

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
Campus Poços de Caldas

DEBORAH GOUVÊA PRADO

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO TITÂNIO RECOBERTO COM APATITA E
DOPADO COM NANOPARTÍCULA DE PRATA E ÓLEO ESSENCIAL**

Poços de Caldas/MG
2019

DEBORAH GOUVÊA PRADO

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO TITÂNIO RECOBERTO COM APATITA E
DOPADO COM NANOPARTÍCULA DE PRATA E ÓLEO ESSENCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Alfenas *campus* Poços de Caldas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais. Área de concentração: Materiais e Compósitos cerâmicos.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neide Aparecida Mariano.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Lucíola Lucena de Sousa

Poços de Caldas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

P896e Prado, Deborah Gouvêa.

Estudo do comportamento do titânio recoberto com apatita e dopado com nanopartícula de prata e óleo essencial / Deborah Gouvêa Prado. -- Poços de Caldas/MG, 2019.

92 f. –

Orientador(a): Neide Aparecida Mariano.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2019.
Bibliografia.

1. Titânio. 2. Prata. 3. Nanopartículas. 4. Hidroxiapatita. 5. Bactericidas. I. Mariano, Neide Aparecida. II. Título.

CDD – 620.11

DEBORAH GOUVÊA PRADO

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO TITÂNIO RECOBERTO COM
APATITA E DOPADO COM NANOPARTÍCULA DE PRATA E ÓLEO
ESSENCIAL**

A banca examinadora abaixo-assinada,
aprova a Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção do
título de mestre em Ciência e
Engenharia de Materiais, pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais da
Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração:
Desenvolvimento, Caracterização e
Aplicação de Materiais.

Aprovada em: 16 de agosto de 2019.



Prof(a.) Dr(a). Neide Aparecida Mariano

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Prof(a.) Dr(a). Silmara Cristina Baldissera Kabayama

Instituição: Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI-MG



Prof(a.) Dr(a). Alfeu Saraiva Ramos

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus porque sem Ele, eu certamente não chegaria aqui.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, me incentivaram e me deram todo suporte que precisei.

A minha orientadora Profa. Dra. Neide Mariano, por toda ajuda, conhecimentos e apoio durante todo o período do curso.

A Dra. Lucíola Lucena de Sousa por toda ajuda e auxílio no laboratório, pelas palavras ditas a mim e pelos incentivos durante os trabalhos desenvolvidos. Lucíola foi à peça fundamental para que esse trabalho chegasse ao fim.

Aos meus parceiros de pesquisa e laboratório, em especial a Aline Borges que foi minha companhia de longos períodos e a Carolina Cruz, que foi meu suporte principalmente neste último ano.

Aos meus amigos e todas as pessoas que estiveram presentes na minha vida durante este período, me ajudando com palavras de ânimo e me dando suporte sempre que necessário.

Ao grupo de materiais metálicos da UNIFAL - *Campus* Poços de Caldas, por toda ajuda e trabalho em equipe.

Ao Laboratório de metais amorfos e nanocristalinos, e técnicos da UFSCar.

Ao Donizeti que juntamente com Universidade do Vale do Sapucaí me permitiram a utilização do laboratório.

A UNESP, *campus* Araraquara onde os ensaios de FTIR foram realizados.

A todos os professores e técnicos do PPGCEM UNIFAL.

A UNIFAL, FAPEMIG, FAPESP e CNPq pelo aporte educacional e financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O titânio é um exemplo de biomaterial utilizado em implantes ortopédicos e ortodônticos, por apresentar uma boa resistência à corrosão e excelente biocompatibilidade. Assim, estudos procuram obter um recobrimento no titânio visando melhorar a adesão entre o osso e o implante, através da modificação da superfície do metal. O objetivo do trabalho foi estudar a caracterização das superfícies do Ti c.p com o recobrimento, o efeito corrosivo utilizando como meios a saliva sintética e o 1,5 SBF (*Simulated Body Fluid*), além de estudar o efeito bactericida da camada de apatita junto a nanopartícula de prata e o óleo essencial formados sobre a superfície do titânio. O recobrimento com hidroxiapatita foi realizado pelo método biomimético. Após a imersão, algumas amostras foram submetidas à solução de nanopartícula de prata e outras em óleo essencial de capim limão. Através da microscopia eletrônica de varredura do Ti c.p com adição de nanopartícula de prata, pode-se observar a formação de camadas homogêneas de pequenos glóbulos compactados e com adição de óleo a formação de camadas heterogêneas. Pelo ensaio de corrosão foi possível observar que tanto no meio de 1,5 SBF, quanto no meio de saliva sintética, o recobrimento com hidroxiapatita e com os bactericidas nanopartícula de prata e óleo capim-limão melhoraram as propriedades corrosivas da amostra.

Palavras chave: Titânio. Nanopartícula de prata. Hidroxiapatita. Bactericida natural.

ABSTRACT

Titanium is an example of biomaterial used in orthopedic and orthodontic implants, because it has good corrosion resistance and excellent biocompatibility. Thus, studies seek to obtain a titanium coating to improve the adhesion between the bone and the implant, by modifying the metal surface. The objective of this work was to study the corrosive effect using as means the synthetic saliva and the 1.5 SBF (Simulated Body Fluid), in addition to studying the bactericidal effect of the apatite layer on the silver nanoparticle and the essential oil formed on the surface of the titanium. The coating with hydroxyapatite was performed by the biomimetic method. After the immersion, some samples were submitted to the solution of silver nanoparticle and other/s in essential oil of lemongrass. By the scanning electron microscopy of the Ti c.p. With addition of silver, it is possible to observe the formation of homogeneous layers of small compacted globules. From the corrosion test it was possible to observe that in that in the medium of 1.5 FBS, as well as in synthetic saliva, coating with hydroxyapatite and silver nanoparticle bactericides and lemongrass oil improved the corrosive properties of the sample.

Keywords: Titanium. Silver nanoparticle. Hydroxyapatite. Natural bactericide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Cristalina do titânio.....	17
Figura 2 - Estrutura cristalina hexagonal da hidroxiapatita mostrando a posição espacial dos elementos, cálcio, fósforo, oxigênio e hidrogênio.....	20
Figura 3 - Curva de polarização do potencial versus logaritmo da densidade de corrente.....	32
Figura 4 - Extrapolação de Tafel para determinação do potencial de corrosão (E_{corr}) e densidade de corrente de corrosão (I_{corr}).	34
Figura 5 - Fluxograma das etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho.....	37
Figura 6 - Sistema eletroquímico.....	44
Figura 7 - Micrografia obtida por MEV do Ti. c.p. grau 2.....	46
Figura 8 - Espectro de difração de raios X do Ti. c.p. grau 2.	47
Figura 9 - Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) do Ti c.p. grau 2....	48
Figura 10 - Curvas de termogravimetria (TG), para o Ti c.p. grau 2.....	49
Figura 11 - Micrografias obtidas na condição Ti c.p + HA obtida por MEV.	50
Figura 12 - Difratograma de raios X da condição Ti c.p+HA	51
Figura 13 - Espectro de infravermelho da condição do Ti c.p + HA.	52
Figura 14 - Micrografias obtidas por MEV para a condição Ti c.p+ HA + AgNps.	53
Figura 15 - Difratograma de raios X da condição Ti+HA+AgNPs.....	55
Figura 16 - Espectro de infravermelho da condição do Ti c.p + HA + AgNPs.	56
Figura 17 - Espectro de absorvância no infravermelho de AgNPs.....	56
Figura 18 - Micrografia obtida por MEV para a condição Ti c.p+ HA + óleo + PS.	57
Figura 19 - Difratograma de raios X da condição Ti + HA + óleo + PS	59
Figura 20 - Espectro de infravermelho da amostra na condição Ti + HA+ óleo + PS, do óleo de capim limão e filme de poliestireno.....	59
Figura 21 - Micrografia obtida por MEV e microanálise por EDS após o ensaio de bioatividade do Ti c.p. sem recobrimento.....	60
Figura 22 - Micrografias obtidas por MEV e microanálise por EDS do ensaio de bioatividade para a condição Ti+HA.....	63
Figura 23 - Espectro de infravermelho do ensaio de bioatividade para a condição Ti c.p+HA	66

Figura 24 - Micrografia obtida por MEV e microanálise por EDS do ensaio de bioatividade para a condição Ti+HA+ AgNPs	67
Figura 25 - Espectro de infravermelho do ensaio de bioatividade do Ti c.p.+HA+AgNPs.....	69
Figura 26 - Micrografia obtida por MEV e microanálise por EDS do ensaio de bioatividade para a condição Ti+HA+ óleo+ PS.	70
Figura 27 - Espectro de infravermelho do ensaio de bioatividade do Ti c.p.+ HA + óleo + PS.....	73
Figura 28 - Curvas de OCP para as amostras nas condições: Ti c.p.,Ti+HA; Ti+HA+AgNPs e Ti+HA+óleo e filme: óleo + PS, em solução 1,5 SBF, temperatura de 36,5°C e pH 7,4.....	74
Figura 29 - Curvas de polarização linear para as amostras nas condições: Ti c.p.,Ti+HA; Ti+HA+AgNPs e Ti+HA+óleo e filme: óleo + PS, em solução 1,5 SBF, temperatura de 36,5°C e pH 7,4.....	74
Figura 30 - Potencial de circuito aberto das amostras Ti c.p, Ti+ HA; Ti + HA + AgNPs; Ti + HA + óleo + PS e filme: óleo + PS, em saliva artificial.	76
Figura 31 - Curvas de polarização nas amostras Ti cp, Ti+HA; Ti+HA+AgNPs; Ti+HA+óleo + PS e filme: óleo + PS, em saliva artificial, temperatura de 36,5°C e pH 6,0.....	77
Figura 32 - Ensaio antimicrobiológico com Staphylococcus aureus, gram-positivo, das amostras nas condições.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição química do Ti c.p. (% em massa)	18
Tabela 2 - Relação de razão atômica Ca/P das fases de apatitas.	19
Tabela 3 - Nomenclatura e condições das amostradas.	36
Tabela 4 - Bandas de absorção do espectro no infravermelho para apatitas.	39
Tabela 5 - Concentração iônica das soluções para o recobrimento biomimético (mol.L ⁻¹).	40
Tabela 6 - Reagentes utilizados no preparo de SBF e 1,5 SBF.	41
Tabela 7 - Reagente para preparo de Saliva Sintética.	44
Tabela 8 - Microanálise semi quantitativa por EDS.	51
Tabela 9 - Microanálise semi quantitativa obtida por EDS.	54
Tabela 10 - Microanálise semi quantitativa obtida por EDS.	58
Tabela 11 - Microanálise semi quantitativa para o Ti c.p. sem recobrimento por EDS	63
Tabela 12 - Microanálise semi quantitativa para a condição Ti + HA, por EDS.	65
Tabela 13 - Microanálise semi quantitativa para a condição Ti + HA + AgNPs por EDS.	68
Tabela 14 - Microanálise semi quantitativa para a condição Ti + HA+ óleo+ PS por EDS.	72
Tabela 15 - Parâmetros eletroquímicos para as amostras nas condições: Ti c.p.,Ti+HA; Ti+HA+AgNPs e Ti+HA+óleo e filme: óleo + PS em solução 1,5 SBF, temperatura de 36,5°C e pH 7,4.....	75
Tabela 16 - Parâmetros eletroquímicos para as amostras Ti c.p., Ti+HA; Ti+HA+AgNPs e Ti+HA+óleo + PS e filme: óleo + PS em saliva sintética	77
Tabela 17 - Resultados dos ensaios antimicrobiológico com Staphylococcus aureus, gram-positivo, via halo de inibição	80

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

HA - Hidroxiapatita

AgNPs - Nanopartículas de prata

SBF - Solução Corpórea

ASTM - American Society for Testing and Materials

CCC - Cúbica de Corpo Centrado

HC - Hexagonal compacta

DRX - Difração de raios X

EDS - Espectroscopia por energia dispersiva

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MO - Microscopia ótica

OCP - Potencial de circuito aberto

T - Temperatura

t - Tempo

Ti - Titânio

PS - Poliestireno

EPS - Poliestireno expandido

OES - óleos essenciais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 BIOMATERIAIS	14
2.2 PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DO TITÂNIO	15
2.3 APATITAS E HIDROXIAPATITA	18
2.4 RECOBRIMENTOS	21
2.4.1 Plasma Spray	21
2.4.2 Sol gel	22
2.4.3 Método Biomimético	22
2.5 BACTERICIDAS	24
2.5.1 Nanopartículas de prata	24
2.5.2 Quitosana	27
2.5.3 Óleo Essencial	28
2.5.4 Polímero	29
2.6 BIOATIVIDADE	29
2.7 CORROSÃO	30
2.7.1 Potencial de Circuito Aberto (OCP)	31
2.7.2 Curvas de Polarização	31
2.7.2.1 Método de extrapolação de Tafel	33
2.8 ENSAIO MICROBIOLÓGICO	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL	37
3.1.1 Microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia por energia dispersiva	37
3.1.2 Difração de raios X	38

3.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Difusa	38
3.1.4 Análises Térmicas – calorimetria diferencial de varredura e termogravimetria	39
3.2 RECOBRIMENTO BIOMIMÉTICO	40
3.3 DOPAGEM COM NANOPARTÍCULA DE PRATA	42
3.4 DOPAGEM COM ÓLEO ESSENCIAL	42
3.5 ENSAIO DE BIOATIVIDADE	43
3.6 ENSAIO DE CORROSÃO POR POLARIZAÇÃO	43
3.7 ENSAIO DE CULTURA E BACTÉRIAS	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1 CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL DO T.I.C.P	46
4.2 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA	47
4.2.1 Calorimetria Diferencial de Varredura	47
4.2.2 Termogravimetria	48
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO RECOBRIMENTO	49
4.3.1 Recobrimento com Hidroxiapatita	49
4.3.2 Recobrimento com Hidroxiapatita e dopagem com nanopartícula de prata	52
4.3.3 Recobrimento com Apatita e dopagem com óleo essencial e poliestireno	57
4.4 ENSAIO DE BIOATIVIDADE	60
4.4.1 Amostra de Titânio sem recobrimento	60
4.4.2 Amostra de Titânio recoberto com Hidroxiapatita	63
4.4.3 Amostra de Titânio recoberto com Hidroxiapatita e dopado com nanopartícula de prata	66
4.4.4 Amostra de Titânio recoberto com Hidroxiapatita e óleo incorporado em polímero	70

4.5 ENSAIO DE CORROSÃO	73
4.5.1 Ensaio de Polarização em Solução corpórea	73
4.5.2 Curvas de corrosão em meio de saliva sintética	76
4.6 ENSAIO DE CULTURA	79
5 CONCLUSÃO	81
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
REFERENCIAS	84
APÊNDICE A – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	91

1 INTRODUÇÃO

Uma grande gama de metais e ligas metálicas vem sendo utilizado como materiais para implantes. Tais materiais devem apresentar, como principais características, biocompatibilidade e resistência à corrosão, pois geralmente os produtos de corrosão são sais do metal, que estando no meio extracelular podem ser nocivos aos tecidos, causando inflamação e posterior necrose dos mesmos. Outros importantes requisitos para a utilização desses materiais é a elevada resistência mecânica, já que estão sujeitos axiais e de fadiga, pelo fato de sofrerem carregamentos cíclicos. Os principais metais usados como implantes na ortopedia são o titânio e suas ligas, os aços inoxidáveis, as ligas de cobalto-cromo, e, com menos frequência, as ligas de tântalo e a liga à base de níquel-cobalto, pois possuem custos elevados (AGRAWAL *et al.*, 2014; KULKARNI *et al.*, 2014 WILLIAMS, 2009).

O titânio tem sido bastante pesquisado e testado em numerosas situações nas áreas odontológicas e médicas. Isto se deve ao suposto desenvolvimento de uma fina camada de óxido formada espontaneamente sobre sua superfície, que se constitui em uma barreira entre o metal e o meio. Valores típicos da espessura inicial dessas camadas de óxido formado ao ar à temperatura ambiente estão entre 2-5 nm, mas podem ser aumentados por oxidação anódica (FURKI, 2015).

A biocompatibilidade e a resistência à corrosão do titânio estão relacionadas à sua estabilidade química no organismo, devido a formação da camada do óxido de titânio, TiO_2 , sobre sua superfície. Assim, vários estudos têm sido desenvolvidos, para modificar a superfície do material a fim de melhorar a atividade biológica, gerando uma integração mais rápida entre o implante e o osso, reduzindo o tempo total de cicatrização. A utilização de recobrimentos bioativos em implantes metálicos para produzir uma resposta mais rápida tem sido investigada, sendo a hidroxiapatita, o material mais utilizado para esta finalidade (HARADA, 2016).

Titânio e suas ligas são amplamente utilizados em ortopedia e em implantes dentários, mas as infecções associadas a esses implantes ainda representam sérias ameaças, levando a possíveis complicações, como internação prolongada, falha do implante, remoção completa, sofrimento do paciente, encargos financeiros e até mesmo morte. Os implantes com titânio estão ficando cada vez mais populares na

indústria biomédica. Dessa forma se faz necessário um estudo sobre suas aplicações (HARADA, 2016).

Nos últimos anos, recobrimentos biomimético com hidroxiapatita e alguns bactericidas vêm sendo estudados, Nesse aspecto, implantes de titânio com apatitas bioativas, estão sendo estudados e dando bons resultados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMATERIAIS

Biomaterial é um material utilizado para interagir com o organismo, para substituir ou reparar tecidos, órgãos e funções no corpo. O desempenho e as aplicações de biomateriais são de extrema importância para o desenvolvimento e desempenho de implantes biomédicos e tecidos (AGRAWAL *et al.*, 2014; KULKARNI, *et al.*, 2014; WILLIAMS, 2009).

O conceito de biomaterial vem sendo definido de diferentes formas ao longo dos últimos anos. De acordo com Zavaglia e Silva (2016), o Instituto Nacional de Saúde Americano informa que os biomateriais podem ser definidos como qualquer substância ou combinação delas, de origem sintética ou natural, incluindo polímeros, cerâmicas e metais. Estes podem ser usados por um curto ou longo período, como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo.

O maior interesse e o aumento do estudo nessa área ocorrem pelo fato de que, recentemente houve um aumento da expectativa de vida da população mundial e, além disso, doenças relacionadas à estrutura óssea tornou-se um problema de saúde pública, segundo Guastaldi e Aparecida (2010).

Portanto, por existir necessidades de melhorias na reparação da capacidade motora, tecidos e órgãos, diversos autores discutem a urgência na priorização de políticas públicas voltadas a esses problemas, a fim de se desenvolver novos materiais e aprimorar outros já disponíveis, visando possibilitar melhor qualidade de vida aos pacientes (BASU *et al.*, 2009; RAPHEL *et al.*, 2016).

Os biomateriais devem apresentar características como biofuncionalidade e biocompatibilidade para que exerçam as funções desejadas. Biofuncionalidade representa a capacidade do biomaterial em desempenhar a função desejada, já a biocompatibilidade é a aceitação do organismo pelo implante, seja em regiões próximas ou órgãos distantes.

Para garantir uma boa biocompatibilidade, os materiais devem apresentar elementos não tóxicos, para evitar quadros infecciosos ou alérgicos ao corpo humano (COELHO, 2013).

Além disso, os materiais usados como implantes podem ser classificados como: bioativo, bioinertes e bioabsorvíveis.

Bioativos são materiais que tem a capacidade de provocar uma resposta biológica específica na interface do material, resultando na formação de uma ligação química entre o tecido e o implante (BASU *et al.*, 2009).

Bioinertes são materiais que não apresentam reações químicas com o tecido, por já ter ocorrido reações com outras substâncias antes da aplicação ao meio biológico (VIEIRA, 2013).

Bioabsorvíveis são materiais que são capazes de manter resistência mecânica suficiente na medida em que novos tecidos ósseos são formados, até que a carga possa ser transferida diretamente ao osso, ou seja, são absorvidos gradativamente, pelo organismo, reduzindo o tempo total de tratamento e reabilitação ao paciente (RESENDE, 2014).

Na primeira geração de implantes, as próteses eram usinadas, para que fosse obtida uma superfície lisa. Já na segunda geração, foram realizados recobrimentos na superfície dos materiais a fim de acelerar e melhorar a osseointegração (SHERESTHA; JOSHI, 2014).

Para aplicação médica, o material metálico se destaca entre os diferentes tipos de materiais para a obtenção de biomateriais, especialmente devido ao excelente desempenho mecânico, como alta resistência à fadiga e à fratura, além da boa biocompatibilidade, elevada resistência à corrosão, propriedades mecânicas aceitáveis, como a osseointegração.

Essas características contribuem com a vida útil do material dentro do corpo hospedeiro, evitando assim, novas intervenções cirúrgicas (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

2.2 PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DO TITÂNIO

Os materiais metálicos atualmente utilizados para implantes cirúrgicos incluem os aço inoxidável 316L (316LSS), ligas cromo cobalto (Co-Cr), titânio e suas ligas (GEETHA, 2009).

Dentre os materiais metálicos, o titânio e suas ligas possuem grande destaque, isto, porque, no ano de 1964, um evento importante marcou a história dos biomateriais, quando o Dr. Per Ingvar Brånemark, cirurgião ortopédico da

Universidade de Lund (Suécia), após observar em seus estudos a integração de um implante de titânio no osso de um rato, criou o conceito de osseointegração. Este termo significa o estabelecimento de ligações químicas do implante com o tecido ósseo (RATNER, 2004).

O titânio é um material biocompatível em razão de ser bioinerte, ou seja, é indiferente às funções vitais do organismo e dentre os metais biocompatíveis, esse metal é o que possui menor módulo de elasticidade (~100 GPa), valor mais próximo dos determinados para o osso (10 – 40 GPa), o que promove uma melhor transferência de cargas mecânicas entre os dois elementos (NIINOMI, 2008).

O titânio apresenta boa resistência à corrosão em fluidos corporais, boas propriedades mecânicas, como resistência a flexão e resistência à tração. No entanto, o titânio e suas ligas não satisfazem plenamente os requisitos para fabricação de próteses, pois além de apresentar uma baixa resistência ao desgaste, esse material pode apresentar liberação de íons tóxicos em alguns ambientes, por isso, o desenvolvimento de revestimentos que evitam a dissolução de metais tóxicos é de grande importância (GEURTSSEN, 2003).

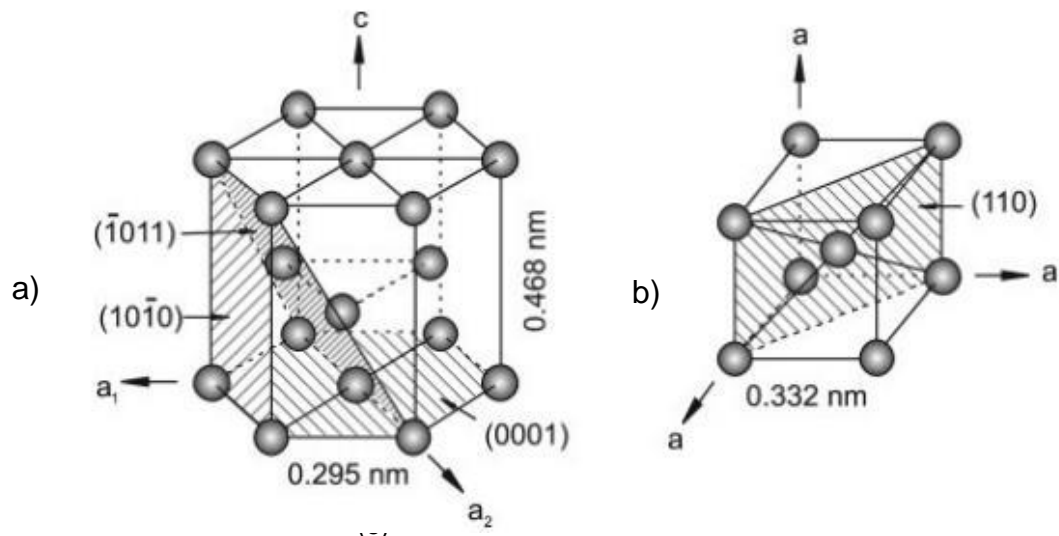
Assim, os implantes de Ti são comumente revestidos com hidroxiapatita (HA), que apresentam similaridade com os constituintes minerais de ossos e dentes humanos. O revestimento de HA pode reduzir a liberação de íons metálicos o qual age como uma barreira e, ao mesmo tempo, pode aumentar a bioatividade óssea devido aos seus constituintes químicos (FURKI, 2015).

Este metal apresenta baixa condutividade térmica, baixa massa específica (4,51 g/cm³) em comparação a outros metais como o cromo (7,14 g/cm³) e o tântalo (16,65 g/cm³), e é um material atrativo por sua dureza (170 HV) que é próxima ao aço inoxidável (200 HV) também usado na indústria biomédica, o que garante boas características para sua aplicação (EISENBARTH *et al.*, 2004; FURKI, 2015; PAZ, 2011).

Este metal é um elemento alotrópico, ou seja, existe em mais de uma estrutura cristalográfica, quando há alteração na temperatura.

Em temperatura ambiente encontra-se a fase α que consiste em um formato hexagonal compacta (HC), e acima de 883°C, o titânio passa por uma variação cristalina, se tornando uma estrutura cúbica de corpo centrado (CCC), nesse aspecto predomina-se a fase β . As estruturas cristalinas do titânio estão representadas na Figura 1 (VAZ, 2007).

Figura 1 - Estrutura Cristalina do titânio.



Fonte: LEYENS; PETERS (2003, p.123).

Legenda: a) hexagonal compacta (HC), fase α .

b) Cúbica de corpo centrado (CCC), fase β .

A superfície de Ti pode ser física ou quimicamente modificada a fim de melhorar a integração biomaterial-tecido. Para esse fim, os métodos mais utilizados envolvem tratamentos físicos, químicos ou recobrimentos com fosfatos de cálcio, principalmente a hidroxiapatita (HA) (MARKOVIC; FOWLER; TUNG, 2004).

Segundo a norma ASTM F67-06, o titânio comercialmente puro (Ti c.p.), é dividido em quatro graus, conforme mostra a Tabela 1, em que as diferenças estão relacionadas com a composição de elementos como nitrogênio, oxigênio e ferro, no material, sendo que as quantidades desses elementos influenciam na dureza, na resistência mecânica e na resistência a corrosão (HARADA *et al.*, 2016).

Tabela 1-Composição química do Ti c.p. (% em massa)

Elemento	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Nitrogênio	0,03	0,03	0,05	0,05
Carbono	0,08	0,08	0,08	0,08
Hidrogênio	0,015	0,015	0,015	0,015
Ferro	0,20	0,30	0,30	0,50
Oxigênio	0,18	0,25	0,35	0,40
Titânio	Balanço	Balanço	Balanço	Balanço

Fonte: Adaptado de ASTM F67-06, (2006).

O Ti puro grau 1 por apresentar menor quantidade de oxigênio que o Ti grau 4 apresenta maior resistência à corrosão, porém o Ti grau 4 possui maior resistência mecânica. Já o Ti puro grau 2 é o mais utilizado na área médica, especificamente na aplicação dentária por ser mais resistente mecanicamente que o Ti grau 1 e possuir semelhante resistência à corrosão (DAVIS, 2003; RACK & QAZI, 2005).

Segundo Vieira (2013), diversas metodologias têm sido desenvolvidas com a finalidade de melhorar a bioatividade da superfície do titânio e de suas ligas. Essa possibilidade existe se estes materiais forem submetidos a alguns pré- tratamentos, incluindo tratamento alcalino seguido de tratamento térmico (KOKUBO; MATSUSHITA; TAKADAMA, 2007).

2.3 APATITAS E HIDROXIAPATITA

As cerâmicas de fosfato de cálcio apresentam grandes potenciais para aplicação como biomaterial, pois oferece semelhança química e estrutural com a apatita biológica, isto porque possuem os mesmo íons formados pela fase mineralizada do osso natural (Ca^{2+} e P^{4-}) que está presente em alta concentração em ossos e dentes. (KAWACHI *et al.*, 2000; PIRES, 2015).

Existe uma família de fosfato de cálcio e as propriedades de cada composto podem ser caracterizadas de acordo com a proporção de íons de cálcio e fósforo. Assim uma maneira conveniente de fazer as subdivisões para classificar os fosfatos é por meio da razão Ca/P, que varia entre 0,5-2,0, como mostra a Tabela 2.

Os fosfatos com maior razão apresentam menor solubilidade em condições neutras e baixa taxa de degradação, ou seja, apresentam uma maior estabilidade química em meio aquoso do que outras cerâmicas de fosfatos de cálcio dentro de uma faixa de pH de 4,2-8,0 (BEST, 2008; PIRES, 2015). Se a razão Ca/P for superior a 1,67, o óxido de cálcio (CaO) pode estar presente juntamente com a fase HA (hidroxiapatita). E fases diferentes podem afetar negativamente a resposta biológica ao implante *in vivo* (BEST, 2008; CATAURO, 2016).

Os fosfatos mais conhecidos e pesquisados atualmente são: os fosfatos tricálcico nas formas polimórficas α e β ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e a hidroxiapatita, que apresenta fórmula química ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), cujas superfícies facilitam a adsorção de proteínas (Ligações de hidrogênio) e têm alto potencial osteoindutivo (PIRES, 2015).

Os fosfatos de cálcio têm sido amplamente estudados e empregados em aplicações envolvendo todo o sistema esquelético, como reconstruções e tratamento de defeitos ósseos (DOROZHKIN, 2010).

Tabela 2 - Relação de razão atômica Ca/P das fases de apatitas

(continua)		
Fosfato de cálcio	Fórmula química	Razão Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,00
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,50
Fosfato tricálcico (α , α' , β , γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
Fosfato octacálcico(OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD).	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (CPP)	CaHPO_4	1,00
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,00

Tabela 3 - Relação de razão atômica Ca/P

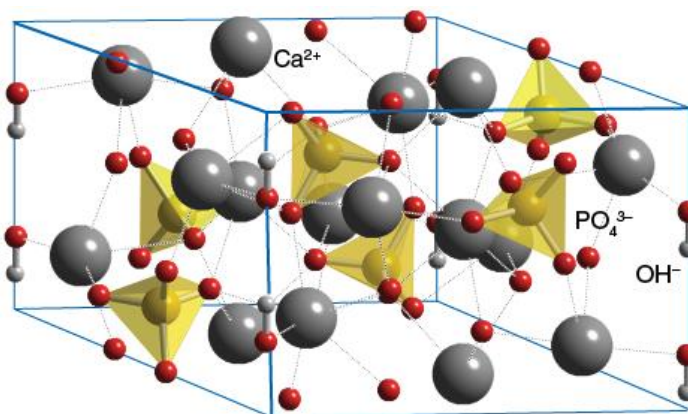
(conclusão)		
Fosfato de cálcio	Fórmula química	Razão Ca/P
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,70
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcicomono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,50
Metafosfato de cálcio (α , β , γ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,50

Fonte: Adaptado de APARECIDA *et al.* (2007); COSTA *et al.* (2009).

A hidroxiapatita (HA), principal constituinte mineral do osso natural tem atraído muita atenção por sua boa compatibilidade, bioatividade e osteocondutividade (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). É estudada como um material artificial de substituição do osso e dentes em implantes ortopédicos e dentários, bem como o revestimento de implantes de tecidos duros e materiais de enchimento de ossos devido à semelhança química e cristalográfica entre eles (ZHAO, 2014).

A cristalização da hidroxiapatita é mostrada na Figura 2:

Figura 2 - Estrutura cristalina hexagonal da hidroxiapatita mostrando a posição espacial dos elementos, cálcio, fósforo, oxigênio e hidrogênio



Fonte: STEFAN *et al.* (2016, p.32).

De acordo com Mavropoulos (1999), a hidroxiapatita apresenta a facilidade de substituições catiônicas e aniônicas em sua estrutura, o que garante a capacidade de incorporar grande parte dos elementos da tabela periódica, porém algumas substituições podem alterar suas propriedades estruturais, mudando as propriedades físico-químicas e biológicas.

Apesar de todas as vantagens exibidas, a HA apresenta uma lenta biodegradação e este comportamento pode ser atribuído à razão molar Ca/P de 1,67, que torna a HA praticamente insolúvel em meios neutros, com baixas propriedades mecânicas, como tenacidade e fadiga. Portanto, seu uso como implante é limitado para algumas aplicações específicas (BEST, 2008; PAZ, 2011).

Assim, diferentes métodos estão sendo desenvolvidos para deposição de camadas de hidroxiapatita em implantes metálicos, como por exemplo, em titânio, de modo que se combinem as propriedades biológicas da HA como a resistência mecânica dos metais. Portanto, a hidroxiapatita se apresenta como um material importante nos enxertos de próteses, minimizando o risco de rejeições (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

2.4 RECOBRIMENTOS

A principal função do recobrimento é induzir uma resposta rápida da formação de osso durante o período inicial de cicatrização. O emprego de recobrimentos bioativos, como a hidroxiapatita em implantes metálicos, oferece a possibilidade de combinar a resistência mecânica do metal e a bioatividade da cerâmica (RIGO, 1999; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Várias técnicas são utilizadas com o objetivo de desenvolver uma superfície adequada, para a osseointegração, por meio do depósito de apatitas, dentre essas podemos citar: *Plasma Spray*, *Sol-gel*, *Ion Sputtering* e *Recobrimento Biomimético*.

2.4.1 Plasma Spray

De acordo com Rolando (2016) essa técnica é a mais popular no que diz respeito ao recobrimento de hidroxiapatita para implantação médica com o uso de pó como matéria-prima.

No processo do plasma spray, uma zona de altíssima temperatura é criada, onde o pó é injetado, este é fundido, superaquecido e pulverizado a altas velocidades. A combinação de alta temperatura, rápido aquecimento das partículas e atmosfera inerte permite a aplicação de revestimentos com qualidade para as mais diversas aplicações (PAREDES, 1998).

O pó de HA fundido e injetado sobre o substrato metálico assume forma de gotas e resfria rapidamente. A adesão do osso com o implante recoberto com hidroxiapatita apresenta uma rápida estabilização da região implantada em curto prazo, dessa forma a osseointegração é rápida durante o período inicial de cicatrização (RIGO, 1999).

2.4.2 Sol gel

Um dos processos sol-gel para obtenção de recobrimentos de hidroxiapatita, utiliza o nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e ácido fosfórico (H_3PO_4) em metanol, obedecendo a razão $(\text{Ca}/\text{P}) = 1,67$. O processo da hidrólise do alcóxido metálico gera um hidróxido metálico, tornando a solução um sol, que é agitada certo tempo, para obtenção de uma solução transparente.

As reações continuam, de modo que as partículas se interligam, solidificando o sol em um gel. Assim, o produto final pode ser o gel ou ainda ser submetido à calcinação e/ou sinterização a temperaturas relativamente baixas para obter pós, fibras ou recobrimentos cerâmicos (CHOUDHURY; AGRAWAL, 2011; SANTOS, 2005; WANG, 2010).

2.4.3 Método Biomimético

Pesquisadores como Abe, Kokubo e Yamamuro (1990) introduziram o método biomimético, uma das técnicas mais promissoras para a produção de biomateriais em condições ambientes. Essa técnica permite recobrir qualquer substrato metálico, polimérico e cerâmico com uma camada uniforme de HA de baixa cristalinidade, muito similar à biológica, presente no tecido ósseo natural e, por isso, é uma técnica bastante promissora para produção de biomateriais (ABE; KOKUBO; YAMAMURO, 1990; KOKUBO, 2008).

O método de Abe, Kokubo e Yamamuro (1990) consiste na imersão do substrato, a ser recoberto, em uma solução sintética (SBF – Simulated Body Fluid), de composição química e pH semelhantes ao plasma sanguíneo e temperatura próxima à do corpo humano.

Coloca-se, em conjunto, uma placa de vidro G bioativo, cujos íons silicato dissolvem-se e absorvem-se sobre o substrato, ocorrendo à nucleação da HA (GUSTALDI; APARECIDA, 2010; RIGO *et al.*, 1999).

O sistema é mantido durante sete dias em pH = 7,4 e à temperatura de 36,5°C, para que haja formação sobre o substrato de uma camada contínua e homogênea composta por cristalitos de hidroxiapatita carbonatada de baixa cristalinidade semelhante à HA biológica. Em seguida, os substratos são imersos novamente, só que em uma solução de SBF 1,5 vezes mais concentrada, obtendo-se um aumento na espessura da camada (BHARATI; SINHA; BASU, 2005; RIGO *et al.*, 1999;).

Desde Abe e colaboradores, o método e a solução biomimética sofreram significativas variações, a fim de acelerar o processo de deposição e alterar a cristalinidade do recobrimento, como a substituição da placa de vidro bioativo G por imersão do substrato em uma solução de silicato de sódio, a fim de formar grupos de Si-OH (silanol) na superfície e a substituição da solução de silicato de sódio por tratamento em solução de NaOH 5 mol.L⁻¹, seguido de tratamento térmico a 600°C (BOSCHI; RIGO; ZANIN, 2007).

Este método oferece algumas desvantagens como: o tempo de recobrimento necessário, que é longo se comparado aos outros, e por não saber se as condições da solução de SBF são ideais para o processo de recobrimento devido a metaestabilidade da solução, pode ocorrer precipitação ou recobrimento desigual sobre o substrato.

Entretanto, é uma boa alternativa, por ser aplicável a qualquer substrato sensível ao calor, devido ao uso de temperatura baixa, diferentemente do método Plasma Spray, que utiliza altas temperaturas de processo, além desse método não requerer equipamento tecnológico sofisticado e apresentar baixo custo dos reagentes químicos.

2.5 BACTERICIDAS

O insucesso do implante devido à infecção é responsável por aproximadamente 23% das cirurgias e isso leva ao aumento dos custos de assistência médica, tempo de hospitalização, desconforto e uso prolongado de antibióticos que contribui para resistência de bactérias (JAGGESSAR, 2018).

Segundo Carrilo, Castillo e Mauricio (2011) diferentes bactérias patogênicas e resistentes a antibióticos tem-se tornado um grande desafio no pós-operatório de realização cirúrgica de implantes.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*), bactérias Gram-positivas e negativas, respectivamente, são comumente usadas para avaliar as propriedades antibacterianas de materiais metálicos (REN, YANG, 2017).

Identificada como uma colonizadora de implantes dentários especialmente em superfícies de titânio, a *Staphylococcus aureus* é, de acordo com Roberts *et al.*(2006) uma bactéria Gram-positiva que pode causar diferentes infecções que podem estar relacionadas muitas vezes aos maus resultados de alguns implantes ou pela formação de biofilmes (AGUAYO *et al.*, 2015; JAGGESSAR 2018).

Escherichia Coli assume forma de um bacilo, é uma bactéria bastante utilizada em estudos *in vitro* com o propósito de se estudar a esterilização, desinfecção e contaminação. Além disso, é de fácil manipulação em laboratório, multiplica-se em pouco tempo (20 min) e pode ser encontrada na cavidade oral de indivíduos saudáveis (STEINEBRUNNER, 2005).

A *Escherichia coli*, juntamente com a *Staphylococcus aureus* é a mais comum e uma das mais antigas bactérias simbiotes do homem (MURRAY *et al.*,2004).

Assim, há uma procura crescente por biomateriais e técnicas de esterilização capazes de inibir a colonização bacteriana em dispositivos implantados por meio da imobilização dos agentes antibacterianos na sua superfície, destruindo a adesão bacteriana inicial ou após o contato (ACTIS; GAVIRIA; GUDA; ONG, 2013).

2.5.1 Nanopartículas de prata

Nos últimos anos, recobrimentos biomimético com HA e alguns bactericidas vêm sendo estudados. Nesse aspecto, implantes de titânio com apatitas bioativas

estão obtendo bons resultados, no que diz respeito a resistência mecânica e a bioatividade.

A prata é reconhecida por suas propriedades bactericidas, e por ser um agente inorgânico, ganhou atenção, pois em pequenas concentrações apresenta boa biocompatibilidade, perfil de segurança satisfatória e estabilidade específica (TIAN, *et al.*, 2016).

A maioria dos biomateriais antimicrobianos é constituída de prata elementar, sais de prata ou complexos de prata incorporada nos materiais orgânicos (polímeros) ou inorgânicos (biovidros e HA).

Embora a atividade antimicrobiana *in vitro* de polímeros (poliamida, poliuretano e PMMA) e biovidros contendo prata sejam extensivamente estudada, a ação bactericida do recobrimento via método biomimético de HA com nanopartículas de prata tem sido relatada em menor extensão (BAUDRIT, 2014; DURÁN, 2016).

Uma maneira de prevenção e tratamento de infecções microbianas é a utilização de prata. A presença de Ag^+ tem demonstrado sua eficiência e capacidade de inibir o crescimento bacteriano.

Assim, surgiram recobrimentos de HA dopados com Ag^+ com excelentes resultados. Diferentes métodos de recobrimento, tais como: precipitação (OH *et al.*, 2004;) e troca iônica (FENG *et al.*, 2005) são encontrados na literatura com o objetivo de incorporar o íon Ag^+ na HA (ABE; KOKUBO; YAMAMURO, 1990).

As nanopartículas de prata (AgNPs) podem ser utilizadas para reduzir infecções, prevenir a colonização bacteriana em superfícies de prótese, em cateteres e materiais odontológicos, bem como na indústria de alimentos, no tratamento de água e na fabricação de tintas antibactérias. A prata possui ação bactericida sobre inúmeros tipos de bactérias Gram-positivas e negativas tais como *E. coli*, *S. aureus*, *E. flecium*, *S. pneumoniae*, *V. cholera* e sobre alguns vírus.

Porém, alguns tipos de microrganismos se apresentam resistentes à ação da prata, como *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*.

A resistência pode ser ocasionada pela produção de proteínas que atuam como quelatos, complexando a prata ou outros metais pesados no interior das células fazendo com que haja a diminuição de sua toxicidade (MIRZAJANI, 2011).

Existem outros microrganismos que são capazes de sintetizar nanopartículas de prata por ação enzimática (*P. fungi*) ou por redução extracelular (*Fusarium*

oxysporum), ou ainda podem realizar a degradação das mesmas, como caso da bactéria *Chromobacterium violaceum* (FERRARIS; SPRIANO, 2016).

Nanomateriais levam vantagem por serem de tamanho reduzido e assim aumentam consideravelmente os efeitos de superfície em relação ao volume dos materiais.

O uso das AgNPs, deve-se ao fato da prata ser um bom agente bactericida, potencializando seu efeito por estar na escala nanométrica. Muitos materiais inorgânicos com efeitos bactericidas contendo nanopartículas de prata estão sendo desenvolvidos e alguns deles em uso comercial para esse fim (JUAN, 2010).

Quando se trata de implantes, além da propriedade antimicrobiana, a citotoxicidade deve ser levada em consideração. Nas AgNPs, a maioria dos estudos foram sugeridos como não tóxicos sob níveis de concentração específicos, sendo que o desenvolvimento de novas estratégias de **engenharia de química verde** deve levar a AgNPs a condições mais amigáveis, com ações específicas controláveis e efeitos colaterais reduzidos (KOKUBO, 2016).

Um dos métodos mais conhecidos para a síntese das nanopartículas foi proposto por Turkevich. Este método se dá através da redução do nitrato de prata com citrato de sódio, com adição de amônia para atingir uma coloração amarela.

No presente trabalho será utilizado um método baseado nesses princípios da “**Química Verde**” que utiliza nitrato de prata junto à quitosana, fazendo com que sua síntese seja favorecida em relação à natureza (CAO;LIU, 2010).

Zheng e Wilkie (2003) utilizaram a técnica de recobrimento por Plasma Spraying para recobrir o titânio com hidroxiapatita e, além disso, incorporaram Ag^+ . Através dos ensaios de halos de difusão e DRX puderam observar a excelente capacidade inibitória da prata contra bactérias Gram-positivas.

A capacidade inibitória da prata foi caracterizada por este metal possuir carga positiva, e quando em contato com as membranas celulares que possuem cargas negativas, adere à superfície das membranas, causando a morte celular e conseqüentemente leva a eliminação total ou parcial das bactérias (FIELDING, *et al.*, 2012; LALUEZA, *et al.*, 2011).

Apesar da excelente atividade antimicrobiana, compostos de prata solúveis, como o $AgNO_3$ por exemplo, não são adequados para uso a longo prazo. No entanto, uma quantidade desejada de atividade antimicrobiana pode ser obtida com AgNPs, sendo que a atividade antimicrobiana de AgNPs é altamente influenciada

pela sua morfologia; quanto menor as partículas, maior a eficiência antimicrobiana (LAZIC, *et al.*, 2018).

Juan *et al.* (2010) conseguiram comprovar a boa capacidade das AgNPs, quando depositadas em superfície de titânio e constataram que a modificação na superfície gerou um material promissor com excelente propriedade antibacteriana, já que após 24 horas de exposição a cobertura, 94% de *S. aureus* e mais de 95% de *E. coli* sofreram morte celular.

2.5.2 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, um elemento estrutural encontrado no exoesqueleto de crustáceos e insetos, sendo o segundo mais abundante biopolímero natural em abundância na natureza.

A aplicabilidade desse material ocorre em diversas áreas, incluindo a médica, devido a propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (LIU, 2017; RAHEL, 2012; SOGIAS; WILLIAMS; KHUTORYANSKIY, 2012).

Quando comparada a outros polímeros naturais a quitosana possui uma grande vantagem que é a muco adesão, ou seja, há uma habilidade do polímero se aderir ao muco ou à pele. Porém, para que isso ocorra, é necessário que o material interaja com os componentes do muco ou alterem sua estrutura (DAMIAN *et al.*, 2005; NEVES, 2013).

Combinado com os metais há formação de um complexo estável, devido à presença de cargas positiva nos grupos funcionais de amina da quitosana. Neste complexo, os íons metálicos se encontram ligados a vários grupos amino ou grupos hidroxila.

Estes grupos podem ser da mesma cadeia ou de diferentes cadeias poliméricas. O complexo formado entre a prata e a quitosana, por exemplo, possui como forma molecular $[Ag(NH_3)_2]OH$ (BANERJEE *et al.*, 2016; KIM, 2014; LIH *et al.*, 2016; NAHRAWY *et al.*, 2016; RAHEL, 2012;).

O uso de polímeros, principalmente os naturais, tem sido de vital importância para o avanço das ciências. Esses materiais poliméricos vêm sendo empregados em diversos campos como na engenharia de tecidos, implante de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, farmacêutica, odontologia e em sistema de liberação controlada de fármacos (BRITA; GARCIA, 2018).

Em implantes ortodônticos e ortopédicos, há necessidade de que o material apresente propriedades anti-inflamatórias e os íons metálicos (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ou Fe^{2+}) adsorvidos em nanopartículas de quitosana aumentam suas propriedades antibacterianas, por exemplo, os íons Ag^+ adsorvidos em nanopartículas de quitosana tem um efeito bactericida contra *Escherichia coli*, *Salmonella cholera* e *Staphylococcus aureus* (RAHEL, 2012).

2.5.3 Óleo Essencial

O óleo essencial é um líquido volátil concentrado, podendo ser utilizado como produto farmacêutico, cosmético, alimentício e, na aplicação médica para tratar várias doenças. Os óleos apresentam propriedades importantes como atividades antioxidante, antimicrobiana e antifúngica, e também podem ser usados para higiene bucal e para manutenção de implantes (RUCKMAN, 2013).

Principalmente como bactericidas, os óleos essenciais têm recebido atenção, pois, além dessa propriedade, são antimicrobianos naturais extraídos de fontes vegetais (JUNG; SONG, 2015).

Neste trabalho foi utilizado o óleo essencial de capim-limão, um dos mais importantes e conhecidos internacionalmente como *lemongrass*, tem como constituintes principais o geraniol, o farnesol, o citronelol, o mirceno, o neral o geraniale (BRITO *et al.*, 2011).

A eficiência analgésica, bactericida, inseticida, inibitória do crescimento de fungos e bactérias, tem sido motivo de muitas pesquisas com este material (MARTINS *et al.*, 2004).

Uma pesquisa conduzida por Saddiq e Khayat (2010), mostrou que o epóxido de citral, que é um ingrediente ativo do óleo de capim-limão, tem alta atividade contra o crescimento de bactérias.

A atividade antibacteriana dos óleos vai depender do tipo, composição e concentração da espécie, da composição do substrato e do processamento e condições de estocagem, sendo que o óleo de capim-limão pode apresentar ações contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. (BERTINIET, 2005).

Na cavidade oral, bactérias Gram positivas são predominantes, e estudos mostraram que o capim limão é mais eficaz em bactérias Gram-positiva do que em Gram-negativas mesmo em baixa concentração (NAIK *et al.*, 2010).

2.5.4 Polímero

Polímeros estão sendo utilizados em enxertos ósseos e outras aplicações médicas, devido sua biocompatibilidade, flexibilidade de design, disponibilidade de grupos funcionais, leveza e alto rendimento (STYLIOS; TAOYU; GIANNOUDIS, 2007).

O poliestireno é um polímero aromático sintético feito com monômero de estireno e possui um alto peso molecular (SANPUI, 2008).

A resina de poliestireno tornou-se muito utilizada em construções, entre outras aplicações, em decorrência de possuir propriedades isolantes, resistência mecânica, leveza, facilidade de manuseio e baixo custo (TWU, 2008).

Neste trabalho foi utilizado o poliestireno expandido, que é uma espuma rígida obtida por meio da expansão do poliestireno (PS) durante o processo de polimerização, sendo que o processo de fabricação do EPS é um processo que consiste em uma transformação física e, por isso, não interfere nas propriedades químicas do PS (FERREIRA, 2016).

Quimicamente, o EPS consiste de dois elementos, o carbono e o hidrogênio, portanto não apresenta produtos tóxicos ou perigosos, além disso, esse material tem resistência ao envelhecimento, ou seja, as propriedades do isopor mantêm-se inalteradas por um longo período, há estimativas de que em meio à natureza demore cerca de 150 anos para se degradar (ABIQUIM, 2017; FERREIRA, 2016).

Estudo realizado por Monte *et al.*(2016), avaliaram o efeito da membrana de poliestireno com colágeno e norbixina, por meio do teste do micronúcleo e ensaio cometa em ratos e evidenciaram que a membrana não tem toxicidade biológica e, por isso, é seguro para aplicações in vivo.

2.6 BIOATIVIDADE

Larry L. Hench introduziu o conceito de bioatividade, como sendo: “Um material que retorna uma resposta específica na sua interface, resultando na formação de uma ligação entre os tecidos e o material” (HENCH,1994).

Esta definição se deu a partir de alguns vidros que entraram em contato direto e se uniram fortemente ao osso e desde então, algumas cerâmicas como,

hidroxiapatita sintetizada, fosfato tricálcico também se ligaram ao osso (KOKUBU, 2016).

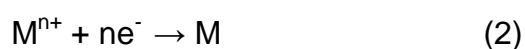
Assim, quando um material bioativo é implantado no corpo humano, ocorre uma série de reações bioquímicas e biofísicas na interface implante-tecido. Estas reações resultam em uma forte interação interfacial, associada à formação de uma camada fina com alta concentração de cálcio (Ca) e fósforo (P) na superfície do implante (ORÉFICE; SILVA JR., 2001).

A bioatividade do material pode ser verificada através de submersão do material em soluções que simulem os fluidos corpóreos. Sendo a solução de SBF (*Simulated Body Fluid*), a mais utilizada em teste, isto, porque esta solução apresenta concentração iônica próxima à do plasma sanguíneo (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

2.7 CORROSÃO

A corrosão é um processo espontâneo que influencia e altera as características dos metais diminuindo a vida útil. O processo de corrosão nesse material ocorre normalmente por processo eletroquímico, onde na reação anódica ocorre a oxidação do metal e na catódica ocorre a redução do metal.

As reações anódica e catódica estão representadas pelas equações (1) e (2), respectivamente (ASM Handbook, 2003; CALLISTER, 2012, RETHWISH, 2012).



Em ambientes naturais e artificiais, a corrosão ocorre quando materiais feitos de metais puros e/ou suas ligas passam por uma mudança química do estado fundamental para uma espécie ionizada (BEECH, 1999).

De acordo com Beech (1999) estas reações podem ser influenciadas por atividades microbianas, especialmente quando os organismos estão em contato com a superfície do metal, formando um biofilme. A deterioração resultante do metal é conhecida como biocorrosão, ou corrosão influenciada microbiologicamente.

Assim, segundo Toptan (2016), a resistência à corrosão é um fator importante que deve ser levado em consideração na escolha de um biomaterial, já que, os

materiais de implantes estão rodeados pelo fluído corpóreo, que por apresentar água, oxigênio dissolvido, proteínas entre outros íons, torna-se um ambiente agressivo para os metais utilizados.

2.7.1 Potencial de Circuito Aberto (OCP)

O potencial de circuito aberto é determinado pela variação do potencial em função do tempo, entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, quando o eletrodo de trabalho é imerso em solução eletrolítica (FONTANA, 1987).

Quando iniciada a indução, a solução metal/solução se caracteriza por uma distribuição de cargas não homogêneas. Com o tempo, acontecem processos de transferências de cargas, como a adsorção de moléculas do solvente, íon do eletrólito e de moléculas presentes no meio e, nestas condições, a célula se mantém estável (SOUZA, *et al.*, 2009).

O potencial de circuito aberto é uma maneira simples de analisar a formação de filmes passivos de implantes/ligas em uma solução. Um aumento de potencial na direção positiva indica a formação de um filme protetor que no caso do titânio é o filme de óxido de titânio (TiO_2), enquanto que um potencial constante indica que a película se mantém estável. Já uma queda de potencial no sentido negativo indica quebra do filme, a dissolução do filme ou que não houve a formação da película (WANG, *et al.*, 2016).

2.7.2 Curvas de Polarização

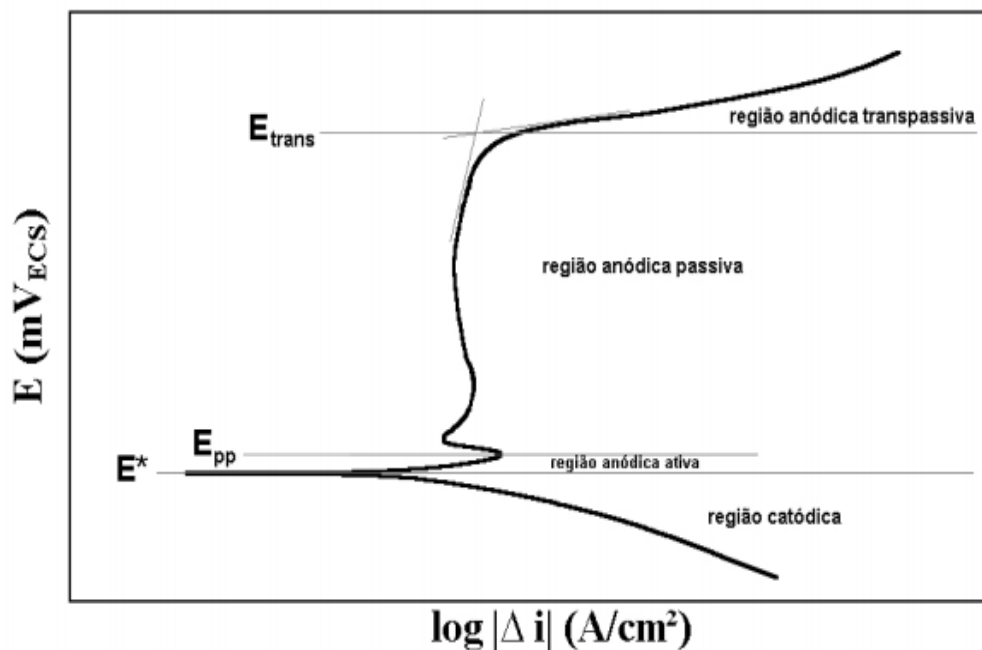
Polarização é definida como a variação do potencial de um eletrodo em função da corrente elétrica, em que as curvas consistem em uma varredura contínua de potenciais, aplicada a uma velocidade constante, monitorando a densidade de corrente que flui na interface da solução/metal (FONTANA, 1987).

A superfície de um metal é transformada na polarização, em uma camada de óxido e/ou hidróxidos, através da passagem de corrente elétrica. As células eletroquímicas podem ser divididas em dois tipos: célula galvânica e célula eletrolítica.

Na célula galvânica o processo é caracterizado pela variação da intensidade de corrente que circula no sistema. Já na célula eletrolítica, a variável é o potencial do eletrodo (FONTANA, 1987).

A Figura 3 mostra uma curva típica de polarização de um metal, em que é possível observar as regiões catódicas e anódicas dividida em regiões ativa, passiva e transpassiva.

Figura 3 - Curva de polarização do potencial versus logaritmo da densidade corrente



Fonte: FONTANA (1987, p.26).

A região abaixo do potencial catódico (potencial abaixo do potencial de corrosão- E^* , a taxa de solução do metal é muito baixa devido às reações catódicas. Já a região anódica tem início com o aumento de potencial e a reversão da corrente no potencial de corrosão, nesta região ocorre à dissolução anódica (FONTANA, 1987).

De acordo com Callister (2012) a corrosão de alguns metais e ligas perdem sua reatividade química e se tornam inertes sob condições ambientais específicas, esse fenômeno é conhecido por passividade.

Esse comportamento pode ser resultante da formação de um filme óxido muito fino e aderente a superfície do metal, que atua como uma barreira de proteção contra corrosão adicional.

No caso do ambiente bucal, os filmes de óxido de titânio e suas ligas podem ser removidos por escovação ou quando em contato com alimentos. Portanto, tanto em aplicações dentárias, quanto em outras aplicações, a compreensão da cinética de repassivação é muito importante para a compreensão da corrosão (LIU *et al.*, 2014).

Yetim (2016) utilizou amostras de Ti c.p de grau 2 para os ensaios de corrosão em fluido corporal, saliva artificial e solução de Ringer, em que se analisou uma amostra de Ti c.p, Ti revestido com TiO_2 e Ti revestido com TiO_2 dopado com prata.

Apesar do Ti c.p já ter boa resistência à corrosão, a mudança positiva do potencial de corrosão (E_{corr}) mostrou um aumento na resistência à corrosão das amostras revestidas, além de que, as curvas também mostraram a avaliação de passivação para as amostras revestidas em todos os meios.

A partir das observações foi concluído que as melhores propriedades de corrosão foram obtidas a partir dos testes realizados em solução de saliva artificial com amostras de TiO_2 dopadas com prata e este material pode ser utilizado em aplicações dentárias.

2.7.2.1 Método de extrapolação de Tafel

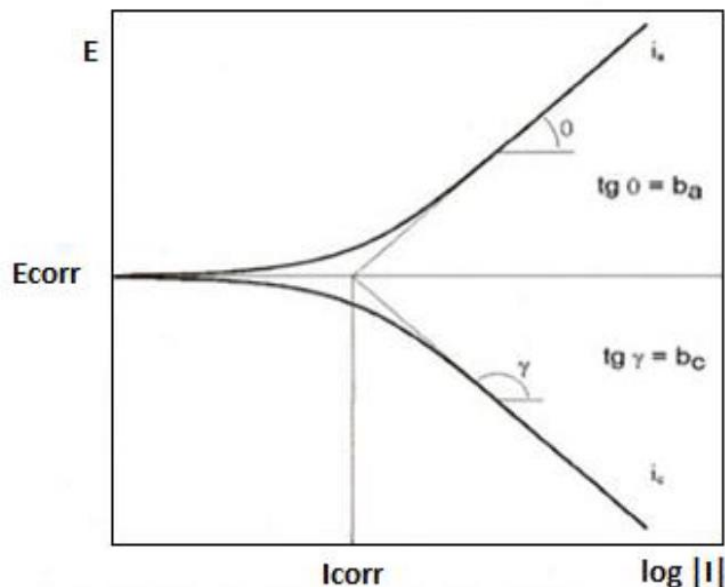
As informações quantitativas do processo de corrosão podem ser obtidas pelo método de extrapolação de Tafel (método de inserção), por meio das conhecidas curvas de Tafel, como ilustra a Figura 4.

A representação gráfica é feita através da curva de polarização (potencial *versus* log da densidade de corrente), onde é feita uma extrapolação dos ramos, região anódica e catódica.

A extrapolação dos referidos ramos, que culmina com sua interseção, gera um par de valores coordenados, os quais são: o potencial de corrosão (E_{corr}) e a densidade de corrente de corrosão (I_{corr}) do sistema.

A vantagem em utilizar a representação da densidade de corrente em escala logarítmica é que, nestas curvas, a parte em que é válida a equação de Tafel é linear.

Figura 4 - Extrapolação de Tafel para determinação do potencial de corrosão (E_{corr}) e densidade de corrente de corrosão (I_{corr})



Fonte: Adaptado de MENUCCI (2006).

2.8 ENSAIO MICROBIOLÓGICO

Na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica, diferentes métodos podem ser utilizados, sendo os seguintes os mais conhecidos: método de difusão, bioautógrafos e macrodiluição e microdiluição.

O método de difusão em ágar é a técnica utilizada nesse trabalho, e é a mais utilizada para avaliação da atividade antimicrobiana, principalmente de OEs, sendo reconhecido como preciso e confiável, embora produza resultados qualitativos, além de ser uma técnica de fácil execução (BURT, 2004).

De acordo com este método, placas de Petri são preenchidas com ágar, sendo inoculado com o micro-organismo a ser testado. Séries de placas de Petri com discos de papel ou poços contendo diferentes concentrações são incubadas.

A eficácia do teste é demonstrada pelo tamanho da zona de inibição do crescimento do micro-organismo em torno do disco ou poço, sendo usualmente

expresso como o diâmetro dessa zona, em cm ou mm, podendo ou não ser incluída a área correspondente ao disco de papel ou poço.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado Ti c.p. grau 2, as amostras foram lixadas, lavadas e separadas para análises microestruturais.

Em seguida, as condições descritas na Tabela 3 foram avaliadas, sendo as amostras recobertas pelo método biomimético, em meio de 1,5 SBF (*Simulated body fluid*). Após, o processo de recobrimento, as amostras foram dopadas com dois bactericidas: AgNPs e óleo essencial de capim-limão.

Após o processo de recobrimento, as amostras foram submetidas à caracterização microestrutural, ensaio de corrosão, bioatividade e bactericida. A Tabela 3 apresenta a nomenclatura e as condições das amostras utilizadas.

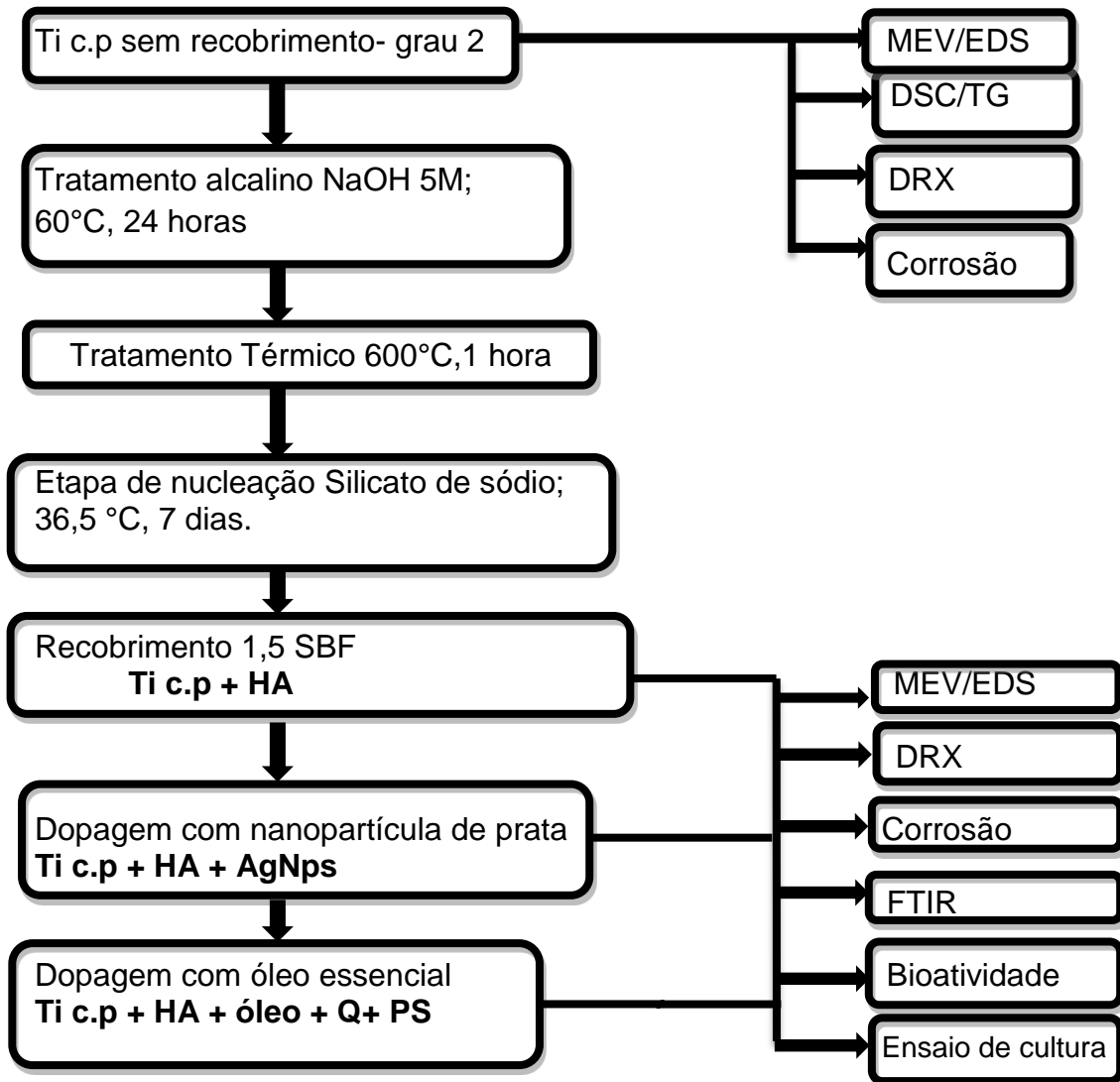
Tabela 4 - Nomenclatura e condições das amostradas

NOMENCLATURA	CONDIÇÃO
Ti c.p.	titânio comercialmente puro
Ti c.p.+ HA	titânio comercialmente puro+hidroxiapatita
Ti c.p.+HA+AgNPs	titânio comercialmente puro+hidroxiapatita+nanopartícula de prata
Ti c.p. + HA+óleo + PS	titânio comercialmente puro + hidroxiapatita+ óleo essencial + poliestireno.

Fonte: Autor.

A Figura 5 mostra as etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho.

Figura 5 - Fluxograma das etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho



Fonte: Autor.

3.1 CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL

3.1.1 Microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia por energia dispersiva

O microscópio eletrônico de varredura permite realizar a caracterização morfológica do titânio, além dos defeitos e homogeneidade do recobrimento. No presente trabalho foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca FEI, modelo Inspect S 50, com espectrômetro de energia dispersiva (EDS) acoplado,

da marca EDAX, modelo Apollo X, instalado no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE), na UFSCar - São Carlos.

3.1.2 Difração de raios X

A Difractometria de raios X é uma técnica utilizada para obter características importantes sobre a estrutura de materiais, em que ao incidir um feixe de raios X sobre o sólido, o mesmo interage com os átomos presentes, originando o fenômeno de difração.

Através dessa técnica, foi possível identificar fases cristalográficas no material, sendo que neste trabalho é importante para a determinação da fase da hidroxiapatita formada durante o recobrimento.

As análises foram feitas no Difrátômetro da marca Rigaku, modelo Miniflex600, da USP- campus Pirassununga, com radiação Cu-K α , em uma faixa de 2θ de 20° a 90° , com passo de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 2 s/ passo.

3.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Difusa

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflectância difusa (FTIR) é uma técnica utilizada para determinar grupos funcionais. Isto é possível, pois cada grupo funcional apresenta bandas de absorção em frequências características de radiação na região infravermelha do espectro.

O uso da espectroscopia no infravermelho permite avaliar nos recobrimentos de apatitas, possíveis bandas de absorções para os grupos fosfato (PO_4^{3-}), carbonato (CO_3^{2-}) e hidroxilas (OH^-), o que permite acompanhar o desenvolvimento da camada de hidroxiapatita carbonatada sobre o metal, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 5 - Bandas de absorção do espectro no infravermelho para apatitas

Grupos Funcionais	Banda de Absorção (Cm⁻¹)	Ligação Química
PO ₄ ³⁻	1200-1000	Estiramento Assimétrico do fosfato.
	960-950	Estiramento Simétrico do fosfato.
	570-560	Vibração da ligação assimétrica do fosfato.
OH ⁻	3670-3570	Vibração de estiramento do íon OH-
	3670-3570	Vibração de estiramento do íon OH-
OH ⁻ (H ₂ O)	630	Vibração de estiramento do íon OH-
	3600-3200	Deformação da ligação H ₂ O.
CO ₃ ²⁻ - Tipo A	1700-1600	Deformação da ligação H ₂ O.
	1514,1450	Estiramento assimétrico da ligação do carbonato.
CO ₃ ²⁻ - Tipo B	880	Vibração da ligação fora do plano do carbonato
	1465,1412	Estiramento assimétrico da ligação do carbonato.
	870	Vibração da ligação fora do plano do carbonato.

Fonte: LAFRON (2008, p.55).

3.1.4 Análises Térmicas – calorimetria diferencial de varredura e termogravimetria

Os ensaios de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TG) foram realizados nas seguintes condições: aquecimento a 1100°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min, seguido de isoterma por 10 minutos a 1100°C e resfriamento até temperatura ambiente, com taxa de resfriamento de 10°C/min, sendo o argônio utilizado como gás de arraste. O equipamento empregado foi da marca Netzsch, modelo STA 449 F3, instalado no LABMAT, na UNIFAL-MG, Campus de Poços de Caldas.

3.2 RECOBRIMENTO BIOMIMÉTICO

Para realizar o recobrimento biomimético foram utilizadas soluções de NaOH 5 mol.L⁻¹, para a etapa do tratamento alcalino, solução de silicato de sódio (S.S) para etapa de nucleação e solução de 1,5 SBF para formação de hidroxiapatita. A concentração iônica das soluções utilizadas está representada na Tabela 5.

Tabela 6 - Concentração iônica das soluções para o recobrimento biomimético (mol.L⁻¹)

Condições	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ²⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	SiO ₃ ²⁻
Plasma	142,0	5,0	2,5	1,5	27,0	103,0	1,0	0,50	-
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	4,2	147,8	1,0	0,50	-
1,5 SBF	213,0	7,5	3,8	2,3	6,3	221,7	1,5	0,75	-
S.S	2,0	-	-	-	-	1,0	-	-	3,6

Fonte: ABNT NBR ISO 23317(2013, p.23).

Na Tabela 6 está descrita a quantidade dos reagentes utilizados para preparar a solução de 1,5 SBF (SBF 50% mais concentrado), segundo a norma ABNT NBR ISO 23317:2013. O pH da solução foi ajustado para 7,40 na temperatura de 36,5°C.

Tabela 7 - Reagentes utilizados no preparo de SBF e 1,5 SBF

Reagentes	SBF (g)	1,5SBF (g)
NaCl	8,035	12,053
NaHCO₃	0,355	0,533
KCl	0,225	0,338
K₂HPO₄.3H₂O	0,176	0,264
MgCl₂.6H₂O	0,311	0,467
HCl 1,0M	39,0 mL	58,5mL
CaCl₂.2H₂O	0,386	0,579
Na₂SO₄	0,072	0,108
Tris	6,118	9,177
HCl 1,0M	0 a 5 mL	0 a 7,5 mL

Fonte: Adaptado de ABNT NBR ISO 23317 (2013).

Para o recobrimento das amostras, os corpos de prova foram lixados com lixa 180 mesh, de modo a promover uma superfície rugosa e aumentar a área específica do material. Segundo Vercik (2003), esta característica foi necessária para favorecer a precipitação de apatitas. Em seguida ocorreu a limpeza do material metálico com detergente, acetona, álcool e água destilada, em banho ultrassônico.

Posteriormente, as amostras foram mergulhadas na solução de NaOH (5M) e levadas para estufa a 60°C por 24 horas, para promover sítios ativos sobre a superfície, a fim de favorecer a precipitação da apatita. Após o tratamento alcalino, os substratos de Ti c.p. foram lavados com água e secos à temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, as amostras foram tratadas termicamente a 600°C por 1 hora em forno, disponível do LABMAT – ICT- Unifal.

As amostras foram submetidas à etapa de nucleação, permanecendo imersas em solução de silicato de sódio a 36,5°C por sete dias. Finalizada a etapa da

nucleação, as amostras foram mergulhadas em solução de 1,5 SBF a 36,5°C por sete dias, sendo a solução trocada a cada 48 horas para favorecer as condições de supersaturação da solução, acelerando a formação da camada de apatita. Após essas etapas, as amostras foram lavadas com água deionizadas e secas no dessecador.

3.3 DOPAGEM COM NANOPARTÍCULA DE PRATA

Após o recobrimento biomimético, algumas amostras de Ti+HA foram dopadas com AgNPs. As AgNPs foram obtidas a partir de solução de ácido acético 1%(v/v), quitosana e solução AgNO_3 $1,6 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

Preparou-se uma solução contendo 6,92 mg/mL de quitosana em solução de ácido acético 1% preparada anteriormente, em agitação magnética por 30 minutos. Um volume de 40 mL desta solução foi misturada junto a 16 mL de solução AgNO_3 , com agitação magnética por 10 minutos. A solução foi colocada em tubos de ensaio tampados e mantidos em banho-maria a 90°C por 18 horas.

Posteriormente, a solução foi colocada em béquer e as amostras foram submersas rapidamente três vezes na solução. Em seguida, foram secas em temperatura ambiente dentro do dessecador.

A comprovação da formação de AgNPs foi realizada por meio de análise de espectro de infravermelho, realizado na solução, o qual apresentou um pico de absorbância característico da Ag no comprimento de onda de banda em, aproximadamente, 420 nm.

3.4 DOPAGEM COM ÓLEO ESSENCIAL

Após o recobrimento biomimético, algumas outras amostras de Ti+HA foram dopadas com óleo essencial. A solução foi preparada a partir da diluição de 0,25g de quitosana em ácido acético 1% (v/v). A solução foi agitada por 30 minutos em agitador magnético. Foram utilizados 0,5 gramas de poliestireno dissolvido em 1,5 mL de óleo de capim-limão e essa mistura foi adicionada na solução de quitosana diluída em ácido, com alta velocidade de agitação.

Posteriormente, a solução foi colocada em béquer e as amostras foram submersas três vezes na solução. Em seguida, foram secas em temperatura ambiente em dessecador.

3.5 ENSAIO DE BIOATIVIDADE

O ensaio de bioatividade foi realizado de acordo com a norma ISO 23317:2014. Amostras de Ti c.p e todas as outras condições foram imersas em SBF à 36,5°C pelo período de uma, duas, três e quatro semanas, e avaliado o crescimento de apatitas. No final de cada semana as amostras foram retiradas dos recipientes, lavadas com água destilada e secas no dessecador.

Para avaliação do crescimento das apatitas, técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Difusa (FTIR) foram utilizadas.

3.6 ENSAIO DE CORROSÃO POR POLARIZAÇÃO

As amostras de titânio sem revestimento e com revestimento foram submetidas ao ensaio de corrosão por circuito aberto (OCP) e por polarização potenciodinâmica linear.

Para a realização dos ensaios de corrosão, foi utilizado o potenciostato da marca Metrohm, modelo Autolab/PGSTART 302, conectado a um microcomputador controlado pelo programa NOVA 1.8, do mesmo fabricante, instalado no LABMAT na UNIFAL-MG, *campus* Poços de Caldas. A Figura 6 mostra o sistema eletroquímico utilizado para a obtenção dos resultados de corrosão.

Os ensaios foram realizados utilizando como solução eletrolítica de 1,5 SBF com pH de 7,4 a 36,5°C (temperatura corpórea) e uma solução de saliva artificial com pH 6,0 a 25°C.

Para a realização da solução de saliva sintética foram dissolvidas quantidades determinadas de Na_2HPO_4 , NaCl , KSCN , KH_2PO_4 , NaHCO_3 e KCl em água destilada e deionizada a 25°C e utilizou-se o HCl 1M para a correção do pH para 6,0, as quantidades de cada reagente estão especificadas na Tabela 7.

Tabela 8 - Reagente para preparo de Saliva Sintética

Reagentes	Saliva sintética (g)
Na_2HPO_4	0,26
NaCl	6,7
KSCN	0,33
KH_2PO_4	0,2
NaHCO_3	1,5
KCL	1,2

Fonte: Adaptado de AFNOR S90-701 (2004)

A Figura 6b, mostra em detalhe a célula eletroquímica e os eletrodos de trabalho (ET), contra-eletrodo de platina (EP) e de referência de calomelano saturado (ECS), e o termômetro. A Figura 6c mostra o eletrodo de trabalho, indicando a posição da amostra. Nos ensaios de corrosão por circuito aberto (OCP), os eletrodos permaneceram na solução por 1200s. E nos ensaios de polarização as curvas foram obtidas variando o potencial (E) de -1,5 V a + 3,0 V com passo de 0,001 V e velocidade de varredura de 0,001 V/segundo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 6 - Sistema eletroquímico

(continua)

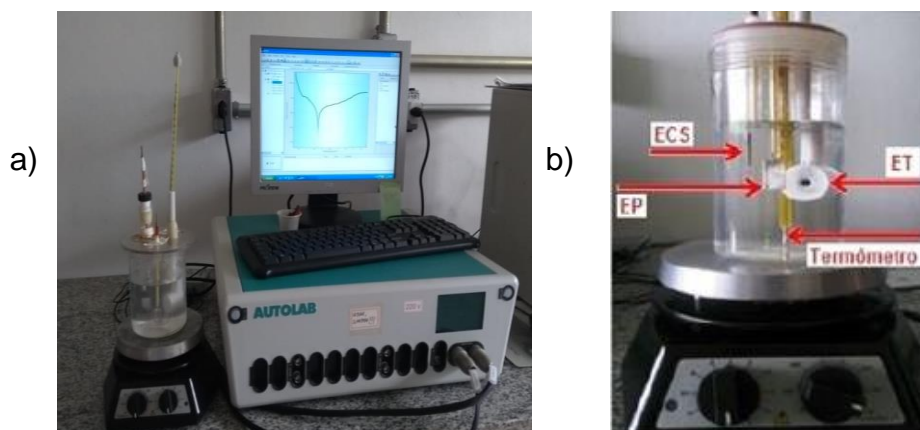


Figura 6 - Sistema eletroquímico

(conclusão)



Fonte: Autor.

- Legenda: a) Potenciostato
b) Célula Eletroquímica
c) Eletrodo de Trabalho

3.7 ENSAIO DE CULTURA E BACTÉRIAS

Neste trabalho foi utilizado o método do teste difusão em disco para avaliar o potencial antimicrobiano das amostras. Para os testes, a cepa bacteriana usada foi [American Type Culture Collection (ATCC)] *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Neste método o halo de inibição do crescimento bacteriano indica a magnitude da atividade antimicrobiana.

Inicialmente, a cepa bacteriana selecionada *Staphylococcus aureus*, foi retirada de placa de cultura preservada e suspendida em solução salina estéril (cloreto de sódio a 0,9 %, NaCl). Essa suspensão padrão da bactéria foi padronizada em 10^8 células mL^{-1} utilizando a escala 0,5 de *Mac Farland* e semeada na superfície das placas de ágar Muller-Hinton com auxílio de *swabs* estéreis.

As amostras foram colocadas sob a cultura de bactérias e incubadas por 24 h a 37 °C e o diâmetro do halo formado em volta dos discos foi mensurado de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (antigo *NCCLS*) para testes de sensibilidade por disco-difusão. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

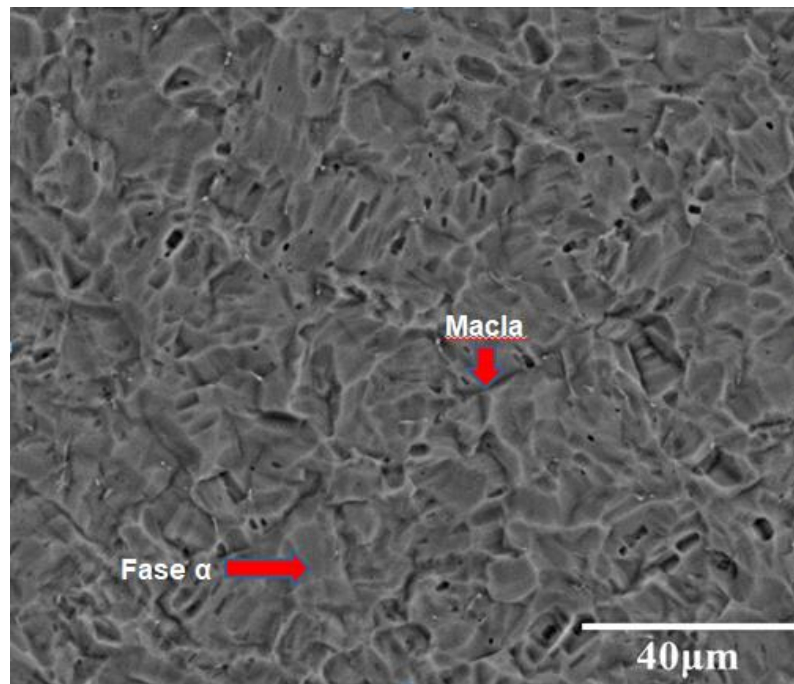
4.1 CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL DO TI.C.P

A micrografia da amostra do titânio grau 2 comercialmente puro (Ti c.p.), obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) está apresentada na Figura 7.

Observou-se uma morfologia com distribuição homogênea com estrutura granular e equiaxial, com a presença de maclas (defeito cristalino em que ocorre o deslocamento dos átomos de suas posições regulares), característica da fase α do titânio, confirmada através dos picos do difratograma na Figura 8, resultado também observado por Wang, et. al. (2013).

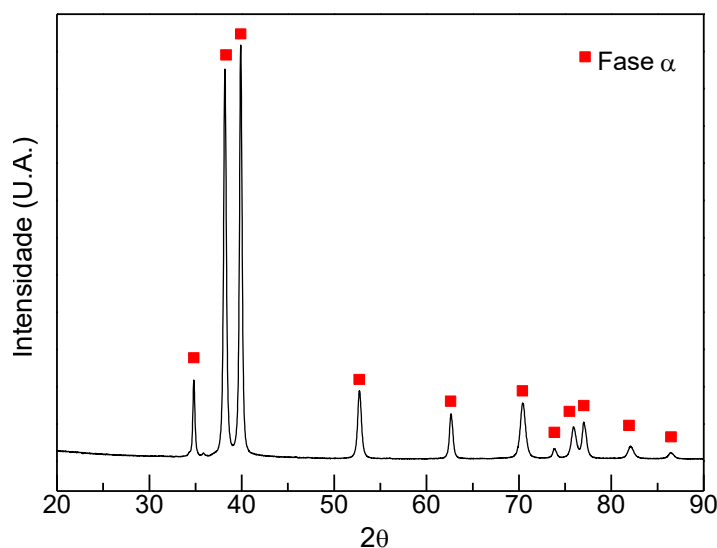
Este difratograma apresenta picos bem definidos e estreitos, indicando que o material apresenta uma estrutura cristalina bem definida. (Wang, et. al. 2013).

Figura 7 - Micrografia obtida por MEV do Ti. c.p. grau 2.



Fonte: Autor.

Figura 8 - Espectro de difração de raios X do Ti. c.p. grau 2



Fonte: Autor.

A micrografia do titânio corrobora com o resultado obtido pelo DRX. Os picos obtidos para a fase α do titânio estão em concordância com o difratograma de Santos, 2014.

4.2 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA

4.2.1 Calorimetria Diferencial de Varredura

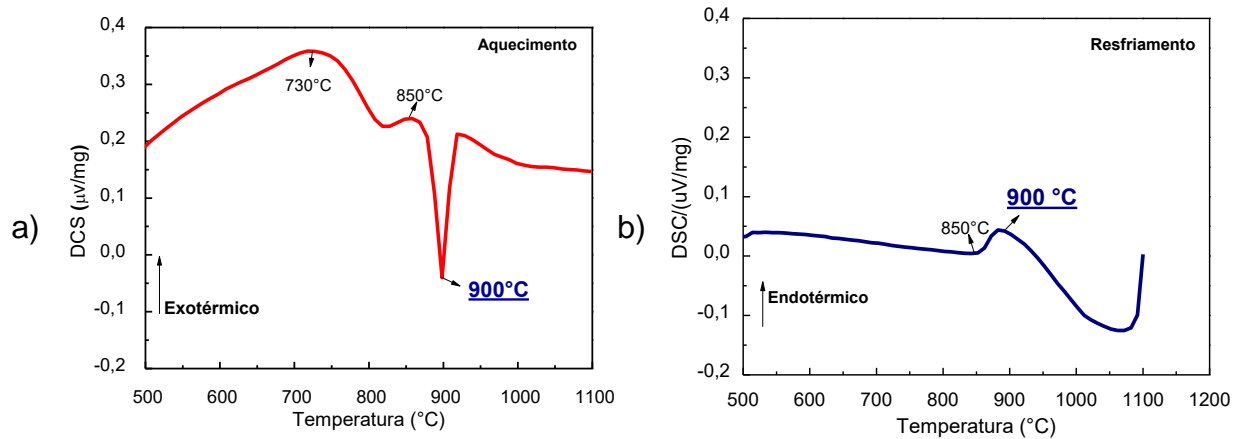
A Figura 9 apresenta as análises por calorimetria exploratória diferencial (DSC) de aquecimento e resfriamento para o Ti c.p. grau 2. Segundo Gemelli (2007) a temperatura de 730°C se refere à energia liberada na transformação do TiO_2 de anatásio para rutilo, que é o único óxido estável acima de 718°C.

Na temperatura de 850°C ocorre a recristalização do metal, onde os novos grãos se estabelecem em formatos de núcleos muito pequenos que crescem até substituir completamente o seu material de origem (CONTIERI, 2009).

O pico (endotérmico) a 900°C refere-se à transformação de fases α/β , segundo Murray (1986), o titânio de alta pureza muda de fase em torno de 882°C, porém, o titânio grau 2, apresenta teores de nitrogênio e oxigênio que podem ser responsáveis pelo deslocamento desse pico.

Segundo Weschetal (1993) o Ti grau 2 apresenta a transição de fases em temperatura em torno de $913 \pm 14^\circ\text{C}$. Essas transformações também podem ser observadas na curva de resfriamento, Figura 9b.

Figura 9 - Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) do Ti c.p. grau 2



Fonte: Autor.

Legenda: a) Aquecimento

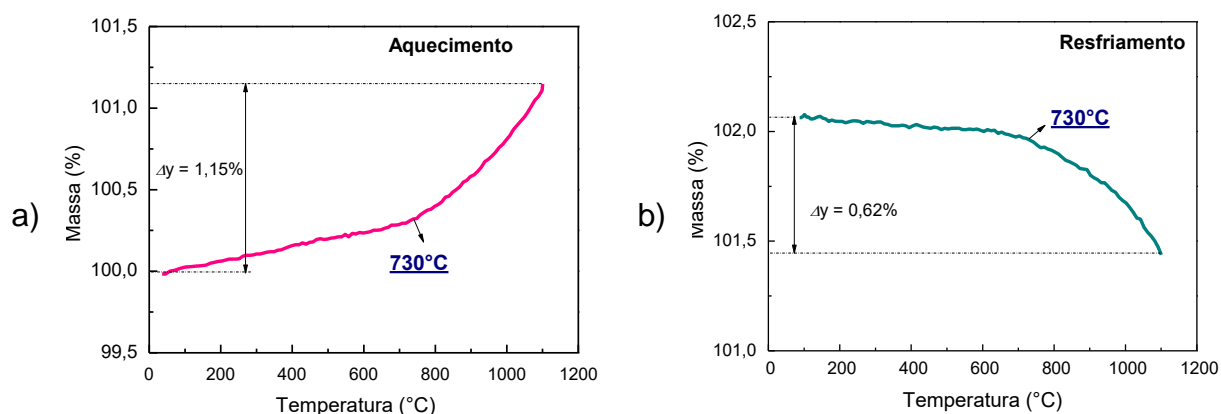
b) Resfriamento

4.2.2 Termogravimetria

A Figura 10 mostra as curvas de termogravimetria para o Ti c.p. grau 2. Foi observado pela curva de aquecimento, um aumento na massa da amostra de aproximadamente 1,15% massa, em decorrência da formação de TiO_2 na superfície do material. Na curva de resfriamento foi possível observar um ganho de massa de 0,62% massa.

O aumento de massa do Ti c.p, mostrado na Figura 10, refere-se com a formação de TiO_2 .

Figura 10 - Curvas de termogravimetria (TG), para o Ti c.p. grau 2



Fonte: Autor.

Legenda: a) Aquecimento.

b) Resfriamento.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO RECOBRIMENTO

4.3.1 Recobrimento com Hidroxiapatita

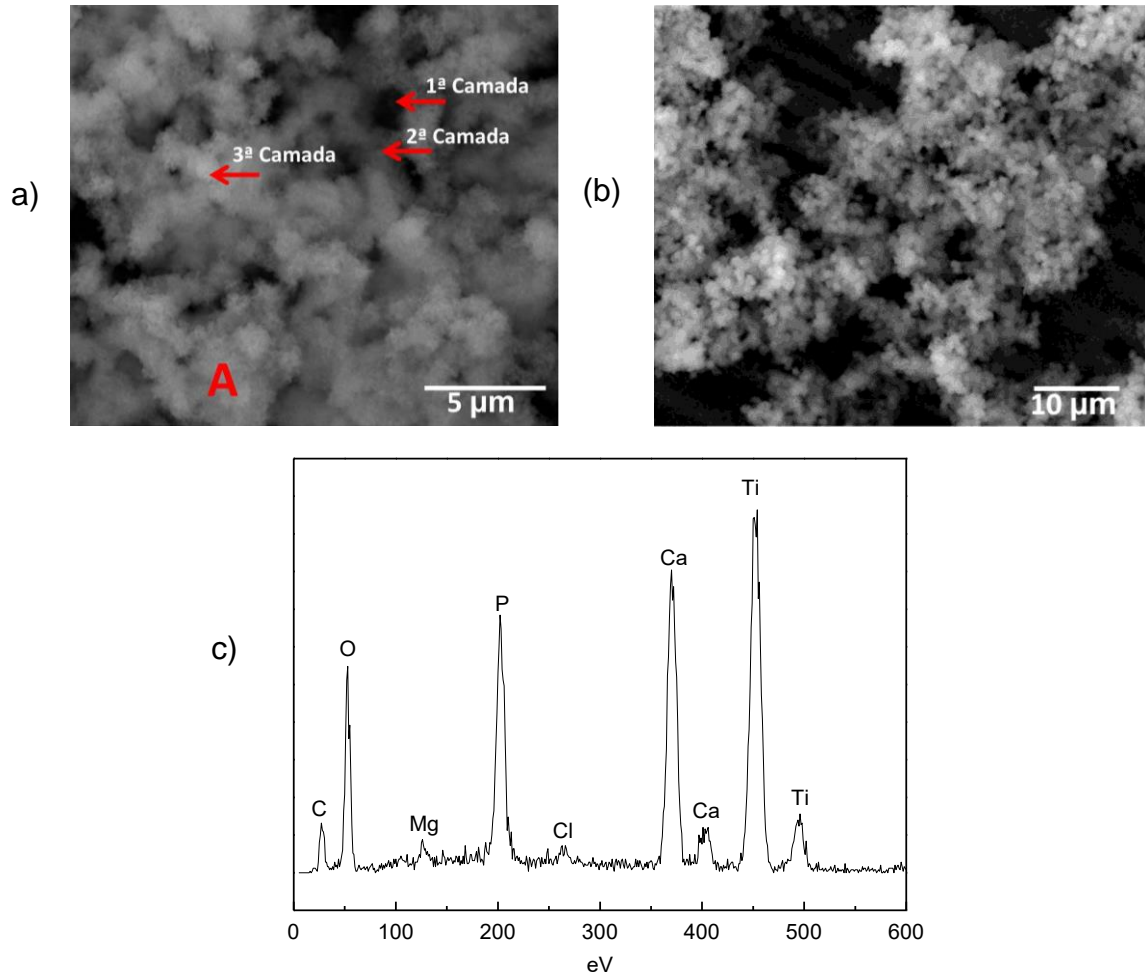
As Figuras 11a e 11b apresentam as micrografias obtidas por MEV e a Figura 11c mostra o espectro obtido por EDS, na condição Ti c.p+HA, em que foi possível observar a formação de uma estrutura globular e homogênea, característica da hidroxiapatita, mostrando que a imersão em 1,5 SBF foi determinante na formação do recobrimento (CUMPATA 2014).

A homogeneidade do recobrimento ocorreu devido aos tratamentos alcalinos e térmicos. O tratamento alcalino foi importante neste processo, visto que, devido a formação espontânea do TiO_2 , ocorreu uma camada protetora sobre a superfície do substrato, o que o torna pouco reativo à deposição de hidroxiapatitas.

Quando o dióxido de titânio reage com o NaOH, forma-se o hidrogel de titanato, que se desidrata durante o tratamento térmico e se estabiliza na forma de titanato de sódio ($Na_2Ti_5O_{11}$), parcialmente cristalizada, responsável pela aceleração do crescimento do fosfato (ADAWY, 2009). Ou seja, nos tratamentos alcalino e térmico, há um aumento nos sítios ativos da superfície do metal.

Na Figura 11a foi possível observar a formação de três camadas de hidroxiapatita superpostas com formato globular.

Figura 11 - Micrografias obtidas na condição Ti c.p + HA obtida por MEV



Fonte: Autor.

Legenda: a) Vista geral

b) Em detalhes

c) Espectro obtido na microanálise por EDS na região A.

A Figura 11c, mostra a microanálise semi quantitativa por EDS e a Tabela 7 apresenta os resultados da microanálise semi quantitativa, realizada na região A, em que foi possível observar a presença de Ca, P e O, elementos presentes nas hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A presença de cloro pode ser proveniente do HCl, NaCl, e outros compostos contendo cloro, que foram utilizados para preparar a solução de 1,5 SBF.

Apesar de se esperar a formação de hidroxiapatita, que é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos, a partir do recobrimento biomimético, o EDS mostra a formação de apatita, já que a razão atômica Ca/P apresentou um

valor inferior a 1,67, conforme Costa et al. 2009. Porém, a composição estável pode ter esta razão estendida para aproximadamente 1,5 (BEST, 2008).

A presença do elemento oxigênio pode ser decorrente da formação da estrutura hidroxiapatita e ou de contaminação superficial, assim como o carbono, a presença do magnésio pode ser decorrente dos reagentes utilizados na preparação da solução de 1,5 SBF.

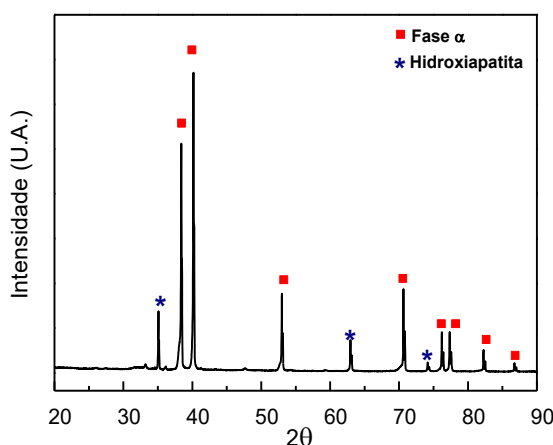
Tabela 9 – Microanálise semi quantitativa por EDS

Elemento	% peso	% atômica
Carbono	9.03	16.73
Oxigênio	39.88	55.49
Magnésio	0.93	0.85
Fósforo	8.76	6.30
Cloro	0.66	0.42
Cálcio	14.07	7.81
Titânio	26.67	12.40

Fonte: Autor.

A Figura 12 mostra o difratograma de raios X do substrato com recobrimento na condição Ti c.p+HA. Foram observados picos característicos da estrutura cristalina hexagonal compacta, fase α , estrutura apresentada pelo Ti em temperatura ambiente e outros picos confirmando a presença de hidroxiapatita, também observado por Coelho (2013) e Erakovic et. al (2004).

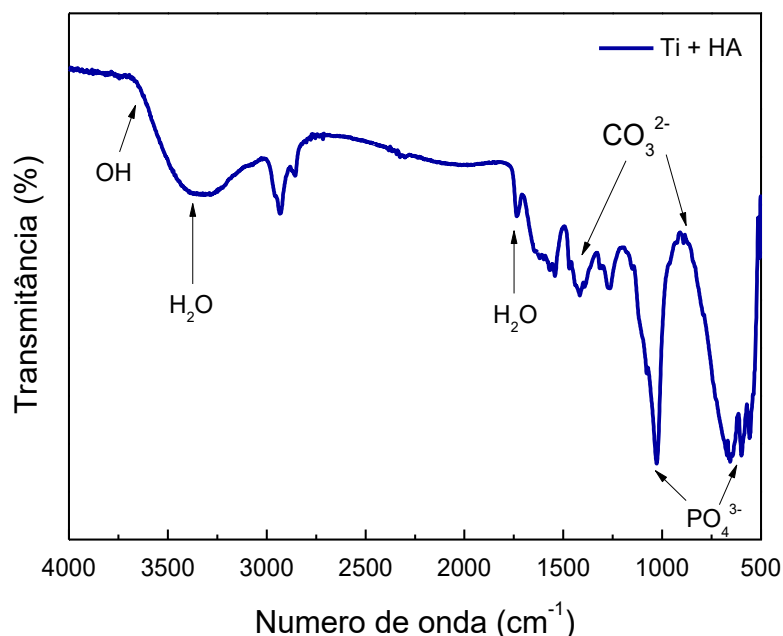
Figura 12 - Difratograma de raios X da condição Ti c.p+HA



Fonte: Autor.

O resultado obtido por espectroscopia no infravermelho (FTIR) para Ti c.p + HA é apresentado na Figura 13.

Figura 13 - Espectro de infravermelho da condição do Ti c.p + HA



Fonte: Autor

O espectro de FTIR confirma os resultados do MEV/EDS e DRX, com a identificação da formação de apatita através das bandas de absorção referentes a vibração dos grupos PO_4^{3-} ($587, 1021 \text{ cm}^{-1}$) e OH (3691 cm^{-1}).

A banda em 1735 cm^{-1} e a banda larga em $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ são referentes às moléculas de águas incorporadas. Os picos em 1412 cm^{-1} e 880 cm^{-1} são referentes, respectivamente, ao estiramento e vibração do grupo CO_3^{2-} do tipo A e B, caracterizando assim a hidroxiapatita do tipo AB (BARRERI, 2001).

4.3.2 Recobrimento com Hidroxiapatita e dopagem com nanopartícula de prata

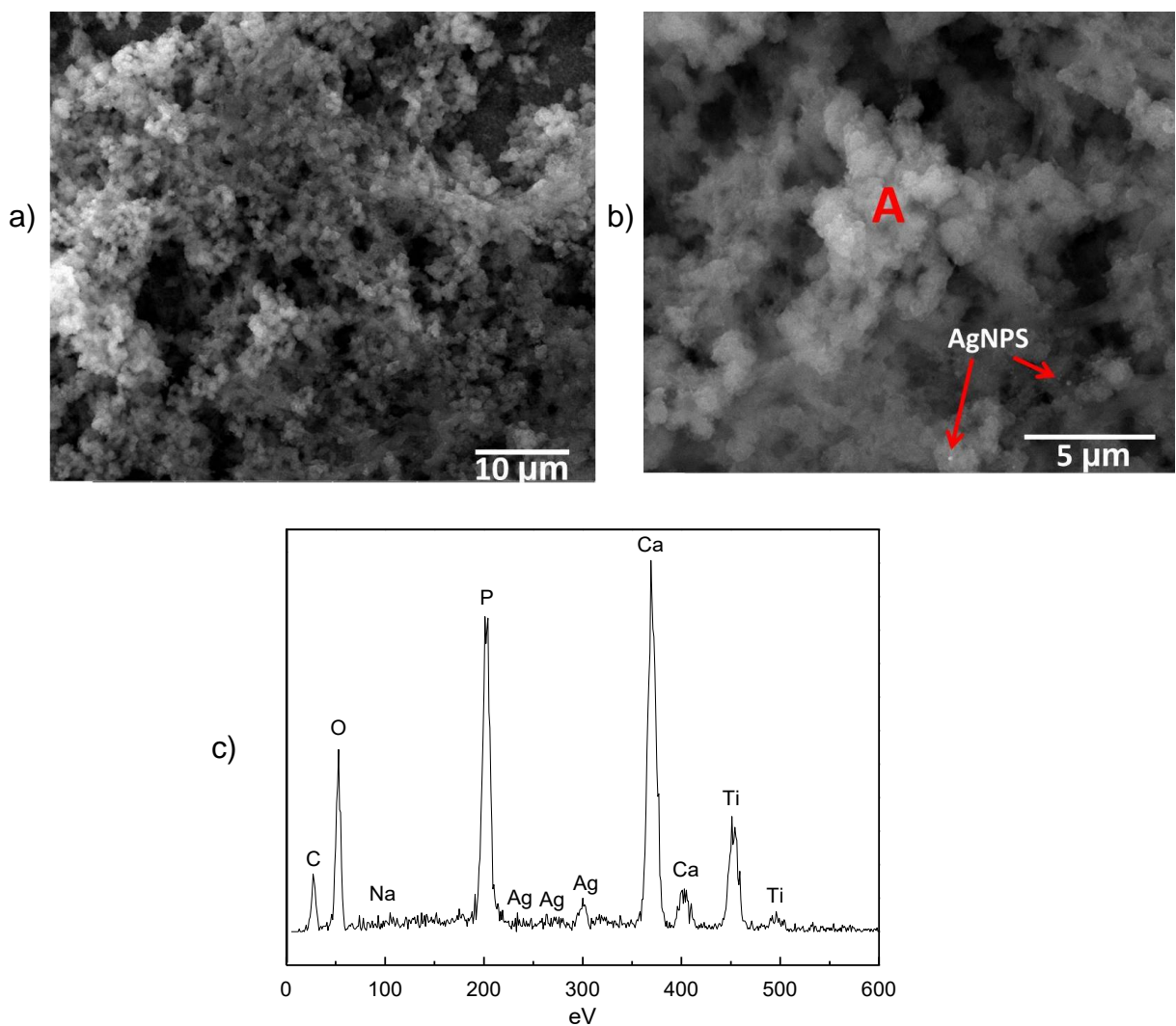
As Figuras 14a e 14b mostram as amostras do Ti + HA + AgNPs. Foi possível observar que as nanopartículas de prata (AgNPs) recobriram a superfície de forma homogênea e densa, isso pode ter ocorrido devido a substituição dos íons de cálcio por íons de prata, já que a estrutura das apatitas possuem íons Ca^+ que podem ser substituídas por cátions metálicos como Ag^+ e Cu^+ (LALUEZA, et. al., 2011).

A Figura 14c mostra o EDS realizado na região A, e observa-se que além da presença de fósforo e cálcio, principais elementos da hidroxiapatita, verificou-se a

presença de sódio que pode ser decorrente do tratamento alcalino, ao qual as amostras foram submetidas, previamente ao recobrimento biomimético, ou em decorrência do NaCl utilizado na preparação da solução de 1,5 SBF.

O oxigênio pode ser decorrente da formação da estrutura hidroxiapatita e ou de contaminação superficial, assim como o carbono. E a presença da prata indica que houve a incorporação da nanopartícula de prata (AgNPs), na superfície da amostra.

Figura 14 - Micrografias obtidas por MEV para a condição Ti c.p+ HA + AgNps



Fonte: Autor.

Legenda: a) Vista geral

b) Em detalhes

c) Espectro obtido por EDS na região A.

A Tabela 8 mostra os resultados da microanálise semi-quantitativa, por EDS. Foi possível verificar que a razão Ca/P (% atômica), não apresentou o valor de 1,67, mas apresentou um valor superior a 1, ou seja, o material pode ser empregado como implante, pois de acordo com Best et al. 2008, compostos com razão menor que 1, não são adequados, visto que apresentam uma alta solubilidade.

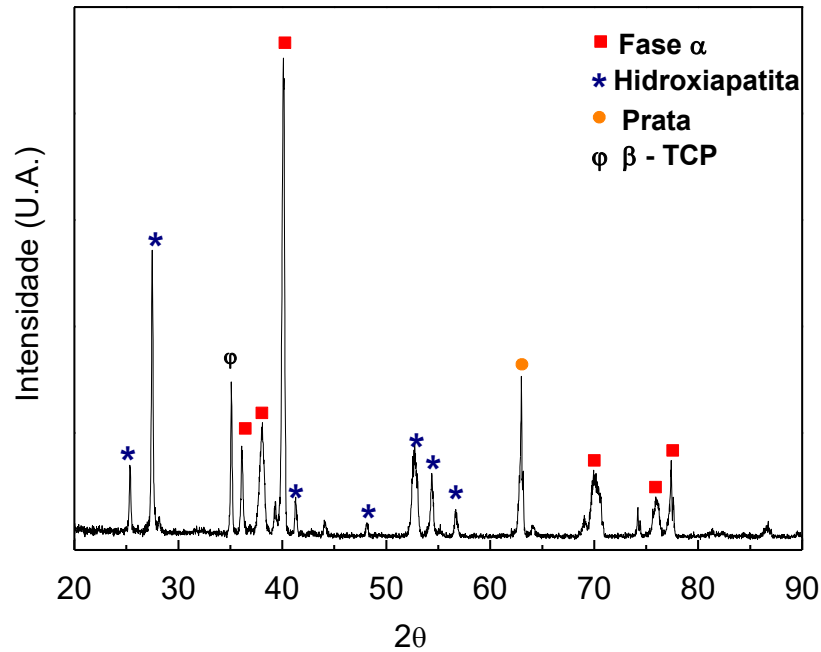
Tabela 10 - Microanálise semi quantitativa obtida por EDS

Elemento	% peso	% atômica
Carbono	13,08	22,94
Oxigênio	39,02	51,39
Sódio	0,53	0,48
Fósforo	13,73	9,34
Prata	3,03	0,59
Cálcio	20,91	10,99
Titânio	9,70	4,27

Fonte: Autor.

A Figura 15 mostra o difratograma de raios X da condição Ti + HÁ + AgNPs. Foi possível observar a presença da hidroxiapatita da fase α do titânio (estrutura cristalina hexagonal), a prata, proveniente das nanopartículas e β -TCP, decorrente da transformação de HA deficiente em cálcio. A distribuição mais homogênea observada nas micrografias das amostras dopadas com AgNPs podem estar relacionadas ao surgimento da fase β -TCP (RAMESHABU, 2006).

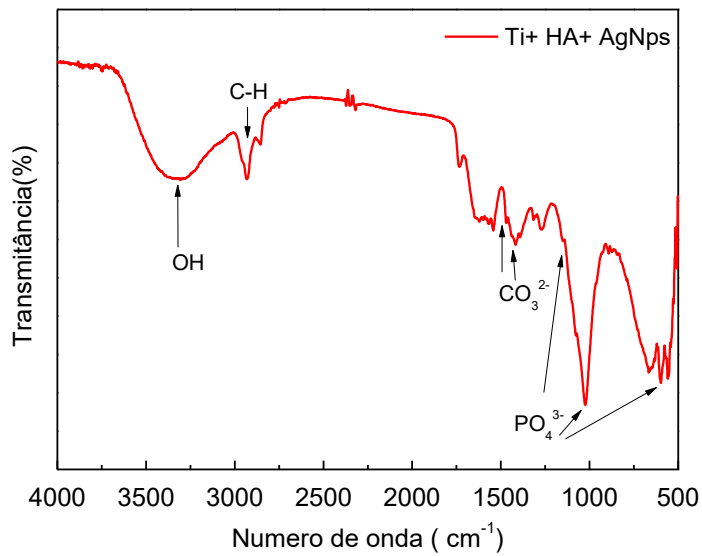
Figura 15 - Difratoograma de raios X da condição Ti+HA+AgNPs



Fonte: Autor.

A Figura 16 apresenta o FTIR para essa condição, e foi possível observar a partir do espectro bandas características ao grupo OH^- a 3437 cm^{-1} , do grupo CO_3^{2-} do tipo A em 1492 cm^{-1} , enquanto em 1406 cm^{-1} do tipo B, referente aos estiramentos assimétricos da ligação de carbono do grupo CO_3^{2-} do tipo B, indicando dessa forma a formação de apatitas. Os grupos PO_4^{3-} são identificados nas bandas situadas a 1140 e 1030 e 599 cm^{-1} (BULINA, 2017).

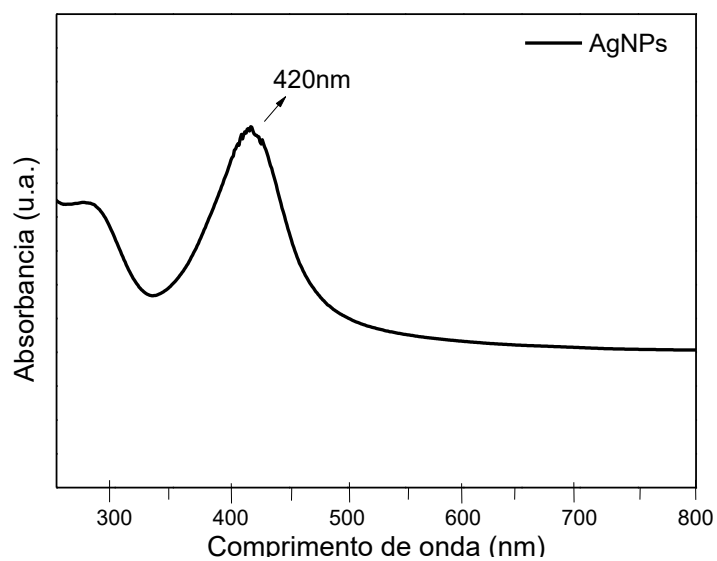
Figura 16 - Espectro de infravermelho da condição do Ti c.p + HA + AgNPs



Fonte: Autor

A Figura 17 apresenta o espectro de infravermelho da nanopartícula de prata, obtido a partir da solução, observa-se um pico de absorbância característico no comprimento de onda de banda da Ag em, aproximadamente, 420 nm.

Figura 17 - Espectro de absorbância no infravermelho de AgNPs



Fonte: Autor

4.3.3 Recobrimento com Apatita e dopagem com óleo essencial e poliestireno

As Figuras 18a e 18b mostram as micrografias da amostra Ti c.p. + HA + óleo + PS. Foi observada uma superfície heterogênea e porosa. A superfície heterogênea pode ser decorrente da evaporação de solventes orgânicos durante a preparação do filme.

Observa-se a formação de uma estrutura fragmentada com uma distribuição desigual do recobrimento, sendo que as regiões mais claras vistas nas imagens, provavelmente estejam relacionadas ao acúmulo de óleo (YANG, SONG, 2016).

As Figuras 18c e 18d mostram o EDS realizado nas regiões A e B, e foi observado a presença de carbono e oxigênio proveniente do polímero (PS), e os elementos cálcio e fósforo, indicando que houve a incorporação do filme de óleo com polímero sobre o Ti recoberto com hidroxiapatita.

Figura 18 - Micrografia obtida por MEV para a condição Ti c.p+ HA + óleo + PS

(continua)

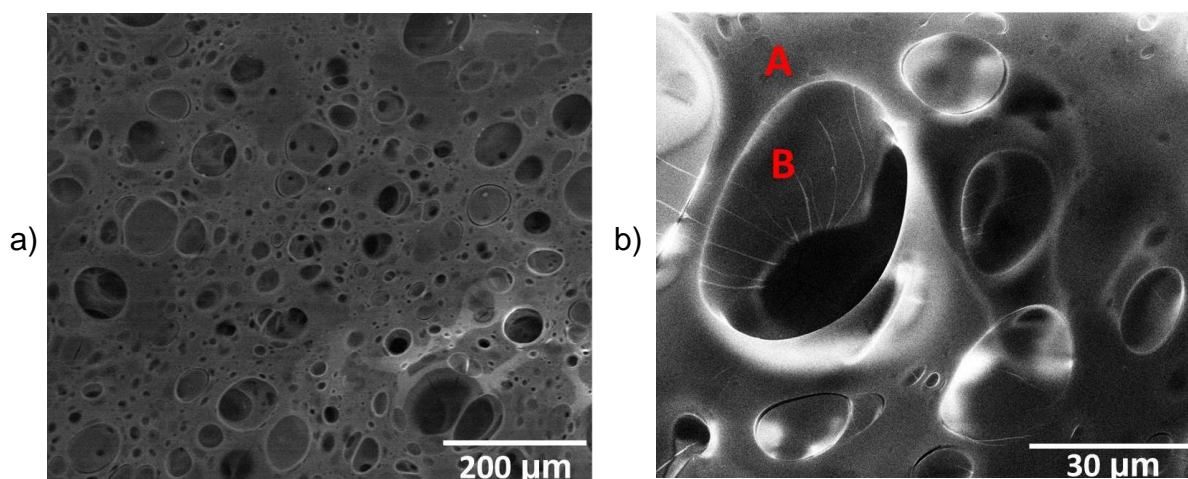
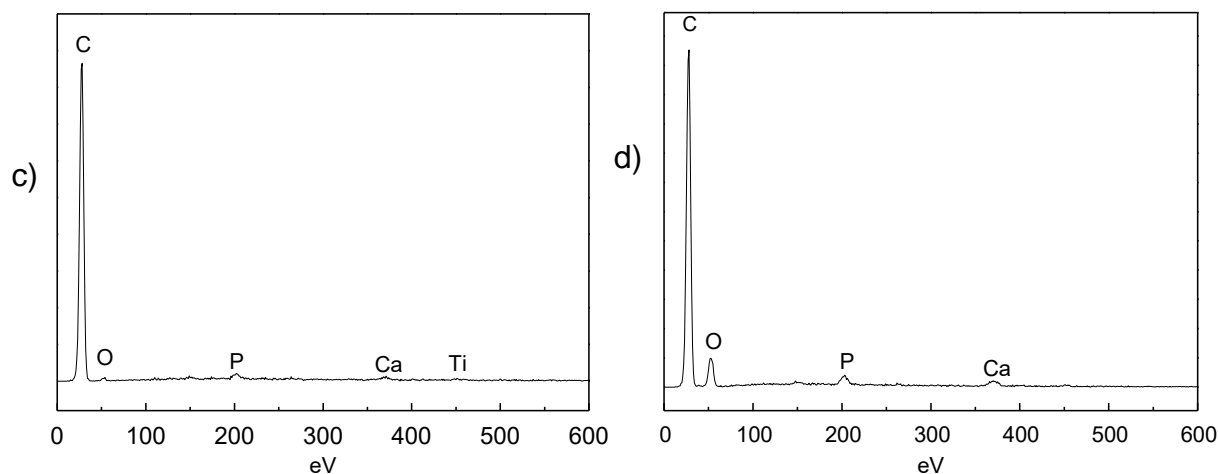


Figura 18 - Micrografia obtida por MEV para a condição Ti c.p+ HA + óleo + PS

(conclusão)



Fonte: Autor.

Legenda : (a) Vista geral.

(b) Em detalhes.

(c) Espectro obtido por EDS na região A.

(d) Espectro obtido por EDS na região B.

A Tabela 9 mostra os resultados da microanálise semi-quantitativa, por EDS, realizada nas regiões A e B, em que foi possível observar a presença dos elementos químicos presentes na estrutura das hidroxiapatitas como Ca, P e O.

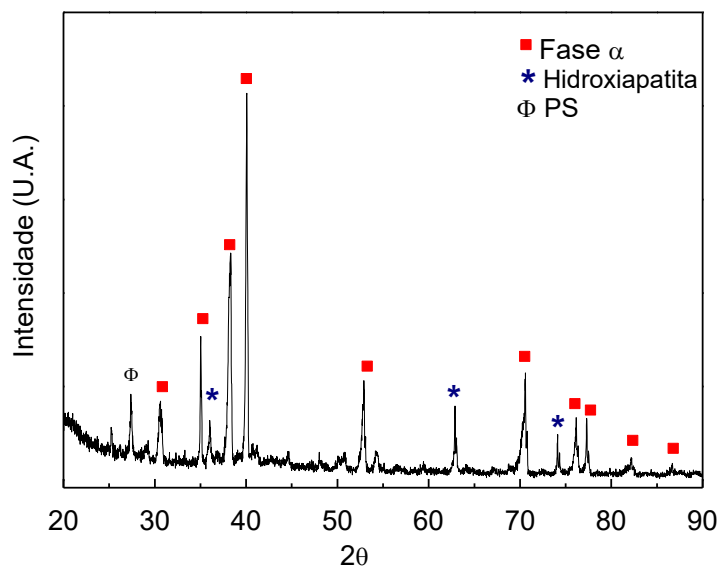
Tabela 11 - Microanálise semi quantitativa obtida por EDS.

Elemento	Região A		Região B	
	% Peso	% Atômica	% Peso	% Atômica
Carbono	76,43	81,97	90,18	93,92
Oxigênio	21,46	17,28	7,32	5,28
Fósforo	0,94	0,39	0,76	0,30
Cálcio	0,88	0,28	0,97	0,30
Titânio	0,29	0,08	0,77	0,20

Fonte: Autor.

A Figura 19 mostra o difratograma de raios X do substrato com recobrimento na condição Ti c.p+ HA + óleo + PS, e observou se picos de Ti, hidroxiapatita e um pico de baixa intensidade do poliestireno em $2\theta = 27,3^\circ$, (LOPES,2007).

Figura 19 - Difratograma de raios X da condição Ti + HA + óleo + PS



Fonte: Autor.

A Figura 20 apresenta o espectro de FTIR do óleo essencial de capim limão, do poliestireno (PS) e do Ti+ HA + óleo+ PS.

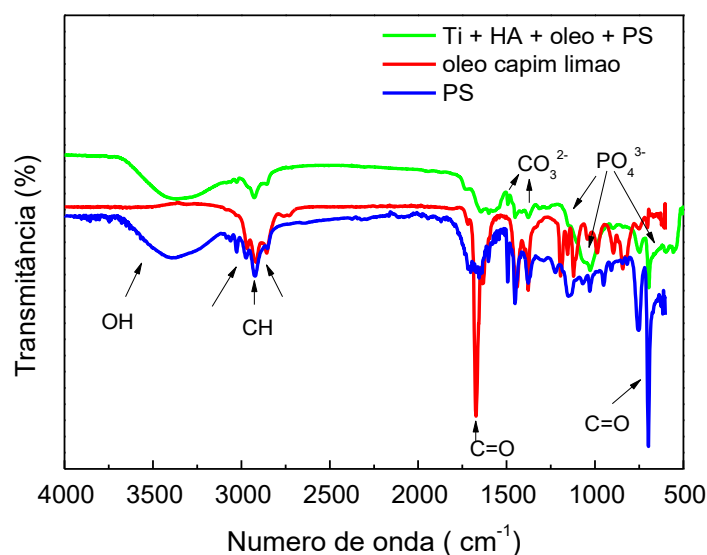
O espectro do óleo apresenta uma banda na forma de tripleto, entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} que pode ser atribuída a grupos metílicos (CH_3), metilênicos (CH_2) e metínicos (CH), confirmados pelo dubletos próximo a 1370 cm^{-1} , equivalente às deformações angulares do grupo. A banda intensa ocorre entre 1600 e 1700 cm^{-1} , característica da carbonila (C=O).

No espectro do poliestireno observa-se a presença do anel aromático corresponde ao mero do estireno e ocorre em bandas características em 1653 cm^{-1} (deformação axial de ligação carbono-carbono no anel), 746 cm^{-1} (deformação angular fora do plano de C-H do anel aromático), e a 697 cm^{-1} (deformação angular fora do plano do anel aromático (PEDROZA, MONTEIRO, TAVAREZ, 2008).

Já no espectro da condição Ti+ HA+ óleo + PS, observou-se as bandas características do grupo OH^- a 3394 cm^{-1} , do grupo CO_3^{2-} a 1498 cm^{-1} do tipo A e 1413 cm^{-1} do tipo B, referentes aos estiramentos assimétricos da ligação de carbono, indicando a atividade de apatitas. Os picos em 1142 e 1028 cm^{-1} são

referentes a vibração do grupo PO_4^{3-} , enquanto o pico em 681 cm^{-1} refere-se ao estiramento do grupo PO_4^{3-} .

Figura 20 - Espectro de infravermelho da amostra na condição Ti + HA+ óleo + PS, do óleo de capim limão e filme de poliestireno



Fonte: Autor.

4.4 ENSAIO DE BIOATIVIDADE

O ensaio de bioatividade descreve a capacidade de formação de apatitas sobre a superfície de implantes metálicos, em solução *SBF*, por um período de quatro semanas.

4.4.1 Amostra de Titânio sem recobrimento

No ensaio de bioatividade do Ti c.p. sem recobrimento, apresentados nas micrografias das figuras 21a a 21d, foi observado que no decorrer das semanas houve a formação de pequenos glóbulos compactos característicos de hidroxiapatita. Na primeira e segunda semana, ainda é possível observar a superfície do titânio e pequenos aglomerados de hidroxiapatita distribuídos sobre a superfície, identificados pelos elementos Ca, P e O, através do EDS, realizado na primeira semana, Figura 21e.

As Figuras 21c e 21d mostram as micrografias após os ensaios de bioatividade nas terceira e quarta semanas, respectivamente. Observa-se na quarta semana uma intensa formação de camada de HA na forma de glóbulos aglomerados, identificados pelo EDS (Figura 20f) realizado na região A da Figura 21d, a partir dos elevados teores dos elementos Ca, P e O, quando comparados com o EDS da primeira região, demonstrando que o Ti c.p. sem recobrimento, apresenta baixa bioatividade.

Figura 21 - Micrografia obtida por MEV e microanálise por EDS após o ensaio de bioatividade do Ti c.p. sem recobrimento

(continua)

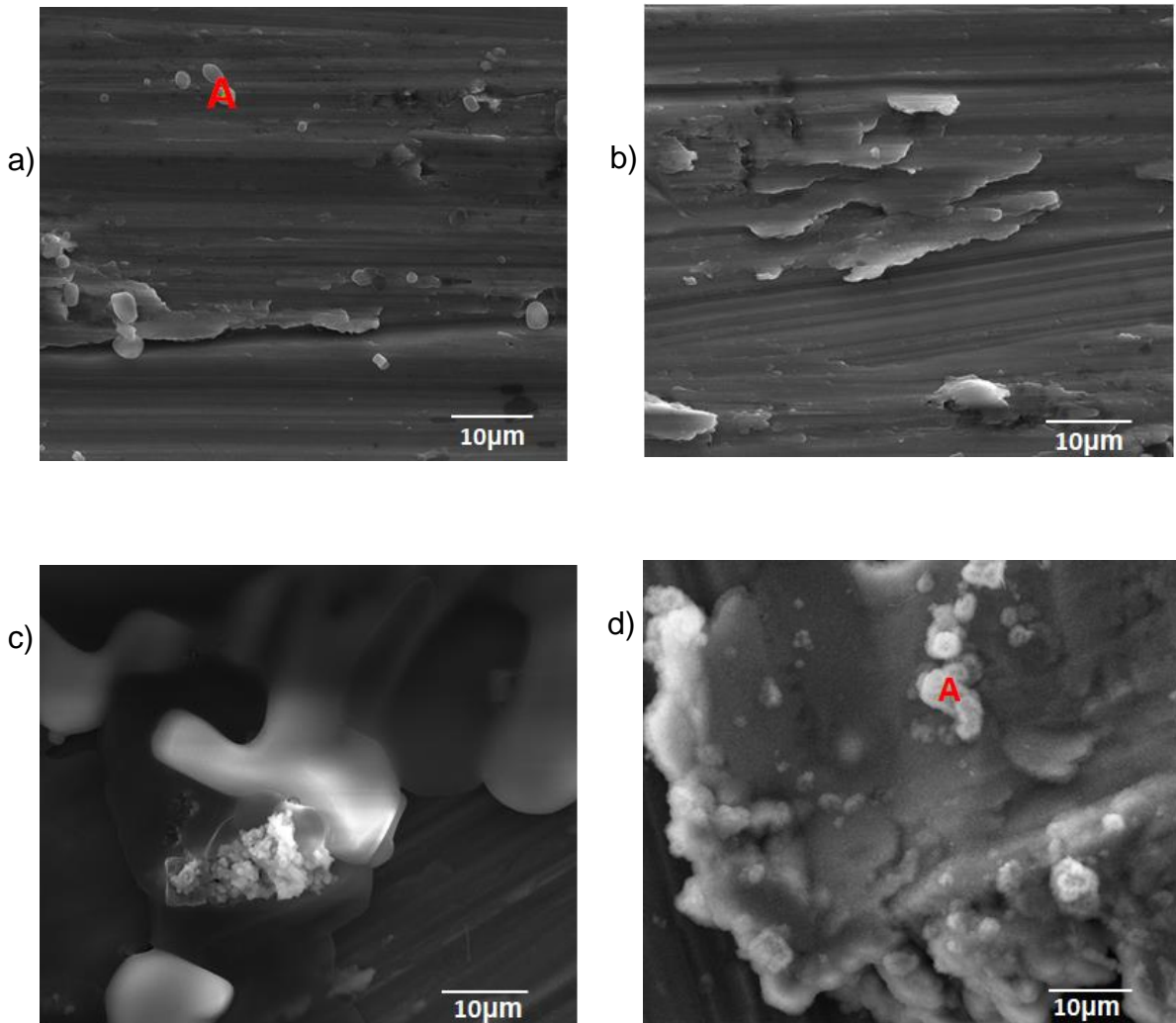
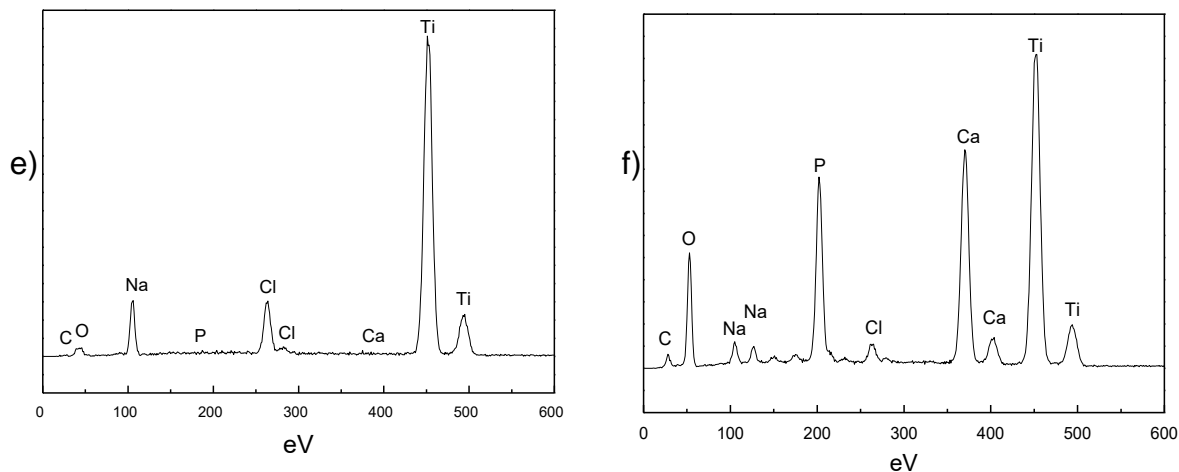


Figura 21 - Micrografia obtida por MEV e microanálise por EDS após o ensaio de bioatividade do Ti c.p. sem recobrimento

(conclusão)



Fonte: Autor.

- Legenda: (a) 1ªSemana;
 (b) 2ªSemana;
 (c) 3ªSemana;
 (d) 4ªSemana;
 (e) Microanálise por EDS-1ªSemana.
 (f) Microanálise por EDS- 2ª Semana.

A Tabela 10 apresenta os resultados da microanálise semi-quantitativa, por EDS, em que se observa a presença de Ca, P e O, presentes na estrutura da hidroxiapatita.

A presença de cloro pode ser proveniente do HCl (utilizado para preparar a solução de 1,5 SBF), o sódio pode ser decorrente do tratamento alcalino, ao qual as amostras são submetidas previamente ao recobrimento biomimético ou devido ao NaCl presente em grande quantidade na preparação da solução de 1,5 SBF.

Os elementos carbono e oxigênio aumentam no decorrer das semanas, pelo fato da hidroxiapatita permitir a substituição dos íons PO_4^{3-} pelo íon CO_3^{2-} .

Tabela 12 - Microanálise semi quantitativa para o Ti c.p. sem recobrimento por EDS

Elemento	EDS A – 1ª semana		EDS B – 4ª semana	
	% Peso	% Atômica	% Peso	% Atômica
Carbono	0,61	1,97	1,57	3,47
Oxigênio	1,36	3,29	31	51,53
Sódio	15,50	26,05	2,62	3,03
Cloro	7,03	7,66	1,23	0,92
Fósforo	0,25	0,31	1,23	0,92
Cálcio	0,20	0,19	15,77	10,46
Titânio	75,05	60,54	36,65	20,35

Fonte: Autor.

4.4.2 Amostra de Titânio recoberto com Hidroxiapatita

As Figuras 22 a 22f, mostram a superfície das amostras na condição Ti + HA, durante as quatro semanas do ensaio de bioatividade, bem como a análise semi quantitativa por EDS, para as regiões A e B identificados nas micrografias.

Figura 22 - Micrografias obtidas por MEV e microanálise por EDS do ensaio de bioatividade para a condição Ti+HA.

(continua)

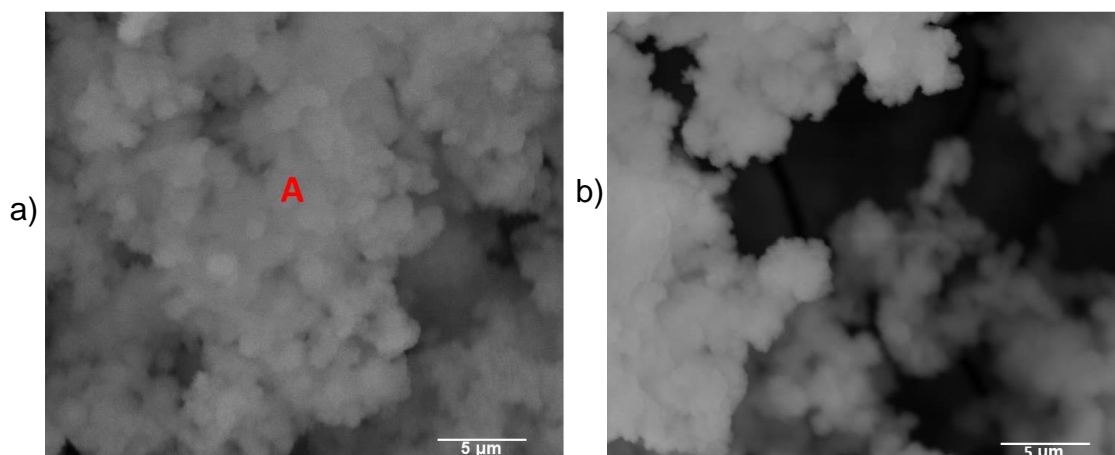
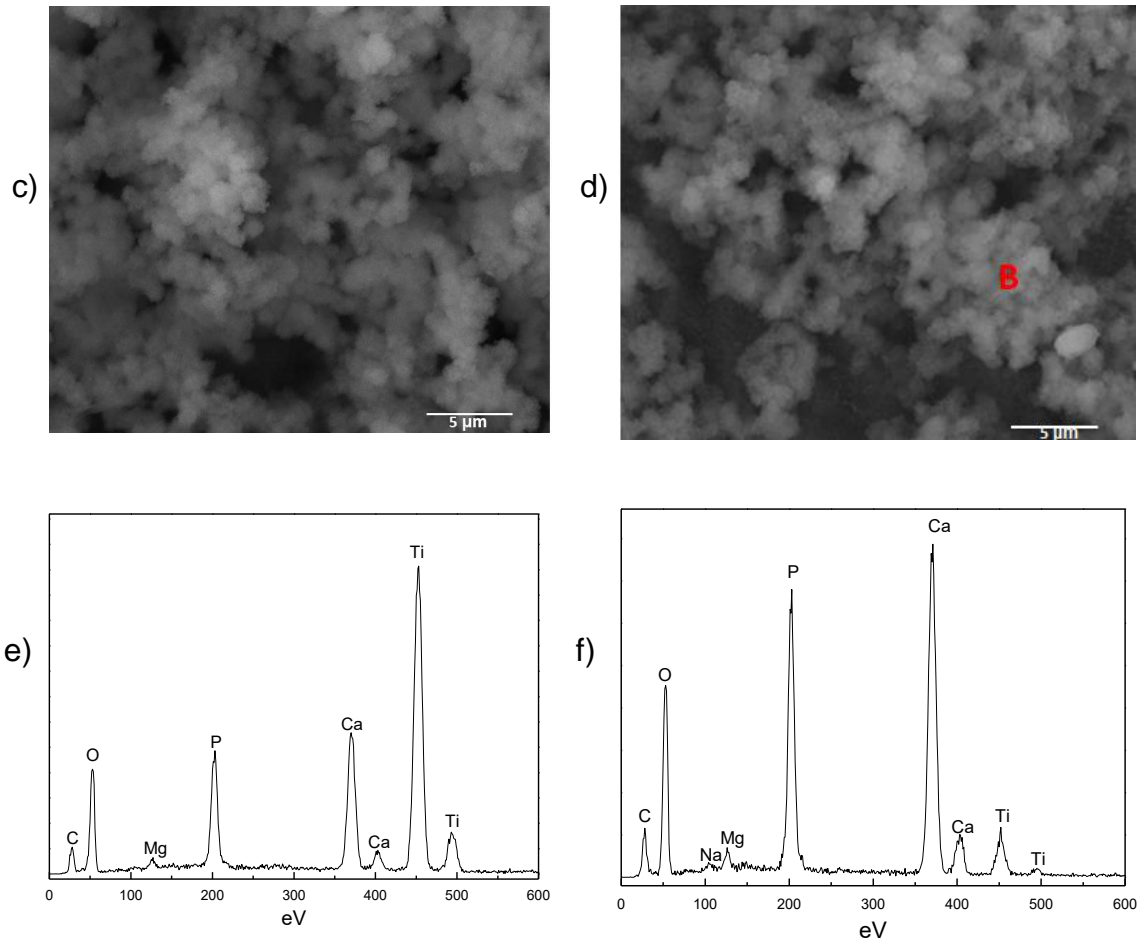


Figura 22 - Micrografias obtidas por MEV e microanálise por EDS do ensaio de bioatividade para a condição Ti+HA.

(conclusão)



Fonte: Autor

Legenda: (a) 1ªSemana;

(b) 2ªSemana;

(c) 3ªSemana;

(d) 4ªSemana;

(e) Microanálise por EDS-1ªSemana;

(f) Microanálise por EDS-4ªSemana.

A Tabela 11 mostra os resultados da microanálise semi-quantitativa por EDS, realizados na primeira e quarta semana, e foi possível observar a presença dos elementos Ca, P e O, presente na estrutura da hidroxiapatita, sendo que esses elementos tiveram suas % aumentadas na quarta semana, apresentando uma relação de Ca/P de 1,70, razão bem próxima da hidroxiapatita.

Tabela 13 - Microanálise semi quantitativa para a condição Ti + HA, por EDS

Elemento	EDS região A – 1ª semana		EDS região B – 4ª semana	
	% Peso	% Atômica	% Peso	% Atômica
Carbono	7,08	13,69	12,74	20,83
Oxigênio	39,24	56,97	46,52	57,07
Sódio	-	-	0,64	0,54
Magnésio	0,97	0,93	1,15	0,93
Fósforo	7,05	5,29	12,96	8,21
Cálcio	10,25	5,95	22,14	10,84
Titânio	35,39	17,16	3,86	1,58

Fonte: Autor.

Os resultados referentes as quatro semanas do ensaio demonstraram que houve a formação de uma grande quantidade de glóbulos de hidroxiapatita, e na primeira semana do ensaio de bioatividade foi possível observar a formação de uma camada sobreposta de HA.

No decorrer das semanas observou-se um acréscimo na formação de HA, isso sugere que o biomaterial nessa condição quando for implantado, facilitará a osseointegração (KOKUBO, 2004).

Na Figura 22d, referente a quarta semana de ensaio de bioatividade, observou-se os glóbulos da hidroxiapatita distribuídos homogeneamente sobre a superfície do titânio em camadas sobrepostas.

O aumento na quantidade de hidroxiapatita pode ser confirmado quando comparado os EDS da primeira e quarta semana, nas Figuras 22e e 22f, respectivamente, nas quais pode-se observar a presença dos elementos Ca, P e O, com maior intensidade na quarta semana.

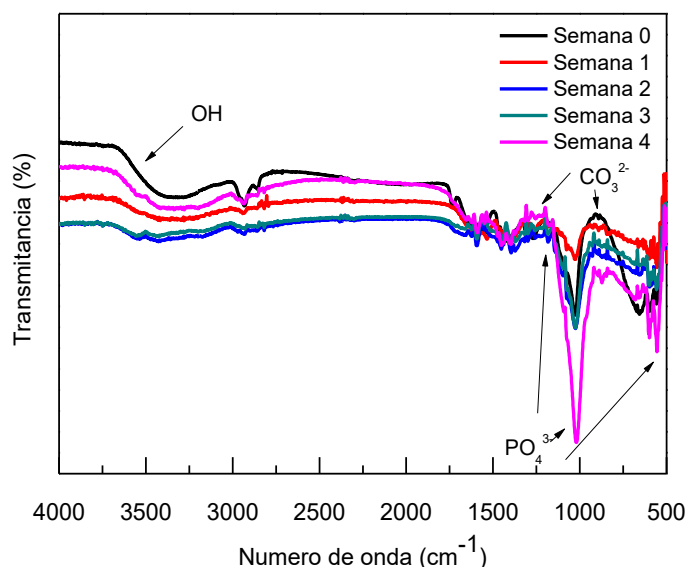
Os teores de sódio e magnésio presentes nas análises de EDS das Figuras 22d e 22e podem ser decorrentes do tratamento alcalino ou dos reagentes (NaCl e $MgCl_2 \cdot 6H_2O$), utilizados no recobrimento da hidroxiapatita.

A Figura 23 está apresentado o espectro de infravermelho (FTIR), do ensaio de bioatividade para as quatro semanas para a condição Ti c.p + HA e a semana zero (ensaio utilizado como controle), para comparar com as quatro semanas de ensaios.

É possível observar as bandas características do grupo PO_4^{3-} em 1114, 1176, 556 cm^{-1} , esta última referente à vibração da ligação assimétrica do fosfato, em 1490 cm^{-1} a banda referente ao estiramento grupo CO_3^{2-} do tipo A e em 904 cm^{-1} referente à vibração do grupo CO_3^{2-} do tipo B e em 3583 cm^{-1} vibração do grupo OH^- (BULINA, RICCI, 2017).

Estas bandas ocorrem nas quatro semanas, estando assim coerente com as Figuras de microscopia por MEV que evidenciam o aumento da hidroxiapatita no decorrer das semanas. No FTIR é possível observar que as bandas de PO_4^{3-} e de CO_3^{2-} foram mais intensas na quarta semana.

Figura 23 - Espectro de infravermelho do ensaio de bioatividade para a condição Ti c.p+HA



Fonte: Autor.

4.4.3 Amostra de Titânio recoberto com Hidroxiapatita e dopado com nanopartícula de prata

As Figuras 24a a 24d apresentam as micrografias obtidas por MEV, e as análises por EDS para a condição Ti + HA + AgNPs, e foi possível observar com maior evidência, as nanopartículas de prata (AgNPs), na quarta semana, isso pode ter ocorrido devido a transformação da estrutura da hidroxiapatita, que tem seus íons de Ca^{2+} substituídos pelos íons Ag^+ , o que justifica a maior quantidade de prata no decorrer das semanas, resultado também observado por VIEIRA, 2013.

Na análise por *EDS* observa-se a presença de Ag sobre as regiões de análise, bem como a presença de fósforo, cálcio e oxigênio referentes à formação da hidroxiapatita, já o carbono é evidenciado devido à quitosana utilizada no preparo da nanopartícula de prata e a presença do enxofre pode ser decorrente de contaminação superficial.

Na primeira semana é possível observar a formação de hidroxiapatita com um crescimento ao longo das semanas durante o ensaio de bioatividade.

Figura 24 - Micrografia obtida por MEV e microanálise por EDS do ensaio de bioatividade para a condição Ti+HA+ AgNPs

(continua)

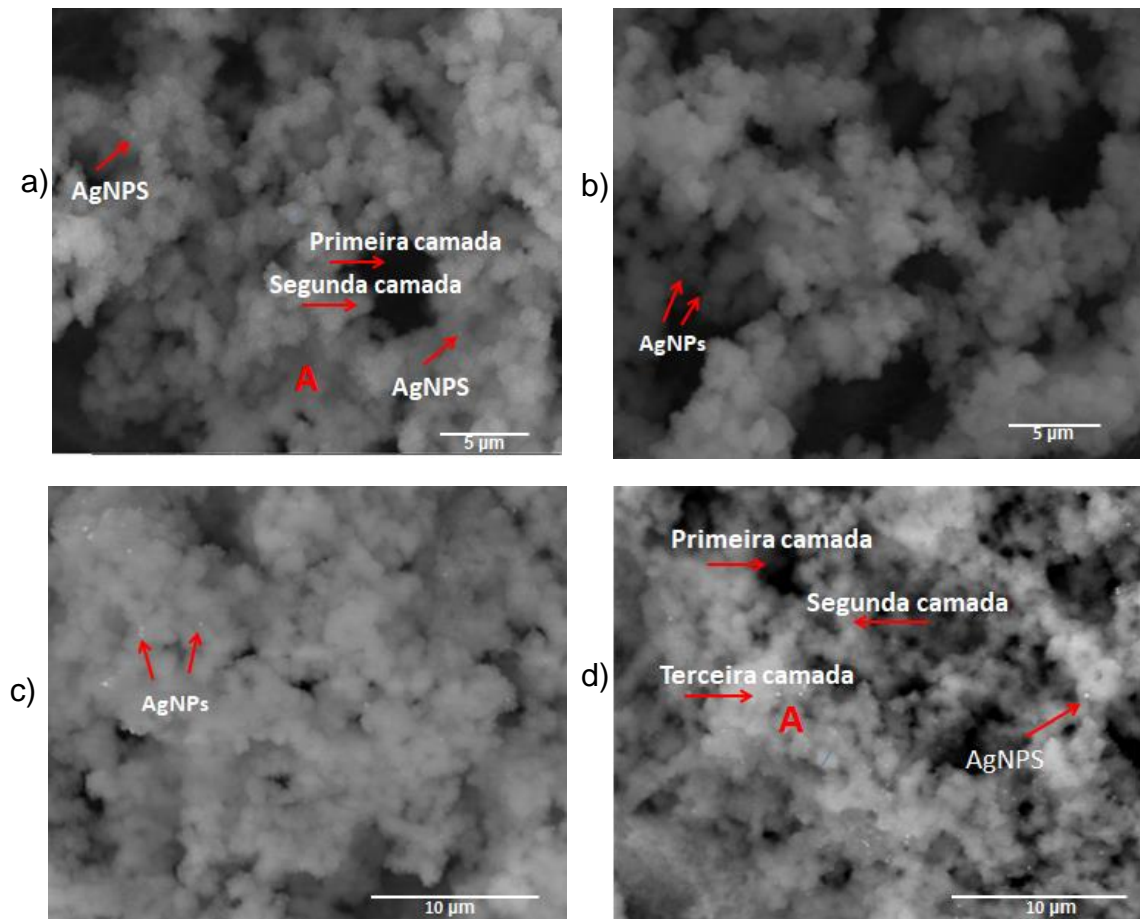
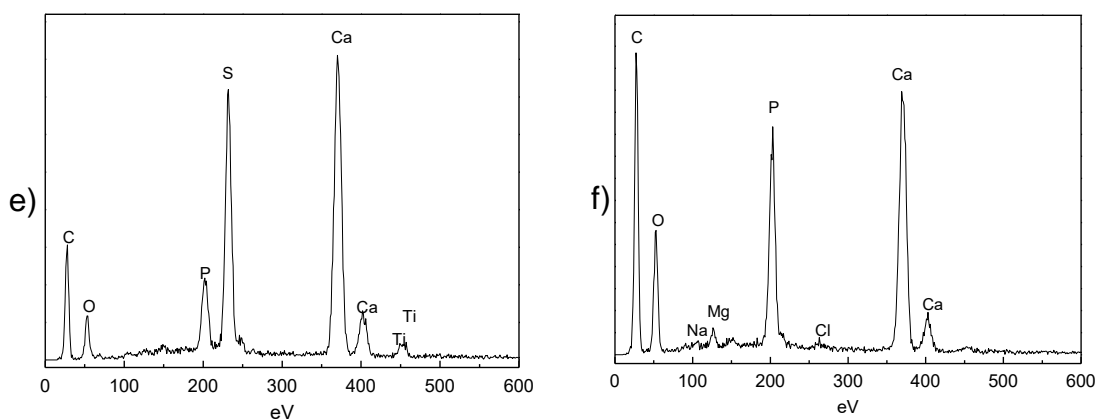


Figura 24 - Micrografia obtida por MEV e microanálise por EDS do ensaio de bioatividade para a condição Ti+HA+ AgNPs

(conclusão)



Fonte: Autor

- Legenda: (a) 1ªSemana;
 (b) 2ªSemana;
 (c) 3ªSemana;
 (d) 4ªSemana;
 (e) Microanálise por EDS-1ªSemana.
 (f) Microanálise por EDS- 2ª Semana.

De acordo com as concentrações apresentadas na Tabela 12, referentes à análise de *EDS*, nota-se a maior concentração dos elementos precursores das hidroxiapatita na 4ª semana condizentes com o MEV em que se observou pelas micrografias o aumento das camadas com o decorrer das semanas, e esse aumento facilitará a osseointegração do material.

Tabela 14 - Microanálise semi quantitativa para a condição Ti + HA + AgNPs por EDS

(continua)

Elemento	EDS região A – 1ª semana		EDS região A – 4ª semana	
	% Peso	% Atômica	% Peso	% Atômica
Carbono	9,68	19,37	15,04	26,18
Oxigênio	30,61	45,96	36,76	48,03
Fósforo	11,42	8,86	14,33	9,67
Prata	0,52	0,12	2,77	0,54
Cálcio	17,81	10,67	23,71	12,37

Tabela 14 – Microanálise semi quantitativa para a condição Ti + HA + AgNPs por EDS

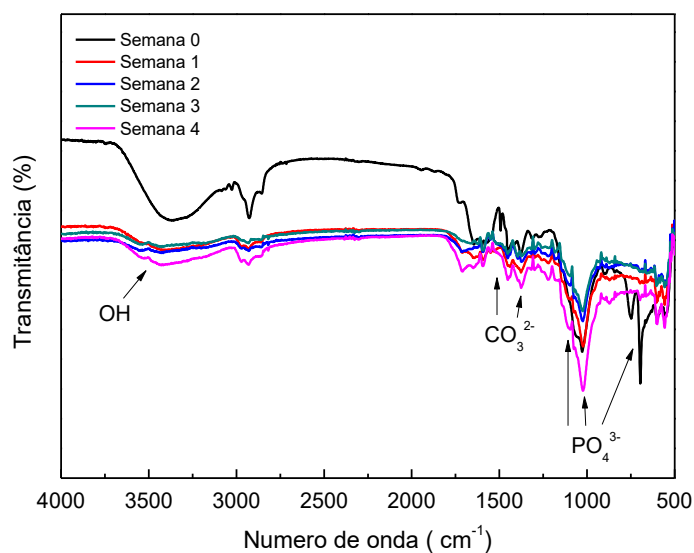
(conclusão)

Elemento	EDS região A – 1ª semana		EDS região A – 4ª semana	
	% Peso	% Atômica	% Peso	% Atômica
Titânio	29,97	15,03	7,38	3,22

Fonte: Autor.

A Figura 25 apresenta o espectro de infravermelho para o ensaio de bioatividade. É possível observar as bandas em 1014 e 1190 cm^{-1} referente à vibração do grupo PO_4^{3-} em 535 cm^{-1} ao estiramento do grupo PO_4^{3-} . Em 1345 cm^{-1} é verificado o estiramento do grupo CO_3^{2-} do tipo A, enquanto em 904 cm^{-1} corresponde a vibração do grupo CO_3^{2-} . A banda de vibração do grupo OH^- corresponde ao pico em 3697 cm^{-1} .

Figura 25 - Espectro de infravermelho do ensaio de bioatividade do Ti c.p.+HA +AgNPs



Fonte: Autor.

4.4.4 Amostra de Titânio recoberto com Hidroxiapatita e óleo incorporado em polímero

As Figuras 26a-26f, apresentam as micrografias obtidas por MEV e por EDS, nos ensaios de bioatividade, para a condição Ti c.p. +HA+ óleo + PS.

Na primeira semana, conforme mostra a Figura 26a, já se observa a formação de hidroxiapatita. As Figuras 26b e 26c, são referentes às segundas e terceiras semanas, respectivamente, e nota-se um aumento na formação dos glóbulos de hidroxiapatita.

Porém na quarta semana observa-se maior nitidez da sobreposição de camadas de hidroxiapatita, sendo possível verificar o aumento na quantidade dos glóbulos. A formação de hidroxiapatita sobre este recobrimento indica que o filme (óleo com o polímero) possui bioatividade.

Figura 26 - Micrografia obtida por MEV e microanálise por EDS do ensaio de bioatividade para a condição Ti+HA+ óleo+ PS

(continua)

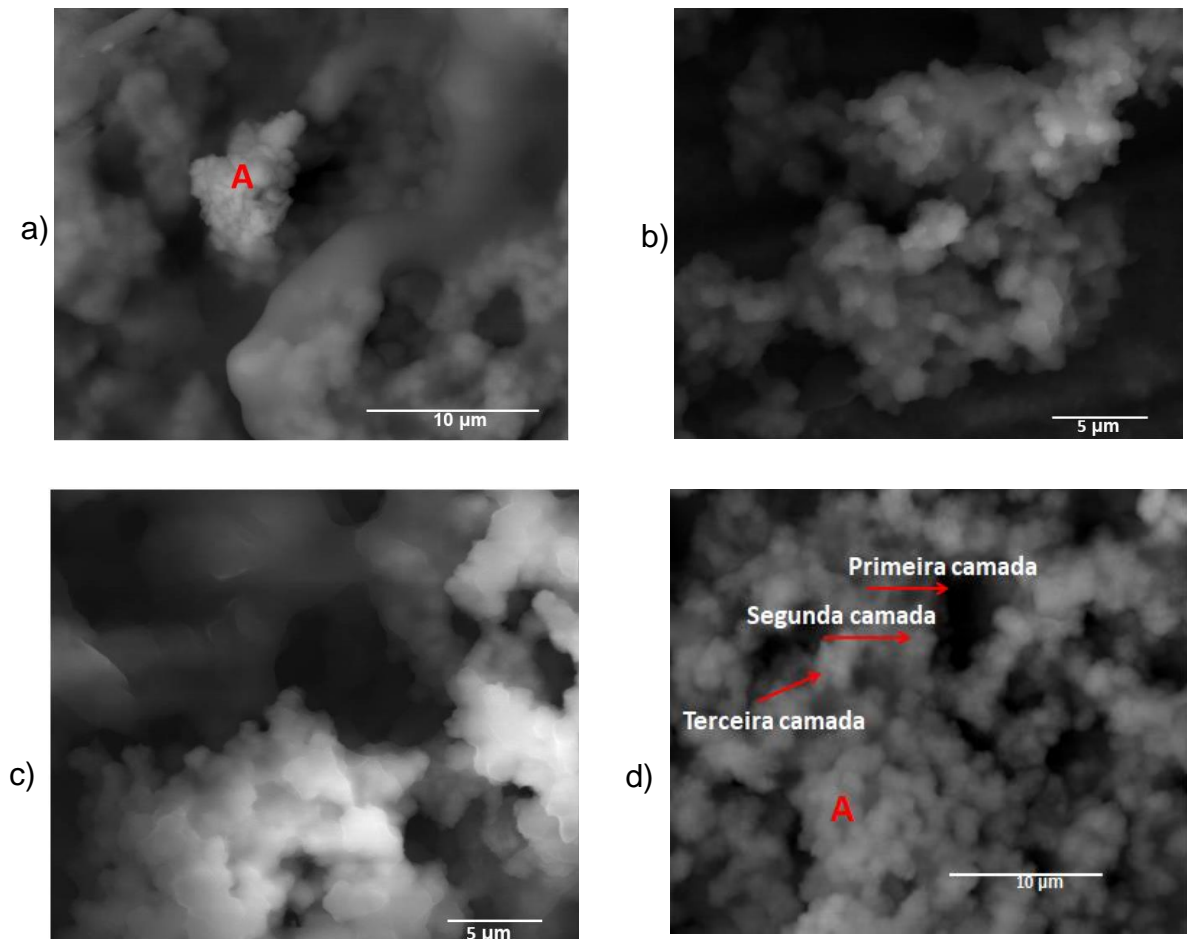
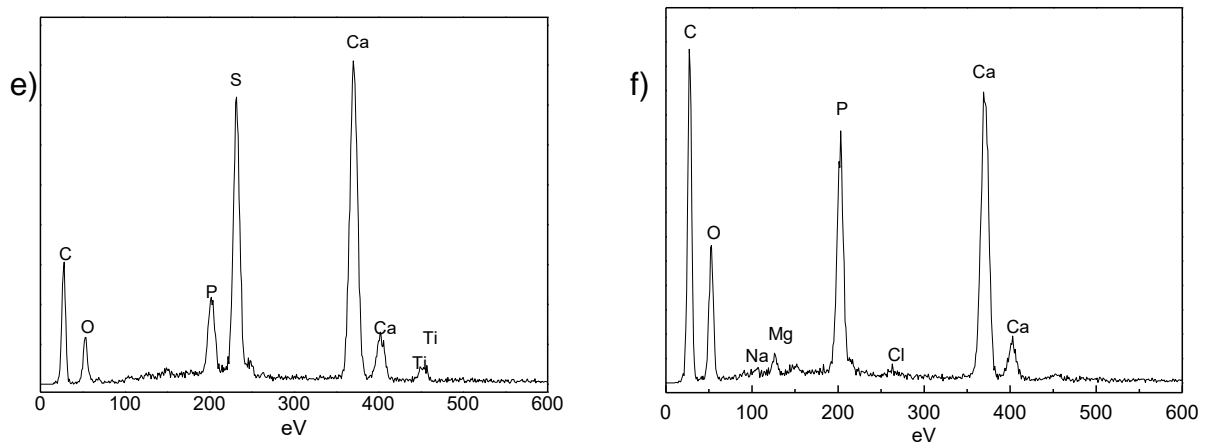


Figura 267 - Micrografia obtida por MEV e microanálise por EDS do ensaio de bioatividade para a condição Ti+HA+ óleo+ PS

(Conclusão)



Fonte: Autor

Legenda: (a) 1ªSemana;

(b) 2ªSemana;

(c) 3ªSemana;

(d) 4ªSemana;

(e) Microanálise por EDS-1ªSemana.

(f) Microanálise por EDS- 2ª Semana.

De acordo com as concentrações apresentadas na Tabela 13, referentes à análise de *EDS*, nota-se a presença dos elementos cálcio, fósforo e oxigênio presentes na estrutura da hidroxiapatita.

O carbono é o principal constituinte do óleo e do polímero e por isso os teores são elevados, já o sódio, o magnésio e o cloro são decorrentes dos reagentes utilizados no preparo da solução de SBF e o enxofre pode ser decorrente de contaminação superficial.

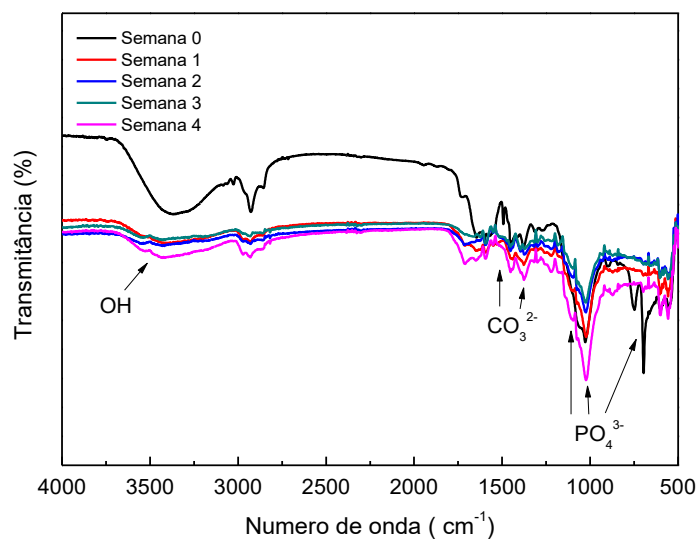
Tabela 15 - Microanálise semi quantitativa para a condição Ti + HA+ óleo+ PS por EDS

Elemento	EDS região A – 1ª semana		EDS região A – 4ª semana	
	% Peso	% Atômica	% Peso	% Atômica
Carbono	41,83	61,67	48,83	63,05
Oxigênio	16,29	18,02	27,31	26,47
Sódio	-	-	0,55	0,37
Magnésio	-	-	0,80	0,51
Fósforo	3,77	2,16	7,74	3,87
Enxofre	12,97	7,16	-	-
Cálcio	23,60	10,43	14,51	5,61
Cloro	-	-	0,26	0,11
Titânio	1,54	0,57	-	-

Fonte: Autor.

A Figura 27 mostra o espectro de infravermelho do ensaio de bioatividade, para a condição Ti c.p. + HA + óleo + PS. E foi possível observar as bandas em 1016 e 1088 cm^{-1} , referentes à vibração do grupo PO_4^{3-} em 589 cm^{-1} ao estiramento do grupo PO_4^{3-} . Em 1459 cm^{-1} foi verificado o estiramento do grupo CO_3^{2-} do tipo A, enquanto em 992 cm^{-1} corresponde a vibração do grupo CO_3^{2-} . A banda de vibração do grupo OH^- corresponde ao pico em 3509 cm^{-1} .

Figura 27 - Espectro de infravermelho do ensaio de bioatividade do Tic.p.+ HA + óleo + PS



Fonte: Autor.

4.5 ENSAIO DE CORROSÃO

4.5.1 Ensaio de Polarização em Solução corpórea

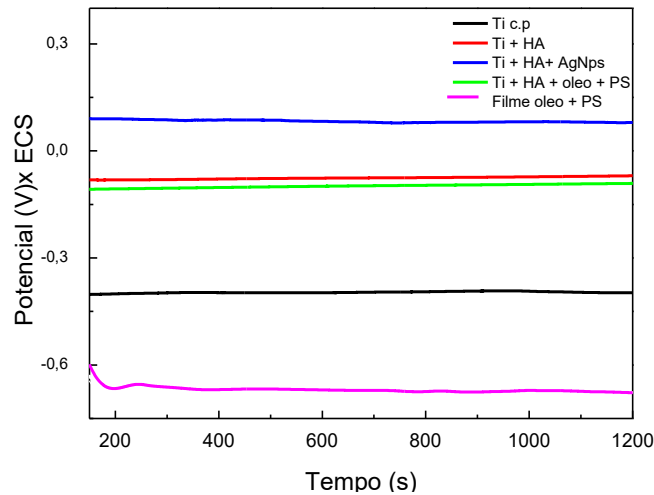
A Figura 28 apresenta as curvas do potencial de circuito aberto (PCA) das amostras nas condições: Ti c.p., Ti + HA; Ti + HA + AgNPs; Ti + HA + óleo + PS e do filme: óleo + PS, os ensaios foram realizados em solução 1,5 SBF, a temperatura de 36,5°C e pH 7,4.

A amostra do Ti c.p apresentou um pequeno aumento no potencial com o decorrer do tempo, indicando a formação da película passiva pela formação do óxido de titânio (TiO_2), na superfície, que tende a proteger o substrato.

Enquanto que o potencial dos substratos para as condições Ti + HA; Ti + HA + AgNPs e Ti + HA + óleo + PS, tenderam a permanecer constantes, indicando que o recobrimento foi estável e aderente à superfície, resultado semelhante foi encontrado por Sinha (2012).

A curva de potencial de circuito aberto para o filme: óleo+PS apresentou um comportamento de estabilização do filme, verificado pela tendência constante do potencial em função do tempo.

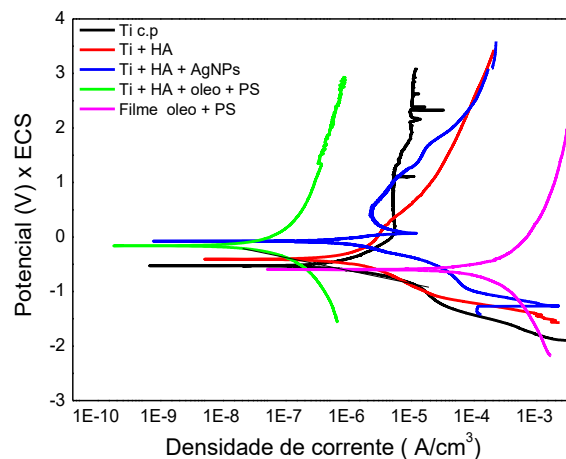
Figura 28 - Curvas de OCP para as amostras nas condições: Ti c.p., Ti+HA; Ti+HA+AgNPs e Ti+HA+óleo e filme: óleo + PS, em solução 1,5 SBF, temperatura de 36,5°C e pH 7,4



Fonte: Autor.

A Figura 29 mostra as curvas de polarização linear, das amostras nas condições: Ti c.p., Ti+HA; Ti+HA+AgNPs; Ti+HA+óleo + PS e do filme: óleo+PS, e através do método de extrapolação de Tafel, foi possível determinar os valores do potencial de corrosão (E_{corr}), a densidade de corrente de corrosão (I_{corr}) e a densidade de corrente passiva (I_{pass}), os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Figura 29 - Curvas de polarização linear para as amostras nas condições: Ti c.p., Ti+HA; Ti+HA+AgNP s e Ti+HA+óleo e filme: óleo + PS, em solução 1,5 SBF, temperatura de 36,5°C e pH 7,4



Fonte: Autor.

Tabela 16 - Parâmetros eletroquímicos para as amostras nas condições: Ti c.p., Ti+HA; Ti+HA+AgNPs e Ti+HA+óleo e filme: óleo + PS em solução 1,5 SBF, temperatura de 36,5°C e pH 7,4

Condição	E _{corr} (V)	I _{corr} (A/cm ²)	I _{pass} (A/cm ²)
Ti c.p.	-0,458 ± 0,032	1,176 E ⁻⁶ ± 2,913E ⁻⁷	1,572E ⁻⁵ ± 3,620E ⁻⁶
Ti + HÁ	-0,389 ± 0,036	1,618E ⁻⁶ ± 3,425E ⁻⁷	8,992E ⁻⁵ ± 1,762 E ⁻⁵
Ti + HA + AgNPs	-0,055 ± 0,059	3,700E ⁻⁶ ± 7,631E ⁻⁷	4,216 E ⁻⁵ ± 1,644E ⁻⁵
Ti + HA+ óleo+PS	-0,110 ± 0,044	5,921E ⁻⁸ ± 5,151E ⁻⁹	1,478 E ⁻⁶ ± 3,435 E ⁻⁷
Filme: óleo + PS	-0,553 ± 0,049	5,201E ⁻⁵ ± 1,872E ⁻⁶	1,484 E ⁻³ ± 2,869E ⁻⁴

E_{corr}=potencial de corrosão; I_{corr} =densidade de corrente de corrosão; I_{pass} = densidade de corrente de passivação.

Fonte: Autor.

Foi possível observar que a amostra na condição Ti c.p., há uma nítida região passiva, onde a densidade de corrente se manteve praticamente constante, enquanto os valores de potencial sofreram variação. Este comportamento indica a formação de um filme passivo (possivelmente óxido de titânio) na superfície do Ti cp. (I_{pass} = 1,572x10⁻⁵A/cm²).

Ocorreu uma quebra desse filme em torno do potencial 1,102 V e em seguida uma camada de óxido foi novamente formada, indicando que o óxido estava aderente e estável na superfície do Ti c.p.

Nas amostras com recobrimento nas condições: Ti+HA; Ti+HA+AgNPs e Ti+HA+ óleo + PS, não foi observada uma região passiva nítida, sugerindo que o recobrimento de hidroxiapatita, de AgNPs e de óleo foram aderentes na superfície do Ti c.p.

O potencial de corrosão (E_{corr}) para as condições: Ti+HA+AgNPs (-0,55mV) e Ti+HA+óleo+PS (-110mV), são maiores que o Ti cp (-0,458mV), Ti+HA (-0,389mV) e Filme: óleo +PS (-0,553mV). Isso indica que os recobrimentos propostos (HA+AgNPs e HA+óleo+PS) são mais estáveis e retardam o início do processo corrosivo, isso também foi observado por Sousa (2018) e Mariano (2009), em amostras de titânio grau 4.

A condição Ti c.p. + HA + AgNPs, apresentou o maior valor de potencial de corrosão (E_{corr}), mostrando que o recobrimento com nanopartículas de prata retarda

o início do processo de corrosão, em comparação as demais condições, resultado semelhante foi encontrado por Ricci, 2017, em titânio recoberto com hidroxiapatita e dopado com nitrato de prata e quitosana (Ti+HA+AgNO₃+Q), em meio de 1,5 SBF.

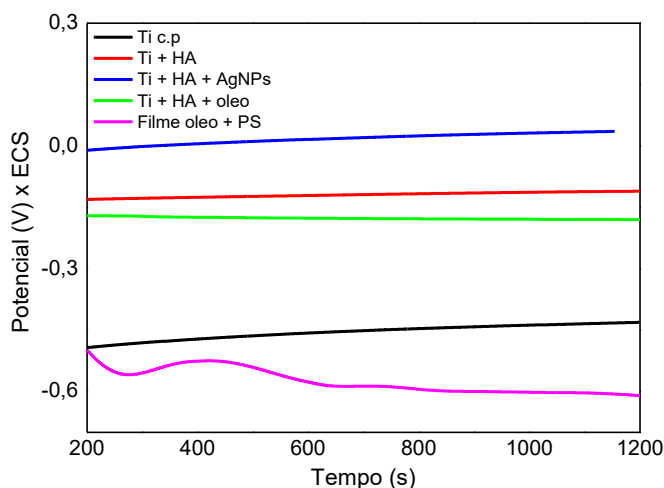
Observou-se ainda que a adição do filme (óleo+PS), na condição Ti+HA+óleo+PS, promoveu a diminuição da densidade de corrente de passivação, $I_{pass}=1,478 \times 10^{-6} \text{ A/cm}^2$, mostrando que o filme auxiliou na formação de um filme passivo, em valores menores ao que ocorre com o Ti c.p. ($I_{pass}=1,572 \times 10^{-5} \text{ A/cm}^2$).

4.5.2 Curvas de corrosão em meio de saliva sintética

As amostras nas condições: Ti c.p., Ti+HA; Ti+HA+AgNPs; Ti+HA+óleo+ PS e filme óleo + PS foram submetidas a ensaios de corrosão por polarização potenciodinâmica, em meio de saliva sintética, e através da Figura 30 foi possível observar o potencial de circuito aberto.

Em todas as condições estudadas foi possível observar um aumento do potencial com o tempo, indicando a formação de um filme passivo seguido de estabilização. Este filme tende a proteger o material, já que é mais estável que o metal puro, porém, devido a alta presença de cloreto, o filme de óleo + PS não se mostrou estável, isso porque os íons de cloreto são os principais responsáveis pela quebra do filme passivo e iniciação de sítios de corrosão localizada por pites.

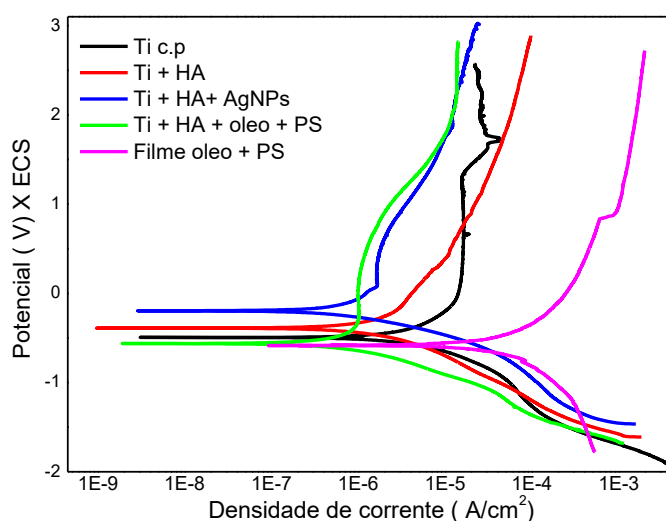
Figura 30 - Potencial de circuito aberto das amostras Ti c.p, Ti + HA; Ti + HA + AgNPs; Ti + HA + óleo + PS e filme: óleo + PS, em saliva artificial



Fonte: Autor.

A Figura 31 mostra as curvas de polarização potenciodinâmica linear das amostras: Ti c.p., Ti+HA; Ti+HA+AgNPs; Ti+HA+óleo + PS e filme: óleo + PS, em saliva artificial.

Figura 31 - Curvas de polarização nas amostras Ti cp, Ti+HA; Ti+HA+AgNPs; Ti+HA+óleo + PS e filme: óleo + PS, em saliva artificial, temperatura de 36,5°C e pH 6,0



Fonte: Autor

Tabela 17 - Parâmetros eletroquímicos para as amostras Ti c.p., Ti+HA; Ti+HA+AgNPs e Ti+HA+óleo + PS e filme: óleo + PS em saliva sintética

Condição	E_{corr} (V)	I_{corr} (A/cm ²)	I_{pass} (A/cm ²)
Ti c.p.	$-0,458 \pm 0,048$	$1,117 E^{-6} \pm 1,821E^{-7}$	$1,445E^{-5} \pm 1,463E^{-6}$
Ti + HÁ	$-0,389 \pm 0,093$	$1,627E^{-6} \pm 6,387E^{-7}$	$6,530E^{-5} \pm 3,752E^{-7}$
Ti + HA + AgNPs	$-0,123 \pm 0,022$	$4,285E^{-7} \pm 2,148E^{-8}$	$1,596 E^{-6} \pm 4,352E^{-7}$
Ti + HA+ óleo+PS	$-0,526 \pm 0,064$	$7,779E^{-7} \pm 2,893E^{-8}$	$9,856 E^{-7} \pm 1,243E^{-8}$
Filme:óleo + PS	$-0,576 \pm 0,081$	$3,841E^{-5} \pm 2,143E^{-6}$	$1,570 E^{-3} \pm 3,764E^{-4}$

Fonte: Autor.

A amostra Ti c.p.+ HA + AgNPs apresentou o maior valor de potencial de corrosão ($E_{corr} = -0,123 \text{ V}$), comparado as demais condições.

Não houve variação significativa da densidade de corrente de passivação (i_{pass}), para as condições Ti+HA+óleo+PS e Ti+HA+AgNPs, mostrando que tanto o filme quanto as AgNPs, e os valores de i_{pass} foram menores em relação as demais condições, indicando que a passivação acontece mais rapidamente nessas condições.

Também foi observada, uma nítida região passiva na amostra de Ti c.p, em que a densidade de corrente se manteve constante em uma larga faixa de valores de potenciais. Este comportamento indica a formação de um filme protetor, provavelmente o óxido de titânio que protege o material (ROBIN, 2008).

Semelhante ao meio de 1,5 SBF, o filme de óleo + PS apresentou um elevado valor de densidade de corrente de passivação ($1,570 \text{E}^{-3} \text{ A/cm}^2$), se comparada as demais condições, indicando que o recobrimento é mais estável que somente o filme.

A condição do Ti+HA+AgNPs, com nanopartículas de prata apresentou maior potencial de corrosão e baixa densidade de passivação, sugerindo que o recobrimento apresentou maior estabilidade e homogeneidade.

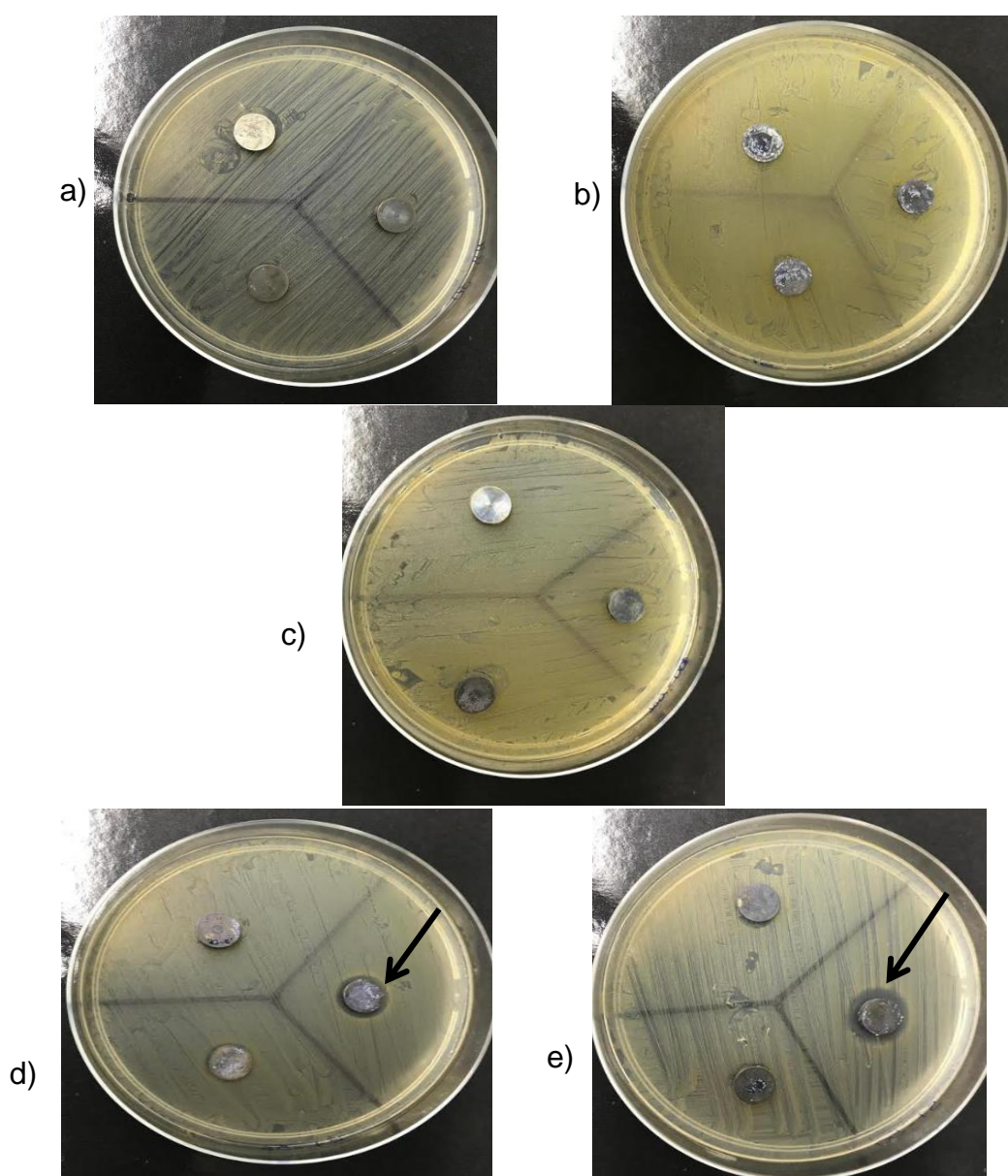
Quando comparamos os parâmetros eletroquímicos dos dois meios estudados, é possível observar que no meio 1,5 SBF as condições de Ti+HA+AgNPs e Ti+HA+óleo+PS apresentaram maiores valores de potencial de corrosão, $-0,055 \text{ V}$ e $-0,110 \text{ V}$, respectivamente, em relação ao meio de saliva sintética, $-0,123 \text{ V}$ e $-0,526 \text{ V}$, respectivamente, ou seja, em ambos revestimentos o processo corrosivo iniciará primeiro no meio de saliva sintética, isto porque a composição dessa solução, que tem como base para sua fabricação uma maior quantidade de substâncias químicas, principalmente sais que podem gerar um meio corrosivo mais agressivo.

Assim, a camada passiva pode, ser destruída por substância redutoras, polarização catódica ou íons muito eletronegativos, principalmente cloretos, que penetram na camada de óxido aumentando sua permeabilidade. A presença de cloreto pode levar à corrosão localizada pela destruição local da camada protetora.

4.6 ENSAIO DE CULTURA

Nas Figuras 32 (a, b, c, d, e) estão apresentadas os resultados do ensaio microbiológico usados no ensaio de halo de inibição com a bactéria *Staphylococcus aureus*, gram-positivo. E os resultados da atividade antibacteriana estão apresentados na Tabela 16, em função do halo de inibição indicados na seta, em mm.

Figura 32 - Ensaio antimicrobiológico com *Staphylococcus aureus*, gram-positivo, das amostras nas condições



Fonte: Autor.

Legenda: a) Ti c.p; b) Ti c.p+HA; c) Ti+ HA + Q; d) Ti c.p+HA+AgNPs; e) Ti c.p+HA+ PS+ óleo.

Nas Figuras 32a e 32b, para as condições Ti c.p e Ti c.p+HA, observou-se que não ocorreu a formação de halo, pois, estes materiais não possuem características bactericidas.

Na Figura 32c, (Ti+HA+Q), também não houve formação de halo apesar da quitosana apresentar atividade antimicrobiológica, isto pode ter ocorrido devido à baixa concentração utilizada, provavelmente não se atingiu a concentração mínima inibitória para a formação de halos.

O teste desta condição foi realizado para efeito comparativo, com a finalidade de provar que o efeito bactericida não ocorreria pela quitosana e sim pelos bactericidas utilizados no trabalho, a AgNPS e o óleo de capim limão

A Figura 32d, para a condição Ti c.p+HA+AgNPs, ocorreu a formação de halos de inibição de diâmetro médio de $9,667 \pm 0,667$ mm, circulares e crescentes ao redor dos discos, após 24 horas de incubação com as cepas bacterianas, isto ocorreu pelo fato das AgNPs possuírem carga positiva e quando em contato com as membranas celulares que possuem cargas negativas, os íons de prata aderem à superfície das membranas, causando eliminação total ou parcial das bactérias (HANSEN, THÜNEMANN, 2016).

Ricci, 2017 observou que à amostra de Ti cp+HA+AgNO₃ apresentou um halo com diâmetro médio de aproximadamente 0,9 cm, indicando que a prata possui ação bactericida contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Na Figura 32e, para a condição Ti c.p+ HA+óleo+PS, foi possível observar que o filme: óleo + PS, mostrou-se eficaz, contra as bactérias Gram positivas. Esses resultados corroboram com relatos anteriores que justificam maior susceptibilidade dessas bactérias devido à presença da membrana externa em suas células, que proporciona forte barreira aos óleos (AL-REZA *et al.*, 2010; BURT, 2004; CALSAMIGLIA *et al.*, 2007).

Tabela 18 - Resultados dos ensaios antimicrobiológico com *Staphylococcus aureus*, gram-positivo, via halo de inibição

Amostras-condição	halo de inibição (mm)
Ti c.p.	$9,007 \pm 0,067$
Ti + HÁ	$9,066 \pm 0,069$
Ti + HA + AgNPS	$9,667 \pm 0,667$
Ti + HA +óleo+OS	$11,000 \pm 2,00$
Ti + HA + Quitosana	$9,067 \pm 0,067$

Fonte: Autor.

5 CONCLUSÃO

A análise da micrografia e a difração de raios X mostrou que o Ti. c.p. apresenta uma estrutura predominantemente composta de fase α . Através do DSC verificou-se que a transformação de fase α/β ocorreu em aproximadamente 900 °C e em torno de 730 °C houve a formação do dióxido de titânio rutilico.

As etapas de tratamento alcalino e tratamento térmico se mostraram eficientes, visto que em todas as condições de recobrimento houve a formação da camada de hidroxiapatita confirmada pelo MEV e EDS. Observou-se também que a dopagem com AgNPs sobre a camada com HA, promoveu um recobrimento homogêneo diferente da dopagem com o óleo essencial+ PS que apresentou uma superfície heterogênea que pode ter sido causada pela evaporação de solventes orgânicos durante a preparação do filme.

O potencial de circuito aberto revelou um pequeno aumento do potencial em relação ao tempo do Ti. c.p, indicando a formação de uma película passivadora na superfície que tende a proteger o material em ambos meios corrosivos. Já em todas as outras condições foi possível concluir que as camadas se mostraram aderidas e estáveis no meio 1,5 SBF, pois permaneceram constantes. No meio de saliva sintética, isto não ocorreu, o que pode indicar que o recobrimento não mostrou grande estabilidade.

As curvas de polarização revelaram uma considerável melhora na resistência à corrosão após a dopagem com os bactericidas nos 2 meios, sendo que a amostra com óleo+ PS apresentou uma melhor atividade corrosiva no meio de 1,5 SBF, porém, em saliva sintética a amostra com nanopartícula de prata apresentou melhor resistência à corrosão.

Quando comparamos o parâmetro eletroquímico de corrosão, foi possível observar que a corrosão inicia primeiro em saliva sintética, tanto para a condição Ti+HA+AgNPs quanto para a Ti+HA+óleo+PS.

Em relação ao ensaio de cultura, como esperado, as amostras com nanopartícula de prata e com óleo essencial apresentaram atividade contra a *Staphylococcus aureus*, confirmado através da formação do halo de inibição formado somente nessas duas condições.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1- Realizar o recobrimento biomimético em outro material/ ligas metálicas.
- 2- Testar outros óleos.
- 3- Testar outros polímeros.
- 4- Realizar ensaio de adesão.
- 5- Realizar o teste de Cultura com outras bactérias e outros métodos (biofilme).
- 6- Avaliar outras técnicas de recobrimento de hidroxiapatita em implantes metálicos;

REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 1, n.4, p. 233-238, 1990.
- ABNT NBR ISO 23317. **Implantes para cirurgia: avaliação *in vitro* da capacidade de formação de apatita de materiais de implante**. Rio de Janeiro, RJ, 2013.
- ACTIS, L.; GAVIRIA, L.; GUDA, T.; ONG, L. J. Antimicrobial surfaces for crânio fácil implants: state of the art. **KAOMS**, v.29, n.2, p. 43-54, 2013.
- AGUAYO, S. et al. Nanoadhesion of Staphylococcus aureus onto Titanium Implant Surfaces. **Dental Research**, London, p. 1078-1084. out. 2015.
- ALKA J.; ASHA M.; HONGXIA W.; TUQUABO T.; CHENG Y. Mechanical, bactericidal and osteogenic behaviors of hydrothermally synthesized TiO₂ nano wire arrays. **Science Direct**, v.80, n.2, p. 311-319, 2018.
- APARECIDA, A. H. et al. Estudo da influência dos íons K⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻ e CO₃²⁻ na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP). **Química Nova**, v. 30, n.4, p. 892-896, 2007.
- ASTM Standard F67, 2006, **Standard Specification for Um alloyed Titanium, for Surgical Implant Applications (UNS R50250, UNS R50400, UNS R50550, UNS R50700)**. West Conshohocken : ASTM International, , PA, 2006.
- BASU, B; KATTI, D; KUMAR, A. **Advanced materials fundamentals** : processing and applications. New Jersey: Ed. A. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, 2009.
- BARRÈRE, F. et al. Biomimetic coatings on titanium: a Crystalgro with study of octacalcium phosphate, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, n.6, p. 529-534, 2001.
- BEST, S. M.; PORTER, E.S.; HUANG, J. Bioceramics: Past, presente and for the future: **Science Direct**, v. 28, p.1319-1327, 2008.
- BHARATI, S.; SINHA, M. K.; BASU, D. Hydroxyapatite coating by biomimetic method on titanium alloy using concentrated SBF. **Bulletin of Material Science**, v. 28, n. 6; p. 617-621, 2005.
- BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury**, v. 31, p. 37-47, 2000.
- BOSCHI, A. O; RIGO, E. C. S.; ZANIN, M. S. Recobrimento biomimético de hidroxiapatita com pré-tratamento álcali-térmico sobre aços inoxidáveis austeníticos, **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 23, n.2, p. 117-122, 2007.

BULINA, N. V. et al. Fast synthesis of La-substituted apatite by the dry mechano chemical method and analysis of its structure. **Journal of Solid State Chemistry**, v.252, n.1, p. 93-99, 2017.

CALLISTER, W. D. Jr., RETHWISH, D. G. **Ciência e Engenharia de Materiais: uma Introdução**. 8. ed. São Paulo: LTC, 2012.

CARRILO, M L.; CASTILLO, L N.; MAURICIO, R. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina. **Carrillo**, Huasteca Potosina, v. 22, n. 28, p.21-28, mar. 2011.

COELHO, M. F. C. **Recobrimento biomimético em superfícies de Titânio e aço inoxidável austenítico**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2013.

CONTIERI, R.J. **Recristalização e crescimento de grãos do titânio comercialmente puro: simulação computacional e análise experimental**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Unicamp, Campinas, 2009.

COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4, n. 3, p. 29-38, 2009.

CHOUDHURY, P.; AGRAWAL, D.C. Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrates; **Surface&Coatings Technology**, v. 206, n.4; p. 360-365; 2011.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**. Norma aprovada 3^a ed. Wayne, PA, CLSI document M31-A3, 2008.

DAVIS, J. R., Metallic Materials. **Hand book of Materials for Medical Devices** 2003, p. 14-14; 20-22.

DOROZHKIN, S. V.; Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p.1465-1485, 2010.

EISENBARTH E.,VELTEN D., MÜLLER M., THULL R. & BREME J., Biocompatibility of beta stabiliz in gel ements of titanium alloys. **Biomaterials**, vol.25, n.26, p. 5705-5713, 2004.

FERRARIS,S; SPRIANO,S. Antibacterial titaunium surfaces for medical implants. Review. **Materials Science and Engineering** , v. 61, n.1, p.965-978, 2016.

FERREIRA, C. F. **Obtenção de superfície super-hidrofóbica a partir de nanocompósitos de PS e EPS com nanopartículas de ZnO modificado**. 2016. 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Cefet-MG, Belo Horizonte, 2016.

FERREIRA, C. C., RICCI, V. P., SOUSA, L. L. de, MARIANO, N. A., & CAMPOS, M. G. N. Improvement of Titanium Corrosion Resistance by Coating with Poly-

Caprolactone and Poly-Caprolactone/Titanium Dioxide: Potential Application in Heart Valves. **Materials Research**, v. 20, p.126–133, 2018.

FIELDING, G., A.; ROY, M., BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 3144–3152, 2012.

FONTANA, M. G. **Corrosion engineering**. Singapore: Mc Graw-Hill Book Company, 1987.

FURKO, Monika et al. Development and characterization of silver and zinc doped bioceramic layer on metallic implant materials for orthopedic application. **Ceramics International**, Budapest, v. 2, n. 4, p.4924-4931, 2015.

GEMELLI, E. *et al.* Oxidation Kinetics of commercially Pure Titanium. **Revista Material**, v.12, 2007.

GUASTALDI, A, C.; APARECIDA, A, H. Fosfato de Cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Revista Química nova**, v. 33, n.6, p. 1352-1358, 2010.

HABIBOVIC, P. et. al. Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants; **Journal of the American Ceramic Society**; v. 85; n. 3; p. 517-22; 2002.

HARADA, Rino et al. Influence of sulfide concentration on the corrosion behavior of titanium in a simulated oral environment. **Materials Science And Engineering**, Tokyo, v. 4, n. 2, p.268-273, jan. 2016.

HENCH L. L. Bioceramics: theory and clinical application. *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 7, 1994, Turku. **PROCEEDINGS** [...]. Turku, 1994.

ROLANDO et al., Development of hydroxyapatite coatings by solution precursor plasma spray process and their microstructural characterization. **Science Direct**, v. 61, p. 39-49, 2017.

KARLOV, A. V.; SHAKHOV, V. P.; KOLOBOV, J. R. Definition of silver concentration in calcium phosphate coatings on titanium implants ensuring balancing of bactericidity and cytotoxicity. **Bioceramics**, v. 192-1, p.207-209, 2000.

KAWACHI, E. Y. et al. Bioceramics tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, p. 518-522, 2000.

KIM, S., K. **Chitina and chitosan derivatives**: advances in drug Discovery and developments. São Paulo: Ed. CRC, 2014.

KOKUBO, T.; KIM, H.; KAWASHITA, M. Bioactive metals: preparation and properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, p. 99-107, 2004.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. **Biomaterials**, v. 27, p. 2907-2915, 2006.

LAFRON, J. P.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D. Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ceramics with controlled composition. **Journal of the Europe Ceramic Society**, v.28, n. 1, p. 139-147, 2008.

LALUEZA, P.; MONZÓN, M.; ARRUEBO, M.; SANTAMARÍA, J. Bactericidal effects of diferente silver-containing materials. **Materials Research Bulletin**, v.46, p. 2070–2076, 2011.

LAZIC, Vet al. Antibacterial ability of supported silver nanoparticles by function alized hydroxyapatite with 5-aminosalicylic acid. **Vaccum**, Servia, v. 148, p 62-68, 2018.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 395, p. 81-98, 2002.

LEYENS, C; PETERS, M. **Titanium and titanium alloys: fundamentals and applications**. Ed. Wiley-VHC GmbH&Co. KGaA, 2003.

LOPES, N.C. **Síntese e caracterização do Compósito de poliestireno/grafite produzido através do processo de polimerização em suspensão *IN SITU***. Tese (Doutorado em engenharia química)- UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, 2007.

MARKOVIC, M., FOWLER, B. O. & TUNG, M. S. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. **J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol**, v.109, p. 553, 2004.

MARIANO N. A, OLIVEIRA R.G, FERNANDES M.A, RIGO E.C.S., Corrosion behavior of purê titanium in artificial saliva solution. **Matéria**. Rio de Janeiro, v.14, p.878-880, 2009.

MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. 1999. 105 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

MIYAJI, F. et al. Apatite formation on polymers by biomimetic process using sodium silicate solution. In: SEDEL, L.; REY, C. **Bioceramics**. Paris: Elsevier Science, 1997.v.10.

MURRAY, J. L., BENNET, L. H., BAKER, H. Binary Alloy Phase Diagrams. **American Society for Metals**, Ohio, v. 1.p. 173 – 176, 1986.

MURRAY, P.R. et al. Agentes antibacterianos. In: MURRAY, P.R. **Microbiologia médica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NAIK I, F, B.C, BHAT, J.A. On antibacterial activity of lemongrass (*cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. **J Trop Med, Asian Pac** , v.4, n.8, p. 535-5382, 2010.

NEVES, A. L. P. **Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana.** Tese (Doutorado em engenharia química) - UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, 2013.

Oréface, R. L.; Silva Junior, P.E. -Compósitos Bioativos Obtidos a Partir da Inserção de Vidro Bioativo em Matriz de Poli(Metacrilato de Metila). **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 11, n. 3, p. 109-115, 2001.

PAREDES, R. S. C. **Aspersão Térmica.** Apostila Curso Aspersão Térmica. UFPR, 1998. Curitiba. UFPR.

PAZ, A. et al. Obtención de recubrimientos de hidroxiapatita sobre titanio mediante el método biomimético. **Revista de Metalurgia**, v. 47, n. 2, p.138-146, 2011.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**. São Paulo, v.38, n.7, p.957-971, 2015.

PRIMO, J. O. **Estudo visando a obtenção de micropartículas e géis de quitosana para liberação controlada de substâncias bioativas.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

RACK H.J., QAZI J.I., "Titanium alloys for biomedical applications", **Materials Science and Engineering**; v. 26, p. 1269 – 1277, 2006

RUCKMAN. R, T. Lakshmi.,Lemongrass oil for improvement of oral health, Mini Review, **Dent Hypotheses**, v.4, 2013;

RAMESH BABU,N.*et al.* Antibacterial nano sized silver substituted hydroxyapatite: synthesis and characterization. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.80, p.581-591, 2007.

RAPHEL, J.; HOLODNIY, M.; GOODMAN, S., B.; HEILSHORN, S., C. Multi functional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. **Biomaterials**, v. 84, p. 301-314, 2016.

Ratner, B. D. Em **Biomaterials Science – Na Introduction to Materials in Medicine**; Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E.,eds; Elsevier: Oxford, 2013, cap. History of Biomaterials.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. Em **Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine**; Oxford, 2013, cap. Biomaterials Science: Na Evolving, Multidisciplinary Endeavor.

RESENDE, C. R. S. **Estudo de ligas bioabsorvíveis baseadas em Mg.** 2014. 159f. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2014.

REN, L., & YANG, K. Antibacterial design for metal implants. **Metallic Foam Bone**, v.10, p.203–216, 2017.

RICCI, P.V. **Caracterização do recobrimento biomimético de hidroxiapatita dopado com nitrato de prata recoberto com quitosana sobre substrato de titânio**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2017.

RIGO, E. C. S. *et al.* Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita, **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 15, n. 1-2, p. 21-29, 1999.

ROBERTS, C *et al.* Characterizing the Effect of the Staphylococcus aureus Virulence Factor Regulator, SarA, on Log-Phase mRNA Half-Lives. **Of Bacteriology**. Nebraska, v. 188, p. 2593-2603, 2006.

ROBIN, A. Corrosion behavior of Ti-xNb-13Zr alloys in Ringer's solution, **Materials and Corrosion**, v. 59, n. 12, p. 929-933, 2008.

SANTOS, S.L. **Obtenção e caracterização morfológica, estrutural, mecânica e de molhabilidade de nanotubos de tio2 para aplicação em biomateriais**. 2014, 81f (mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SANTOS, M.L. *et al.* Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **ECLETICA QUIMICA**, Araraquara, v.30, 3, p. 29-35, 2005.

SOUZA, A. R. *et al.* Medidas de potencial de circuito aberto: um experimento para o ensaio de Eletroquímica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32, 2009, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Química, 2009.

SOUSA L, RICCI V, PRADO D, Apolinario R, Vercik L, Rigo E *et al.* Titanium Coating with Hydroxyapatite and Chitosan Doped with Silver Nitrate. **Materials Research**, v.20, p. 863-868, 2018.

SOGIAS, I.A; WILLIAMS, A.C; KHUTORYANSKIY, V.V. Chitosan-based muco adhesive tablets for oral delivery of ibuprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 602-610, 2012.

SHERESTHA, S.; JOSHI, S. Current concepts in biomaterials in dental implant. **Science Research**, v.2, p. 7-12, 2014.

STEINEBRUNNER. L, WOLFART. S, BOSSMANN. K, KERN. M. In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of diferente implant systems. **Int J Oral Maxillo fac Implants**, v.20, n. 875-881, 2005 .

TIAN, B. *et al.* Fabrication of silver nanoparticle doped hydroxyapatite coatings with oriented block arrays for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity. **Science Direct**. Shanghai, v. 61, p. 345-359, 2016.

TORRISI, L.; FOTI, G. KeV ion sputtering of hydroxyapatite, **Applied Physics Letters**, v. 62, n. 3, p. 237, 1993.

VALLET- REGÍ, M; GONZÁLEZ-CALBET, M.J. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v.32, p. 1-31, July.2004.

VAZ, A. P. **Morfologia dos revestimentos de Titânio**. 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

VERCIK, L. C. *et al.* Recobrimento de Apatitas "in vitro" sobre Titânio-Influência do Tratamento Térmico, **Eclética química**, v. 28, n. 001, p. 25-31, 2003.

WANG, H.; ZHANG, R.; YUAN, Z.; SHU, X.; LIU, E.; HAN, Z. A comparative study of the corrosion performance of titanium (Ti), titanium nitride (TiN) titanium dioxide (TiO₂) and nitrogen-doped titanium oxides (N-TiO₂), as coatings for biomedical applications. **Ceramics International**, v.41, p. 1844-11851, 2015.

YETIM. T. Corrosion Behavior of Ag-doped TiO₂ Coatings on Commercially Pure Titanium in Simulated Body Fluid Solution. **Materials research**, v.13, p. 397- 405, 2016.

ZAVAGLIA, Cac; SILVA, Mh Prado da. **Biomaterials**. São Paulo e Rio de Janeiro :Elsevier Inc., 2016. 5p.

ZHENG, X.; WILKIE, C.A. Flame retardancy of polystyrene nanocomposites base on naolegomic organically-modified clay containing phosphate. **Polymer Degradation and Stability**, v.81, n.3, p.539-550, 2003.

WANG, Q.; ZANG, P., Z.; WEI, D., B.; WANG, R., N.; CHEN, X., H.; WANG, H., Y. Microstructure and corrosion resistance of purê titanium surfasse modified by double-glow plasma surfasse alloying. **Materials and Design**.v. 49, p. 1042–1047, 2013.

WELSCH, G. *et al.* **Materials propieties handbook: titanium alloys**. [SI]: ASM International, 1993.

APÊNDICE A – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

A – Trabalhos apresentados em Eventos Científicos

1-SOUSA, L. L.; **PRADO, D. G.**; FERREIRA, C. C.; RICCI, V. P.; FARIA, A.N.; MARQUES, R.F.C.; SILVA, Y.M.V.S.; PIAZZA, R.D.; MARIANO, N.A. Estudo da bioatividade da superfície do titânio para aplicação biomédica. In: **23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (Cbecimat)**, Foz do Iguaçu, PR, 2018.

2-**PRADO, D.G.**; COELHO, M.F.C.; SOUSA, L.L.; SILVA, Y.M.V.S.; RIGO, E.C.S.; MARIANO, N.A. Avaliação da bioatividade e da resistência á corrosão do aço AISI 316L recoberto com hidroxiapatita em solução de sbf. In: **23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (Cbecimat)**, Foz do Iguaçu, PR, 2018.

3-SOUSA, L.L.; FERREIRA, C.C.; **PRADO, D.G.**; RICCI, V.P.; MARQUES, R.F.C.; PIAZZA, R.D.; FARIA, A.N.; SILVA, Y.M.V.S.; MARIANO, N.A.;.Melhoria na biocompatibilidade de ligas metálicas para implantes. In: **23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (Cbecimat)**, Foz do Iguaçu, PR, 2018.

4-**PRADO, D.G.**; SOUSA, L.L.; OLIVEIRA, T.P.; FERREIRA, C.C.; SILVA, Y.M.V.S.; VERCIK, L.C.O.; RIGO, E.C.S.; MARIANO, N.A.;.Efeito da corrosão do ti c.p. recoberto com hidroxiapatita e nanopartículas de prata em enxaguante bucal. In: **23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (Cbecimat)**, Foz do Iguaçu, PR, 2018.

5- FERREIRA, C.C.; SOUSA, L.L.; RICCI, V.P.; **PRADO, D.G.**; FARIA, A.N.; RIGO, E.C.S.; BRUCHA, G.; MELO, M.S.F.; CAMPOS, M.G.N.; MARIANO, N.A.; Titânio recoberto biomimeticamente com hidroxiapatita, nitrato de prata e policaprolactona para aplicação em biomaterial. In: **23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (Cbecimat)**, Foz do Iguaçu, PR, 2018.

6- FERREIRA, C.C.; SOUSA, L.L.; **PRADO, D.G.**; RICCI, V.P.; VERCIK, L.C.O.; FARIA, A.N.; BRUCHA, G.; MELO, M.S.F.; CAMPOS, M.G.N.; MARIANO, N.A.;

Avaliação microbiológica do titânio recoberto com hidroxiapatita e quitosana para implantes. In: **23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (Cbecimat)**, Foz do Iguaçu, PR, 2018.

7-**PRADO, D. G.** ;SOUSA, L.L.; RICCI, V. P. ; FERREIRA, G. V. ; SANTOS, C. M. A. ; RIGO, E. C. S.; MARIANO, N. A.. Efeito da corrosão em solução de SBF no recobrimento de apatita e nitrato de prata. In: 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais- OBI, 2017, Maresias - SP. **Anais do 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, OBI**, Maresias – SP, 2017.

8-**PRADO, D. G.** ;SOUSA, L.L.; RICCI, V. P. ; FERREIRA, G. V. ; VERCIK, L. C. O. ; SANTOS, C. M. A. ; RIGO, E. C. S.; MARIANO, N. A.. Ti c.p. recoberto com hidroxiapatita e nanopartículas de prata. In: 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais- OBI, 2017, Maresias - SP. **Anais do 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, OBI**, Maresias – SP, 2017.

9-SOUSA, L.L.; RICCI, V. P. ;**PRADO, D. G.** ; FIORIN, B. O. ; SANTOS, C. M. A. ; RAMOS, A. S. ; RIGO, E. C. S.; MARIANO, N. A. . Crescimento da camada de apatita sobre titânio recoberto com nitrato de prata. In: 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - OBI, 2017, Maresias - SP. **Anais do 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, OBI**, Maresias – SP, 2017.

10- SOUSA, L. L.; **PRADO, D. G.**; COELHO, M. F. C.; RICCI, V. P.; FERREIRA, G. V. RIGO, E. C. S.; FERNANDES, M. C. S.;MARIANO, N. A.. Avaliação das propriedades bactericidas do recobrimento biomimético de HA dopado com AgNO₃. In: **22º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (Cbecimat)**, Natal, RN, 2016.

11-Prado, D. G.; COELHO, M. F. C.; NAKAMATSU, S.; RICCI, V. P.; MARIANO, N. A. Recobrimento de hidroxiapatita com nitrato de prata em titânio utilizado para implantes. I **Simpósio Integrado UNIFALMG**, Alfenas, MG, 2015.

B- Artigos publicados em periódicos

1-Sousa, Lucíola Lucena de; RICCI, VIRGILIO PEREIRA; **PRADO, DEBORAH GOUVEA** ; APOLINARIO, RAIRA CHEFER ; VERCIK, LUCI CRISTINA DE OLIVEIRA ; RIGO, ELIANA CRISTINA DA SILVA ; FERNANDES, MÉRILIN CRISTINA DOS SANTOS ; MARIANO, NEIDE APARECIDA . Titanium Coating with Hydroxyapatite and Chitosan Doped with Silver Nitrate. MATERIALS RESEARCH, v. 20, p. 1-6, 2018.

1-SOUSA, L.L.; **PRADO, D. G.**; COELHO, M. F. C. ; RICCI, V. P. ; FERREIRA, G. V. ; RIGO, E. C. S.; FERNANDES, M. C. S.; MARIANO, N. A.. Evaluation of the bactericidal properties of the biomimetic coating of HA doped with AgNO₃. Materials Science Forum, v 930, p. 362-367,2018.

D – Capítulo de livro

1-SILVA, Y. M. V. S. E. ;SOUSA, L.L.; **PRADO, D. G.**; COGO, F. D. . BIOMATERIAIS: APLICAÇÃO E IMPORTÂNCIA. PRINCÍPIOS BÁSICOS DE IDENTIFICAÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E INFORMATIZAÇÃO DE PRÁTICAS EDUCATIVAS. 01 ed.; 2018, v., p. 184-198.