UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PABLO EDUARDO COSTA DOS SANTOS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE REVESTIMENTOS DE FOSFATOS DE CÁLCIO SOBRE SUBSTRATO DE Ti PELA TÉCNICA DE ELETRODEPOSIÇÃO

OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF CALCIUM PHOSPHATE COATINGS ON Ti SUBSTRATE BY ELECTRODEPOSITION METHOD

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PABLO EDUARDO COSTA DOS SANTOS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE REVESTIMENTOS DE FOSFATOS DE CÁLCIO SOBRE SUBSTRATO DE Ti PELA TÉCNICA DE ELETRODEPOSIÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: **Profª. Drª. Zaine Teixeira Camargo**

Co-orientadora: **Profª. Drª. Cristiane Xavier Resende**

OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF CALCIUM PHOSPHATE COATINGS ON Ti SUBSTRATE BY ELECTRODEPOSITION METHOD

Master dissertation presented to the Graduate Programm in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Santos, Pablo Eduardo Costa dos

S237o Obtenção e caracterização de revestimentos de fosfatos de cálcio sobre substrato de Ti pela técnica de eletrodisposíção / Pablo Eduardo Costa dos Santos ; orientador Zaine Teixeira Camargo. - São Cristóvão, 2016.

112 f.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Materiais biomédicos. 2. Eletrometalurgia. 3. Fosfato de cálcio. 4. Ligas de titânio. 5. Biocompatibilidade. 6. Compostos poliméricos. I. Camargo, Zaine Teixeira, Orient. II. Título.

CDU 544.654.2

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-graduação em Química - PPGQ

PPGQ

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Pablo Eduardo Costa dos Santos apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 22/07/2016.

Prof.ª Dr.ª Zaine Teixeira Camargo
Departamento de Química - UFS

Prof.ª Dr.ª Cristiane Xavier Resende
Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais – UFS

Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos
Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais – UFS

Profª. Drª. Iara de Fátima Gimenez
Departamento de Química - UFS

RESUMO

Este trabalho teve como proposta a construção de um sistema constituído por um substrato de Ti revestido com cristais de fosfatos de cálcio (CaP) e o copolímero Pluronic® F-127 (F-127) por eletrodeposição. Os CaP são bastantes atrativos, pois podem ser convertidos facilmente à fase da hidroxiapatita (HA) em meio biológico. Devido à similaridade química com a parte inorgânica do tecido ósseo os CaP são altamente biocompatíveis e promovem uma melhor osseointegração. O copolímero biocompatível F-127 apresenta ação anti-inflamatória conhecida, possibilidade de controle da morfologia na síntese de diversos materiais, bem como propriedade antiadesiva de filmes bacterianos. A técnica de eletrodeposição se destaca pela obtenção de revestimentos uniformes em peças de geometria complexa, como a de uma prótese de Ti ou suas ligas, além de apresentar baixo custo. A caracterização das amostras foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Pela técnica de FTIR, comprovou-se a presença de bandas de grupos fosfatos sobre o substrato de Ti. Por DRX, verificou-se que os revestimentos apresentam fases cristalinas, a depender das condições empregadas, de: fosfato octacálcico (OCP) - $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$; fosfato bicálcico dihidratado (DCPD) - $CaHPO_4.2H_2O$ e fosfato bicálcico anidro (DCPA), $CaHPO_4$, todos precursores da HA. A morfologia da superfície do revestimento, observado por MEV, das amostras sem F-127 (controle) foi de somente placas e placas com crescimento radial, distinta das morfologias das amostras contendo F-127, as quais foram cristais em forma de paralelepípedos, em forma de agulhas espessas paralelas ao substrato ou com aspecto fibrilar com dimensões de 24-57 µm de comprimento. Análises gravimétricas revelaram que os revestimentos contêm aproximadamente 7,7% em massa de F-127. Os ensaios realizados com *S. aureus* mostraram que nas amostras obtidas com adição de F-127 não houve formação de biofilme. Tais sistemas são promissores para serem empregados no aumento de biocompatibilidade, osseointegração e minimização de infecções relacionadas a próteses.

Palavras-chave: Biomateriais, Eletrodeposição, Fosfatos de cálcio, Pluronic F-127.

ABSTRACT

This work proposed a system composed by calcium phosphate-pluronic coatings on titanium substrates using electrodeposition method. Calcium phosphates (CaP) are very attractive because they can be converted to the hydroxyapatite (HA) phase in biological fluid. The CaP are biocompatible and promote a better osseointegration due to their chemical similarity to the inorganic part of bone tissue. The biocompatible copolymer Pluronic F-127 (F-127) shows anti-inflammatory action, possibility of morphological control during the synthesis of several materials, as well the capacity of avoid the bacterian biofilm formation. The electrodeposition process stands out from others due to obtaining uniform coatings on complex geometry parts, such as a Ti prosthesis or Ti-alloys, and presents low cost. The characterization of samples was performed by infrared spectroscopy with Fourier transformed (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). Bands of phosphate groups onto Ti substrate were confirmed by FTIR analysis. XRD analysis showed that the coatings presented different crystalline phases, depending on the conditions employed that were: Octacalcium phosphate (OCP) - $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$; dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) - $CaHPO_4.2H_2O$ and anhydrous dicalcium phosphate (DCPA), $CaHPO_4$, all of them precursors of HA. The morphology of coating surfaces, observed by SEM, of samples without F-127 (control) was plates and plates with radial growth, distinct from the morphology of the samples containing F-127, which were cobblestone, thick needles parallel to the substrate or fibrillary with dimensions of 24-57 µm in length. Gravimetric analysis after sample calcination revealed that the coatings present around 7.7 wt% F-127; while microbiological tests with S. aureus showed that the samples obtained by adding F-127 reduces bacterial adhesion. These systems have great potential to be used in increasing biocompatibility, osseointegration and minimize infections related to prosthesis.

Keywords: *Biomaterials, Electrodeposition, Calcium phosphates, Pluronic F-127.*

Sumário

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Composição óssea 4
1.1.1 Composição química 4
1.1.2 Fosfatos de cálcio 7
1.1.3 Remodelação óssea 11
1.2 Biomateriais 15
1.3 Fundamento da Eletrodeposição 21
1.4 Polímeros em bloco: F-127 28
1.5 Propriedades físico-químicas do copolímero F-127 31
1.6 Possível formação de biofilmes 36
1.7 Aplicações com o uso dos Pluronic® F-127 de interesse para este trabalho. 39
1.8 Justificativa do trabalho 40
2 OBJETIVOS 41
2.1 Objetivo Geral 41
2.2 Objetivos específicos 41
3 MATERIAIS E MÉTODOS 42
3.1 Obtenção dos substratos de titânio. 42
3.2 Reagentes Utilizados 43
3.3 Sistema de eletrodeposição 43
3.4 Preparação das soluções 44
3.5 Caracterização dos revestimentos 46
3.5.1 Análise por FTIR 46
3.5.2 Análise gravimétrica 46
3.5.3 Análise por DRX 47
3.5.4 Análises por microscopia eletrônica de varredura 47
3.5.4 Análise por microscopia eletrônica de transmissão 47
3.6 Ensaios microbiológicos 48
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 49
4.1 Obtenção das amostras 49
4.2 Caracterização dos sistemas. 52
4.2.1 Análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourrier com o modo de reflectância total atenuada (FTIR/ATR) 52
4.2.2 Difratometria de raios X 58
4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura, MEV 67

4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão, MET. 76
4.2.5 Análise gravimétrica 78
4.3 Análise da adesão de *S. aureus* por microscopia eletrônica de varredura 79
5 CONCLUSÕES 83
6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO 84
7 REFERÊNCIAS 85

Dedico este trabalho a....

Deus, pela vida, saúde e força.

Aos meus pais, José Eduardo dos Santos e Terezinha Costa dos Santos, que me passaram os melhores ensinamentos baseados no respeito e trabalho.

A minha esposa, Ana Nery, que está ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Paloma e Paulo.

"Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde. E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido. "

(Jim Brown)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela concessão de mais uma graça em minha vida. Obrigado por tudo senhor. Em tudo o Senhor é misericordioso e bondoso em minha vida.

A minha orientadora, Profª. Drª. Zaine Teixeira Camargo e co-orientadora, Profª. Drª. Cristiane Xavier Resende, pela oportunidade concedida, pelos conselhos, pelos ensinamentos, estou aprendendo muito com ambas, tanto na vida acadêmica quanto na pessoal.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições ao trabalho.

Ao Prof. Cristiano Teles de Meneses e ao Prof. Dr. José Gerivaldo pelo uso dos equipamentos no Laboratório de Preparação de Materiais e Magnetismo, na UFS/Ita, bem como a todos os alunos que compõe o grupo do GPMAT, especialmente o Samuel Mercena que sempre me auxiliou nos cortes dos discos.

Ao aluno de doutorado, Jônathas Rafael de Jesus, pelas ajudas nas medidas de DRX, e ao aluno também de doutorado, Douglas Costa Santos, pela ajuda nas medidas de FTIR/ATR e pela disponibilidade de ambos os alunos em sempre que possível ajudar.

Ao Lucas, aluno do departamento de engenharia química, pela ajuda na produção de algumas amostras.

A Profª Cristina e ao Diego, pela colaboração nas realizações dos ensaios biológicos.

Ao Profº. Fred por sempre que solicitado demonstrou toda sua boa vontade e atenção.

A Profª. Drª. Eliana Midori Sussuchi e Profª. Drª. Gisélia Cardoso, por conceder a disponibilidade do equipamento de FTIR/ATR. A Prof. Drª. Michelle Cardinale Macedo, pelos ensinamentos e disponibilidade a respeito do potenciostato do Laboratório de Corrosão do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais.

Ao departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS e a todos os professores que o compõe, pela utilização dos laboratórios; em especial aos

alunos que fazem parte (ou frequentam) do Laboratório de Biomateriais: Camila, Yslaine, Renata, Daniela, Vanessa, Silmara, Geane, Jamily, Cristiano, Leila, Thiago, Talita, Erisfagna, agradeço a todos pela excelente espírito receptivo e vontade de sempre ajudar o próximo.

Aos grandes amigos Dayane Santana, Robson Andrade e Thiago Rodrigues, que sempre me apoiam.

A todos que diretamente e indiretamente contribuíram, muito obrigado.

A UFS pela estrutura fornecida para o desenvolvimento desse trabalho, a CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP – Fosfato de Cálcio amorfo, ($Ca_x(PO_4)_y.nH_2O$).

BSP - Sialoproteínas óssea.

CaP – Fosfatos de cálcio.

C.E. – Contra eletrodo.

CMC – Concentração micelar crítica.

DCPA – Fosfato bicálcico anidro, monetita, ($CaHPO_4$).

DCPD – Fosfato bicálcico dihidratado, ($CaHPO_4.2H_2O$).

DRX – Difratometria de raios X.

E – Diferença de potencial.

E.R. – Eletrodo de referência.

E.T. – Eletrodo de trabalho.

EPS – Matriz exopolissacarídea.

F-127 – Copolímero tribloco, ($PEO_{100}PPO_{65}EO_{100}$).

FGH – Fibroblastos da gengiva humana.

FTIR – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourrier.

FTIR/ATR - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourrier com o modo de Reflectância Total Atenuada.

HA – Hidroxiapatita, ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$).

HA def-Ca – Hidroxiapatita deficiente em cálcio, ($Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ ($0<x<1$)).

i – Corrente aplicada.

MCPA – Fosfato monocálcico anidro, ($Ca(H_2PO_4)_2$).

MCPM - Fosfato monocálcico hidratado, ($Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$).

MET – Microscopia eletrônica de transmissão.

MEV – Microscopia eletrônica de varredura.

MOD – Matriz óssea desmineralizada.

OCP – Fosfato octacálcico, ($Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$).

OPN – Osteopontinas.

P-123 – Copolímero tribloco, ($PEO_{20}PPO_{70}PEO_{20}$).

PEO – óxido de polietileno.

PPO – óxido de polipropileno.

QS – Quorum sensing.

SPT – Spray de plasma, realizado com partículas de titânio.

TGC – Temperatura de gelificação crítica.

TMC – Temperatura micelar crítica.

TTCP – Fosfato tetracálcico, ($Ca_4(PO4)_2O$).

α-TCP – Fosfato tricálcico do tipo α , (α-$Ca_3(PO_4)_2$)

β-TCP – Fosfato tricálcico do tipo β, (β-$Ca_3(PO_4)_2$).

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população mundial faz com que problemas relacionados com a má formação óssea, como a osteoporose, decorrente do processo natural de envelhecimento, tenha uma incidência cada vez mais elevada, ocasionando maiores riscos de fraturas e lesões ósseas [1,2].

Com este envelhecimento da população, na América Latina, no ano de 2050, se compararmos com o ano de 1950, há estimativas que apontam um crescimento de 400% no número de fraturas de quadril para pessoas do sexo masculino e feminino com idade entre 50 e 60 anos, e próximo de 700% para pessoas com idades superiores a 65 anos [3].

Estes traumas (e até doenças), muitas das vezes requerem cirurgia, incluindo a substituição total da articulação (artroplastia) em caso de deterioração da articulação natural. Além disso, inúmeras fraturas ósseas, dor lombar, osteoporose, escoliose e outros problemas músculo-esqueléticos precisam ser resolvidos usando dispositivos permanentes, temporários ou biodegradáveis. Dessa forma, biomateriais ortopédicos são destinados a serem implantados no corpo humano como componentes de dispositivos que são projetados para executar determinadas funções biológicas pela substituição ou reparação de diferentes tecidos, como osso, cartilagem ou até mesmo guiando o processo reparação óssea, quando necessário [1].

Quando se trata da substituição de tecidos duros como na cirurgia de artroplastia total de quadril, da fixação de fraturas ósseas ou em tratamentos odontológicos, os metais são os mais utilizados. Tal classe de materiais começou a ser utilizada em implantes ortopédicos a partir de 1926, quando foi datado o emprego dos primeiros aços inoxidáveis [4]. Hoje, o titânio e suas ligas são amplamente usados em dispositivos biomédicos, especialmente quando se trata de substituições de tecidos rígidos, devido às suas propriedades desejáveis, tais como um relativo baixo módulo de elasticidade, maleabilidade, boa resistência à fadiga, usinabilidade, resistência à corrosão e biocompatibilidade [5].

Dados mostram que no período de 1940 a 1975, cerca de cem milhões de procedimentos cirúrgicos foram realizados em humanos para inserção de

implantes metálicos em todo o mundo. Dados de 2004 revelam que no Brasil, houve um gasto anual de US$ 64 milhões com implantes ortopédicos, sendo que mais de 80% dos implantes cirúrgicos metálicos foram consumidos pelo serviço público de saúde nacional [6]. Em termos de implantes odontológicos, atualmente estima-se que o uso de titânio para fixação de implantes dentários em todo o mundo chega a movimentar todo ano um mercado de cerca de US$ 4 bilhões [7].

No que se refere à inserção desses implantes, é importante que haja uma prevenção da adesão bacteriana e formação de biofilmes sobre as suas superfícies. A formação destes biofilmes é responsável por uma ampla gama de infecções em humanos após procedimentos cirúrgicos, sendo, portanto, um tema de grande relevância médica e social [8].

A elevada resistência de bactérias associada a formação do biofilme em uma superfície de um biomaterial implantado, traz consequências diretas ao tratamento do paciente, como maior tempo de internação, elevados custos com antibióticos e medicamentos complementares, gastos com médicos e diagnósticos; e consequências indiretas como uma pior qualidade de vida do paciente, ausência ao trabalho e até desemprego. Estimativas mostram que a depender do biomaterial, o custo relacionado com o tratamento destas possíveis infecções é maior que o custo envolvido com a retirada e troca do dispositivo implantado [9], o qual pode chegar a ser de cinco a sete vezes do custo da inserção inicial. A remoção de biomateriais implantados em casos de infecções ocorre com frequência. No entanto, estes procedimentos podem estar atrelados com o aumento da mortalidade e morbidade. Há casos em que a retirada não é possível e o paciente é submetido a uma massiva terapia antimicrobiana [9].

Alguns tratamentos de superfícies são extremamente relevantes para o bom funcionamento e manutenção de um biomaterial, podendo influenciar diretamente em alguns processos, como: Adsorção de proteínas, interação células-superfície, desenvolvimento celular, por conseguinte o desenvolvimento tecidual, e o não favorecimento de formação e desenvolvimento de biofilmes sobre o biomaterial [10].

Apenas o titânio e suas ligas somente, não podem satisfazer todos os requisitos clínicos para o sucesso de um procedimento. A fim de melhorar as

propriedades mecânicas, biológicas, e químicas, modificações da superfície são frequentemente realizadas [11].

Diversos pesquisadores buscam a compreensão de como as modificações da superfície de biomateriais pode otimizar a regeneração de tecidos ósseos [11,12], e a ideia principal é a de promover um aumento da integração da superfície do titânio com o osso (osseointegração) realizando revestimentos com materiais bioativos. O uso de revestimento com materiais a base de fosfatos de cálcio vem se mostrando a melhor escolha para que se consiga uma melhor bioatividade, permitindo aliar as propriedades já mencionadas do tiânio metálico a osseointegração e osteocondução de materiais bioativos. E estes revestimentos podem também promover uma proteção contra corrosões e possíveis metaloses, responsáveis em algumas situações por reduzirem drasticamente o tempo de uso do dispositivo [13].

Existem diversos processos para se realizar modificações nas superfícies de metais, dentre eles pode ser destacado o processo de eletrodeposição (ou deposição eletroquímica), que se baseia na redução catódica de moléculas de água, produzindo uma elevação localizada do pH nas imediações do eletrodo, atuante como cátodo (substrato). Este aumento do pH é responsável pela precipitação de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} presentes no meio eletrolítico formando uma camada aderente e insolúvel de fosfatos de cálcio sobre o substrato. É um método simples e requer equipamentos de baixo custo. Além disso, é possível obter revestimentos com espessura uniforme e com composição homogênea, revestir substratos metálicos com geometria mais simples à complexas, possibilitando também a obtenção de revestimentos bioativos [14,15].

Nos últimos anos, nota-se uma tendência para desenvolver materiais constituídos por polímero-cerâmica, tais como compósitos constituídos por fosfato de cálcio/colágeno, fosfatos de cálcio/proteína em substratos de Ti, com finalidade de obter revestimentos mais elaborados que apresentam uma maior bioatividade e biocompatibilidade [16,17].

Com estas motivações, este trabalho tem como proposta o desenvolvimento de um sistema constituído por um substrato de titânio revestido com cristais de fosfatos de cálcio bioativo que pode ser convertido à fase de hidroxiapatita, HA

(principal componente mineral do osso humano), em meio biológico. É adicionado também ao sistema proposto, e o que o torna inédito, copolímero sintético do tipo tribloco, Pluronic F127 (F-127) que pode apresentar função de evitar a adesão bacteriana [18], bem como controlar a morfologia do revestimento (síntese *template*) [19].

Diferentes materiais compósitos foram obtidos por eletrodeposição, caracterizados e submetidos a ensaios microbiológicos com *Staphylococcus aureus,* uma bactéria com incidência elevada em quadros de infecções [20]. Dessa forma, foi possível investigar a influência das diferentes superfícies na adesão das mesmas.

1.1 Composição óssea

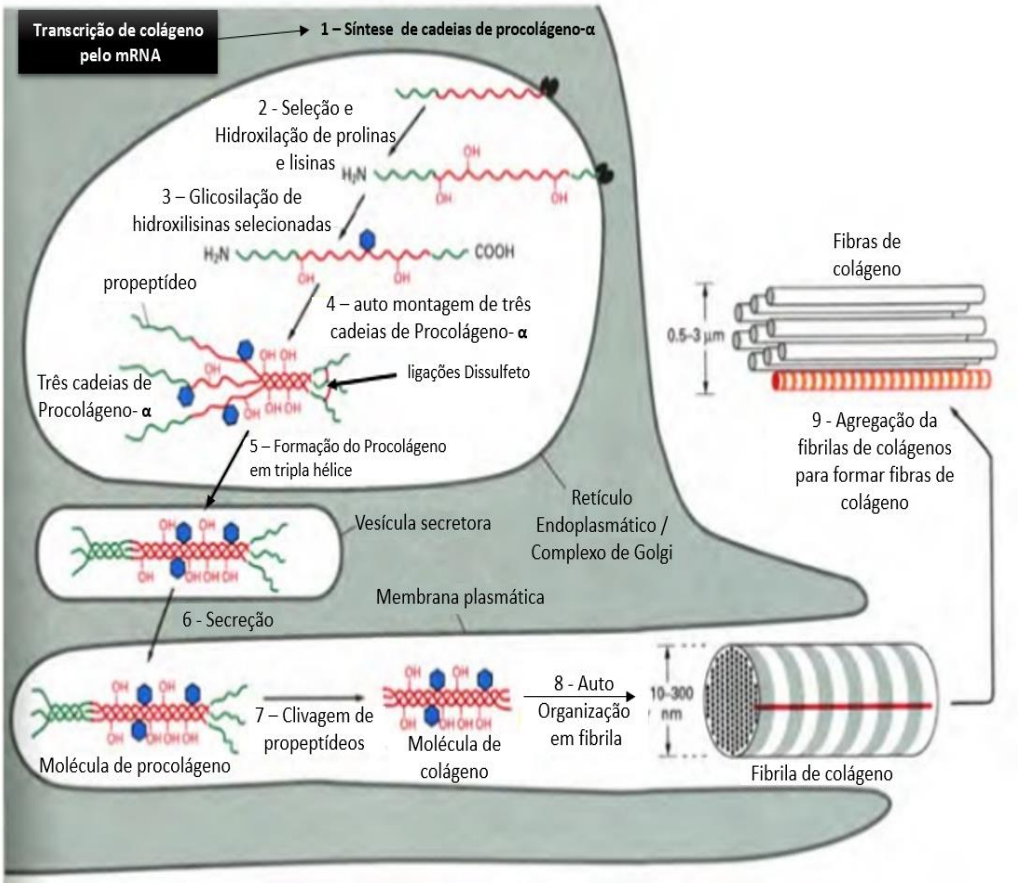
1.1.1 Composição química

Quanto à composição, o osso pode ser dividido em uma porção orgânica e uma inorgânica. A parte orgânica é constituída por células: Osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, uma matriz rica em fibras de colágeno, substâncias como proteoglicanos e glicoproteínas. É produzida e expelida, principalmente, por osteoblastos, a matriz orgânica confere a elasticidade do osso [21]. O meio extracelular, que compõe a matriz orgânica, é formado basicamente por colágeno em sua grande parte e pela chamada substância fundamental (componente intrafibrilar e extracelular do tecido conjuntivo, o qual fica disperso entre as fibras de colágeno e é constituído principalmente por água, polissacarídeos proteicos, glicoproteínas, eletrólitos e proteína não estrutural) [22].

O colágeno é uma proteína fibrosa, encontrada praticamente em todos os tecidos corpóreos, sintetizada por células fibroblásticas e células relacionadas, como: condroblastos presentes em cartilagens e os osteoblastos presente no osso. A síntese de fibrilas de colágeno envolve reações tanto no meio intracelular como no extracelular. No meio intracelular, acontece a síntese de moléculas de protocolágenos, hidroxilação de resíduos dos aminoácidos prolina e lisina e a

glicosilação de resíduos de hidroxilisina, ocorrendo a formação de monômeros de pró-colágeno, sendo esse, excretado da célula já com a estrutura de tríplice hélice [22]. Na Figura 1 é esquematizado o processo de síntese de colágeno pelas células.

Figura 1: Esquema de síntese do colágeno pelas células. Adaptado de Alberts *et al.* [23].

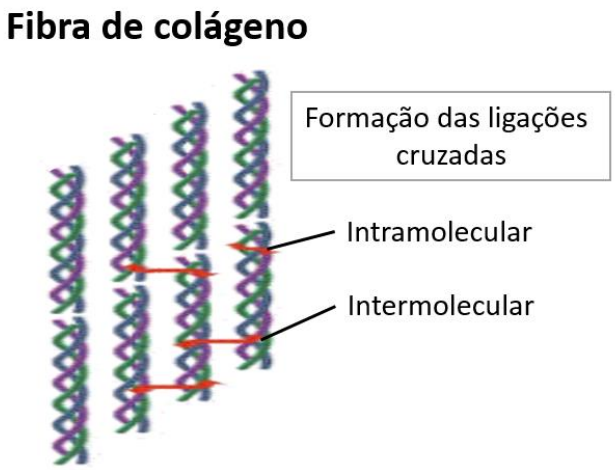


Dezenove tipos de colágenos já foram encontrados e identificados, possuindo tamanhos diferentes e funções específicas para os diversos tecidos animais. O colágeno fibrilar do tipo II é encontrado predominantemente em cartilagens, já no osso encontra-se colágeno fibrilar do tipo I, sendo que os dois tipos podem estar presentes em tecidos sujeitos ao estresse de compressão e tensão. Conseguem formar uma rede fibrilar na matriz extracelular que é estabilizada pela formação de ligações inter e intramoleculares cruzadas (Figura

2). São essas ligações cruzadas o principal fator que influencia na estabilização das moléculas e das fibras de colágeno e, por consequência confere as propriedades mecânicas únicas do osso como a resistência à tração e elevadas pressões [24].

Os diversos tipos de colágeno são caracterizados pela tripla hélice de cadeias α que contém cerca de 600 a 3.000 resíduos de aminoácidos. Estas cadeias possuem sequências que se repetem de glicina – a– b, onde a e b representam qualquer aminoácido [24].

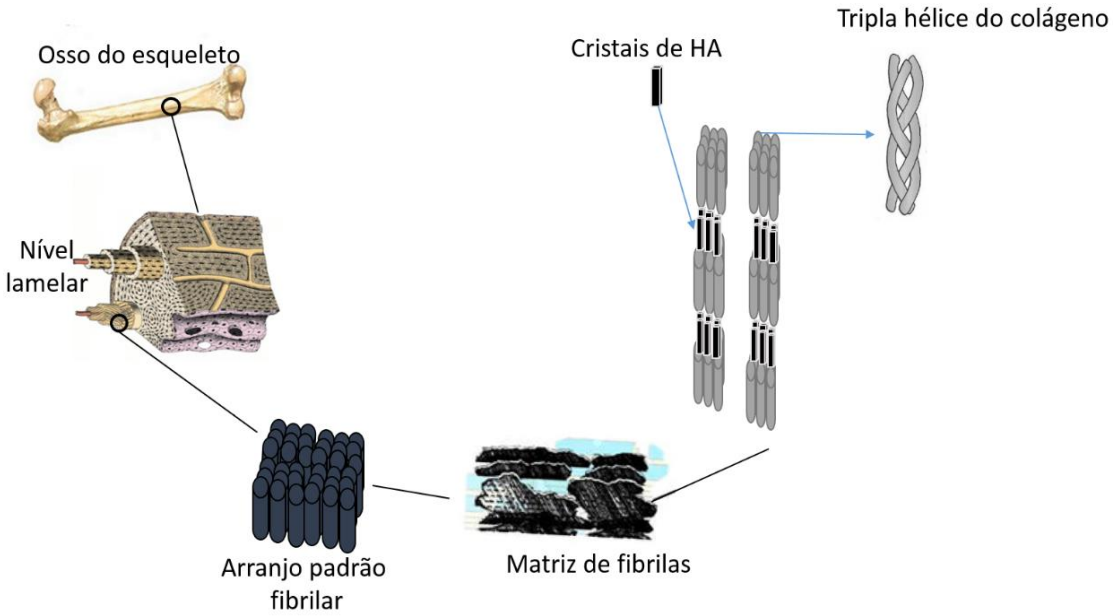
Figura 2: Ligações inter e intramoleculares de moléculas de colágeno. Adaptada de CARMEN, 2010 [25].



Já a porção inorgânica do osso, é constituída predominantemente pelos elementos Ca e P, na forma de cristais de hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, compões cerca de 60 a 70% da massa do osso. Estão presentes outras substâncias inorgânicas como 13% de carbonato de cálcio ($CaCO_3$), e 2% de fosfato de magnésio $Mg_3(PO_4)_2$ [26]. Há uma constante troca destes constituintes inorgânicos do osso com os do plasma sanguíneo. Acontece a desmineralização do osso quando a perda destes minerais é excessiva ou quando não se tem uma dieta inadequada.

A Figura 3 a seguir esquematiza os níveis de organização da matriz óssea.

Figura 3: Esquema resumido dos níveis de organização do osso. Adaptado de GSHALAEV, 2012 [27].



Visto que a HA é o componente majoritário da porção inorgânica dos ossos, ela acaba sendo intensamente estudada, pois há uma vasta gama de dispositivos biomédicos voltados para substituição óssea que a utilizam devido a sua elevada biocompatibilidade.

1.1.2 Fosfatos de cálcio

Como já mencionado anteriormente, a hidroxiapatita (HA) é o componente inorgânico encontrado naturalmente no osso e é responsável, juntamente com a matriz de colágeno, por conferir a suas características mecânicas únicas. Vem sendo bastante estudada, sendo usada em aplicações clínicas relacionada com tratamento (reparo, reconstrução) do osso há mais de 40 anos, estes estudos continuam devido a necessidade de cada vez mais se aperfeiçoar a eficácia dos tratamentos realizado com a HA e proporcionar uma possível melhora na qualidade de vida a população [27].

Os estudos iniciais com a utilização de cerâmicas a base de fosfatos de cálcio como biomateriais se deu com Albee em 1930 [29], onde foi utilizado fosfato tricálcico para regeneração de defeitos ósseos, mas somente 50 anos após surgiram diferentes tipos de materiais disponíveis para implantes na odontologia e medicina com uma variedade de cerâmicas a base de fosfato de cálcio. A boa aceitação destes biomateriais que possuem sais de fosfato de cálcio, como a HA, se deve essencialmente a sua elevada biocompatibilidade, que está relacionada com a similaridade química com a fase inorgânica encontrada naturalmente no tecido ósseo [30] Tratando-se de regeneração óssea, a HA, empregada como biomaterial, favorece a osteocondutividade, osteoindução e adesão de células específicas [27].

Sistemas contendo os íons $Ca^{2+}_{(aq)}$ e $PO_4^{3-}{}_{(aq)}$, cujas concentrações sejam superiores ao valor de seu produto de solubilidade ou em contato com superfícies que possam atuar como sítios nucleadores, favorecem a formação do fosfato de cálcio amorfo (ACP) e pode ocorrer a precipitação [31]. Os fosfatos de cálcio amorfo são produtos intermediários e que podem ser transformados em fosfatos de cálcio mais cristalinos em solução contendo água como solvente, como por exemplo, o fosfato octacálcico (OCP) e a HA; sendo que a taxa de cristalização do OCP a pH 7 e a 37ºC é maior que a da HA [32]. Por isso, que o OCP em alguns trabalhos vem sendo chamado como precursor de apatitas em processo que utilizam soluções aquosas [33]. A conversão de OCP à HA, ocorre devido a perda de moléculas de água e reordenamento da rede cristalina, sendo espontâneo em meio aquoso. A razão entre o número de átomos do elemento cálcio (Ca) pelo número de átomos do elemento fósforo (P), ou simplesmente chamada de razão molar Ca/P é um importante parâmetro que difere a maioria dos fosfatos de cálcio. Essa razão, em geral, varia de 0,5 a 2 e quanto maior o valor desta razão menor sua solubilidade em água e acidez.

A HA é o fosfato de cálcio menos solúvel em água e mais estável. A Tabela 1 mostra os principais fosfatos de cálcio com suas respectivas razões molares e algumas propriedades.

Tabela 1 - Principais fosfatos de cálcio com suas respectivas razões molares e algumas propriedades [27].

Composto	Fórmula química	Razão Ca/P	Solubilidade a 25°C ($-\log K_{ps}$)	Solubilidade a 25°C, $g.L^{-1}$	Faixa de pH mais estável a 25°C
Fosfato Monocálcico Hidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$	0,5	1,14	≈18	0,0-2,0
Fosfato Monocálcico Anidro (MCPA)	$Ca(H_2PO_4)_2$	0,5	1,14	≈17	#
Fosfato Bicálcico Dihidratado (DCPD, bruxita)	$CaHPO_4.2H_2O$	1,0	6,59	≈0,088	2,0-6,0
Fosfato Bicálcico Anidro (DCPA, monetita)	$CaHPO_4$	1,0	6,90	≈0,048	#
Fosfato Octacálcico (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$	1,33	96,6	≈0,0081	5,5-7,0
Fosfato α-Tricálcico (α-TCP)	$\alpha\text{-}Ca_3(PO_4)_2$	1,5	25,5	≈0,0025	x
Fosfato β-Tricálcico (β-TCP)	$\beta\text{-}Ca_3(PO_4)_2$	1,5	28,9	≈0,0005	x
Fosfato de Cálcio amorfo (ACP)	$Ca_x(PO_4)_y.nH_2O$	1,2-2,2	*	*	5-12
Hidroxiapatita deficiente em Cálcio (CDHA, HA def-Ca)	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ (0<x<1)	1,5-1,67	≈85,1	≈0,0094	6,5-9,5
Hidroxiapatita (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67	116,8	≈0,0003	9,5-12
Fosfato Tetracálcico (TTCP)	$Ca_4(PO_4)_2O$	2,0	38-44	0,00007	x

* - Os valores não foram medidos com precisão; x - Estes compostos não precipitam a; partir de soluções aquosas; # Estáveis a temperatura acima de 100°C

Os demais fosfatos de cálcio (CaP) não são menos importantes, pois muitos deles podem ser convertidos em meio biológico a fase HA, se tratando

do uso de fosfatos de cálcio em biomateriais, há uma tendência da utilização de CaP mais solúveis, e apresentam degradação mais rápida quando comparados com a HA. No trabalho de Yamaguchi *et al.* [34], foi demostrado por meio de raios-X, que blocos implantados de HA cristalina porosa e sintética em defeitos ósseos humanos permaneceram com forma e volume intactos por mais de 3 anos e alguns deles por mais de 6 anos. Os resultados mostraram ausência de degradação por dissolução do material implantado, de concordância com literatura que mostra que a hidroxiapatita estequiométrica com elevada cristalinidade não sofre degradação apreciável no meio biológico [35]. Esta propriedade da HA torna-se uma limitação para se alcançar o ideal da engenharia tecidual onde dispositivos biomédicos devem ser degradados em meio biológico e no caso de implantes voltados para reconstrução óssea deve ser substituído pelo osso natural.

Por isso, outros fosfatos de cálcio vêm chamando a atenção para utilização em biomateriais. A Tabela 2 a seguir mostra algumas cerâmicas de CaP que são utilizados e investigados como materiais de substituição óssea no campo ortopédico e cirurgias orais/dentárias.

Tabela 2: Alguns dos fosfatos de cálcio usados em substituição óssea [36].

Fosfato de cálcio	Nome	Fórmula química	Preparação	Uso em implantes
DCPD	Fosfato de cálcio dihidratado	$CaHPO_4.2H_2O$	Síntese	Cemento. [37]
DCPA	Fosfato de cálcio anidro	$CaHPO_4$	Síntese	Pó, grânulos e blocos [38] [39][40].
OCP	Fosfato octacálcico	$Ca_8H_2(PO_4)_6.5H_2O$	Síntese e/ou sinterização	Grânulos [41,42,43]; revestimentos [44]; grânulos [45,46] ou depósitos em polímeros [47,48]
HA	Hidroxiapatita	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$		Grânulos [49,50]; revestimentos [51]

Uma das principais aplicações de OCP voltadas para biomateriais é a utilização como preenchimento de defeitos ósseos, já que devido sua solubilidade ser maior quando comparada com a da HA, apresenta uma excelente velocidade de reabsorção. A reabsorção é uma característica que se deseja em aplicações onde o processo de degradação é simultâneo com a reposição do osso novo em formação, o que faz com que o composto apresente propriedades de proliferação celular e osteocondutividade mais acentuadas do que a HA [52]. A estrutura cristalina do OCP consiste de um arranjo alternado entre camadas hidratadas de composição $4[CaHPO_4.\ 2H_2O]$ e camadas com estrutura semelhante a da HA de composição $4[Ca_3(PO_4)_2.\ 0{,}5H_2O]$ e, o OCP pertence ao sistema triclínico (P1) com parâmetros de rede a = 19,71Å, b = 9,53Å e c = 6,83Å e α = 9,014°, β = 92,52° e γ = 108,67° [53,54].

Ohta, *et al.* [55] aponta que o DCPD ($CaHPO_4.2H_2O$, DCPD) pode ser um dos precursores de HA, e que a síntese de HA se dá através de agregados orientados ao longo do eixo *c* baseado na seguinte reação:

$$10\ CaHPO_4.2H_2O \longrightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18H_2O + 12H^+ + 4PO_4^{3-} \quad \text{(Eq. 1)}$$

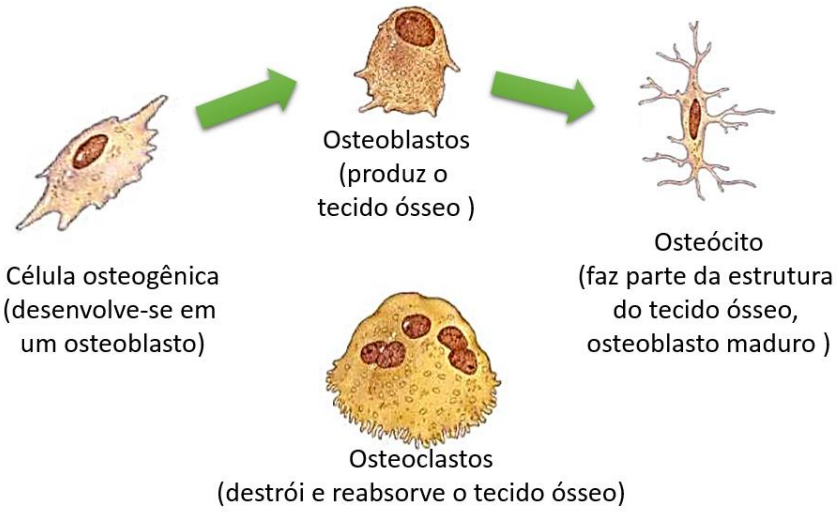
De acordo com a literatura, os principais fosfatos de cálcio eletrodepositados sobre substratos metálicos são as fases de DCPD, OCP, DCPA, HA, todos promissores para utilização em biomateriais, pois as que diferem de HA atuam como percursoras de HA no processo de remodelação óssea.

1.1.3 Remodelação óssea

O processo de cicatrização óssea é bastante complexo e envolve alterações na expressão de milhares de genes. Embora exista uma grande quantidade de estudos relacionados ao entendimento do processo de regeneração óssea, eventos ao nível bioquímico e anatômico ainda são focos de pesquisa e estão sendo estudados de forma mais detalhada. Estes estudos possuem fundamental importância para uma melhor compreensão de como ocorre a fratura e regeneração do tecido ósseo [56].

Quatro principais tipos de células que são encontradas no osso e estão direteamente ligadas com o processo de regeneração óssea: Os oesteoclastos, as células osteoprogenitoras, os osteoblastos e os osteócitos (Figura 4) [57,58].

Figura 4: Representação das principais células envolvidas no processo de regeneração óssea, figura adaptada de TORMENA, 2009 [59]



Os osteoclastos são células responsáveis pela identificação do tecido ósseo danificado, estão diretamente relacionadas com o processo de reabsorção e estão presentes onde o osso será removido. As células osteoprogenitoras são encontradas na camada celular do periósteo, no endoósteo e na linha vascular de passagem da matriz medular. A partir dessas células são originadas as células osteoblásticas [57,58].

Os osteoblastos, por sua vez, são células que atuam especificamente na reparação, secretando matriz óssea extracelular, colágeno e substâncias que constituem o osso não mineralizado. Também são responsáveis por concentrar fosfatos de cálcio, partipando da mineralização da matriz. Conforme ocorre o enrigecimento da matriz os osteoblastos amadurecem e se tornam osteócitos, fazendo parte da estrutura da matriz e responsáveis por estabelecer comunicação entre os demais osteócitos e trocar nutrientes [57,58].

Assim como outros tecidos humanos, o osso está constantemente em processo de regeneração, o qual pode ser descrito resumidamente pelas seguintes etapas: Ativação, reabsorção, reversão, formação e mineralização, que serão descritas a seguir.

A ativação da superfície do osso ocorre antes da reabsorção, por meio da retração das células de revestimento do osso (osteoblastos maduros alongados existentes na superfície endósteo) e a digestão da membrana pela ação do da colagenase. A etapa de "ativação" envolve recrutamento e ativação de precursores mononucleares de osteoclastos monócito-macrófago da circulação, resultando em interação de osteoclastos e células precursoras dos osteoblastos. Isto leva a diferenciação, migração, e fusão dos osteoclastos grandes multinucleados [60].

Na etapa de reabsorção os osteoclastos se anexam a superfície do osso mineralizado, em seguida, começa a dissolver a matriz mineral e a matriz óssea, iniciando, de fato, a reabsorção pela secreção de íons de hidrogênio e as enzimas lisossomais, particularmente catepsina K, que pode degradar todo os componentes da matriz do osso, incluindo colágeno, a um pH baixo. Este processo é completado pelos macrófagos. Mediada pelos osteoclastos a reabsorção óssea leva apenas cerca de 2 a 4 semanas, durante cada ciclo de remodelação [60].

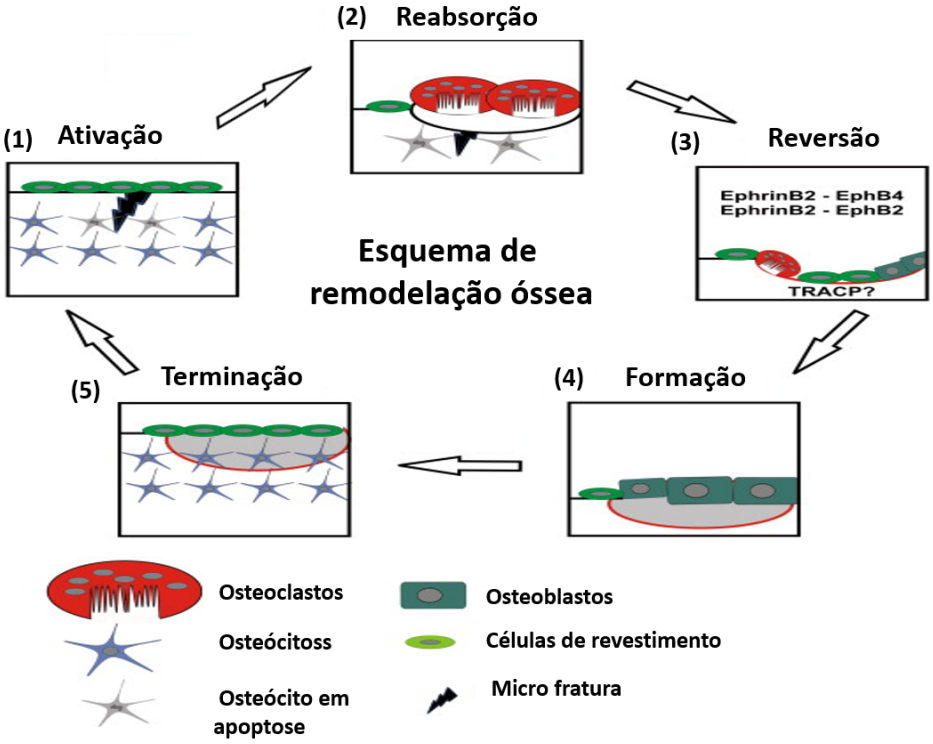
A etapa de reversão ocorre com a terminação da reabsorção, dando origem a uma cavidade com variedade de células como os osteócitos libertados da matriz óssea, assim, preosteoblastos (células osteoprogenitoras) são recrutadas para começar a nova formação óssea. Os sinais que terminam o fim da etapa de reabsorção e o início da reversão e consequentemente início da formação do novo osso são ainda desconhecidos [60].

Na formação, os osteoclastos que estão na cavidade oriunda da etapa de reabsorção óssea, são substituídos por células da linhagem dos osteoblastos que por sua vez iniciam a formação de osso, produzindo e liberando a matriz óssea [60].

A etapa de mineralização, que é a fixação dos íons fosfatos e cálcio na matriz, começa cerca de 30 dias após a deposição do osteóide (matriz óssea

não mineralizada), terminando em 90 dias no osso trabecular e em 130 dias no osso cortical. A quantidade de osso formado deve ser igual à quantidade de osso reabsorvida. As células osteoblásticas aprisionadas na matriz são transformadas em osteócitos e compõe a estrutura da matriz óssea. A Figura 5 a seguir ilustra estas etapas.

Figura 5: Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea. Adaptado de Henriksesn *et al.* [61].



Para o sucesso da remodelação, uma quantidade adequada de suprimento sanguíneo e um aumento da estabilidade mecânica são fundamentais. Em situações que isso não acontece, pode resultar em fibrose atrófica, não união óssea, ou até a formação de cartilagens [62].

O estudo, a utilização e desenvolvimento de biomateriais voltados para regeneração óssea sempre leva em consideração estas etapas da regeneração óssea, para que seja possível sempre aprimorá-los.

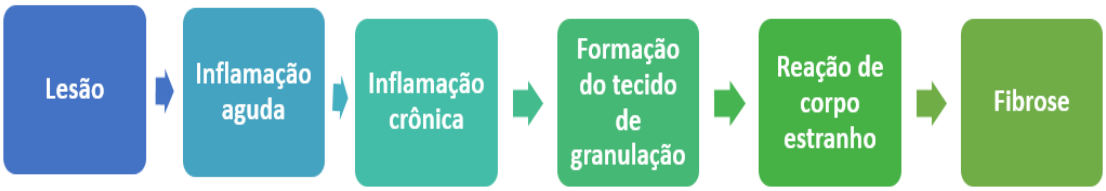
1.2 Biomateriais

Ao longo dos anos surgiram diversos biomateriais, mas basicamente todos podem ser agrupados em categorias conhecidas como as três gerações dos biomateriais. Na primeira geração, a maior preocupação era de apenas desenvolver materiais bioinertes, que não provocasse reações de corpo estranho no organismo; a segunda geração já se abordava conceitos como biocompatibilidade e biodegradabilidade na produção destes materiais; e a terceira geração são os materiais capazes de estimular respostas celulares específicas ao nível molecular [63].

Avanços recentes em nosso conhecimento a respeito do comportamento eletrofisiológico de células e tecidos tem inspirado o desenvolvimento de uma nova geração de biomateriais para regeneração de tecidos: a quarta geração. Que se baseia na existência de sinais bioelétricos endógenos que se originam da atividade das bombas e de canais iônicos presente nas membranas celulares. Entende-se que não somente células de músculos e neurônios, mas qualquer outra célula do corpo que são rodeadas por membranas plasmáticas constituídas de proteínas bombeiam íons para gerar potenciais elétricos transmembranares. Esses sinais bioelétricos originários da atividade de bombas e dos canais iônicos se mostram cada vez mais reguladores importantes do comportamento celular (proliferação, apoptose, migração, diferenciação, entre outros), e tem sido identificados nos processos de regeneração de tecidos. Experiências recentes, demostram que mecanismos elétricos de sinalização podem ter um papel muito mais significativo do que se pensava. Por exemplo, Zhao, *et al.* [64] descobriram que sinais elétricos de natureza fisiológica tem um efeito de orientação na migração de células da córnea e cicatrização de feridas [65].

A inserção de um biomaterial no organismo provoca uma lesão em determinada região (tecidos ou órgão envolvidos), seja ocasionada por injeções, inserção ou implantação cirúrgica, é inevitável a sequências de acontecimentos mostrado de acordo com a Figura 6 a seguir [66].

Figura 6: Sequência de acontecimentos locais após uma implantação.



O processo inflamatório faz parte da inserção de um biomaterial, e esses acontecimentos são provocados por defesas naturais do organismo.

Para que um dispositivo ou material possa ser usado como biomaterial uma série de pré-requisitos devem ser levado em consideração, como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, taxa de degradação, citotoxicidade, entre outros [2]. Alguns destes requisitos atendem a exigências de normas internacionais como a da Norma ISO 10.993, que trata das avaliações biológicas dos biomateriais [67].

Um biomaterial, atualmente, pode ser definido como:

"Qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizadas em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo." [2].

Para que ocorra uma interação satisfatória do biomaterial com o organismo, de acordo com CAO, 2009 [68], o biomaterial implantado deve conferir propriedades como:

- Não haver reações inflamatórias sustentada ou tóxica após implantação in vivo;
- Quando biodegradável, o tempo de degradação do material seja suficiente para permitir que ocorra o processo de regeneração do local comprometido;
- Que a sua degradação não gere sub-produtos tóxicos e que sejam metabolizados facilmente;
- Apresente propriedades mecânicas adequadas a aplicação que fora proposto e que possíveis alterações das propriedades

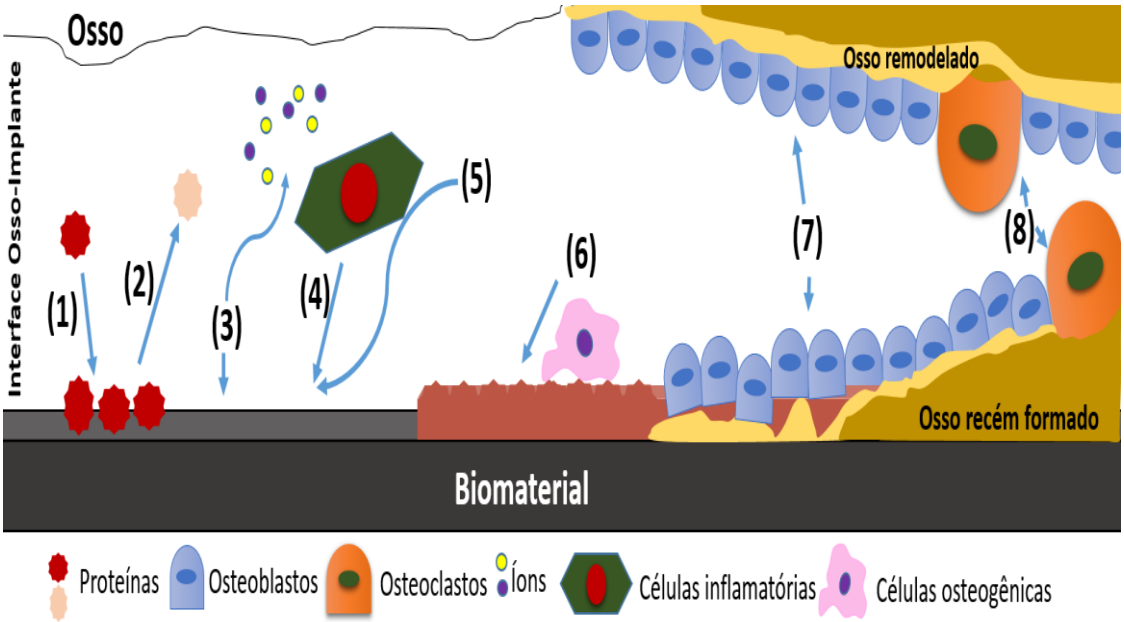
mecânicas seja compatível com a regeneração ou o restabelecimento do sítio de implantação.

No caso específico de implantes de titânio, algumas propriedades como osteoindução e osteointegração também devem estar presentes nesse tipo de biomaterial, que estão relacionadas com a habilidade que o tecido ósseo possui de interagir e fixar-se na superfície do material.

Existem diferença nos mecanismos que levam a osteoindução, osteocondução e osseointegração. A osteoindução ocorre através do recrutamento de células potencialmente osteogênicas (células imaturas) para serem estimuladas a desenvolverem-se a células pré-osteoblásticas; a osteocondução é basicamente o crescimento do tecido ósseo ao longo da superfície dos implantes (a retenção de fibrina na superfície do implante é importante para a induzir atividades celulares, como a ativação de leucócitos e plaquetas, além disso serve de guia para que as células osteoprogenitoras possam migrar em direção ao implante); a osseointegração é baseada na fixação estável por meio do contato direto osso-implante. Para que a osseointegração ocorra com sucesso, os fenômenos de osteoindução e osteocondução são necessários. Uma boa osseointegração é essencial em implantes que serão submetidos a elevadas pressões.

A resposta das células que irão se aderir no implante colocado em uma região contendo matriz óssea envolve uma série de eventos celulares e da matriz, culminando (preferencialmente) na completa ligação e fixação do osso, ou seja, a osseointegração. Este processo será descrito a seguir, mas pode ser resumidamente representado pelo esquema da Figura 7.

Figura 7: Esquema ilustrando as estapas que ocorrem no processo de osseointegração de um implante com o osso já existente, adaptado de PUELO, 1999 [69]:



1 - Adsorção e proteínas provenientes dos fluidos teciduais e sangue; 2 – Possível dessorção de proteínas; 3 – Alteração da superfície (adsorção de proteínas), e possível liberação de material proveniente da superfície do implante;4 – Células do tecido conectivo e células inflamatórias (macrófagos, por exemplo) se aproximam do implante, para iniciação de mecanismos de defesas; 5 – Possível liberação direcionada de proteínas da matriz e adsorção seletiva de proteínas como BSP e OPN; 6 – Organização das proteínas em forma de lâminas e adesão de células osteogênicas devido a sequências específicas de aminoácidos; 7 - Deposição óssea tanto na superfície do osso exposto quanto na superfície do implante, com a ação de osteoblastos; 8 – Remodelação do osso recém formado.

Ao ser implantado um biomaterial voltado para regeneração (ou voltado para a osseointegração) do tecido ósseo no organismo humano uma sequência de eventos fundamentais acontece. Após a inserção do implante, o coágulo sanguíneo é o tecido que entra primeiramente em contato com o mesmo, quase que imediato, especificamente, plaquetas e fibrinas (proteínas responsáveis pela coagulação do sangue) entram em contato com a superfície do implante.

Esta camada de proteínas é quem controla a interação das células dos tecidos circundantes com a superfície do biomaterial implantado, as integrinas são as moléculas proteicas presente na membrana das células e são responsáveis por transmitirem informações da matriz extracelular para núcleo da célula por meio do citoesqueleto (assim como podem transmitir informações do interior da célula para o meio extracelular); essas vias de sinalização são importantes, pois são elas que regulam o comportamento das células quando em contato com a superfície do biomaterial, especialmente quando se trata de adesão, espraiamento e indução de novo tecido ósseo [69].

O biomaterial implantado também entra em contato com a matriz extracelular óssea que é constituída por cerca de 90% de proteínas colagenosa (97% de colágeno tipo I; 3% de colágeno tipo V) e cerca de 10% de proteínas não colagenosas (20% de osteonectina, 20% de osteocalcina, 10% de proteoglicanas 12% de sialoproteínas ósseas, fibronectinas, osteopontinas, fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas do osso). As células osteoblásticas conseguem sintetizar tais proteínas, onde a maioria está relacionada com o processo de adesão [69].

A proteína de maior importância no processo de adesão celular e que está presente na matriz extracelular é a fibronectina (glicoproteína encontrada em vários fluidos corpóreos e imobilizada em alguns tecidos), ela contém a sequência de aminoácidos (Arg-Gly-Asp) responsável pela fixação das integrinas e promovem a adesão de células osteoblásticas. Dependendo da superfície do material implantado as proteínas também podem dessorver (podem desnaturar, desfragmentar) e não mediar o processo de adesão. [69].

Além da adsorção ou dessorção de proteínas, alterações significativas podem ocorrer com a superfície do material como a oxidação do metal (evidenciada pelo aumento da espessura da camada de óxidos, mesmo sendo utilizado Ti) e no caso de superfícies revestidas com mais de um fosfatos de cálcio, pode ocorrer a liberação proveniente das fase mais solúvel de íons cálcio e fosfatos presente no revestimento [69].

Células que atuam no processo inflamatório (por exemplo, leucócitos) se aproximam do objeto estranho ao organismo na tentativa de eliminá-lo. Ainda há evidências de liberação de matiz extracelular direcionada constituída por

proteínas como sialoproteínas óssea (BSP) e osteopontinas (OPN) na superfície do material, e por conterem a sequência Arg-Gly-Asp, acredita-se que desempenham um papel importante na adesão celular e na fixação de proteínas. Estudos mostram que há heterogeneidade morfológica ao longo da zona interfacial osso-implante; uma característica geralmente observada nesta interface é o aspecto similar as linhas cimentares e também com forma de camadas de lâminas limitante, esta camada interfacial é rica nas já mencionadas proteínas não colagenosas como a OPN e a BSP [69].

Células osteogênicas aderem facilmente a superfície do biomatereial contendo estas proteínas, diferenciando-se em pré-osteoblastos e posteriormente em osteoblastos. Com a ação dos osteoblastos, ocorre a deposição do osso tanto na superfície óssea exposta quanto na do implante e, por fim, ocorre o processo de remodelagem do osso recém-formado com auxílio de células osteoblásticas [69].

Para o sucesso de um dispositivo biomédico implantado, é de extrema relevância que a superfície do mesmo favoreça a adesão e proliferação de células específicas que atuam no processo de remodelação óssea, já mencionadas [70], otimizando processos que envolvam cicatrização óssea. Levando em consideração que o primeiro contato destas células é com a superfície do dispositivo, trabalhos mostram que biomateriais com revestimentos constituídos por fosfatos de cálcio apresentam resultados mais promissores quando comparados com dispositivos sem revestimentos [27]. O trabalho de Wang, *et. al*., (2006) [72], ilustra bem esta melhora na formação do novo osso, onde é comparado a formação do novo osso com o uso de liga de Ti (Ti–6Al–4V) sem revestimento, com revestimento de HA por plasma spray e com revestimento de HA por eletrodeposição. Foi possível observar por meio do implante em osso canino trabecular que as amostras com revestimentos apresentaram maiores taxas de mineralização (formação do novo osso), em acordo com a referência [71], e que os revestimentos obtidos por ambas metodologias proporcionaram taxas de mineralização semelhantes após 14 dias. [72]. Este trabalho utiliza o processo de eletrodeposição para obter revestimentos de fosfatos de cálcio sobre substratos de Ti, aspectos básicos da técnica será descrito a seguir.

1.3 Fundamento da Eletrodeposição

Existem diversas técnicas para se realizar revestimentos de HA sobre substratos, dentre elas podemos destacar o plasma spray, *sputtering* (pulverização), deposição por laser pulsado, *dip coating*, sol-gel, revestimento biomimético e deposição eletroquímica. A Tabela 3 a seguir mostra as vantagens e desvantagens de cada técnica utilizada.

Tabela 3: Comparação entre algumas técnicas de revestimento, adaptada de GSHALAEV, 2012 [27].

Técnica	Espessu-ra	Vantagens	Desvantagens
Plasma Spray	30-200 mm	Altas taxas de deposição; baixo custo.	Altas temperaturas induz decomposição; resfriamento rápido produz revestimentos amorfo ; revestimentos relativamente espessos.
Sputtering	0,5-3 mm	revestimento com espessura uniforme; ; revestimento denso	Caro; demorado; produz revestimentos amorfos
Dip Coating	0,05-0,5 mm	Barato; revestimentos aplicado rapidamente; pode revestir substratos complexos	Requer altas temperaturas de sinterização;
Sol-gel	<1 mm	Pode-se obter revestimentos complexos; baixas temperaturas de processamento; relativamente baratas quando o revestimento é muito fino.	Alguns processos requerem controle de atmosfera; uso de matéria prima cara.
Revestimento Biomimético	<30 mm	Baixas temperaturas de processamento; pode revestir formas complexas; podem incorporar fatores para estimulador o crescimento ósseo	Demorado; exige reabastecimento e um fluido corporal simulado de pH constante ; fraca adesão com substrato
Deposição Eletroquímica	0,05-0,5 mm	Espessura do revestimento uniforme; rápidas taxas de deposição; pode-se revestir substratos complexos, com qualquer forma; baixas temperaturas; baixo custo.	Fraca adesão com substrato

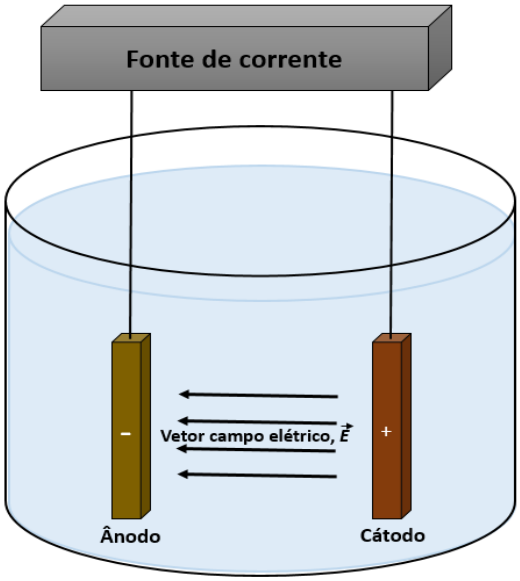
Como mencionado na Tabela 3 a deposição eletroquímica é uma técnica bastante vantajosa quando comparada com as demais, pois apresenta um procedimento rápido, de baixo custo, requer temperaturas relativamente baixas, além de revestimento uniforme em geometrias complexas.

A deposição eletroquímica (ou simplesmente eletrodeposição) é um processo que permite a formação de revestimentos sobre superfície de material condutor. Para que as reações ocorram, correntes devem ser aplicadas afim de se promover a transferência de cargas elétricas por meio da interface eletrólito/eletrodo [73].

A eletrodeposição é baseada nas reações de oxirredução. Em geral, estas reações ocorrem em uma superfície de um eletrodo sólido que fica imerso em uma solução, sendo que a redução de algumas espécies presentes na solução forma a camada depositada no eletrodo.

Este processo ocorre em uma célula eletroquímica contendo a solução eletrolítica e os eletrodos, separados e carregados por uma fonte externa com cargas opostas, gerando um campo elétrico E, onde este campo determina o movimento dos íons presente na solução. A Figura 8 ilustra um esquema de uma célula eletroquímica [74].

Figura 8: Esquema de uma célula eletroquímica.



O campo elétrico, devido a fonte externa, tem sua orientação no sentido do ânodo (eletrodo negativo). Na célula eletroquímica, os cátions se movimentam na direção do vetor campo elétrico. Na deposição eletroquímica, o substrato que irá ser revestido é posicionado no eletrodo negativo, e é imerso em uma solução eletrolítica que contem os elementos a serem incorporado ao revestimento.

As etapas envolvidas no processo podem ser representadas de uma forma geral da seguinte maneira: O ânodo por estar carregado negativamente e imerso em solução, acaba atraindo espécies positivas (cátions), na tentativa de neutralizar o sistema tornando-o termodinamicamente estável, formando uma camada de íons adsorvidos na superfície, esta camada de íons aderidos no ânodo é a chamada de Camada Interna de Helmholtz, (CIH), além dessa primeira camda, é formada logo a seguir uma outra camada constituída por íons solvatados por moléculas de água, esta camada é mais espessa que a CIH e é chmada de Camada Externa de Helmholtz, (CRH).

A formação de bolhas de hidrogênio nas redondezas do ânodo devido a decomposição da água, pela aplicação de corrente, conforme a reação

$$2H_2O_{(l)} + 2e^- \rightarrow H_{2(g)} + 2OH^-_{(aq)} \text{ (Eq. 2)}$$

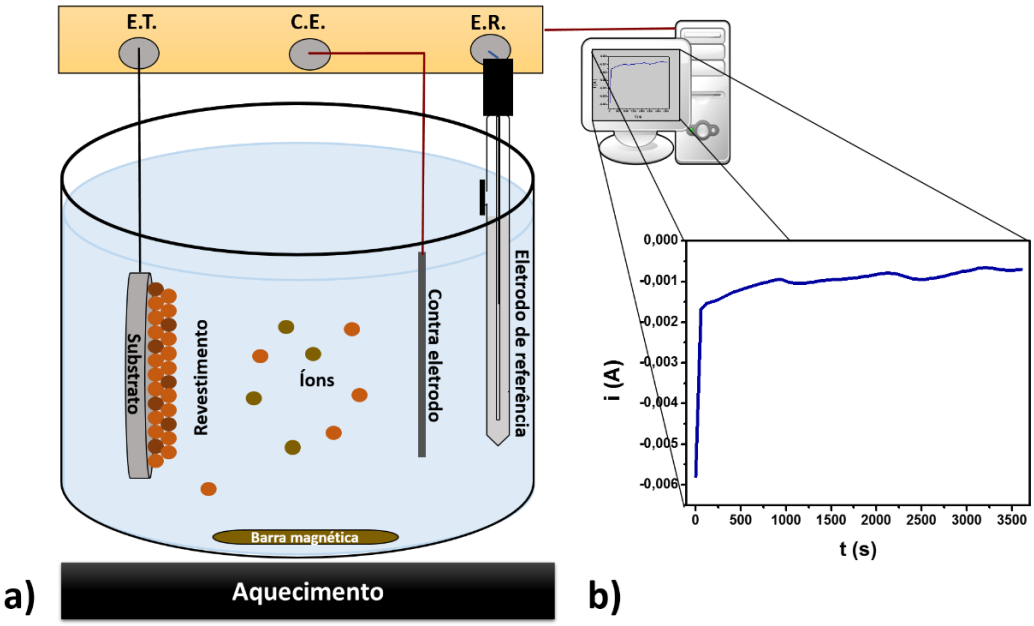
Comum nesses processos, são responsáveis pelo sugimento de poros no revestimento, prejudicando tamém a adesão do mesmo.

Diversas técnicas eletroquímicas podem ser utilizadas, dependendo do sistema e das propriedades desejadas para o depósito. Para se realizar deposição de metais são usadas técnicas como a eletrodeposição galvanostática, a eletrodeposição pulsada e a potenciostática. Quando a corrente que flui entre o eletrodo de trabalho (E.T.) e o contraeletrodo (C.E.) é mantida constante, esse processo é chamado de galvanostático. No método da eletrodeposição pulsada, aplica-se pulsos de corrente controlados por um potenciostato, sendo possível obter revestimentos com camadas de composição diferente (multicamadas) [75].

Experimentos onde a diferença de potencial (E) entre o cátodo e o ânodo é mantida constante são chamados de potenciostáticos (método adotado neste

trabalho); mas para que esta condição ocorra se faz necessário o uso de um eletrodo de referência (E.R.). O controle do potencial e da corrente é realizado com o uso de um potenciostato. Nas células usadas no processo de eletrodeposição, o cátodo (E.T) é o local onde as reações químicas de interesse ocorrem; e o ânodo é o C.E. A curva obtida a partir do procedimento de eletrodeposição potenciostática de corrente aplicada (i) contra tempo (t) é chamada de transientes de corrente. A Figura 9 mostra uma célula eletrolítica constituída por três eletrodos e uma curva de i *versus* t [76].

Figura 9: a) Esquema de uma célula eletrolítica de três eletrodos conectados a um potenciostato controlado por um computador; os eletrodos e íons mostrados, são os que foram usados neste trabalho: E.T. – substrato metálico; E.R. – Eletrodo de referêcnia; C.E. – Contra eletrodo. b) Transiente de corrente obtida a partir de um processo de eletrodeposição.



O C.E. usado é feito de um material inerte a faixa de potencial a ser trabalhado, geralmente grafite ou platina, para que não ocorra deposição no mesmo. A sua finalidade é de apenas conduzir elétrons. O E.R. fornece um determinado valor de potencial constante a célula. Isto se faz necessário devido a diferença de potencial entre o C.E. e o E.T., o qual varia devido a alterações

na resistência elétrica da solução ocasionada pela redução de íons e transferência de massa para o substrato. Assim a carga oscila nas proximidades do E.T. gerando um potencial efetivo que difere daquele que é imposto entre o C.E. e o E.T.. Desta forma, outros valores de potenciais podem ser medidos em relação a este potencial de referência, sendo fundamental que este eletrodo tenha um potencial de referência estável ao longo da temperatura e tempo. É também importante que não ocorra reações que envolva os componentes do eletrólito e o E.R.. Desta maneira é possível manter o sobrepotencial imposto ao E.T. constante [77].

O eletrodo de referência usado internacionalmente pela comunidade científica é o eletrodo de hidrogênio, mas se torna difícil trabalhar na prática com este eletrodo, por isso se utiliza os chamados eletrodos de segundo tipo ou eletrodo metálicos. Esses são formados por um eletrodo de metal em contato com íons ânions que ao entrarem em contato com íons metálicos formam sal pouco solúvel, que devido a baixa solubilidade do sal contido na solução deste eletrodo o potencial torna-se bastante estável. O E.R. usado neste trabalho foi o Calomelano Saturado Hg/Hg_2Cl_2 em solução saturada de KCl.

Processos de deposição onde ocorre a transferência de elétrons do eletrodo de trabalho para o eletrólito é chamado de deposição catódica, já quando ocorre deposições em que há transferência de elétrons do eletrólito para o eletrodo de trabalho, esse processo é chamado de deposição anódica.

Um modelo que pode representar o processo de deposição eletroquímica pode ser descrito em três etapas principais:

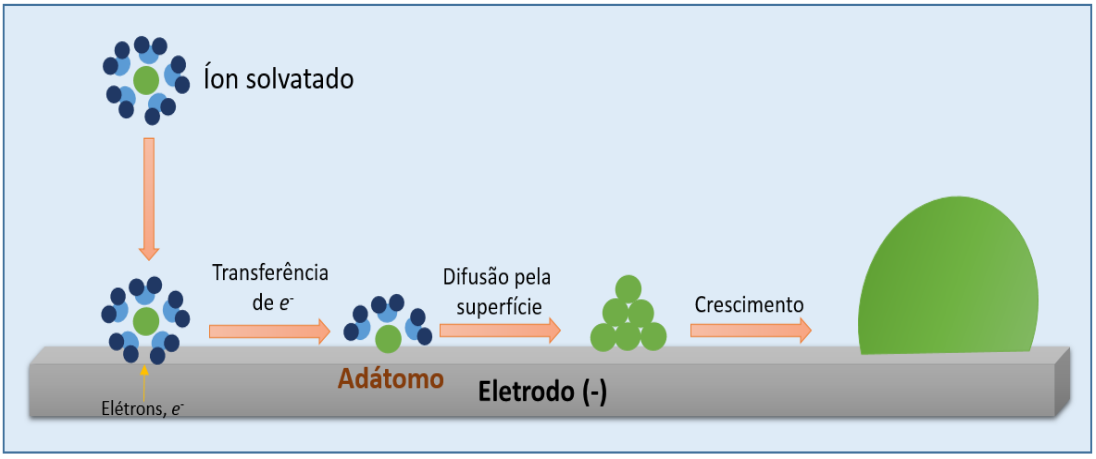
1 – difusão dos íons solvatados na solução em direção ao E.T.;

2 – transferência de elétrons dando o início da adsorção (ad-átomo);

3 – difusão superficial com a incorporação à superfície do eletrodo.

A Figura 10 ilustra este mecanismo e o crescimento da camada depositada [78].

Figura 10: Representação de mecanismo para o crescimento da camada depositada.



Estes íons passam por etapas até serem incorporados ao depósito; em solução os íons são solvatados por moléculas de água ou formam complexos com os outros componentes da solução eletrolítica. Em uma primeira etapa, o íon metálico é adsorvido na superfície de E.T. sendo reduzido (total ou parcialmente). O íon metálico torna-se o chamado adátomo, caracterizado por um estado intermediário entre o metálico incorporado no depósito e o estado iônico quando presente na solução. Esse adátomo se difunde pela superfície do E.T. até que se fixa em alguma irregularidade, ou encontre algum núcleo de crescimento [79].

Diferentes tipos de revestimentos de fosfatos de cálcio em metais têm sido obtidos pelo processo de eletrodeposição, tais como o fosfato de cálcio dihidratado, (DCPD, $CaHPO_4.2H_2O$) [80], fosfato de cálcio anidro (DCPA, $CaHPO_4$) [81], o fosfato octacálcico (OCP, $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4{\cdot}5H_2O$) [82] e hidroxiapatita (HA, $Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6$) [83].

Nos últimos anos, nota-se uma tendência para desenvolver materiais constituídos por polímero-cerâmica, tais como compósitos constituídos por fosfato de cálcio/colágeno, fosfatos de cálcio/proteína em substratos de Ti, com finalidade de obter revestimentos novos e mais elaborados que apresentem uma maior bioatividade e biocompatibilidade [84, 85].

Podem ser encontrados na literatura trabalhos que visam obter revestimentos organo-cerâmicos, tais como o trabalho de Cheng *et al*. [84], onde foi preparado revestimento contendo a proteína albumina de soro bovino/DCPD por método eletroquímico usando 0,042 mol L^{-1} $Ca(NO_3)_2$ e 0,025 mol $L^{-1}NH_4H_2PO_4$ e 2 mg mL^{-1} da albumina, que foi adsorvida previamente no substrato, o pH observado da solução foi de aproximadamente 4,2, a uma temperatura constante de 65°C. Após a eletrodeposição foi realizado um tratamento hidrotérmico, e que permitiu obter uma camada porosa de HA com morfologia em forma de agulha e com espessura final de 50 µm, dados obtidos por DRX, FTIR e MEV.

O trabalho de Xiong *et al.* [86], mostra que é possível obter revestimentos organo-cerâmicos de OCP/quitosana em substratos de Ti por eletrodeposição. Para isso, utilizou-se placa de Ti como eletrodo de trabalho, uma placa de platina como contra eletrodo e como eletrodo de referência o eletrodo de calomelano saturado. Os eletrodos foram imersos em uma solução aquosa tamponada a pH 5 contendo 12,5 mmol L^{-1} de $Ca(NO_3)_2$ e 5 mmol L^{-1} de $NH_4H_2PO_4$ e 4% em massa de quitosana, o procedimento de eletrodeposição foi realizado a temperatura ambiente por 1h. A comparação da morfologia das amostras produzidas sem adição de quitosana (em forma de flocos) difere das amostras obtidas com adição de quitosana (em forma de microfibras com 20-30 µm comprimento e 0,1-1 µm de largura), isso sugere que a quitosana tem efeito na mineralização dos cristais de fosfatos de cálcio, pois atua como modulador da morfologia dos cristais.

Observações similares, foram realizadas por Wu *et al.* [87], ao utilizar colágeno como fase ogânica, que obtém basicamente por um método de precipitação a partir de uma reação ácido base, fibras de colágeno com cristais de HA orientados (com uso de campo magnético aplicado).

No caso da utilização do colágeno como molde, o colágeno atua como molde devido a presença de carbonilas na sua estrutura, o que favorece as interações eletrostáticas desses grupamentos com íons cálcio presentes em solução. Essa interação é responsável pela nucleação e crescimento orientado de HA [88].

Nesse contexto, vários polímeros têm sido utilizados como molde para controlar a morfologia dos cristais contidos em revestimentos, a presente Dissertação emprega o copolímero Pluronic F-127 em solução foi selecionado com essa proposta, visto que diversos trabalhos o utilizaram para se ter um controle de morfologia no processo de crescimento de cristais [89, 90, 91 e 92].

Zhao *et al.* [89], usaram um método de precipitação para controlar a morfologia de nanocristais de fosfatos de cálcio, onde o agente modelador é o Pluronic F-127. Foi possível obter nanocristais em formas de esferas e bastões, sendo que a morfologia obtida depende da concentração de F-127 empregada.

1.4 Polímeros em bloco: F-127

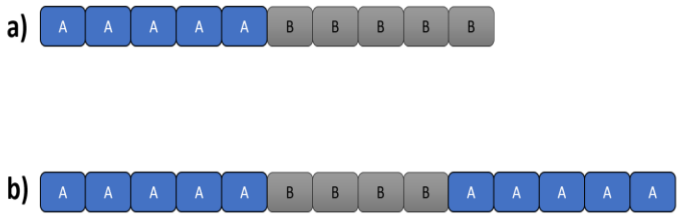
A palavra polímero tem origem grega, onde *poli* significa muitas e *meros* equivale a partes. São chamados de polímeros, as substâncias com elevada massa molecular e que em sua constituição apresentam unidades repetitivas denominadas de monômeros. São facilmente encontrados na natureza, como os carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, onde estes são importantes nas funções biológicas. Entretanto, a demanda cada vez mais intensa por polímeros que atendam aos diversos ramos da indústria (petrolífera, farmacêutica, construção, saúde, etc.) fez com que polímeros sintéticos fossem cada vez mais produzidos. As propriedades químicas destes polímeros estão diretamente relacionadas com as unidades monoméricas dos mesmos, e esta possibilidade de modificação dos monômeros é que confere a grande versatilidade dos polímeros sintéticos [36].

Os polímeros que possuem apenas uma unidade monomérica são chamados de homopolímeros, já os que apresentam duas ou mais unidades monoméricas distintas são chamados de copolímeros. Os copolímeros de acordo com a disposição dos monômeros, podem ser subdivididos em: copolímeros em bloco, copolímeros alternados, copolímeros estatísticos e enxertados [36].

Os copolímeros em blocos são formados por uma sequência de monômeros A ligados covalentemente a uma sequência de monômeros B, e podem ser classificados em grupos: Copolímeros em bloco do tipo dibloco; do tipo tribloco; multibloco e estrela conforme a disposição espacial de seus blocos

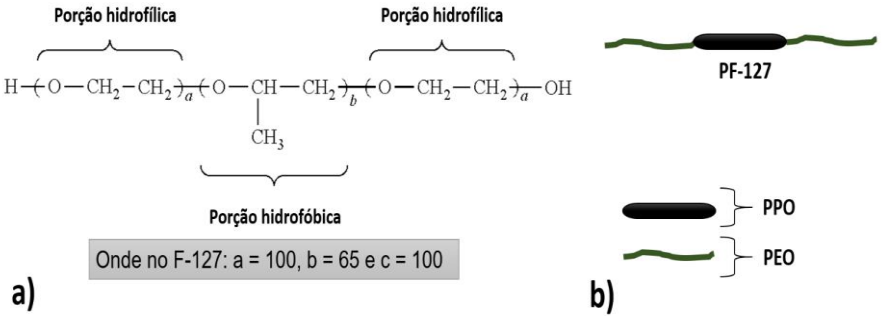
[93], a Figura 11 ilustra a representação de estruturas de alguns copolímeros em bloco.

Figura 11: Alguns dos tipos de copolímeros em bloco – a) Copolímero dibloco, é o mais simples copolímero em bloco do tipo A_mB_n; b) Copolímero tribloco, constituído do homopolímero B_n com extremidade contendo homopolímeros A_m [93].



O polímero usado neste trabalho (F-127) é chamado de polaxamero, introduzidos em 1950, comercialmente conhecidos por Pluronic®, Supronic® ou Tetronic® [94]. São copolímeros sintéticos do tipo tribloco e possuem estruturas representadas pela Figura 12. Vale ressaltar que o F-127 foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) [96].

Figura 12: Estrutura química do F-127 destacando a quantidade de cada grupo de PEO (óxido de polietileno) e PPO (óxido de polipropileno), porção hidrofílica e hidrofóbica respectivamente; b) representação da estrutura do F-127.



Devido a estrutura das unidades monoméricas, os Pluronics são surfactantes não iônicos, com comportamento anfifílico. Há um crescente interesse em estudá-los, pois apresentam propriedades únicas. Em misturas com água, o Pluronic F-127, por exemplo, pode formar gel termorreversível, devido a esta característica em especial, tem se mostrado um grande transportador de fármacos, por diversas vias, como: Via oral, tópica, intranasal, vaginal, retal e ocular. Tem sido inclusive relatado o potencial do uso do F-127 como uma pele artificial [97].

O nome destes copolímeros em bloco é um tipo de codificação iniciado por uma letra seguida de dois ou três dígitos que tem significado de acordo com a estrutura do copolímero e aspecto físico. Para nomes dados aos Pluronic® a primeira letra em maiúsculo representa a forma física: P – Pasta, F – Flocos, e L – líquido; em seguida o primeiro ou os dois primeiros dígitos devem ser multiplicado por 300 para encontrar a massa molecular do óxido de propileno (parte hidrofóbica), e o próximo dígito deve ser multiplicado por 10 para encontrar a porcentagem do óxido de etileno [94]. A Tabela 4 ilustra as variedades de Pluronic® de acordo com esta nomenclatura destacando a porcentagem da porção hidrofílica (PEO) e a massa molecular média.

Tabela 4: Denominação comercial dos Pluronic® e relação com a estrutura; adaptado de [98].

B	Unidades de óxido de polietileno no polímero (%m/m) e massa molar (g/mol^{-1})						
	10%	20%	30%	40%	50%	70%	80%
16	L31 1100				L35 1900		F38 4800
21		L42 1500	L43 1700	L44 2000			
30	L61 2000	L62 2200	L63 2500	L64 2900	P65 3500		F68 8700
35		L72 2800			P75 4100	F77 6800	
39	L81 2500			P84 3800	P85 4500	F87 7500	F88 11200
47		L92 3500		P94 4600			F98 14000
56	L101 3600		P103 4700	P104 5400	P105 6500		F108 16200
69	L121 4500	L122 5000	P123 5700			F127 13300	

*b é o número de unidades da parte hidrofóbica (PPO).
Os números abaixo dos códigos é o peso molecular médio do polímero.

Por exemplo, para o Pluronic F127, esta codificação significa que a substância é sólida, tendo aspecto de flocos; a massa molar da porção hidrofóbica (PPO) apresenta um valor de 3600 (neste caso, dois primeiros dígitos: 12 vezes 300), a porcentagem em massa da porção hidrofílica (PEO) corresponde a 70% (último dígito: 7 vezes 10), ou seja a massa molar de todo o copolímero é aproximadamente 12.000; se ainda desejarmos encontrar a quantidade de moléculas que constituem a porção hidrofóbica, o primeiro ou os dois primeiro dígitos corresponde a aproximadamente a 1/5 do número de moléculas que constituem a porção de PPO, para o F-127 dá aproximadamente 60 (12 vezes 5) [98]. Sendo que o tamanho das porções hidrofóbicas e hidrofílicas influenciam diretamente nas propriedades dos sistemas que utilizam estes copolímeros tribloco.

1.5 Propriedades físico-químicas do copolímero F-127

O F-127 quando em meio aquoso, exibe agregados similares a estruturas micelares que podem formar gel, os fatores que contribuem para isso são a concentração, tamanho das estruturas e temperatura.

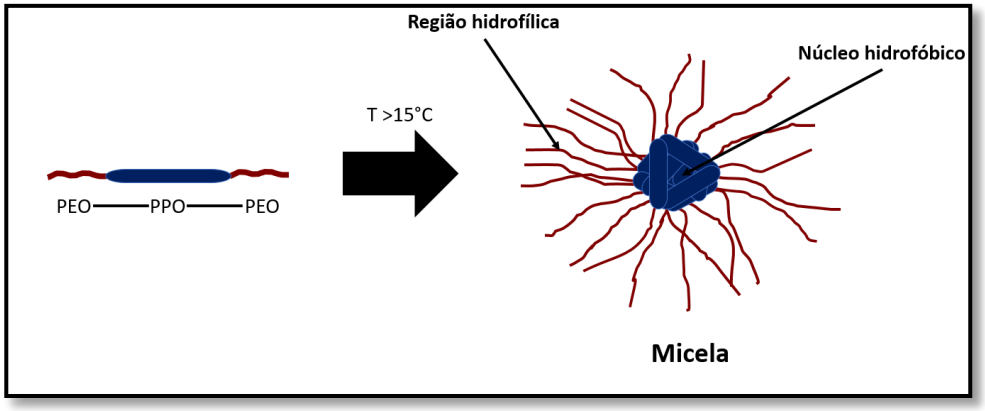
A formação de micelas através do uso de surfactantes ocorre na presença de água devido a tendência que estas substâncias possuem de se concentrarem na interface do sistema para maximizar as interações favoráveis e minimizar as interações desfavoráveis, na redução da energia de Gibbs do sistema, a partir da redução da tensão superficial. A medida que se aumenta a concentração do surfactante na solução, as interfaces do sistema se saturam e a estabilização do mesmo pode ocorrer por mecanismos como: Precipitação, cristalização e formação de micelas [99].

De maneira simplificada, a formação destas micelas é regida pela hidrofilicidade das regiões polares e hidrofobicidade das regiões apolares do surfactante, podendo se agregarem nas mais diversas formas: Esferas, cilindros, lamelas e discos. Sendo que a parte hidrofílica constitui a região externa da

micela (corona) e a parte hidrofóbica constitui a região interna da micela (núcleo) [99].

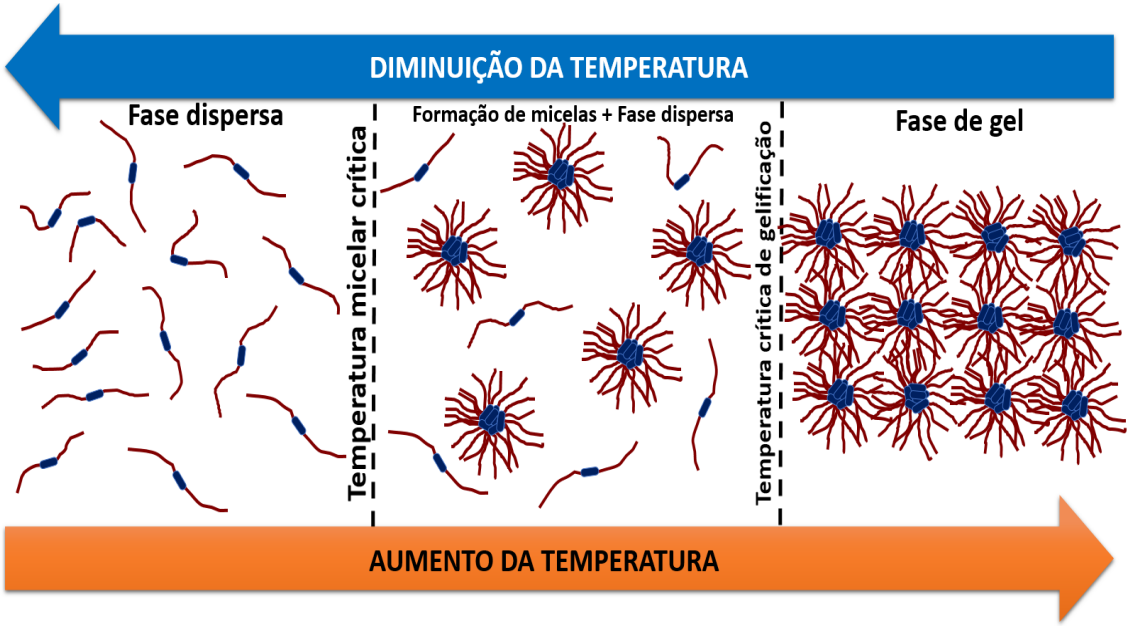
A baixas temperaturas (abaixo de 15°C a pressão ambiente) e baixas concentrações (menores que cerca de 20% em peso) os grupos PPO e PEO do F-127 possuem caráter hidrofílicos. Com o aumento da temperatura os blocos PPO se comportam de maneira hidrofóbica e micelas esféricas podem ser formadas, a Figura 13 ilustra essa situação [89].

Figura 13: Representação de formação de micelas esféricas.



A concentração na qual as moléculas do surfactante, de maneira dinâmica, se associam em um processo espontâneo para a formação das micelas é chama de concentração micelar crítica (CMC) [45]. Já a temperatura na qual as moléculas do surfactante começam a se aglomerarem (em uma mesma concentração) é chamada de temperatura micelar crítica (TMC). A medida que a concentração é fixada (acima da CMC) e varia-se a temperatura, a estrutura micelares do sistema torna-se mais organizadas formando um gel, esta temperatura pode ser chamada de temperatura de gelificação crítica (TGC) [41]; esta transição fluido-gel pode ser revertida variando-se a temperatura, a Figura 14 ilustra estas situações.

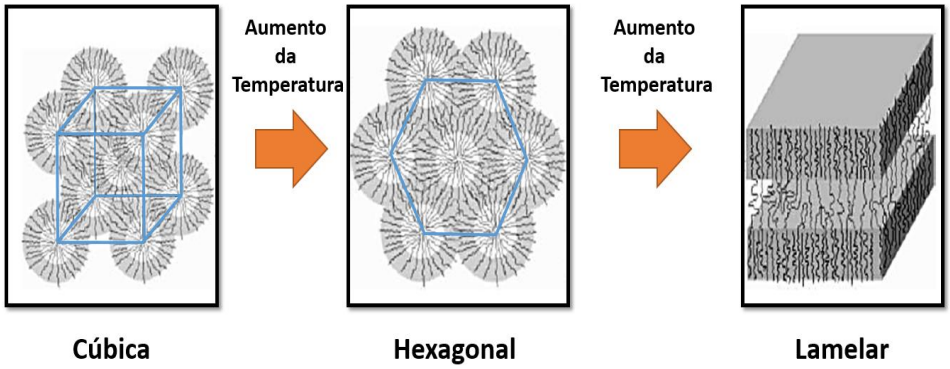
Figura 14: Representação da transição fluido-gel, em função da temperatura.



No trabalho de Silva *et al.* [100], a temperatura de gelificação para misturas de diversas proporções entre os polímeros P-123 e F-127 em água foi avaliada utilizando o método da inversão de tubo. Os autores encontraram para o F-127 um temperatura de gelificação em torno de 25°C para solução aquosa contendo 20% em massa de F-127, esses dados estão em concordância com o que foi encontrado na referência [101].

Dessa forma, em uma solução, a medida que se aumenta a concentração destes polímeros e/ou elevando a temperatura do sistema que os contém, suas soluções começam a ficar mais viscosas até transformar-se em gel. Wanka *et al.* [102], sugeriram que o processo de gelificação ocorre devido ao empacotamento das micelas em mesofases cristalinas hexagonais, cúbicas ou lamelares a depender da forma das micelas (Figura 15). Micelas esféricas tendem a formar mesofases cúbicas, micelas cilíndricas tendem a formar mesofases hexagonais e micelas na forma de disco tendem a formam mesofases lamelares, e o aumento da temperatura contribui para estas transições.

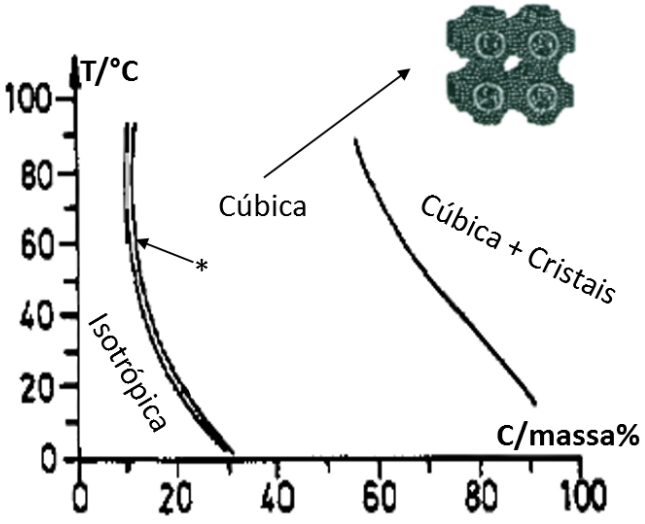
Figura 15: Representação das fases das micelas mais comuns exibidas por copolímeros em bloco em solução aquosa; adaptado de [103].



Como por exemplo, soluções contendo o copolímero F-127, já com micelas esféricas formadas a uma temperatura baixa, quando submetidas a uma dada temperatura mais elevada as micelas formadas a baixas temperaturas são transformadas em micelas com formato de “haste” ou chamadas de *Worm-like*. Com o aumento da concentração do polímero a temperatura de transição é reduzida [89].

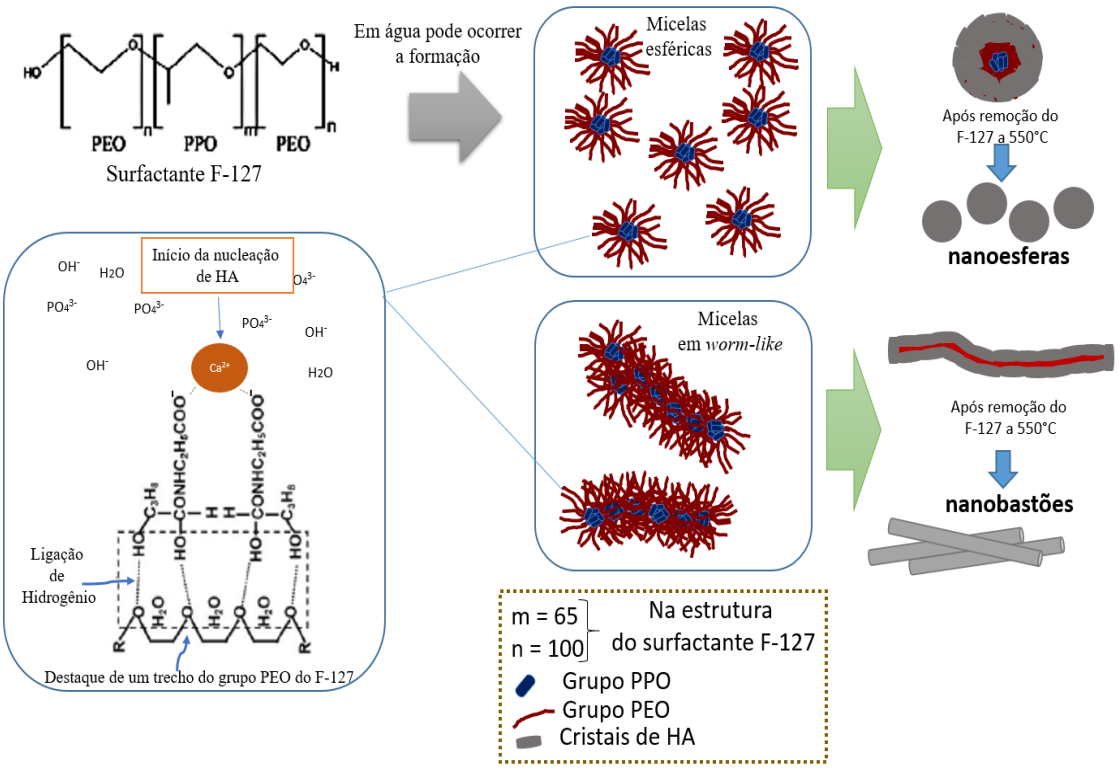
Wanka *et al.*, mostraram que as propriedades isotrópicas de um gel duro de F-127 são consistentes com uma estrutura de empacotamento do tipo cúbica [102]. A Figura 16 mostra um diagrama de fases (concentração expressa em porcentagem de massa em função da temperatura) para o F-127. O diagrama apresenta três grandes regiões que diferencia os comportamentos das fases possíveis. Por exemplo, pode-se observar uma região estreita na interface entre a fase isotrópica e a fase cúbica, que representa as condições que existirá equilíbrio entre unímeros e micelas dispersas (destacada por * na Figura 16) [102].

Figura 16: diagramas de fases das possíveis transições micelares do F-127em solução aquosa. Adaptado de Wanka *et al.* [102].



As diversas variações micelares que ocorrem com essa classe de polímero, bem como a possibilidade da transição sol-gel para sistemas contendo apenas água e Pluronic, são responsáveis pelo controle da morfologia dos cristais, como mencionados em alguns trabalhos. Por exemplo, no trabalho de Zhao *et al.* [89], foi usado Pluronic-F127 como *template* e um precursor inorgânico como fonte de íon cálcio e o hidrogenofosfato de potássio trihidratado ($K_2HPO_4.3H_2O$) como fonte de fosfato para obtenção de nanocristais de HA em forma de esferas (usando baixas concentrações de F-127) e em forma de nanobastões (com uso de elevadas concentrações de F-127). A explicação das diferentes morfologias observadas pode ser explicada de acordo com o esquema da Figura 17 a seguir; é observado que os grupos hidrofóbicos, PPO, do F-127 ficam no núcleo da micela, já os grupos hidrofílicos, PEO, ficam na parte externa da micela, na Figura 17. Pode-se observar a presenças de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas do D-pantotenato de cálcio monohidratado (precursor inorgânico usado) com os oxigênio do grupo PEO. Assim, os íons fosfatos poderão interagir com os íons cálcio dando inicio a nucleação e crescimento dos cristais; a depender das características das micelas formadas, cristais em forma de nanobastões ou nanoesferas podem ser observados.

Figura 17: Esquema com explicação das diferentes morfologias de cristais de HA observadas no trabalho de Zhao *et al.* [89], que usa o Pluronic F-127 como *template*.



O trabalho de Li *et al.* [19], usa também um método de precipitação a partir de sais de cálcio, fosfato e Pluronic F-127 (entre outros) para obtenção de nanobastões de hidroxiapatita com 20 nm de diâmetro e 100 nm de comprimento. Obtiveram uma massa de 2% de F-127 na amostra mesmo após etapa de lavagem por filtração com água e etanol. Essa morfologia obtida é atribuída a interações que ocorre entre íons Ca^{2+} e os oxigênios do grupo (C-O-C), referentes aos grupos PEO e PPO, com consequente formação de um complexo estabilizado [19].

1.6 Possível formação de biofilmes

Um grande problema enfrentado durante procedimentos cirúrgicos são as complicações oriundas de infecções causadas por bactérias. Um biomaterial implantado não está imune a este problema. Atualmente, implantes médicos são

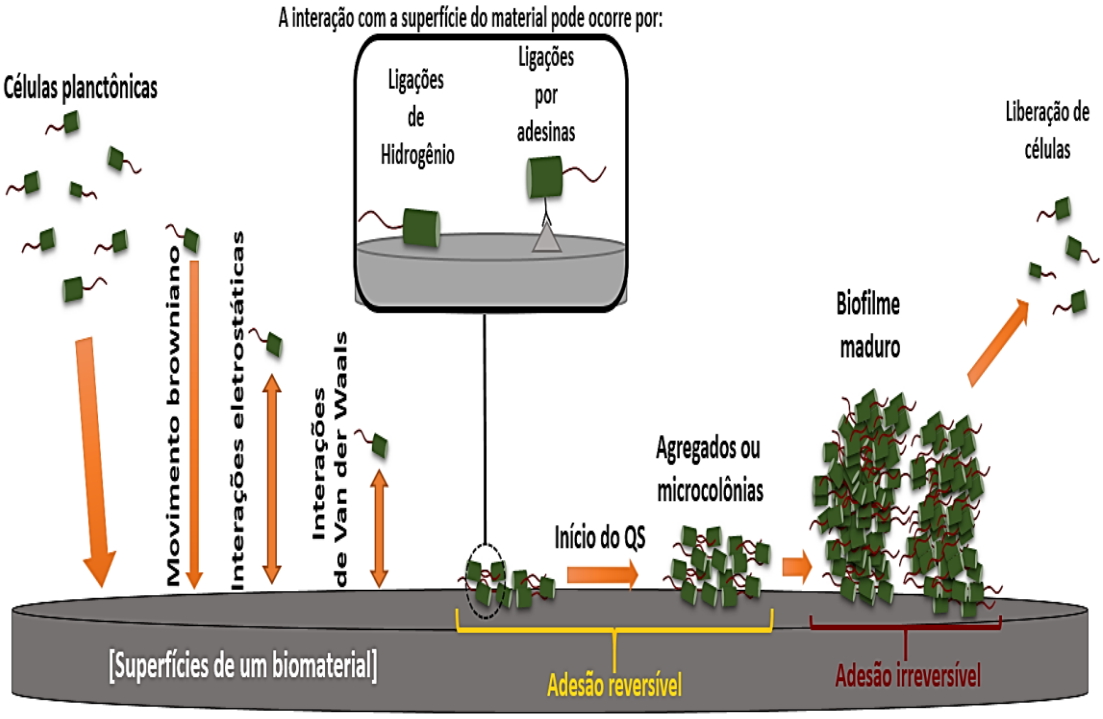
removidos com frequência devido a infecções por bactérias, tendo como principais consequências: i) risco de morte ao paciente; ii) exposição do paciente a doses elevadas de antibióticos; iii) gastos desnecessários com esses tipos de medicamentos e com novos procedimentos cirúrgicos [104].

As bactérias no organismo existem em basicamente dois estados: as planctônicas e as sésseis. As planctônicas são conhecidas pela sua liberdade. São importantes para uma rápida proliferação e propagação dos micro-organismos para novos locais. Já as sésseis caracterizam-se pela sua cronicidade, sendo possível a inter conversão entre estes estados.

Pesquisas vem mostrando que a reprodução e crescimento de bactérias não ocorre individualmente, mas ocorrem em comunidades estruturadas como organismos falsomulticelulares ou biofilmes, presentes em quase todos os ecossistemas naturais patogênicos. O processo de adesão de bactérias também é um processo complexo, mas é o primeiro estágio de formação de um biofilme, que pode ser por meio de interações físico-químicas ou por interações moleculares por meios de ligações específicas do tipo receptor-ligante.

A medida em que a densidade bacteriana é elevada, elas conseguem se comunicar induzindo transcrição de genes específico que regulam funções como motilidade, produção de matriz exopolissacarídea (EPS), virulência e a formação do biofilme. Esse processo de comunicação encontrado em várias bactérias é chamado de *quorum sensing* (QS), a Figura 18 a seguir ilustra o processo de formação de um biofilme.

Figura 18: Ilustração das interações envolvidas na adesão de bactérias e estágios de evolução para formação de um biofilme (adesão reversível, com produção de EPS e irreversível, biofilme maduro geralmente em forma de cogumelo) Adaptado de TRENTIN, 2013 [9].



Pesquisas mostram que estas células sésseis chegam a ser quinhentas [105] ou até mil vezes [106] mais resistentes que as células planctônicas.

Relatos mostram que grandes quantidades de infecções relacionadas a implantes são causadas por *Staphylococcus* (cerca de 80%), sendo que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis* são responsáveis juntas por 60 % das infecções [107]. Estas bactérias aderem e proliferam rapidamente em superfícies de Ti. A adesão inicial de bactérias em superfícies de biomateriais é o evento mais crítico na patogênese de infecções de corpo estranho[108]. Um intervalo inicial de 6h após a inserção de um implante foi apontado como sendo um período decisivo para prevenir a adesão de bactérias, sendo essencial para o sucesso à longo prazo[109]. A resposta bacteriana à diferentes superfícies não é bem entendida. Sabe-se que moléculas de adesina compostas por proteínas,

como lectinas, flagelos, pili-fimbrias, entre outras, bem como carboidratos, desempenha papel fundamental das interações superfícies-bactérias e bactérias-superfícies [110].

Vários mecanismos vêm sendo reportados para se evitar a adesão e a consequente formação do biofilme, a revisão de Campoccia *et al.* [111] traz por exemplo, maneiras de como alterar superfícies de um biomaterial de modo que venha a prevenir infecções associadas a bactérias, sendo destacado o uso de polímeros, entre eles os surfactantes do tipo copolímero em bloco. Sugere-se ainda que o uso de antibióticos em conjunto com uma superfície tratada (com um revestimento), com proposito de evitar a formação de bactérias no estado séssil (chegando ao biofilme), pode ser mais eficaz.

1.7 Aplicações com o uso dos Pluronic® F-127 de interesse para este trabalho.

O uso do Pluronic® F-127 (F-127) já possui liberação pelo FDA (Food and Drug Administration), a referida agência o classifica inerte para várias preparações, como: soluções orais, intravenosas, aplicações tópicas, suspensões, inalatórias, oftálmicas, etc. Isso se deve a sua baixa citotoxicidade [112].

Além da possibilidade de se obter diferentes morfologias de micelas para obtenção de diferentes morfologias de cristais de apatita sobre substrato de titânio (proposta desta Dissertação), o uso dos copolímeros possui aplicações biológicas, que possam complementar e melhorar a eficiência de um possível biomaterial voltado para regeneração óssea.

Como já mencionado anteriormente, a reação inflamatória após o implante de qualquer biomaterial é inevitável. O uso destes polímeros como propriedades anti-inflamatórias vem sendo relatado por Chi *et al.* [113]. Os autores examinaram a velocidade de espalhamento e adesão de fibroblastos da gengiva humana (FGH), onde avaliara in vitro a influencia de Pluronics® sobre o crescimento e fixação de FGH sobre superfícies da dentina. Os ensaios *in vitro* com esse tipo de célula demonstraram que mesmo com o uso de baixas concentrações de F-127, foi possível verificar um benefício no início da cura de

ferimentos causados por pós-operatório, facilitando a adesão precoce e reforçando a taxa de crescimento de (FGH) [97].

Em outro trabalho, um compósito com uma matriz óssea desmineralizada (MOD) a partir de uma solução salina contendo 20% (m/v) de F-127 e com a adição de partículas da MOD foi preparado, resultando numa composição de 40% em massa de MOD. Radiação gama foi utilizada com finalidade de esterilização. Foram feitos testes *in vivo* em fraturas do fêmur em ratos, enxertando o material produzido; os ensaios *in vivo*, foram avaliados em fraturas sem implante algum, com apenas F-127 e com o compósito MOD-F127, comparando a recuperação do defeito quanto ao reparo e volume do osso, bem como a organização do tecido, foram avaliados em 15, 30 e 90 dias [114]. Os diferentes tipos de tratamento levaram a volumes ósseos diferentes. Com o uso do P-F127 já se notou uma maior formação óssea quando comparado ao tratamento de referência (tratamento sem adição de qualquer substância) e resultados similares utilizando-se a matriz óssea desmineralizada (MOD) com o F-127. O compósito MOD-PF127 mostrou uma excelente biocompatibilidade, com ausência de células inflamatórias na região periférica ao implante [114].

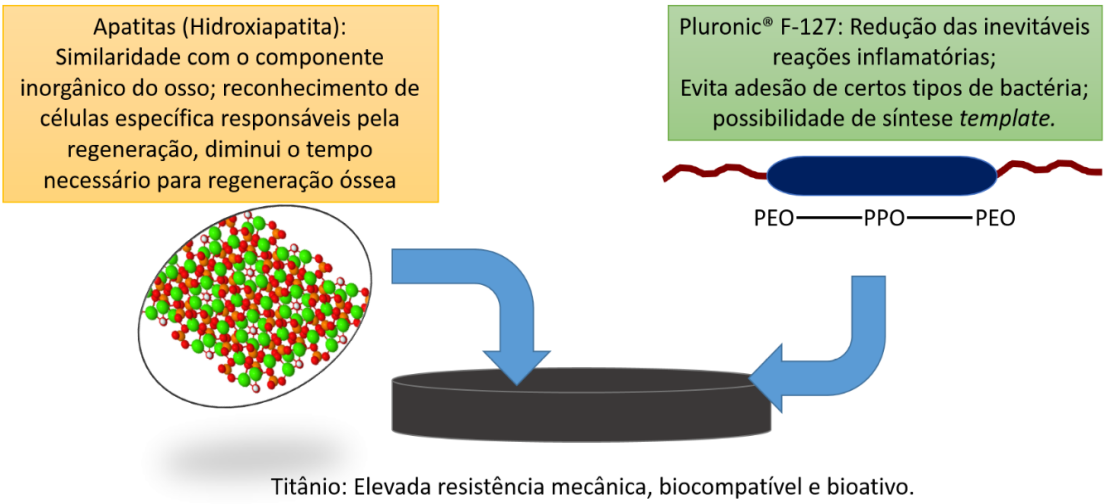
Resultados Similares, quanto a ausência de reações inflamatórias, foram observados em implantes intramuscular em ovelhas com o uso de F-127 utilizado como transportador para a entrega de fosfato de cálcio bifásico [115].

1.8 Justificativa do trabalho

O desenvolvimento de biomaterias bi ou multifuncionais tem sido objeto de vários estudos, pois unem propriedades de substâncias especificas num único material. Nesse contexto, o presente trabalho tem como uma das finalidades avaliar a viabilidade de revestimentos compósitos constituídos por fosfatos de cálcio (CaP) e Pluronic® F-127 obtidos pela técnica de eletrodeposição. Dessa forma, seria possível obter revestimentos cerâmicos/poliméricos em biomateriais metálicos, conjugando as propriedades que cada um dos materiais constituinte do sistema possui, a fim de se aprimorar as propriedades dos biomateriais à base de titânio. A Figura 19 ilustra as

características de cada material destacando as suas propriedades para projetar e/ou aperfeiçoar um possível biomaterial.

Figura 19: Principais características e função de cada componente do sistema.



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi verificar a influência sobre a morfologia e estrutura cristalina que a adição do copolímero Pluronic F-127 pode ocasionar em revestimentos de fosfato de cálcio sobre substrato de titânio pelo processo de eletrodeposição; vislumbrando a possibilidade de obtenção de um biomaterial com propriedades aprimoradas, como melhor osseointegração e menor suscetibilidade a formação de filmes bacterianos.

2.2 Objetivos específicos

- Revestir os substratos de Ti com fosfatos de cálcio pela técnica de eletrodeposição em solução eletrolítica contendo Pluronic F127 (F-127);
- Investigar os efeitos da temperatura, concentração do polímero e dos sais no processo de eletrodeposição;

- Caracterizar os sistemas obtidos por espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourrier (FTIR), difratometria de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), e microscopia eletrônica dede transmissão (MET);
- Avaliar a contribuição das variáveis impostas no processo de eletrodeposição na estabilidade e formação das fases cristalinas identificadas;
- Realizar ensaios microbiológicos para se investigar a suscetibilidade a adesão de *Staphylococcus aureus* e formação de filmes bacterianos.

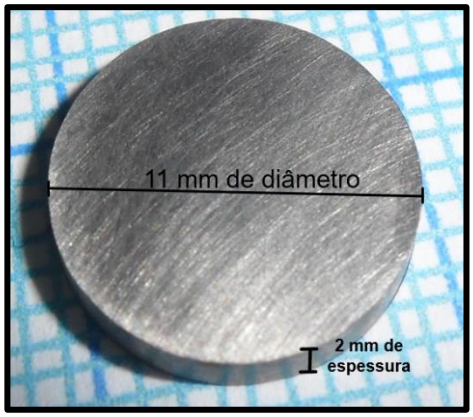
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos substratos de titânio.

Para obtenção dos substratos, foi usada uma barra de titânio de 11 mm de diâmetro, grau 2, adquirida da empresa TiBrasil Titanio Ltda.

Foi usada uma isométrica da marca BUEHLER, (Figura 20) com lâmina diamantada para o corte de discos de titânio com 2 mm de espessura. As placas posteriormente foram limpas, e lixadas com papel abrasivo de carbeto de silício (SiC) com granulosidade 600.

Figura 20 - Máquina usada no corte de discos de Ti, esquerda; placa de Ti cortada e lixada com suas dimensões, direita.



Antes de cada procedimento de eletrodeposição os discos foram limpos pela imersão dos mesmos em banhos ultrasônicos, na sequência acetona, álcool e água por 5 min cada.

3.2 Reagentes Utilizados

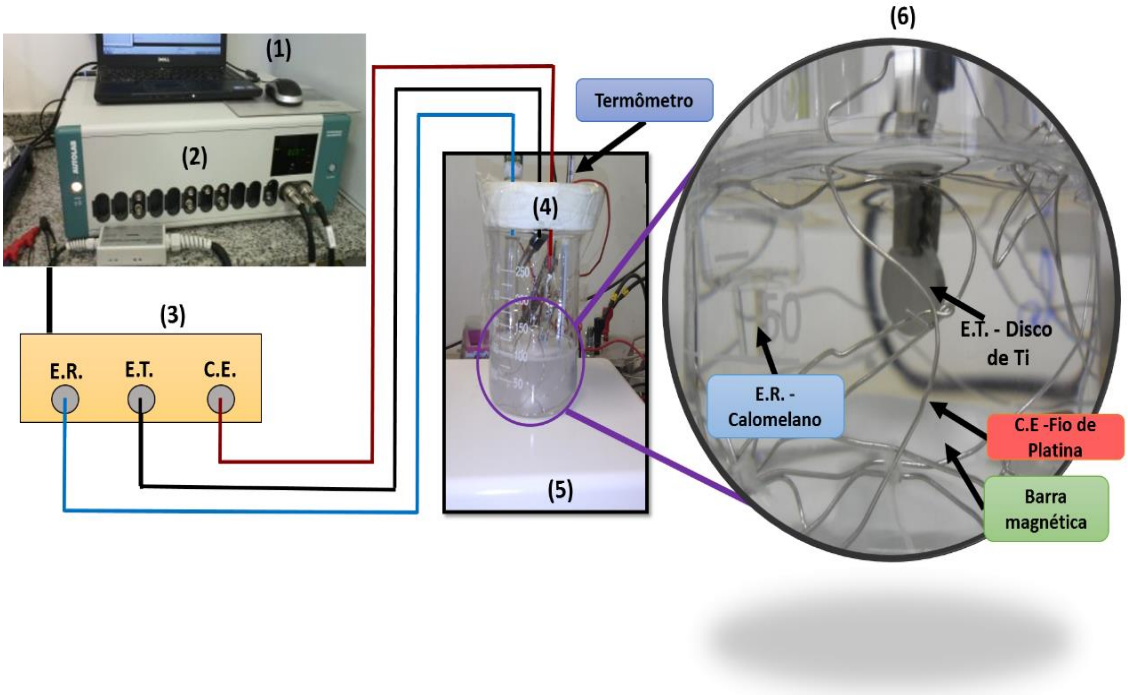
Neste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: nitrato de cálcio (Sigma-Aldrich®) di-hidrogenofosfato de amônio (Sigma-Aldrich®), Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich®).

3.3 Sistema de eletrodeposição

A potenciometria foi utilizada para levantamento das curvas de polarização catódica obtidas pela varredura de potencial em circuito aberto no intervalo de 0 a –2,8 V ao passo de 5 mV s^{-1}. Estas foram obtidas usando um potenciostato da marca Autolab® modelo PGSTAT100, localizado no Laboratório de Corrosão no Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Sergipe. O potenciostato foi conectado a três eletrodos: Eletrodo de trabalho (E.T., discos de titânio), de referência (E.R., $Hg/Hg_2Cl_2/KCl$) e o contraeletrodo (C.E., fio de platina). Estes foram imersos dentro de uma célula eletrolítica contendo a solução com os íons cálcio e fosfato nas proporções adequadas (Tabela 5), e os polímeros com diferentes concentrações (Tabela 5). Os dados foram obtidos através do uso do software “GPES” também da Autolab®.

A Figura 21 apresenta uma imagem dos equipamentos potenciostato/galvanostato, microcomputador utilizados para obtenção das medidas.

Figura 21: Esquema do sistema de eletrodeposição utilizado: (1) Computador com o software que controla o potenciostato; (2) Potenciostato; (3) Distribuidor de sinal com os fios condutores dos eletrodos; (4) Béquer contendo a solução usada no processo de obtenção do revestimento; (5) Placa de aquecimento; (6) Na ampliação observa-se o detalhe dos eletrodos usados.



3.4 Preparação das soluções

Para produção dos revestimentos, foram preparadas previamente soluções a serem usadas como meio eletrolítico (100g de cada solução por eletrodeposição). Os íons cálcio provenientes do $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e fosfato provenientes do $NH_4H_2PO_4$ foram primeiramente dissolvidos na proporção adequada (Ca/P = 1,67) em água; posteriormente foi adicionado a quantidade do copolímero a ser utilizado e a quantidade de água foi ajustada a fim de se obter diferente porcentagens em massa do mesmo na solução (Tabela 5). As soluções poliméricas foram mantidas por 24 h a 4°C, para que o copolímero usado solubilizasse e, em seguida, foram adicionadas aos eletrólitos. Após a obtenção das misturas, aguardou-se o equilíbrio térmico para a realização do procedimento de eletrodeposição.

Tabela 5: Condições do meio eletrolítico para produção das amostras.

Amostra	Concentração de Pluronic F-127 (% em massa)	Concentrações respectivas de $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e $NH_4H_2PO_4$ (mol L^{-1})	Temperatura de eletrodeposição (ºC)
P0% 01 28ºC	0	0,0209 e 0,0125(*)	28
P6% 01 28ºC	6	0,0209 e 0,0125	28
P9% 01 28°C	9	0,0209 e 0,0125	28
P0% 02 28°C	0	0,0419 e 0,0250	28
P6% 02 28°C	6	0,0419 e 0,0250 (#)	28
P9% 02 28°C	9	0,0419 e 0,0250	28
P0% 01 60°C	0	0,0209 e 0,0125	60
P6% 01 60°C	6	0,0209 e 0,0125	60
P9% 01 60°C	9	0,0209 e 0,0125	60
P0% 02 60°C	0	0,0419 e 0,0250	60
P6% 02 60°C	6	0,0419 e 0,0250	60
P9% 02 60°C	9	0,0419 e 0,0250	60
P15% 02 60°C	15	0,0419 e 0,0250	60
P25% 02 60°C	25	0,0419 e 0,0250	60
P0% 02 90°C	0	0,0419 e 0,0250	90
P6% 02 90°C	6	0,0419 e 0,0250	90
P9% 02 90°C	9	0,0419 e 0,0250	90
P15% 02 90°C	15	0,0419 e 0,0250	90
P25% 02 90°C	25	0,0419 e 0,0250	90

* eletrólito 01 e # eletrólito 02 na composição da nomenclatura das amostras, os quais indicam a concentração de eletrólitos.

A nomenclatura da Tabela 5 consiste no símbolo P acompanhado da porcentagem indicando a concentração de polímero, seguido da concentração de eletrólito, denominada como 01 ou 02 e, por fim, a temperatura. Após o processo de eletrodeposição, as amostras foram lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente.

3.5 Caracterização dos revestimentos

3.5.1 Análise por FTIR

Os grupamentos químicos presentes nos revestimentos foram identificados usando a técnica de Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier com o modo de reflectância total atenuada (FTIR/ATR). As medidas foram realizadas em um equipamento Nicolet, modelo i-10 FTIR, localizado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe. Todos os espectros de absorção no infravermelho foram gerados na região do infravermelho médio, na faixa entre 650 e 4000 cm^{-1} O equipamento foi operado em ambiente com temperatura ao redor de 20ºC e umidade relativa do ar inferior a 50%, com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans.

3.5.2 Análise gravimétrica

Os discos de Ti foram limpos e secos e pesados antes do processo de eletrodeposição em uma balança SHIMADZU® modelo AUW220D, após o revestimento a amostra foi seca em estufa a 100ºC por 2 h para remoção de água adsorvida, o disco revestido foi pesado novamente para se obter a massa do revestimento. Para estimar a massa do Pluronic F-127 o disco com revestimento foi calcinado a 550°C [89] por 3 h para remoção do polímero, logo em seguida o disco foi pesado novamente.

3.5.3 Análise por DRX

As análises por difratometria de raios X (DRX) foram realizadas com o equipamento Panalytical® EMPYREAN configurado com geometria Bragg Brentano localizado no laboratório de Preparação de Materiais e Magnetismo, na Universidade Federal de Sergipe Campus Prof. Alberto Carvalho. O equipamento possui como fonte de produção de raios X um tubo de cobre, foi operado com 1,6 kW de potência, com passo de 0,01º e intervalo angular 2θ de 3 a 45º.

3.5.4 Análises por microscopia eletrônica de varredura.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada para avaliar a morfologia da superfície dos revestimentos produzidos; as amostras foram fixadas em uma superfície condutora. O equipamento utilizado para realizações das análises foi o microscópio localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, JEOL JSM-5700, do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais (DCEM) da UFS. As análises foram executadas com 10 kV com detector de elétrons secundários.

3.5.4 Análise por microscopia eletrônica de transmissão

Substrato de Ti revestido foi imerso em um bequer contendo etanol. A seguir, realizou-se a sonicação da amostra por 5 minutos em banho de ultrassom Unique UltraCleaner 1400. A suspensão de partículas foi gotejada em um grid de cobre/Formvar (3 gotas com um intervalo de 1 minuto entre cada deposição). A Análise de microscopia eletrônica de transmissão foi realizada utilizando um equipamento JEM 1400 Plus (Jeol), operando a 120 kV.

3.6 Ensaios microbiológicos

Para realização dos ensaios microbiológicos foi utilizada a metodologia adaptada da norma global consensual M2-A8 do NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003) para halo de inibição. O meio Ágar Mueller-Hinton foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, esterilizado e distribuído em placas de Petri. Para a obtenção das bactérias, 100 µL da solução estoque de *Staphylococcus aureus* (armazenada em glicerol 10% e mantida sob congelamento) foram incubadas em 10 mL de caldo BHI (infusão de coração e cérebro), ficando sob agitação constante por 18 horas a 37ºC até atingir exponencial do crescimento. A cultura foi diluída para $3x10^8$ UFC/mL e 100 µL desta suspensão foram inoculadas nas placas de Petri preparadas inicialmente.

Sobre a superfície da placa semeada foram depositados cuidadosamente uma das faces dos discos de Ti com revestimentos de fosfatos de cálcio obtidos com e sem a utilização de Pluronic F-12, e discos sem revestimento, tais discos possuem 11 mm de diâmetro. Foram feitas as incubações das placas a 37ºC, por 24 horas, após este período, foram registradas imagens fotográficas para observação de possíveis halos de inibição. Os resultados foram feitos em duplicata [116].

Em seguida foi realizado um protocolo para fixação das bactérias aderidas e visualização no microscópio eletrônico de varredura: As amostras foram lavadas com 3 proporções de tampão PBS e imersas em glutaraldeído a 2,5% em tampão PBS a 4ºC por 24h. A seguir, foram desidratadas com proporções crescentes de etanol:água (25%, 50%, 75%, 95% e 100%) e 10 min cada. As superfícies foram imersas em HMDS por 10 min e logo em seguida o HDMS foi retirado e as amostras secas em capela por 1 h. Foram guardadas em dissecador e recobertas com Au-Pd para visualização por microscopia eletrônica de varredura [117]. O equipamento utilizado para realizações das análises foi o microscópio localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, JEOL JSM-5700, do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais (DCEM) da UFS. As análises foram executadas com 10 kV. Dados referentes a quantificação de bactérias foram obtidos por meio da contagem direta nas imagens com ampliações de 5000x, obtidas de diferentes regiões do substrato com auxílio do

software ImageJ® [118]. Este procedimento foi realizado em duplicata e os valores das quantidades de bactérias aderidas na superfície foram divididos pela área da imagem em mm².

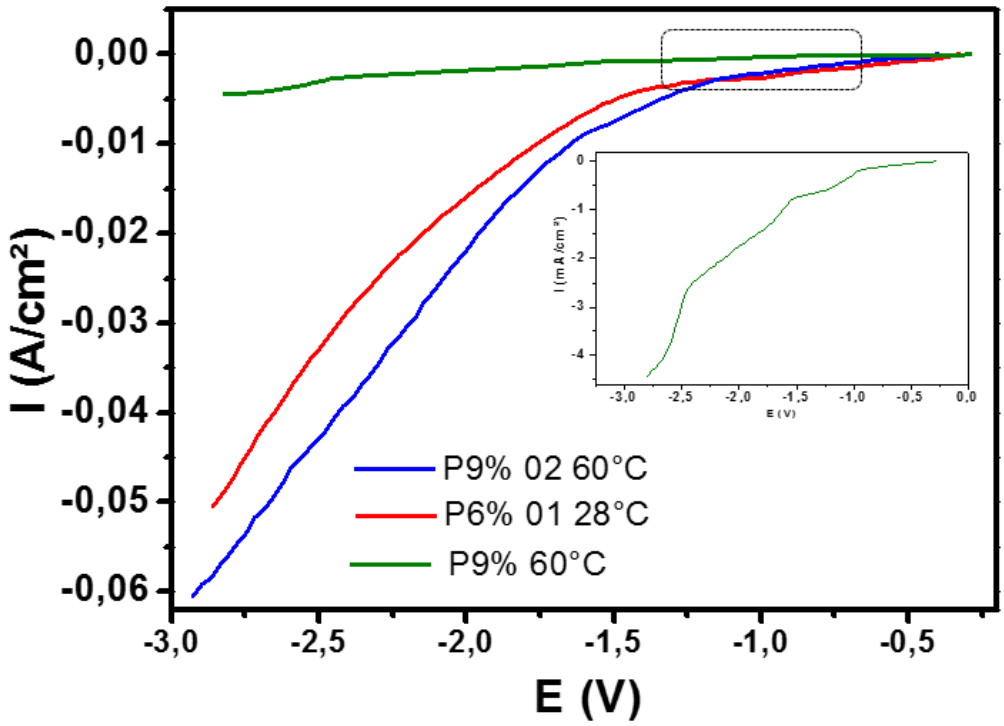
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Obtenção das amostras

Com o intuito de selecionar o melhor potencial para se realizar o procedimento de eletrodeposição e determinar as melhores condições para se obter os sistemas propostos, foram realizadas medidas das curvas de polarização catódica obtidas através da varredura de potencial em circuito aberto no intervalo de 0 a –2,8 V; foi usado como eletrodo de trabalho um disco de titânio, eletrodo de referência $Hg/Hg_2Cl_2/KCl$ e fio de platina como contraeletrodo, submetidos a uma temperatura de 28 e 60°C.

As curvas de polarização catódica obtidas com estas condições são mostradas na Figura 22.

Figura 22: Curva de polarização catódica em condições de potencial de circuito aberto.



O potencial escolhido para se realizar o procedimento de eletrodeposição, foi aquele onde se começou a observar uma menor variação de corrente, pois assim, é possível se ter um procedimento potenciostático com pouca variação de corrente, ou seja, - 1 V (Figura 22), além do mais, esta região de baixas correntes favorece a pouca evolução de gás hidrogênio proveniente da decomposição da água, que influencia diretamente em uma melhora da adesão do revestimento ao substrato.

De acordo com Zhang *et al*. [119], a formação da HA pelo processo de eletrodeposição ocorre devido a uma combinação de várias reações, mas pode ser descrita resumidamente em algumas etapas principais:

Em água, devido a presença do $NH_4H_2PO_4$, acontece o equilíbrio a seguir:

$$H_2PO_4^{-}{}_{(aq)} \leftrightarrows HPO_4^{2-}{}_{(aq)} + H^+{}_{(aq)} \text{ (Eq. 3)}$$

Este equilíbrio torna o pH da solução eletrolítica levemente ácido, antes da adição da corrente elétrica. A adição do campo elétrico promove a decomposição da água em gás hidrogênio e íons hidroxila:

$$2H_2O_{(l)} + 2e^- \leftrightarrows H_{2(g)} + 2OH^-{}_{(aq)} \text{ (Eq. 4)}$$

A formação das hidroxilas na equação anterior, favorece o consumo dos íons H^+ (evidenciado pelo aumento do pH após iniciado o processo de eletrodeposição) produzidos na primeira etapa onde há um deslocamento de equilíbrio para produzir mais íons HPO_4^{2-}; finalmente os íons Ca^{2+} provenientes do $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ usado migram para o Ti e se combinam com o HPO_4^{2-}, ocorrendo a precipitação e depósito na superfície do substrato para produzir o fosfato de cálcio:

$$Ca^{2+}{}_{(aq)} + HPO_4^{2-}{}_{(aq)} + 2\ H_2O_{(l)} \rightarrow CaHPO_4.2H_2O_{(s)} \text{ (Eq. 5)}$$

O fosfato de cálcio obtido predominante, em geral, é a bruxita (DCPD) com razão molar Ca/P = 1,0, a conversão da bruxita a HA ocorre após o contato com meio básico:

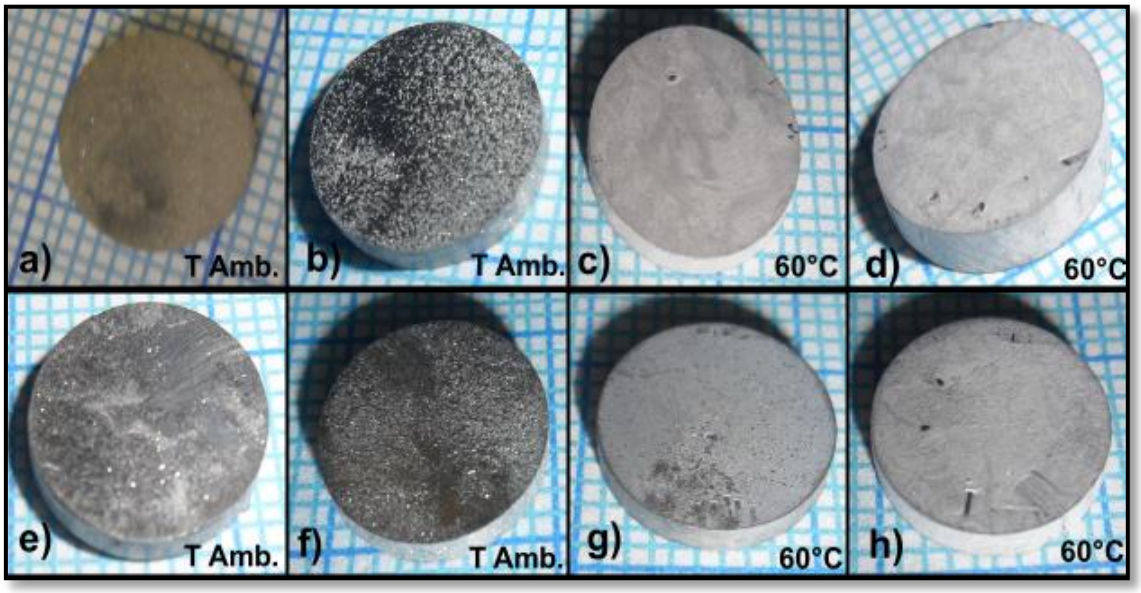
$$10\ CaHPO_4 + 2\ OH^-{}_{(aq)} \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 4PO_4^{3-} + 10H^+ \text{ (Eq. 6)}$$

No trabalho realizado por Thanh *et al.* [120], HA sobre ligas de Ti por eletrodeposição foi obtida empregando como contra eletrodo e eletrodo de referência, Pt e calomelano saturado $Hg/Hg_2Cl_2/KCl$ respectivamente. Foram empregados os eletrólitos $Ca(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$, $NH_4H_2PO_4$ e $NaNO_3$ em diferentes concentrações e razão molar Ca/P de 1,67. Adições de diferentes concentrações de H_2O_2, bem como variações na temperatura de deposição (60, 70, 75, 80 e 85°C) também foram investigadas. Os revestimentos de HA obtidos apresentaram diferentes morfologias. Os autores observaram que a massa de HA depositada variou com as concentrações dos eletrólitos e com as temperaturas estudadas; para uma amostra preparada com as seguintes concentrações de eletrólitos: $3x10^{-2}$ mol L^{-1} de $Ca(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$, $1,8x10^{-2}$ mol L^{-1} de $NH_4H_2PO_4$, 0,15 mol L^{-1} de $NaNO_3$ e 6% em massa de H_2O_2, o peróxido de hidrogênio teve como finalidade melhorar a adesão do revestimento ao substrato proporcionando uma rota alternativa para produção de íons OH^- sem produção de gás, que prejudica a adesão do revestimento, a produção de hidroxilas a partir do peróxido de hidrogênio ocorre conforme equação: $H_2O_2 + 2e^- \rightarrow 2OH^-_{(aq)}$; foi possível concluir que 70°C foi a temperatura onde se obteve o máximo de massa no revestimento. As morfologias observadas foram de nanocristais em forma de haste, placas e lâmina.

Neste trabalho, os parâmetros investigados foram a porcentagem em massa de Pluronic F-127, concentração dos eletrólitos e temperatura, conforme já mostrado na Tabela 5.

A Figura 23 a seguir mostra o aspecto dos revestimentos das amostras inicialmente obtidas.

Figura 23: Aspecto visual dos revestimentos - a) P6% 01 28°C, b) P9% 01 28°C, c) P6% 01 60°C, d) P9% 01 60°C, e) P6% 02 28°C, f) P9% 02 28°C, g) P6% 02 60°C, h) P9% 02 60°C.



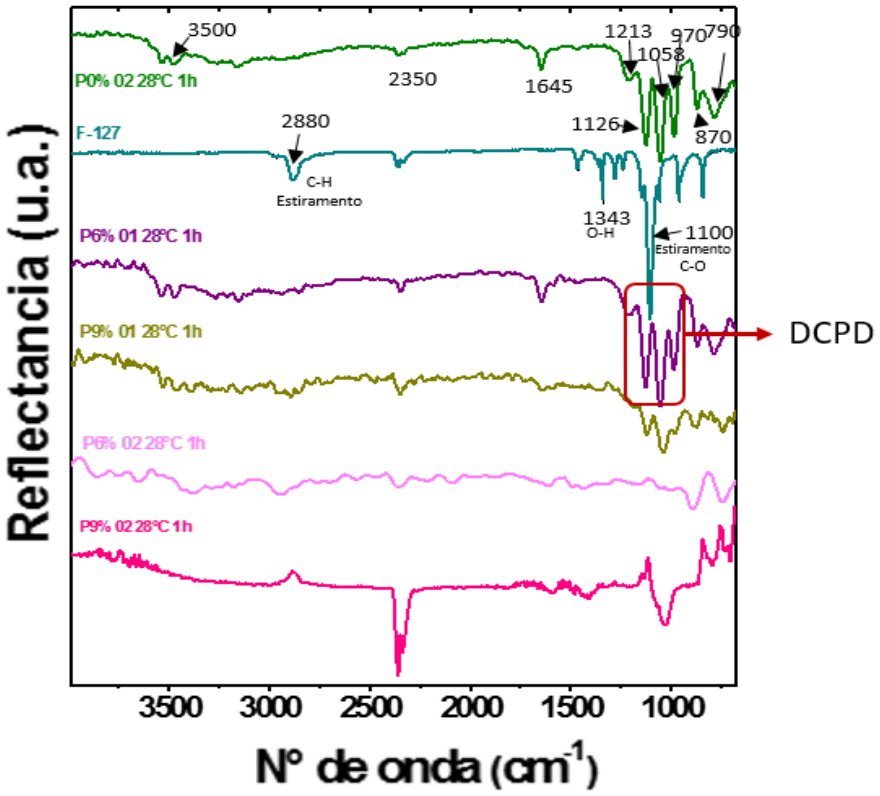
Nota-se na Figura 23 que as amostras que foram produzidas em temperaturas de 60°C apresentam um revestimento mais homogêneo, o qual pode estar relacionado com uma distribuição mais uniforme da corrente devido a uma melhor mobilidade dos íons presente, e também, por ser uma temperatura onde a quantidade em massa de depósito seja máxima, já avaliada pelo trabalho de Thanh *et al.* [120].

4.2 Caracterização dos sistemas.

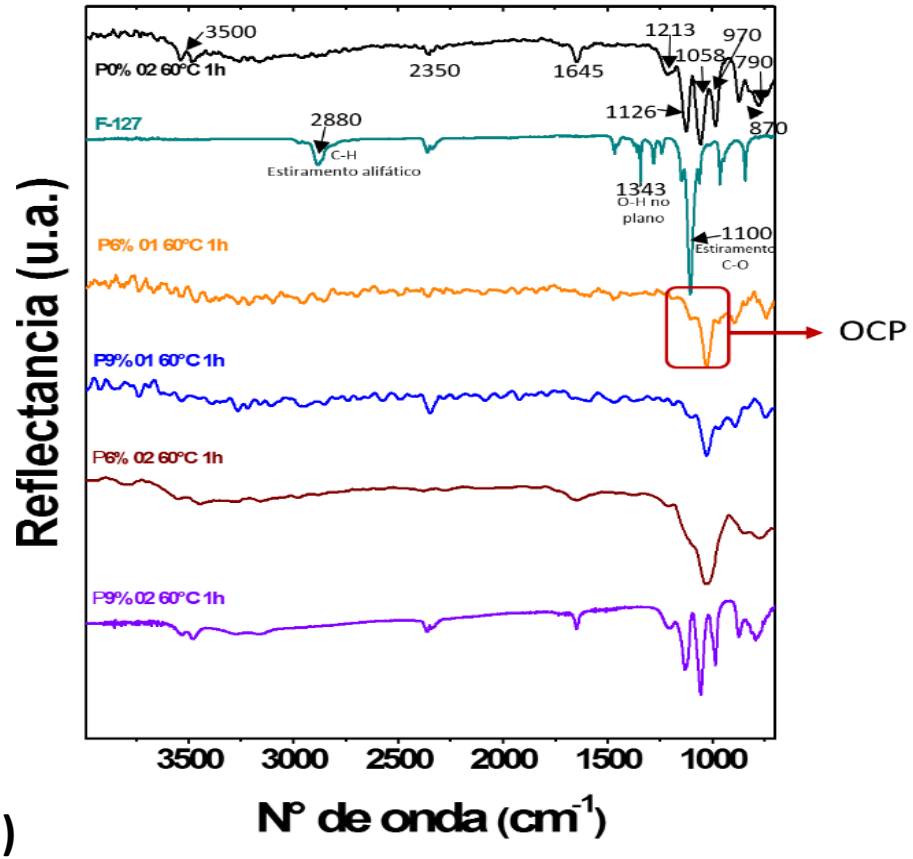
4.2.1 Análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourrier com o modo de reflectância total atenuada (FTIR/ATR)

Os resultados obtidos por meio das medidas de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourrier com o modo de reflectância total atenuada (FTIR/ATR) das amostras inicialmente produzidas a 28°C e a 60°C, podem ser visualizados na Figura 24.

Figura 24: FTIR/ATR das amostras produzidas inicialmente em diferentes condições: a) temperatura ambiente, b) obtidas a 60°C.



a)



b)

Essas amostras foram produzidas variando-se temperatura, concentração dos sais na solução e do copolímero usado; as bandas observadas na Figura 24 nas regiões em torno de 3500 cm^{-1} são atribuídas a estiramentos assimétricos da hidroxila de moléculas de água adsorvida; a banda na região de 1645 cm^{-1} é devido a dobramentos das ligações O-H presente em moléculas de água. Dobramento do grupo O-H no plano foi medido na região de 1213 cm^{-1}. Estiramentos da ligação P-O presente em grupos HPO_4^{2-} foram registrados em 1126, 1058, 970 e 870 cm^{-1}.

Vibrações de moléculas de água também é observada na região de 790 cm^{-1}. As posições das bandas observadas estão em acordo com as referências [121] e [122].

No espectro do F-127, bandas em 2880 cm^{-1} são referentes a estiramento alifático do grupo C-H presente na estrutura de polímero; em 1343 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} são observadas bandas referentes ao estiramento de ligações O-H (no plano de torção) e estiramento de ligações C-O, respectivamente [123].

As bandas que aparecem em 2350 cm^{-1} são oriundas de deformações axiais simétricas de CO_2 presente no ar.

Nota-se na Figura 24, duas regiões destacadas que indicam os modos vibracionais do PO_4^{3-} característicos de determinados fosfatos de cálcio de acordo com Drouet, 2013 [124]; a apreciação dos gráficos sugere que as amostras P0% 02 28°C 1h, P6% 01 28°C 1h, P9% 01 28°C 1h P0% 02 60°C 1h e P9% 02 60°C 1h apresentam a fase DCPD, já as amostras P6% 01 60°C 1h, P9% 01 60°C 1h e P6% 02 60°C 1h, apresentam em sua composição predominantemente a fase de OCP.

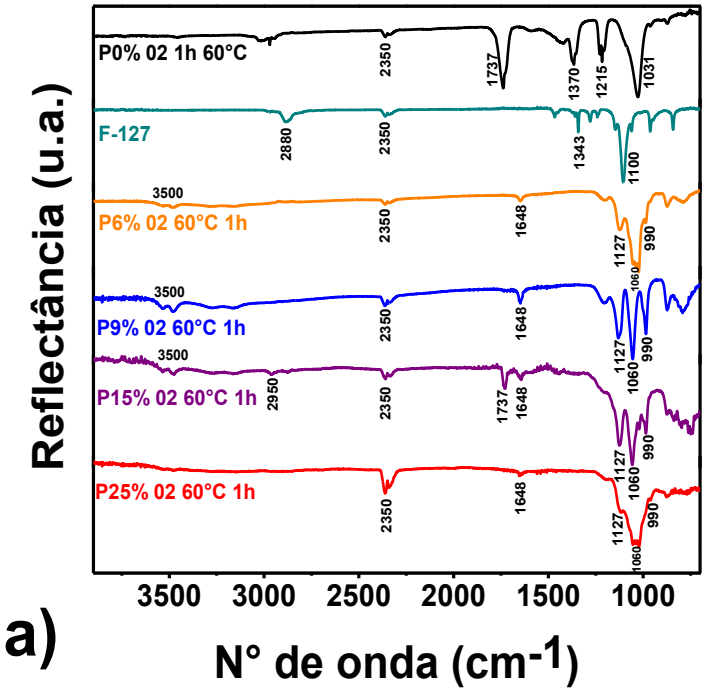
Devido a não homogeneidade dos revestimentos das amostras produzidas a 28°C (podendo ser evidenciada através das fotografias dos revestimentos na Figura 23) observa-se nos espectros de FTIR da figura anterior (Figura 24 a)) que as bandas, para as algumas amostras produzidas com adição de F-127 e principalmente para as específicas P6% 02 28°C 1h e P9% 02 28°C 1h não aparecem bem definidas, com sinal se confundindo com ruídos. Isso pode ser

atribuído a pouca quantidade de revestimento presente no substrato prevista por Thanh *et al*, 2013 [120], já para as amostras produzidas a 60°C (Figura 24 b)) os sinais das bandas se mostram bem definidos, provavelmente devido a maior quantidade e homogeneidade de revestimento no substrato, apenas para as amostras produzidas com o eletrólito 01 (metade da concentração do eletrólito 02) as bandas apresentam maior ruído.

Por conta da má qualidade dos revestimentos obtidos a temperatura ambiente, não se foi investido na produção destes sistemas, visto que não são interessantes em aplicações voltadas para biomateriais. Foi fixado apenas um dos eletrólitos para dar continuidade nas produções das amostras, o eletrólito 02, pois vários autores utilizam por ser uma condição otimizada de concentração sais para obter uma maior massa de revestimento [120,125]. Vale ressaltar que as informações provenientes das caracterizações apresentadas mais adiante das amostras produzidas a temperatura ambiente e com o eletrólito 01 foram importantes para se entender a influência desses parâmetros nas diferentes fases e morfologias dos cristais contidos nos revestimentos.

A Figura 25 na página seguinte mostra os FTIR/ATR das demais amostras produzidas.

Figura 25: FTIR das amostras produzidas a: a) 60°c por 1 h; b) 90°C por 1h e c) 90°C por 2h (Continuação).



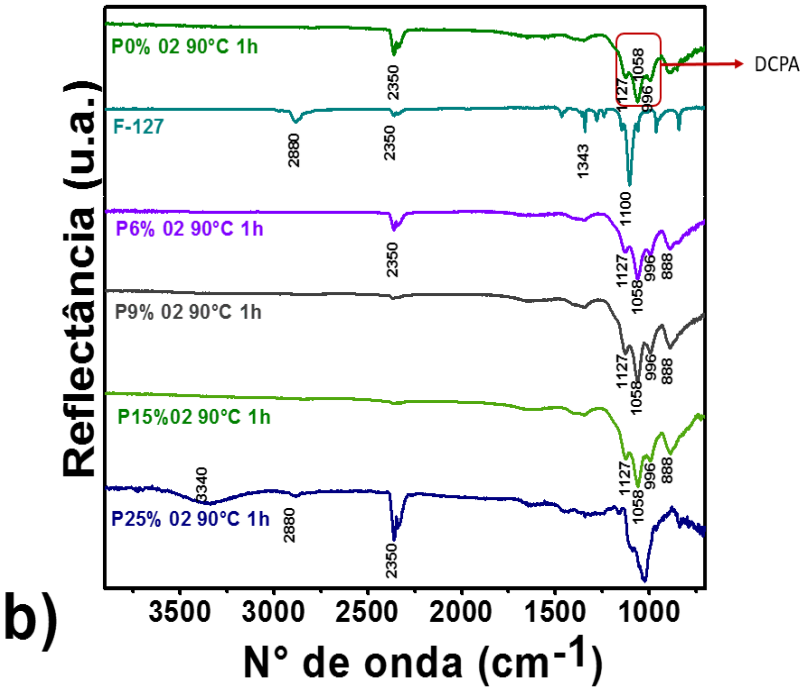
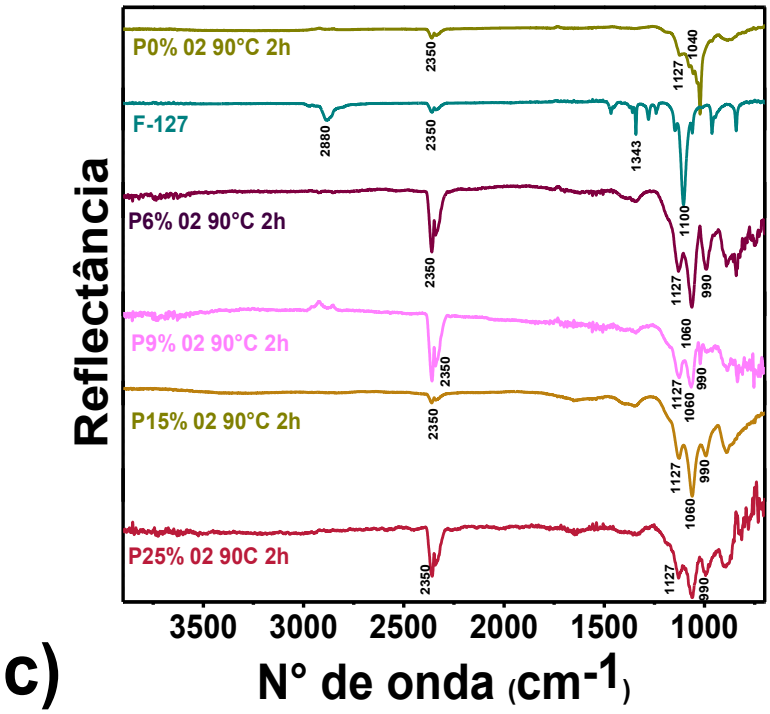


Figura 25: FTIR das amostras produzidas a: a) 60°c por 1 h; b) 90°C por 1h e c) 90°C por 2h (Conclusão).



As bandas presentes na Figura 25, coincidem com as bandas observadas e mencionadas anteriormente para as amostras produzidas a 28ºC e 60°C com baixas concentrações de F-127. Percebe-se também na mesma Figura 25, destaques que identifica os formatos característicos de vibrações de grupos fosfatos oriundos de diferentes fases de fosfatos de cálcio de acordo com DROUET, 2013 [124].

As análises das bandas na Figura 25 a) sugere que as amostras P0% 02 60°C 1h, P6% 02 60°C 1h, 9% 02 60°C 1h e 15% 02 60°C 1h apresentam fases do DCPD, e OCP na amostra P25% 02 60°C 1h, já as bandas presentes nas Figuras 25 b) e c) sugerem a presença da fase de monetita, (DCPA), nos revestimentos [124, 126].

Todas estas conclusões obtidas a respeito das fases por FTIR/ATR foram confirmadas posteriormente por difratometria de raios X.

Comparando as bandas características do grupo fosfato e das bandas característica dos estiramentos de ligações O-H (em 1343 cm^{-1}) e estiramento de ligações C-O (na região de 1100 cm^{-1}) das amostras controle (HA 60 ºC e F-

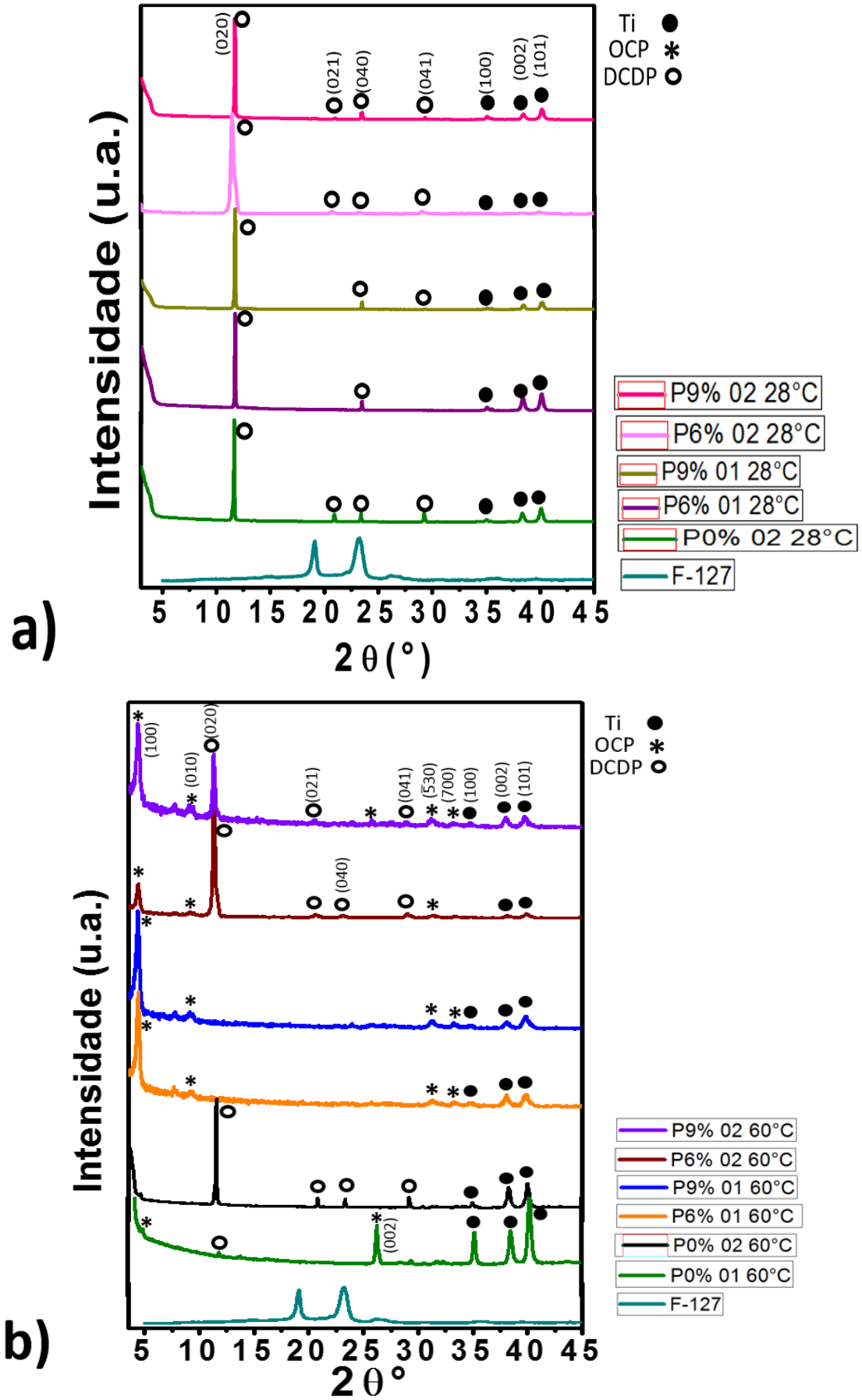
127) com as bandas das amostras produzidas com a adição de diferentes concentrações de F-127, nota-se que as mesmas são sobreponíveis, dificultando inferir a respeito da presença do polímero no revestimento de fosfato de cálcio com esta técnica. Somente para a amostra P25% 02 90°C 1h e P15% 02 60°C é possível verificar uma banda a 2880 cm^{-1} de estiramentos C-H, sugerindo a presença do F-127 no revestimento.

Análises gravimétricas foram realizadas em algumas amostras para quantificação do F-127.

4.2.2 Difratometria de raios X

As identificações das fases cristalinas presentes nas amostras foram feitas comparando os padrões de difração experimentais com os padrões existentes em um banco de dados da ICDD (*International Centre for Diffraction Data*). A Figura 26 a seguir mostra os difratogramas das amostras produzidas inicialmente a uma temperatura de 28°C e a 60°C.

Figura 26: Amostras produzidas inicialmente a: a) 28°C e b) 60°C.



Pela análise dos difratogramas das amostras produzidas a uma temperatura ambiente (Figura 26 a)), é possível confirmar que no revestimento há a presença de uma única fase de fosfato de cálcio, o fosfato bicálcico dihidratado, (DCPD), de fórmula $CaHPO_4.2H_2O$ [127] também conhecido como bruxita, isso pode ser atribuído ao valor do pH da solução em torno de 4, que favorece a formação de fosfatos de cálcio mais ácidos, a exemplo do DCPD que apresenta cristais em forma de placas, confirmadas por microscopia eletrônica de varredura (Fig. 30 b) e c)), através do processo já descrito pela Equação 5 anteriormente [126].

As medidas de DRX realizadas nas amostras produzidas a 60°C são mostradas na Figura 26 b). Observa-se que para amostras produzidas a 60°C há o aparecimento da fase de fosfato octacálcico, (OCP), de fórmula $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$ [127], apenas nas que foram feitas com a adição de polímero, isso ocorre devido ao aumento do pH localizado (nas proximidades do eletrodo de trabalho, para valores possivelmente em torno de 6 [128]). Adicionalmente, com um aumento da temperatura faz com que a mobilidade das partículas presentes nas soluções, sejam íons ou moléculas, seja mais acentuada quando comparada com o mesmo processo em temperatura ambiente, o que ocasiona uma diminuição da resistência elétrica da solução, pela lei de Ohm, propiciando ao sistema um aumento nos valores da corrente, de forma a manter o valor do potencial constante, assim se promove uma maior ionização da água de acordo com a equação:

$$2H_2O_{(l)} + 2e^- \leftrightarrows H_{2(g)} + 2OH^-_{(aq)} \quad \text{(Eq. 7)}$$

É bem provável que estas hidroxilas, acabem ficando “retidas” nas proximidades dos eletrodos, seja possivelmente por interação com as extremidades do polímero presente $HO\text{-}(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})n$ do grupo PEO, ou por dificuldade de locomoção devido ao impedimento pelas longas cadeias poliméricas do F-127, fazendo que íons H^+ sejam consumidos do equilíbrio:

$$H_2PO_4^-{}_{(aq)} \leftrightarrows HPO_4^{2-}{}_{(aq)} + H^+_{(aq)} \quad \text{(Eq. 8)}$$

Favorecendo a formação de HPO_4^{2-}, com o aumento quantidade das hidroxilas o equilíbrio a seguir para formação de íons fosfatos é favorecido:

$$HPO_4^{2-}{}_{(aq)} \leftrightarrows PO_4^{3-} + H^+{}_{(aq)} \text{ (Eq. 9)}$$

A presença de íons fosfatos é essencial para a precipitação da fase de fosfato octálcico, (OCP), de acordo com a equação [128]:

$$8Ca^{2+}{}_{(aq)} + 6PO^{3-} + 2H^+ \leftrightarrows Ca_8H_2(PO_4)_6 \text{ (Eq. 10)}$$

(OCP)

Sendo evidenciado pelo padrão de difração um revestimento composto por OCP e DCPD.

Estes mecanismos possivelmente não acontecem para a amostra P0% 02 60°C, pois, hidroxilas podem mover-se com mais liberdade pela solução, não favorecendo as etapas descritas anteriormente nas imediações do eletrodo de trabalho, tendo como consequência a formação apenas da fase DCPD, conforme equações:

$$H_2PO_4^{-}{}_{(aq)} \leftrightarrows HPO_4^{2-}{}_{(aq)} + H^+{}_{(aq)} \text{ (Eq. 11)}$$

$$Ca^{2+}{}_{(aq)} + HPO_4^{2-}{}_{(aq)} + 2\ H_2O_{(l)} \rightarrow CaHPO_4.2H_2O_{(s)} \text{ (Eq. 12)}$$

(DCPD)

Observa-se na Figura 26 ainda, que não apenas a adição de F-127 na solução como também a concentração do eletrólito utilizada influência nas fases formadas na superfície do substrato. Para as amostras produzidas com o eletrólito 01 (P6% 01 60°C e P9% 01 60°C), são obtidas a fase de somente de OCP, isso talvez possa ser atribuído justamente a uma menor produção de íons OH^- provenientes da ionização da água, pois esta solução eletrolítica utilizada, mais diluída, apresenta uma menor condutividade elétrica. Assim, apesar de termos hidroxilas formadas em menor quantidade, as mesmas podem ficar retidas nas proximidades dos eletrodos, não se desocando tando para o sentido do cátodo, aumentam o pH local para valores possivelmente em torno de 6 (pH onde essa fase é mais estável), o acréscimo do F-127, possibilita uma maior

retenção de OH^-, nas proximidades do eletrodo, implicando em grandes quantidades de íons PO_4^{3-} [126], favorecendo a produção da fase do OCP.

Na Figura 27 a seguir pode ser apreciado os demais padrões de DRX para as amostras obtidas com o eletrólito 02 a uma temperatura de 60°C, 90°C por 1h e 90°C por 2h.

Figura 27: Padrão de DRX dos revestimentos, a) obtidos a 60°C; b) obtidos a 90°C 1h e C) obtidos a 90°C 2h (Continua).

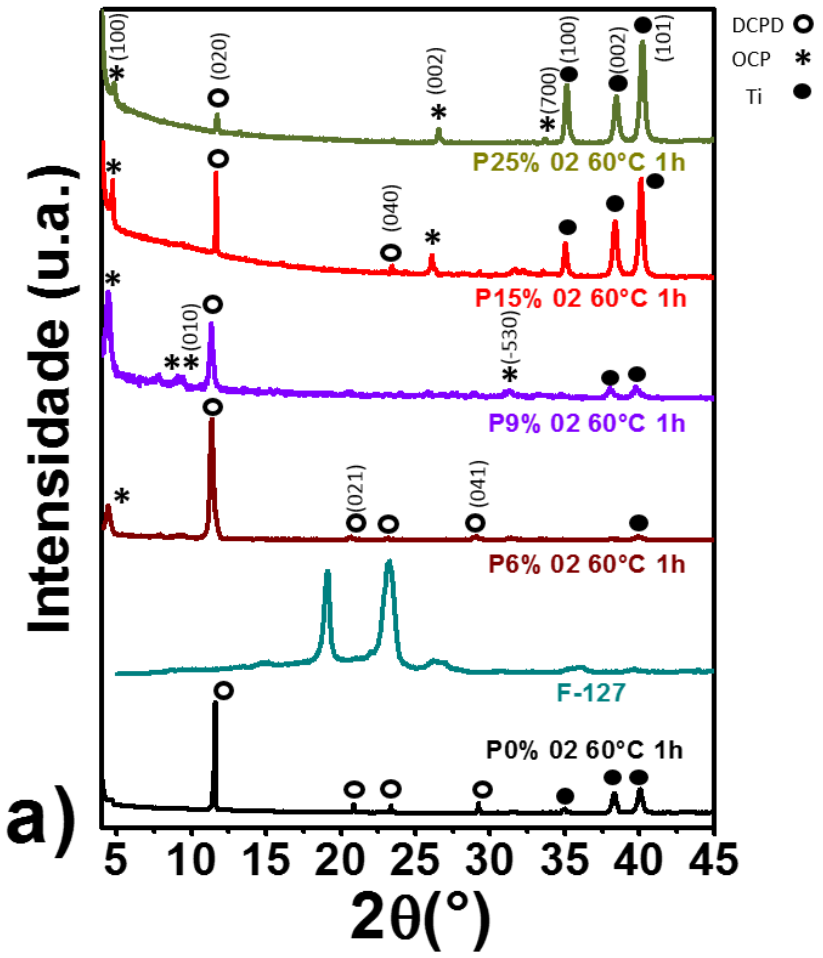
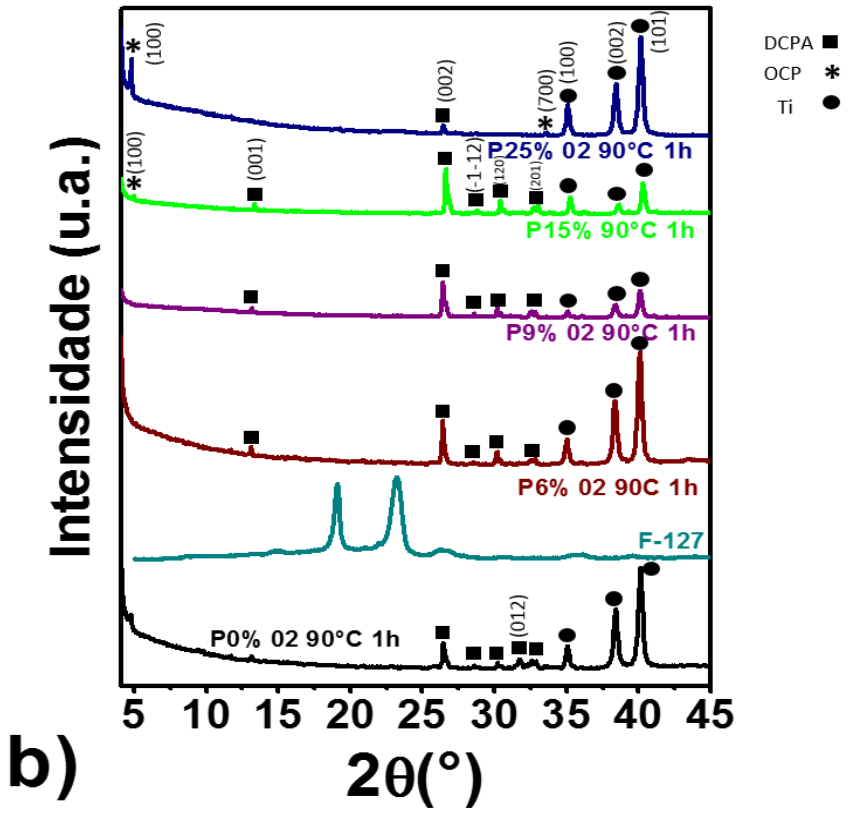
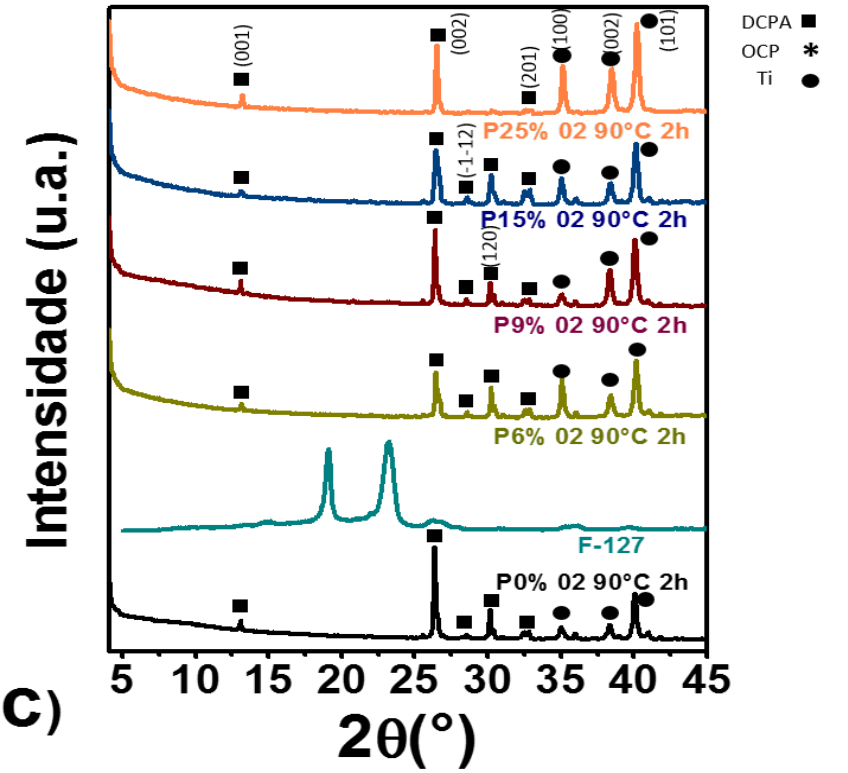


Figura 27: Padrão de DRX dos revestimentos, a) obtidos a 60°C; b) obtidos a 90°C 1h e C) obtidos a 90°C 2h (Conclusão).





Observa-se na Figura 27 a) que as fases obtidas foram OCP com DCPD [127], nas amostras com adição de F-127, e DCPD somente na amostra sem adição de F-127. Nota-se na mesma figura, que ao se elevar a concentração de F-127 as intensidades da fase de DCPD é diminuída e a de OCP é aumentada, para a mesma temperatura e mesma concentração iônica.

Essas diferenças estão relacionadas possivelmente com as quantidades das fases, podendo ser explicadas pelo aumento na concentração de polímero que eleva a resistividade da solução, e que apesar de acarretar em uma diminuição da corrente aplicada e uma consequente diminuição da quantidade de hidroxilas provenientes da ionização da água, estas hidroxilas podem ficar "retidas" nas proximidades do eletrodo de trabalho, elevando-se o pH local e favorecendo os equilíbrios descritos pelas equações 13 e 14 até a formação de íons PO_4^{3-}, que origina maiores quantidades de OCP e menores de DCPD.

A presença do OCP no revestimento se torna bastante vantajosa, pois o uso de OCP como biomaterial vem crescendo acentuadamente, pesquisas mostram que o OCP apresenta melhores resultados de proliferação celular e osteocondutividade [52].

Pode ser citado como exemplos desta considerável vantagem o trabalho de Dekker *et al*. [52], no qual foram analisados por meio de ensaios *in vitro*, por meio de cultura de células, e ensaios *in vivo*, com uso de implantes em ratos. Foi analisada a adesão e proliferação celular sobre substratos de Ti revestido com OCP e HA carbonatada; os resultados mostraram que tanto a adesão quanto a proliferação foram maiores nas amostras com recobrimento de OCP, e também que o revestimento com OCP proporcionou uma maior formação de volume de tecido ósseo sobre o substrato de Ti, sendo ainda mais organizado que o tecido formado sobre o revestimento de HA.

Estudos similares foram realizados por Imaizumi *et al.* [43], confirmam os resultados obtidos por Dekker *et al.* [52], onde foi atribuído o melhor desempenho do OCP devido a sua maior taxa de reabsorção em comparação com a HA. Esses resultados indicam que o OCP pode ser um substituto para revestimentos de biomateriais mais adequado que a HA em aplicações que se necessita de uma rápida formação óssea [129].

Para as amostras produzidas a 90°C por 1 h e 2h (Figura 27 b) e c)) observa-se o aparecimento nos revestimentos de uma nova fase, a do fosfato bicálcico anidro, (DCPA), de fórmula $CaHPO_4$, também conhecido como monetita [127]. A fase do OCP também aparece em pequena quantidade para as amostras P15% 02 90°C 1h e P25% 02 90°C 1h.

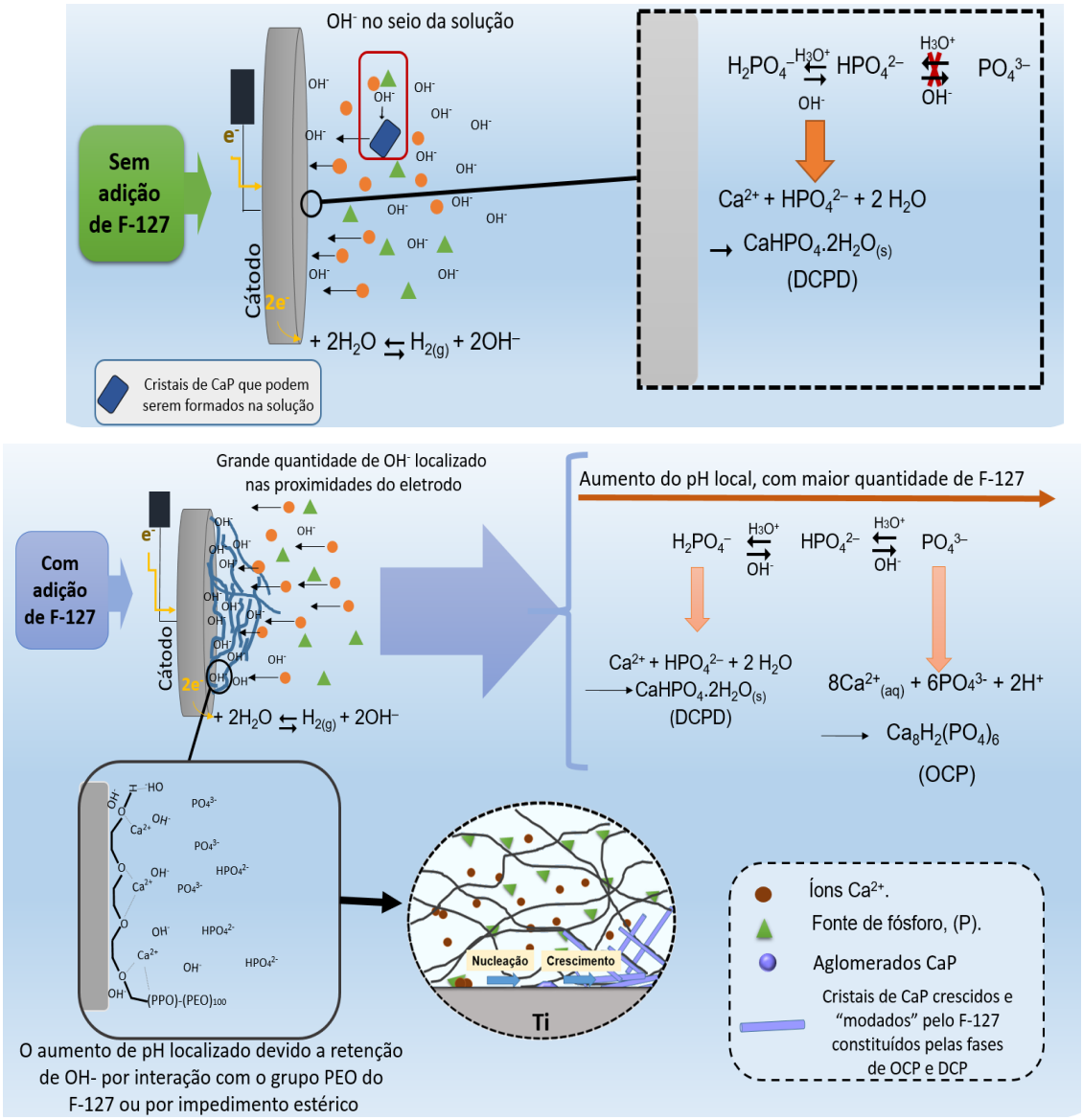
O surgimento da fase de DCPA pode ser atribuída a retirada de água do DCPD, pois esta transformação em DCPA ocorrem em temperaturas acima de 80°C, ou seja, a DCPA é simplesmente a forma anidra de DCPD [82]. DCPA é fisicamente estável e resiste a hidratação, mesmo quando disperso em água por mais de 7 meses nas faixas de temperaturas 4-50 °C [130].

Observando os padrões de difração obtidos e comparando-os com o padrão disponível no banco de dados ICDD [127], o pico mais intenso para o DCPA deveria ser o que se localiza a 30,2° com planos (1 2 0), porém nota-se uma drástica redução deste pico na Figura 27 c, sugerindo uma possível orientação preferencial na direção dos planos (0 0 2) localizados a 26,3°.

É possível também notar a partir da Figura 27 uma redução na quantidade das massas de revestimento no substrato principalmente para as amostras obtidas a 90°C por 1 h e 2h, pois os picos referentes a fase do Ti ficam bem mais intensos, esse decréscimo da massa no substrato para temperaturas de 90°C é prevista por Thanh *et al.* [120]. De acordo com os autores a redução da massa de CaP obtida pode ser observada em temperaturas a partir de 70°C (para os sistemas estudados), pois a elevação da temperatura para estes valores leva ao aumento da solubilidade do revestimento, o que eleva a concentração simultaneamente de íons fosfatos e hidróxidos que se difundem a partir da superfície do eletrodo para forma fosfato de cálcio na solução.

Em suma, as diferentes fases observadas pode ser atribuído aos diferentes valores de pH localizado nas imediações do eletrodo de trabalho, temperatura e concentração que afetam diretamente a condutividade elétrica e a corrente aplicada para manter o mesmo potencial em todas as condições, como já mencionado anteriormente. A figura a seguir traz um esquema que resume a explicação para o surgimento das diferentes fases observadas.

Figura 28: Esquema de possível mecanismo que relaciona a influência do F-127 na formação das fases.



As fases de fosfatos de cálcio presentes nos revestimentos, DCPD e DCPA, podem ser convertidas a HA em meio biológico, podem ocorrer de acordo com a seguinte equação:

$$10\ CaHPO_4 + 2\ OH^-_{(aq)} \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 4PO_4^{3-} + 10H^+ \quad \text{(Eq. 13)}$$

[119].

O mesmo pode ser observado para o OCP obtidos nas amostras produzidas a 60ºC. A transformação da fase metaestável de OCP a HA é termodinamicamente favorável, sendo um processo espontâneo e irreversível. No campo de aplicações biomédicas, o meio biológico é responsável por esta

transformação, no qual ocorre hidrólise do OCP e simultâneo consumo de íons Ca^{2+} do fluido corpóreo conforme reação:

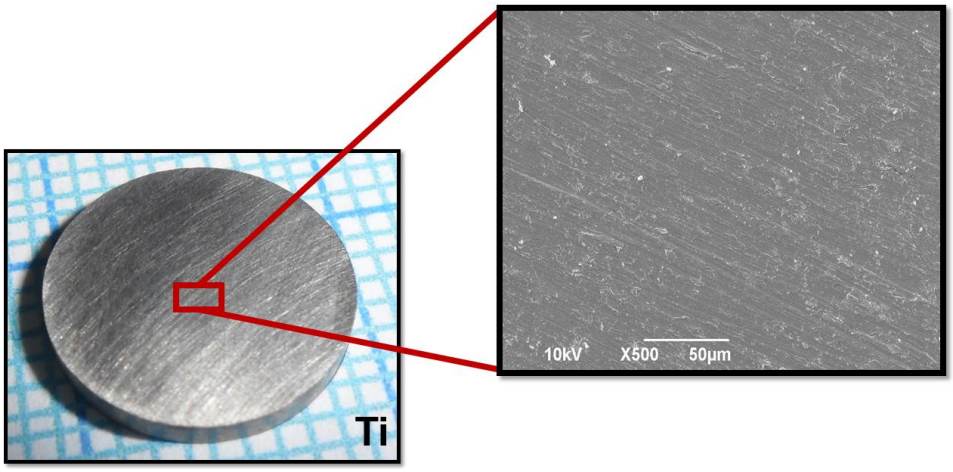
$$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O + 2Ca^{2+} + 2OH^- + 2H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 5H_2O + 2H_3O^+ \text{ (Eq. 14)}$$

Caso o meio (*in vitro* ou *in vivo*) apresente íons Mg^{2+} numa razão Mg/Ca maior que 0,02; a presença destes íons inibe a transformação do OCP a HA, devido a incorporação preferencial do mesmo na estrutura [129].

4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura, MEV

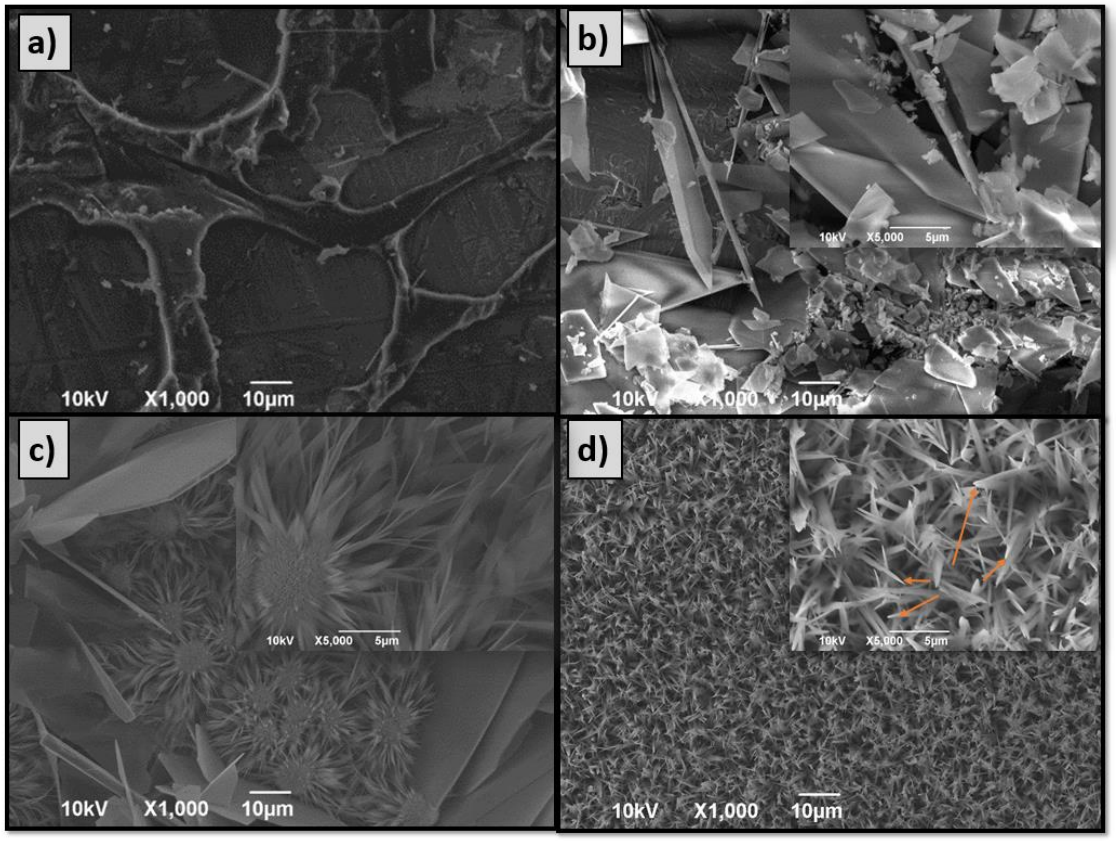
Inicialmente foram realizadas medidas de MEV em amostras controle: O substrato de Ti, o substrato com polímero F-127 adsorvido e do substrato com somente fosfatos de cálcio. A Figura 29 a seguir mostra a superfície do Ti sem revestimento.

Figura 29: Controle – MEV de substrato de Ti não revestido.



Na Figura 30 é possível observar os demais controles. Nesta figura identifica-se facilmente regiões revestidas e não revestidas.

Figura 30: Controles - a) somente F-127 9% 28°C sobre o substrato; b) P0% 02 28°C; c) P0% 02 60°C d) P0% 01 60°C 1h; a ampliação dentro das figuras b), c) e d) é de 5000 vezes. Para a amostra P0% 01 60°C 1h, reflexões a 26° identificadas no padrão de DRX indica cristais orientados na direção 0 0 2 da fase de OCP.



Nota-se cristais em forma de placas (Fig. 30 b)) para amostras produzidas a 28°C (P0% 02 28°C), morfologia mais típica da fase do DCPD que constitui o revestimento; para a amostra P0% 02 60°c 1h (Fig. 30 c)) observa-se cristais em forma de placas e placas com crescimento radial, muito distinta da morfologia da amostra P0% 01 60°C 1h (Fig. 30 d)) em forma de agulhas, característica da fase de OCP, sendo que muitas delas estão perpendicular ao substrato (indicadas por setas laranja na Figura 30 d)), o padrão de difração de raios X para esta amostra indica uma pequena orientação do planos cristalinos na direção 002 mostradas por reflexões ocorridas em torno de 26º, o que de acordo com a referência [131], é o possível fator que ocasiona o alongamento do cristais perpendicularmente ao substrato, essa morfologia de agulhas perpendicular ao substrato não é interessante quando se trata de regeneração óssea, pois, células ao entrarem em contato com a superfície podem acabar com a membrana celular

perfurada, ocasionando redução da viabilidade celular, esta condição de preparo da amostra confirma que a concentração usada no processo de eletrodeposição influencia na morfologia e fase dos revestimentos de fosfatos de cálcio, neste caso, o eletrólito 01 favorece a formação da fase de OCP.

Na Figura 31 é encontrado um comparativo entre a superfície dos revestimentos produzidos inicialmente, com diferentes magnificações, de amostras produzidas a 28°C, e 60°C com adição eletrólitos e de polímeros em diferentes concentrações.

Figura 31: MEV das amostras produzidas inicialmente: a) e b) a 28°C, c) e d) a 60°C (Continua).

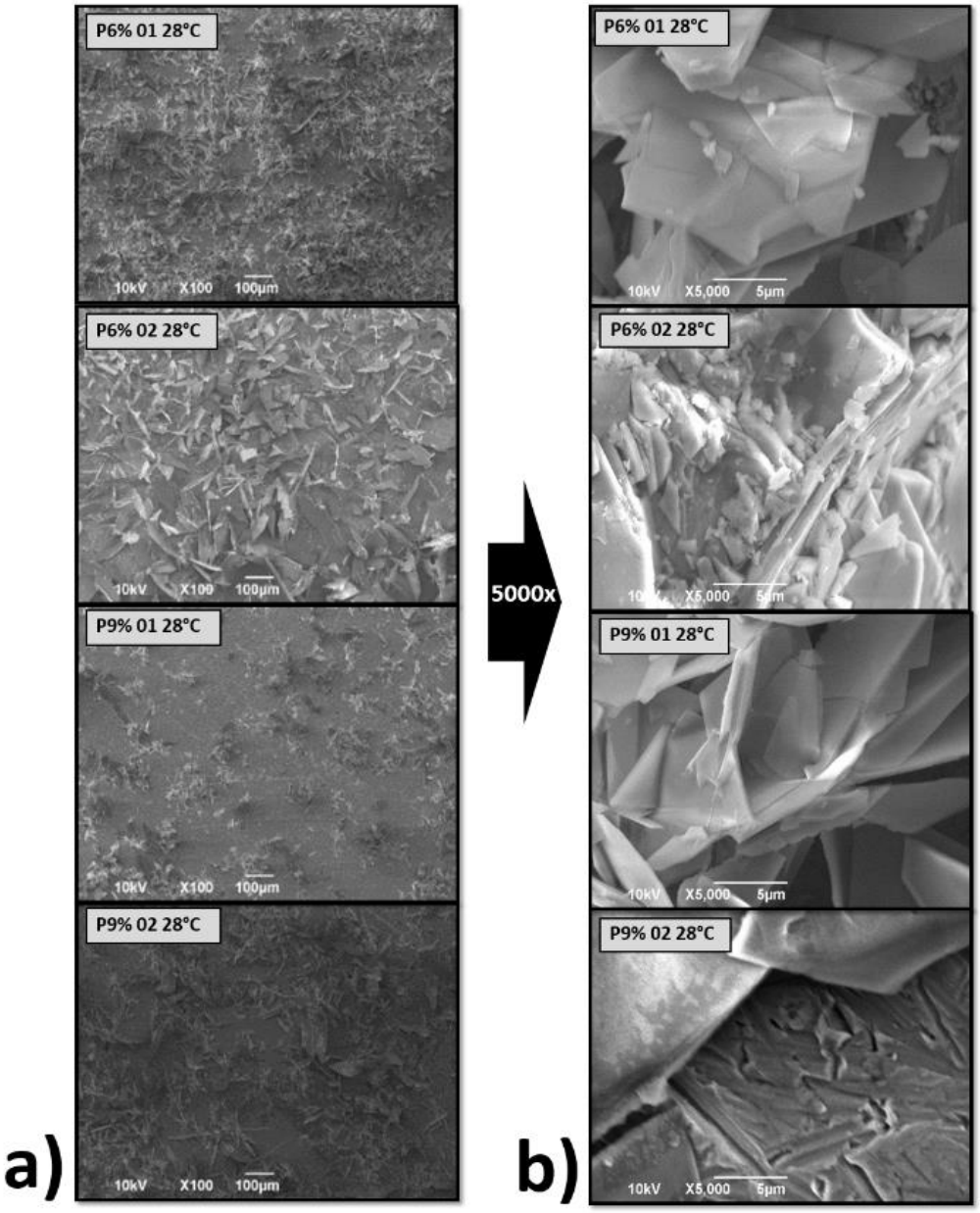
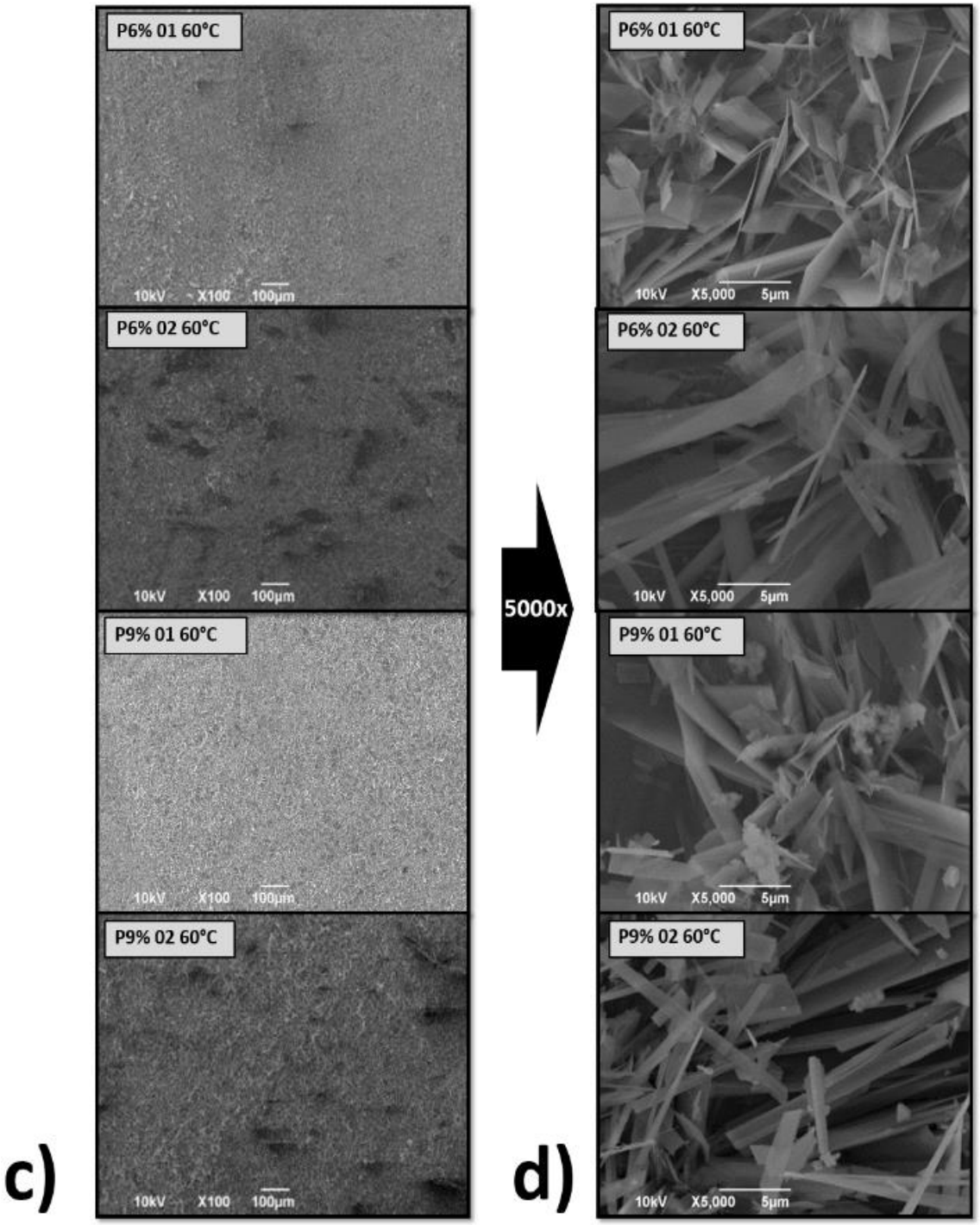


Figura 31: MEV das amostras produzidas inicialmente: a) e b) a 28°C, c) e d) a 60°C (Conclusão).



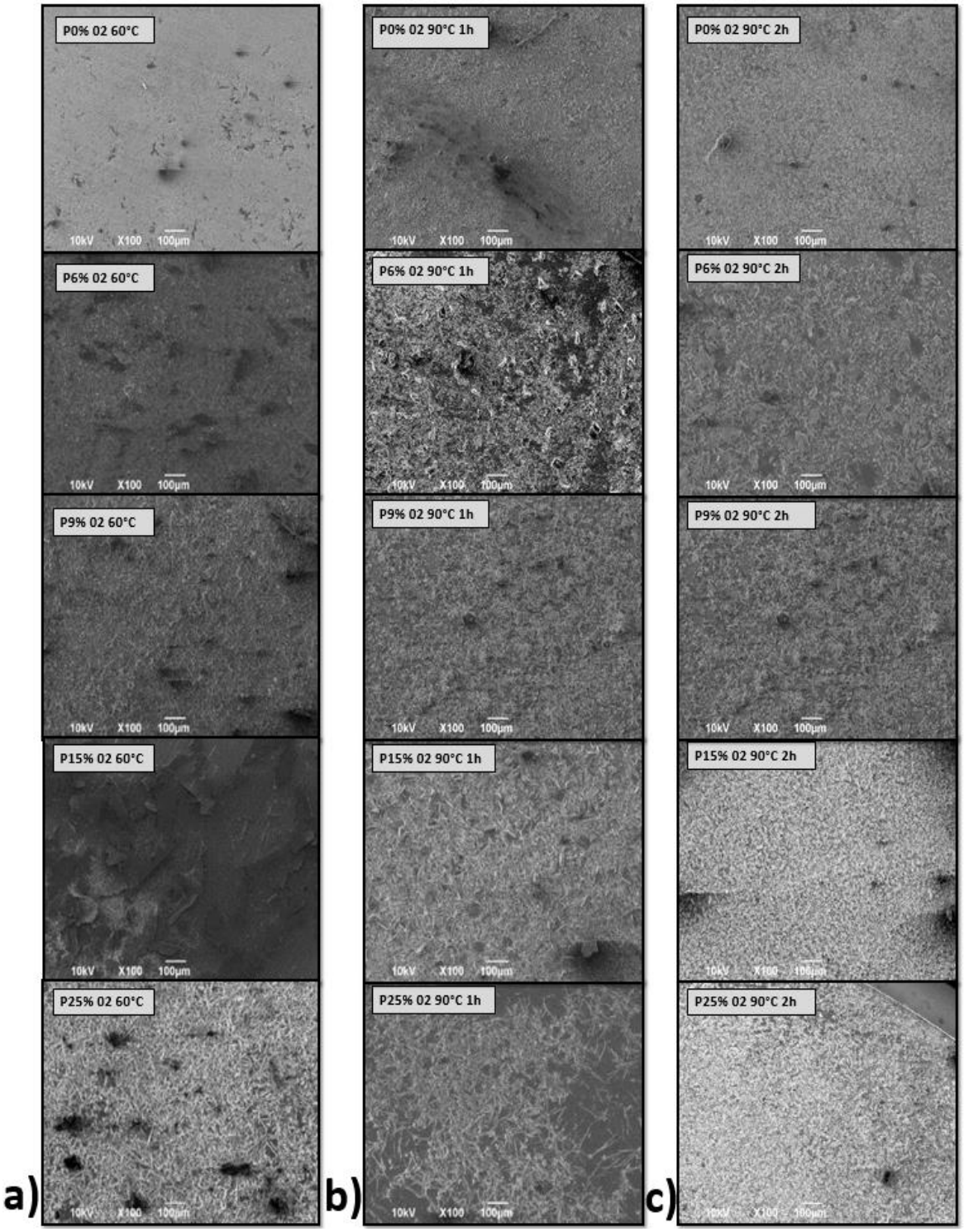
Percebe-se a partir da apreciação da Figura 31 a) e c) nas imagens com ampliação de 100x, onde se tem a visualização ampla da superfície, que o substrato das amostras produzidas a 60°C apresenta-se totalmente revestidos,

o que não acontece com as amostras produzidas a 28°C. Isto se deve provavelmente a maior quantidade de revestimento que se consegue obter nas condições de submissões a temperaturas de 60°C (Thanh *et. al.* [120], prevê a quantidade máxima de massa presente nos revestimentos para processos realizados a uma temperatura de 70°C, porém usando concentrações de $3x10^{-2}$ e $1,8x10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ de nitrato de cálcio de dihidrogenofosfato de amônio respectivamente). Na mesma Figura 31, porém com as magnificações de 5000x nota-se as distinções nas morfologias dos cristais que constituem o revestimento. As amostras produzidas a 28°C com cristais predominantemente em forma de placas (DCPD) e 60°C onde apresenta cristais em forma de agulhas paralelas ao substrato (DCPD e OCP).

As diferenças na morfologia observadas em amostras produzidas a 28°C (Figura 31) e 60°C pode ser atribuída as concentrações muito baixas do F-127 adicionado na solução usada para realização do procedimento de eletrodeposição. Nestas condições apenas micelas esféricas são formadas, há a presença de uma fase fluida, porém ao se elevar a temperatura para 60°C se atinge a temperatura de gelificação crítica, (TGC), para as concentrações que estão sendo utilizadas. A medida que as condições que satisfazem a gelificação são fixadas (concentração e temperatura adequada) as estruturas micelares do sistema tornam-se mais organizadas formando uma rede organizada, característica da fase de gel, possibilitando o crescimento orientado pela estrutura desta rede.

As Figuras 32 e 33 a seguir mostram imagens de MEV para as demais amostras produzidas a 60 e 90°C, com o uso do eletrólito 02 somente com ampliações de 100x para se ter uma melhor avaliação da qualidade do revestimento e a 5000x para se acompanhar as morfologias dos cristais encontrados nos revestimentos.

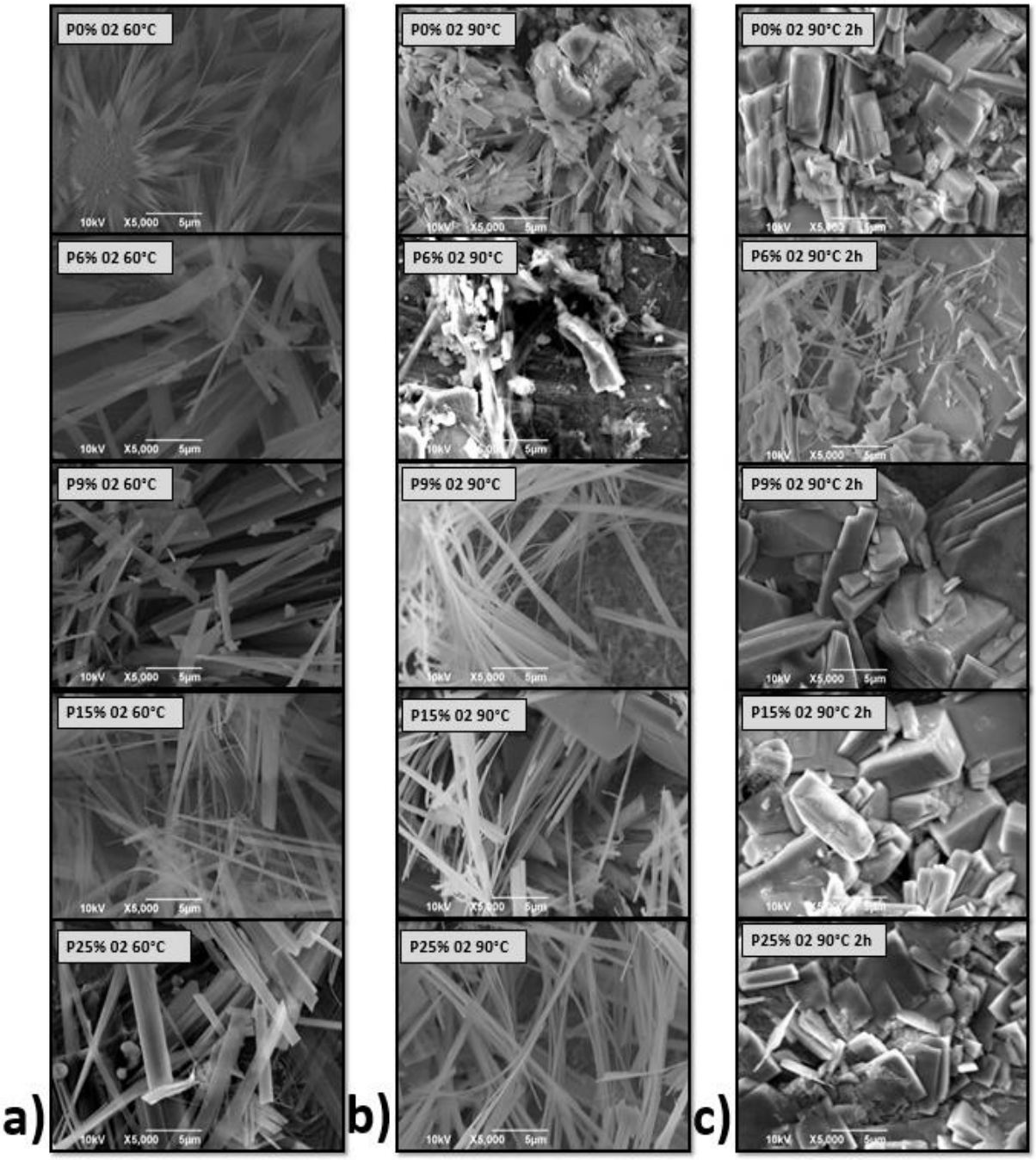
Figura 32: MEV da superfície dos revestimentos a 100x: Amostras produzidas a: a) 60°C; b) a 90°C por 1h e c) a 90°C por 2h.



Nota-se que nas imagens da Figura 32 com aproximação de 100x, que os revestimentos obtidos a 60°C e 90°C são bastantes homogêneos (ausência de

regiões não revestidas) quando comparado com os demais. Revestimentos homogêneos são importantes, principalmente no caso de possível adesão celular sobre a superfície do material, pois, todas as células serão afetadas pela mesma morfologia.

Figura 33: MEV da superfície dos revestimentos a 5000x: a) amostras produzidas a 60°C; b) a 90°C por 1h e c) a 90°C por 2h.



Como as amostras controles não apresentaram cristais em forma de agulhas relativamente espessas paralelas ao substrato, pode-se afirmar que o polímero influencia diretamente na morfologia do revestimento, para as amostras produzidas por meio de um procedimento de 1h de duração.

Uma outra forte evidência de que o polímero utilizado no processo de eletrodeposição influencia na morfologia atuando como um direcionador do crescimento dos cristais ao logo do processo, é que as amostras produzidas a 60°C e a 90°C por 1h apresentam morfologias similares, em forma de agulhas espessas paralelas ao substrato e em alguns casos com aspecto fibrilar (P15% 02 60°C 1h, P9% 02 90°C 1h e P25% 02 90°C 1h), porém fases diferentes: a 60°C OCP e DCPD e a 90°C DCPA.

A fim de se aumentar a espessura do revestimento, foi realizado procedimentos de eletrodeposição por um tempo de 2 horas, acompanhando-se a intensidade dos picos referente a fase do Ti nos padrões de DRX, é sugestivo um aumento da quantidade de revestimento, quando comparado com as amostras obtidas a 90°C por 1h.

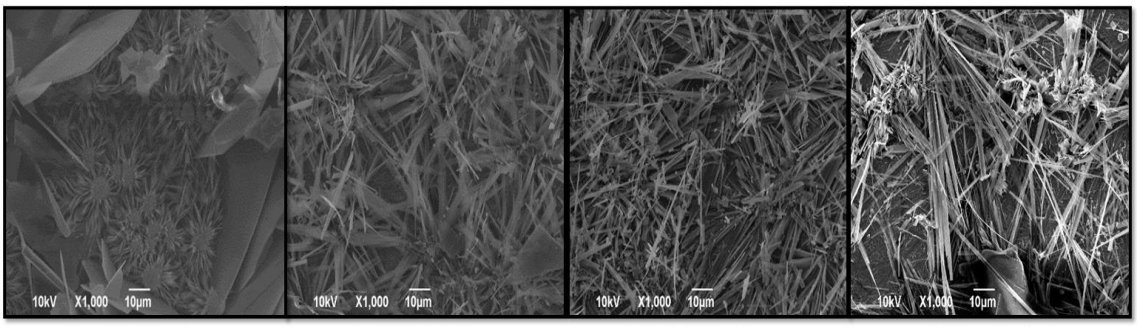
As imagens de MEV na Figura 33 revelam que há uma alteração na morfologia significativa nas amostras produzidas a 90°C por 2h, quando comparada com as já visualizadas anteriormente em forma de fibras e agulhas paralelas ao substrato, cristais de DCPA em forma de blocos são obtidos para amostras produzidas por 2h.

A morfologia encontrada nos revestimentos para as amostras obtidas a 90°C por 2h de duração, foi predominantemente em forma de blocos, essas distintas morfologias entre as amostras obtidas a 90°C por 1h e por 90°C 2h ocorre provavelmente devido a fatores de competição cinética e termodinâmica (estabilidade), o crescimento dos cristais no decorrer de 1h é suficiente para adquirirem a forma a que estão sendo “impostas”, orientadas possivelmente por micelas alongadas presentes na fase de gel, é tanto que para as amostras obtidas com baixa concentrações de F-127 (P6% 02 60°C 1h) e sem adição de polímero (P0% 02 90°C 1h) já é possível observar grandes quantidades de cristais com morfologias predominantes em blocos. Enquanto que no tempo de

2h, é suficiente para a fase da monetita, (DCPA) adquirir sua estabilidade assumindo sua forma mais estável: a de blocos.

Nota-se que ao compararmos os revestimentos preparados nas mesmas condições, porém variando-se a concentração do F-127, que há um alongamento dos cristais em forma de fibras, a Figura 34 mostra as imagens obtidas no MEV que evidencia esta observação, cujos tamanhos médios das mesmas são 24 a 57 µm, sendo possível também encontrar cristais em forma de fibras com tamanho próximos de 88 µm.

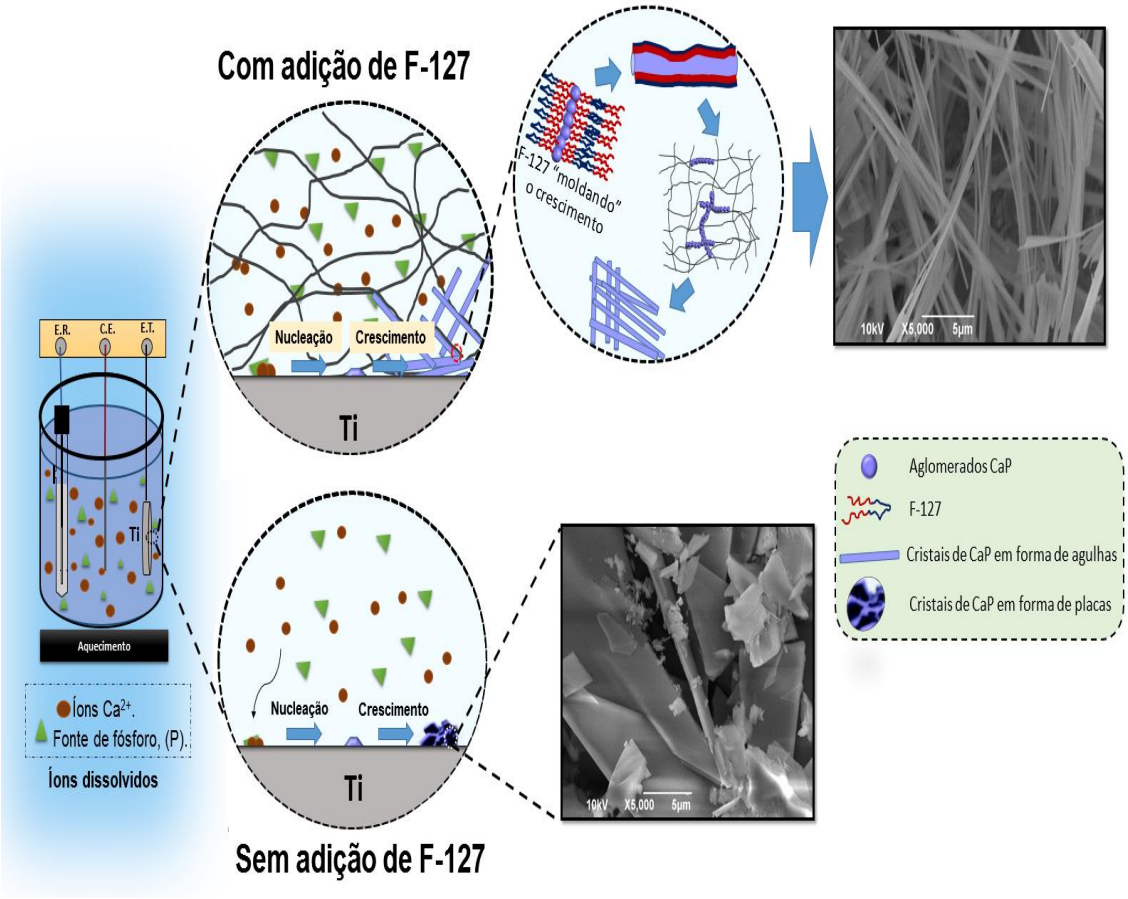
Figura 34: Comparação de amostras produzidas nas mesmas condições, porém com o aumento da concentração de F-127.



P0% 02 60°C | P6% 02 60°C 24(5) µm | P9% 02 60°C 31(5) µm | P25% 02 60°C 57(8) µm

As principais diferenças encontradas nas morfologias dos cristais das fases de fosfatos de cálcio, podem ser atribuídas ao regimento pelo arranjo tridimensional da fase de gel do F-127 (síntese *template*), quando não se tem a fase de gel, é obtida uma morfologia em forma de placas. A Figura 35 apresenta um esquema que ilustra as diferenças entre as morfologias obtidas.

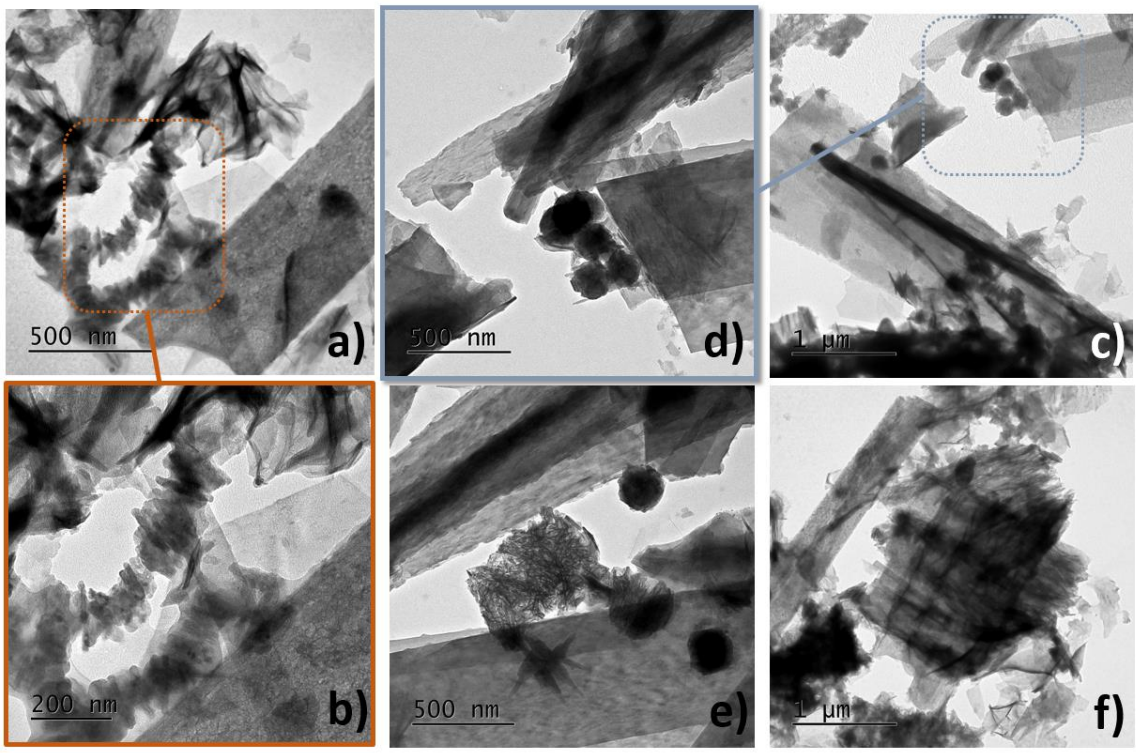
Figura 35: Ilustração do desenvolvimento morfológico de partículas de fosfato de cálcio sobre o substrato de Ti, com e se adição de F-127.



4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão, MET.

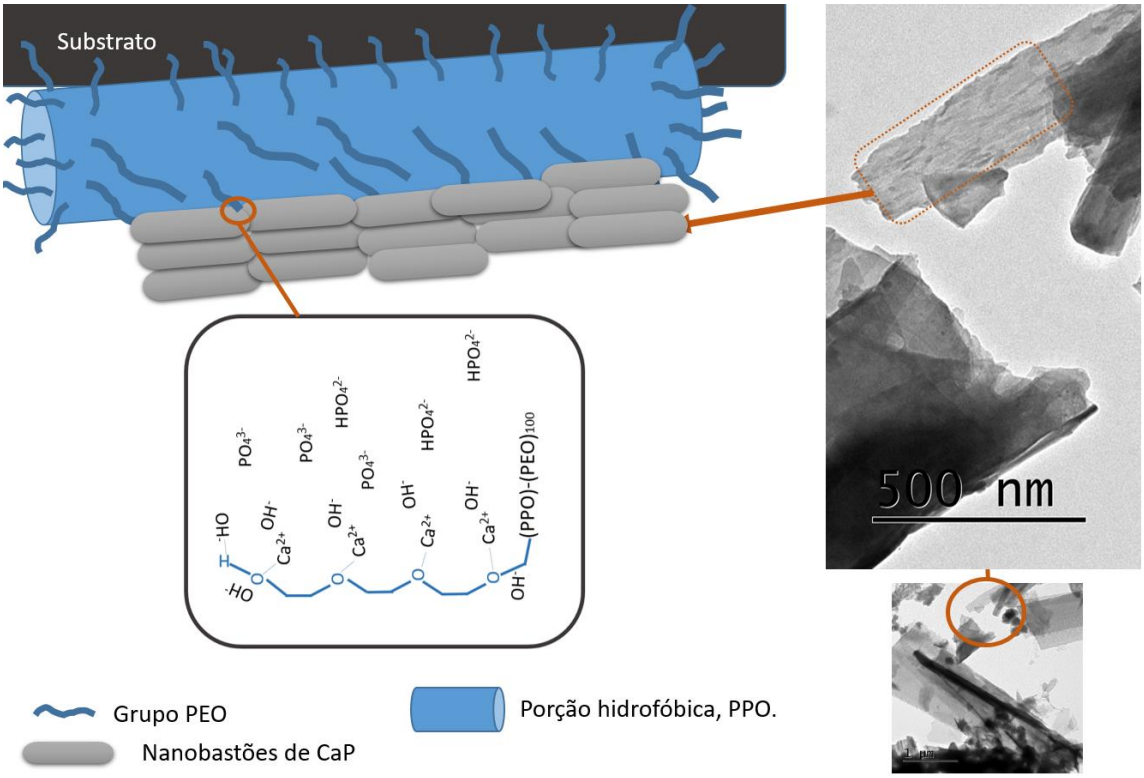
Diversas morfologias de cristais de DCPD e OCP foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão da amostra P6% 02 60°C 1h, como mostra a Figura 36 (próxima página).

Figura 36: TEM da amostra P6% 0260°C 1h: a) e b) nanobastões, emaranhados de cristais em forma de agulhas e fibras; c) e d) esferas, placas e nanobastões organizados; e) esferas, emaranhados e nanobastões; f) cristais organizados em forma de xadrez.



As análises das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão podem colaborar com a proposta do mecanismo de orientação dos cristais influenciado pelo Pluronic F-127. A Figura 37 a seguir mostra imagens de TEM para amostras de P6% 02 60°C 1h, constituídas pelas fases de OCP e DCPD, a escolha desta amostra foi devido a possibilidade de observar a microestrutura no início do processo de formação de nova fase.

Figura 37: Esquema ilustrando a formação de fibras a partir de nanobastões.



A figura anterior destaca na MET (com ampliação de 500nm) nanobastões ordenados, sugerindo que há a produção de nanobastões que coalescem para formar estruturas maiores, como placas e cristais mais alongados. Este aspecto de cristais constituídos por nanobastões ordenados, para esta amostra, se repete em diversas regiões com aspecto fibrilar observadas por MET.

4.2.5 Análise gravimétrica

Outra técnica utilizada foi a análise gravimétrica, para identificar e quantificar o polímero que se espera estar adsorvido. Ensaios foram realizados para amostras que usaram P15% 02 60°C1h, pois estas foram selecionadas para se realizar ensaios microbiológicos de adesão com Sthaphylococcus *aureus*. O valor encontrado para massa de revestimento na amostra P15% 02 60°C1h foi de $2{,}07.10^{-3}$ g e 7,73% da massa do revestimento foi de F-127.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que use este polímero para se realizar procedimento de eletrodeposição de fosfatos de cálcio e que o quantificou, a fim de comparação de resultados quantitativos com metodologia similar.

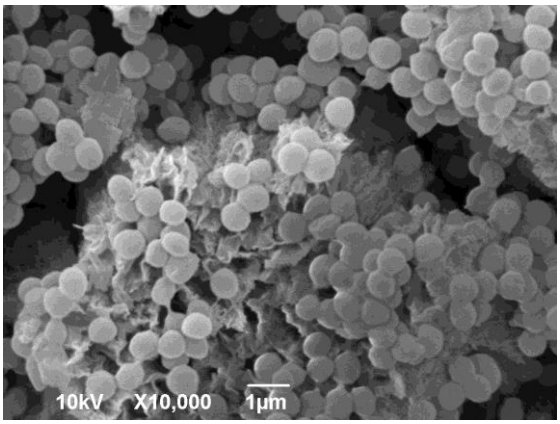
Li *et al.* [19], investigaram a influência de Pluronics na síntese de HA em solução na razão Ca/P de 1,7, utilizando cloreto de cálcio e hidrogenofosfato de potássio em pH 10. Foram empregados Pluronic F127, Pluronic P-123 e Pluronic F-87 nas concentrações molares de 35, 47 e 24%, respectivamente. Foram obtidos nanobastões de HA, os quais foram lavados com água deionizada e álcool anidro. As amostras preparadas com o F127 foram analisadas por análise termogravimétrica, verificando-se 2% em massa do polímero nas amostras.

4.3 Análise da adesão de *Staphylococcus aureus* por microscopia eletrônica de varredura

A formação de biofilmes é caracterizada pela progressiva ejecção de substâncias extracelulares poliméricas ricos em polissacáridos e proteínas a partir de bactérias, é o que permite a adesão de bactérias em superfícies sólidas.

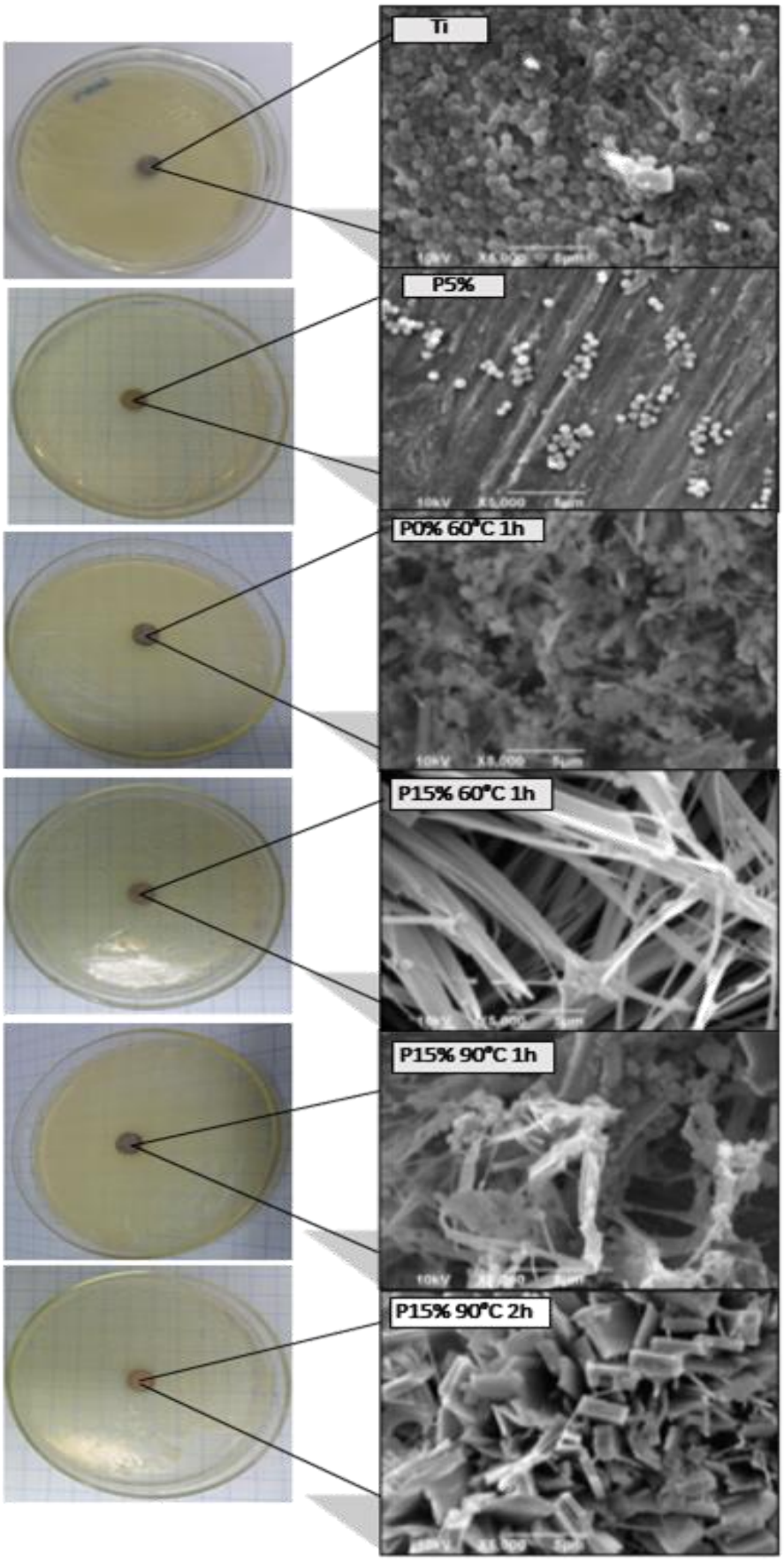
A Figura 38 revela a aderência do *S. aureus*, esferas aglomeradas, no substrato de Titânio revestido com fosfatos de cálcio (após 24 h de crescimento bacteriano).

Figura 38: Bactérias de *S. aureus* (formas esféricas) aderidas a superfície de fosfato de cálcio, em aglomerados.



As amostras selecionadas para a cultura de *S. aureus* foram Ti sem revestimento, P5% (solução aquosa com 5% em massa de F-127 gotejada no substrato e seca a 40°C por 24h) F-127P0% 02 60°C1h, e P15%0260°c 1h e P15% 02 90°C 2h. As imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas da superfície após 24h de cultura pode ser apreciada na Figura 39 a seguir (próxima página).

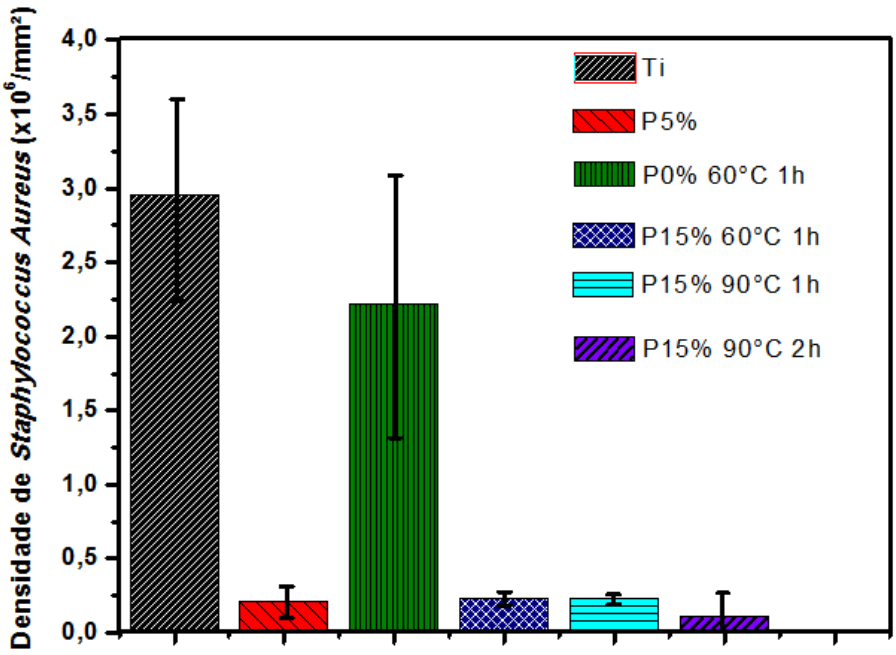
Figura 39: Resultados dos ensaios microbiológicos observados por MEV.



Halos de inibição ao redor dos discos não foram verificados nas placas de cultivos de *S. aureus* (Figura 39 a)). Isso indica que o revestimento não apresenta propriedades bactericidas ou bacteriostáticas.

Já a Figura 40 a seguir mostra a densidade de *S. aureus* aderidos na superfície por mm².

Figura 40: Contagem do número de bactérias aderidas na superfície por mm², após 24h de cultura, visualizadas por MEV.



Os dados sugerem que os revestimentos obtidos com o uso de F-127 apresentam propriedades antiaderentes a S. aureus, como já reportados por Bridgett *et al*. [10].

As células de bactéria como as dos *S. aureus* possuem adesinas que reconhecem a fibronectina, proteína da matriz extracelular desta produzida por esta bactéria, e se ligam às moléculas de fibronectina [132,133].

Esta redução do número de bactérias aderidas na superfície pode ser atribuída a presença deste polímero que bloqueia a adsorção fibronectina na superfície, devido a fraca interação de van der Waals resultante entre o grupo PEO do F-127 e proteína [134], reduzindo significativamente a adesão e a

consequente formação de biofilmes *in vitro*. Para a amostra contendo apenas fosfato de cálcio, P0% 60°C 1h, nota-se um grande número de *S. aureus* aderido, isso devido as fortes interações que ocorrem entre proteínas e os grupos fosfatos presente no revestimento.

5 CONCLUSÕES

O método de eletrodeposição empregado é de baixo custo e eficaz para obtenção de revestimentos de fosfatos cálcio em substratos metálicos. Na temperatura de 60° C obteve-se uma melhor qualidade de revestimento quando comparada com as demais temperaturas, sendo as amostras produzidas a temperatura ambiente as que apresentaram várias regiões não revestidas.

Foi verificado por meio das imagens obtidas no MEV que a presença do polímero F-127 na solução usada para realização do depósito influencia na morfologia dos cristais.

A presença do polímero em temperaturas de 60°C favorece a formação da fase cristalina do fosfato octacálcico, (OCP). Para algumas das amostras, foi possível identificar o F-127 presente no revestimento, pela técnica de FTIR/ATR.

As soluções com concentrações de 0,0209 mol.L^{-1} de $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e 0,0125 mol.L^{-1} de $NH_4H_2PO_4$ usado no procedimento de eletrodeposição a 60°C favorece a formação da fase de OCP.

Por DRX, foi possível observar que ocorre a formação da fase do fosfato bicálcico anidro (DCPA) a 90ºC, enquanto que a fase fosfato bicálcico dihidratado (DCPD) e fosfato octacálcico é formada a 60°C.

Análise gravimétricas indicam uma quantidade de 7,7% de massa de F-127 presente no revestimento.

Os ensaios microbiológicos com Staphylococcus aureus e as observações obtidas por MEV, revelam que os revestimentos de fosfatos de cálcio obtidos com a adição de F-127 apresentam propriedades antiadesivas, reduzindo cerca de 92% a adesão bacteriana quando comparado com o substrato de Ti sem revestimento.

Os sistemas obtidos podem trazer contribuições para aprimorar dispositivos biomédicos, pois, é mostrado neste trabalho que é possível obter um

controle da morfologia e estrutura cristalina das fases que constituem o revestimento com as condições adequadas durante a realização do processo, bem como se prevenir a possível formação de biofilmes com a redução da adesão bacteriana.

6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- Realizar ensaios que quantifiquem de maneira representativa para toda amostra o número de *S. aureus* aderidos nas amostras produzidas, como os descritos por Traba *et al.* [135], que usa corantes para marcar bactérias e absorção de radiação UV-vis para se estimar o número de bactérias aderidas.
- Investigar a susceptibilidade a proteção contra corrosão do Ti com diferentes tipos de revestimentos (com e sem adição de F-127).
- Produzir e caracterizar amostras com inserção de $AgNO_3$ em diferentes concentrações na solução com finalidade de se inserir íons Ag^+ na estrutura dos fosfatos de cálcio que se formará nos revestimentos, bem como acompanhar possíveis alterações nos parâmetros da rede cristalina por DRX e refinamento Rietveld. Realizar a adsorção de Ag metálica nos revestimentos de fosfatos de cálcio por meio de uma adaptação da metodologia descrita por Bahareh, *et al*. [136], onde é usado o F-127 como estabilizador e redutor de Ag^+ a Ag° por meio de radiação UV e em solução etanólica.
- Realizar ensaios de adesão celular e citotoxicidade (com utilização de fibroblastos e/ou osteoblastos) para se avaliar a influência da morfologia, fase cristalina, da presença do polímero e presença de Ag metálica e iônica no processo de adesão celular.
- Avaliar adesão dos revestimentos, bem como propor tratamento superficiais (químicos, mecânicos ou com uso de corrente , como

a oxidação anódica) do Ti que favoreçam uma melhor adesão do revestimento.

- Realizar ensaios microbiológicos (Uso de cepas de *Staphylococcus aureus*), com algumas amostras para avaliar a influência da morfologia, estrutura cristalina, da prata adicionada, e da presença do polímero no processo de adesão e na proliferação de bactérias.

7 REFERÊNCIAS

[1] Navarro, M.; Michiardi, A.; Castaño, O.; Planell, J.A. Biomaterials in orthopaedics, *J R Soc Interface.* **2008,** 1137–1158.

[2] Oliveira, L. S. de A. F.; Oliveira, C. S.; Machado, A. P.L.;, Rosa, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras, *R. Ci. méd. biol.,* **2010,** 37-44.

[3] Cunha, E. P.; Steiner, M. L.; Strufaldi, R.; Fernandes, C.; Laurindo, I. M. M.; Pereira, R. M. R.; Simões, R. *Osteoporose: Tratamento*, Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia, 2011.

[4] Mears, D. C. Metals in medicine and surgery. *International Metals Reviews*, **1977,** 119-155.

[5] Liu, X.; Chu, P. K.; Ding, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, **2004**, 47, 49-121.

[6] Azevedo, C.R.F.; Hippert jr, E. Análise de Falhas de Implantes Cirúrgicos. *Cadernos de Saúde Pública*, **2002**, 18, 1347-1358.

[7] Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine,* 3rd ed.*;* Academic Press, 2013.

[8] K. Glinel, P. Thebault, V. Humblot, C.M. Pradier, T. Jouenne, Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches, *Acta Biomaterialia*, **2012**, 8, 1670-1684.

[9] Trentin, D. S.; Giordani, R. B.; Macedo, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate, *Revista Liberato*, **2013,** 14, 113-238.

[10] Bridgett, M.J.; Davies, M.C.; Denyer, S.P. Control of staphylococcal adhesion to polystyrene surfaces by polymer surface modification with surfactants, *Biomaterials,* **1992**, 13.

[11] Carvalho, B. C.; Pellizzer, E. P.; Moraes, S. L. D. de; Flacón-Antenucci, R. M.; Júnior, J. S. F. J.Tratamentos de superfície nos implantes dentários *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac.*, **2009,** 9, 123-130.

[12] Chiesa, R.; Giavaresi, G.; Fini, M.; Sandrini, E.; Giordano, C.; Bianchi, A.; Giadiono, R. In vitro and in vivo performance of a novel surface treatment to enhance osseointegration of endosseous implants, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **2007,** 103, 745-756.

[13] Resende, C. X.; Lima, I. R.; Gemelli, E.; Granjeiro, J. M.; Soares, G. de A. Cell adhesion on different titanium-coated surfaces. *Matéria*, [Online] **2010,** 15, 386-391 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-70762010000200041&lng=en&nrm=iso (Acessed Jul 02, 2016).

[14] Zhitomirsky, I. Cathodic electrodeposition of ceramic and organoceramic materials. Fundamental aspects. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2002,** 97, 279 -317.

[15] Rigo, E.C.S.; Oliveira, L.C.; Santos, L.A.; Boschi, A.O.; Carrodeguas, R.G. Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita, *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, **1999**, 15, 21-29.

[16] Cheng, X.L.; Filiaggi, M.; Roscoe, S. G. Biomaterials, **2004,** 25**,** 5395–5403.

[17] Liu, Y.; Hunzikerc, E. B.; Randalld, N.X.; Groot, K. de; Layrolle, P. Biomaterials, **2003,** 24, 65.

[18] Bridgett, M.J.; Davies, M.C.; Denyer, S.P. Control of staphylococcal adhesion to polystyrene surfaces by polymer surface modification with surfactants, *Biomaterials,* **1992**, 13.

[19] Yanbao, L.; Dongxu, L.; Zhongzi, X. Synthesis of hydroxyapatite nanorods assisted by Pluronics, *Journal of Materials Science*, **2009,** 44, 1258-1263.

[20] Moreira, M.; Medeiros, E.A.S.; Pignatari, A.C.C.; Wey, S.B.; Cardo, D.M. Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por Staphylococcus aureus resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização. *Revista da Associação Médica Brasileira*, **1998,** 44, 263-268.

[21] CONSTANTINEUSCU, G. M. Clinical Anatomy for Small Animal Practitioners. 1. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2002, 381p.

[22] Dukes, H. H.; Swenson, M. J. *Fisiologia dos animais domésticos*, 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

[23] Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Molecular biology of the cell.* 2nd ed.; New York: Garland Publishing, 1989.

[24] Velleman, S. G. The role of the extracelular matrix in skeletal development. *Poultry Science*, **2000**, 79, 985-989.

[25] Jordi, M. del C. L.; Rosana, A. S.; Sandra, B. K. Proteolisis enzimática del colágeno dentinario. *Odontoestomatología*, **2010**, 12.

[26] Field, R. A. Ash and calcium as measures of bone in meat and boné mixtures. *Meat Science*, **2000,** 55, 255-264.

[27] Gshalaev, V. S.; Demirchan, A. C. *Hydroxyapatite: synthesis, properties, and applications*, Nova Science Publishers: Inc. + New York, 2012.

[28] <http://pt.slideshare.net/nursemila/aula-tecido-sseo-presentation> (Acesso em 01 de fevereiro de 2016.

[29] Albbe, F. H. Studies in bone growth triple calcium phosphate as stimulus to osteogenesis. *Annuals of Surgery*, **1920,** 71, 32-36.

[30] Costa, A.C.F.M.; Lima, M.G.; Lima, L.H.M.A.; Cordeiro, V.V.; Viana, K.M.S.; Souza, C.V.; Lira, H.L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações.

Revista Eletrônica de Materiais e Processos, [Online] **2009,** 4.3, 29-38 http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/viewFile/105/123 (Acessed Jun 01, 2016).

[31] Kim, H.; Himeno, T.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid", *Biomaterials*, **2005,** 26, 4366-4373.

[32] Elliot, J. C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, London, 1994.

[33] Brown, W. E.; Eidelman, N.; Tomazic, B. Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation. *Adv Mater Res*, **1987,** 1, 306-313.

[34] Yamaguchi, K.; Hirano, T.; Yoshida, G.; Iwasaki, K. Degradation-resistent character of synthetic hydroxyapatite blocks filled in bone defects. *Biomaterials*, **1995,** 16, 983-985.

[35] Nagano, M.; Nakamura, T.; Kokubo, T.; Tanahashi, M.; Ogawa, M. Differences of bone bonding ability and degradation behaviour in vivo between amorphous calcium phosphate and highly crystalline hydroxyapatite coating, *Biomaterials*, **1996,** 17, 1771-1777.

[36] Suzuki, O. Octacalcium phosphate: Osteoconductivity and crystal chemistry. *Acta Biomaterialia*, **2010,** 6, 3379–3387.

[37] Bohner, M.; Theiss, F.; Apelt, D.; Hirsiger, W.; Houriet, R.; Rizzoli, G. Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials,* **2003,** 24, 3463–3474.

[38] Suzuki, O.; Nakamura, M.; Miyasaka, Y.; Kagayama, M.; Sakurai, M. Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. *Tohoku J Exp Med*, **1991,** 164, 37–50.

[39] Tamimi, F.; Torres, J.; Gbureck, U.; Lopez-Cabarcos, E.; Bassett, D. C.; Alkhraisat, M. H. Craniofacial vertical bone augmentation: a comparison between 3D printed monolithic monetite blocks and autologous onlay grafts in the rabbit. *Biomaterials*, **2009,** 30, 6318–6326.

[40] Tamimi, F.; Torres, J.; Bassett, D.; Barralet, J.; Cabarcos, EL. Resorption of monetite granules in alveolar bone defects in human patients. *Biomaterials*, **2010,** 31, 2762–2769.

[41] Suzuki, O.; Nakamura, M.; Miyasaka, Y.; Kagayama, M.; Sakurai, M. Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. *Tohoku J Exp Med,* **1991,** 164, 37–50.

[42] Kamakura, S.; Sasano, Y.; Homma, H.; Suzuki, O.; Kagayama, M.; Motegi, K. Implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat skull defects enhances bone repair. J Dent Res 1999;78(11):1682–7. in collagen matrix. J *Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **2007,** 80, 281–289.

[43] Imaizumi H, Sakurai M, Kashimoto O, Kikawa T, Suzuki O. Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. *Calcif Tissue Int,* **2006,** 78, 45–54.

[44] Barrere, F.; Layrolle, P.; van Blitterswijk, CA.; de Groot K. Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6AI4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg2+ and HCO3. *Bone,* **1999,** 25,107–111.

[45] Kamakura, S.; Sasaki, K.; Honda, Y.; Anada, T.; Suzuki, O. Octacalcium phosphate combined with collagen orthotopically enhances bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **2006,** 79, 210–217.

[46] Kawai, T.; Anada, T.; Honda, Y.; Kamakura, S.; Matsui, K.; Matsui, A. Synthetic octacalcium phosphate augments bone regeneration correlated with its content in collagen scaffold. *Tissue Eng A*, **2009,** 15, 23–32.

[47] Sugihara, F.; Oonishi, H.; Minamigawa, K.; Mandai, Y.; Tsuji, E.; Yoshikawa, M.; Toda, T. Bone tissue reaction of octacalcium phosphate-collagen conjugated sponge. *Bioceramics*, **1996**, 9, 399–402.

[48] Panzavolta, S.; Fini, M.; Nicoletti, A.; Bracci, B.; Rubini, K.; Giardino, R.; et al. Porous composite scaffolds based on gelatin and partially hydrolyzed alphatricalcium phosphate. *Acta Biomater*, **2009,** 5, 636–643.

[49] Aoki, H.; Zasshi, K. G. Synthetic apatite as an effective implant material. *J Stomatol Soc Jpn*, **1973,** 40, 277.

[50] Jarcho, M.; Kay, J.; Gumaer, K.; Doremus, R.; Drobeck, H. Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface. *J Bioeng*, **1977,** 1, 79–92.

[51] de Groot, K.; Geesink, R.; Klein, C. P.A.T.; Serekian, P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res*, **1987,** 21, 1375–1381.

[52] Dekker, R. J.; de Bruijn, J. D.; Stigter, M.; Barrere, F.; Layrolle, P.; van Blitterswijk, C. A. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. *Biomaterials*, **2005,** 26, 5231-5239.

[53] Kanazawa, T. *Inorganic phosphate materials*. 2nd ed. Tokyo: Kodansha, 1989. pp. 79-98

[54] Pavinato, V. P. Estudo da solubilidade de apatitas em meios de interesse biológico. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2012.

[55] Ohta, K.; Kikuchi, M.; Tanaka, J.; Eda, H. *Chem. Lett*. (**2002**), 894.

[56] Marsell, R.; Einhorn, T. A. The biology of fracture healing. *Injury, Bristol*, **2011,** 42, 551-555.

[57] Andia, D. C.; Cerri, P. S.; Spolidorio, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos*. Revista de Odontologia da UNESP*, **2006,** 35, 191-198.

[58] Akers, R. M.; Denbow, D. M. *Bones and Skeletal System. Anatomy & Physiology of Domestic Animals.* Blackwell Publishing: Iowa, 2008.

[59] Tormena, F. V. Um modelo de remodelamento ósseo utilizando potenciais termodinâmicos generalizados. Tese de Doutorado, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

[60] Kini, U.; Nandeesh, B. N. *Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism*, In Radionuclideand Hybrid Bone Imaging, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2012, 29-57.

[61] Henriksen, K.; Neutzsky-Wulff, A. V.; Bonewald, L. F.; Karsdal, M. A. Local communication on and within bone controls bone remodelling. *Elsevier Bone,* **2009,** 44, 1026-10.

[62] Greeen, E.; Lubahn, J. D.; Evans, J. Risks factors treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. Journal of Surgical *Orthopaedic Advances*, **2005,** 14, 64-72.

[63] Oliveira, L. S. de A. F.; Oliveira, C. S.; Machado, A. P.L.;, Rosa, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras, *R. Ci. méd. biol.*, **2010,** 37-44.

[64] Zhao, M.; Song, B.; Pu, J.; Wada, T.; Reid, B.; Tai, G.; Wang, F.; Guo, A.; Walczysko, P.; Gu, Y.; Sasaki, T.; Suzuki, A.; Forrester, J. V.; Bourne, H. R.; Devreotes, P. N.; McCaig, C. D.; Penninger, J. M. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature*, **2006,** 457460.

[65] Ning, C.; Zhou, L.; Tan, G. Fourth-generation biomedical materials, *Materials Today*, **2016,** 19, 2-3.

[66] Ratner, B. D., *et. al*. *Biomaterial Science: an introduction to material in medicine*, 1996.

[67] Borelli, V. Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais: estudo das inter-relações científicas, tecnológicas e normativas. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, São Paulo, 2011.

[68] Cao, Y.; Wang, B. Biodegradation of Silk Biomaterials. *Int. J. Mol. Sci.*, **2009,** 10, 1514-1524.

[69] Puelo, D. A.; Nanci, A. Understanding and controlling the bone-implant interface, *Biomaterials*, **1999,** 20, 2311-2321.

[70] Li, H.; Frith, J.; Cooper-White, J. J. Modulation of Stem Cell Adhesion and Morphology via Facile Control over Surface Presentation of Cell Adhesion Molecules, *Biomacromolecules*, **2014,** 15, 43−52.

[71] Porter, A. E.; Hobbs, L. W.; Rosen, V. B.; Spector, M. The ultrastructure of the plasma-sprayed hydroxyapatite-bone interface predisposing to bone bonding. *Biomaterials*, **2002,** 23, 725–733.

[72] Wang, H.; Eliaz, N.; Xiang, Z.; Hsu, H-P.; Spector, M.; Hobbs, L. W. Early bone apposition in vivo on plasma-sprayed and electrochemically deposited hydroxyapatite coatings on titanium alloy, *Biomaterials*, **2006,** 27, 4192-4203

[73] Pasa, A. A., Munford, M. L. Electrodeposition – Encyclopedia of Chemical Processing. New York: Dekker Encyclopedias, 821-832, 2006.

[74] Lou, H. H.; Huang, Y. Electroplating Encyclopedia of Chemical Processing, chapter 84, 839-848.

[75] Gamburg, Y.D.; Zangari, G. Theory and Practice of Metal Electrodeposition, Springer Science & Business Media, p. 6, 2011.

[76] Vilchenski, M. C.; Silva, G. C.; Benedetti, A. V.; Sumodjo, P. T. A. Electrodeposition of Co and Co-Fe Films on Platinum and on Copper Substrates, *Portugaliae Electrochimica Acta*, **2003,** *21, 33*.

[77] Silva JR., A. Í. da; Araujo Filho, H. da C.; Silva, R. C. Testes de desempenho de eletrodos: eletrodos de referência. *Quím. Nova*, **2000,** 23, 512-517.

[78] Santos, M. C.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. Estudos da eletrodeposição de metais em regime de subtensão. *Quím. Nova*, **2000,** 23, 392-400.

[79] Agostinho, S.M. L.; Villamil, R. F. V.; Neto, A. A.; Aranha, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo, *Quim. Nova,* **2004,** 27, 813-817.

[80] Kumar, M.; Dasarathy, H.; Riley, C., *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (**1999**) 302.

[81] Silva, M. H. P. da; Lima, J. H. C.; Soares, G. A.; Elias, C. N.; de Andrade, M. C.; Best, S.M.; Gibson, I. R. *Surf. Coat. Technol.* 137 (**2001**) 270.

[82] Lin, S.; LeGeros, R. Z.; LeGeros, J. P. *J. Biomed.* Mater*. Res.* 66A (**2003**) 819.

[83] Hu, H. B.; Lin, C.J.; Lui, P.P.Y.; Leng, Y. *J. Biomed. Mater. Res.* 65A (**2003**) 24.

[84] Cheng, X. L. ; Filiaggi, M.; Roscoe, S. G. Electrochemically assisted co-precipitation of protein with calcium phosphate coatings on titanium alloy *Biomaterials*, **2004,** 25, 23.

[85] Liu, Y.; Hunziker, E. B.; Randall, N. X.; de Groot, K.; Layrolle, P. Proteins incorporated into biomimetically prepared calcium phosphate coatings modulate their mechanical strength and dissolution rate, *Biomaterials,* **2003,** 24, 65-70

[86] Lu, X.; Leng, Y.; Zhang, Q. Electrochemical deposition of octacalcium phosphate micro-fiber/chitosan composite coatings on titanium substrates, *Surface & Coatings Technology*, **2008,** 202, 3142–3147

[87] Wu, C. Y.; Sassa, K.; Iwai, K.; Asai, S. Unidirectionally oriented hydroxyapatite/collagen composite fabricated by using a high magnetic field. *Mater. Lett.*, **2007,** 61, 1567–1571.

[88] Shen, X.; Chen, L.; Cai, X.; Tong, T.; Tong, H.; Hu, J. A novel method for the fabrication of homogeneous hydroxyapatite/collagen nanocomposite and nanocomposite scaffold with hierarchical porosity. *J. Mater. Sci: Mater Med.* **2011,** 22, 299-305.

[89] Zhao, Y. F.; Ma, J. Triblock co-polymer templating synthesis of mesostructured hydroxyapatite, *Microporous and Mesoporous Materials*, **2005,** 87, 110-117.

[90] Zhanga, W.; Chaia, Y.; Xua, X.; Wangb, Y.; Cao, N. Rod-shaped hydroxyapatite with mesoporous structure as drugcarriers for proteins, *Applied Surface Science,* **2014,** 322, 71–77.

[91] Danielle, D. de O. F.; Aranha, D. W.; Araujo dos Santos, E.; Resende, C. X.; Almeida, L. E.; Teixeira, Z. Nanostructures of Hydroxyapatite in Pluronic F 127: Preparation and Structural Characterization. *Key Engineering Materials*, **2011,** 493-494, 31-36.

[92] Sun, F.; Zhou, H.; Lee, J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale iocomposites for bone regeneration, *Acta Biomaterialia*, **2011,** 7, 3813–3828.

[93] Mano, E. B., Introdução a plolímeros – 2ª ed. rev. e ampl. – São Paulo: Editora Blücher, 1999.

[94] Devi, D. R.; Sandhya, P.; Hari, B. N. V. Poloxamer: A Novel Functional Molecule For Drug Delivery And Gene Therapy. *J. Pharm. Sci. & Res*., **2013,** 5-8, 159-165.

[95] Dumortier, G.; Grossiord, J. L.; Agnely, F. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research*, **2006,** 23, 2709–2728.

[96] Almeida, H.; Amaral, M. H.; Lobão, P.; Lobo, J. M. S. Pluronic F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): Main Features and their Applications in Topical and Transdermal Administration of Drugs. *J Pharm Pharmaceut Sci* , 2012, 15, 592-605.

[97] Escobar-Chávez, J.; López-Cervantes, M.; Naïk, A.; Kalia, Y. N.; Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar. A. Applications of thermoreversible pluronic f-127 gels in pharmaceutical formulations *Pharm Pharmaceut Sci.*, **2006,** 339-358.

[98] Berthod, A.; Garcia-Alvarez-Coque, C. Micellar Liquid Chromatography *CRC Press*, 2000, p 632.

[99] Myers, D.; *Surfactant Science and Technology*, 3. ed. New York: VCH Publishers, 2006.

[100] Silva, D. S. da; Ribeiro, M. E. N. P.; Nogueira, R. B. M.; Oliverira, S. A. de; Trevisan, M. T. S.; Ricardo, N. M. P. S. Copolímeros triblocos do tipo p123 e f127 e suas misturas: Solubilização da griseofulvina e mangiferina; *Anais do 9° Congresso Brasileiro de Polímeros*.

[101] Schmolka, I. R. *Poloxamers in the pharmaceutical industry*. In: Tarcha, P.J. Polymers for Controlled Drug Delivery. cap. 10, p.189-214.CRC Press: Boca Raton, 1991.

[102] Wanka, G.; Hoffmann, H.; Ulbricht, W. Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. *Macromolecules,* **1994**, *27*, 4145–4159.

[103] Fairclough, J. P. A.; Norman, A. I. Structure and rheology of aqueous gels *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem*., **2003,** 99, 243-276.

[104] Veyries ML, Faurisson F, Joly-Guillou ML, Rouveix B. Control of staphylococcal adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by poloxamer 407. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000,** 44, 1093-1096

[105] Costerton, J. W.; Lewandowski, Z. Microbial biofilmes. *Annual Review of Microbiology*, **1995,** 49, 711-745.

[106] Drenkard, E. Antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **2003**, 5, 1213-1219.

[107] Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* **2006,** 27, 2331-2339.

[108] Harris, L. G.; Tosatti, S.; Wieland, M.; Textor, M.; Richards, R. G. Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptidefunctionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials*, **2004,** 25, 4135-4148.

[109] Poelstra, K. A.; Barekzi, N. A.; Rediske, A. M.; Felts, A. G.; Slunt, J. B.; Grainger, D. W. Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. *J Biomed Mater Res,* **2002,** 60, 206-215.

[110] Ploux, L.; Ponche, A.; Anselme, K. Bacteria/material interfaces: role of the material and cell wall properties. *J Adhes Sci Technol*, **2010,** 24, 2165-2201.

[111] Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials*, **2013,** 34, 8533-8554.

[112] Rowe, R.; Sheskey, P.; Owen, S. *Pharmaceutical Handbook of Pharmaceutical of Pharmaceutical Excipients*, 5th Ed. London UK and American Pharmaceutical Association, Washington, USA, 2005.

[113] Chi, S. Ch.; Do, K.; Tan, H. K.; Chun, H. W. Anti-inflammatory and analgesic transdermal gel, *United States Patents.*, Patent number 5,527,832, 1996.

[114] Al Kayal, T.; Panetta, D.; Canciani, B.; Losi, P.; Tripodi, M.; Burchielli, S.; Ottoni, P.; Salvadori, P. A.; Soldani, G. N.; Syam. Evaluation of the Effect of a Gamma Irradiated DBM-Pluronic F127 Composite on Bone Regeneration in Wistar Rat. *PLoS ONE*, **2015,** 10, 1-19.

[115] Barbieri, D.; Yuan, H.; de Groot, F.; Walsh, W. R.; de Bruijn, J. D. Influence of different polymeric gels on the ectopicbone forming ability of an osteoinductive biphasic calcium phosphate ceramic. *Acta Biomater,* **2011,** 7, 2007–2014.

[116] *Performance Standards for antimicrobial disc susceptibility tests*, Approved standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

[117] Zhao, L.; Hu, Y.; Xu, D.; Cai, K. Surface functionalization of titanium substrates with chitosan–lauric acid conjugate to enhance osteoblasts functions and inhibit bactéria adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2014,** 119, 115–125.

[118] Harrisa, L.G.; Tosattib, S.; Wielandc, M.; Textorb, M.; Richardsa, R. G. Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(l-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials*, **2004,** 25, 4135–4148.

[119] Zhang, Y.; Tao, J.; Pang, Y.; Wang, W.; Wang, T. Electrochemical deposition of hydroxyapatite coatings on titanium. *Trans. Nonferrous Met. SOC. China*, **2006,** 633-637.

[120] Thanh, D. T. M. Nam, P. T.; Phuongm N. T.; Anh, N. V.; Hoang, T.; Lam, T. D. Controlling the electrodeposition, morphology and structure of hydroxyapatite coating on 316L stainless steel. *Materials Science and Engineering: C*, **2013,** 33, 2037-2045.

[121] Mandel, S. A.; Tas, C. Brushite (CaHPO4·2H2O) to octacalcium phosphate (Ca8(HPO4)2(PO4)4·5H2O) transformation in DMEM solutions at 36.5 °C, *Materials Science and Engineering: C*, **2010,** 30, 245-254.

[122] Lu, X.; Wang, Y.; Wang, J.; Qu, S.; Weng, J.; Xin, R.; Leng, Y. Calcium phosphate crystal growth under controlled environment through urea hydrolysis. *Journal of Crystal Growth,* **2006,** 297, 396-402.

[123] Al Kayal, T.; Panetta, D.; Canciani, B.; Losi, P.; Tripodi, M.; Burchielli, S.; Ottoni, P.; Salvadori, P. A.; Soldani, G. N.; Syam. Evaluation of the Effect of a

Gamma Irradiated DBM-Pluronic F127 Composite on Bone Regeneration in Wistar Rat. *PLoS ONE*, **2015,** 10, 1-19.

[124] Drouet, C. Apatite formation: Why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds. *BioMed Research International*, **2013,** 2013, 12 pages.

[125] Yan, Y.; Zhang, X.; Huang, Y.; Ding, Q.; Pang, X.; Antibacterial and bioactivity of silver substituted hydroxyapatite/TiO2 nanotube composite coatings on titanium, *Applied Surface Science*, **2014,** 314, 348-357.

[126] Shojai, M. S.; Khorasani, M. T.; Jamshidi, A. Hydrothermal processing of hydroxyapatite nanoparticles – A Taguchi experimental desidn approach. *Journal of Crystal Growth,* **2012,** 361, 73-84.

[127] International Centre for Diffraction Data, ICDD: OCP – 79-0123; DCPD – 09-0077; DCPA – 70-0359.

[128] Drive, M., *Coatings for Biomedical Applications*, Woodhead Publishing Limited, 2012.

[129] Guastaldi, A. C.; Aparecida, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quím. Nova*, **2010,** 33, 1352-1358.

[130] Miyazaki, T.; Sivaprakasam, K.; Tantry, J.; Suryanarayanan, R. Physical characterization of dibasic calcium phosphate dihydrate and anhydrate. *J Pharmacol Sci,* **2009,** 98, 905-916.

[131] Chow, L. C.; Eanes, E. D. *Octacalcium Phosphate*, Karger Publisher, 2001.

[132] Sinha, B.; Francois, P.; Que, Y. A.; Hussain, M.; Heilmann, C.; Moreillon, P.; Lew, D.; Krause, K.; Peters, G.; Herrmann, M. Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect. Immun.,* **2000,** 68, 6871-6878.

[133] Vaudaux, P. E.; Waldvogel, F. A.; Morgenthaler, J. J.; Nydegger, U. E. Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of Staphylococcus aureus adherence. *Infect. Immun.,* **1984,** 45, 768-774.

[134] Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; De Gennes, P. G. Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide, *Journal of Colloid and Interface Science*, **1991,** 142, 149-158.

[135] Traba, C.; Liang, J. F. Susceptibility of Staphylococcus aureus biofilms to reactive discharge gases. *Biofouling*, **2011,** 27, 763-772.

[136] Yahyaei, B.; Azizian, S. Rapid photogeneration of silver nanoparticles in ethanolic solution: A kinetic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2013,** 101, 343-348.