

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

LUDMILLA MAGALHÃES SILVA

**BIOCOMPÓSITOS PIEZOELÉTRICOS A BASE DE PVDF E FOSFATO DE
CÁLCIO SOB ESTÍMULOS DE CAMPO ELÉTRICO E CAMPO MAGNÉTICO:
UMA PROPOSTA PARA ACELERAR A REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Maringá
2019

LUDMILLA MAGALHÃES SILVA

**BIOCOMPÓSITOS PIEZOELÉTRICOS A BASE DE PVDF E FOSFATO DE
CÁLCIO SOB ESTÍMULOS DE CAMPO ELÉTRICO E CAMPO MAGNÉTICO:
UMA PROPOSTA PARA ACELERAR A REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Tese apresentada à Universidade Estadual
de Maringá, como requisito parcial para a
obtenção do título de doutora.

Orientador: Valdirlei Fernandes Freitas
Coorientadora: Taiana Gabriela Moretti Bonadio

Maringá
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S586b Silva, Ludmilla Magalhães
Biocompósitos piezoelétricos a base de pvdf e fosfato de cálcio sob estímulos de campo elétrico e campo magnético: uma proposta para acelerar a regeneração óssea / Ludmilla Magalhães Silva. -- Maringá, 2019.
122 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Valdirlei Fernandes Freitas.
Coorientadora: Profa. Dra. Taiana Gabriela Moretti Bonadio.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2019.

1. Biocompósitos piezoelétricos. 2. Hidroxiapatita. 3. PVDF Poli(fluoreto de vinilideno). 4. fosfato de cálcio. 5. Magnetita. 6. Biomaterial. 7. Bioatividade. I. Freitas, Valdirlei Fernandes, orient. II. Bonadio, Taiana Gabriela Moretti, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.

CDD 23.ed.530.412

Elaine Cristina Soares Lira - CRB 1202/9

LUDMILLA MAGALHÃES SILVA

**BIOCOMPÓSITOS PIEZOELÉTRICOS A BASE DE PVDF E FOSFATO DE CÁLCIO
SOB ESTÍMULO DE CAMPO ELÉTRICO E CAMPO MAGNÉTICO: UMA
PROPOSTA PARA ACELERAR A REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Aprovado em: Maringá, 28 de fevereiro 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdirlei Fernandes Freitas
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Taiana Gabriela Moretti Bonadio
Universidade Estadual do Centro-Oeste - Guarapuava

Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil
Universidade Estadual do Centro-Oeste - Guarapuava

Prof. Dr. Willian Júnior do Nascimento
Universidade Federal do Paraná – Jandaia do Sul

Prof. Dr. Ivair Aparecido dos Santos
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand
Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho ao meu filho
*Luiz Henrique Magalhães de
Moraes* e ao meu esposo *Flávio
Gomes de Moraes*

AGRADECIMENTOS

É com o coração “apertado” que tento aqui externar o quanto sou grata as pessoas que contribuíram de modo direto ou indireto no decorrer da minha jornada de doutorado. Digo isso, pois finalizar ciclos me deprimem, mesmo com a alegria de ter mais uma conquista e é com essa mistura de emoções que eu agradeço....

Ao Prof. Dr. Valdirlei Fernandes Freitas pela oportunidade de um novo aprendizado, pelo incentivo no decorrer da orientação e pelo exemplo de profissionalismo, sempre tentando me compreender.

A Prof. Dra. Taiana G. Moretti Bonadio pela orientação e entusiasmo durante os experimentos, que com certeza fez a diferença.

Ao Prof. Dr. Ivair A. dos Santos pela confiança e pelo acolhimento no grupo GDDM.

Ao Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand pela disponibilidade, pela paciência, sempre trabalhando com bom humor, suavizando os imprevistos.

Ao Prof. Dr. Gustavo S. Dias por dividir um pouco do seu conhecimento, por chegar na maioria das vezes na hora certa com auxílios e por acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica pelo apoio no decorrer da pesquisa.

Aos amigos (Jaciele, Eduardo, Lívia, Guilherme, Odair, Adalto, João, Alaíne, Gilvan...) integrantes do Grupo de Desenvolvimento de Dispositivos Multifuncionais, pelo apoio, amizade e tolerância durante a realização da pesquisa.

A Msc Raquel D. Bini pela amizade, pela magnetita cedida e pelo conhecimento compartilhado.

A Msc e grande amiga Denise Alanis por estar sempre ao meu lado...

A Msc Adriane do Nascimento pela amizade e pelas análises de FTIR-ATR.

A secretária (o) da Pós-Graduação em Física (PFI) pela cordialidade e profissionalismo.

Aos amigos do Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP/UEM), pelas análises de MEV realizadas.

A CAPES pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A minha família por todo o amor, por serem os meus primeiros orientadores e financiadores de meus estudos.

Ao meu esposo Dr. Flávio Gomes de Moraes e ao meu filho Luiz Henrique Magalhães de Moraes pela compreensão, incentivo, companheirismo e paciência nos momentos em que tive que me ausentar em prol da pesquisa, em resumo por todo o amor.....

A Deus pela minha vida, pela minha família, pela minha saúde, pela oportunidade de mais uma conquista e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais.

Muito obrigada!

“Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado”
Isaac Newton

RESUMO

Há vários anos o desenvolvimento de novos biomateriais e técnicas vêm sendo amplamente incentivado, com o intuito de promover menor tempo de recuperação dos pacientes. O objetivo desta pesquisa foi produzir biocompósitos multifuncionais 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ para aplicações ortopédicas e analisar a influência da aplicação de campos elétrico e magnético alternados em amostras imersas em fluido corpóreo simulado (SBF). Foram realizadas análises de Difração de Raios X, Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier no modo Reflexão Total Atenuada, Magnometria de Amostra Vibrante, Caracterização Ferroelétrica e de Bioatividade. Em suma, os resultados obtidos indicaram que houve um crescimento acelerado de apatita, o qual ocorreu devido a ação do campo elétrico no compósito 60%HA β -40%PVDF que possui fase piezoelétrica, resposta ferroelétrica e bioatividade. Da mesma forma, os resultados indicaram um crescimento ósseo sintético acelerado, que ocorreu devido a ação do campo magnético no compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ que possui fase piezoelétrica, resposta magnética e bioatividade. Diante do exposto é evidente que o método de estimulação extrínseca utilizado neste trabalho bem como os biocompósitos produzidos, que podem ser ativados por campo elétrico e magnético, são inéditos.

Palavras-chave: Hidroxiapatita. PVDF. Magnetita. Biomaterial. Bioatividade.

ABSTRACT

For several years the development of new biomaterials and techniques have been widely encouraged, with the aim of promoting shorter patient recovery times. The objective of this research was to produce 60%HA β -40%PVDF and 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ multifunctional biocomposites for orthopedic applications and to analyze the influence of the application of alternating electric and magnetic fields on samples immersed in simulated body fluid (SBF). X Ray Diffraction, Scanning Electron Microscopy, Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the attenuated Total Reflection mode, Vibrating Sample Magnometry, Ferroelectric Characterization and Bioactivity performed. In short, the results indicated that there was an accelerated growth of apatite, which occurred due to the action of the electric field in the composite 60%HA β -40%PVDF that has piezoelectric phase, ferroelectric response and bioactivity. Likewise, the results indicated an accelerated synthetic bone growth, which occurred due to the action of the magnetic field in the 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ composite that has a piezoelectric phase, magnetic response and bioactivity. In view of the above, it is evident that the extrinsic stimulation method used in this work as well as the produced biocomposites, which can be activated by electric and magnetic field, are unprecedented.

Keywords: Hydroxyapatite. PVDF. Magnetite. Biomaterial. Bioactivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.2.1** - Célula unitária da estrutura cristalina da hidroxiapatita, construída no programa VESTA [39] com base na referência [40] 26
- Figura 2.2.2** - Célula unitária da estrutura cristalina do fosfato tricálcico fase β , construída no programa VESTA [39] com base na referência [43] 28
- Figura 2.3.1** - Célula unitária da estrutura cristalina da magnetita e os respectivos sítios de coordenação tetraédrico e octaédrico, construídos no programa VESTA [39] com base na referência [49] 30
- Figura 2.4.1** - Cristalização na forma de esferulito com destaque para a estrutura lamelar e a região amorfa, adaptada da referência [51] 31
- Figura 2.4.2** - Estrutura molecular do PVDF na fase β (a), α (b), γ (c) e δ (d) visto ao longo do eixo “c”. Esquema da conformação da cadeia em (e) α e δ , (f) γ e (g) β . As setas verdes indicam a orientação dos dipolos. As esferas cor ciano representam (Carbono), azuis o elemento (Hidrogênio) e vermelhas (Flúor), adaptada da referência [63] 33
- Figura 2.6.1** - Representação esquemática da conversão de energia do efeito piezoelétrico 35
- Figura 2.6.2** - Ilustração do efeito piezoelétrico na estrutura do quartzo, adaptada da referência [10] 36
- Figura 2.9.1** - Cura óssea: um desafio multifacetado, adaptada da referência [78] 39
- Figura 3.1.1** - Processo de sinterização: (a) antes de iniciar a sinterização, (b) estágio inicial formação de “pescoços”, (c) estágio intermediário aumento do tamanho dos “pescoços” e (d) estágio final fechamento progressivo dos poros. Figura retirada e adaptada da referência [103]. 43
- Figura 3.2.1** - Representação da Lei de Bragg com interferência construtiva, retirada da referência [106] 44

Figura 3.2.2 - Funcionamento do difratômetro de Raios X, adaptada da referência [107]	45
Figura 3.2.3 - Imagem ilustrativa de um difratograma de raios X de um sólido cristalino, retirada da referência [107]	45
Figura 3.3.1 - Princípio de funcionamento do MEV, adaptada da referência [111]	47
Figura 3.4.1 - Esquema da técnica de FTIR-ATR, adaptada da referência [69]	49
Figura 3.5.1 - Esquema de um magnetometro de amostra vibrante, adaptada da referência [114]	50
Figura 3.6.1 - Esquema de um circuito Sawyer-Tower, adaptado da referência [10].	51
Figura 4.1 - Fluxograma dos procedimentos experimentais	53
Figura 4.2.1 - Esquema do teste de bioatividade realizado por 7 dias com o (C.E. = 0 V/mm) e com (C.E. = 0,308 V/mm). Na ilustração, a amostra (a) em pastilha suspensa em SBF por uma presilha (b), ambos contidos em um tubo falcon (c) de 15 ml, grupo controle. Na parte experimental com campo elétrico, foi realizada em (h) solda dos fios de cobre, conectados a eletrodos de tinta prata (e) em faces opostas do tubo falcon (f) e encaixados dentro de um tubo falcon de 50 ml (g). As amostras com aplicação de campo elétrico, pastilha (d) também foram fixadas em presilhas (b) e imersas em SBF em tubos falcon de 15 ml (f) com aplicação de 0,308 V/mm em banho térmico (i) à temperatura de 36,5 °C.	57
Figura 4.2.2 - Esquema do teste de bioatividade realizado por 7 dias com (C.M. = 0 Oe) (sem influência externa) e com (C.M. = 6 Oe) (com aplicação de campo magnético alternado). Na ilustração, a amostra (a) é fixada por uma presilha (b), ambas ficam imersas no fluido corpóreo simulado em um tubo falcon (c) de 15 ml, grupo controle. Na parte experimental o campo magnético alternado foi aplicado por meio de uma bobina de fios de cobre (d), fixada no tubo falcon (e). Com o aparato experimental pronto e as amostras preparadas, foram colocadas em banho térmico (f) a 36,5 °C.	58

Figura 5.1.1 - Padrão de difração de raios X obtido para o precursor PVDF, compactado e sinterizado. Na parte superior da figura estão indicados os planos cristalográficos (hkl) referentes às fases cristalinas identificadas.....	61
Figura 5.1.2 - Difratoograma de raios X do precursor HA β , compactada e sinterizada. Acima dos picos identificados, são destacados os respectivos índices de Miller (hkl)	62
Figura 5.1.3 - Difratoograma de raios X da precursora magnetita. Acima dos picos são destacados os respectivos índices de Miller (hkl)	63
Figura 5.1.4 - Difratoograma de raios X do compósito 60% HA β -40% PVDF na forma de pastilha.....	64
Figura 5.1.5 - Difratoograma de raios X do compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe ₃ O ₄ na forma de pastilha	65
Figura 5.2.1.1 - Curva de magnetização versos campo magnético aplicado da precursora magnetita.	66
Figura 5.2.1.2 - Curva de magnetização versos campo magnético aplicado do compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe ₃ O ₄	67
Figura 5.2.2.1 - Curvas de polarização como função do campo elétrico aplicado, adquiridas com a frequência de 30 Hz, para HA β (a), PVDF (b) e o compósito 60% HA β -40% PVDF (c).....	69
Figura 5.3.1 - Análise de FTIR-ATR do precursor poli(fluoreto de vinilideno) em pó, em pastilha sinterizada e em filmes: filme 1, filme 2, filme 3 e filme 4....	71
Figura 5.3.2 - Espectro de absorção na região do infravermelho do precursor fosfato de cálcio bifásico..	74
Figura 5.3.3 - Espectro de absorção na região do infravermelho da precursora magnetita.....	75
Figura 5.4.1 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos compósitos 60% HA β -40% PVDF. Espectro (a) referente ao compósito que não foi imerso em SBF e espectros (b), (c), (d) e (e) são dos compósitos que foram imersos em SBF submetidos a diferentes condições.....	76

Figura 5.4.2 - 5.4.2: Micrografias de superfície das amostras de PVDF sinterizadas expostas a diferentes condições: (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF com (C.E. = 0 V/mm) e (c) amostra que foi imersa em SBF com (C.E. = 0,308 V/mm)..... 78

Figura 5.4.3 - Micrografias de superfície das amostras de HA β sinterizadas expostas a diferentes condições: (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF sem aplicação de campo elétrico e (c) amostra que foi imersa em SBF com aplicação de campo elétrico..... 81

Figura 5.4.4 - Micrografias de superfície das amostras 60%HA β -40%PVDF sinterizadas expostas a diferentes condições: (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF por 3 dias sem aplicação de campo elétrico e (c) amostra que foi imersa em SBF por 3 dias com aplicação de campo elétrico 81

Figura 5.4.5 - Micrografias de superfície das amostras 60%HA β -40%PVDF sinterizadas expostas a diferentes condições: (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias sem aplicação de campo elétrico e (c) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias com aplicação de campo elétrico 82

Figura 5.4.6 - Micrografias de fratura das amostras que foram imersas em SBF expostas a diferentes condições. Coluna das amostras que não receberam aplicação de campo elétrico, micrografias (a), (b), (c) e (d) e coluna das amostras com aplicação de campo elétrico, micrografias (e), (f), (g) e (h)... 86

Figura 5.5.1 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄. Espectro (a) referente ao compósito que não foi imerso em SBF e espectros (b), (c), (d) e (e) são dos compósitos que foram imersos em SBF submetidos a diferentes condições. 86

Figura 5.5.2 - Micrografias de superfície das amostras de PVDF sinterizadas expostas a diferentes condições. Em (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF sem aplicação de campo magnético e (c) amostra que foi imersa em SBF com aplicação de campo magnético. 87

Figura 5.5.3 - Micrografias de superfície das amostras de HA β sinterizadas expostas a diferentes condições. Em (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF sem aplicação de campo magnético e (c) amostra que foi imersa em SBF com aplicação de campo magnético. 88

Figura 5.5.4 - Micrografias de superfície dos compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ sinterizados sob diferentes condições. Em (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF por 3 dias sem aplicação de campo magnético e (c) amostra que foi imersa em SBF por 3 dias com aplicação de campo magnético..... 89

Figura 5.5.5 - Micrografias de superfície dos compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ sinterizados. Em (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias sem aplicação de campo magnético e (c) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias com aplicação de campo magnético..... 90

Figura 5.5.6 - Micrografias de fratura das amostras que foram imersas em SBF expostas a diferentes condições. Coluna das amostras que não receberam aplicação de campo magnético, micrografias (a), (b), (c) e (d) e coluna das amostras com aplicação de campo magnético, micrografias (e), (f), (g) e (h) 91

Figura 5.5.7 - Micrografias e EDS de superfície dos compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ que foram imersos em SBF por 3 dias. (a), (b), (c) e (d) são referentes a amostra sem aplicação de campo magnético. (e), (f), (g) e (h) são da amostra com aplicação de campo magnético..... 92

Figura 5.5.8 - Difratoograma de raios X com ângulo rasante, das amostras ternárias 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ que foram imersas em SBF por 3 dias: amostra sem aplicação de campo magnético (em roxo) e amostra com aplicação de campo magnético (em preto) 94

Figura 5.6.1 - Fluxograma esquemático dos fenômenos decorrentes no compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ durante o processo de bioatividade intensificada por campo magnético externo.)..... 94

Figura 5.6.2 - Fluxograma esquemático dos fenômenos decorrentes no compósito 60%HA β -40%PVDF durante o processo de bioatividade intensificada por campo elétrico externo. 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.2.1 - Diferentes substituições de íons realizadas na estrutura da hidroxiapatita e possíveis consequências dessas modificações [41], [42] e [29]	29
Tabela 2.7.1 - Comparação entre a concentração iônica do SBF e do plasma sanguíneo humano [72].....	39
Tabela 2.9.1 - Estudo de caso sobre estímulos e diferentes meios de promoção, para avaliar o crescimento ósseo.....	43
Tabela 4.1.1 - Diferentes configurações do banho térmico e da estufa, para a produção dos filmes 1, 2, 3 e 4 de poli(fluoreto de vinilideno).....	57
Tabela 5.3.1 - Percentual de fase β ($F_{\beta\%}$) do precursor poli(fluoreto de vinilideno) em pó e em pastilha sinterizada, calculada com base na equação (2.4.3).....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COMCAP	Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa
DMA	Dimetilacetamida
DMF	Dimetilformamida
DRX	Difração de Raios X
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy, em português Espectroscopia por Dispersão de Energia
Fe₃O₄	Magnetita
FTIR- ATR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier no modo Refletância Total Atenuada
G	Conformação Gauche
GDDM	Grupo de Desenvolvimento de Dispositivos Multifuncionais
HAβ	Fosfato de cálcio bifásico
HAp	Fase Hidroxiapatita
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICSD	<i>Inorganic Crystal Structure Database</i> , em português Banco de Dados de Estruturas Cristalinas Inorgânicas
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PA	Pureza Analítica
PCL	Poli(caprolactona)
PLLA	Ácido Polilático
PVA	Polivinil Álcool
PVDF	Poli(fluoreto de vinilideno)
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i> , em português Fluido Corpóreo Simulado
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Conformação Trans
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UV	Ultra Violeta
VSM	<i>Vibrating Sample Magnetometer</i> , em português Magnometria de Amostra Vibrante
β-TCP	Beta Fosfato Tricálcico

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Objetivos	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. Biomateriais.....	25
2.2. Fosfato de cálcio bifásico	28
2.3. Magnetita.....	32
2.4. Poli(fluoreto de vinilideno).....	33
2.5. Quantificação da fase β em amostras de poli(fluoreto de vinilideno)	37
2.6. Piezoelectricidade	38
2.7. Nucleação da camada de apatita em teste in vitro por fluido corpóreo simulado	40
2.8. Tecido ósseo.....	41
2.9. Estimulação extrínseca para o reparo ósseo	42
3. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	44
3.1. Sinterização	44
3.2. Difração de Raios X.....	45
3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	48
3.4. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier no modo Reflexão Total Atenuada	50
3.5. Magnometria de Amostra Vibrante	51
3.6. Caracterização ferroelétrica via circuito Sawyer-Tower	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1. Obtenção dos precursores e preparação das amostras em pastilhas	56
4.1.1. Preparação das amostras em filme de poli(fluoreto de vinilideno).....	57
4.2. Experimento in vitro	57
4.3. Difração de Raios X.....	60
4.4. Magnometria de Amostra Vibrante.....	61
4.5. Caracterização ferroelétrica via circuito Sawyer-Tower.....	61
4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	61
4.7. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier no modo Reflexão Total Atenuada	62
5. RESULTADOS	63
5.1. Difração de raios X.....	63
5.2. Caracterização magnética e elétrica	68
5.2.1. Magnometria de Amostra Vibrante	68
5.2.2. Comportamento ferroelétrico	69

5.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier no modo Reflexão Total Atenuada	71
5.4. Teste <i>in vitro</i> com aplicação de campo elétrico.....	77
5.5. Teste <i>in vitro</i> com aplicação de campo magnético	86
5.6. Discussão.....	97
6. CONCLUSÃO	100
6.1. Perspectivas.....	101
REFERÊNCIAS	103
<hr/> <hr/>	
APÊNDICE	114

1. INTRODUÇÃO

Desde as civilizações antecedentes a era cristã, o ser humano busca desenvolver diversas alternativas para a substituição ou reparo do tecido ósseo. Há relatos na literatura que povos da antiguidade utilizavam próteses produzidas com materiais rústicos [1]. Precisamente na segunda guerra mundial as próteses se tornaram mais elaboradas, porém ainda possuíam funcionalidade bastante limitada [2]. A limitação para os materiais utilizados em implantes ou enxertos ósseos se tornou menor, entretanto ainda não foi possível obter próteses com características físicas, químicas e biológicas que satisfaçam por completo as necessidades do corpo humano.

A necessidade de pesquisas para otimizar materiais para produção de próteses ortopédicas é uma questão de saúde pública. Foi divulgado no Portal Brasil um balanço feito pelo Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO) [3], onde foram realizadas 1.908 cirurgias de janeiro a abril de 2014, enquanto que no mesmo período de 2015 foram realizadas 3.289 cirurgias. Os dados revelaram que houve um aumento de 72% no número de procedimentos cirúrgicos realizados no instituto, considerado referência ortopédica do Sistema Único de Saúde (SUS). De acordo com o coordenador assistencial do (INTO) e vice-diretor geral da instituição, vinculado ao Ministério da Saúde, apesar da expansão no número de cirurgias ortopédicas ainda é possível equalizar entre a demanda e a oferta de atendimentos no instituto [3], porém não se sabe até quando. Em contrapartida, houve uma redução de doação no banco de tecidos ósseos do INTO, de janeiro até abril de 2014 foram registradas seis doações, enquanto que em 2015 no mesmo período foi registrada apenas uma doação [4]. Segundo o ortopedista chefe do banco de tecidos, um doador pode beneficiar até 30 pessoas, mas devido à resistência dos familiares em aceitar esse tipo de doação e a falta de conhecimento sobre os benefícios que essa atitude pode trazer para a qualidade de vida das pessoas doentes, o número de enxertos reduziu significativamente.

Outra questão que incentiva as pesquisas em biomateriais, é o fato da população brasileira estar envelhecendo em ritmo acelerado. De acordo com a projeção divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [5], o contingente de pessoas com idade superior a 65 anos deve aumentar progressivamente, sendo de

58,4 milhões em 2060, representando 26,7% da população brasileira. Este fato gera maior preocupação com as doenças relacionadas à velhice, em que ocorre redução progressiva da densidade óssea [6].

Perante essa conjuntura nacional, pesquisas visando o desenvolvimento de biomateriais são de extrema importância. Nesse caminho surgem os materiais bioativos, que são caracterizados pela osseointegração. A osseointegração é a capacidade do material ligar-se quimicamente ao osso por meio da formação de fosfato de cálcio, ou seja, ocorre aposição óssea sem a formação de uma cápsula colagenosa [7]. Os materiais sintéticos são os mais promissores para atender as necessidades dessa área. Além disso, na falta de um único biomaterial que possa suprir todas as exigências do tecido ósseo, como: propriedades mecânicas, térmicas e microestruturais. A comunidade científica tem como alternativa o desenvolvimento de biocompósitos sintéticos [8], projetados para serem utilizados na ampla área biológica, sendo caracterizados pela combinação das melhores características dos materiais que os compõem [9].

Dois candidatos promissores para aplicações ortopédicas são os biocompósitos multifuncionais ($\text{HA}\beta$ -PVDF- Fe_3O_4) e ($\text{HA}\beta$ -PVDF), produzidos com os precursores: fosfato de cálcio bifásico ($\text{HA}\beta$), poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) e magnetita (Fe_3O_4). O termo multifuncional se refere ao fato dos materiais possuírem duas ou mais propriedades em um único compósito que podem ser usadas em uma única aplicação[10]. O compósito ternário ($\text{HA}\beta$ -PVDF- Fe_3O_4) foi pensado para acoplar as propriedades magnéticas, piezoelétricas e de bioatividade para catalisar o processo de regeneração óssea sob excitação magnética externa. Enquanto que o biocompósito binário ($\text{HA}\beta$ -PVDF) foi combinado para agregar as propriedades piezoelétricas e de bioatividade, para acelerar o processo de regeneração óssea sob excitação elétrica externa.

De fato, o $\text{HA}\beta$ é composto pela fase de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e pela fase β - fosfato tricálcio ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), essa cerâmica é caracterizada por ser bioativa, apresentar maior semelhança com a hidroxiapatita mineral encontrada em ossos humanos do que a hidroxiapatita pura e também por ser mais reativa em meio fisiológico [11-13].

Por outro lado, o PVDF é um polímero biocompatível de fórmula $(-\text{H}_2\text{C}-\text{CF}_2-)_n$, com n sendo o número de repetições do monômero. Possui quatro fases

cristalinas (α , β , γ e δ), dentre essas a fase β é a mais desejada, por apresentar piezoelectricidade mais acentuada [14-16]. O efeito piezoelétrico é caracterizado pela capacidade que o material possui de converter energia elétrica em energia mecânica e vice-versa, efeito também é encontrado no tecido ósseo.

Por fim, a (Fe_3O_4) é um óxido de ferro caracterizado por ser ferrimagnético a temperatura ambiente [17, 18]. Além disso, a magnetita possui baixa toxicidade no corpo humano, podendo ser utilizada para diversos tratamentos como hipertermia, carreadores de drogas, separação magnética entre outros, [19, 20].

A procura por satisfazer as expectativas ortopédicas e ortodônticas em processos de enxerto, substituição e/ou regeneração óssea, levou ao desenvolvimento de materiais eficientes que possam acelerar o crescimento ósseo de modo significativo. Além disso, com esse propósito existem algumas pesquisas que utilizam diferentes métodos experimentais para obter uma boa formação óssea, como a aplicação de: tensão elétrica, campo magnético, estímulos mecânicos. Grande parte das pesquisas encontradas até o momento, utilizam de testes *in vitro* por meio de cultura de células ou de testes *in vivo* com animais cobaias, para verificar se houve a neoformação óssea [21, 22].

Neste trabalho foram realizados testes *in vitro*, mais especificamente com o fluido corpóreo simulado (SBF). Foram realizados dois tipos de testes em grupos de amostras diferentes: teste com aplicação de campo elétrico alternado e teste com aplicação de campo magnético alternado.

O fluido corpóreo simulado utilizado foi desenvolvido por Kokubo e colaboradores (2006) [23]. Trata-se de uma solução com composição iônica próxima à do plasma sanguíneo. Desse modo, torna-se possível analisar o comportamento das amostras sob estímulos externos, em um meio que simula parte das reações biológicas que ocorrem no corpo humano.

Optou-se por essa metodologia, pois existe uma gama de possibilidades, como por exemplo: variação de frequência, voltagem, tempo de aplicação de campo elétrico ou magnético. Sendo assim, mais viável que essas variáveis sejam testadas primeiramente *in vitro*. Desse modo, objetiva-se primeiro encontrar uma configuração experimental adequada de aplicação de campo elétrico ou magnético, que possa resultar

em um crescimento de apatita eficiente, para depois passar para a etapa com experimento *in vivo*, que será realizada em trabalhos futuros.

Neste trabalho foram analisadas as propriedades: estruturais, bioativas, magnéticas e elétricas dos precursores PVDF, HA β , Fe₃O₄ e dos compósitos 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄. Foram realizadas análises de difração de raios X (DRX), magnometria de amostra vibrante (VSM), caracterização ferroelétrica, bioatividade, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier no modo reflexão total atenuada (FTIR-ATR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O trabalho está organizado em seis capítulos estruturados da seguinte maneira: No capítulo 1 é realizada uma breve introdução do trabalho, contexto histórico, motivação e os objetivos da pesquisa a serem alcançados. Capítulo 2 é apresentada a fundamentação teórica necessária para a compreensão dos principais tópicos que serão abordados. No capítulo 3 “Técnicas experimentais” é apresentada uma abordagem sobre a teoria por trás das técnicas experimentais utilizadas nesta pesquisa, de forma sucinta. No capítulo 4 foram descritos os procedimentos realizados nas técnicas mencionadas anteriormente, de modo qualitativo e quantitativo, com o intuito de abordar o maior número possível de detalhes para a descrição e, até mesmo, reprodução dos mesmos. No capítulo 5 são apresentados os resultados, expondo as análises e discussões orientadas pela teoria envolvida na obtenção e caracterização das amostras. No capítulo 6 constam as conclusões finais relativas aos experimentos e as perspectivas com relação à pesquisa. Em sequência, são apresentadas as referências utilizadas durante todo o trabalho e por fim, consta um apêndice com informações sobre a patente e os artigos produzidos no decorrer do doutorado.

1.1. Objetivos

O objetivo geral da pesquisa é analisar a influência da aplicação de campos elétrico e magnético alternados em diferentes compósitos multifuncionais à base de PVDF e fosfato de cálcio, imersos em SBF.

Objetivos específicos são:

- Compactar e sinterizar amostras de PVDF, HA β e dos compósitos 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄;
- Analisar as amostras precursoras e os compósitos, por meio das técnicas de DRX, FTIR-ATR e MEV quanto à possível nucleação de apatita;
- Investigar a resposta magnética das amostras 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ antes da imersão em SBF e da magnetita por meio da técnica de VSM;
- Analisar a resposta ferroelétrica obtida por circuito Sawyer–Tower nas amostras de PVDF, HA β e do compósito 60%HA β -40%PVDF;
- Montar o aparato experimental para aplicação de campo elétrico alternado (**C.E.** = 0,308 V/mm) nas amostras de PVDF, HA β e dos compósitos 60%HA β -40%PVDF imersas em SBF;
- Montar o aparato experimental para aplicação de campo magnético alternado (**C.M.** = 6 Oe) nas amostras de PVDF, HA β e dos compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ imersas em SBF;
- Realizar teste de bioatividade *in vitro* nas amostras de PVDF, HA β e compósitos, pertencentes ao (grupo controle) sem influência externa e ao (grupo teste) com influência externa (com aplicação de campo elétrico ou campo magnético);
- Averiguar se os protocolos de estímulo externo influenciaram no comportamento das amostras, quando comparadas com o respectivo grupo controle.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomateriais

O termo biomaterial foi definido inicialmente pela conferência *European Society for Biomaterials* realizada em Chester-Inglaterra em março de 1986 [24]. Desde então, esse conceito foi redefinido para se adequar ao caráter interdisciplinar que envolve várias áreas do conhecimento e também para incluir novas substâncias. De acordo com Williams (2009) [25], os biomateriais são caracterizados como qualquer substância desenvolvida para ter uma forma que, de modo isolado ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle de interações como componentes do sistema vivo, o andamento de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico na medicina humana ou veterinária.

Os biomateriais podem ser de origem natural ou sintética e são classificados de acordo com os quatro grupos abaixo:

- ✓ Autógenos ou autólogos: são definidos quando o biomaterial implantado é de origem do próprio receptor. Os enxertos autógenos podem ser obtidos de diferentes regiões do corpo como: crista do osso ilíaco, calota craniana, tibia, costelas e mandíbula;
- ✓ Homólogos, homogêneos ou alógenos: são biomateriais definidos quando o receptor e o doador são da mesma espécie, são os casos de ossos liofilizados;
- ✓ Heterólogos, heterógenos ou xenógenos: ocorrem quando receptor e doador são de espécies diferentes como, por exemplo, o uso do osso bovino liofilizado empregado para enxerto em humanos na área da odontologia;
- ✓ Aloplásticos: são biomateriais modificados em laboratório, independente da origem ou do receptor como, por exemplo, o titânio.

Com relação à composição química, os biomateriais aloplásticos são divididos em: metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos.

- Os biomateriais metálicos são utilizados para implante de tecido ósseo, devido a capacidade de a prótese suportar cargas elevadas. Algumas das desvantagens de produzirem próteses metálicas estão relacionadas ao

efeito “tensão blindagem”, que pode vir a ocorrer em consequência da diferença entre o módulo elástico do tecido ósseo e o da prótese. Outro problema é o fato dos metais não apresentarem boa biocompatibilidade, como resposta a corrosão e a liberação de íons metálicos no organismo [26];

- Os biomateriais cerâmicos são muito utilizados na área médica por serem bioinertes, bioativos e/ou reabsorvíveis. Essas características possibilitam uma série de aplicações que abrangem: reparo e preenchimento de cavidades ósseas, recobrimento de implantes metálicos, liberação controlada de fármacos entre outros [27]. Entretanto as limitações das cerâmicas estão relacionadas à fragilidade: baixa resistência à tração (alongamento do corpo na linha de ação da carga) e baixa tenacidade (quantidade de carga que o material pode receber até ocasionar ruptura);
- Os biomateriais poliméricos são frequentemente utilizados na engenharia de tecidos, por serem biodegradáveis, de fácil fabricação e densidade relativamente baixa. A desvantagem é que alguns tipos de polímeros quando degradados no organismo podem causar efeitos deletérios, outro fator é que dependendo da região destinada o baixo valor do módulo elástico pode ser um agravante [28];
- Os biomateriais compósitos são caracterizados pela junção de dois ou mais materiais, com o intuito de obter um único compósito com propriedades superiores quando comparado aos componentes integrantes [2], [29]. Há vários estudos como de Bonfield e colaboradores (1981) [30], Fernandes (2009) [31], Rego (2012) [32] que consideram compósitos constituídos de cerâmica e polímero promissores na área de engenharia de tecidos. Isso ocorre de modo geral, devido às propriedades de biocompatibilidade, bioatividade das cerâmicas e propriedades mecânicas dos polímeros.

Após a inserção dos biomateriais em meio biológico é possível classificá-los de acordo com a interação entre a prótese e o tecido adjacente em: bioinerte, reabsorvível ou bioativo.

- ❖ Os materiais bioinertes ou quase inertes são caracterizados por possuírem boa estabilidade, podendo ocorrer a formação de um tecido fibroso

adjacente a prótese [33]. Quanto mais espessa for a camada de tecido formada, maior será a possibilidade de ocorrer rejeição da prótese;

- ❖ Os materiais biodegradáveis ou reabsorvíveis são definidos pela degradação da prótese no organismo concomitante com a formação do tecido ósseo, devendo respeitar a atividade metabólica das células [34];
- ❖ Nos materiais bioativos ou biomateriais de superfície ativa ocorre uma ligação química estável entre a prótese e o organismo [34], caracterizada pela osseointegração na interface biomaterial-tecido receptor.

A capacidade de regeneração do osso, após o enxerto do biomaterial ocorre devido à quatro mecanismos biológicos de formação do tecido ósseo: osteogênese, osteoindução, osteocondução e osseointegração.

- Osteoindução é um processo de formação do tecido ósseo que ocorre por meio da ação de um ou mais agentes indutores, atuando na diferenciação local de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, como as proteínas ósseas morfogenéticas [35], dando início a osteogêneses [36];
- Osteogênese é a capacidade que o biomaterial para enxerto possui em formar e desenvolver o tecido ósseo, sem depender de células do sítio receptor [37]. O processo apenas ocorre devido o biomaterial possuir células vivas em diferentes estágios;
- Osteocondução é caracterizada pelo crescimento de tecidos perivasculares, vasos sanguíneos e células precursoras dos osteoblastos no biomaterial [36]. O material de enxerto torna-se estrutura para a formação do novo osso, proveniente de imediações e gradualmente é reabsorvido pelo organismo;
- Osseointegração tem por base a osteoindução e a osteocondução, é um processo caracterizado pela fixação rígida do biomaterial no tecido ósseo depois de finalizado o intervalo para cicatrizar a cirurgia [7, 38]. Após a cicatrização, o enxerto será capaz de suportar condições normais de cargas, sem haver deslocamento entre prótese e tecido adjacente.

A ciência dos biomateriais é uma área interdisciplinar, pois apresenta diferentes maneiras de classificar as próteses. Entretanto, para um material ser considerado biomaterial, dentre vários testes a serem realizados, destaca-se a análise de

biocompatibilidade. O material terá que apresentar uma resposta adequada às funções que desempenhará, deverá ser biocompatível [7], ou seja, necessita desenvolver respostas teciduais adequadas ao receptor e não deve provocar reações desfavoráveis no sistema biológico.

2.2. Fosfato de cálcio bifásico

O fosfato de cálcio bifásico (HA β) é uma cerâmica composta por duas fases cristalinas, a fase hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e a fase β -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). O HA β possui propriedades diferentes da hidroxiapatita monolítica [39], visto que o mesmo é mais reativo em meio fisiológico e possui maior semelhança com hidroxiapatita mineral, encontrada em ossos humanos.

Com base em pesquisas realizadas até o presente momento, é possível obter fosfato de cálcio bifásico por duas maneiras. Por meio natural, obtido diretamente do osso do peixe que passa por um processo de lavagem, calcinação, moagem [33, 40]. Ou por meio de diferentes procedimentos realizados em laboratório, em que a proporção dos precursores utilizados e a temperatura de sinterização influenciam na formação bifásica da cerâmica [41].

A relevância dos estudos relacionados com o fosfato de cálcio bifásico se deve à ampla gama de aplicações na área médica. Isso ocorre devido o HA β ser osteocondutor e biocompatível. Essa biocerâmica é empregada na engenharia de tecidos duros para o recobrimento de próteses metálicas, a reconstrução e preenchimento do tecido ósseo podendo ser utilizada também em cirurgias regenerativas. O maior desafio é combinar os requisitos biomecânicos, pois o fosfato de cálcio possui baixa resistência a tração.

De modo geral, as cerâmicas bifásicas são definidas pela formação de um único material, resultado da combinação de duas fases físicas cristalinas diferentes [39].

A fase hidroxiapatita pertence ao grupo espacial de simetria $P6_3/m$ (176), com célula unitária hexagonal e parâmetros de rede $a = b = 0,9432$ nm e $c = 0,6881$ nm. Na Figura 2.2.1 é possível observar a estrutura cristalina da hidroxiapatita, em que os íons de cálcio estão dispostos em duas posições cristalográficas diferentes [42]. Sendo o

sítio A ou Ca1 representado pelas (esferas azuis), este sítio é caracterizado por quatro íons cálcio que ao direcionar a estrutura exatamente ao longo do eixo c é possível visualizar a formação da coluna dos Ca1. Ao observar as (esferas verdes) que representam o sítio B ou Ca2, nota-se que os seis íons estão dispostos de modo a formar um hexágono e que visto de modo detalhado constituem dois triângulos equiláteros defasados 60° no plano perpendicular ao eixo cristalográfico c . As (esferas amarelas) representam o elemento fósforo, que ligadas as (esferas de cor marrom) formam os seis grupos ortofosfato (PO_4). Ainda na Figura, as (esferas com cor metade marrom e metade branca) representam os grupos hidroxilas em que a cor marrom é referente ao elemento oxigênio e cor branca indica o elemento hidrogênio.

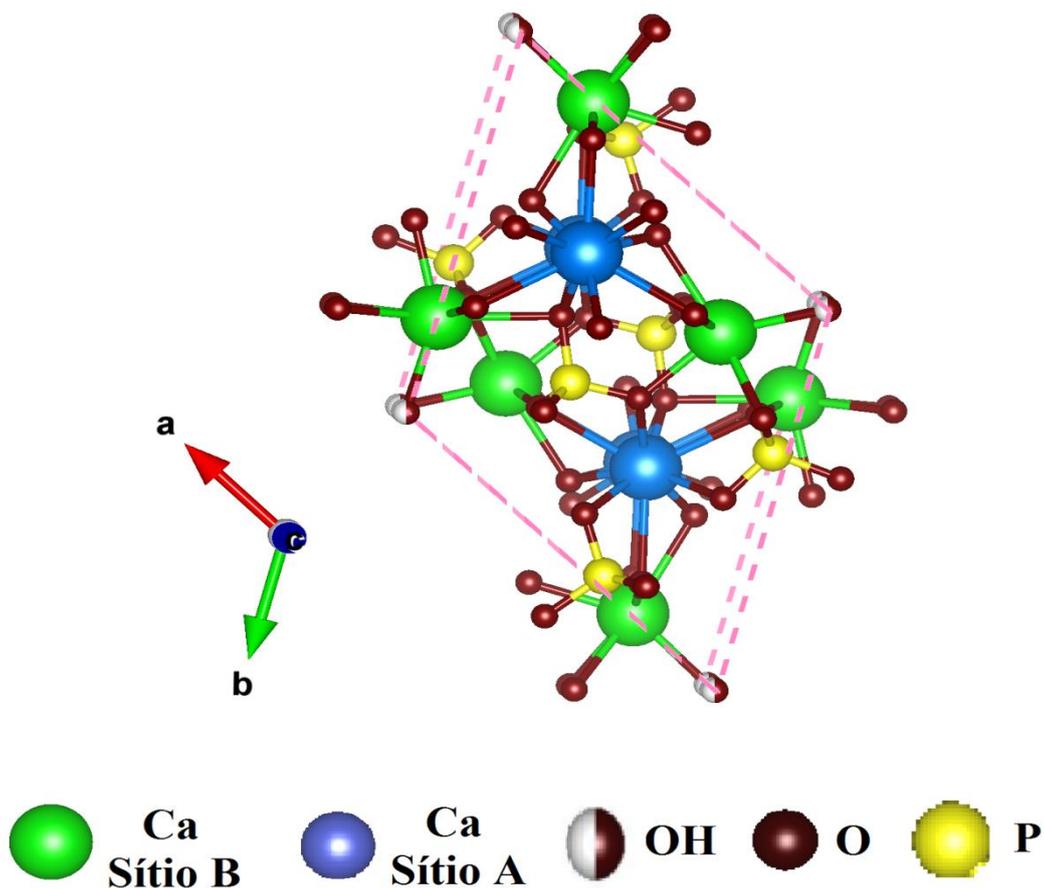


Figura 2.2.1: Célula unitária da estrutura cristalina da hidroxiapatita, construída no programa VESTA [43] com base na referência [44].

Ainda com relação a estrutura cristalina da hidroxiapatita (HAp), essa biocerâmica é caracterizada por sua capacidade “hospedeira”, permitindo a substituição de diferentes íons. As possíveis substituições que podem ocorrer com as hidroxilas, os grupos ortofosfato e os íons de Ca^{2+} podem influenciar de modo significativo nas propriedades físicas, químicas e até morfológicas das amostras. Na tabela 2.2.1 é destacado a relação das substituições que podem ser realizadas pelos íons contidos na HAp e também as possíveis consequências dessas modificações.

<i>Íons contidos na estrutura da HAp</i>	<i>Íons para possíveis substituições</i>	<i>Variações nas propriedades da HAp, após substituição por:</i>
OH^-	F^- , CO_3^{2-} , Cl^-	<ul style="list-style-type: none"> * F^- aumenta a estabilidade química do compósito; * Cl^- altera os parâmetros de rede sem alterar a cristalinidade; * CO_3^{2-} faz com que a taxa de dissolução aumente em meio biológico;
Ca^{2+}	K^+ , Sr^+ , Na^+ , Mg^{2+}	<ul style="list-style-type: none"> * Mg^{2+} é possível alterar tanto os parâmetros de rede quanto diminuir a cristalinidade; * K^+, Sr^+, e Na^+ não altera os parâmetros de rede;
PO_4^{3-}	CO_3^{2-} , HPO_4^{2-}	<ul style="list-style-type: none"> * CO_3^{2-} altera os parâmetros de rede, a cristalinidade e aumenta a taxa de dissolução em meio biológico; * HPO_4^{2-} aumenta o parâmetro de rede a e b.

Tabela 2.2.1: Diferentes substituições de íons realizadas na estrutura da hidroxiapatita e possíveis consequências dessas modificações [33, 45, 46].

A fase β -fosfato tricálcico (β -TCP) pertence ao grupo espacial $R3c$ (161), com célula unitária romboédrica e parâmetros de rede $a = b = 1,0439$ nm e $c = 3,7375$ nm [47]. Na Figura 2.2.2 observa-se a estrutura cristalina do β -TCP, em que os íons de cálcio estão dispostos em cinco sítios com posições não equivalentes. Sendo os sítios A, B e C respectivamente Ca1, Ca2 e Ca3 representado pelas (esferas verdes), esses três sítios não apresentam nenhum elemento de simetria. O sítio D, Ca4 (esfera azul/branca) e o sítio E Ca5, (esferas azuis) formam uma simetria octaédrica com a distância entre o

cálcio e oxigênio menor que no sítio D. Ambos os sítios Ca4 e Ca5 são caracterizados por ocorrer substituições iônicas com relação aos demais cálcios. As (esferas amarelas e marrons) representam os átomos de fósforo e oxigênio.

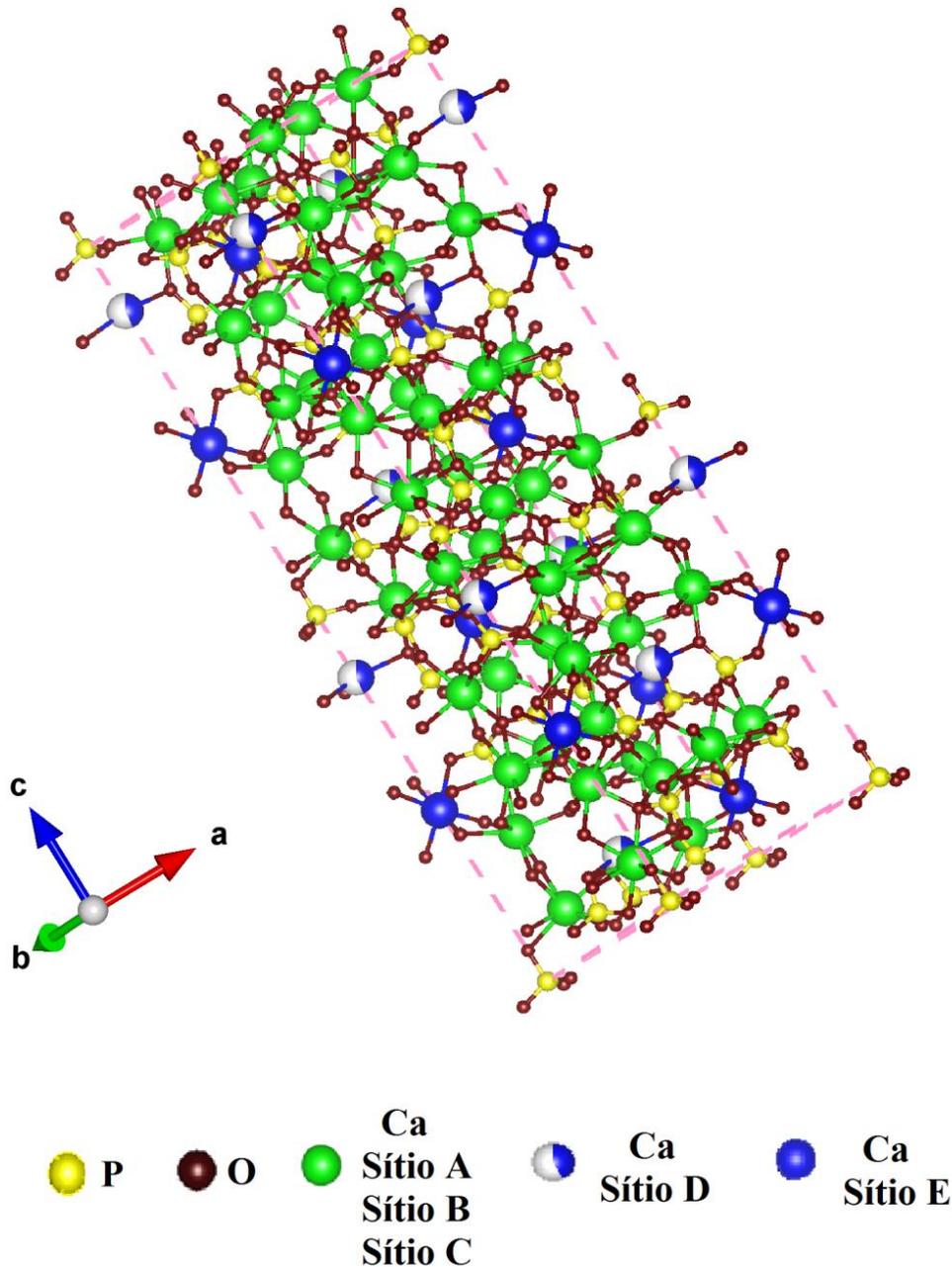


Figura 2.2.2: Célula unitária da estrutura cristalina do fosfato tricálcico fase β , construída no programa VESTA [43] com base na referência [47].

Assim como na hidroxiapatita, no β -TCP também podem ocorrer substituições iônicas, porém essas trocas são somente nos sítios Ca4 e Ca5. Quando a troca de Ca^{2+} por Mg^{2+} for maior que 15%, isso acarretará em uma redução nos

parâmetros de rede, uma vez que a substituição ocorre por um cátion menor [48]. A alteração de Ca^{2+} por Mg^{2+} no sítio Ca5 resulta em um aumento na estabilidade da rede e como consequência em uma menor solubilidade do fosfato tricálcico fase β .

2.3. Magnetita

A magnetita é um óxido de ferro com fórmula (Fe_3O_4) em que os elementos ferro, encontram-se em diferentes estados de oxidação, sendo um íon de Fe^{2+} e dois íons de Fe^{3+} . A magnetita destaca-se pelo fato de ser ferrimagnética a temperatura ambiente, possuir baixa toxicidade no corpo humano e poder ser produzida por meio de diferentes rotas de sínteses, como: decomposição térmica, coprecipitação, processo sol-gel, microemulsões [19, 20].

Dentre os processos utilizados para produção de magnetita com tamanho uniforme, a síntese por decomposição térmica pelo método polimérico é uma das mais citadas [49-51]. Nessa síntese o precursor $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ é adicionado na proporção correta em uma solução aquosa de polivinil álcool (PVA). Então a mistura é mantida sob agitação magnética durante 24 horas a 70 °C e, posteriormente, é despejada em uma placa de poliestireno e colocada para secar à temperatura ambiente. Após isso, o material é posto na estufa, em seguida é macerado para então ser sintetizado no forno a 500 °C. Por fim, a magnetita é lavada com uma solução de 1 M de HNO_3 , água e ao final do processo são secas em estufa.

A variação no método de produção de magnetita está diretamente relacionada com a quantidade, o tamanho e a função que deseja-se obter. As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro possuem ampla gama de aplicação, dentre estas destaca-se aqui seu uso na área de aplicações biológicas, no intuito de diagnosticar, prevenir ou tratar doenças. Essas aplicações podem ser para imagens por ressonância magnética, hipertermia, carreadores de drogas, separação magnética [52].

A magnetita pertence ao grupo espacial de simetria $Fd\bar{3}m$ (227), com estrutura cristalina do tipo espinélio inverso, com célula unitária cúbica de face centrada e parâmetro de rede $a = b = c = 0,839$ nm [17, 53]. Na Figura 2.3.1 observa-se a estrutura cristalina da magnetita, composta por dois tipos de sítios: os tetraédricos e os octaédricos. Os sítios tetraédricos são compostos por íons de oxigênio (esferas de cor

marrom) e íons de Fe^{3+} (esferas de cor verde). Enquanto que os sítios octaédricos são compostos por íons Fe^{3+} e Fe^{2+} em proporção igual (esfera cor azul) e também a presença de íons de oxigênio.

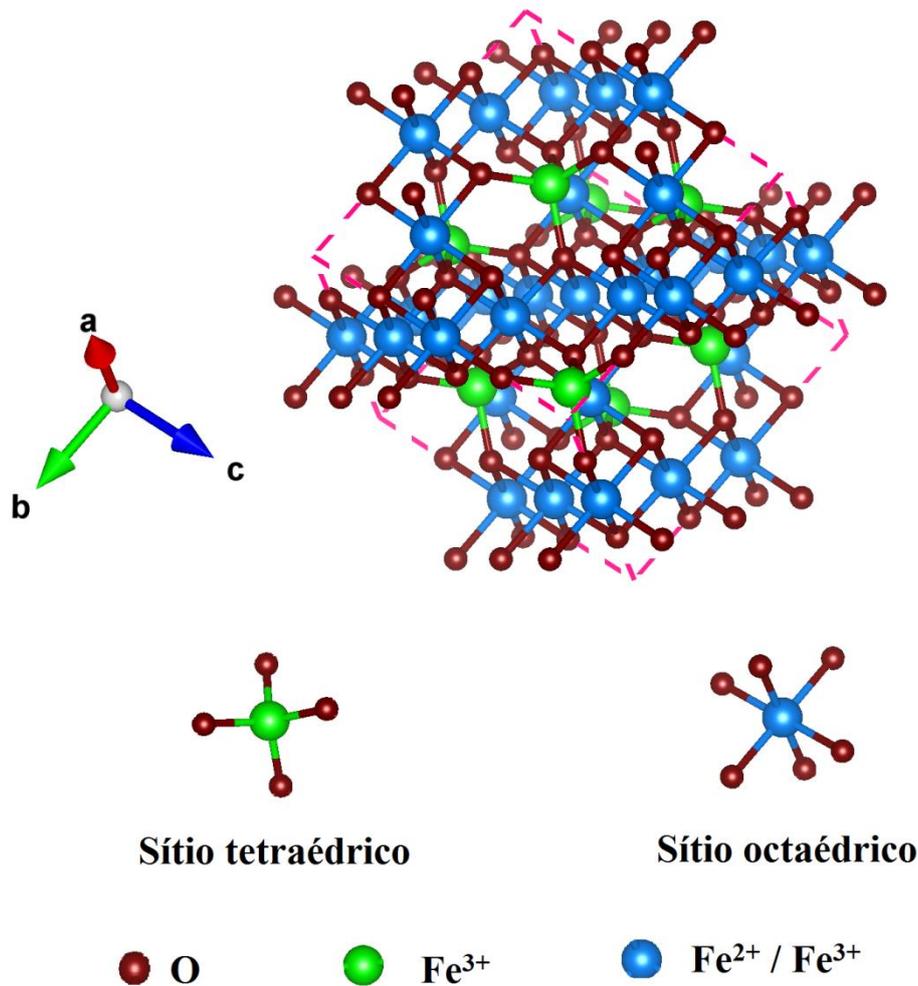


Figura 2.3.1: Célula unitária da estrutura cristalina da magnetita e os respectivos sítios de coordenação tetraédrico e octaédrico, construídos no programa VESTA [43] com base na referência [53].

2.4. *Poli(fluoreto de vinilideno)*

O poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) é um termoplástico semicristalino com fórmula $(-\text{H}_2\text{C}-\text{CF}_2-)_n$, em que n é o número de repetições do monômero. Esse polímero é caracterizado por ser flexível, possuir boa resistência mecânica quando

comparado a outros polímeros, estabilidade química e apresentar piro, piezo e ferroeletricidade na fase β [54]. Na área biomédica o PVDF tem sido utilizado como material de sutura em cirurgia cardiovascular [14], também há vários estudos para o uso desse polímero como: implante na promoção de tecido ósseo devido ao efeito piezoelétrico [14], sensores cardiopulmonares não invasivos [55], construção de malhas cirúrgicas para reparo de hérnias abdominais [56], regeneração nervosa [57] entre outros.

O PVDF cristaliza na forma de esferulitos, que são estruturas esféricas constituídas por parte amorfa que entrepõe-se as lamelas (parte cristalina) [58], estas crescem paralelas ao eixo do núcleo na direção radial a partir do centro, como mostrado na Figura 2.4.1.

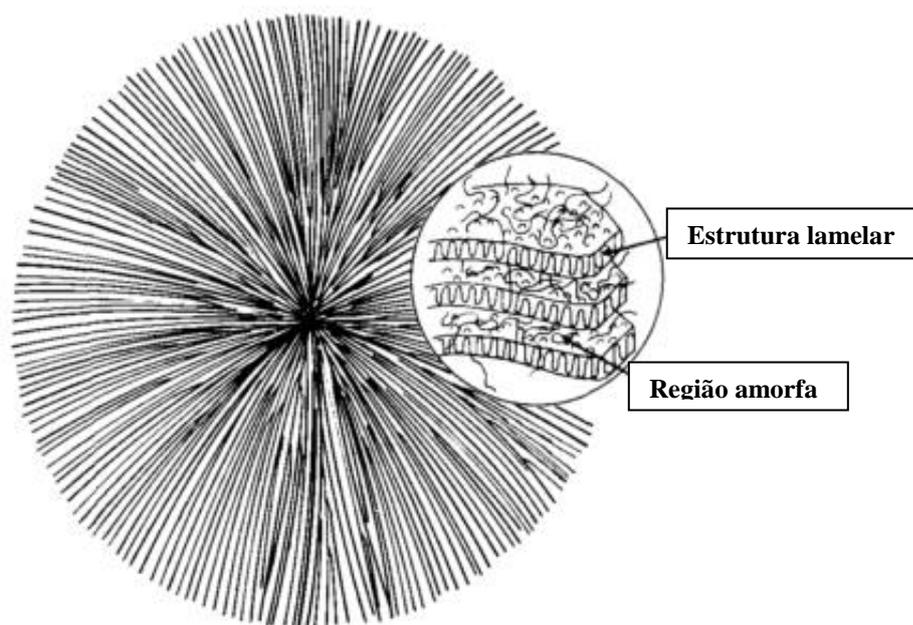


Figura 2.4.1: Cristalização na forma de esferulito com destaque para a estrutura lamelar e a região amorfa, adaptada da referência [54].

Com relação a estrutura cristalina, o PVDF pode ser classificado em quatro fases cristalográficas diferentes, sendo: fase β , fase α , fase γ e fase δ ou nomeada respectivamente como forma I, forma II, forma III e forma IV. A fase obtida no polímero depende diretamente do modo de produção da amostra com relação a fatores

como: temperatura, tempo de sinterização, pressão, tipo de solvente, taxa de aquecimento e campo elétrico [59].

A fase β é a de maior interesse quando comparada as demais fases por apresentar piezeletricidade e piroeletricidade mais intensa, visto o ordenamento dos dipolos. Nesta fase a amostra é produzida por meio de diferentes métodos como: cristalização por uso de solventes (dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA) ou n-metilpirrolidona) a temperatura inferior a 70 °C, por estiramento mecânico a partir do polímero na fase α , por aplicação de campo elétrico [60], [61]. Na Figura 2.3.2 (a) e (g) observa-se que a conformação planar da fase β é toda trans (T) zigue-zague com uma deflexão de 7° entre as ligações de carbono (esferas cor ciano) e o flúor (esferas cor vermelha), com os dipolos indicando no mesmo sentido representado pelas setas. Nota-se na conformação da cadeia atômica, que os átomos de flúor estão de um lado e os átomos de hidrogênio (esferas azuis) estão do outro lado. Nesta fase a simetria é ortorrômbica com grupo espacial $Cm2m$ e parâmetros de rede $a = 8,58 \text{ \AA}$; $b = 4,91 \text{ \AA}$ e $c = 2,56 \text{ \AA}$.

A fase α é a mais comum de ser produzida, essa fase é obtida por meio da cristalização do PVDF após ter atingido o ponto de fusão, ou pela adição de solventes a temperatura superior a 120 °C. Nessa fase a conformação da cadeia é helicoidal em uma sequência alternada de trans (T) e gauche (G) na seguinte ordem TGTG. Os componentes dipolares da cadeia estão dispostos de forma antiparalela, com simetria monoclinica e grupo espacial $P21/c$ ou ortorrômbica $P2cm$ [62, 63], ambas com os parâmetros de rede $a = 4,96 \text{ \AA}$; $b = 9,64 \text{ \AA}$ e $c = 4,62 \text{ \AA}$. Na Figura 2.3.2 em (b) e (e) observa-se a estrutura molecular da fase α .

A terceira forma cristalina ou fase γ possui ferroeletricidade e a amostra é obtida a partir da fase α com a cristalização do PVDF após ter sido fundido sob alta pressão. Nesta fase, as cadeias poliméricas estão organizadas em um arranjo T_3GT_3G , em que a cada 3 conformações trans existe uma gauche, conforme representada na Figura 2.3.2 (c) e (f). A estrutura molecular está orientada de modo intermediário a configuração helicoidal da fase α e ziguezague da fase β . Na forma III a simetria é monoclinica, com grupo espacial Cc e parâmetros de rede $a = 4,96 \text{ \AA}$; $b = 9,58 \text{ \AA}$ e $c = 9,23 \text{ \AA}$ com β aproximado de 97° [64].

A fase δ é obtida após submeter o polímero ainda na fase α a um intenso campo elétrico, como consequência ocorre a inversão dos momentos de dipolo é uma fase polar, ferroelétrica. Nesta fase, a estrutura da célula unitária apresenta simetria ortorrômbica com parâmetros de rede $a = 4,96 \text{ \AA}$; $b = 9,64 \text{ \AA}$ e $c = 4,62 \text{ \AA}$ pertencente ao grupo $P21cn$ [65]. Na Figura 2.4.2 em (d) e (e) observa-se a estrutura molecular da fase δ .

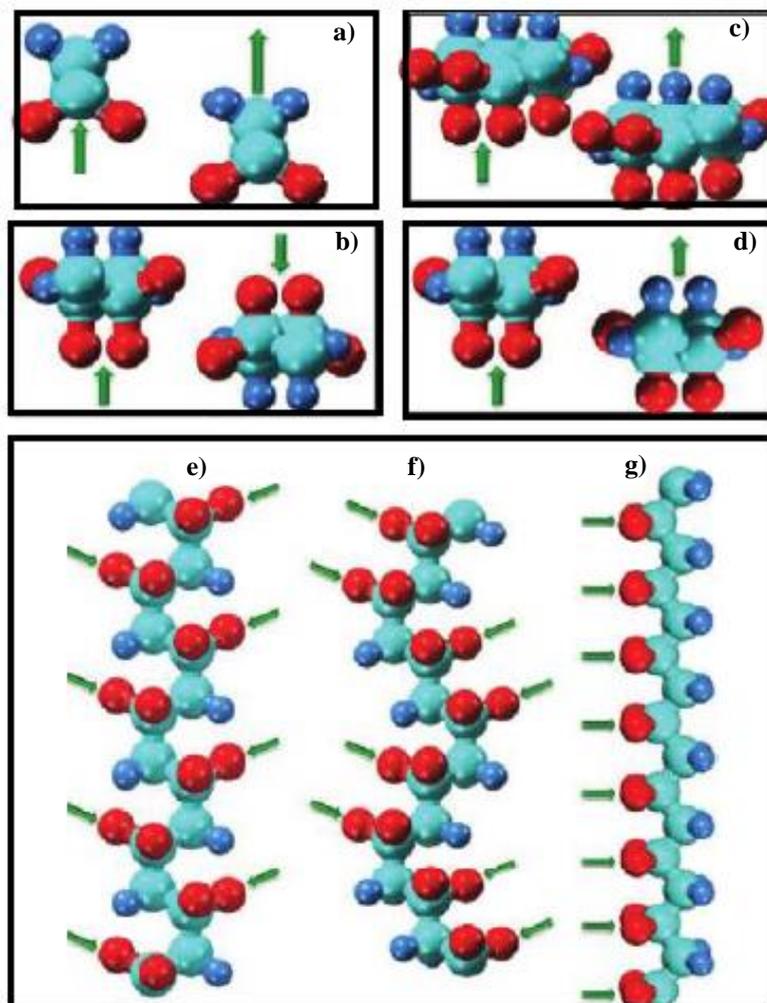


Figura 2.4.2: Estrutura molecular do PVDF na fase β (a), α (b), γ (c) e δ (d) visto ao longo do eixo “c”. Esquema da conformação da cadeia em (e) α e δ , (f) γ e (g) β . As setas verdes indicam a orientação dos dipolos. As esferas cor ciano representam (Carbono), azuis o elemento (Hidrogênio) e vermelhas (Flúor), adaptada da referência [66].

A piezoelectricidade que o PVDF apresenta, ocorre devido aos dipolos elétricos permanentes, que são formados pela diferença de eletronegatividade entre os

átomos de flúor (negativos) e os átomos de hidrogênio (positivos) em relação aos átomos de carbono.

2.5. Quantificação da fase β em amostras de poli(fluoreto de vinilideno)

O método para calcular a quantidade de fase em amostras de PVDF por meio da técnica de FTIR, foi utilizado pela primeira vez por Osaki e Ishida (1975) [67] para quantificar a fase γ , tendo por base as bandas em 510 cm^{-1} (fase γ) e 530 cm^{-1} (fase α). A partir de então, Gregorio e Cestari (1994) [68] utilizando as bandas 766 cm^{-1} (fase α) e 840 cm^{-1} (fase β) e Salimi e Yousef (2003) com as bandas 530 cm^{-1} (fase α) e 840 cm^{-1} (fase β), utilizaram métodos análogos para quantificar a fase β presente em amostras de PVDF. Ambos os autores consideraram que a absorção de infravermelho obedece à lei de Lambert Berr.

De acordo com Stuart (2004) [69], a absorbância de um material pode ser calculada pela a diferença entre os logaritmos da intensidade de radiação incidente I_i^0 pela intensidade da radiação transmitida I_i . Desse modo, a lei de Lambert Berr pode ser escrita de acordo com a equação (2.5.1)

$$A_i = \log \frac{I_i^0}{I_i} = K_i C_i X_i L \quad (2.5.1)$$

em que A_i é a absorbância do material, L é a espessura da amostra, K_i é o coeficiente de absorção em um dado número de onda, C_i é a concentração molar de cada fase, X_i é a cristalinidade e o índice i é referente as fases α e β do PVDF.

A fração relativa de fase β ($F_{\beta(\%)}$) em uma amostra contendo as fases α e β pode ser calculada com base na equação (2.5.2) [68, 70]

$$F_{\beta(\%)} = \frac{X_{\beta}}{X_{\alpha} + X_{\beta}} \quad (2.5.2)$$

Assim substituindo a equação (2.5.1) na equação (2.5.2) e utilizando as bandas 766 cm^{-1} (fase α) e 840 cm^{-1} (fase β) Gregorio e Cestari (1994) [68], chegaram na relação (2.5.3)

$$F_{\beta(\%)} = \frac{A_{\beta}}{1,3 A_{\alpha} + A_{\beta}} \quad (2.5.3)$$

De modo semelhante ao substituir a equação (2.5.1) na equação (2.5.2) Salimi e Yousef (2003) com as bandas 530 cm^{-1} (fase α) e 840 cm^{-1} (fase β) estabeleceram a relação (2.5.4)

$$F_{\beta(\%)} = \frac{A_{\beta}}{1,26 A_{\alpha} + A_{\beta}} \quad (2.5.4)$$

Para calcular a fração relativa de fase β ($F_{\beta(\%)}$) nas equações (2.5.3) ou (2.5.4) é preciso primeiramente determinar a linha de base do espectro [69], para em seguida utilizar o valor das absorbâncias referentes as bandas supracitadas. A quantificação da fase β ($F_{\beta(\%)}$) em amostras de PVDF é um método que pode ser utilizado quando as fases γ e δ forem praticamente desprezíveis [71].

2.6. Piezoelectricidade

A propriedade que certos materiais cristalinos possuem de converter energia mecânica em energia elétrica e vice-versa é denominada de piezoelectricidade. Esse resultado ocorre quando o material sofre uma deformação mecânica (tração ou compressão), e em resposta ocorre o acúmulo de cargas elétricas em sua superfície [72]. Essas cargas acumuladas nas extremidades dos materiais piezoelétricos são proporcionais a força aplicada. Quando o processo é invertido, ou seja, quando aplica-se campo elétrico no material e em resposta ocorre uma deformação mecânica denominada de efeito piezoelétrico inverso, como representado na Figura 2.6.1

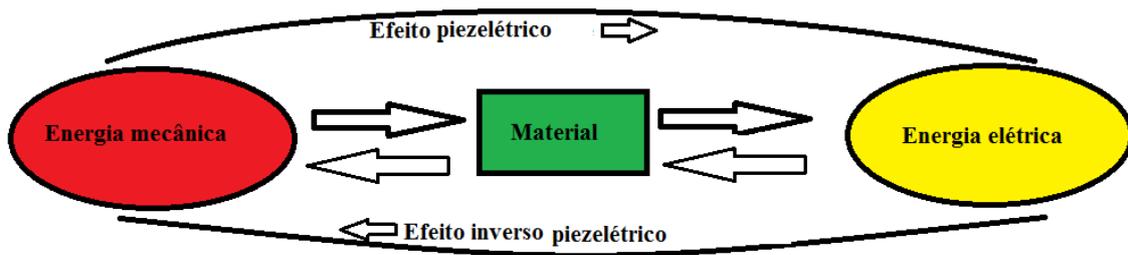


Figura 2.6.1: Representação esquemática da conversão de energia do efeito piezoelétrico.

Após compreender a definição de efeito piezoelétrico direto é possível obter o vetor deslocamento elétrico (D) com base na equação (2.6.1)

$$D_n = d_{mi}T_i + \varepsilon_{mn}^T E_m \quad (2.6.1)$$

Em que d é o coeficiente piezoelétrico, T é a tensão mecânica, E é o campo elétrico, ε é a permissividade dielétrica, $i = 1,2, \dots, 6$; e $m, n = 1, 2, 3$. Já o efeito piezoelétrico inverso pode ser descrito pela seguinte equação (2.6.2):

$$S_i = s_{ij}^E T_j + d_{mi} E_m \quad (2.6.2)$$

Sendo S a deformação, s o coeficiente elástico e $j = 1,2, \dots, 6$. Na Figura 2.6.2 é representado o efeito piezoelétrico na estrutura do quartzo (SiO_2), esse exemplo foi abordado por Freitas (2011) [10], em que descreve a piezeletricidade em três etapas: primeiramente a estrutura encontra-se eletricamente neutra, em seguida ocorre a aplicação de tensão mecânica fazendo com que os átomos se desloquem, havendo assim um rearranjo de cargas que polarizam a estrutura e geram uma diferença de potencial (ddp) no cristal em questão.

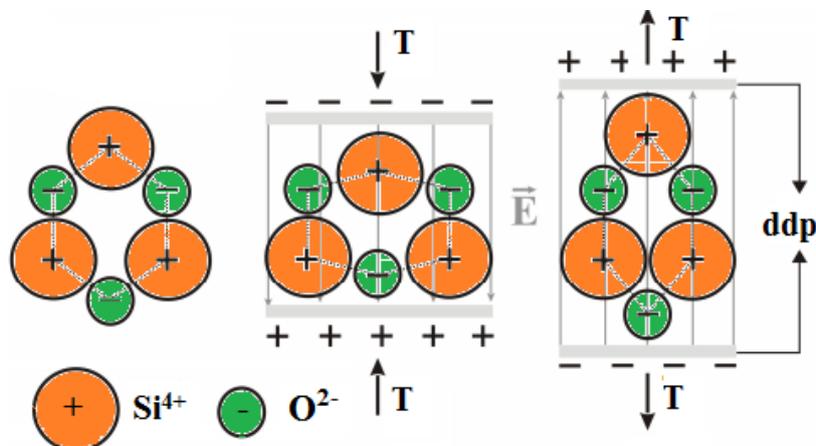


Figura 2.6.2: Ilustração do efeito piezoelétrico na estrutura do quartzo, adaptada da referência [10].

2.7. Nucleação da camada de apatita em teste *in vitro* por fluido corpóreo simulado

O objetivo de evitar transtornos relacionados a procedimentos experimentais e éticos característicos de testes *in vivo*, os testes *in vitro* ganharam destaque no decorrer dos últimos anos. Ao utilizar testes *in vitro*, torna-se possível simular reações biológicas que ocorrem no corpo humano com métodos menos dispendiosos para analisar o comportamento de amostras.

O teste de bioatividade convencional *in vitro* desenvolvido por Kokubo e colaboradores (2006) [23], é uma solução acelular, sem a presença de proteínas e com composição iônica próxima ao do plasma sanguíneo como mostrado na tabela 2.7.1.

Concentração iônica (mM)								
Íons	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma humano	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Tabela 2.7.1: Comparação entre a concentração iônica do SBF e do plasma sanguíneo humano [73].

O teste de bioatividade *in vitro* possibilita a formação de apatita na superfície da amostra, caso ela seja bioativa. Entender o mecanismo de nucleação de apatita em diferentes materiais imersos em SBF é algo de grande interesse. Kokubo e colaboradores (2003) [73] explicam a formação da apatita por meio da amostra de titanato de sódio amorfo. Quando a amostra de titanato de sódio amorfo fica imersa em SBF, ocorre troca iônica entre íons da superfície da amostra, liberação de Ca²⁺, Na²⁺ ou K⁺ com o íon H₃O⁺ do SBF, formando os grupos Ti-OH com cargas negativas na superfície do material. Os grupos formados (cargas negativas), interagem com os íons de Ca²⁺ dispersos na solução do SBF, formando compostos de cálcio amorfo (titanato de cálcio) de superfície com carga positiva. A superfície com carga positiva irá então atrair os íons (PO₄²⁻) de carga negativa presentes na solução, formando fosfatos de cálcio amorfo que em seguida irão se cristalizar e dar origem a apatitas semelhantes às existentes no tecido ósseo.

2.8. Tecido ósseo

O tecido ósseo desempenha importante papel na fisiologia dos vertebrados, ele é responsável por algumas funções como: sustentar o corpo (proporcionando apoio aos músculos), proteger órgãos vitais (como os contidos na caixa craniana e na caixa torácica), servir como reserva de íons (cálcio, fosfatos, magnésio, sódio, potássio e carbonatos), além de ser responsável por controlar a liberação desses íons no metabolismo [74]. Macroscopicamente o tecido ósseo pode ser dividido em dois grupos, ossos corticais (são mais densos, compactos) e ossos trabeculares (são porosos, esponjosos), sendo que cada grupo apresenta propriedades mecânicas diferentes.

Embora se tenha a ideia equivocada de que o tecido ósseo é inerte, o mesmo prevalece em constante remodelação óssea, isso ocorre devido as suas estruturas serem altamente dinâmicas. Esse processo de regeneração é resultado basicamente dos osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

Os osteoblastos são células responsáveis por produzir o novo osso dando início a mineralização. Nesse processo ocorre basicamente, a precipitação dos cristais de hidroxapatita em associação com as fibras de colágeno [35, 37].

Os osteócitos são células advindas dos osteoblastos que ficaram circundados na matriz óssea mineralizada. Na matriz cada osteócito ocupa uma lacuna e o contato entre as lacunas ocorrem por meio de uma rede de canaliculos, assim os osteócitos funcionam como mecanossensores [75].

Os osteoclastos são células capazes de migrarem sobre a superfície óssea, sendo responsáveis pela reabsorção da matriz óssea. No final do processo ocorre a liberação para a corrente sanguínea, dos produtos da degradação do tecido ósseo, como por exemplo, aminoácidos e íons [76].

Assim ao considerar um osso vergado, os elétrons que se encontravam em uma região inicial migram para a região de compressão, surgindo um potencial negativo nessa área. No entanto, na região que sofreu tração, ocorre ausência de elétrons, ficando o local com potencial positivo. As cargas negativas têm a propriedade de ativar os osteoblastos e osteócitos (que produzem colágeno), enquanto que as cargas positivas ativam os osteoclastos [55]. Assim, com a propriedade piezelétrica do tecido ósseo,

quanto mais estímulos o tecido receber melhor será o desempenho da remodelação óssea.

2.9. Estimulação extrínseca para o reparo ósseo

O uso de estímulos extrínsecos para o reparo ósseo foi destacado a partir do ano de 1957, quando Fukada e Yasuda divulgaram em sua pesquisa [77] o efeito piezoelétrico do tecido ósseo. Desde então, os estímulos produzidos extrinsecamente são utilizados com o intuito de substituir ou melhorar funções no corpo humano, que foram prejudicadas devido a ocorrência de lesões ou doenças. Assim, com o objetivo de impedir que ocorra a transmissão de informação indesejada, como estímulo da dor, ou para facilitar a promoção acelerada da cura, como na estimulação do crescimento ósseo.

Apesar da capacidade regenerativa do osso, grandes defeitos ósseos e algumas doenças são difíceis de cicatrizar, e torna-se um desafio aos pesquisadores. O desafio encontra-se na complexidade fisiológica do tecido ósseo, em que a cura depende de vários fatores biológicos. Apesar de haver aproximadamente seis décadas de estudos sobre estímulos extrínsecos, ainda há necessidade de definir a melhor técnica de estímulo.

Dentre as pesquisas realizadas nos últimos anos, a tabela 2.9.1 nos permite uma breve visão da ampla gama de estímulos extrínsecos que foram utilizados para a cura óssea, como: campo elétrico, campo magnético estático, campo magnético oscilante, campo eletromagnético, radiação a laser, ultrassom, radiação ultra violeta (UV), micro-ondas.

Com relação ao meio de promoção deve-se ressaltar que este refere-se ao meio onde o estímulo foi aplicado, podendo ser de modo geral definidos em experimentos *in vitro*, como (cultura de células, imersão em SBF) ou experimento *in vivo* que referem-se a aplicação em animais ou até mesmo seres humanos.

<i>Modo de estímulo</i>	<i>Meio de promoção</i>	<i>Duração</i>	<i>Ano/Refer.</i>
Ultrassom	Fêmur de ratos	24 dias	2001/[78]
Campo elétrico	Cultura de células do metacarpo bovino	21 dias	2001/[79]
Campo eletromagnético	Cultura de células ósseas MC3T3-E1	24 horas	2001/[80]
Campo eletromagnético pulsado	Tíbias caninas	9 semanas	2002/[81]
Campo elétrico pulsado	Tíbias de ratos	27 dias	2007/[82]
Ultrassom	Mandíbulas de cães	12 semanas	2009/[83]
Campo elétrico	Cultura de células-tronco mesenquimais	21 dias	2011/[84]
Radiação a laser de baixa energia	Tíbias de ratos	45 dias	2012/[85]
Campo elétrico	Implante coclear	-	2015/[86]
Campo magnético estático	Cultura de células Com nanopartículas magnéticas e Ácido Polilático (PLLA)	7 dias	2015/[87]
Micro-ondas	HA imersa em SBF	6 horas	2015/[88]
Radiação. U. V.	Titânio anodizado imerso em SBF	7 dias	2016/[89]
Radiação a laser de baixa energia	Oso parietal de ratos	60 dias	2017/[90]
Campo eletromagnético pulsado	Cultura de células Com nanofibra de Poli(caprolactona) (PCL)	21 dias	2017/[91]
Campo magnético estático	Cultura de células Implante em coelho com HAFé	7 dias 90 dias	2018/[92]
Campo magnético oscilante Campo magnético estático	Enxerto de HA bifásica em coelho	9 semanas	2018/[93]
Campo elétrico pulsado	Cultura de células MG63	-	2018/[94]
Campo magnético estático	Cultura de células MG63	42 dias	2018/[95]
Ultrassom	Tíbias de ratos	2 semanas	2018/[96]
Campo magnético estático	Oso parietal de coelho	60 dias	2018/[97]
Campo magnético estático	Cultura de células Defeito ósseo em mandíbula de rato Magnetita e TCP	14 dias 8 semanas	2019/[98]
Campo elétrico	Explante de rato em cultura de células	30 dias	2019/[99]

Tabela 2.9.1: Estudo de caso sobre estímulos e diferentes meios de promoção, para avaliar o crescimento ósseo.

3. *TÉCNICAS EXPERIMENTAIS*

3.1. *Sinterização*

A sinterização é uma técnica muito utilizada no processamento da metalurgia do pó. Ela ocorre por meio de um processo termicamente ativado, que faz com que ocorram reações físicas e químicas entre as partículas do material que estejam em contato mútuo [100]. O processo ocorre quando há aumento de temperatura suficiente para haver uma fusão dos elementos do compósito em questão. É importante ressaltar que pode haver também no decorrer do processo de sinterização uma fase líquida do material, isso somente será possível se a temperatura ultrapassar a temperatura de fusão de algum dos componentes do compósito.

Após o término da sinterização o material geralmente apresenta alterações tanto na sua microestrutura como nas suas propriedades. Essas mudanças são resultados dos três estágios que ocorre na sinterização, que são: estágio inicial, intermediário e final [101].

Na Figura 3.1.1 é mostrada as principais variações que ocorrem em cada etapa. Na ilustração (a), as partículas que estão em contato umas com as outras são as partículas soltas de pó, ainda não há a sinterização. No item (b), as partículas se encontram no estágio inicial da sinterização. Neste há uma reorganização das partículas e a formação de “pescoços” nas regiões de contato das partículas próximas. No estágio intermediário (c), ocorre um crescimento no tamanho dos “pescoços” e uma redução na quantidade de poros, conseqüentemente a densidade relativa aumenta, pois ocorre uma aproximação entre os centros das partículas, e também a formação dos contornos de grãos. E na fase final (d), ocorre um fechamento progressivo dos poros, devido ao preenchimento das vacâncias nos contornos de grãos.

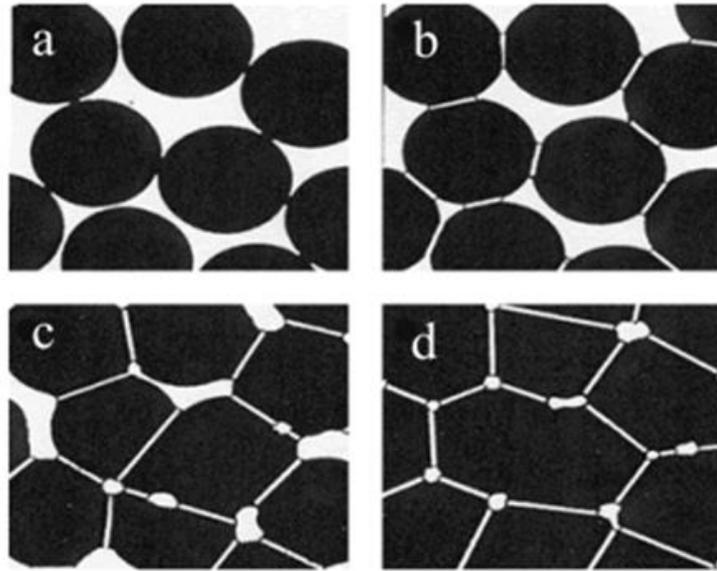


Figura 3.1.1: Processo de sinterização: (a) antes de iniciar a sinterização, (b) estágio inicial formação de “pescoços”, (c) estágio intermediário aumento do tamanho dos “pescoços” e (d) estágio final fechamento progressivo dos poros. Figura retirada e adaptada da referência [102].

3.2. Difração de Raios X

Essa técnica é bastante utilizada para caracterizar materiais cristalinos. Isso ocorre por se tratar de uma medida não destrutiva capaz de determinar as fases cristalinas dos materiais e fornecer dados referentes ao tamanho, a simetria e a orientação dos cristais. Para a melhor compreensão, é importante lembrar que cristal é definido como um sólido homogêneo com um arranjo atômico interno regular, ou seja, que apresenta periodicidade [103].

O princípio de funcionamento da DRX consiste na interação de um feixe de raios X incidente com os átomos da superfície da amostra (cristal), a partir de então ocorre o espalhamento, de modo que o feixe difratado é captado por um detector de raios X [104]. Assim, segundo a lei de Bragg a radiação é difratada por meio dos planos naturais do cristal analisado, no qual a direção dos planos cristalográficos são especificados pelos índices de Miller $\{hkl\}$ de cada pico de difração. A relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originam é estabelecida pela equação (3.2.1), característica de cada fase cristalina.

$$n \lambda = 2 d \operatorname{sen} \theta \quad (3.2.1)$$

Em que n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda do feixe de raios X incidentes, d é a distância interplanar e θ é o ângulo de Bragg.

Quando há incidência de um feixe de raios X com comprimento de onda λ , na rede cristalina com distância interplanar d , em que o ângulo de incidência é θ , podem ocorrer interferências construtivas e destrutivas. Na Figura 3.2.1 é ilustrado a interferência construtiva, que ocorre quando a diferença entre os feixes refletidos por diferentes planos cristalinos seja de um número inteiro de comprimento de onda, λ [18]. Isso significa dizer que um feixe qualquer difratado percorre uma distância (λ) a mais que um feixe difratado pelo plano adjacente e assim sucessivamente.

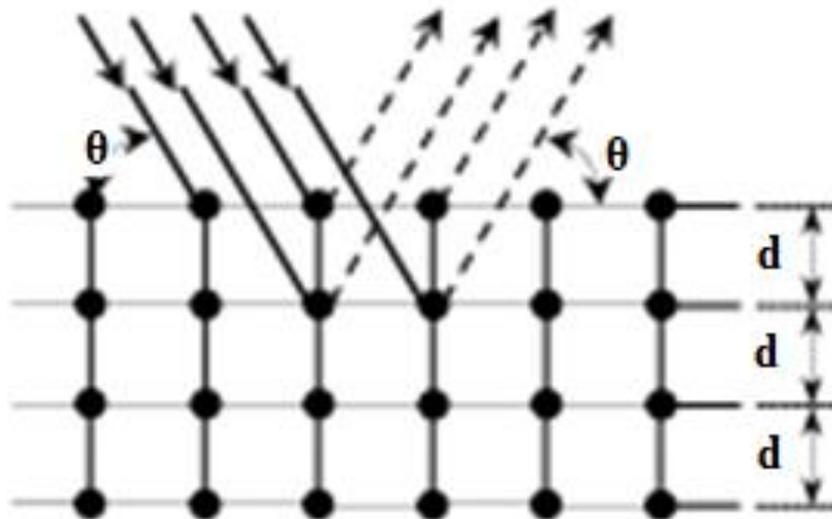


Figura 3.2.1: Representação da Lei de Bragg com interferência construtiva, retirada da referência [105].

Caso ocorra a interferência destrutiva não é possível observar qualquer sinal de raios X, ao contrário do ilustrado anteriormente. Com o intuito de conhecer um pouco mais sobre a técnica de DRX é preciso ainda analisar um difratômetro e um difratograma respectivamente.

Na Figura 3.2.2 tem-se a imagem de um difratômetro de raios X e os seus principais componentes. Pode-se resumir o funcionamento do difratômetro a partir do feixe de raio X gerado na fonte, que passa pelo colimador e incide na amostra (que deve

apresentar superfície plana). Então, o feixe difratado é colimado e deste modo chega ao detector de raios X. O movimento de detecção de 2θ graus é acompanhado pela rotação de θ graus da amostra e isso ocorre pois os suportes são vinculados mecanicamente. Essa ligação garante que o ângulo de incidência e o ângulo de reflexão serão iguais à metade do ângulo de difração 2θ [106].

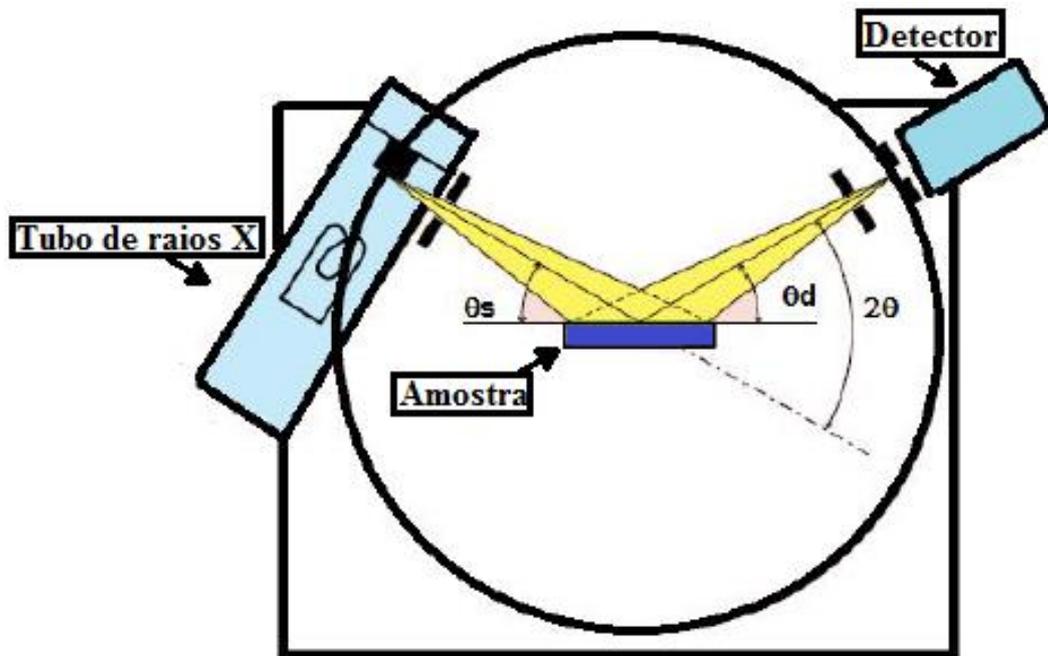


Figura 3.2.2: Funcionamento do difratômetro de Raios X, adaptada da referência [107].

Após ser detectado o feixe difratado, utiliza-se um sistema computacional que produz um gráfico denominado “perfil de difração” ou difratograma como mostrado na Figura 3.2.3. Neste, é relacionado a intensidade de radiação medida pelo ângulo de espalhamento 2θ . O difratograma é único para cada tipo de cristal e o perfil de difração de um composto é a soma dos perfis de difração dos seus constituintes [108]. A identificação das amostras é realizada por meio de comparação destes resultados com um banco de dados, como o arquivo Inorganic Crystal Structure Database (ICSD).

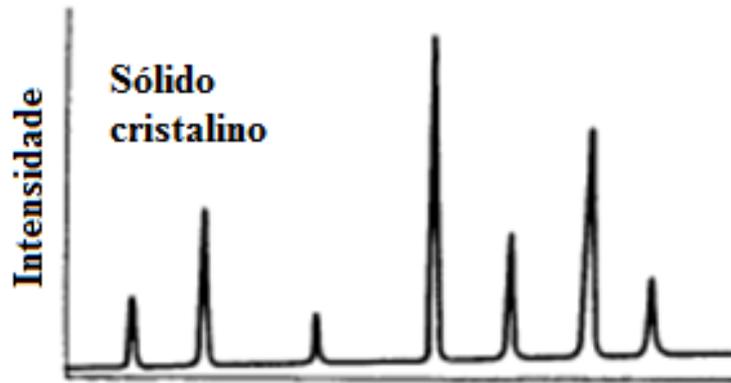


Figura 3.2.3: Imagem ilustrativa de um difratograma de raios X de um sólido cristalino, retirada da referência [106].

3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Essa técnica é utilizada para investigar superfícies dos materiais, a qual permite grandes ampliações. Dessa forma, é possível observar a microestrutura e a morfologia do material e com isso identificar alterações que tenham ocorrido durante o processo de fabricação da amostra [46, 109].

Para melhor compreensão da técnica se faz necessário uma breve abordagem sobre o funcionamento do MEV e os seus principais componentes. Observa-se na Figura 3.3.1, o canhão de elétrons que tem a função de emitir um feixe de elétrons. O qual, na maioria dos microscópios eletrônicos de varredura são provenientes de emissão termiônica de um filamento de tungstênio e por meio de uma fonte variável de tensão acelera os elétrons. Então, o sistema de lentes eletromagnéticas, que podem constituir-se de uma ou mais lentes, são responsáveis por colimar e controlar a intensidade desse feixe de elétrons. Em seguida, os elétrons passam pela lente objetiva eletromagnética, que tem a finalidade de controlar o tamanho do feixe de elétrons (formato retangular) que incide na amostra. Já a bobina de controle de varredura, que constitui o MEV, é composta por dois pares. Um faz a varredura da amostra na direção x e o outro executa o movimento na direção y, varrendo assim toda a superfície da amostra. Assim quando o feixe de elétrons que é criado em vácuo atinge a superfície da amostra, os sinais emitidos são identificados por detectores de elétrons e então são armazenados e convertidos em imagem no computador [110, 111].

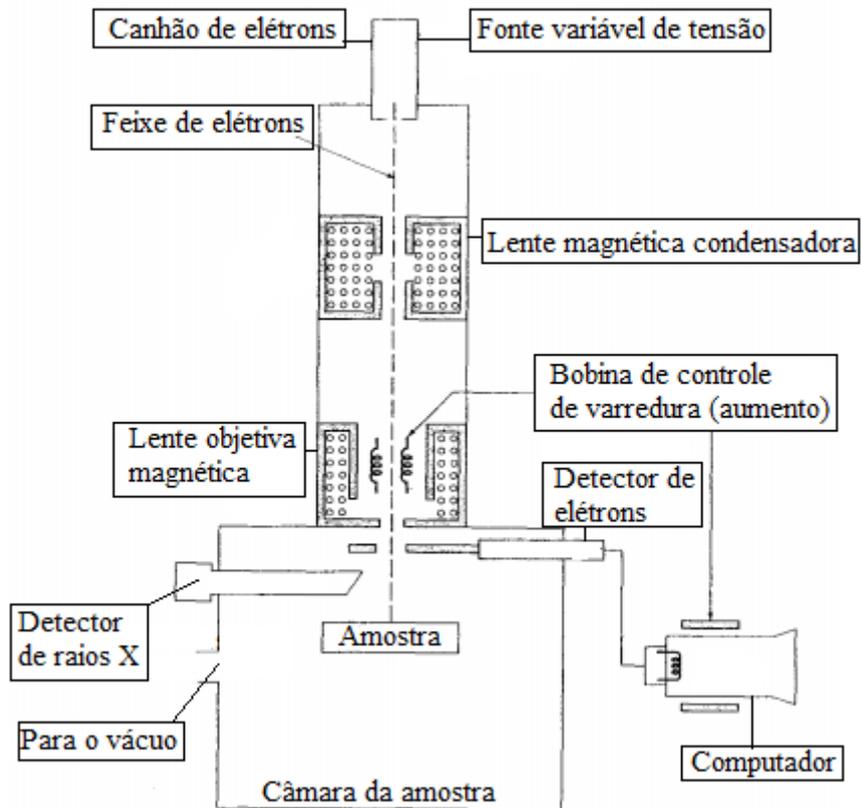


Figura 3.3.1: Princípio de funcionamento do MEV, adaptada da referência [111].

Como consequência da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, é possível obter uma ampla variedade de sinais emitidos, dentre eles vale destacar três tipos: elétrons secundários, elétrons retro-espalhados e raios X característicos. Estes sinais quando captados por detectores, fornecem informações da amostra como: topografia da superfície, composição, cristalografia, entre outros [112].

Os elétrons secundários são resultados da interação entre o feixe de elétrons incidente e os elétrons de condução fracamente ligados ao sólido em análise, fazendo com que ocorra uma ejeção de elétrons da banda de condução. Porém como os elétrons secundários possuem pouca energia, eles são atraídos para o detector por meio de um potencial positivo [18].

Os elétrons retro-espalhados são caracterizados por possuírem alta energia, proveniente de numerosas colisões elásticas que ocorrem com os elétrons na superfície do sólido. Esse é o motivo que limita a resolução da imagem formada por esse tipo de

sinal, ao contrário dos elétrons secundários que apresentam uma imagem com boa resolução e bastante nítida [111].

Uma terceira forma de análise resultante da interação do feixe de elétrons primário com a superfície do sólido é chamada de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS). Essa técnica consiste em analisar os raios X característicos emitidos da interação da amostra com o feixe de elétrons, possibilitando assim, uma análise qualitativa e semi quantitativa da composição do sólido [29, 46].

3.4. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier no modo Reflexão Total Atenuada

A técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier no modo Reflexão Total Atenuada é utilizada para investigar os modos vibracionais das moléculas e assim caracterizar as ligações químicas, a geometria molecular e a conformação de cadeias. O espectro de radiação infravermelho compreende o intervalo de número de onda muito extenso, que varia de 10 cm^{-1} a 12800 cm^{-1} [111]. Desse modo, o espectro é dividido em: infravermelho próximo ($12800 - 4000\text{ cm}^{-1}$), infravermelho médio ($4000 - 200\text{ cm}^{-1}$) e infravermelho longo ($200 - 10\text{ cm}^{-1}$).

Na espectroscopia de infravermelho os espectros podem ser gerados de três maneiras diferentes: emissão, transmissão/absorção ou reflexão [111]. No modo emissão, tem-se por base o aquecimento da amostra e assim as moléculas emitem comprimentos de onda característicos. Já na transmissão/absorção, parte da radiação que incide na amostra é absorvida e parte transmitida. No modo reflexão, o feixe de radiação incide na superfície da amostra ocorrendo uma interação e logo em seguida há uma absorção parcial da radiação.

A versatilidade da FTIR se deve ao fato de poder analisar amostras na fase líquida, sólida ou gasosa, dependendo do acessório acoplado ao espectrofotômetro. No caso do acessório de reflectância acoplado é possível realizar a técnica de FTIR-ATR. Essa técnica é caracterizada por ser uma espectroscopia de reflexão interna [113], em que a amostra entra em contato com um elemento de reflexão interna com alto índice de refração. Então a radiação (onda evanescente) atravessa o elemento de reflexão sendo

refletida e direcionada para um detector, conforme Figura 3.4.1. Vale ressaltar que os elementos de reflexão interna são cristais que possuem altos índices de refração, podendo ser: germânio, seleneto de zinco ou diamante.

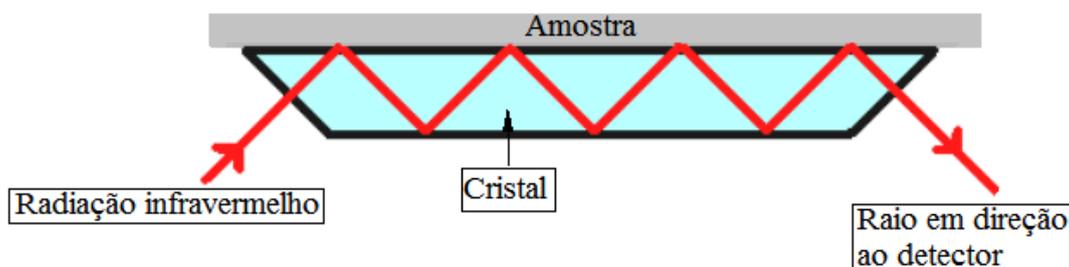


Figura 3.4.1: Esquema da técnica de FTIR-ATR, adaptada da referência [69].

No decorrer da análise, devido as várias reflexões que ocorrem ao longo do comprimento da amostra, a intensidade da radiação é atenuada e um espectro da superfície é gerado.

3.5. *Magnetometria de Amostra Vibrante*

A técnica de magnetometria de amostra vibrante, do inglês *Vibrating Sample Magnetometry*, foi descrita por Foner em um artigo publicado em (1959) [114]. A partir de então, a técnica foi bastante utilizada devido a facilidade e o bom desempenho do equipamento para medir o momento magnético. Na Figura 3.5.1 observa-se o diagrama de um VSM. No vibrador é fixada uma haste rígida por uma das extremidades, desse modo, impõe-se um movimento de vibração na amostra, que é colocada presa na extremidade oposta da haste. Posteriormente é aplicado um campo magnético perpendicular a direção de vibração da amostra, desse modo se a amostra for magnética irá induzir uma variação de fluxo magnético nas bobinas captadoras. Assim, quando a amostra vibra a uma dada frequência f , uma voltagem E é induzida nas bobinas captadoras e esta voltagem é expressa matematicamente na equação (3.5.1) [115]:

$$E = \sigma GA 2\pi f \cos(2\pi ft) \quad (3.5.1)$$

Em que σ é o momento magnético da amostra, G é uma variável que depende da geometria das bobinas captadoras, A é a amplitude de vibração e t o tempo de medida.

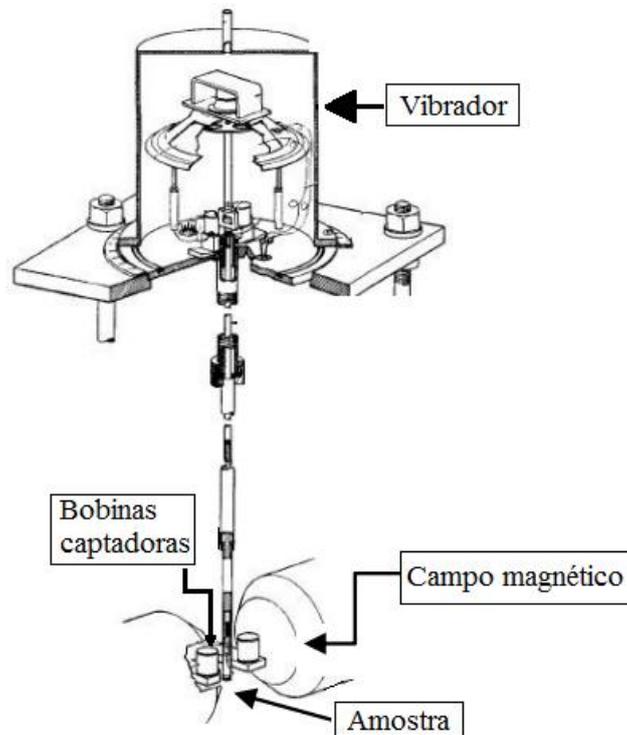


Figura 3.5.1: Esquema de um magnetômetro de amostra vibrante, adaptada da referência [114].

3.6. Caracterização ferroelétrica via circuito Sawyer-Tower

A medida ferroelétrica é utilizada para caracterizar a amostra, analisando o comportamento da polarização sob a influência de um campo elétrico externo oscilante. A partir de então, torna-se possível verificar há formação de uma curva de histerese e assim extrair informações sobre o ordenamento elétrico dos materiais. Existem alguns circuitos que são utilizados para obter resultados de ferroeletricidade, no caso dessa pesquisa utilizou-se um circuito Sawyer-Tower, que tem estudos sobre a técnica divulgados a partir de 1930 [116].

Na Figura 3.6.1 é exposto o esquema de um circuito Sawyer-Tower. Neste, um capacitor ferroelétrico (amostra) é ligado em série a um capacitor de referência (C_0).

Em paralelo a essa ligação são conectados em série dois resistores, um de alta resistência elétrica (R_1), e outro de baixa resistência elétrica (R_2). O circuito é alimentado por uma fonte de tensão alternada ($V(t)$) e o osciloscópio mede a queda de tensão na posição (X), após (R_1) do ramo 1 e em (Y) no ramo 2 do circuito. As variáveis (C_0) e (R_2) tem a função de ajuste da intensidade dos sinais que passam, por ambos os ramos (1 e 2), para que tenham aproximadamente a mesma amplitude e para que essa amplitude esteja entre os limites de escala do osciloscópio.

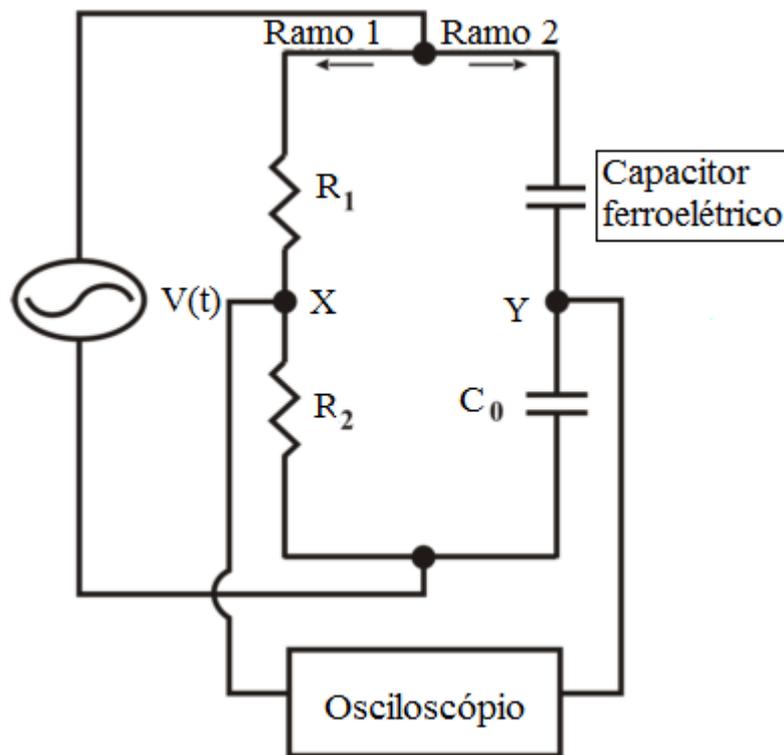


Figura 3.6.1: Esquema de um circuito Sawyer-Tower, adaptado da referência [10].

As leituras de tensão, V_x e V_Y obtidas respectivamente nos ramos (1 e 2) do circuito Sawyer-Tower descrito anteriormente, podem ser convertidas em resultados de campo elétrico E e polarização elétrica P [117], com base nas seguintes equações:

$$E = \frac{V_x R_1}{d_F R_2} \quad (3.6.1)$$

$$P = \frac{V_Y}{A_F} C_0 \quad (3.6.2)$$

Em que R_1 e R_2 são respectivamente o primeiro e o segundo resistor do ramo(1), d_F é a espessura do capacitor ferroelétrico, A_F é a área do capacitor ferroelétrico e C_0 é o capacitor de referência do ramo (2).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Após fazer uma breve abordagem teórica sobre as técnicas experimentais utilizadas no decorrer da pesquisa, é importante saber como foram realizados os procedimentos experimentais. Desse modo, é exposto na Figura 4.1 um fluxograma com as duas etapas sobre os procedimentos adotados no trabalho. Logo a etapa I consta dos procedimentos com as amostras sinterizadas que não foram imersas em SBF, enquanto que a etapa II é referente aos procedimentos com as amostras sinterizadas que foram imersas em SBF.

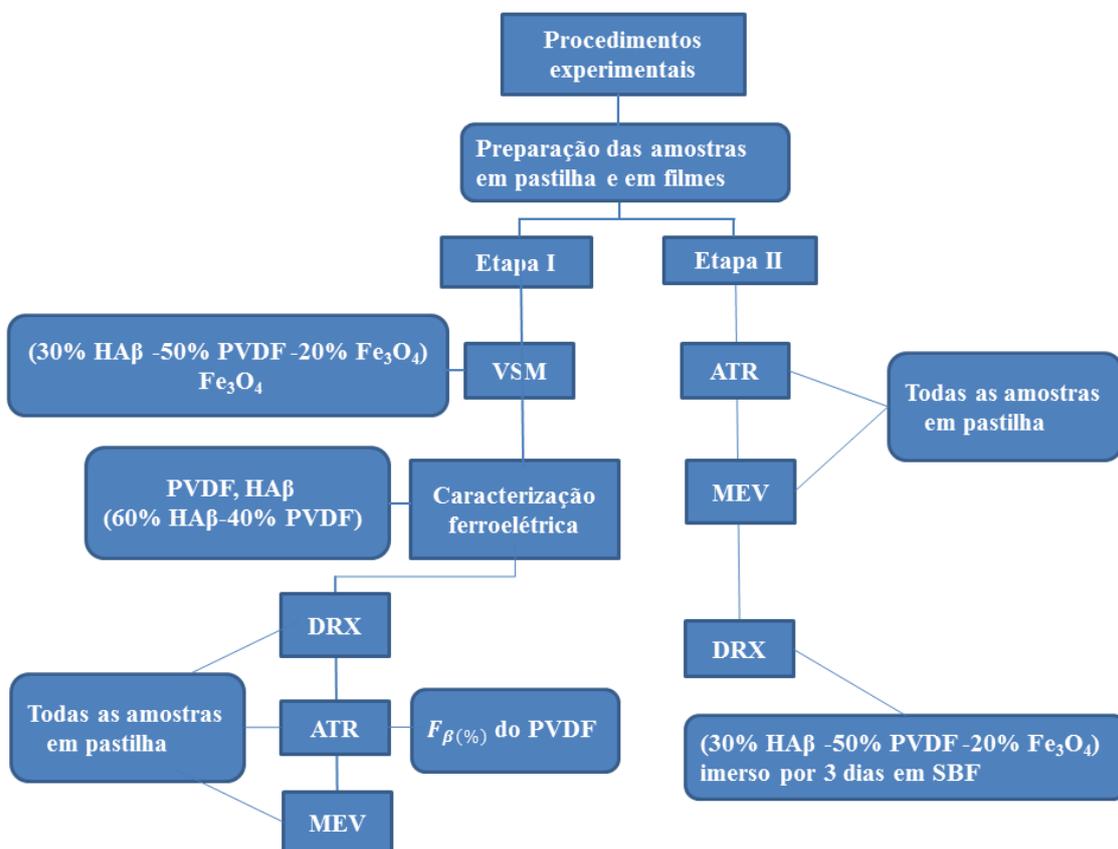


Figura 4.1: Fluxograma dos procedimentos experimentais.

4.1. Obtenção dos precursores e preparação das amostras em pastilhas

As amostras precursoras, poli(fluoreto de vinilideno), magnetita e fosfato de cálcio bifásico, utilizadas na pesquisa foram obtidas de diferentes maneiras. O PVDF na forma de pó foi obtido do fabricante Alfa Aesar com pureza analítica (PA) de 99,8%. A magnetita obtida na pesquisa foi produzida e cedida por Bini (2016) [50], produzida pelo método de polimerização e sintetizada a 500 °C. O HA β obtido a partir de ossos de peixes da espécie linguado, *pleuronectiformes* com tamanho entre 30 a 40 centímetros de comprimento, foi produzido e cedido por Weinand (2005) [118].

De posse dos materiais precursores, foram preparados os compósitos nas proporções de 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄. Para a produção das amostras compostas, utilizou-se a regra das misturas demonstrada na dissertação de Silva (2015) [45].

Primeiramente, as massas dos precursores na forma de pó foram aferidas em uma balança digital Shimadzu AUW220D, com precisão de 10⁻⁵g. Em seguida, foram misturados e homogeneizados em um almofariz de ágata por 10 minutos, então as amostras foram compactadas em uma prensa uniaxial a frio de ação simples, que de acordo com Albaro (2001) [119] é a mais indicada para compósitos cerâmicos com espessura reduzida e geometria simples. A partir de então as amostras foram compactadas, sendo mantidas na prensa por 90 segundos. O polímero e os compósitos foram compactados a 6 MPa, enquanto que na cerâmica bifásica foi utilizada uma pressão de compactação de 294 MPa. A diferença nos valores da pressão de compactação se deve ao fato do HA β não compactar com pressão inferior a 294 MPa, ao contrário do precursor PVDF e dos compósitos.

Após prensadas, as amostras foram sinterizadas em um forno tipo mufla CPU-3P-LCD em variadas configurações. O HA β foi sinterizado a 1100 °C por uma hora, enquanto que o PVDF e os compósitos foram consolidados a 170 °C (temperatura de fusão do PVDF) por 1 hora. Em geral as amostras foram retiradas do forno 24 horas após o processo encerrado, o resfriamento não foi controlado, ocorrendo por inércia térmica.

4.1.1. *Preparação das amostras em filme de poli(fluoreto de vinilideno)*

Para a produção dos filmes de PVDF utilizou-se também o precursor na forma de pó. Os filmes foram produzidos pelo método de cristalização a partir da solução, com concentração de 0,25g/ml utilizando o solvente N,N Dimetilformamida com pureza analítica de 99,8%.

A solução composta de PVDF e DMF foi diluída completamente em banho térmico com velocidade de agitação de 60 RPM, formando uma mistura homogênea. Em seguida, o fluido foi posto em um recipiente e colocado na estufa. Na tabela 4.1.1 observa-se as diferentes configurações que as soluções compostas do soluto e do solvente foram submetidas para a obtenção das amostras nomeadas como filmes 1, 2, 3 e 4.

<i>Amostras</i>	<i>Tempo/Temperatura (Banho Térmico)</i>	<i>Tempo/Temperatura (Estufa)</i>
<i>Filme 1</i>	1 hora/55 °C a 63 °C	1 hora/60 °C
<i>Filme 2</i>	2 horas/55 °C a 63 °C	1 hora/60 °C
<i>Filme 3</i>	2 horas/55 °C a 63 °C	4 horas/ 60 °C
<i>Filme 4</i>	0,41 horas/70 °C a 74 °C	5,5 horas/70 °C

Tabela 4.1.1: Diferentes configurações do banho térmico e da estufa, para a produção dos filmes 1, 2, 3 e 4 de poli(fluoreto de vinilideno).

4.2. *Experimento in vitro*

O teste de bioatividade foi realizado com o SBF convencional, preparado de acordo com o método proposto por Kokubo e colaboradores (2006) [23]. Depois de preparado, o SBF foi armazenado em um recipiente de polietileno vedado, em temperatura entre 5 °C a 10 °C até o momento de ser utilizado.

Para avaliar o comportamento bioativo das amostras produzidas, foi necessário que as mesmas estivessem devidamente limpas, para não contaminar o fluido e assim não comprometer o objetivo de verificar a bioatividade do compósito. Desse modo, todas as amostras foram primeiramente lixadas e em seguida lavadas três vezes

em ultrassom. Em cada lavagem as amostras foram mantidas imersas em etanol por um intervalo de tempo de cinco minutos e posteriormente, foram colocadas em uma estufa a temperatura de 30 °C por 12 horas.

As amostras possuíam área superficial aproximada de 58,5 mm². De acordo com Kokubo e colaboradores (2006) [23], para essa área superficial, o volume de SBF calculado foi de 5,85 ml, porém como trata-se de um material poroso a quantidade de SBF foi superestimada e as amostras ficaram imersas em 12 ml de fluido corpóreo simulado. A temperatura foi mantida em 36,5 °C e o pH em aproximadamente 7,4 por um período máximo de 7 dias.

Na Figura 4.2.1 é apresentada uma ilustração do teste de bioatividade que foi realizado com (C.E. = 0 V/mm) (sem aplicação de campo elétrico), simultaneamente com o (C.E. = 0,308 V/mm) (com aplicação de campo elétrico externo), ambos em banho térmico (i) a 36,5 °C aproximadamente. Para o teste sem campo elétrico, na Figura 4.2.1 foram imersas: 1 amostra de PVDF, 1 amostra de HAβ e 4 amostras do compósito 60%HAβ-40%PVDF. As amostras representadas em (a) foram fixadas com presilhas (b) e colocadas em tubos falcon (c), com 12 ml de SBF. Houve troca do SBF a cada 24 horas durante os 7 dias de imersão .

Ainda na Figura 4.2.1 é possível notar o esquema com (C.E. = 0,308 V/mm), que foi imerso por 7 dias em SBF e recebeu a aplicação de 12 horas por dia. Neste, também foi realizada a troca do fluido uma vez por dia das amostras. As amostras representadas em (d) foram presas com suportes (b) e imersas em SBF em tubos falcon de 15 ml (f). Foi realizada uma soldagem dos fios de cobre (h) com tinta prata no tubo facon (f) em lados opostos, produzindo assim contato elétrico nos eletrodos. Para tornar a tinta prata condutiva a eletricidade, os tubos (f) pintados e já com os fios de cobre, foram colocados em uma estufa por 120 minutos a 75 °C, com o objetivo de degradar o material orgânico presente na tinta. Por fim, os tubos representados em (f) já preparados, foram envoltos por tubos falcon 50 ml (g) contendo óleo de silicone. O objetivo do óleo de silicone (material que possui alta rigidez dielétrica) é evitar possível condução (faísca) entre os eletrodos.

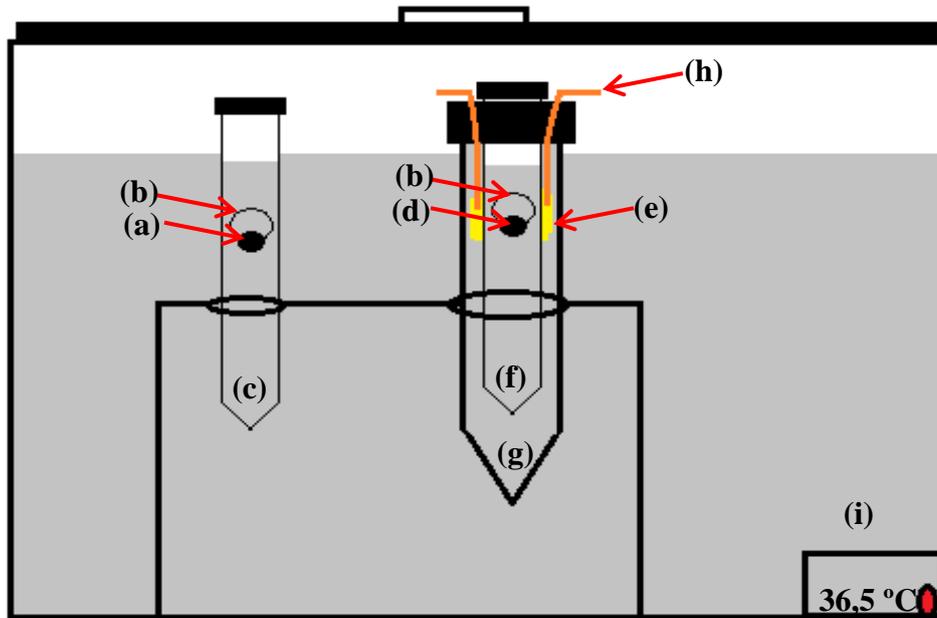


Figura 4.2.1: Esquema do teste de bioatividade realizado por 7 dias com o (C.E. = 0 V/mm) e com (C.E. = 0,308 V/mm). Na ilustração, a amostra (a) em pastilha suspensa em SBF por uma presilha (b), ambos contidos em um tubo falcon (c) de 15 ml, grupo controle. Na parte experimental com campo elétrico, foi realizada em (h) solda dos fios de cobre, conectados a eletrodos de tinta prata (e) em faces opostas do tubo falcon (f) e encaixados dentro de um tubo falcon de 50 ml (g). As amostras com aplicação de campo elétrico, pastilha (d) também foram fixadas em presilhas (b) e imersas em SBF em tubos falcon de 15 ml (f) com aplicação de 0,308 V/mm em banho térmico (i) à temperatura de 36,5 °C.

Para a aplicação do campo elétrico foi utilizado um gerador de função, com o qual foi gerado uma tensão senoidal de 0,5 V (Vpp) com frequência de 3 Hz, uma amplificadora TREK para amplificar a tensão para 5 V. Como resultado obteve-se um campo elétrico de 0,308 V/mm, que foi aplicado durante 12 horas por dia no decorrer de 7 dias. O grupo de amostras submetidas ao teste de bioatividade foram analisadas parte após completarem 3 dias submergidas e o restante somente com 7 dias de imersão.

Na Figura 4.2.2 é apresentada uma ilustração do teste de bioatividade que foi realizado com (C.M. = 0 Oe) (sem aplicação de campo magnético), simultaneamente com (C.M. = 6 Oe), ambos em banho térmico (f) à aproximadamente 36,5 °C.

Para o teste sem campo magnético, na Figura 4.2.2 foram imersas: 1 amostra de PVDF, 1 amostra de HA β e 4 amostras do compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄. As amostras representadas em (a) foram fixadas com presilhas (b) e colocadas em tubos falcon (c), com 12 ml de simulador de fluido corpóreo. Assim como no teste realizado anteriormente, neste também foram realizadas as trocas do fluido “velho” por um “novo” diariamente durante os 7 dias.

Foi aplicado um campo magnético alternado 24 horas por dia de 6 Oe com frequência de 1 kHz, por meio de um amplificador/gerador de campos magnéticos, conectado nas bobinas (d).

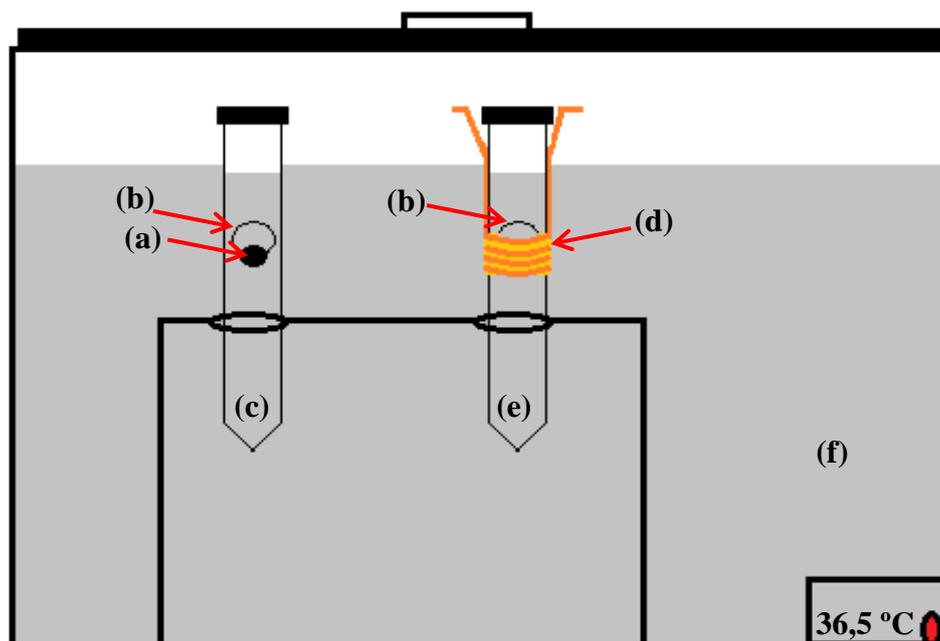


Figura 4.2.2: Esquema do teste de bioatividade realizado por 7 dias com (C.M. = 0 Oe) (sem influência externa) e com (C.M. = 6 Oe) (com aplicação de campo magnético alternado). Na ilustração, a amostra (a) é fixada por uma presilha (b), ambas ficam imersas no fluido corpóreo simulado em um tubo falcon (c) de 15 ml, grupo controle. Na parte experimental o campo magnético alternado foi aplicado por meio de uma bobina de fios de cobre (d), fixada no tubo falcon (e). Com o aparato experimental pronto e as amostras preparadas, foram colocadas em banho térmico (f) a 36,5 °C.

Ao término dos testes de bioatividade, adotou-se um procedimento padrão com todas as amostras. As amostras foram retiradas do SBF, enxaguadas levemente com água Mili-Q e em seguida foram colocadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 16 horas. Depois de secas, as amostras foram armazenadas em recipientes adequados até serem analisadas.

4.3. *Difração de Raios X*

Foram realizadas as análises de difração de raios X nos compósitos de 60%HA β -40%PVDF, 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄, nos precursores HA β e PVDF

sinterizados na forma de pastilhas. Para a análise foi utilizado o difratômetro Shimadzu XRD-7000, com radiação de Cu K α configurado com velocidade de varredura de 2°/min e tempo de aquisição de 0,6s na faixa de varredura de 10° a 80°. Após a imersão em SBF foi realizado análise com radiação de molibdênio, ângulo rasante e θ fixo nos compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ que foram imersas por três dias. O difratômetro utilizado pertence ao Grupo de Desenvolvimento de Dispositivos Multifuncionais (GDDM) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Na precursora magnetita a análise foi feita na amostra em pó, cedida por Bini (2016) [50].

4.4. Magnometria de Amostra Vibrante

A investigação da resposta magnética das amostras compostas 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ sinterizadas a 170 °C e da precursora magnetita sintetizada a 500 °C foram realizadas no magnetômetro de amostra vibrante (VSM) construído pelo GDDM, da Universidade Estadual de Maringá. A medida foi realizada no compósito em pastilha à temperatura ambiente com campo máximo de 15 kOe. A medida da magnetita foi cedida por Bini (2016) [50], realizada com a precursora em pó, à temperatura ambiente com campo máximo de 15 kOe.

4.5. Caracterização ferroelétrica via circuito Sawyer-Tower

As curvas de histerese ferroelétricas foram obtidas usando um circuito Sawyer-Tower, instalado no Grupo de Desenvolvimento de Dispositivos Multifuncionais da Universidade Estadual de Maringá. As medidas foram conduzidas a frequência de 30 Hz a temperatura ambiente, nas amostras de PVDF, HA β e do compósito 60%HA β -40%PVDF.

4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises de MEV foram realizadas nas amostras de PVDF, HA β e nos compósitos 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ que foram

sinterizadas e lixadas e também foram analisadas as amostras que foram submetidas ao teste bioatividade descrito anteriormente. As amostras foram fraturadas e em seguida submetidas à deposição de uma fina camada condutora de ouro pelo processo de *Sputtering*, para então serem colocadas no microscópio para realizar as análises. Foi utilizado um microscópio (Quanta 250) do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa.

4.7. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier no modo Reflexão Total Atenuada

A análise de FTIR-ATR foi realizada nas amostras de PVDF, HA β e dos compósitos com 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ que não foram imersas em SBF e também nas amostras que foram imersas em SBF por 3 e 7 dias. O objetivo da análise foi verificar a nucleação da camada de apatita formada e comparar com a amostra que não teve contato com o fluido. As medidas de FTIR-ATR foram realizadas em um espectrômetro Bruker (Vetex 70V). Neste, o espectro adquirido de cada amostra é resultado de uma média de 128 varreduras com resolução espectral de 4 cm⁻¹, obtidos no intervalo entre 4000 a 400 cm⁻¹.

5. RESULTADOS

5.1. Difração de raios X

Inicialmente foram caracterizados os precursores PVDF, HA β e Fe $_3$ O $_4$. O padrão de difração do PVDF apresentado na Figura 5.1.1, foi melhor indexado com as fases α e β . A fase α pertencente ao grupo espacial $P2_1/c$, com simetria monoclínica. A fase β faz parte do grupo espacial $Cm2m$, com simetria ortorrômbica. A presença da fase β pode ser notada pelos picos em 20,6° e em 56,1° que referem-se respectivamente aos planos cristalográficos (200) e (221). De acordo com Thurmer (2010) [120], a dificuldade de identificar picos referentes a fase β pode ocorrer devido a maior intensidade dos picos na fase α e pelo fato de alguns picos da fase β ficarem superpostos aos da α , como no caso do pico em $2\theta = (20,6^\circ)$ [63, 121-123].

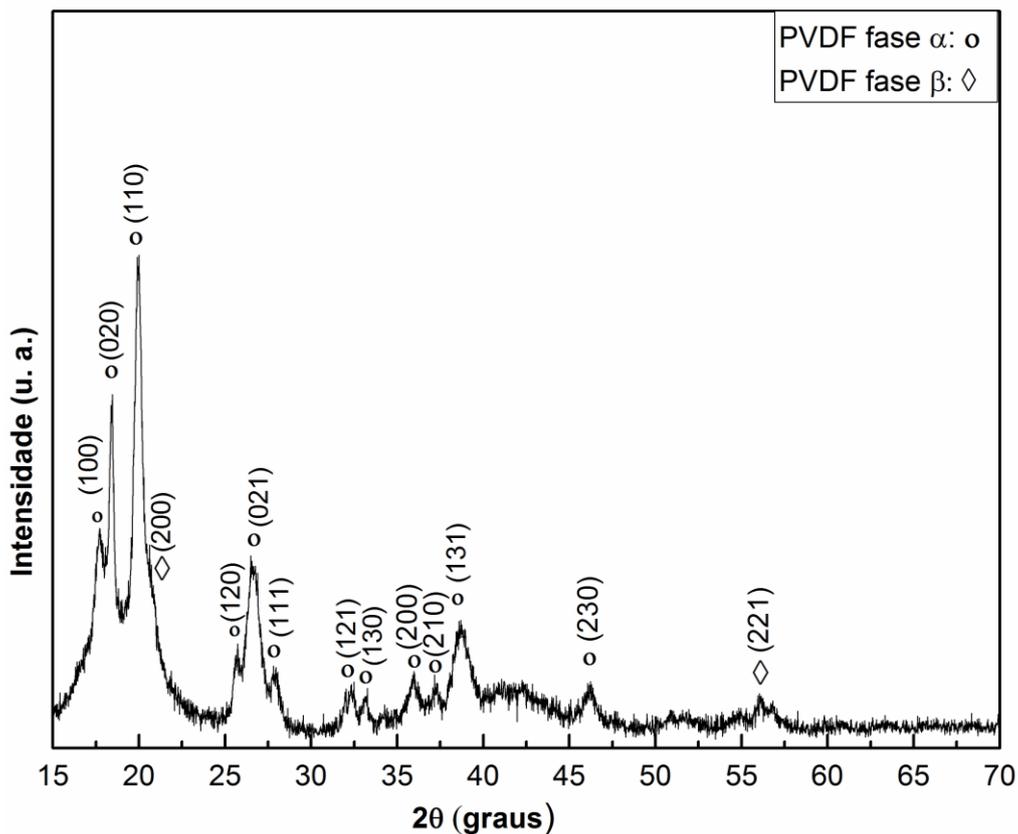


Figura 5.1.1: Padrão de difração de raios X obtido para o precursor PVDF em pastilha sinterizada. Na parte superior da Figura estão indicados os planos cristalográficos (hkl) referentes às fases cristalinas (α e β).

O difratograma de raios X da amostra de fosfato de cálcio bifásico é mostrado na Figura 5.1.2, na qual os padrões de difração foram indexados com as cerâmicas: HAp e β -TCP. A HAp com fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, possui estrutura de simetria Hexagonal do grupo espacial $P6_3/m$. A β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), tem simetria romboédrica do grupo espacial $R3c$. Em ambas as fases, foram identificados os índices de Miller dos respectivos padrões de difração.

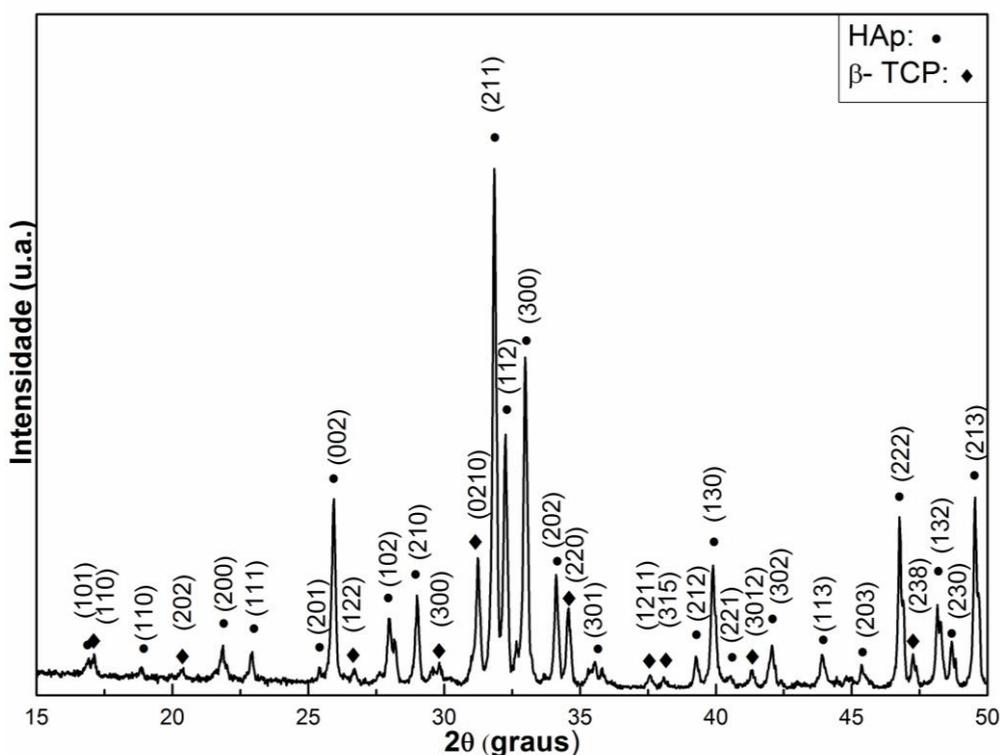


Figura 5.1.2: Difratograma de raios X do precursor HA β , compactada e sinterizada. Acima dos picos identificados, são destacados os respectivos índices de Miller (hkl).

A fase β -TCP ocorreu, pois os ossos utilizados para produzirem o HA β eram de peixes jovens com tamanho de 30 à 40 cm de comprimento, uma vez que, peixes maiores produzem somente a fase de hidroxiapatita[46,48]. Desse modo, o fosfato de cálcio utilizado na pesquisa pode ser classificado como uma cerâmica bifásica e será nomeada de (HA β). Segundo Ribeiro [48] a presença das duas fases é uma grande vantagem, pois quando imersa em meio fisiológico a cerâmica é mais reativa. Isto é, compósitos contendo a fase β -TCP com HAp assemelha-se mais a estrutura mineral encontrada em ossos vivos. Além disso, são mais reabsorvíveis e por

esse motivo as cerâmicas bifásicas apresentam em alguns casos, um desempenho melhor do que a HAp para implantes ou enxertos ósseos.

Na Figura 5.1.3 é caracterizado o difratograma do precursor magnetita, com fórmula química Fe_3O_4 . A magnetita pertence ao grupo espacial $Fd3m$ com estrutura de simetria cúbica do tipo espinélio inverso [50, 124].

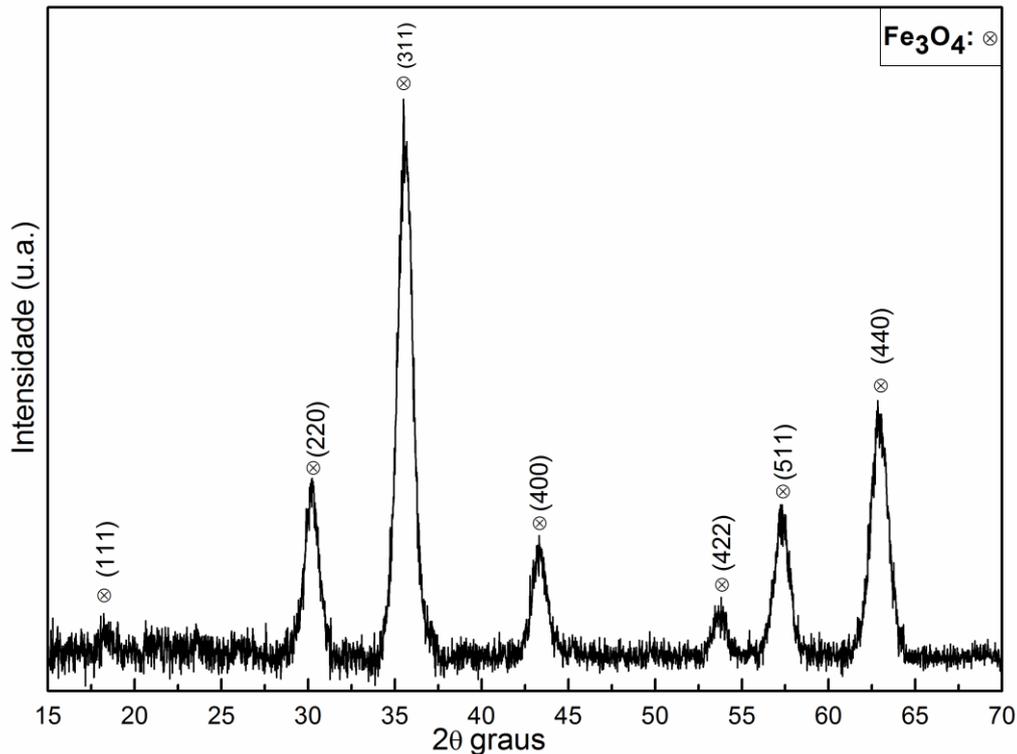


Figura 5.1.3: Difratograma de raios X do precursor magnetita. Acima dos picos são destacados seus respectivos índices de Miller (hkl).

Na Figura 5.1.4 é apresentado o difratograma do compósito 60%HA β -40%PVDF. O padrão de difração foi melhor indexado com as fases HAp e β -TCP. Outro aspecto importante a se destacar é que não foram detectados picos referentes ao precursor PVDF. No entanto é possível notar uma pequena elevação entre o intervalo de $2\theta = 15^\circ$ à 25° . Essa alteração no difratograma pode ter ocorrido devido a presença de fases cristalinas do precursor PVDF, assim como observado por Rosso (2013) [125]. A presença majoritária da HAp no difratograma do compósito binário se justifica pelo fato do índice de cristalinidade da cerâmica ser maior que do polímero. Além disso,

elementos leves como F, C, O, possuem coeficiente de espalhamento muito baixo. Assim o feixe de raios X é espalhado majoritariamente pela HA β .

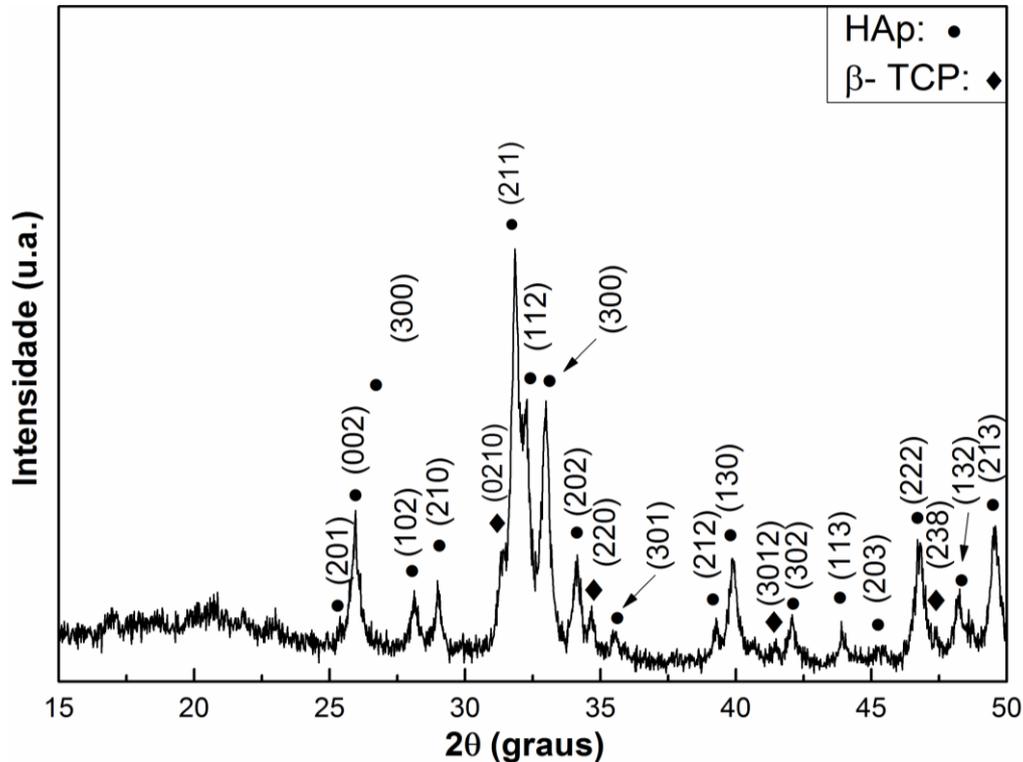


Figura 5.1.4: Difratoograma de raios X do composto 60%HA β -40%PVDF na forma de pastilha.

Na Figura 5.1.5 é apresentado o padrão de difração de raios X do composto 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ e seus respectivos índices de Miller. No difratograma foi possível identificar as fases cristalinas referentes aos três precursores HA β (fase HAp e β -TCP), PVDF (fase α) e a magnetita. O composto ternário apresentou um comportamento diferente do composto binário, com presença de picos referentes ao PVDF. Isso ocorreu devido ao aumento na porcentagem de PVDF quando comparado com o composto binário e também pelo fato da magnetita utilizada ser nanométrica.

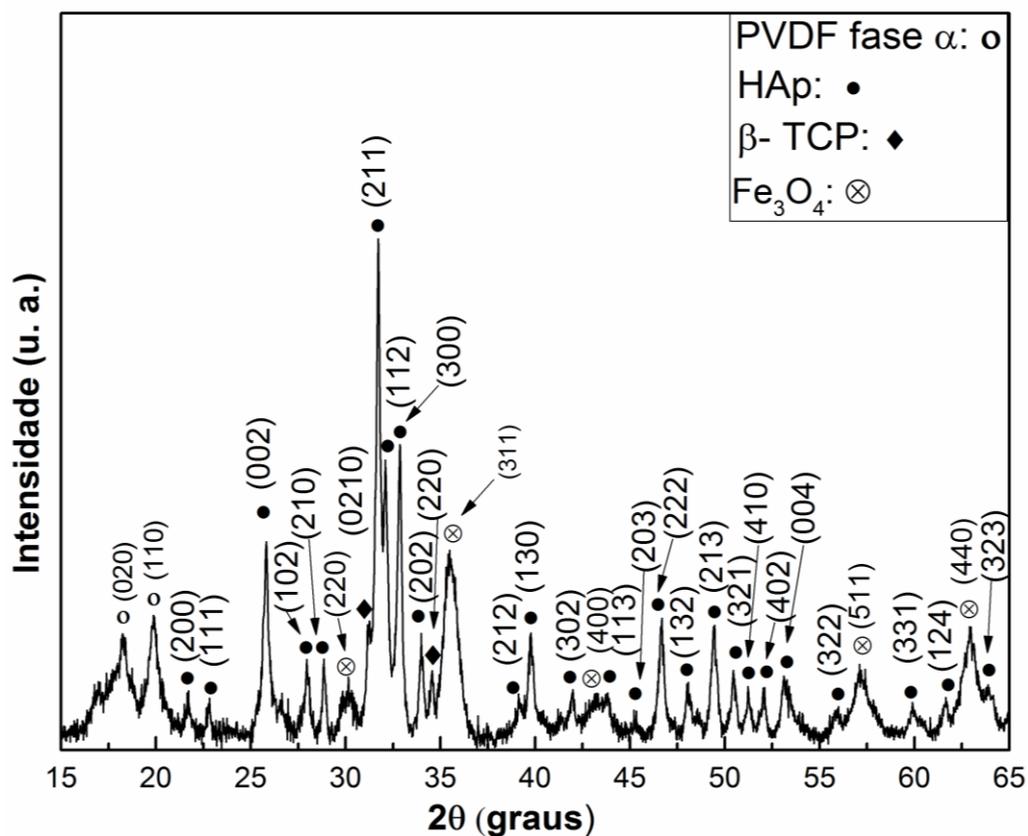


Figura 5.1.5: Difratoograma de raios X do composto 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ na forma de pastilha.

Apesar de não terem sido observados picos referentes à fase β do PVDF, não se descartou a hipótese da existência de fase nos compostos. Uma vez que os picos das cerâmicas e da magnetita são mais intensos e essa característica poderia justificar uma possível sobreposição de fases, dificultando assim a identificação de picos da fase β referentes ao poli(flúoreto de vinilideno).

5.2. Caracterização magnética e elétrica

5.2.1. Magnometria de Amostra Vibrante

Na Figura 5.2.1.1 é apresentada a curva de magnetização por campo magnético aplicado da precursora magnetita. Respostas de magnetização, como magnetização de saturação, indicam uma mudança no comportamento magnético da amostra. Observa-se um comportamento tipo superparamagnético, no qual os valores de magnetização de remanescência e a coercividade são muito pequenos. O valor obtido para a magnetização de saturação foi de 19,8 emu/g, esse valor é pequeno quando comparado com outros resultados de nanopartículas de magnetita preparadas experimentalmente, em que a magnetização de saturação varia de 30 à 50 emu/g [93, 127]. Há duas possíveis justificativas para essa ocorrência, de acordo com Bini (2016) [50]. A primeira se deve ao fato da partícula ser bem pequena, assim um grande número de ligações de super-troca são rompidas na superfície das nanopartículas e isso acarreta um desordenamento de spin nesta superfície. A segunda justificativa tem por base a existência de resquícios de PVA na superfície das nanopartículas, o que também pode causar uma redução da magnetização da precursora.

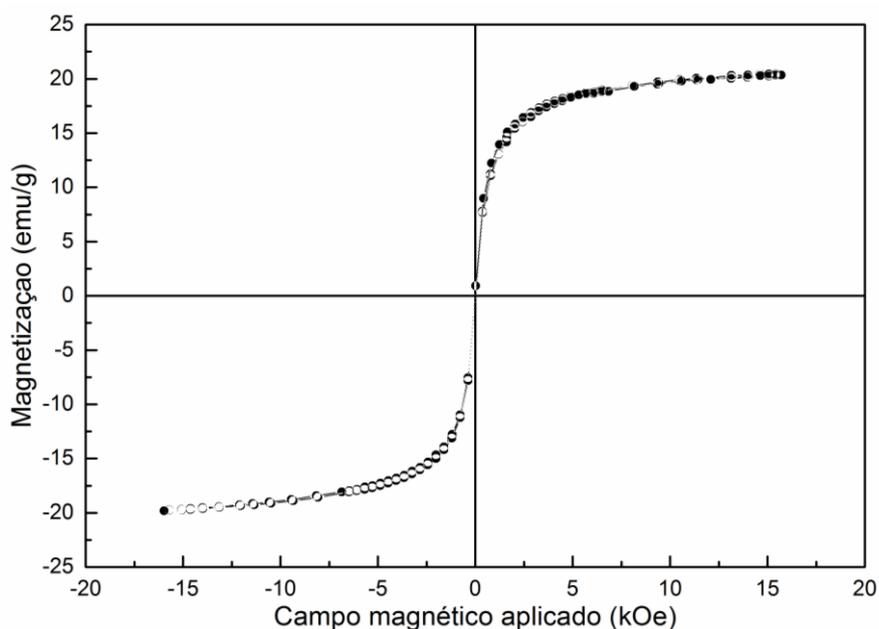


Figura 5.2.1.1: Curva de magnetização versus campo magnético aplicado da precursora magnetita.

Na Figura 5.2.1.2 é apresentada a curva de magnetização versus campo magnético aplicado do compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄. A magnetização de saturação do compósito foi de 6,05 emu/g valor pequeno quando comparado com a magnetização de saturação da magnetita precursora que foi de 19,8 emu/g. Essa redução era esperada, visto que o fosfato de cálcio bifásico e o poli(fluoreto de vinilideno) são diamagnéticos [128,129]. Outro fator que influencia nesse dado é a proporção de magnetita incorporada no compósito ternário ser de apenas 20%. Ainda assim, o compósito preserva propriedades magnéticas que o tornam interessante para as aplicações aqui propostas.

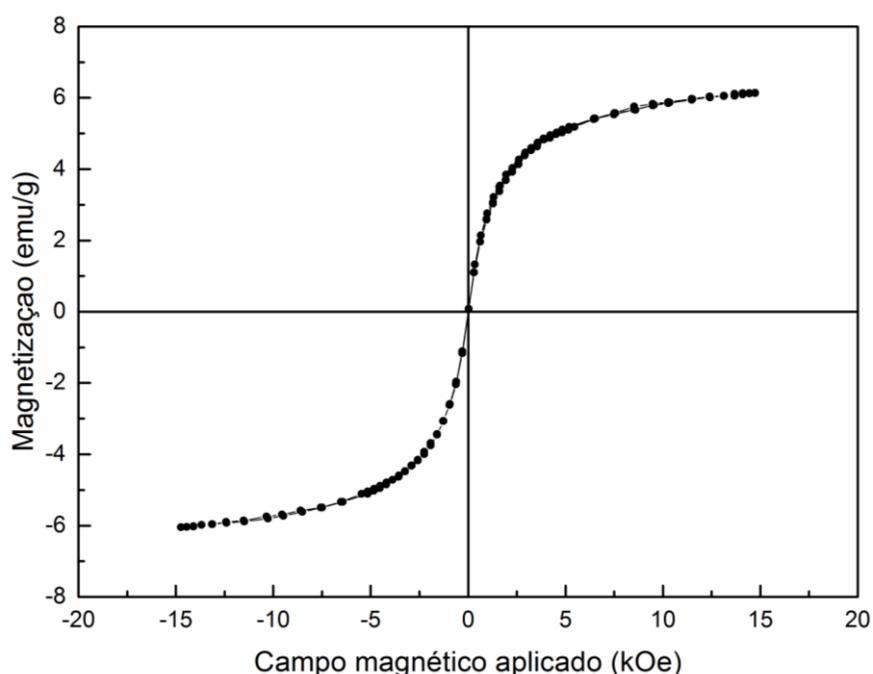


Figura 5.2.1.2: Curva de magnetização versus campo magnético aplicado do compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ sinterizado.

5.2.2. Comportamento ferroelétrico

Existem outros estudos sobre biocompósitos polarizados eletricamente [130-132] que foram realizados em experimentos *in vitro* e *in vivo*. A alta bioatividade foi observada em cerâmicas e compósitos polarizados, com elevada

segregação/adsorção e formação de células ósseas em suas superfícies carregadas negativamente. De fato, relatos anteriores revelaram a influência das superfícies eletricamente carregadas na atividade de biomateriais, indicando o alto potencial dos materiais piezoelétricos para catalisar respostas biológicas [133].

Na Figura 5.2.2.1 observa-se o comportamento da curva de polarização por campo elétrico dos precursores HA β (a), PVDF (b) e do compósito 60%HA β -40%PVDF (c). Nota-se que o fosfato de cálcio bifásico revela um comportamento quase paraelétrico, sobreposto com uma pequena curva de histerese, assim como relatado por Lang e colaboradores (2013) [134]. Diferentemente o PVDF (b) apresentou uma histerese ferroelétrica, porém com resposta não tão elevada, esse resultado segundo Ikeda e colaboradores (1985) [135], justifica-se devido à existência de certa quantidade de fase amorfa (paraelétrica) na amostra, simultaneamente com a presença de fases cristalinas polares no polímero.

Figura 5.2.2.1 (c) observa-se o comportamento da curva de polarização por campo elétrico do compósito 60%HA β -40%PVDF. Nota-se que a existência de histerese ferroelétrica atesta o caráter polar do compósito multifuncional obtido. Percebe-se uma espécie de resposta ferroelétrica sobreposta ao comportamento paraelétrico, compreendida pelos comportamentos do PVDF e do HA β . De fato, uma maior polarização remanescente, alcançada sob campos elétricos muito baixos, foi observada para o compósito. Esse comportamento ferroelétrico, associado a uma resposta piezoelétrica, pode ser potencialmente utilizado em aplicações biomédicas avançadas, como a aceleração do processo de cicatrização de fraturas ósseas, utilizando campos elétricos como estímulos externos [136].

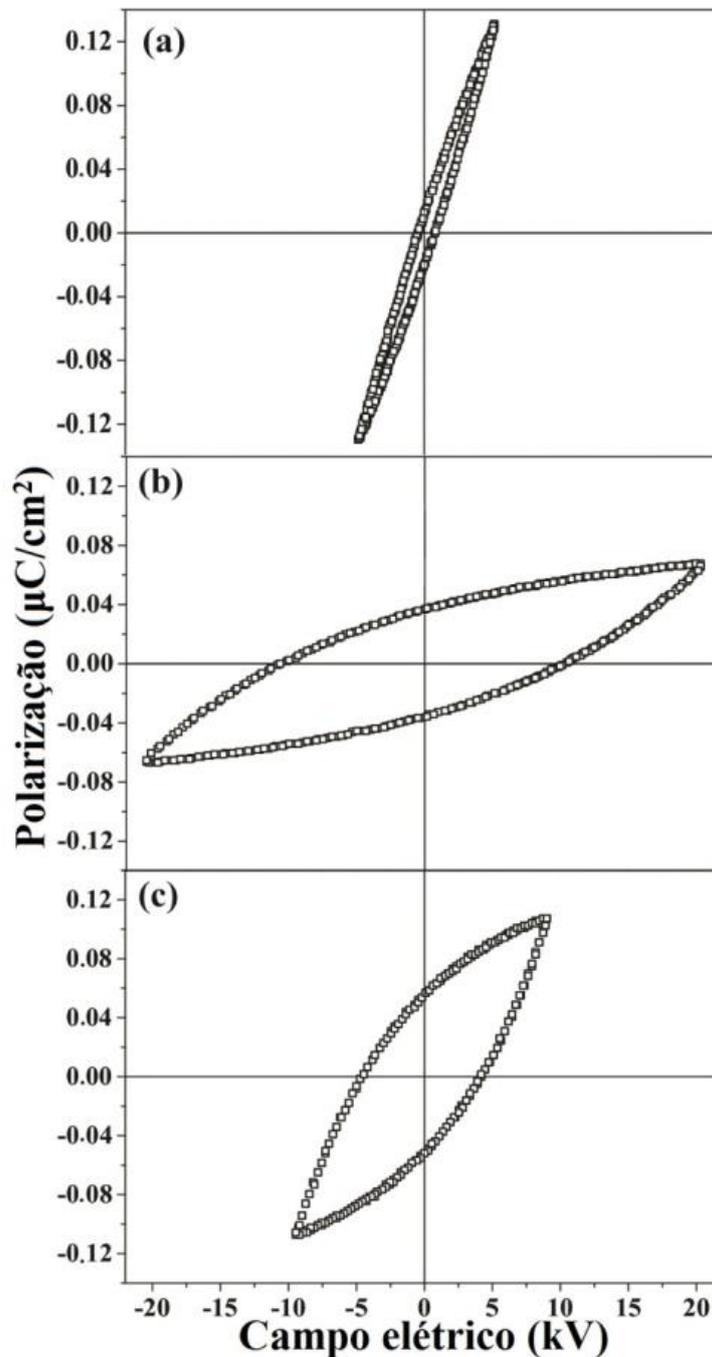


Figura 5.2.2.1: Curvas de polarização como função do campo elétrico aplicado, adquiridas com a frequência de 30 Hz, para HA β (a), PVDF (b) e o compósito (60%HA β -40%PVDF) (c).

5.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier no modo Reflexão Total Atenuada

Estudos de FTIR-ATR foram conduzidos em amostras de PVDF, sinterizadas com o intuito de verificar a existência de vibração referentes à fase β .

Na Figura 5.3.1 observa-se os espectros de absorvância no infravermelho do precursor PVDF em pó, em pastilha sinterizada e em filmes com diferentes procedimentos de preparação, sendo: filme 1 (1 hora no banho térmico com temperatura variando de 55 °C a 63 °C + 1 hora na estufa a 60 °C), filme 2 (2 horas no banho térmico com temperatura variando de 55 °C a 63 °C + 1 hora na estufa a 60 °C), filme 3 (2 horas no banho térmico com temperatura variando de 55 °C a 63 °C + 4 horas na estufa a 60 °C) e filme 4 (0,41 horas no banho térmico com temperatura variando de 70 °C a 74 °C + 5,5 horas na estufa a 70 °C). Todas as amostras apresentam polimorfismo, ou seja, a presença de diferentes fases cristalinas.

Na amostra de PVDF em pó, a fase α é evidenciada pelas bandas de absorção em 408, 488, 530, 615, 766, 796, 855, 875, 976, 1150, 1184, 1209, 1382, 2977 e 3023 cm^{-1} [136-140]. Enquanto que na fase ferroelétrica β , foram identificadas as bandas com comprimento de onda em 511, 840, 1071, 1273 e 1428 cm^{-1} [137,139, 140]. A banda em 1404 cm^{-1} pode ser atribuída tanto à fase α , como à fase β ou ainda à fase γ , também foi caracterizada a banda em 1450 cm^{-1} referente a um defeito na cadeia do polímero [136]. Além disso, foi detectada uma banda de baixa intensidade em 950 cm^{-1} [140], referente à fase γ do polímero nos espectros do PVDF em pó e em pastilha.

No polímero na forma de pastilha sinterizada por 1 hora, foram identificadas as bandas de absorção em 408, 488, 530, 615, 766, 796, 875, 976, 2977 e 3023 cm^{-1} referentes a fase α [136-139]. Na fase β , foram detectadas as bandas de absorção em 444, 472, 511, 840, 1071, 1273 e 1428 cm^{-1} [137, 139, 140]. A banda em 1173 cm^{-1} pode ser atribuída tanto à fase β quanto à fase γ [113]. Foram identificadas as bandas em 1404 e 1450 cm^{-1} assim como na amostra em pó. As bandas em 2850 e 2920 cm^{-1} correspondem a grupos de CH_2 no PVDF [141, 142].

Observa-se ainda na Figura 5.3.1 que os espectros referentes às amostras do polímero em filmes também apresentaram bandas características da fase α , β e γ . Os espectros referentes aos filmes (1), (2), (3) e (4) apresentaram as bandas 615, 766, 875, 2977 e 3023 cm^{-1} pertencentes à fase α do PVDF [136-139]. Enquanto que a fase β corresponde as bandas de absorção 472, 511, 840 e 1071 cm^{-1} [137, 139, 140]. A fase γ foi detectada nas bandas em 431, 812, 950 e 1234 cm^{-1} [137, 140, 143]. Foram detectadas outras três bandas, sendo a banda em 1450 cm^{-1} caracterizada por ser um defeito na cadeia do polímero, a banda em 1404 cm^{-1} caracterizada pela possibilidade de

pertencer a uma das três fases supracitadas e a banda em 1173 cm^{-1} que pode ser atribuída tanto à fase β quanto à fase γ .

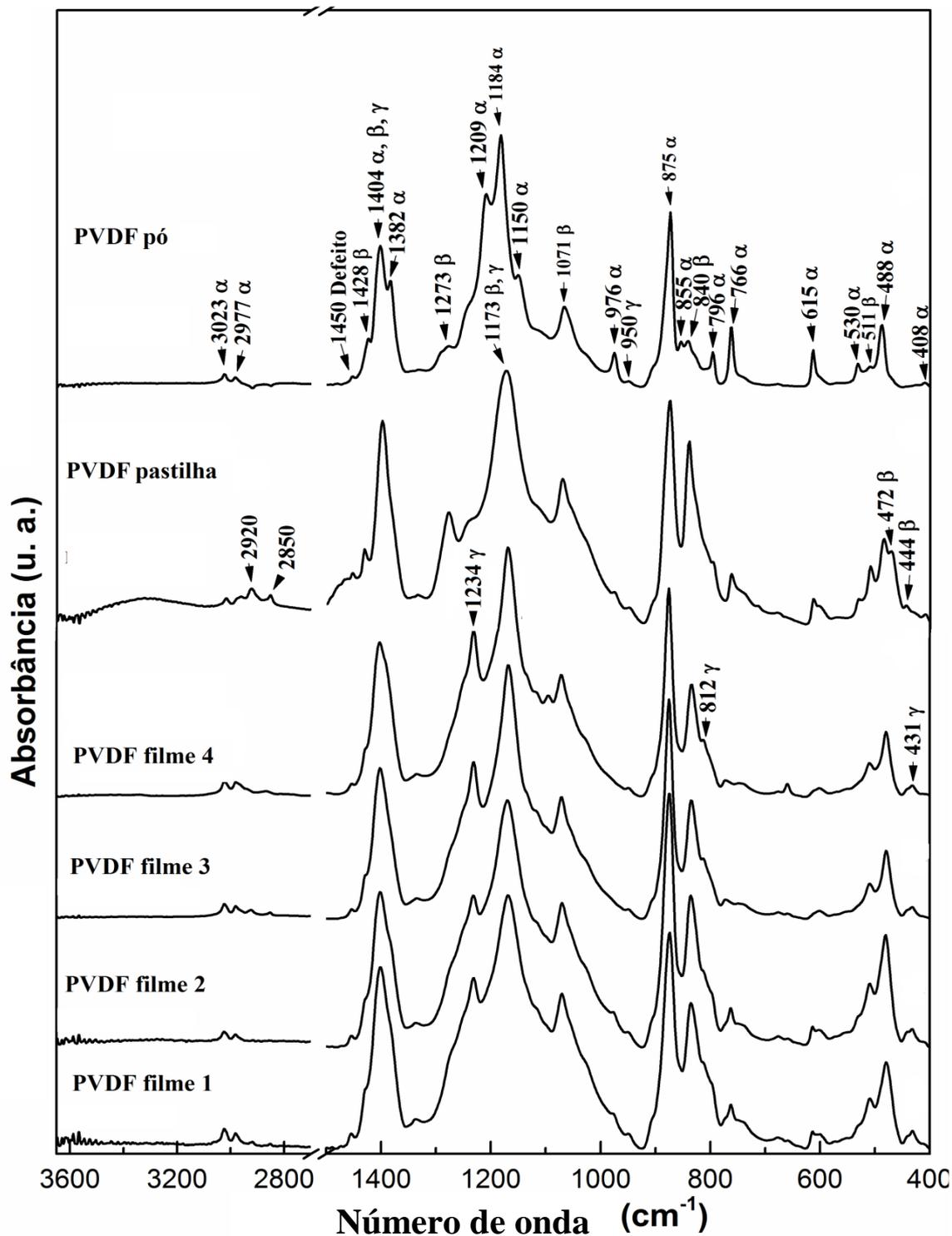


Figura 5.3.1: Análise de FTIR-ATR do precursor poli(fluoreto de vinilideno) em pó, em pastilha sinterizada e em filmes: filme 1, filme 2, filme 3 e filme 4.

De modo geral, ao observar a Figura 5.3.1 nota-se que há uma mudança na morfologia dos espectros, ao comparar o polímero em pó, com a pastilha e os filmes. A amostra em pastilha apresentou o surgimento de novas bandas da fase β em conjunto com outras, enquanto as amostras em filme surgiram bandas da fase γ .

O método utilizado para a produção dos filmes de PVDF teve por base um levantamento bibliográfico sobre procedimentos de cristalização a partir da solução. Nos trabalhos analisados [68, 139, 144, 145], observou-se que para a produção dos filmes com fase β exclusiva, a temperatura utilizada variou de 60 a 80° C. Para a produção dos filmes 1, 2, 3 e 4 a temperatura variou de 55 a 74 °C, com base nessa informação não era esperada a presença de fase γ . Entretanto, sabe-se também que a taxa de evaporação do solvente pode influenciar de modo significativo na predominância de fase β da amostra, assim como a concentração da solução pode ter influenciado no resultado.

Devido o PVDF ser um termoplástico semicristalino, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier no modo reflexão total atenuada propiciou a identificação das fases cristalinas nas amostras analisadas. Também foi possível determinar o teor de fase β das amostras, com exceção dos filmes 1, 2, 3 e 4 devido a quantidade de bandas referentes a fase γ .

Na tabela 5.3.1 é destacado o percentual de fase β das amostras de poli(fluoreto de vinilideno) em pastilha após ter sido compactada e sinterizada e em pó sem nenhum tratamento. O $F_{\beta(\%)}$ pode ser obtido a partir da equação (2.4.3), utilizando as bandas 766 cm^{-1} (fase α) e 840 cm^{-1} (fase β).

<i>Amostras</i>	<i>$F_{\beta(\%)}$, calculada com as bandas (840 e 766 cm^{-1})</i>
<i>PVDF pó</i>	44,5%
<i>PVDF pastilha</i>	77%

Tabela 5.3.1: Percentual de fase β ($F_{\beta(\%)}$) do precursor poli(fluoreto de vinilideno) em pó e em pastilha sinterizada, calculada com base na equação (2.4.3).

Observa-se na tabela 5.3.1 que a amostra de PVDF em pó, obteve ($F_{\beta(\%)}$) de 44,5% para o cálculo com as bandas 766 cm^{-1} (fase α) e 840 cm^{-1} (fase β). A pastilha de PVDF que foi compactada e sinterizada a 170 °C obteve um aumento na

porcentagem de fase β em comparação com a amostra em pó, atingindo o ($F_{\beta(\%)}$) de 77%.

Salimi e colaborador (2003) [70] também trabalharam com o PVDF sem o uso de solvente, para tentar obter maior percentual de fase β . Na pesquisa, duas marcas de poli(fluoreto de vinilideno) Kynar 720 e Hylar MP10 foram submetidas a tratamento térmico e a estiramento. Com base nas bandas 530 cm^{-1} (fase α) e 840 cm^{-1} (fase β) os autores verificaram que o ($F_{\beta(\%)}$) no PVDF Kynar 720 foi de 74%, enquanto que no PVDF Hylar MP10 foi de 69%. Foram encontrados também alguns trabalhos [62, 68, 71], que utilizaram diferentes tipos de solventes e técnicas para a produção de PVDF, com foco no maior ($F_{\beta(\%)}$). Nesses trabalhos o percentual aproximado de fase β calculado variou de 80 a 95% e todas as amostras foram produzidas em formato de filmes.

Analisando esse contexto, nota-se que o resultado obtido nessa pesquisa, com a amostra em pastilha é muito satisfatório. Visto a facilidade do método utilizado para a produção da amostra e a diferença entre a porcentagem de fase β obtida na pesquisa em comparação com os trabalhos supracitados.

Completando os resultados, também foram analisados os precursores HA β e Fe₃O₄. Na Figura 5.3.2 observa-se o espectro de absorbância do fosfato de cálcio bifásico (HA β), caracterizado pela fase hidroxiapatita com vibrações em 474, 569, 601, 630, 962, 1046, 1092 e 3572 cm^{-1} e pela fase secundária β -fosfato tricálcico representada nas vibrações 980 e 1122 cm^{-1} [146-148]. Com exceção dos íons OH⁻ que foram detectados nas bandas em 630 e 3572 cm^{-1} e que correspondem respectivamente aos modos de deformação rotacional (ν_L) e de estiramento (ν_S), os demais modos de vibração referem-se ao grupo funcional PO₄³⁻. Para os íons fosfato, a banda de absorção em 474 cm^{-1} ocorre deformação duplamente degenerada, ν_2 com ligação iônica em O-P-O. Na banda 569 e 601 cm^{-1} existe uma deformação em ν_4 e nas bandas 950, 962 e 980 cm^{-1} ocorre estiramento simétrico ν_1 . Em 1046, 1092 e 1122 cm^{-1} ocorre estiramento assimétrico em ν_3 ou triplamente degenerado [33, 148, 149].

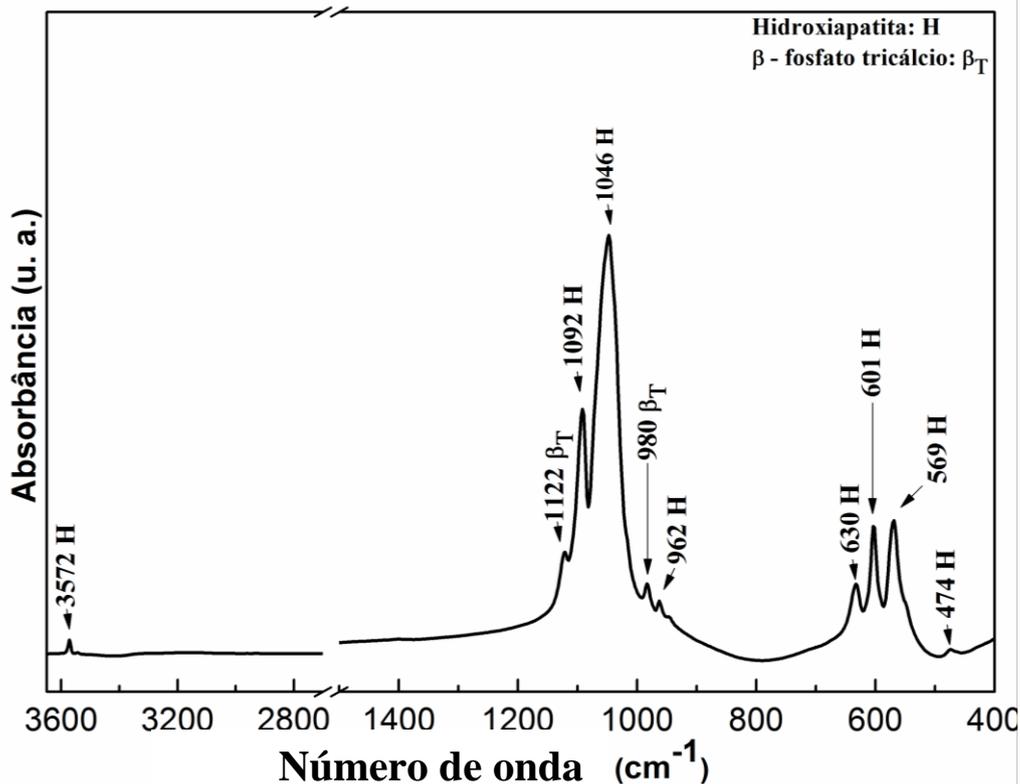


Figura 5.3.2: Espectro de absorção na região do infravermelho do precursor fosfato de cálcio bifásico.

Na Figura 5.3.3 é apresentado o espectro de absorção da magnetita sintetizada via técnica do PVA, à temperatura de decomposição térmica de 500 °C. Foi identificada a banda em 442 cm^{-1} caracterizada pela ligação Fe-O, em que ocorre deformação por estiramento em ν_2 . Enquanto que as bandas em 579 e 631 cm^{-1} , também caracterizadas pela ligação Fe-O, são resultados de um desdobramento da banda em ν_1 . As bandas 819 e 879 cm^{-1} podem ser atribuídas aos íons nitratos, enquanto que em 1384, 1580 e 1710 cm^{-1} refere-se respectivamente as ligações C-OH, $-\text{COO}^-$ e C=O [50,150-152]. A existência de tais bandas e o alargamento em torno de 1384 cm^{-1} é consequência de resquícios de PVA nas nanopartículas.

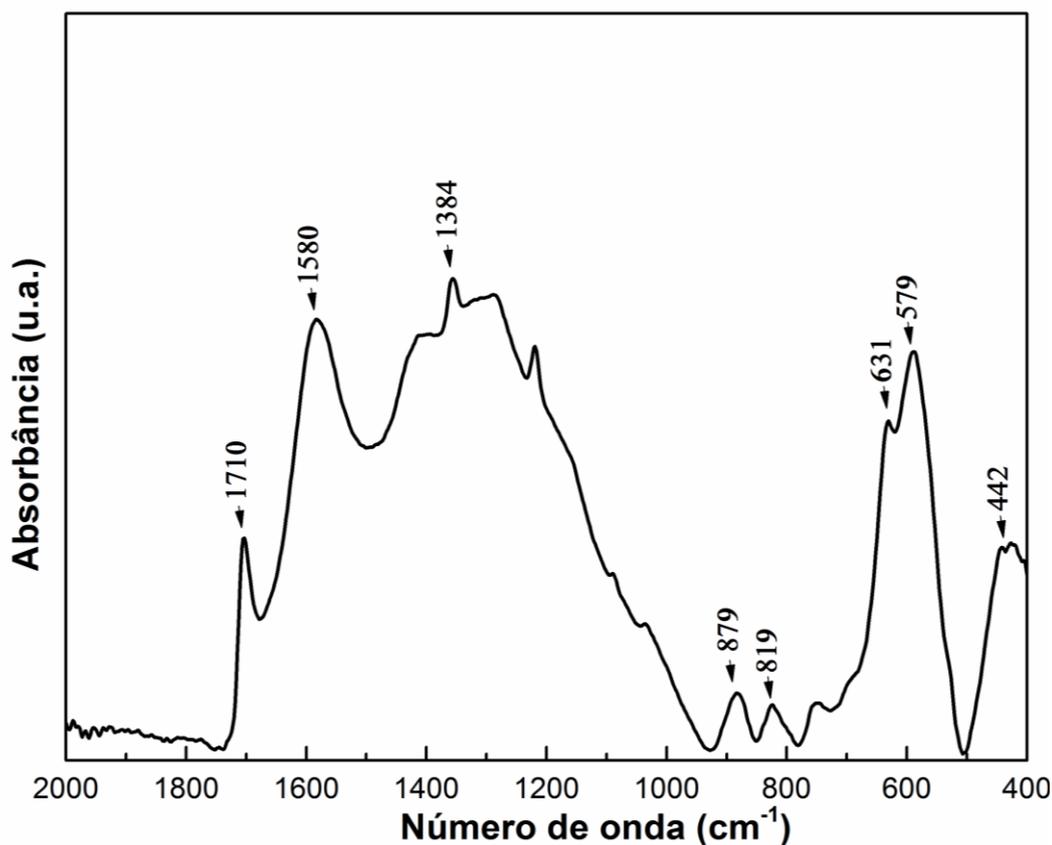


Figura 5.3.3: Espectro de absorção na região do infravermelho da precursora magnetita.

5.4. Teste *in vitro* com aplicação de campo elétrico

Na Figura 5.4.1 são apresentados os espectros de FTIR-ATR das amostras dos compósitos 60%HA β -40%PVDF que foram sinterizadas a 170° C. No espectro (a), referente a amostra que não foi imersa em SBF, foram identificadas as bandas em 488, 766, 796, 875 e 1184 cm⁻¹ pertencentes a fase α e em 511, 840, 1273 e 1428 cm⁻¹ atribuídas a fase β do PVDF [71, 137, 153]. A banda em 1404 cm⁻¹ pode ser caracterizada como pertencente tanto a fases α como a β ou a γ [136]. Na região em torno de 470 cm⁻¹ no espectro (a) houve uma superposição de bandas, visto que o PVDF possui uma banda na fase β em 472 cm⁻¹ e o HA β possui uma banda referente ao grupo funcional PO₄³⁻ em 474 cm⁻¹. Ainda na amostra que não foi imersa no fluido, também foram identificadas as bandas de absorção em 569, 601, 630, 962, 1030, 1092 e 3572 cm⁻¹ referentes a fase hidroxiapatita e em 980 cm⁻¹ atribuída a fase β -TCP [33, 148, 149, 154, 155]. Observa-se também os modos de vibração em 2850 e 2920 cm⁻¹ que correspondem a grupamentos de CH₂ referente ao precursor polimérico.

Também são apresentadas na Figura 5.4.1, os espectros dos compósitos 60%HA β -40%PVDF que foram imersas no fluido corpóreo simulado. Os espectros (b) e (c) referem-se as amostras imersas em SBF por 3 dias, sendo (b) sem aplicação de campo elétrico e (c) com aplicação de campo elétrico. Os espectros (d) sem aplicação de campo elétrico e (e) com aplicação de campo elétrico são de amostras compostas submersas em SBF por 7 dias. As amostras do (grupo teste) tiveram aplicações de campo elétrico (C.E. = 0,308 V/mm) por 12 horas diárias.

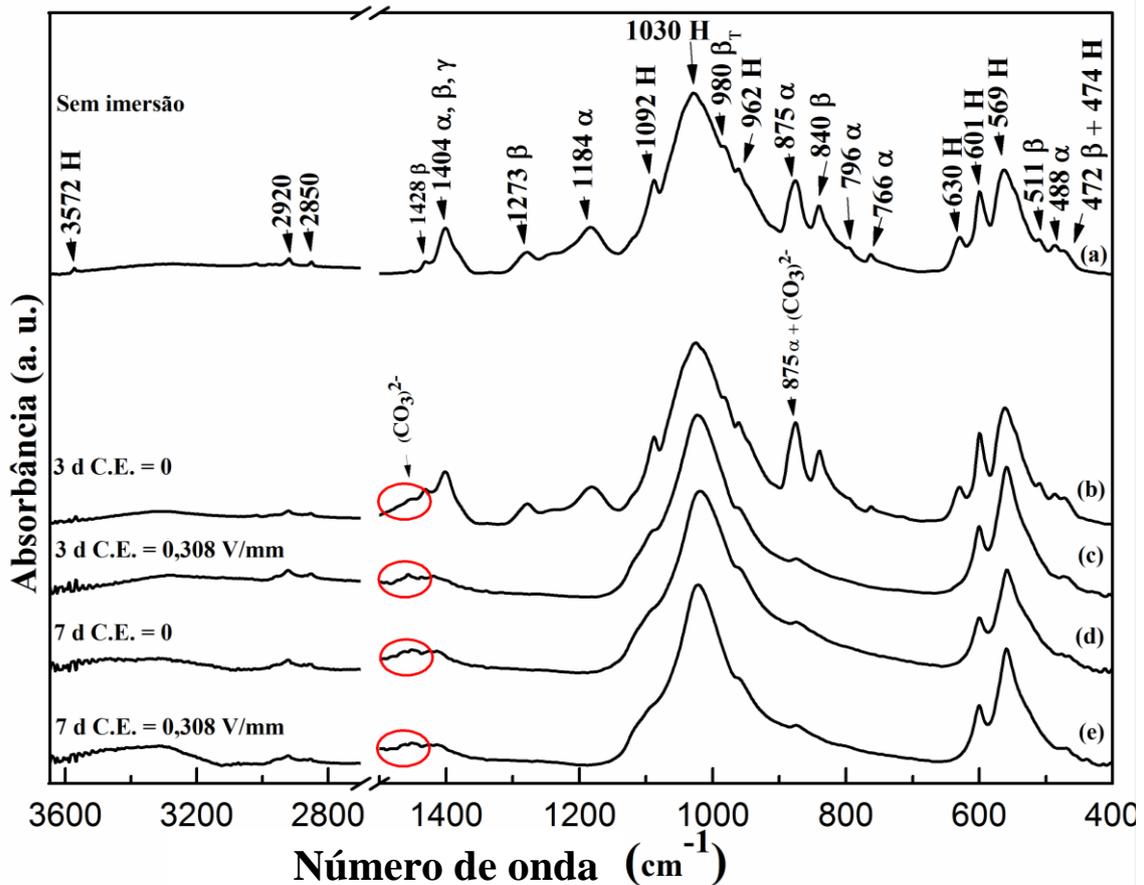


Figura 5.4.1: Espectros de absorção na região do infravermelho dos compósitos 60%HA β -40%PVDF. Espectro (a) referente ao compósito que não foi imerso em SBF e espectros (b), (c), (d) e (e) são dos compósitos que foram imersos em SBF submetidos a diferentes condições.

Nas amostras que foram imersas por 3 dias em SBF, espectro (b) e espectro (c) da Figura 5.4.1, observa-se comportamentos diferentes. Nota-se significativa semelhança entre o espectro (b) e o espectro (a), com relação à presença de várias bandas referente ao precursor PVDF, exceto os modos vibracionais em 875 e em torno de 1460 cm^{-1} . A banda em 875 cm^{-1} pode ser referente a fase α do polímero e/ou, ao

grupamento CO_3^{2-} , visto que a amostra foi imersa em SBF. A alteração (elevação) no espectro em torno de 1420 cm^{-1} a 1460 cm^{-1} (região circulada), também é caracterizada pelo grupo CO_3^{2-} [156]. De acordo com Muller e colaboradores (2007) [156], a presença das bandas referente ao grupo carbonato confirma a nucleação de uma camada de apatita carbonatada, porém talvez a camada não tenha sido formada em toda a superfície da amostra, visto a existência de várias bandas referentes ao precursor PVDF.

O espectro (c), quando comparado ao espectro (b) apresenta bandas do poli(fluoreto de vinilideno) identificado apenas nas bandas em $2920, 2850\text{ cm}^{-1}$ e em regiões com sobreposição de bandas, em 470 e em 875 cm^{-1} . Detectou-se também os modos vibracionais em torno de 1420 a 1460 cm^{-1} que correspondem ao grupo CO_3^{2-} [156]. Nota-se no fosfato de cálcio bifásico, a ausência das bandas em 980 e 630 cm^{-1} . A banda 630 cm^{-1} é referente a OH e a sua ausência evidencia a formação de uma camada de apatita carbonatada com baixa cristalinidade, característica de apatita nucleada em SBF [148, 156, 157]. Outro aspecto que corrobora, é a ausência de bandas do PVDF na amostra com aplicação de campo elétrico comparado com a amostra sem aplicação de campo elétrico. O desaparecimento dessas bandas em $840, 1184, 1273$ e 1404 cm^{-1} reforça a nucleação da apatita na superfície da amostra e as bandas de fosfato continuam aparecendo.

De modo geral, ao comparar as amostras imersas em SBF por 3 dias, deve-se ressaltar que a amostra com aplicação de campo elétrico, espectro (c), apresenta mais evidências de nucleação de apatita que a amostra do espectro (b) sem aplicação de campo elétrico.

Ao analisar os espectros (d) e (e) da Figura 5.4.1, destaca-se um comportamento semelhante. Houve redução significativa das bandas referente ao precursor PVDF, a presença de bandas referentes aos grupos carbonato e fosfato e a ausência da banda 630 cm^{-1} . Atribui-se a essas constatações a nucleação de uma camada de apatita na superfície da amostra. Possivelmente após os 7 dias a apatita recobre toda a superfície das amostras (com campo e sem campo elétrico) por igual.

Na Figura 5.4.2 são apresentadas as micrografias de superfície das amostras poliméricas: (a) amostra de PVDF sinterizada e lixada que não foi imersa em SBF, (b) PVDF (C.E. = 0 V/mm) com imersão no fluido corpóreo simulado por 7 dias e (c)

amostra de PVDF que foi imersa em SBF por 7 dias e submetida a aplicação de campo elétrico por 12 horas diárias.

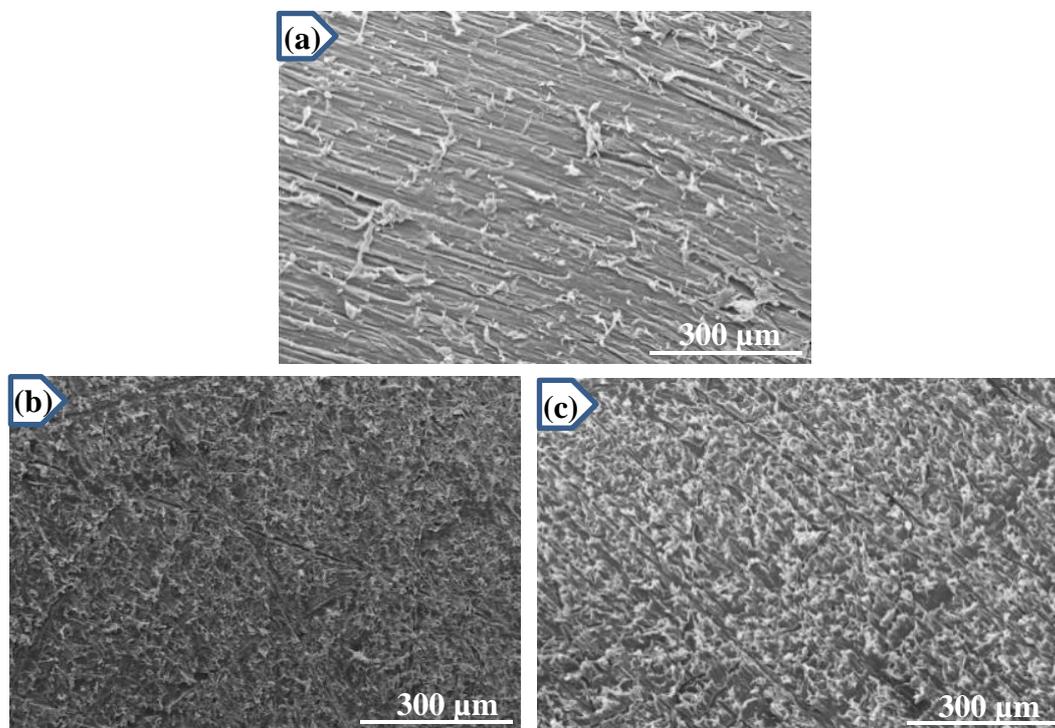


Figura 5.4.2: Micrografias de superfície das amostras de PVDF sinterizadas expostas a diferentes condições: (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF com (C.E. = 0 V/mm) e (c) amostra que foi imersa em SBF com (C.E. = 0,308 V/mm).

Nota-se que apesar das três amostras de PVDF terem sido submetidas a procedimentos diferentes, as micrografias (a), (b) e (c) apresentam morfologias semelhantes, com a existência de ranhuras provindas do processo de lixar as amostras e conseqüentemente que não houve nucleação de apatita.

Na Figura 5.4.3 são apresentadas as micrografias do HA β que foram expostas a diferentes procedimentos: (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias sem aplicação de campo elétrico e (c) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias com aplicação de campo. Comparando as três micrografias, é possível ver a diferença morfológica da superfície da amostra antes e após serem colocadas no líquido simulador de fluido corporal. Amostra (a), pastilha que não foi exposta em SBF nota-se uma superfície regular, enquanto que as amostras que foram imersas, micrografias (b) e (c) observa-se que houve a nucleação da camada de apatita. Verifica-se uma superfície irregular que cobre o substrato da amostra, com

aspecto “craquelado”, com presença de trincas. De acordo com Le Gero (1991) [12], essa característica na superfície das amostras é consequência da formação de apatita (camada espessa) após serem secas.

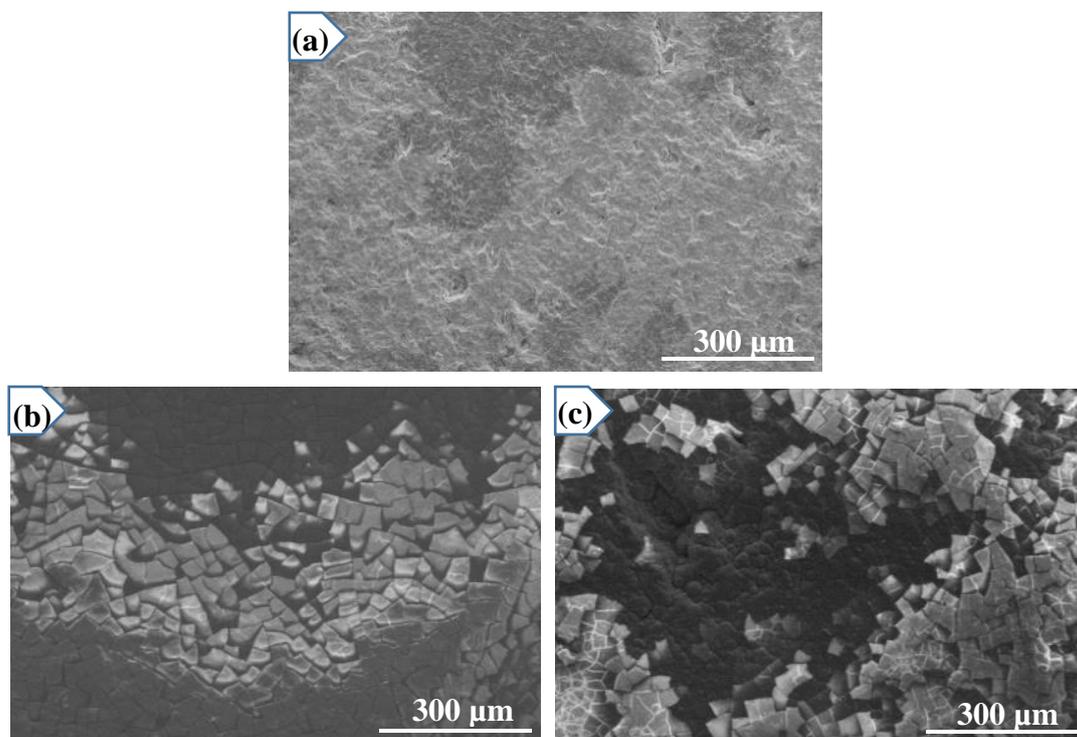


Figura 5.4.3: Micrografias de superfície das amostras de HA β sinterizadas expostas a diferentes condições: (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF sem aplicação de campo elétrico e (c) amostra que foi imersa em SBF com aplicação de campo elétrico.

Após analisar as amostras precursoras PVDF e HA β , também é interessante observar a morfologia das amostras 60%HA β -40%PVDF em diferentes condições. A Figura 5.4.4 (a), é referente ao compósito que não foi imerso em SBF. Nesta, é possível observar uma superfície regular com a presença de ranhuras decorrentes do preparo da amostra. Ao contrário do observado na micrografia (a), nota-se que as amostras compostas referentes as micrografias (b) e (c), que foram submetidas ao teste de bioatividade por 3 dias, apresentaram morfologias diferentes. Observa-se no compósito da micrografia (b) (C.E. = 0 V/mm), a formação da camada de apatita como se fossem “ilhas” na superfície da amostra. Esse resultado indica que a amostra é bioativa e que provavelmente nuclearia apatita em toda a superfície se ficasse por mais tempo imersa.

Por outro lado, observa-se no compósito (C.E. = 0,308 V/mm) micrografia (c), a nucleação da camada de apatita cobrindo toda a superfície da amostra com aspecto “craquelado”, com a presença de fendas e novos núcleos de apatita sobre a camada já formada. Desse modo, esse resultado indica claramente que a aplicação do campo elétrico por 12 horas diárias influenciou de maneira positiva, acelerando o crescimento da apatita.

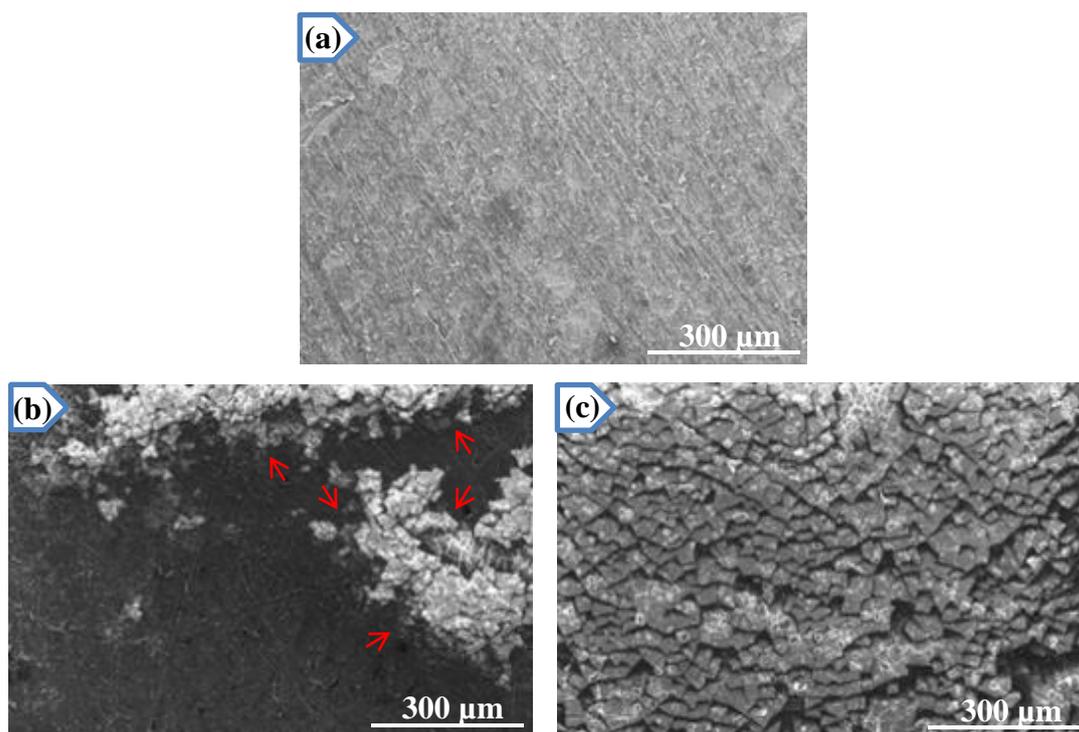


Figura 5.4.4: Micrografias de superfície das amostras 60%HA β -40%PVDF sinterizadas expostas a diferentes condições: (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF por 3 dias sem aplicação de campo elétrico e (c) amostra que foi imersa em SBF por 3 dias com aplicação de campo elétrico.

Na Figura 5.4.5 são apresentadas as micrografias dos compósitos 60%HA β -40%PVDF que foram expostos a diferentes procedimentos: (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias sem aplicação de campo elétrico e (c) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias com aplicação de campo elétrico. A influência do SBF nos compósitos imersos por 7 dias, micrografias (b) e (c), foi significativa, visto a diferença ao comparar com a micrografia (a) do compósito antes da imersão. Os compósitos, sem aplicação de campo elétrico (b) e com aplicação de campo elétrico (c) apresentaram morfologias com aspecto “craquelado”, com a

presença de trincas e novos núcleos de apatita sobre a camada nucleada. Nessa perspectiva é difícil observar diferença significativa entre as amostras, pois a apatita recobriu a superfície de ambas por igual.

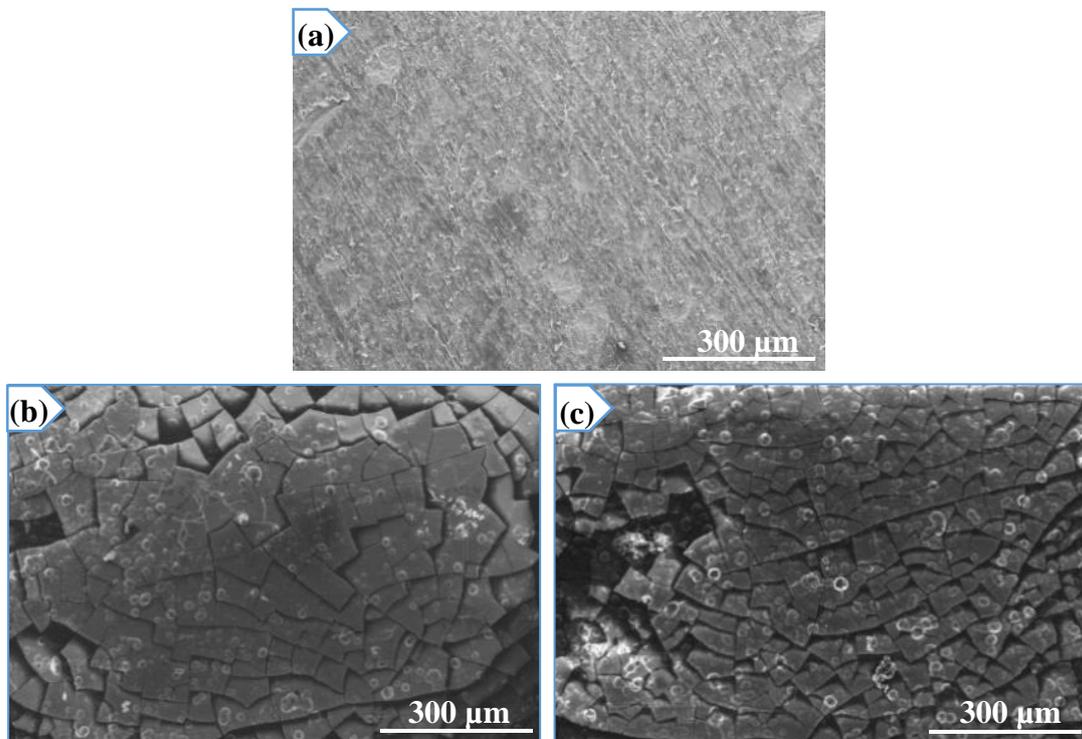


Figura 5.4.5: Micrografias de superfície das amostras 60%HA β -40%PVDF sinterizadas expostas a diferentes condições: (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias sem aplicação de campo elétrico e (c) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias com aplicação de campo elétrico.

Na Figura 5.4.6 são apresentadas as micrografias de fratura das amostras de PVDF, HA β e dos compósitos 60%HA β -40%PVDF que foram submetidas ao teste de bioatividade em diferentes condições. O intuito de analisar em outra perspectiva é de medir a espessura da camada de apatita nucleada. Em (a), (b), (c) e (d) são mostradas as micrografias das amostras com (C.E. = 0 V/mm). Nas imagens (e), (f), (g) e (h) referem-se as amostras que foram submetidas a aplicação de campo elétrico por 12 horas diárias (C.E. = 0,308 V/mm).

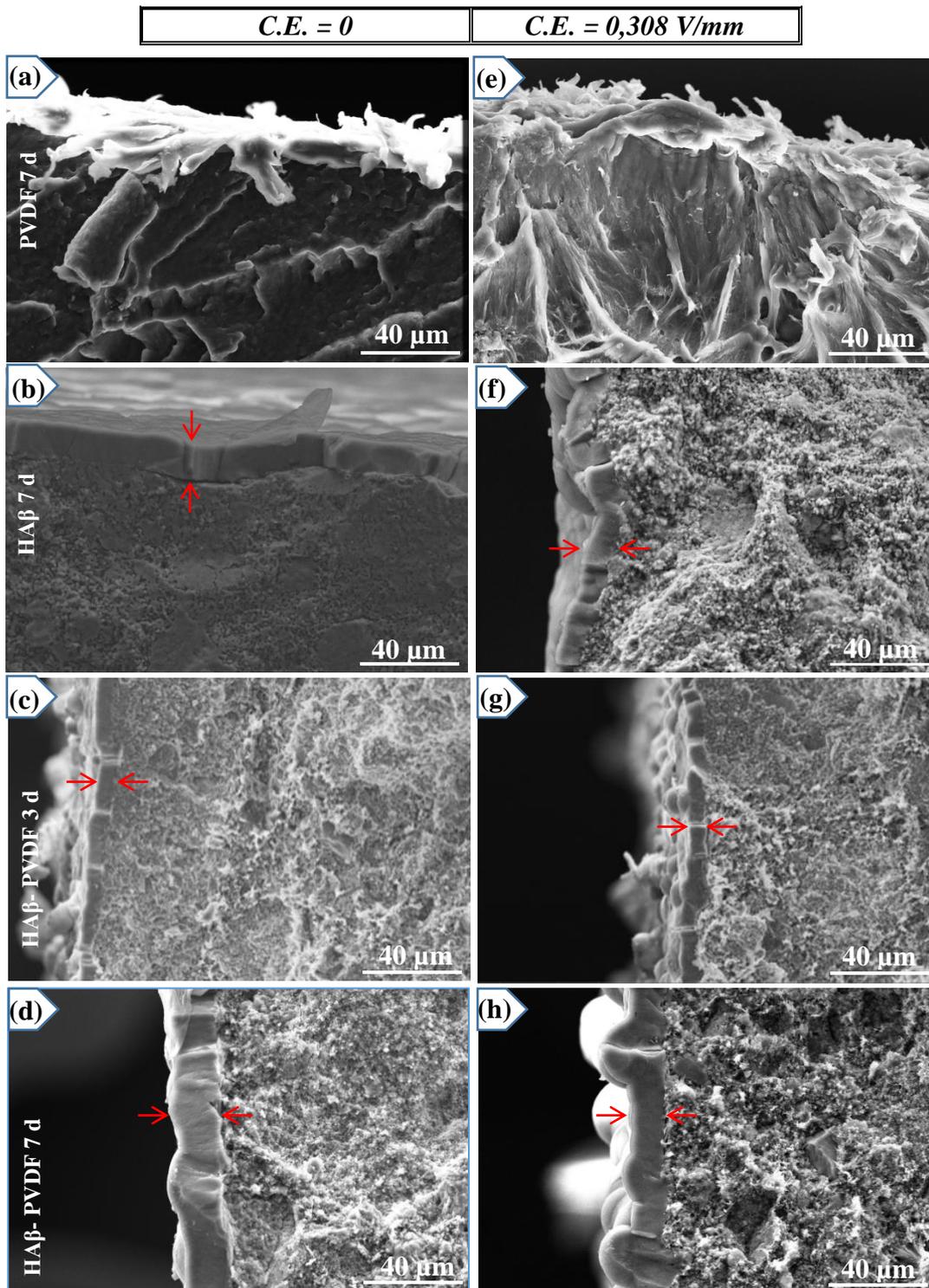


Figura 5.4.6: Micrografias de fratura das amostras que foram imersas em SBF expostas a diferentes condições. Coluna das amostras que não receberam aplicação de campo elétrico, micrografias (a), (b), (c) e (d) e coluna das amostras com aplicação de campo elétrico, micrografias (e), (f), (g) e (h).

Na Figura 5.4.6 ao comparar as micrografias (a) e (e) que são referentes às amostras de PVDF, observa-se uma morfologia com aspecto de “rasgado”, que ocorreu devido ao processo de fraturar as amostras. Ainda com relação as regiões fraturadas do

polímero, nota-se que não houve a formação da camada de apatita, como esperado, visto que o PVDF apresenta biocompatibilidade em meio fisiológico, possui ele a fase piezométrica ou não. Segundo Callegari e colaboradores (2004) [14], para formar uma camada de apatita sobre um material, o mesmo deve ser bioativo, o que não acontece com este polímero.

Observa-se nas imagens de fratura (b) e (f) da Figura 5.4.6, a nucleação de uma camada de apatita na superfície de ambas as amostras de HA β . A amostra referente ao HA β submetida ao teste de bioatividade (C.E. = 0 V/mm) (b), apresenta a nucleação de uma camada de apatita com aproximadamente 10,6 μ m de espessura, enquanto que o HA β imerso em SBF e submetido a aplicação de campo elétrico, micrografia (f), a camada de apatita nucleada atingiu 10,1 μ m de espessura. Nota-se que não houve diferença significativa ao comparar as duas amostras de fosfato de cálcio bifásico, submetidas aos testes de bioatividade por 7 dias com condições diferentes.

As micrografias (c) com (C.E. = 0 V/mm) e (g) com (C.E. = 0,308 V/mm) da Figura 5.4.6, são dos compósitos 60%HA β -40%PVDF que foram submetidos ao teste de bioatividade por 3 dias. No compósito da micrografia (c) nota-se a nucleação de uma camada de apatita, com espessura de 4,54 μ m, também observa-se a presença de possíveis núcleos sobre a camada formada. Na micrografia (g) do compósito que foi submetido a aplicação de campo elétrico, a camada formada obteve espessura de aproximadamente 5,09 μ m, com a presença de vários núcleos. Observa-se que a amostra (c) e (g) apresentaram pouca diferença na espessura da camada formada, porém deve-se ressaltar que a camada encontrada na imagem (c), não foi nucleada em toda a superfície da amostra, como visto na micrografia (b) da Figura 5.4.4 mostrada anteriormente.

Também na Figura 5.4.6 são mostradas as micrografias (d) (C.E. = 0 V/mm) e (h) (C.E. = 0,308 V/mm) dos compósitos 60%HA β -40%PVDF que foram imersos em SBF por 7 dias. Na micrografia (d), é possível notar a presença de uma camada de apatita uniforme nucleada na superfície da amostra, essa camada atingiu espessura aproximada de 15 μ m. Toda via o compósito referente a micrografia (h), que recebeu 12 horas diárias de campo elétrico formou uma camada mais irregular, com variação significativa na espessura da camada nucleada, sendo de aproximadamente 11 μ m na região mais fina e de aproximadamente 18 μ m na regiões mais espessas da camada, nos glóbulos.

De modo geral, as alterações que ocorreram nos compósitos 60%HA β -40%PVDF sob influência de campo elétrico e que não ocorreu na amostra de HA β , indica que pode existir uma relação entre a propriedade piezoelétrica do polímero, o campo aplicado e o crescimento de apatita. As propriedades podem ter sido ativadas pelo campo externo modificando as cargas superficiais e facilitando o crescimento de apatita.

5.5. *Teste in vitro com aplicação de campo magnético*

Na Figura 5.5.1 observa-se os espectros de absorvância dos compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄. O espectro (a) corresponde a amostra que não foi imersa em SBF. Os espectros (b) (C.M. = 0 Oe) e (c) (C.M. = 6 Oe), referem-se as amostras imersas em SBF por 3 dias. Os espectros (d) (C.M. = 0 Oe) e (e) (C.M. = 6 Oe) são de amostras compostas imersas em SBF por 7 dias.

No espectro (a) da Figura 5.5.1, foram identificadas as bandas de absorção 488, 766, 796, 875, 1184 e 3023 cm⁻¹ correspondentes a fase α e as bandas 511, 840, 1273 e 1428 cm⁻¹ atribuídas a fase β do PVDF [71, 137, 153]. A banda em 1404 cm⁻¹ pode ser caracterizada como pertencente a fases α , β ou γ , enquanto que a banda em 1450 cm⁻¹ é definida por ser um defeito na cadeia do polímero [136]. Também foram identificados grupamentos de CH₂, referentes aos modos de vibração 2850 e 2920 cm⁻¹. A fase β -TCP foi detectada em 980 cm⁻¹, enquanto que a fase hidroxiapatita foi identificada nas bandas 569, 601, 962, 1034 e 1092 cm⁻¹. Por sua vez, a magnetita foi caracterizada pela ligação Fe-O na banda 442 cm⁻¹.

Ainda no espectro (a) ocorreram sobreposição de bandas referentes aos três precursores PVDF, HA β e Fe₃O₄, utilizados na produção da amostra. No primeiro caso foi em torno de 470 cm⁻¹, visto que o PVDF possui uma banda na fase β em 472 cm⁻¹ e o HA β possui uma banda em 474 cm⁻¹. No segundo caso a sobreposição ocorreu na banda 631 cm⁻¹, pois na magnetita essa banda corresponde a ligação Fe-O, enquanto que na fase hidroxiapatita a banda 630 cm⁻¹ é relacionada aos íons OH⁻ [33,147-150].

Observa-se na Figura 5.5.1 os espectros (b) (C.M. = 0 Oe) e (c) (C.M. = 6 Oe), referentes aos compósitos que foram imersos em SBF por 3 dias. Nota-se

significativa semelhança entre os espectros (a), (b) e (c) com exceção das bandas em 875 e 980 cm^{-1} . Em 875 cm^{-1} há possibilidade da banda corresponder ao grupamento CO_3^{2-} , visto que as amostras referentes aos espectros (b) e (c) foram imersas em SBF. Observa-se também que houve o desaparecimento da banda 980 cm^{-1} , isso pode ter ocorrido devido a deposição na amostra de alguns cristais contidos na solução de SBF.

Ainda na Figura 5.5.1 observa-se que os espectros (d) e (e) apresentaram características que comprovam a formação de apatita. A presença de bandas referentes aos grupos carbonato e fosfato, o desaparecimento da banda 630 cm^{-1} e de bandas de PVDF confirmam a nucleação de uma camada de apatita carbonatada na superfície da amostra. Deve-se ressaltar, entretanto que a amostra com (C.M. = 0 Oe), espectro (d) apresentou bandas em 840, 1184, 1273 e 1404 cm^{-1} referentes ao polímero que não ocorrem no espectro (e) com (C.M. = 6 Oe). A existência de algumas bandas referentes ao precursor PVDF a mais, pode ter ocorrido devido a camada não ter sido nucleada em toda a superfície da amostra ou devido a presença de fendas na camada nucleada.

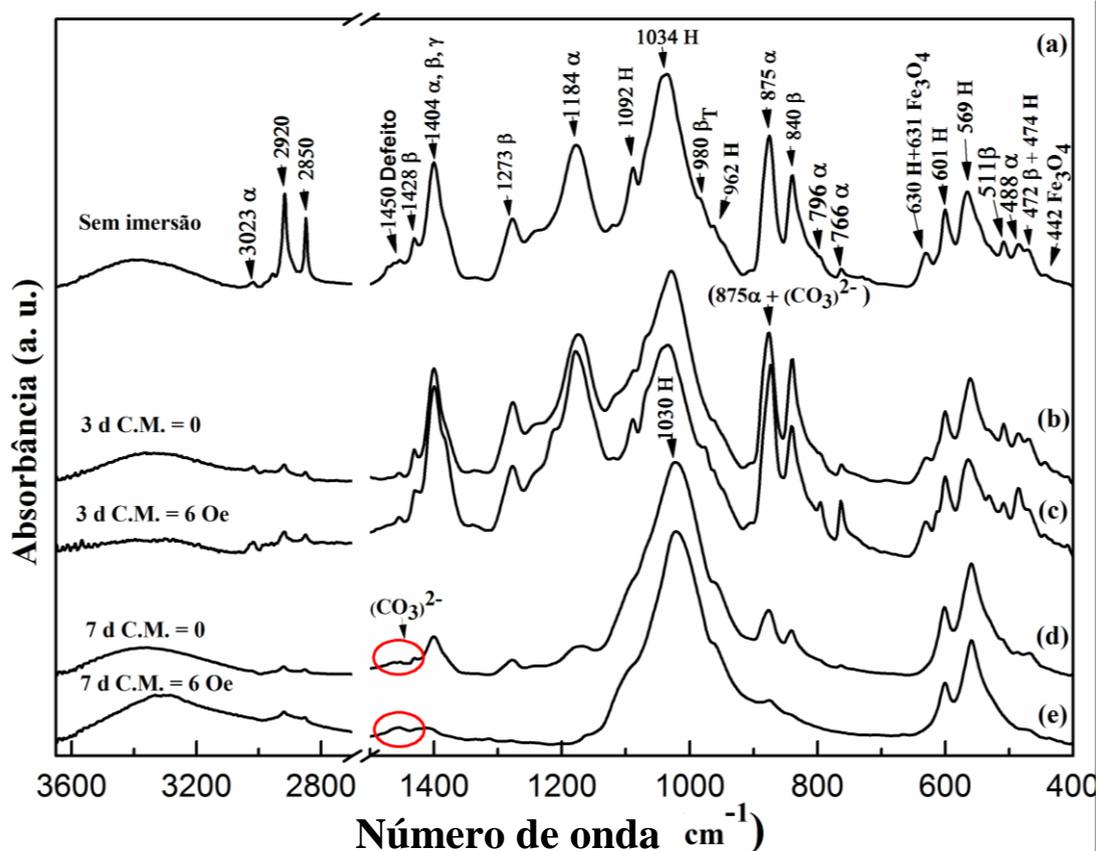


Figura 5.5.1: Espectros de absorção na região do infravermelho dos compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe $_3$ O $_4$. Espectro (a) referente ao compósito que não foi imerso em SBF e espectros (b), (c), (d) e (e) são dos compósitos que foram imersos em SBF submetidos a diferentes condições.

Na Figura 5.5.2 são apresentadas as micrografias de superfície das amostras de PVDF, sendo em (a) amostra sinterizada e lixada que não foi imersa em SBF, em (b) amostra com (C.M. = 0 Oe) imersa em SBF por 7 dias e em (c) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias e submetida a aplicação de campo magnético por 24 horas diárias. Nota-se que assim como nas amostras poliméricas analisadas na Figura 5.4.2, nestas, os diferentes procedimentos também não influenciaram de modo significativo para alterar a morfologia da superfície das amostras de PVDF. As micrografias (a), (b) e (c) apresentam morfologias semelhantes, com a existência de ranhuras providas do processo de preparo das pastilhas e em nenhuma das amostras foi possível encontrar evidências de nucleação de apatita, como esperado.

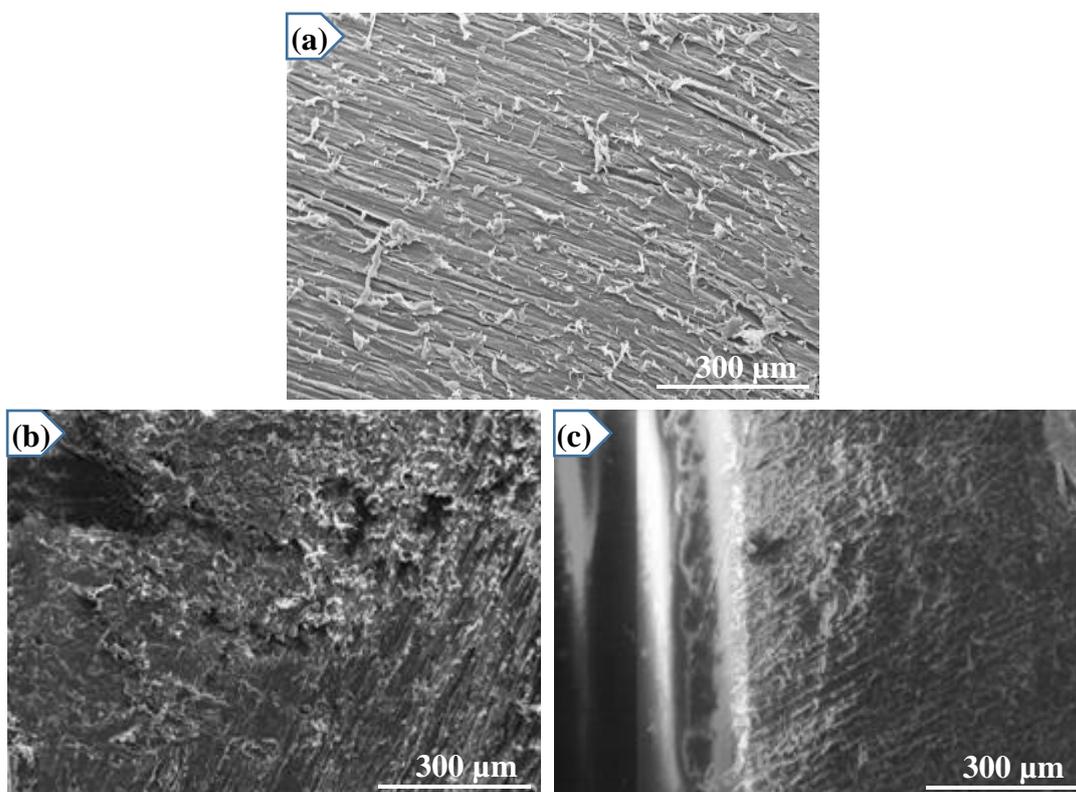


Figura 5.5.2: Micrografias de superfície das amostras de PVDF sinterizadas expostas a diferentes condições. Em (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF sem aplicação de campo magnético e (c) amostra que foi imersa em SBF com aplicação de campo magnético.

Observa-se na Figura 5.5.3 as micrografias de amostras de HA β que foram expostas a diferentes procedimentos. Em (a) é mostrada a superfície da amostra que não foi imersa em SBF (analisada anteriormente na Figura 5.4.3), em (b) e (c) são referentes

as amostras que foram submetidas ao teste de bioatividade por 7 dias, sendo respectivamente, sem aplicação de campo magnético e com aplicação de campo magnético. Nota-se que nas amostras que foram imersas, micrografias (b) e (c) houve a nucleação da camada de apatita, verifica-se uma superfície irregular que cobre o substrato da amostra, com aspecto “craquelado” e com presença de trincas. Porém, deve-se ressaltar que ambas as amostras da Figura 5.5.3 (b) e (c) apresentaram “craquelados” com tamanhos menores, quando comparados com o tamanho dos “craquelados” observados nas micrografias de HA β (b) e (c) da Figura 5.4.3. A presença desses “craquelados” nas amostras de HA β , indica a bioatividade da amostra que foi imersa no fluido corpóreo simulado.

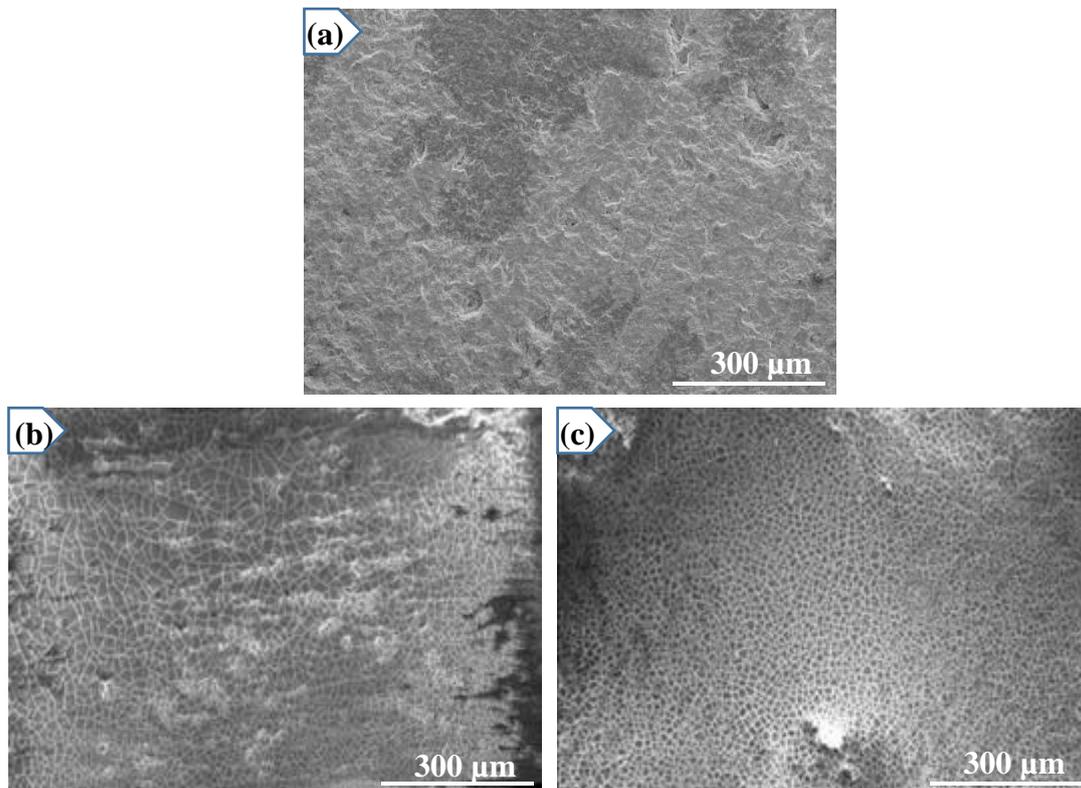


Figura 5.5.3: Micrografias de superfície das amostras de HA β sinterizadas expostas a diferentes condições. Em (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF sem aplicação de campo magnético e (c) amostra que foi imersa em SBF com aplicação de campo magnético.

Na Figura 5.5.4 a micrografia (a) é referente ao compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe $_3$ O $_4$ que não foi imerso em SBF. Nesta, observa-se uma superfície regular com a presença de ranhuras, que foram realizadas durante o preparo da amostra.

Ao comparar a micrografia (a), com as micrografias (b) (C.M. = 0 Oe) e (c) (C.M. = 6 Oe) dos compósitos que foram submetidos ao teste de bioatividade por 3 dias, nota-se diferença significativa na morfologia das amostras que foram imersas. Nas micrografias (b) e (c), observa-se que não é possível visualizar a formação de uma camada de apatita espessa. Porém, esse fato não descarta a possibilidade de formação de apatita, visto que a magnificação utilizada nessa perspectiva poderia ser um obstáculo para visualizar uma possível camada de apatita tênue.

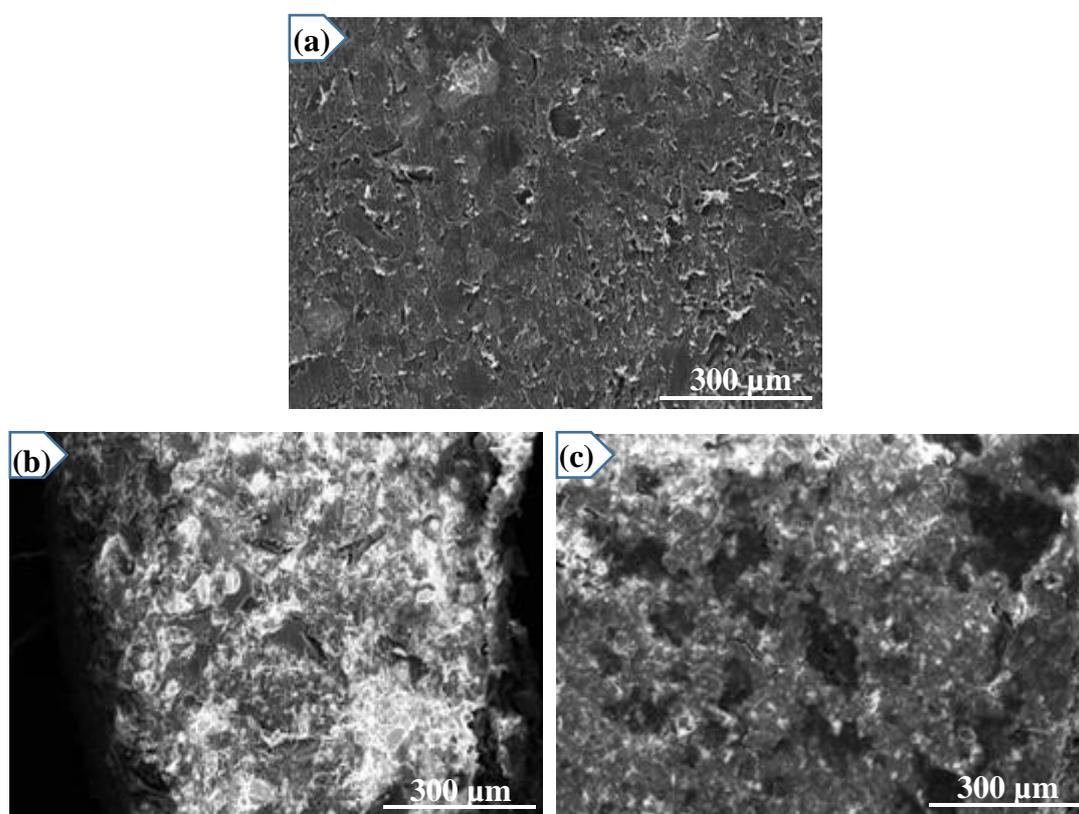


Figura 5.5.4: Micrografias de superfície dos compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ sinterizados sob diferentes condições. Em (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF por 3 dias sem aplicação de campo magnético e (c) amostra que foi imersa em SBF por 3 dias com aplicação de campo magnético.

Ao contrário do observado nas micrografias das amostras 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ imersas por 3 dias em SBF, os compósitos imersos por 7 dias em SBF apresentaram comportamentos diferentes, visto na Figura 5.5.5. Nas micrografias (b) (C.M. = 0 Oe) e (c) (C.M. = 6 Oe) é possível visualizar a nucleação da camada de

apatita cobrindo toda a superfície da amostra com aspecto “craquelado”, com a presença de trincas e novos núcleos de apatita sobre a camada já formada.

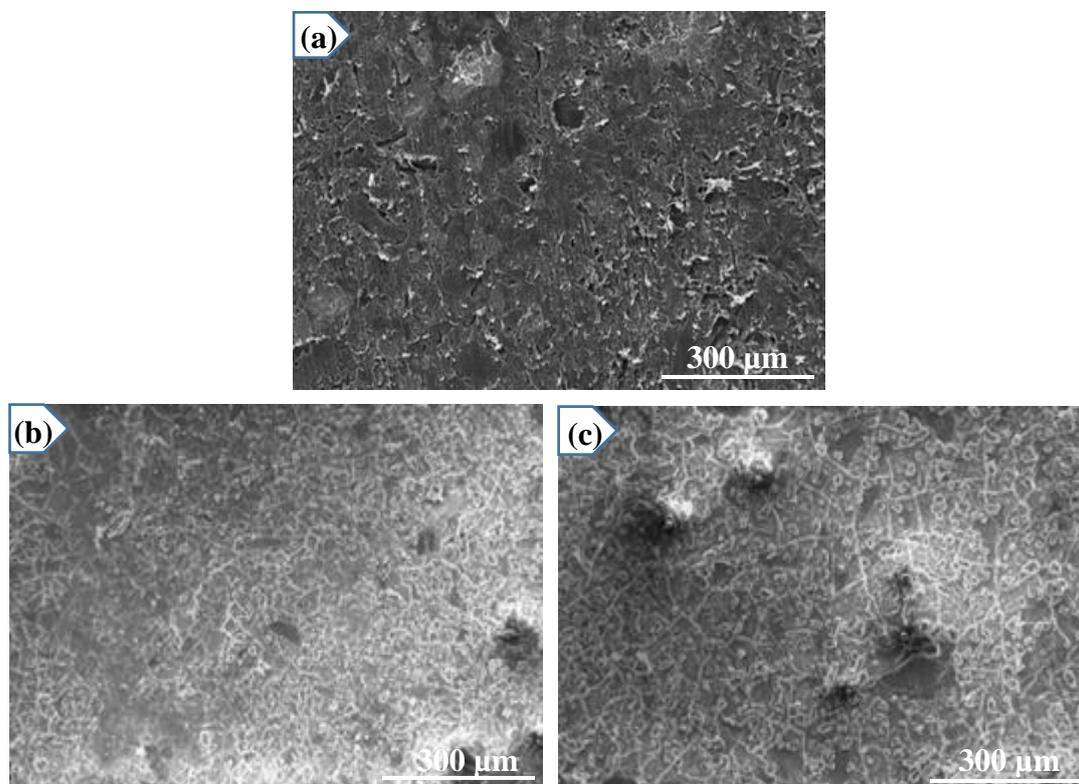


Figura 5.5.5: Micrografias de superfície dos compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ sinterizados. Em (a) amostra que não foi imersa em SBF, (b) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias sem aplicação de campo magnético e (c) amostra que foi imersa em SBF por 7 dias com aplicação de campo magnético.

Observa-se em outra perspectiva, na Figura 5.5.6 as micrografias de fratura das amostras que foram submetidas ao teste de bioatividade, sem aplicação de campo magnético micrografias (a), (b), (c) e (d) e com aplicação de campo magnético imagens (e), (f), (g) e (h). Nota-se que ambas as amostras de PVDF, micrografia (a) e (e), não possuem nucleação de apatita, como esperado.

Ao contrário das amostras de PVDF, observa-se nas imagens de fratura (b) e (f) da Figura 5.5.6, a espessura da camada de apatita na superfície de ambas as amostras de HA β . A amostra referente ao HA β submetida ao teste de bioatividade sem aplicação de campo magnético (b), houve a nucleação de uma camada de apatita com aproximadamente 3,44 μm de espessura. Enquanto que o HA β com aplicação de campo magnético micrografia (f), a camada de apatita nucleada atingiu 3,27 μm de espessura.

Nota-se que não houve diferença significativa ao comparar as duas amostras de fosfato de cálcio bifásico, submetidas aos testes de bioatividade em condições diferentes.

Os compósitos que foram imersos em SBF por 3 dias, micrografias (c) (C.M. = 0 Oe) e (g) (C.M. = 6 Oe) apresentaram morfologias com aspectos semelhantes, em que não foi possível identificar a nucleação de uma camada de apatita.

Ainda na Figura 5.5.6 são mostradas as micrografias (d) (C.M. = 0 Oe) e (h) (C.M. = 6 Oe) dos compósitos que foram imersos em SBF por 7 dias. Em (d), é possível notar a presença de uma camada de apatita nucleada na superfície da amostra, essa camada atingiu espessura aproximada de 2,95 μm . Enquanto que o compósito referente a micrografia (h), a espessura da camada nucleada foi de aproximadamente 3,18 μm . Observa-se que as amostras das micrografias (d) e (h), apresentaram pouca diferença na espessura da camada, porém a amostra com campo magnético cresceu mais apatita.

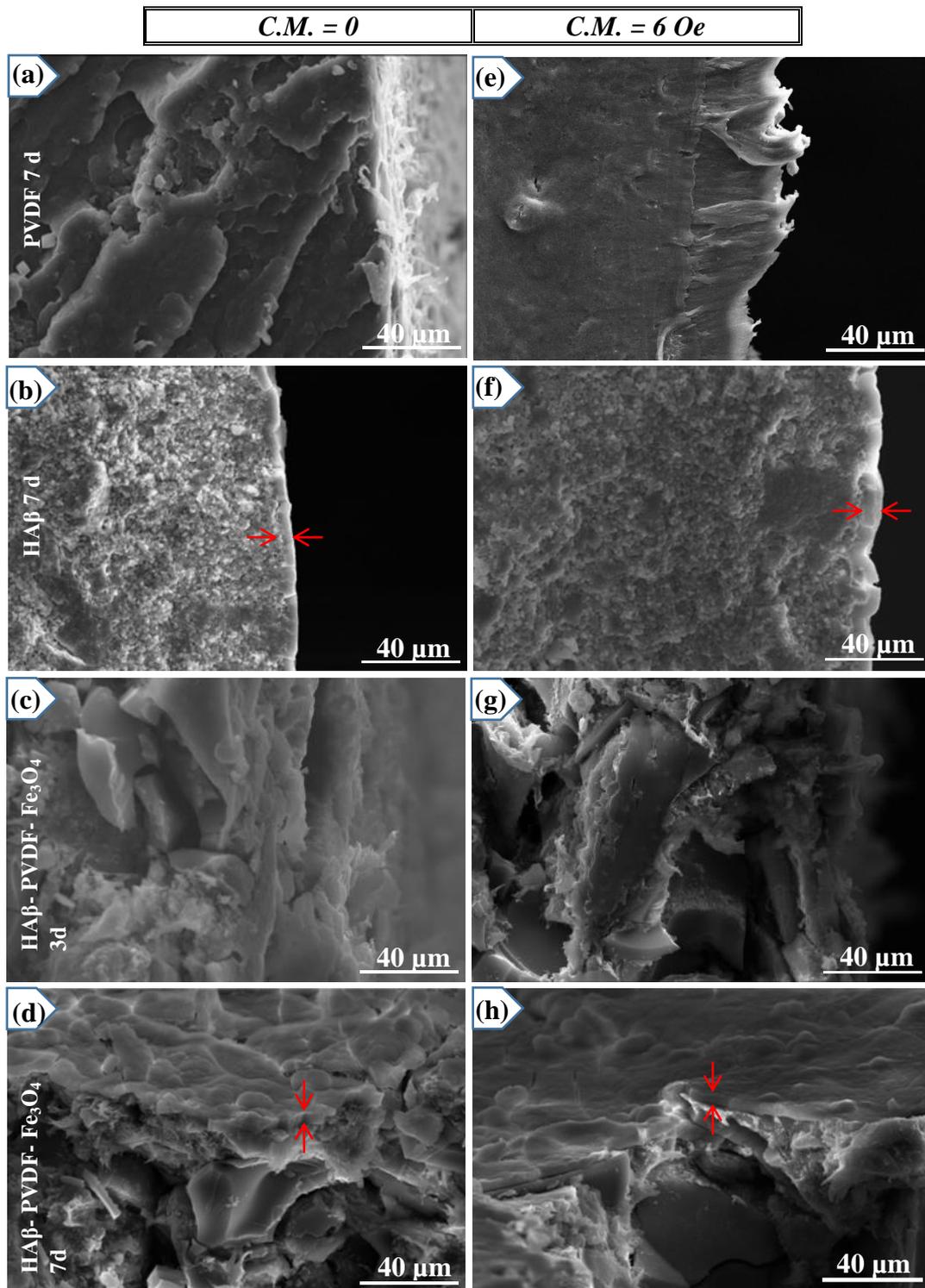


Figura 5.5.6: Micrografias de fratura das amostras que foram imersas em SBF expostas a diferentes condições. Coluna das amostras que não receberam aplicação de campo magnético, micrografias (a), (b), (c) e (d) e coluna das amostras com aplicação de campo magnético, micrografias (e), (f), (g) e (h).

Após realizar análise de ATR e MEV em todas as amostras dos compósitos, tanto para o teste com campo elétrico como para o teste com campo magnético. Verificou-se que ambas as análises serviram de complemento uma a outra, exceto para os compósitos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ que foram imersos em SBF por 3 dias. Nessas amostras não foi possível identificar a camada nucleada. Nesse sentido são mostradas na Figura 5.5.7 as micrografias e seus respectivos EDS dos compósitos, sem aplicação de campo magnético e com a aplicação de campo magnético.

Observa-se que os resultados obtidos dos compósitos sem campo magnético (a), (b), (c) e o EDS (d), comparado com os resultados do compósito com campo magnético (e), (f), (g) e o EDS (h) permitem análises bastante contundentes. As imagens confirmam que o biocompósito, quando submetido a campo magnético por 3 dias no experimento com o SBF, fica completamente recoberto por uma camada de apatita, enquanto que o biocompósito sem aplicação de campo magnético fica parcialmente (com poucas áreas) recoberto pela apatita. Esse resultado confirma a intensificação da formação da apatita induzida por campo magnético.

<i>C.M. = 0</i>	<i>C.M. = 6 Oe</i>
-----------------	--------------------

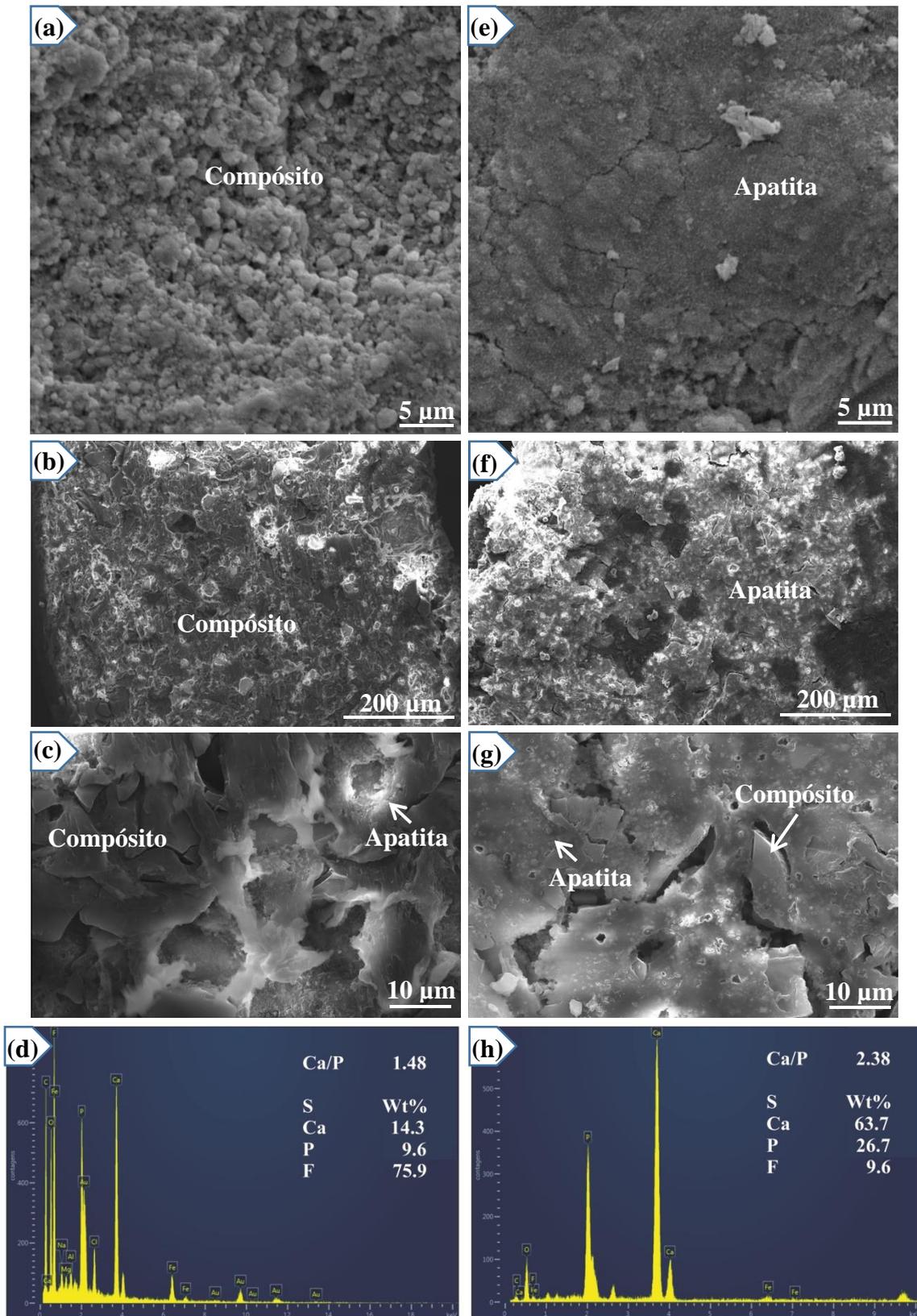


Figura 5.5.7: Micrografias e EDS de superfície dos compostos 30%HA β -50%PVDF-20%Fe $_3$ O $_4$ que foram imersos em SBF por 3 dias. (a), (b), (c) e (d) são referentes a amostra sem aplicação de campo magnético. (e), (f), (g) e (h) são da amostra com aplicação de campo magnético.

A comparação do padrão de difração de raios X obtido dos biocompósitos (Figura 5.5.8) revela o crescimento de apatita (osso sintético) induzido pelo campo magnético. Esse fenômeno pode ser constatado nos picos de difração localizados na direção (002) os quais correspondem simultaneamente as energias $K\alpha$ e $K\beta$ do difratograma de raios X, utilizando um feixe de raios X com alvo de molibdênio. Esses picos mais intensos são característicos do padrão de difração obtido da estrutura de apatitas crescidas superficialmente nas amostras em experimentos com SBF [136]. Observa-se que na amostra que não houve aplicação de campo magnético não foi possível verificar a nucleação de apatita, provavelmente isso tenha ocorrido devido ao fato da área nucleada ser pequena, dificultando a localização por meio desta técnica.

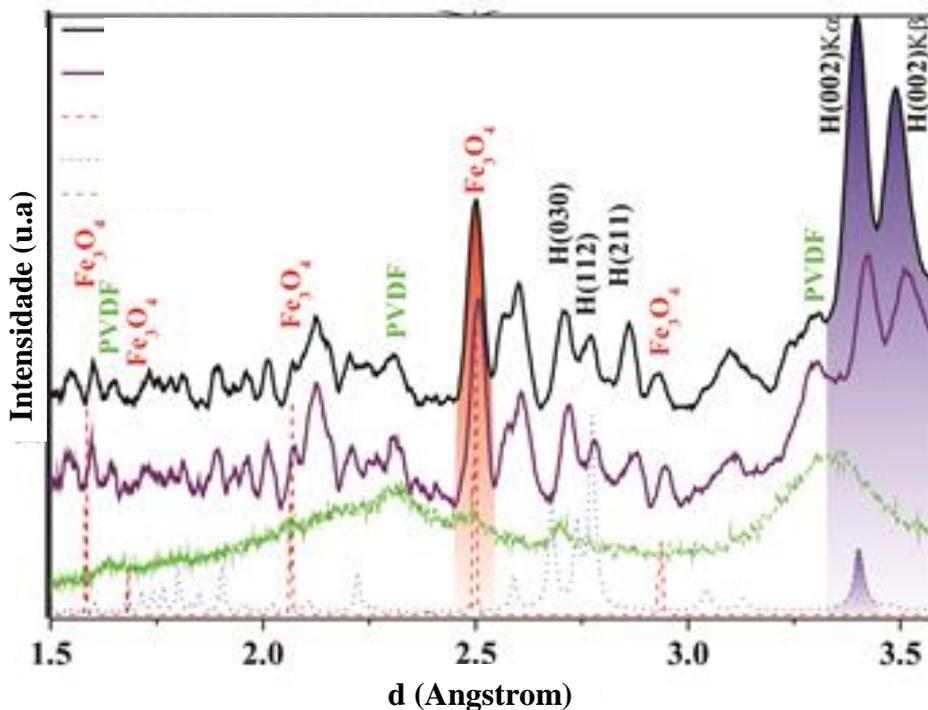


Figura 5.5.8: Difratograma de raios X com ângulo rasante, das amostras ternárias 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ que foram imersas em SBF por 3 dias: amostra sem aplicação de campo magnético (em roxo) e amostra com aplicação de campo magnético (em preto).

Desse modo, pode-se afirmar que o campo magnético influencia de modo positivo para acelerar a nucleação de apatita. Visto os resultados de MEV, EDS e DRX complementares das amostras com 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ que foram imersas em SBF por 3 dias.

5.6. Discussão

Em suma, esta pesquisa teve por objetivo produzir biocompósitos multifuncionais à base de PVDF, fosfato de cálcio e Fe_3O_4 com propriedade magnética, piezoelétrica e de bioatividade para aplicações ortopédicas. O principal intuito foi analisar a influência da aplicação de campos elétrico e magnético alternados em amostras imersas em SBF. De acordo com literatura, (tópico 2.9) existem diferentes meios de promoção e formas de estimulação extrínseca que podem ser utilizadas em prol do reparo do tecido ósseo. Todavia, o método utilizado neste trabalho bem como os biocompósitos multifuncionais 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20% Fe_3O_4 , que podem ser ativados por campo elétrico e magnético, são inéditos.

O efeito piezoelétrico inverso do compósito 60%HA β -40%PVDF pode ser ativado por meio de um campo elétrico externo capaz de acelerar a nucleação de apatita. Por outro lado, o compósito 30%HA β -50%PVDF-20% Fe_3O_4 foi proposto para ser bioativo, piezoelétrico e magnético, em que o estímulo com campo magnético externo possa vir a acelerar o crescimento de apatita, mediante a combinação de suas propriedades. O fluxograma apresentado na Figura 5.6.1 facilita a compreensão dos fenômenos atrelados a esse processo. Assim, quando um campo magnético alternado é aplicado ao compósito 30%HA β -50%PVDF-20% Fe_3O_4 causa vibrações na magnetita, devido às forças magnéticas sofridas por ela. A vibração da magnetita induz vibração em todo material e, conseqüentemente, essa vibração ativa o efeito piezoelétrico direto na matriz polimérica de PVDF. O efeito piezoelétrico promoverá/rearranjará cargas elétricas superficiais no biocompósito. A mudança no arranjo de cargas superficiais intensifica a bioatividade, já que o processo de crescimento de apatita ocorre devido à atração iônica promovida pelas cargas superficiais.

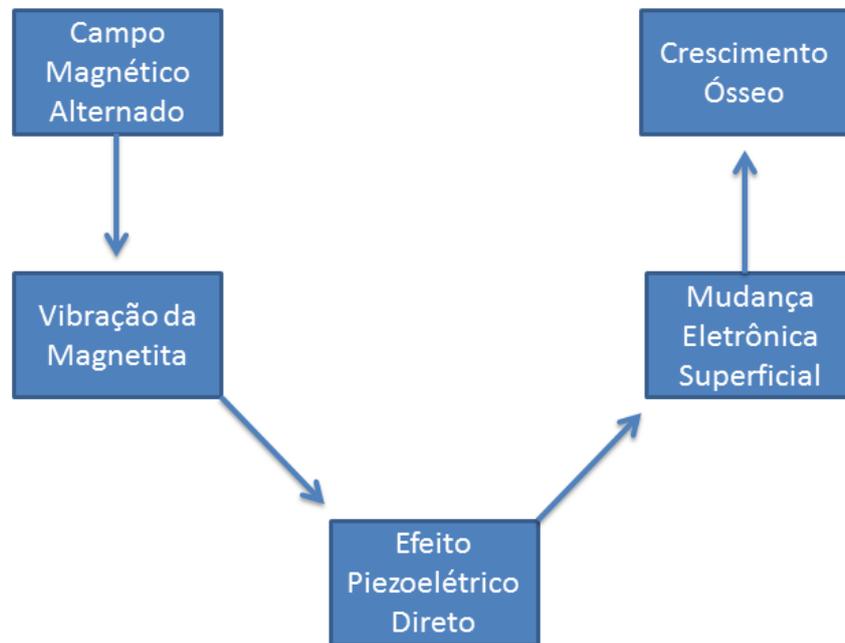


Figura 5.6.1: Fluxograma esquemático dos fenômenos decorrentes no compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ durante o processo de bioatividade intensificada por campo magnético externo.

Na Figura 5.6.2 é apresentado um fluxograma esquemático dos fenômenos decorrentes no compósito 60%HA β -40%PVDF, durante o processo de bioatividade intensificada por campo elétrico externo. No esquema, um campo elétrico alternado é aplicado ao compósito, que ativa o efeito piezoelétrico (existente no PVDF fase β) inverso. Neste processo ocorre deformação mecânica alternada, (movimento de contração / expansão), rearranjando as cargas elétricas na superfície do compósito (revertendo os polos elétricos negativos e positivos nas regiões superficiais). Assim, estimulando o crescimento de apatita acelerado por troca iônica.

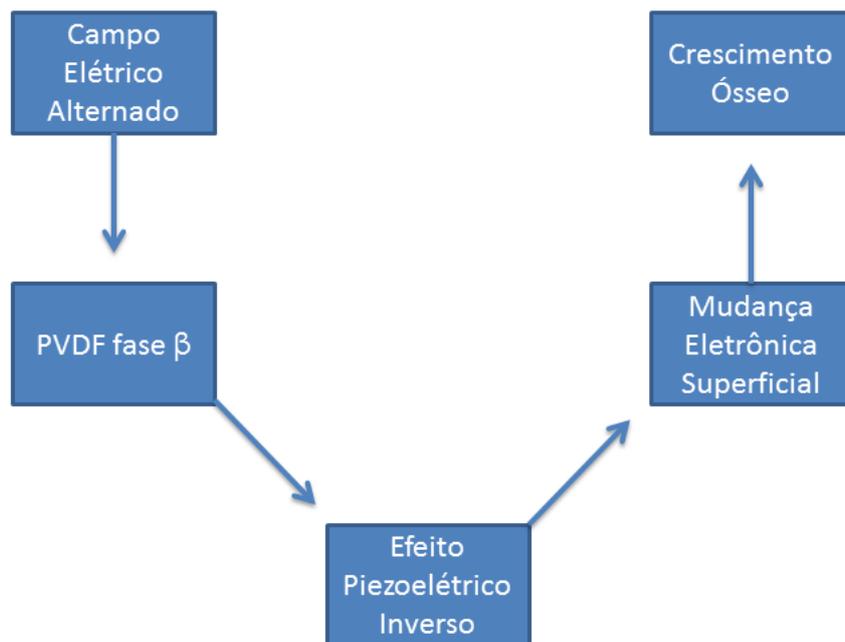


Figura 5.6.2: Fluxograma esquemático dos fenômenos decorrentes no compósito 60%HA β -40%PVDF durante o processo de bioatividade intensificada por campo elétrico externo.

Os resultados obtidos indicaram a catálise da bioatividade do compósito 60%HA β -40%PVDF imerso em SBF por 3 dias sob aplicação de campo elétrico. Observou-se que houve um crescimento acelerado de apatita, o qual ocorreu devido a ação do estímulo externo do campo elétrico no compósito que possui fase piezoelétrica, resposta ferroelétrica e bioatividade. Da mesma forma, os resultados do compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ imerso em SBF por 3 dias sob aplicação de campo magnético, também indicaram catálise no crescimento ósseo sintético, que ocorreu por causa da ação do estímulo externo campo magnético no compósito. Assim, tanto a ativação do efeito piezoelétrico direto quanto do inverso afetam o potencial bioativo dos compósitos. Diante do exposto é evidente que os biocompósitos e as técnicas desenvolvidas são promissoras. Assim, no presente trabalho foi comprovada por meio de uma investigação diferenciada, a capacidade de campos alternados (elétrico e magnético) em acelerar o crescimento de apatita *in vitro*. O desenvolvimento desse trabalho resultou no depósito da patente BR1020180164953, além de apresentar potencial para ser empregado em futuras próteses avançadas, confeccionadas com os biocompósitos multifuncionais que possam vir a acelerar o processo de cura em cirurgias ortopédicas.

6. CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos e nos resultados obtidos das amostras de PVDF, HA β e dos compósitos 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ pode-se chegar as seguintes conclusões:

Na análise de difração de raios X, realizada nas amostras antes de serem imersas em SBF, foi verificado que o HA β pode ser classificado como uma cerâmica bifásica, devido presença das fases cristalinas HAp e β -TCP. No difratograma do PVDF foi possível identificar a fases α e com maior dificuldade a fase β . A precursora Fe₃O₄ foi identificada somente com a fase magnetita. No compósito 60%HA β -40%PVDF foi detectado no difratograma as fases referentes ao HA β e uma pequena elevação referente ao precursor PVDF. Já no compósito ternário 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ foram identificadas as fases referentes aos três precursores PVDF, HA β e Fe₃O₄.

Por meio da análise de magnetometria de amostra vibrante foi possível observar um comportamento superparamagnético da magnetita e do compósito. Apesar do compósito 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄, conter 80% de material diamagnético ainda foi possível obter resposta magnética, resultado esse, essencial para a aplicação que se almeja.

A caracterização ferroelétrica revelou na amostra de HA β um comportamento quase paraelétrico, sobreposto com uma pequena curva de histerese, enquanto que o PVDF apresentou uma histerese ferroelétrica, com resposta não tão elevada. No compósito 60%HA β -40%PVDF foi possível verificar também a existência de histerese ferroelétrica, atestando seu caráter polar.

A análise de FTIR-ATR possibilitou identificar as bandas do precursor PVDF, e a partir de então calcular o percentual de fase β . Os resultados revelaram que o método utilizado para sinterizar a amostra em pastilha é promissor. Visto que houve aumento expressivo no percentual da fase β , facilidade no processo de produção quando comparado com amostras em filmes, e a pequena diferença entre a porcentagem de fase β obtida na pesquisa em comparação com outros resultados (que utilizam técnicas mais elaboradas).

O SBF utilizado na pesquisa foi sintetizado com sucesso, pois os resultados indicaram nucleação de apatita nas amostras bioativas padrões de HA β .

Conclui-se que tanto a aplicação de campo elétrico, quanto a aplicação de campo magnético influenciaram positivamente acelerando o crescimento de apatita, visto os resultados de FTIR-ATR, MEV e DRX das amostras compostas imersas por 3 dias em SBF (grupo controle) em comparação com os respectivos (grupo teste).

Observou-se que há uma relação direta entre a espessura da camada de apatita e o tamanho da área “craquelada”, quanto mais espessa for a camada nucleada maior é a área “craquelada”.

6.1. *Perspectivas*

- ✓ Investigar a bioatividade de amostras com 60%HA β -40%PVDF com aplicação de campo elétrico e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ com aplicação de campo magnético, imersas em SBF em intervalo de tempo diferentes como 1 dia, 2 dias, 4 dias e assim por diante;
- ✓ Investigar diferentes configurações (frequência, amplitude, tempo de aplicação) com o uso de campo elétrico e/ou campo magnético;
- ✓ Procurar entender as trocas iônicas que ocorrem entre os compósitos 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ com o fluido corpóreo simulado;
- ✓ Entender como se comporta a “sopa de íons” (SBF), com a aplicação de campo elétrico e campo magnético;
- ✓ Buscar aperfeiçoar amostras (pastilhas) de PVDF com maior quantidade possível de fase β , para depois produzir amostras compostas;
- ✓ Imergir amostras de compósitos com 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ por vários dias em SBF, com intuito de avaliar o comportamento da formação da camada de apatita após os sete dias, que é o intervalo que se conhece até o momento;
- ✓ Analisar as propriedades mecânicas e térmicas nos compósitos com 60%HA β -40%PVDF e 30%HA β -50%PVDF-20%Fe₃O₄ e comparar com resultados da literatura;
- ✓ Utilizar os compósitos, com matriz polimérica, para sintetizar filamentos para impressora 3D e com eles imprimir peças de substituições ósseas

com encaixe perfeito, o que aprimora e também acelera o processo de cura;

- ✓ Com o uso da técnica de impressão 3D buscar também imprimir matrizes porosas tridimensionais (scaffolds), projetados para serem arcabouços para o crescimento de tecido ósseo;
- ✓ Após definir a melhor configuração de campo elétrico e campo magnético, realizar experimento *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- [1] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterial science: an introduction to materials in medicine*, 2^a Ed. San Diego, 2004.
- [2] A. L. R. Pires, A. C. K. Bierhalz, and Â. M. Moraes, “Biomateriais: tipos, aplicações e mercado,” *Quim. Nov.*, vol. 38, no. 7, pp. 957–971, 2015.
- [3] P. Brasil, “Cirurgias ortopédicas crescem 72% no primeiro quadrimestre do ano,” 2015. [Online]. Available: <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/06/cirurgias-ortopedicas-crescem-72-no-primeiro-quadrimestre-de-2015>. [Accessed: 13-Mar-2019].
- [4] P. Brasil, “INTO registra apenas uma captação de ossos em 2015,” 2015. [Online]. Available: <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/03/into-registra- apenas-uma-captacao-de-ossos-em-2015>. [Accessed: 13-Mar-2019].
- [5] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, “Sinopse do censo demográfico de 2010,” 2010. [Online]. Available: <http://www.ibge.gov.br/populacao/projecao/>. [Accessed: 13-Mar-2019].
- [6] J. C. Gali, “Osteoporose,” *Acta Ortop Bras*, vol. 9, no. 2, pp. 3–12, 2001.
- [7] M. Ramazanoglu and Y. Oshida, “Osseointegration and bioscience of implant surfaces - current concepts at bone-implant interface,” in *Implant Dentistry - A Rapidly Evolving Practice*, Turkyilmaz I., Ed. InTech, 2011, pp. 57–80.
- [8] T. R. Cuadrado and G. Abraham, “Propriedades mecânicas de biomateriais,” in *Biomateriais*, Italia: Faenza Editrice Ibérica, S.L., 2004.
- [9] W. D. J. Callister, *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*, 5^a ed. Rio de Janeiro: S.A., 2002.
- [10] V. F. Freitas, “O composto BiFeO₃-PbTiO₃ dopado com La : relações propriedade/estrutura,” UEM, 2011.
- [11] C. Ribeiro, E. C. S. Rigo, P. Sepúlveda, J. C. Bressiani, and A. H. A. Bressiani, “Formation of calcium phosphate layer on ceramics with different reactivities,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 24, no. 5, pp. 631–636, 2004.
- [12] R. Z. LeGeros, *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*, vol. 15. New York: Karger, 1991.
- [13] Y. Tanimoto, Y. Shibata, A. Murakami, T. Miyazaki, and N. Nishiyama, “Effect of varying HAP/TCP ratios in tape-cast biphasic calcium phosphate ceramics on response in vitro,” *J. Hard Tissue Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 2–7, 2009.
- [14] B. Callegari and W. D. Belangero, “Análise da interface formada entre o polifluoreto de vinilideno (piezelétrico e não piezelétrico) e o tecido ósseo de ratos,” *Acta Ortop. Bras.*, vol. 12, no. 3, pp. 160–166, 2004.
- [15] N. Meng, X. Zhu, R. Mao, M. J. Reece, and E. Bilotti, “Nanoscale interfacial electroactivity in PVDF/PVDF-TrFE blended films with enhanced dielectric and

- ferroelectric properties,” *J. Mater. Chem. C*, vol. 5, no. 13, pp. 3296–3305, 2017.
- [16] F. J. C. et al Braga, “Characterization of PVDF/HAP composites for medical applications,” *Mater. Res.*, vol. 10, no. 3, pp. 247–251, 2007.
- [17] B. D. Cullity and C. D. Graham, *Introduction to magnetic materials*, 2^a. New Jersey: Wiley-IEEE, 2009.
- [18] V. F. Freitas, “Mecanosíntese e Caracterizações Ferróicas de cerâmicas de (1-x) BiFeO₃ -(x) PbTiO₃,” UEM, 2009.
- [19] P. Tartaj, M. D. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreño, and C. J. Serna, “Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, pp. 182–197, 2003.
- [20] P. Tartaj, M. D. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreño, and C. J. Serna, “Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles,” in *Handbook of magnetic materials*, K. H. J. Buschow, Ed. New York: Elsevier North Holland, 2006, p. 550.
- [21] J. Reis *et al.*, “A new piezoelectric actuator induces bone formation in vivo: A preliminary study,” *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012.
- [22] C. Frias, J. Reis, F. C. e Silva, J. Potes, J. Simões, and A. T. Marques, “Polymeric piezoelectric actuator substrate for osteoblast mechanical stimulation,” *J. Biomech.*, vol. 43, no. 6, pp. 1061–1066, 2010.
- [23] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [24] D. F. Williams, *Definitions in biomaterials proceedings of a consensus conference of the European society for biomaterials*. Chester, England, 1986.
- [25] D. F. Williams, “On the nature of biomaterials,” *Biomaterials*, no. 30, pp. 5897–5909, 2009.
- [26] L. S. De Moraes, G. S. Guimarães, and C. N. Elias, “Liberação de íons por biomateriais metálicos,” *Rev. Dent. Press Ortod. e Ortop. Facial*, vol. 12, pp. 48–53, 2007.
- [27] C. S. Delfino, C. Ribeiro, G. F. Vieira, a. H. a. Bressiani, and M. L. Turbino, “Uso de novos materiais para o capeamento pulpar (hidroxiapatita - HAp e fosfato tricálcico -B-TCP),” *Cerâmica*, vol. 56, pp. 381–388, 2010.
- [28] Y. Tabata, “Biomaterial technology for tissue engineering applications,” *J. R. Soc. Interface /*, vol. 6, no. March, pp. S311–S324, 2009.
- [29] W. D. J. Callister, *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*. 2002.
- [30] W. et al Bonfield, “Hydroxyapatite reinforced polyethylene – a mechanically compatible implant material for bone replacement,” *Biomaterials*, pp. 185–186, 1981.
- [31] B. G. Fernandes, “Bioativação superficial do PEUAPM com hidroxiapatita,” UFRGS, 2009.

- [32] B. T. Rego, “Avaliação do comportamento mecânico de nanocompósito de PEEK/nHA sob curta e longa duração para aplicação como biomaterial,” UFSCar, 2012.
- [33] W. R. Weinand, “Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e a sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis,” Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- [34] W. Cao and L. L. Hench, “Bioactive materials,” *Ceram. Int.*, vol. 22, no. 6, pp. 493–507, 1996.
- [35] A. C. Carreira, G. G. Alves, W. F. Zambuzzi, M. C. Sogayar, and J. M. Granjeiro, “Bone morphogenetic proteins: Structure, biological function and therapeutic applications,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 561, pp. 64–73, 2014.
- [36] K. J. Burg, S. Porter, and J. F. Kellam, “Biomaterial developments for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2347–2359, 2000.
- [37] M. Witkowska-Zimny, “Transcriptional control of osteogenesis,” in *Osteogenesis*, Y. Lin, Ed. Rijeka, Croatia: InTech copyright, 2012, pp. 1–20.
- [38] T. Albrektsson and C. Johansson, “Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration,” *Eur. Spine J.*, no. 10, pp. 96–101, 2001.
- [39] G. M. L. Dalmônico, D. F. Silva, P. F. Franczar, N. H. A. Camargo, and M. A. Rodríguez, “Elaboration biphasic calcium phosphate nanostructured powders,” *Cerâmica y Vidr.*, vol. 54, no. 1, pp. 37–43, 2015.
- [40] T. M. Coelho *et al.*, “Characterization of natural nanostructured hydroxyapatite obtained from the bones of Brazilian river fish,” *J. Appl. Phys.*, vol. 100, no. 9, pp. 094312–0943126, 2006.
- [41] F. M. Fonseca, “Biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por gelcasting,” Instituto Militar de Engenharia, 2007.
- [42] P. S. de Souza, “Sítios preferenciais de substituição de Cd e Sr em hidroxiapatita: previsão teórica baseada em métodos de ligação forte, Hückel estendido,” Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2011.
- [43] K. Momma and F. Izumi, “VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data,” *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 44, no. 6, pp. 1272–1276, 2011.
- [44] L. I. Ardanova *et al.*, “Isomorphous substitutions of rare earth elements for calcium in synthetic hydroxyapatites,” *Inorg. Chem.*, vol. 49, no. 22, pp. 10687–10693, 2010.
- [45] L. M. Silva, “Preparação e caracterizações físicas do compósito bioativo PVDF-HAp com o potencial para implante ósseo,” Universidade Estadual de Maringá, 2015.
- [46] T. G. M. Bonadio, “Estudos dos Compósitos TiO₂-Hidroxiapatita e Nb₂O₅-Hidroxiapatita: Comportamento Físico- mecânico, Estrutural e de Bioatividade,” Universidade Estadual de Maringá, 2011.

- [47] M. Yashima, A. Sakai, T. Kamiyama, and A. Hoshikawa, "Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction," *J. Solid State Chem.*, vol. 175, no. 2, pp. 272–277, 2003.
- [48] C. Ribeiro, "Processamento e caracterização de cerâmicas à base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico," Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2003.
- [49] T. C. de C. Costa, "Síntese de nanopartículas de magnetita via decomposição térmica em meio não aquoso," Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013.
- [50] R. D. Bini, "Desenvolvimento de nanopartículas de Magnetita para aplicações biológicas: propriedades estruturais, microestruturais e magnéticas," Universidade Estadual de Maringá, 2016.
- [51] A. G. L. Martinez, "Síntese de nanopartículas magnéticas com elevada magnetização de saturação e estabilidade química," Universidade de São Paulo, 2013.
- [52] K. C. de Souza, N. D. S. Mohallem, and E. M. B. de Sousa, "Nanocompósitos magnéticos: potencialidades de aplicações em biomedicina," *Quim. Nova*, vol. 34, no. 10, pp. 1692–1703, 2011.
- [53] C. Haavik, S. Stølen, H. Fjellvåg, M. Hanfland, and D. Häusermann, "Equation of state of magnetite and its high-pressure modification: Thermodynamics of the Fe-O system at high pressure," *Am. Mineral.*, vol. 85, pp. 514–523, 2000.
- [54] M. G. Broadhurst, G. T. Davis, J. E. McKinney, and R. E. Collins, "Piezoelectricity and pyroelectricity in polyvinylidene fluoride - A model," *J. Appl. Phys.*, vol. 49, no. 10, pp. 4992–4997, 1978.
- [55] A. L. Paschoal, "Estudo da viabilidade de aplicação do polímero piezoelétrico fluoreto de polivinilideno (PVDF) entre osso cortical e placa de osteossíntese para estimulação de crescimento ósseo.," EESC/USP, 2003.
- [56] U. Klinge, B. Klosterhalfen, a. P. Öttinger, K. Junge, and V. Schumpelick, "PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes," *Biomaterials*, vol. 23, no. 16, pp. 3487–3493, 2002.
- [57] R. F. Valentini, T. G. Vargo, J. A. Gardella, and P. Aebischer, "Electrically charged polymeric substrates enhance nerve fibre outgrowth In vitro," *Biomaterials*, vol. 13, no. 3, pp. 183–190, 1992.
- [58] L. Akcelrud, *Fundamentos da ciência dos polímeros*. Barueri- SP: Manole, 2007.
- [59] D. S. Hashimoto, "Dependência da fluência e recuperação do Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) com a tensão e taxa de deformação," UFRJ, 2013.
- [60] P. F. R. da Costa, "Estudo das propriedades mecânicas, elétricas e térmicas do compósito Poli(Fluoreto de vinilideno)/ Nanotubos de Carbono," Universidade do Minho, 2009.
- [61] R. G. Gonzaga, "Caracterização piroelétrica do polímero Fluoreto de

- Polivinilideno (PVDF),” UNIFAL-MG, 2014.
- [62] V. J. G. da S. Sencadas, “Influência das condições de processamento na morfologia e fases cristalinas do PVDF e nas transições de fase do copolímero P(VDF-TrFE),” Universidade do Minho, 2005.
- [63] R. Hasegawa, Y. Takahashi, Y. Chatani, and H. Tadokoro, “Crystal structures of three crystalline forms of Poly(vinylidene fluoride),” *Polym. J.*, vol. 3, no. 5, pp. 600–610, 1972.
- [64] H. Hasegawa, Ryoso; Kobayashi, Masamich; Tadokoro, “Molecular conformation and packing of Poly(vinylidene fluoride), stability of three crystalline forms and the effect of high pressure,” *Polym. J.*, vol. 3, pp. 591–599, 1972.
- [65] M. Li *et al.*, “Revisiting the δ -phase of poly(vinylidene fluoride) for solution-processed ferroelectric thin films,” *Nat. Mater.*, vol. 12, no. 5, pp. 433–438, 2013.
- [66] L. Zhu and Q. Wang, “Novel ferroelectric polymers for high energy density and low loss dielectrics,” *Macromolecules*, no. 45, pp. 2937–2954, 2012.
- [67] S. Osaki and Y. Ishida, “Effects of annealing and isothermal crystallization upon crystalline forms of poly(vinylidene fluoride),” *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, vol. 13, no. 6, pp. 1071–1083, 1975.
- [68] R. J. Gregorio and M. Cestari, “Effect of crystallization temperature on the crystalline phase content and morphology of poly (vinylidene fluoride),” *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. Vol. 32, pp. 859–870, 1994.
- [69] B. H. Stuart, *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*, 1^a ed., vol. 8. New York: John Wiley & Sons, 2004.
- [70] A. Salimi and A. A. Yousefi, “FTIR studies of β -phase crystal formation in stretched PVDF films,” *Polym. Test.*, vol. 22, no. 6, pp. 699–704, 2003.
- [71] G. R. Salmazzo, E. A. Falcão, A. R. L. Caires, D. Garcia, J. A. Eiras, and E. R. Botero, “Síntese e caracterização estrutural de compósitos a base de poli(flúoreto de vinilideno)/(Pb_{0,91} La_{0,09})(Zr_{0,65} Ti_{0,35})_{0,98} O₃,” *Cerâmica*, vol. 60, pp. 83–87, 2014.
- [72] W. P. Mason, *Piezoelectric Crystals and Their Applications to Ultrasonics*. New York – USA, 1950.
- [73] T. Kokubo, H. M. Kim, and M. Kawashita, “Novel bioactive materials with different mechanical properties,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2161–2175, 2003.
- [74] J. A. Almeida and A. Ferreira, *Elementos de anatomia e fisiologia humanas*, Nacional. São Paulo, 1983.
- [75] C. V. B. Gusmão and W. D. Belangero, “Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico?,” *Rev. Bras. Ortop.*, vol. 44, no. 4, pp. 299–305, 2009.
- [76] J. F. Loutit and N. W. Nisbet, “The origin of osteoclasts.,” *Immunobiology*, vol.

161, no. 3–4, pp. 193–203, 1982.

- [77] E. Fukada and I. Yasuda, “On the piezoelectric effect of bone,” *J. Phys. Soc. Japan*, vol. 12, no. 10, pp. 1158–1162, 1957.
- [78] Y. Azuma, M. Ito, Y. Harada, H. Takagi, T. Ohta, and S. Jingushi, “Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 16, no. 4, pp. 671–680, 2001.
- [79] H.-P. Wiesmann, M. Hartig, U. Stratmann, U. Meyer, and U. Joos, “Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1538, no. 1, pp. 28–37, Feb. 2001.
- [80] C. T. Brighton, W. Wang, R. Seldes, G. Zhang, and S. R. Pollack, “Signal transduction in electrically stimulated bone cells,” *J. BONE Jt. Surg.*, vol. 83, no. 10, 2001.
- [81] N. Inoue, I. Ohnishi, D. Chen, L. W. Deitz, J. D. Schwardt, and E. Y. S. Chao, “Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model,” *J. Orthop. Res.*, vol. 20, no. 5, pp. 1106–1114, Sep. 2002.
- [82] S. P. Calixto, “Estudo do efeito de campo elétrico pulsado no reparo ósseo em tíbias de ratos,” Escola de Engenharia de São Carlos/Instituto de Física de São Carlos/Instituto de Química de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2007.
- [83] Y. Ding *et al.*, “Effect of low-intensity pulsed ultrasound on bone formation during mandible distraction osteogenesis in a canine model—A preliminary study,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 67, no. 11, pp. 2431–2439, Nov. 2009.
- [84] M. Hronik-Tupaj, W. L. Rice, M. Cronin-Golomb, D. L. Kaplan, and I. Georgakoudi, “Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields,” *Biomed. Eng. Online*, vol. 10, no. 1, p. 9, Jan. 2011.
- [85] J. A. Léo, A. Cunha, E. F. Oliveira, and R. P. Prado, “Efeito do laser de baixa potência (ASGA, 904 nm) na reparação óssea de fraturas em ratos,” *Rev. Bras. Ortop.*, vol. 47, no. 2, pp. 235–240, 2012.
- [86] T. K. Malherbe, T. Hanekom, and J. J. Hanekom, “The effect of the resistive properties of bone on neural excitation and electric fields in cochlear implant models,” *Hear. Res.*, vol. 327, pp. 126–135, 2015.
- [87] Q. Cai *et al.*, “Osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells on poly(l-lactide)/Fe₃O₄ nanofibers with static magnetic field exposure,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 55, pp. 166–173, Oct. 2015.
- [88] T. T. Demirtaş, G. Kaynak, and M. Gumuşderelioğlu, “Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10×SBF-like solution by microwave irradiation,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 49, pp. 713–719, 2015.
- [89] T. C. Lee, P. Koshy, H. Z. Abdullah, and M. I. Idris, “Precipitation of bone-like apatite on anodised titanium in simulated body fluid under UV irradiation,” *Surf.*

Coatings Technol., vol. 301, pp. 20–28, 2016.

- [90] T. H. Jonasson *et al.*, “Effects of low-level laser therapy and platelet concentrate on bone repair: Histological, histomorphometric, immunohistochemical, and radiographic study,” *J. Cranio-Maxillo-Facial Surg.*, 2017.
- [91] M. Arjmand, A. Ardeshirylajimi, H. Maghsoudi, and E. Azadian, “Osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells cultured on nanofibrous scaffold improved in the presence of pulsed electromagnetic field,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 2, pp. 1061–1070, Feb. 2017.
- [92] Y. Xia *et al.*, “Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration,” *Biomaterials*, vol. 183, pp. 151–170, 2018.
- [93] X. Zhuo *et al.*, “Effects of combined magnetic fields treatment and nano-hydroxyapatite coating on porous biphasic calcium phosphate bone graft in rabbit spinal fusion model,” *Spine (Phila. Pa. 1976)*, vol. 43, no. 11, pp. E625–E633, Jun. 2018.
- [94] P. Zhou, F. He, Y. Han, B. Liu, and S. Wei, “Nanosecond pulsed electric field induces calcium mobilization in osteoblasts,” *Bioelectrochemistry*, vol. 124, pp. 7–12, 2018.
- [95] Z. Yuan, K. Memarzadeh, A. S. Stephen, R. P. Allaker, R. A. Brown, and J. Huang, “Development of a 3D collagen model for the In vitro evaluation of magnetic-assisted osteogenesis,” *Sci. Rep.*, no. 8, pp. 1–11, 2018.
- [96] J. Liu *et al.*, “Acceleration of bone defect healing and regeneration by low-intensity ultrasound radiation force in a rat tibial model,” *Ultrasound Med. e Biol.*, pp. 1–9, 2018.
- [97] D. F. N. da Silva, “Análise histomorfométrica após ação do campo magnético no processo de reparo ósseo em coelhos,” Universidade do Sagrado Coração, 2018.
- [98] Y. Xia *et al.*, “Novel magnetic calcium phosphate-stem cell construct with magnetic field enhances osteogenic differentiation and bone tissue engineering,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 98, pp. 30–41, 2019.
- [99] J. J. Vaca-gonzález, J. F. Escobar, J. M. Guevara, Y. A. Hata, G. G. Ferrer, and D. A. Garzón-alvarado, “Bioelectrochemistry capacitively coupled electrical stimulation of rat chondroepiphysis explants : A histomorphometric analysis,” *Bioelectrochemistry*, vol. 126, pp. 1–11, 2019.
- [100] F. I. G. de Brito, K. F. Medeiros, and J. M. Lourenço, “Um estudo teórico sobre a sinterização na metalurgia do pó,” *Holos*, vol. 3, pp. 204–211, 2007.
- [101] Á. M. Turatti, “Sinterização de carbetto de boro com alta resistência ao desgaste,” UFRGS, 2009.
- [102] J. L. Johnson, *Sintering of advanced materials: fundamentals and processes*. 2010.
- [103] C. E. Teixeira, “Sobre a teoria da difração de raios-X em estruturas tridimensionais,” UFMG, 2014.

- [104] C. S. Novais, “Caracterização estrutural por difração de raios X e estudo de atividade citotóxica de complexos de platina,” UFU, 2009.
- [105] C. C. et al Silva, “Aplicação da difração de raio-X para inspeções de campo – avaliação de tensões residuais em tubulações,” *4º PDPETRO*, pp. 1–10, 2007.
- [106] A. F. Padilha, *Materiais de Engenharia Microestrutura e Propriedades*. São Paulo, 1997.
- [107] S. do Brasil, “Manual de Instruções: Difratorômetro de raios X – Shimadzu – Maxima_X XRD – 7000,” 2019. [Online]. Available: www.shimadzubrasil.com.br. [Accessed: 26-Apr-2019].
- [108] C. L. G. de Amorim, “Estudo do efeito das interações água-argila no inchamento de argilominerais através da difração de raios X,” UFRJ, 2007.
- [109] R. L. B. Freitas, “Fabricação, caracterização e aplicações do compósito PZT/PVDF,” Unesp, 2012.
- [110] L. Reimer, *Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis*, 2^a. New York, 1998.
- [111] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, 6^a. Belmont, 2002.
- [112] E. C. Valadares, “Introdução aos microscópios eletrônicos de varredura e tunelamento,” *Rev. Bras. Ensino Física - Mater. e Métodos*, vol. 14, pp. 63–71, 1992.
- [113] S. Mohamadi, “Preparation and characterization of PVDF / PMMA / graphene polymer blend nanocomposites by using ATR-FTIR technique,” in *Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology*, vol. 1, T. Theophile, Ed. InTech copyright, 2012, p. 510.
- [114] S. Foner, “Versatile and sensitive vibration-sample magnetometer,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 30, no. 7, pp. 550–557, 1959.
- [115] L. C. Sampaio, F. Garcia, G. R. C. Cernicchiaro, and A. Y. Takeuchi, “Técnicas de magnetometria,” *Rev. Bras. Ensino Física*, vol. 22, no. 3, pp. 406–410, 2000.
- [116] C. B. Sawyer and C. H. Tower, “Rochelle salt as a dielectric,” *Phys. Rev.*, vol. 35, pp. 269–275, 1930.
- [117] S. L. Miller, R. D. Nasby, J. R. Schwank, M. S. Rodgers, and P. V. Dressendorfer, “Device modeling of ferroelectric capacitors,” *J. Appl. Phys.*, vol. 68, no. 12, pp. 6463–6471, 1990.
- [118] W. R. Weinand and W. M. Lima, “Processo de obtenção de hidroxiapatita via calcinação do osso de peixe,” PI 0506242-0 B1, 2005.
- [119] J. L. A. Albaro, “A operação de prensagem: considerações técnicas e sua aplicação industrial, parte V: descrição da etapa de prensagem,” *Cerâmica Ind.*, vol. 6, no. 3, pp. 26–32, 2001.
- [120] M. B. Thurmer, “Preparação e caracterização de membranas poliméricas de

poli(fluoreto de vinilideno) para uso em nanofiltração,” Universidade de Caxias do Sul, 2010.

- [121] D. M. Esterly and B. J. Love, “Phase Transformation to Beta-Poly (vinylidene fluoride) by Milling,” *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 42, no. 1, pp. 91–97, 2004.
- [122] C. X. Cardoso, J. S. C. Campos, and N. Alves, “Novos compósitos PVDF/CaO3-caracterização estrutural,” *Congr. Bras. Eng. e Ciências dos Mater.*, no. 14, pp. 19401–19408, 2000.
- [123] L. Yu and P. Cebe, “Crystal polymorphism in electrospun composite nanofibers of poly (vinylidene fluoride) with nanoclay,” *Polymer (Guildf)*., vol. 50, no. 9, pp. 2133–2141, 2009.
- [124] D. Dorniani, A. U. Kura, Z. Ahmad, A. Halim Shaari, M. Z. Hussein, and S. Fakurazi, “Preparation of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coated with gallic acid for drug delivery,” *Int. J. Nanomedicine*, no. 7, p. 5745, 2012.
- [125] J. M. Rosso, “Síntese e caracterização de compósitos Poli(fluoreto de vinilideno)/Ba_{0,3}Na_{0,7}Ti_{0,3}Nb_{0,7}O₃,” UEM, 2013.
- [126] R. . Kodama, “Magnetic nanoparticles,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 200, no. 1, pp. 359–372, 1999.
- [127] A. K. Gupta and M. Gupta, “Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3995–4021, 2005.
- [128] E. R. Kramer *et al.*, “Synthesis and characterization of iron-substituted hydroxyapatite via a simple ion-exchange procedure,” *J. Mater. Sci.*, vol. 48, no. 2, pp. 665–673, 2013.
- [129] G. C. Dias, L. Zadorosny, A. O. Sanches, and L. F. Malmonge, “Produção microfibras magnéticas de poli(fluoreto de vinilideno) e hexaferrita de bário– (PVDF/BAFE12019), obtidos pela técnica de fiação por sopro de solução (FSS),” *Rev. Iberoam. Polímeros y Mater.*, vol. 19, no. 1, pp. 10–19, 2018.
- [130] K. Yamashita, N. Oikawa, and T. Umegaki, “Acceleration and deceleration of bone-like crystal growth on ceramic hydroxyapatite by electric poling,” *Chem. Mater.*, vol. 8, no. 12, pp. 2697–2700, 1996.
- [131] K. S. Hwang *et al.*, “Effect of poling conditions on growth of calcium phosphate crystal in ferroelectric BaTiO₃ceramics,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 13, no. 1, pp. 133–138, 2002.
- [132] F. Jianqing, Y. Huipin, and Z. Xingdong, “Promotion of osteogenesis by a piezoelectric biological ceramic,” *Biomaterials*, vol. 18, no. 23, pp. 1531–1534, 1997.
- [133] J. E. Davies, “Surface Characterization of Biomaterials,” in *Journal of Biomedical Materials Research*, R. E. Baier, Ed. Amsterdam: Holland: Elsevier Science, 1988, pp. 369–371.

- [134] S. B. Lang *et al.*, “Ferroelectric polarization in nanocrystalline hydroxyapatite thin films on silicon,” *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, p. 2215, 2013.
- [135] S. Ikeda, M. Jimbo, S. I. Kobayashi, and Y. Wuada, “Depolarization field effect on the ferroelectric behavior of polymers,” *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, vol. 23, pp. 1781–1791, 1985.
- [136] T. Tominaga *et al.*, “Polyvinylidene fluoride/hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate multifunctional biocomposite: Potentialities for bone tissue engineering,” *Curr. Appl. physics*, vol. 17, pp. 767–773, 2017.
- [137] Y. Bormashenko, R. Pogreb, O. Stanevsky, and E. Bormashenko, “Vibrational spectrum of PVDF and its interpretation,” *Polym. Test.*, vol. 23, pp. 791–796, 2004.
- [138] B. S. Ince-Gunduz *et al.*, “Impact of nanosilicates on poly(vinylidene fluoride) crystal polymorphism: Part 1. Melt-crystallization at high supercooling,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 51, no. 6, pp. 1485–1493, 2010.
- [139] L. M. M. Costa, R. E. S. Bretas, and R. G. Filho, “Caracterização de filmes de PVDF- β obtidos por diferentes técnicas,” *Polímeros Ciência e Tecnologia*, vol. 19, pp. 183–189, 2009.
- [140] M. Kobayashi, K. Tashiro, and H. Tadokoro, “Molecular vibrations of three crystal forms of poly(vinylidene fluoride),” *Macromolecules*, vol. 8, no. 2, pp. 158–171, 1975.
- [141] G. L. Oliveira and M. F. Costa, “Avaliação do envelhecimento de pvdf por microdureza instrumentada,” *An. do 11º Congresso Bras. Polímeros*, pp. 4093–4098, 2011.
- [142] F. G. Abreu, “Análise de Polifluoreto de Vinilideno (PVDF) sob carregamento cíclico,” Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- [143] J. Sun *et al.*, “Modification on crystallization of poly(vinylidene fluoride) (PVDF) by solvent extraction of poly(methyl methacrylate) (PMMA) in PVDF/PMMA blends,” *Front. Mater. Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 388–400, Dec. 2011.
- [144] R. G. Junior and D. S. Borges, “Effect of crystallization rate on the formation of the polymorphs of solution cast poly (vinylidene fluoride),” *Polymer (Guildf.)*, vol. 49, pp. 4009–4016, 2008.
- [145] V. Sencadas, R. Gregorio Filho, and S. Lanceros-Mendez, “Processing and characterization of a novel nonporous poly(vinylidene fluoride) films in the β phase,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 352, pp. 2226–2229, 2006.
- [146] C. B. Baddiel and E. E. Berry, “Spectra structure correlations in hydroxy and fluorapatite,” *Acta, Spectrochim.*, vol. 22, pp. 1407–1416, 1966.
- [147] C. Paluszkiwicz, M. Gawlicki, and Z. Paszkiewicz, “The FTIR spectroscopy and QXRD studies of calcium phosphate based materials produced from the powder precursors with different Ca / P ratios,” *Ceram. Int.*, vol. 23, no. 96, pp. 297–304, 1997.

- [148] B. Fowler, "Infrared studies of apatites. I. vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution," *Inorg. Chem.*, vol. 13, no. 1, pp. 194–207, 1974.
- [149] S. J. Gadaleta, E. P. Paschalis, F. Betts, R. Mendelsohn, and A. L. Boskey, "Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite : new correlations between X-Ray Diffraction and Infrared Data," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 58, pp. 9–16, 1996.
- [150] M. Yamaura, R. L. Camilo, L. C. Sampaio, M. A. Macêdo, M. Nakamura, and H. E. Toma, "Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 279, pp. 210–217, 2004.
- [151] T. K. Jain, M. A. Morales, S. K. Sahoo, D. L. Leslie-pelecky, and V. Labhasetwar, "Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents," *Mol. Pharm.*, vol. 2, no. 3, pp. 194–205, 2005.
- [152] A. A. P. Mansur and H. S. Mansur, "Estimativa do grau de hidrólise do PVA através de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier," in *8º congresso brasileiro de polímeros*, 2005, pp. 349–350.
- [153] T. Boccaccio, A. Bottino, G. Capannelli, and P. Piaggio, "Characterization of PVDF membranes by vibrational spectroscopy," *J. Mater. Sci.*, vol. 210, pp. 315–329, 2002.
- [154] X. Zhang, W.-Z. Lang, H.-P. Xu, X. Yan, and Y.-J. Guo, "The effects of hydroxyapatite nano whiskers and its synergism with polyvinylpyrrolidone on poly(vinylidene fluoride) hollow fiber ultrafiltration membranes," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 28, pp. 21532–21543, 2015.
- [155] A. Siddharthan, S. K. Seshadri, and T. S. S. Kumar, "Microwave accelerated synthesis of nanosized calcium deficient hydroxyapatite," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 15, pp. 1279–1284, 2004.
- [156] L. Müller, E. Conforto, D. Caillard, and F. A. Müller, "Biomimetic apatite coatings-Carbonate substitution and preferred growth orientation," *Biomol. Eng.*, vol. 24, no. 5, pp. 462–466, 2007.
- [157] R. N. Panda, M. F. Hsieh, R. J. Chung, and T. S. Chin, "FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nanoparticles synthesized by hydroxide-gel technique," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 64, no. 2, pp. 193–199, 2003.

APÊNDICE

Patente

BONADIO, T. G. M.; FREITAS, V. F.; SILVA, L. M. ; SANTOS, I. A.; WEINAND, W. R.; MIYAHARA, R. Y. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180164953, título: "COMPÓSITO BIOMAGNETOATIVO, PVDF-BIO-MAGNÉTICO, PARA IMPLANTES, ENXERTOS E SUBSTITUIÇÕES ÓSSEAS E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito PCT: 13/08/2018.

Artigos publicados

SILVA, L. M. ; ROSSO, J. M. ; BONADIO, T. G. M. ; SILVA, D. M. ; DIAS, G. S. ; WEINAND, W. R. ; TOMINAGA, T. T. ; MIYAHARA, R. Y. ; CÓTICA, L. F. ; SANTOS, I. A. dos ; FREITAS, V. F. . On mechanical properties and bioactivity of PVDF-BCP composites. CERÂMICA, v. 64, p. 359-366, 2018.

SILVA, L. M.; BONADIO, T. G. M. ; ROSSO, J. M. ; DIAS, G. S. ; COTICA, L. F. ; WEINAND, W. R. ; MIYAHARA, R. Y. ; SANTOS, I. A. dos ; FREITAS, V. F. . On the synthesis and characterization of (bio) ferroelectrically active PVDF-BCP composites. FERROELECTRICS, v. 533, p 63-71, 2019.