



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES (IPEN)

FOLHA DE ROSTO - **RELATÓRIO CIENTÍFICO**

A handwritten signature in blue ink, reading 'Felipe Antunes Santos', is positioned above the name.

Bolsista: FELIPE ANTUNES SANTOS

A handwritten signature in blue ink, reading 'Sonia Regina Homem de Mello Castanho', is positioned above the name.

Supervisora: SONIA REGINA HOMEM DE MELLO CASTANHO

**Recobrimentos vítreos biofuncionais para implantes médicos e odontológicos**

São Paulo – SP

2017



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES (IPEN)

## **RELATÓRIO CIENTÍFICO**

Bolsista: FELIPE ANTUNES SANTOS

Supervisora: SONIA REGINA HOMEM DE MELLO CASTANHO

**Recobrimentos vítreos biofuncionais para implantes médicos e odontológicos**

São Paulo – SP

2017

# PROJETO DE PESQUISA DE PÓS-DOCTORADO

Bolsista: Felipe Antunes Santos

Supervisora: Sonia Regina Homem de Mello Castanho

Recobrimentos vítreos biofuncionais para implantes médicos e odontológicos

## 1 - RESUMO DO PLANO DE TRABALHO

O projeto tem como proposta desenvolver um material vítreo para recobrimento da superfície de biomateriais metálicos. Atualmente os biomateriais metálicos mais empregados nas áreas médica e odontológica são o titânio e suas ligas, aço inox e ligas cobalto-cromo. Mesmo quando apresentam boas características osseointegradoras (materiais biocompatíveis) muitos dos implantes estão sujeitos a infecções durante e no pós-operatório. Ações que visem simplificar e proteger essas intervenções cirúrgicas tem sido alvo de concentração de esforços tanto da pesquisa científica como do setor produtivo. Desenvolver materiais capazes de acelerar os mecanismos de osseointegração constitui em importante contribuição. Em adição, a possibilidade de acrescentar funções de proteção à infecção bacteriológica (materiais com ação biocida) nestes procedimentos abre um novo horizonte de desenvolvimento para materiais multifuncionais voltados à implantologia. Nesta proposta é destaque o caráter multifuncional dos materiais de recobrimento, obtidos a partir de compósitos de matriz vítrea, que apresentem resposta positiva na ação de ambas as funções, biocompatibilidade e biocida. Aplicando-se os conceitos termodinâmicos para o planejamento de composições, serão estudados vidros pertencentes ao sistema  $\text{CaO}-\text{Na}_2\text{O}-\text{SiO}_2-\text{M}$ . Os metais possivelmente testados serão o Ag, Cu, Nb, W, Ta ou Zr, os quais têm demonstrado bons resultados de biocompatibilidade. O desafio científico e tecnológico desta proposta é integrar de forma eficaz funções dissimilares como a osseointegração e ação biocida em um único material, contribuindo no processo de recuperação de pacientes.

Deste modo será importante comparar composições, estudar as diversas atuações dos metais em relação às bioatividades, tais como, citotoxicidade e taxa de dissolução no ambiente corpóreo, além do que se refere ao comportamento físico, como propriedades mecânicas, molhabilidade e expansão térmica dos materiais em contato (vidro/substrato).

## 1.2 ETAPAS REALIZADAS NO TRABALHO

As etapas contidas na Figura 1 abaixo representam, em forma de diagrama, a sequência realizada no plano de trabalho.

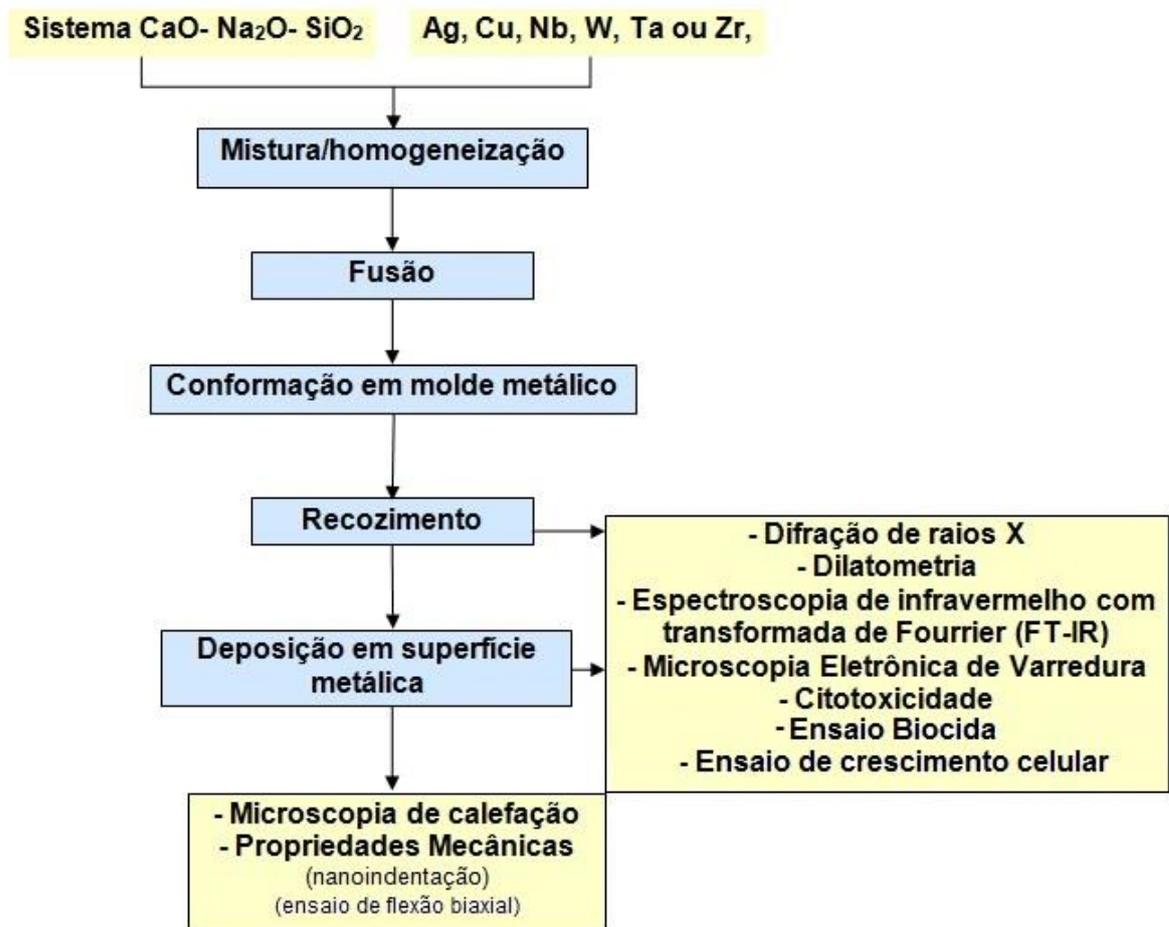


Figura 1 – Diagrama de blocos que apresenta as etapas cumpridas ao longo do trabalho para a produção do material de recobrimento multifuncional.

## 2 - RESUMO DO QUE FOI REALIZADO

Em paralelo aos cálculos realizados para a obtenção de uma composição otimizada que se adequasse aos parâmetros propostos no projeto, a matéria-prima e alguns equipamentos foram sendo conseguidos e/ou reparados. Nosso laboratório já possuía matéria-prima base para o vidro em questão, porém o nióbio (Nb) de alta pureza foi conseguido em parceria com a Escola de Engenharia de Lorena (EEL) da USP, através do Professor Durval Rodrigues Junior.

Também foi necessário que se trocasse o termpar do forno, para sua regularização. Assim, iniciou-se o processo de fusão, porém a contaminação pelos cadinhos de alumina exigiu que o trabalho se seguisse com o cadinho de platina. O cadinho disponível de platina apresentou um furo, e teve de ser reformado; a empresa responsável foi a *Platimex*.

Além do estudo da composição e fusão dos vidros, para a primeira fase dos trabalhos também foram realizadas análises por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), caracterizações iniciais por difratometria de raios X, ensaio de citotoxicidade e análise térmica.

O projeto foi realizado em parceria com a *Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM) - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)*, Madrid, Espanha. O ponto em comum para a definição das agendas foi definido de maneira a possibilitar a participação – quase que simultaneamente - na *International Conference of European Ceramic Society (Ecers)*, que também aconteceu na Espanha, próximo a Madrid, na cidade de Toledo. A conferência do Ecers aconteceu de 21 a 25 de junho de 2015, e precedeu a visita à UAM.

Foram realizadas nesta segunda fase em parceria com o ICMM: tratamentos térmicos das pastilhas dos materiais calculados posicionados em cima dos possíveis substratos em diferentes atmosferas e temperaturas, análises microestruturais utilizando microscopia (eletrônica, óptica e de calefação), parte das caracterizações por difratometria de raios X, dilatometria, avaliação da aderência, atividade biocida e simulação de um novo recobrimento por dipping.

Além de levar uma prévia do trabalho ao Ecers, uma discussão preliminar de parte mais evoluída do trabalho aconteceu na *International Conference & Exhibition on Advanced & Nano Materials (Icanm)*, que foi realizada em Ottawa, Canadá, de 12 a 14 de agosto de 2015.

Na parte/ano final do trabalho um artigo completo na revista científica *Materials Letters* foi publicado; também requerido o pedido de patente junto ao INPI através do IPEN-FAPESP; além da exposição do trabalho (referente a este projeto de pós doutorado) – e apresentado por parceiros/coautores do trabalho – nos eventos: *6th International Congresso on Ceramics*, 2016, realizado em Dresden, Alemanha (rendendo o prêmio de 3º melhor pôster do evento); e *Pan American Materials Congress: Advanced Biomaterials*, 2017, realizado em San Diego, Estados Unidos da América.

Para os mais novos resultados seguiu-se a pareceria com o ICMM-CSIC, e, escolhida a melhor composição para a sequência, foi realizado um estudo mais aprofundado sobre o recobrimento dos substratos que apresentaram melhor aderência. Para tal, foram analisadas as seguintes características (para o vitrocerâmico, e não mais para o vidro): adesão, deposição da camada e escolha da melhor espessura, propriedade mecânica por dureza Vickers dos substratos antes e depois dos tratamentos térmicos, análise de flexão biaxial do material de recobrimento, análise micrográfica/morfológica por microscopia ótica e eletrônica, ensaio biocida e análise por FTIR.

Por fim, novamente no IPEN – e com as amostras recobertas e o material tratado termicamente -, foram realizados ensaios de citotoxicidade e crescimento celular; parte fundamental para o entendimento da multifuncionalidade da camada proposta.

### **3 – PROGRESSOS REALIZADOS E RESULTADOS**

#### **3.1 – ENUNCIADO DO PROBLEMA E DESAFIO TECNOLÓGICO**

A demanda por biomateriais que interajam e forneçam resposta adequada ao meio corpóreo é crescente (ZHOU, 2008) e, portanto, a necessidade de desenvolver alternativas, seja do ponto de vista de processo ou do ponto de vista de composição, na busca de materiais que apresentem melhor interação com tecidos vivos, também se torna crescente.

Entre as principais aplicações desses biomateriais está a utilização como próteses e implantes, em ambos os casos estando em contato direto com os fluidos corpóreos. Muitos dos problemas mais recorrentes relacionados à introdução de uma prótese no corpo humano ocorrem no período pós-cirúrgico, e em geral motivados, pela introdução acidental de organismos contaminantes durante a cirurgia, ou ainda mais tardiamente, pela migração de bactérias providas de outros locais do corpo do paciente que eventualmente já apresente quadro infeccioso (SBQ, 2012). Com o observado aumento da expectativa de vida em termos mundiais, destacadamente o Brasil (IBGE, 2012), é consequente que o crescimento da demanda por próteses na população da terceira idade aumente, aumentando-se também, proporcionalmente, os quadros de infecções. Justificado pelo fato de que aproximadamente 10% dos homens e 20% das mulheres idosas possuem infecções por bactérias na urina. E que também é comum o risco por infecção pulmonar, periodôntica, diabete, entre outros (SBQ, 2012). Anualmente, os custos com tratamentos das doenças infecciosas chegam a bilhões (CRAMTON, 2001; DONLAN, 2002; BOZIC, 2005).

Frequentemente, a solução no tratamento de infecções crônicas dos implantes ou próteses, principalmente nos de quadril, é a introdução de cimentos impregnados com antibióticos. Contudo existe uma grande controvérsia em relação a esse método, e por tanto os riscos versus benefícios, como por exemplo, elevado custo, alto risco de que os microrganismos desenvolvam resistência frente ao antibiótico e possível falha mecânica em longo prazo, devem ser levados em consideração para cada grupo de pacientes (BLOCK, 2005; DUNBAR, 2009; HANSSSEN, 2004; JIRANEK, 2006; JOSEPH, 2003; NAMBA, 2009; JIRANEK, 2005; JUNG, 2009).

No campo dos implantes odontológicos, mais de 10% das implantações gera periimplantite, uma infecção que representa o risco mais importante de perda óssea, além de promover uma pobre osseointegração, levando à perda do implante (PYE, 2009; FLORES,

2010). A Figura 2 mostra uma infecção bacteriana (periimplantite) ao redor de um implante inserido.



Figura 2 – Imagem da infecção bacteriana (periimplantite) em volta de um implante inserido.

Atualmente, no Brasil, o implante metálico mais utilizado é o de aço inoxidável 316 LVM (ELIAS, 2008; FONSECA, 2005). Porém o aço inoxidável não é promotor da osseointegração, com se observa em ligas com o titânio (FLORES, 2010). Este último, que também será utilizado no presente trabalho, apresenta ainda a vantagem de menor peso. Desta forma, recobrimentos biocompatíveis, capazes de contribuir na osseointegração, associada à atividade biocida, resulta na redução da taxa de problemas associados aos procedimentos cirúrgicos e pós-cirúrgicos. Este fato, certamente constitui uma possibilidade de extrema utilidade tecnológica e mercadológica, não só em termos nacionais como internacionais. Estudos realizados pelo grupo de pesquisa do IPEN, em parceria com o grupo de pesquisa da ICMM-CSIC, mostraram, que as composições desenvolvidas em nossos laboratórios, apresentaram atividade biocida, com grande potencial para aplicações em próteses metálicas. Estudos detalhados sobre estas pesquisas e desenvolvimentos se encontram divulgados na literatura (SILVA, A.C., 2004; SILVA, A.C., 2008; MOYA, 2012; MOYA, 2011; ESTEBAN-TEJEDA, 2012).

Por outro lado, o titânio apresenta boas características de biocompatibilidade e atividade osseointegradora e, estabilidade química, devido à formação de uma película

oxidada em sua superfície. Deste modo, é viável recobrir essa superfície com um biovidro biocida, haja vista que esse último pode ser planejado de forma a apresentar compatibilidade química e adesão mecânica com a película superficial da matriz de titânio.

Diante da diversidade dos problemas/desafios pertinentes a este intento, o presente projeto desenvolveu composições de biovidros capazes de contemplar as aplicações supracitadas, apresentando características biocompatíveis e atividade biocida. Algumas outras composições vêm sendo estudadas e mostram grande eficiência nessa ação (MOYA, 2012; MOYA, 2011; ESTEBAN-TEJEDA, 2012).

Deste modo, com procedimentos e composições controladas, se pretendeu obter uma nova família de implantes multifuncionais, com melhores desempenhos e com uma vida útil superior a esperança de vida dos pacientes. Em adição, se espera que o projeto tenha um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, reduzindo os riscos associados à substituição de próteses articuladas e ortodônticas devido a infecções, que é atualmente um dos fatores mais preocupantes e importantes na implantologia.

Diante do exposto foi necessário que a superação de alguns desafios tecnológicos, e o projeto teve os seguintes, como dois dos principais: planejamento de materiais funcionais a partir de dados termodinâmicos utilizando-se os diagramas de equilíbrio do sistema; e a produção de vidros com o nióbio incorporado. Essas composições devem ser capazes de atuarem como materiais biocompatíveis e/ou com atividade biocida. É sabido que algumas composições pertencentes ao sistema em estudo, sem adição de metal, podem apresentar por si próprias a atividade biocida. Porém, o desafio em questão, foi encontrar composições adequadas para sobrepor possíveis dificuldades na obtenção de um ângulo de molhabilidade adequado (vidro/substrato). Esse desenvolvimento implicou na sugestão de um novo produto de grande importância no campo médico e odontológico em âmbito mundial com potencial para aliar o uso de uma matéria-prima com reserva expressiva no país, como é o caso do nióbio, como agente funcional.

A superfície do biomaterial é de extrema importância em sua aplicação, pois responde ao primeiro contato com o tecido vivo quando o material é colocado no corpo. Por essa razão os estudos relacionados às superfícies nestes materiais têm expandido muito rapidamente (OLIVARES-NAVARRETE, 2011). A corrosão é um dos fatores considerados de grande importância no tempo de vida do material. Por essa razão metais como ligas a base de Co-Cr e Ti são largamente aplicadas a esse mercado. Porém ainda existe pouca informação em relação à biocompatibilidade de outros metais que são refratários e que também possuem boa resistência à corrosão, como Ta, Nb e Zr (KAWAHARA, 1963; STEINEMANN, 1980;

JACOBS, 1998). As respostas de biocompatibilidade têm se mostrado satisfatórias para esses metais, como o próprio Nb - incorporado ao vidro de recobrimento - proposto neste plano de trabalho (OLIVARES-NAVARRETE, 2011). Esse fato configura em uma grande abertura e desafio para o desenvolvimento tecnológico no campo dos biomateriais.

Outro ponto bastante importante é aliar as funções propostas anteriormente, tendo como base o controle da composição, com o caráter não tóxico do material. A expansão térmica dos materiais de interface também é um fator de extrema importância a ser controlado. Mesmo com adequada molhabilidade do vidro na superfície do biomaterial é necessário que os materiais, de recobrimento e substrato, tenham expansões térmicas próximas, evitando assim problemas por tração e compressão entre as camadas.

Em estudos realizados recentemente observou-se que o ângulo de molhabilidade entre materiais dissimilares, como um biovidro e um substrato, é acentuadamente dependente da concentração das fases presentes, como é apresentado na Figura 3 (ESTEBAN-TEJEDA, 2012).

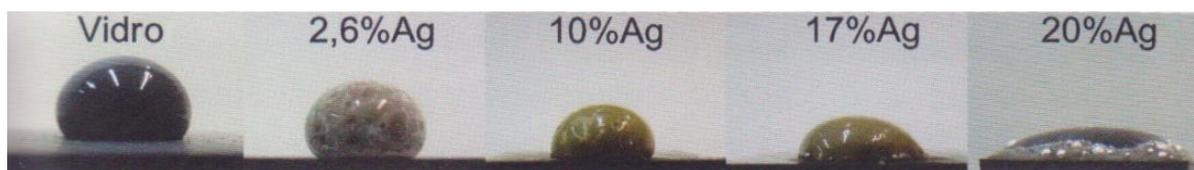


Figura 3 - Pseudoesferas de vidro com diferentes porcentagens de Ag sobre a superfície de titânio.

Por outro lado, a temperatura durante o processo de recobrimento e adesão entre estes materiais também irá interferir no ângulo de molhabilidade e evidentemente nas características de fluxo do vidro como se ilustra nos resultados dos ensaios de microscopia com dilatômetro acoplado (microscopia de calefação), na Figura 4. Verifica-se, nesta figura, que tanto a temperatura de início de deformação como a de formação de semiesfera varia sensivelmente com o tipo de metal presente na matriz vítrea.

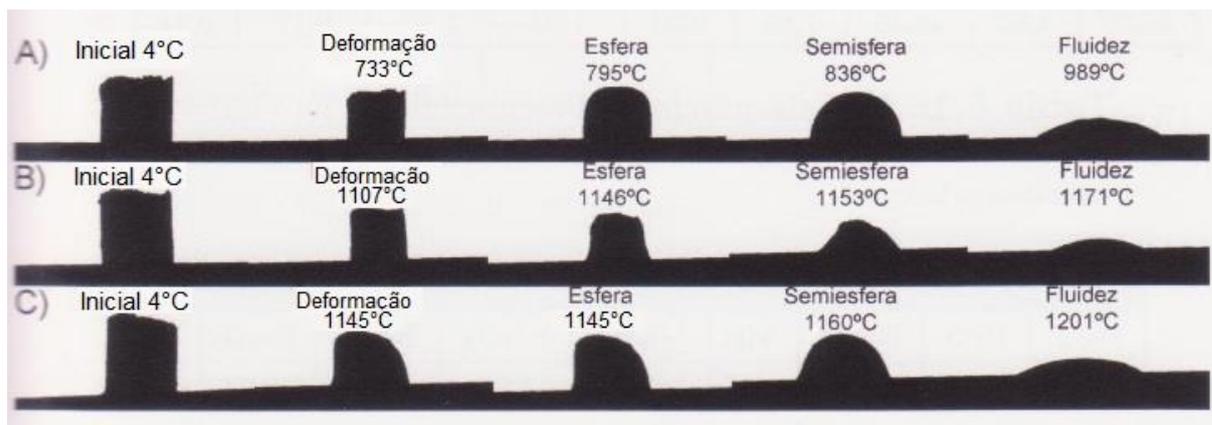


Figura 4 – Comportamento de molhabilidade e fluidez com a temperatura para os vidro: (A) com 20% de Ag, (B) com 20% de Cu e (C) com 20% de Cu<sub>incorporado</sub>. Substrato de titânio (ESTEBAN-TEJEDA, 2012).

Neste projeto, acompanhou-se o comportamento em matrizes com metal diferente dos estudados por Esteban-Tejeda (2012) utilizando-se técnicas similares. Onde o planejamento das composições teve como foco reduzir as temperaturas de adesão das superfícies, sem comprometer as ações esperadas para ambos os materiais.

### 3.2 – DESENVOLVIMENTO E RESULTADOS

A primeira parte do projeto, que implica na mistura e sequente fusão para produção do vidro, foi baseada em cálculos para obtenção das porcentagens adequadas entre o metal e o sistema CaO – Na<sub>2</sub>O – SiO<sub>2</sub>. O projeto indicava alguns metais como possibilidades na mistura em questão. A opção, também explicada no projeto proposto, foi pelo nióbio (Nb), isso porque o metal cada vez mais se apresenta como uma alternativa interessante em aplicações biomédicas. O comportamento relativo às respostas biológicas que o Nb tem apresentado, sobretudo na osteointegração, chama a atenção para um aprofundamento no estudo de sua utilização (OLIVARES-NAVARRETE, 2011); paralelo a este fato encontramos no Brasil a maior reserva desse metal no planeta.

#### 3.2.1 – Estudo da composição química e fusão do vidro

Além da análise realizada com a auxílio do diagrama de fases do sistema A-B-C (SiO-CaO-Na<sub>2</sub>O), ilustrado na Figura 5, em diversas composições do sistema realizada pelo grupo (SILVA, A.C., 2004; MARIALVA NETO, 2005; SILVA, A.C., 2008), o ajuste da

composição química do material vítreo foi desenvolvido levando em consideração fatores como fluidez, dilatação térmica, estabilidade química e atividade biocida

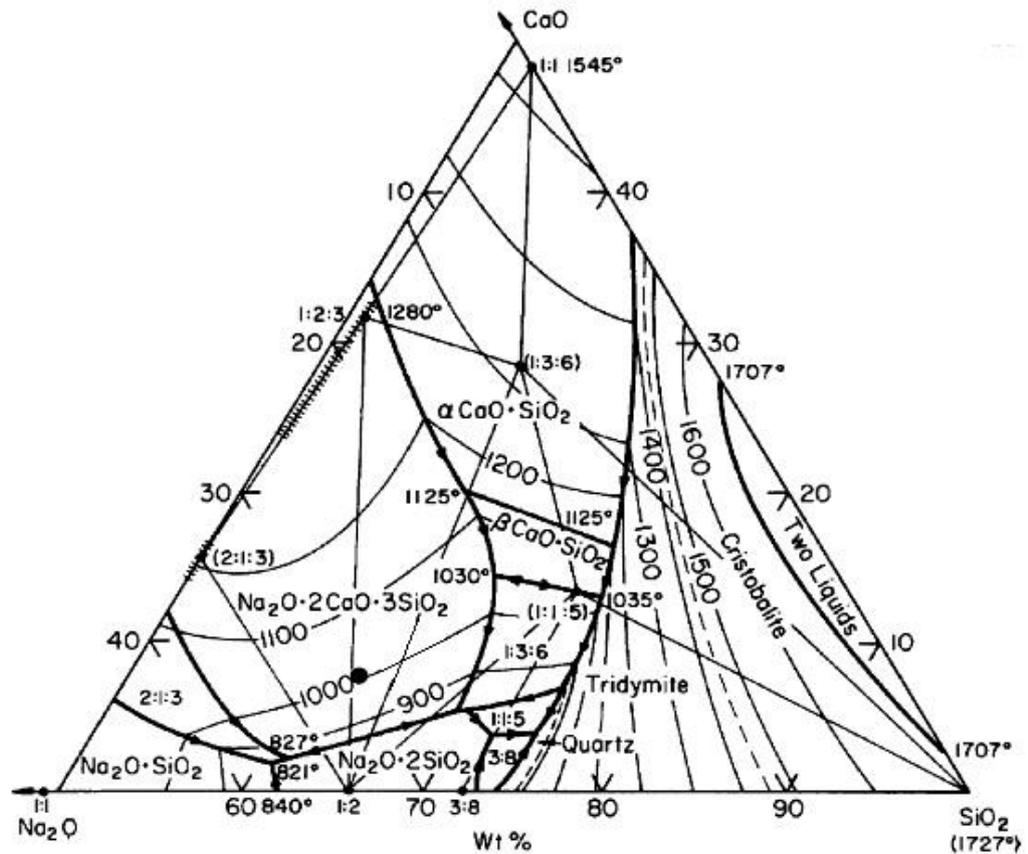


Figura 5 – Diagrama de fases do sistema A-B-C (SiO-CaO-Na<sub>2</sub>O) (ROTH, 1996).

Os cálculos de composição seguiram os estudos e publicações mais recentes do grupo.

A Figura 6 mostra a região escolhida e limitante para que, segundo Silva et al., o cálcio possua efeito percolativo, podendo assim contribuir no comportamento biocida, proposto neste projeto. Foi utilizado Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> no lugar do R<sub>2</sub>On do diagrama ternário da figura - estado mais provável de oxidação do Nb.

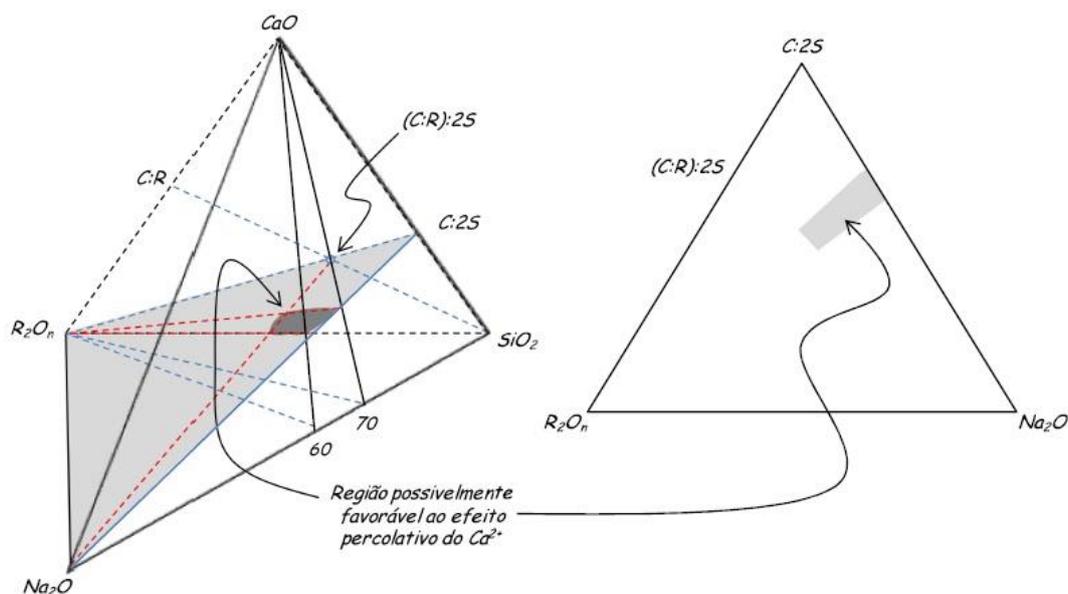


Figura 6 – Representação em diagramas de composição da região definida para o provável efeito percolativo do cálcio em vidros soda-cal modificados por  $R_2O_n$  (SILVA, A. C. 2014).

Uma vez escolhidos, a seleção do metal e cálculo das melhores composições, as matérias-primas foram pesadas, misturadas e a fusão das duas composições, otimizadas, os vidros foram produzidos, para o estudo de seus comportamentos.

A Tabela 1 mostra as duas composições calculadas e produzidas e o nome de cada uma dessas amostras.

Tabela 1 – composições calculadas.

Composição	T15C(Nb) -% massa	T20C(Nb) -% massa
SiO <sub>2</sub>	43,71	39,47
Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	14,52	16,52
Na <sub>2</sub> O	25,25	23,14
CaO	13,68	18,06
K <sub>2</sub> O	0,92	0,91
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,84	1,81
Outros	0,09	0,09

Para a fusão foi utilizado cadinho de platina reformado com ajuda da reserva técnica do projeto. Uma parte do processo pode ser visualizada pelas etapas Figura 7.



(a)



(b)

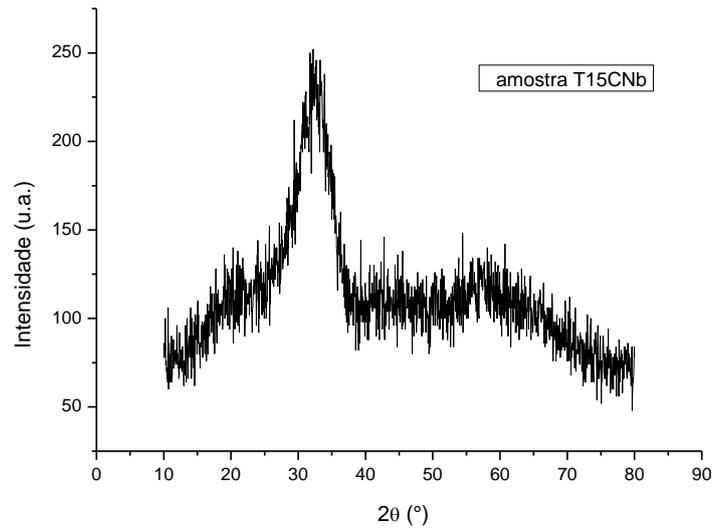


(c)

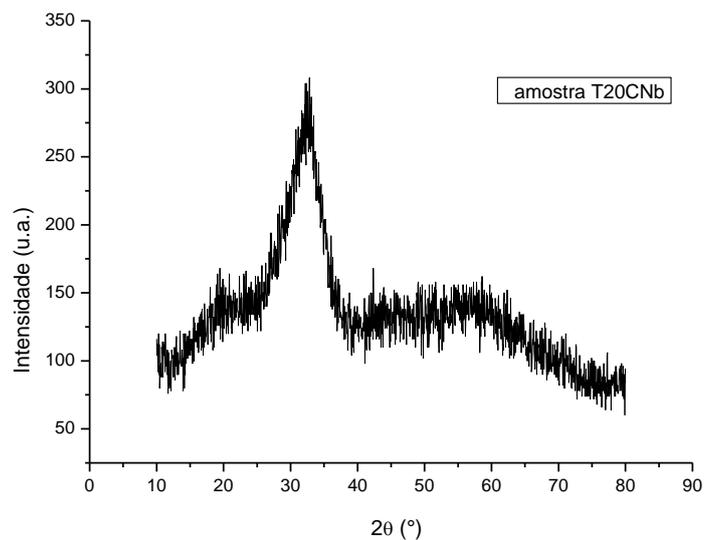
Figura 7 – A mistura de pós é colocada em cadinho de platina em etapas para completa homogeneização, e então o fundido é retirado do forno e em seguida vertido no molde metálico, como a sequência (a), (b) e (c).

### 3.2.1.1 –Caracterização estrutural dos vidros por DRX

Após a produção iniciou-se a caracterização desses materiais, submetendo-os à técnica de difratometria de raios X (DRX) com radiação  $\text{Cu-K}\alpha$  (1,5418 Å), varredura entre  $10^\circ$  e  $80^\circ$ , e aplicando-se passo angular de  $0,05^\circ$  com 2s de contagem por ponto, conforme Figura 8.



(a)



(b)

Figura 8 – Espectros de difração de raios X obtidos a partir das amostras de composições T15CNb (a) e T20CNb (b).

É possível notar o comportamento predominantemente amorfo de ambas as amostras. Porém, apesar da nítida característica amorfa que o difratograma apresenta, há um pronunciamento, em forma de pico, por volta de 32°, que, de acordo com o *Powder Diffraction File*, pode representar a presença de óxidos de nióbio na rede, como mostra a Figura 9.

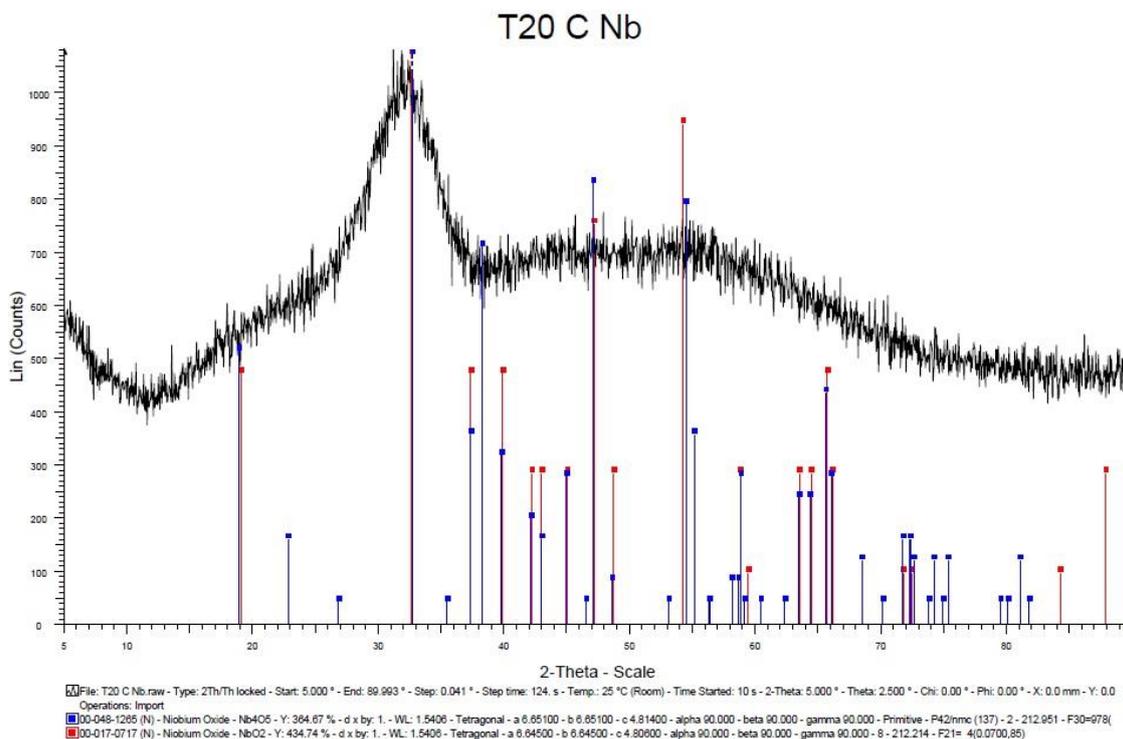


Figura 9 – Espectro de difração de raios X, com picos indexados de  $\text{Nb}_4\text{O}_5$  e  $\text{NbO}_2$  a partir da composição T20CNb.

### 3.2.1.2 – Citotoxicidade dos vidros

Amostras relativas às 2 composições foram submetidas aos testes de citotoxicidade, para verificar se há viabilidade celular nas composições propostas.

A Figura 10 mostra os resultados obtidos relativos aos ensaios de citotoxicidade para as amostras das composições T15CNb e T20CNb. Este teste é uma forma de avaliação biológica *in vitro*, qual se utilizam extratos dos materiais a serem testados em contato com uma cultura de células de mamíferos, em microplacas para cultura celular. Neste trabalho, a avaliação da citotoxicidade foi realizada utilizando-se o método de incorporação do corante vital vermelho neutro (HABIBE, A.F., 2009). O ensaio foi realizado nos laboratórios do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN, pela pesquisadora Sizue Ota Rogero.

Observa-se que tanto a amostra T15CNb quanto a T20CNb apresentaram comportamento não citotóxico, evidenciando, inclusive, um pequeno crescimento celular em comparação com a quantidade inicial; com uma diferença sutil no crescimento celular da amostra T15CNb em relação a T20CNb (o controle positivo mostra inviabilidade celular, ou seja, tem comportamento citotóxico, enquanto que o controle negativo é não citotóxico, como aqui, no presente trabalho, se pretende).

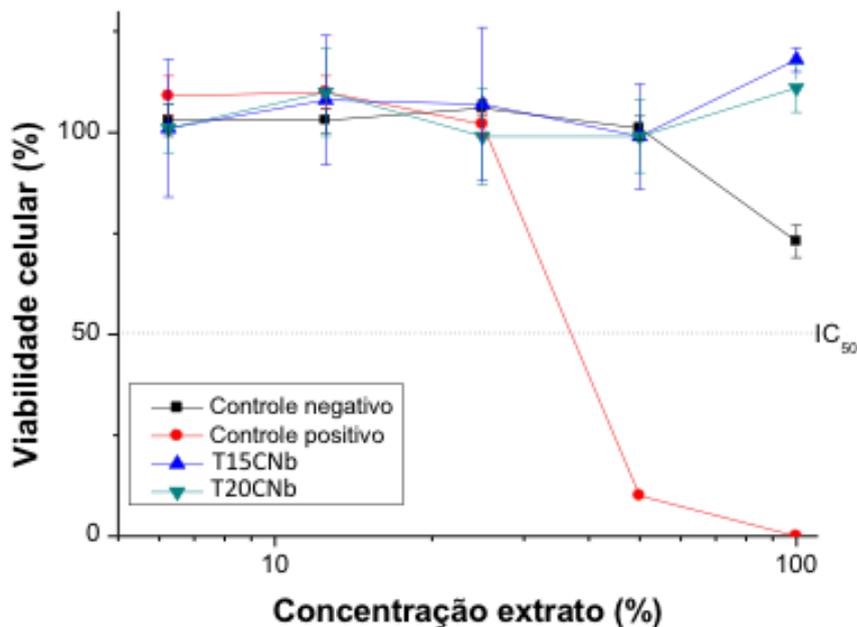
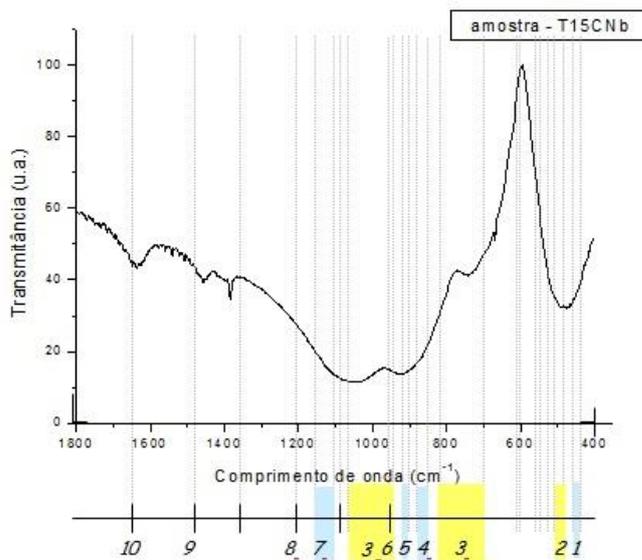


Figura 10 - Curvas de Viabilidade Celular obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro para os vidros de recobrimento.

### 3.2.1.3 – Espectrometria no Infravermelho com transformada de Fourier, FTIR, para os vidros estudados

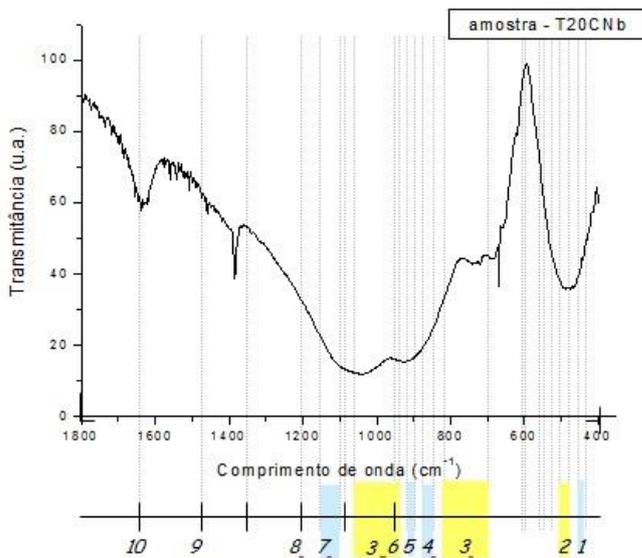
Análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas utilizando o equipamento *Thermo Nicolet* modelo *Nexus 870 FT-IR*. A FTIR permite identificar espécies químicas e, sobretudo, grupos funcionais como resultado da interação com a energia relativa ao feixe da fonte de infravermelho incidente sobre eles (KOENDERINK, R. H., 2000; SIGOLI, F. A., 2001; GUO, G., 1996; MACDONALD, S.A., 2000; ZAYAS, M. E., 2003; LÓPEZ, A., 2002)

Na Figura 11 temos os FTIR das amostras T15CNb e T20CNb.



1. Si-O-Si [Q<sup>4</sup>]
2. Óxidos metálicos segregados
3. Silicatos de metais
4. Si-O[NB],[Q<sup>0</sup>]
5. Si-O[NB],[Q<sup>1</sup>]
6. Si-O[NB],[Q<sup>2</sup>]
7. Si-O[NB],[Q<sup>3</sup>]
8. Si-O,[Q<sup>4</sup>]
9. Na-O
10. Água estrutural (1640)

(a)



1. Si-O-Si [Q<sup>4</sup>]
2. Óxidos metálicos segregados
3. Silicatos de metais
4. Si-O[NB],[Q<sup>0</sup>]
5. Si-O[NB],[Q<sup>1</sup>]
6. Si-O[NB],[Q<sup>2</sup>]
7. Si-O[NB],[Q<sup>3</sup>]
8. Si-O,[Q<sup>4</sup>]
9. Na-O
10. Água estrutural (1640)

(b)

Figura 11 – FTIR das amostras T15CNb (a) e T20CNb (b).

No o espectro de FTIR da Figura 11 (a) observa-se uma distribuição heterogênea de espécie Q<sup>X</sup> na rede de sílica. As regiões de sílica Q<sup>4</sup> (1 e 8) podem ser indicativas de líquido de sílica pura segregado no vidro fundido. Observam-se também a distribuição de espécie Q<sup>3</sup> até Q<sup>0</sup> (4, 5, 6 e 7) os quais indicam uma distribuição estrutural capaz de acomodar com facilidade tanto o NaO e CaO quanto o nióbio - indicado pelos picos atribuídos às ligações sílica-metal (2). A acomodação do nióbio na rede de sílica seria meta-estável devido ao desbalanceamento de cargas na rede vítrea; a ocorrência de silicatos cristalinos também foi observada (Figura 19). A intensidade dos picos da ligação Na-Si (9) indica que o Na<sup>+</sup> está sendo solicitado na compensação de cargas para estabilizar a estrutura. Tal fato é indicativo

da acomodação precária na rede vítrea do  $\text{Nb}^{x+}$ . Observa-se ainda a tendência à corrosão do vidro, ainda que pela umidade do ar, como indica a presença de água estrutural (10).

Contudo na Fig. 11 (b) há maior intensidade nos picos relacionados aos silicatos de metais (3), aparentando maior interação entre os metais; por outro lado o  $\text{Na}^+$  é menos exigido para a compensação de cargas da estrutura. Tais resultados indicam a incorporação ordenada e estável do  $\text{Nb}^{x+}$  na rede vítrea.

Em trabalhos anteriores (MOYA, J.S., 2012), observou-se que quando o  $\text{Na}^+$  é exigido para a compensação de cargas em redes vítreas heterogêneas (-Si-O-B-, por exemplo) o  $\text{Ca}^{2+}$  torna-se fracamente unido a rede. A decorrente mobilidade por lixiviação do  $\text{Ca}^{2+}$  é a responsável pela atividade biocida dos vidros. No presente trabalho, nota-se mais uma vez a maior resistência a lixiviação em amostras com altos teores de  $\text{CaO}$  e  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . É possível atribuir esse comportamento ao ordenamento estrutural que permite atingir melhor equilíbrio entre as cargas desses óxidos e o  $\text{SiO}_2$ , tornando o  $\text{Na}^+$  menos solicitado. Reduzida a mobilidade do  $\text{Ca}^{2+}$ , conseqüentemente o efeito biocida também se reduz. Por tanto fica indicado um limite na fração composicional de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  quando há a finalidade biocida.

#### 3.2.1.4 – Atividade biocida dos vidros

A Norma ASTM E-2149-01 (Atividade antimicrobiana/antibacteriana de agentes imobilizados sob condições dinâmicas de contato) foi concebida para avaliar a atividade antibacteriana (ação biocida) de amostras em que essa atividade é dependente do contato direto entre as bactérias e o agente biocida. Esse ensaio determina a atividade biocida de uma amostra por agitação desta em uma suspensão bacteriana durante alguns tempos de contato especificados pelo pesquisador. A agitação constante da amostra na suspensão bacteriana assegura o bom contato entre as bactérias e o agente biocida. Para cada tempo de contato estabelecido, o número de organismos viáveis na suspensão é determinado por diluição em série após o plaqueamento.

Uma única colônia de *Escherichia coli* DH10B foi inoculada no meio de cultura Luria Bertani (LB) (composição LB: tripton a 1%, extrato de levedura a 0,5%,  $\text{NaCl}$  a 1% e ágar a 1,5%) e incubada durante a noite a  $37^\circ\text{C}$ . Cada cultura (10  $\mu\text{L}$ ) foi diluída em meio fresco (1 mL) e cultivada a  $37^\circ\text{C}$  por 6 h. Essa suspensão foi diluída em meio LB fresco para se obter concentração bacteriana de 105 CFU/mL. Por fim, foram inoculados com essa cultura (1 mL) 15 mg de pós T15CNb e T20CNb. O número de células bacterianas viáveis que sobreviveram foi determinado por diluições em série após o plaqueamento sobre as placas de meio LB

sólido. O limite de detecção foi de 102 CFU/mL. A eficácia antibacteriana é expressa pela redução logarítmica das bactérias viáveis ensaiadas (CFU/mL).

Para verificar a atividade biocida dos materiais T15CNb e T20CNb foi realizado, no *Centro de Investigación en Nanomateriales y Nanotecnología (CINN)-CSIC*, em Oviedo, Espanha, pela pesquisadora Elisa Fernandez-Garcia, teste que implicou na incubação das substâncias investigadas dentro da suspensão bacteriana a 37 ° C sob agitação. O número de micro-organismos viáveis foi determinado por diluição em série de 48 horas após o plaqueamento. O material de referência G1 não contém atividade biocida e o resultado do ensaio pode ser visualizado na Figura 12.

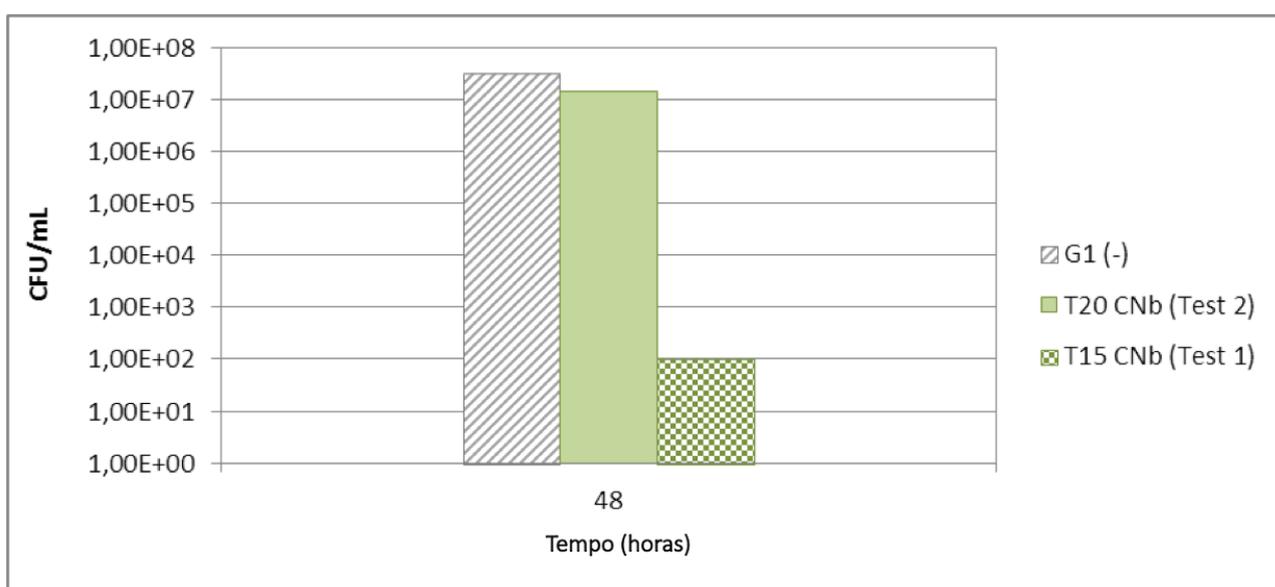


Figura 12 – teste biocida para as amostras T15CNb e T20CNb.

Pode-se notar que apenas a amostra T15CNb apresentou característica biocida, já que apresentou grande redução na colônia de bactérias (referência utilizada: *Escherichia coli*) enquanto a amostra T20CNb não apresentou redução considerável.

### 3.2.1.5 – Microscopia de calefação dos vidros

Para o recobrimento de uma superfície é muito importante acompanhar a fluidez do material a ser depositado na superfície em relação à temperatura, por isso foram realizados ensaios de microscopia de calefação. Em particular para os vidros, os pontos importantes a serem analisados durante o ensaio são: 1-) Ponto de início da contração; 2-) Ponto de amolecimento; 3-) Ponto de semi-esfera; e 4-) Ponto de fluidez (BOCCACCINI, A. R., 1999;

LARA, C., 2004). Para os vidros silicatos, os intervalos ou faixas de viscosidades relativos a essas etapas descritas foram determinados por Scholze et al (SCHOLZE, H., 1962), como mostra a Figura 13. Para esse trabalho foi utilizado o equipamento da marca *Hesse Instruments (Osterode am Harz, Germany)*.

	Intervalo de Viscosidade	forma projetada
Início do ensaio	-	
Ponto de início da contração	$10^{10}$ dPas	
Ponto de amolecimento	$10^6$ - $10^{7,6}$ dPas	
Ponto de semi-esfera	$10^{4,2}$ - $10^{4,7}$ dPas	
Ponto de fluidez	$10^3$ - $10^{3,5}$ dPas	

Figura 13 - Intervalos de viscosidade de acordo com a forma projetada para vidros silicatos (SCHOLZE, H., 1962; SILVA, A. C., 2008).

Uma questão importante na comparação entre os materiais que vão recobrir uma superfície é a sua facilidade de molhamento, a Figura 14 nos mostra que o vidro T15CNb apresentou maior capacidade de fluidez e molhamento de acordo com a temperatura do que a composição T20CNb.

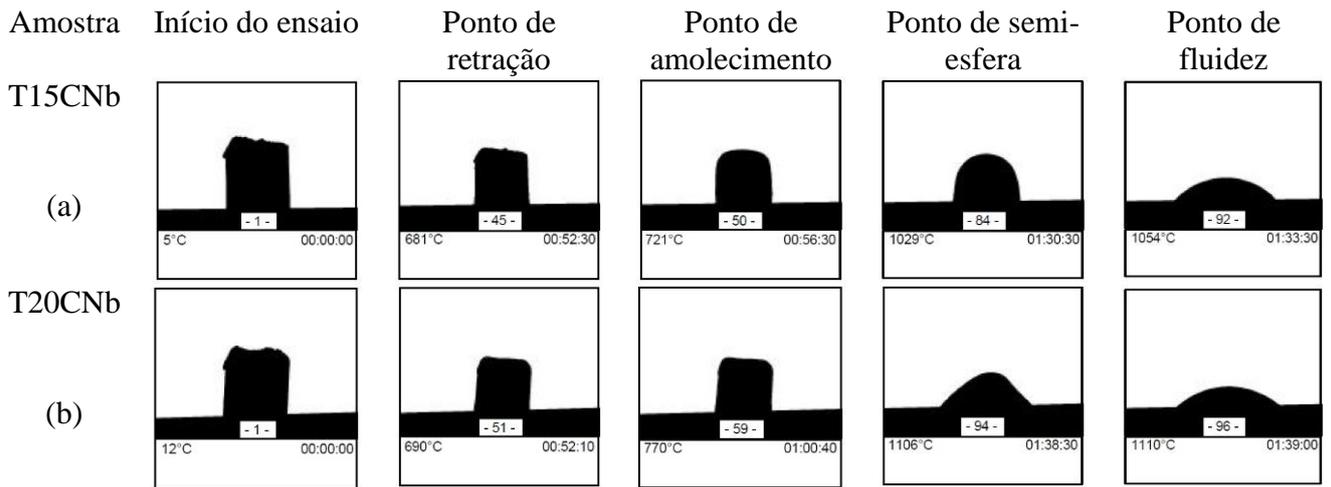
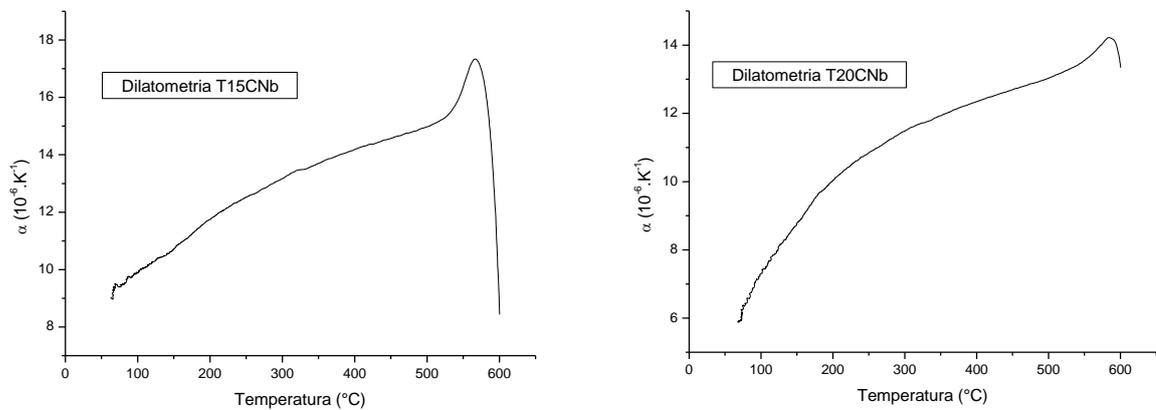


Figura 14 – Micrografias obtidas no ensaio de calefação para as amostras T15CNb (a) e T20CNb (b)

### 3.2.1.6 – Dilatometria dos vidros

De acordo com o ensaio de dilatometria (Figura 15), determinado pela variação longitudinal de acordo com a temperatura ( $\alpha = (\Delta l/l) \cdot (1/T) [K^{-1}]$ ) utilizando um dilatômetro *Bähr Thermoanalyse* modelo *DIL 802*, vê-se que o valor de expansão térmica, por volta de  $14,0 (10^{-6} \cdot K^{-1})$  para o vidro T20CNb e  $17 \alpha (10^{-6} \cdot K^{-1})$  para o vidro T15CNb, esta mais próximo do valor do aço inox 316L (16,0) do que o encontrado para o titânio (9,7) e a alumina (8,8). Ainda que esses valores tenham sido determinados para o vidro, e não para o vitrocerâmico (após tratamento térmico), há um bom indicativo de menor possibilidade de trincas entre as camadas e, por tanto, maior compatibilidade entre as superfícies, quando os materiais de recobrimentos são depositados em aço inox.



(a)

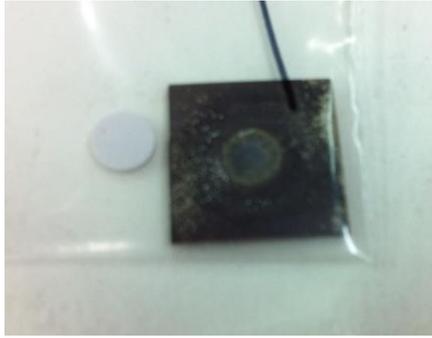
(b)

Figura 15 – Dilatometria da amostra T15CNb (a) e T20CNb (b).

### 3.2.1.7 – Tratamento térmico dos vidros e análise micrográfica

Apesar de não previsto no projeto inicial, pelo entendimento da importância de se trabalhar com o recobrimento de mais de um tipo de material para prótese/implante, foram utilizados, além do substrato de titânio, também o aço inox 316L (aplicado como biomaterial) e a alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

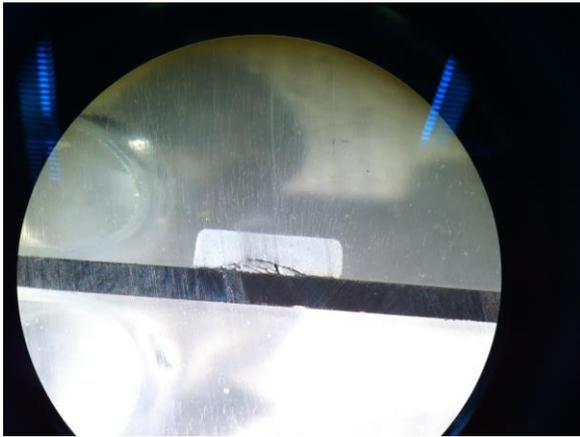
As duas amostras, T15CNb e T20CNb, foram prensadas em forma de pastilhas de aproximadamente 5,00 mm de diâmetro e 2,00 mm de espessura utilizando uma prensa Perkin Elmer com carga de 2-3 toneladas e submetidas a um tratamento térmico com rampa de subida de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  até o patamar de  $750^\circ\text{C}$  por 1 hora, e rampa de descida de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  nos três substratos (titânio, aço inox 316L e alumina em ar). Fez-se um corte transversal com o objetivo de se analisar a aderência do esmalte ao substrato. Observando a “cross-seccion” polida, em microscópio óptico, nota-se que, por este tratamento, apenas a amostra T15CNb em aço inox aderiu à superfície (Figura 16). Também pode-se analisar essa adesão, na Figura, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio *HITASCHI S-4300* com poder de resolução de 1,5nm a 15kV, no *Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM)*.



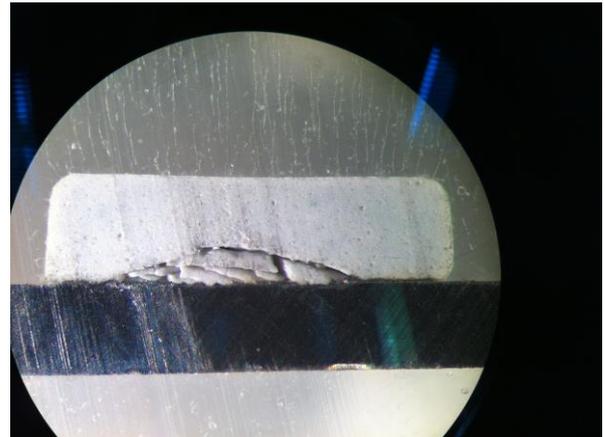
(a)



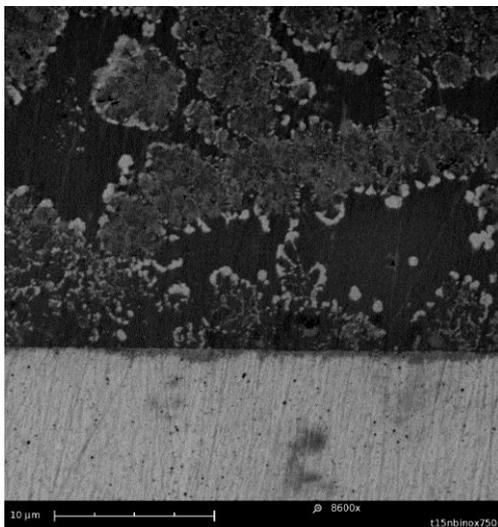
(b)



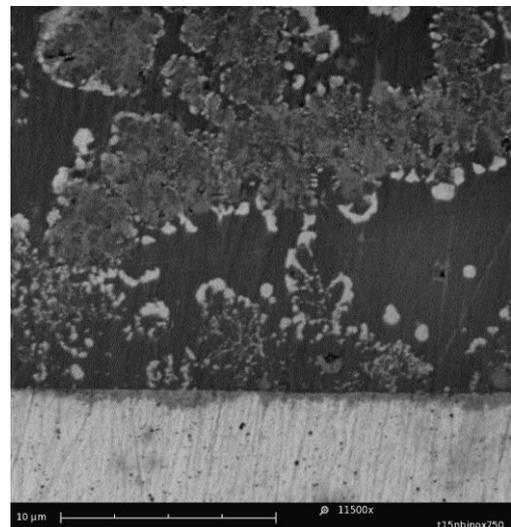
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 16 – (a) Microscopia ótica da mostra T20CNb não aderida ao substrato de titânio; (b) Microscopia ótica da amostra T15CNb não aderida ao substrato de alumina; (c) e (d) Amostra T15CNb aderida ao substrato de aço inox 316 L tratado termicamente à 750°C em ar vista por microscopia ótica (c) e (d); e por MEV (e) e (f).

A adesão da amostra T15CNb vai de encontro aos resultados obtidos na dilatométrica, uma vez que essa combinação recobrimento/substrato é a mais próxima em coeficiente de

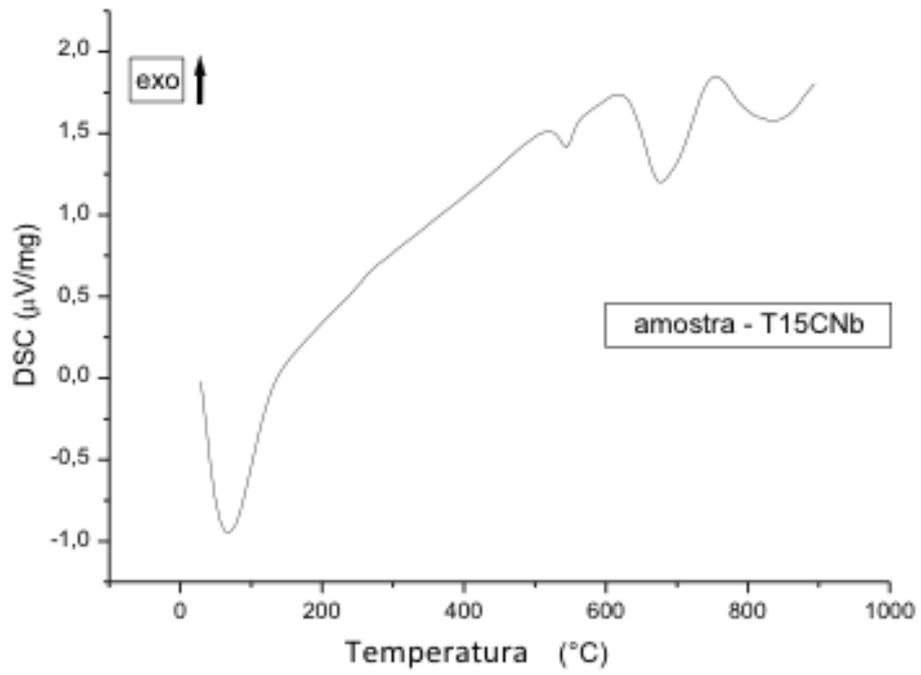
expansão térmico. Pela análise da microscopia de calefação também se pode notar que a amostra T15CNb tem fluidez antecipada em comparação com a T20CNb, o que pode ter contribuído para uma melhor molhabilidade e adesão do material à superfície.

### 3.2.1.8 – Análise térmica dos vidros

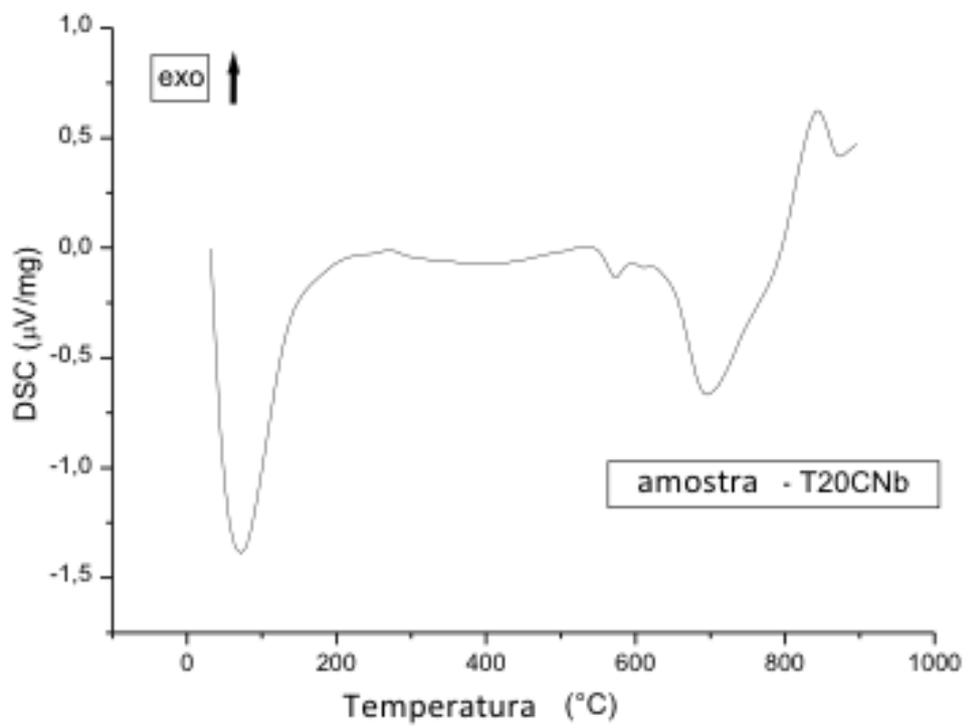
De acordo com a análise térmica por differential scanning calorimetry (DSC) presente na Figura 17 é possível notar que as transformações na amostra T15CNb também acontecem de maneira antecipada em relação à amostra T20CNb, como pôde ser visto no item 3.2.1.5, bem como na Figura 14, que mostraram importantes pontos de transformação (como, por exemplo, de amolecimento e semi-esfera). A análise térmica abaixo mostra que formação das fases cristalinas, apesar de serem as mesmas em ambos os materiais – conforme irão mostrar os difratogramas das Figuras 18 (a) e 18 (b) do item 3.2.1.9 - acontece antes no material T15CNb.

As temperaturas de transformação, principalmente a de cristalização, são importantes para que - combinadas às temperaturas (posteriormente determinadas) para a adesão do biomaterial no substrato e aos DRXs -, consigamos melhor compreender a microestrutura que se dará no recobrimento nessas condições.

O DSC, corroborado pelos DRXs da Figura 19 do item 3.2.1.9, mostra que acima de 700°C as transformações cristalinas, as quais o material se submeterá nas condições aqui propostas, já ocorreram.



(a)

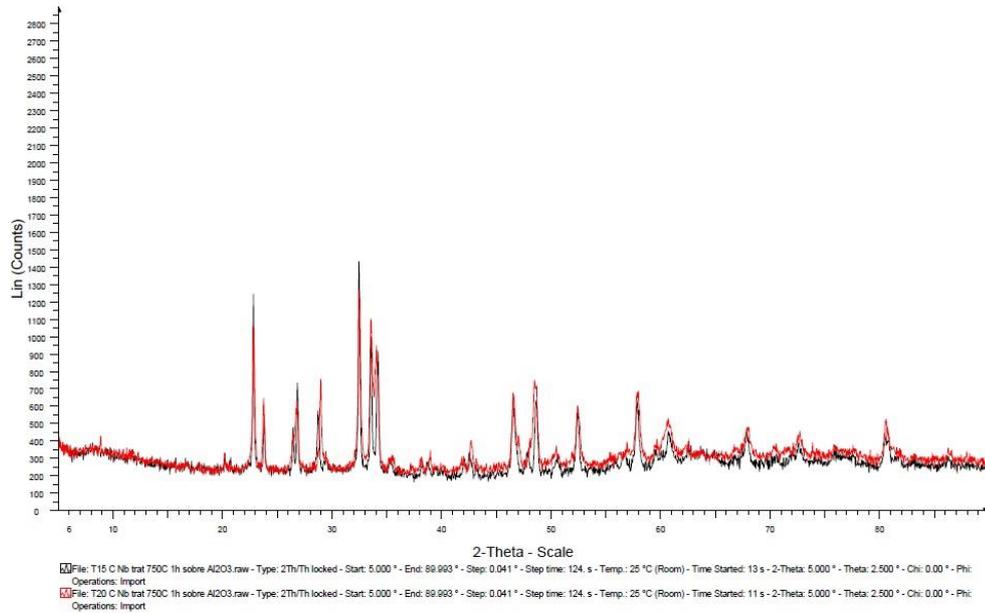


(b)

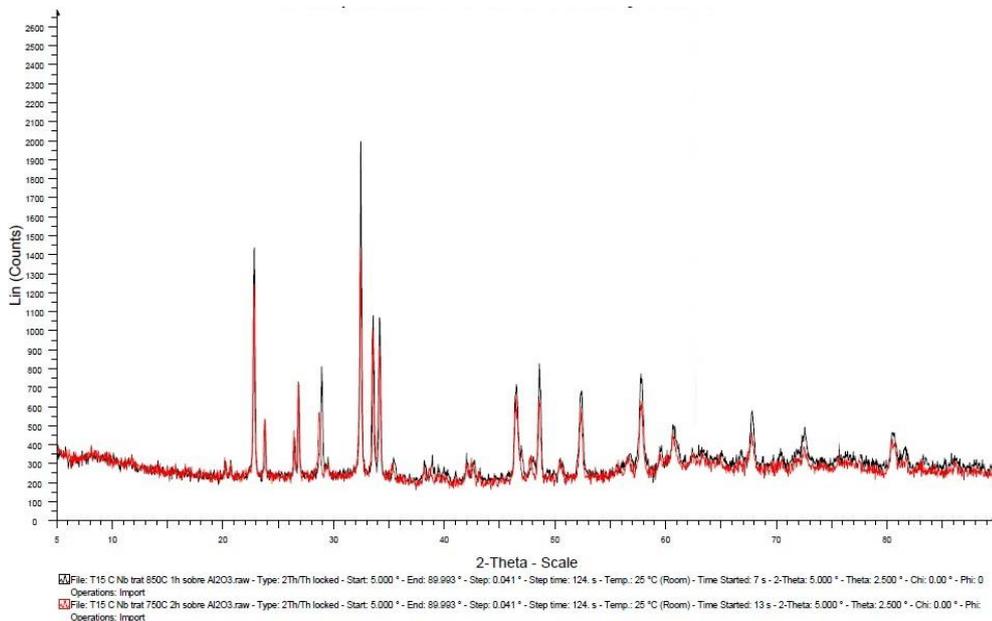
Figura 17 – DSC das amostras T15CNb (a) e T20CNb (b).

### 3.2.1.9 – DRX dos vitrocerâmicos

A Figura 18 apresenta os difratogramas comparados de T15CNb com a T20CNb após tratamento térmico e possibilita analisar se existe alteração de fases com a variação de temperatura de tratamento térmico de 750°C para 850°C - por 1 hora - também por DRX e para o mesmo material T15CNb.



(a)



(b)

Figura 18 – DRX comparativo da amostra T15CNb com a T20CNb após tratamento térmico a 750°C (a) e comparação entre os DRX do material T15CNb a 750 e 850 °C (b).

De acordo com a Figura 18 (b) é possível verificar que não há alteração de fases com a variação de temperatura de 750 para 850 °C, o que confirma, de acordo com o DSC das amostras, que todas as transformações cristalinas estão aproximadamente entre 500 e 800°C. Também permite saber, Figura 18 (a), que não há diferença entre os materiais T15CNb e T20CNb do ponto de vista das fases cristalinas formadas.

A Figura 19 mostra a proposição dos picos relativos formados após a cristalização dos vidros em vitrocerâmicos para os materiais T15CNb e T20CNb, bem como os difratogramas de tais fases cristalinas.

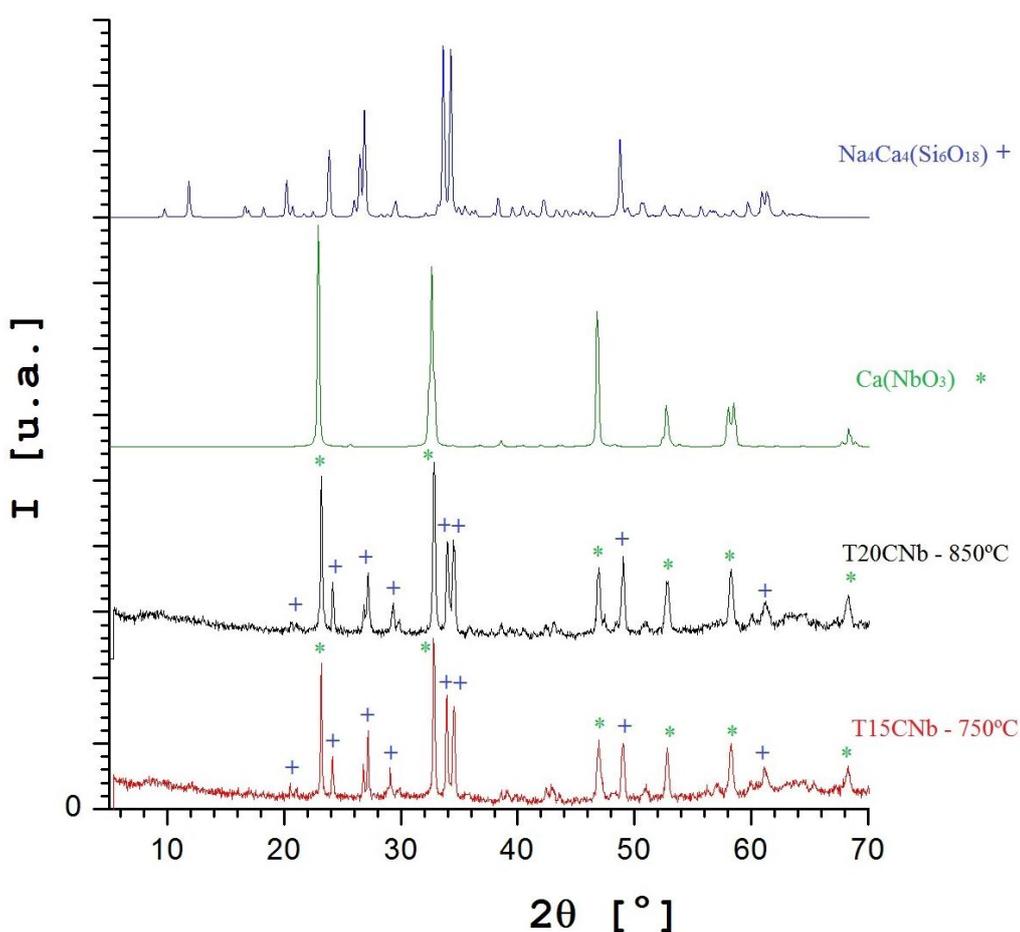


Figura 19 – DRX da amostra T15CNb após mesmo tratamento com as respectivas microfichas (JCPDS, 1979) encontradas para as fases cristalinas formadas.

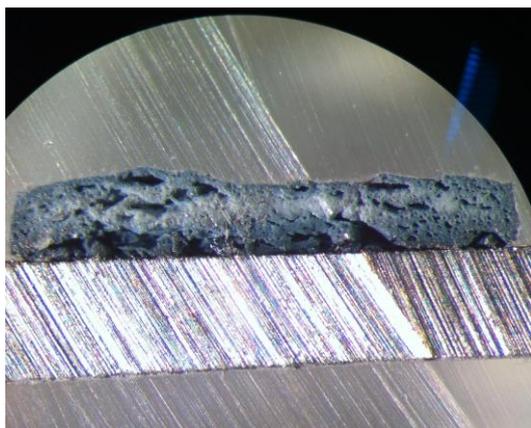
A Figura 19 mostra a impossibilidade de se encontrar apenas uma fase cristalina após os tratamentos térmicos para ambos os materiais. Há, como destacadas na Figura, a presença de duas fases majoritárias, quase que exclusivas, nos materiais T15CNb e T20CNb:  $\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$  e  $\text{Ca}(\text{NbO}_3)$ . Os picos de maior intensidade, e/ou possíveis de serem

definidos/identificados – salvo a ocorrência de alguma fase residual de menor expressão/intensidade -, aparentam sempre pertencer a uma dessas duas fases.

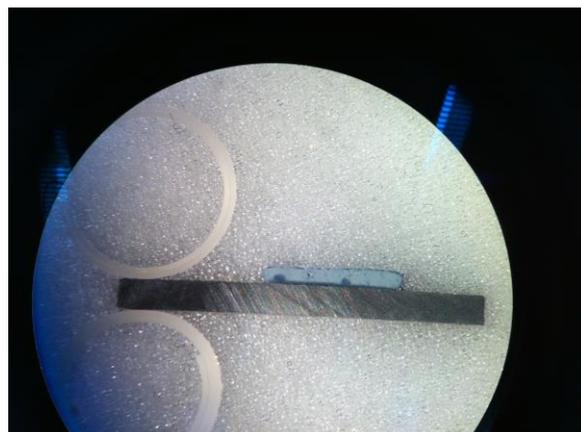
#### 3.2.1.10 – Estudo micrográfico e adesão mecânica dos recobrimentos

O tratamento a 850°C (taxa de 5°C/min e patamar de 1 hora ao ar) também foi utilizado para verificar se há alteração na interação entre o comportamento da adesão entre o material T20CNb e o substrato de aço inox, além da adesão de ambos os materiais aos substratos de titânio e alumina, não havendo nenhuma alteração ao comportamento encontrado a 750°C.

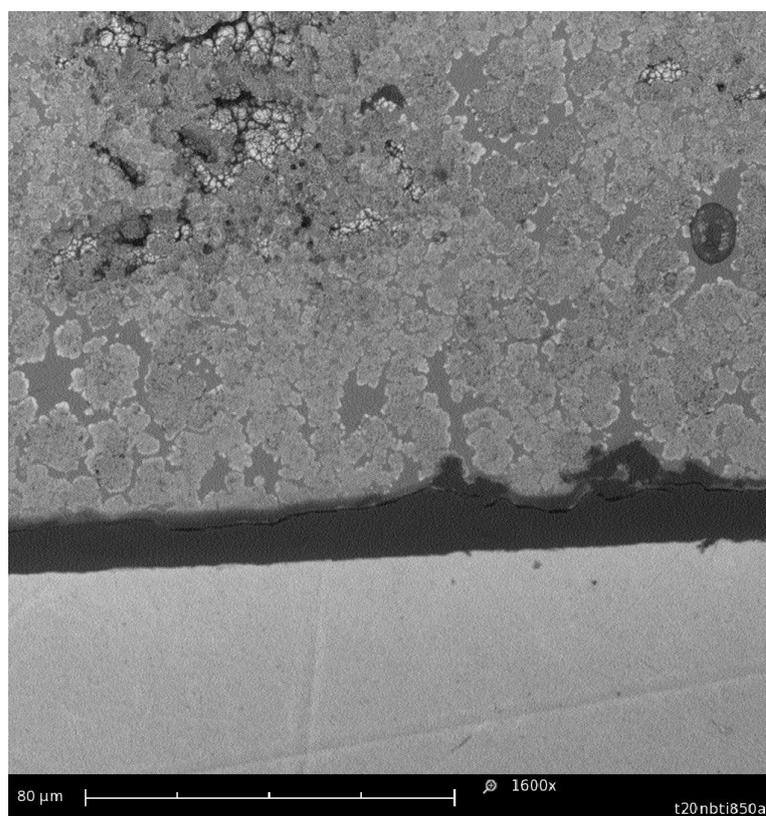
Para verificar a influência da atmosfera no comportamento de adesão entre o material de recobrimento e o substrato foram realizados ambos os tratamentos (750 e 850°C) em atmosfera de argônio para ambos os materiais nos substratos de titânio e aço inox. Para esses tratamentos apenas o substrato de titânio obteve resultado positivo, porém com uma aparente difusão do metal no vidro como mostra a Figura 20.



(a)



(b)



(c)

Figura 20 – (a) Microscopia ótica da amostra T15CNb em substrato de titânio com tratamento térmico de 850°C em atmosfera de argônio; (b) Microscopia ótica da amostra T20CNb em substrato de titânio com tratamento térmico de 850°C em atmosfera de argônio; e (c) MEV.

Pode-se concluir que, ao contrário do substrato de aço inox, a adesão em titânio depende da atmosfera, no caso inerte. Para ampliar as possibilidades de adesão em substrato de alumina, foi realizado tratamento térmico a 1.000°C com taxa de 5°C/min e patamar de 1 hora ao ar, onde pode-se obter adesão aparente, porém com alta porosidade e fragilidade do material depositado, como mostra a Figura 21.

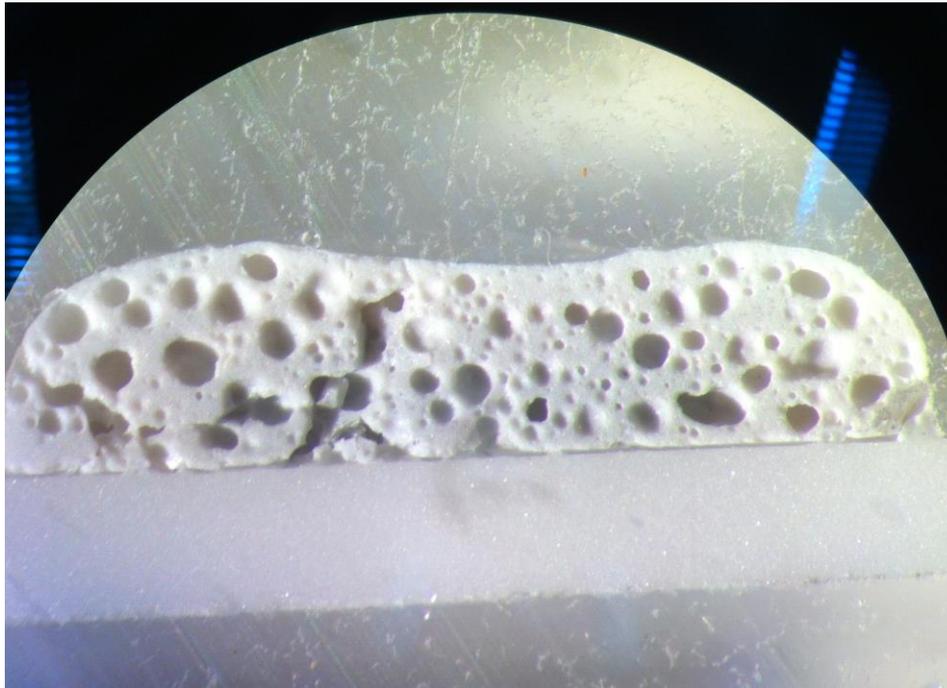


Figura 21 – Amostra T15CNb tratada a 1.000°C ao ar em substrato de alumina.

De posse dos resultados positivos encontrados, sobretudo para a composição T15CNb, foram também realizados, apesar de não sugeridos no plano inicial, ensaios de adesão mecânica e deposição em pino para analisar a alteração no recobrimento para este material. Para tanto se realizaram ensaios de resistência ao cisalhamento ( $\sigma_s$ ) usando uma máquina de ensaios mecânicos. A célula de carga foi de 5 kN a uma velocidade da cabeça transversal de 0,05 mm/min; imprimindo no material de recobrimento até a falha, ou seja, até descolar a superfície do substrato. As pastilhas têm diâmetro de 3,0 mm e aproximadamente 2,00 mm de altura; os pós foram prensados utilizando uma prensa Perkin Elmer com carga de 2-3 toneladas. As amostras utilizadas para o ensaio foram das pastilhas T15CNb recobrindo o aço inox e tratadas termicamente a 750°C em ar. A adesão encontrada, a partir do cálculo de  $\sigma_s$  [F (força) / A (área)] ficou por volta de 11 MPa.

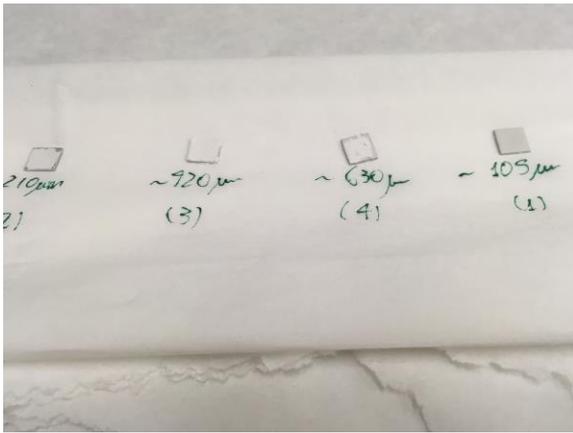
### 3.2.2 – Escolha da composição e desenvolvimento com o vitrocerâmico

Diante dos bons resultados com a composição T15CNb, foram preparadas novas amostras desse material para a sequência dos ensaios. Após nova fusão e moagem desse vidro iniciou-se o trabalho de deposição da camada do mesmo nos substratos escolhidos (titânio e aço inox 316, já que em alumina não foram obtidos bons resultados – Figura 21). Para tal

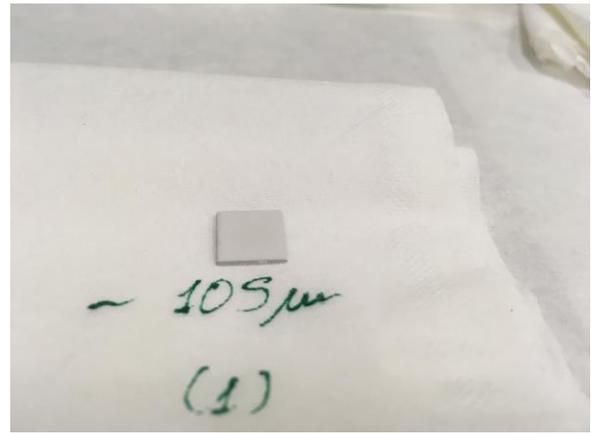
revestimento - após o recobrimento realizado (utilizando, para produzir líquido do pó do vidro, um misturador magnético e uma quantidade de pentanol) por deposição (sedimentação), seguida de secagem em estufa por cerca de 12 horas para o completo recobrimento -, as pequenas placas de titânio e aço inox revestidas foram levadas ao forno a 850°C (em argônio) e 750°C (em ar) por 1 hora, respectivamente. Daí a importância de se estudar o vitrocerâmico, já que nessas temperaturas, como demonstrado anteriormente nas Figuras 17 e 18, a transformação cristalina já ocorreu.

### 3.2.2.1 – Deposição da camada de recobrimento

A deposição foi realizada afim de se obter diferentes espessuras e assim poder avaliar qual, dentre estas, seria a mais indicada para um melhor recobrimento. A Figura 22 mostra um teste preliminar de deposição, antes e depois do tratamento térmico, para 04 espessuras diferentes (E1, E2, E3, E4).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 22 – Deposição de T15CNb nos substratos de aço inox para as 04 espessuras diferentes (a), destacando-se o bom recobrimento de E1 (b); antes (c) e depois (d) do tratamento térmico correspondente; (e) fundo do Becker após a completa secagem na deposição.

De acordo com a Figura 22 pode-se notar a maior dificuldade operacional com camadas mais espessas. Para menores espessuras a distribuição da camada pela superfície das plaquinhas de titânio e aço inox aparentou maior homogeneidade.

### 3.2.2.2 – Análise micrográfica das espessuras

Após realizadas deposições e tratamentos térmicos dos revestimentos nas plaquinhas de aço inox (750°C em ar) e titânio (850°C em argônio), as amostras foram analisadas micrograficamente, para possibilitar o entendimento da diferença de distribuição, homogeneização e adesão entre as diferentes espessuras.

A Figura 23 apresenta a microscopia ótica para as espessuras de recobrimento E1, E2 e E3.

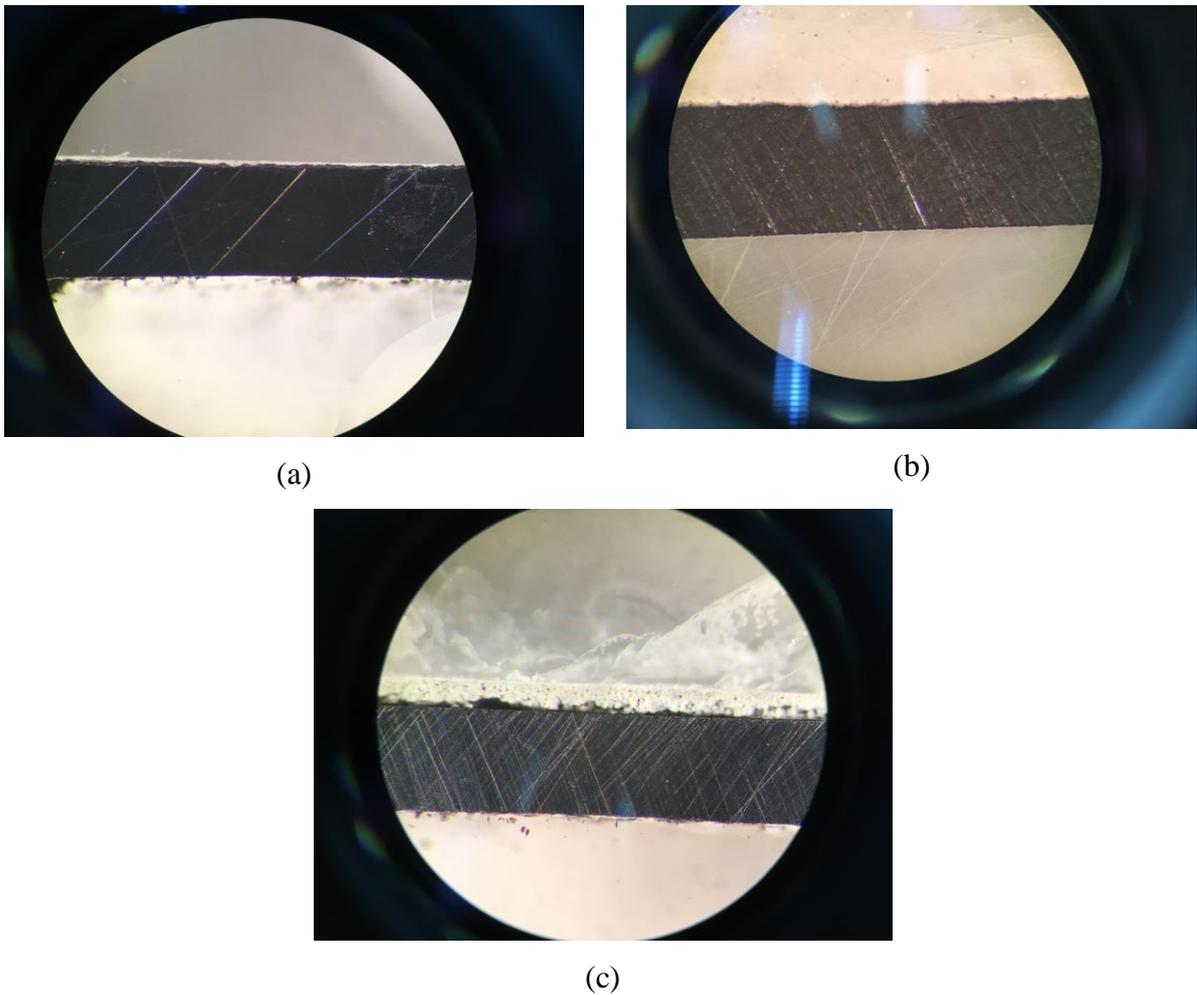
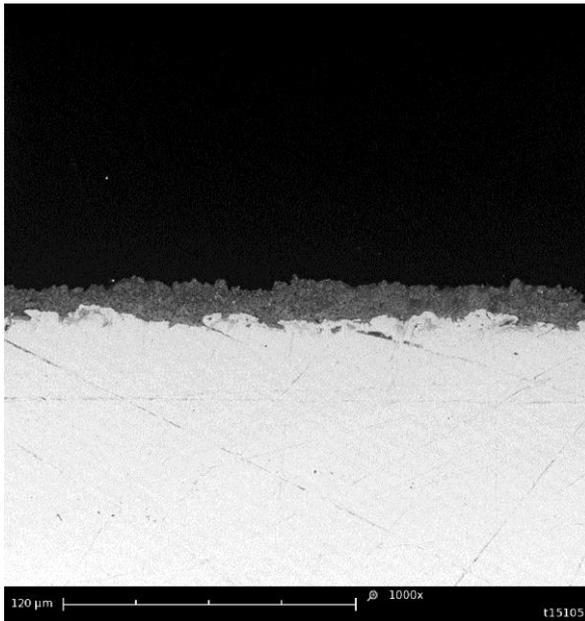
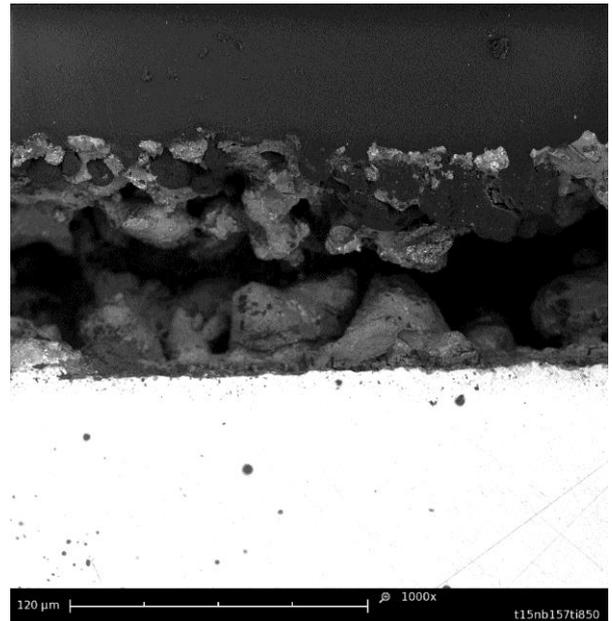


Figura 23 – Microscopia ótica das interfaces substrato (aço inox) – recobrimento (T15CNb) para E1 (a), E2 (b) e E3 (c).

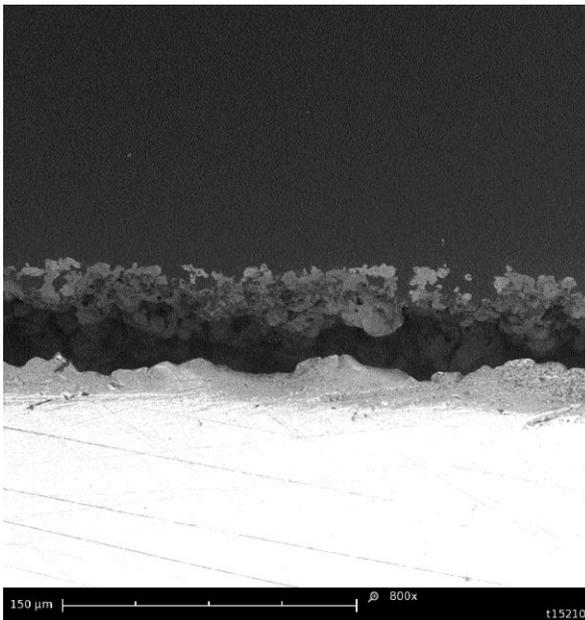
A Figura 24 mostra a interface das camadas recobrimento-substrato para E1, E2, E3 e E4 por MEV.



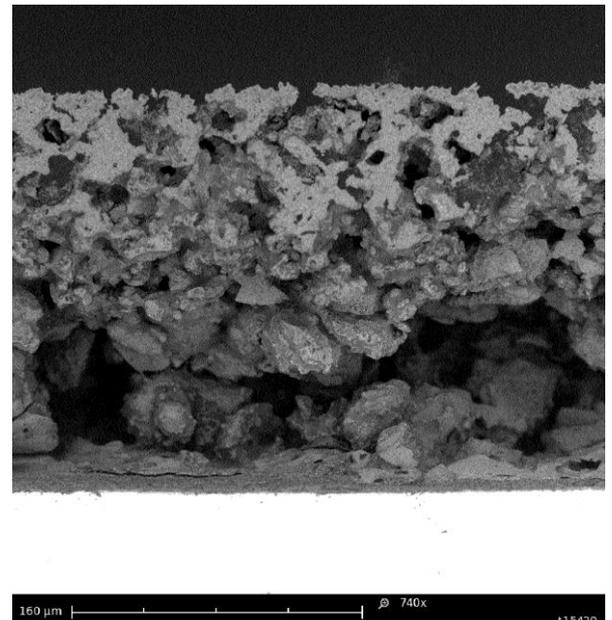
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 24 – MEV das interfaces substrato (aço inox) – recobrimento (T15CNb) para E1 (a), E2 (b), E3 (c) e E4 (d).

Pode-se notar, tanto na Figura 23 quanto na 24, que o aumento da espessura da camada de recobrimento dificulta sua adesão ao substrato e conseqüentemente piora sua distribuição nela, reduzindo a homogeneidade. A menor espessura (E1) apresentou melhor distribuição e aparente adesão ao substrato, sendo, por tanto, escolhida como condição otimizada para a seqüência do trabalho.

Escolhida a espessura foram realizadas deposições nos substratos de titânio e aço inox de uma maior quantidade de plaquinhas para que possibilitasse o estudo posterior micrográfico e biológico, afim de se compreender os caracteres citotóxicos, biocidas e de crescimento celular.

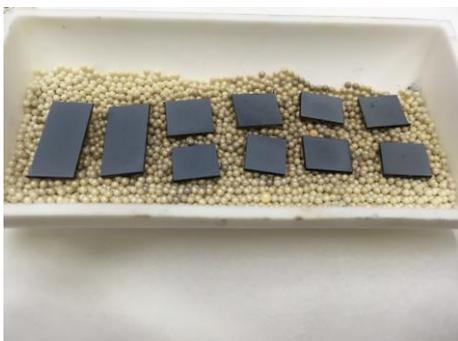
A Figura 25 ilustra as amostras antes e depois de seus respectivos tratamentos térmicos (substrato de aço inox – 750°C em ar; substrato de titânio – 850°C em argônio), onde é possível notar a aparente satisfatória – e previamente confirmada pelas Figuras 23 e 24 - homogeneização da camada de recobrimento nos substratos para a espessura escolhida. A Figura também mostra a produção de pastilhas do material para realização de posterior ensaio de flexão biaxial e microscopia; foi utilizada uma prensa *Perkin Elmer* com carga de aproximadamente 1 tonelada para gerar espessura e diâmetro médios de 2,00 e 12,00 mm, respectivamente.



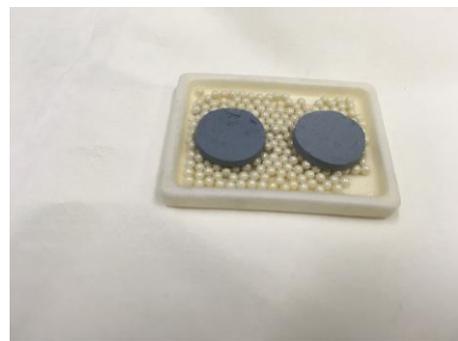
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)



(h)

Figura 25 – T15CNb de espessura E1 recobrindo os substratos antes do tratamento térmico (a) e (b); e depois, para substrato de titânio a 850°C em argônio (c) e (d); e de aço inox a 750°C em ar (e), (f), (g); o mesmo, em aço inox, no porta amostras para MEV (h).

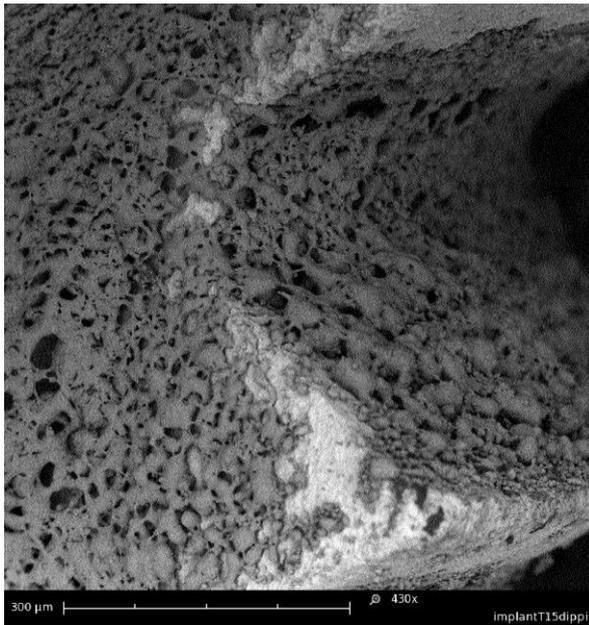
Também foi realizado, como teste adicional e proposicional, recobrimento por dipping da composição T15CNb no pino de titânio - utilizado como implante dentário. Foram realizados tratamentos térmicos de 750 e 850°C em atmosfera de argônio e resultados interessantes na morfologia do recobrimento foram encontrados.

A Figura 26 mostra o pino em processo de secagem após a realização do dipping.

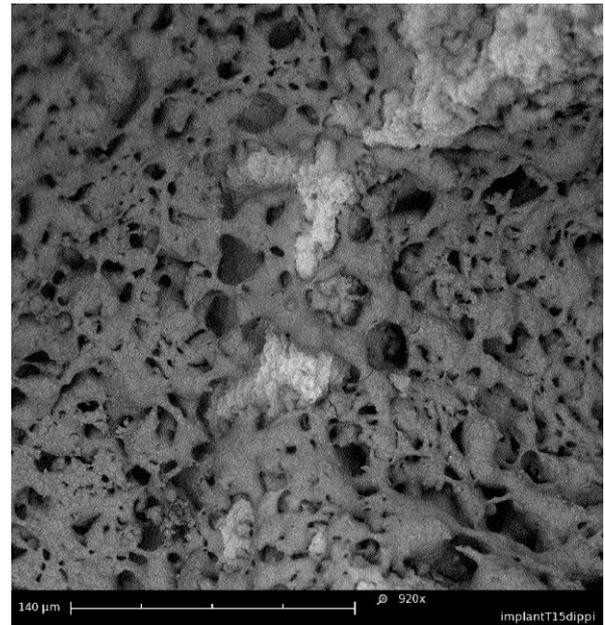


Figura 26 – Dipping do pino de titânio recoberto pelo material T15CNb.

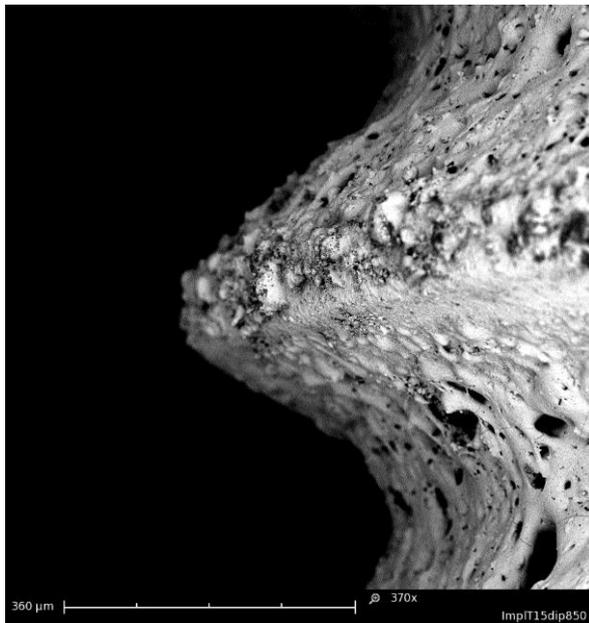
Na Figura 27 é possível observar a microscopia eletrônica de varredura (MEV) - utilizando o equipamento *Phenon G2 (Netherlands)* - dos recobrimentos após os tratamentos térmicos indicados.



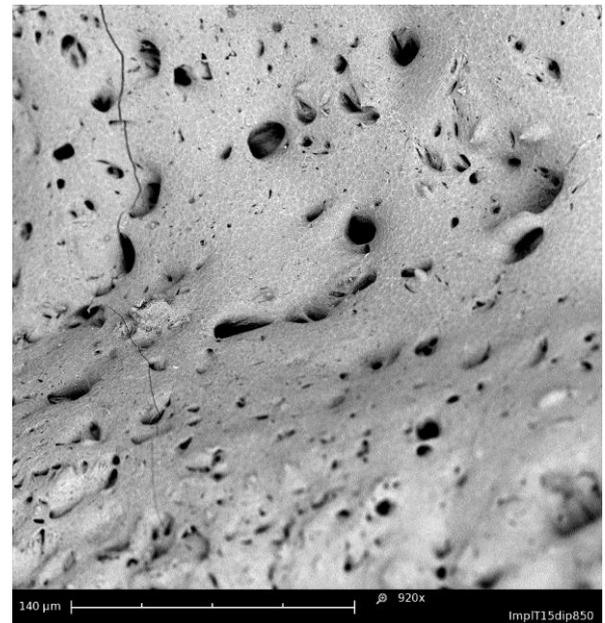
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 27 – MEV do material T15CNb recobrindo o pino de titânio com tratamento térmico em argônio a 750°C (a) e (b); e 850°C (c) e (d).

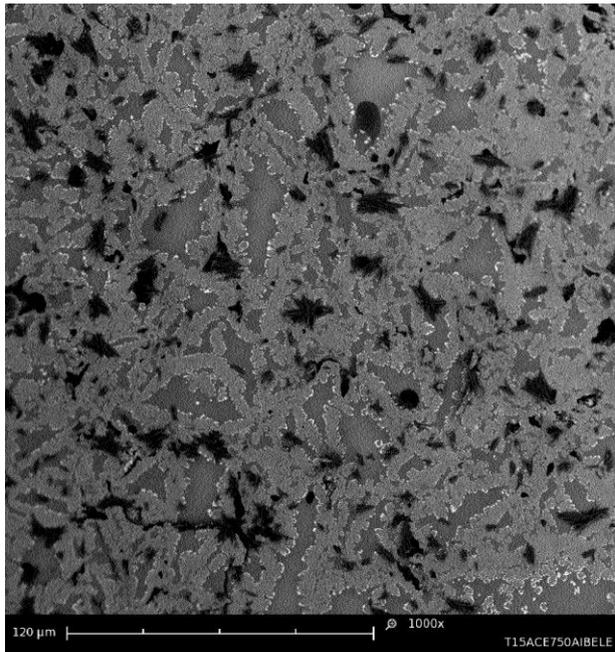
Com base nos resultados preliminares observados nas Figuras 20, 23 e 24 e nos recobrimentos utilizando pastilhas e deposição da suspensão dos itens 3.2.1.10 e 3.2.2.2, é possível notar que o tipo de deposição, da superfície e da espessura tem um elevado grau de influencia sobre a adesão. A morfologia apresentada, principalmente nas Figuras 27 (a) e 27 (b) se assemelham às celulares, o que representa um panorama bastante otimista para esse recobrimento. As Figuras 27 (c) e 27 (d) mostram que uma maior temperatura e espessura (o

*dipping* manual foi realizado por mais tempo nesse, e por tanto houve maior deposição do material) pode influenciar na densificação e adesão da camada de recobrimento, o que pode levar a perda da morfologia celular e a trincas indesejáveis no material.

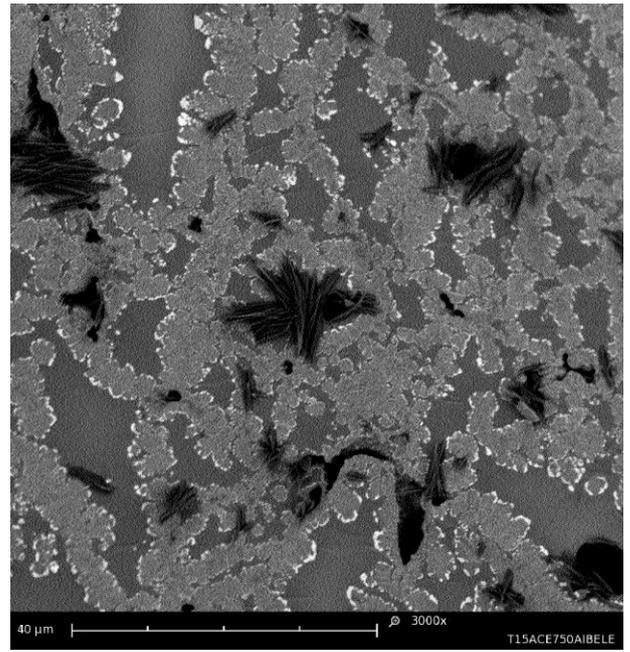
Um estudo específico para superfície/recobrimento, como já citado em trabalhos anteriores (KUSHWAHA, M., 2012), é necessário para evolução e desdobramento do projeto.

### 3.2.2.3 – Estudo micrográfico das regiões do vitrocerâmico

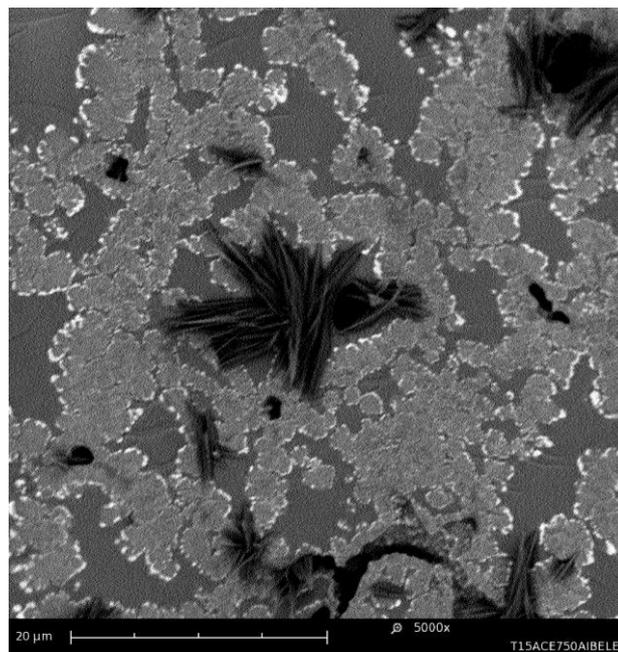
Para compreensão morfológica do material devitrificado, foram realizadas diferentes análises de imagem a partir das micrografias adquiridas por MEV do material T15CNb. As Figuras 28 e 29 mostram imagens de MEV para T15CNb tratado termicamente a 750°C em ar, após fratura das pastilhas produzidas como descrito no item 3.2.2.2.



(a)



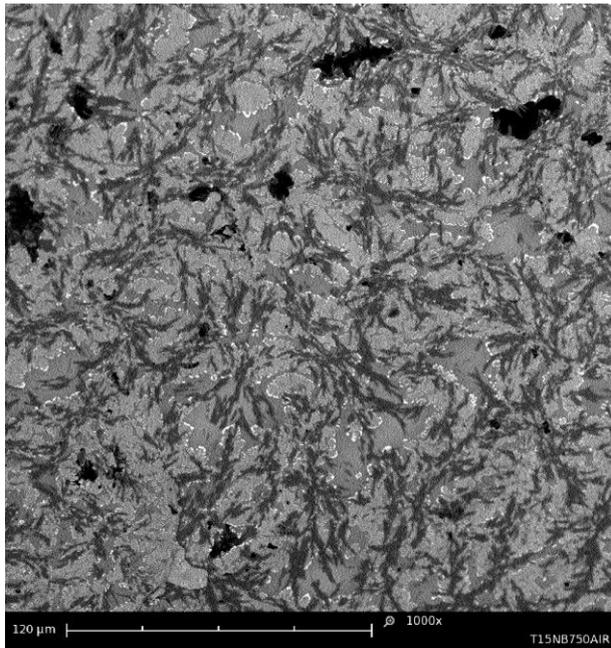
(b)



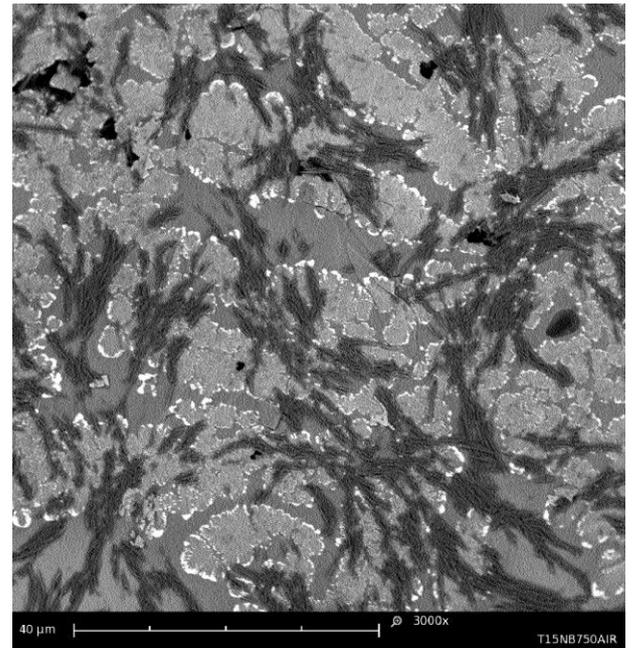
(c)

Figura 28 - MEV da superfície de fratura de T15CNb tratado termicamente a 750°C em ar tempos depois do rompimento para diferentes ampliações.

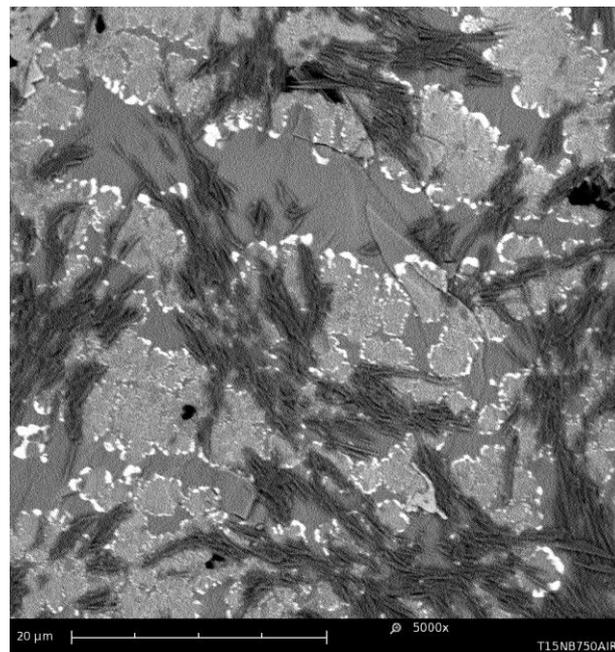
Apesar da Figura 29 também apresentar imagens da fratura para o mesmo material com as mesmas condições de tratamento térmico, aqui as imagens foram captadas imediatamente após a fatura, sem que houvesse tempo para possíveis alterações.



(a)



(b)



(c)

Figura 29 – MEV da superfície de fratura de T15CNb tratado termicamente a 750°C em ar imediatamente após o rompimento para diferentes ampliações.

A partir das Figuras 28 e 29 pode-se perceber que há diferença entre as regiões contidas no material, ou seja, não há homogeneidade na morfologia encontrada. Nota-se, diante de tais diferenças, o possível desequilíbrio na concentração de elementos químicos ao longo do material. Porém, apesar da heterogeneidade morfológica, há homogeneidade no todo, já que ele apresenta concentrações dos elementos e distribuições morfológicas coerentes

no macro da imagem, como ilustram as Figuras 28 (a) e 29 (a). Uma maior discussão sobre as possíveis concentrações de elementos químicos por diferentes regiões será esclarecida um pouco mais adiante com análise por EDS (*energy dispersive spectroscopy*).

As Figuras 30 e 31 mostram imagens de MEV para T15CNb tratado termicamente a 850°C em argônio, após fratura das pastilhas produzidas como descrito no item 3.2.2.2.

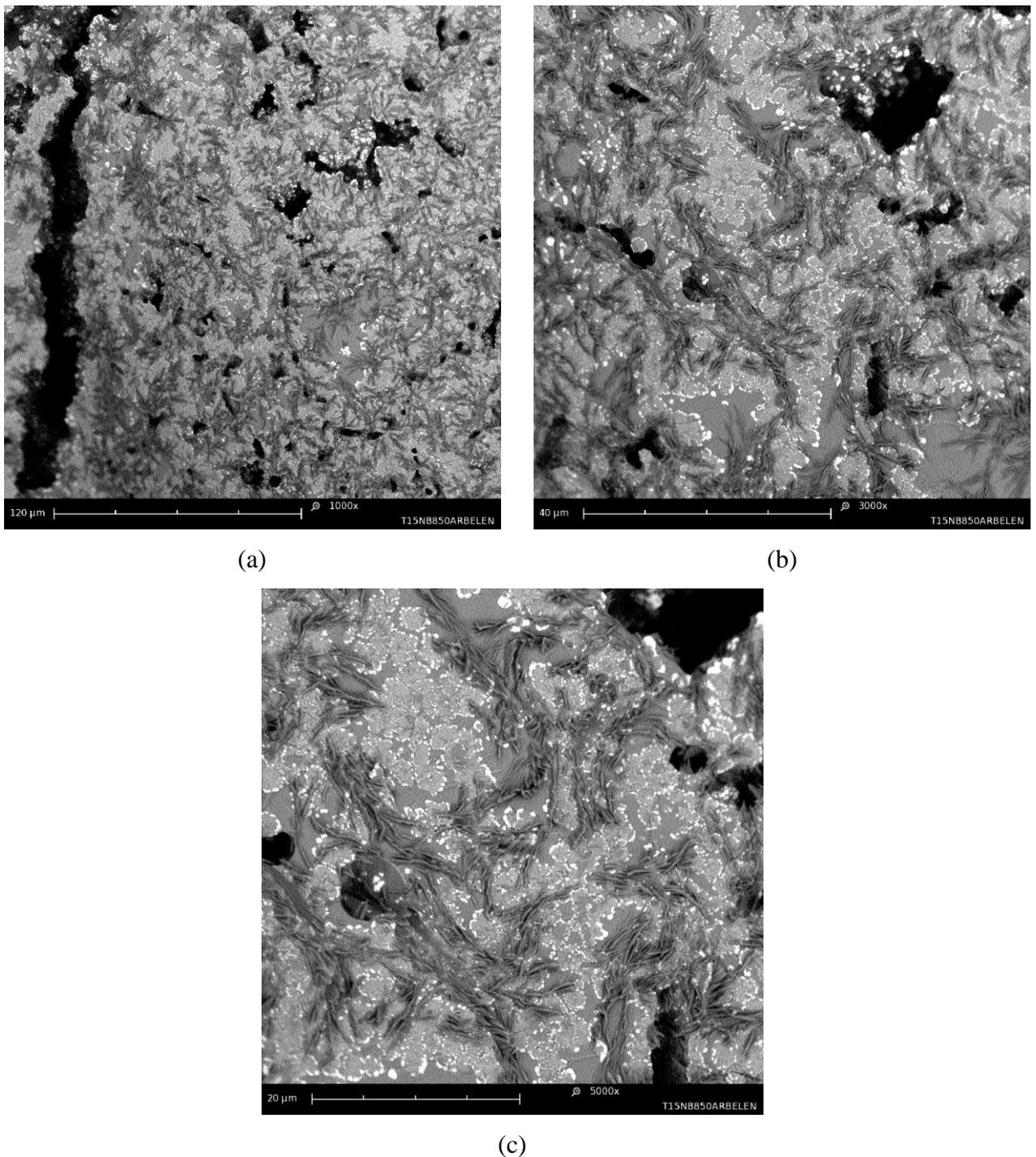
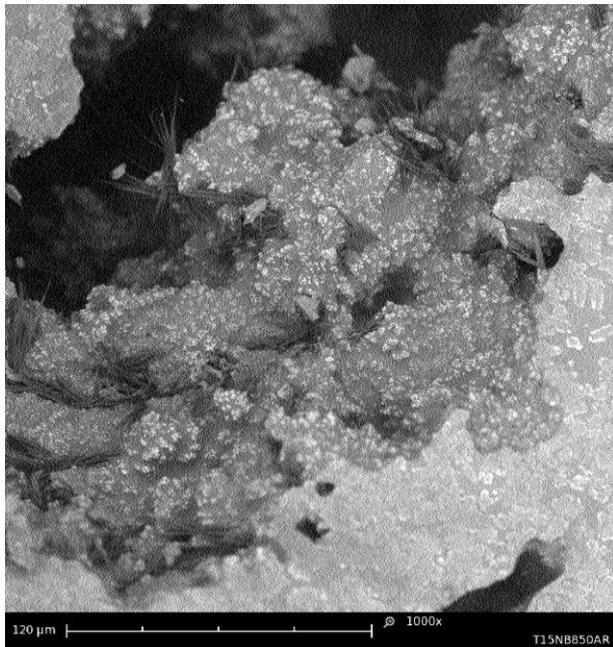
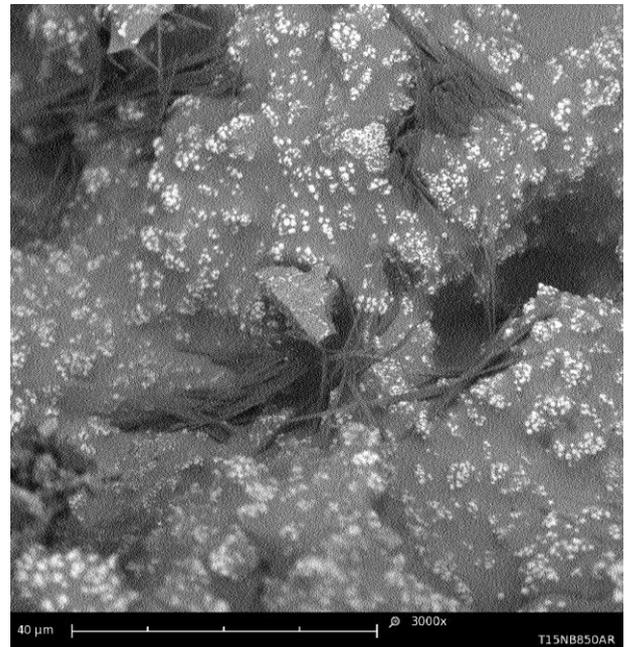


Figura 30 - MEV da superfície de fratura de T15CNb tratado termicamente a 850°C em argônio tempos depois do rompimento para diferentes ampliações.

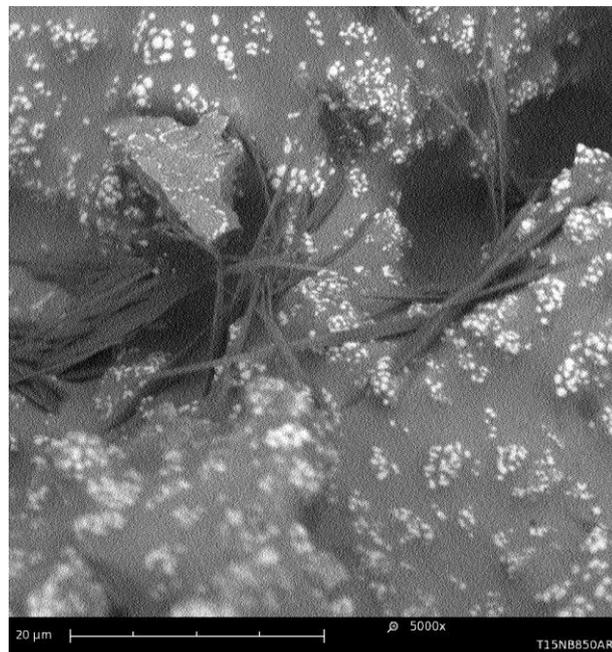
Assim como na Figura 29 em relação à 28, a Figura 31 difere da 30 por se trata da análise realizada imediatamente após a fratura.



(a)



(b)



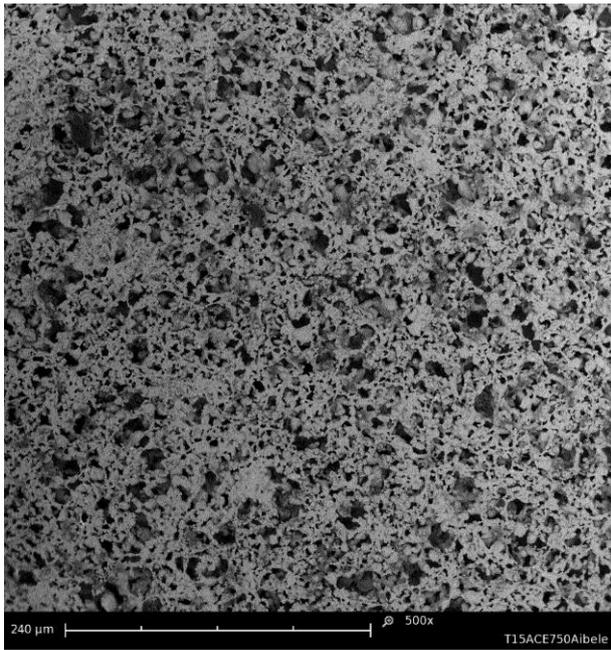
(c)

Figura 31 - MEV da superfície de fratura de T15CNb tratado termicamente a 850°C em argônio imediatamente após o rompimento para diferentes ampliações.

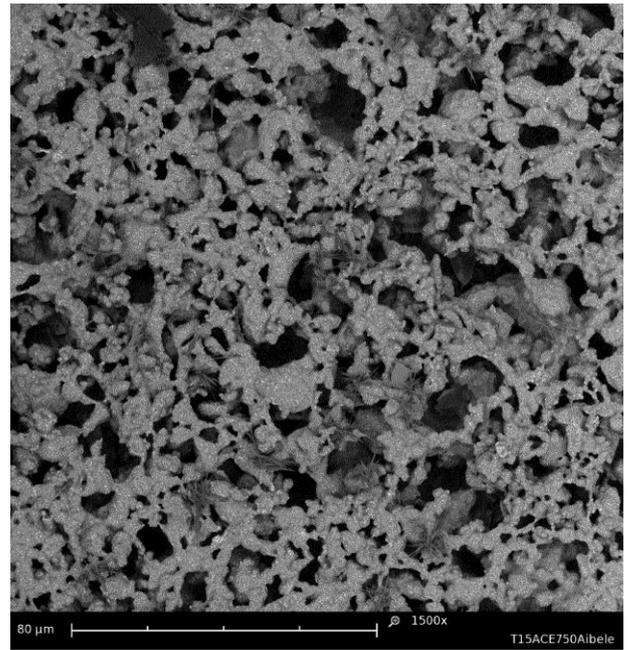
Como anteriormente descrito, também nas Figuras 30 e 31 acima, regiões aparentando diferentes concentrações de elementos químicos ao longo do vitrocerâmico são visualizadas.

Porém, aqui, o material contém certa porosidade não encontrada no tratamento térmico anterior, o que refletirá no comportamento mecânico visualizado no ensaio de flexão biaxial do item 3.3.3.6 Outro ponto importante na análise das micrografias e no estudo comparativo entre as amostras ensaiadas pós fratura (tempos depois e imediatamente após), é que as “agulhas” visualizadas, que em princípio poderiam ser sais precipitando com o tempo, aparecem em ambas as situações, sinalizando já estarem contidas no interior dos materiais.

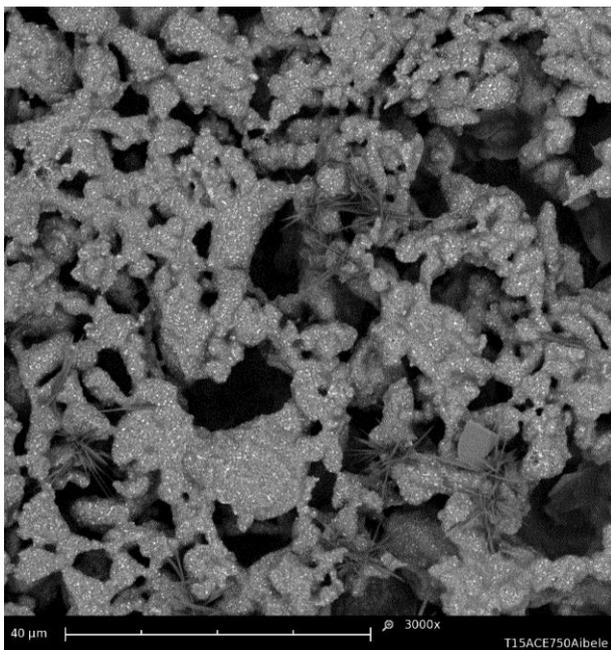
As Figuras 32 e 33 mostram o material de revestimento T15CNb revestindo, respectivamente, os substratos de aço inox 316 tratado termicamente a 750°C em ar e de titânio tratado termicamente a 850°C em argônio.



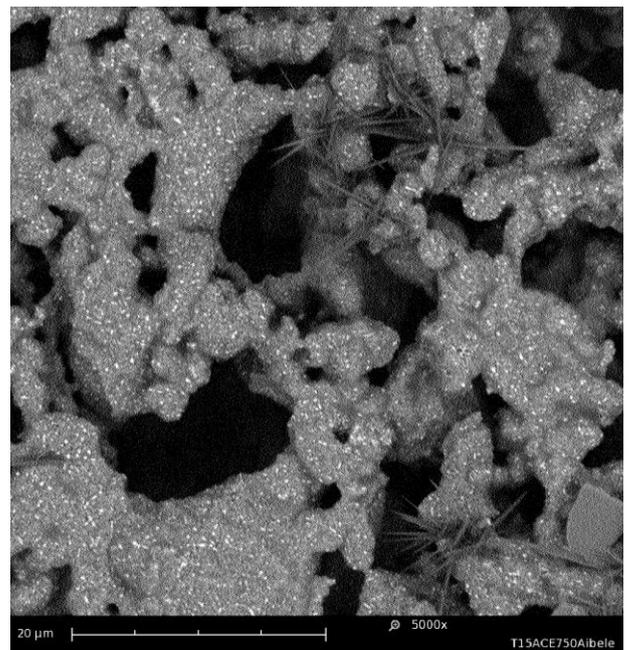
(a)



(b)

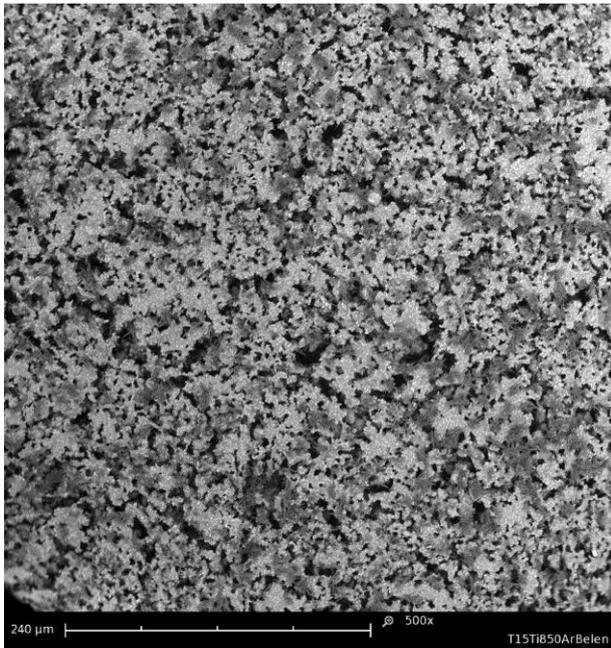


(c)

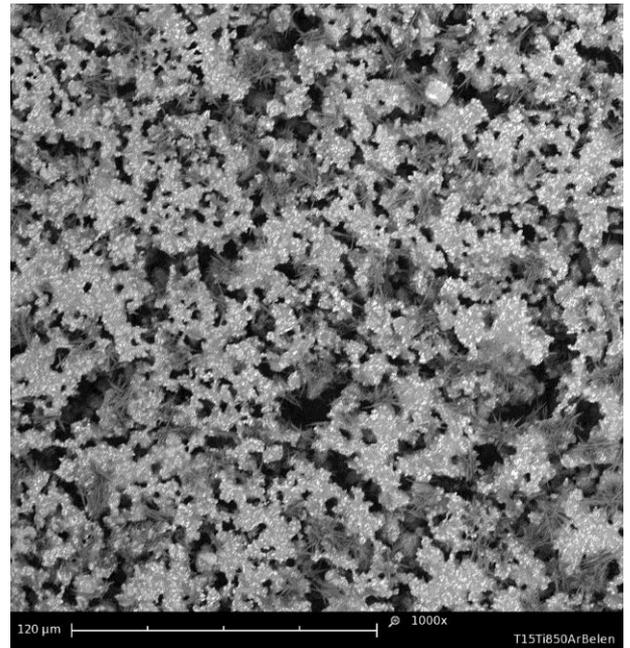


(d)

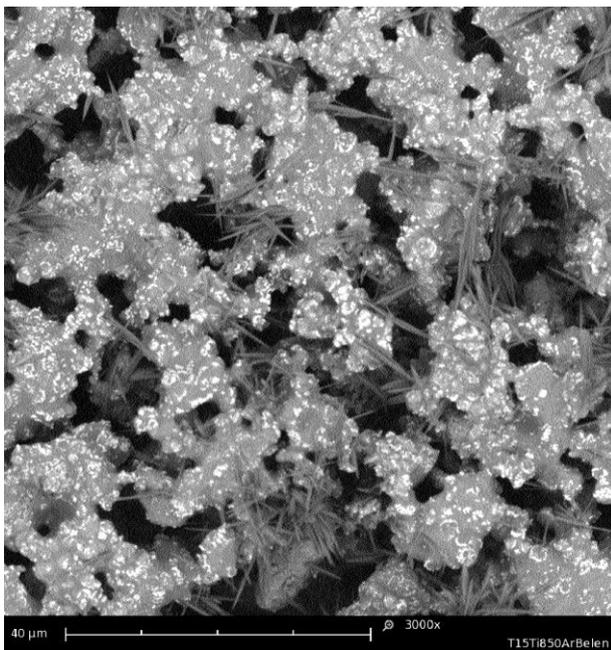
Figura 32 - MEV de T15CNb tratado termicamente a 750°C em ar recobrindo o substrato de aço inox para diferentes ampliações.



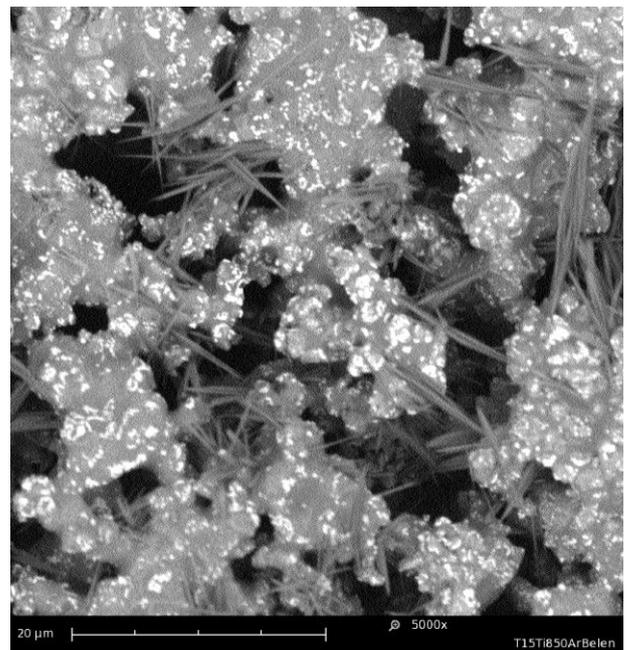
(a)



(b)



(c)



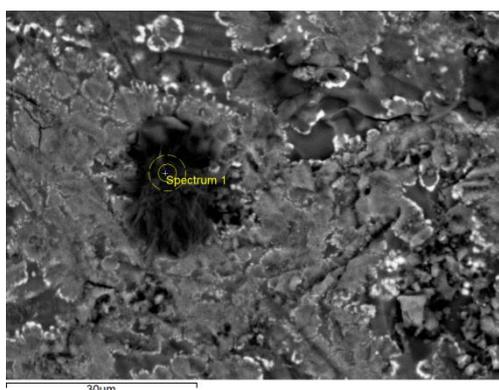
(d)

Figura 33 - MEV de T15CNb tratado termicamente a 850°C em argônio recobrendo o substrato de titânio para diferentes ampliações.

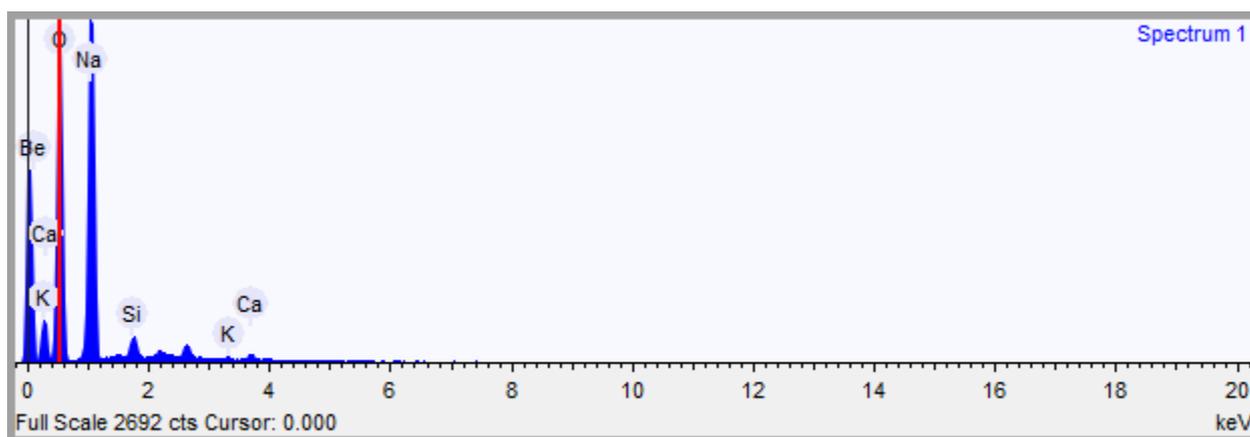
Assim como visualizado nas imagens micrográficas das fraturas, aqui, nas Figuras 32 e 33, a morfologia acima descrita se repete. Nota-se regiões claras distribuídas ao longo do vitrocerâmico e a presença de “agulhas” na estrutura. Por se tratar de uma fina camada de recobrimento, vê-se que o pó do vidro depositado antes do tratamento, além de sofrer a transformação cristalina para vitrocerâmico, se vale dos mecanismos de sinterização para se

conectar e densificar em uma camada de T15CNb. Porém, a Figura 33, mostra diferença morfológica em relação à Figura 32; a maior temperatura parece influenciar na perda da morfologia arredondada presente na menor temperatura, e conseqüentemente na densificação dessas regiões. Também parece haver maior quantidade de “agulhas” na maior temperatura.

Como mostrado no EDS da Figura 34 abaixo (realizado com *EDS Brooker, MEV HITACHI TM 3000*, no DEMAR da EEL-USP), a região dessas “agulhas” tem alta concentração de Na, a análise que virá no item 3.2.2.4, do FTIR, também corrobora na discussão mostrando haver grande diminuição da ligação química Na-O, o que sugere – unido ao fato das ligações de sílica mostrarem certa segregação e fechamento em cristais – que a rede pode não necessitar mais do Na-O para compensar carga na estrutura. Com isso, de maneira segregada, o Na se organiza nas “agulhas” visualizadas nas micrografias acima e demonstradas na análise abaixo.



(a)



(b)

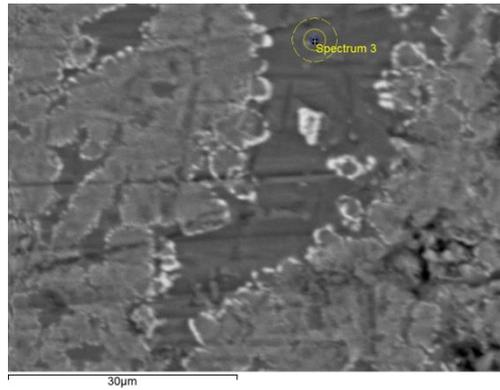
Figura 34 – Imagem (a) e espectro (b) da análise por EDS da região escura das “agulhas”.

A Tabela 2 mostra a quantia dos elementos e compostos encontrados por análise EDS na região da Figura 34.

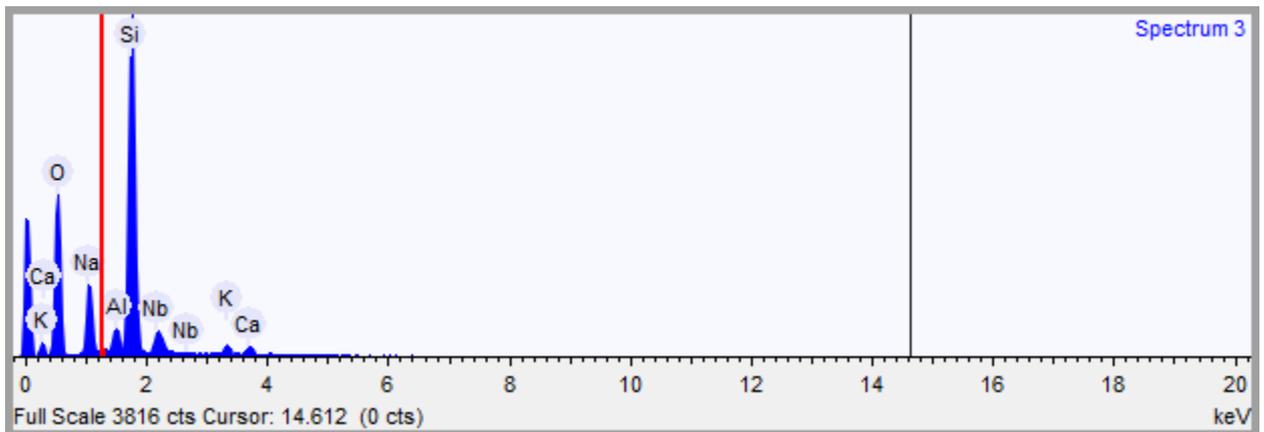
Tabela 2 – Quantidade dos elementos e compostos obtidas na análise por EDS da região escura das “agulhas”.

Elemento	Peso %	Atômica %	Composto %	Fórmula
Sódio	63,230	57,195	85,232	Na <sub>2</sub> O
Silício	5,257	3,892	11,245	SiO <sub>2</sub>
Potássio	0,859	0,457	1,035	K <sub>2</sub> O
Cálcio	1,778	0,923	2,488	CaO
Oxigênio	28,876	37,533	-	-

Seguindo a análise por EDS das regiões descritas, e que posteriormente será demonstrado pelas ligações encontradas no FTIR, pode-se notar (como por exemplo na região da Figura 35 abaixo) a estruturação dos compostos baseados em silício e a redução de elementos como o Na, Nb e Ca nessas regiões. O íon de Ca têm, para o presente trabalho, a importante função de agente biocida (MOYA, J.S.;, 2012), por tanto, se não se une fortemente a estrutura, tem a possibilidade de agir na polarização com as bactérias eliminando-as, como mostrará o ensaio biocida do item 3.2.2.8



(a)



(b)

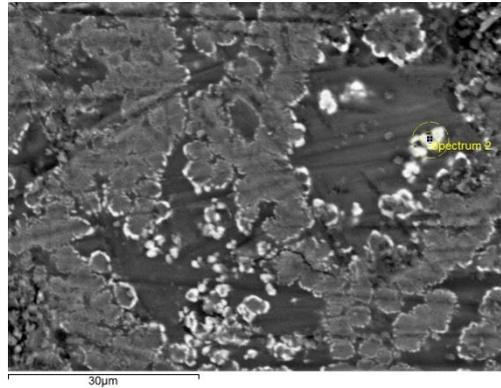
Figura 35 - Imagem (a) e espectro (b) da análise por EDS da região com alta concentração de Si.

A Tabela 3 mostra a quantidade dos elementos e compostos encontrados por análise EDS na região da Figura 35.

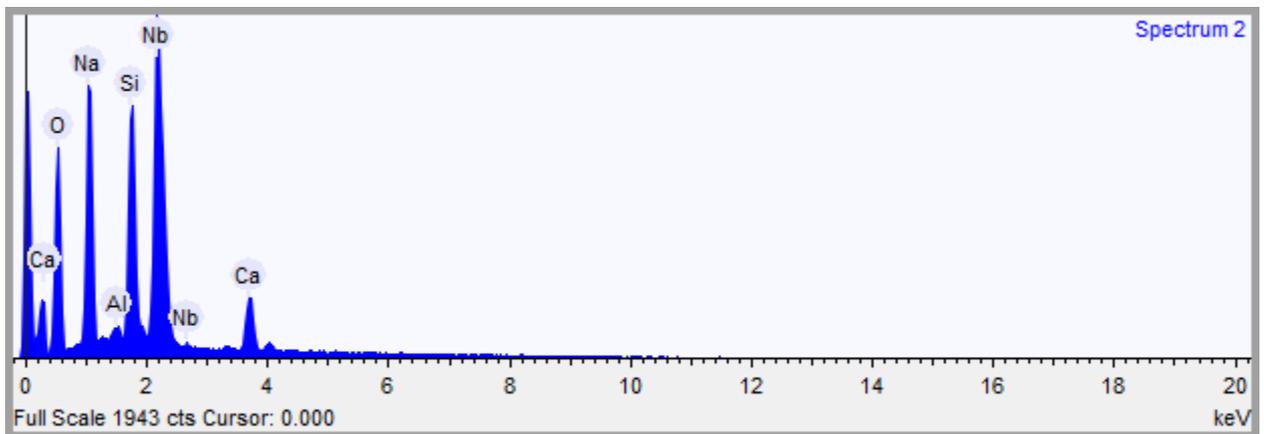
Tabela 3 - Quantidade dos elementos e compostos obtidas na análise por EDS da região com alta concentração de Si.

Elemento	Peso %	Atômica %	Composto %	Fórmula
Sódio	8,721	8,170	11,755	Na <sub>2</sub> O
Alumínio	2,147	1,714	4,056	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Silício	32,209	24,700	68,905	SiO <sub>2</sub>
Potássio	1,472	0,811	1,774	K <sub>2</sub> O
Cálcio	1,709	0,918	2,391	CaO
Nióbio	7,773	1,802	11,119	Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Oxigênio	45,969	61,885	-	-

As regiões mais claras, como mostram a Figura 36 e a Tabela 4 abaixo, possuem alta concentração do elemento Nb.



(a)



(b)

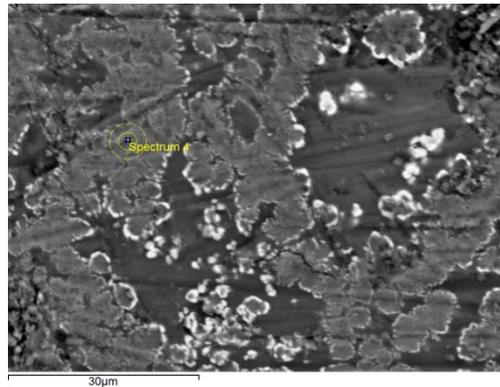
Figura 36 – Imagem (a) e espectro (b) da análise por EDS da região com alta concentração de Nb.

Tabela 4 - Quantidade dos elementos e compostos obtidas na análise por EDS da região com alta concentração de Nb.

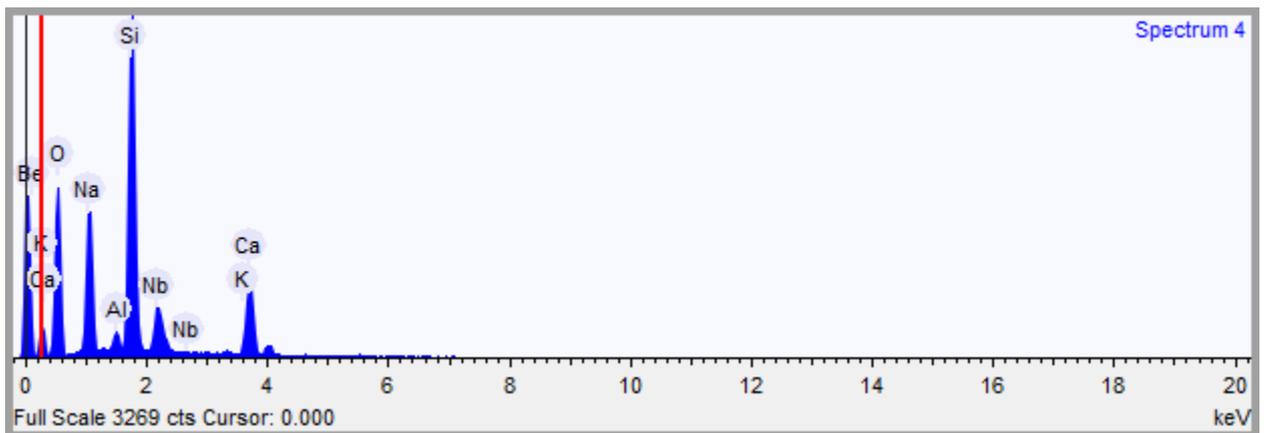
Elemento	Peso %	Atômica %	Composto %	Fórmula
Sódio	14,339	17,219	19,328	Na <sub>2</sub> O
Alumínio	0,577	0,590	1,089	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Silício	9,479	9,318	20,279	SiO <sub>2</sub>
Cálcio	4,516	3,111	6,319	CaO
Nióbio	37,039	11,006	52,985	Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Oxigênio	34,050	58,756		

A alta concentração de Nb na região vai de encontro aos resultados obtidos e explicitados mais adiante pelo FTIR do item 3.2.24, que explica as possíveis alterações ocorridas nas ligações químicas após o processo de devitrificação.

A região localizada na Figura 37 mostra a região de maior proximidade com a composição química calculada e produzida para o T15CNb no presente trabalho.



(a)



(b)

Figura 37 – Imagem (a) e espectro (b) da análise por EDS da região de composição mais próxima da calculada e produzida.

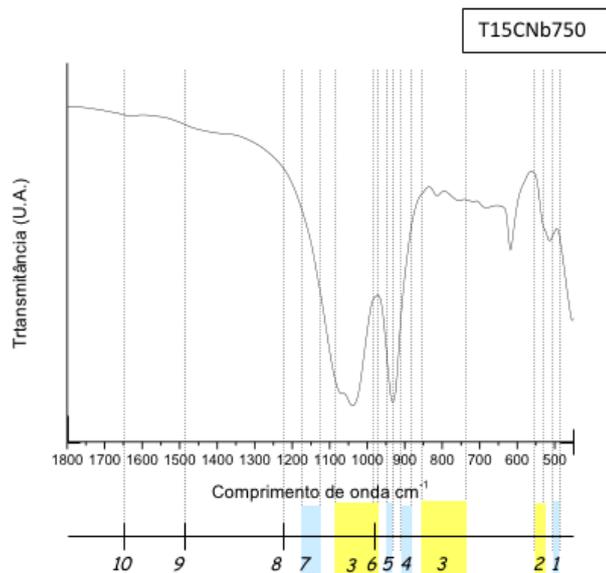
A Tabela 5 abaixo traz a comparação das porcentagens dos compostos encontrados na região da Figura 37 com a composição química calculada e misturada para a fusão do material inicial T15CNb.

Tabela 5 – Comparação das composições por EDS e produzida.

Fórmula	Composto %	<b>T15C(Nb)</b> -% massa
SiO <sub>2</sub>	50,08	43,71
Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	14,95	14,52
Na <sub>2</sub> O	18,51	25,25
CaO	13,89	13,68
K <sub>2</sub> O	0,52	0,92
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,05	1,84

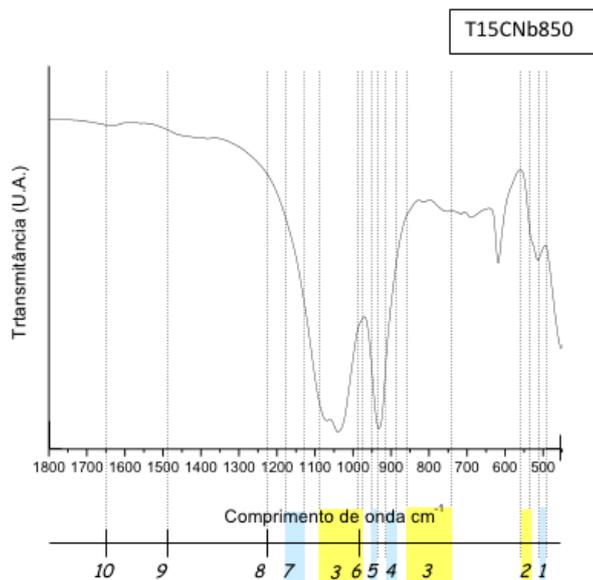
3.2.2.4 – Espectrometria no Infravermelho com transformada de Fourier, FTIR, para os vitrocerâmicos estudados

Na Figura 38 vemos os FTIR das amostras T15CNb750 e T15CNb850.



1. Si-O-Si [Q<sup>4</sup>]
2. Óxidos metálicos segregados
3. Silicatos de metais
4. Si-O[NB],[Q<sup>0</sup>]
5. Si-O[NB][Q<sup>1</sup>]
6. Si-O[NB],[Q<sup>2</sup>]
7. Si-O[NB],[Q<sup>3</sup>]
8. Si-O,[Q<sup>4</sup>]
9. Na-O
10. Água estrutural (1640)

(a)



1. Si-O-Si [Q<sup>4</sup>]
2. Óxidos metálicos segregados
3. Silicatos de metais
4. Si-O[NB],[Q<sup>0</sup>]
5. Si-O[NB][Q<sup>1</sup>]
6. Si-O[NB],[Q<sup>2</sup>]
7. Si-O[NB],[Q<sup>3</sup>]
8. Si-O,[Q<sup>4</sup>]
9. Na-O
10. Água estrutural (1640)

(b)

Figura 38 – FTIR das amostras T15CNb750 (a) e T15CNb850 (b).

É possível notar que, para ambos os casos da Figura 38, o material manteve metais segregados (2), provavelmente o nióbio, o que se confirma pela análise por EDS da Figura 36.

Houve nítida redução nos silicatos de metais (3) entre 820-700 cm<sup>-1</sup>. Nesta região os silicatos de metais normalmente estão associados a metais como o nióbio. Metais alcalinos e alcalinos terrosos estão na região à esquerda, ocorrendo a concentração nas formas que correspondem às energias de ligação encontradas em 1030 e 1060 cm<sup>-1</sup> - indício claro de cristalização, pois há redução nos tipos aleatório de ligações.

A sílica  $Q^0$  (4) e  $Q^1$  (5) parecem se rearranjar na forma  $Q^1$ , o que pode indicar o rearranjo cristalino da rede vítrea ou a formação de silicatos de metais segregados da rede (cristais).

A sílica  $Q^2$  (6) responsável pela formação de filamentos de sílica é básica numa estrutura de vidro similar ao soda-cal ( $Q^2$  e  $Q^3$  principalmente). A redução de intensidade do pico  $Q^2$  indica intenso rearranjo na estrutura vítrea, possível representação de devitrificação.

A estrutura parece concentrar-se em  $Q^3$  (7) e  $Q^4$  (1 e 8), sinal de uma estrutura mais compacta, próxima a sílica cristalina ou tendendo a essa forma – aqui, há diferença entre as Figuras 38 (a) e (b), pois parece haver maior segregação de  $Q^4$  em TCNb750.

Os picos relativos às ligações Na-O (9) e água estrutural (10) reduziram de intensidade, o que pode representar a segregação destes e sugerir maior resistência química do vidro devitrificado (vitrocerâmico).

### 3.2.2.5 – Ensaio de dureza dos substratos

A dureza é uma propriedade mecânica que mostra a resistência de um material à deformação. A tabela desenvolvida por Mohs mostra uma escala de 1 a 10, do talco ao diamante, no qual é classificada a capacidade de um material riscar o outro. Essa é a primeira definição conhecida para a dureza. Existem algumas maneiras de se realizar uma medida de dureza, mas basicamente o conceito se resume na penetração de um material mais duro em um material mais mole. De acordo com a área de impressão são realizados cálculos para a obtenção de um valor de dureza a ser comparado (MASSARDO, S. B., 2011).

O material é penetrado por indentação, por uma ponta denominada indentador; após um período de tempo da carga removida, uma área impressa permanece no material. A área da impressão residual plástica é então analisada por microscopia utilizando a relação entre a área (A) e a carga aplicada (P) previamente conhecida. No presente trabalho foi utilizado indentador de base quadrada (*Vickers – Buehler* modelo Micromet 5103), cuja área de impressão esta representada pela Figura 39. A dureza Vickers é representada pela sigla  $H_v$ .

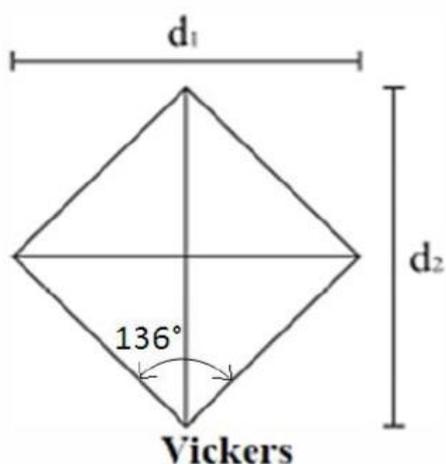


Figura 39 – Representação da impressão gerada por penetradores de uma indentação do tipo Vickers (MIKOWSKI, A., 2008).

É importante entender se houveram alterações mecânicas nos substratos do material depositado pois podem haver modificações em sua resistência. Para o presente trabalho isso poderá afetar na peça (prótese/implante) a ser introduzida no corpo. Por isso, foram realizados ensaios de dureza Vickers nos substratos de aço inox 316 e de titânio antes e depois de seus respectivos tratamentos térmicos (750°C em ar e 850°C em argônio) utilizando carga de indentação de 1000 mg por 10 segundos nos materiais T15CNb. A Tabela 6 apresenta a comparação dos valores medidos.

Tabela 6 – Dureza Vickers para os substratos antes e depois dos tratamentos térmicos.

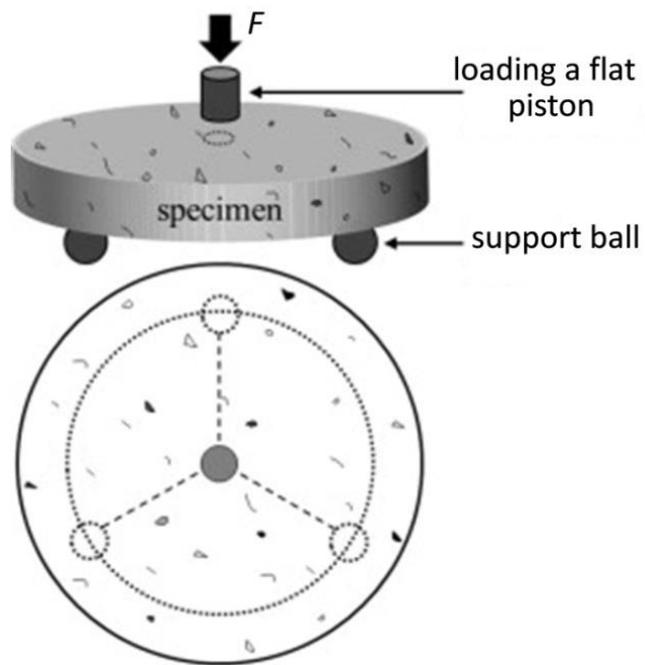
HV para o <b>aço inox</b> medida ANTES do tratamento térmico + desvio padrão	HV para o <b>aço inox</b> medida APÓS o tratamento térmico + desvio padrão	HV para o <b>titânio</b> medida ANTES do tratamento térmico + desvio padrão	HV para o <b>titânio</b> medida APÓS o tratamento térmico + desvio padrão
139 ± 4	134 ± 2	229 ± 4	230 ± 2

É possível notar, de acordo com a Tabela 6, que praticamente não há alteração no que diz respeito a dureza dos materiais antes e depois dos tratamentos térmicos. São necessários ensaios mais aprofundados para uma melhor conclusão, porém são bons indicativos da baixa, ou inexistente, influência do tratamento térmico no comportamento mecânico dos substratos.

### 3.2.2.6 – Ensaio de flexão biaxial dos vitrocerâmicos

Devido à fragilidade inerente, a resistência de materiais cerâmicos é normalmente medida em testes de flexão uniaxial de 3 ou 4 pontos, utilizando amostras prismáticas. Contudo, a desvantagem deste método é a preparação da amostra; as barras têm de ser cortadas a partir do *bulk* do material, e a superfície de tração deve estar livre de defeitos, ou seja, é necessário cuidado no tratamento com a superfície e com as bordas das amostras do material. Uma alternativa para os ensaios de flexão de 3 ou 4 pontos é o ensaio de flexão biaxial. A vantagem desse ensaio é que o que se submete a um estado biaxial de tensão é a porção central da amostra. O ensaio independe das condições das bordas e responde às falhas independentemente da direção. A técnica é simples, de baixo custo, e não requer preparo rigoroso da amostra.

O método determina a resistência com precisão elástica para pequenas deflexões. Para os ensaios, as cerâmicas podem ser produzidas em forma cilíndrica e os discos podem ser cortados no corpo a verde ou parte sinterizada. Existem diferentes tipos de carregamento utilizados para ensaiar amostras cerâmicas em forma de disco por flexão biaxial. O método aqui utilizado, e padronizado (ASTM F 394; ISO 6872), foi o ensaio de pistão-em-três-esferas, como ilustra a Figura 40 abaixo.



(a)



(b)

Figura 40 - Desenho esquemático do método de ensaio pistão-em-três-esferas para resistência à flexão biaxial (a) e a máquina de ensaio universal com configuração biaxial (b).

Cada amostra polida (foram realizadas 10 amostras para cada condição) em forma de disco com espessura de aproximadamente 2,0 mm foi colocada de maneira central nas três bolas de aço endurecido (com o diâmetro de 3 mm e posicionadas a  $120^\circ$  entre si em um suporte circular com diâmetro de 10 mm). A superfície polida da amostra foi submetida a

tensão enquanto que a superfície não polida foi carregada por um punção plano de diâmetro 1,2 mm no centro, com velocidade de 1 mm/min até o rompimento.

A Figura 41 mostra uma das 10 curvas realizadas como exemplo do desenvolvimento do ensaio.

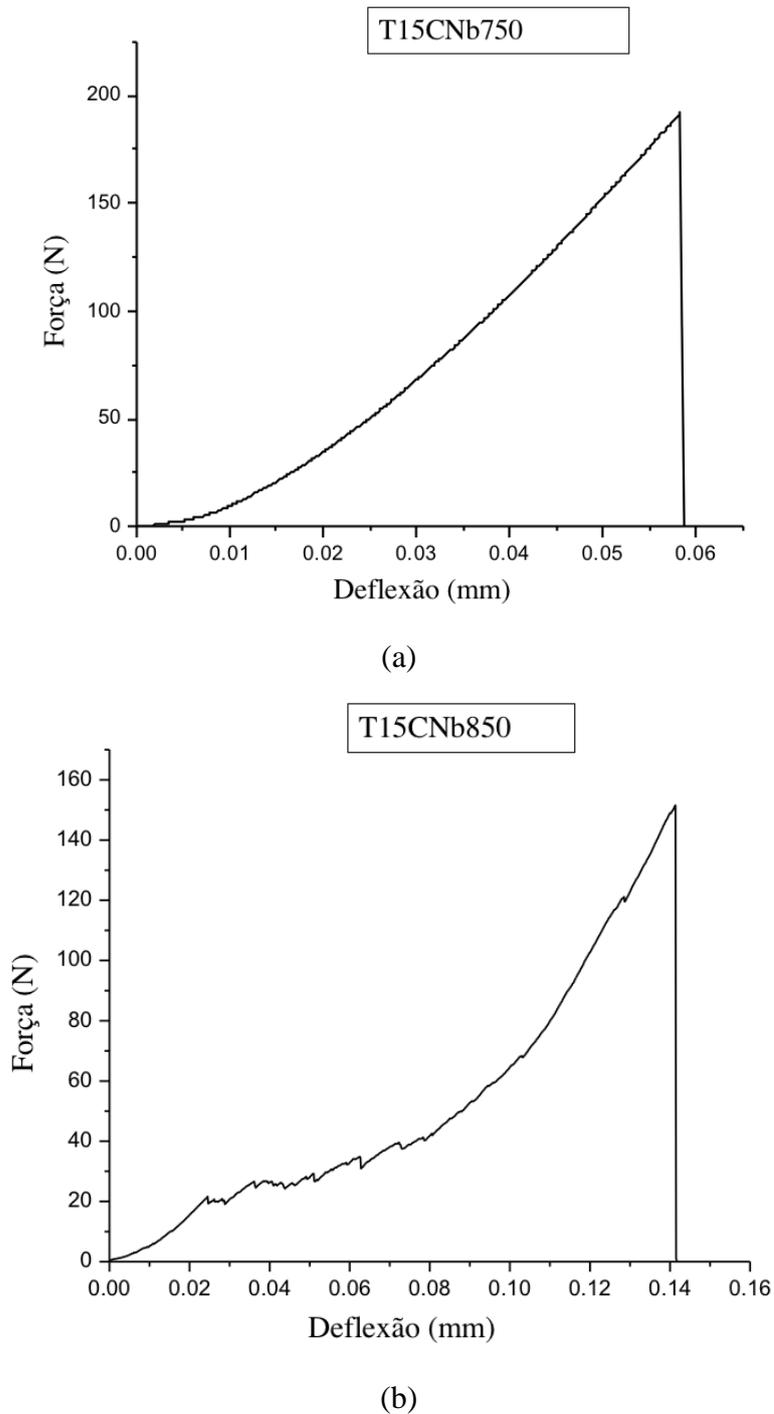


Figura 41 – Ensaio de flexão biaxial para T15CNb tratado termicamente a 750°C em ar (a) e a 850°C em argônio (b).

A carga encontrada para o rompimento (N) de cada amostra foi registrada e a resistência à flexão biaxial (MPa) pôde ser calculada utilizando a seguinte equação:

$$S = -0.2387P(X - Y)/d^2$$

Onde  $S$  (ou  $\sigma_s$ ) é a tensão máxima de ruptura (MPa);  $P$  a carga total causadora da fratura (N); e  $d$  é a espessura da amostra na origem da fratura (mm).  $X$  e  $Y$  foram determinados de acordo com as equações abaixo:

$$X = (1 + \nu) \ln(r_2 / r_3)^2 + [(1 - \nu) / 2] (r_2 / r_3)^2$$

$$Y = (1 + \nu) [1 + \ln(r_1 / r_3)^2] + (1 - \nu) (r_1 / r_3)^2$$

Onde  $\nu$  é o coeficiente de Poisson;  $r_1$  é o raio do círculo do suporte;  $r_2$  é o raio da área submetida à carga (mm);  $r_3$  é o raio da amostra (mm); e  $d$  é a espessura da amostra na origem da fratura (mm).

É possível notar, na Figura 41 (b), que a fratura não se apresenta de maneira integralmente frágil, como na Figura 41 (a), já que regiões de pequenos deslizamentos/acomodações e não linearidade são visualizadas. Essas acomodações podem advir das regiões de porosidade – tanto através de mecanismos de sinterização (maiores temperaturas e diferente atmosfera), quanto pela aparente presença de bolhas durante o processo de devitrificação (Figura 30).

A média dos valores de flexão encontrados e os respectivos desvios padrão de ambos os materiais pode ser vista na Tabela 7 abaixo, onde se nota que as amostras tratadas em menor temperatura e ar obtiveram praticamente o dobro do valor de resistência à flexão biaxial das tratadas em maior temperatura e argônio.

Tabela 7 – Valores médios das tensões máximas de ruptura obtidas por ensaio de flexão biaxial.

$S$ ( $\sigma_s$ ) (T15CNb750 - ar) + desvio padrão	$S$ ( $\sigma_s$ ) (T15CNb850 - argônio) + desvio padrão
84 ± 25	45 ± 11

### 3.2.2.7 - Citotoxicidade do vitrocerâmico

Amostras relativas à composição T15CNb, tratadas termicamente a 750°C em ar e 850°C em argônio, para obter a transformação cristalina do vidro em vitrocerâmico, foram submetidas aos testes de citotoxicidade (também no CQMA do IPEN), para verificar se há viabilidade celular nas composições propostas também após os tratamentos térmicos – além da viabilidade no material vítreo, demonstrada no item 3.2.1.2 -, já que os recobrimentos, nos substratos estudados, requerem tais transformações no material final.

A Figura 42 mostra os resultados obtidos relativos aos ensaios de citotoxicidade para as amostras das composições T15CNb nas diferentes temperaturas e atmosferas.

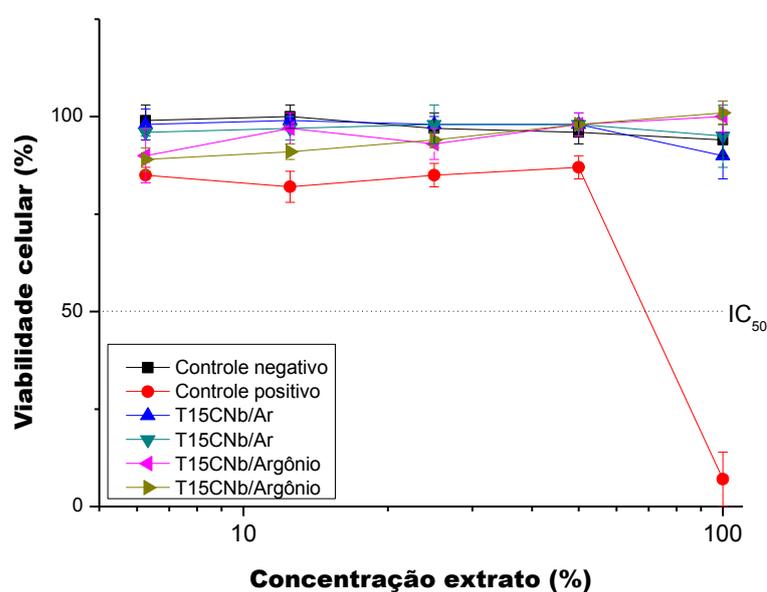


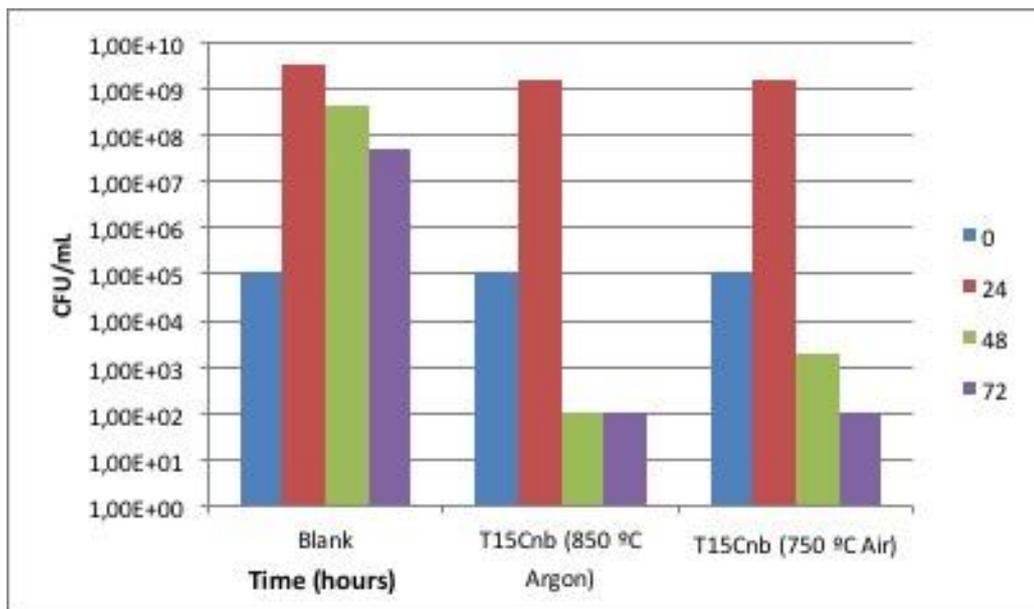
Figura 42 - Curvas de Viabilidade Celular obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro para os vitrocerâmicos de recobrimento.

Observa-se que, assim como no material vítreo, aqui, os vitrocerâmicos - seja na temperatura de 750°C em ar, seja na temperatura de 850°C em argônio - apresentaram comportamento não citotóxico; parte importante para a obtenção do caráter multifuncional da camada de recobrimento estudada.

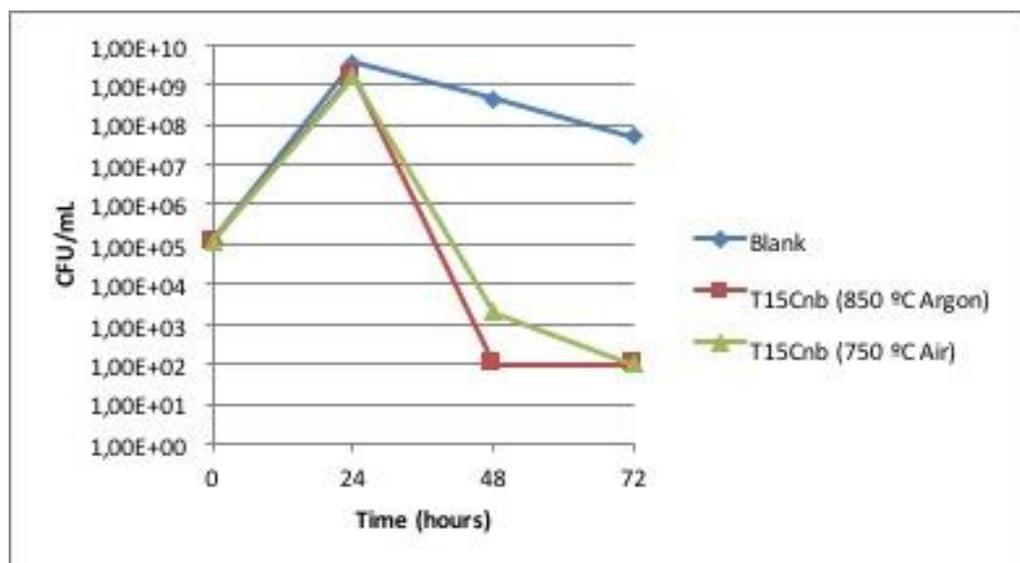
### 3.2.2.8 – Atividade biocida do vitrocerâmico

Para verificar a atividade biocida da composição T15CNb após os tratamentos térmicos, e conseqüentemente cristalizado em vitrocerâmico, utilizando as temperaturas de

750°C (ar – substrato de aço inox) e 850°C (argônio – substrato de titânio), foi novamente realizado o ensaio descrito no item 3.2.1.4, agora pela pesquisadora Dra. Belén Cabal no mesmo CINN-CSIC. O ensaio, que implicou na incubação da substância investigada dentro da suspensão bacteriana a 37 ° C sob agitação, foi, dessa vez, averiguado com maior detalhamento em relação aos tempos em que os materiais foram submetidos às análises de viabilidade bacteriana: os tempos de incubação estudados foram de 24, 48 e 72 horas. O resultado do ensaio pode ser visualizado na Figura 43.



(a)



(b)

Figura 43 –Gráfico (a) e curva (b) comparativa entre os vitrocerâmicos de recobrimento e o controle bacteriano (blank) ao longo do tempo.

Pode-se notar que a amostra T15CNb, mesmo cristalizada, e para ambas as temperaturas, manteve o carácter biocida como no material vítreo. A redução na colônia de bactérias foi bastante expressiva, sendo esse mais um ótimo indicativo do comportamento multifuncional esperado e estudado no presente trabalho.

### 3.2.2.9 - Crescimento celular no substrato

O crescimento celular tem papel fundamental para a intenção a qual o presente material se propõe. Pois há necessidade de que, além de compatível do ponto de vista citotóxico - e que tenha carácter biocida (como confirmado nos itens 3.2.1.4 e 3.2.2.8) -, ele também possibilite boa integração do substrato que protagonizará o papel de prótese/implante na interface com as células do corpo. Por isso é necessário um maior detalhamento do ensaio.

A metodologia para tal seguiu a padronização do projeto FAPESP 2015/022657 (Prof<sup>ª</sup>. Dra Cecilia Guedes), e foi realizado pela pesquisadora Andrea Cecilia Dorión Rodas nos laboratórios do Centro de Biotecnologia do IPEN.

As células MG63 são uma linhagem celular isolada inicialmente de osteosarcoma humano. A aplicação destas células é útil para avaliar a adesão e proliferação de células com morfologia e funcionalidade semelhantes aos osteoblastos.

As células foram cultivadas com meio de cultura MEM (Minimum Essential Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótico/antimicótico. As células foram mantidas em uma incubadora úmida na temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Quando as células ocupavam aproximadamente 80% da área de cultivo no frasco de cultura, foram descoladas pela ação enzimática de solução de tripsina 0,05% /EDTA 0,02% e amplificadas na proporção de 1:5 ou utilizadas para adesão nas amostras.

Os corpos de prova - T15CNb em titânio tratado a 850°C em argônio (T15CNbTi), e T15CNb em aço inox tratado a 750°C em ar (T15CNbAço) - tinham tamanho aproximado de 1 X 1 cm, os quais foram esterilizadas por calor seco (180°C por 2 horas) e acomodadas em uma placa de 24 cavidades. Foi adicionado o meio de cultura uma hora antes da semeadura das células.

As células MG63 foram utilizadas entre a 10<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> passagem, quando atingiram a subconfluência, foram retiradas do frasco de cultura por ação da solução tripsina/EDTA e contadas em câmara de Neubauer. A partir da contagem celular, foi preparada uma suspensão celular com quantidade final de 2,2 X 10<sup>4</sup> células por cavidade com o corpo de prova. As amostras foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Uma amostra de cada exemplar foi retirada em 3, 5, 7 e 14 dias. Foi realizado teste de viabilidade celular e posterior fixação das células para avaliação no microscópio.

A viabilidade celular foi verificada pela reação do corpo de prova com um corante vital, o MTS. O corante vital é um componente do kit CellTiter96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> Non – RadioactiveCellProliferationAssay (Promega Corporation).

O teste CellTiter96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> é um método colorimétrico para determinação do número de células viáveis em testes proliferativos ou quimiossensitivos, preparado com soluções de um composto tetrazólico (3-(dimetiliazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, sal inerte, MTS) e um reagente acoplador de elétrons (metassulfato de fenazida, PMS) [Cory, 1991]. O MTS é bio-reduzido pelas células ao produto formazan que é solúvel no meio de cultura. A absorbância do formazan a 490nm pode ser medida diretamente no meio de cultura sem adição de outros reagentes. A conversão do MTS em formazan solúvel aquoso é executada pela enzima desidrogenase, encontrada em células metabolicamente ativas. A quantidade do produto de formazan como medida da quantidade de absorbância a 490nm é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura.

Os corpos de prova com as células foram transferidos para uma placa nova a cada tempo determinado. Foi adicionado 500µL de meio de cultura e 100µL da solução de MTS. A placa foi colocada na incubadora novamente por 2 horas. Foram recuperados 500µL de cada meio que foram acondicionados de 100 em 100µL em uma placa de 96 cavidades e levados a um espectrofotômetro tipo ELISA para leitura da absorbância. O mesmo procedimento foi realizado para amostras sem células que foi usada como branco nos cálculos.

Para determinação do número de células que cresceram nos corpos de prova, foi utilizada a equação linear de uma curva de calibração onde:

$$\text{Absorbância (490nm)} = 0,00392 + 0,00491 \times \text{número de células}$$

$$\text{Correlação Linear} = 0,997$$

Após reação com o MTS, os corpos de prova foram lavados com solução de cloreto de sódio 0,9% (m/v) e imediatamente fixadas com formaldeído 4% em solução cloreto de sódio 0,9% por 30 minutos. As amostras foram secas a temperatura ambiente e cobertas para proteção contra a deposição de poeira; ao final as amostras foram coradas com solução de Alizarina S Red 2% em água destilada (pH 4,2) para análise funcional durante 10 minutos e, então, lavadas com água destilada, este teste foi utilizado para analisar a calcificação dos osteoblastos e interligações da estrutura *in vitro* produzida.

Após secas, as amostras coradas foram analisadas no microscópio confocal a laser *Olympus LEXT OLS4100* para análise da formação de neo-osso, como descrito em MOURA *et al.* (2007).

A Figura 44 mostra a curva de crescimento das células MG63 em diferentes superfícies.

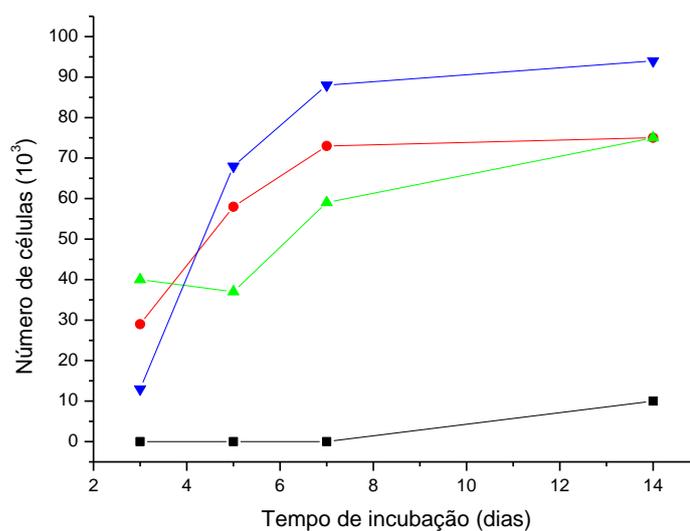


Figura 44. Curva de crescimento das células MG63 sobre as superfícies de: (■)T15CNbAço; (●)T15CNbTi; (▲) Ti; (▼) aço.

As Figuras 45 e 46 mostram a morfologia das células sobre os corpos de prova após coloração pela Alizarina Red S. A alizarina S é utilizada para corar cálcio em amostras e quando em contato com o cálcio, a alizarina fica avermelhada. Quando o cálcio está em contato com outros compostos sua cor pode variar entre amarelo e castanho, principalmente quando ligada à moléculas de fosfato, como é o caso da hidroxiapatita, que é a estrutura mineral do osso (PUCHTLER, H., 1969).

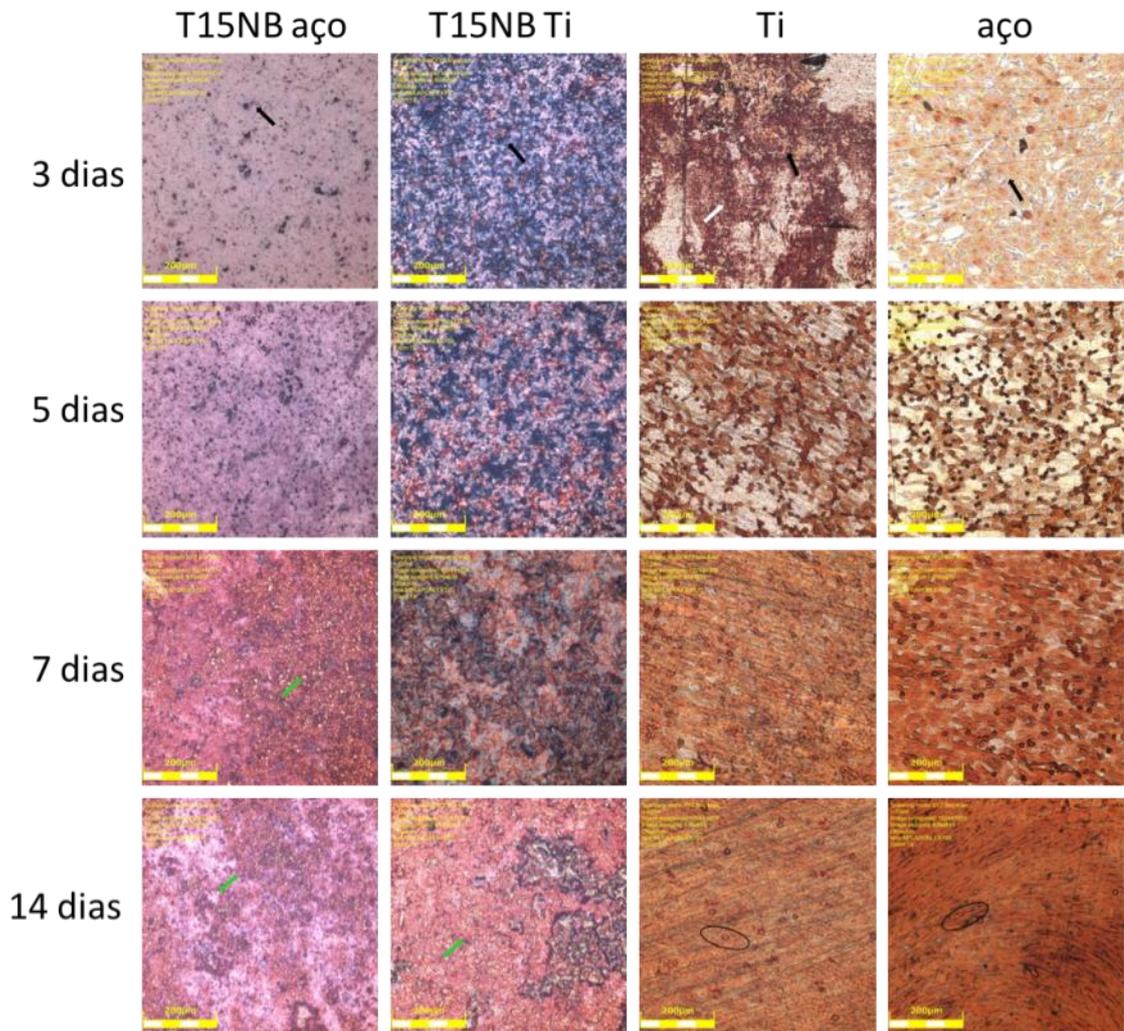


Figura 45. Observação das células MG63 sobre a superfície dos corpos de prova T15CNbAço, T15CNbTi, Ti e aço inox. Setas pretas: exemplar de célula aderida; seta branca: oxidação da superfície de Ti; setas verdes: modificação da matriz de cálcio; círculos pretos: observação de células aderidas nas superfícies em camada confluenta.

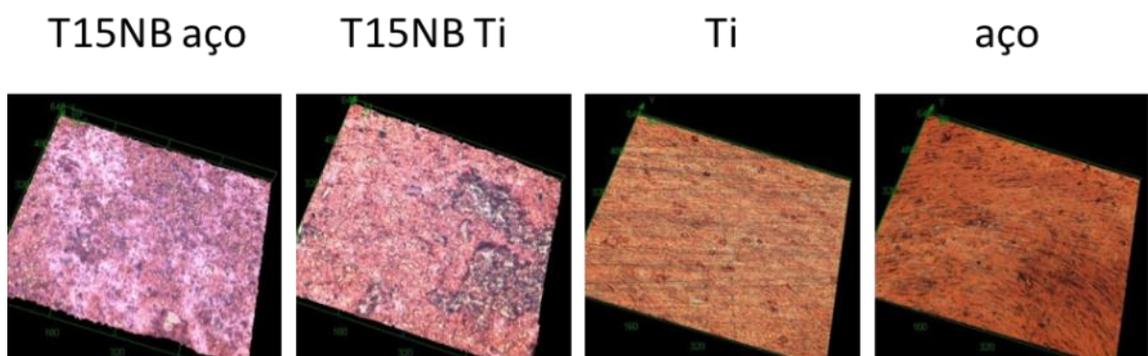


Figura 46. Observação 3D das células MG63 sobre a superfície dos corpos de prova T15CNbAço, T15CNbTi, Ti e aço inox após 14 dias de cultivo.

Na Figura 44 podemos observar a atividade celular na superfície dos corpos de prova e sua variação em relação ao tempo em que o sistema foi deixado em cultura. Neste estudo preliminar onde foi realizado o teste em um exemplar para cada tempo, pode-se observar que há adesão das células nas superfícies de T15CNbTi, Ti e aço inox em quantidade significativa para serem detectados pelo reagente MTS e que após 14 dias de cultivo o crescimento das células mostra uma tendência à estabilização. Para uma conclusão mais precisa do teste, seria necessário realizar mais 5 replicatas das amostras para confirmar a não casualidade dos resultados por análise estatística paramétrica; mesmo assim, os corpos de prova de T15CNbTi, Ti e aço mostraram-se promissores para adesão e proliferação das células MG63. Ti e aço inox da série 300 (como desse caso) já apresentaram valores significativos de crescimento celular anteriormente (FEDERMAN, S.R., 2009; YEUNG, K.W.K., 2007)

A Figura 45 corrobora os resultados da atividade celular com o MTS. Nas Figuras correspondentes aos 3 dias de cultivo estão marcadas as células representativas sobre os corpos de prova; pela própria análise microscópica, pode-se evidenciar o aumento do número de células na superfície até o 7º dia, onde as células chegam à confluência formando uma monocamada. Parte das células cultivadas parecem disformes, pois foram fixadas após a reação com o MTS, o qual mesmo sendo um corante vital, causa dano celular até o final da reação, sendo mais evidente no 5º dia de cultivo onde as células ainda não cobriram toda a superfície e parte das células foi descolada durante a manipulação.

Na comparação da atividade celular (Figura 44) e morfologia (Figura 45) das amostras de Ti e aço inox, já são utilizados para confecção de próteses/implantes, verifica-se que no 3º dias de cultivo há maior atividade celular no Ti; porém na análise da fotografia, o aço inox parece mais recoberto pelas células. Nesse caso, o que pode estar acontecendo é uma alta polarização das células no aço inox, fazendo com que elas “esparrem” seu citoplasma e assim recubram uma maior área desse aço, porém não significa que o número de células seja maior. Isto pode estar atribuído à rugosidade das amostras, uma vez que o aço inox estava polido e o Ti possuía ranhuras.

Na observação da Figura 45, aos 14 dias, as ranhuras de Ti parecem ter direcionado as células para o crescimento de maneira linear; já para o aço, que estava polido, as células tomaram forma circular.

Ainda na Figura 45, nas amostras recobertas com T15CNb, verifica-se reação espontânea do vitrocerâmico de recobrimento com o cálcio e o fosfato contidos no meio de cultura - trocado a cada 3 dias. A interação das células aderidas faz com que seja produzido colágeno como matriz extracelular, e este colágeno é responsável pela nucleação cálcio-

fosfato. (WIESMANM, H.P., 2005; NUDELMAN, F. 2013; LANDIS, W.J., 2013). Fato que é mais bem visualizado na Figura 46, em que o espessamento da camada de hidroxiapatita no T15CNbTi é mais homogênea.

Para uma investigação mais detalhada da compatibilidade do recobrimento de T15CNb no Ti ou no aço inox - com desenvolvimento de implante óssea -, ainda é necessário ensaio complementar de bioatividade com SBF (*Simulated Body Fluid*); (KOKUBO, T., 2006).

## CONCLUSÕES

Foi possível realizar o cálculo de duas composições ótimas - que numericamente se apresentam como biologicamente adequadas ao propósito, e ao mesmo tempo possíveis de receber o Nb (metal que vem obtendo importantes resultados em tal meio) em sua rede – a T15CNb e a T20CNb, utilizando cálculos estequiométricos baseados em resultados que o grupo vem obtendo pelo estudo do Diagrama Trifásico da composição em questão.

Foi possível realizar a deposição e a adesão (verificou-se o comportamento do material vítreo para três diferentes substratos: titânio, aço inox 316l e alumina) em titânio e aço inox; porém, com tratamentos térmicos de 850°C em argônio para o primeiro, e de 750°C em ar para o segundo, ambos por 1 hora no patamar.

Verificou-se, a partir das ligações químicas, ser possível que  $\text{Ca}^{2+}$  exerça atividade biocida - as ligações químicas em ambos os materiais foram parecidas, porém, notou-se pelo FTIR dos materiais ainda vítreos, que em T20CNb o  $\text{Na}^+$  foi menos solicitado para a compensação de cargas, e a exigência de  $\text{Na}^+$  para tal compensação, no caso do sistema aqui proposto, é fator determinante para que o  $\text{Ca}^{2+}$  esteja fracamente unido a rede, e assim possa desempenhar o papel de agente biocida.

Do ponto de vista biológico, a citotoxicidade de ambos os materiais foi inexistente, porém, o material T20CNb na forma vítrea não obteve carácter biocida, como consequência que comprova o equilíbrio de cargas do FTIR descrito; já T15CNb sim, o que fez com que o desenvolvimento posterior se restringisse ao T15CNb, já que o comportamento biocida é parte fundamental do desenvolvimento do substrato multifuncional em questão.

Foi possível verificar que, para as temperaturas exigidas de deposição do revestimento no substrato, a composição sofre devitrificação, ou seja, perde o carácter vítreo e se torna um vitrocerâmico.

No detalhamento realizado para se obter um revestimento adequado, foi possível propor estratégias para esse revestimento, como deposição por diluição e secagem e *dipping*; sendo a primeira utilizada até o final do trabalho e entendendo-se a deposição de menor espessura como mais adequada para homogeneização e aderência.

Verificou-se, por dureza *Vickers*, que não houve alteração expressiva no comportamento mecânico dos substratos - pela necessidade de realização de tratamentos térmicos para o conjunto revestimento-substrato, os ensaios foram realizados no titânio e no aço inox antes e depois dos tratamentos -, ou seja, não parece haver alteração no material que se pretende utilizar posteriormente como prótese/implante.

Na caracterização microestrutural, bem como de acordo com os novos FTIRs, foi possível encontrar regiões com maiores concentrações de Na (em forma de “agulhas”), outras de maiores concentrações de Nb e outras ainda de maiores concentrações de Si, indicando um arranjo estrutural interessante do ponto de vista biológico, já que o  $\text{Ca}^{2+}$ , como se discutiu, pôde ficar livre.

Os tratamentos térmicos produziram arranjos estruturais diferentes nos materiais: os ensaios de fratura mostraram que o menor tratamento térmico ( $750^{\circ}\text{C}$  em ar) obteve quase o dobro do valor do maior ( $850^{\circ}\text{C}$  em argônio), talvez pela maior porosidade vista nos ensaios micrográficos por MEV.

A repetição dos ensaios de citotoxicidade e comportamento biocida para o T15CNb (vitrocerâmico) nas duas condições de tratamentos térmicos escolhidos manteve a resposta dos primeiros. As amostras foram não citotóxicas e biocidas.

Com o estudo da composição de recobrimento, da espessura desse recobrimento, dos tipos de substratos e tratamentos térmicos escolhidos - além de constatados carácter não citotóxico e biocida -, foi possível produzir pequenas placas, de dimensão  $1,0 \times 1,0$  cm, de boa distribuição superficial (do conjunto substrato-recobrimento) para realização do ensaio de crescimento celular.

Os resultados de crescimento celular foram bastante animadores, sobretudo para o recobrimento em titânio, já que o crescimento das células se deu de maneira considerável. O recobrimento em aço inox não obteve bom desempenho nesse caso.

Diante de todo o exposto, é possível afirmar que a proposição desse trabalho, de desenvolver um novo e promissor recobrimento multifuncional que reunisse características não citotóxicas, biocidas e possibilitasse crescimento celular, foi bem-sucedida. A situação que melhor demonstra esse fato é a deposição do material vítreo T15CNb com espessura E1 em substrato de titânio tratado termicamente a  $850^{\circ}\text{C}$  por 1 hora em atmosfera de argônio, já que contempla toda a multifuncionalidade proposta.

## SUGESTÕES FUTURAS

Diante dos bons resultados obtidos é necessário que se ressaltem algumas sugestões e considerações.

Apesar de já citada ao longo do trabalho, é importante pontuar novamente a necessária repetição de algumas análises para que não configurem eventualidade, principalmente para os importantes resultados de crescimento celular.

Também é necessário ensaio complementar de bioatividade por SBF.

O trabalho de superfície, apesar da necessária e satisfatória (indo além da proposta) amplitude atingida ao longo do presente trabalho, requer atenção ainda maior, já que pode influenciar diretamente nas respostas biológicas dos ensaios. São necessários cuidado e estudo específicos para a superfície, afim de que nenhum tipo de interpretação errônea aconteça.

Outros desdobramentos, a partir da nova composição de interesse multifuncional aqui desenvolvida, são possíveis e necessários para o melhor entendimento das características do material, como por exemplo um estudo mais detalhado dos tratamentos térmicos, levando em consideração, além das temperaturas para transformações cristalinas, também os tempos e as taxas de aquecimento/resfriamento no processo. Esse estudo nos trará, também, a possibilidade de observar a influência do tratamento na morfologia do material - certamente a frente de cristalização e a formação de fases será afetada por diferentes taxas e tempos. A adesão do recobrimento no substrato também sofrerá influência das configurações de tratamento.

Ainda que com resultados de crescimento celular, no caso do recobrimento em aço inox 316l, aquém do esperado, não é possível sugerir que o mesmo seja descartado como prótese/implante multifuncional, já que a anterior deposição do recobrimento no substrato pode afetar de maneira decisiva na resposta biológica posteriormente aferida. Por isso a recorrente afirmação de um estudo superficial mais detalhado, já que a composição - e por tanto também uma nova classe de materiais -, pôde ser alcançada pelo presente projeto.

## **AGRADECIMENTOS**

À **FAPESP** pelo aporte financeiro e confiança no trabalho depositados. Ao **IPEN** pelo acolhimento e estrutura disponibilizada. À **EEL-USP / DEMAR**, minha instituição de formação e parceira importante desse projeto. Ao **ICMM-CSIC** de Madri, Espanha, por receber-me e disponibilizar-me por duas vezes suas instalações, pessoal e material para o projeto. À minha supervisora e amiga Prof<sup>a</sup>. Sonia Regina Homem de Mello Castanho, do IPEN, por toda parceria e cuidado de sempre. Ao Prof. Antonio Carlos da Silva, importante parceiro na concepção e discussão desse projeto. Ao Prof. José Bartolomé, do ICMM-CSIC, pelo acolhimento, empenho e importantes discussões ao longo de todo o trabalho. Ao Prof. José Serafín Moya, Teresa Duran e Pedro Mario Garcia, também do ICMM-CSIC, pelas importantes contribuições ao longo do trabalho. Às Prof<sup>as</sup>. Belén Cabal e Elisa Fernandez-Garcia, do CINN-CSIC pela pronta parceria sempre que necessária. À Prof<sup>a</sup>. Andrea Cecilia Dorión Rodas dos laboratórios do Centro de Biotecnologia do IPEN e Universidade Federal do ABC (UFABC), por seus importantes ensaios e necessárias discussões acerca do assunto realizados. Às Prof<sup>as</sup>. Olga Zazuco Higa e Sizue Oto Rogero pelo trabalho e grande disposição em ajudar. À Prof<sup>a</sup>. Cecilia Guedes que disponibilizou parte do material de seu projeto para esse trabalho. Ao Prof. Claudinei dos Santos e Bruno Galvão Simba, respectivamente da UERJ e da FEG-UNESP, indispensáveis parceiros de trabalho, discussão e publicações do projeto. Ao Prof. Durval Rodrigues Jr. e ao Bruno Xavier Freitas da EEL-USP / DEMAR, pelas sempre pronta disposição em ajudar e cuidado com o trabalho.

## REFERÊNCIAS

ASTM F 394 - Standard test method for biaxial flexure strength (modulus of rupture) of ceramic substrates.

BOCCACCINI, A. R. HAMANN, B. In Situ high-temperature optical microscopy. *J. of Mat. Sci.*, v. 34, p. 5419-5436, 1999.

BOZIC, K. J.; RIES, M. D. The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization. *J. Bone Joint Surg.* V. 87(8), p. 1746-1751, 2005.

BLOCK, J. E.; STUBBS, H. A. Reducing the risk of deep wound infection in primary joint arthroplasty with antibiotic bone cement. *Orthopedics.* V. 28(11), p. 1334-1345, 2005.

CORY, A. H., OWEN, T.C., BARLTROP, J. A., CORY J.G., Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm*, v. 3,p. 207-212, 1991.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; GOTZ, F. In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation. *Methods in Enzymol.* V. 336, p. 239-255, 2001.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W.; Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiol.* V. 15(2), p. 167-193, 2002.

DUNBAR, M. J. Antibiotic bone cements: Their use in routine primary total joint arthroplasty is justified. *Orthopedics.* V. 33(9), p. 660, 2009.

ELIAS, C. N.; LIMA, J. H. C.; VALIEV, R.; MEYERS, M. A. Biomedical Applications of Titanium and its Alloys. V. 60 (3), p. 46-49, 2008.

ESTEBAN-TEJEDA, L. Actividad biocida de vidrios sodocálcicos que contienen nanopartículas d plata o cobre. 2012, 224 p. Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, (Tese de Doutorado), Madrid, 2012.

FEDERMAN, S. R.; MANSUR, H. S.; STANCIOLI, E. F. B.; VASCONCELOS, W. L. Biocompatibility evaluation of SiO<sub>2</sub>-CaO/stainless steel composite bioactive film for biomedical application. *Cerâmica*, v. 55, p. 257-262, 2009.

FLORES, C. Y.; DÍAZ, C.; RUBERT, A.; BENÍTEZ, G. A. et al. Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO<sub>2</sub> surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Colloid Interface Sci.* V. 350 (2), p. 402-408, 2010.

FONSECA, K. B.; PEREIRA, H. H.; SILVA, S. N. Avaliação de Falhas em Implantes Metálicos Coxo-Femoral e Joelho Retirados de Pacientes. V. 10 (3), p. 472-480, 2005.

GUO, G. CHEN, Y. Thermal analysis and infrared measurements of a lead-barium-aluminium phosphate glass. *J. Non-Cryst. Solids*, v. 201, p. 262-266, 1996.

HABIBE, A.F., et al., Effect of bioglass additions on the sintering of Y-TZP bioceramics. *Materials Science and Engineering: C*, v. 29, p. 1959-1964, 2009.

HANSEN, A. D. Prophylactic use of antibiotic bone cement: An emerging standard-In opposition. *J. Arthroplasty*. V. 19(4), p. 73-77, 2004.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Contagem Populacional. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1767&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1767&id_pagina=1)> Acesso em: agosto de 2012.

ISO 6872 - 2008, International standards for dental ceramics. Requirements and the corresponding test methods for dental ceramic materials for fixed all-ceramic and metal-ceramic restorations and prostheses.

JACOBS, J. J.; GILBERT, J. L.; URBAN, R. M. Corrosion of metal orthopaedic implants. *J. Bone Joint Surg.* V. 80A, p. 268-282, 1998.

JCPDS - Joint Committee on Powder Diffraction Standard. *Inorganic Materials*, Pensilvania: International Centre for Diffraction Data Swarthmore, 1979.

JIRANEK, W. Antibiotic-loaded cement in total hip replacement: Current indications, efficacy, and complications. *Orthopedics*. V. 28(8), p. 873-877, 2005.

JIRANEK, W.; HANSSEN, A.; GREENWALD, A. S. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *J. Bone Joint Surg*. V. 88(11), p. 2487-2500, 2006.

JOSEPH, T. N.; CHEN, A. L.; DI CESARE, P. E. Use of antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. *J. Am. Acad. Orthop. Surg*. V. 11(1), p. 38-37, 2003.

JUNG, J.; SCHMID, N.; KELM, J.; SCHMITT, E. et al. Complications after spacer implantation in the treatment of hip joint infections. *Int. J. Med. Sci*. V. 6(5), p. 265-273, 2009.

KAWAHARA, H.; OCHI, S.; TANETANI, K.; KATO, K. et al. Biological test of dental biomaterials, effect of pure metals upon the mouse subcutaneous fibroblast, strain L cell in tissue cultura. *Japan Soc. Dent. Appar. Mater*. V. 4, p. 65-85, 1963.

KOENDERINK, R. H. BRZESOWSKY, R. H. BALKENENDE, A. R. Effet of the initial stages of leaching on the surface of alkaline earth sodium silicate glasses. *J. Non-Cryst. Solids*, v. 262, p. 80-98, 2000.

KOKUBO, T., TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*.; v. 27, p.2907–15, 2006.

KUSHWAHA, M.; PAN, X.; HOLLOWAY, J.A.; DENRY, I.L. Differentiation of human mesenchymal stem cells on niobium- doped fluorapatite glass-ceramics. *Dental Materials*, v. 28(3), p. 252–260, 2012.

LANDIS, W.J.; JACQUET R. Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues. *Calcif Tissue Int*. v. 93, n. 4, p. 329-37, 2013.

LARA, C.; PASCUAL, M. J.; DURÁN, A., Glass forming ability, sinterability and thermal properties in the systems RO-BaO-SiO<sub>2</sub> (R = Mg, Zn). *J. Non-Cryst. Solids*, v. 348, p. 149-155, 2004.

LARA, C.; PASCUAL, M. J.; PRADO, M. O.; DURÁN, A., Sintering of glasses in the system RO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-BaO-SiO<sub>2</sub> (R=Ca, Mg, Zn) studies by hot-stage microscopy. *Sol. State Ionics*, v. 170, p. 201-208, 2004.

LÓPEZ, A.; MÁRQUEZ, C. Espectroscopia Infrarroja (IR) in: *Técnicas de análisis y caracterización de matireales*, Madrid.: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2002. pp. 153-188.

MAcDONALD, S.A.; SCHARDT, C. R.; MASIELLO, J. H.; SIMMONS, J. H. Dispersion analysis of FTIR reaction measurements in silicate glasses. *J. Non-Cryst. Solids*, v. 275, p. 72-82, 2000.

MARIALVA NETO, A. A.; CUNHA, S.M.; SILVA, A. C.; MELLO CASTANHO, S.R.H. Solid Galvanic Wastes Incorporation in Glass Matrices. *Materials Science Forum*. V. 498-99, p. 500-505, 2005.

MASSARDO, S. B. Nanoindentação em vitrocerâmicas de dissilicato de lítio – fratógrafia e propriedades mecânicas. 2011. 118p. Dissertação (Mestrado em ciência e engenharia de materiais) - UFPR, Curitiba, 2011.

MIKOWSKI, A. Propriedades nanomecânicas e processos de fratura de materiais lamelares. 2008. Curitiba, 2008. Dissertação (Doutorado em física) - UFPR, Curitiba, 2008.

MOURA, J., TEIXEIRA, L.N., RAVAGNANI, C., PEITL, O., ZANOTTO, E.D., BELOTI, M.M., PANZERI, H., ROSA, A.L., OLIVEIRA, P.T. - In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate), *J Biomed Mater Res A*. v. 82A, n. 3, p. 545–557, 2007.

MOYA, J. S.; CABAL, B.; SANZ, J.; SILVA, A. C. et al. Mechanism of calcium lixiviation in soda-lime glasses with a strong biocide activity. V. 70, p. 113-115, 2012.

MOYA, J. S.; ESTEBAN-TEJEDA, L.; PECHARROMÁN, C.; MELLO-CASTANHO, S. R. H. et al. Glass powders with a high content of calcium oxide: a step towards a “green” universal biocide. *V. 13 (6)*, p. 256-260, 2011.

NAMBA, R. S.; CHEN, Y.; PAXTON, E. W.; SLIPCHENKO, T. et al. Outcomes of routine use of antibiotic-loaded cement in primary total knee arthroplasty. *J. Arthroplasty. V. 24(6)*, p. 44-47, 2009.

NUDELMAN, F.; LAUSCH, A.J.; SOMMERDIJK, N.A., Sone ED. In vitro models of collagen biomineralization. *J Struct Biol. 2013 Aug; v. 183, n. 2*, p. 258-69.

OLIVARES-NAVARRETE, R.; OLAYA, J. J.; RAMÍREZ, C.; RODIL, S. E. Biocompatibility of niobium coatings. *Coatings. V. 1*, p. 72-87, 2011.

PUCHTLER, H.; MELOAN, S.N.; TERRY M.S. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J Histochem Cytochem. 1969 Feb; v.17, n. 2*: p. 110-24.

PYE, A. D.; LOCKHART, D. E. A.; DAWSON, M. P.; MURRAY, C. A. et al. A review of dental implants and infection. *J. Hosp. Infect. V. 72 (2)*, p. 104-110, 2009.

ROTH, S.R.; NEGAS, T.; CONN, L.P. Phase diagrams for ceramists. *Am. Ceram. Soc.*, 1996, Fig. 5321.

SBQ - Sociedade Brasileira de Quadril. Artroplastia de Quadril: O que você precisa saber antes da cirurgia. Disponível em: <<http://www.sbquadril.org.br/info-pacientes.php?ver=3>> Acesso em: agosto de 2012.

SCHOLZE, H. Influence of viscosity and surface tension on hot-stage microscopy measurements on glasses. *Ver. Dtsch Keram. Ges.*, v. 391, p. 63-68, 1962.

SIGOLI, F. A. KAWANO, Y. DAVALOS, M. R. JAFELICCI JR, M. Phase separation in pyrex glass by hydrothermal treatment: Evidence from micro-Raman spectroscopy. *J. Non-Cryst. Solids*, v. 284, p. 49-59, 2001.

SILVA, A.C. Vidros e vitrocerâmicos com alta concentração de metais obtidos a partir de resíduos industriais. 2008. 177f. Tese (Doutorado em ciências na área de tecnologia nuclear - materiais) - IPEN, São Paulo, 2008.

SILVA, A.C.; MELLO-CASTANHO, S.R.H. Silicate glasses obtained from fine silica powder modified with galvanic waste addition. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 348, p. 211–217, 2004.

SILVA, A.C.; MELLO-CASTANHO, S.R.H.; GUITIAN, S.; MONTERO, F. et al. Incorporation of Galvanic Waste (Cr, Ni, Cu, Zn, Pb) in a Soda–Lime–Borosilicate Glass. *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 91 (4), p. 1300 – 1305, 2008.

SILVA, A.C.; MELLO-CASTANHO, S.R.H.; GUITIAN, S.; MONTERO, F. et al. Vidros com efeito percolativo: possível modelo composicional, in: 58° Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2014. DOI: 10.13140.

STEINEMANN, S. G. Corrosion of Surgical Implants—In vivo and in vitro Tests. *Evaluation of Biomaterials*; Wiley: New York, NY, USA, 1980; p. 1-34.

WIESMANN, H.P.; MEYER, U.; PLATE, U.; HÖLING, H.J. Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int Rev Cytol.* v. 242, p.121-56., 2005.

YEUNG, K.W.K.; POON, R.W.Y; CHU, P.K.; CHUNG, C.Y. et al. Surface mechanical properties, corrosion resistance, and cytocompatibility of nitrogen plasma-implanted nickel–titanium alloys: A comparative study with commonly used medical grade materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 82A, p. 403-414, 2007.

ZAYAS, M. E. ARIZPE-CHAVEZ, H. ESPINOZA-BELTRAN, F. J. DIAZ-FLORES, L. L. YANEZ-LIMON, J. M. GONAZALES-HERNANDEZ, J. Spectroscopic studies on Na<sub>2</sub>O-SiO<sub>2</sub> glasses with different Ag concentration using silica obtained from wastes of geothermal plant. *J. Non-Cryst. Solids*, v. 324, p. 67-72, 2003.