]. Em um difratômetro, o detector é o componente responsável pela conversão dos fótons de raios X em pulsos de tensão, os quais serão contados e expressos na forma de picos com diferentes intensidades que se sobressaem da linha de base (*background*) no difratograma. Difratograma ou padrão difratométrico é o gráfico que relaciona o espectro de intensidade com o ângulo de difração dos elementos constituintes da amostra analisada [56]. Um exemplo de difratograma é dado na Figura 10.

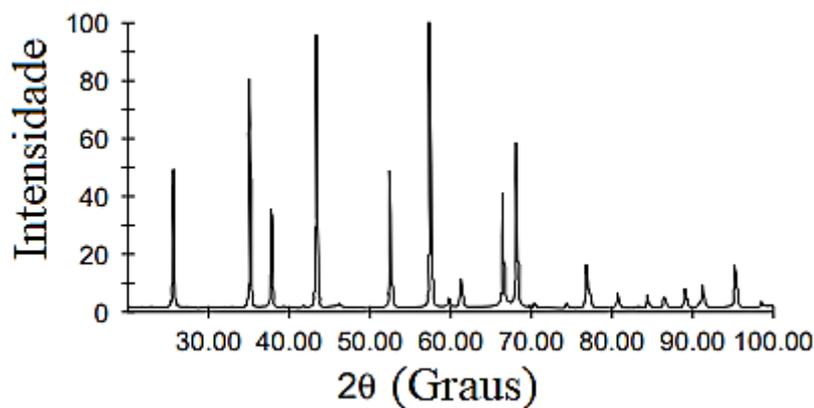


Figura 10 - Exemplo de um difratograma [57].

Os difratogramas obtidos pela técnica de DRX podem ser divididos em duas classes distintas, de acordo com os valores dos ângulos de difração. Para $2\theta < 15^\circ$, a difração é considerada de baixo ângulo. Para os demais valores, o padrão difratométrico possui alto ângulo [51], como é o caso do exemplo da Figura 10.

A identificação dos componentes cristalinos do material se dá por meio de comparação com padrões de difração encontrados em banco de dados tais como PDF (*Powder Diffraction File*) ou COD (*Crystallography Open Database*) [56], [58].

2.8 Ensaios de desgaste

Define-se desgaste como o dano progressivo de uma superfície causado pelo deslocamento ou remoção de material, podendo ocorrer inteiramente por fenômenos mecânicos ou pela associação do processo de corrosão química à ação mecânica [59], [60].

Os principais tipos de desgaste são o desgaste abrasivo, erosivo, corrosivo e a cavitação [61]. O desgaste abrasivo refere-se à deformações mecânicas causadas por partículas duras presentes em um corpo sólido ou entre duas superfícies; já no desgaste erosivo, as partículas duras se chocam contra a superfície de desgaste. O desgaste corrosivo ocorre quando uma superfície reage com o meio que se encontra, sendo que o fator de controle da taxa de desgaste é o crescimento da camada oxidada. Por último, tem-se o desgaste

por cavitação que ocorre em máquinas de fluido da seguinte forma: a vaporização do líquido em pontos de baixa pressão pode levar as bolhas formadas nesse processo até pontos de mais elevada pressão, onde tais bolhas se condensam e se colapsam ao entrarem em contato com a superfície da máquina, acarretando em uma perda de material nessas regiões de colapso [59], [61].

Os ensaios de desgaste investigam a degradação de determinado material, simulando em um tempo relativamente curto como este material se comportaria após longos períodos de utilização [61]. Os testes de desgaste são classificados em duas categorias: ensaios de desgaste fenomenológicos e operacionais. Os testes de desgaste fenomenológicos são ensaios que tendem a se concentrar em algum tipo geral ou amplo de situação de desgaste, como desgaste por erosão ou abrasão, enquanto que os testes de desgaste operacionais focam em aplicações ou situações específicas, tal como analisar a durabilidade de uma caixa de câmbio [59], [61]. O presente trabalho é baseado na perspectiva fenomenológica dos ensaios de desgaste.

Os tipos de testes fenomenológicos de desgaste são: ensaio de disco de borracha com areia, ensaio de erosão de partículas sólidas, ensaio de erosão por cavitação, ensaio de desgaste de quatro esferas, ensaio de desgaste bloco-disco e ensaio de desgaste pino-disco. Entre os vários testes fenomenológicos de desgaste, destaca-se o ensaio pino-disco, uma vez que este teste é aplicado em áreas reduzidas, tal como é necessário para este trabalho [61].

O ensaio de desgaste pino-disco é regido pela norma ASTM G99 (*American Society for Testing and Materials*) e consiste de um pino com ponta arredondada (cilíndrica ou esférica) e um disco plano dispostos perpendicularmente na horizontal ou na vertical, tendo como resultado do ensaio um risco circular no disco. Nesse tipo de ensaio, ocorre a rotação do disco ou a movimentação circular do pino, o qual é pressionado contra o disco devido à ação de um carregamento controlado aplicado por meio de um braço, alavanca, por um sistema hidráulico ou pneumático [62]. A Figura 11 ilustra este ensaio.

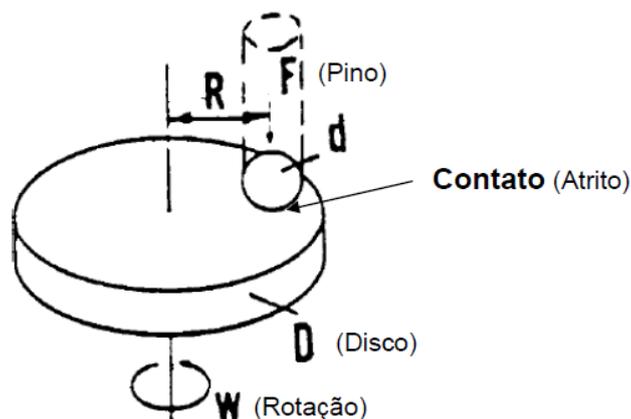


Figura 11 - Representação do ensaio pino-disco. Na imagem, W: rotação; D: espessura disco; d: diâmetro do pino; F: força normal aplicada no pino; R: raio do risco circular [62].

Embora este ensaio possa ser realizado na horizontal ou na vertical, deve-se especificar a direção utilizada, uma vez que os resultados podem ser diferentes. Isso porque, quando o disco se encontra na posição vertical, os resíduos de desgaste podem ser removidos do sistema por gravidade, enquanto na posição horizontal não há tal possibilidade [59].

Além da carga utilizada, outros parâmetros variáveis no teste de desgaste pino-disco são a velocidade, os tipos de materiais utilizados no pino e no disco e se o ensaio é feito com lubrificação ou em atmosfera controlada [59].

O teste de desgaste pino-disco pode ter um sistema acoplado de medição da força de atrito (como uma célula de carga) que permite determinar o coeficiente de atrito de forma direta [87]. Caso contrário, a determinação é realizada através da análise da perda de volume do pino (admitindo que o desgaste do disco seja insignificante) ou pela perda de volume do disco (assumindo como insignificante o desgaste do pino) [61], [62].

2.9 Polarização Potenciodinâmica

Quando um eletrodo metálico encontra-se fora do seu potencial de corrosão, diz-se que o mesmo está polarizado, sendo que o potencial de corrosão é estabelecido segundos depois da inserção do material numa solução eletrolítica de baixa resistividade elétrica [63], [64].

A polarização potenciodinâmica é a técnica responsável pela obtenção das curvas de polarização de um metal. Para tanto, o potencial é varrido a uma taxa constante, iniciando-

se no potencial menor ou igual ao potencial de corrosão. Os parâmetros que influenciam a forma das curvas são a composição da solução, a temperatura e a velocidade de varredura do ensaio e o tempo de imersão do material na solução antes do início da varredura do potencial. Nas curvas de polarização, costuma-se dividir a corrente pela área do metal exposto à solução, de modo a se trabalhar com o conceito de densidade de corrente [64].

O adequado controle do potencial aplicado ao metal é conseguido através da utilização de um potenciostato, o qual possibilita impor o potencial desejado ao eletrodo, medir e registrar a corrente gerada [64]. A Figura 12 esquematiza o sistema para obtenção das curvas de polarização, incluindo um potenciostato, um registrador, um eletrodo de trabalho (ET), um contra-eleto-rodo (CE) e um eletrodo de referência (ER).

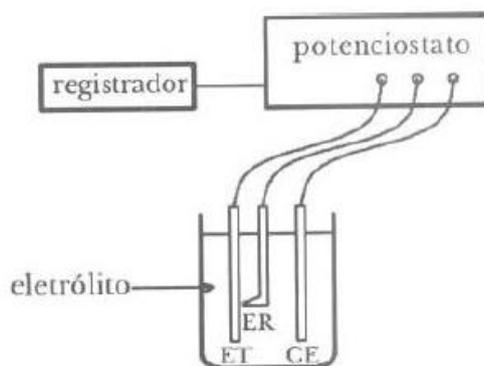


Figura 12 - Sistema utilizado para obtenção das curvas de polarização, sendo ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência e CE: contra-eleto-rodo [64].

Utilizando um potenciostato, como o representado na Figura 12, é possível manter uma diferença de potencial constante entre o eletrodo de trabalho e o contra-eleto-rodo, o qual é constituído por um material inerte sendo, normalmente, platina ou grafite. O terceiro eletrodo, chamado de eletrodo de referência, permite a leitura do potencial do eletrodo de trabalho. Assim, com os potenciais e correntes registradas no potenciostato, é possível avaliar o comportamento eletroquímico de materiais no que se refere à sua corrosão [65].

Na Figura 13, apresenta-se uma típica curva de polarização de um aço inoxidável em meio ácido.

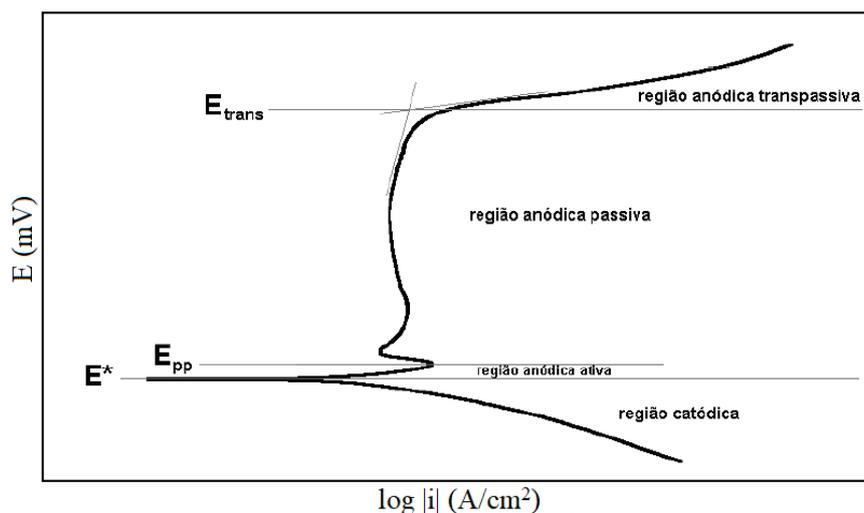


Figura 13 - Curva de polarização típica de aços inoxidáveis em meio ácido sendo E^* : potencial de corrosão; E_{pp} : potencial inicial de passivação e E_{trans} : potencial inicial de transpassivação [65].

A Figura 13 possui duas divisões principais, as quais são denominadas regiões catódicas e anódicas, sendo a última subdividida em áreas ativa, passiva e transpassiva. Na região catódica, referente aos potenciais abaixo do potencial de corrosão (E^*), a taxa de dissolução do material é baixa e geralmente ocorrem reações de redução sobre o metal tal como a redução do hidrogênio, não havendo corrosão no mesmo. Aumentando o potencial para potenciais acima do de corrosão, inicia-se a porção anódica da curva, representando a faixa de potencial em que pode ocorrer a corrosão do metal [65].

A parte anódica ativa é marcada pelo acréscimo da densidade de corrente e do potencial, indicando a região onde haverá corrosão do material. Além disso, alguns metais possuem uma porção anódica passiva, caracterizada pela redução da densidade de corrente gerando uma baixa taxa de corrosão [65]. A passivação, que se inicia no potencial indicado como E_{pp} na Figura 13, se deve à formação de uma película de óxido ou hidróxido aderente ao material gerada como produto da corrosão. Essa camada é capaz de impedir o contato do metal com a solução corrosiva e é caracterizada pela sua pequena espessura (2 a 3 nm), alta capacidade de regeneração e de isolamento elétrico [65], [66]. Já a região anódica transpassiva, iniciada no potencial indicado na Figura 13 como E_{trans} , ocorre com o aumento contínuo do potencial e é marcada pela desestabilização da camada passiva e, com isso, eleva a densidade de corrente do processo [65].

2.10 Ensaios de biocompatibilidade

A viabilidade celular e a fosfatase alcalina (*Alkaline phosphatase* - ALP) são importantes parâmetros de análise em ensaios de biocompatibilidade. A viabilidade celular de osteoblastos indica a taxa de sobrevivência das células e está relacionada com a atividade celular e a citotoxicidade, sendo a mesma definida de acordo com a reação de uma célula à determinado composto, podendo essa reação ser a morte celular. Já a fosfatase alcalina é o marcador bioquímico de osteoblastos mais reconhecido, uma vez que esta enzima encontra-se associada à formação óssea e mineralização esquelética e o aumento da atividade de ALP está relacionado à diferenciação de osteoblastos [67], [68], [69], [70].

Um dos métodos utilizados para avaliar a citotoxicidade e viabilidade celular é a partir do ensaio Alamar *Blue*, que consiste em utilizar um indicador REDOX chamado resazurina e conhecido comercialmente como Alamar *Blue* para medir a proliferação celular. Como a resazurina possui coloração azul e não apresenta fluorescência e a resorufina (forma reduzida da resazurina) é vermelha e altamente fluorescente, é possível associar as alterações da fluorescência deste corante com o número de células metabólicas ativas no ambiente intracelular, isso porque os agentes redutores da resazurina são coenzimas que participam das reações metabólicas de respiração celular, tais como NADPH (forma reduzida do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) e NADH (redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo). Os sais de tetrazólio se apresentam como alternativa ao ensaio Alamar *Blue*. Porém, esse método apresenta como desvantagem a alta toxicidade dos reagentes necessários para obtenção dos resultados celulares, que são o DMSO ou HCl/ isopropanol [71], [72].

A ALP é uma enzima catalisadora da hidrólise de esteres em meio alcalino, sendo capaz de remover grupos fosfatos de uma ampla variedade de substratos alterando, portanto, as propriedades fluorescentes destes materiais. Desse modo, a espectrofotometria se destaca como uma técnica de avaliação da atividade de ALP [69], [73].

2.11 Espectroscopia de força

Espectroscopia de força é uma das técnicas da Microscopia de Varredura por Sonda (*Scanning Probe Microscopy* – SPM) que permite obter informações sobre propriedades

mecânicas das amostras. As técnicas de SPM apresentam o mesmo princípio de funcionamento: a utilização de uma sonda mecânica para detecção de diferentes grandezas físicas. Além da espectroscopia de força, outras técnicas encontradas na SPM são: microscopia de varredura por tunelamento, de força lateral, de contraste de fase, de modulação de força, de força magnética e a microscopia de força atômica, utilizada para medir a topografia de amostras [74], [75].

A Figura 14 apresenta um desenho esquemático de um microscópio de varredura por sonda.

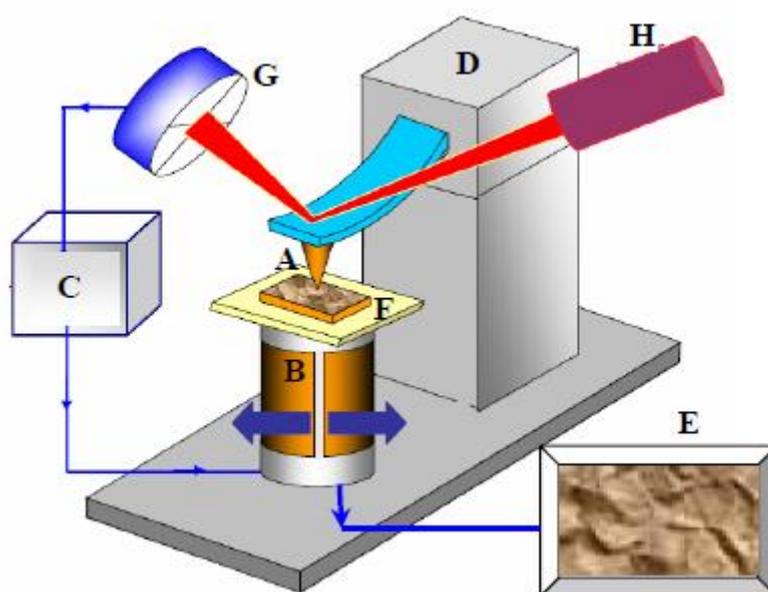


Figura 14 - Desenho esquemático dos componentes de um microscópio de varredura por sonda, sendo A: sonda; B: cerâmicas piezoelétricas (*scanner*); C: sistema de monitoramento da interação sonda-amostra; D: sistema de aproximação manual; E: computador; F: amostra; G: fotodetector; H: *laser* [74].

De acordo com a Figura 14, o princípio de funcionamento de um microscópio de varredura por sonda é o seguinte: a sonda mecânica em A é posicionada muito próxima ou em contato com a superfície da amostra (F). O *scanner* (B) movimenta a amostra, permitindo sua varredura lateralmente. O sistema de monitoramento (C) identifica variações na interação entre a sonda e a amostra através de mudanças na posição do *laser* (H) que é refletido e atinge um fotodetector (G), o qual funciona como um sensor de posição e converte o sinal luminoso em elétrico. Essa informação é, então, passada a um sistema de realimentação que controla a separação entre a sonda e a amostra. Todo este processo é controlado por um computador (E) que movimenta o *scanner*, recebe e converte os dados obtidos. O microscópio de varredura por sonda possui, ainda, um

sistema de aproximação manual (D) para que a sonda seja colocada próxima a uma região específica desejada [74], [75], [76].

A espectroscopia de força fornece informações pontuais tais como a adesão e a dureza do material analisado a partir da indentação da ponta na amostra. Como resultado da análise, tem-se uma curva de força que mede a deflexão da alavanca em Δz (e, a partir da Lei de Hooke, da força de interação F) em função da distância sonda-amostra (z) [74], [76], [77]. A Figura 15 apresenta uma curva típica de uma análise de espectroscopia de força. A partir dessa curva, pode-se obter informações relativas à elasticidade, adesão, dureza, hidrofobicidade e hidrofiliicidade da amostra analisada [74].

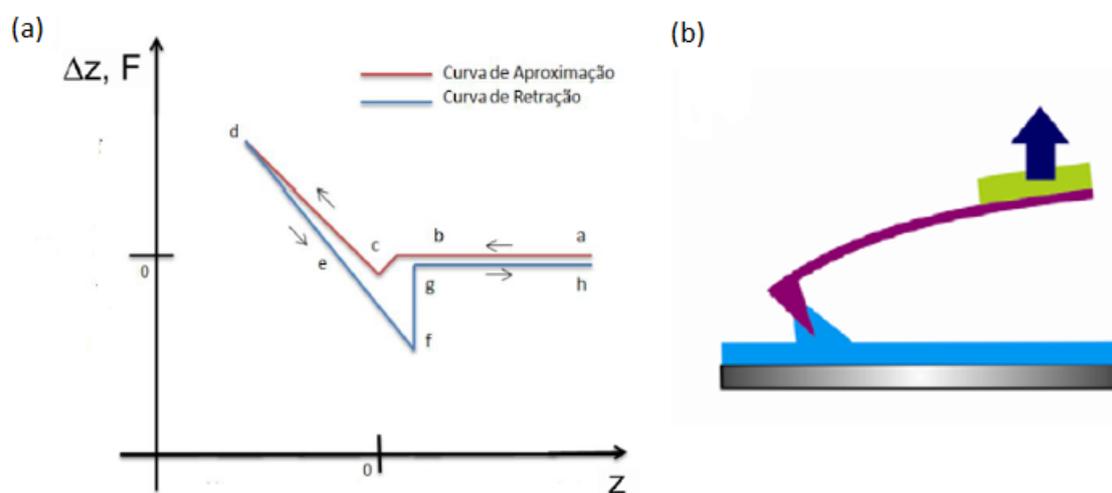


Figura 15 - (a) Deflexão da alavanca Δz (proporcional a F) em função da distância sonda-amostra (z). Em vermelho: curva de aproximação. Em azul: curva de retração. (b) Camada de contaminação na superfície da amostra causando a força de adesão [74], [76].

A partir da Figura 15 (a) e (b), a curva de força pode ser descrita da seguinte forma: no segmento **a-b**, há a aproximação da sonda na amostra. Em **b-c** ocorre uma forte atração da ponta com a amostra. Essa atração é chamada de “*jump to contact*” e ocorre quando a ponta entra em contato brusco com a camada de contaminação da amostra (formada principalmente por água e representada na imagem (b)). No segmento **c-d**, a sonda continua em contato com a amostra e o *scanner* se distende, apertando a sonda contra a amostra e causando uma deflexão na alavanca, a qual é registrada no fotodetector. Em **d-e** ocorre a retração do *scanner*, ou seja, a ponta se afasta da amostra até o ponto e. No segmento **e-f** tem-se o processo de afastamento sonda-amostra. Quando a força de restauração da alavanca for superior à força de adesão, tem-se o segmento fg da curva de força. A partir do ponto g, não há mais interação entre a ponta e a amostra [74], [76].

Como a alavanca pode ser considerada uma mola, a força de adesão (F_a) é dada pela Lei de Hooke [74], [76]. Desse modo:

$$F_a = k \cdot \Delta z \quad (8)$$

Sendo que k e Δz são, respectivamente, a constante de mola e a deflexão da alavanca.

A fim de mapear e distinguir propriedades nanomecânicas de uma amostra, utiliza-se o *PeakForce* QNM (*Quantitative Mechanical Property Mapping*), o qual é um modo de geração de imagens do SPM de alta resolução capaz de fornecer informações nanomecânicas dos materiais analisados [78], [79]. No modo *PeakForce* QNM, cada pixel da imagem apresenta um curva de força gerando, portanto, resultados quantitativos mais seguros do que a curva de força pontual [78], [80].

As principais propriedades mecânicas obtidas utilizando o *PeakForce* QNM são topografia, módulo de elasticidade, deformação, dissipação e adesão de uma amostra. Para tanto, é necessário configurar os canais de medição, indicando quais propriedades mecânicas serão mapeadas [81]. A Figura 16 apresenta uma imagem gerada no *PeakForce* QNM utilizando como canal a adesão.

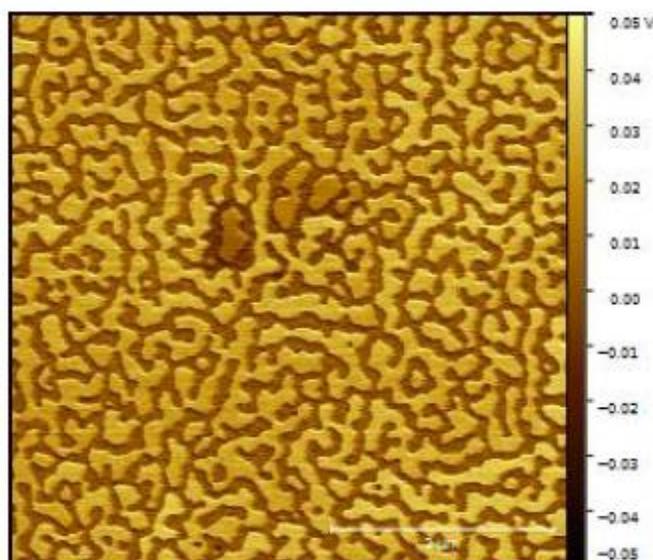


Figura 16 - Imagem da adesão de uma amostra de β -caroteno em substrato de grafite [81].

Como pode-se observar pela Figura 16, a adesão da amostra de β -caroteno em substrato de grafite foi medida em mV. Isso porque a deflexão do cantilver é proporcional às mudanças na posição do *laser* do SPM, o qual atinge o fotodetector e converte o sinal luminoso em voltagem [74], [75], [76], [82].

A Figura 17 representa uma curva de força típica obtida a partir da geração de uma imagem no *PeakForce QNM*, ilustrando quantitativamente as propriedades mecânicas obtidas.

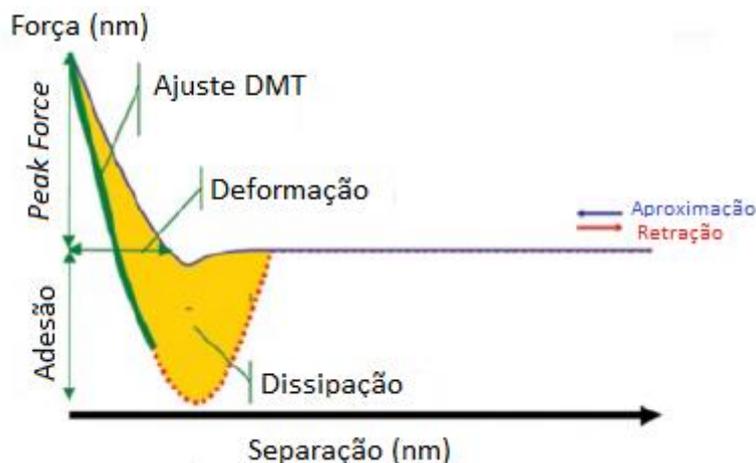


Figura 17 - Gráfico da força em função da separação ponta/amostra, ilustrando as informações que podem ser obtidas a partir desta curva [83].

O módulo de elasticidade é calculado a partir do modelo DMT (Derjaguin–Muller–Toporov) o qual inclui forças de adesão à teoria de Hertz sobre contato mecânico entre superfícies [83], [84]. A força de adesão é ilustrada como a força mínima negativa da Figura 17, sendo que o valor negativo serve apenas para retratar a deflexão acentuada do cantilever neste ponto [83], [85]. A dissipação de energia é dada pela força vezes a velocidade integrada ao longo de um período de vibração (representada pela área da Figura 17). Já a deformação é definida como a penetração da ponta na superfície da amostra e é calculada pela diferença entre o ponto de força nula e a força de pico na curva de aproximação. Sabendo a forma da ponta e a área de contato entre ponta e amostra, a deformação pode ser convertida em dureza [83].

3. Materiais e métodos

3.1 Preparação dos substratos

Tarugos de titânio de grau 2, com 10 mm de diâmetro, foram cortados com máquina de corte (marca: Buehler; modelo: IsoMet 1000) para serem utilizados como substrato para a deposição de HA. Desse modo, obteve-se discos de Ti com 1 mm de espessura. A escolha do grau do titânio se deve ao fato deste ser o tipo de titânio mais utilizado para implantes ortopédicos e dentários.

Após o corte, os discos de Ti foram lixados manualmente com lixas de carbetto de silício grana 220, 320 e 420. Água e detergente foram utilizados durante o lixamento a fim de reduzir o atrito entre os discos e as lixas.

Os substratos lixados foram imersos em solução de HF (ácido fluorídrico) a 4% por 2 minutos e, então, limpos no ultrassom (marca: Unique; modelo: UltraCleaner 1400) em acetona, álcool etílico e água bidestilada, respectivamente. Cada um dos solventes sonicou os discos de Ti por 15 minutos.

3.2 Procedimento para Eletrodeposição

Os filmes de HA foram depositados a partir da eletrodeposição catódica pulsada tendo como potencial superior -5 V e potencial inferior, 0 V. A frequência dos pulsos de todos os testes foi 0,2 Hz [23].

Para a eletrodeposição, utilizou-se uma célula eletroquímica de três eletrodos sendo que o substrato de titânio corresponde ao eletrodo de trabalho, um eletrodo de grafite representa o contra-eletrodo e um eletrodo de calomelano saturado corresponde ao eletrodo de referência [23], [86]. A disposição dos eletrodos assim como a célula utilizada são apresentadas na Figura 18.



Figura 18 - Célula eletrolítica de três eletrodos utilizada na eletrodeposição.

A Figura 18 exibe também o agitador magnético (marca: Biomixer; modelo: 78HW-1) utilizado para manter a concentração do eletrólito constante na superfície do catodo. Além desse equipamento, também foram usados um banho ultratermostático (marca: Quimis; modelo:0214S2) a fim de manter a temperatura do banho eletrolítico em 65°C e um potenciostato (marca: Microquímica Automação Ltda; modelo: MQPG-1) para controlar os potenciais aplicados, a frequência e o tempo de deposição.

3.2.1 Solução eletrolítica

A solução eletrolítica utilizada é composta por 5×10^{-3} M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 3×10^{-3} M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ [22]. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na concentração de 2% em volume foi adicionado aos eletrólitos a fim de prevenir a formação de bolhas no substrato [1], [23]. Tal concentração foi determinada de acordo com o trabalho de Mota [23], o qual comparou filmes com adição de 2% e 6% de H_2O_2 e demonstrou que H_2O_2 a 2% gera revestimentos mais uniformes e compactos. O pH da solução eletrolítica foi obtido naturalmente tendo como valor 4,62. Não foi realizado o ajuste do pH, uma vez que Mota [23] demonstrou que melhores resultados eram obtidos ao se utilizar a solução eletrolítica de HA sem controle de pH. O tempo de eletrodeposição, para este trabalho, foi de 15 minutos.

3.3 Procedimento para esfoliação do talco em fase líquida

Para a esfoliação em fase líquida, foram realizados testes com o talco da pedra-sabão (talco em pó) e com o talco em forma de flocos. O talco em pó foi obtido do seguinte modo: a pedra-sabão foi adquirida nas feiras artesanais da cidade de Ouro Preto e a mesma foi raspada manualmente para obtenção do pó de talco. Após este processo, o pó foi passado por uma peneira de 300 μm a fim de limitar o tamanho dos grãos. Já o floco de talco foi adquirido diretamente da natureza. A seguir, a Figura 19 apresenta imagens do floco e do pó de talco utilizados neste trabalho.

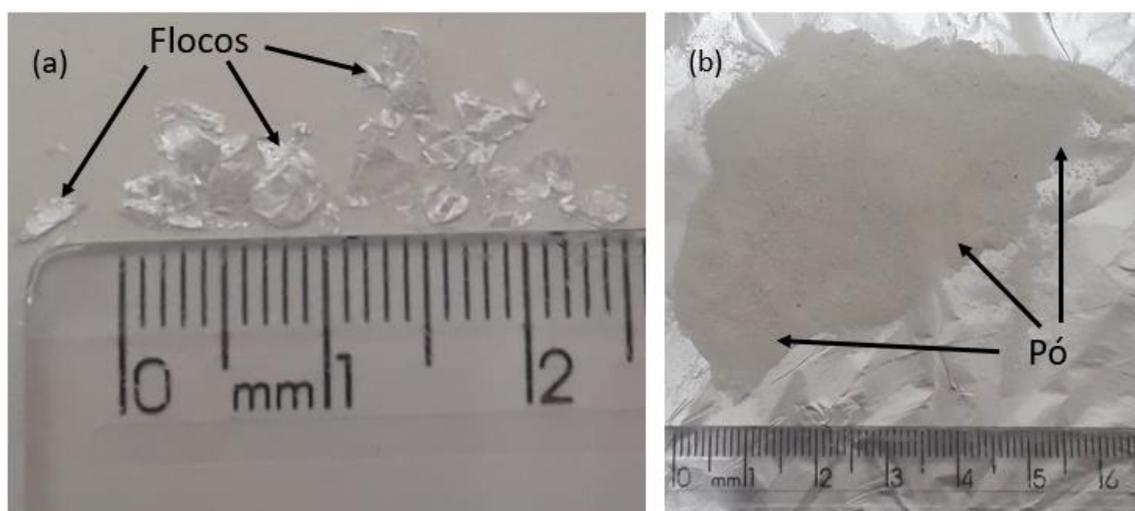


Figura 19 - Formatos de talco utilizados e representação de uma régua para indicar a dimensão de (a) e (b), sendo que em (a) têm-se flocos de talco e em (b), pó de talco peneirado sobre papel alumínio.

Tanto o pó quanto o floco de talco foram medidos na balança Shimadzu (modelo AUX 220) e sonicados em ultrassom Bandelin (modelo Sonorex Super RK 106) em diferentes solventes, sendo eles: NMP (N-metil-2-pirrolidona), DMF (N,N-Dimetilformamida), DMSO (Dimetilsulfóxido), água bidestilada, água deionizada, água Mili-Q, álcool isopropílico, butanona, ácido clorídrico e soluções eletrolíticas de hidroxiapatita. A fim de separar o sobrenadante, o qual apresenta camadas com menores espessuras, algumas amostras foram centrifugadas em um centrífuga da Quimis (modelo Q222TM).

As soluções sonicadas e centrifugadas (quando era o caso) foram depositadas em substrato de silício e analisadas em um microscópio óptico da Optech (modelo XJL-17).

Algumas medidas de AFM (*Atomic Force Microscopy*) foram realizadas no Nanolab da UFOP/REDEMAT, coordenado pelo Prof. Fernando Gabriel da Silva Araújo. A análise

foi feita em um SPM XE7 da Park Instruments, pela Prof.^a Ana Paula Moreira Barboza e pela aluna Ana Carolina Brito. As medidas de *PeakForce* QNM foram realizadas no microscópio de varredura por Sonda Nanoscope Multimode 8 da Bruker, no Laboratório de Nanoscopia, do Departamento de Física da UFMG, coordenado pelo professor Bernardo Neves. As imagens foram tratadas no programa XEI a fim de investigar a altura das camadas de talco obtidas. Para tais medidas, a solução eletrolítica de HA descrita na seção 3.2.1 foi gotejada em substrato de silício e secas com nitrogênio.

3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*)

Para obtenção de informações à respeito da composição e morfologia dos filmes depositados, foram realizadas análises de MEV e EDS das amostras. Para tanto, utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura da Jeol (modelo: JSM-IT300LV) e a obtenção das imagens se deu a partir de feixes de elétrons que foram acelerados por tensões de 2,0 kV, 7,0 kV, 10kV e 20 kV. As medidas foram realizadas pela Prof.^a Cláudia Vasconcelos na PUC Minas (Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais) e as amostras foram recobertas por uma fina camada de ouro antes dos ensaios para que as mesmas se tornassem superfícies condutoras.

3.5 Difração de Raios X (DRX)

Utilizou-se a difração de raios X a fim de identificar os materiais presentes nas amostras analisadas. Para isso, um difratômetro modelo D-8 ADVANCE da marca Bruker, foi utilizado com uma faixa de varredura de 10° a 80°, passo angular de 0,02°/s e radiação Cu-K α ($\alpha = 1,5406 \text{ \AA}$). Além disso, utilizou-se o *software X'Pert HighScore Plus* para análise do difratograma obtido, o qual utiliza o banco de dados de padrões cristalográficos PDF (*Powder Diffraction File*) para comparar o espectro DRX obtido experimentalmente com o padrão de difração de determinado material.

A difração de raios X foi realizada pela pesquisadora Prof.^a Giovanna Machado e pelos técnicos Gian Duarte e Thiago Soares no Laboratório de nanotecnologia do CETENE

(Centro de Tecnologia Estratégica do Nordeste), que enviaram os dados que foram analisados no *software* indicado (*X'Pert HighScore Plus*).

3.6 Ensaio de desgaste

Ensaio de desgaste foram realizados a fim de avaliar a resistência ao desgaste do substrato de titânio e das amostras depositadas. Para tanto, utilizou-se um tribômetro da Microtest (modelo MT/60), localizado no laboratório Nanotech Tribologia do Departamento de Engenharia Metalúrgica da UFMG. O ensaio realizado foi do tipo pino-disco, sendo o disco a amostra analisada e o pino, uma esfera de alumina. A Tabela 3 apresenta os demais parâmetros dos testes de desgaste.

Tabela 3 - Parâmetros dos ensaios de desgaste.

Carga aplicada	2 N
Velocidade	2 mm/s
Raio da trilha de desgaste	1 mm
Raio da esfera de alumina	6 mm
Tempo dos ensaios	10 min
Temperatura dos ensaios	Ambiente

Os ensaios foram realizados à seco e controlados por computador a partir do *software* Nanovea. Os testes de desgaste foram realizados por Mário Jose Bueno e Anderson Junior dos Santos, alunos da Prof.^a Geralda Cristina Godoy da UFMG. A análise das trilhas de desgaste foi realizada através de imagens ao MEV na PUC Minas (Jeol, modelo: JSM-IT300LV).

3.7 Polarização potenciodinâmica

Realizou-se ensaios de polarização potenciodinâmica tanto das amostras depositadas quanto dos substratos de titânio com o objetivo de investigar o comportamento dos mesmos em meio corrosivo. Para tal, utilizou-se um potenciostato da marca Metrohm (modelo Autolab PGSTAT128N) e solução salina tamponada com fosfato (solução PBS). Tal solução é composta por 8g/L de NaCl; 0,2 g/L de KCl; 0,594 g/L de Na₂HPO₄ e 0,2

g/L de KH_2PO_4 e simula os fluidos corporais [87]. A Figura 20 demonstra o sistema preparado para realização dos ensaios.



Figura 20 - Disposição dos eletrodos para realização da polarização potenciodinâmica.

Como observado na Figura 20, o eletrodo de trabalho, o contra-eleto-rodo e o eletrodo de referência utilizados para obtenção das curvas de polarização são, respectivamente, a amostra analisada, a platina e o eletrodo de calomelano. Antes de inicializar os ensaios, o sistema foi mantido em solução durante 1 hora a fim de estabilizar o potencial de corrosão [88].

Os ensaios de polarização potenciodinâmica foram realizados à temperatura ambiente (aproximadamente $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), a uma taxa de varredura de $0,167\text{ mV/s}$, com potencial inicial de 300 mV abaixo do potencial de corrosão e potencial final de 1000 mV . Tais parâmetros foram determinados de acordo com o trabalho de Manhabosco [87].

3.8 Ensaios de biocompatibilidade

Os ensaios de biocompatibilidade foram realizados no laboratório de Sinalização Celular da UFMG, o qual possui como responsável o Prof. Rodrigo Ribeiro Resende. Os testes foram realizados pelo aluno Nathanael Vieira Medrado sob orientação da Prof^a. Érika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga da UFSJ (Universidade Federal de São João del Rei). Os ensaios foram analisados e discutidos na seção 4.6.

3.8.1 Extração de osteoblastos primários

Neonatos de ratos wistar foram sacrificados com aplicação de anestésico em dose letal intraperitoneal, sendo esse anestésico composto de cloridrato de lidocaína a 2% sem vaso constritor. Em seguida, procedeu-se com a limpeza dos espécimes com iodopovidona, os quais foram levados para o fluxo laminar. Todos os procedimentos procederam-se dentro do fluxo laminar. Foi retirado o escalpo dos neonatos com um corte na rima ocular até o ouvido unindo-se na parte frontal e o retalho foi deslizado para região posterior a fim de se expor a calvária. Para destacar a parte óssea, utilizou-se uma tesoura na sutura mediana e na parieto-occipital. Os fragmentos dos animais foram recolhidos em um tubo falcon contendo PBS estéril. A solução tampão contendo os fragmentos foi inserida em uma placa de petri onde se realizou a limpeza e a redução do PBS com fragmentos a pequenas partículas, as quais foram submetidas à digestão enzimática [87].

Os fragmentos passaram por um banho de tripsina 1% em estufa de CO₂ a 37°C por 15 min. Em seguida, removeu-se a tripsina e as amostras receberam quatro banhos sequenciais de colagenase/PBS 0,02% em estufa de CO₂ a 37°C por 20 minutos cada. Por conter alta proporção de fibroblastos, o sobrenadante tanto do banho de tripsina quanto do primeiro banho de colagenase foram descartados. O sobrenadante dos demais banhos foram recolhidos e centrifugados a 250 rpm por 5 minutos. Os pellets formados após centrifugação foram ressuspensos em 5 mL de meio de cultura DMEM (Meio Dulbecco) acrescido de 10% de SFB (N-succinimidil 4-fluorobenzoato) e plaqueados em caixa de cultura T25, as quais foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C umidificada até atingir a confluência. Realizou-se os ensaios quando as células estavam na segunda para terceira passagem [87].

3.8.2 Atividade da Fosfatase Alcalina

A taxa de reação da hidrólise do fosfato de p-nitrofenil é diretamente proporcional a atividade de ALP, uma vez que essa enzima é catalisadora da reação. Assim, a atividade de ALP foi medida por espectrofotometria de acordo com a transformação, por hidrólise, do fosfato de p-nitrofenil (incolor em meio alcalino) em p-nitrofenol (de coloração amarela) [23], [68].

As medidas foram realizadas no comprimento de onda igual a 595 nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific Varioskanr Flash) e a análise estatística foi feita por *two-way* ANOVA comparando-se os grupos de HA e HA com incorporação de talco a diferentes concentrações com o titânio e o grupo de controle (significância estatística para valores menores que 0,05 - $p < 0,05$).

3.8.3 Cultura de Osteoblastos primários sobre os revestimentos

Após serem colocadas em placa de 24 poços, as células foram plaqueadas (1×10^5 células por poço/amostra) e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. Em seguida, aguardou-se 24 horas após o plaqueamento para verificação da adesão celular por microscópio. Foi realizada troca de meio de cultura nos 3º e 7º dias. Utilizando eppendorf contendo inibidor de protease, o sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer à -80°C [23].

3.8.4 Viabilidade celular

Para o ensaio de viabilidade celular, utilizou-se o Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific) de acordo com informações do fabricante, ou seja, adicionando 40 mL do reagente em 360 mL de meio de cultura. O ensaio foi realizado nos 1º, 3º e 7º dias após plaqueamento celular das amostras e as placas do ensaio foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 3 horas. Após o tempo de reação do Alamar Blue, transferiu-se o sobrenadante para placa de 96 poços e realizou-se a leitura da absorbância no comprimento de onda igual a 595nm. A absorbância foi medida em leitor de microplaca Thermo Scientific Varioskanr Flash [23].

4. Resultados e discussões

4.1 Esfoliação em fase líquida

Com o objetivo de esfoliar o talco em fase líquida e incorporá-lo à matriz de HA, foram realizados vários ensaios em que os seguintes parâmetros foram avaliados: solvente utilizado, concentração da solução, tempo de sonicação, velocidade e tempo de centrifugação (quando aplicada) e formato do talco (em pó ou em flocos). A Tabela 4 apresenta um resumo dos ensaios com os melhores resultados, sendo eles os testes que apresentaram alta concentração de talco esfoliado.

Tabela 4 - Parâmetros da esfoliação em fase líquida do talco (em pó ou em flocos).

Ensaio	Solvente	Concentração (g/L)	Tempo de sonicação (h)	Formato do talco
1	NMP	0,40	3	Floco
2	NMP	1,80	3	Pó
3	5×10^{-3} M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 3×10^{-3} M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 2% H_2O_2 (em volume)	1,80	3	Pó
4	0,042 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,025 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 0,15 M NaNO_3 e 2% H_2O_2 (em volume)	1,80	3	Pó

A centrifugação, como já mencionado, é a etapa do processo de esfoliação em fase líquida responsável pela seleção das dimensões dos flocos, em que os flocos menores (sobrenadantes) se encontram na superfície e os maiores na parte inferior do frasco de amostra [17], [40], [41]. Para este trabalho, como o objetivo era apenas desenvolver um método de esfoliação do talco em fase líquida sem a necessidade de que o mesmo fosse esfoliado em poucas camadas (mono ou bicamadas) mas apenas na escala nanométrica, optou-se pela não realização da centrifugação, como pode-se observar pela Tabela 4, que não possui a centrifugação como um dos parâmetros dos ensaios com melhores resultados. Isso porque notou-se que ao se proceder com a centrifugação, perdia-se material esfoliado que se alojava no fundo do frasco. A seguir, apresenta-se algumas imagens obtidas dos ensaios especificados na Tabela 4.

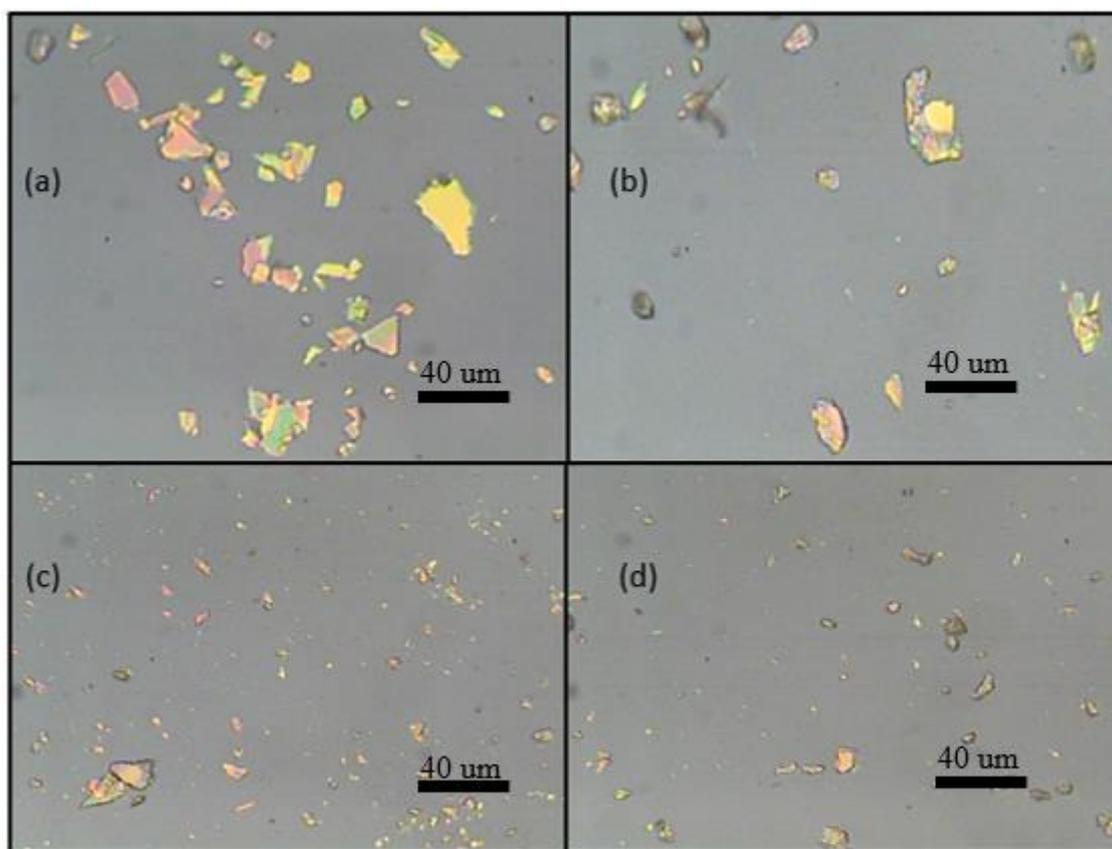


Figura 21 - Imagens de microscopia ótica referentes aos testes especificados na Tabela 4, sendo (a): Ensaio 1; (b) Ensaio 2; (c): Ensaio 3 e (d) Ensaio 4.

Nas imagens da Figura 21, o substrato de silício se apresenta na cor cinza escura, enquanto as figuras coloridas referem-se ao talco esfoliado.

Os testes realizados foram avaliados com relação à concentração de acordo com uma escala comparativa, sendo que ensaios considerados de baixa concentração de material esfoliado apresentam imagens similares à apresentada na Figura 22, mostrada a seguir. Já os ensaios com grande quantidade de talco esfoliado apresentam imagens que se assemelham ao demonstrado na Figura 21.

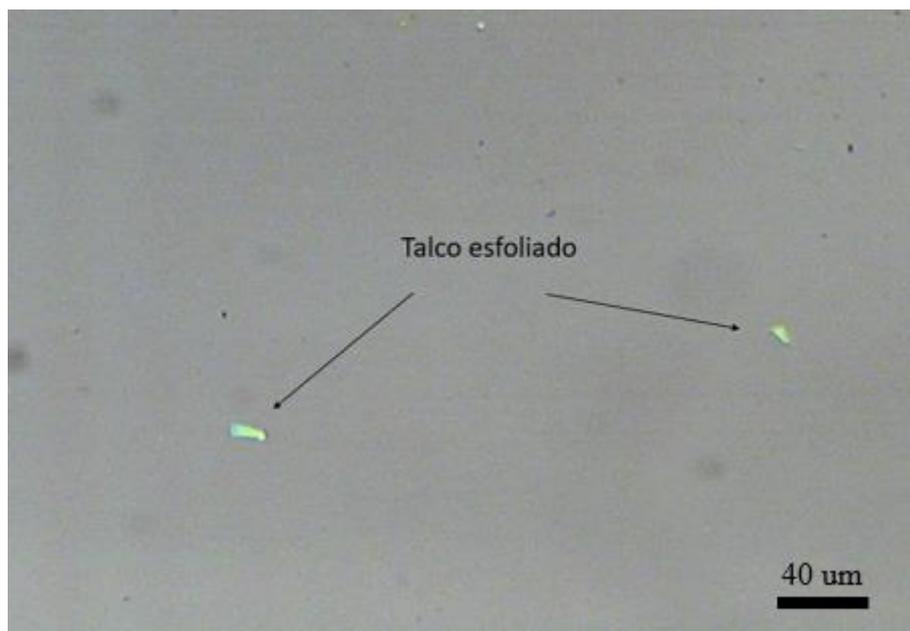


Figura 22 - Imagem de microscopia ótica referente a um teste com baixa concentração de material esfoliado. Parâmetros do teste: flocos de talco como soluto e NMP como solvente na concentração 0,2 g/L, solução sonicada por 3 horas.

Comparando as imagens obtidas nas Figuras 21 e 22, percebe-se a diferença na concentração de flocos de talco, de modo que pode-se considerar as imagens da Figura 21 como ensaios que resultaram em alta concentração de talco esfoliado.

As Figuras 21 e 22, juntamente com a Tabela 4, demonstram que a esfoliação em fase líquida foi atingida com maior facilidade utilizando o pó de talco. Com maior superfície de contato quando comparado ao floco, o talco em pó apresenta maior eficiência no processo de transmissão de energia ultrassônica gerando, portanto, maior concentração de material esfoliado.

Como já mencionado neste trabalho, a proximidade entre a energia de superfície do solvente e do soluto impede a reagregação das camadas gerando, assim, uma dispersão estável de material esfoliado [37], [38]. Sabendo que as energias superficiais do NMP e do talco são, respectivamente, iguais a aproximadamente $0,04 \text{ J/m}^2$ e $0,1 \text{ J/m}^2$ [15], [89], conclui-se que essa diferença entre as energias superficiais é suficiente para que a reagregação das camadas esfoliadas não ocorra. Pode-se concluir também que as soluções de HA devem possuir energia de superfície próxima aos valores encontrados para o talco ou para o NMP, já que tais soluções também esfoliaram o talco.

Os testes 3 e 4 da Tabela 4 apresentam, como solventes, soluções eletrolíticas para deposição de HA. Ambas as condições realizaram a esfoliação do talco. Porém, a solução

eletrolítica do teste 3 - 5×10^{-3} M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 3×10^{-3} M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 2% H_2O_2 (em volume) - foi selecionada como eletrólito padrão deste trabalho por não ter apresentado formação de óxido de cálcio nos depósitos de HA (ver seção 4.2), fato este observado nos eletrólitos do teste 4, como descrito por Mota [23].

Após a realização da esfoliação em fase líquida de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 4, optou-se por seguir com o processo de esfoliação apenas do talco em pó devido à maior facilidade de esfoliação do talco neste formato, como demonstrado pela Tabela 4 e pelas imagens das Figuras 21 e 22. Assim, diferentes concentrações de talco em pó foram utilizadas para a mesma solução eletrolítica a fim de investigar a influência desse parâmetro no processo de esfoliação. A Tabela 5 apresenta as variações nas concentrações de talco utilizadas neste trabalho.

Tabela 5 - Diferentes concentrações de talco.

Ensaio	Concentração de talco (g/L)
1	1,80
2	0,90
3	0,07

Para os ensaios da Tabela 5, todos os demais parâmetros foram mantidos, sendo eles a solução eletrolítica composta por 5×10^{-3} M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 3×10^{-3} M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 2% H_2O_2 (em volume), com $\text{pH} = 4,62$, tempo de sonicação de 3 horas e sonicação do talco em pó.

A seguir, apresenta-se algumas imagens obtidas dos ensaios especificados na Tabela 5.

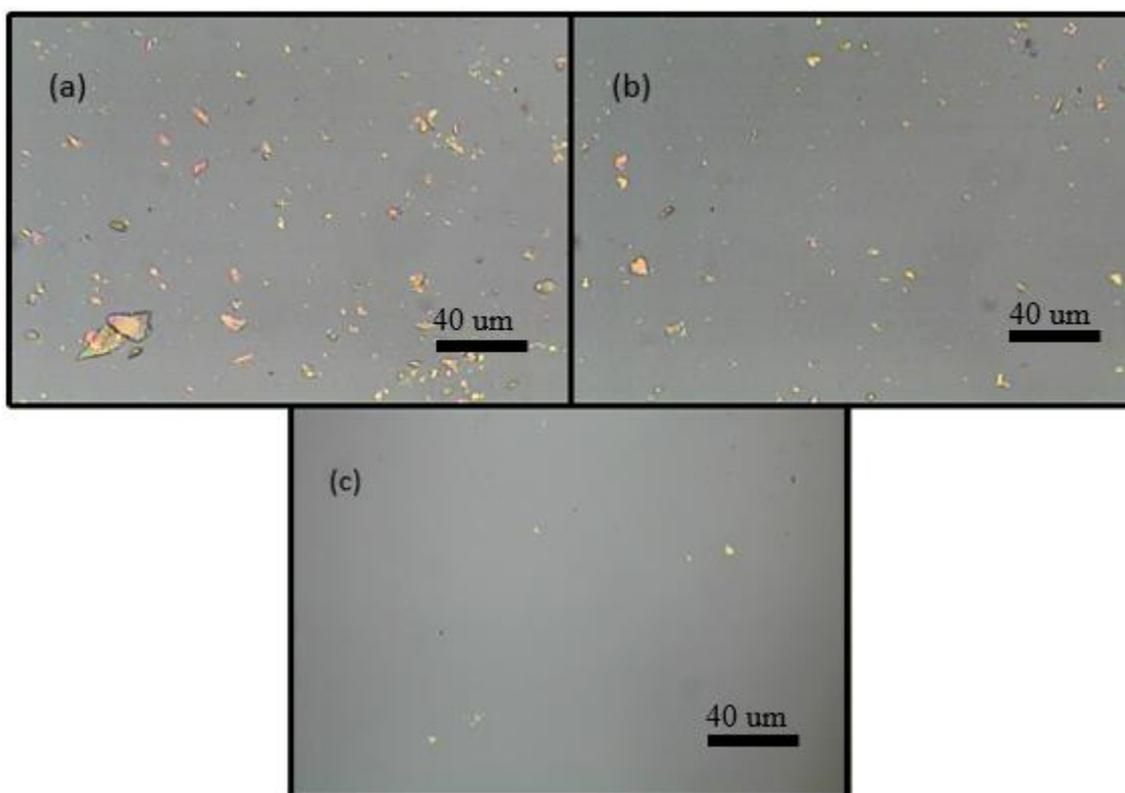


Figura 23 - Imagens de microscopia ótica referentes aos ensaios especificados na Tabela 5, sendo (a): Ensaio 1; (b) Ensaio 2; (c): Ensaio 3.

Analisando a Figura 23, percebe-se que as imagens (a) e (b) apresentam alta concentração de talco esfoliado, fato este que não foi observado na Figura 23 (c). A ausência de material esfoliado na imagem (c) pode ser explicada de acordo com Coleman e colaboradores [17] que afirmam que para o processo de esfoliação, uma baixa concentração inicial de material acarretará em uma baixa concentração de nanomaterial.

Medidas de AFM foram realizadas para investigar a altura das camadas de talco. A Figura 24 apresenta alguns dos resultados obtidos para a referida esfoliação.

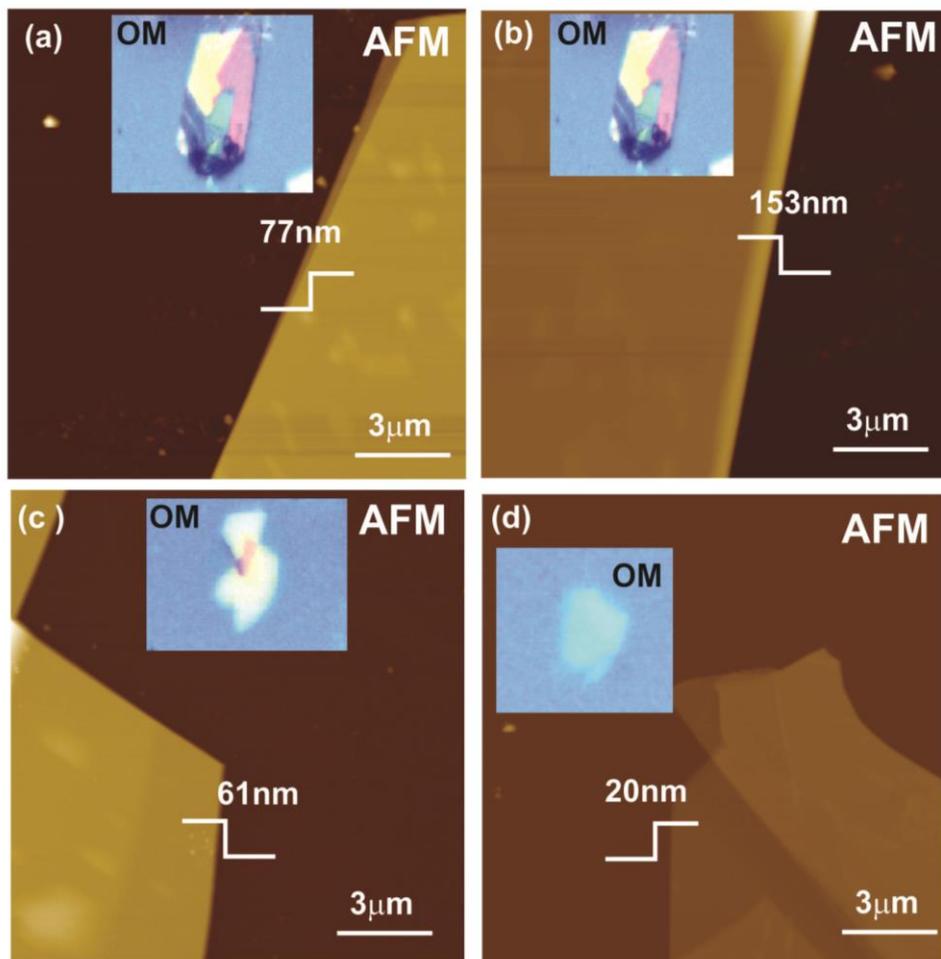


Figura 24 - Medida AFM e imagem óptica (OM: *optical microscopy*) do talco esfoliado na solução eletrolítica da HA, sendo: (a) floco de altura igual a 77 nm; (b) floco de altura igual a 153 nm; (c) floco de altura igual a 61 nm e (d) floco de altura igual a 20 nm.

Percebe-se, pela Figura 24, que as cores estão associadas a altura do floco de talco esfoliado. Desse modo, a Figura 24 indica que as alturas das camadas estão abaixo de 200 nm, demonstrando que o talco foi esfoliado apresentando espessuras na escala nanométrica.

4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Micrografias ao MEV dos filmes de HA depositados com e sem a presença de nanocamadas de talco são apresentadas a seguir, sendo que os parâmetros para obtenção das amostras foram: solução eletrolítica composta por 5×10^{-3} M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3×10^{-3} M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 2% H_2O_2 , com 15 minutos de eletrodeposição e $\text{pH} = 4,62$. Tal solução também foi utilizada como solvente para esfoliação do talco em pó, nas concentrações 0,07 g/L; 0,90 g/L e 1,80 g/L, sonicada por 3 horas.

A Figura 25 apresenta uma imagem ao MEV de HA pura e a Figura 26 mostra uma micrografia ao MEV de HA com talco na concentração de 0,07 g/L, ambas as imagens com ampliação de 500 vezes.

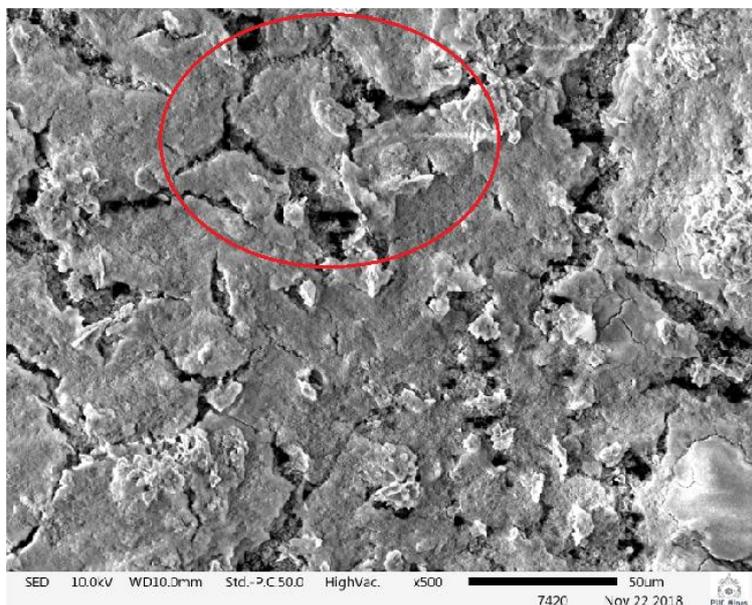


Figura 25 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA pura. Em destaque, trincas da amostra.

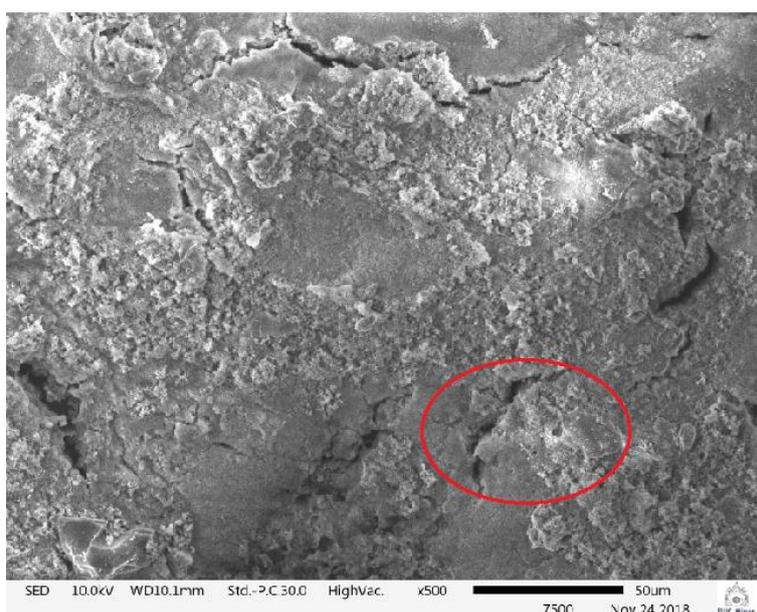


Figura 26 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA com talco na concentração de 0,07 g/L. Em destaque, trincas da amostra.

É possível observar nas micrografias das Figuras 25 e 26 superfícies irregulares e rugosas, sendo que na Figura 25 é possível detectar uma grande presença de trincas ao longo da amostra (em destaque na imagem), as quais prejudicam a resistência à corrosão do

revestimento. Na micrografia da Figura 26 observa-se uma redução na quantidade das trincas (também em destaque), o que pode ter ocorrido devido à presença do talco na matriz de HA que, mesmo não sendo esfoliado promoveu, possivelmente, uma interligação da matriz de HA.

O fato de a incorporação de talco na matriz de HA reduzir as trincas das amostras também foi relatado por Mota [23], que mostrou que menores quantidades de talco geram revestimentos mais compactos e uniformes.

As imagens a seguir são micrografias ao MEV com maiores ampliações (2500 vezes), sendo a Figura 27 composta de HA pura e a Figura 28 formada por HA com incorporação de talco na concentração de 0,07 g/L.

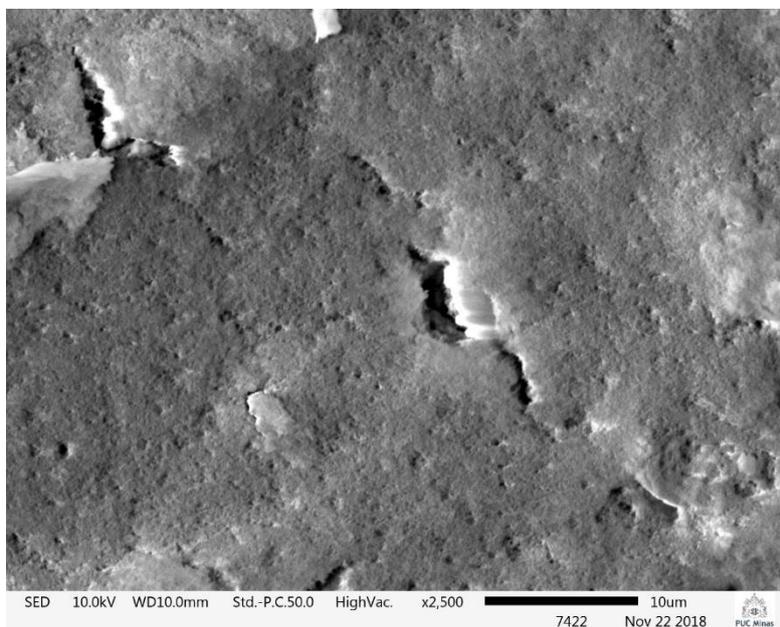


Figura 27 - Micrografias ao MEV ampliadas 2500 vezes de HA pura.

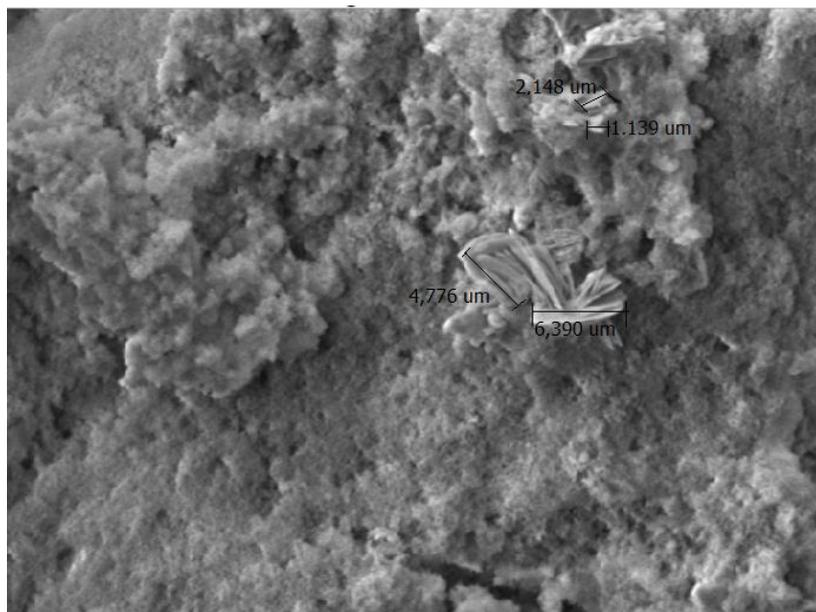


Figura 28 - Micrografias ao MEV ampliadas 2500 vezes de HA com talco na concentração de 0,07 g/L. Em destaque, comprimentos de possíveis flocos de talco.

Na micrografia ao MEV da Figura 28 é possível notar a presença de camadas em forma de placas em meio à matriz de HA, as quais não foram observadas na imagem da Figura 27. Do exposto, conclui-se que a micrografia ao MEV da Figura 28 indica que o talco não-esfoliado foi adicionado à matriz de HA e se aderiu à mesma. Medidas de comprimento das placas foram realizadas e as mesmas apresentam comprimentos variáveis entre 1,0 e 6,0 μm , aproximadamente.

Para confirmar a presença de talco nas amostras, análises de EDS foram feitas para HA pura e com incorporação de talco na concentração de 0,07 g/L. A Figura 29 apresenta o resultado do EDS para HA pura.

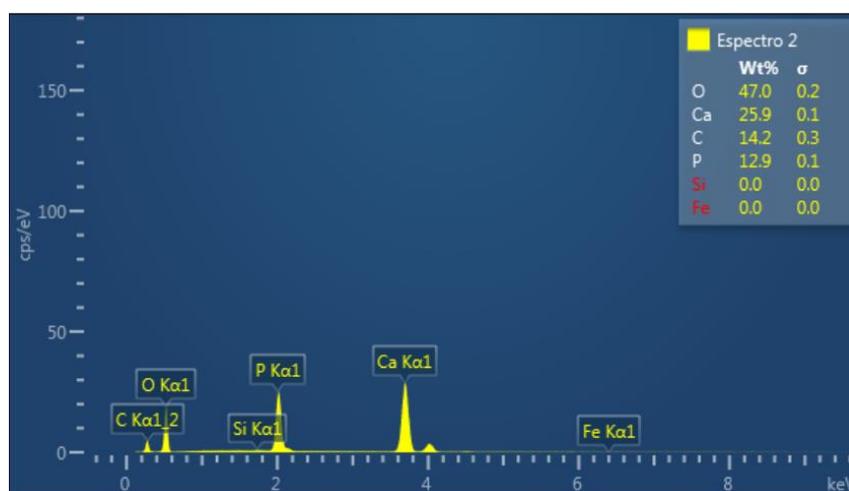


Figura 29 - Espectro EDS mostrando os elementos identificados nas amostras de hidroxiapatita pura.

Pela Figura 29, observa-se a presença de picos de Ca, P e O, componentes característicos da HA. Também é possível identificar um pico de C, uma vez que o carbono é um componente leve e geralmente aparece como contaminante das amostras.

A razão Ca/P calculada foi de 2,0, valor acima da relação estequiométrica Ca/P para a hidroxiapatita (igual a 1,67). Para Ca/P igual ou acima de 2,0, autores indicam a possibilidade da presença de óxido de cálcio na matriz de HA [5], [27], [28], [37] o qual não foi encontrado nas amostras analisadas, uma vez que a presença de CaO seria detectada na análise de DRX e nas micrografias ao MEV, as quais indicariam cristais em meio à matriz de HA, conforme descrito por Mota [23].

A Figura 30 apresenta a análise de EDS para amostras de HA com incorporação de talco na concentração de 0,07 g/L.

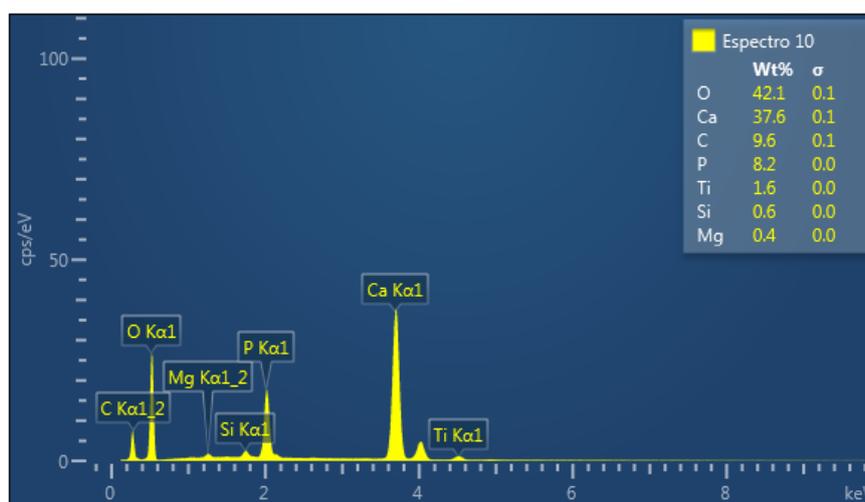


Figura 30 - Espectro EDS mostrando os elementos identificados nas amostras de hidroxiapatita com talco na concentração de 0,07 g/L .

Além dos picos já explicados na Figura 29, a Figura 30 apresenta três novos picos. O pico de Ti refere-se ao substrato utilizado nas amostras. Já os picos de Si e Mg são elementos característicos do talco indicando, portanto, que o talco se incorporou à matriz de hidroxiapatita.

A Figura 31 apresenta uma imagem ao MEV de HA pura e a Figura 32 mostra uma micrografia ao MEV de HA com nanocamadas de talco na concentração de 0,90 g/L, ambas com ampliação de 500 vezes.

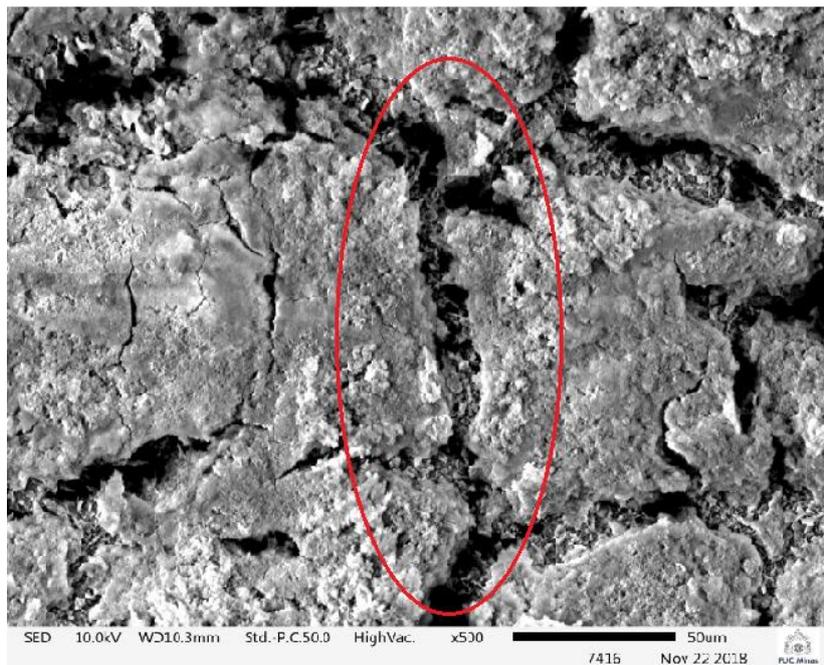


Figura 31 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA pura. Em destaque, trincas presentes na amostra.

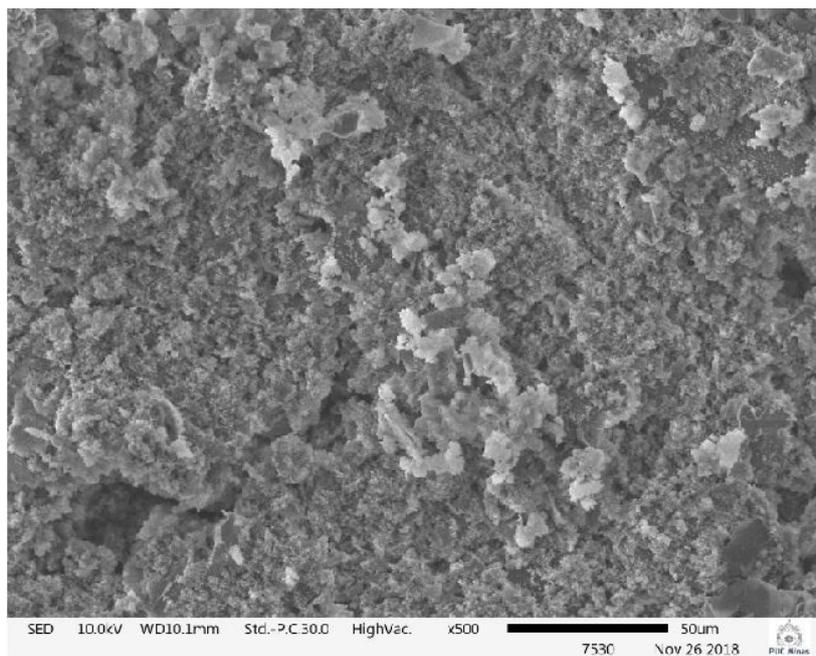


Figura 32 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA com nanocamadas de talco na concentração de 0,90 g/L.

Observa-se que as micrografias indicam a formação de superfícies irregulares e rugosas na Figura 31 e de uma estrutura compacta e rugosa na Figura 32. A área circunscrita na Figura 31 identifica as trincas da condição analisada na imagem (HA pura). Nota-se, analisando ambas as imagens que a Figura 31 apresenta maior quantidade de trincas

quando comparada com a Figura 32. Assim, a adição de nanocamadas de talco na matriz de HA pode ter sido responsável pela diferença morfológica entre as imagens ao MEV das Figura 31 e 32, promovendo uma interligação da matriz de HA, o que provavelmente irá propiciar uma melhora na resistência à corrosão como será explanado na seção 4.5.

A Figura 33 apresenta a análise de EDS da amostra de HA com incorporação de nanocamadas de talco na concentração de 0,90 g/L.

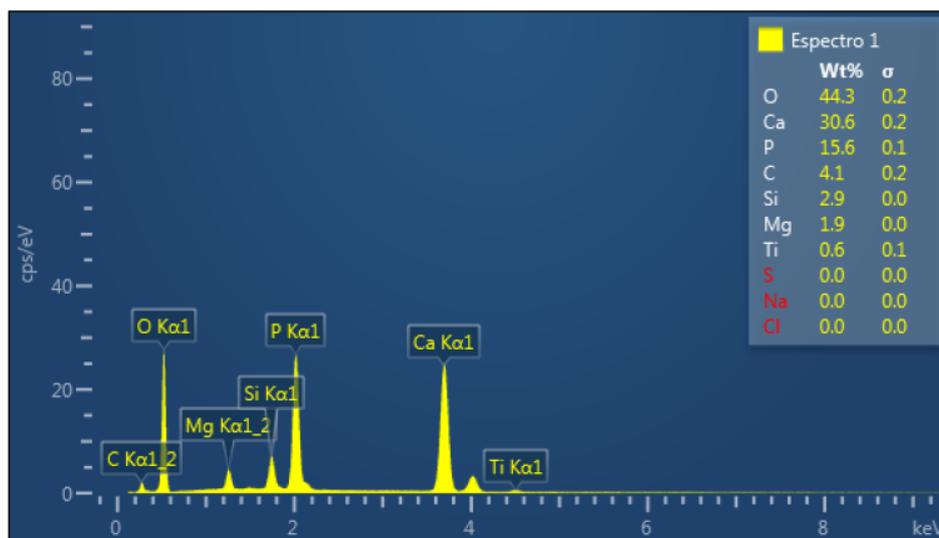


Figura 33 - Espectro EDS mostrando os elementos identificados nas amostras de hidroxiapatita com incorporação de nanocamadas de talco na concentração de 0,90 g/L.

Analisando a Figura 33, observa-se os picos dos elementos característicos do talco, sendo eles o Si e o Mg, o que indica que o talco nanoestruturado também se incorporou à matriz de hidroxiapatita. Todos os demais picos mostrados na imagem já foram identificados em análises anteriores de EDS.

As Figuras 34 e 35 a seguir apresentam imagens ao MEV de amostras de HA com incorporação de nanocamadas de talco na concentração de 1,80 g/L, ambas com ampliações de 500 vezes.

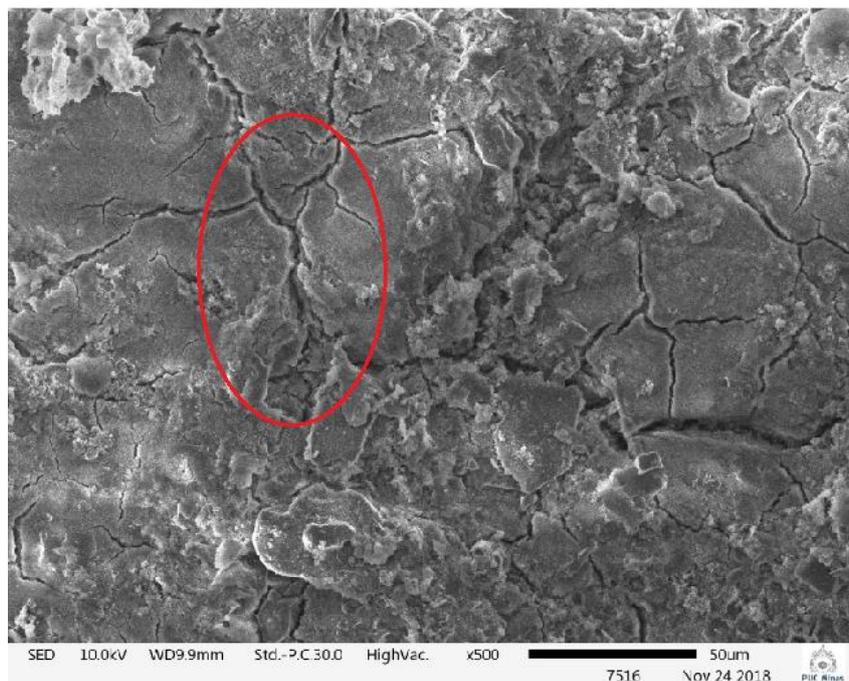


Figura 34 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA com nanocamadas de talco com concentração 1,80 g/L de estrutura irregular e rugosa. Trincas em destaque na imagem.

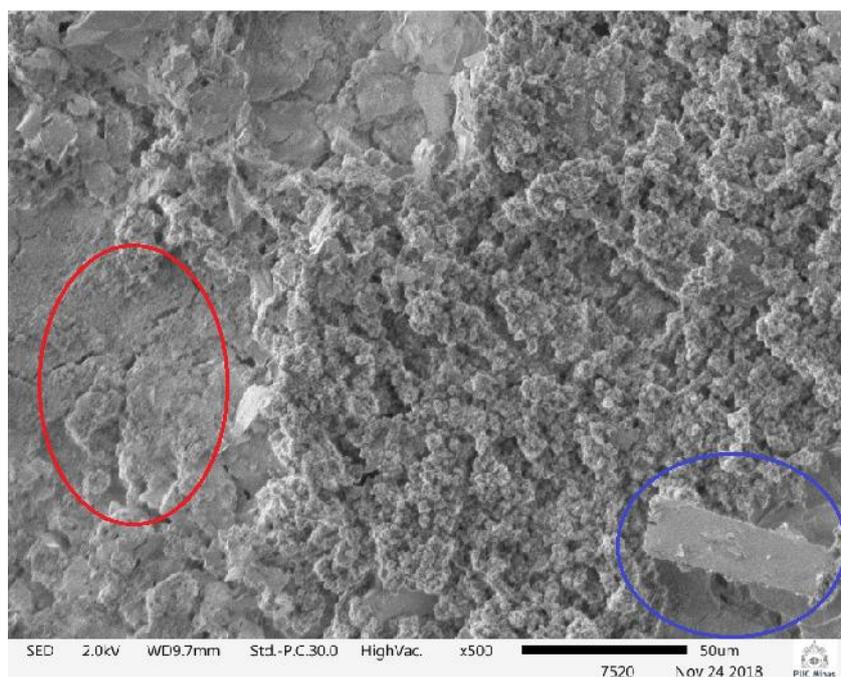


Figura 35 - Micrografia ao MEV ampliada 500 vezes de HA com nanocamadas de talco com concentração 1,80 g/L de estrutura variante entre irregular/ rugosa e a compacta/ rugosa. Em destaque na imagem: trincas (em vermelho) e um possível floco de talco (em azul).

A Figura 34 apresenta uma estrutura irregular e rugosa, enquanto a Figura 35 apresenta uma morfologia variante entre a irregular/ rugosa (parte superior à esquerda) e a compacta/ rugosa (parte inferior à direita). Comparando as Figuras 34 e 35 percebe-se

que há uma predominância de trincas na Figura 34 (destaque em círculos vermelhos). Tal observação indica que a redução das trincas devido à incorporação de nanocamadas de talco na concentração de 1,8 g/L se deu de forma esporádica. Uma explicação para tal fato é que os filmes esfoliados nesta concentração eram visivelmente menos aderentes do que o restante das concentrações analisadas, sendo necessário um maior cuidado no manuseio destas amostras para que não ocorresse queda de parte do depósito. Assim, a Figura 35 provavelmente apresenta depósitos em que o talco se aderiu melhor à matriz de HA, sendo possível observar mesmo nesta imagem como a integração do talco à matriz de HA se deu de forma heterogênea, uma vez que a parte esquerda superior da Figura 35 se assemelha à Figura 34, enquanto que o restante da imagem apresenta uma estrutura diferente com a presença, inclusive, de um suposto floco de talco marcado em azul na imagem.

Além disso, relacionando as Figuras 34 e 35 com a Figura 32, pode-se inferir que a diminuição das trincas foi mais acentuada e mais homogênea na concentração de 0,9 g/L do que na concentração de 1,80 g/L, possivelmente devido ao excesso de nanocamadas de talco na concentração de 1,8 g/L.

A agregação de nanomateriais de alta concentração na matriz de HA foi relatada por Bao e colaboradores [86] que notaram uma aglomeração dos nanotubos de carbono de parede simples (*Single-walled carbon nanotubes* - SWCNTs) ao se elevar a concentração dos mesmos de 0,5 mg/mL para 1,0 mg/mL.

A Figura 36 apresenta uma ampliação de 2500 vezes da região de estrutura compacta e rugosa da Figura 35.

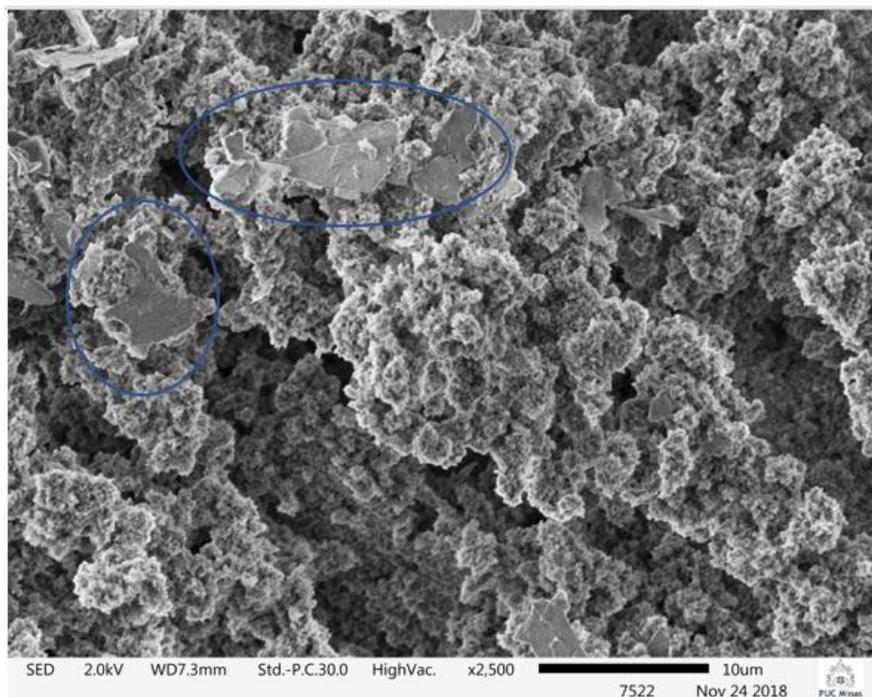


Figura 36 - Micrografia ao MEV ampliada 2500 vezes de HA com nanocamadas de talco na concentração de 1,80 g/L. Em destaque, possíveis flocos de talco.

Na Figura 36, observa-se a presença de flocos no formato de placas de comprimentos aproximadamente iguais a 10 µm e 21 µm (em destaque em azul), o que indica que a estrutura compacta e rugosa da Figura 35 é formada por camadas de talco esfoliadas de menores dimensões laterais, quando comparadas às dimensões laterais do floco encontrado na Figura 35 (de comprimento igual a 60,0 µm, aproximadamente).

Análise de EDS também foi realizada para esta condição de deposição e, mais uma vez, indicou a incorporação do talco (nanométrico, neste caso) à matriz de HA.

Além das imagens ao MEV para analisar a morfologia dos depósitos, também foram realizadas microfotografias ao MEV da espessura dos depósitos de hidroxiapatita. A Figura 37 apresenta uma das imagens obtidas e os valores encontrados para espessura do filme.

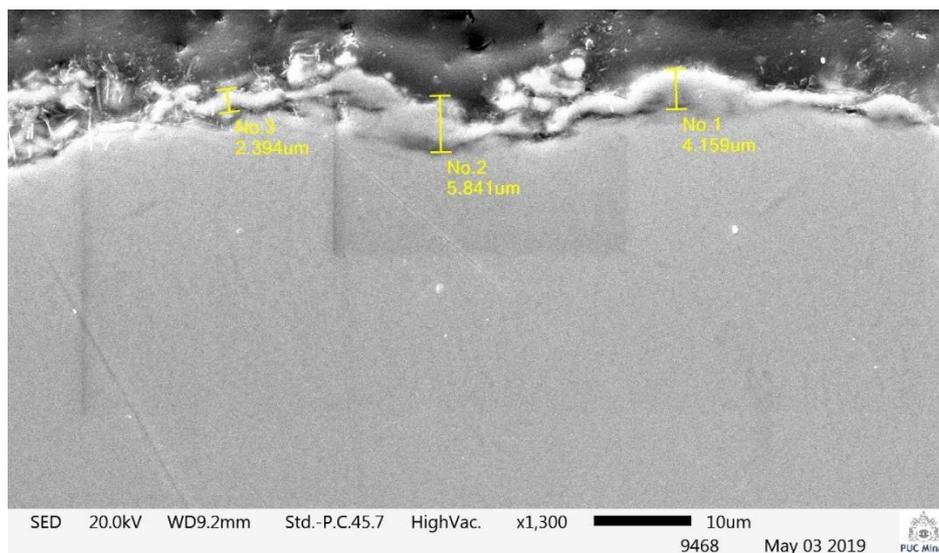


Figura 37 - Imagem ao MEV da espessura do depósito de HA+talco esfoliado na concentração de 1,80 g/L

Analisando a Figura 37, tem-se que a espessura média do depósito de HA é de aproximadamente 4,0 μm .

4.3 Difração de Raios X (DRX)

Difratogramas correspondentes à amostra de HA e ao talco puro são apresentados a seguir.

Analisando as Figuras 38 e 39, percebe-se que tanto a HA quanto o talco da pedra-sabão apresentaram padrões de difração com picos definidos e estreitos, o que caracteriza que os materiais possuem estruturas cristalinas definidas não sendo, portanto, materiais amorfos [90].

A Figura 38 apresenta o espectro de DRX da hidroxiapatita depositada nas seguintes condições: solução eletrolítica composta por 5×10^{-3} M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3×10^{-3} M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 2% H_2O_2 , com 15 minutos de eletrodeposição e $\text{pH} = 4,62$.

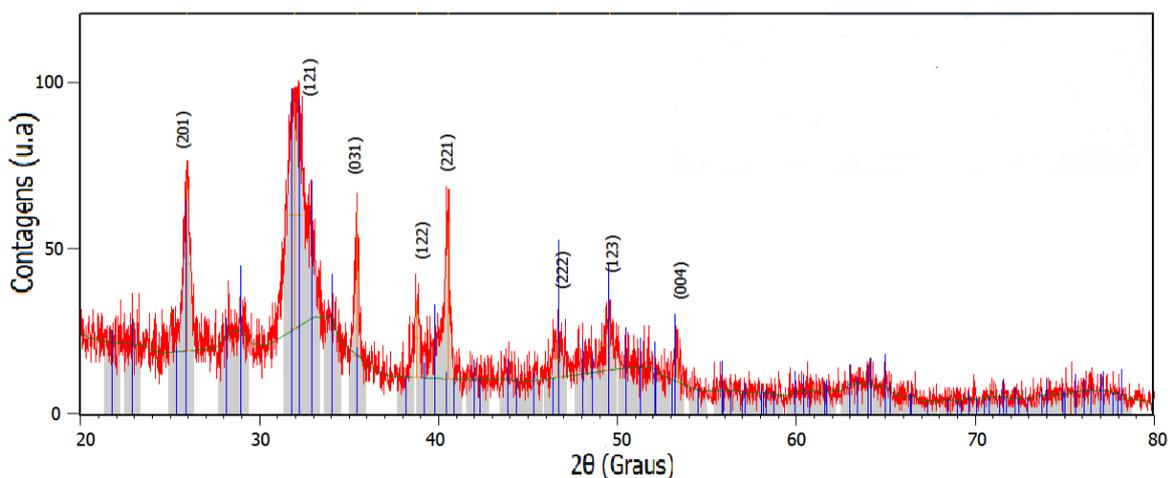


Figura 38 – Espectro de DRX das amostras de hidroxiapatita pura.

O espectro de DRX da amostra depositada é mostrado em vermelho, já os picos característicos da difração da HA segundo a ficha cristalográfica PDF 96-901-1094 são representados pelas linhas azuis.

Como pode-se observar no gráfico, há correspondência entre o pico de maior intensidade da hidroxiapatita presente no padrão cristalográfico PDF 96-901-1094 e o pico mais intenso do difratograma da amostra, sendo ele referente ao plano cristalográfico (121). Além disso, a partir da comparação entre os demais picos característicos da HA encontrados na ficha cristalográfica PDF 96-901-1094 com os picos da amostra, pode-se inferir que o espectro obtido corresponde à hidroxiapatita, corroborando a análise EDS.

A Figura 39 apresenta o espectro de DRX da amostra de talco em pó da pedra-sabão utilizada no processo de esfoliação em fase líquida.

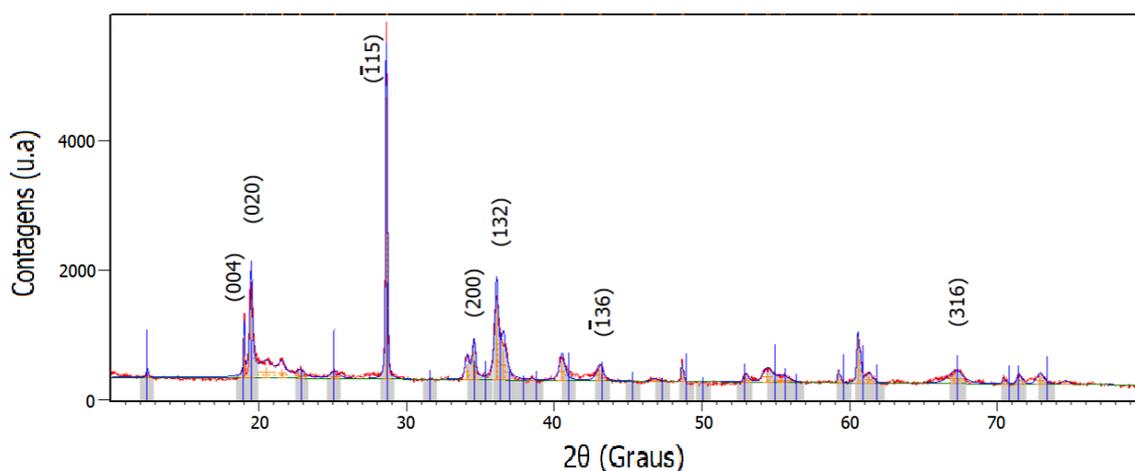


Figura 39 - Espectro de DRX das amostras de talco em pó da pedra-sabão.

Na Figura 39, o difratograma da amostra de talco em pó da pedra-sabão é mostrado em vermelho e os picos da ficha cristalográfica PDF 00-002-0569 referentes ao padrão de difração do talco em pó da pedra-sabão correspondem às linhas azuis.

Do mesmo modo que na análise de DRX da hidroxiapatita, observa-se pela Figura 39 que o pico de maior intensidade presente na ficha cristalográfica PDF 00-002-0569 coincide com o pico mais intenso da amostra de talco pedra-sabão, sendo este pico referente ao plano cristalográfico ($\bar{1}15$). Além disso, comparando os demais picos percebe-se a correspondência entre os picos do espectro experimental com os picos do padrão de difração do talco pedra-sabão (ficha PDF 00-002-0569). Com isso, conclui-se que o material analisado é referente a uma amostra de talco pedra-sabão, tal como indicava a análise EDS.

4.4 Ensaios de desgaste

Ensaios de desgaste foram realizados para o titânio lixado e atacado em HF, para os filmes de HA pura e para amostras de HA com incorporação de nanocamadas de talco, sendo que os parâmetros para obtenção dos filmes foram: solução eletrolítica composta por 5×10^{-3} M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3×10^{-3} M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 2% H_2O_2 , com 15 minutos de eletrodeposição e pH= 4,62. Tal solução também foi utilizada como solvente para esfoliação do talco em pó, nas concentrações 0,90 g/L e 1,80 g/L, sonicada por 3 horas. A concentração de 0,07 g/L, na qual a esfoliação do talco não foi observada, também foi analisada.

Os testes de desgaste avaliaram os coeficientes de atrito e as trilhas de desgaste das amostras, que são importantes fatores para avaliação da resistência ao desgaste de um material, uma vez que quanto menor o coeficiente de atrito, menor será a força contrária ao deslizamento entre superfícies e, portanto, maior será a resistência ao desgaste do material. Já as trilhas de desgaste indicam de forma qualitativa ou semi-quantitativa os tipos de desgaste dos filmes analisados [59], [60], [87], [88], [91].

A Figura 40 apresenta os resultados obtidos para os ensaios de desgaste da HA pura e do substrato de titânio.

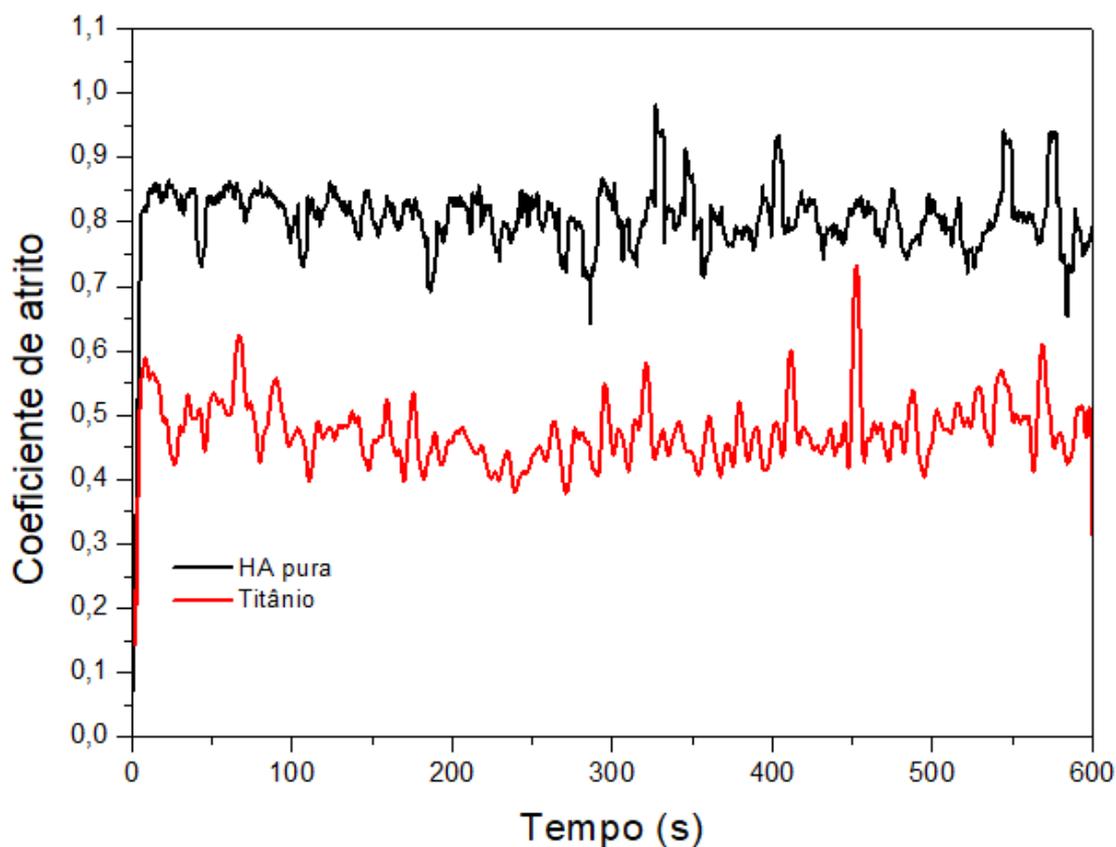


Figura 40 - Coeficiente de atrito da hidroxiapatita pura (curva preta) e do substrato de titânio (curva vermelha) em função do tempo (em segundos).

Na Figura 40 observa-se a variação do coeficiente de atrito em função do tempo do substrato de titânio e dos filmes de HA pura. Analisando as curvas, obtém-se os valores em torno de 0,80 e 0,47 para os coeficientes médios de atrito da HA pura e do substrato de titânio, respectivamente. Tais valores encontram-se em concordância com a literatura, uma vez que os coeficientes de atrito encontrados para a HA pura variam entre 0,68 a 0,80 e do titânio, entre 0,30 e 0,60 [92], [93], [94], [95], [96], [23].

A Figura 41 apresenta imagens ao MEV das trilhas de desgaste do titânio e da HA pura.

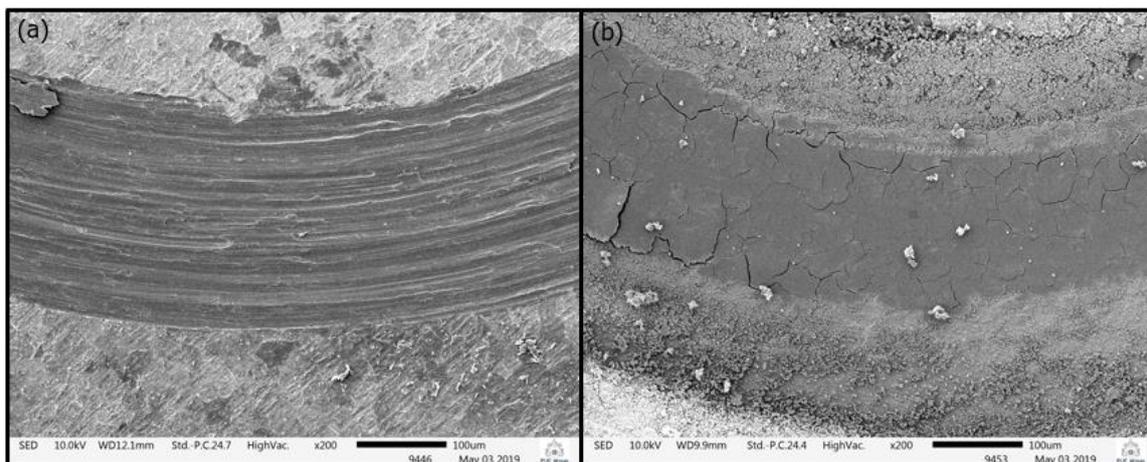


Figura 41 - Imagem ao MEV da trilha de desgaste de: (a) Ti; (b) HA.

Como pode-se observar na Figura 41 (a) o titânio, por ser um material dúctil, apresenta deformação de asperezas, sendo a mesma caracterizada pela presença de material esmagado ao longo da trilha, o qual se forma devido à deformação plástica de saliências (ou asperezas) que entram em contato com a contra-parte e partículas de terceiro corpo. A colisão e a consequente deformação plástica de asperezas leva à remoção de material e riscos no material mais macio, como é o caso do substrato de titânio deste trabalho [88]. Desse modo, a deformação de asperezas apresentada pelo titânio indica a ocorrência de desgaste abrasivo. Observou-se visualmente a contra-parte de alumina, a qual apresentou material titânio aderido, indicando também um desgaste adesivo neste material. Como a HA é um material duro e frágil, na Figura 41 (b) não se observou deformação por asperezas e somente apresentou uma planificação da morfologia. Análises de EDS da amostra de HA apresentada na Figura 42 (b), demonstra que o depósito de HA não foi totalmente removido no teste de desgaste, indicando uma melhora da resistência ao desgaste devido ao recobrimento da superfície com HA. A Figura 42 (a) apresenta a região onde o ensaio EDS foi realizado.

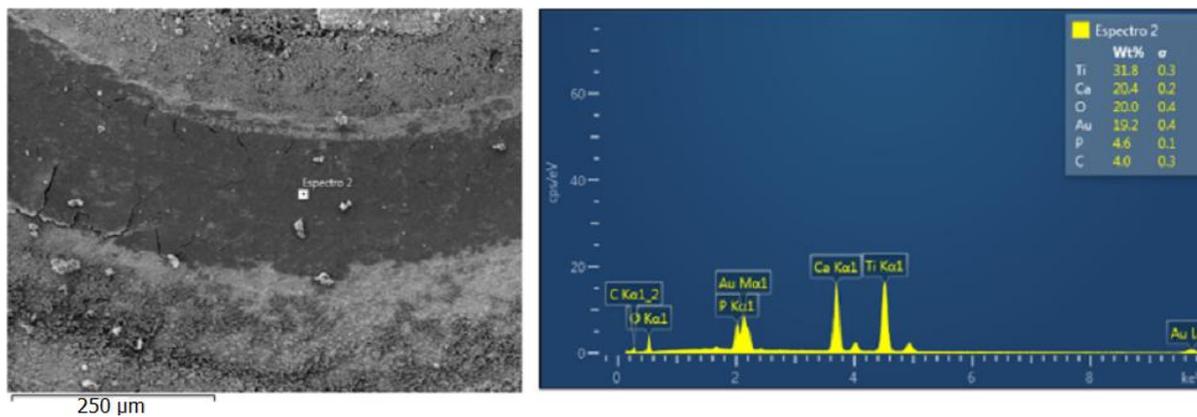


Figura 42 - (a) Imagem ao MEV da HA; (b) EDS da HA.

Assim, apesar de o coeficiente de atrito da HA ser maior que o coeficiente de atrito do titânio, o depósito de HA agiu como uma “proteção” ao substrato de titânio, aumentando a resistência ao desgaste deste material.

A Figura 43 apresenta os resultados de coeficiente de atrito em função do tempo obtidos para os ensaios de desgaste da HA pura e dos filmes de HA com incorporação de talco em diferentes concentrações. Filmes de HA com incorporação de 0,90 g/L de talco é apresentada na curva verde, filmes com incorporação de 1,80 g/L de talco é apresentada pela curva vermelha. Resultados referentes à concentração de talco não esfoliado igual a 0,07 g/L também são apresentados na Figura 43 (curva azul).

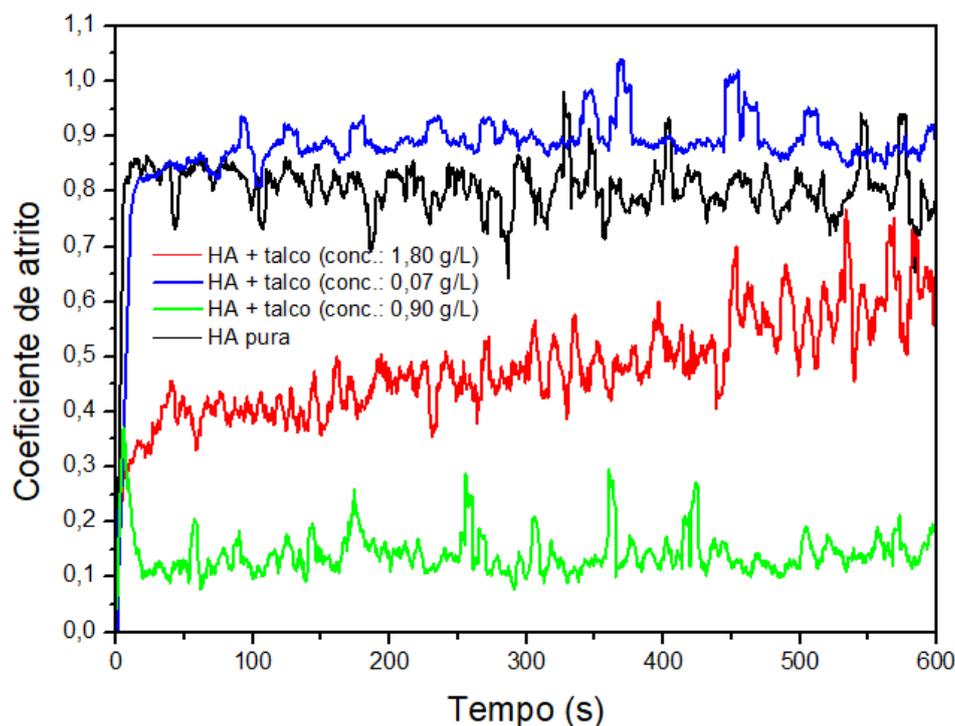


Figura 43 - Coeficiente de atrito em função do tempo dos filmes de hidroxiapatita pura (curva preta) e de HA com incorporação de talco nas concentrações: 0,90 g/L (curva verde), 1,80 g/L (curva vermelha) e 0,07 g/L (curva azul).

Filmes de HA com incorporação de 0,90 g/L de talco esfoliado apresentam valores médios de coeficiente de atrito em torno 0,20, o que corresponde a uma redução apreciável de 75% do coeficiente de atrito médio comparado à HA pura ($\mu = 0,80$). Este resultado indica um aprimoramento das propriedades mecânicas da HA devido à adição de talco que, possivelmente forma uma interligação da matriz e ainda confere uma redução do atrito possivelmente pelo fato de o talco esfoliado apresentar propriedades lubrificantes [15].

Pela Figura 43 percebe-se que o coeficiente de atrito dos filmes de HA com incorporação de 1,80 g/L inicia a baixos valores e aumenta ao longo do teste, chegando a valores próximos ao do titânio, dando indício de que o filme degradou ao longo do experimento. Adicionalmente, os filmes de HA nesta concentração se apresentaram visivelmente menos aderentes à matriz (tal afirmação é baseada no fato de que o manuseio destas amostras poderia gerar buracos nas mesmas, enquanto que este problema não era observado nas demais concentrações analisadas e nem mesmo nos depósitos de HA pura). Imagens ao MEV dos filmes de HA com incorporação de talco na concentração de 1,80 g/L (Figura 44 (c)) confirmam a hipótese de que o filme degradou durante o ensaio, já que as imagens apresentam deformações de asperezas características do substrato de

titânio. Imagina-se que a alta concentração de talco na matriz pode promover sua desintegração quando da aplicação do desgaste.

Redução do coeficiente de atrito de uma matriz devido à presença de nanomateriais foi relatada por Shi e colaboradores [97] ao incorporarem nanopartículas de alumina em epoxy. Já o aumento do coeficiente de atrito devido à elevação da quantidade de material esfoliado foi descrito em Neto e colaboradores [98] que incorporaram caulinita (KAO) nanométrica a uma matriz polimérica e observaram que, entre as amostras com 0% e 1% em peso de KAO, o coeficiente de atrito era menor nas amostras com presença de caulinita enquanto que, aumentando a porcentagem de KAO para 3% em peso, o coeficiente de atrito se elevava.

Comparando os resultados obtidos para a HA pura e HA com talco na concentração 0,07 g/L, percebe-se que houve um comportamento similar entre ambas as cuvas. Tal resultado pode ter ocorrido porque a concentração de 0,07 g/L não levou à esfoliação efetiva do talco incorporando, provavelmente, micropartículas em uma concentração muito baixa à matriz de HA e, portanto, não alterando significativamente o coeficiente de atrito da HA pura, uma vez que o coeficiente de atrito da HA pura é em torno de 0,80 e da HA com incorporação de talco na concentração de 0,07 g/L é igual a 0,88.

A seguir, a Figura 44 apresenta imagens ao MEV das trilhas de desgaste dos filmes compostos de hidroxiapatita com incorporação de: 0,07 g/L de talco não esfoliado, 0,90 g/L e 1,80 g/L de talco esfoliado, respectivamente.

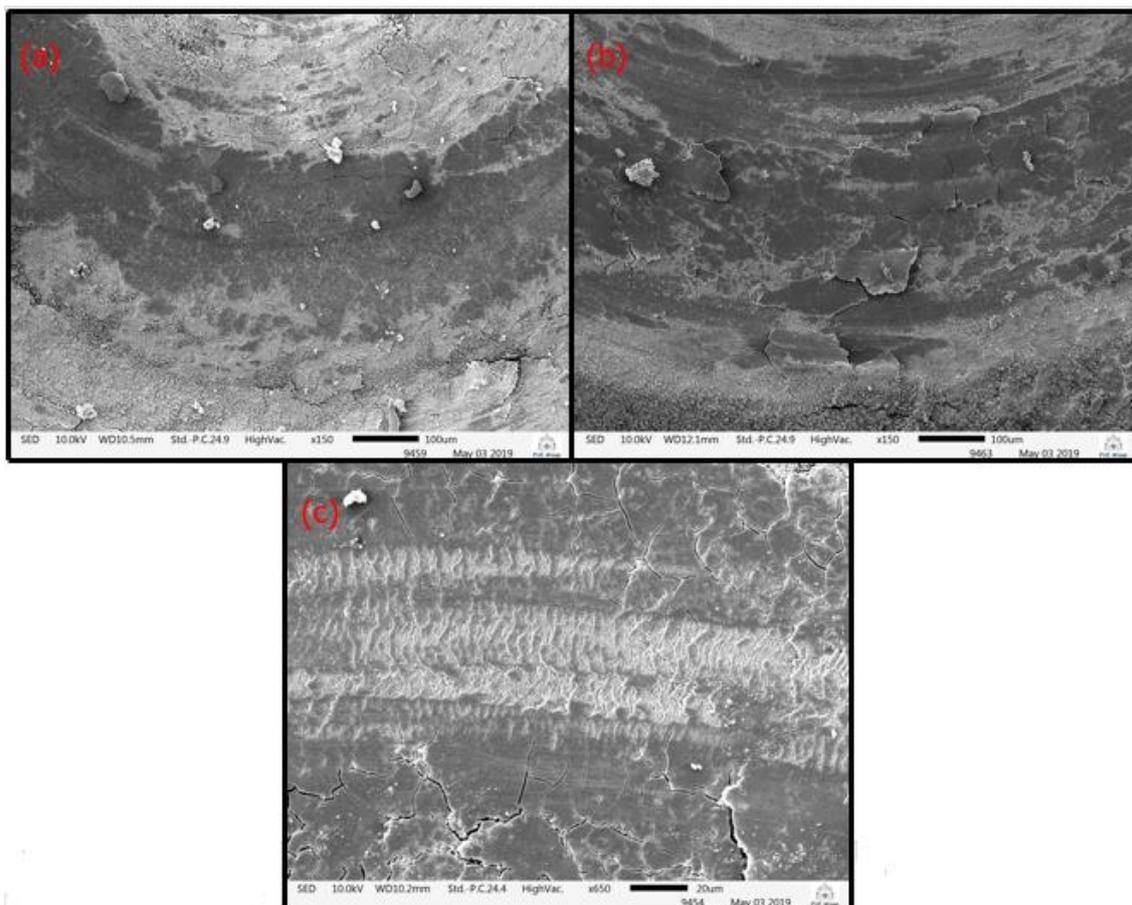


Figura 44 - Imagens ao MEV das trilhas de desgaste dos filmes de HA com diferentes concentrações de talco, sendo: (a) 0,07 g/L de talco não-esfoliado; (b) 0,90 g/L de talco esfoliado e (c) 1,80 g/L de talco esfoliado.

Na Figura 44 (a) apresenta-se uma imagem ao MEV da trilha de desgaste de uma amostra de HA com incorporação de talco não-esfoliado na concentração de 0,07 g/L. A similaridade entre as trilhas de desgaste das Figuras 44 (a) e 41 (b) indica que a resistência ao desgaste dos filmes de HA e das amostras depositadas nesta condição não se alterou de forma significativa, o que pôde ser confirmado a partir da análise do coeficiente de atrito obtido para ambas as condições de deposição analisadas.

Na Figura 44 (c) observa-se a presença de um ligeiro desgaste plástico por asperezas na trilha composta por HA com incorporação de talco esfoliado na concentração de 1,80 g/L, o que indica que realmente houve uma desintegração da matriz de HA ao se adicionar talco nanoestruturado em alta concentração, fazendo com que o substrato de titânio seja atingido pelo movimento da esfera de alumina, reduzindo a proteção imposta pela presença HA e diminuindo, portanto, a resistência ao desgaste das amostras depositadas nesta condição, quando comparadas com filmes de HA com talco esfoliado na

concentração de 0,90 g/L, a qual corresponde à Figura 44 (b). A Figura 45 apresenta uma análise EDS realizada na trilha de desgaste da Figura 44 (c), indicando que o substrato de titânio foi atingido no ensaio de desgaste das amostras de HA com incorporação de talco na concentração de 1,80 g/L.

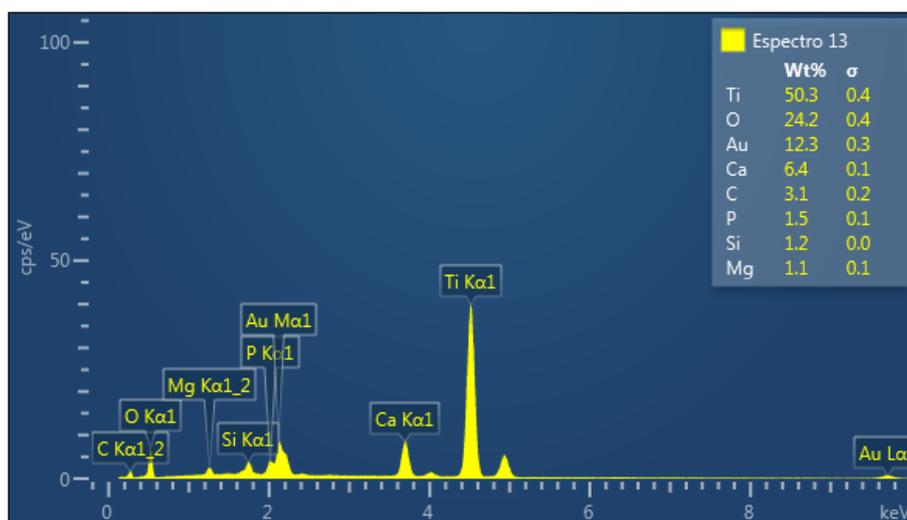


Figura 45 - Análise EDS da trilha de desgaste da Figura 44 (c) composta por HA com incorporação de talco esfoliado na concentração de 1,80 g/L.

Os resultados obtidos para as trilhas de desgaste corroboraram a análise dos coeficientes de atrito das amostras de HA pura e de HA com incorporação de talco em diferentes concentrações: a adição de talco não-esfoliado não alterou a resistência ao desgaste significativamente e que, entre as concentrações que esfoliaram o talco, os depósitos com 0,90 g/L de talco apresentaram maior resistência ao desgaste, uma vez que a adição de talco à concentração de 1,80 g/L parece desintegrar a matriz de HA.

4.5 Polarização potenciodinâmica

A Figura 46 apresenta a curva de polarização do substrato de titânio lixado e atacado com HF e da hidroxiapatita pura. Já a Figura 47 compara as curvas obtidas para filmes de HA pura e de HA com incorporação de nanocamadas de talco nas concentrações 1,80 g/L e 0,90 g/L. Também é apresentado, na Figura 47, o resultado obtido para a concentração em que não se observou a esfoliação do talco, 0,07 g/L.

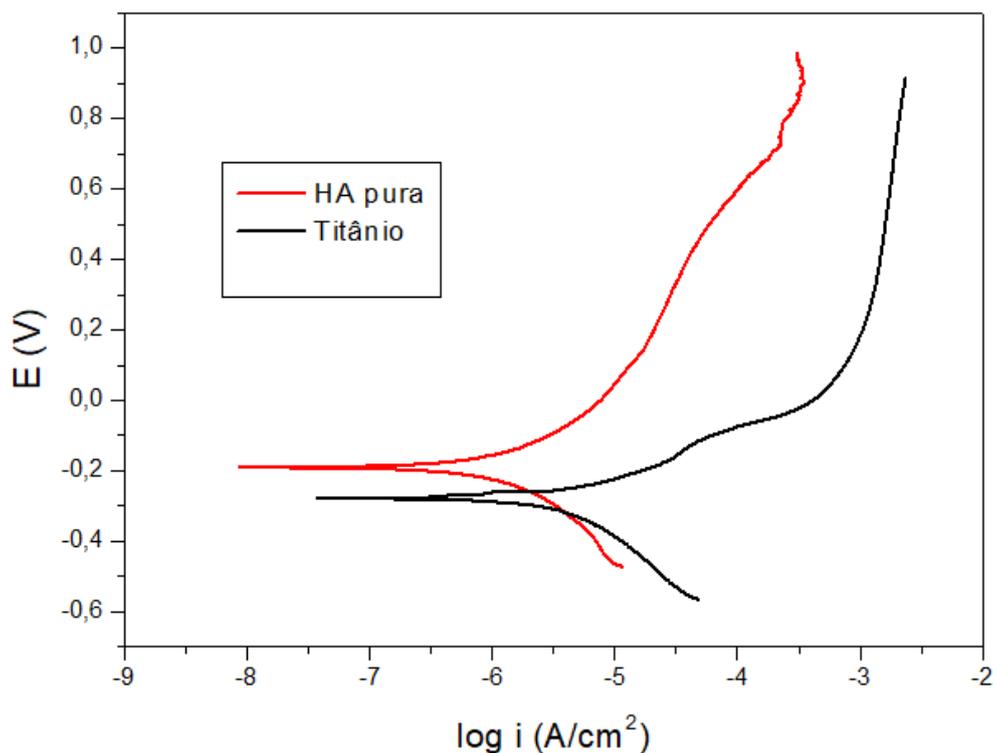


Figura 46 - Curvas de polarização das amostras de Ti puro (curva preta) e HA pura com os seguintes parâmetros: solução de 5×10^{-3} M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 3×10^{-3} M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 2% H_2O_2 , 15 minutos de eletrodeposição e $\text{pH} = 4,62$ (curva vermelha).

Pela Figura 46 percebe-se que a curva de polarização do titânio apresenta um comportamento anódico ativo entre $3,0 \times 10^{-8}$ A/cm² a $3,0 \times 10^{-4}$ A/cm² (aproximadamente) e comportamento anódico passivo a partir deste último valor de corrente apresentando, ainda, um potencial de corrosão (E^*) em torno de -0,279 V.

Comparando as curvas de polarização dos filmes de HA pura e do substrato de titânio da Figura 46 observa-se que, para um mesmo potencial, as densidades de corrente das amostras de HA são menores que os valores encontrados para o Ti, o que sugere que a HA apresenta uma proteção à corrosão superior aos discos de titânio avaliados. Além disso, o potencial de corrosão encontrado para as amostras de HA pura - em torno de -0,190 V - é superior ao E^* dos substratos de titânio, demonstrando que a HA é um material mais nobre (mais resistente à corrosão) que o titânio. É importante ressaltar que os valores dos potenciais de corrosão obtidos para as amostras analisadas são consistentes com o que foi encontrado na literatura uma vez que, segundo Zhong e colaboradores [99], os potenciais de corrosão do titânio e da hidroxiapatita são -0,302 V e -0,133 V, respectivamente.

A seguir, além da curva de polarização da HA pura, a Figura 47 apresenta os resultados obtidos para os filmes com incorporação de talco nas concentrações 1,80 g/L, 0,90 g/L e 0,07 g/L (talco não esfoliado).

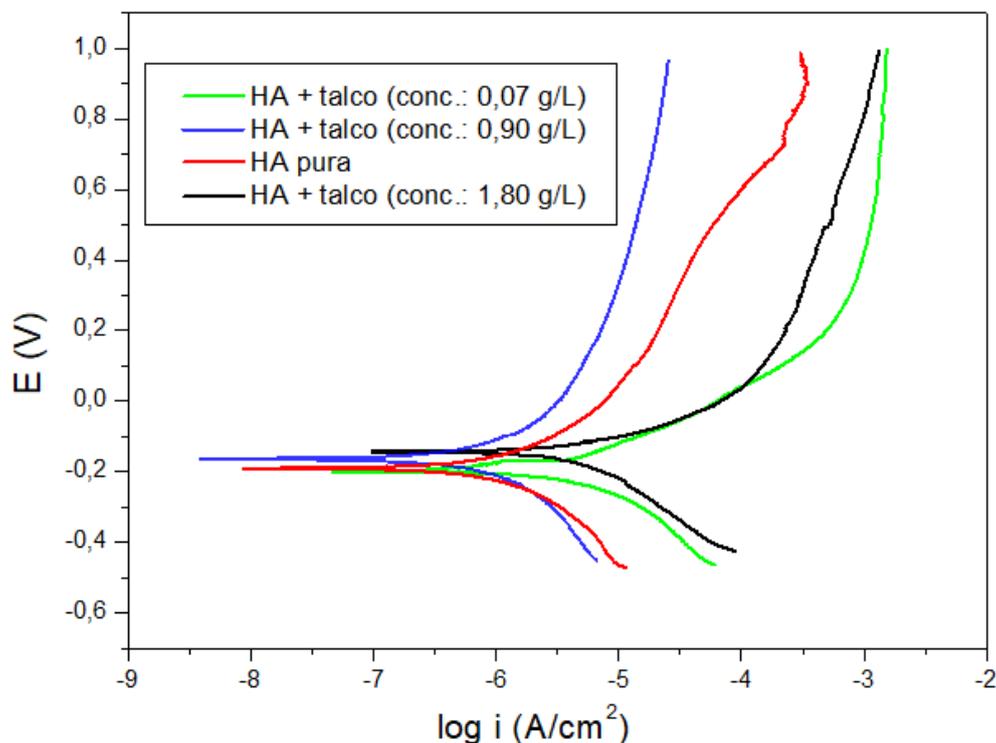


Figura 47 - Curvas de polarização das amostras de HA pura (curva vermelha), HA com incorporação de talco não-esfoliado na concentração 0,07 g/L (curva verde), HA com nanocamadas de talco nas concentrações 0,90 g/L (curva azul) e 1,80 g/L (curva preta).

Apesar de os potenciais de corrosão apresentarem valores similares percebe-se que, para um mesmo potencial, as densidades de corrente dos filmes com incorporação de talco não esfoliado na concentração de 0,07 g/L são superiores aos filmes compostos por HA pura gerando, portanto, depósitos menos resistentes à corrosão. Tal fato também é observado nas amostras com incorporação de nanocamadas de talco na concentração igual a 1,80 g/L em que, mesmo o potencial de corrosão tendo se elevado para -0,164V, as densidades de corrente também se apresentaram superiores às densidades de corrente dos filmes de HA pura, para um mesmo potencial. Esse comportamento pode ser devido às trincas e/ou poros presentes nos filmes e identificadas nos ensaios de MEV, as quais são prejudiciais à resistência à corrosão de materiais.

Já os filmes compostos de HA com incorporação de nanocamadas de talco na concentração de 0,90 g/L apresentaram potencial de corrosão superior e menores

densidades de corrente que as amostras de HA pura, indicando que a adição de nanocamadas de talco na matriz de HA na concentração de 0,90 g/L aumentou a resistência à corrosão dos filmes, o que pode ter ocorrido devido à diminuição das trincas nos filmes depositados nesta condição, como evidenciado pela análise de MEV.

4.6 Ensaios de biocompatibilidade

Ensaios de biocompatibilidade dos substratos de titânio lixados e atacados, de amostras de HA pura e de revestimentos de HA com incorporação de talco em diferentes concentrações (1,80; 0,90 e 0,07 g/L) foram analisados e comparados ao grupo de controle (osteoblastos) com relação à viabilidade celular e à atividade de ALP. A Figura 48 apresenta os resultados do ensaio de viabilidade celular para períodos de incubação de 3 e 7 dias.

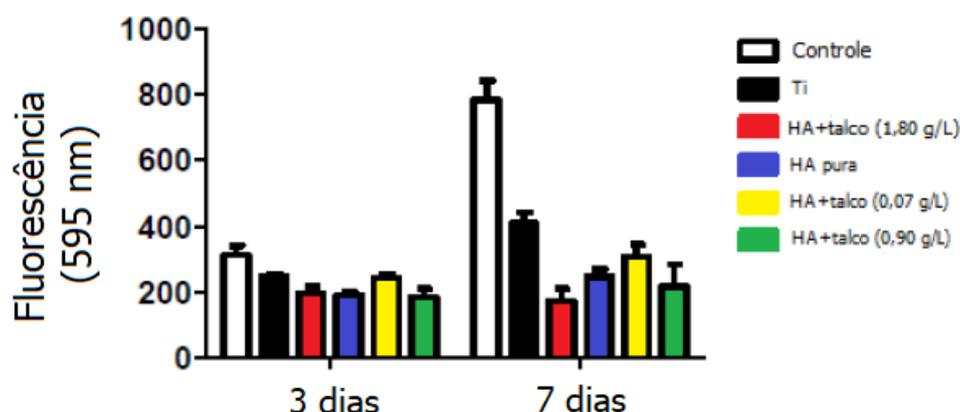


Figura 48 - Viabilidade celular de osteoblastos das amostras de controle (em branco), de titânio (em preto), de HA pura (em azul) e de HA + talco nas concentrações 1,80 g/L (em vermelho) e 0,90 g/L (em verde). A concentração de talco não esfoliado igual a 0,07 g/L também é apresentada em amarelo. Períodos de incubação: 3 dias e 7 dias.

A partir da Figura 48 percebe-se que entre as condições analisadas, o titânio lixado e atacado apresentou a maior viabilidade celular tanto para 3 quanto para 7 dias de incubação. Nota-se também que o Ti, a HA pura e HA com incorporação de talco não-esfoliado na concentração de 0,07 g/L apresentaram um aumento de viabilidade celular no 7º dia, sendo este maior nas amostras de HA+talco (0,07 g/L). Já as amostras de HA com nanocamadas de talco incorporadas nas concentrações 0,90 e 1,80 g/L não apresentaram mudança significativa na viabilidade celular entre 3 e 7 dias, isso porque a variação estatística representada pela barra de erros desses filmes apresentaram intervalos

coincidentes. A elevação da viabilidade celular de osteoblastos está relacionada com o processo de fixação, proliferação e sobrevivência celular, enquanto que a manutenção da viabilidade celular se relaciona com a estabilização da atividade da célula, indicando uma manutenção celular [67].

Para o ensaio de viabilidade celular de osteoblastos, resultados semelhantes aos apresentados na Figura 48 foram alcançados por Mota [23], que demonstrou que o substrato de titânio apresenta maior viabilidade celular do que os filmes de HA pura e de HA com incorporação de talco não-esfoliado nas concentrações 10 g/L, 40 g/L e 80 g/L. Porém, no trabalho citado, a incorporação de talco não favoreceu a viabilidade celular a qual, em comparação com os resultados aqui apresentados, se mostrou extremamente baixa para o período de incubação de 7 dias. Desse modo, os resultados obtidos por Mota [23] e por este trabalho para os ensaios de viabilidade celular indicam que a incorporação de talco em baixa concentração ou em nanocamadas favoreceu a proliferação e manutenção celular de osteoblastos.

A Figura 49 apresenta o ensaio de atividade de ALP para as mesmas condições analisadas na Figura 48, que são: grupo de controle, titânio lixado e atacado, HA pura e com talco incorporado nas concentrações 1,80; 0,90; e 0,07 g/L.

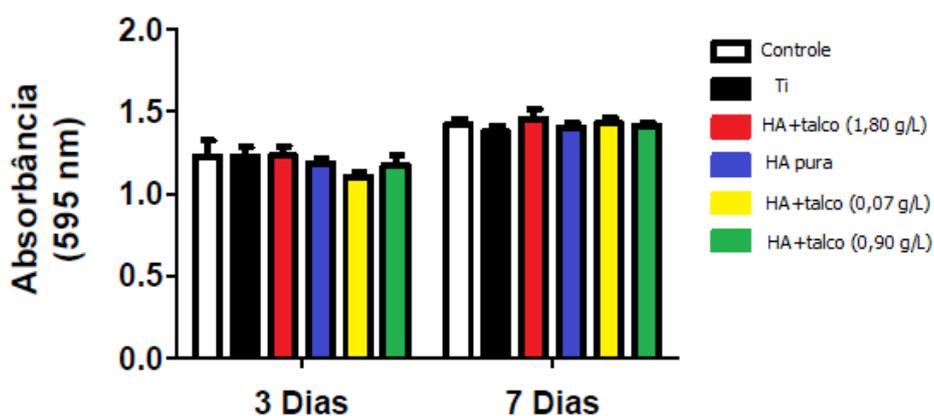


Figura 49 - Atividade de ALP das amostras de controle (em branco), de titânio (em preto), de HA pura (em azul) e de HA + talco nas concentrações 1,80 g/L (em vermelho) e 0,90 g/L (em verde). A concentração de talco não esfoliado igual a 0,07 g/L também é apresentada em amarelo. Períodos de incubação: 3 dias e 7 dias.

A partir da Figura 49 percebe-se que após 3 dias de ensaio, as amostras de titânio lixado e atacado, de HA pura e HA com incorporação de nanocamadas de talco nas concentrações 1,80 g/L e 0,90 g/L apresentaram níveis de atividade de ALP similares,

sendo que somente os filmes de HA com incorporação de talco não-esfoliado na concentração de 0,07 g/L exibiram atividade de ALP inferior às demais condições analisadas. Nota-se também que a atividade de ALP de todos os filmes se elevou e possuíram comportamento análogo ao se aumentar o tempo de incubação de 3 para 7 dias, sendo que os valores encontrados de atividade de ALP para todas as amostras encontraram-se próximos ao valor de controle e os filmes de HA com incorporação de talco na concentração de 1,80 g/L apresentaram atividade de ALP ligeiramente superior às demais condições de teste, após 7 dias de ensaio.

Para o ensaio de atividade de ALP, resultados semelhantes aos apresentados na Figura 49 foram alcançados por Pei e colaboradores [69] que, ao incorporarem nanotubos de carbono (CNT) à matriz de HA depositada em substrato de titânio observaram um aumento da atividade de ALP para as amostras de titânio, HA pura e HA com incorporação de CNT a diferentes concentrações ao se elevar o tempo de ensaio de 1 para 2 dias e de 2 para 4 dias.

Como o aumento da atividade de ALP está associada com a diferenciação de osteoblastos, sendo esses os responsáveis pela mineralização da matriz óssea, os resultados mostrados na Figura 49 indicam que substratos de titânio com depósitos de HA e incorporação de talco em baixa concentração (0,07 g/L) ou esfoliado (concentração de 1,80 e 0,90 g/L) favorecem a formação de tecido ósseo [1], [69].

4.7 Espectroscopia de Força

Curvas de força foram feitas para a hidroxiapatita pura e para a melhor condição de esfoliação do talco, sendo esta referente à concentração de 0,90 g/L. A Figura 50 apresenta os resultados obtidos.

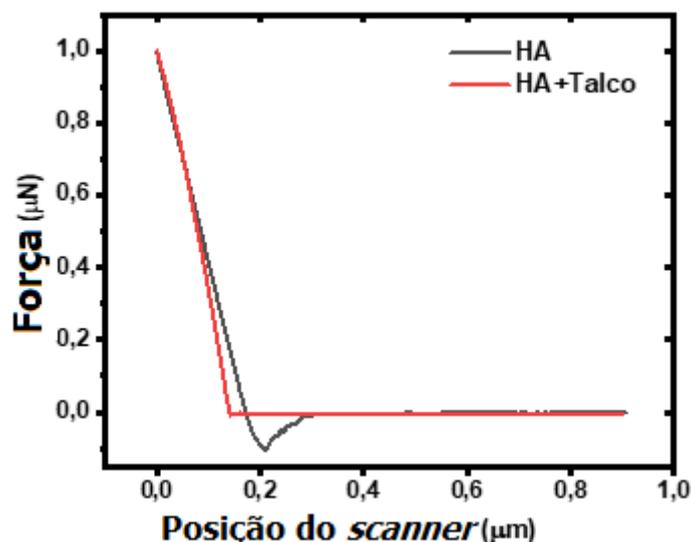


Figura 50 - Curva de força da HA pura (em preto) e da HA com incorporação de nanocamadas de pó de talco na concentração 0,90 g/L (em vermelho).

A Figura 50 apresenta a curva de retração, tanto da amostra de HA pura (em preto) quanto da amostra de HA com incorporação de talco na concentração de 0,90 g/L (em vermelho).

Comparando as curvas obtidas, observa-se que houve uma redução na adesão dos filmes quando o talco esfoliado na concentração 0,90 g/L foi incorporado à matriz de HA. Assim, o valor da força de adesão (F_a) da amostra de HA pura foi de, aproximadamente, 0,1 μN sendo que, para o filme de HA com incorporação de talco esfoliado (concentração de 0,90 g/L), F_a teve um valor de 0,03 μN .

Ao pressionar a ponta do cantilever contra a superfície de uma amostra obtém-se informações sobre a dureza do material analisado uma vez que, uma menor deflexão da alavanca caracteriza materiais com maiores durezas e, de acordo com a Lei de Hooke, quanto menor a deflexão da alavanca, menor será a força. Portanto, uma amostra de menor adesão apresenta uma dureza mais elevada [74], [77]. Como a F_a da HA + talco (concentração de 0,90 g/L) foi menor, isso indica que a dureza se eleva ao incorporar talco esfoliado na concentração de 0,90 g/L à matriz de HA. Resultado similar foi apresentado por Balamarugan e Maiti [100] que observaram que a dureza de uma matriz polimérica se elevava ao adicionar partículas nanométricas de talco.

A seguir, as Figuras 51 e 52 apresentam, respectivamente, imagens de adesão e deformação feitas no modo *PeakForce* QNM para as mesmas condições de deposição analisadas na Figura 50, ou seja, as imagens apresentam depósitos de hidroxiapatita pura-

Figuras 51 (a) e 52 (a) - e com incorporação de 0,90 g/L de talco esfoliado - Figuras 51 (b) e 52 (b). As imagens foram obtidas com o objetivo de investigar as propriedades de adesão e deformação ao longo da amostra analisada, uma vez que a curva de força da Figura 50 apresenta apenas resultados pontuais [78], [80].

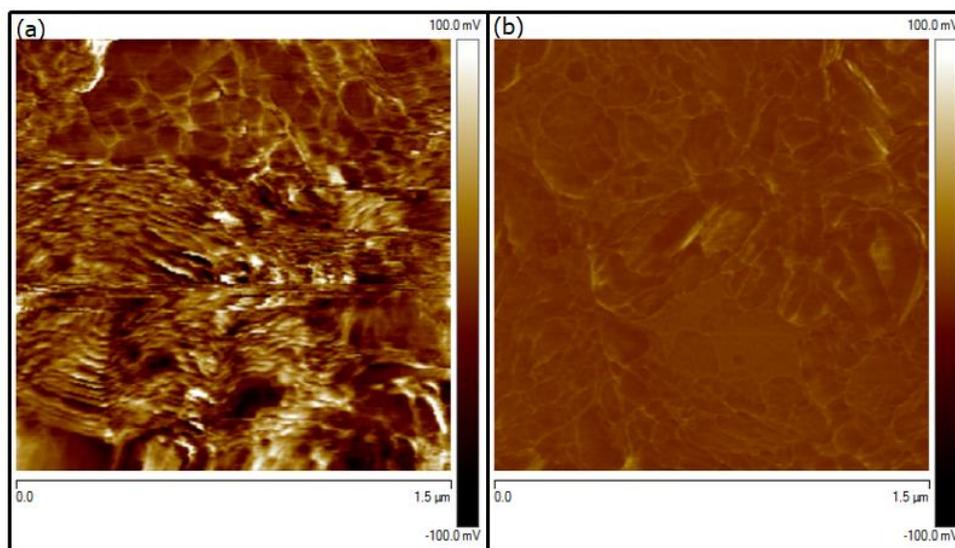


Figura 51 - Imagens de adesão obtidas no modo *PeakForce* QNM, sendo: (a) HA pura; (b) HA com incorporação de nanocamadas de talco na concentração 0,90 g/L.

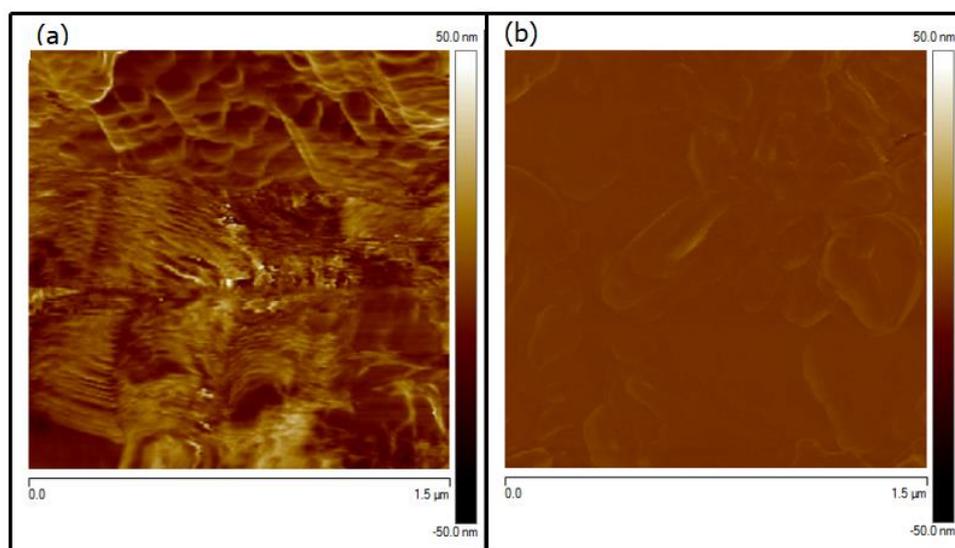


Figura 52 - Imagens de deformação obtidas no modo *PeakForce* QNM, sendo: (a) HA pura; (b) HA com incorporação de nanocamadas de talco na concentração 0,90 g/L.

Para a análise no *PeakForce* QNM, não foram obtidos dados com relação à posição do *scanner* ou área de contato entre a ponta da alavanca e amostra. Além disso, a curva de força no modo *PeakForce* QNM, a qual apresenta valores mais confiáveis para as propriedades mecânicas, por ser obtida a partir de uma varredura da amostra e não apenas

em um ponto da mesma (como é o caso da Figura 50), não foi obtida [74], [76], [78], [80], [83]. Desse modo, a análise das imagens obtidas no *PeakForce* QNM foram feitas de modo qualitativo, a partir da comparação entre os valores e as cores apresentadas nas barras laterais de escalas.

Comparando as imagens da Figura (a) e (b) percebe-se que a Figura 51 (b) apresenta cores mais claras que a Figura 51 (a) indicando que a adesão diminuiu ao adicionar nanocamadas de talco na concentração 0,90 g/L à matriz de HA, coincidindo com o resultado pontual obtido pela análise da curva de força da Figura 50. Nessas imagens, quanto mais branco, maior a força de adesão.

Do mesmo modo, comparando as imagens da Figura 52, nota-se que as cores apresentam tonalidades mais escuras em (a) do que em (b) indicando que a deformação também é reduzida ao se incorporar talco esfoliado na concentração de 0,90 g/L à matriz de HA.

Análises quantitativas no modo *PeakForce* QNM devem ser obtidas para que estes resultados sejam confirmados.

5. Conclusões

Este trabalho utilizou a técnica eletrodeposição no modo pulsado para depositar filmes de hidroxiapatita em substrato de titânio. A fim de incorporar nanocamadas de talco na matriz de hidroxiapatita, o pó de talco obtido da pedra-sabão foi esfoliado pelo método de esfoliação em fase líquida.

As imagens de microscopia óptica e AFM mostraram que o talco em pó da pedra-sabão foi esfoliado na própria solução eletrolítica da HA nas concentrações 1,80 g/L e 0,90 g/L, resultado este confirmado pelas análise AFM, a qual indicou a altura das camadas de talco esfoliado como sendo da ordem de nanômetros. Apenas na concentração de 0,07 g/L não se observou as nanocamadas de talco.

Comparado aos filmes de HA pura, as imagens ao MEV apontaram para uma redução de trincas nas amostras de HA com concentrações de talco iguais a 0,07 g/L e 0,90 g/L e a aleatoriedade das trincas encontradas nos filmes de HA com incorporação de talco na concentração de 1,80 g/L. Já o EDS mostrou que os picos encontrados no ensaio correspondem aos elementos característicos dos materiais analisados: titânio, hidroxiapatita e talco. A comparação entre os espectros de DRX obtidos e os picos característicos dos materiais demonstrou que as amostras analisadas são, de fato, hidroxiapatita e talco pedra-sabão.

Os ensaios de desgaste apontaram que o depósito de HA age como um material de “proteção” ao disco de titânio, evitando que este seja danificado. Os testes de desgaste indicaram também que as amostras de HA com incorporação de talco não-esfoliado (concentração: 0,07 g/L) possuem coeficiente de atrito semelhante aos filmes compostos de HA pura e que, entre as condições em que se obteve talco esfoliado, a concentração de talco igual à 0,90 g/L apresentou a maior resistência ao desgaste.

As curvas de polarização potenciodinâmica indicaram que a HA é um material com maior resistência à corrosão que o titânio, devido às suas menores densidades de corrente e maior potencial de corrosão. Tal análise mostrou também que, entre as condições analisadas de incorporação de talco à matriz de HA, as amostras com concentração de nanocamadas de talco igual a 0,90 g/L apresentaram a melhor resistência à corrosão alcançando, ainda, uma resistência superior aos filmes de HA pura.

Ensaio sobre a biocompatibilidade dos materiais mostraram que o titânio apresenta a maior viabilidade celular tanto para 3 dias quanto para 7 dias de ensaio, sendo este

parâmetro crescente nas amostras de titânio, HA e HA+talco (concentração de 0,07 g/L) e estável nos filmes de HA+talco esfoliado nas concentrações de 0,90 g/L e 1,80 g/L. Observou-se também que todas as amostras analisadas apresentaram um aumento da atividade de ALP do 3º para o 7º dia, indicando que os depósitos são viáveis para a regeneração óssea.

A espectroscopia de força e o *PeakForce* QNM indicaram que os filmes de HA com incorporação de talco nanoestruturado na concentração de 0,90 g/L apresentaram menor adesão e deformação e maior dureza que as amostras compostas por HA pura.

A partir dos ensaios realizados, percebe-se que amostras de HA com incorporação de nanocamadas de talco na concentração de 0,90 g/L apresentaram redução de trincas na sua estrutura, biocompatibilidade e dureza. Tais filmes possuíram, ainda, resistência ao desgaste e resistência à corrosão superior às demais condições de deposição analisadas sendo, portanto, as amostras com melhores resultados para utilização em implantes ortopédicos e dentários.

Referências Bibliográficas

- [1] S. BOSE e S. TARAFDER, “Calcium phosphate ceramic system in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review.,” *Acta biomaterialia*, Elsevier, pp. 1401-1421, 2012.
- [2] R. CHAKRABORTY, K. DAS, S. DAS, S. DHARA, P. SAHA, V. S. SEESALA, M. SENC e S. SENGUPTA, “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,” *Surface and Coatings Technology*, Elsevier, pp. 496-514, 2017.
- [3] J. B. PARK e J. BRONZINO, *Biomaterials: principles and applications*, Boca Raton: CRC Press, 2003.
- [4] A. BALAMURUGAN, S. KANNAN e S. RAJESWARI, “Electrochemical characterization of hydroxyapatite coatings on HNO₃ passivated 316L SS for implant applications,” *Eletrochimica Acta*, pp. 2065-2072, 2005.
- [5] L. FATHYUNES e J. KHALIL-ALLAFI, “Characterization and corrosion behavior of graphene oxide-hydroxyapatite composite coating applied by ultrasound-assisted pulse electrodeposition,” *Ceramic Internacional*, Elsevier, pp. 13885-13894, 2017.

- [6] T. R. RAUTRAY, R. NARAYANAN e K.-H. KIM, “Ion implantation of titanium based biomaterials.,” *Progress in Materials Science, Elsevier.*, pp. 1137-1177, 2011.
- [7] D. T. THAN, P. T. NAM, N. T. PHUONG, L. X. QUEL, N. V. ANH, T. HOANG e T. D. LAM, “. Controlling the electrodeposition, morphology and structure of hydroxyapatite coating on 316L stainless steel,” *Material Science and Engineering C, Elsevier*, pp. 2037-2045, 2013.
- [8] M. S. MUMJITHA e V. RAJ, “Fabrication of biopolymers reinforced TNT/HA coatings on Ti: Evaluation of its Corrosion resistance and Biocompatibility,” *Electrochimica acta, Elsevier*, pp. 1-11, 2015.
- [9] B. D. RATNER e e colaboradores, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.*, Academic Press, 2004.
- [10] F. MARASHI-NAJAFI, J. KHALIL-ALLAFI e M. R. ETMINANFAR, “Biocompatibility of hydroxyapatite coatings deposited by pulse electrodeposition technique on the Nitinol superelastic alloy,” *Material Science and Engineering C, Elsevier*, pp. 278-286, 2017.
- [11] D. GOPI, J. INDIRA e L. KAVITHA, “A comparative study on the direct and pulsed current electrodeposition of hydroxyapatite coatings on surgical grade stainless steel.,” *Surface and Coating Technology, Elsevier*, pp. 2859-2869, 2012.
- [12] M. L. MUNFORD, Eletrodeposição de filmes finos de cobalto em silício tipomonocristalino. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

- [13] L. PÉREZ-MAQUEDA, A. DURAN e J. PÉREZ-RODRÍGUES, “Preparation of submicron talc particles by sonication.,” *Applied Clay Science*, pp. 245-255, 2005.
- [14] K. QUINTAES, “A influência da composição do esteatito (pedra-sabão) na migração de minerais para os alimentos-minerais do esteatito (the influence of the steatite (soapstone) composition in mineral migration to food meal-minerals from steatite).,” *Cerâmica Scielo Brasil*, pp. 298-306, 2006.
- [15] A. B. ALENCAR, A. P. BARBOSA, B. S. ARCHANJO, H. CHARCHAM e B. R. NEVES, “Experimental and theoretical investigations of monolayer and few-layer talc.,” *2D Materials*, IOP Publishing, p. 015004, 2015.
- [16] I. D. BARCELOS e colaboradores, “Infrared Fingerprints of Natural 2D Talc and Plasmon-Phonon Coupling in Graphene-Talc Heterostructures,” *ACS Photonics*, 2018.
- [17] J. COLEMAN e colaboradores, “Guideline for exfoliation, characterization and processing of layered materials produced by liquid exfoliation,” *Chemistry of materials*, pp. 243-255, 2017.
- [18] Y.-y. ZHANG e colaboradores, “Electrochemical deposition of hydroxyapatite coatings on titanium,” *Transactions of nonferrous society of China*, Science Press, pp. 633-637, 2006.
- [19] M. J. JUNIOR, *Titanium: A Technical Guide*, ASM International, 2ª edição., 2000.
- [20] F. W. METALS. [Online]. Available: <https://fwmetals.com/services/resource-library/unalloyed-commercially-pure-cp-titanium1/>. [Acesso em 03 08 2019].

- [21] D. I. E. C. LTDA, “Família de ligas de Cromo-Cobalto , Liga para uso odontológico, Instruções de uso,” Wolfgang, Alemanha.
- [22] W. A. BRANTLEY e colaboradores, “Surface characteristics of hydroxyapatite coatings on nanotubular Ti–25Ta–xZr alloys prepared by electrochemical deposition,” *Surface and Coatings Technology, Elsevier*, pp. 274-280, 2014.
- [23] L. M. MOTA, Deposição e caracterização de revestimentos de hidroxiapatita com incorporação de talco de pedra-sabão. Tese (Mestrado)., Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Física de Materiais. Universidade Federal de Ouro Preto, 2017.
- [24] M. R. ETMNFAR, J. KHALIL-ALLAFI e A. B. PARSA, “On the electrocrystallization of pure hydroxyapatite nanowalls on Nitinol alloy using a bipolar pulsed current.,” *Journal of Alloys and Compounds, Elsevier*, pp. 549-555, 2016.
- [25] M. SARAMEERI, S. MOHAJERNIA e S. HEJAZI, “Controlling the degradation rate of AZ31 Magnesium alloy and purity of nano-hydroxyapatite coating by pulse electrodeposition,” *Materials Letters, Elsevier*, pp. 111-113, 2014.
- [26] Y. PARCHAROEN e colaboradores, “Hydroxyapatite electrodeposition on anodized titanium nanotubes for orthopedic applications.,” *Applied Surface Science*, pp. 54-61, 2014.
- [27] M. T. FULMER, “Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites,” *Biomaterials, Elsevier*, pp. 751-755, 2002.

- [28] C. ERGUN e colaboradores, “Increased osteoblast adhesion on nanoparticulate calcium phosphate with higher Ca/P ratios,” *Society for Biomaterials, Journal of Biomedical Materials Research*, 2007.
- [29] M. SIVAKUMAR e I. MANJUBALA, “Preparation of hydroxyapatite/fluoroapatite-zirconia composites using Indian corals for biomedical applications.,” *Materials Letters, Elsevier*, pp. 199-205, 2001.
- [30] H. MORGAN e colaboradores, “Preparation and characterisation of monoclinic hydroxyapatite and its precipitated carbonate apatite intermediate,” *Biomaterials, Elsevier*, pp. 617-627, 2000.
- [31] H. S. S. TORRES, . Caracterização do refugo do esteatito das indústrias e oficinas artesanais da região de Congonhas, Conselheiro Lafaiete, Mariana e Ouro Preto., 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, 2007.
- [32] A. P. L. NUNES e A. E. D. PERES, Reagentes depressores de carbonatos: uma revisão., Série Tecnológica Mineral. CETEM/MCT, 2011.
- [33] F. O. NOBILE e J. M. JUNIOR, “Geologia e Mineralogia. Apostila”.
- [34] SPECIALITY MINERALS, “Minerals and Technologies,” [Online]. Available: <https://www.mineralstech.com/Pages/SMI/Talc.html>. [Acesso em 21 08 2018].
- [35] W. SHAO e colaboradores, “Intercalation and Exfoliation of Talc by Solid-State Shear Compounding (S3C) Using Pan-Mill Equipment,” *Polymer Engineering and Science*, 2005.

- [36] A. L. LIMA, Simulações De Dinâmica Molecular de Dobras de Grafeno. Tese (Mestrado), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Física de Materiais. Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.
- [37] M. R. MUNARO e colaboradores, “. Avaliação de diferentes rotas de esfoliação líquida para obtenção de nanolamelas de nitreto de boro hexagonal,” *Química Nova*, pp. 1018-1024, 2017.
- [38] J. N. COLEMAN, “Liquid Exfoliation of Layered Materials,” *Science*, 2013.
- [39] H. ZENG e colaboradores, “2D materials via liquid exfoliation: a review on fabrication and applications,” *Materials Science*, pp. 1994-2008, 2015.
- [40] M. M. BERNAL e D. MILANO, “Two-dimensional nanomaterials via liquid-phase exfoliation: synthesis, properties and applications”. *Carbon Nanotechnology. IMDEA Nanociência*.
- [41] S. T. BARWICH, A study of liquid phase exfoliation and properties of 2D nanomaterials. Tese (Doutorado)., Chemical Physics of Low Dimensional Nanostructures Group. School of Physics, Trinity College Dublin, 2015.
- [42] A. A. PASA e M. L. MUNFORD, “Electrodeposition,” *Encyclopedia of Chemical Processing*, pp. 821-832, 2006.
- [43] P. A. GONÇALVES, Proposta de fabricação de hidroxiapatita através do processo de eletrodeposição, PUC-PR, 2006.

- [44] METROHM AUTOLAB, Basic Overview of the Working Principle of a Potentiostat/Galvanostat (PGSTAT)., Eletrochemical Cell Setup, 2011.
- [45] D. A. d. S. RIBEIRO, Eletrodeposição e Caracterização de Camadas Magnéticas de Magnetita. Tese (Mestrado em Ciências e Engenharia dos Materiais), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.
- [46] C. S. AOKI, Eletrodeposição de nip e nip+camadas por corrente pulsada. Tese (Mestrado), Faculdade de Engenharia Mecânica. Departamento de Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Campinas, 2003.
- [47] E. RIGO e colaboradores, “Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita,” pp. 21-29, 1999.
- [48] T. T. LI e colaboradores, “Properties and Mechanism of Hydroxyapatite Coating,” *Nanomaterials*, pp. 1-12, 2019.
- [49] D. BLACKWOOD e K. SEAH, “Galvanostatic pulse deposition of hydroxyapatite for biomedical purposes,” *Materials Science and Engineering, Elsevier*, pp. 561-565, 2010.
- [50] B. A. DEDAVID, C. I. GOMES e G. MACHADO, Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores, EdiPUCRS, 2007.
- [51] A. M. d. P. SILVA, Filmes finos cristalinos de hidroxiapatita: uma abordagem original com magnetron sputtering de alvos opostos. Tese (Doutorado), Instituto Militar de Engenharia, 2013.

- [52] J. GOLDSTEIN, “Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists,” *Springer Science and Business Media*, 2012.
- [53] J. GOLDSTEIN, “Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis,” *Springer Science and Business Media*, 1992.
- [54] K. G. B. ALVES, Síntese e caracterização de materiais nanoestruturados baseados em polímeros condutores e compósitos com óxidos metálicos, Universidade Federal de Pernambuco, 2010.
- [55] J. F. SHACKELFORD, *Ciência dos materiais*, Pearson Prentice Hall, 2008.
- [56] L. A. GOBBO, Aplicação da Difração de Raio-X e Método de Rietveld no Estudo de Cimento Portland. Tese (Doutorado em Recursos Minerais e Hidrogeologia), Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 2009.
- [57] R. JENKINS, *X-Ray Techniques: Overview*, Chicester: Jonh Wiley and Sons Ltd., 2000.
- [58] COD, “Crystallography Open Database,” [Online]. Available: <http://crystallography.net/cod/index.php>. [Acesso em 16 09 2018].
- [59] R. G. BAYER, *Mechanical Wear Fundamentals and Testing*, revised and expanded., CRC Press, 2004.
- [60] E. P. KOLTON, Comportamento tribológico do par stellite 6 e colmonoy 56 utilizado em revestimento de mancal de extrusora monorosca (Tese Mestrado), Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas,

- Metalúrgica e de Materiais - PPGE3M. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.
- [61] J. VERDI, Dispositivo pino-disco para análise de desgaste na presença de diesel e biodiesel. Dissertação (Mestrado), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2011.
- [62] ASTM, Standard Test Method for Wear Testing with a Pin-on-Disk Apparatus, Annual Book of ASTM Standards, 2017.
- [63] S. WOLYNEC, Técnicas Eletroquímicas em Corrosão, Edusp, 2003.
- [64] G. A. GONÇALVES, Estudo comparativo da resistência à corrosão dos aços inoxidáveis aisi 304 e 444 em soluções detergentes e sanitizantes da indústria de refrigerantes, UFMG, 2011.
- [65] R. MAGNABOSCO, Influência da microestrutura no comportamento eletroquímico do aço inoxidável UNS S31803 (SAF 2205). Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, 2001.
- [66] C. L. DO NASCIMENTO, Diagnóstico de corrosividade em eletrodo de aterramento elétrico cobreado. Tese (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2013.
- [67] P. H. MOLIN, . Biocompatibilidade e osteointegração de células osteoblásticas em contato com nióbio. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, 2016.

- [68] MILLET e colaboradores, “A rapid quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cell in vitro,” *Bone and Mineral, Elsevier*, pp. 57-67, 1994.
- [69] X. PEI e colaboradores, “Single-walled carbon nanotubes/hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition,” *Applied Surface Science, Elsevier*, pp. 71-80, 2014.
- [70] P. D. DELMAS e P. GARNERO, “Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1993.
- [71] F. BONNER e colaboradores, “Cell viability assessment using the alamar blue assay: a comparison of 2d and 3d cell culture models,” *Toxicology in Vitro, Elsevier*, pp. 124-131, 2015.
- [72] B. ALBERTS e colaboradores, *Molecular Biology of the Cell*, 2004.
- [73] J. DENG e colaboradores, “Real-time Ratiometric Fluorescent Assay for Alkaline Phosphatase Activity with Stimulus Responsive Infinite Coordination Polymer Nanoparticles,” *Analytical Chemistry*, pp. 3080-3086.
- [74] A. P. M. BARBOZA, Estudo da Injeção de Carga em Nanotubos de Carbono por Microscopia de Força Elétrica. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- [75] M. S. ANDRADE, B. R. A. NEVES e J. M. C. VILELA, “Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução (Scanning probe microscopy: an introduction),” *Cerâmica*, 1998.

- [76] R. Q. ALMEIDA, Microscopia de Varredura por Sonda em Materiais Carbonosos. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, 2013.
- [77] ETON e colaboradores, “Combined Nanoindentation and Adhesion Force Mapping Using the Atomic Force Microscope: Investigations of a Filled Polysiloxane Coating,” *Langmuir*, pp. 10011-10015, 2002.
- [78] N. ERINA, B. PITTENGER e C. SU, “Quantitative Mechanical Property Mapping at the Nanoscale with PeakForce QNM. Bruker Corporation,” [Online]. Available: http://www.cim.unipr.it/html/PeakForce-QNM_AFM_AN128.pdf. [Acesso em 06 05 2019].
- [79] BRUKER CORPORATION, “PeakForce QNM,” [Online]. Available: <https://www.bruker.com/products/surface-and-dimensional-analysis/atomic-force-microscopes/modes/modes/imaging-modes/PeakForce-qnm.html>. [Acesso em 06 05 2019].
- [80] BRUKER CORPORATION, “PeakForce QNM Principles of Operation,” [Online]. Available: <http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/icon/bruker-help/Content/PeakForceQNM/Operation/OperatingPrinciples.htm>. [Acesso em 06 05 2019].
- [81] B. E. N. FARIA, Estruturas Auto-Construídas de β -caroteno e Ácido Octadecilfosfônico. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

- [82] JPK INSTRUMENTS, “A Practical Guide to AFM Force Spectroscopy and Data Analysis (Technical Note),” [Online]. Available: <https://www.jpk.com/app-technotes-img/AFM/pdf/jpk-tech-force-spectroscopy.14-2.pdf>. [Acesso em 10 05 2019].
- [83] BRUKER CORPORATION, Quantitative mechanical property mapping at the nanoscale with PeakForce QNM (Application Note n. 128), Technical Report, Research Gate, 2010.
- [84] M. B. D. SANTOS, Identificação da força de atrito através de análise de sinais não lineares em ensaios tribológicos. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Uberlândia, 2005.
- [85] J. D. BALDESCHWIELER e D. R. BASELTA, “Imaging spectroscopy with the atomic force microscope,” *Journal of Applied Physics*, 1994.
- [86] H. BAO e colaboradores, “Single-walled carbon nanotubes/hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition,” *Applied Surface Science, Elsevier*, pp. 71-80, 2014.
- [87] T. M. MANHABOSCO e colaboradores, “Tribological, electrochemical and tribo-electrochemical characterization of bare and nitrided ti6al4v in simulated body fluid solution.,” *Corrosion Science*, pp. 1786-1793, 2011.
- [88] T. M. MANHABOSCO, Tribocorrosão da liga Ti6Al4V, liga nitretada, Ti6Al4V revestida por filmes Diamond-Like Carbon (DLC) e obtenção eletroquímica de filmes DLC. Tese (Doutorado)., Escola de Engenharia. Programa de Pós-

Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (PPGEM).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 2009.

- [89] Z. LIU e X. ZHOU, *Graphene: Energy Storage and Conversion Applications*, Flórida, EUA.: CRC Press, 1ª ed., 2014.
- [90] E. LANDI e colaboradores, “Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites,” *Journal of the European Ceramic Society, Elsevier*, pp. 2377-2387, 2000.
- [91] C. d. F. MALFATTI, “Heat treated nip–sic composite coatings: elaboration and tribocorrosion behaviour in nacl solution,” *Tribology Letters, Springer*, pp. 165-173, 2009.
- [92] A. LISIECKI e J. PIWNIK, “Tribological characteristic of titanium alloy surface layers produced by diode laser gas nitriding,” *Archives of Metallurgy and Materials*, pp. 543-552, 2016.
- [93] E. MIURA-FUJIWARA, T. OKUMURA e T. YAMASAKI, “Frictional and wear behavior of commercially pure ti, ti-6al-7nb, and sus316l stainless steel in artificial saliva at 310k,” *Materials Transactions, The Japan Institute of Metals and Materials*, pp. 1648-1657, 2015.
- [94] M. P. KAPCZINSKI, “Surface modification of titanium by plasma nitriding,” *Materials Research, Scielo Brasil*, pp. 265-271, 2003.
- [95] A. CHOUBEY, B. BASU e R. BALASUBRAMANIAM, “Tribological behaviour of ti-based alloys in simulated body fluid solution at fretting contacts,” *Materials Science and Enginnering: A, Elsevier*, pp. 234-239, 2004.

- [96] A. W. BATCHELOR, Y. FU e K. A. KHOR, “. Fretting wear behavior of thermal sprayed hydroxyapatite coating lubricated with bovine albumin,” *Wear, Elsevier*, pp. 98-102, 1999.
- [97] SHI e colaboradores, “Sliding wear behavior of epoxy containing nano-Al₂O₃ particles with different pretreatments,” *Wear, Elsevier*, pp. 1072-1081, 2004.
- [98] NETO e colaboradores, Friction and wear of nanocomposites polystyrene/kaolinite, Natal, Rio Grande do Norte: 22° CBECiMat, 2016.
- [99] Z. ZHONG, J. QIN e J. MA, “Electrophoretic deposition of biomimetic zinc substituted hydroxyapatite coatings with chitosan and carbon nanotubes on titanium,” *Ceramics International, Elsevier*, pp. 8878-8884, 2015.
- [100] G. P. BALAMURUGAN e S. N. MAITI, “Effects of nanotalc inclusion on mechanical, microstructural, melt shear rheological, and crystallization behavior of polyamide 6-based binary and ternary nanocomposites,” *Polymer Engineering and Science*, 2010.