

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR DE RECOBRIMENTOS DE ZINCO-HIDROXIAPATITA SOBRE A SUPERFÍCIE DE TITÂNIO PARA APLICAÇÕES SOBRE IMPLANTES

Iveth Yessenia Ortiz Ramos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientador: Sérgio Álvaro Souza Camargo Jr.

Rio de Janeiro Março de 2015

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR DE RECOBRIMENTOS DE ZINCO-HIDROXIAPATITA SOBRE A SUPERFÍCIE DE TITÂNIO PARA APLICAÇÕES EM IMPLANTES

Iveth Yessenia Ortiz Ramos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

stast St.

Prof. Sérgio Álvaro de Souza Camargo Jr., D.Sc.

Alino Raybel des Santos

Prof. Aline Raybolt dos Santos, D.Sc.

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva, D.Sc.

Prof. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL MARCO DE 2015 Ortiz, Iveth Yessenia Ramos

Produção, caracterização e avaliação da resposta celular de recobrimentos de zinco-hidroxiapatita sobre a superfície de titânio para aplicações em implantes / Iveth Yessenia Ortiz Ramos. - Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XV, 89 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Sérgio Álvaro de Souza Camargo Jr.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 72-85.

 Recobrimentos de zinco hidroxiapatita. 2. Zinco. 3.
Superfícies de Titânio. 4. Implantes. I. Camargo Jr., Sérgio Álvaro de Souza. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais, Moisés e Fermina, que apesar da distância sempre estiveram presentes e me apoiaram em mais essa conquista sem vocês, nenhuma conquista teria acontecido ou valido à pena

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador, Sérgio Camargo, agradeço pelo aceite no programa e orientação desse trabalho. Obrigada por me ajudar a buscar solução para problemas e dúvidas.

À minha professora e orientadora Aline Raybolt, por toda dedicação, cuidado, compreensão e carinho ao longo de todo o trabalho, pela paciência, confiança e amizade durante estes dois anos.

À querida equipe do laboratório de Recobrimentos PEMM/COPPE/UFRJ, que sempre pude contar, em Especial ao Bruno, que sempre me esclareceu e me ajudou a ver meu trabalho de diferentes perspectivas.

Ao professor Marcelo Prado, do IME, que me orientou e me fez conhecer mais sobre a hidroxiapatita.

À equipe do laboratório de Cerâmicas do IME, em especial à Andrea, pela orientação e por abrir-me portas, a querida Flávia, que me ofereceu sua ajuda e apoio incondicional.

À equipe do laboratório de Células do CBPF, em especial para Elena e Marcelo, pelo tempo e dedicação oferecidos para minha pesquisa, e a boa disposição para ajudar-me.

À equipe do laboratório de Espectrofotometria de FTIR / AA do CBPF, por me permitir realizar as análises no laboratório, pelos conselhos e tempo dedicado.

À equipe do laboratório de análise química do CETEM, por me permitir realizar minha análises no laboratório.

As queridas amigas de mestrado Livia e em especial a Omayra, pelo apoio tanto acadêmico como pessoal, por ser amiga e companheira em todos os momentos, pelas horas de estudo, pelas boas risadas, conversas e pelo incentivo.

À minha família, pais, meu irmão e meus amigos, que sempre estiver ao meu lado e torceram por mim.

À Carolina por seu apoio na fase final desta pesquisa, companhia e o apoio com língua portuguesa.

Meu agradecimento especial à todos que durante esse dois anos participaram de alguma maneira da minha conquista, direta ou indiretamente. Obrigada, não seria possível a realização de mais esse sonho sem vocês.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR DE RECOBRIMENTOS DE ZINCO-HIDROXIAPATITA SOBRE A SUPERFÍCIE DE TITÂNIO PARA APLICAÇÕES EM IMPLANTES

Iveth Yessenia Ortiz Ramos Março /2015

Orientador: Sergio de Souza Camargo Jr.

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A hidroxiapatita (HA) é utilizada como biocerâmica, devido a sua composição química semelhante à do osso, e propriedades bioativas que permitem uma ligação direta com o osso. A incorporação do zinco na solução precursora de hidroxiapatita (ZnHA) tem efeitos positivos sobre os osteoblastos estimulando a sua proliferação, o que permite a formação da matriz óssea, além de promover uma inibição de atividade osteoclástica. Por este motivo, a superfície de titânio recoberta e convertida em ZnHA pode contribuir positivamente, podendo evitar a rejeição dos implantes. O objetivo do estudo foi depositar estes recobrimentos pelo processo hidrotérmico, caracterizar os recobrimentos, e investigar a resposta celular in vitro esta nova superfície. Os revestimentos foram caracterizados por XRD, SEM/EDS, FRX, perfilometria. А viabilidade, citotoxicidade e a adesão celular foram avaliadas utilizando cultura de osteoblastos humanos. Os resultados mostram que foram obtidos recobrimentos de hidroxiapatita cálcio deficiente. A incorporação de 3 mol % de Zn na estrutura da HA produz uma mudança na morfologia e no tamanho dos cristais, e uma diminuição na espessura do recobrimento indicando que o zinco é um inibidor do crescimento de cristais de Ca-P. Os recobrimentos de ZnHA apresentaram melhor resposta celular em 24h quando comparadas com os recobrimentos de HA. Os recobrimentos testados não alteraram a viabilidade celular nem causaram alterações na morfologia celular, apresentando propriedades adequadas para aplicações biológicas.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND CELL RESPONSE EVALUATION OF THE TITANIUM SURFACE WITH ZINC- SUBSTITUTED HYDROXYAPATITE COATINGS IN IMPLANTS

Iveth Yessenia Ortiz Ramos March /2015

Advisor: Sergio de Souza Camargo Jr.

Department: Metallurgy and Materials Engineering

Hydroxyapatite (HAp) is widely as bioceramic used because of their chemical composition similar to that of bone and bioactive properties that have the potential to allow direct interface connection with the bone. The incorporation of zinc in the precursor solution on hydroxyapatite (ZnHA) has positive effects on osteoblasts, stimulating their proliferation, which allows the formation of bone matrix and promote inhibition of osteoclast activity. For this reason, the surface of titanium coated with hydroxyapatite partially replaced with Zinc (ZnHA) can contribute positively to the process of bonding of implants. The purpose of this study was to prepare the hydrothermal coating process, and investigate the cellular response in vitro of the new surface. The coatings are characterized by XRD, SEM / EDS, XRF, profilometry. The viability, cytotoxicity and cell adhesion were evaluated using cultured human osteoblasts. The results showed that Calcium deficient hydroxyapatite coatings were obtained. The incorporation of 3 mol % Zn in the structure of HA produces a change in morphology and size of crystals, and hence a decrease in the thickness of the coating indicating that zinc is an inhibitor of the growth of Ca-P crystals. The coatings of ZnHA showed better cellular response within 24 hours when compared with the HA coatings. The coatings tested did not affect cell viability or caused changes in cell morphology, with properties suitable for biological applications.

ÍNDICE GERAL

1	. IN	TRO)DUÇÃO	1
2	OB	BJE	FIVOS	3
	2.1	Ob	etivos Gerais	3
	2.2	Ob	etivos Especificos	3
3	RE	VIS	ÃO DA LITERATURA	4
	3.1	TE	CIDO ÓSSEO	4
	3.1	.1.	Mecanismos biológicos de reparo ósseo	6
	3.2.	BIC	OMATERIAIS	7
	3.2	.1.	Biomateriais aplicados a tecido ósseo	9
	3.3.	ZIN	JCO	. 15
	3.3	.1.	O zinco e sua substituição nos fosfatos de cálcio e na hidroxiapatita .	. 16
	3.4.	INT	FERAÇÃO CÉLULA – SUBSTRATO	. 18
	3.5.	TR	ATAMENTOS DE SUPERFÍCIE	. 19
	3.5	.1.	Recobrimentos de hidroxiapatita.	. 19
	3.6.	TE	CNICAS DE DEPOSIÇÃO DE RECOBRIMENTOS DE HA	. 21
	3.6	.1.	Processo de precipitação em meio aquoso	. 23
4	. MA	ATE	RIAIS E MÉTODOS	. 26
4	• M A 4.1.	ATE PRI	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	. 26 . 26
4	• M A 4.1. 4.1	ATE PRI .1.	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS Preparo dos substratos	. 26 . 26 . 26
4	• MA 4.1. 4.1 4.1	ATE PR .1. .2.	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita	• 26 • 26 • 26 • 27
4	• MA 4.1. 4.1 4.1 4.1 cor	ATE PR .1. .2. .3. n ziu	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituí	. 26 . 26 . 26 . 27 da . 27
4	• MA 4.1. 4.1 4.1 4.1 con 4.2.	ATE PR .1. .2. .3. n zin CA	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituío nco RACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS	26 26 26 27 da 27 27 29
4	• MA 4.1. 4.1 4.1 4.1 con 4.2. 4.2	ATE PR .1. .2. .3. n zin CA .1.	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituío co	26 26 27 27 27 27 27 29 29
4	• MA 4.1. 4.1 4.1 4.1 con 4.2. 4.2 4.2	ATE PR .1. .2. .3. n zin CA .1. .2.	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS. Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituío co RACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Difração de raios X (DRX).	• 26 • 26 • 27 da • 27 • 29 • 29 • 29
4	• MA 4.1. 4.1 4.1 4.1 cor 4.2. 4.2 4.2 4.2 4.2	ATE PR .1. .2. .3. n zin CA .1. .2. .3.	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituíd nco RACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Difração de raios X (DRX) Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	. 26 . 26 . 26 . 27 da . 27 . 29 . 29 . 29 . 30
4	• MA 4.1. 4.1 4.1 4.1 cor 4.2. 4.2 4.2 4.2 (FI	ATE PR: .1. .2. .3. m zin CA .1. .2. .3. TIR)	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS. Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituíd nco RACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Difração de raios X (DRX). Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	. 26 . 26 . 26 . 27 da . 27 . 29 . 29 . 29 . 30 . 30
4	• MA 4.1. 4.1 4.1 4.1 cor 4.2. 4.2 4.2 4.2 (FI 4.2	ATE PR: .1. .2. .3. m zin CA .1. .2. .3. TIR) .4.	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS. Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituíd nco. RACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Difração de raios X (DRX) Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier Perfilometria por contato	. 26 . 26 . 27 da . 27 . 29 . 29 . 29 . 30 . 30 . 30
4	• MA 4.1. 4.1 4.1 4.1 cor 4.2. 4.2 4.2 4.2 (FI 4.2 4.2 (FI 4.2 4.2	ATE PRJ .1. .2. .3. m zin CA .1. .2. .3. TIR) .4. .5.	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituín co RACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Difração de raios X (DRX) Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier Perfilometria por contato Fluorescência de raios X	. 26 . 26 . 27 da . 27 . 29 . 29 . 30 . 30 . 30 . 30
4	• MA 4.1. 4.1 4.1 4.1 cor 4.2. 4.2 4.2 4.2 (FI 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2	ATE PRJ .1. .2. .3. n zin CA .1. .2. .3. TIR) .4. .5. .6.	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS. Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituío co. RACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Difração de raios X (DRX). Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. Perfilometria por contato Fluorescência de raios X. Teste de adesão do recobrimento ao substrato.	. 26 . 26 . 27 da . 27 . 29 . 29 . 30 . 30 . 30 . 30 . 31
4	• MA 4.1. 4.1 4.1 4.1 cor 4.2. 4.2 4.2 4.2 (FI 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2	ATE PRJ .1. .2. .3. n zin CA .1. .2. .3. TIR) .4. .5. .6. .7.	RIAIS E MÉTODOS EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS Preparo dos substratos Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituíd nco. RACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Difração de raios X (DRX) Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier Perfilometria por contato Fluorescência de raios X Teste de adesão do recobrimento ao substrato. Molhabilidade/Capilaridade.	. 26 . 26 . 26 . 27 da . 27 . 29 . 29 . 29 . 30 . 30 . 30 . 30 . 31 . 32

	4.3.1.	Cultura de osteoblastos	32
	4.3.2.	Viabilidade/ Citotoxicidade	33
	4.3.3.	Adesão dos osteoblastos	34
	4.3.4.	Caracterização de morfologia celular	36
	4.3.5.	Ensaio de proliferação celular	36
	4.3.6.	Análise Estatística	37
5.	RESUI	LTADOS E DISCUSSÃO	38
5	.1. DA	ELABORAÇÃO DOS RECOBRIMENTOS	38
	5.1.1.	Grupo I: Recobrimento de hidroxiapatita (HA)	38
	5.1.2. zinco (Z	Grupo II: Recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituída co ZnHA)	m 40
5	.2. CA	RACTERIZAÇÃO DOS RECOBRIMENTOS DE HA e ZnHA	43
	5.2.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/EDS	43
	5.2.2.	Difração de raios X (DRX)	46
	5.2.3.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	48
	5.2.4.	Perfilometria	52
	5.2.5. UV-VIS	Análise semiquantitativa de elementos químicos: FRX, EDS, AA/ e	
	5.2.6.	Teste de adesão do recobrimento ao substrato	55
	5.2.7.	Ensaio de Ascensão Capilar	60
5 V	.3. ENS TTRO D	SAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE IN OS RECOBRIMENTOS	61
	5.3.1.	Viabilidade/ Citotoxicidade	61
	5.3.2.	Adesão dos osteoblastos	63
	5.3.3.	Morfologia celular	64
	5.3.4.	Ensaio de proliferação celular	68
6.	CONC	LUSÕES	74
7.	SUGES	STÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	76
8.	REFEF	RENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Esquema do tecido ósseo 5
Figura 3.2 A estrutura da hidroxiapatita 12
Figura 4.1 (A) cone tubo estéril, (B) Células no meio de cultura colocado dentro do cone tubo e meio de cultura colocado por fora. (C) Ampliação
Figura 4.2 (A) Amostras colocadas no poço de cultura em 3 diferentes tempos. (B) Suspensão de células sendo colocado em cada poço de cultura
Figura 4.3 Ilustração mostrando a morfológica das células. Adaptado de Raybolt, 2008.
Figura 5.1 Morfologia do recobrimento de monetita observados por SEM em diferentes aumentos (A) x 40 vezes (B) x 500 vezes
Figura 5.2 Difratograma de Raios X confirmando a presença de monetita como fase única

Figura 5.3 Cristais de HA após da conversão em meio alcalino mostrando a reprecipitação de nanocristais em aumentos de (A) x 4 000 vezes e (B) x 30 000 vezes . 40

Figura	5. 11	Espectro	de EDS	do re	ecobrimen	to de	HA c	com	picos	de n	naior	intensi	idade
de Ca e	P												45

Figura 5.13 Difratograma da amostra de HA com picos indexados pelo JCPDS. 46

Figura 5.14 Difratograma da amostra de ZnHA com picos indexados pelo JCPDS..... 47

Figura 5. 16 Espectro de FTIR dos recobrimentos de HA. 50

Figura 5. 17 Espectro de FTIR dos recobrimentos de ZnHA...... 51

Figura 5.20 Gráfico do teste de resistência ao risco do recobrimento de HA, onde mostra as curvas de força de atrito (Ff), carga aplica (F), emissão acústica (E.A.), em função do tempo. Onde podemos observar que a Lc1 é 0,57 kgf e a Lc2 é 1.06 kgf.... 55

Figura 5. 25 Ascensão capilar da água, através das amostras de HA e ZnHA...... 60

Figura 5.27 Análise da viabilidade celular após 24h . A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de Live / Dead. Os pontos em verde marcam as células vivas

Figura 5. 32 Micrografias da superfície de Ti (A,B), HA (C,D) e ZnHA (E,F) após 120 minutos de cultura. As células exibiram uma forma lisa e plana, saliências correspondentes aos núcleos foram observadas (A). Em (B e C), filopodios ainda foram

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Fases de Fosfatos de Cálcio, formula química e razão molar Ca/P .
Adaptado de DOROZHKIN, 2011 10
Tabela 3.2 Concentração de zinco nos diferentes tecidos e órgãos do corpo. Adaptado
de Ito et al., 2002
Tabela 3.3 Algumas das diversas técnicas de obtenção de recobrimentos de
hidroxiapatita. Adaptado de (YANG et al, 2005)
Tabela 4.1 Reagentes que foram utilizados
Tabela 4.2 Tabela de reagentes que foram utilizados no recobrimento com ZnHA 28
Tubera 4.2 Tubera de reagentes que forant utilizados no recoormiento com zintra 20
Tabela 5.1 Bandas principais no infravermelho para Hidroxiapatita* e HAP
Tabela 5.2 Bandas características no Infravermelho para OHAn B-TCP e g-TCP
(DENA et al. 2002)
(PENA et al., 2005)
Tabela 5.3 Espessuras dos recobrimento de HA e ZnHA obtidas por perfilometria de
contato. * Média de 5 medidas 52
$\mathbf{T}_{\mathbf{r}} \mathbf{h}_{\mathbf{r}} \mathbf{h}_{\mathbf{r}} = \mathbf{f}_{\mathbf{r}} \mathbf{f}_{\mathbf{r}} \mathbf{h}_{\mathbf{r}} $
Tabela 5.4 valores de Kazao Ca/P e %de zinco em peso e em mol
Tabela 5.5 Resultados do scratch test mostrando as médias da carga crítica dos
recobrimentos de HA e ZnHA

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de substituir o osso, dentes e outros órgãos perdidos, por materiais é evidente desde a pré-história. Esta necessidade de reposição de tecidos perdidos levou ao aprimoramento técnico e ao avanço do estudo de biomateriais que pudessem substituir e/ou auxiliarem no reparo destes tecidos. Neste processo cientistas vem conduzindo a investigação de novos materiais utilizados para implantes, desde os bioinertes aos que integram ativamente, estimulando o seu reparo tecidual.

O titânio é o biomaterial mais utilizado como implante em seres humanos em sua forma de titânio comercialmente puro (Ti-cp) por possuir excelentes propriedades biomecânicas, boa rigidez, resistência à corrosão e biocompatibilidade. Embora tenha sido descrito como um material de ancoragem óssea, seu uso se intensificou por volta dos anos 60 com o sistema de Branemark (BRANEMARK, 1969, 1977), que introduziu o conceito de osseointegração como sendo a ligação direta, estrutural e funcional entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais. Com a introdução desse conceito, as pesquisas em materiais passaram a se concentrar em materiais bioinductores, visando acelerar a osteointegração.

O sucesso dos biomaterias está intimamente relacionado com as propriedades de sua superfície, e por este motivo o interesse em otimizar a superfície destes materiais como o titânio mediante diversas técnicas e tratamentos de superfície, sendo um dos principais o recobrimento com materiais bioativos.

A aplicação de recobrimentos cerâmicos em implantes metálicos acelera a resposta do tecido ósseo na superfície do implante, além de fortalecer ligações entre o hospedeiro e o implante, serve ainda como proteção contra corrosão do metal no meio biológico e atua como barreira de liberação de íons para o tecido receptor.

Dentro das cerâmicas, as biocerâmicas a base de fosfato de cálcio apresentam alta biocompatibilidade devido à sua semelhança química com a apatita biológica óssea (LEGEROS, 2008). A hidroxiapatita (HA) é o fosfato de cálcio mais amplamente utilizado. Sendo o material eleito para enxertos ósseos devido a sua semelhança estrutural com a parte inorgânica do osso. Utilizada como seu substituto, uma vez que a hidroxiapatita sintética pode se ligar quimicamente ao osso, esta tem sido bastante

pesquisada na produção de recobrimentos biologicamente ativos em implantes inertes, tais como implantes metálicos odontológicos.

Estudos recentes mostram que a incorporação de outros elementos na estrutura da HA como Zn²⁺, Mg ²⁺, La³⁺, Y³⁺, In³⁺, Bi³⁺, Nb, podem melhorar algumas de suas propriedades, considerando que eles estão presentes nos cristais da HA natural (JONES, 2001), A liberação gradual dos íons substituintes na HA poderia favorecer o reparo ósseo. (ITO et al., 2001,2002; FROST, 2004; SOGO et al., 2004; WEBSTER et al., 2004; WEI e AKINC, 2005, NAVARRO DA ROCHA, 2011).

O zinco (Zn) é um componente estrutural de algumas enzimas e proteínas ósseas de grande importância para o funcionamento do organismo. Esse elemento tem efeitos positivos sobre os osteoblastos, quando encontrados em baixas concentrações, estimulando assim, a proliferação deste tipo celular, o que permite a formação da matriz óssea, o aumento da atividade de fosfatasse alcalina e a inibição da ação de osteoclastos.

Por este motivo, a superfície de titânio recoberta com hidroxiapatita parcialmente substituída com zinco (ZnHA) pode contribuir positivamente no processo de regeneração em volta dos implantes. Desta forma, HA modificada tem grande importância para a área biomédica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da incorporação de zinco nos recobrimentos de Hidroxiapatita

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir recobrimentos de HA e ZnHA sobre superfícies de Ti através do método hidrotérmico;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas e morfológicas de superfícies de titânio recobertas com hidroxiapatita e hidroxiapatita parcialmente substituída com zinco;
- Avaliar a resposta celular dos osteoblastos humanos (HOB) cultivadas sobre recobrimentos de HA parcialmente substituída com zinco, produzidos pelo método hidrotérmico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é caracterizado por sua matriz calcificada e rígida, promovendo a sustentação dos animais vertebrados. É um tecido conectivo especializado que possui alta rigidez e grande resistência tanto à tração como à compressão. É também um tecido dinâmico que muda constantemente em resposta às tensões e forças que atuam sobre ele. São suas células específicas, responsáveis pela reabsorção e aposição óssea. Uma das principais funções do tecido ósseo é a de sustentação e proteção dos órgãos e tecidos moles, e a movimentação do corpo. Além de ser uma importante reserva de minerais como fósforo e cerca de 99% de cálcio de todo o corpo (ALBERTS *et al.,* 2010).

Na estrutura macroscópica do tecido ósseo, basicamente duas formas distintas de tecido podem ser encontradas. Elas são: osso compacto, responsável pelas propriedades mecânicas, formando um espesso revestimento duro, externo, e o osso esponjoso, mais interno e responsável pela atividade metabólica do tecido, formado por trabéculas delgadas que se entrelaçam e se encontram na medula óssea. Além desses tecidos, temos uma fina camada de tecido conjuntivo que funciona como invólucro sobre o osso compacto, denominada periósteo, a qual é rica em células ósseas, vasos e fibras. O periósteo possui duas camadas, uma camada interna, composta de células precursoras dos osteoblastos, e uma camada externa, rica em vasos sanguíneos e nervos, fibroblastos e fibras de colágeno. Internamente, entre o tecido ósseo e a medula óssea, também temos uma membrana denominada endóstio, esta é composta por uma única camada de osteoblastos. (ALLEN *et al.*,2004) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).



Figura 3.1 Esquema do tecido ósseo

Na sua estrutura microscópica, o tecido ósseo é formado basicamente por dois elementos: células e substância intercelular ou matriz. As células se subdividem em tipos específicos: osteoclastos e osteoblastos, responsáveis pela reabsorção e pela aposição óssea respectivamente. Além daquelas consideradas progenitoras e conhecidas como células tronco ou células mensenquimais indiferenciadas. Por último, temos os osteócitos, que são osteoblastos maduros responsáveis pela manutenção da matriz extracelular. Essa por sua vez divide-se em uma parte inorgânica e uma orgânica, onde a parte inorgânica representa 67% de todo o peso do osso e é formada por minerais, principalmente o cálcio e o fosfato que irão formar os cristais de hidroxiapatita, os quais possuem uma camada hidratada que promove a troca de íons com o líquido corpóreo. E a parte orgânica, que representa 33% do peso do osso, é representada por fibras colágenas, exclusivamente do tipo I assim como também encontramos uma parte amorfa formada por glicoproteínas e glicosaminoglicanos (CATE, 2008).

O tecido ósseo é dinâmico e está sempre passando por processos de remodelação, em resposta ao estresse mecânico e mudanças hormonais sofridas pelo organismo. Essa remodelação óssea exige um equilíbrio entre a reabsorção feita pelos osteoclastos, e a síntese de matriz desempenhada pelos osteoblastos. Os osteócitos possuem um papel fundamental na remodelação óssea, gerando sinais enviados a osteoblastos e osteoclastos presentes na superfície do osso por meio de um sistema de canalículos. Os osteoclastos reabsorvem matriz, criando poros no tecido conhecidos como Lacunas de Howship. Após os osteoclastos sofrem apoptose, são então enviados sinais de acoplamento aos osteoblastos para que sejam recrutados até a cavidade de

reabsorção. Os osteoblastos começam a sintetizar matriz extracelular, que, por fim, se mineraliza (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

O processo de remodelação óssea é regulado por diversos hormônios e citosinas, tais como hormônios da paratireoide, vitamina D3, interleucina-1, fatores de crescimento (TGF- β), membros da superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNF- α), entre outros.

Dente os tecidos humanos, o tecido ósseo é um dos poucos capazes de remodelar-se, apresentando uma taxa de renovação de 0,7% ao ano, o que resulta na remodelação quase completa do tecido a cada dez anos (MARX *et al.*, 1998)

Na maioria das lesões ósseas, a cura acontece sem a necessidade de procedimentos mais elaborados. Porém, em grandes lesões ocasionadas por traumas, tumores, infecções, distúrbios bioquímicos ou desenvolvimento anormal do esqueleto existe a necessidade de intervenções cirúrgicas visando à regeneração tecidual, fusão espinhal e o aumento da consolidação da fratura. Para o tratamento dessas lesões são utilizados enxerto ósseo autólogo, enxerto ósseo alógeno, enxerto ósseo heterólogo e, também, matriz óssea desmineralizada, bem como metais, cerâmicos e polímeros, os chamados biomateriais (MEIJER *et al.*, 2007).

3.1.1. Mecanismos biológicos de reparo ósseo

Os mecanismos biológicos de reparo ósseo associados aos biomateriais ou enxertos ósseos podem ser classificados em diferentes níveis, são esses, osteogênicos, osteoinductores, osteoconductores e osteopromotores.

A osteogênese se caracteriza pela atividade de osteoblastos e pré-osteoblastos viáveis, transplantados com o enxerto para o defeito ósseo a partir de uma área doadora do próprio individuo, as principais fontes de células para esta fase são as células osteogênicas e osteoprogenitoras do hospedeiro. (LINDHE *et al.*, 2010).

A osteoindução se caracteriza pelo processo no qual as células são persuadidas a produzir osso e é evidente a conversão fenotípica das células de células mesenquimais em osteoblastos na área do defeito ósseo (ALBREKTSSON *et al.*, 2001). São exemplos deste processo matriz óssea desmineralizada (OLIVEIRA *et al.*, 2008) e as proteínas morfogenéticas ósseas (GRANJEIRO *et al.*, 2005).

A osteocondução se refere ao crescimento ósseo sobre a superfície do biomaterial (ALBREKTSSON *et al.*, 2001; CALASANS-MAIA *et al.*,2008) Outros autores definem a osteocondução como o processo em que o enxerto serve como arcabouço, de forma passiva para migração de vasos sanguíneos e deposição de novo osso (ALBREKTSSON *et al.*, 2001; FLECKENSTEIN *et al.*, 2006)

A osteopromoção utiliza barreiras mecânicas de proteção que evitam a proliferação de tecido conjuntivo em meio do defeito ósseo, permitindo que o mesmo seja povoado por células osteoprogenitoras (TAGA *et al.*, 2008) Este exclusão tecidual é realizada com o uso de membranas (barreiras físicas) que podem ser reabsorvíeis ou não.

3.2. BIOMATERIAIS

Um biomaterial pode ser definido como: "Um material de origem biológica ou sintética, que não seja droga e que apresente propriedades físicas, químicas e biológicas compatíveis com os tecidos, estimulando uma resposta adequada, utilizado como suporte temporário de células e tecidos, para confecção de implantes, aparelhos ou sistemas de forma a reparar, regenerar ou mesmo substituir funções de órgãos ou tecidos do corpo humano".

Para ser considerado ideal, um biomaterial deve promover uma cicatrização rápida, passível e controlada dos tecidos hospedeiros (OLIVEIRA e NANCI, 2004). Dessa forma, para serem aplicados em tecidos moles (tecido conjuntivo, epitelial e mucoso) e tecidos duros (ossos e dentes), e serem aceitos pelo organismo vivo, estes biomateriais devem possuir alguns pré-requisitos como:

- Biocompatibilidade;
- Biofuncionalidade;
- Bioatividade;
- > Textura superficial que permita adesão e proliferação celular;
- Boas propriedades mecânicas, como resistência à corrosão;
- Prevenir adesão bacteriana;
- Devem ser facilmente produzidos e reproduzidos;
- Baixo custo e facilidade no processamento.

Possuir boas propriedades mecânicas para o suporte celular e suporte de cargas no local de implante;

O principal critério de seleção de um biomaterial baseia-se em sua aplicação no organismo vivo, visto que precisa estimular o ambiente biológico sem apresentar características nocivas (PFEIFFER *et al*, 2003).

Além da classificação supracitada, há outra classificação quanto à resposta biológica, ou seja, frente à implantação desses materiais no organismo, como:

- Biotoleráveis: Materiais moderadamente aceitos pelo tecido receptor, que apresentam uma resposta interfacial mínima, que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro. Sendo isolados dos tecidos adjacentes por uma cápsula fibrosa, devido à liberação de compostos químicos. A maioria dos polímeros sintéticos e metais encontram se neste grupo.
- Bioinertes: Material que, não provocam reação de corpo estranho no organismo, podem apresentar uma resposta tecidual mínima, praticamente imperceptivel, e liberação mínima de componentes. Como exemplo podemos citar: a alumina, a zircônia e o dióxido de titânio.
- Bioativos: Material que interage com o tecido circundante a partir da formação de ligações químicas na interface implante/tecido e induz o crescimento tecidual. Os vidros bioativos e a hidroxiapatita encontram se neste grupo. Os materiais cerâmicos biativos são portadores de osteoprogenitores e potencialmente úteis na regeneração do tecido ósseo (osteoindução/ osteocondução).
- Bioabsorvíveis: Material que se incorpora aos tecidos e, após um determinado período de tempo em contato com os tecidos, é degradado, solubilizado ou fagocitado completamente.

Adicionalmente a esta classificação KOKUBO (2009), propôs um outro tipo de biomateriais:

Biorreativos: Material que pode adquirir bioatividade após um tratamento de ativação de sua superfície onde serão formados óxidos, os quais entrarão em contato com os tecidos vivos (KOKUBO *et al*, 2009); Visto que todos os materiais produzem uma resposta *in vivo*, podemos considerar que nenhum material é realmente "inerte"

3.2.1. Biomateriais aplicados a tecido ósseo

Quanto à aplicação dos biomateriais na reparação de tecidos ósseos, temos que os mais utilizados na área ortopédica e odontológica são os metais, que, além de inertes, possuem alta resistência mecânica, o que é um ponto importante para dispositivos biomecânicos, que sofrerão ação de forças externas quando em função, na substituição de tecidos perdidos, ou mesmo, na reparação de defeitos ósseos. (PRADO DA SILVA, 1999). Apesar de sua baixa tenacidade, alta dureza e, consequentemente, alta fragilidade, as cerâmicas são uma opção de escolha devido a sua biocompatibilidade e bioatividade, além do que, são menos susceptíveis à corrosão. Nesse contexto, em busca do implante ideal, optou-se por associar as propriedades mecânicas dos metais com as propriedades biológicas das cerâmicas (bioceramicas); estas passaram a servir de recobrimentos para as superfícies dos materiais metálicos, promovendo uma ligação entre o material e os tecidos vivos, superior àquelas encontradas em materiais sem tratamento superficial. (MISTRY et al, 2011). As biocerâmicas compreendem, o fosfatos de cálcio (apatitas), biovidros, zircônia e alumina. Contudo, propriedades como biocompatibildade, bioatividade, biodegradabilidade e osteocondutividade, fazem dos fosfatos de cálcio as cerâmicas mais empregadas na área ortopédica e odontológica.

3.2.1.1.O titânio como material de implante

O titânio é o material mais utilizado como implante em seres humanos em sua forma de titânio comercialmente puro (Ti-cp). Possui excelentes propriedades biomecânicas, boa rigidez, resistência à corrosão e biocompatibilidade. Além de propriedades relacionadas à sua camada de oxido passiva e estável (TiO₂), formada espontaneamente em contato com oxigênio do ar a temperatura ambiente, que tem uma espessura em torno de 1,5 a 17 nm. (SUL, 2002). O titânio pode se oxidar rápida ou lentamente dependendo das condições do meio, no ambiente fisiológico a corrosão ocorre em condições aeróbicas (onde o oxigênio é o agente de oxidação).

3.2.1.2.Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio, são à base dos tecidos mineralizados do corpo e estão presentes nos ossos e dentes dos vertebrados sob a forma de apatita cálcio deficiente, não estequiométrica e com substituições iônicas. Este grupo de biomateriais fosfatos de cálcio (Ca/P), são de especial interesse na medicina e na área odontológica, por possuírem propriedades como bioatividade, osteocondutividade e uma composição mais próxima da parte mineral do osso. Desta forma, os biomateriais de fosfato de cálcio são potencialmente úteis na engenharia de tecidos para regeneração de tecidos duros (LEGEROS, 2002). Os fosfatos de cálcio abrigam um amplo espectro de combinações químicas dependendo da sua razão Ca/P podendo variar de 0,5 a 2,0 como mostrado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Fases de Fosfatos de Cálcio, formula química e razão molar Ca/P. Adaptado de DOROZHKIN, 2011.

Ca/P Razão molar	Componente	Formula
0.5	Fosfato Monocálcico Monohidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$
0.5	Fosfato Monocálcico Anhidro (MCPA ou MCP)	$Ca(H_2PO_4)_2$
1.0	Fosfato Dicálcico Dihidratado (DCPD), mineral brushita	CaHPO ₄ ·2H ₂ O
1.0	Fosfato Dicalcico anhidro (DCPA ou DCP), mineral monetita	CaHPO ₄
1.33	Fosfato Octacálcico (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$
1.5	α -Fosfato tricálcico (α -TCP)	α -Ca ₃ (PO ₄) ₂
1.5	β-Fosfato tricálcico (β-TCP)	β -Ca ₃ (PO ₄) ₂
1.2 – 2.2	Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$Ca_xH_y(PO_4)_z \cdot nH_2O, n = 3$ - 4.5; 15 - 20% H ₂ O
1.5 – 1.67	Hidroxiapatita Calcio Deficiente (CDHA)	$Ca_{10-x(HPO_4)x(PO_4)_{6-}}$ $_x(OH)_{2-x} (0 < x < 1)$
1.67	Hidroxiapatita (HA, HAp ou OHAp)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
1.67	Fluorapatita (FA ou FAp)	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$
1.67	Oxiapatita (OA, OAp or OXA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ O
2.0	Fosfato tetracalcico (TTCP ou TetCP), mineral hilgenstockite	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O

Os matérias mais reconhecidos com alto potencial para substituição óssea são hidroxiapatita (HA) e o β -TCP, por sua excelente condutividade e propriedade de

reabsorção, respectivamente. Além de ambas serem bastante similares ao tecido ósseo. A HA é mais estável em meio biológico que o β -TCP devido a sua menor solubilidade e cinética de reabsorção mais lenta. Sendo assim, a HA apresenta baixa taxa de dissolução quando utilizada como dispositivo para remodelação óssea (TURRER *et al.*, 2008). A literatura médica recomenda o uso da mistura desses dois materiais, para várias aplicações químicas. As formas de síntese dos fosfatos de cálcio incluem precipitação, hidrólise a partir de outros fosfatos de cálcio, síntese hidrotérmica ou reação de fase sólida, podendo ser usados sob as formas de grânulos, blocos densos e porosos, cimentos, revestindo metais e como compósitos.

As cerâmicas apatiticas, assim também chamadas devido a sua estrutura complexa, permitem substituições catiônicas e aniônicas. Os resultados dessas substituições na fórmula estequiométrica são mudanças nas propriedades físicoquímicas, alterando os parâmetros originais da rede cristalina, as dimensões da célula unitária, assim como a morfologia da estrutura e a distribuição da carga superficial do material. Consequentemente mudança na taxa de dissolução e mineralização quando em contato com fluidos corporais (SONG *et. al.*, 2008).

A taxa de reabsorção dos revestimentos e a interação célula-superfície estão diretamente relacionadas com a solubilidade ou taxa de dissolução, que aumenta com a diminuição do tamanho do cristal ou cristalinidade. Outros fatores como área especifica, topografia e fadiga de superfície também afetam a reabsorção. As substituições catiônicas e aniônicas são estudados com a finalidade de aperfeiçoar e acelerar o processo de reparo ósseo. Têm sido desenvolvidas apatitas sintéticas modificadas similares ao osso natural sob o ponto de vista estrutural (grau de cristalinidade, estequiometria e arquitetura) para serem utilizadas em reparos e substituições ósseas de modo eficaz devido a sua similaridade com a parte inorgânica da maioria dos tecidos calcificados do corpo (LEGEROS, 2008).

3.2.1.3.Hidroxiapatita

A palavra hidroxiapatita (HA) é formada pela junção do sufixo hidroxi que se refere ao grupo hidroxila (OH)⁻ e apatita que é o grupo mineral ao qual pertence. A fórmula da HA estequiométrica é $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. É um fosfato de cálcio com elevada estabilidade em solução aquosa dentro de uma faixa de pH 4,2-8,0. Possui uma razão

molar Ca/P igual a 1,67, caso a relação Ca/P seja menor ou maior que 1,67 outras fases podem estar presentes após o processamento (BEST *et al.*, 2008).

A HA cristaliza-se no sistema hexagonal, como visto na Figura 3.2, esta célula unitária da HA contém 10 íons cálcio (Ca²⁺) localizados em sítios não equivalentes (Ca1 e Ca2). No sítio Ca1, quatro íons Ca2+ estão alinhados em coluna, enquanto no sítio Ca2 seis íons Ca^{2+} estão alinhados em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura e os íons Ca²⁺ ocupam duas posições diferentes. Os grupos OH⁻ estão ordenados no eixo c. Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons O^{2-} e de íons Ca^{2+} estão ligados entre si por íons fosfato. Dos quatro átomos que constituem os grupos fosfatos, dois estão situados em planos perpendiculares à direção ce os outros dois são paralelos a esta direção. Por apresentar uma estrutura complexa, a HA permite substituições aniônicas e catiônicas isomorfas com grande facilidade, o íon Ca^{2+} pode ser substituído por: Zn ²⁺, Mg ²⁺, Pb ²⁺, Fe ²⁺ Cd ²⁺, Sr²⁺, Co ²⁺, o íon (PO₄)³⁻ pode ser substituído por: carbonatos e vanadatos, silicatos, etc. O (OH)⁻ pode ser substituído por: carbonato, flúor e cloro. A apatita biológica é sempre impura e não estequiométrica independente do fato de ser encontrada em esmalte, dentina e osso. A principal impureza é o carbonato CO32-, tendo impurezas menores que incluem Na+, Mg2⁺, K⁺, Cl⁻, F⁻, (LEGEROS, 2008).



Figura 3.2 A estrutura da hidroxiapatita

Por conta da deficiência em cálcio, em torno de 10%, a HA natural é denominada HA cálcio deficiente e pelas substituições do grupo carbonato como hidroxiapatita carbonatada, (JONES, 2001).

A HA carbonatada pode ser classificada como tipos A e B, dependendo do sítio de substituição do carbonato. Nas carboapatitas do tipo A, os íons carbonatos localizamse em canais e substituem os sítios dos íons hidroxila, enquanto que nas carboapatitas do tipo B esses íons substituem os sítios dos íons fosfatos, sendo este último semelhante em composição ao tecido ósseo dentário. A apatita biológica pode ainda apresentar mistura de ambos os tipos A e B. As substituições na estrutura cristalina da HA requerem uma compensação, pois cargas desequilibradas resultam em modificações da estequiometria do composto, como diminuição do Ca ou favorecimento da incorporação de outras impurezas na rede cristalina (JONES, 2001). É portanto essencial a manutenção da neutralidade da carga. Os grupos carbonatos alteram a cristalinidade da HA, podendo acelerar a dissolução da estrutura, processo verificado no evento de reabsorção óssea. (SANTOS, 2005).

A hidroxiapatita cálcio deficiente apresenta maior analogia com as apatitas biológicas em quanto a estequiometria e cristalinidade, que as faz mais reativas em meio biológico, já que ainda possui certa atividade química nos cristais menos perfeitos. A presença de carbonato pode alterar a solubilidade do material e sua afinidade por proteínas da matriz extracelular, propriedades que são cruciais para a determinação de parâmetros de qualidade de implantes ósseos e próteses ortopédicas. (CORDEIRO e GRANGEIRO, 2010). Biologicamente quanto maior o teor de carbonato incorporado à apatita, maior é sua atividade metabólica (COSTA *et al.*, 2009). A estabilidade térmica também é influenciada pela presença do íon carbonato. A HA carbonatada descompõese em temperaturas menores com o aumento do teor de carbonato.

A HA tem grande potencial para regeneração de tecidos duros devido a sua similaridade com a fase mineral do tecido ósseo, o que permite, através do estabelecimento de ligações químicas, a proliferação de osteoblastos, fibroblastos e outras células ósseas, as quais não distinguem essa superfície sintética da superfície óssea. A ligação característica é a do tipo dipolo, a qual promove a adsorção de moléculas de H₂O, além de proteínas e colágeno, induzindo assim a regeneração tecidual. A HA possui alta afinidade por proteínas, tornando-se um ideal portador de peptídeos bioativos, de fatores de crescimento do osso ou de células (SANTOS, 2005). Uma desvantagem da HA como biomaterial é a fragilidade, não sendo recomendada

para esforços mecânicos de grande cargas. Pesquisas tem sido desenvolvidas visando a otimização das propriedades desse material a partir da adição de componentes como zircônia, sílica, titânio, alumina, na sua estrutura. Assim é também utilizado na preparação de compósitos com quitosana, lignina, polietileno de alta densidade, celulose, polímeros biodegradáveis, etc. (SANTOS, 2005).

A HA natural pode ser obtida por desproteinização de tecido ósseo ou por tratamento térmico de corais. A forma sintética pode ser obtida, por precipitação de soluções aquosas, hidrólise a partir de outros fosfatos, síntese hidrotérmica ou reação no estado sólido.

Qualquer variação da composição durante a síntese leva a formação de diferentes fases de compostos de fosfatos de cálcio, cujas propriedades são completamente diferentes das da HA. O que compromete eventos como a osteocondução, além da integridade e a eficiência mecânica do material em função de sua solubilização. Por isso, é importante o controle cuidadoso destes parâmetros como: pH, temperatura de reação, tempo de envelhecimento, estequiometria dos precursores. (VERCIK *et al.*, 2003).

A temperatura sob a qual a HA é sintetizada, tem efeito sobre a cristalinidade do material, as sintetizadas a baixas temperaturas, apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos; as produzidas em altas temperaturas que apresentam uma boa cristalinidade e tamanho de cristais maiores. A sintetizada por via úmida possui características similares as do tecido ósseo e dentário (por ser a baixa temperatura), diferentes das hidroxiapatitas sinterizadas em altas temperaturas. (COSTA *et al.*, 2009)

Dentre as diversas áreas que fazem uso desses biomateriais destacam-se: a ortopedia buscando a união na interface tecido implante no caso das próteses metálicas; fármaco-química, sendo utilizado como suporte de ação prolongada no tratamento de tumores, pois permite o tratamento da doenças através da liberação controlada de drogas no organismo, combinando o tratamento do tumor e a neoformação do osso reabsorvido. Na área odontológica, é utilizado como suporte ósseo após extrações dentárias, além de atuar em defeitos ósseos e na manutenção e aumento de rebordo alveolar.

Autores sugerem a incorporação de polímeros naturais como o colágeno com o intuito de melhorar as propriedades do compósito formado. O colágeno, por exemplo, é um grande agente de união, biocompatível e reabsorvível, demonstrando a eficiência da associação de materiais distintos, acoplando suas melhores propriedades (SANTOS,

2005). Vários compósitos de hidroxiapatita/colágeno têm sido desenvolvidos devido a sua análoga composição com a estrutura do osso. Os estudos obtiveram melhorias nas suas propriedades e no processamento (LIN *et al.*, 2005). Na linha de controle ambiental a HA tem a capacidade de remover metais pesados não só de águas e solos contaminados, assim como também de dejetos industriais especialmente do chumbo.

3.3. ZINCO

O zinco é um elemento que na natureza, se encontra associado ao chumbo, cobre, prata e ferro. Caracteriza-se por sua alta resistência à corrosão, o que permite sua utilização como recobrimento de aços, chapas, tubos e fios por meio de imersão ou electrodeposição. No sistema biológico, se encontra no núcleo das células, nos cromossomas e ribossomos. O zinco é um elemento traço essencial presente numa porcentagem de 0,01% do peso corpóreo (NISHI 1996). Mais com um papel importante em numerosas vias metabólicas. Tem importante função no crescimento e desenvolvimento da síntese celular, hormonal e proteica, além de atuar em todos os sistemas metabólicos (WHO, 2007). A Figura 3.3 ilustra os principais processos biológicos que contam com a participação do zinco.



Figura 3.3 Principais mecanismos enzimáticos sujeitos a ação do zinco. Adaptado de COSTA, 2004

Desta forma, seu excesso e sua falta repercutem no organismo. Este material usado em grandes concentrações é citotóxico, inibe o crescimento dos cristais de apatita,

retardando o crescimento ósseo, pois o mesmo também participa de diversas formas na proliferação celular, na regulação de síntese de DNA além de influenciar na regulação hormonal da divisão celular (MCCALL, *et al.*, 2000). Em baixas concentrações, os íons de Zn²⁺ estimulam a proliferação celular de osteoblastos, e consequentemente a formação óssea (ITO *et al.*, 2000; WEBSTER, *et al.*, 2004) aumentado a quantidade de proteínas, o conteúdo de cálcio e a atividade de fosfatase alcalina das células ósseas. Também tem um efeito inibidor sobre a reabsorção óssea por osteoclastos (SANTOS, 2007; MIAO,2004). O local mais importante de reserva de zinco no corpo humano é o fígado, seguido do tecido ósseo que acumula o 40% do zinco corporal. Cerca de 0,0126 a 0,0217% do peso do zinco concentra-se nos ossos humanos. Este teor é relativamente alto comparado com outros tecidos do plasma sanguíneo. Na Tabela 3.2, pode se observar a concentração de zinco nos diferentes tecidos e órgãos do corpo. (ITO, *et al.*, 2002)

Tabela 3.2 Concentração de zinco	nos diferentes teci	idos e órgãos do corp	o. Adaptado de	Ito et al.,
2002				

Órgãos e tecidos humanos	Concentração µg. g ^{∙1}
Todo o corpo	28-33
Epiderme	70,5
Derma	12,6
Músculo	38-57
Osso	125-250
Plasma sanguíneo (Homem)	0,72-1,21
Plasma sanguíneo (mulher)	0,69-1,15
Próstata	102
Rim	52-75

Foi observado que, com o envelhecimento, ocorre diminuição dos níveis de zinco nos ossos. A ausência de atividades físicas também está relacionada com a perda de zinco tendo uma correlação negativa com a densidade do mineral óssea.

3.3.1. O zinco e sua substituição nos fosfatos de cálcio e na hidroxiapatita

A estrutura complexa da HA permite substituições tanto aniônicas como catiônicas com grande facilidade (MA *et al.*, 2006; MA *et al.*, 2008). Estudos recentes relatam dopagens dos materiais de fosfatos de cálcio com outros elementos químicos como Zn ²⁺, Mg ²⁺, La ³⁺, Y ³⁺, In ³⁺, Bi³⁺, Nb (ITO *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2002; FROST, 2004; SOGO *et al.*, 2004; WEBSTER *et al.*, 2004; WEI e AKINC, 2005, NAVARRO DA ROCHA, 2011), para melhorar a biofuncionalidade, considerando que eles estão presentes nos cristais da HA natural (JONES, 2001). A liberação gradual dos íons substituintes na HA poderia favorecer o reparo ósseo como Mg²⁺ e Zn ²⁺ (WEBSTER *et al.*, 2004; LANDI *et al.*, 2008). Estas substituições aumentaram significativamente a adesão de osteoblastos na estrutura. De acordo com WEBSTER e colaboradores (2004), Zn²⁺, In³⁺ e Bi³⁺ foram os dopantes mais efetivos na resposta dos testes de crescimento celular. Os íons Zn²⁺ em baixas concentrações, 0,6 a 1,2 % em peso, podem se comportar como estimuladores da formação óssea em curto período de tempo (WEBSTER *et al.*, 2004), e como um inibidor dos osteoclastos na reabsorção óssea (ITO *et al.*, 2001).

A existência de dois dos íons de cálcio (Ca1 e Ca2) traz consequências importantes para a HA que contem impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sitio ocupado pelo cátion da impureza. Estudos recentes mostraram a preferência do Zn^{2+} pelo sitio 2 do cálcio, esse sitio pode facilitar a liberação de Zn pela HA biológica, pois não interromperia a estrutura da rede (TANG *et al.*, 2009)

A presença de zinco diminui a razão molar Ca/P e, gradativamente o tamanho dos cristais à medida que aumenta a concentração de zinco e formação de novas faces. (MOURA, 2012). Foi observada a diminuição dos parâmetros de rede dos fosfatos de cálcio com o aumento da concentração de zinco na fase solida indicando que o zinco reposiciona o cálcio na estrutura da HA.

Vários estudos consideram ao zinco como um promissor biomaterial (ITO *et al.*, 2002). SANTOS e colaboradores (2005) concluíram que os compósitos dopados com Zn^{2+} mostraram maior produção de fosfatase alcalina, que os compósitos não dopados com Zn^{2+} . ITO e colaboradores (2006) comentam que o teor ótimo de zinco que havia encontrado para os componentes cerâmicos β -Zn TCP e HA é mínimo de 0,316% e máximo de 0,63% em peso. Diferente aos resultados encontrados por outros autores, SOGO e colaboradores (2004) relataram que nos ensaios de citocompatibilidade feitos em calvária de ratos não houve diferencias significativas no uso de β -TCP puro e β -TCP

com um conteúdo de zinco de 0,11% em peso. SANTOS e colaboradores (2007), indicaram que compostos de HA/COL dopado com Zn^{2+} em quantidade 1,05% em peso não estimularam os efeitos sobre a proliferação e nem aumento da fosfatase alcalina das células osteoblásticas. RESENDE (2010), relata que em ensaios feitos em tíbia de coelhos não houve diferencia significativa em quanto a formação de tecido ósseo sobre microesferas de HA contendo zinco a 5%, sendo esta parcialmente reabsorvida em comparação com microesferas de HA.

PEREIRA DA SILVA (2012) relata que nos ensaios de biocompatibilidade in vivo em calvária de coelhos, não houve diferenças significativas no uso de arcabouços de HA nanoestruturada puro e arcabouços de HA com um conteúdo de zinco a 2% no peso desse recobrimento. Nestes estudos provavelmente a quantidade de agente dopante de zinco e o método de síntese são fatores para a variação dos resultados. (SANTOS, 2007).

3.4. INTERAÇÃO CÉLULA – SUBSTRATO

Sabe-se que as células são capazes de responder a estímulos do meio em que estão inseridas e que os mecanismos pelos quais isso ocorre, estão intimamente ligados a bioatividade do material. Além disso, a resposta fisiológica da célula em contato com a superfície do material determinará sua adesão, proliferação e diferenciação (PFEIFFER *et al.*, 2003).

Para que as células possam se desenvolver e se organizar, formando um tecido, é necessário que aconteçam interações dos receptores presentes na superfície destas com diversas moléculas presentes na matriz extracelular. Essa interação entre as células e a matriz consiste no processo de adesão, (BERRIER e YAMADA 2007). As células se aderem a proteínas específicas da matriz (principalmente colágeno) através das integrinas. Estas, por sua vez, quando aderidas ao substrato podem se agregar formando placas (contato focal) que consistem de junções onde a distância entre a membrana da célula e a superfície do substrato está entre 10 a 15 nanômetros. Estas ficam na porção interna da membrana citoplasmática. Uma vez aderidas, as integrinas expõem em sua porção intracelular, sítios de ligação específicos para comunicação com os filamentos de actina presentes no citoesqueleto. Esses filamentos passam por uma reorganização que permite à célula alterar sua conformação em resposta ao ambiente externo (ALBERTS *et al.*, 2010b).

Para que ocorra a migração, adesão e diferenciação celular e consequentemente o crescimento do tecido, é interessante que os biomateriais utilizados como suporte celular apresentem similaridade físico química com a matriz extracelular, objetivando auxiliar a interação do material com o organismo. (SANTOS, *et al.*, 2007). Uma vez que o material possua características similares àquelas apresentadas pela matriz extracelular, ao realizar uma cultura a célula passa a colonizar o material, que deve se manter íntegro por tempo suficiente para que ocorra a organização dessas células e deposição de matriz extracelular secretada por elas formando, então, um tecido íntegro.

3.5. TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE

Objetivando a bioatividade do material, torna-se essencial a realização de modificações em sua superfície com agentes responsáveis pela promoção e organização do processo de adesão celular, o que promoverá a migração, diferenciação e crescimento do tecido.

As propriedades da superfície devem englobar tanto aspectos estruturais, quanto químicos. Dessa forma, os tratamentos de superfície nos implantes ortopédicos e odontológicos visam a promoção de uma ligação químico-mecânica com o osso subjacente (PFEIFFER *et al*, 2003). Os tratamentos de superfície podem ser divididos em 3 métodos principais: recobrimentos, tratamentos mecânicos e tratamentos químicos.

3.5.1. Recobrimentos de hidroxiapatita.

As cerâmicas à base de Ca e P são consideradas frágeis e têm limitações clinicas quando usadas como próteses de quadril ou implantes dentários. Os metais são os materiais mais apropriados por suas propriedades mecânicas para este fim. Como os metais não formam ligações quimicamente estáveis com o tecido ósseo foram buscadas maneiras para melhorar esta interface. É assim que são desenvolvidos os recobrimentos de biocerâmicas de fosfatos de cálcio por terem habilidades de ligar-se quimicamente com o osso. Sendo a interação entre células e tecidos com os biomateriais na interface tecido-implante um fenômeno de superfície, as propriedades da superfície exercem um papel primordial na determinação da resposta biológica ao implante e da resposta do material perante as condições fisiológicas (PAITAL *et al.*, 2009). Os recobrimentos são

aplicados para melhorar as propriedades da superfície do substrato tais como adesão, molhabilidade, resistência à corrosão, resistência ao desgaste, entre outros. Em estudos recentes, foram observados revestimentos de implantes bioinertes com cerâmicas bioativas que proporcionam uma adequada matriz na superfície do implante para interação com o tecido ósseo (DE GROT, 1998). A ligação ao tecido ósseo por meio de liberação de íons da superfície do implante induz à nucleação de apatita, acompanhada pela formação de uma camada de apatita carbonatada na superfície do material.

Além das considerações mecânicas, ainda é complexo conseguir um equilíbrio entre as propriedades osteoindutoras, apresentadas pelo material bioativo e a sua reabsorção ou degradação. A taxa de degradação ou reabsorção do recobrimento maior do que a taxa de crescimento interno do osso, pode levar à perda de estabilidade do implante. Isto resultará na perda da adesão e a falha do implante. Uma das maiores preocupações associadas ao uso de recobrimentos de HA diz respeito a sua estabilidade em longo prazo. No caso de recobrimentos com HA, a estabilidade mecânica precisa ser suficiente para manter as funcionalidades bioativas após a cirurgia de implantação.

Pesquisas têm-se desenvolvido com foco não somente na interface implantetecido, mas principalmente nos problemas associados com o processo de recobrimento e na otimização dos parâmetros de recobrimento melhorando a resposta tecidual. Outro fator amplamente estudado é a adesão do recobrimento ao substrato, o desempenho do conjugado substrato-recobrimento depende, não só de suas propriedades biológicas ligadas a estrutura do recobrimento si não também a estabilidade mecânica e química. A esteabilidade mecânica dos recobrimentos esta intimamente associada a aderência ao substrato. A ordem de aderência depende do tipo de ligação (química: iônica-covalente ou mecânica: ancoragem física) que ocorre na interfase metal hidroxiapatita. A aderencia é fundamentalmente afetada pelos parâmetros do processo e pelas características da superfície do substrato antes do recobrimento (limpeza dos óxidos ou outros compostos orgânicos e também rugosidade). A energia superficial das superfícies partículas- substrato também determina o quão boa será a aderência, devido a facilidade de molhabilidade e do contato físico entre os materiais. A taxa de dissolução é um outro fator importante para a estabilidade do recobrimento e depende; da cristalinidade da HA, da espessura e topografia do recobrimento, do ambiente celular, dentre outros fatores. A dissolução de íons de Ca^{2+} y PO_4^{3-} tem sido vista com favorecedora da osteoconductividade.

A espessura do recobrimento também é importante, pois recobrimentos muito espessos são susceptíveis de quebrar. Ao contrário se o recobrimento fosse muito fino, poderia ser mais facilmente reabsorvido, devido a sua solubilidade. A solubilidade da HA que é a segunda menor entre os fosfatos de cálcio, estando na faixa de 15-30 m por ano.

3.6. TECNICAS DE DEPOSIÇÃO DE RECOBRIMENTOS DE HA

Dentre as varias técnicas utilizadas para a aplicação de recobrimentos de HA, têm-se as técnicas físicas: plasma *spray*, recobrimento por *sputtering*. Estas produzem recobrimentos de alta qualidade e filmes com alta densidade. No entanto estas técnicas possuem algumas desvantagens como requerimento de equipamentos sofisticados e altos custos, além de baixa resistência e adesão.

A HA pode ser sintetizada por técnicas químicas a partir de meios aquosos (por precipitação em solução aquosa, síntese hidrotérmica e hidrólise de outros fosfatos de cálcio). Nestas técnicas a temperatura não excede 1000 C, podem-se preparar cristais de tamanho nanométricos. Sua cristalinidade e razão Ca/P dependem fortemente das condições de preparação. (ELLIOT, 1994).

Estas técnicas obtêm recobrimentos com diferentes espessuras variando de dimensões submicrométricas a várias centenas de mícrons, como mostrado na Tabela 3.3. Camadas mais finas de HA como recobrimentos apresentam melhor adesão, além de uniformidade na camada produzida.

TÉCNICA	ESPESSURA	VANTAGENS	DESVANTAGENS	REFERÊNCIAS
Plasma spray	30-200 μm	Baixo custo, Altas taxas de deposição	Uso de altas temperaturas; produção de recobrimentos amorfos.	YANG <i>et al.</i> , 2005; VERCIK, 2004.
Deposição por Sputtering	0,5-3 μm	Recobrimento denso e uniforme em	Alto custo; recobrimentos amorfos	DINGS, 2003; NAKAGAWA, 2004; YANG <i>et</i>

Tabela 3.3 Algumas das diversas técnicas de obtenção de recobrimentos de hidroxiapatita.Adaptado de (YANG et al, 2005)
		superfícies planas		al., 2005.
Sol-Gel	< 1 µm	Promove boa adesão substrato- recobrimento; baixas temperaturas, baixo custo	Pode requerer atmosfera controlada	ZHANG J. Y. <i>et</i> <i>al.</i> , 2013 AVES, <i>et al</i> , 2008 PEON, E., et al 2005.
Deposição por eletroforese	0,1 – 2,0 μm	Recobrimentos com espessura uniforme; altas taxas de deposição; Recobre superfícies complexas	Altas temperaturas; Dificuldade em controlar o aparecimento de trincas	AVES <i>et al</i> , ; 2007; SENA et al., 2002
Deposição biomimética	< 30 µm	Formaapatitasemelhante àapatitaapatitanatural;Pode incorporarfatoresdecrescimento ósseo.	Processo lento; Técnica sensível a variações pelo Simulated Body Fluid (SBF)	PAZ et a.,l, 2011; VERCIK et al, 2003.
Deposição Hidrotérmica	< 30 µm	Forma apatita semelhante à apatita natural, com espessura uniforme, Baixo custo	Técnica sensível a variações de Ph, e Temperatura.	NAVARRO, 2013 MOURA, 2012

Métodos que utilizam baixa temperatura, envolvendo precipitação com uma solução, possuem como vantagem a uniformidade e tamanhos menores de partículas, quando comparados com os métodos em altas temperaturas. (PAZ *et al.*, 2011).

Hoje em dia, persistem problemas relacionados com a uniformidade do recobrimento e da estabilidade a longo prazo, da união do recobrimento ao substrato metálico. É por isso que se realizam inumeráveis investigações para conseguir um sistema que combine as vantagens mecânicas dos metais e a afinidade biológica das

cerâmicas de hidroxiapatita, obtidas por diferentes vias e depositadas sobre superfícies metálicas, tentando superar tais inconvenientes.

3.6.1. Processo de precipitação em meio aquoso

A precipitação de HA pode ser realizada empregando a precipitação em soluções aquosas (CUNHA *et al.*, 2004). A síntese de fosfatos de cálcio via precipitação química apresenta vantagens devido ao seu baixo custo e simplicidade. No entanto, a maioria dos procedimentos sintéticos apresenta a formação de produtos não estequiométricos e mistura de fases, que se deve à presença de vacâncias e substituições iônicas na rede, tais como carbonatos (FERNANDES, 2011), isso permite incorporar outros elementos como o zinco. Estudos relatam a utilização desta técnica para a elaboração de recobrimentos de HA com diferentes substituições iônicas como o zinco, o nióbio, a prata. (NAVARRO, 2011; MOURA, 2012).

Os processos de precipitação consistem na adição de grupos fosfatos a suspensões que contenham íons cálcio, podendo partir de diferentes reagentes. A reação de neutralização que utiliza ácido ortofosfórico e hidróxido de cálcio apresenta maior potencial para produção da HA, uma vez que se tem apenas água como subproduto da reação (RIGO et al., 2007, FERNANDEZ, 2011). AFSHAR e colaboradores (2003), prepararam HA a partir de suspensão de hidróxido de cálcio 0,5M, a qual foi aquecida por 1 hora em 40°C e agitada constantemente. Sobre ela foi adicionada ácido fosfórico 0,3M a uma taxa de 2 gotas/s. Os resultados apresentaram partículas com forma de bastão de escala nanométrica. Além foram encontrados alguns íons de carbonato, indicando que o precipitado em presença de dióxido de carbono no ar transforma se em HA carbonatada tipo A e B. FONSECA (2007), relata a inclusão de 1 M de ácido lático, na solução descrita por AFSHAR e colaboradores (2003), e mantendo a nova solução a temperatura ambiente. A suspensão obtida, denominada transparente, mostrou pH 3,8. Para a obtenção de precipitados com pH 12, adicionou-se uma base forte de hidróxido de potássio (KOH). Obtendo de HA nanométrica em pó. De acordo com WANG e SHAW, (2009), o método de precipitação aquosa é capaz de sintetizar HA nanométrica.

Outros autores relatam a obtenção de um precursor de HA e sua posterior conversão em hidroxiapatita por um processo hidrotérmico. (MOURA, 2012; NAVARRO *et al.* 2012; PRADO DA SILVA *et al.*, 2014,) Moura em 2012 relata que foram colocados os substratos de titânio e nióbio numa solução (solução transparente) e

mediante um processo hidrotérmico (60°C em Banho Maria) foi depositada monetita, posteriormente convertida hidrotérmicamente em HA (80°C em Banho Maria). Este mesmo autor descreve a incorporação de zinco na solução transparente, obtendo mediante o processo hidrotérmico parascolzita e monetita como precursores de HA. Esta técnica apresentam variáveis que influência no recobrimento resultante, tais como pH, temperatura de obtenção, concentração molar dos reagentes, taxa de adição de reagentes, tempo de agitação (FERNANDES, 2011). Para que se forme um solido por precipitação tem que acontecer dois processos que ocorrem simultaneamente: precipitação a partir de uma solução e cristalização, a razão com a qual estas etapas acontecem determina a cristalinidade do material. Esta razão pode ser controlada pela variação da saturação da solução e pelo tempo médio de cristalização, que tem como parâmetros a temperatura e a taxa de gotejamento. A temperatura na qual a precipitação se processa tem grande importância na fase obtida e na conversão de uma em outra fase. O tamanho da partícula e a morfologia também são influenciados pela temperatura. A taxa na qual os reagentes são adicionados influencia na taxa de nucleação dos cristais. A adição lenta de íons fosfato proporciona menor taxa de nucleação e maior taxa de crescimento, o que implica na obtenção de partículas maiores. Pelo contrário, altas taxas de adição de reagentes permitem a formação de maiores números de núcleos, mas sem que haja tempo suficiente para crescimento de grão (RIGO et al., 2007).

LU e colaboradores (2007) conseguiu induzir a formação de fosfatos de cálcio na superfície de titânio mediante um tratamento com ácido nítrico. Este condicionamento ácido aumenta a rugosidade superficial, pois superfícies ásperas levam a uma boa aderência entre revestimentos e substratos (LU *et al.*, 2007). Estudos mostram que os tratamentos ácidos prévios a deposição, promovem uma maior adesão do recobrimento devido à formação do titânio de sódio e sua interação com a apatita formada. Estudos recentes, KOKUBO e colaboradores (2009) apresentam tratamentos hidrotérmico no qual a superfície do titânio é ativada por meio de hidróxido de sódio, criando uma camada intermediária bioativa entre a apatita precipitada e o óxido do substrato metálico. Assim com esta camada bioativa se favorece a nucleação e crescimento de fosfatos de cálcio pela ativação da superfície. O uso de uma solução sobressaturada de íons cálcio e fosfato e um tratamento de ativação da superfície de Ti permite obter uma superfície oxidada com elevada bioatividade, possibilitando diminuir o tempo de formação do recobrimento além de depositar camadas com uma elevada cristalinidade e densidade (PAZ *et al.*, 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O método do recobrimento da hidroxiapatita e da hidroxiapatita parcialmente substituída com zinco seguirá uma rota de deposição hidrotérmica por precipitação em meio aquoso segundo os estudos anteriores já descritos. (NAVARRO DA ROCHA e PRADO DA SILVA, 2011; MOURA, 2014). O processo de deposição é similar para os dois grupos. Durante o processo, temos dois procedimentos, a primeiro em que ocorreu uma deposição hidrotérmica de uma fase precursora a partir de uma solução rica em íons de cálcio e fosfato. Onde a monetita (procedente da solução rica em Ca e P) ou a parascolzita (procedente da solução rica em Ca e P com a incorporação do Zn) foi depositado sobre a superfície do substrato previamente ativo, por precipitação. No segundo procedimento os revestimentos de monetita e parascolzita foram convertidos em hidroxiapatita por uma conversão hidrotérmica, em um meio alcalino.

4.1.1. Preparo dos substratos

Para a produção dos recobrimentos, foram utilizados substratos de Ti comercialmente puros. Os substratos foram cortados em dimensões de 10 mm x 10 mm x 1 mm (tamanho recomendado para o teste de cultura celular) e lixados com lixa de SiC de granulometria 400 e 600 grãos/pol2 (mesh) seguido de lavagem com abundante água.

Os substratos de Ti foram imersos em uma solução de ácido fluorídrico e ácido nítrico [HF/HNO₃] por 30 segundos, a concentração da solução é 70 ml água, 28 ml acido nítrico, 2 ml ácido fluorídrico. Posteriormente estes foram submetidos a um protocolo de limpeza da superfície e posteriormente secos em estufa a 80°C por 10 minutos. Este tratamento com ácido tem como objetivo obter uma rugosidade homogênea nos substratos, ativar a superfície de Ti e diminuir o tempo de deposição do recobrimento.

4.1.2. Deposição dos recobrimentos de hidroxiapatita

Para a deposição destes recobrimentos foi realizado como primeiro passo o preparo de uma solução rica em íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} que é precursora de monetita. Esta solução foi elaborada misturando em agitação constante uma solução de 0,5 M de hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂], uma solução de 0,3M de ácido orto fosfórico [H₃PO₄] e uma solução de 1M de ácido láctico [C₃H₆O₃]. Estas soluções foram preparadas nas proporções descritas na Tabela 4.1. Ao final, se obteve 750mL de solução. Esta solução é mantida em agitação por 24 horas e controlando para que o pH fique ao redor de 3,7. Uma vez que neste pH a monetita é termodinamicamente estável.

Reargentes	Quantidade	Água	Volume	
		ultrapura	total obtido	
Hidróxido de cálcio [Ca(OH) ₂]	9,63g	250 mL	250mL	
Ácido lático [C ₃ H ₆ O ₃]	25m L	225 mL	250mL	
Ácido fosfórico [H ₃ PO ₄]	5mL	245 mL	250mL	

Tabela 4.1 Reagentes que foram utilizados.

Depois disto, os substratos de Ti previamente ativados com tratamento acido, foram colocados em um béquer contendo 250 mL de solução rica em Ca e P e aquecidos em banho-maria a 80°C por 1 hora, neste tempo teremos a deposição de uma camada fina e uniforme de monetita sobre o substrato de Ti. Após a deposição os substratos foram secos na estufa a 60°C por 10 minutos. A conversão dos recobrimentos de monetita para HA foi feita através da imersão dos substratos de Ti em 250 mL de solução 0,1M de hidróxido de sódio (NaOH) para o pH ser ajustado a fim de alcançar valor de 12 pH e mantida a 80°C por 24h, permitindo a conversão em HA. Posteriormente foram novamente secos na estufa a 60°C por 10 minutos.

4.1.3. Elaboração do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituída com zinco.

O nitrato de zinco hexa-hidratado ZnNO₃.6H₂O foi eleito para ser utilizado como fonte de zinco (ITO *et al.*, 2000; SOGO *et al.*, 2004; FUJI *et al.*, 2006;

GRANDJEAN-LAQUERRIEREA *et al.*, 2006). A incorporação de zinco à solução rica em Ca e P foi baseada seguindo a rota descrita por MOURA (2012), na qual se procede à substituição parcial de íons Ca^{2+} por Zn^{2+} , reduzindo-se a proporção de Ca^{2+} na suspensão de hidróxido de cálcio e pelo acréscimo de nitrato de zinco à razão de 0,10M.

Esta nova solução foi elaborada misturando sempre em agitação uma solução de 0,5 M de hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ e uma solução de 0,1M de nitrato de zinco hexa-hidratado $[ZnNO_3.6H_2O]$ durante 1 hora, após este tempo se adiciona a solução de 0,3M de ácido orto fosfórico $[H_3PO_4]$ e uma solução de 1M de ácido láctico $[C_3H_6O_3]$. Estas soluções foram preparadas nas proporções descritas na Tabela 4.2. Ao final, se obteve 750 ml de solução. Esta nova solução é mantida em agitação por 24 horas controlando que o pH fique ao redor de 3,7 similar ao processo feito para o recobrimento de HA.

Reargentes	Quantidade	Água ultrapura	Volume
			total
Hidróxido de cálcio [Ca(OH) ₂]	8,63 g	200 mL	200mL
Nitrato de zinco hexa-hidratado	3,8 g	50mL	50mL
$[ZnNO_3. 6H_2O]$			
Ácido lático [C ₃ H ₆ O ₃]	22m L	225 mL	250mL
Ácido fosfórico [H ₃ PO ₄]	5mL	245 mL	250mL

Tabela 4.2 Tabela de reagentes que foram utilizados no recobrimento com ZnHA

Posteriormente foram colocados substratos de Ti previamente tratados com acido, em um béquer, contendo 250 ml de solução rica em Ca, P e Zn, aquecidos em banho-maria a 80°C por 12 horas. O processo de precipitação nesta solução é mais demorado, sendo necessário mais tempo em comparação com a solução sem zinco. O recobrimento começa aparecer a partir de 5 horas de imersão, porém, são necessárias de 8 a 12 horas para a obtenção de um recobrimento total e uniforme. Após a deposição, os substratos foram secos na estufa a 60°C por 10 minutos. Nesta fase teremos a deposição de outro precursor além da monetita, a parascolzita, ambas foram posteriormente convertidas em HA. Esta conversão foi feita através da imersão dos substratos de Ti recobertos em 250 ml de solução 0,1M de hidróxido de sódio (NaOH) para o pH ser ajustado a fim de alcançar valor de 12 pH e mantida a 80°C por 24h, permitindo a conversão em HA. Foram novamente secos na estufa a 60°C por 10 minutos.

4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS

4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a realização da caracterização da superfície dos substratos de Ti e dos recobrimentos foi utilizado a Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV Zeiss DSM 940, dotado de um detector EDX Link 45 do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanalise do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, UFRJ. Assim como também e o equipamento JEOL JSM- 5800LV do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Militar de Engenharia. Os parâmetros para a caracterização do recobrimento foi voltagem de 20 kV e uma distância de trabalho média de 10 mm.

4.2.2. Difração de raios X (DRX)

O objetivo de se empregar esta técnica neste trabalho foi de caracterizar os recobrimentos de HA e ZnHA, através da investigação das possíveis fases presentes e do grau de cristalinidade de cada material.

As análises por DRX foram realizadas por dois métodos: Primeiro pelo método de incidência rasante, porque a espessura de película média calculada foi de aproximadamente, 18 um. Ângulos de incidência de 0,5°, 2,5° e 3,5° foram testados até obter uma diminuição dos picos do substrato sem afetar nos picos do recobrimento. Sendo que em Ângulo de 2,5° conseguiu-se eliminar os picos do substrato tendo como resultado só os picos do recobrimento. Medições de difração de raios X adicionais foram feitos do pó para definir a estrutura cristalina do revestimento. A obtenção do pó foi por raspagem das placas de Ti recobertas.

Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Cristalografia e Difração de Raios-X do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF. As amostras de pó foram analisadas com o difratometro de pó Zeiss HZG4, usando uma radiação de CuKa (= 1,5418 Å) a varredura angular de $10-80^{\circ}$ com passo de 0,05/s. As amostras de Ti recobertas foram analisadas usando o Equipamento X Pert Pro MPD módulo de filmes na radiação de Cu Ka (= 1,5418 Å) a varredura angular de $20-80^{\circ}$ com passo de 0,05/s e um angulo de incidência de $2,5^{\circ}$. Os difratogramas obtidos foram comparados com os

registros do banco de dados do JCPDS - ICDD (Joint Commitee on Powder Diffraction Standards - International Centre for Diffraction).

4.2.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais será realizada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, esta técnica nos permite também identificar algumas substituições importantes ou alterações na composição da hidroxiapatita, particularmente nos grupos $(PO_4)^{-3}$ e OH⁻ pelos grupos CO_3^{-2} . Os espectros foram obtidos no Laboratório de Biomateriais do CBPF utilizando o espectrofotômetro por transformada de Fourrier da Schimadzu, IR-Prestige 21 com detector DTGS KBr, separador de feixes de KBr. A análise foi por transmissão utilizando pastilhas de KBr, numero de scans: 200, resolução: 4,0 e na região do infravermelho (4000- 500 cm⁻¹).

4.2.4. Perfilometria por contato

A técnica de perfilometria por contato é uma técnica de caracterização da topografia da superfície, na qual uma agulha fina varre toda superfície a ser investigada. À medida que ocorrem alterações na altura da superfície, as mesmas são identificadas pelo sistema mecânico e serão transmitidos como sinais elétricos para um computador que irá digitalizar e analisar essas informações, criando o perfil da superfície. Nesse trabalho, foi utilizado o Perfilômetro Dektak XT da BRUKER do Laboratório de Filmes Finos, PEMM/UFRJ para medir a espessura dos recobrimentos.

Para a medida de espessura do filme, foram feitas cinco varreduras de 5 mm cada, na região de degrau entre o recobrimento e o substrato. O degrau foi feito colocando outra chapa de Ti sobre metade do substrato antes da deposição.

4.2.5. Fluorescência de raios X

Através da fluorescência de raios X podem ser quantificados os elementos químicos presentes nos recobrimentos, avaliando o grau de substituição dos íons zinco na hidroxiapatita e sua estequiometria, razão Ca+Zn/P.

Foram analisados o pó do recobrimento e as chapas de Ti recobertas. As amostras do pó foram preparadas por fusão à 1050 °C no equipamento VULCAN, na diluição 1:5 (1g de amostra e 5g de fundente), utilizando-se como fundente a mistura de boratos (Li2B4O7 66,25 % - LiBO2 33,25% - LiI 0,5%), as placas foram embutidas em ácido bórico, e lidas em Espectrômetro de Fluorescência de raios-X por comprimentos de onda. Nesse trabalho, foi utilizado o equipamento VULCAN do Laboratório de Analises químicas do CETEM/UFRJ.

4.2.6. Teste de adesão do recobrimento ao substrato

A aderência de um recobrimento é dada pela energia necessária para separá-lo de um substrato sobre o qual foi depositado. Se a aderência for inadequada à aplicação, pode ocorrer desprendimento do recobrimento e exposição do substrato, podendo levar o conjugado substrato/recobrimento a uma falha catastrófica. Os critérios de atribuição de falha supõem que a carga na qual ocorre um evento (carga crítica para o evento) é uma boa medida da aderência do filme ao substrato.

Os estudos de adesão dos recobrimentos aos substratos serão realizados por meio de testes de resistência ao risco. Este ensaio baseia-se em deslocar um penetrador com ponta de diamante do tipo Rockwell C sobre o recobrimento, com carga constante ou progressiva, provocando um risco, quando atingida a carga crítica, o recobrimento pode trincar-se ou desprender-se do substrato. Quando isso ocorre, ruídos emitidos pelos processos de fratura do recobrimento são captados e processados. A falha dos revestimentos é normalmente detectada através da observação do risco produzido ao microscópio.

Os ensaios do teste de resistência ao risco foram realizados utilizando uma Maquina de Teste Universal UMT-2 fabricado pela CETR (*Center for Tribology Co.*) do Laboratório de Filmes Finos, PEMM/UFRJ. Mediante um incremento linear progressivo de uma carga sobre uma ponta Rockwell C de diâmetro de 6,25 mm (1/4"), com uma velocidade de 1,66 mm/s e uma taxa de carregamento constante de 0,53 kgf/s, até uma carga final de 2 kgf (19,62 N). Dando origem a um risco de 6mm de cumprimento.

4.2.7. Molhabilidade/Capilaridade

A molhabilidade é um parâmetro que indica o quanto um líquido pode se espalhar sobre uma superfície. Quando uma gota líquida é depositada sobre uma superfície horizontal, a molhabilidade estará ligada ao comportamento do ângulo de contato entre a linha tangente à superfície do líquido e esta superfície horizontal, é por tanto de grande interesse na área.

A determinação de ângulo de contato do solido por líquidos em sistemas envolvendo água como fase liquida, indica o caráter hidrofílico/ hidrofóbico do sólido. Diversos métodos são empregados na determinação do ângulo de contato, a determinação direta pode ser feita pela técnica de gota séssil ou da bolha cativa, em uma gota líquida ou em uma bolha de gás posicionada na superfície do material, é medida utilizando o goniômetro de contato. Estas técnicas demandam via regra, superfícies planas, polidas, impermeáveis e homogêneas. Então os recobrimentos de HA e composto de cristais e não apresentam uma superfície plana suficientemente grande para a determinação direta do ângulo de contato (MARTINS, 2009). Portanto para a determinação da molhabilidade do material, são utilizadas medições indiretas, como a baseada na ascensão capilar de líquidos (capilaridade).

Medidas de capilaridade foram realizadas em triplicata pelo método de ascensão capilar, a temperatura ambiente na qual as chapas de Ti recobertas foram colocadas em contato com a superfície do liquido teste (água mili-Q), sendo a razão de ascensão da mesma medida pela massa adquirida pelo recobrimento ao ser percolado pelo líquido em função do tempo. O tempo de ascensão foi monitorado por filmagem do processo.

4.3. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* DOS RECOBRIMENTOS

4.3.1. Cultura de osteoblastos

A cultura de células nos recobrimentos foi realizada com osteoblastos humanos (HOB). As HOB foram mantidas em meio contendo meio de cultura DMEM com baixa concentração de glicose (GIBCO) e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Soromed). O pH do meio de cultivo é ajustado para 7,2 e as culturas mantidas em estufa a 37 ^oC, em atmosfera úmida com 5% de CO₂, até confluência. Ao longo da cultura o meio será trocado cada dois dias, dando os nutrientes necessários para a sobrevivência celular. (RAYBOLT, 2008) Os experimentos relacionados à cultura de células foram realizados no Laboratório de Bioengenharia de Sistemas do Departamento de Biofísica da UFRJ e no Laboratório de Cultura de Células do Centro Brasileiro de Pesquisa Física (CBPF).

4.3.2. Viabilidade/ Citotoxicidade

Para observar a viabilidade / citotoxicidade celular foi utilizando a Analise de Live/Dead onde a calceína-AM (Ca-AM) e etídio homodimero-1 (EthD-1) foram utilizado para quantificar as células viáveis. Calceina-AM é clivada pela esterases celulares presentes no interior de células viáveis para formar um produto verde fluorescente que é membrana impermeável. Homodímero-1 de etídio é um marcador fluorescente vermelho que liga-se a ácidos nucleicos e só passa através da comprometida membrana de células não-viáveis.

Os osteoblastos cultivados foram recolhidas da garrafa de cultura contendo Dulbecco Médium Eagle-Modified (DMEM) por prévia digestão enzimática com 0,1% tripsina (Sigma Chem Co, EUA) feita em 0.25% Verseno (DIFCO, EUA) por 5 min. a 37 $^{\circ}$ C, centrifugadas (1500 rpm; 5 min.). O sobrenadante foi descartado e os precipitados (pelet) resuspensos em meio de cultura para realizar a contagem do número de células e ensaiadas. A densidade celular da suspensão foi estimada por contagem hematimétrica e ajustada para 1 x 10⁴ células/ ml. As amostras previamente esterilizadas com raios gama foram colocadas nos poços de uma placa de 12 poços padrão; 6 lamínulas de vidro (3 para o controle negativo, por não ser toxico; 3 para o controle positivo, colocando posteriormente SDS que é tóxico), 3 placas de Ti recobertas com HA e 3 amostras de Ti recobertas com ZnHA. O campo foi limitado com em clone tubo que foi colocado acima de cada chapa (Figura 4.1 A), foi adicionado 1 ml para dentro de cada cilindro, após foi colocada DMEN ao redor do clone tube como mostrado na Figura 4.1. As amostras foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.



Figura 4.1 (A) cone tubo estéril, (B) Células no meio de cultura colocado dentro do cone tubo e meio de cultura colocado por fora, (C) ampliação.

Ao fim de 24 horas de cultura, foi cuidadosamente removido o meio de cultura com células dos poços, para serem lavadas as amostras com PBS a 37 °C. Longe da luz, foram colocadas as amostras numa caixa fechada, invertidas sobre 15µl da mistura dos corantes (Ca-AM + EthD-1), mantidos em Banho Maria por 30 min. Seguidamente foram lavadas novamente com PBS. Numa lâmina de vidro foi colocada uma gota de DABCO para cada amostra e colocada á amostra ainda invertida, posteriormente é levada ao microscópio.

As células aderidas ás superfícies foram então visualizadas por microscopia de fluorescência. Iluminação sequencial em comprimentos de onda de 500 nm e 625 nm foi utilizada para destacar calceína-AM positivo (ao vivo) e EthD-1 (células positivas mortas), respectivamente. As contagens de células vivas (verde) e mortas (vermelhas) foram feitas em quatro campos pré-selecionados por amostra. Este procedimento se realizou no Laboratório de Cultura de Células do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas.

4.3.3. Adesão dos osteoblastos

Para quantificar a adesão celular ao recobrimento, foram novamente cultivadas as células HOB, para este teste a densidade celular da suspensão foi estimada por contagem hematimétrica e ajustada para 5 x 10^4 células/ ml. Foram colocadas 3 amostras de Ti sem recobrir, 3 placas de Ti recobertas com HA e 3 amostras de Ti recobertas com ZnHA em placas de poços como mostra a Figura 4.2 (A), o experimento foi feito em triplicata. 5ml de suspensão de células foi colocado em cada poço (o suficiente para cobrir a amostra) (Figura 4.2 B). As amostras foram incubadas em estufa a 37 $^{\circ}$ C com 5% de CO₂ em três grupos de tempos diferentes para o estudo da adsorção e adesão celular (T1= 30 min.T2= 120 min.T3= 240 min).

Depois deste tempo as placas foram lavadas com PBS 0,01M para retirar as células não aderidas e, em seguida, as amostras foram preparadas para análise no MEV.



Figura 4.2 (A) Amostras colocadas no poço de cultura em 3 diferentes tempos. (B) Suspensão de células sendo colocado em cada poço de cultura.

As imagens obtida pelo microscópio Eletrônico de Varredura, observadas a 20 kV e uma distância de trabalho media de 10 mm, foram fotografadas e, então, seguiu-se ao contagem das células presentes em cada grupo de amostras. A contagem foi feita diretamente das microfografias obtidas do MEV. Para isso dividimos a morfologia das células conforme descrito por Raybolt em 2008, em três grupos: esféricas ou não espraiadas, parcialmente espraiadas e totalmente espraiadas. Conforme a Figura 4.3.

- Não espraiadas ou esféricas, menores que 60 μm, onde as protrusões citoplasmáticas e lamelipódios ainda não foram produzidos.
- Parcialmente espraiadas ou polimórficas, menores que 100µm, quando as células começam a se espalhar lateralmente para um ou mais lados.
- Totalmente espraiadas ou polimórficas, maiores que 100µm, quando as extensões da membrana plasmática estão para todos os lados, a célula está achatada com uma larga área de contato com o material.



Figura 4.3 Ilustração mostrando a morfológica das células. Adaptado de Raybolt, 2008.

4.3.4. Caracterização de morfologia celular

De forma a fazer as análises da morfologia celular no MEV, as células aderidas a substrato foram fixadas usando a solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% PFA 4% cacodilato de sódio 0,1M) por 1 hora, posteriormente foram lavadas 3 vezes com tampão cacodilato de sódio 0,2M. Pós-fixadas com ósmio (1% de ósmio para 1% de cacodilato) e posteriormente lavadas novamente 3 vezes com cacodilato 0,2 M.

Após fixação, as células foram desidratadas por imersão em soluções aquosas de etanol com concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90%, 100%). Cada imersão dura 20 minutos sempre mantendo a amostra úmida para prevenir sua desidratação. A secagem das amostras foi realizada no aparelho de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030) utilizando-se CO₂ como substituto, e posteriormente foram recobertas por um fino filme de ouro (Emittec) para serem examinadas no MEV. Este procedimento se realizou no Laboratório de Cultura de Células/Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas. O ponto crítico foi realizado no Laboratório de Microbiologia do CCS-UFRJ.

As imagens obtida pelo microscópio Eletrônico de Varredura, observadas a 20 kV e uma distância de trabalho media de 10 mm, foram fotografadas e, então, seguiu-se a avaliação da morfologia das células presentes em cada grupo de amostras. Foi observada a adesão, espraiamento, presença de prolongamento membranar/citoplasmático e possível deposição de matriz extracelular.

4.3.5. Ensaio de proliferação celular.

A proliferação celular foi avaliada mediante uma quantificação celular durante o período de cultivo, avaliando-se os núcleos, que foram corados com DAPI (40,6-20diamidino-fenilindol, dicloridrato). Para a determinação do número de células, os discos de titânio foram micrografados em microscópio de fluorescência, em um aumento de 10x, as curvas de crescimento obtidas foram utilizadas para estabelecer a proliferação das células.

As células HOB cultivadas foram recolhidos da garrafa de cultura como explicado no item 4.3.4. A densidade celular da suspensão foi estimada por contagem hematimétrica e ajustada para 1×10^5 células/ ml. As amostras previamente esterilizadas com raios gama foram colocadas numa placa de 12 poços padrão; 2 amostras de cada

grupo foram colocadas nos poços. O campo foi limitado com um clone tubo, foi adicionado 1 ml de suspensão de células dentro de cada clone tubo, após foi colocada DMEN ao redor do clone tubo. As amostras foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 .

O ensaio se realizou em 3 tempos diferentes, a células se mantiveram em cultura por um período de 1, 2 e 3 dias. Após estes tempos, os clone tubos foram cuidadosamente separados, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos, lavadas três vezes com PBS, e adicionado 500µl de NH₄Cl mM por 10 minutos, lavadas novamente três vezes com PBS e permeabilizadas com PBS-Triton (0,1%) durante 10 minutos, novamente lavadas com PBS, foi adicionado 500 µl BSA 3% por 30 minutos. Após três lavagens com PBS as células foram marcadas com 20 µl de Alexa Fluor 546 phalloidin, diluído em BSA (1%) + Triton a (0,1%) por 30 min, após 3 lavagens com PBS marcadas com 1: 1000 DAPI (40,6-20-diamidino-fenilindol, dicloridrato) durante 15 minutos a temperatura ambiente, para a marcação dos núcleos. As marcações foram analisadas no microscópio de fluorescência (Axio Observer. A1, Zeiss, Alemanha) os campos de células aderidas foram adquiridos digitalmente e gravados para quantificação de células utilizando software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc., EUA). Foram contados os núcleos de 12 campos (visualizados em objetiva de 10X). os experimentos foram realizados em duplicatas.

4.3.6. Análise Estatística

A significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais durante os ensaios celulares, foram avaliados por análise unidireccional da variância (ANOVA), e do teste T, (p<0.05). A análise estatística foi realizada com a ajuda do software GraphPad 5 Prysm (GraphPad Software Inc, CA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DA ELABORAÇÃO DOS RECOBRIMENTOS

Foram produzidos dois grupos de recobrimentos: de hidroxiapatita pura ou convencional (HA) e um segundo grupo de recobrimentos de hidroxiapatita parcialmente substituída com zinco (ZnHA). Ambos foram depositados pelo método hidrotérmico.

Os recobrimentos se mostraram uniformes ao longo de todo substrato, resultando ambos em recobrimentos de hidroxiapatita (HA).

5.1.1. Grupo I: Recobrimento de hidroxiapatita (HA)

Durante o processo de recobrimento as chapas de Ti foram previamente tratadas com uma solução ácida. Pois a associação do método hidrotérmico, com pré-tratamento químico do substrato de titânio aumenta significativamente a adesão química dos cristais nucleados e crescidos na superfície de titânio (ANDRADE, 2002). Quando os substratos foram colocados na solução transparente (rica em Ca²⁺ e PO₄³) sofreram hidratação e desenvolveram cargas OH⁻ na superfície devido ao seu baixo pH de 3,7, promovendo assim uma modificação na superfície e crescimento de uma camada de óxido. É nesta camada que ocorre a adsorção de íons Ca²⁺ que consequentemente atrai (PO₄)³⁻. Nessas condições de pH e temperatura, a monetita é a fase de fosfato de cálcio mais estável, sendo considerada, um precursor de hidroxiapatita (PRADO DA SILVA 2001; MOURA, 2012).

Este recobrimento precursor foi analisado mediante SEM e DRX, os resultados podem ser vistos na Figura 5.1 e 5.2, respectivamente. As Micrografias dos recobrimentos mostram cristais com uma morfologia de placas alargadas, e corresponderiam à fase de monetita. Estes resultados são coerentes com os reportados na literatura (PRADO DA SILVA, 2001), e conferidos pelo padrão de DRX.



Figura 5.1 Morfologia do recobrimento de monetita observados por SEM em diferentes aumentos (A) x 40 vezes (B) x 500 vezes

A Figura 5.2 apresenta o padrão de DRX deste recobrimento, de acordo com os dados dos registros do banco de dados do JCPDS (Joint Commite on Powder Diffraction Standards- ICDD-International Centre for Diffraction data). (JCPDS -01-070-1425) correspondente à fase de monetita.





A conversão do recobrimento de monetita para HA requer um aumento do pH, de 3,7 para 12, foi feita mediante a imersão das amostras numa solução NaOH. Quando aumentado o pH a valores em torno de 12,5 se rompe o equilibro da monetita, sendo nestas condições a hidroxiapatita a fase mais estável. (MOURA, 2012; PRADO DA SILVA *et al.*, 2001 e 2012)

O mecanismo mais provável para esta conversão envolve um continuo processo de dissolução e reprecipitação (PRADO DA SILVA, 2001 e 2012). Como descrito por PRADO DA SILVA em 2001, se sugere que há uma dissolução continua de monetita, com consequente enriquecimento de íons Ca^{2+} e Po_4^{3-} na solução. Quando o equilíbrio termodinâmico é atingido, a HA é precipitada na superfície do precursor (monetita). Como consequência desta reação a microestrutura final dos cristais sofre uma mudança, tendo como resultado a formação de nano cristais de HA (Figura 5.3). Por ser relativamente porosa, a monetita não inibe a conversão no interior de suas camadas, permitindo com isso, que todo o recobrimento seja convertido. Esta conversão é conferida pelo DRX mostrado na Figura 5.13, onde identificamos HA como fase única.



Figura 5.3 Cristais de HA após da conversão em meio alcalino mostrando a re-precipitação de nanocristais em aumentos de (A) x 4 000 vezes e (B) x 30 000 vezes

5.1.2. Grupo II: Recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituída com zinco (ZnHA)

As chapas de Ti previamente tratadas como descritas anteriormente, foram colocadas numa solução rica em Ca²⁺ e PO₄ ³⁻ com adição de Zn²⁺ (mediante a substituição de 10% em mol de Ca²⁺ por Zn ²⁺. Com esta mudança passou a ser necessário um maior tempo de deposição. Na Figura 5.4, podemos observar que após 5 horas ainda não se obteve um recobrimento uniforme, temos apenas a presença de grandes precipitados e pequenos cristais em crescimento. Este resultado melhora após 8 horas como mostrado na Figura 5.5, onde foi recoberto todo o substrato, no entanto esse recobrimento aparece de forma irregular. Observamos que durante as duas primeiras horas houve uma precipitação de cristais maiores, que tornam o recobrimento irregular.

Com o objetivo de melhorar a uniformidade do recobrimento, as novas chapas de titânio só foram colocadas 2 horas após do começo do processo de precipitação, passadas 12 horas um recobrimento uniforme, como mostra a Figura 5.5. A adição do zinco na solução alterou consideravelmente a morfologia dos cristais formando placas achatadas agrupadas em forma de flor ou estrela como se observa na Figura 5.6.



Figura 5.4 Morfologia dos recobrimentos de monetita/parascolzita em diferentes aumentos (A) x 50 vezes e (B) x 2 000 vezes, após 5h de precipitação.



Figura 5.5 Morfologia dos recobrimentos de monetita/parascolzita após 8 h de precipitação, onde é observado irregularidade no recobrimento com presença de precipitados maiores (2) e menores com formato de estrela (1).



Figura 5.6 Morfologia dos recobrimentos monetita/parascolzita após 12h de precipitação em diferentes aumentos (A) x 5000 vezes e (B) x 1000 vezes, é observando crescimento regular dos cristais.

Os resultados da difração de raios X deste recobrimento mostram o surgimento de uma outra fase, além da monetita (JCPDS -01-070-1425). De acordo com os dados dos registros do banco de dados do JCPDS, essa nova fase no recobrimento é denominada parascolzita.(JCPDS- 00-035-0495). (Figura 5.7)



Figura 5. 7 Difratograma do recobrimento precursor, mostrando a presença de duas fases: monetita e parascolzita.

ROLLAND e colaboradores (1991), relataram a presença de parascolzita e de outros fosfatos de cálcio em cápsulas fibrosas ao redor de implantes mamários. BAN e colaboradores em 1999, buscando caracterizar recobrimentos hidrotérmico eletrolíticos em diferentes placas de metal, encontraram parascolzita em substratos de zinco. Esses autores postularam que a troca iônica do cálcio pelo zinco no substrato diminuiu a razão Ca/P devido à formação de outras fases diferentes da HA.

Alguns autores relatam a obtenção de parascolzita a partir de uma concentração de18% em peso de Zn na hidroxiapatita, (MIYAJI, 2005) De acordo com LE GEROS e colaboradores (1999) e MIYAJI e colaboradores (2005), a capacidade de substituição de Zn varia de acordo com o método de síntese.

A conversão deste recobrimento para HA requer um aumento do pH, como descrito no recobrimento de HA pura, desta vez denominado de ZnHA.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS RECOBRIMENTOS DE HA e ZnHA

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/EDS

A técnica foi realizada e escolhida para a avaliação mais detalhada da topografia dos recobrimentos tanto na sua morfologia como seu tamanho.

Na Figura 5.8 a morfologia dos cristais de hidroxiapatita em MEV, sendo esse recobrimento uma camada continua composta de cristais em forma de placas, e com a presença de nanocristais sobre estas placas.



Figura 5.8 Morfologia dos recobrimentos de HA em diferentes aumentos, (A) x 40 vezes, (B) x 500 vezes, (C) x 1 000 vezes e (D) x 4 000 vezes.

A adição de zinco na solução precursora ocasionou mudanças na morfologia dos recobrimentos quando observadas no MEV, que passou de cristais com formato de paralelepípedos nos recobrimentos de HA, para cristais em forma de placas agregadas em formato de estrela, como mostra a Figura 5.9. Também podemos observar o processo de reprecipitação dos cristais sobre a ZnHA.(Figura 5.9 D)



Figura 5. 9 Morfologia dos recobrimentos de ZnHA em diferentes aumentos(A) x 500 vezes, (B) x 1000 vezes, (C) x 2 000 vezes e (D) x 10 000 vezes.

Observou-se também que além da mudança na morfologia dos cristais, houve uma diminuição do tamanho dos cristais de HA, quando tivermos a incorporação do zinco. Em concordância com a literatura, onde o zinco é conhecido como um potente inibidor dos cristais de HA, quando este é usado em concentrações muito elevadas (ITO *et al.*, 2000; COSTA 2004; MOURA, 2012; MOURA, 2014). SANTOS relata (2005), que quantidades maiores, 3,49 a 8,11w.t.% levaram a um retardo do crescimento de cristais de apatita. A Figura 5.10 mostra uma grande diferença quando observados no mesmo aumento de 500x.



Figura 5. 10 (A) Recobrimento com HA, (B) Recobrimento com ZnHA num aumento de x 500 vezes, é possível observar a diferença no tamanho dos cristais.

A composição química elementar qualitativa dos recobrimentos foi avaliada através da análise por EDS. Os espectros obtidos do recobrimento de hidroxiapatita revelaram picos de alta intensidade referentes aos seus principais elementos químicos constituintes, cálcio (Ca), oxigênio(O) e fósforo (P); mostrou picos de baixa intensidade referentes ao substrato titânio (Ti) e sódio (Na), que é considerado um resíduo advindo do processo de conversão que utilizou solução de NaOH. (Figura 5.11).



Figura 5. 11 Espectro de EDS do recobrimento de HA com picos de maior intensidade de Ca e P.

Os espectros obtidos do recobrimento de ZnHA também revelaram picos de alta intensidade referentes aos seus principais elementos constituintes, cálcio (Ca),

oxigênio(O) e fósforo (P). Apareceram novos picos que correspondem ao Zn, evidenciando a presença deste elemento no recobrimento. Também se observou a presença de sódio (Na), considerado resíduo advindo do processo de conversão utilizando solução de NaOH. (Fig. 5.12)



Figura 5. 12 Espectro de EDS do recobrimento de HA com picos de maior intensidade de Ca e P e a presencia do pico de Zn

5.2.2. Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas obtidos permitem verificar as diferentes fases cristalinas presentes nas amostras e as variações na cristalinidade e no tamanho do cristalito.

A Figura 5.13 apresenta o difratograma de raios X do recobrimento de hidroxiapatita, pelo método de incidência rasante. Mostrando HA como fase única (JCPDS -00-009-0432).



Figura 5.13 Difratograma da amostra de HA com picos indexados pelo JCPDS.

A Figura 5.14 apresenta o difratograma de raios X do recobrimento de hidroxiapatita parcialmente substituída por zinco, no ZnHA pelo método de incidência rasante. A amostra ZnHA apresenta padrão de difração similar a da HA (JCPDS -00-009-0432). Isto nos mostra, que a amostra ZnHA apresenta a mesma formação de picos da HA, no entanto há uma diminuição de intensidade do pico (211) nas amostras ZnHA.





Comparando os difratogramas das amostras de HA e ZnHA na Figura 5.15, verifica-se que as amostras dopadas apresentam a mesma disposição de picos que a HA confirmando a formação de uma única fase cristalina. Diante dos resultados supõe-se que os íons Ca^{2+} foram substituídos por íons Zn^{2+} na estrutura cristalina da HA, já que não foi observada a formação de uma nova fase detectável pelo método de caracterização utilizado, isso esta de acordo com a literatura (ITO *et al.*, 2002, SOGO *et al.*, 2004, WEBSTER *et al.*, 2004., SOGO *et al.*, 2005, SANTOS, 2005).



Figura 5. 15 Difratogramas das amostras de HA e ZnHA.

No entanto, alguns autores observam um alargamento nos picos das amostras à medida em que se aumenta o teor de zinco sugerindo assim, que o zinco contribui para a diminuição da cristalinidade. (COSTA, 2004, MIAO *et al.*, 2004). O aparecimento de outras fases além da HA em compostos dopados com zinco foram registrados na literatura. COSTA (2004) relatou que, em amostras dopadas com diferentes teores de zinco após tratamento térmico, ocorre uma decomposição parcial do material, formando uma nova fase cristalina de fosfato misto de cálcio e zinco (Ca₁₉Zn₂(PO₄)₁₄. MOURA (2012) relata o aparecimento da fase zincita (ZnO) com teores de zinco de 10% mol.

5.2.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises por espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier, foram realizadas com o objetivo de complementar as informações obtidas nas análises de difração de raios X. A estrutura molecular do pó do recobrimento apresentou modos vibracionais resultantes das ligações interatômicas fortes, dos grupos funcionais específicos presentes no material, representado pelo espectro de FTIR.

Mais especificamente, o objetivo dessas análises foi obter informações quanto às alterações dos grupos funcionais frequentemente encontrados na hidroxiapatita, após a incorporação do zinco à sua estrutura cristalina. O perfil dos espectros de FTIR das amostras de HA e ZnHA mostram concordância com os espectros encontrados na literatura.(SANTOS, 2005; PEÑA *et al.*, 2003)(Tabela 5.1, 5.2)

Freqüência (cm ⁻¹) (hidroxiapatita*)	Freqüência (cm ⁻¹) (HAP)	Grupo funcional	
3569	3571	ion OH ⁻ estrutural	
3400 - 3200	3416 - 3200	Molécula de H ₂ O adsorvida ou estrutural	
1400 - 1445	1417 e 1454	v ₃ CO ₃ ⁻²	
837		$v_2 \text{CO}_3^{-2}$ (tipo A - ligação O – H)	
873	871	v ₂ CO ₃ ⁻² (tipo B - ligação P – OH)	
2368 - 2.337	2354 e 2332	CO2	
1550	1631	CO2	
1116 - 1033	1096, 1059 e 1041	$v_{3} PO_{4}^{-3}$	
950 - 963	964	v1 PO4 ⁻³	
605 - 566	606 - 565	v ₂ PO ₄ ⁻³	
632	632	PO₄ ⁻³ lábil	

Tabela 5.1 Bandas principais no infravermelho para Hidroxiapatita* e HAP

* Cheng et al., 1998; Ogawa e Plepis, 2001; Di Renzo et al., 2001; Afshar et al., 2003; Chang et al., 2003; Oliveira et al., 2004

Tabela 5.2 Bandas características no Infravermelho para OHAp, β -TCP e α -TCP (PEÑA et al., 2003).

OH-			PO ₄ ^{3.}							
	strech.	lib.			ν_{i}	3		v_1	ν ₄	
OHAp	3572	630	10	87	1040		9	62	601	571
1.66 1.64 1.58 1.54	:	:	β	• • •	β.		β β β	β β β	β.	•β •β
1.50 β-TCP			β 1120	1	β 042 1	β 025	β 972	β 945	ββ 606 594	β 552
α-TCP				1055	1025	984	4 9	54 61	3, 597, 585,	563, 551

A análise por infravermelho da amostra recoberta com hidroxiapatita, foi feita do pó do recobrimento obtida por raspagem. Como mostrado na Figura 5.16, se observa a presença das principais bandas referentes aos grupos funcionais $(PO_4)^{3-}$ nos valores de 1091, 1044, 960 cm⁻¹, 601, 571 cm⁻¹ e do grupo funcional $(OH)^{-}$ nos valores 635 e 3572 cm⁻¹. Além disso, temos a presença de bandas indicativas da presença de carbonatos no valor de 1452 cm⁻¹. A inclusão de íons carbonatos pode acontecer pela substituição dos grupos $(OH)^{-}$ e $(PO_4)^{3-}$ durante o processo de precipitação da hidroxiapatita, resultando em carbohidroxiapatita ou HA carbonatada. Na região correspondente a banda larga que

inicia em 3437 cm⁻¹, há a indicação da presença de moléculas de água absorvidas pela amostra.

Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, quanto à posição de bandas hidroxiapatita obtidas por análise de FTIR. (Peña, *et al.*, 2002).



Figura 5. 16 Espectro de FTIR dos recobrimentos de HA.

A Figura 5.17 mostra que, o espectro de infravermelho por transformada de Fourier dos recobrimentos com adição de zinco é similar ao da hidroxiapatita.

Observa-se assim, presença das principais bandas referentes ao grupo funcional $(PO_4)^{3-}$ nos valores de 1126, 1082, 1037, 974, 606, 547, 471 cm^{-1.} Além de verificarmos a presença da banda referente ao grupo funcional $(OH)^{-}$ no valor 3437 cm⁻¹ e de bandas indicativas da presença de $(CO_3)^{2-}$ no valor de 1536 cm⁻¹. Ocorreu um ligeiro aumento de intensidade dos picos menores a 1000 cm⁻¹ que segundo Rolland, esta relacionado à presença de zinco na estrutura. (ROLLAND, GUIDOIN *et al.*, 1991)



Figura 5. 17 Espectro de FTIR dos recobrimentos de ZnHA.

É também observada uma banda adicional no espectro de ZnHA quando comparado ao espectro da amostra de HA no valor de 1126cm⁻¹. Isto poderia ser atribuído a parazcolcita. (ROLLAND *et al*,. 1991). No entanto, análises de DRX mostraram 100% ZnHA após o tratamento alcalino, esta banda pode ser associado a uma baixa concentração de parazcolcita, não detectado por DRX, ou a um desvio na banda de fosfato, devido à adição de Zn, uma vez que esta banda se encontra na região de impressão do digital do espectro de FTIR. É bem conhecido que a posição das bandas é sensível na região de impressão digital. (Figura 5.18)



Figura 5.18 Espectro de infravermelho dos recobrimentos de ZnHA e de HA

5.2.4. Perfilometria

Para a medida de espessura do filme, foram feitas cinco varreduras de 5 mm cada, na região de degrau entre o recobrimento e o substrato. O degrau foi produzido colocando-se uma chapa de Ti sobre metade do substrato antes da deposição (Figura 5.19).



Figura 5. 19 Substrato de Ti recoberto com HA (A) e ZnHA (B) com o degrau para a análise de perfilometria.

A espessura média dos recobrimentos é mostrada na Tabela 5.3, onde a espessura média do recobrimento de HA foi de 99,13 μ m, diferente da obtida por outros autores, como mostrado na Tabela 3.3, onde obtiveram uma espessura de até 30 μ m para o recobrimento de HA pelo método hidrotérmico. Esta diferença pode ser pelo tempo de deposição da amostra, assim como pelo tratamento ácido prévio a deposição com a solução de [HF/HNO₃]. A espessura dos recobrimentos varia dependendo da técnica desde dimensões submicrométricas a várias centenas de mícrons. (YANG *et al*, 2005).

A espessura média do recobrimento de ZnHA foi de 18,27 μ m, significantemente menor quando comparado com o recobrimento de HA, isso pode se dever ao fato de que o zinco é um inibidor do crescimento dos cristais dos precursores (monetita e parascholzita), (MOURA, 2012 e 2014).

Tabela 5. 3 Espessuras dos recobrimentos de HA e ZnHA obtidas por perfilometria de contato. * Média de 5 medidas.

Recobrimento	Espessura (µm)*
HA	99,13 (± 7,25)
ZnHA	18,27 (± 2,19)

* Media de 5 medidas ± desvio padrão

5.2.5. Análise semiquantitativa de elementos químicos: FRX, EDS, AA/ e UV-VIS

Medidas de FRX dos teores de Ca, Zn e P permitem avaliar o grau de substituição de zinco na HA e sua estequiometria, razão Ca/P. A razão molar da HA e ZnHA depositada sobre superfície de titânio pelo método hidrotérmico são mostradas na Tabela 5.4.

Amostra	Razão molar (Ca+Zn)/P	% de zinco em peso	% de zinco em mol (Zn/Ca+Zn)
HA	1,6	-	-
ZnHA	1,61	3,15%	7%

Tabela 5.4 Valores de razão Ca/P e % de zinco em peso e em mol.

Verificou-se que o teor de zinco incorporado na solução foi de 0,10 mol (10%), obtendo-se no final como resultado de FRX, 0,7 mol (7%), levemente inferior ao valor previsto, demonstrando eficiência no método hidrotérmico.

A razão molar Ca/P do recobrimento de HA e a razão molar Ca+Zn/P estão dentro do valor teórico proposto de 1,5-1,67 para hidroxiapatita cálcio deficiente (DOROZHKIN, 2011). A presencia de grupos carbonatos no FTIR indicam que se obteve hidroxiapatita carbonatada.

Quando se trata de uma HA carbonatada, a neutralização das cargas se dá pela deficiência de cálcio ou pela substituição de Ca^{2+} . Nas análises de FTIR, observou-se a presença de grupos $(CO_3)^{2-}$ nas amostras de HA e ZnHA. O valor da razão (Ca+Zn)/P manteve-se aproximado para ambas amostras, o que sugere portanto que o metal foi incorporado na estrutura da HA.

MATSUNAGA (2010) verificou que a hidroxiapatita dopada com Zn^{2+} tende a ter uma composição química deficiente em cálcio, uma vez que os íons Zn^{2+} substituintes compensam a vaga do Ca^{2+} com seus dois prótons de carga. A incorporação Zn^{2+} na HA não se limita à troca iônica, mas os sítios do Ca^{2+} geram defeitos complexos que podem atuar como núcleos para Zn^{2+} e grupos carbonatos na HA. Os resultados das analise semi-quantitativa de elementos é pontual, sendo detectada a presença do Zn na HA mesmo após a transformação de fase. A porcentagem do zinco neste estudo foi de 3,15% em peso sem causar alteração na hidroxiapatita carbonatada obtida pelo método hidrotérmico. A quantidade de zinco possível de se incorporar à hidroxiapatita, sem alterar a sua estrutura, é ainda bastante controversa na literatura. A facilidade de substituição de Ca^{2+} por Zn^{2+} na apatita muda dependendo do processo de síntese.

SOGO e colaboradores (2002), realizaram um estudo sobre a razão molar (Ca+Zn/P) mais apropriada para compósitos cerâmicos de ZnTCP/HA, em estudo com intervalos entre 1,50 a 1,66. Estes autores obtiveram como resultado que o teor molar de 1,60 com 0,316% em peso de Zn foi o que mostrou ser mais eficaz para promover proliferação osteoblástica e a formação óssea em fêmur de coelhos.

KAWAMURA e colaboradores (2003), comentam que o teor ótimo de zinco encontrado para os componentes cerâmicos β -Zn TCP e HA, é no mínimo de 0,316% e no máximo de 0,63% em peso. SANTOS (2005), relata que obteve hidroxiapatita carbonatada e hidroxiapatita/ β -fosfato tricalcico dopadas com nitrato de zinco na concentração molar de 1%, sem causar alterações nas suas características morfológicas e nem estruturais. SOGO e colaboradores (2005), relataram que a síntese de α - TCP dopada com zinco em concentrações menores que 0,26% em peso não apresenta nenhuma dificuldade para a incorporação do zinco no composto, quantidades até de 1,26% em peso foram suficientes para proporcionar uma alta solubilidade ao material e quantidades maiores, 3,49 a 8,11% levaram a um retardo do crescimento de cristais de apatita.

COSTA (2004) verificou que o aumento do teor de zinco (de 5% a 20% em mol) provoca uma queda na cristalinidade do material e uma diminuição das dimensões do cristalito. MIAO e colaboradores (2008), revestiram uma liga de Ti com uma camada de hidroxiapatita fluoretada contendo 9% em mol de zinco, o estudo in vitro mostrou que devido a sua capacidade de liberar íons zinco, a hidroxiapatita fluoretada contendo zinco, teve um importante papel no aumento do crescimento ósseo quando usada como revestimento bioativo mais externo em implantes metálicos. MOURA (2012) relata que recobrimentos de hidroxiapatita com adição de 5% mol de zinco apresentam hidroxiapatita como fase única, e com adição de 10% mol de zinco houve o aparecimento de uma outra fase, a da zincita, o que indicaria que o limite da solubilidade do zinco na HA estaria na faixa de 5 e 10% mol.

Foi usada também a técnica de AAS e UV-VIS, para quantificar as amostras de Zn HAP e HA, apresentando resultados próximos aos obtidos por FRX e EDS.

5.2.6. Teste de adesão do recobrimento ao substrato

A força de adesão do recobrimento ao substrato foi avaliada a partir do teste de resistência ao risco, que induz uma falha no recobrimento, especificamente fratura ou delaminação, que é monitorada. Durante o ensaio, foram registrados os valores da carga aplicada (Fz) e da força lateral produzida (Ff) em decorrência do riscamento. Uma mudança no incremento da Ff foi gravada, acompanhada de uma sinal de emissão acústica (E.A.). A falha de adesão ao substrato é observada como um evento de delaminação, observado em MEV. A resistência à aderência do revestimento foi avaliada em termos da carga crítica (Lc) obtida no ensaio de riscamento. (Lc1) é a carga aplicada onde aparece a primeira delaminação, e (Lc2) a carga aplicada onde ocorreu a delaminação total do recobrimento.

A força de atrito (Ff), a carga aplica (F), a emissão acústica (E.A.), em função do tempo são mostradas na Figura 5.20, para o recobrimento de HA onde são mostradas Lc1 e Lc2.



Figura 5.20 Gráfico do teste de resistência ao risco do recobrimento de HA, onde mostra as curvas de força de atrito (Ff), carga aplica (F), emissão acústica (E.A.), em função do tempo. Onde podemos observar que a Lc1 é 0,57 kgf e a Lc2 é 1.06 kgf.



Figura 5.21 Micrografia MEV da área onde aconteceu a falha do recobrimento. Em (A) observa-se que a partir de Lc1 o filme começa a ser destacado. Em (B) observa-se a delaminação total do recobrimento de HA.

Na Figura 5.21, são apresentadas as Micrografias de um segmento das trillas produzidas pelos testes de riscamento. O primeiro ponto onde ocorreu a visualização, de uma região mais clara na trilha do risco, foi tomado como sendo aquele correspondente a Lc1. Essa região mais clara indica a região onde o substrato começa ficar aparente na trilha (A), confirmado pelo EDS. O ponto onde é observada a delaminação total do recobrimento e a correspondente a Lc2 (B). A Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS) foi utilizada para microanálise dos elementos presentes na região escura (recobrimento) e na região mais clara (substrato) onde é revelado que os tons escuros à presença Ca e P, e na região mais clara é revelado apenas Ti o que indica que temos somente a presença do substrato, Figura 5.22



Figura 5. 22 Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS) da area da falha^{keV}do recobrimento, onde os tons escuros estão associados à aprecia Ca e P,(1) e a região mais clara, ao Ti o que indica tratar-se do substrato (2).

A Figura 5.23 mostra o perfil característico de um resultado do ensaio de riscamento para o recobrimento de ZnHA, onde a Lc1 foi de 0,50 kgf e Lc2 foi de 0,94 kgf, na Figura 5.24 (A), são mostradas as Micrografia onde aparecem o início da delaminação, que neste caso foi na distancia de 2.5 mm do risco, e coincide com o sinal de emissão acústica observada na Figura 5.23. Na Figura 5.24 (B), observa-se o ponto no risco onde encontra-se a delaminação total, na distancia de 3.7 mm. Aproximadamente nesta mesma altura do risco, é observada uma mudança no Ff e na emissão acústica na Figura 5.23.


Figura 5. 23 Gráfico do teste de resistência ao risco do recobrimento de ZnHA, onde se mostra as curvas de força de atrito (Ff), carga aplica (F), emissão acústica (E.A.), em função do tempo, Onde podemos observar que a Lc1 é 5,0 N e a Lc2 é 9,4 N.



Figura 5. 24 Micrografia MEV da área onde aconteceu a falha do recobrimento de ZnHA. Em (A) observa-se que a partir de Lc1 o filme começa a ser destacado, Em (B) observa-se a delaminação total do recobrimento.

Três riscos foram feitos sobre cada recobrimento em 3 amostras diferentes para garantir a reprodutividade do teste, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Resultados do teste de resistência ao risco mostrando as médias da carga crítica dos recobrimentos de HA e ZnHA.

Recobrimento	Lc 1*	Lc 2*
HA	6 N (±0,1)	8,9 N (±0,2)
ZnHA	5,4 N (±0,2)	9,3 N (±0,1)

*Média de 9 medidas ± desvio padrão

Os resultados do teste nas condições descritas anteriormente, mostraram que há pouca diferença entre os valores da carga crítica das amostras recobertas com HA, quando comparadas com as amostras recobertas com ZnHA. Sendo maior a Lc1 e menor a Lc2, dos recobrimentos de HA.

Com a incorporação do zinco na estrutura da HÁ, obteve-se uma diminuição na espessura do recobrimento. A diferença da espessura entre os recobrimentos pode ser um fator que influencia na variação destes resultados.

O resultado é considerado positivo, já que a incorporação de 3% de zinco nos recobrimentos diminui a espessura do recobrimento e não afeta a adesão do recobrimento quando comparada com a HA convencional. Também pode estar associado com uma diferença estrutural da morfologia e tamanho dos cristais nos recobrimentos, e a facilite de dissipar o estresse da carga aplicada. (CLERIES 2000)

BLIND e colaboradores (2005) relataram que num recobrimento de HA a carga crítica para o revestimento aumenta quando a espessura da película diminui. Quando a espessura diminui a influência do substrato aumenta. Quando o substrato muito fino, é dúctil e não há falha adesiva, só se deforma plasticamente.

MOURA (2012) relata que com o incremento progressivo do zinco na estrutura da HA existe uma diminuição na adesão do recobrimento quando comparada com a HA convencional, o que indicaria que a concentração de zinco influencia na adesão do recobrimento.

A adesão do recobrimento de HA e ZnHA está intimamente relacionada com a existência de um óxido na interface entre o recobrimento e o substrato. (BLIND 2005).

5.2.7. Ensaio de Ascensão Capilar

Medidas de Capilaridade foram realizadas pelo método de ascensão capilar, a temperatura ambiente na qual as chapas de Ti recobertas foram colocadas em contato com a superfície do líquido teste (água mili-Q), como mostra a Figura 5.25, sendo a razão de ascensão do mesmo medida pela massa adquirida pelo recobrimento, ao ser percolado pelo líquido em função do tempo.



Figura 5. 25 Ascensão capilar da água, através das amostras de HA e ZnHA.

Os resultados mostrados na Figura 5.26 mostram que os recobrimentos sofreram molhabilidade quando foram colocados em contato com uma gota de água, o que demonstra que os dois materiais são hidrofílicos. Quanto à capilaridade, as amostras recobertas com ZnHA quando colocadas em contato com a água foram molhadas mais rapidamente, quando comparadas com as amostras recobertas com HA, demonstrando com isso, uma maior capilaridade. Este resultado se repete quando as amostras são colocadas sobre gotas de etileno glicol, que é um líquido de caráter hidrofóbico, fazendo assim que ao longo do teste tenhamos um tempo maior de ascensão através dos recobrimentos (Figura, 5.26). A quantidade de água absorvida nas amostras de HA foi de 7,3µl e nas amostras de ZnHA foi de 9,6 µl.



Figura 5.26 (A) Ascensão capilar da água em função do tempo, (B) Ascenção capilar do etileno glicol em função do tempo. Mostrando que a ascensão da ZnHA en ambos casos, é mais rápida para uma mesma altura.

A altura da penetração de água por sucção capilar depende basicamente do raio de capilares (poros). Quanto maior for o raio capilar dos poros, menor será a altura de ascensão de água pelos poros capilares. Esta pode ser uma explicação para que a ZnHA tenha uma ascensão mais rápida que a HA, devido a que os cristais são menores deixando espaços menores por onde possa ascender a água.

5.3. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* DOS RECOBRIMENTOS

5.3.1. Viabilidade/ Citotoxicidade

A cultura de células foi analisada após 24 horas para avaliar a viabilidade celular, com a exibição do ensaio LIVE/DEAD tanto para os recobrimentos de HA como para os de ZnHA. Foram utilizados um controle positivo/tóxico e como controle negativo/não tóxico lamínulas de vidro (não alteram morfologia e crescimento celular).

As imagens obtidas pelo microscópio de fluorescência são mostradas na Figura 5.27 onde as células vivas são marcadas em cor verde devido a Calcein AM, as células mortas são marcadas em vermelho devido ao EthD-1. Esse teste avalia a sobrevivência/viabilidade de uma célula em cultura.



Figura 5.27 Análise da viabilidade celular após 24h. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de Live / Dead. Os pontos em verde marcam as células vivas (Calcein AM), os pontos em vermelho marcam as células mortas (EthD-1). (A) Recobrimentos de HA 10x (B). Ampliação. (C) Recobrimentos de ZnHA 10x (D) Ampliação. (E) Recobrimentos de HA 10x (F) Ampliação.

Ambos os grupos mostraram uma alta proporção de células viáveis sem diferenças significativas entre os dos grupos, com um valor de $82.18 \pm 5.5\%$ (n=9) para as amostras recobertas com HA e um valor de $79.32 \pm 3.4\%$ (n=9) para as amostras recobertas com ZnHA (Figura 5.28). Nenhum dos recobrimentos analisados se mostrou tóxico para as células. Isso pode ser afirmado uma vez que um material é considerado citotóxico quando as células expostas a ele têm porcentagem inferior a 75% em relação

ao controle celular. Após 24 horas não há diferença estatística significativa entre os recobrimentos HA e ZnHA, mostrando ambas não serem citotóxicas.



Figura 5. 28 Porcentagem da viabilidade após 24 horas de cultura celular. * Indica diferença significativa de ZnHA e HA comparada com o grupo controle. Não havendo diferencia estadística significativa entre as amostras de ZnHA e HA. As barras verticais indicam o erro da media ± o desvio padrão. (95% de confiança).

Esse resultado é o primeiro indício de que todos os grupos podem ser usados para cultivo celular por não causarem danos às células. Seguidamente é importante avaliar se os recobrimentos permitem uma adesão celular, espraiamento e a proliferação adequada destas.

5.3.2. Adesão dos osteoblastos

O ensaio de adesão foi feito através das Micrografias obtidas pelo MEV trabalhando com aumento de 1000 vezes. Foram obtidas dez imagens por amostra e três amostras por tratamento de superfície. O objetivo foi quantificar o total de células em forma de "bola", com adesão fraca e o total de células espalhadas, consideradas aderidas, nos tempos de 30, 120 e 240 minutos.

Na Figura 5.29, podem-se observar os resultados da contagem de adesão celular. As três superfícies foram aumentando a quantidade de células aderidas a medida que aumento o tempo no meio de cultura sendo que após 240 min a superfície recoberta com ZnHA mostrou maior aderência das células em comparação com os outros grupos.

Adesão x Tempo



Figura 5. 29 Histograma da adesão celular em função do tempo, após 30, 120 e 240 minutos. * Indica diferença estatisticamente significativa do Ti puro e as superfícies recobertas., ** Mostra diferença significativa do recobrimento de ZnHA comparada com as outras amostras, *** Indica diferença significativa de ZnHA comparada com as outras duas amostras no mesmo tempo. Dados referents a media ±desvio pardrão. (p<0,05).

Este teste nos permite analisar a resposta inicial das células quando em contato os recobrimentos de HA ZnHA.

5.3.3. Morfologia celular

Os diferentes grupos de recobrimentos foram submetidos a cultura com células HOB, por 30, 120 e 240 min. As células cultivadas no material passaram por fixação com solução Karnovsky e pós fixação com tetróxido de ósmio 1%. Seguiu-se a desidratação com diluições seriadas de álcool. As amostras foram levadas para o ponto crítico para total desidratação e, posteriormente, foram metalizadas com ouro. Por fim, foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura.

Na Figura 5.30, são apresentadas as Micrografias da superfície de Ti (A), HA(B) e ZnHA(C) após 30 minutos de cultura. A partir destas imagens, é possível verificar a resposta dos osteoblastos quando em contato com a superfície. Após este tempo, foi observado a presencia de células esféricas nas três amostras, começando a se espalhar lateralmente para um ou mais lados e as protrusões citoplasmáticas e lamelipodios começam a ser produzidos, é observado também um elevado número de estruturas parecidas a microvilosidades especialmente na amostra C.



Figura 5.30 Micrografias da superfície de Ti (A), HA (B) e ZnHA (C) após 30 minutos de cultura, observamos presencia de células esféricas, começando a se espalhar lateralmente para um ou mais lados e as protrusões citoplasmáticas e lamelipodios começam a ser produzidos.

Na Figura 5.31, são apresentadas as Micrografias das amostras após 120 minutos de cultura. Na amostra de titânio sem recobrimento (A e B), as células não estão totalmente espraiadas sendo ainda esféricas, começando a se espalhar lateralmente para vários lados, se observam as algumas protrusões citoplasmáticas e lamelipodios evidentes. As células nos recobrimentos de HA, mostradas na Figura 5.31 (C e D), estão em processo de espraiamento, ou seja, células aderidas a superfície, mas que ainda não estão completamente estendidas sobre ela, com presencia de protrusões citoplasmáticas. Nas amostras recobertas por ZnHA foram encontradas células aderidas (F) e células espraiadas (E) sobre a amostra.



Figura 5. 31 Micrografias da superfície de Ti (A,B), HA (C,D) e ZnHA (E,F) após 120 minutos de cultura, observamos Na amostra (A e B), as células ainda esféricas, começando a se espalhar lateralmente, com algumas protrusões citoplasmáticas e lamelipodios evidentes. Em (C e D), as células estão em processo de espraiamento, ou seja,células aderidas, mas não completamente estendidas, com presencia de protrusões citoplasmáticas. Nas amostras recobertas por ZnHA foram encontradas células aderidas (F) e células espraiadas (E) sobre a amostra.

As células aderentes exibiram um aumento óbvio no espalhamento ao longo do tempo. Inicialmente, as células tinham alguns famelopodios longos evidentes e eram frequentemente arredondadas com um elevado número de estruturas microvilosidades semelhante, após 4 h de cultura, a maioria das células exibiram uma forma plana (Figura 5.32). Devido a esta aparência lisa e plana, saliências correspondentes aos núcleos foram observadas (A). Nas amostras de HA, lamelopodios ainda foram frequentes, mas foram curtas em comprimento, e houve uma diminuição no número de estruturas semelhantes a microvilosidades. Nas amostras recobertas com ZnHA (E e F), podemos observar, que há conexão entre as células e que estas já estão começando a recobrir a superfície do material.



Figura 5. 32 Micrografias da superfície de Ti (A,B), HA (C,D) e ZnHA (E,F) após 120 minutos de cultura. As células exibiram uma forma lisa e plana, saliências correspondentes aos núcleos foram observadas (A). Em (B e C), lamelopodes ainda foram frequentes, mas foram curtas em comprimento com diminuição no número de microvilosidades. Nas (E e F), observa se, que há conexão entre as células.

A diferença mais marcante observada entre os principais grupos (HA e ZnHA) foi encontrada após de 2 h de aderência (Figura 5.32). As células semeadas sobre os recobrimentos de HA exibiram algumas famelopodias, enquanto que no recobrimento de ZnHA as células foram espalhadas e planas exibindo só alguns famelopodias curtos e finos. No entanto, nas amostras de HA é necessário mais tempo para atingir o mesmo padrão de disseminação, do que o grupo ZnHA fez.

É bem conhecido que a topografia da superfície é um parâmetro que influencia diretamente na adesão e mobilidade celular. No presente trabalho, o mais alto nível de espalhamento celular foi observada nos recobrimentos de (ZnHA). Essa constatação pode estar associada à presença de cristais menores (18 μ m). Em contraste, as células na superfície de HA tiveram maior dificuldade na adesão provavelmente porque esta apresenta cristais maiores (90 μ m). Nessa direção, observou se maior espraiamento celular na superfície de Ti do que na superfície recoberta por HA.

5.3.4. Ensaio de proliferação celular

Com este ensaio foi avaliado o possível efeito do zinco na proliferação celular, pela quantificação do número total de células. As imagens representativas das amostras observadas por microscopia de fluorescência após 1, 2 e 3 dias são mostradas na Figura 5.33.



Figura 5. 33 Imagem representativa observada por microscopia de fluorescência em objetiva de 10X, em azul marcação de DAPI. As células foram cultivadas em placas de 12 poços (1x105 células/poço).

Na Figura 5.34 é mostrado o número de células que aderem aos recobrimentos de HA e ZnHA, após 1, 2 e 3 dias de cultura. O grupo controle do experimento (células semeadas em lamínulas altamente aderentes), apresentou um número maior de células do que os grupos recobertos. Como pode ser observado, houve um número significativamente maior de células que aderiram aos recobrimentos de ZnHA do que para o recobrimentos de HA após os três tempos de cultura. O recobrimento de ZnHA apresentou diferença estatisticamente significante em relação ao controle, sendo maior o grupo controle nos três casos.



Figura 5. 34 Representação Gráfica do número de células por poço, expressas pelas médias ± desvio padrão, ANOVA de uma via seguido por Teste T. p <0.05. Foi observado diferencia estadisticamente significativa entre as três no mesmo tempo (1d, 2d, 3d) e nos três tempos.

A marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (por faloidina) e núcleo por DAPI de células osteoblásticas (HOB) cultivadas sobre recobrimentos de HA e ZnHA e o grupo controle são mostradas na Figura 5.35 após 1, 2 e 3 dias de cultura celular. Este ensaio se fez para complementar o estudo da morfologia celular e para ver o nível de espalhamento das células, os prolongamentos de membrana e as conexões entre as células.

As imagens representativas mostradas na Figura 5.35 sugerem que o espalhamento das células foi maior no grupo controle (lamínula de vidro) e no recobrimento de ZnHA, a medida que passa o tempo as células adotam uma forma mais fusiformes e alongada.



Figura 5. 35 Imagem representativa observada por microscopia de fluorescência em objetiva de 20x, Os núcleos foram corados em azul por DAPI, e microfilamentos foram coradas em vermelho por phalloidin. As células foram cultivadas em placas de 12 poços (1x10⁴ células/poço) em 3 diferentes tempos: 1, 2 y 3 dias.

As diferenças no nível da célula se espalhando sobre cada superfície testada foram avaliadas através da visualização filamentos de actina sobre a periferia da célula, como mostrado na Figura 3.36 após 3 dias. Células com núcleos volumosos espalhadas foram observada no grupo controle (lamínulas de vidro)(A), enquanto que nos recobrimentos de HA a maioria das células eram redondas, com filopodes circundante (B). Nos recobrimentos de ZnHA apresentou células com características semelhantes formas alongadas ou poligonal e numerosos expansões de filopodes, e essas células foram claramente mais espalhadas do que as células no grupo de HA (C).



Figura 5. 36 Ampliação das imagens de microscopia de fluorescência, após 3 dias de cultura. Os núcleos foram corados em azul por DAPI, e microfilamentos foram coradas em vermelho por phalloidin. Células com núcleos volumosos espalhadas foram observada no grupo controle (lamínulas de vidro)(A), enquanto que nos recobrimentos de HA a maioria das células eram redondas, com filopodes circundante (B). Nos recobrimentos de ZnHA apresentou células com características semelhantes formas alongadas ou poligonal e numerosos expansões de filopodia, e essas células foram claramente mais espalhados do que as células no grupo de HA (C).

A visualização das células por fluorescência foi dificultada pela morfologia do recobrimento, devido a que as amostras recobertas com HA e ZnHA tem muitos cristais densos e em diferentes direções, formando várias camadas onde as células ficam a diferentes níveis (fazendo com que pareçam menores e com uma morfologia diferente) isso pode mascarar a morfologia sendo diferente ás observadas nas imagens de MEV.

O presente estudo analisou e comparou *in vitro* a resposta de uma linha celular de osteoblastos humanos (HOB) sobre recobrimentos de HA e ZnHA sobre uma superfície de titânio. Ambos os materiais demonstraram não ser tóxicos, confirmando a sua biocompatibilidade e capacidade de indução de proliferação celular.

Estes resultados são consistentes com estudos anteriores, onde um outro liberador de zinco com CPC um teor de zinco de 1,20% em peso também foi capaz de significativamente promover a proliferação de células MC3T3-E1 *in vitro* (ITO *et al.,* 2000; KAWAMURA *et al.,* 2000). Nossos dados revelaram que ouve um aumento na proliferação dos osteoblastos nos recobrimentos dopados com zinco quando comparados com os recobrimentos de HA. Webster et al., relataram que a adesão de osteoblastos humanos foi maior em HA dopado com Zn^{+2} de HA não dopado. (WEBSTER *et al.,* 2004).

6. CONCLUSÕES

- Foi possível produzir recobrimentos uniformes e homogêneos de HA e ZnHA pela técnica hidrotérmica, a partir de um precursor (monetita e parascolzita) sobre o substrato que foi posteriormente convertido em HA.
- Os recobrimentos HA e ZnHA apresentaram uma razão molar de 1,6, dando lugar à hidroxiapatita cálcio deficiente. A análise de FTIR mostra que esta deficiência pode se dever a substituições pelo grupo carbonato, nas amostras dopadas e não dopadas com zinco, sendo esta a que apresenta maior analogia com as apatitas biológicas com relação à estequiometria e cristalinidade.
- A incorporação de 3 % em peso de Zn na estrutura da HA produz uma mudança na morfologia assim com no tamanho dos cristais nos precursores (monetita e parascozita) que se manteve após a conversão (em HA e ZnHA). Obtendo-se um recobrimento mais fino.
- Não foi observada uma diferença significativa de adesão (substratorecobrimento) entre os recobrimentos dopados e não dopados com zinco, mostrando que o zinco não teve uma influencia na adesão do recobrimento ao substrato.
- O teste de citotoxicidade utilizando o ensaio de (LIVE/DEAD) para avaliar a viabilidade das células mostrou que os materiais não são citotóxicos.
- A morfologia das células cultivadas por 30, 120 e 240 min, nos diferentes grupos foi semelhante. Houve adesão e espraiamento sobre todos os grupos. Sendo que as células HOB já estavam totalmente espraiadas aos 120 min nos recobrimentos de ZnHA, a diferençaa dos outros grupos onde o espraiamentos total se observo após os 240 min. Mostrando maior afinidade das células pelo recobrimento de ZnHA em comparação com os outros grupos.

Na miscroscopia de fluorescência observou-se sobre os recobrimentos de ZnHA células espraiadas recobrindo a superfície da amostra com prolongamentos de membrana e conexão entre as células, presença de células em fase de divisão celular, mais evidentes que nos recobrimentos de HA. Na análise quantitativa houve um número significativamente maior de células que aderiram aos recobrimentos de ZnHA quando comparadas com os recobrimentos de HA. Em concordância com a literatura, sendo o zinco conhecido como estimulador da proliferação de osteoblastos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Novos trabalhos devem ser conduzidos, com a finalidade de melhorar as propriedades mecânicas dos recobrimentos confeccionados neste trabalho, visando sua aplicação na engenharia de tecido ósseo;
- Avaliar a bioatividade dos recobrimentos produzidos neste trabalho mediante a imersão em solução de Kokubo (SBF);
- Investigar, através de testes de solubilidade, a concentração final do zinco no composto e sua liberação no meio de cultura e em meio fisiológico.
- Avaliar a degradação "in vitro" dos recobrimentos produzidos neste trabalho a fim de acompanhar possíveis mudanças estruturais ao longo do período de cultura;
- Analisar a diferenciação das células aderidas ao material através de ensaios para ver o grau de mineralização e produção de fosfatasse alcalina;

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHAR, A., GHORBANI, M., EHSANI, N., *et al.*, "Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite". **Materials & Design**, v. 24, pp. 197-202, 2003.

ALBERTS, B., RENARD, G., CHIES, J. M., **Citoesqueleto, In Biologia Molecular da Célula**. 5^a edição. Capitulo. 16. Porto Alegre, Brasil, Artmed, 2010.(a)

ALBERTS, B., RENARD, G., CHIES, J. M., Junções celulares, Adesão celular e Matriz extracelular, In: Biologia Molecular da Célula. 5ª ed. Cap 19. Porto Alegre, Brasil, Artmed, 2010 (b)

ALLEN, M. R., HOCK, J. M., BURR, D. B., Periosteum: biology regulation, and response to osteoporosis therapies, v.35 p. 1003-12, 2004

ALBREKTSSSON, T., JOHANSSON, C., Osteoinduction, Osteoconduction and Osseointegration. **European Spine Journal**, v. 10, n. 2, pp. S96-S101, 2001.

ANDRADE, M.C., FIGUEIRAS R. T. M., OGASAWARA, T., "Hydrothermal nucleation of hydroxyapatite on titanium surface", **Journal of the European Ceramic Society** v 22 n 4, pp. 505-510, 2002.

AVES, E. P., GALVAN, J. C., LIMA, I. R.; GRANJEIRO, J. M., *et al.*, "Recobrimento da liga Ti-6Al-4V com hidroxiapatita pelo método sol-gel e sua aplicação a hastes femorais não-cimentadas". **Cerâmica**, vol.54, n.332, pp. 476-479, 2008.

AVES, E.P., SADER, M. S., JERONIMO, F.A.R., *et al.*, "Comparative Study of Hydroxyapatite Coatings Obtained by Sol-Gel and Electrophoresis on Titanium Sheets" **Matéria (UFRJ)**, v. 12, pp. 156-163, 2007.

BASTOS, I.N., VANZILLOTA, P.S., SOARES, G.A., "Caracterização morfológica e topográfica da superfície de implantes dentário", **Revista brasileira de odontololgia**, v.60, n. 1, pp. 47-50, 2003.

BAKER, K.C., ANDERSON, M.A., OEHLKE, S.A., *et al.*, "Growth, characterization and biocompatibility of bone-like calcium phosphate layers biomimetically deposited on metallic substrata", **Material Science Engineering**, v 26 pp. 1351-1360, Sept, 2006.

BERRIER, A. L., YAMADA, K. M., "Cell–Matrix Adhesion", Journal of cellular physiology v. 213, n. 3 pp. 565-573, 2007.

BEST, S. M., PORTER, A. E., *et al.* "Bioceramics: past, present and for the future". Journal of the European Ceramic Society, v.28, p.1319-27. 2008.

BRANEMARK, P.I., HANSSON, B.O, ADELL, R., *et al.*, "Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period". **Scand.** Journal Plastic Reconstrion Surgery., v. 16, pp.7-127., 1977.

CALASANS-MAIA, M. D., FERNANDES, G.V.O, ROSSI, A.M, *et al.*, "Effect of Hydroxyapatite and Zinc-containing Hydroxyapatite on Osseous Repairo of Critical Size Defect in the Rat Calvaria". **Key Engineering Materials** v 20 pp.1273-1276, 2008.

CALLISTER, W. D., Fundamentos da ciência e engenharia de materiais. Uma abordagem integrada. pp. 45 Rio de Janeiro: LTC. 2006.

CATE, T. A. R. **Histologia bucal**. 7º Edição, Rio de Janeiro; Editora Guanabara S.A. 2008.

CHEN, J., WANG, Y., CHEN, X., REN, L., *et al.*, "Simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite and biphasic powders"- **Materials Letters**, Vol.65(12), pp.1923-1926, June 2011.

CHIES, J. M., **Biologia Molecular da Célula**, Artmed. 5^a ed. Cap 19. Porto Alegre, Brasil, 2010

COSTA A.C.F.M., LIMA M. G., LIMA L.H.M.A., *et al.*, "Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações". **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v 4.3 pp.29-38, 2009.

CUNHA, S. M., LAZAR, D. R. R., USSUI, V., *et al.*, "Síntese de hidroxiapatita por precipitação homogênea". In: **XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais**, Porto Alegre, 2004.

DING, S. J., "Properties and inmersion behavior of magnetrom-sputtering multi-layered hydroxyapatite/titanium composite coatings". **Rev. Biomaterials**, v. 24, pp. 4233-4238, 2003.

DOROZHKIN, S. "Calcium orthophosphates". Journal of materials science, v.42, pp.1061-1095, 2007.

DOROZHKIN, S. "Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine". **Materials**, v.2,pp.1975-2045. 2009.

DOROZHKIN, S. "Medical application of calcium orthophosphate bioceramics". **BIO**, v.1, pp.1-51, 2011.

FERNANDES, T. J., 2011,*Síntese de hidroxiapatita nanométrica com pvp: sinterização e adsorção de albumina bovina*. Dissertação de Mestrado. Engenharia dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia (IME). Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

FONSECA, F. M., 2007 *Biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por gelcasting*. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Materiais, Instituto Militar de Engenharia (IME), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

FLECKENSTEIN, K. B., CUENIN, M. F., PEACOCK, M. E., *et al.*, "Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium", **Journal of periodontology**. v 77 n 1 pp. 39-45, 2006.

FROST, R. L., "An infrared and Raman spectroscopic study of natural zinc phosphates". Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 60, n. 7, pp. 1439-1445, 2004.

FUJII, E., OHKUBO, M., TSURU, K., *et al.*, "Selective protein adsorption property and characterization of nano-crystalline zinc-containing hydroxyapatite", **Acta Biomaterialia**, v 2 n 1 pp. 69-74, Jan 2006.

GOLDSTEIN, J., Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. 3^a ed. Londres, Inglaterra, Springer London, 2003.

GRANDJEAN-LAQUERRIEREA, A., LAQUERRIERE, P., "Influence of the zinc concentration of sol–gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro", **Biomaterials**, v.27, pp.3175-3200, 2006.

GRANJEIRO, J.M., OLIVEIRA, R.C., BUSTOS-VALENZUELA, J.C., *et al.*, "Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use."; **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. *38* n.10, pp.1463-1473, 2005.

ITO, A., KAWAMURA, H., MIYAKAWA, S., *et al.*, "Resorbability reduction by the incorporation of zinc into tricalcium phosphate." **Key Engineering Materials**, v.192-195, pp.199-202. 2001.

ITO, A., KAWAMURA, H., "Resorbability and solubility of zinc-containing tricalcium phosphate." **Journal of biomedical materials research,** v.60, n.2, pp.224-31, 2002.

ITO, A., OJIMA, K., HIROSHI, N., *et al.*, "Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics." **Journal of biomedical materials research**, v.50, n.2, pp.178-183, 2000.

81

ITO, A., SENDA, K., SOGO Y., *et al.*, "Dissolution rate of zinc-containing beta-tricalcium phosphate ceramics." **Journal of biomedical materials research**, v.1, n.3, pp.134-139, 2006.

JONES, F.H., "Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials". **Surface Science Reports,** v.42, pp.75-205, 2001

JONES, J. R., "Review of bioactive glass: from Hench to hybrids." Acta biomaterialia, v. 9, n.1, p. 4457-4486, 2013.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, **Histologia Básica.** 11^a ed. Rio de Janeiro, Brasil, Guanabara Koogan, 2008.

KALITA, S. J., BHATT, H. A., "Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization". Materials Science and Engineering: C v. 27, n. 4, pp. 837-848, 2007.

KOKUBO, T., YAMAGUCHI, S., "Novel bioactive titanate layers formed on Ti metal and its alloys by chemical treatments". **Materials**, v. 3, n. 1, p. 48-63, 2009.

VERCIK C., 2004, "Estudo do recobrimento de hidroxiapatita sobre superfícies de Ti cp e liga Ti-6 Al-4V, sem e com deposição de TiO₂ por plasma-spray." Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Araraquara,.Instituto de Química, São Paulo, Brasil,

VERCIK, C., de ASSIS, M., LIA FOOK, M. V., "Recobrimento de apatitas "in vitro" sobre titânio – Influência do tratamento térmico." **Eclética Química**, v 28 n1 pp 25-31, 2003.

LANDI, E., LOGROSCINO, G., PROIETTI, L., *et al*,. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behavior". Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 19, n. 1, pp. 239-247, 2008.

LEGEROS, R.Z., "Calcium phosphate-based osteoinductive materials." Chemical reviews, v.108, n.11, pp.4742-53. 2008.

LIN, X.Y., FAN, H.S., LI, X.D., *et al.*, "Evaluation of bioactivity and cytocompatibility of nano-hydroxyapatite/collagen composite in vitro." **Key Engineering Materials.** v.284-286, pp.553-556, 2005.

LINDHE, J., KARRING, T., LANG, N. P., **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.** 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LU, X., ZHAO, Z., LENG, Y., "Biomimetic calcium phosphate coatings on nitric-acidtreated titanium surfaces". **Materials Science and Engineering: C**, v. 27, n. 4, pp. 700-708, 2007.

MA, M. G., ZHU Y.J., CHANG J., "Monetite formed in mixed solvents of water and ethylene glycol and its transformation to hydroxyapatite." **The Journal of Physical Chemistry B,** v.110, n.29, pp.14226-14230. 2006.

MA, X., ELLIS E.D., "Initial stages of hydration and Zn substitution/occupation on hydroxyapatite (001) surfaces." **Biomaterials**, v.29, pp.257-265. 2007.

MALISKA, A. M., 2005, Microscopia eletrônica de varredura. Universidade Federal de Santa Catarina–UFSC. Departamento de Engenharia Mecânica, Laboratório de Materiais, Laboratório de Caracterização Microestrutural e Análise de Imagens.

MATSUNAGA, K., MURATA, H., MIZOGUCHI, T., *et al.*, "Mechanism of incorporation of zinc into hydroxyapatite." **Acta Biomateralia**, v. 6 pp.2289-2293, Jun 2010.

MARTINS M., 2009, *"Molhabilidade de apatita e sua influência na flotação.*" Tese de Doutorado, Escola Politecnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

MARX, R.E., GARG, A.K., "Bone structure, metabolism, and physiology its impact and dental implantology." **PubMed - Implant Dent,** v 7 pp.267-276, 1998. MATSUNAGA, K., MURATA H., NAKAHIRA A., MIZOGUCHI T., "Incorporation mechanism of zinc into hydroxyapatite." Acta Biomaterials, v.6, pp.2289-2293. 2009.

MCCALL, K. A., HUANG, C. C., *et al.* "Function and mechanism of zinc metalloenzymes". **The Journal of nutrition**, v.130, n.5, pp.1437-1446. 2000.

MEIJER, G. J., "Cell-Based Bone Tissue Engineering". Plos Medicine, v. 4, n. 2, pp. 260-264, 2007.

MIAO, S., WENG, W., GHENG, K., *et al.*, "Sol-gel preparation of Zn doped fluoridated hydroxyapatite films", **Surface e Coatings Technology**. v. 198, n. 1, pp. 223-226, 2005.

MOURA, F. N., LOURO, L. H. L., PRADO DA SILVA, M. H., *et al.* "Parascholzite Coatings on Niobium Substrates". **Key Engineering Materials,** v.493-4, pp.477-82. 2011.

MOURA, F.N., 2012, *Síntese e Caracterização de recobrimento de monetita e hidroxiapatita parcialmente substituída com zinco*. Tese de Doutorado em Ciencias dos Materiais, Instituto Militar de Ingenieria, IME. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MYSTRY, S., KUNDU, D., DATTA, S., *et al.*, "Comparison of bioactive glass coated and hydroxyapatite coated titanium dental implants in the human jaw bone" **Australian Dental Journal**, v. 56 pp.68-75, 2011.

NAKAGAWA, D., 2004, *Otimizaçao na preparação de recobrimentos de hidroxiapatita para aplicações biomédicas e teste de citotoxicidade*. Tese de Doutorado. Universidade de São Jose dos Campos, São Pulo, Brasil.

NAVARRO DA ROCHA, D., 2011, *Síntese e caracterização de hidroxiapatita manométrica parcialmente substituída com nióbio*. Dissertação de mestrado em Ciências dos Materiais, Instituto Militar de Engenharia, IME. Rio de janeiro, RJ. Brasil.

NISHI, Y., "Zinc and Growth". Journal of the American College of Nutrition, v.15, n.4, pp.340- 44. 1996.

NUNES T. B., 2013, Investigação da Resposta Celular a Arcabouços de Poli (3hidroxibutirato) Funcionalizados com Fibronectina. Dissertação de mestrado em Ciências dos Materiais UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Rio de janeiro, RJ, Brasil.

OLIVEIRA J. F., 2003, *Efeito dos parametros de processamento nas Caracteristicas de Ceramicas Porosas a Base de Fosfato de Calcio para Aplicação em Engenheria Ossea.* Tese de Doutorado COPPE- UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. Brasil.

OLIVEIRA, P.T, NANCI, A., "Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells". **Biomaterials**, v. 25, Issue 3, pp. 403-413, February 2004.

ORÉFICE, R. L., MAGALHÃES, M. M., *et al.* Biomateriais: Fundamentos e aplicações.: Cultura Médica. 2006.

PAITAL, S. R. E., DAHOTRE, N. B., "Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies". Materials Science and Engineering, v.66, pp.1-70. 2009.

PAZ, A., MARTÍN, Y., PAZOS, L., *et al.*, "Obtención de recubrimientos de hidroxiapatita sobre titânio mediante el método biomimético". **Revista de Metalurgia**, v. 47 n. 2, pp.138-145, 2011.

PEON, E., MORALES, A.J., ESCALANTE, E.F., *et al.*, "Hydroxyatatite coatings prepared by a sol-gel process". **Revista de Metalurgia**, pp. 479-482, 2005.

PEON, A. E., SADER, M. S., JERÔNIMO, F. D. A. R., *et al.*, "Comparative study of hydroxyapatite coatings obtained by Sol-Gel and electrophoresis on titanium sheets". **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 12, n. 1, pp. 156-163, 2007.

PEREIRA DA SILVA, A. A., 2012, Avaliação in vivo de arcabouço de hidroxiapatita nanoestructurada contend 2% de zinco em calvaria de coelhos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia. UFF. Rio de janeiro, RJ, Brasil.

PFEIFFER, F., HERZOG, B., KERN, D., *et al.*, "Cell reaction to microstructured implant surfaces". **Microelectronic Engineering**, v. 67-68, pp. 913-922, 2003.

PRADO DA SILVA, M. H. P., 1999, Recobrimentos de titânio com hidroxiapatita: desenvolvimento do processo de deposição eletrolítca e caracterização biológica in vitro. Tese de Doutortado, COPPE\UFRJ, UFRJ, Rio de janeiro, RJ, Brasil.

PRADO DA SILVA, M. H., MONTEIRO, A. M., NETO, J. A. C., "Nano-Sized Apatite Coatings on Niobium Substrates". **Key Engineering Materials**, v.254, pp.439-442, 2003.

DA SILVA, M. P., LIMA, J. H. C., SOARES, G. A., "Transformation of monetite to hydroxyapatite in bioactive coatings on titanium". **Surface and Coatings Technology**, v.137, pp.270-276, 2001.

RAYBOLT DOS SANTOS, A., 2008, Efeito da oxidação anódica de titânio comercialmente puro revestido ou não com fibronectina na interface osteoblastos humanos-superfície de titânio. de Doutorado em Ciências dos Materiais. COPPE/UFRJ. Rio de janeiro, RJ Brasil.

RAYBOLT DOS SANTOS, A., COSTA E SILVA, F., DE ALMEIDA SOARES, G., "The Interaction between Human Osteoblastic Cells and Titanium Anodized with Sulphuric Acid coated or not with Human Plasma Fibronectin". **Key Engineering Materials**, v. 396-98, pp. 389-392, 2009.

REN, F., R. XIN, GE, X., *et al.* Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites. Acta Biomaterialia, v.5, pp.3141-3149. 2009.

RESENDE F. B. R., 2010, Avaliação da biocompatibilidade e bioabsorção de microesferas de hidroxiapatita com 0,5% de zinco no reparo ósseo. Dissertação de Mestrado, Clinica Odontologica/UFF. Rio de janeiro, RJ Brasil.

RIGO, E. C. S., GEHRKE, S. A., CARBONARI, M., "Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação", **Revista Dental Press Periodontia Implantologia**, v. 1, n. 3, pp. 39-50, 2007.

SANTOS M. H., "Cytocompatibility evaluation of hydroxyapatite/collagen composites doped with Zn^{+2} " **Revista Matéria**, v. 12, n. 2, pp. 307 – 312, 2007.

SANTOS, M. H., 2005, "Sintese e caracterização de Biocompositos Fosfatos de Calcio/ colágeno dopados com zinco", Tese de Doutorado, Escola de Engenheria / UFMG, Belo Horizonte, M. G. Brasil.

SENA, L. A., SADER, M. S., SOARES, G. A., *et al.*, "Deposição eletroforética de hidroxiapatita em chapas de titânio visando a formação de uma camada bioativa". **Revista Matéria**, v. 7, n.2, pp. 1-6, 2002.

SENA, L.A., ROCHA, N.C.C., ANDRADE, M.C., *et al.*, "Bioactivity assessment of titanum sheets electrochemically coated with thick oxide film". **Surface and Coatings Technology,** v. 166, n. 2, pp. 254-258, 2003.

SOGO, Y., ITO, A., FUKASAWA, K., *et al.* Zinc containing hydroxyapatite ceramics to promote osteoblastic cell activity. **Materials Science and Technology**, v.20, pp.1079-83, 2004.

SONG, W., TIAN, M., CHEN, F., *et al.*, "The study on trhe degradation and mineralization mechanism of ion-doped calcium polyphosphate in vitro". **Journal of Biomedical Materials Reserch Part B: Applied Biomaterials,** v. 89, n. 2, p. 430-438, 2009.

SPADAVECCHIA, U., "Obtención de hidroxiapatita nanometrica para aplicaciones médicas". **Revista de la Facultad de Ingenieria de la U. C. V**., v.22, n 4, pp. 37-44, 2007.

SUL, Y.T., 2002, On the bone tissue response to oxidized titanium implants. The hole of microporous structure and chemical composition of the surface oxide in enhanced osseointegration. Phd dissertation, Institute for surgical sciences. Göteborg University, Suécia.

TAGA, M. L., GRANJEIRO, J. M., CESTARI, T. M., *et al.*, "Healing of critical-size cranial defects in guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane". **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 23, n. 3, p. 427-436, 2007.

TANG, T., CHAPPELL, H. F., DOVE, M. T., *et al.*, "Zinc incorporation into hydroxyapatite". **Biomaterials**, v. 30, n. 15, p. 2864-2872, 2009.

TURRER, C. L. E., FERREIRA F. P. M., "Biomaterials in craniomaxilofacial surgery: basic principles and applications - literature revision". **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica.**, v.23, n.3, pp.234-9, 2008.

VERCIK, L. D. O., ALMEIDA FILHO, E. D., ASSIS, C. M. D., "Biomaterials: deposition of hydroxyapatite on Ti-cp surfaces modified by thermal aspersion". **Química Nova**, v. 30, n. 5, pp. 1129-1232, 2007.

VERCIK, L. C. O., ASSIS, C. M., FOOK, M., *et al.* "Recobrimento de apatitas in vitro sobre titâneoinfluência do tratamento térmico". **Eclética Química,** v. 28, n. 1, pp. 25-31, 2003.

WANG, J., SHAW, L. L., "Nanocrystalline hydroxyapatite with simultaneous enhancements in hardness and toughness". **Biomaterials**, v. 30, n. 34, pp. 6565-6572, 2009.

WANG, X. X., HAYAKAWA, S., TSURU, K., *et al.*, "A comparative study of *in vitro* apatite deposition on heat, H₂O₂, and NaOH⁻ treated titanium surfaces" **Journal** of biomedical materials research, v. 54, n. 2, pp. 172-178, 2001.

WEBSTER, T.J., MASSA-SCHLUETER, E.A., SMITH, J.L., SLAMOVICH, E.B., "Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations" **Biomaterials**, v.25, pp.2111-2121, 2004.

WEI, X., AKINC, M. S., "Zn modified tricalcium phosphates: a phase composition and crystal structure study". **Key Engineering Materials**, v.284286, pp.8386, 2005.

WHO., Workshop to review the results of studies evaluating the impact of zinc supplementation on childhood mortality and severe morbidity. 20.10. 2007.

YANG, Y., KIM, K. H. ONG, J. L., "A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process—an alternative to plasma spraying". **Biomaterials**, v.26, n.3, pp.327-37. 2005.

ZHANG J. Y., AI H.J., QI M., "Osteoblast growth on the surface of porous Zncontaining HA/TiO₂ hybrid coatings on Ti substrate by MAO plus sol-gel methods". **Surface and Coatings Tecnology**, v. 228, pp. S202-S205, 2013.