



Universidade Estadual de Maringá

GILVAN BONFIM E SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE APATITA NO
COMPÓSITO BIOATIVO HAp-PVDF ESTIMULADO VIA
APLICAÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO – POTENCIAL PARA
IMPLANTE ÓSSEO**

Orientador
Prof. Dr. Valdirlei Fernandes Freitas

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Física da Universidade Estadual de
Maringá para obtenção do título de Doutor em
Física

Maringá, 28 de março de 2022.



Universidade Estadual de Maringá

GILVAN BONFIM E SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE APATITA NO
COMPÓSITO BIOATIVO HAp-PVDF ESTIMULADO VIA
APLICAÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO – POTENCIAL PARA
IMPLANTE ÓSSEO**

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Valdirlei Fernandes Freitas

Prof. Dr. Ludmilla Magalhães Silva

Prof. Dr. Eduardo Augusto Castelli Astrath

Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica

Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand

Prof. Dr. Gustavo Saguino Dias (suplente)

Prof. Dr. Ricardo Yoshimitzu Miyahara
(suplente)

Maringá, 28 de março de 2022.

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

S729c

Souza, Gilvan Bonfim e

Caracterização da formação de apatita no compósito bioativo HAp-PVDF estimulado via aplicação de campo elétrico - potencial para implante ósseo / Gilvan Bonfim e Souza. -- Maringá, PR, 2022.

84 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Valdirlei Fernandes Freitas.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Matemática, 2022.

1. HAp-PVDF (Biocompósito). 2. Biomateriais. 3. Campo elétrico. 4. Hidroxiapatita. 5. POLI (Fluoreto de Vinilideno). I. Freitas, Valdirlei Fernandes, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Matemática. III. Título.

CDD 23.ed. 530.4

Gilvan Bonfim e Souza

**CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE APATITA NO
COMPÓSITO BIOATIVO HAp-PVDF ESTIMULADO VIA
APLICAÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO – POTENCIAL PARA
IMPLANTE ÓSSEO**

.

Orientador
Prof. Dr. Valdirlei Fernandes Freitas

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Física da Universidade Estadual de
Maringá para obtenção do título de Doutor em
Física

Maringá, 28 de março de 2022.

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai (in memoriam): Antônio Carneiro, pelo incentivo e dedicação a criação dos filhos.
A minha família pelo carinho e afeto nesses tempos difíceis longe de casa, em especial minha tia
Ivoneide por sempre incentivar e apoiar a minha vida acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre me conceder saúde para o desenvolvimento do trabalho. Ao Prof. Valdirlei Fernandes Freitas, pela orientação e oportunidade de realização deste trabalho, e por estar desde o primeiro contato disposto ao incentivo e construção de conhecimento científico.

A todos os professores que contribuíram na minha vida acadêmica de forma direta e indiretamente.

Aos amigos do departamento de Física que propiciaram que o ambiente fosse agradável para realização do trabalho.

Ao Programa de pós-graduação em física da UEM- Maringá, pela oportunidade da realização do doutorado em física.

A Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa.

RESUMO

O biocompósito HAp-PVDF, cerâmico/polimérico foi estudado neste trabalho devido ao seu grande potencial para aplicações multifuncionais, trata-se de uma cerâmica bioativa (HAp) obtida via calcinação de osso de peixe e um fluoreto de poli (vinilideno) PVDF como propriedade piezoelétrica. O compósito quando submetido a aplicação de um fluido corporal simulado (SBF) desenvolve por reações naturais uma estrutura superficial de apatita sintética, semelhante a encontrada no osso humano. O objetivo deste trabalho é observar como os materiais reagiram à aplicação de um campo elétrico alternado quando submetido a um aparato experimental, analisar com diferentes técnicas experimentais como: Difração de Raio X, Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia de adsorção no infravermelho por transformada de Fourier. Esses métodos de investigação têm como finalidade observar as potencialidades que o experimento com campo elétrico contribuiu na formação de osso sintético em curto espaço de tempo.

Palavras chave: Biomateriais, Hidroxiapatita, Poli (Fluoreto de Vinilideno), Fluido Corporal Simulado, campo elétrico.

ABSTRACT

Biocomposite HAp-PVDF, ceramic/polymeric was studied in this work due to its great potential for multifunctional applications, it is a bioactive ceramic (HAp) obtained by calcination of fish bone and a poly (vinylidene) PVDF fluoride as piezoelectric property. The composite when subjected to the application of a simulated body fluid (SBF) develops by natural reactions a surface structure of synthetic apatite, similar to human bone. The objective of this work is to observe how the materials reacted to the application of an alternating electric field when submitted to an experimental apparatus, to analyze with different experimental techniques such as: X-Ray Diffraction, Scanning Electron Microscopy, Fourier transform infrared adsorption spectroscopy. These investigation methods aim to observe the potential that electric field experiment contributed to the formation of synthetic bone in short period of time.

Keywords: Biomaterials. Hydroxyapatite, Poly (vinylidene fluoride), simulated body fluid (SBF), electric field.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Unidade monomérica do PVDF.....	19
Figura 2: Modelo representativo do movimento das esferas no interior de um moinho do tipo planetário adaptado da referência [20].....	21
Figura 3: Estágio de sinterização por fase sólida: A) Partículas Soltas, B) Estágio Inicial, C) Estágio Intermediário, D) Estágio Final. Figura adaptada da referência [24].....	23
Figura 4: Condições geométricas para lei de Bragg, adaptada da referência [28].....	24
Figura 5: Desenho esquemático para comparação dos microscópios óptico e elétrico.[32].....	26
Figura 6: Modelo esquemático do aparato experimental para produção do SBF.....	30
Figura 7: Diagrama esquemático do arranjo experimental para caracterização das amostras de HAp, PVDF e HAp-PVDF.....	31
Figura 8: Simulação do campo elétrico de eletrodos semi-cilíndricos pelo método de elementos finitos a 3 Hz. (a) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial e imersos em potencial elétrico (coloração indica a intensidade escalonada pela barra lateral). (b) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D. (c) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial. (d) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D imersos em potencial elétrico.....	34
Figura 9: Características elétricas simuladas. (a) Simulação da intensidade de campo elétrico no interior dos eletrodos semi-cilíndricos em duas direções de análise. (b) Potencial elétrico no interior dos eletrodos semi-cilíndricos em 3 dimensões.....	35
Figura 10: Simulação do campo elétrico de eletrodos semicilíndricos pelo método de elementos finitos a 500 Hz. (a) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial e imersos em potencial elétrico (coloração indica a intensidade escalonada pela barra lateral). (b) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D. (c) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial. (d) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D imersos em potencial elétrico.....	36
Figura 11: Simulação do campo elétrico de eletrodos semi-cilíndricos pelo método de elementos finitos a 1 kHz. (a) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial e imersos em potencial elétrico (coloração indica a intensidade escalonada pela barra lateral). (b) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D. (c) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial. (d) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D imersos em potencial elétrico.....	37
Figura 12: Imagens de PVDF obtidas após imersão em SBF. (a) Imagem de superfície e (b) de fratura com 168 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de superfície e (d) de fratura com 84 horas de experimento com campo elétrico. Adaptado da ref. [35,38].....	40
Figura 13: Imagens de HAp obtidas após imersão em SBF. (a) Imagem de superfície e (b) de fratura com 168 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de superfície e (d) de	

LISTA DE FIGURAS

fratura com 84 horas de experimento com campo elétrico. Adaptado da ref. [35,38].....	41
Figura 14: - Imagens de HAp-PVDF obtidas após imersão em SBF. (a) Imagem de superfície e (b) de fratura com 24 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de superfície e (d) de fratura com 12 horas de experimento com campo elétrico. Adaptado da ref. [35,38].....	42
Figura 15: Imagens de HAp-PVDF obtidas após imersão em SBF. (a) Imagem de superfície e (b) de fratura com 48 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de superfície e (d) de fratura com 24 horas de experimento com campo elétrico. Adaptado da ref. [35,38].....	43
Figura 16: Imagens de HAp-PVDF obtidas após imersão em SBF. (a) Imagem de superfície e (b) de fratura com 72 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de superfície e (d) de fratura com 36 horas de experimento com campo elétrico. Adaptado da ref. [35,38].....	44
Figura 17: Imagens de HAp-PVDF obtidas após imersão em SBF. (a) Imagem de superfície e (b) de fratura com 96 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de superfície e (d) de fratura com 48 horas de experimento com campo elétrico. Adaptado da ref. [35,38].....	47
Figura 18: Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostra de HAp-PVDF com 72 horas de imersão em SBF com 36 h de aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico. Adaptado da ref. [35,38].....	46
Figura 19: Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostra de HAp-PVDF com 168 horas de imersão em SBF com 84 h de aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico. Adaptado da ref. [35,38].....	47
Figura 20: Difratoograma de Raio X, amostra de HAp-PVDF com 3 dias de imersão no SBF.....	48
Figura 21: Difratoograma de Raio X, amostra de HAp-PVDF com 5 dias de imersão no SBF.....	49
Figura 22: Difratoograma de Raio X, amostra de HAp-PVDF com 7 dias de imersão no SBF.....	49
Figura 23: Difratoograma de raio X do PVDF, com 7 dias de imersão em SBF.....	50
Figura 24: Difratoograma de Raio X, amostra de HAp com 7 dias de imersão no SBF.....	51
Figura 25: Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostra de HAp-PVDF com 3 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.....	52
Figura 26: Análise de espectroscopia FTIR-ATR para amostra de HAp-PVDF com 5 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.....	53
Figura 27: Análise de espectroscopia FTIR-ATR para amostras de HAp-PVDF com 7 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.....	54
Figura 28: Análise de espectroscopia FTIR-ATR para amostra de PVDF com 7 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.....	55
Figura 29: - Análise de espectroscopia FTIR-ATR para amostra de HAp com 7 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem campo elétrico.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 30: Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 72 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 72 horas de experimento com campo elétrico.....	57
Figura 31: Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 120 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 120 horas de experimento com campo elétrico.....	58
Figura 32: Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 168 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 168 horas de experimento com campo elétrico.....	59
Figura 33: Imagens de PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 168 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 168 horas de experimento com campo elétrico.....	60
Figura 34: Imagens de HAp. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 168 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 168 horas de experimento com campo elétrico.....	61
Figura 35: Padrão de difração de raios X obtido do composto HAp-PVDF imersos por 24 horas em SBF. (a) Sem campo elétrico e (b) com campo elétrico alternado externo.....	62
Figura 36: Padrão de difração de raios X obtido do composto HAp-PVDF imersos por 48 horas em SBF. (a) Sem campo elétrico e (b) com campo elétrico alternado externo.....	63
Figura 37: Padrão de difração de raios X obtido do composto HAp-PVDF imersos por 72 horas em SBF. (a) Sem campo elétrico e (b) com campo elétrico alternado externo.....	64
Figura 38: Padrão de difração de raios X obtido do composto PVDF imersos por 72 horas em SBF. (a) Sem campo elétrico e (b) com campo elétrico alternado externo.....	64
Figura 39: Padrão de difração de raios X obtido do composto HAp imersos por 72 horas em SBF. (a) Sem campo elétrico e (b) com campo elétrico alternado externo.....	65
Figura 40: Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostras de HAp-PVDF com 24 horas de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.....	66
Figura 41: Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostras de HAp-PVDF com 48 horas de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.....	66
Figura 42: Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostras de HAp-PVDF com 72 horas de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.....	67
Figura 43: Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostras de PVDF com 72 horas de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.....	68
Figura 44: Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostras de HAp com 72 horas de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.....	69
Figura 45: Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 24 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 24 horas de	

LISTA DE FIGURAS

experimento com campo elétrico.....	70
Figura 46: Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 48 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 48 horas de experimento com campo elétrico.....	71
Figura 47: Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 72 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 72 horas de experimento com campo elétrico.....	72
Figura 48: Imagens de PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 72 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 72 horas de experimento com campo elétrico.....	73
Figura 49: Imagens de HAP. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 72 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 72 horas de experimento com campo elétrico.....	74
Figura 50: Mecanismo ilustrativo onde destacam-se os efeitos da oscilação do campo elétrico na bioatividade HAb-PVDF. a Estrutura PVDF, vibração mecânica (b), (c) contração e (d) expansão, (e) atração de íons SBF. f Deposição iônica na configuração HAb e de superfície de carga. g Diferentes regiões de cargas elétricas que podem ocorrer na superfície do composto dependendo da orientação de sua polarização.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Velocidade, temperatura e tempo para sinterização das amostras.....	29
Tabela 2: Ordem dos Reagentes e massa para preparação do SBF.....	30

NOMENCLATURAS

HAp - Hidroxiapatita

PVDF - Poli(Fluoreto de Vinilideno)

FTIR - Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier

ATR - Espectroscopia de Reflectância Total Atenuada

MAE - Moagem de Alta Energia

SBF - Fluido Corpóreo Simulado

DRX - Difração de Raio X

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO 1</i>	16
1. INTRODUÇÃO	16
<i>CAPÍTULO 2</i>	17
2. OBJETIVOS	17
<i>CAPÍTULO 3</i>	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1. Hidroxiapatita.....	18
3.2. POLI (Fluoreto de Vinilideno).....	19
<i>CAPÍTULO 4</i>	20
4. METODOLOGIA E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	20
4.1. Moagem	20
4.2. Sinterização.....	22
4.3. Difração de Raio X (DRX).....	23
4.4. FTIR-ATR.....	25
4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	25
4.6. Obtenção das Amostras.....	26
4.7. Sinterização das Amostras.....	29
4.8. Preparação do Fluido Corporal Simulado.....	29
<i>CAPÍTULO 5</i>	33
5. APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA APLICAÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO DURANTE A IMERSÃO EM SBF	31
5.1. Arranjo Experimental.....	31
<i>CAPÍTULO 6</i>	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1. Simulação de Campo elétrico.....	33
6.2. Campo Elétrico 3 Hz.....	33
6.2.1 Campo com 500 Hz.....	35
6.2.2 Campo com 1 kHz.....	37
6.3. Estudos In Situ Com o Campo Elétrico Alternado EAC (3 HZ).....	39
6.3.1. Análise de Micrografia 3 HZ.....	39

6.4. Estudos In Situ Com o Campo Alternado EAC (500 Hz)	48
6.4.1 Difração de Raios X (DRX).....	48
6.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier no modo de refletância total atenuada.....	51
6.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	56
6.5. Análise das amostras com 1, 2 e 3 dias de imersão.....	61
6.5.1. Difração de Raio X (DRX).....	61
6.5.2. Análise de FTIR-ATR.....	65
6.5.3. Imagens de microscopia eletrônica de varredura.....	69
<i>CAPÍTULO 7</i>	75
7. MECANISMO DE AÇÃO SOB CAMPO ELÉTRICO.....	75
<i>CAPÍTULO 8</i>	77
8. DISCUSSÃO.....	77
<i>CAPÍTULO 9</i>	78
9. CONCLUSÃO.....	78
<i>PERSPECTIVAS</i>	80
<i>REFERÊNCIAS</i>	81

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o uso de biomateriais tem sido fundamental na aplicação e correção dos mais diversos tipos de problemas relacionados à saúde humana, o que torna de extrema importância o desenvolvimento e estudos que tenham como finalidade torná-los cada vez mais eficientes.

O termo biomateriais, por definição, é dado a uma substância que não seja droga ou fármaco, sendo naturais ou não utilizados, em aplicações biomédicas, tendo interações com o sistema biológico que tratam, substituem ou aumentam qualquer tecido, órgãos ou funções do corpo humano [1,2].

Os biomateriais podem ser sintéticos ou naturais, metálicos, cerâmicos, polímeros e compósitos, tendo como principal característica a biocompatibilidade para a qual foram projetados. Dentre estas a aplicação de biomateriais na regeneração de tecidos ósseo, é bastante relevante, pois os mesmos não danificam tecidos saudáveis, não aumentam riscos de contaminação, sendo elas virais ou bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente, podendo ainda ser de fácil dissolução e adsorção, ao mesmo tempo que permite estimular a formação óssea [3,4,5].

Várias técnicas de estudos para caracterização e adequação de novos materiais para aplicações biomédicas tem sido constantemente melhorada, a fim de viabilizar e tentar simular condições específicas como ocorridas após implantadas em corpo humano, isso é fundamental para avaliar o desenvolvimento em ambiente biológico podendo assim estudar propriedades físicas, químicas e biológicas.

Neste trabalho foi sintetizado o compósito cerâmico-polimérico 60%HAp-40%PVDF com propriedades piezoelétricas e de bioatividade. O composto foi caracterizado por DRX, MEV, FTIR-ATR e apresentou indicativos de crescimento de apatita (osso sintético) ao ser estimulado por campo elétrico.

Para esse procedimento utilizou-se 20 amostras, 10 para o grupo determinado controle e 10 para o grupo experimental submetido a aplicação de campo elétrico. O experimento foi dividido em duas etapas, a primeira consistia em analisar os efeitos do campo elétrico nos compósitos submerso em SBF por 3,5, e 7 dias. Na segunda etapa os compostos foram imersos em SBF com aplicação de campo elétrico por 1, 2 e 3 dias. De modo a termos dados suficientes para corroborar a efetividade do uso de campo elétrico alternado nas amostras.

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é identificar o quanto o campo elétrico alternado pode afetar um compósito de HAp-PVDF quando o mesmo está imerso em um fluido corporal simulado SBF. Tendo em vista que esses compósitos quando submetidos a esse tipo de experimento apresentam formação de camada superficial de apatita, mesmo material que compõem o osso humano.

Os objetivos específicos:

- Extrair dados que corroboram a eficácia do campo elétrico quando aplicados nas amostras.
- Caracterizar amostras submetidas ao experimento, trabalhamos com DRX, FTIR-ATR e MEV.
- Otimizar os resultados obtidos nas análises, a fim de compreender os efeitos do campo elétrico.
- Avaliar a efetividade do campo elétrico tanto pela sua intensidade, quanto pela quantidade de dias que o experimento foi desenvolvido.

CAPÍTULO 3

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita natural é um mineral encontrado no osso animal, sua estrutura é similar a fluorapatita com seu grupo (OH^-) ocupando os sítios do F^- [6]. Sua fórmula estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ que é o fosfato de cálcio mais estável de todos, com sua razão de Ca/P de 1,67, porém algumas composições estáveis podem ter razão estendida com valor aproximado de 1,5 [7].

A hidroxiapatita sintética que é um material cerâmico que apresenta características que a define como sendo bastante biocompatível, atribuindo a sua similaridade da fase mineral dos tecidos ósseos, isso favorece o crescimento ósseo (osteocondutor), estabelece a ligação entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo (bioativo) permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblasto dentre outras células óssea, sendo que as mesma não apresenta distinção da hidroxiapatita e a superfície óssea, o que indica a similaridade química do material. A hidroxiapatita também permite ligações do tipo dipolo, ou seja, as moléculas adsorvidas na superfície induzem a regeneração tecidual [8].

Um método que possibilita obter hidroxiapatita natural foi desenvolvido por Lima e Weinand, pelo processo de calcinação de ossos “*in natura*” a partir do osso de peixe, dessa forma pode-se obter matéria prima disponível em todas as regiões do país, além de possuir baixo custo pelo fato de utilizar osso de peixe, a temperatura utilizada nesse processo de calcinação é relativamente baixa em torno de 900°C [9].

A hidroxiapatita é considerada como o principal constituinte do tecido calcificado, dentes e ossos. Destaca-se também por apresentar características químicas e estruturais. Usada também na área farmacêutica como adsorvente de drogas, e na área química como catalisador e antipolvente [10].

3.2. POLI (FLUORETO DE VINILIDENO) PVDF

O poli (Fluoreto de Vinilideno) é um termoplástico com estrutura química linear, constituído pelos grupos CH₂ e CF₂ ao longo de sua cadeia polimérica, seu ponto de fusão é aproximadamente 170° C [11]. Foi descoberto por KAWAI em 1969, após foram feitos diversos estudos sobre o material. O mesmo mostrou-se altamente piezelétrico após sofrer modificações mecânicas e ser submetido à ação de um campo elétrico. Dessa forma, o estudo do PVDF tornou-se bastante viável pois apresenta propriedades características como resistência mecânica, estabilidade química, propriedades piro e piezelétricas. Ao se cristalizar forma esférulas, ou seja, estruturas esféricas [12,13]. O mesmo apresenta quatro fases distintas, α , β , γ e δ .

O PVDF é um polímero semicristalino é constituído por um peso molecular de 10⁵ g/mol que corresponde a 2000 unidades de repetição [14]. Sua disposição espacial simétrica dos átomos de hidrogênio e flúor ao longo da cadeia, como visto na figura 1, apresenta polaridade que influencia as suas propriedades, dentre elas a resistência química que está diretamente ligada a forte ligação formada entre carbono-flúor no polímero [15].

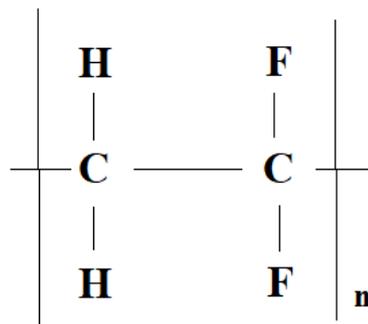


Figura 1 – Unidade monomérica do PVDF.

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGIA E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Nesse capítulo vamos abordar os métodos teóricos utilizados na preparação das amostras, desde a parte de produção até a parte de caracterização das mesmas, métodos esse que foram o guia básico para análise do presente trabalho.

4.1 Moagem

A moagem de alta energia (MAE) foi introduzida primeiramente por John Benjamin nos laboratórios da “International Nickel Company” o desenvolvimento dessa técnica teve por objetivo produzir superligas à base de níquel endurecidas por dispersão de óxido [16]. Mas só a partir dos anos 80 a técnica atingiu seu ápice de grande relevância comercial, pois despertava interesse na fabricação de diversos materiais [17]. Atualmente a técnica possibilita obtenção de materiais compósitos, soluções sólidas amorfa dentre outros [18,19].

Moagem de alta energia consiste basicamente no processamento de materiais na forma de pós, juntamente com esferas de aço ou outro material de alta dureza, reunido em um vaso de moagem, no qual geralmente é do mesmo material, onde essas bolinhas se movimentam dentro de um moinho e faz com que se colidam entre si. Nesse processo de rotação as mesmas chocam-se nas paredes do vaso, isso resulta em transferência de energia o que possibilita a redução do tamanho das partículas com maior eficiência energética [20,21].

A (MAE) envolve um processo bastante complexo, pois a mesma trabalha com otimização de um grande número de variáveis para alcançar a fase desejada, seja ela de dispersão ou microestrutura do produto final. Todas essas variáveis não são totalmente independentes, por exemplo: o tempo de moagem depende do tipo de moinho, dessa forma elas podem atuar simultaneamente [20].

A razão entre a massa das esferas e o pó, conhecida por BPR (Ball -To-Powder Weight

Ratio), é uma importante variável no processo de moagem, pois a mesma está diretamente ligada ao tempo de processo. De modo geral o BPR tem um efeito significativo no tempo que se deseja atingir uma fase específica do pó, esta relação é definida do seguinte modo, quanto maior o BPR menor será o tempo de moagem. Assim, para uma carga de esfera muito baixa conseqüentemente terá uma transferência de energia muito baixa ao contrário do ocorrido quando a carga esfera é maior, o tempo de moagem será menor [20-21].

Tempo de moagem é um dos parâmetros mais importantes dentro deste processo, geralmente é definido de forma a atingir um estado estacionário entre soldagem a frio, fratura, das partículas de pó. O tempo é definido em função de uma combinação de parâmetros, dentre eles, tipos de moinho, razão bola/pó, temperatura de moagem, intensidade de moagem [20].

Na figura 2, temos o esquema representativo do movimento das esferas dentro do vaso de moagem, em um moinho tipo planetário. O pó foi colocado no vaso de moagem junto com as esferas, onde foi fixado em um suporte giratório submetido a uma força centrípeta, isso faz com que ocorra colisões das esferas entre si e com as paredes do vaso, processo responsável pela moagem do pó.

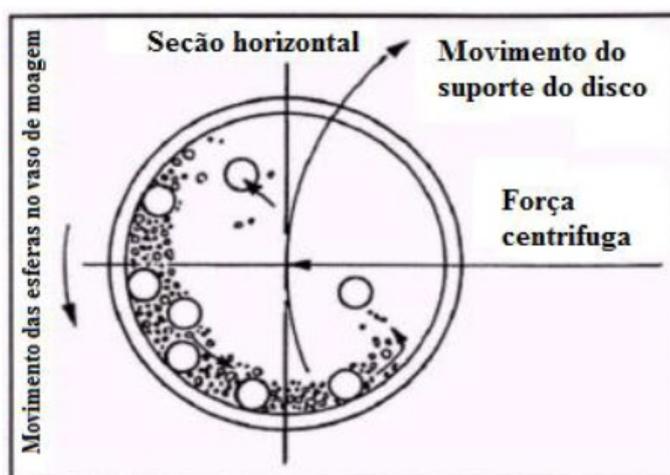


Figura 2 - Modelo representativo do movimento das esferas no interior de um moinho do tipo planetário [20].

4.2 Sinterização

A sinterização é um processo termodinâmico, sendo bastante utilizada na técnica de metalurgia do pó tanto metálico como cerâmicos, esse é uma das etapas mais importantes na ciência dos materiais, pois é nessa fase que a massa da amostra já conformada (a verde) ganha resistência mecânica e adquire grande parte de suas propriedades finais [22].

No processo de sinterização de material cerâmico segue-se um conjunto de etapas, por exemplo: moldagem por injeção, colagem, prensagem uniaxial, dentre outras. O material inicialmente compactado, dentro da forma e dimensões desejadas, que será posteriormente sinterizado é chamado de “a verde”, estado denominado após a compactação inicial do corpo cerâmico [23].

Na figura 3 pode-se observar como ocorre o processo de sinterização e as mudanças na microestrutura do material de fase sólida. No primeiro estágio A), o processo de sinterização ainda não está acontecendo o que se observa é apenas uma ligação das partículas ou pescoços no ponto de contato das extremidades. No segundo momento imagem B), as partículas já se encontram na fase inicial de sinterização, nota-se que há uma reorganização das partículas e já existe uma formação de pescoços na região de contato. No estágio intermediário C), ocorre uma diminuição dos poros e aumento no tamanho dos pescoços, dessa forma a densidade relativa aumenta, devido uma aproximação entre os centros das partículas. Na fase final D), temos o processo de sinterização concluído, observa-se um fechamento dos poros, devido ao preenchimento das vacâncias no contorno dos grãos do material.

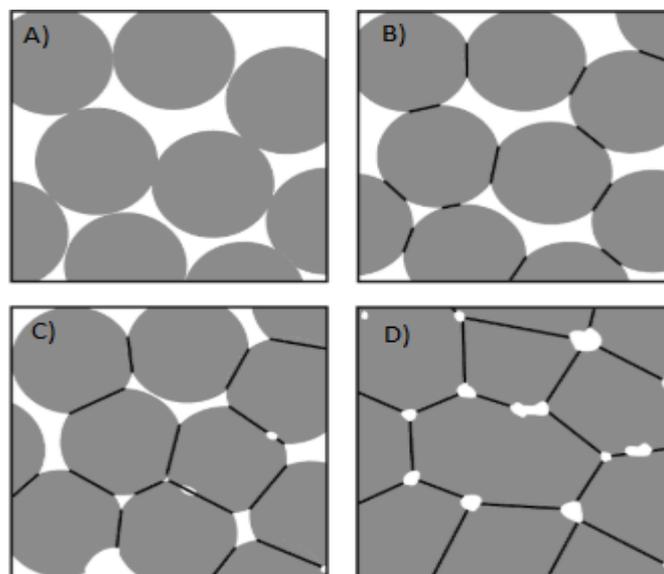


Figura 3 - Estágio de sinterização por fase sólida: A) Partículas Soltas, B) Estágio Inicial, C) Estágio Intermediário, D) Estágio Final [24].

4.3 Difração de Raios X (DRX)

A descoberta da difração de raio X (DRX) em 1912, por Laue, Friedrich e Knipping pode ser considerada um dos eventos mais importante da história da ciência, pois a mesma veio a estabelecer um ponto que estava sendo discutido no qual os raios X era uma fonte de radiação que apresentava um curto comprimento de onda, mas além disso mostrou que a difração de raio X poderia ser usados para examinar a matéria na escala atômica, como também possibilitou-se interpretação sobre o comportamento dos átomos e compreensão da química e da física do estado sólido o que impactou o desenvolvimento da ciência [25].

Atualmente a difratometria de raio X, é utilizado para identificação e caracterização estrutural de compostos cristalinos, durante a última metade do século XX, esse método tornou-se um dos estudos mais importantes e disseminados no campo de identificação e quantificação de minerais e materiais policristalinos naturais e industriais [26], sendo de fundamental importância no estudo de materiais pois permite-se obter diversas informações sobre parâmetros estruturais.

Inspirados por Laue, W. H. Bragg e W. L. Bragg realizaram diversos experimentos possibilitando a formulação matemática de uma lei que explicasse geometricamente as reflexões da radiação incidente das famílias atômicas de cristais [27]. Segundo a lei de Bragg [28], o qual pode ser observada na figura 4 um feixe de raio X entrará em condições de difração e será espalhado, então os raios X incidente de

comprimento de onda λ faz um ângulo θ com uma família de planos (hkl). A diferença existente no caminho entre as ondas espalhadas no 1° e 2° plano são $2 d_{hkl} \sin \theta$.

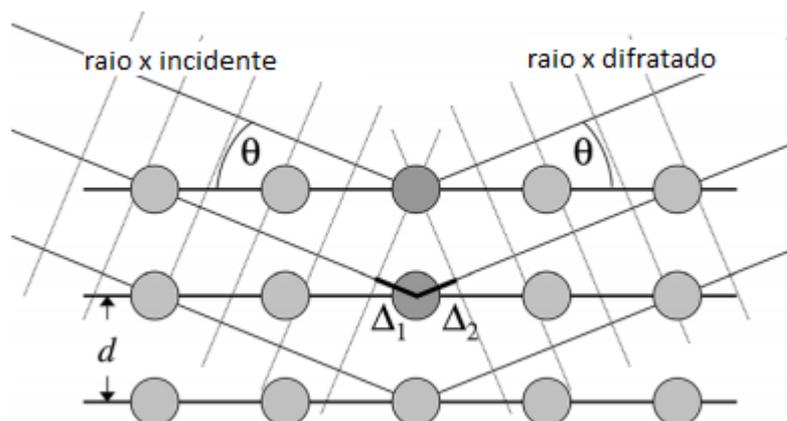


Figura 4 - Condições geométricas para lei de Bragg [28].

Nessas condições para que os raios difratados estejam em fase é preciso que o caminho entre os raios incidentes e difratados seja um número inteiro de comprimento de onda ($n\lambda$), portanto a equação de Bragg é escrita na forma mais popular

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta.$$

Sendo,

n seria a ordem da reflexão, d_{hkl} a distância entre a família de planos (hkl) (\AA), θ o ângulo de incidência ($^\circ$), λ o comprimento de onda da radiação incidente (\AA).

Dessa forma as ondas difratadas possibilitam obter informações sobre o retículo básico, que descreve a natureza periódica do cristal e reconstruir a estruturas.

Neste trabalho os resultados de difração de raio X, foram obtidos por um difratômetro Shimadzu

XRD-7000 (Kyoto, Japão), com radiação de molibdênio (Mo), e cobre (Cu), pertencente ao Grupo de desenvolvimento de Dispositivos Multifuncionais (GDDM/UEM). Os intervalos de tempo de aquisição das medidas foram, velocidade de varredura 8 segundos por ponto, no intervalo de 2θ de 10° a 40° e temperatura ambiente.

4.4 FTIR-ATR

A espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), pode ser caracterizado como um conjunto de técnicas de análise, em que utiliza-se a interação de radiação eletromagnética na amostra a ser estudada, com o objetivo de obter informações físicas e químicas [29].

O modo ATR (espectroscopia de reflectância total atenuada), é uma técnica em que se emprega o fenômeno da reflexão total viável pois é um tipo de análise não destrutiva, sendo importante para o estudo de sólidos, líquidos e gasosos. Desse modo a análise pode ser descrita por um feixe de radiação ao entrar em um cristal sofrerá reflexão total, quando o ângulo de incidência entre a amostra e o cristal for maior que o ângulo crítico, essa radiação atenuada é medida no espectrômetro gerado a partir do comprimento de onda dando origem às características específicas de absorção da amostra [30].

O desenvolvimento desse experimento nas medidas de espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, no modo de reflectância total atenuada (ATR), foi utilizado um espectrômetro Bruker Vertex 70 V, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} e com resolução de 4 cm^{-1} , com 128 varreduras.

4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), é um tipo de análise microestrutural do material, processo no qual possibilita identificar e quantificar possíveis contaminações obtidas no processo de preparação das amostras e observar eventuais defeitos.

O microscópio eletrônico de varredura é um instrumento bastante versátil para analisar características morfológicas e composições químicas da microestrutura. O mesmo é bastante eficiente quando comparado ao microscópio óptico, que possui baixa ampliação, em torno de 2000 vezes, enquanto o MEV pode gerar ampliações de 100-100000 vezes, trazendo boa profundidade de campo. No MEV a formação de imagens depende da aquisição de sinais produzidos entre o feixe de elétrons e a amostra, assim

pode-se dividir essas interações em duas categorias fundamentais: Interações elásticas e Inelásticas [31].

Um microscópio eletrônico de varredura, difere-se do óptico pelo tipo de feixe utilizado enquanto o óptico utiliza um feixe de fótons o eletrônico é equipado com um feixe de elétrons. Esta diferença permite solucionar problemas de resolução, por exemplo, na figura 5 observa-se uma comparação dos dois microscópios

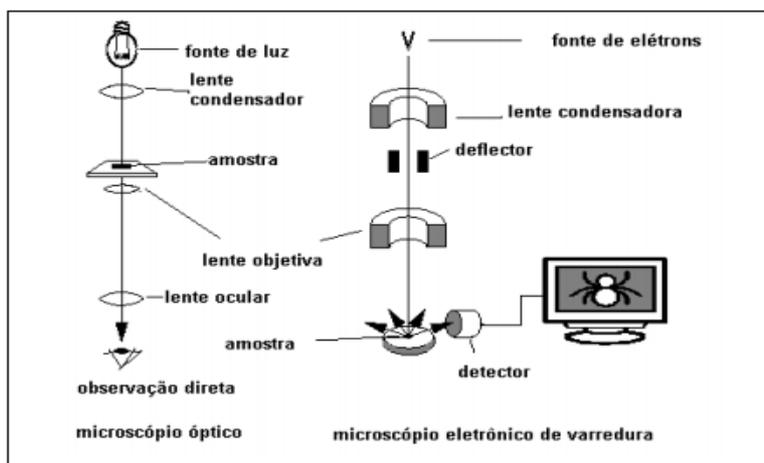


Figura 5 - Desenho esquemático para comparação dos microscópios óptico e eletrônico [32].

Devido às interações elásticas e inelásticas mencionadas anteriormente existentes nas interações do feixe com a amostras o MEV apresenta dois possíveis métodos para obtenção das imagens, um com elétrons secundários e outro com elétrons retroespalhados. No primeiro a energia resultante é muito baixa em torno de 50 eV e possibilitando a formação de imagens com alta resolução. No segundo usando elétrons retroespalhados, o sinal gerado é proveniente de regiões mais profundas da amostra, dessa forma, as imagens geradas por esse tipo de elétrons nos dá informações tanto topográfica quanto imagens de composições, gerado em função do número atômico dos elementos presente no material. [32].

Utilizou-se nas medidas de MEV de 20.000 kV, como também aproximações de 2000 x, para caracterização e identificação de camadas, formação de apatita nucleada nas amostras submetidas a o procedimento experimental.

4.6 Obtenção das Amostras

No presente trabalho a HAp (HAp-390) foi obtida por calcinação de osso de peixe adulto (Tilápia) com idade de 390 dias. Cedido pelo Departamento de Zootecnia (DZO-UEM). Os

espécimes foram transferidos com 45 dias de idade do centro de piscicultura (DZO-UEM) no distrito de Floriano/Maringá, para serem alimentados e criados em tanques-rede, na Estação do Rio do Corvo no Campus Regional de Diamante do Norte DZO/UEM, de acordo com as metodologias adotadas por aquela extensão, após a captura dos peixes procedeu-se a limpeza, secagem e calcinação.

O método de calcinação consiste em um tratamento do material em altas temperaturas, porém a baixo do seu ponto de fusão, esse processo é diferente de outros tratamentos térmicos como: Sinterização ou Vitrificação, ou seja, por que são diferentes, ela antecipa reações que podem ser indesejadas.

Na calcinação da HAp-390, os ossos de peixe foram tratados termicamente a 900° C por 8 horas, no processo de aquecimento e esfriamento do forno usou-se uma taxa de 6°/minuto sendo o forno mantido fechado durante o processo [9].

Após o processo de calcinação, a HAp foi triturada em um almofariz de ágata para reduzir o tamanho das partículas do material calcinado. Após esse procedimento o pó foi submetido ao processo de moagem de alta energia. Usou-se um moinho Retsch PM 100, nessa técnica o material é submetido a um vaso de moagem com esferas de zircônia, com razão de 6:1 (massa de bola/massa de pó). A HAp-390 foi moída por 4 horas com pausa de 10 min a cada 30 min com velocidade de rotação de 300 rpm. Após foram produzidas as pastilhas, para fabricação das mesmas é preciso inicialmente conhecer os dados das densidades teóricas do material a serem trabalhados, nesse caso HAp e PVDF. A densidade da HAp é 3,156 g/cm³ [9], e do PVDF de 1,79 g/cm³ [33], com esses dados utilizamos a regra da mistura para determinar a relação correta de massa para produção de uma pastilha [34].

$$\rho_c = \sum_{j=1}^n p_j \rho_j$$

onde: ρ_c : densidade teórica do compósito, p_j : porcentagem volumétrica de cada compósito ρ_j : densidade de cada elemento do compósito, n : número de elemento do compósito.

Como já se sabe a partir da densidade teórica do material, pode-se calcular o volume do

compósito da seguinte forma

$$V_c = \frac{m_c}{\rho_c}$$

m_c : massa do compósito, ρ_c : densidade do compósito.

Dessa forma o volume de cada um dos materiais

$$V_j = p_j \cdot V_j$$

Assim, para se obter a massa de cada componente (m_j) no compósito, basta multiplicar a equação acima pela densidade teórica do material

$$m_j = \rho_j \cdot V_j$$

A partir dessa regra obteve-se os seguintes valores de massa: HAp = 0,089g, PVDF= 0,051g, HAp-PVDF = 0,06888g, foram produzidas 10 amostras para os teste de bioatividade, com as amostras de HAp, PVDF de compósitos de HAp-PVDF, sendo 6 amostras de HAp-PVDF, 2 amostras de HAp, 2 amostras de PVDF. A composição adotada foi 60% PVDF e 40% HAp, face aos resultados obtidos por Silva, L. M. [35]. Obteve-se bons resultados do composto analisados. Os pós foram misturados inicialmente no almofariz para homogeneização do composto durante 10 min ininterruptos para proporcionar a uniformidade do material.

Após a trituração, o pó foi colocado na matriz metálica com 5,1 mm de diâmetro conformada a pressão de 60 bar em uma prensa uniaxial. No final do processo as amostras ficaram com dimensões de aproximadamente 5,1 mm de diâmetro e 1,3 mm de espessura.

4.7 Sinterização das Amostras

Após a compactação do pó em forma de pastilhas as amostras foram levadas para o processo de sinterização, nessa etapa as amostras foram submetidas a um processo termodinâmico onde foram utilizadas configurações específicas para esse processo, conforme descritas na tabela a seguir [35]:

Tabela 1: Velocidade, temperatura e tempo para sinterização das amostras.

Amostras	Velocidade de sinterização e temperatura a ser atingida	Permanência de temperatura
HAp	5° C/minuto até 1100° + 2° C /minuto até 1100°	1h/1100°C
PVDF	5° C/ minuto até 150° C + 1°/ minuto até 160° C	1h/160°C
60%HAp- 40%PVDF	5° C/minuto até 150° C + 1°/minuto até 160° C	1h/160°C

No final do processo de sinterização as amostras permaneceram por 24 horas no forno antes de serem retiradas, pois o resfriamento não é controlado ele ocorre por inércia térmica.

Em seguida as amostras foram submetidas a um lixamento a base de água, feito manualmente. Nessa fase foram utilizadas lixas com granulometria de 400 e 600, a fim de se obter no final amostras com espessuras em torno de 1,05 a 1,07 mm. Após o lixamento concluído, as amostras seguiram para o processo de limpeza. Nessa etapa as pastilhas foram imersas em água destilada e álcool 70%, cada uma durante 10 min em ultrassônico, em sequência foram secas em estufa a temperatura de 45° C.

4.8 Preparação do Fluido Corporal Simulado

O fluido corporal simulado (SBF), introduzido pela primeira vez por Kokubo *et al* [36], tem como objetivo viabilizar a obtenção de bioatividade óssea *in vitro* de um determinado material, reduzindo notavelmente o número de animais utilizados para esse tipo de experimento, pois o mesmo é uma solução sintética de concentração iônica semelhante ao plasma sanguíneo [36].

Para produzir 1 litro de SBF é necessário seguir um conjunto de etapas rigorosamente, pois o mesmo é essencial no desenvolvimento da pesquisa. No primeiro momento é fundamental a higiene e limpeza dos beckers a serem utilizados para evitar possíveis contaminações no decorrer do processo, nesse processo de limpeza usa-se os seguintes produtos em sequência, água e detergente, Hipoclorito de Sódio diluído em água, água destilada, ácido clorídrico na concentração de 1 MOL e água miliq, após passarem por esse processo coloca-se os mesmos na estufa para secagem antes de serem utilizados, é necessário a higienização de todos os backers utilizados para pesagem dos reagentes.

Na segunda etapa para reproduzir o SBF, com os reagentes mostrados na tabela 2, utiliza-se um becker de polietileno com água miliq, em banho maria com temperatura de 36,5 °C, que simula a temperatura do corpo humano.

Um agitador magnético é utilizado a fim de ter uma dinâmica no processo de inserção dos reagentes, com ilustrado no esquemático do aparato experimental utilizado, figura 6.

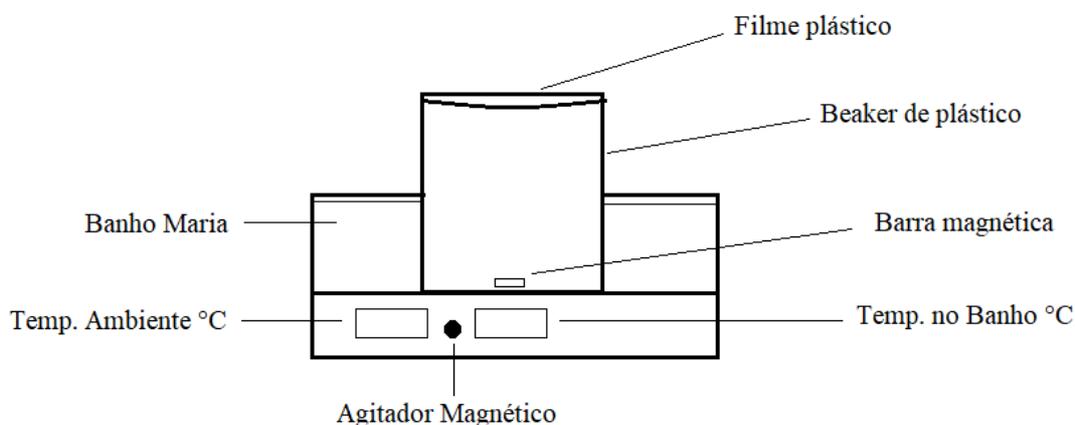


Figura 6 – Esquema do aparato experimental para produção do SBF.

Na terceira etapa os reagentes são pesados e em seguida adicionados na solução de acordo com a quantidade e a ordem mostrada na tabela 2.

Tabela 2: Ordem dos Reagentes e massa para preparação do SBF [36].

ORDEM	REAGENTE	MASSA/ SBF CONVENCIONAL.
1	NaCl	8.035 g
2	NaHCO ₃	0.355 g
3	KCl	0.225 g
4	K ₂ HPO.3H ₂ O	0.231 g
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0.311 g
6	1.0 _M -HCl	39 ml

7	CaCl ₂	0.292 g
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g
9	C ₄ H ₁₁ NO ₃ Tris	6.118 g
10	1.0 _M -HCl	0-5 ml

5. APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA APLICAÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO DURANTE A IMERSÃO EM SBF

Aplicou-se o campo elétrico de 300 V/mm, senoidal com frequência de 500 Hz, durante 12 horas por 3, 5 e 7 dias. O objetivo da aplicação de campo elétrico é fazer com que o processo químico/físico dos íons e cátions presentes no SBF tenha uma maior dinâmica de movimento quando os mesmos forem submetidos ao campo elétrico. Dessa forma o processo que já ocorre naturalmente será acelerado devido a dinâmica de potencial elétrico do campo.

Pode-se observar a seguir o arranjo experimental no qual foram realizados os testes experimentais fundamentais no desenvolvimento do trabalho.

5.1 ARRANJO EXPERIMENTAL

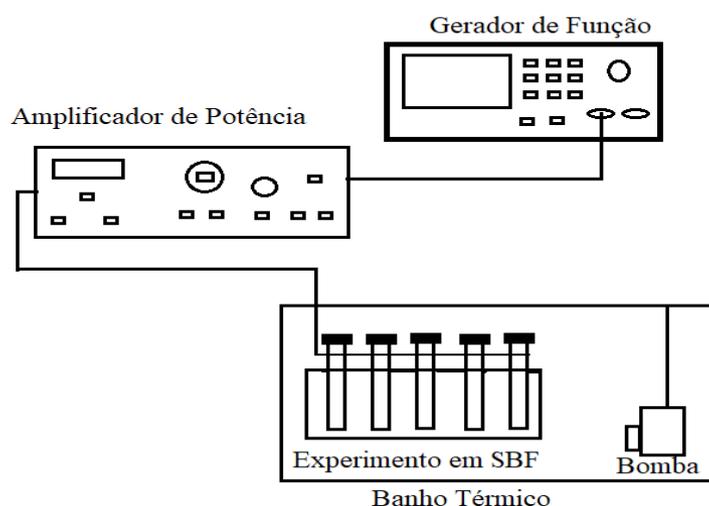


Figura 7 –Esquema do arranjo experimental utilizado no teste de bioatividade com aplicação de campo elétrico.

As características do campo elétrico alternado, gerado pelos eletrodos de concha semicilíndrica, foram investigadas utilizando-se o método de elemento finito e o software OpenFOAM (<https://www.openfoam.com>). O modelo foi desenvolvido utilizando capacitores

tubulares com terminais equipotenciais da mesma dimensão e cercado pelo ar como meio dielétrico. Nesse arranjo, um campo elétrico senoidal de 3 Hz, 500 Hz e 1 kHz foi simulado com uma diferença potencial elétrico de 3760 V entre os terminais, similar ao aplicado experimentalmente. As equações constituintes do campo elétrico \mathbf{E} e o potencial elétrico V são

$$\nabla \cdot \mathbf{J} = Q_{j.v} \quad (1)$$

$$\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E} + j\omega \mathbf{D} + \mathbf{J}_e \quad (2)$$

$$\mathbf{E} = -\nabla V \quad (3)$$

Onde, \mathbf{J} é a densidade atual, $Q_{j.v}$ é a densidade de perda volumétrica, σ condutividade elétrica, \mathbf{D} é o deslocamento elétrico e o \mathbf{J}_e é a densidade de corrente externa. As relações constitutivas são

$$\mathbf{J}_c = \sigma \mathbf{E} \quad (4)$$

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \epsilon_r \mathbf{E} \quad (5)$$

Onde, ϵ_0 e ϵ_r são vácuo e relativas constantes de permissividade elétrica, respectivamente.

CAPÍTULO 6

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussões relativas a caracterização e análises das amostras. Após a realização das etapas experimentais as amostras foram submetidas às análises de forma individual utilizando as técnicas de DRX, FTIR-ATR e MEV. Dessa forma, pode-se comparar os efeitos e mudanças entre os grupos experimental e grupo controle. Permitindo que se determinasse o impacto de como a utilização do campo elétrico afeta a formação de apatita após a imersão em SBF.

6.1. SIMULAÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO

Os experimentos realizados neste trabalho foram guiados por uma prévia simulação de campo elétrico por elementos finitos. A simulação indicou as características das propriedades elétricas vinculadas ao campo elétrico alternado aplicado nas amostras durante os experimentos. Os resultados desta simulação são apresentados a seguir.

6.2. CAMPO COM 3 HZ

A Figura 8 ilustra o campo elétrico e o potencial elétrico simulados com as mesmas características do arranjo montado experimentalmente neste trabalho. Nesta primeira configuração de simulação figura 8 a), o campo elétrico alternado foi simulado com forma senoidal e frequência de 3 Hz. A junção da simulação dos vetores de campo elétrico e potencial elétrico, cuja intensidade é dada pela escala de cores, revelam as configurações elétricas do experimento em um dado instante de tempo. O primeiro arranjo ilustra a distribuição dos vetores de campo elétrico imersos no potencial elétrico o qual pode ser contemplado vista de cima da figura (a). Os vetores de campo

elétrico, cuja intensidades são indicadas na escala de cores, são melhor ilustrados em visão lateral 3D e na ausência de ilustração do potencial elétrico Figura 8 (b). Esta ilustração mais limpa também foi simulada para um ponto de vista superior Figura 8 (c). Finalmente, o instrumental completo, ilustrando todo o arranjo pode ser contemplado na figura 8 (d).

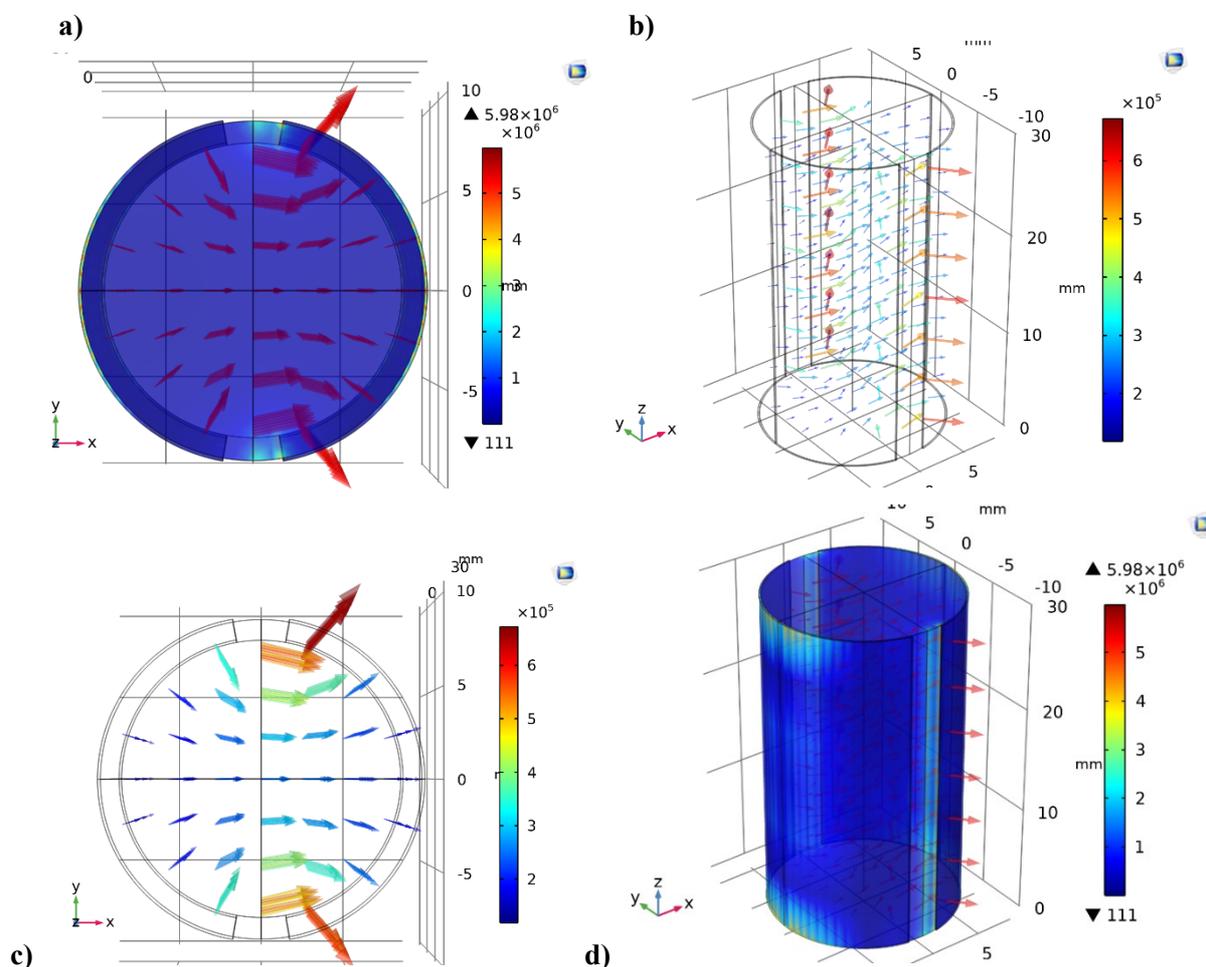


Figura 8 – Simulação do campo elétrico de eletrodos semicilíndricos pelo método de elementos finitos a 3 Hz. (a) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial e imersos em potencial elétrico (coloração indica a intensidade escalonada pela barra lateral). (b) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D. (c) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial. (d) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D imersos em potencial elétrico.

Vale ressaltar que a intensidade do campo elétrico na posição da amostra (centro) é quase homogênea, atingindo 235 kV/m em toda a superfície da amostra. A homogeneidade de campo dessa região também foi analisada em duas linhas cruzadas paralela (dy) e perpendicular (dx) à amostra figure 9 (a).

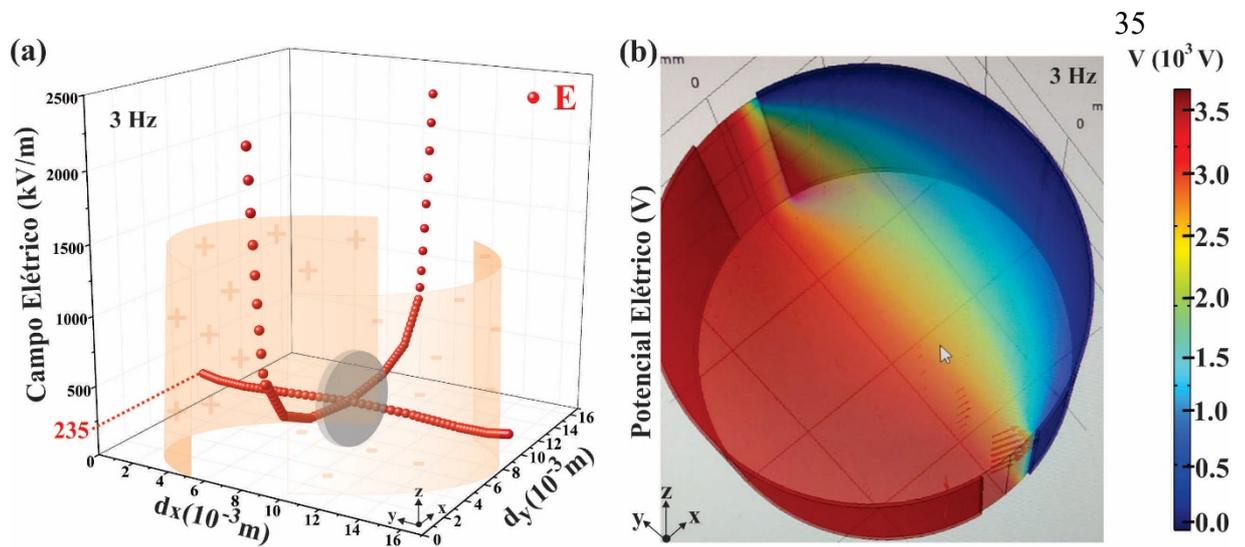


Figura 9 – Características elétricas simuladas. (a) Simulação da intensidade de campo elétrico no interior dos eletrodos semicilíndricos em duas direções de análise. (b) Potencial elétrico no interior dos eletrodos semicilíndricos em 3 dimensões.

Como visto, apesar dos efeitos das bordas, na linha paralela da amostra (região central), o campo permanece homogêneo. Por fim, para ilustrar e atestar a confiabilidade da simulação, também foi analisado os potenciais elétricos Figura 9 (b). As cores destacam as regiões de superfícies equipotenciais com baixos (azul), alto (vermelho) e intermediários (amarelo). Naturalmente, esta simulação foi realizada com ar como um dielétrico durante toda a extensão do arranjo e sem amostra. No experimento, é utilizada uma camada externa de óleo de silicone (entre os tubos de falcon) e a região interna entre os eletrodos semicilíndricos é preenchida com SBF. Dessa forma, no experimento a intensidade do campo pode ser ligeiramente alterada, principalmente devido as propriedades dielétricas do SBF. No entanto, a distribuição do campo elétrico não deve mudar drasticamente, e o campo elétrico que atinge a amostra deve permanecer homogêneo.

Além disso, outras frequências de campo elétrico também foram simuladas, mas nas frequências mais altas (> 500 Hz) os efeitos de borda aumentam e a intensidade no centro diminui acentuadamente.

6.2.1 CAMPO COM 500 HZ

A Figura 10 ilustra o campo elétrico e o potencial elétrico simulados com as mesmas características do arranjo instrumental montado experimentalmente neste trabalho. Nessa figura 10, o campo elétrico alternado foi simulado com forma senoidal e frequência de 500 Hz. A junção da simulação dos vetores de campo elétrico e potencial elétrico, cuja intensidade discriminada é

dada pela escala de cores, revela a configuração elétrica do experimento em um dado instante de tempo.

O primeiro arranjo ilustra a distribuição dos vetores de campo elétrico imersos no potencial elétrico a qual pode ser contemplado na figura 10 (a). Os vetores de campo elétrico, cuja intensidade também é indicada na escala de cores, são melhor ilustrados em visão lateral 3D e na ausência de ilustração do potencial elétrico Figura 10 (b). Esta ilustração mais limpa também foi simulada na Figura 10 (c). Finalmente, o instrumental completo, ilustrando todo o arranjo pode ser contemplado na figura 10 (d).

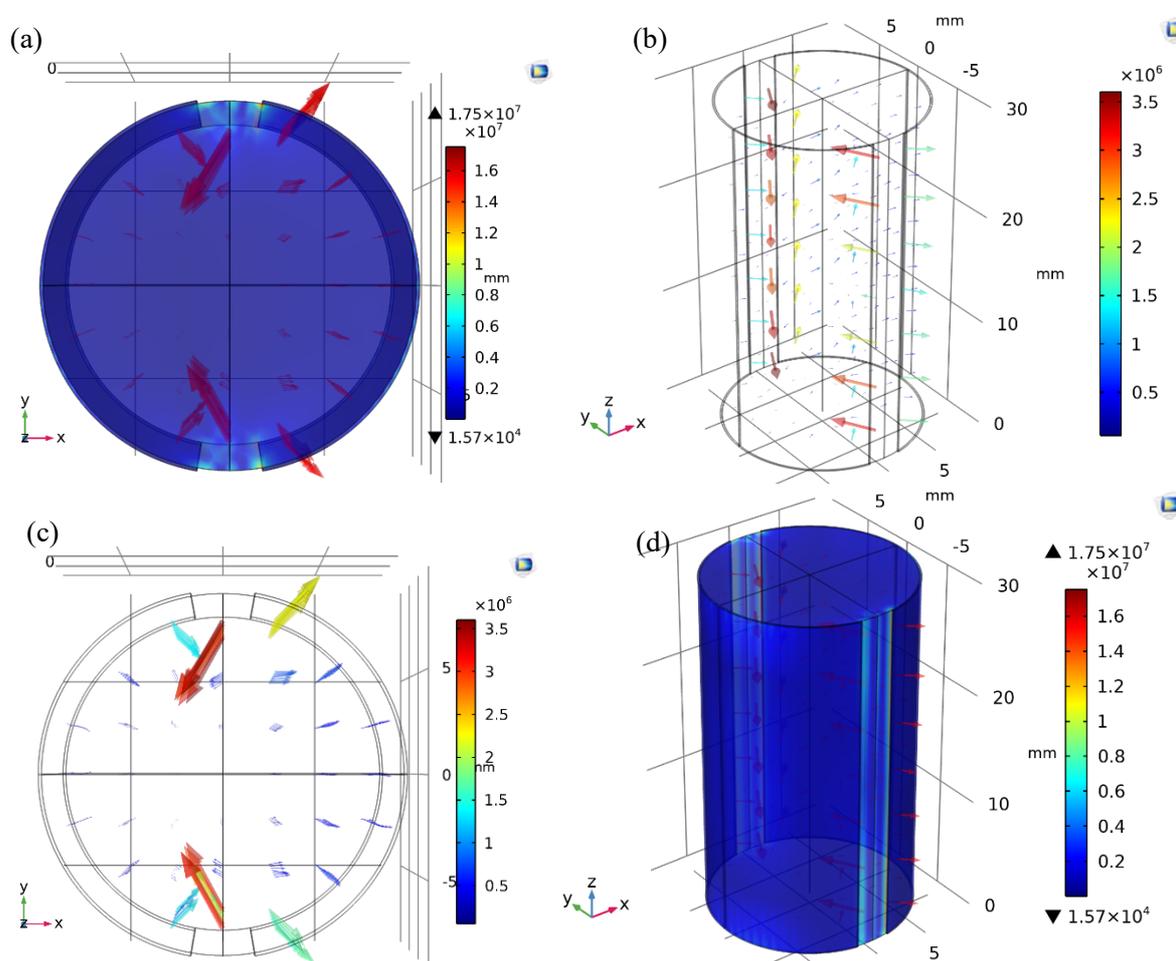


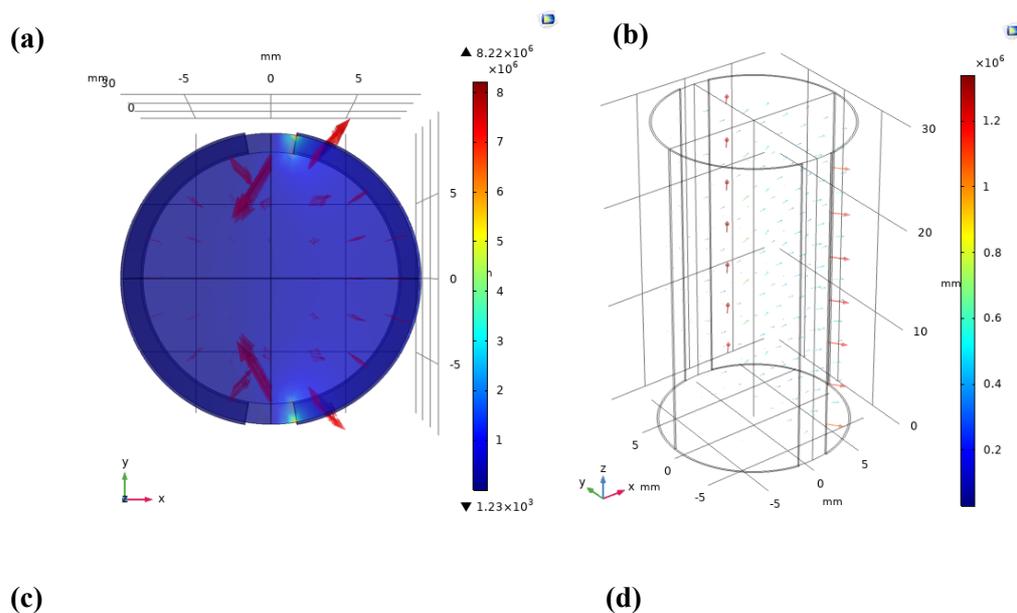
Figura 10 – Simulação do campo elétrico de eletrodos semicilíndricos pelo método de elementos finitos a 500 Hz. (a) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial e imersos em potencial elétrico (coloração indica a intensidade escalonada pela barra lateral). (b) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D. (c) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial. (d) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D imersos em potencial elétrico.

Como se pode observar nos resultados apresentados na figura 10 a), a simulação da intensidade e homogeneidade do campo elétrico a 500 Hz no interior dos eletrodos semicilíndricos indica diminuição quando comparado a mesma realizado para a frequência de 3 Hz. Além disso,

efeitos de borda mais expressivos na interface mais próxima dos eletrodos também são observados.

6.2.2 CAMPO COM 1kHz

A Figura 11, ilustra novamente o campo elétrico e o potencial elétrico simulados com as mesmas características do arranjo instrumental montado experimentalmente neste trabalho. Nessa figura 11, o campo elétrico alternado foi simulado com forma senoidal e frequência de 1 kHz. A junção da simulação dos vetores de campo elétrico e potencial elétrico, cuja intensidade discriminada é dada pela escala de cores, revela a configuração elétrica do experimento em um dado instante de tempo. O primeiro arranjo ilustra a distribuição dos vetores de campo elétricos imersos no potencial elétrico a qual pode ser contemplado por uma vista de cima figura 11 (a). Os vetores de campo elétricos, cuja intensidades também são indicadas na escala de cores, são melhor ilustrados em visão lateral 3D e na ausência de ilustração do potencial elétricos Figura 11 (b). Esta ilustração mais limpa também foi simulada para um ponto de vista superior Figura 11 (c). Finalmente, o instrumental completo, ilustrando todo o arranjo pode ser contemplado na figura 11 (d).



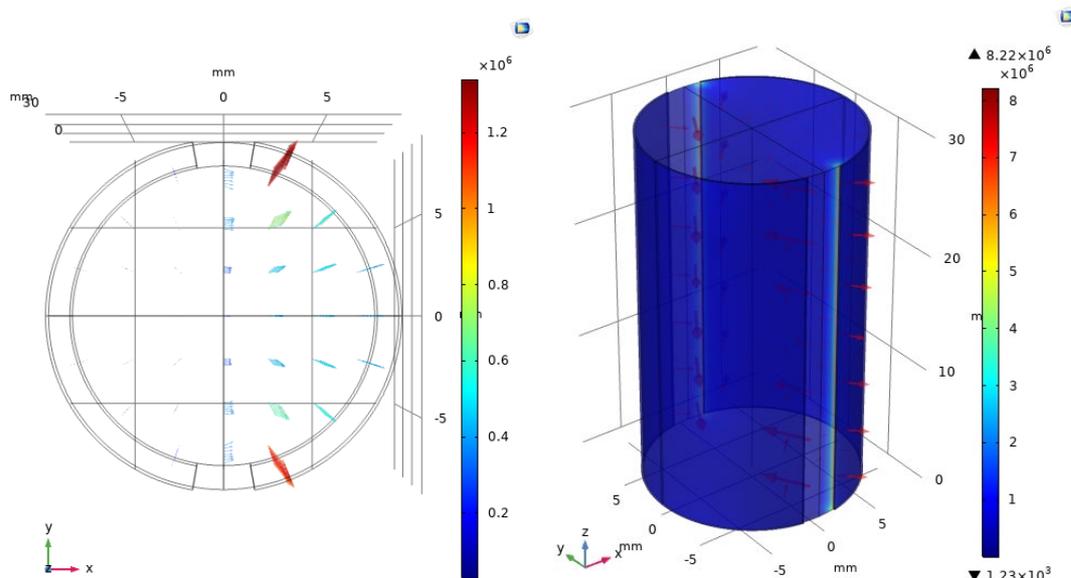


Figura 11 - Simulação do campo elétrico de eletrodos semicilíndricos pelo método de elementos finitos a 1 kHz. (a) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial e imersos em potencial elétrico (coloração indica a intensidade escalonada pela barra lateral). (b) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D. (c) Distribuição dos vetores de campo elétrico por uma visão superficial. (d) Vetores de campo elétrico por uma visão lateral em 3D imersos em potencial elétrico.

Novamente os resultados apresentados na figura 11 da simulação da intensidade e homogeneidade do campo elétrico a 1 kHz no interior dos eletrodos semicilíndricos indicam diminuição quando comparado a mesma realizado para a frequência de 3 Hz. Também são observados efeitos de borda mais expressivos na interface mais próxima dos eletrodos.

O conjunto dos resultados obtidos com a simulação por método dos elementos finitos indicaram que à medida que se aumenta a frequência do campo elétrico ele reduz intensidade e aumenta efeitos de borda nos eletrodos do arranjo testado.

6.3 Estudos in situ com aplicação de campo elétrico alternado - E_{AC} (3 Hz)

A seguir serão apresentados os resultados obtidos pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras que foram sinterizadas e imersas em SBF por um período de até 7 dias.

As 18 amostras foram divididas em 2 grupos, sendo 9 amostras como grupo controle em que foram imersas em SBF sem nenhuma influência elétrica e 9 amostras foram imersas em SBF com a aplicação de campo elétrico de 234,56 V/mm com frequência de 3Hz e amplitude aproximada de 3800V.

6.3.1 ANÁLISE DE MICROGRAFIA 3 HZ

Na figura 12 são apresentados os resultados de MEV obtidos do PVDF, em (a) e (b) são apresentadas as micrografias de superfície e fratura respectivamente, obtidos do PVDF após a imersão em SBF por 7 dias, nas quais nenhuma estrutura de apatita é observada. Os resultados obtidos polímero após a imersão em SBF por 7 dias e sob campo elétrico externo figura 12 (c) e (d) também não mostraram nucleação de apatita.

Nota-se apenas a presença de pequenas ranhuras devido ao processo de preparação das amostras (lixamento) não havendo diferenças morfológicas significativas.

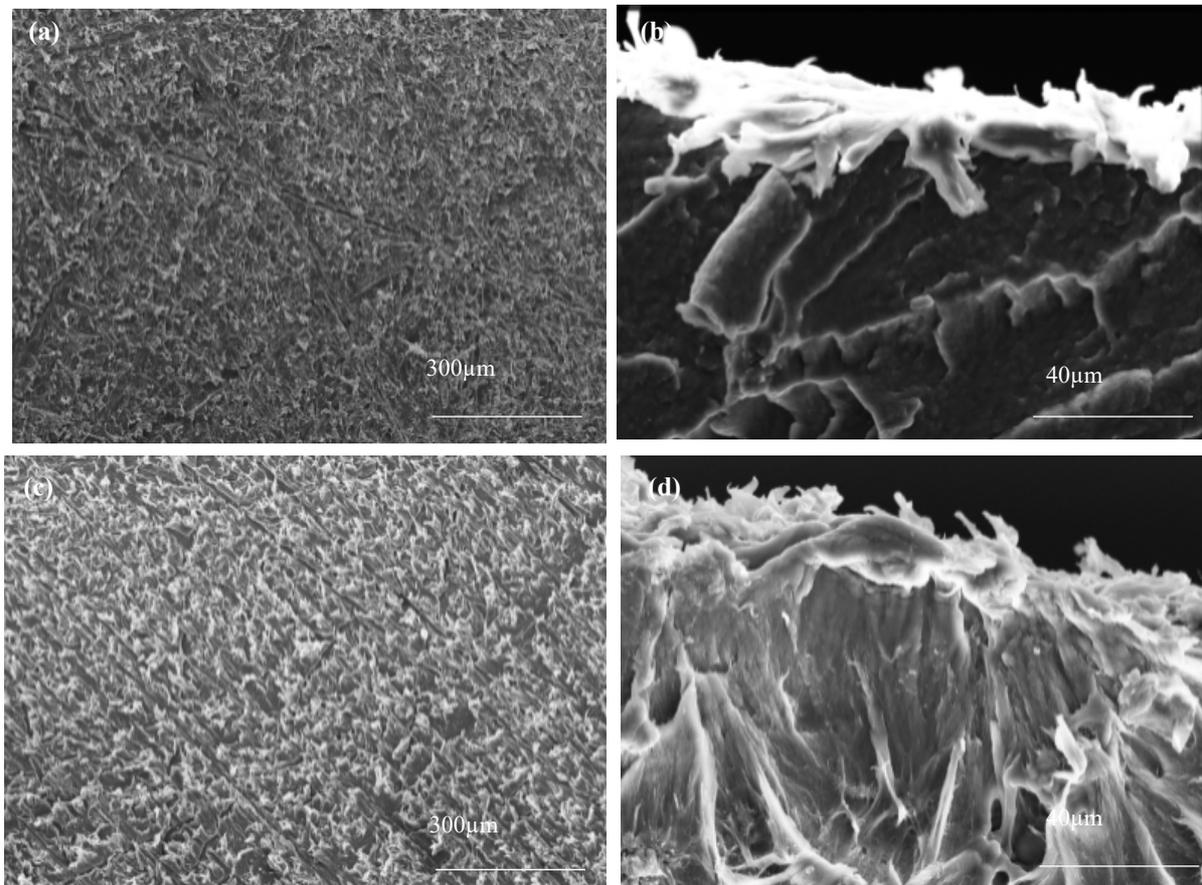


Figura 12 - Imagens de PVDF obtidas após imersão em SBF. (a) e (b), imagens de superfície e de fratura após 7 dias de imersão em SBF e sem aplicação de campo elétrico; (c) e (d), imagens da superfície e de fratura após 7 dias de imersão em SBF e com aplicação de campo elétrico (3Hz). Adaptado da ref. [38].

Na figura 13 são apresentados os resultados de MEV obtidos da HAp, a qual foi submetido a imersão por 7 dias em SBF. Neste experimento foi observado o crescimento de apatitas em todas as condições experimentais aplicadas à cerâmica. Na figura 13 (a) e (b) são apresentadas as micrografias de superfície e de fratura, respectivamente, obtidas para a HAp, após imersão em SBF por 7 dias na qual a nucleação de apatita é facilmente observada. Os resultados obtidos após a imersão em SBF por 7 dias e sob campo elétrico externo figura 13 (c) e (d) também apresentam a formação de apatita. De fato, as estruturas com aspecto “craquelado” são características da nucleação de apatita nas superfícies de compostos bioativos. Todavia, na HAp, não há evidências de que o campo elétrico externo influenciou no crescimento dessa apatita.

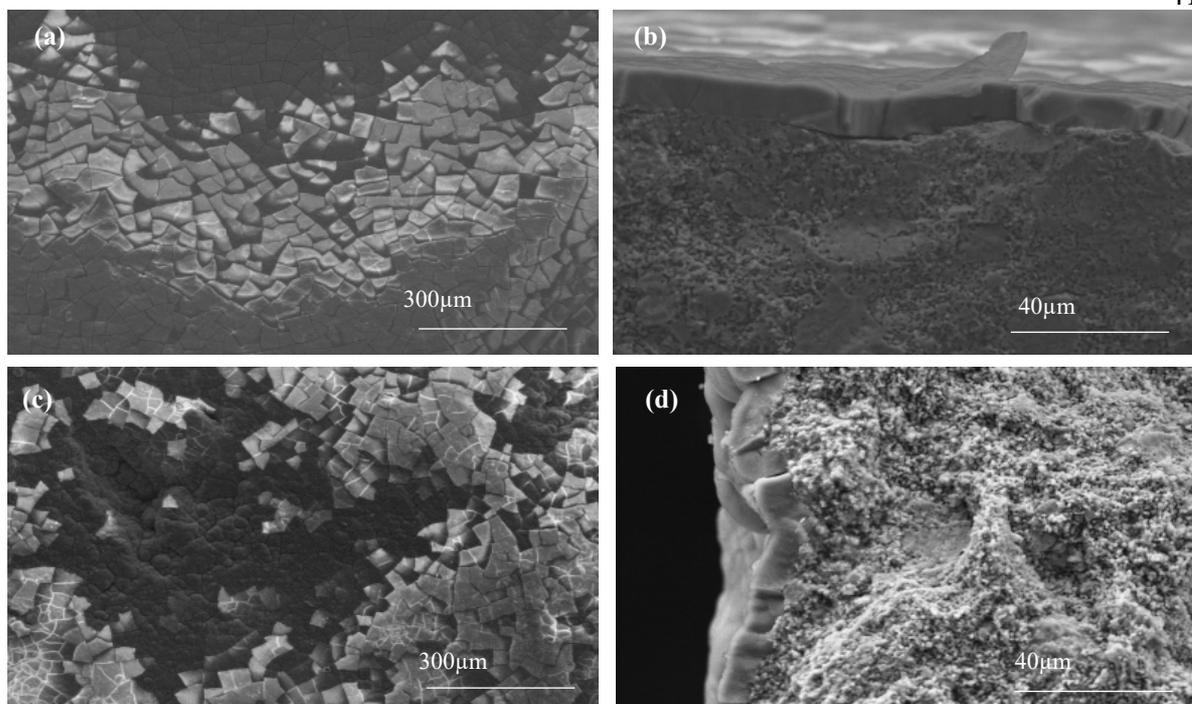


Figura 13 - Imagens de HAp obtidas após imersão em SBF. (a) e (b), imagens de superfície e de fratura após 7 dias de imersão em SBF e sem aplicação de campo elétrico; (c) e (d), imagens da superfície e de fratura após 7 dias de imersão em SBF e com aplicação de campo elétrico (3Hz). Adaptado da ref. [38].

Na figura 14 são apresentados os resultados de MEV, obtidos do compósito HAp-PVDF, o qual foi submetido a imersão por 1 dia em SBF.

Não foi observado o crescimento de apatita em nenhuma condição experimental usado nesse polímero. Na figura 14 (a) e (b) são analisadas as imagens de superfície e fratura, respectivamente, obtidas das amostras de HAp-PVDF após a imersão em SBF por 1 dias, nas quais nenhuma nucleação de apatita é observada. Os resultados obtidos do compósito após a imersão em SBF por 1 dia e sob campo elétrico externo figura 14 (c) e (d) também não apresentam formação da apatita. Nota-se apenas a parição de pequenas ranhuras devido ao processo de preparação das amostras (lixa) não havendo diferenças morfológicas significantes.

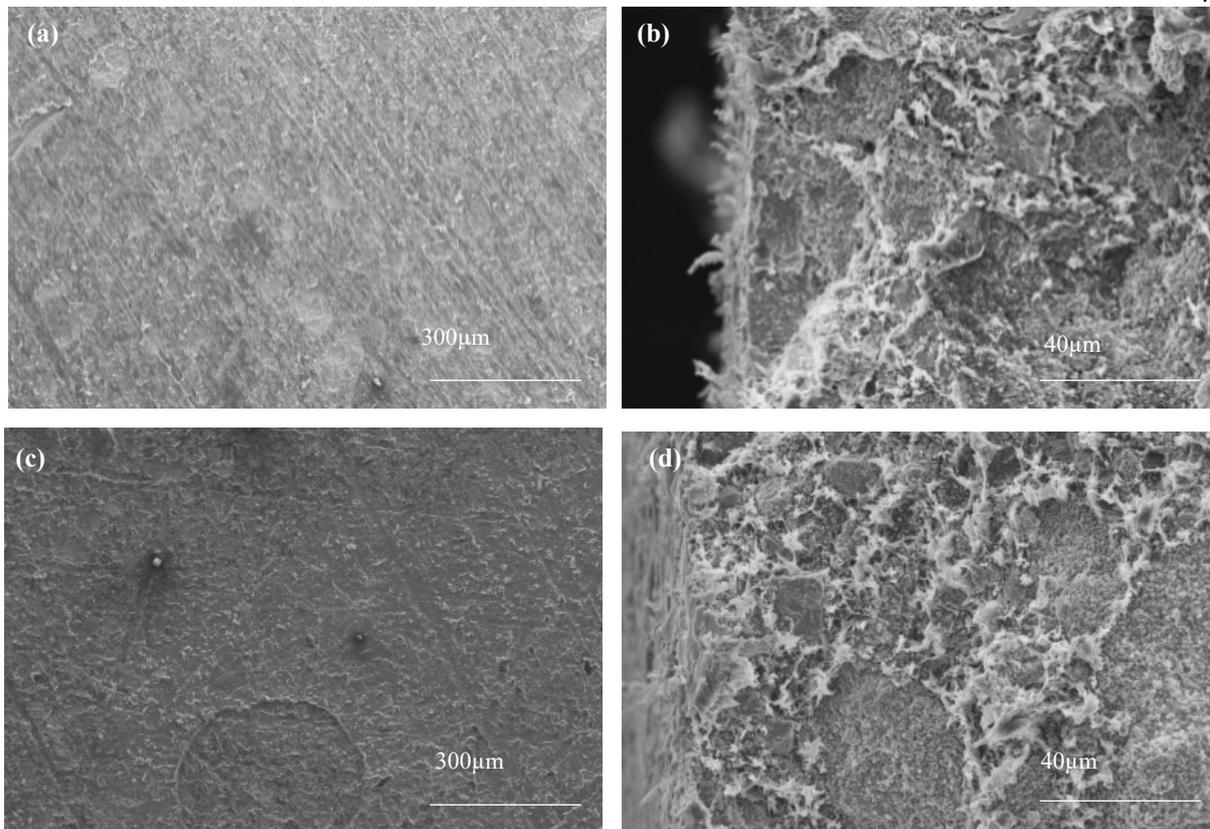


Figura 14 - Imagens de HAp-PVDF obtidas após imersão em SBF. (a) e (b), imagens de superfície e de fratura após 1 dias de imersão em SBF e sem aplicação de campo elétrico; (c) e (d), imagens da superfície e de fratura após 1 dias de imersão em SBF e com aplicação de campo elétrico (3Hz). Adaptado da ref. [38].

Na figura 15 são apresentados os resultados de MEV obtidos do compósito HAp-PVDF, o qual foi submetido a imersão por 2 dias em SBF. Onde observou-se um crescimento de apatita.

Na figura 15 (a) e (b) são apresentadas as micrografias de superfície e fratura, respectivamente, obtidos do HAp-PVDF após a imersão em SBF por 2 dias, nas quais pequenas nucleações de apatita são observadas. Os resultados obtidos do HAp-PVDF após a imersão em SBF por 2 dias e sob campo elétrico externo figura 15 (c) e (d) também apresentam algumas poucas microestruturas características da apatita.

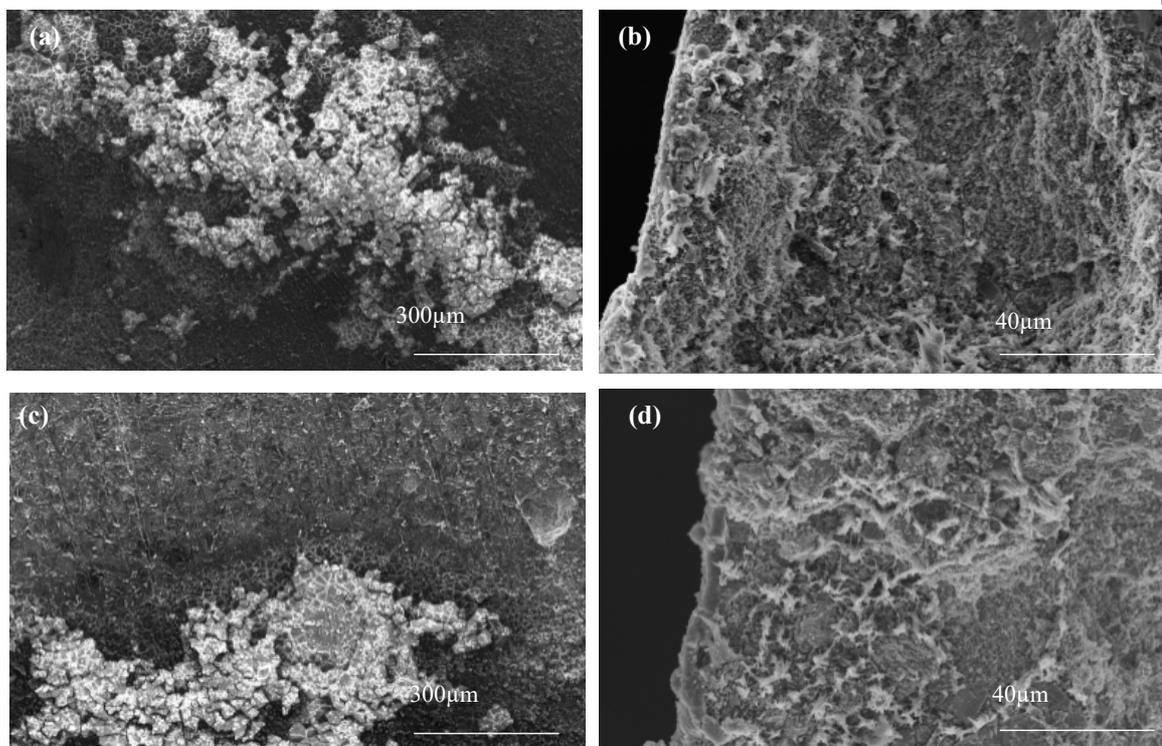


Figura 15 - Imagens de HAp-PVDF obtidas após imersão em SBF. (a) e (b), imagens de superfície e de fratura após 2 dias de imersão em SBF e sem aplicação de campo elétrico; (c) e (d), imagens da superfície e de fratura após 2 dias de imersão em SBF e com aplicação de campo elétrico (3Hz). Adaptado da ref. [38].

Na figura 16 são apresentados os resultados de MEV obtidos do compósito HAp-PVDF, o qual foi submetido a imersão por 3 dia em SBF. Nessas condições experimentais foram observadas evidências contundentes de nucleação de apatita estimuladas por campo elétrico externo. Na figura 16 (a) e (b) são apresentadas as micrografias de fratura e de superfície, respectivamente, obtidos do HAp-PVDF após a imersão em SBF por 3 dias, nas quais pequenas nucleações de apatita são observadas. Os resultados obtidos do HAp-PVDF após a imersão em SBF por 3 dias e sob campo elétrico externo figura 16 (c) e (d), por outro lado, revelam significantes diferenças com relação ao resultado sem campo elétrico. Apesar da espessura da camada nucleadas, em ambas as condições experimentais, figura 16 (d) a superfícies são bastante diferentes. Assim, é possível observar a superfície do compósito totalmente recoberto por apatita quando submetido ao campo elétrico Figura 16 (c). Logo, quando comparado aos poucos núcleos crescidos na ausência do campo elétrico é possível afirmar que o crescimento proeminente observado na superfície do composto que foi exposto ao campo elétrico foi estimulado por este.

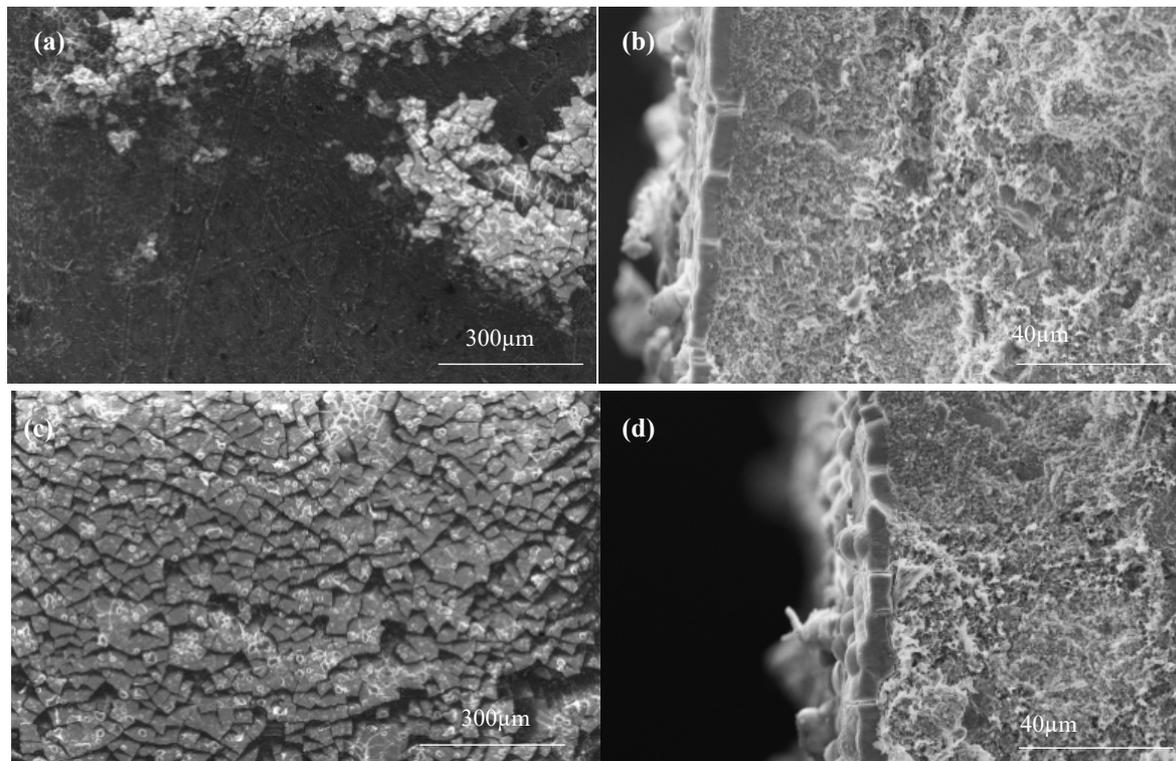


Figura 16 - Imagens de HAp-PVDF obtidas após imersão em SBF. (a) e (b), imagens de superfície e de fratura após 3 dias de imersão em SBF e sem aplicação de campo elétrico; (c) e (d), imagens da superfície e de fratura após 3 dias de imersão em SBF e com aplicação de campo elétrico (3Hz). Adaptado da ref. [38].

Na figura 17 são apresentados os resultados de MEV obtidos do compósito HAp-PVDF, o qual foi submetido a imersão por 4 dias em SBF. Na figura 17 (a) e (b), são apresentadas as micrografias de superfície e de fratura, respectivamente, obtidos do HAp-PVDF após a imersão em SBF por 5 dias, nas quais nota-se a nucleação de apatita. Os resultados obtidos do HAp-PVDF após a imersão em SBF por 5 dias e sob campo elétrico externo figura 17 (c) e (d), também revelam crescimento da apatita.

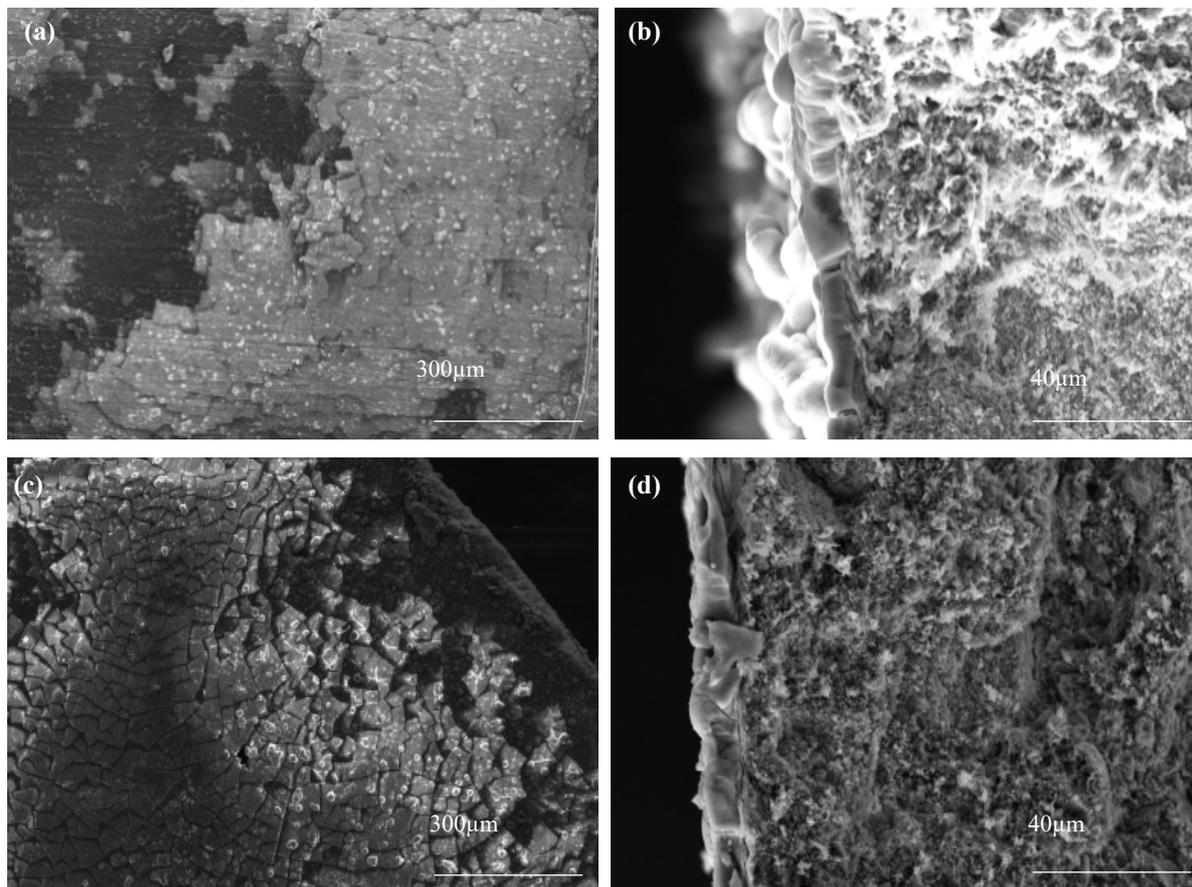


Figura 17 - Imagens de HAp-PVDF obtidas após imersão em SBF. (a) e (b), imagens de superfície e de fratura após 5 dias de imersão em SBF e sem aplicação de campo elétrico; (c) e (d), imagens da superfície e de fratura após 5 dias de imersão em SBF e com aplicação de campo elétrico (3Hz). Adaptado da ref. [38].

Na figura 18 são apresentados os resultados em espectros de absorvância de ATR-FTIR para o composto HAp-PVDF. Os resultados indicam que houve crescimento de apatita estimulado pelo campo elétrico. Na figura 18 (a) é apresentado o espectro de absorvância do composto sem imersão em SBF. Neste resultado são identificadas as principais estruturas de bandas vibracionais, ou seja, do PVDF relacionados aos polimorfos α , β e γ e as da HAp relacionadas aos grupos funcionais OH^- e PO_4^{3-} . O espectro de absorvância do composto submetido a imersão em SBF por 3 dias é apresentado na Figura 18 (b). Como observado, não houve mudança significativa encontrada quando comparado com o espectro sem imersão ao SBF. Por outro lado, quando se observa o espectro de absorvância do composto submetido a imersão em SBF por 3 dias e ao campo elétrico alternado $\text{EAC} = 0,308 \text{ V/mm}$ figura 18 (c) é possível notar mudanças significativas em suas estruturas de banda. As mudanças mais significativas ocorrem com o desaparecimento das duas bandas principais do PVDF (875 cm^{-1} e 840 cm^{-1} β) e a hidroxila 630 cm^{-1} H. Essas mudanças são típicas do crescimento de apatita na superfície do composto.

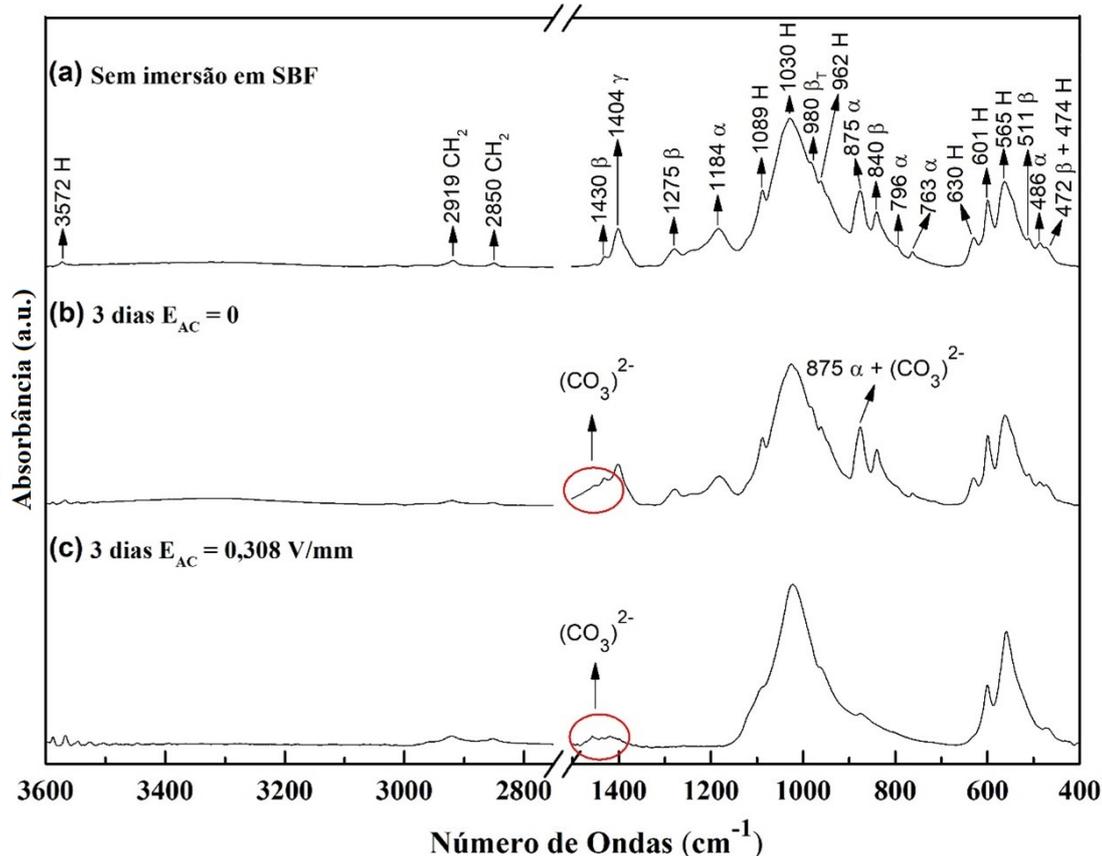


Figura 18 – Espectros FTIR-ATR do compósito HAp-PVDF: a) sem imersão em SBF; b) após imersão em SBF por 3 dias e sem aplicação de campo elétrico e c) após imersão por 3 dias com aplicação de campo elétrico (3Hz). Adaptado da ref. [38].

Na figura 19 são apresentados os resultados em espectros de absorvância de ATR-FTIR para o composto HAp-PVDF. Os resultados indicam que houve crescimento de apatita após 7 dias de imersão em SBF com e sem estímulo do campo elétrico. Na figura 19 (a) é apresentado o espectro de absorvância do composto sem imersão em SBF. Novamente, neste resultado são identificadas as principais estruturas de bandas vibracionais. O espectro de absorvância do compósito submetido a imersão em SBF por 7 dias (168 h) é apresentado na Figura 19 (b). Nota-se que houve mudança significativa quando comparado com o espectro do composto sem imersão em SBF, indicando que houve crescimento de apatita nesta condição experimental. Do mesmo modo, quando se observa o espectro de absorvância do composto submetido a imersão em SBF por 7 dias (168 h) e ao campo elétrico alternado $E_{AC} = 0,308$ V/mm figura 19 c) não é possível notar mudanças significativas em suas estruturas de banda quando comparado a mesma condição sem campo elétrico.

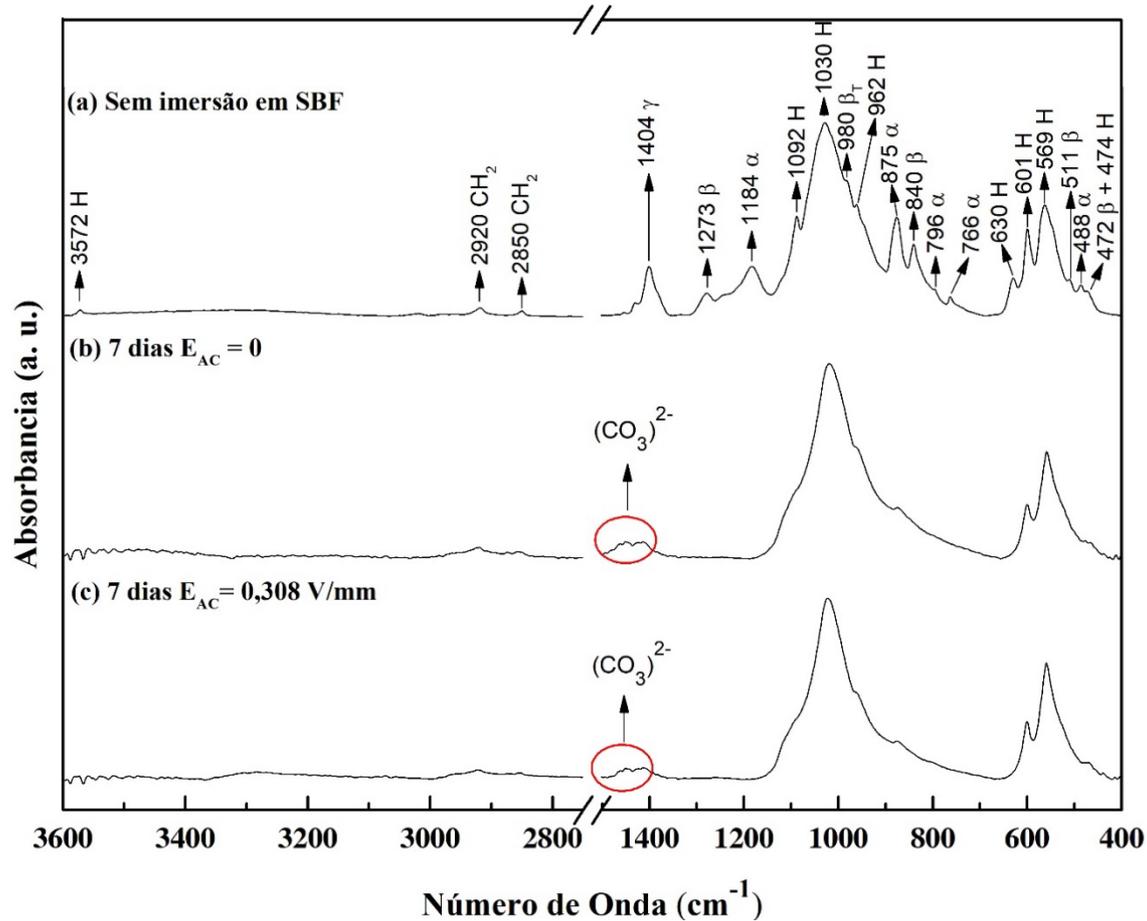


Figura 19- Espectros FTIR-ATR do compósito HAp-PVDF: a) sem imersão em SBF; b) após imersão em SBF por 7 dias e sem aplicação de campo elétrico e c) após imersão por 7 dias com aplicação de campo elétrico (3Hz). Adaptado da ref. [38].

6.4. Estudos in situ com o campo elétrico alternado - E_{AC} (500 Hz)

6.4.1. Difração de raios X

Na figura 20 são apresentados os resultados obtidos para o compósito 60%HAp-40%PVDF após imersão em SBF por 3 dias, com e sem aplicação de campo elétrico externo. Para identificação dos planos utilizou-se as fichas 00-009-0432-ICSD e 00-042-1650-ICSD, correspondentes a HAp e PVDF, respectivamente. O padrão de difração de raios X observado é devido a superposição dos padrões oriundos das estruturas do PVDF e da HAp, caracterizando assim o compósito. Nenhuma diferença significativa é observada no padrão obtido da amostra submetida a aplicação do campo elétrico, comparado com a amostra que não foi exposta ao campo. Isso indica que, possivelmente a camada de apatita crescida superficialmente, observada, é amorfa e por isso não contribui para uma mudança do padrão de difração de raios X, o qual é obtido a partir de uma certa profundidade na superfície da amostra.

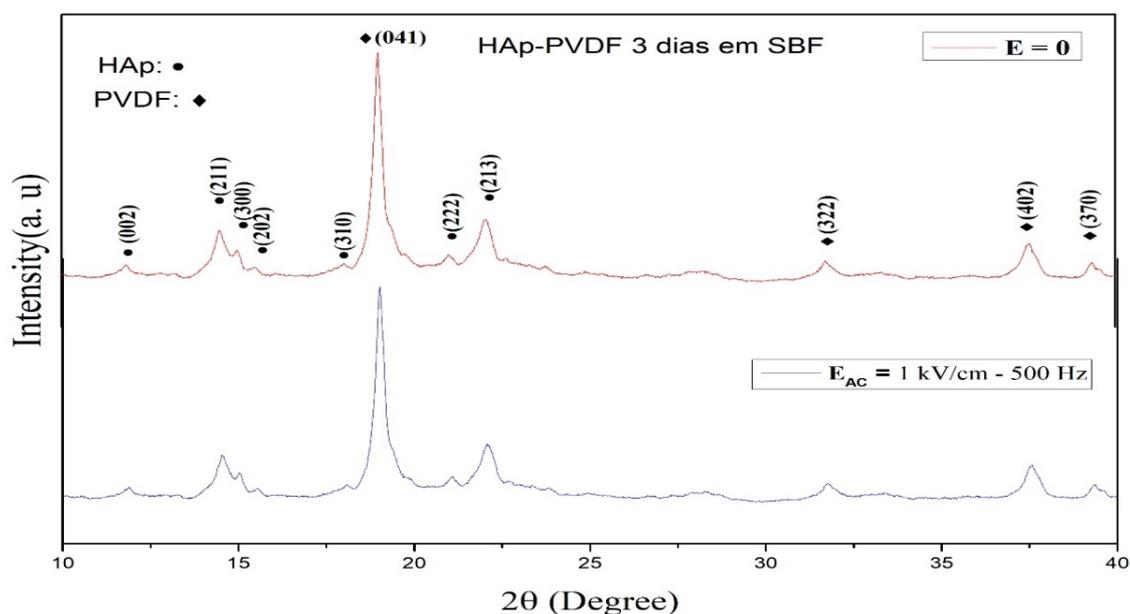


Figura 20 – Difratomogramas de Raios X da amostras de HAp-PVDF com 3 dias de imersão no SBF.

Na figura 21, tem-se o difratograma das amostras submetidas a 5 dias de experimento, com e sem a amplificação de campo elétrico. Nos resultados, observou-se que o plano (221), referente ao PVDF, desapareceu completamente do difratograma da amostra submetida a aplicação de campo elétrico. Acredita-se que isso ocorreu devido a nucleação de uma camada de apatita na superfície da amostra, camuflando o pico.

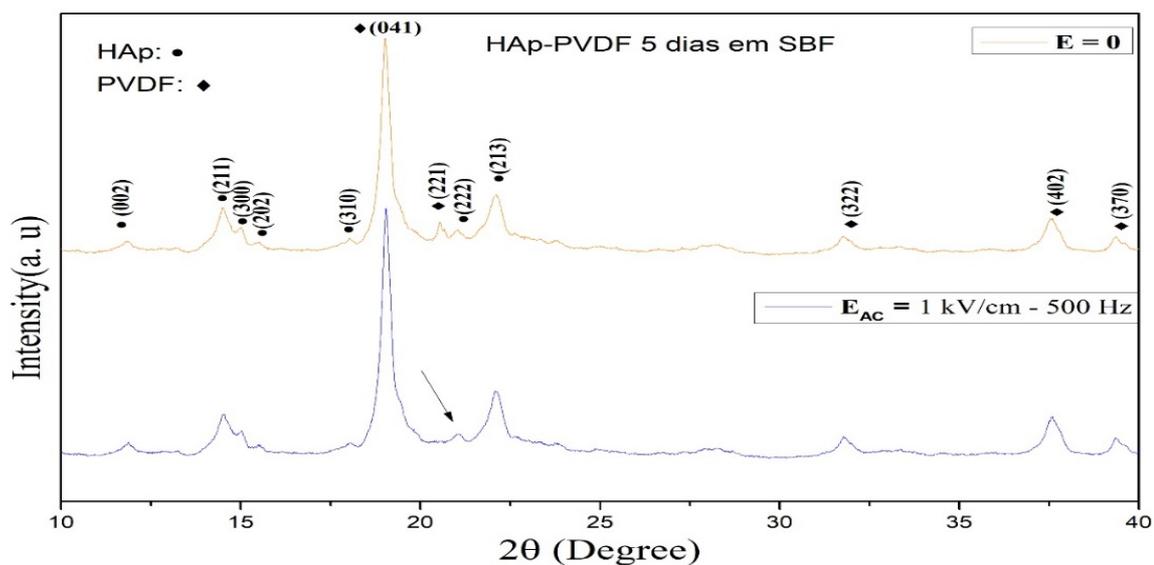


Figura 21 - Difratoogramas de Raios X, amostra de HAp-PVDF com 5 dias de imersão no SBF.

Na figura 22, são apresentados os resultados obtidos das amostras submetidas por 7 dias de experimento. Os resultados das amostras com e sem campo elétrico não indicam significante mudanças nas intensidades de picos de difração, indicando que a camada de apatita formada na superfície das amostras é, estruturalmente, equivalente. Todavia o pico (221) desapareceu indicando que a uma camada crescida em ambas as amostras.

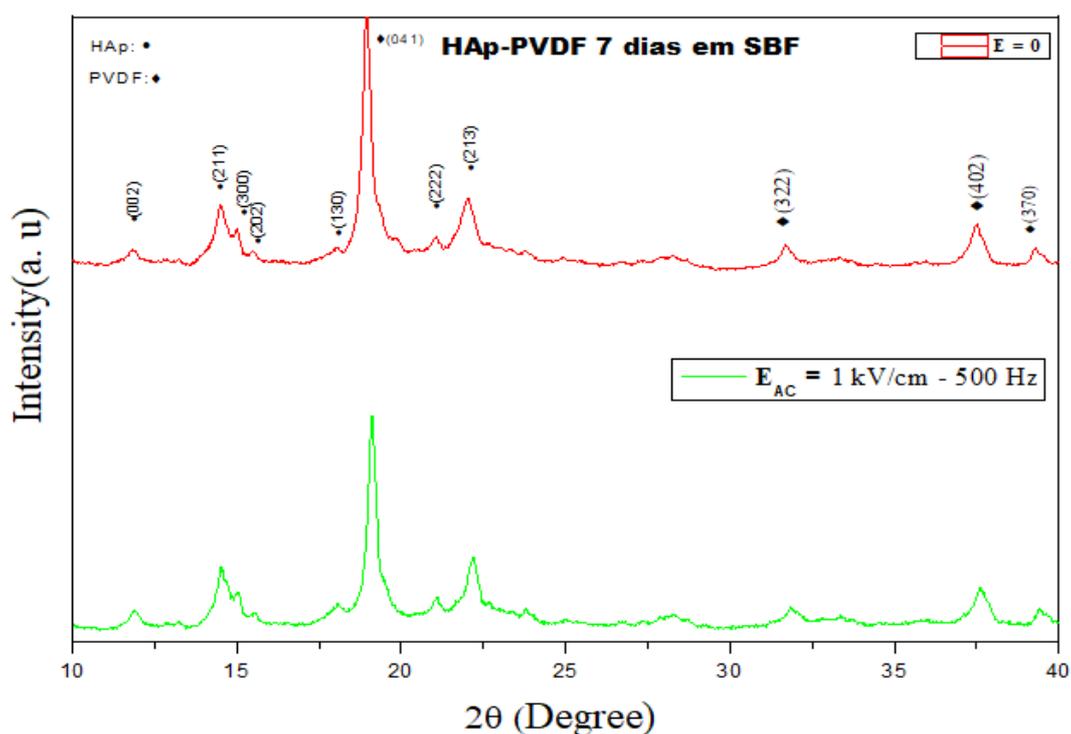


Figura 22 - Difratoogramas de Raioss X, amostras de HAp-PVDF com 7 dias de imersão no SBF.

Na figura 23 são apresentados os resultados obtidos das amostras de PVDF submetidas a

7 dias de imersão em SBF. Os padrões de difração obtidos não apresentam diferença na intensidade dos picos, ou seja, não a formação de nenhuma camada nas amostras, o que deixa evidente que o campo elétrico não afeta o PVDF puro.

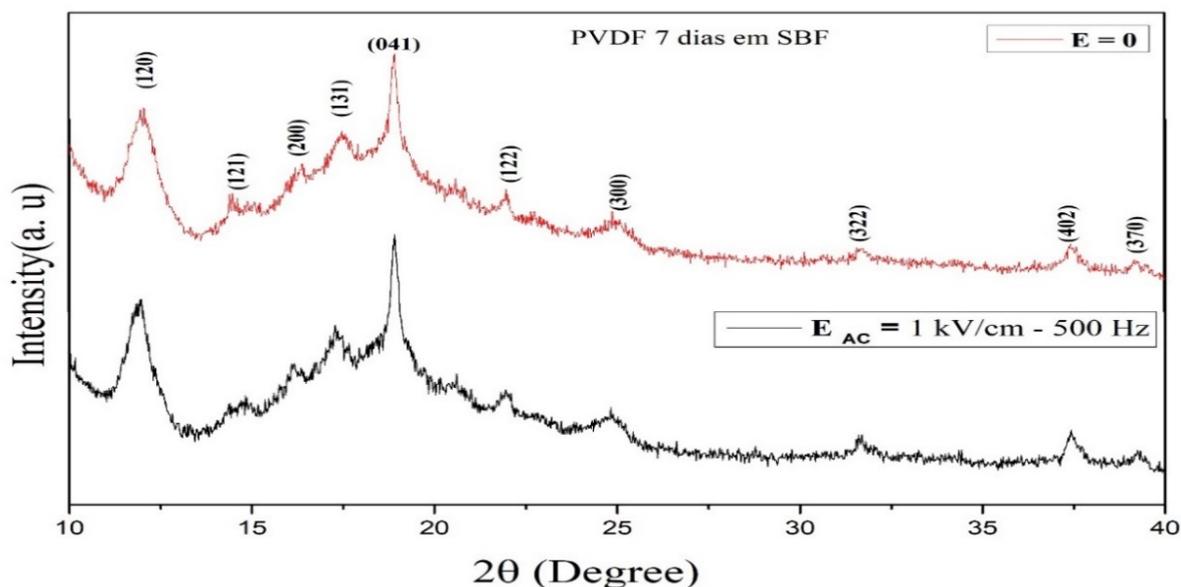


Figura 23 - Difratoograma de raios X do PVDF, com 7 dias de imersão em SBF.

Na figura 24 são apresentados os resultados obtidos para amostras de HAp com 7 dias de imersão. Observa-se que as intensidades dos picos são praticamente idênticas, o que nos sugere que a formação de camada superficial em ambas as amostras foi praticamente idêntica, ou seja, com 7 dias de imersão o campo não promoveu diferenças significativas que possam ser observados no difratograma.

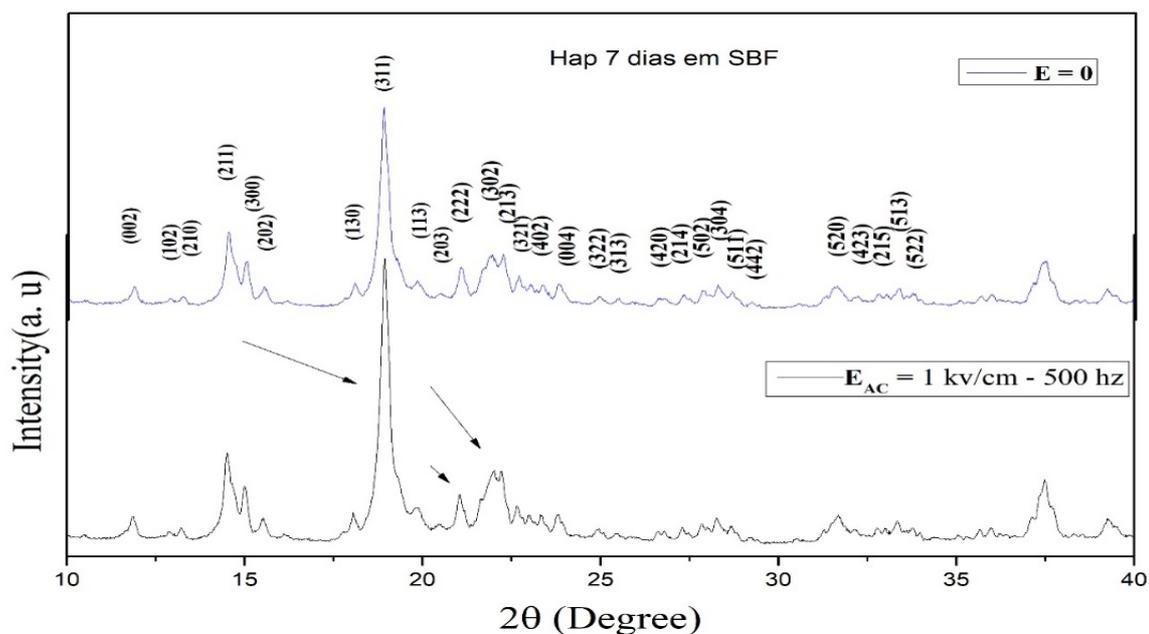


Figura 24 - Difratoograma de Raio X, amostra de HAp com 7 dias de imersão no SBF.

Observa-se nos resultados de DRX, foi que quando temos crescimento de camada amorfa a mesma não apresenta diferenças significativas entres os difratogramas analisados, dessa forma os resultados experimentais de DRX das amostras que foram submetidas a campo elétrico e sem campo elétrico tornam-se bem semelhantes. Por outro lado essas evidências podem ser observadas ao analisarmos difratogramas e percebemos que picos característicos do composto perdem intensidades, assim pode-se inferir que ouve uma nucleação de camada de apatita.

6.4.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER NO MODO DE REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA

Na figura 25, observa-se o espectro de FTIR-ATR da amostra de HAp-PVDF com 3 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico. Podemos observar bandas características das fases do PVDF, em 1400 α , β e γ em 873 β e γ e as bandas características da HAp do grupo fosfato (PO_4^{3-}) em 1018 cm^{-1} , 599 cm^{-1} , 557 cm^{-1} . Por estarem em comparação com $E = 0$ e $E_{AC} \neq 0$, observa-se que houve diminuição nas bandas próximas a 1400 cm^{-1} e 873 cm^{-1} nas amostras com campo elétrico, isto decorre do fato de que o ATR pode estar sofrendo interferência de uma camada na superfície da amostra.

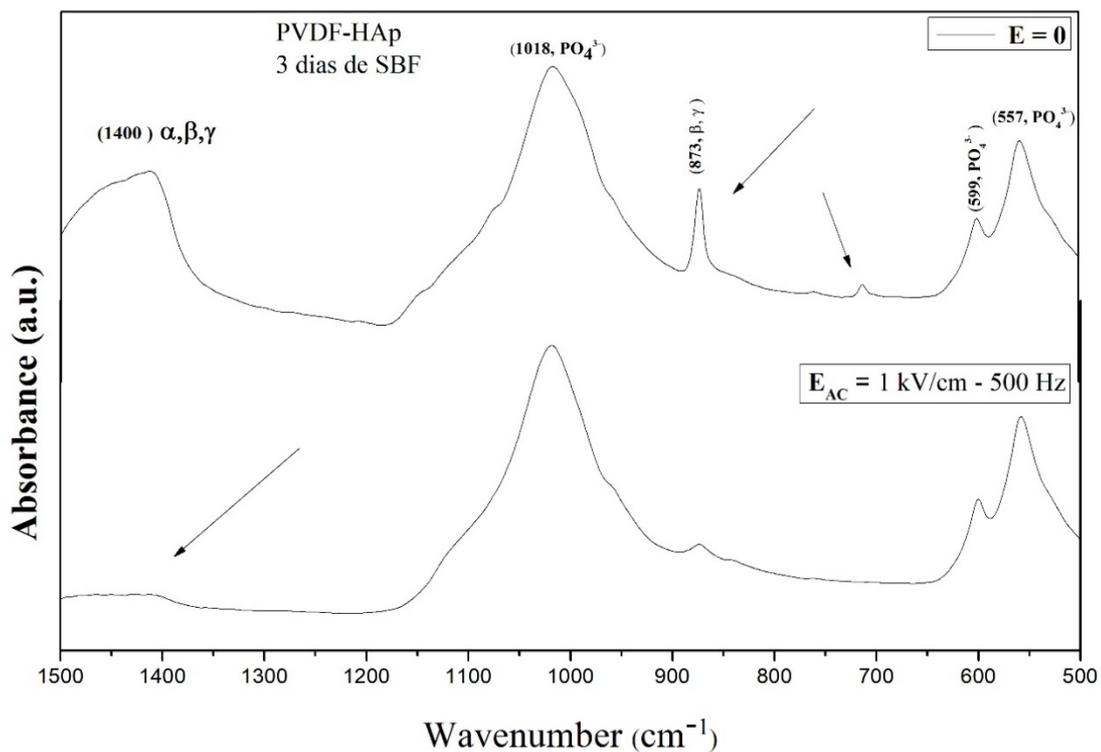


Figura 25 - Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostra de HAp-PVDF com 3 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.

Na figura 26, para 5 dias de experimento, também apresenta bandas características da HAp, são elas 1018 cm^{-1} , 599 cm^{-1} e 557 cm^{-1} , referentes ao grupo de fosfato. Tem-se também bandas aparentemente na região de 1400 cm^{-1} e entorno de 873 cm^{-1} isso seria atribuído ao PVDF, o que pode observar nos espectros em comparação é que não a tanta diferença nas intensidades, o que possivelmente temos formações superficiais bem parecidas.

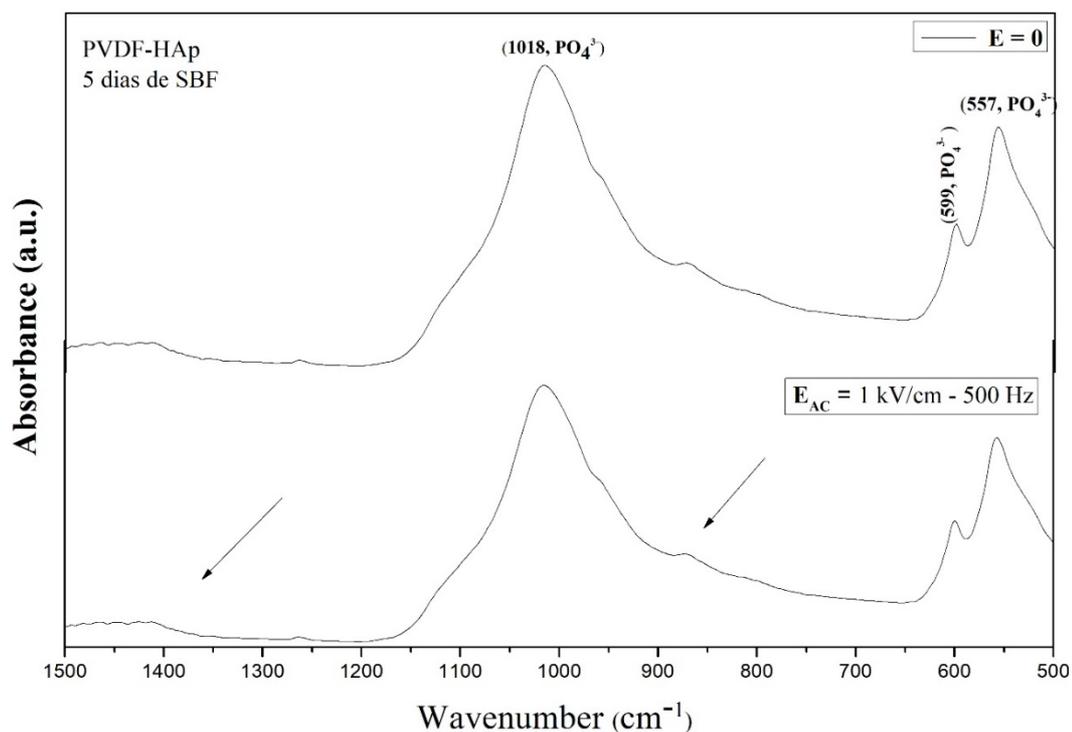


Figura 26 - Análise de espectroscopia FTIR-ATR para amostra de HAp-PVDF com 5 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.

Na figura 27, temos os espectros de FTIR-ATR para amostras com 7 dias de imersão em SBF com campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico como visto anteriormente nas figuras 25 e 26, também temos bandas referentes ao polímero e cerâmica, observou-se as bandas de 1400 cm^{-1} e 873 cm^{-1} referente ao PVDF e 1018 cm^{-1} , 599 cm^{-1} e 557 cm^{-1} atribuídas a HAp.

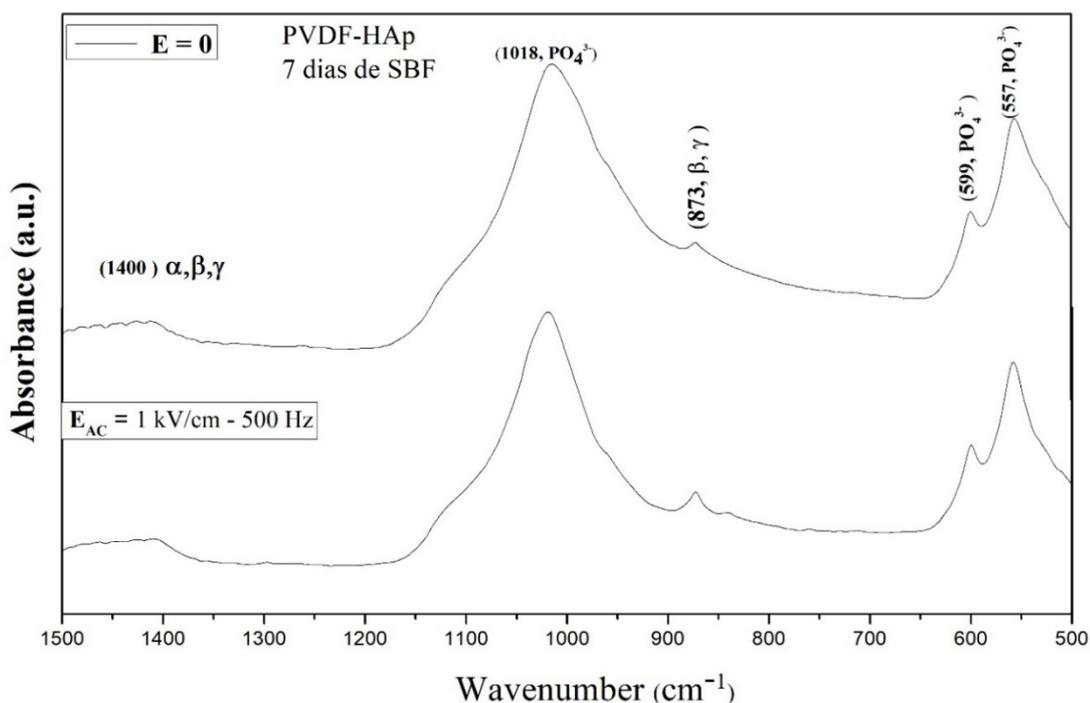


Figura 27 - Análise de espectroscopia FTIR-ATR para amostras de HAp-PVDF com 7 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.

A figura 28, mostra o espectro da amostra de PVDF sem campo elétrico e com aplicação de campo elétrico. Analisando primeiro as bandas onde não houve aplicação de campo elétrico foi possível identificar as fase α , β e γ do polímero de PVDF. As bandas 408 cm^{-1} , 470 cm^{-1} , 486 cm^{-1} , 530 cm^{-1} , 613 cm^{-1} , 761 cm^{-1} , 796 cm^{-1} , 873 cm^{-1} e 975 cm^{-1} , corresponde a modos normais da fase α pode ser observado [37]. As bandas 443 cm^{-1} , 509 cm^{-1} , 838 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} e 1276 cm^{-1} , estão relacionadas a fase β e a banda 1172 está atribuída a uma região onde tem-se fase β ou γ . Como os espectro de FTIR estão sobrepostos, pode-se observar que algumas bandas existem uma formação de “ombros” diferentes do espectro onde não teve aplicação de campo elétrico atribuímos isso a defeitos na cadeia polimérica ou ao processo de prensagem uniaxial que afeta a fase do polímero [37].

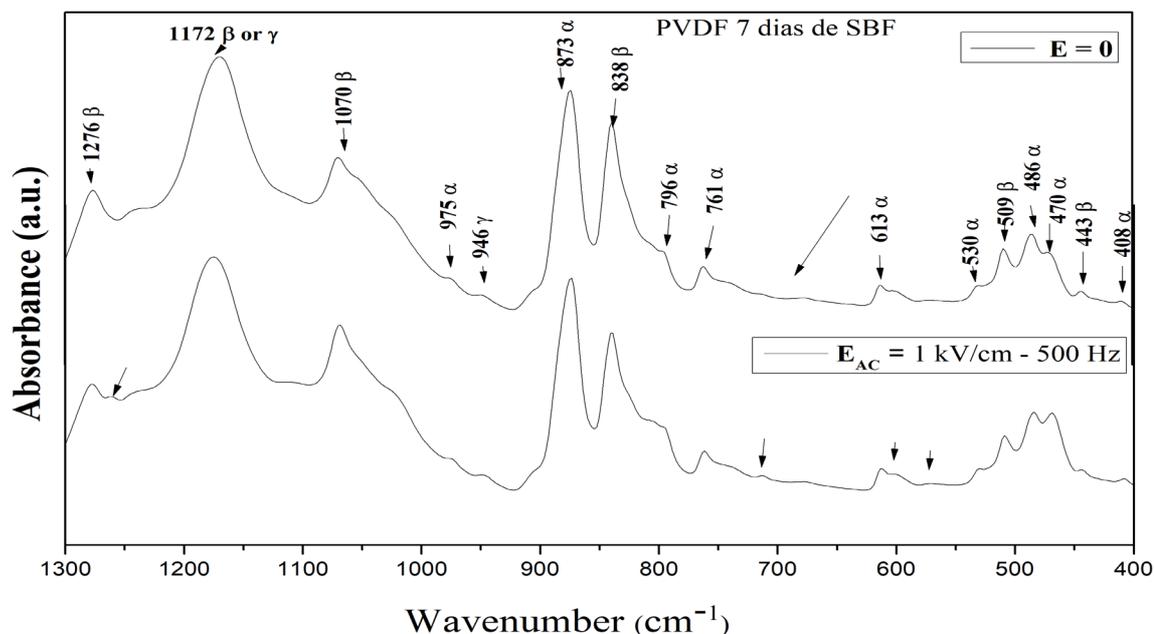


Figura 28 - Análise de espectroscopia FTIR-ATR para amostra de PVDF com 7 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.

Na figura 29, mostra as bandas relacionadas a HAp com 7 dias imersas no SBF com campo e sem campo elétrico, inicialmente pode-se observar diferenças nas intensidades das bandas ao compararmos os espectros referentes a amostra com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico, observa-se também as bandas características do grupo do fosfato e (PO_4^{3-}) da Hidroxiapatita, bandas essas identificadas como 1018 cm^{-1} , 599 cm^{-1} e 557 cm^{-1} .

Presentes em todos os gráficos analisados, pode-se sugerir que a amostra com campo elétrico que apresentou picos mais intensos devido a uma melhor cristalinidade e formação de cristalitos bem definidos.

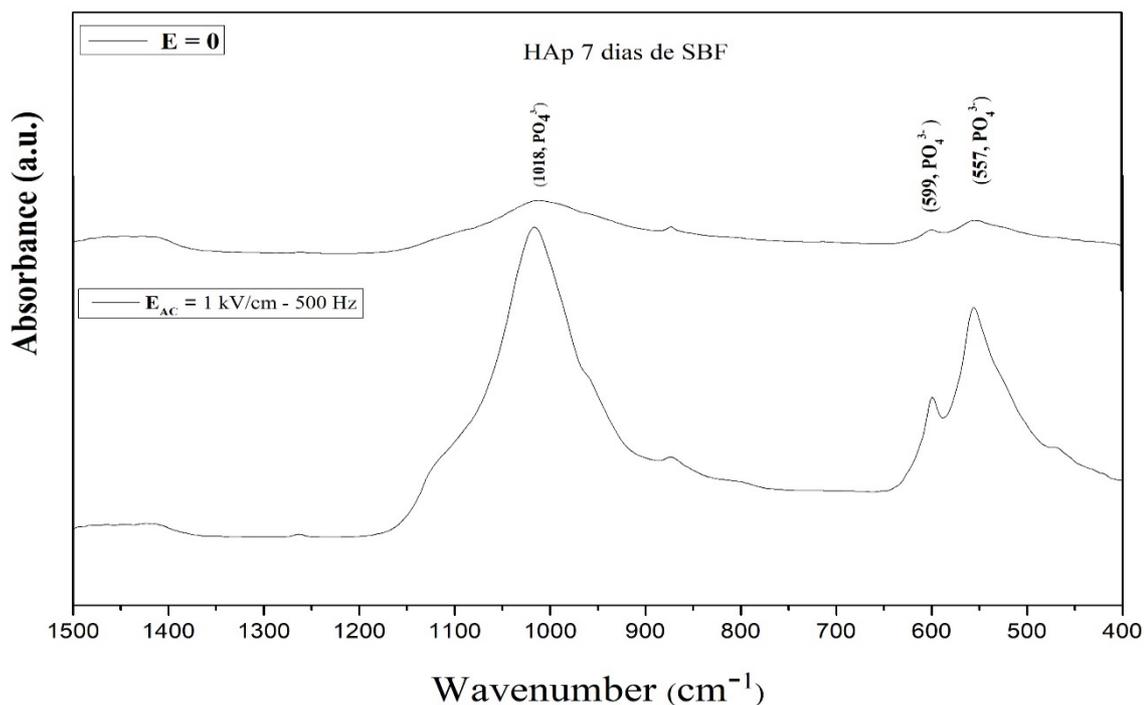


Figura 29 - Análise de espectroscopia FTIR-ATR para amostra de HAp com 7 dias de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem campo elétrico.

6.4.3 Microscopia eletrônica de Varredura

As imagens de MEV do compósito HAp-PVDF submetido ao experimento com 3 dias de imersão em SBF são apresentadas na figura 30. Aqui é possível observar que aparentemente não existe formação de camada na imagem de superfície figura 30 (a), já na fratura figura 30 (b) pode se observar uma formação inicial de apatita, ou seja, já se tem um início do processo de formação de apatita.

Na figura 30 (c) e (d) temos a amostras submetidas a campo elétrico, observa-se evidentemente que houve uma nucleação de apatita, e que a superfície apresenta uma microestrutura com aspecto craquelado, onde pode-se inferir que seja uma camada de apatita grossa. Além disso, a imagem de fratura, figura 30 (d) apresentou formação de camada superficial, o que evidencia eficiência do efeito de campo elétrico aplicado na amostra em apenas 3 dias.

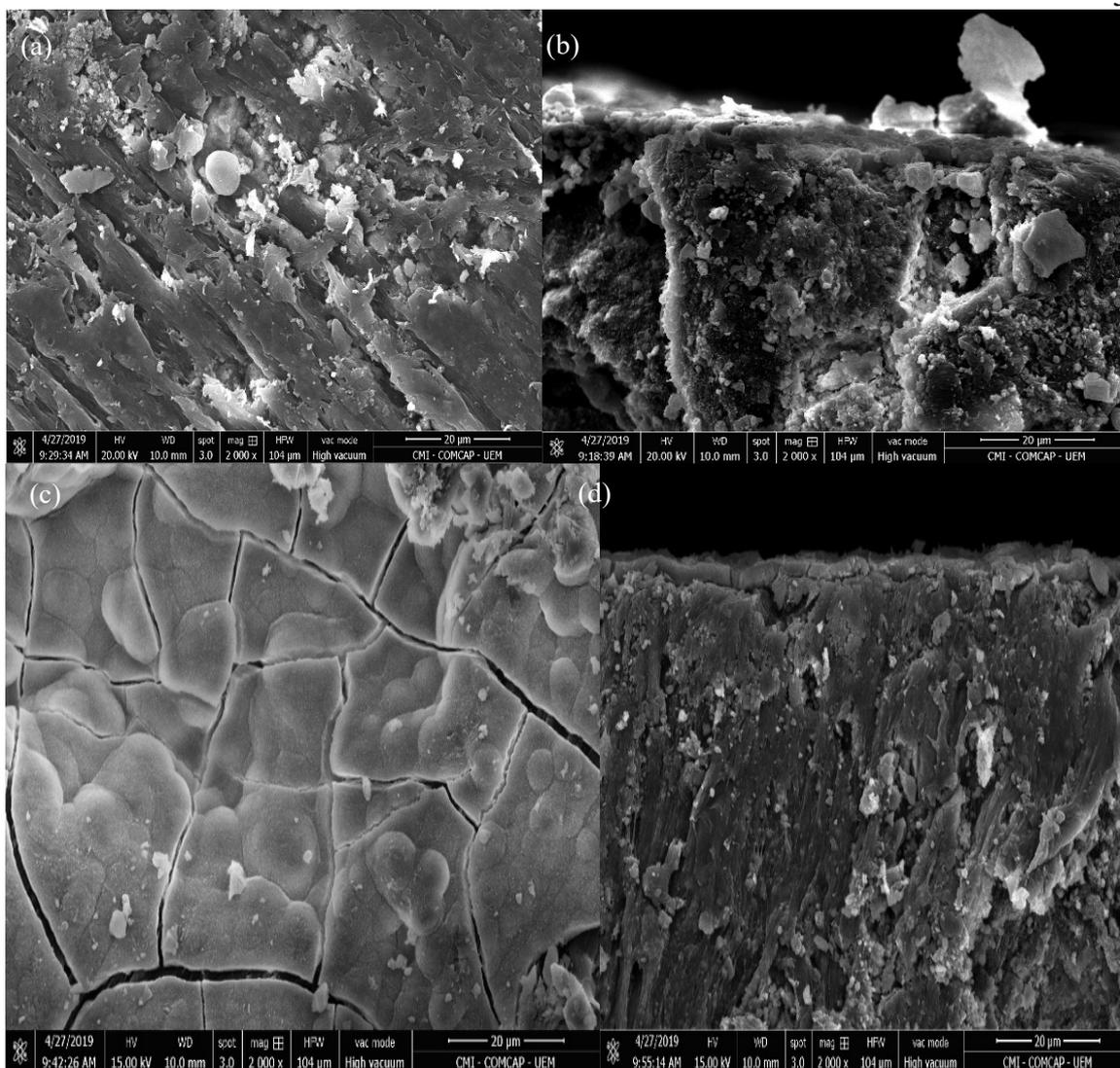


Figura 30 - Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 36 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 36 horas de experimento com campo elétrico.

No experimento com 5 dias, figura 31, as amostras de HAp-PVDF sem campo elétrico, figura 31 (a) e (b), apresentou camada nucleada superficial de apatita. Acredita-se que com 5 dias de imersão já se tenha decorrido tempo suficiente para essa camada nuclear superficialmente, o que é evidenciado nas micrografias de superfície e fratura sem aplicação de campo elétrico.

Nas imagens da figura 31 (c) e (d), com 5 dias de experimento com aplicação de campo elétrico observa-se que as camadas nucleadas de HAp-PVDF, tiveram um potencial de crescimento bastante parecidas com as sem campo elétrico, que se diferencia apenas pelas rachaduras na superfície.

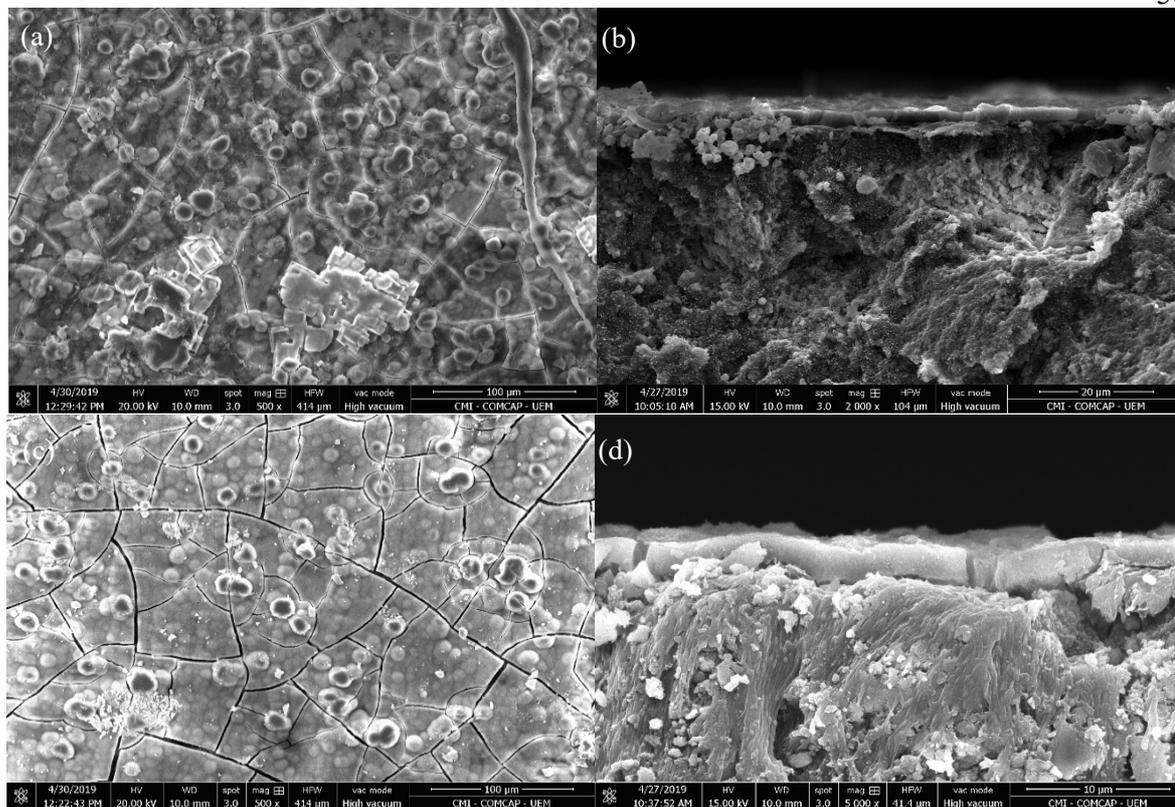


Figura 31 - Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 84 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 84 horas de experimento com campo elétrico.

No MEV de superfície com 7 dias de imersão em SBF sem campo elétrico figura 32 (a) e (b). Observa-se que a camada de apatita cresceu bastante, dessa forma acredita-se que com 7 dias já se tem tempo suficiente para formação de apatita, a camada formada tem uma boa espessura, pode ser observado também por Silva (2019) [38], que também trabalhou com o compósito da mesma proporção.

Nas imagens feitas com 7 dias de imersão com aplicação de campo elétrico, figura 32 (c) e (d), conclui-se que apesar da eficiência do campo elétrico já não se tem uma distinção tão aparente. Ou seja, o potencial de crescimento atribuído a dinâmica que o campo elétrico introduzi no movimento de íons presentes no SBF, que são responsáveis pela formação das fases amorfas inicialmente seguida de formação da apatita, já não é tão forte com 7 dias, pois acredita-se que já tem tempo suficiente para que o processo ocorra espontaneamente.

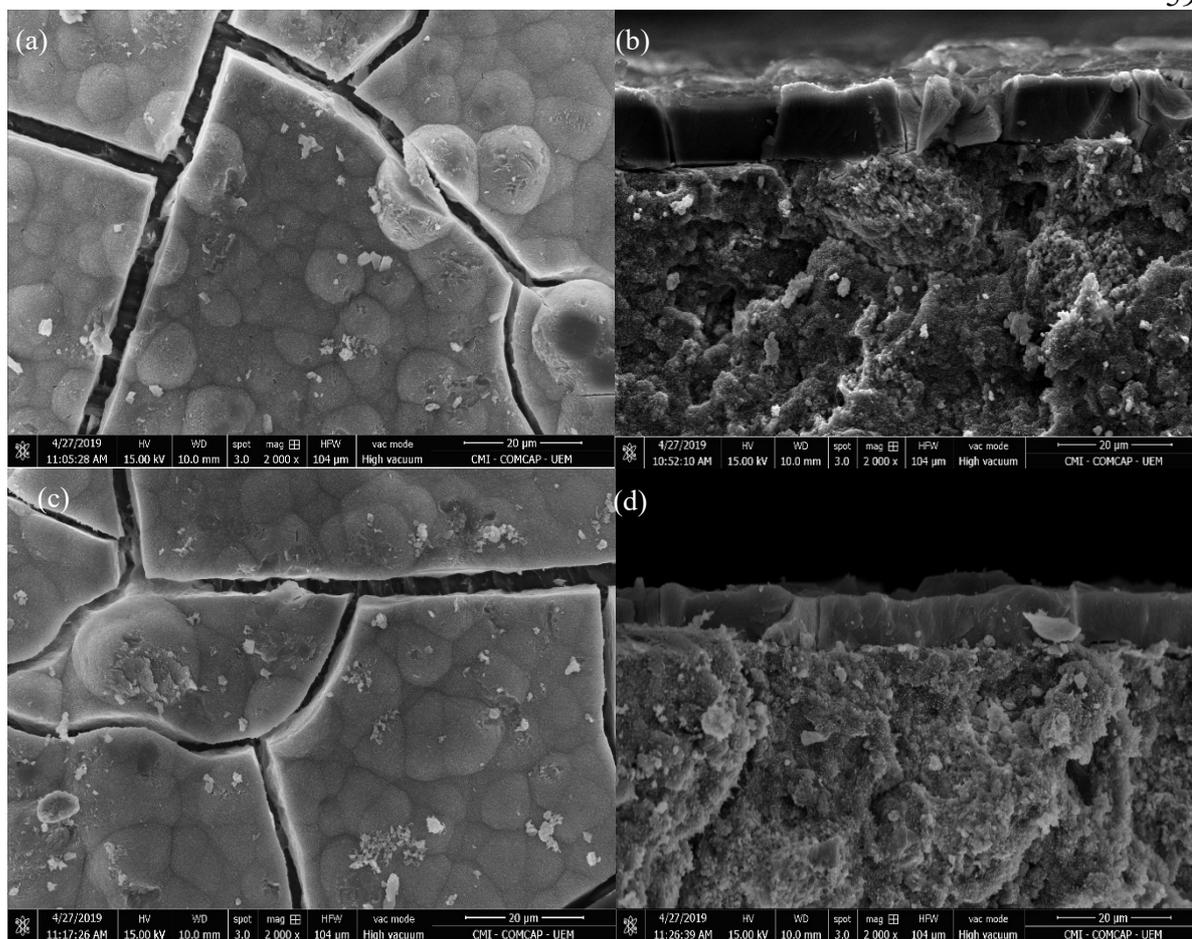


Figura 32 - Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 168 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 168 horas de experimento com campo elétrico.

As imagens de MEV do PVDF com 7 dias de experimento sem campo elétrico, figura 33 (a) e (b), tem como objetivo mostrar como o material reage ao efeito do SBF, o que se constatou que não existe modificações específicas que possam ser observadas, o material continua com suas formas intrínsecas, preservando suas propriedades.

O MEV do PVDF com 7 dias de experimento com campo elétrico figura 33 (c) e (d). Como observado nas imagens de MEV sem campo elétrico, as imagens de superfície e fratura com aplicação de campo não obtiveram diferença nem modificação da estrutura do material, verificado por Silva (2019) [38], que ocorre devido ao fato do PVDF ser biocompatível.

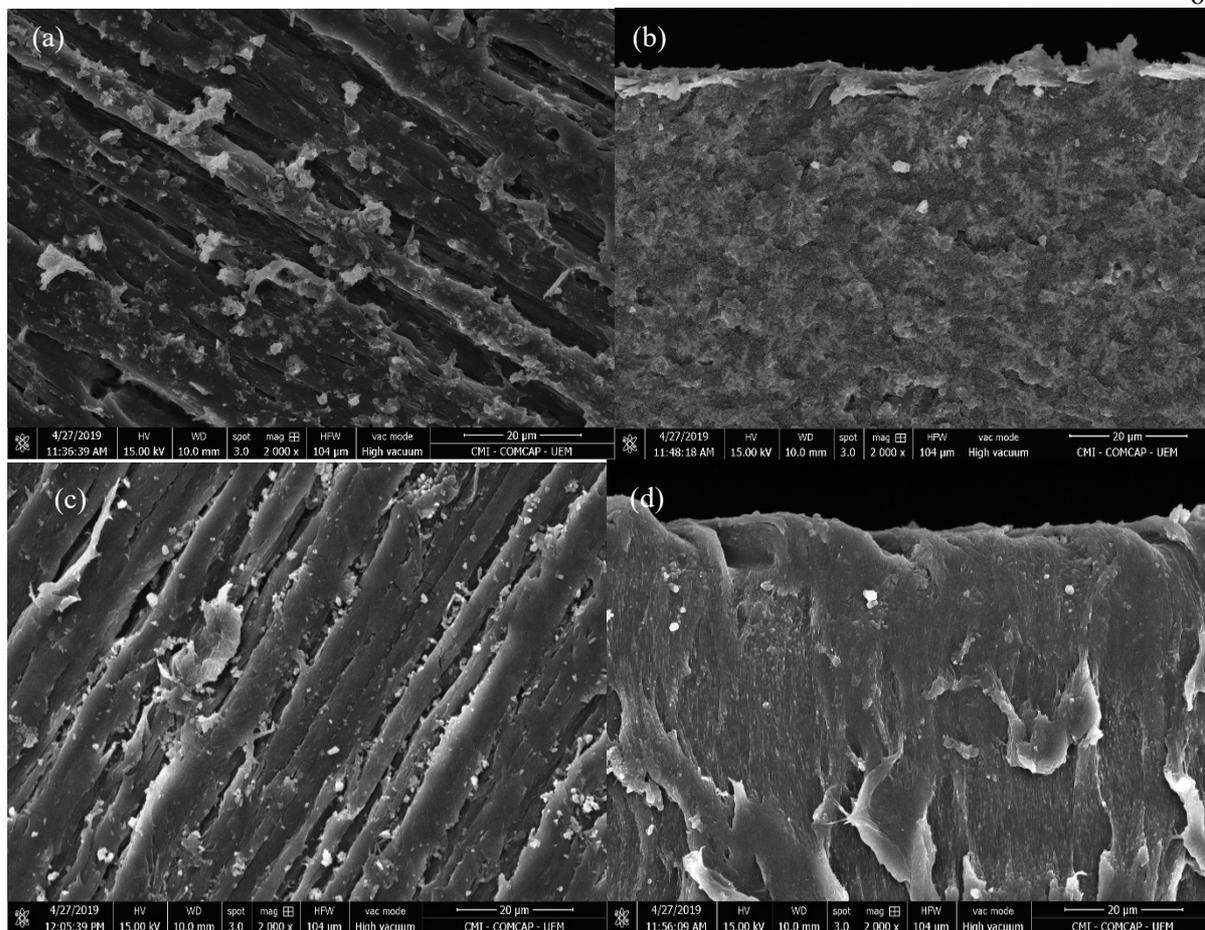
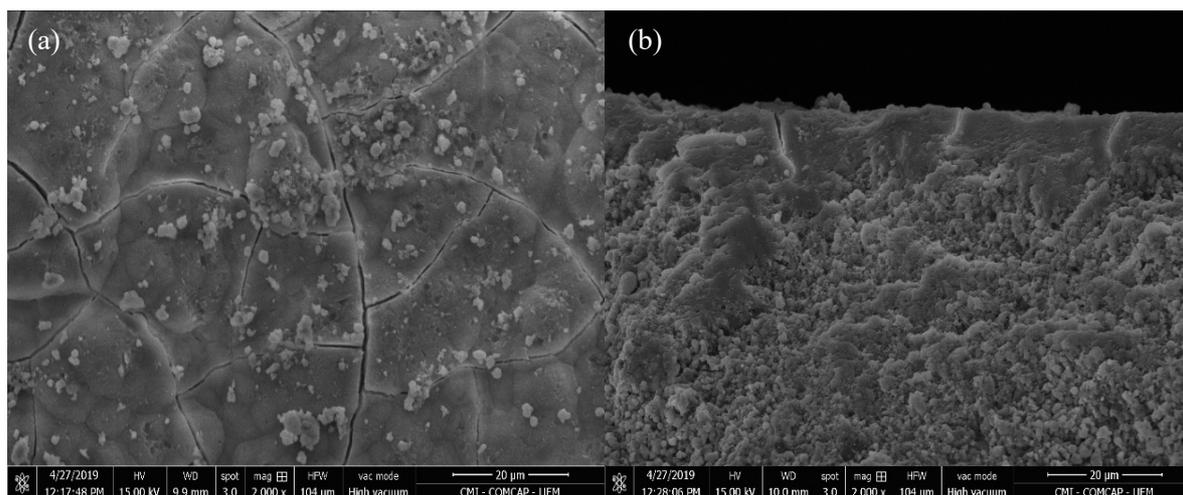


Figura 33 - Imagens de PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 168 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 168 horas de experimento com campo elétrico.

Na figura 34 (a) e (b), tem-se imagens de superfície e fratura da HAp com 7 dias de experimento sem campo elétrico, observa-se que há formação de apatita, assim sabe-se que HAp tem a característica de induzir a formação dessas fases quando imersa em fluido corporal simulado. Ao contrário do comportamento do PVDF que não apresenta bioatividade.

NA figura 34 (c) e (d). As imagens de HAp com 7 dias de experimento com campo elétrico, o campo não influencia consideravelmente na formação de apatita.



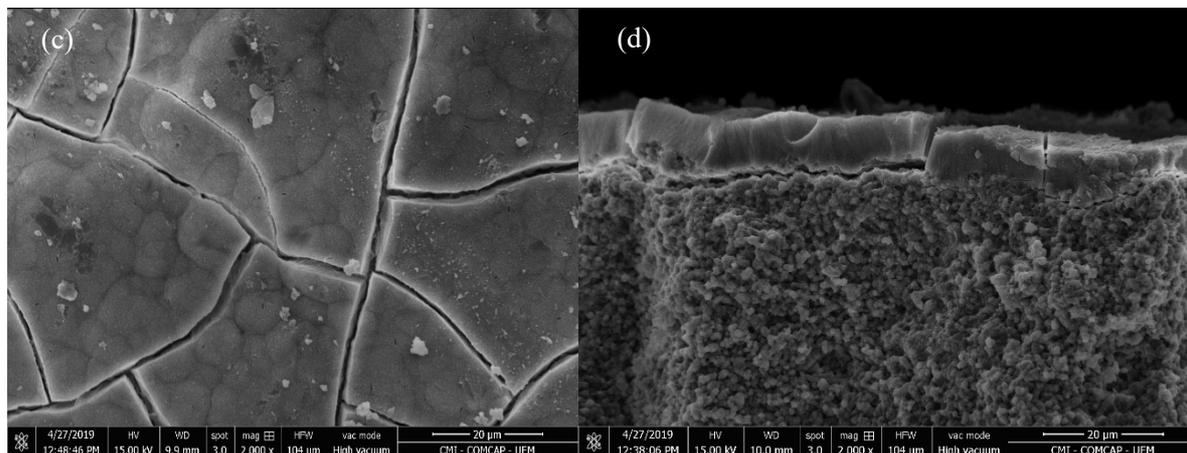


Figura 34 - Imagens de HAp. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 168 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 168 horas de experimento com campo elétrico.

6.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE HAp-PVDF COM 1, 2 e 3 DIAS DE IMERSÃO:

Essa fase experimental foi importante para determinarmos o quanto a aplicação de campo elétrico se torna eficaz nesse estudo, supomos que como os resultados obtidos poderíamos determinar parâmetros que indicassem, a efetividade da aplicação de campo elétrico, como também, com quantos dias seria necessário para termos nucleação das amostras HAp-PVDF, a partir disso poderíamos quantificar os resultados obtidos e determinar o quão eficiente é trabalho proposto.

6.5.1 Difração de raios X

Na figura 35, são apresentados os resultados de difração de raios X após imersão em SBF por 1 horas, com e sem aplicação de campo elétrico externo. Para identificação dos planos utilizou-se as fichas 00-009-0432-ICSD e 00-042-1650-ICSD, correspondentes a HAp e PVDF.

Nenhuma diferença significativa é observada na amostra. Isso indica que, a formação de esporos de apatita, observada nas imagens de MEV, é amorfa e por isso não contribui significativamente para uma mudança do padrão de difração de raios X.

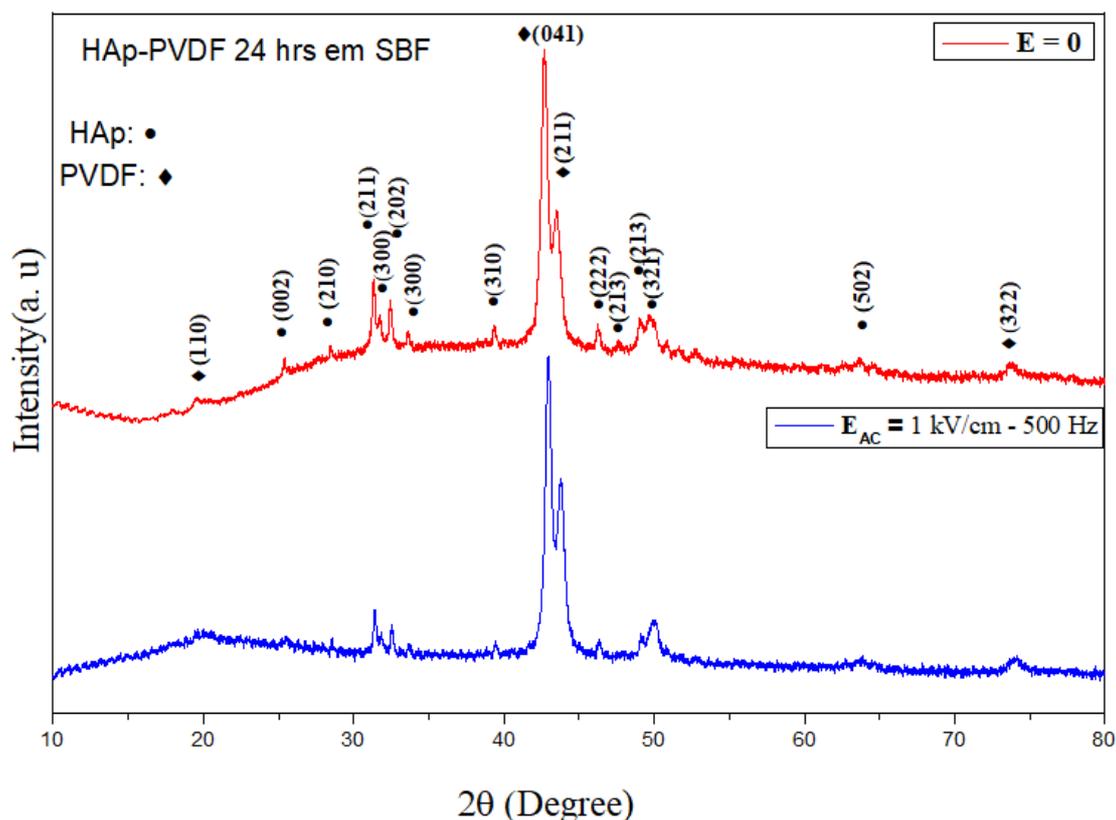


Figura 35 – Padrão de difração de raios X obtido do composto HAp-PVDF imersos por 24 horas em SBF. (a) Sem campo elétrico e (b) com campo elétrico alternado externo.

Na figura 36, tem-se o difratograma das amostras com 2 horas de imersão, com e sem aplicação de campo elétrico. O que se observou como nas amostras com 1 horas de imersão que não se teve diferenças significativas nos planos. Ao observamos o MEV dessas amostras percebe-se que as mesmas também apresentam formação de poros o que não é suficiente para alterar os padrões de difração.

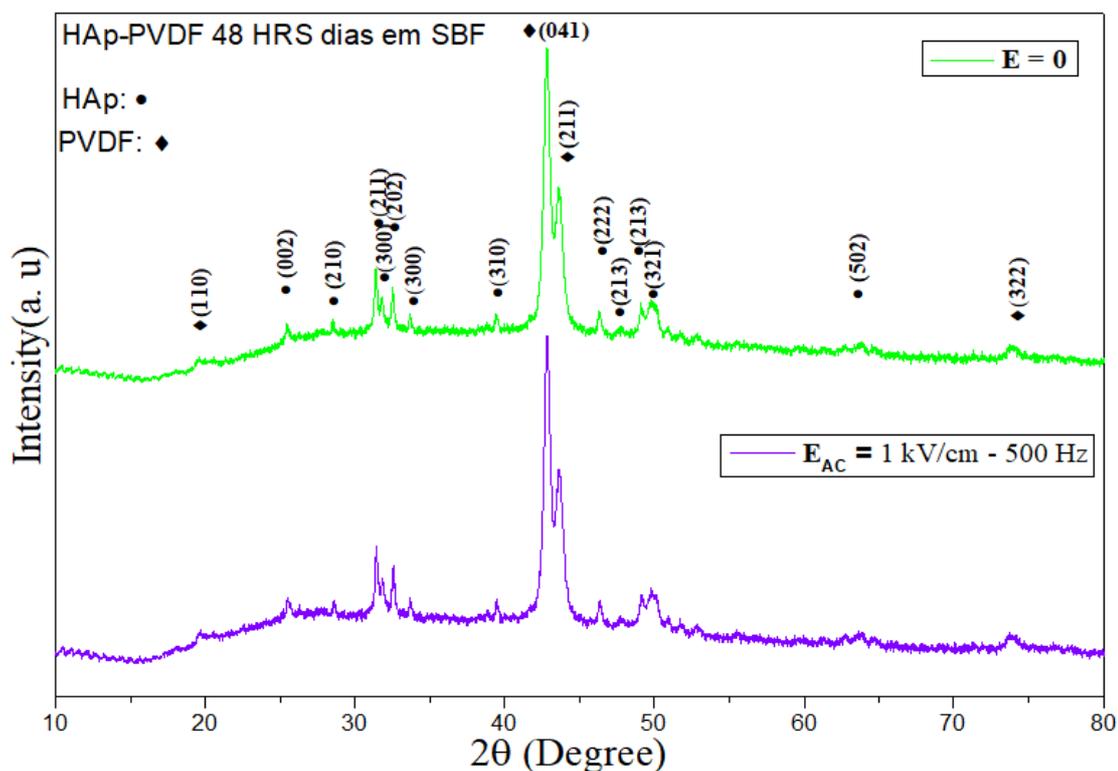


Figura 36 – Padrão de difração de raios X obtido do composto HAp-PVDF imersos por 48 horas em SBF. (a) Sem campo elétrico e (b) com campo elétrico alternado externo.

Na figura 37, são apresentados os resultados de DRX para amostra de HAp-PVDF com 3 dias de imersão. Os resultados obtidos foram presença de um plano (211) que é uma fase de 100% HAp uma diferença aparente dos planos (041) e (211) quando comparados com o difratograma com campo elétrico, e a presença de uma fase de PVDF bem evidente na amostra submetida a campo elétrico.

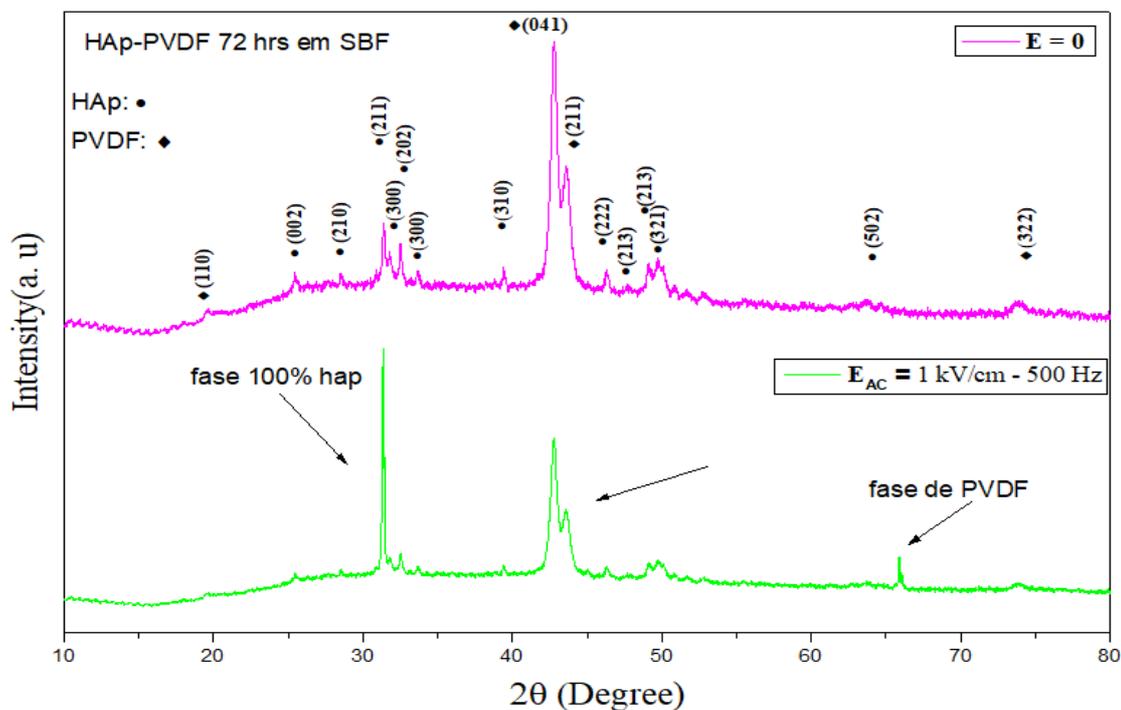


Figura 37 – Padrão de difração de raios X obtido do composto HAp-PVDF imersos por 72 horas em SBF. (a) Sem campo elétrico e (b) com campo elétrico alternado externo.

Na figura 38, são apresentados os resultados obtidos das amostras de PVDF submetidas a 3 dias de imersão em SBF. Os padrões de difração obtidos não apresentam diferença na intensidade dos picos, ou seja, assim como já observado anteriormente o campo elétrico não afeta a estrutura do PVDF puro.

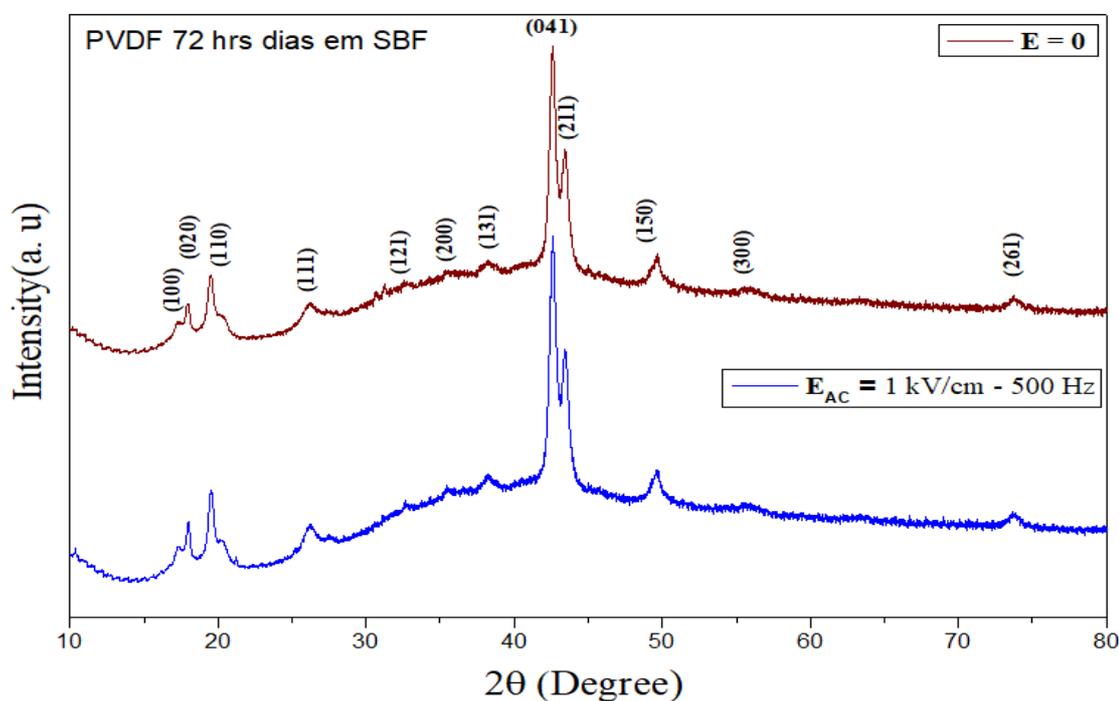


Figura 38 – Padrão de difração de raios X obtido do composto PVDF imersos por 72 horas em SBF. (a) Sem campo elétrico e (b) com campo elétrico alternado externo.

Na figura 39 são apresentados os resultados obtidos para amostras de HAp com 3 dias de imersão. Observa-se uma similaridade aparente entre os difratogramas, o que nos sugere que a formação de apatita em ambas as amostras foi praticamente idêntica, ou seja, não existe uma diferença significativa entre ambas.

:

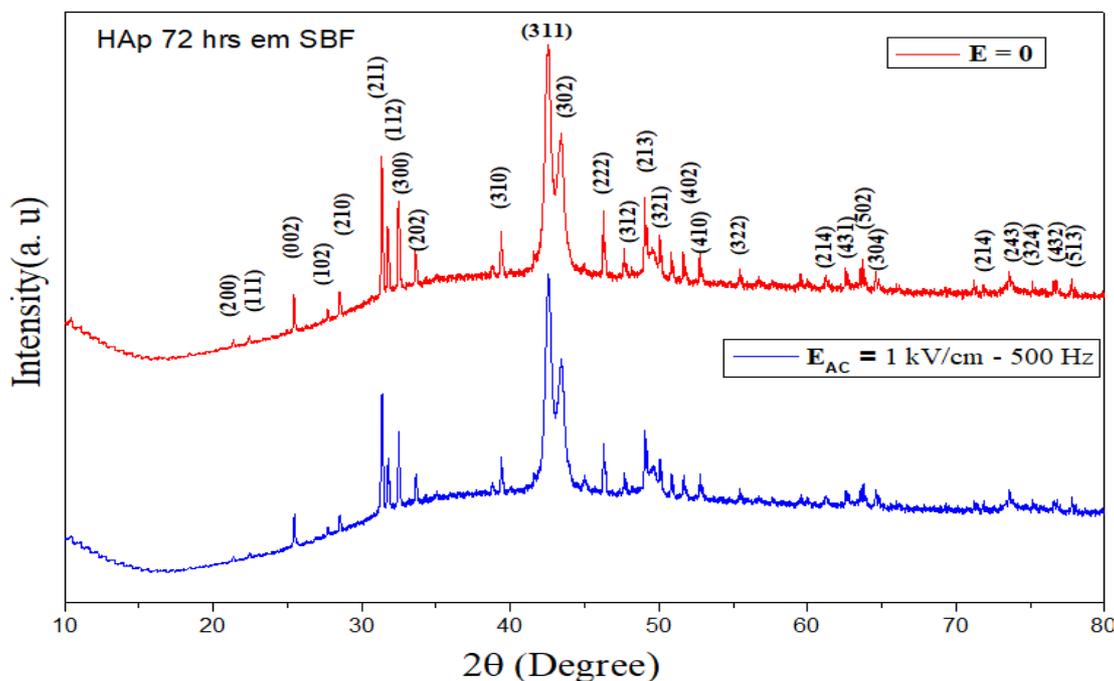


Figura 39 – Padrão de difração de raios X obtido do composto HAp imersos por 72 horas em SBF. (a) Sem campo elétrico e (b) com campo elétrico alternado externo.

6.5.2 Análise de FTIR-ATR

Na figura 40, observa-se o espectro de absorção de FTIR-ATR para as amostras de HAp-PVDF submetidas a imersão em SBF com campo elétrico e sem campo elétrico, com 1 dia de imersão. Na espectroscopia pode-se observar bandas características das fases do polímero PVDF como visto em 1400 cm^{-1} sendo α , β e γ e 873 cm^{-1} β e γ , também pode-se observar fases características da HAp do grupo fosfato sendo (PO_4^{3-}) em 1018 cm^{-1} , 599 cm^{-1} , 557 cm^{-1} . Fazendo-se a comparação de ambas as amostras não se percebe-se nitidamente diferença entre as bandas de ATR aparentemente não sofreram modificação ou interferência.

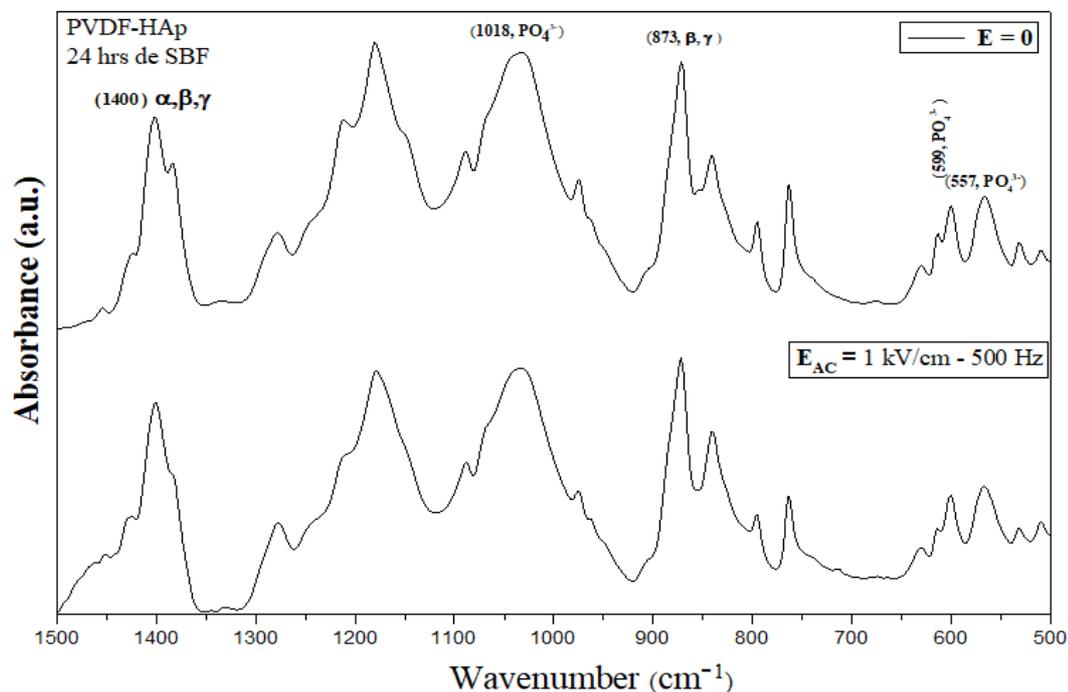


Figura 40 – Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostras de HAp-PVDF com 24 horas de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.

Na figura 41, amostras com 48 horas de experimento, notam-se que há bandas características de HAp do grupo fosfato (PO_4^{3-}) em 1018 cm^{-1} , 599 cm^{-1} , 557 cm^{-1} , as bandas de 1400 cm^{-1} são atribuídas as fases de PVDF, assim como nas amostras analisadas em 2 dias de experimento não se notou diferenças significativas entre as bandas de ATR.

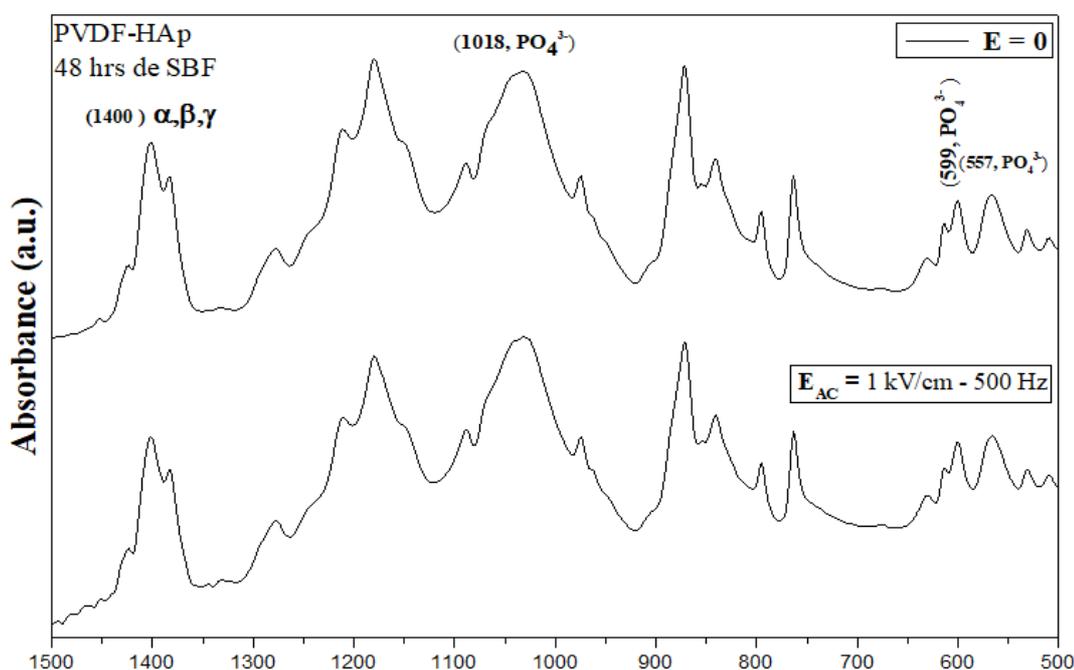


Figura 41 – Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostras de HAp-PVDF com 48 horas de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.

Na figura 42, com amostras de 3 dias de experimento em imersão em SBF com campo elétrico e sem campo elétrico, observou-se diferentemente das espectroscopia de 1 e 2 dias uma pequena redução nas intensidades das bandas tanto de HAp do grupo fosfato (PO_4^{3-}) em 1018 cm^{-1} , 599 cm^{-1} , 557 cm^{-1} , quanto nas bandas de PVDF 1400 cm^{-1} e 873 cm^{-1} esse fato é atribuído a interferência no infravermelho.

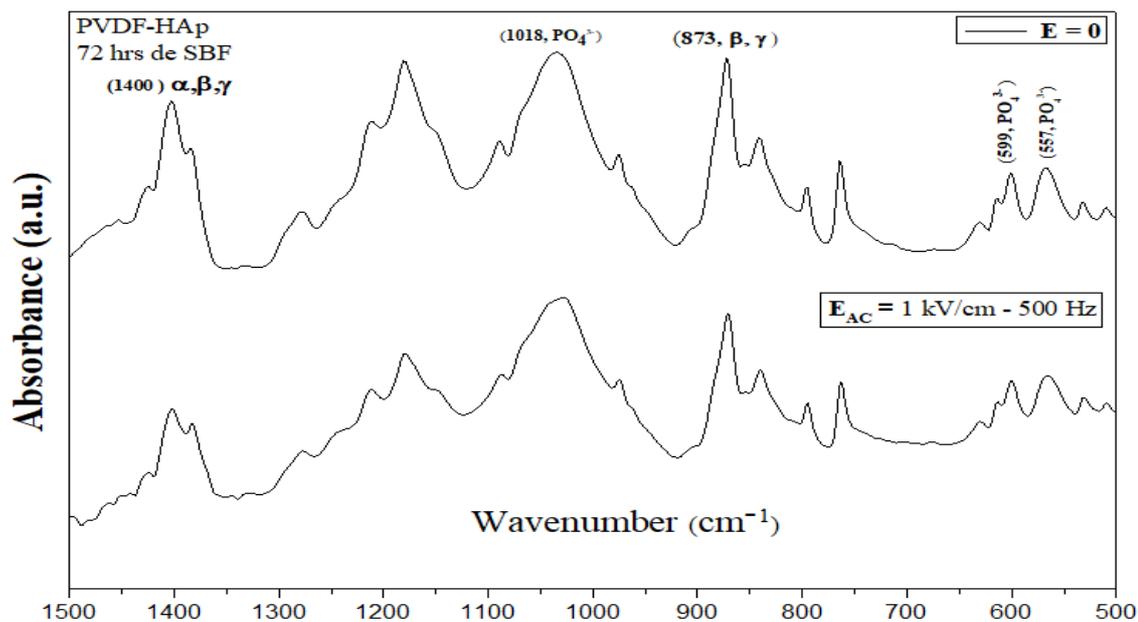


Figura 42 – Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostras de HAp-PVDF com 72 horas de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.

Na figura 43, tem-se o espectro de adsorção de FTIR-ATR para amostras de PVDF submetidas a imersão de SBF e experimento com campo e sem campo elétrico. Observa-se as bandas características da fase α , β e γ do polímero de PVDF. As bandas 408 cm^{-1} , 470 cm^{-1} , 486 cm^{-1} , 530 cm^{-1} , 613 cm^{-1} , 761 cm^{-1} , 796 cm^{-1} , 873 cm^{-1} e 975 cm^{-1} , correspondem a modos normais da fase α pode ser observado [37]. As bandas 443 cm^{-1} , 509 cm^{-1} , 838 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} e 1276 cm^{-1} , estão relacionadas a fase β e a banda 1172 está atribuída a uma região onde tem-se fase β ou γ . Pode-se observar que algumas bandas existem uma formação de “ombros” como nas bandas próximo a 1070 cm^{-1} , diferentes do espectro onde não teve aplicação de campo elétrico atribuímos isso a defeitos na cadeia polimérica ou ao processo de prensagem uniaxial que afeta a fase do polímero.

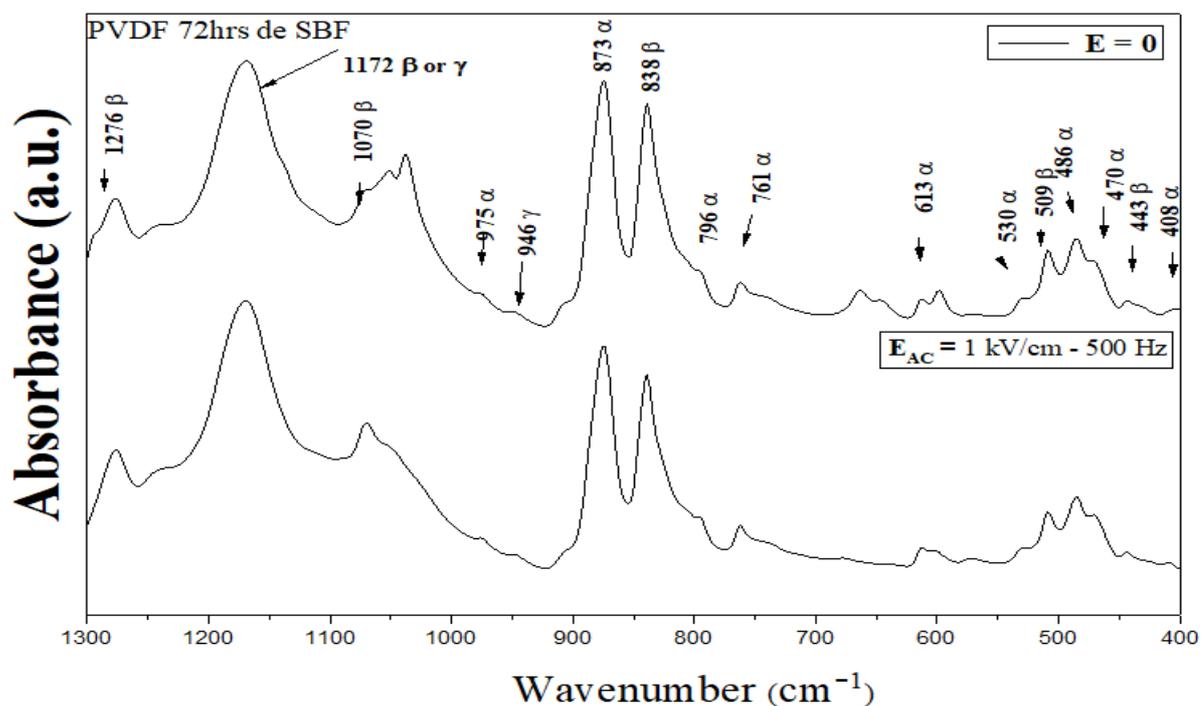


Figura 43 – Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostras de PVDF com 72 horas de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.

Na figura 44, tem-se as bandas da HAp com 3 dias de imersão, observa-se uma diminuição nas intensidades das bandas ao compararmos os gráficos, nota-se também que em ambas as análises temos as bandas características do grupo fosfato (PO_4^{3-}) da Hidroxiapatita, bandas essas identificadas como 1018 cm^{-1} , 599 cm^{-1} e 557 cm^{-1} . Isso é atribuído a formação de cristalitos bem definidos, pois está presente em todas as amostras.

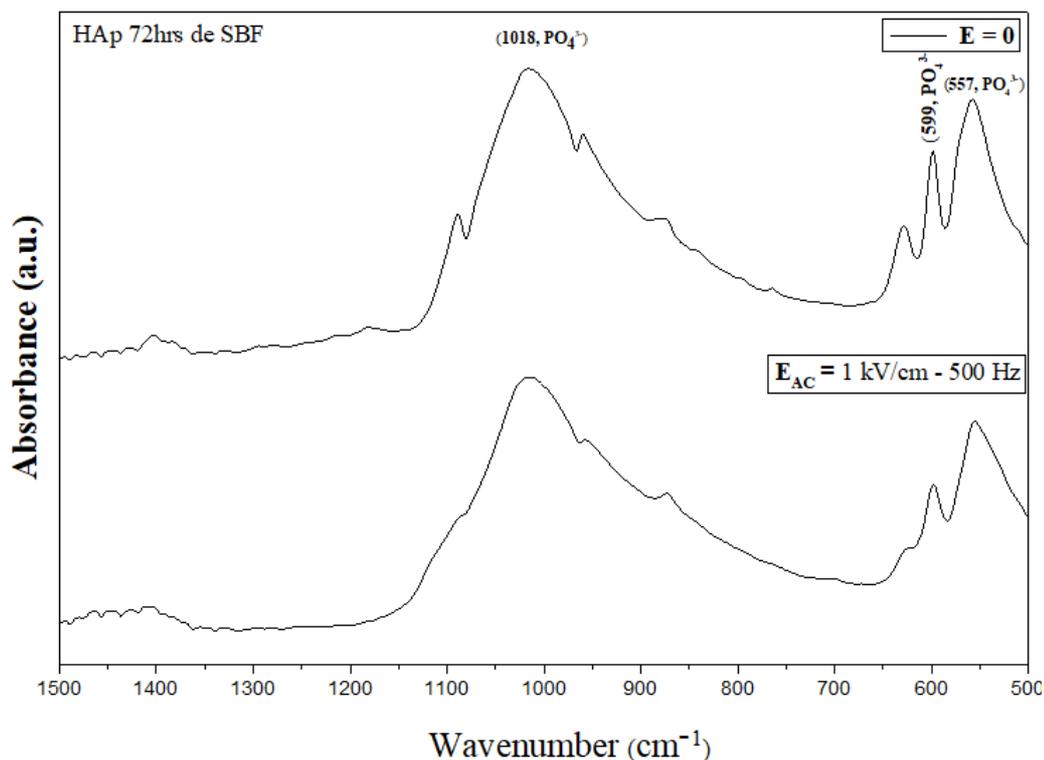


Figura 44 – Análise de espectroscopia de FTIR-ATR para amostras de HAp com 72 horas de imersão em SBF com aplicação de campo elétrico e sem aplicação de campo elétrico.

6.5.3 Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura

Na figura 45 (a) e (b), tem-se imagens de MEV do compósito de HAp-PVDF submetido a 24 horas de experimento imerso em SBF e sem aplicação de campo elétrico. Formações iniciais de apatitas podem existir dentro de poros, e podem se observadas com um estudo bem detalhado de identificação de imagens, já na imagem de superfície, ainda não se tem indícios de formação de camada, o que é aceitável pelo processo.

Na figura 45 (c) e (d), tem-se o MEV das amostras HAp-PVDF submetida a 1 dia de experimento com campo elétrico, assim como as amostras sem campo não se observou-se uma evidência de formação de apatita aparente.

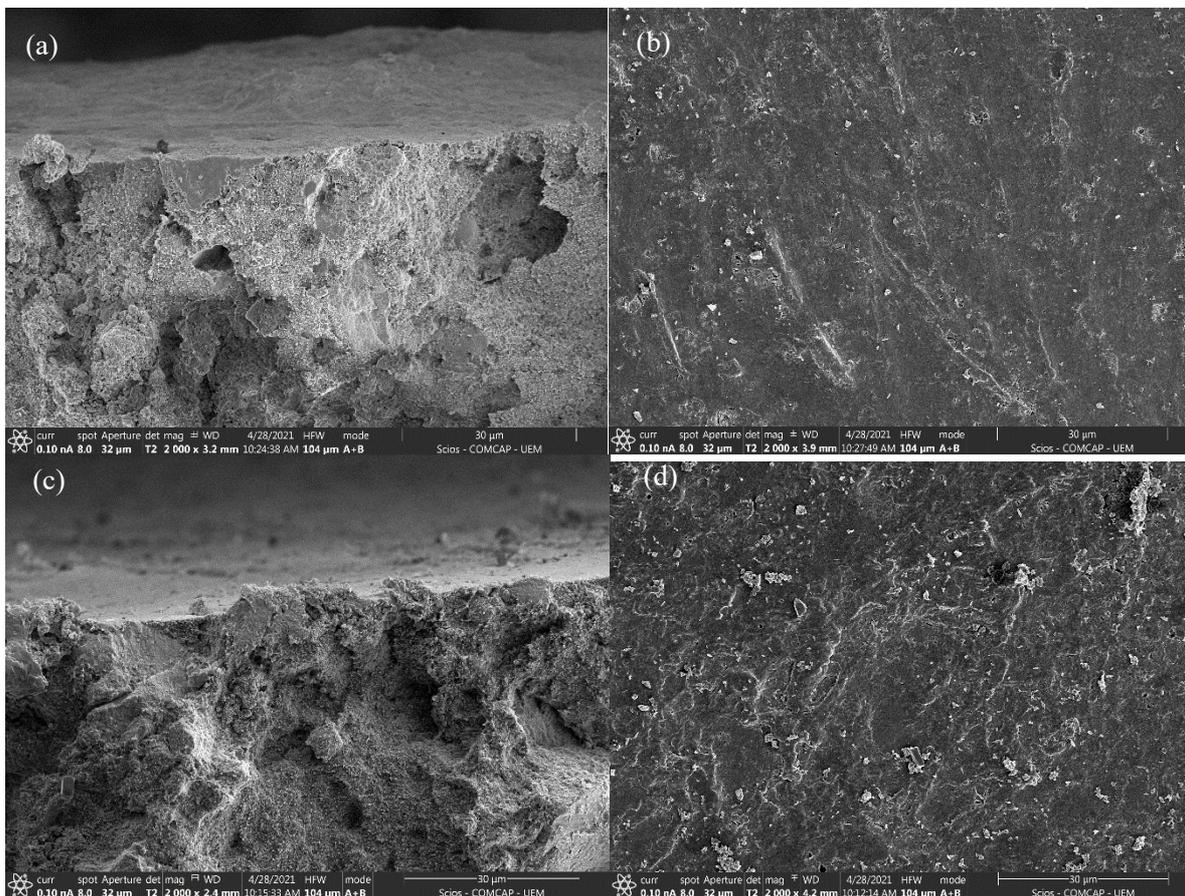
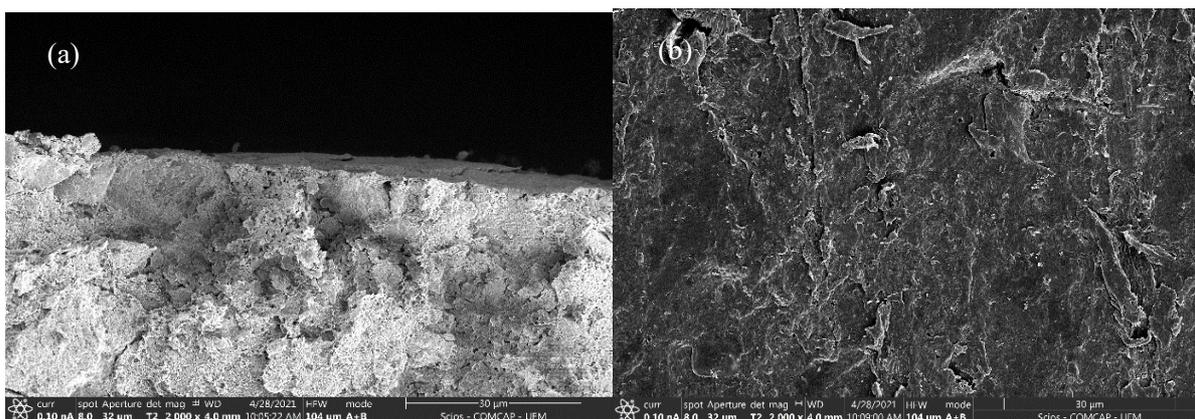


Figura 45 - Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 24 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 24 horas de experimento com campo elétrico.

Na figura 46 (a) e (b), análises com 2 dias de experimento, observa-se na imagem de fratura assim como observado nas imagens de 1 dia não apresentou formação de camadas ou de poros nas amostras.

Na figura 46 (c) e (d), imagens com 2 dias de experimento submetidas a campo elétrico, não se notou presença de camadas de apatitas significativas a ponto de identificarmos pelas imagens de MEV.



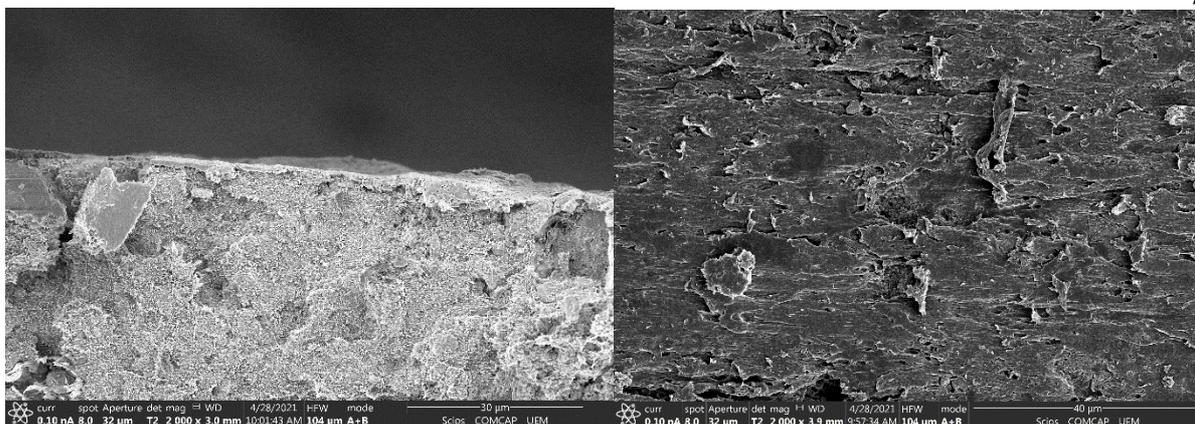
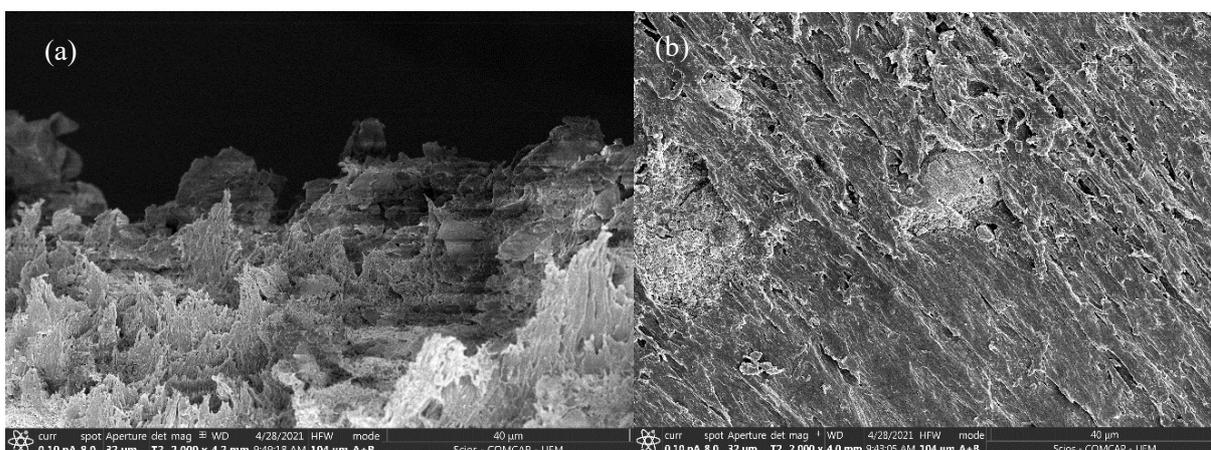


Figura 46 - Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 48 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 48 horas de experimento com campo elétrico.

Na figura 47 (a) e (b), nas análises das amostras com 3 dias de experimento sem campo elétrico, notou-se apesar da dispersão e pela forma da fratura realizada, que a uma certa formação de poros, mas que não pode ser observado como muita eficiência, já na superfície figura 47 (b), com 3 dias.

Na figura 47 (c) e (d), nas análises de MEV de fratura e superfície da amostra submetida a campo elétrico com 3 dias de experimento, nos dá evidências claras que houve nucleação de apatita na superfície da amostra, na fratura deixa evidente que o processo de formação de apatita ocorre de dentro para fora, nota-se a formação de esporos como também uma formação de camada. O resultado corrobora com resultados anteriores, em que se obteve nucleação de apatita com 3 dias de experimento e com campo elétrico, como esperado.



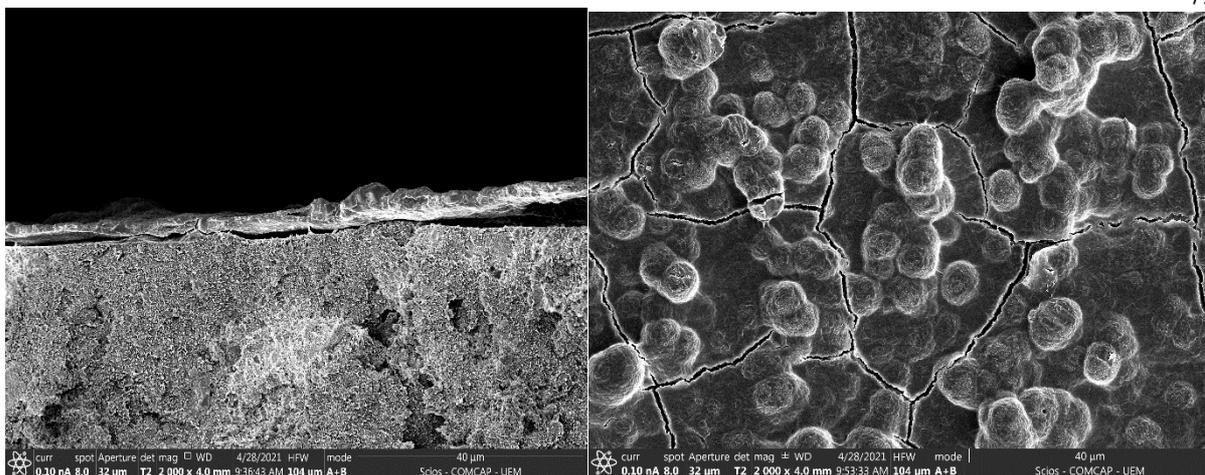
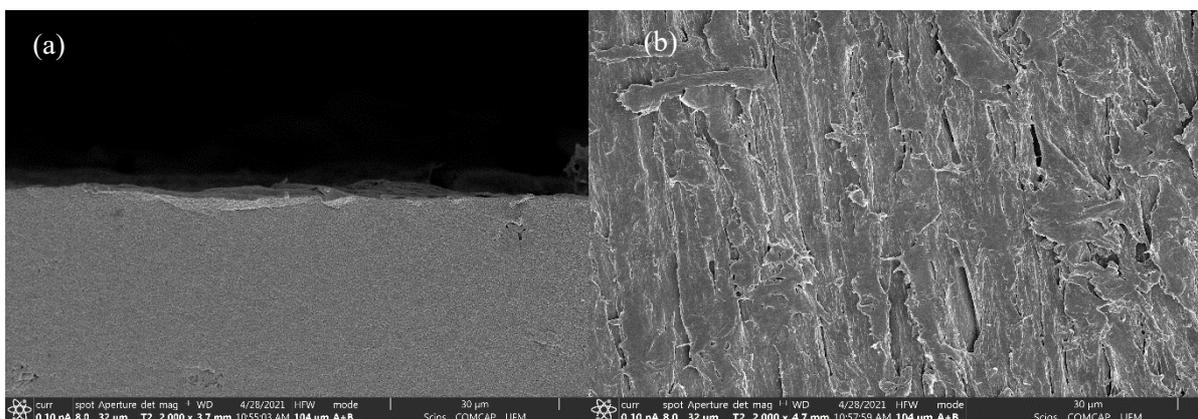


Figura 47 - Imagens de HAp-PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 72 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 72 horas de experimento com campo elétrico.

Na figura 48 (a) e (b) tem se micrografia das amostras de PVDF imersas por 3 dias de experimento sem campo elétrico de PVDF, nessas imagens o objetivo é mostrar como o PVDF reage a imersão em SBF, e evidentemente notou-se que as características são preservadas não havendo nenhum tipo de modificação.

Na figura 48 (c) e (d), o PVDF foi submetido a aplicação de campo elétrico assim como na figura 33 a intenção é observar como o material se comporta, concluímos que assim como já era esperado não há formação de apatita.



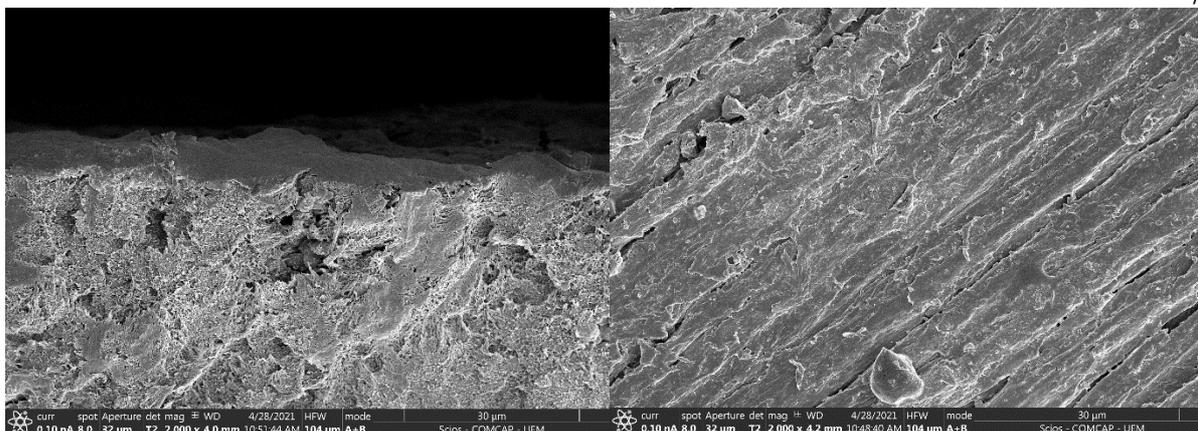
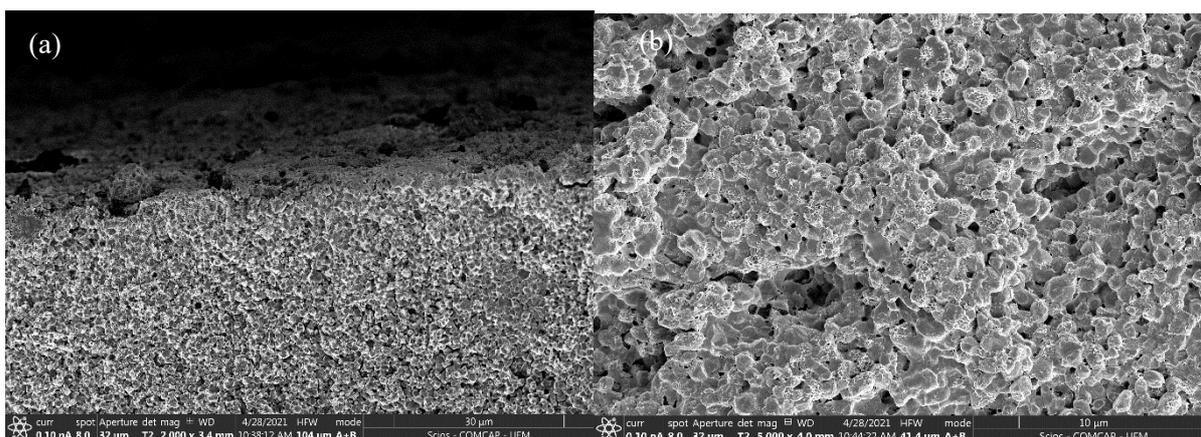


Figura 48 - Imagens de PVDF. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 72 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 72 horas de experimento com campo elétrico.

Na figura 49 (a) e (b), analisou-se imagens de superfície e fratura da HAp com 3 dias sem aplicação de campo elétrico observa-se que em ambas as imagens ocorre a formação de apatita nos poros.

Na figura 49 (c) e (d), HAp com 3 dias com aplicação de campo elétrico observa-se na imagem de fratura a formação dentro dos poros e na imagem de superfície áreas onde atribuiu-se formação de camadas de apatita, esses resultados indicam que não evidências que o campo elétrico diferente de zero induza crescimento de apatita na apatita pura.



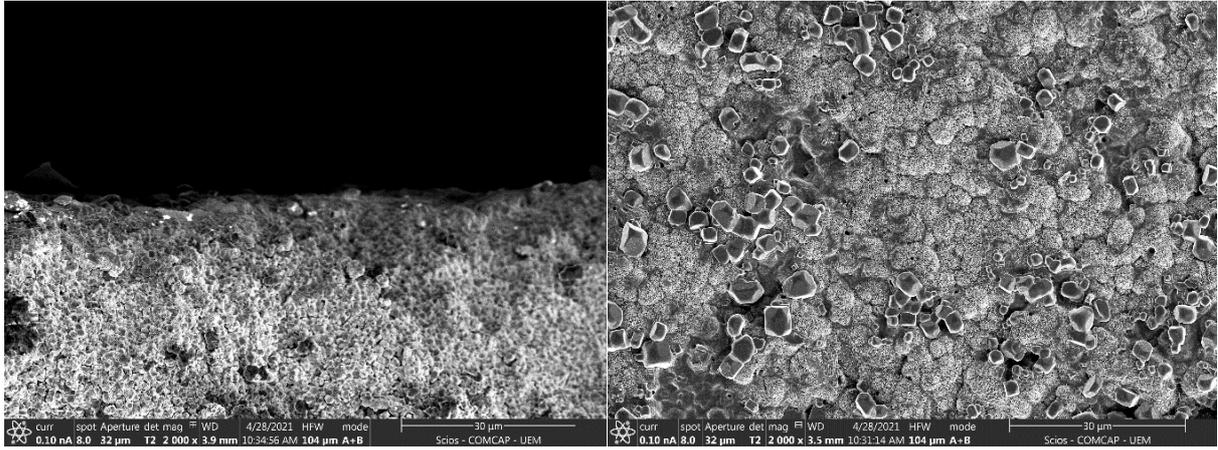


Figura 49 - Imagens de HAP. (a) Imagem de fratura e (b) de superfície com 72 horas de experimento sem campo elétrico. (c) Imagem de fratura (d) e de superfície com 72 horas de experimento com campo elétrico.

7. MECANISMO DE AÇÃO SOB CAMPO ELÉTRICO

Os resultados indicam inequivocamente o rápido crescimento da apatita (apatita semelhante a osso) estimulada por campos elétricos. Isso foi confirmado pela presença do fosfato e pela ausência das bandas hidroxil nas análises ATR-FTIR, características da apatita formada em meio SBF. Observa-se também claramente uma microestrutura de apatita com várias trincas na superfície da amostra submetida ao campo elétrico ($E_{AC} (3 \text{ Hz}) = 235 \text{ kV/m}$), que é muito característico do crescimento apatita no meio SBF. Os mecanismos que regem esse crescimento estimulado de apatita podem ser compreendidos considerando a reconfiguração das cargas elétricas na superfície do biocomposto (Fig. 50) devido ao efeito piezoelétrico do PVDF, que é ativado pelo campo elétrico oscilante. A estrutura molecular polar do PVDF é ilustrada na figura 50 (a). Neste arranjo, as cargas positivas (H^+) são eliminadas em um lado do material enquanto as cargas negativas (F^-) são descartadas no lado oposto. Nesse arranjo, o campo elétrico oscilante ($E_{AC} (3 \text{ Hz}) = 235 \text{ kV/m}$) promove contrações e expansões ($\pm\Delta L$) no biocomposito (Fig. 50(b)), em movimento vibratório, devido à piezoelectricidade da matriz polímera do composto HAp-PVDF. Desta forma, quando o campo está em uma direção, a estrutura molecular do polímero comprime, reorganizando a superfície composta com tendências eletricamente neutras (Fig. 50 (c)). Quando o E é invertido, o PVDF se expande, e as superfícies compostas ficam mais polarizadas, com maior separação das cargas elétricas positivas e negativas (Fig. 50 (d)). Este mecanismo altera a dinâmica local do fluido (SBF) e atrai os íons Ca^{2+} e $(PO_4)^{3-}$ contidos no SBF, que são adsorvidas e aderidos à cerâmica bioativa contida no composto para formar a nova camada de apatita (Fig. 50 (e)). Assim, os íons elétricos absorvidos positivos e negativos criam novas regiões polares que atraem íons do sinal elétrico oposto. Por exemplo, uma região de superfície formada pelo Ca^{2+} atrai $(PO_4)^{3-}$ que atrairá Ca^{2+} e assim por diante. Finalmente, regiões de domínios aleatoriamente orientados/polares alteram o potencial elétrico da superfície das amostras, criando diferentes regiões na superfície das amostras dielétrica (Fig. 50 (g) - positiva +, negativa - e neutra (0)) e cargas neutras, que atrairão diferentes íons.

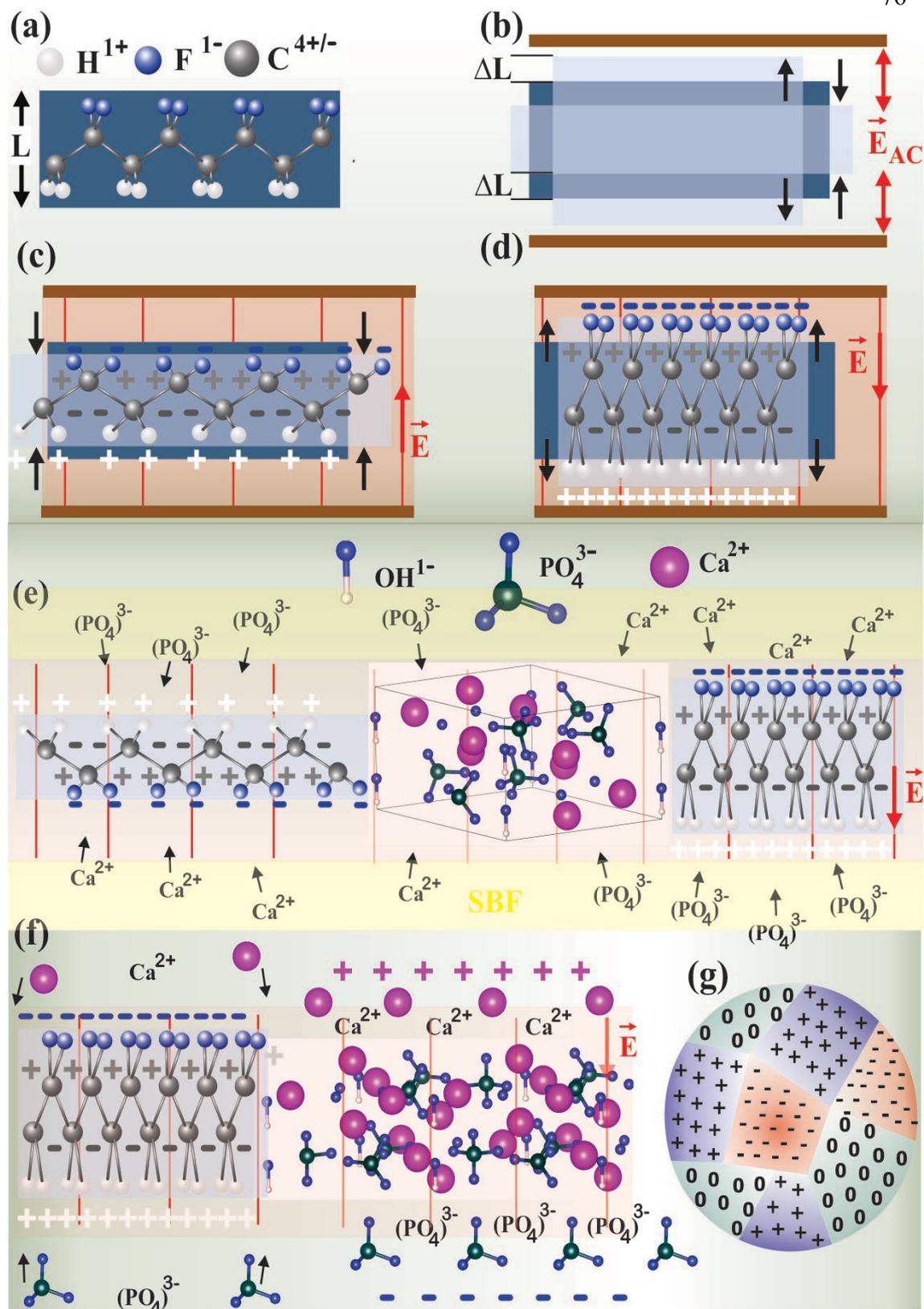


Figura 50 - Mecanismo ilustrativo onde destacam-se os efeitos da oscilação do campo elétrico na bioatividade HAB-PVDF. (a) Estrutura PVDF, vibração mecânica (b), (c) contração e (d) expansão, (e) atração de íons SBF. (f) Deposição iônica na configuração HAB e de superfície de carga. (g) Diferentes regiões de cargas elétricas que podem ocorrer na superfície do composto dependendo da orientação de sua polarização.

Todos os resultados mencionados acima indicam a ativação não só de mecanismos biológicos na bioatividade desses materiais, mas também dos físicos, que são ativados por um

campo elétrico. Nesse sentido, nos organismos vivos, essa polaridade (efeito piezoelétrico ativado no composto HAp-PVDF) não só alteraria a diferenciação celular e a secreção da matriz óssea, mas também poderia colaborar com a parte "acelular" do crescimento ósseo e atrair íons adequados pelas forças de coulomb.

8. DISCUSSÃO

Nas análises dos resultados obtidos pode se observar, como o campo elétrico afetou no processo de formação de apatita, em amostras submetidas a teste de bioatividade imersas em SBF. Observou-se como ocorreu o crescimento de apatita nas amostras sem campo elétrico e com campo elétrico, primeiramente os resultados de DRX mostraram diferenças nas intensidades dos picos, em que atribui-se esse fato a questão de que a camada de apatita estava crescendo na superfície das amostras.

Os resultados de FTIR-ATR, também apresentaram diferenças nas intensidades de absorvância entre as amostras com campo elétrico e sem campo elétrico. Todavia, pode-se observar as bandas características da HAp e do PVDF e inferir também que houve formação de uma camada de hidroxiapatita com melhores formação de cristalinidade, como observado no FTIR-ATR de HAp com 7 dias de imersão, de fato isso poderia ser comprovado com o DRX de HAp com 7 dias de imersão, mas para essa análise o difratograma teria que ser submetido a um refinamento estrutural. Nota-se também bandas onde o espectro analisados nas nas amostra, sem campo elétrico apareceram e que quase sumiram nas amostras com campo elétrico, isso é devido a formação da camada de apatita.

Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura, os resultados obtidos serviram para confirmação de formação de camada apatita na superfície das amostras, com 3 dias de experimento a amostra submetida a campo elétrico já apresentava camada superficial, enquanto

a sem campo não tinha camada, com 5 dias de experimento ambas as amostras com e sem campo elétrico apresentaram formação de camada superficial de apatita, assim como as amostras, com 7 dias de análise, chegando a uma conclusão inicial de que com 5 e 7 dias de experimento, já é o tempo natural para formação de apatita na superfície de amostras submetidas a teste de bioatividade com SBF.

9. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nas discussões, pode-se observar os efeitos do campo elétrico durante a imersão dos materiais em SBF. O campo elétrico é eficaz em curto tempo na indução e formação de apatita. Atribua-se isso a questão da dinâmica de crescimento de apatita nas amostras, pois o campo elétrico diferente de zero potencializa o movimento de íons no SBF o que acelera a formação das fases e a nucleação de apatita, diferente de um processo natural que ocorre espontaneamente.

Os resultados de DRX, apresentaram evidências que as amostras estariam passando por modificação superficiais. Nos difratogramas existem diferenças entre amostra que tiveram aplicação de campo elétrico com compósitos que foram submetidos ao protocolo com aplicação de campo elétrico. As intensidades de picos foram evidentes no qual conclui-se de que as amostras onde os picos diminuíram, havia nucleado apatita. Nos resultados de FTIR-ATR pode-se identificar as bandas características do material estudado e como elas estavam sendo afetadas com o experimento.

A microscopia eletrônica de varredura foi fundamental para analisar os processos que ocorreram nas amostras, pois assim pode-se observar como correu a formação de apatita, de acordo com o tempo de experimento, a partir disso foi analisado o quão eficiente o campo elétrico era em um curto intervalo de tempo, chegando a conclusão de que em um curto espaço

de tempo o campo acelera o processo de formação de apatita, caindo com o passar do tempo, ou seja com 5 e 7 dias os resultados foram bastantes semelhantes, pois em ambas as amostra de HAp-PVDF tanto com campo e sem campo foram constatados formação de camadas de apatita .

PERSPECTIVAS FUTURAS DE ESTUDO

Estudar os efeitos de campo elétrico nas amostras de Hap-PVDF com diferentes tipos de intensidade, afim de identificar com uma melhor margem de resultados o real potencial do campo elétrico nas amostras do compósito, como também fazer medidas que possam sinalizar a espessura da camada de apatita que cresce nos respectivos experimentos. Analisar as amostras por meio de EDS. Utilizar o método de refinamento. Buscar aperfeiçoar as amostras com maior qualidade possível.

REFERÊNCIAS

- 1- VON RECUM, A. F.; LAMBERGE, M. Educational goals for biomaterials Science and engeneering: pespective view. J. Appl. Biomater. v.6, p.137-144, 1995
- 2- GIL, M. H.; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. Química 100, p. 72-74, 2006.
- 3- WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials. Elsevier: New York, 1987.
- 4- WAN, D. C.; NACAMULI, R. P.; LONGAKER, M. T. Craniofacial boné tissue engineering. Dent. Clin. Am. v.50, n.2, p.175-190, 2006.
- 5- CHEM, K-Y *et al.* Reconstruction-of calvarial defect. Using a tricalciun phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatina composite. Biomaterials, v.30, n.9, p.1682-1688, 2009.
- 6- LOGAN, T. J. Ma Q. Y.; Traina, S. J. **lead immobilization from Aqueous solutions and contaminated soils using phosphate rocks.** Environ. Sci. Technol, v. 29, p. 1118-1126, 1995.
- 7- FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. **Formation of calcium deficient Hidroxyapatite at near-physiological temperature.** Journal of Materials Science: Materials in Mediane, v.3, p. 299-305, 1992.
- 8- SANTOS, L. A.; **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área Médico-Odontológica,** Tese de Doutorado em Engenharia Mecânica- Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2002.
- 9- WEINAND, W. R. **“Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis”.** Tese (doutorado), Universidade de Maringá, Maringá-PR, (2009).
- 10- SILVA, L. C.; *et al.* **Síntese da hidroxiapatita na presença de amido.** 32º reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) – Fortaleza - CE, 2009.
- 11- NALVA, H. S. Ferroelectric polymers, chemistry, physics and applications, p.63-67, New York, USA, Marcel Dekker inc. 1995.
- 12- WISNIEWSKI, C.; FERREIRA, G. F. L.; FARIA, R. M.; GIACOMETTI, J. A. **Stable and metastable ferroelectric polarization analysed by the ramp voltage techninque.** Proceedings

of 11th International symposium on electrets. Melbourne: psiscatway, p.215-218, 2002.

13- GREGORIO FILHO, R. *et al.* **Miscibility and morphology poly(vinylidene fluoride)/ poly(vinylidene fluoride) -ran- trifluoroethylene].** Blends Jpurnal of applied Polymer Science. V.85, p.1363-1369, 2002.

14-WISNIEWSKI, C. **Caracterização de Polímeros Ferroelétricos: Metodologia e Resultados.** Tese de doutorado, IFSC-USP: São Carlos, 145p, 1999

15- SILVA, A. B. “**Processamento, caracterização e determinação do perfil de polarização do Poli(fluoreto de vinilideno)**”, Dissertação de Mestrado, UFSCar São Paulo, SP, Brasil, 2009.

16- LAST, H. R. e GARRET, R. K. **Mechanical Behavior and Properties of Mechanically Alloyed Aluminum alloys.** Metallurgical_and_Materials_Transactions A, Vol. 27, No. 3, p. 734-745, 1996.

17- MARTÍNEZ, V. P.; BARRIENTOS, J.; VARAS, G. e GARÍN, J. **Evolution of crystallite size Cu-Cr powders turing mechanical alloying and heat treatment.** P M world congress, p.355-360, 1998.

18-LIN.; HONG, S, e LEE, P. **Formation of NiAl-Al₂O₃ International Matrix Composite Powder Mechanical Alloying Technique.** Intermetallics. Vol. 8, p.1043-1048. 2000.

19-HWANG, S, J. **The Effect of Microstructure and Dispersoids on the Mechanical Properties of NiAl Produced by Mechanical Alloying.** Journal of Metastable and Nanocrystalline Materials._Vol. 7, p. 1-6, 2000.

20-SURYANARAYANA, C. **Mechanical Alloying and Milling.** Progress in Materials Science,_Vol. 46, p. 1-184, 2001.

21-ASM International. **Metals Handbook – Powder Metal technologies and Applications.** Material Park, Ohio: ASM International, Vol. 7, 1990.

22 - SILVA, A. G. P. **Teoria de Sinterização por Fase Sólida; Uma Análise Crítica de sua Aplicação.** Cerâmica, V. 44, n. 289, São Paulo, set/out. 1998.

- 23- RICHERSON, D. W. **Modern Ceramic Engineering**. Properties, Processing, and Use in Design. Second Edition, Revised and Expanded. P. 1-851.
- 24 – JOHSON, J. L. **Sintering of Advanced Materials: Fundamental and Processes**. 2010.
- 25- LIPSON, H. **Elements of X-ray Diffraction**. Contemporary Physics, 20:1, 87-88, 2006.
- 26 – SNELLINGS, R.; MACHIELS, L.; MERTENS, G. e ELSEN, J. **Rietveld Refinement Strategy for Quantitative Phase Analysis of Partially Amorphous Zeolitized Tuffaceous Rocks**. Geologica Belgica. 13:3, 183-196, 2010.
- 27 – RADD, M.; PALMER, R. **Structure Determination by X-ray Crystallography**. Fifth Edition. Springer. 1-737. 2013.
- 28-CULLITY, B. D. **Elements of X-ray Diffraction**. Addison – Wesley Publishing Company, 1956.
- 29- STUART, B. **Infrared Spectroscopy**. Fundamentals and applications. John Wiley e Sons, 2004. p. 208.
- 30- ARGOV, S.; SAHU, R. K.; BERNSHTAIN, E.; SALAM, A.; SHOHAT, G.; ZELIG, U.; MORDECHAI, S. **Inflammatory Bowel Diseases as an Intermediate Stage Between Normal and Cancer; A FTIR – micro-spectroscopy approach**. Biopolymers. 2004, 75, 384-392.
- 31- ZHOU, W.; APKARIAN, R. P.; WANG, Z. L.; JOY, D. "**Fundamentals of Scanning Electron Microscopy**". In: Zhou W. W, Zhong Lin, editor. Scanning Microscopy for Nanotechnology - Techniques and Applications: Springer Verlag; 2006. p. 1- 40.
- 32- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura**. Aplicações e Preparação de Amostra. Porto Alegre. p. 1-60. 2007.
- 33-H. P. Xu e Z. M. Dang, "**Electrical property and microstructure analysis of poly(vinylidene fluoride)-based composites with different conducting fillers**", *Chem. Phys. Lett.*, vol. 438, no 4–6, p. 196–202, 2007.
- 34- BONADIO, T. G. M. **Biocompósitos de pentóxido de nióbio, hidroxiapatita e β-fosfato tricálcico: produção, caracterização e estudos *in vivo* como suportes ósseos denso e poroso**. Tese de Doutorado, Maringá, 2014.

- 35- SILVA, L. M. **Preparação e Caracterização Física do Compósito PVDF-Hap com potencial para implante Ósseo.** Dissertação de Mestrado. Maringá, 2015.
- 36-KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. **How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?** *Biomaterials* 27 (2006) 2907-2915.
- 37- SILVA, L. M. *et al* **On the synthesis and characterization of (bio)ferroelectrically active PVDF-BCP composites.** *Ferroelectrics* vol.523 p. 63-71, 2019.
- 38 – SILVA, L. M **Biocompósito piezoelétrico a base de PVDF e fosfato de cálcio sob estímulo de campo elétrico e campo magnético: uma proposta para acelerar a regeneração óssea.** Tese de Doutorado, Maringá, 2019.