



Cátia Piedade Revestimento em magnésio ultra puro e na liga AZ31 biodegradáveis: funcionalização com nanopartículas de hidroxiapatite e grafeno

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Biomédica - Desporto e Reabilitação**

Júri

Presidente (Doutor, Tito Gerardo Batoreo Amaral, ESTSetúbal/IPS)
Orientadora (Doutora, Catarina Ferreira dos Santos, ESTSetúbal/IPS)
Vogal (Doutora, Maria Helena de Figueiredo Ramos Caria, ESS/IPS)
Vogal (Doutora, Maria de Fátima Grilo Montemor, IST/ULisboa)

novembro 2014



Revestimento em magnésio ultra puro e na liga AZ31 biodegradáveis: funcionalização com nanopartículas de hidroxiapatite e grafeno

Dissertação de Mestrado de Engenharia Biomédica – Desporto e Reabilitação

Cátia Piedade nº120289001

Trabalho orientado por: Prof.^a Doutora Maria João Carmezim
Prof.^a Doutora Catarina Santos

Setúbal
2013/2014

Agradecimentos

Durante todo este percurso acadêmico muitas pessoas contribuíram, de modo direto ou indireto, para a concretização desta dissertação de mestrado, pelo que não posso deixar de agradecer a quem mais me apoiou durante toda esta etapa.

Em primeiro lugar, agradeço às minhas orientadoras Prof. Doutora Maria João Carmezim e Prof. Doutora Catarina Santos por todo o apoio, disponibilidade, dedicação, incentivo e conhecimento transmitido ao longo deste trabalho.

À minha família em especial aos meus pais, irmãos e avós por todo o esforço, carinho, dedicação e apoio incondicional demonstrado ao longo do meu percurso acadêmico.

Aos meus amigos por toda a amizade, apoio e momentos de alegria, com um agradecimento especial a todas as amigas que me acompanharam e proporcionaram diariamente um excelente ambiente de trabalho no laboratório de mecânica.

Aos responsáveis pelo laboratório de mecânica e de química por todo o auxílio prestado.

Resumo

O magnésio e as suas ligas são materiais metálicos interessantes para utilização em implantes médicos devido a possuírem características como baixa densidade, módulo de elasticidade próximo do osso e principalmente à sua capacidade de biodegradação.

O objetivo deste trabalho consistiu, assim, em desenvolver um novo revestimento osteoindutor e biocompatível para melhorar o comportamento deste material, permitindo a sua utilização em implantes médicos biodegradáveis.

De modo a promover a proliferação celular e controlar a taxa de corrosão do implante efetuou-se, pelos processos de eletrodeposição/eletroforese, a passivação da superfície criando um revestimento à base de fosfato de composição química semelhante à do osso. Além disso, funcionalizou-se a superfície com incorporação de hidroxiapatite e grafeno para diminuir a taxa de degradação do implante biodegradável.

Os revestimentos desenvolvidos foram caracterizados quanto à sua morfologia e composição química por SEM (Microscopia eletrónica de varrimento), EDS (Espectroscopia de Energia Dispersiva) e Espectroscopia de Raman e submetidos a testes de molhabilidade e degradação em condições fisiológicas.

Os revestimentos apresentam uma morfologia acicular, tridimensional e arbórea e são constituídos por fosfato, hidroxiapatite e óxido de grafeno. Verificou-se também que os revestimentos tornaram a superfície mais hidrofílica e que a taxa de degradação do Mg ultra puro e da liga AZ31 diminuiu.

A formação destas superfícies temporárias (revestimentos) em substratos de Mg revela-se muito útil clinicamente nomeadamente para aplicação em implantes pois não apresenta efeitos clínicos adversos e evita a realização de uma segunda cirurgia.

Palavras-chave: Magnésio ultra puro, Liga de magnésio AZ31, Degradação, Revestimento, Fosfato, Óxido de grafeno, Nanopartículas de hidroxiapatite

Abstract

The magnesium and its alloys are interest materials for use in medical prosthesis due their characteristics such as low density, modulus of elasticity close to the bone and especially its biodegradability.

The aim of this work consisted to develop an osteoinductive and biocompatible coating to improve the behavior of this material, allowing its use in biodegradable implants.

In order to promote cell proliferation and to control the rate of corrosion implants, was made, by electrodeposition/electrophoresis processes, the surface passivation by creating a phosphate-based coating similar to bone composition. Furthermore, the surface was functionalized with graphene and hydroxyapatite for to decrease the rate of degradation of biodegradable implants.

The developed coatings were characterized for their morphology and chemical composition by SEM (scanning electron microscopy), EDS (Energy Dispersive Spectroscopy), Raman spectroscopy and subjected to wetting and degradation tests under physiological conditions.

The coatings have an acicular, arboreal and tree-dimensional morphology, and which are consist of phosphate, hydroxyapatite and graphene oxide. It was also found that after the coatings, the surface becomes more hydrophilic and degradation rate of the high-purity Mg and AZ31 alloy decreases.

The formation of these temporary surfaces (coatings) on substrates of Mg proves clinically useful particularly for use in implants because there are no adverse clinical effects and avoids performing a second surgery.

Keywords: high-purity magnesium, AZ31 magnesium alloy, Degradation, Coating, Phosphate, graphene oxide, hydroxyapatite nanoparticles

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	x
Lista de Siglas e Acrónimos	xi
Lista de Símbolos	xii
Capítulo 1	13
1. Introdução	13
1.1. Magnésio e suas ligas usadas em aplicações biomédicas	14
1.2. Revestimentos para ligas de magnésio.....	19
1.3. Revestimentos inorgânicos à base de fosfatos	22
1.4. Nova geração de revestimentos multifuncionais para aplicações biomédicas.	24
1.4.1. Funcionalizados com nanopartículas de Hidroxiapatite.....	24
1.4.2. Funcionalização com GO	27
1.5. Comportamento dos revestimentos à base de fosfatos sobre Magnésio em condições fisiológicas	31
1.6. Objetivos e principais metas a alcançar na tese	33
Capítulo 2	34
2. Materiais e métodos	34
2.1. Materiais.....	34
2.2. Preparação das nanopartículas de HAp.....	35
2.3. Eletrólitos	35
2.4. Métodos de preparação dos revestimentos.....	36
2.4.1. Eletrodeposição	36
2.4.2. Eletroforese.....	39
2.5. Técnicas de caracterização do revestimento	42
2.5.1. Microscopia eletrónica de varrimento/Técnica de energia dispersiva (SEM/EDS)	43

2.5.2.	Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM).....	45
2.5.3.	Microscopia confocal de Raman	48
2.5.4.	Molhabilidade/Teoria do ângulo de contacto	50
2.5.5.	Degradação em condições fisiológicas.....	52
Capítulo 3.....	53	
3. Resultados e Discussão	53	
3.1.	Efeito do potencial na morfologia dos revestimentos	53
3.2.	Efeito da concentração do eletrólito na morfologia dos revestimentos	56
3.3.	Funcionalização dos revestimentos com HAp e GO.....	61
3.3.1.	Liga AZ31	64
3.3.2.	MgUP	67
3.3.3.	Molhabilidade.....	71
3.3.4.	Degradação em condições fisiológicas.....	73
Conclusão.....	78	
Trabalhos Futuros	80	
Bibliografia	81	

Lista de Figuras

Figura 1.1- Interface dinâmica entre o magnésio e o ambiente fisiológico durante a degradação (adaptado de [4]).....	18
Figura 1.2 - Tecnologias para a deposição de revestimentos inorgânicos (adaptado de [1])	21
Figura 1.3 - Nanopartículas de HAp.....	25
Figura 1.4 – Esquema que ilustra o comportamento <i>in vivo</i> entre um implante biodegradável de Mg e suas ligas. (A) Implante biodegradável sem revestimento e (B) implante biodegradável com revestimento de HAp (adaptado de [21])	26
Figura 1.5 – Esquema estrutural do Grafeno e do Óxido de Grafeno (adaptado de [32])	28
Figura 1.6 – Funcionalização do óxido de grafeno (adaptado de [35]).....	29
Figura 1.7 – Viabilidade celular em meios contendo óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido por polimerização de dopamina e óxido de grafeno reduzido com HAp (adaptado de [35]).....	30
Figura 2.1 - Exemplo de amostras montadas em resina: (A) liga AZ31, (B1) amostra do MgUP com corte transversal e (B2) MgUP em varão	34
Figura 2.2 - Célula eletrolítica (adaptado de [39])	38
Figura 2.3 - Ilustração esquemática do processo de deposição por Eletroforese: (a) EDP catódica e (b) EDP anódica (adaptado de [13])	39
Figura 2.4 - Esquema da deposição por eletroforese [42]	40
Figura 2.5 - Potencióstato e célula eletroquímica com a montagem a três elétrodos: (1) Elétrodo de trabalho; (2) Contra-elétrodo; (3) Elétrodo de referência.	42
Figura 2.6 - Tipos de radiação emitida pela matéria quando submetida a um feixe de elétrons REF.....	44
Figura 2.7 - Microscópio eletrônico de varrimento do ICEMS/IST	45
Figura 2.8 - Gama de sinais emitidos durante a interação de um feixe altamente energético de elétrons com um material (adaptado de [46]).....	46
Figura 2.9 - Microscópio de transmissão eletrônico utilizado no ICEMS/IST	47
Figura 2.10 - Dispersão de Stokes, anti-Stokes e Rayleigh (Adaptado de [48])	48
Figura 2.11 - Esquema da montagem da Espectroscopia de Raman (Adaptado de [48])	49
Figura 2.12 - Representação do teste de Molhabilidade (a) antes e (b) depois da adesão (adaptado de [51]).....	50
Figura 2.13 - Representação do ângulo de contato (a) maior do que 90°, (b) menor do que 90° e (c) molhabilidade total (adaptado de [51]).....	51

Figura 3.1 - Curvas potencioestáticas obtidas para a liga de magnésio AZ31 a diferentes potenciais.	54
Figura 3.2 - Curvas potencioestáticas obtidas para o MgUP a diferentes potenciais.....	54
Figura 3.3 - Imagens SEM da morfologia da liga de magnésio AZ31 aplicando: (A,A1) potencial de 1V e (B,B1) potencial de 1,8V	55
Figura 3.4 - Imagens SEM da morfologia do MgUP aplicando: (A,A1) potencial de 1V e (B,B1) potencial de 1,8 V	56
Figura 3.5 - Comportamento eletroquímico da liga AZ31 e do MgUP variando a concentração de fosfato no eletrólito	57
Figura 3.6 - Formação do revestimento de fosfato na liga AZ31 para diferentes concentrações de fosfato	58
Figura 3.7 - Formação do revestimento de fosfato no magnésio Ultra puro para diferentes concentrações de fosfato	58
Figura 3.8 - Imagens SEM da morfologia do revestimento na liga AZ31 utilizando um eletrólito com concentração de: (A,A1) 0,06M e (B,B1) 1M.....	59
Figura 3.9 - Imagens SEM da morfologia do revestimento no MgUP utilizando um eletrólito com concentração de: (A,A1) 0,06M e (B,B1) 1M.....	60
Figura 3.10 - Imagens SEM da morfologia do revestimento de fosfatos na liga AZ31 (A,A1) e no MgUP (B,B1).....	62
Figura 3.11 - Imagem de TEM de uma das estruturas constituintes do revestimento... ..	62
Figura 3.12 - Formação dos diferentes revestimentos na liga AZ31	63
Figura 3.13 - Formação dos diferentes revestimentos no MgUP	64
Figura 3.14 - Imagens de SEM do revestimento com fosfato e HAp (A,A1) e com fosfato, HAp e grafeno (B, B1) na liga AZ31. Ampliação de uma folha de Go presente no revestimento com fosfato, HAp e GO (C)	65
Figura 3.15 - Imagem SEM do revestimento de fosfatos com HAp na liga AZ31 (A) e mapa EDX do fosfato, magnésio e oxigénio, respetivamente (B, C e D)	66
Figura 3.16 - Análise EDS do revestimento de fosfatos com HAp na liga AZ31	66
Figura 3.17 - Imagem SEM do revestimento de fosfato com HAp e grafeno na liga AZ31 (A) e mapa EDX do carbono, fosfato, magnésio e oxigénio, respectivamente (B,C,D e E)	66
Figura 3.18 - Análise EDS do revestimento de fosfatos com HAp e grafeno na liga AZ31	66
Figura 3.19 - Imagens de SEM do revestimento com fosfato e HAp (A,A1) e com fosfato, HAp e grafeno (B, B1) no MgUP. Ampliação de uma folha de GO presente no revestimento com fosfato, HAp e GO (C)	68
Figura 3.20 - Imagens TEM de uma das estruturas ramificadas constituinte do revestimento com nanopartículas de hidroxiapatite (A,A1,A2, A3)	67
Figura 3.21 - Análise EDS do revestimento com fosfato e HAp.....	68
Figura 3.22 - Imagem SEM do revestimento de fosfatos com HAp e grafeno no MgUP (A) e mapa EDX do carbono, fosfato, magnésio e oxigénio, respetivamente (B, C,D e E)	69
Figura 3.23 - Análise EDS do revestimento de fosfatos com HAp e grafeno no MgUP	70

Figura 3.24 - Espectro de Raman da liga AZ31 e do MgUP revestidos com fosfatos, HAp e grafeno.....	71
Figura 3.25 - Variação dos ângulos de contacto da água coma liga AZ31 sem revestimento e com os revestimentos de fosfato, fosfato com HAp e fosfato com HAp e grafeno	72
Figura 3.26 - Variação dos ângulos de contacto da água como MgUP sem revestimento e com os revestimentos de fosfato, fosfato com HAp e fosfato com HAp e grafeno.....	73
Figura 3.27 - Curvas OCP dos diferentes revestimentos na liga AZ31 em que: a) sem revestimento, b) fosfato com HAp, c) fosfato e d) fosfato com HAp e GO	74
Figura 3.28 - Curvas de polarização dos diferentes revestimentos na liga AZ31 em que: a) sem revestimento, b) fosfato com HAp, c) fosfato e d) fosfato com HAp e GO	75
Figura 3.29 - Curvas de OCP dos diferentes revestimentos no MgUP em que: a) sem revestimento, b) fosfato, c) fosfato com HAp e GO e d) Fosfato com HAp	76
Figura 3.30 - Curvas de polarização dos diferentes revestimentos no MgUP em que: a) sem revestimento, b) fosfato, c) fosfato com HAp e d) fosfato com HAp e GO.....	76

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - História do magnésio em aplicações biomédicas (adaptado de [1]).....	15
Tabela 1.2 - Propriedades mecânicas do tecido ósseo, ligas de magnésio mais utilizadas em aplicações biomédicas e hidroxiapatite sintética (adaptado de [8]).....	17
Tabela 1.3 - Fosfatos de cálcio utilizados em aplicações biomédicas (adaptado de: [11])	23
Tabela 1.4 - Revestimento de fosfatos de cálcio por diferentes métodos em diferentes substratos (adaptado de [3]).....	24
Tabela 1.5 - Condições utilizadas no processo de formação por eletroforese de revestimentos de hidroxiapatite	27
Tabela 1.6 - Condições utilizadas no processo de eletroforese para revestimentos de GO	31
Tabela 1.7 – Degradação de diferentes substratos de Mg sem revestimento e com revestimento à base de fosfatos (adaptado de: [3, 20, 24, 36, 37]).....	32
Tabela 2.1 - Composição química da liga AZ31 e do MgUP [39]	34
Tabela 2.2 - Propriedades do GO [41]	36
Tabela 2.3 - Análise elementar do GO [41].....	36
Tabela 2.4 - Composição da solução SBF em termos dos reagentes utilizados [53].....	52
Tabela 3.1 - Análise EDS das amostras da liga AZ31 e do MgUP para diferentes concentrações de fosfatos	61

Lista de Siglas e Acrónimos

ED – Eletrodeposição

EDP – Eletroforese

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva

GO – Óxido de grafeno

HAp – Hidroxiapatite

MgUP – Magnésio ultra puro

OCP – Potencial de circuito aberto

SBF – Fluido corporal simulado

SCE – Eléctrodo saturado de calomelanos

SEM – Microscopia eletrónica de varrimento

TEM – Microscopia eletrónica de transmissão

TCP – Fosfatos tricálcicos

Lista de Símbolos

Θ – Ângulo de contacto

ϵ_r – Constante dielétrica

μ – Mobilidade eletroforética

ϵ_0 – Permissividade do vácuo

ζ – Potencial Zeta

γ – Tensão superficial

η – Viscosidade do meio

f – Factor induzido

$\frac{dw}{dt}$ – Cinética da EDP

A – Área do eléctrodo

Q – Carga

c – Concentração da suspensão

E – Campo elétrico aplicado

I – Corrente elétrica

m – Número de moles

n_e – Número de cargas

E_{corr} – Potencial de corrosão

Capítulo 1

1.Introdução

O magnésio é um material que tem vindo desde há muito tempo a ser investigado em aplicações biomédicas. As suas propriedades como baixa densidade, módulo de elasticidade próximo do osso, biocompatibilidade e capacidade de biodegradação tornam-no um material altamente promissor para utilizar em implantes biodegradáveis [1].

No entanto, devido à sua elevada reatividade e alta taxa de corrosão só recentemente se tem dado estão a dar os primeiros passos para a sua utilização em biomédica. O interesse em utilizar o Mg e suas ligas em implantes médicos surge essencialmente devido às limitações que determinados metais apresentam e à necessidade de criar biomateriais inovadores que possam ser utilizados como implantes biodegradáveis e com capacidade de promover o crescimento ósseo.

Para que o Mg e suas ligas possam ser implantados no organismo tem de ser resolvido um dos seus principais problemas, o controlo da taxa de degradação. Revestir o magnésio torna-o mais atrativo do ponto de vista de aplicação e permite uma degradação mais lenta com possibilidade de formar superfícies biocompatíveis e funcionais.

Controlada a taxa de degradação, este pode ser implantado no organismo e deixa de existir a necessidade de realizar uma segunda cirurgia, diminuindo os riscos de para o paciente e os custos.

Ao longo deste trabalho vai ser desenvolvido um revestimento osteoindutor e biocompatível com capacidade de reduzir a taxa de degradação do Mg e suas ligas permitindo a sua futura utilização em implantes biodegradáveis.

1.1. Magnésio e suas ligas usadas em aplicações biomédicas

O magnésio (Mg) e suas ligas têm vindo a ser investigados desde o século XIX (1808) como potenciais materiais para uso em aplicações biomédicas. No entanto, devido ao magnésio ser um metal bastante reativo e à sua taxa de corrosão em soluções fisiológicas ser elevada só atualmente se estão a dar os primeiros passos para a sua utilização em implantes biomédicos [1].

As tentativas para usar implantes de magnésio biodegradáveis começaram logo após a sua descoberta por Sir Humphrey Davy, em 1808 [1]. Desde essa altura diversos estudos foram realizados utilizando como substratos o magnésio puro e mais recentemente algumas das suas ligas. A tabela 1.1 apresenta uma visão geral sobre os resultados obtidos para a utilização do magnésio e algumas ligas em aplicações biomédicas até aos anos 80 [1].

A partir destes estudos foram obtidas conclusões importantes tais como: (1) a corrosão *in vivo* do Mg ocorre de forma mais lenta do que a corrosão *in vitro*, os principais responsáveis pela corrosão *in vivo* do Mg são o oxigénio, o teor de água dos tecidos, o dióxido de carbono, os sais dissolvidos no sangue e os processos químicos nas células, (2) a reabsorção total do Mg quando implantado ocorria entre os 7 e 10 meses, (3) o magnésio só poderia ser implantado sem a combinação com outros metais, de modo a evitar a corrosão.

No entanto, até 1980 existiram poucos desenvolvimentos pois os estudos com magnésio eram geralmente caros e as amostras difíceis de produzir, as vias de processamento e as propriedades mecânicas resultantes eram limitadas, e existiam muitos problemas associados com a baixa resistência à corrosão que até hoje não se conseguiram resolver.

Atualmente, volta novamente a estar em destaque estando a serem desenvolvidas novas ligas e revestimentos para que este possa ser usado em implantes de magnésio biodegradáveis [1].

Tabela 1. 1- História do magnésio em aplicações biomédicas (adaptado de [1])

Autor	Ano	Magnésio (Liga)	Aplicação	Modelo humano/animal
Huse	1878	Magnésio puro	Fios de Mg como ligadura	Seres humanos
Payr	1892-1905	Magnésio de alta pureza	Tubos (intestino, vasos), placas, fios e chapas	Seres humanos, porcos, coelhos e cães
Lambotte	1906-1932	Magnésio puro (99.7%)	Barras, placas e parafusos	Seres humanos, cães, e coelhos
Verbrugge	1933-1937	Mg-AL6-Zn3-Mn0.2 Mg-Al8%	Chapa, banda, parafusos e pinos	Seres humanos, cães, ratos e coelhos
McBride	1938	Mg-Mn3% Mg-AL4-Mn0.3	Folhas, placas, bandas, parafusos, pinos e fios	Seres humanos e cães
Maier	1940	Magnésio	Bandas, fios de Mg para suturas de tecidos e pinos fusiformes	Seres humanos e coelhos
Stone	1951	Mg-Al2%-wt. Mg puro	Fios para aneurismas de coagulação	cães
Wexler	1980	Mg-Al2%-wt.	Fios intravasculares	Ratos
Hussl	1981	Mg puro (99.8%)	Fios para tratamento de hemangioma	Ratos e Coelhos
Wilflingseder	1981	Mg puro (99.8%)	Fios para tratamento de hemangioma	Seres humanos

O crescente interesse em utilizar o magnésio e as suas ligas em implantes biomédicos biodegradáveis deve-se em parte às desvantagens apresentadas pelos metais atualmente mais utilizados. Metais como o titânio, a liga à base de Ti-Al-V, aço inoxidável, ligas cobalto-crômio e níquel apesar de revelarem vantagens como elevada resistência mecânica e biocompatibilidade, apresentam também bastantes desvantagens como, liberação de produtos de corrosão tóxicos e de partículas. Adicionalmente os módulos de elasticidade bastante elevados levando a efeitos de *stress shielding* que causam reações inflamatórias e que podem levar à necessidade de remoção precoce do implante [2].

Considerando as desvantagens apresentadas por esses materiais, o magnésio e as suas ligas surgem então como uma alternativa promissora devido às suas características específicas como, baixa densidade, elevada relação resistência/peso, módulo de elasticidade próximo do módulo de elasticidade do osso, capacidade para se degradar, baixa resistência à corrosão e biocompatibilidade [3]. Além disso, estudos efetuados indicam que a corrosão destas ligas leva à formação de um produto de corrosão que é um óxido solúvel, não tóxico e que é eliminado nos humanos pela urina [3].

O módulo de elasticidade do Mg e suas ligas é de cerca de 41-45 GPa tratando-se, também, de uma vantagem quando comparado com outros metais pois é o que tem módulo de elasticidade mais próximo do osso (3-20 GPa). Este facto permite que ocorra uma maior transferência da carga aplicada para o Mg e faz diminuir o *stress shielding* em aplicações ortopédicas [4].

Por outro lado, existe atualmente a necessidade de criar uma nova geração de biomateriais para serem utilizados como implantes metálicos biodegradáveis e, com a capacidade de estimular as respostas de tratamento dos tecidos lesionados, a nível molecular [3]. Dado que em muitos casos, o corpo necessita apenas da presença temporária de um implante ou de um dispositivo, os materiais biodegradáveis são uma opção mais viável do que os inertes e estáveis. O material biodegradável ideal deve proporcionar uma fixação mecânica adequada, a degradação completa quando já não é necessário e a substituição total por um novo tecido ósseo [3]. Logo, o facto do Mg e suas ligas possuírem capacidade de se degradarem torna-os materiais promissores para utilizar em implantes biodegradáveis.

Em relação às ligas de magnésio utilizadas em aplicações biomédicas os estudos que têm sido apresentados têm como foco a avaliação da corrosão e a sua biocompatibilidade, e explorado ligas que contenham elementos com pouca ou nenhuma toxicidade. Assim, os elementos de liga mais usuais são o Ca, Zn e Mn. O cálcio é um elemento muito usado no processamento de ligas de magnésio biodegradáveis devido a possuir as propriedades químicas e físicas indicadas, e por ser um elemento muito presente no corpo humano. O cálcio (Ca) favorece a formação de ligas binárias à base de magnésio com densidade semelhante ao osso. Sabe-se também que o magnésio é necessário para a incorporação de cálcio no osso, entendendo-se portanto que a libertação de iões Ca^{2+} e Mg^{2+} pode ser benéfica para a formação do tecido ósseo [5]. A utilização de zinco (Zn) como elemento de liga justifica-se por este

levar à modificação da corrosão das ligas de Mg, diminuindo a sua taxa de corrosão e evitando a formação de bolhas de gás pela libertação de H₂ [6]. Por sua vez, o Mn é também um dos elementos de liga utilizados por ser essencial para o ser humano em pequenas quantidades e pelo facto de que quando adicionado a estas ligas melhora a sua resistência à corrosão [6, 7].

Na tabela 1.2, pode-se comparar as propriedades mecânicas dos tecidos ósseos com as ligas de magnésio e titânio mais utilizadas em aplicações biomédicas, bem como com Mg puro e com a hidroxiapatite sintética [8]. Comparando o Mg puro com as restantes ligas identificadas verifica-se que todas as ligas possuem maior resistência a tração, maior módulo de elasticidade e maior tensão de cedência [8].

Tabela 1. 2 - Propriedades mecânicas do tecido ósseo, ligas de magnésio mais utilizadas em aplicações biomédicas e hidroxiapatite sintética (adaptado de [8])

Tecido/Material	Densidade (g.cm ⁻³)	Resistência á compressão (MPa)	Resistência á tração (MPa)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Tensão de Cedência (MPa)
Osso cortical	1,8-2,0	164-240	35-283	5-23	104,9-114,3
Osso esponjoso	1,0-1,4	-	1,5-3,8	10-1570 (MPa)	-
Ti6A14V	4,43	-	830-1025	114	760-880
HAp sintética	3,05-3,15	100-900	40-200	70-120	-
Mg	1,74	-	86,8±2,5	41	20,9±2,3
AZ991D	1,81	160	230	45	150
AZ31	1,78	60-70	235	45	125-135
WE43	1,84	-	280	44	195
AM60B	1,78	130	220	45	-
Mg-Zn-Mn	-	-	280,3±0,9	-	246,5±4,5
Mg-1CA	-	-	239,6±7,2	-	135,6±5,4

Além das ligas de magnésio referidas, atualmente, está também a ser investigada a utilização de magnésio ultra puro em implantes biodegradáveis. No magnésio ultra puro (MgUP) os elementos de impurezas (Fe, Ni, Cu e Co) existentes são todos abaixo do seu limite de tolerância. Quando estes elementos se encontram acima do limite de tolerância a taxa de corrosão é elevada. Segundo Abidin *et al*, as ligas de magnésio têm tendência a corroer mais depressa do que o MgUP [8, 9]. No entanto, não existe consenso acerca deste resultado existindo outros autores que afirmam o contrário, ou seja, que as ligas de magnésio apresentam menor taxa de corrosão que o MgUP [8]. Foi

também efetuado um estudo recente do comportamento à corrosão do MgUP *in vivo* e *in vitro* que demonstra que ao fim de 60 dias a corrosão *in vivo* é menor que a *in vitro* [9]. Em relação à biocompatibilidade, este material não provocou reações inflamatórias que excedam o considerado moderado o que significa o MgUP é tolerado pelo organismo e tem grande potencial para ser aplicado em implantes biodegradáveis [9].

Apesar das excelentes propriedades do Mg e suas ligas estes apresentam uma limitação que é o controlo da sua taxa de corrosão pois esta ocorre de forma muito rápida fazendo com que o Mg se degrade muito depressa e não permitindo a formação de novo tecido ósseo.

A rápida corrosão do Mg deve-se a soluções de cloretos, existentes no fluido corporal humano ou o sangue [7]. Este processo de corrosão vai provocar alterações na interface Mg/Ambiente fisiológico como se pode ver na representação da figura 1.1. Como se pode observar a corrosão do magnésio conduz à evolução de hidrogénio e à alcalinização do meio [4, 7]. As bolhas de hidrogénio formadas podem acumular-se e formar bolsas de gás junto ao implante provocando o atraso da recuperação da região onde foi feita a cirurgia e conduzindo à necrose dos tecidos [7]. Este esquema demonstra, também, como a morfologia, microestrutura e composição da superfície podem desempenhar papéis fundamentais na eficácia dos implantes provocando alterações na absorção de proteínas que intervêm na adesão de células desejáveis e indesejáveis [4]. Considera-se assim que o processo de corrosão do Mg é dinâmico e muito complexo apresentando diferenças em relação aos biomateriais tradicionais como as ligas de titânio e o aço inoxidável [4].

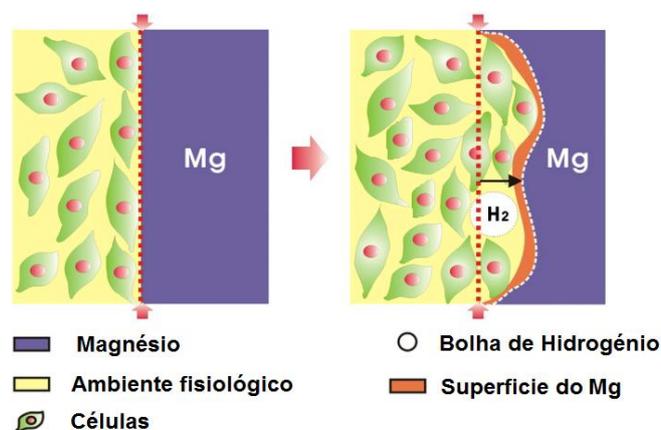


Figura 1. 1- Interface dinâmica entre o magnésio e o ambiente fisiológico durante a degradação (adaptado de [4])

Perante estes problemas a estratégia passa por tornar a velocidade de corrosão, ou seja, a biodegradação do Mg mais lenta fazendo com que iões Mg^{2+} , OH^- e bolhas de H^+ sejam gerados mais lentamente e assim que o organismo se ajuste gradualmente e possa eliminar os produtos da biodegradação [4]. Controlada a biodegradação do magnésio, este pode ser implantado no organismo e deixa de existir a necessidade de realizar uma segunda cirurgia para o remover, visto possuir a capacidade de se degradar e assim diminui os riscos de saúde do paciente e os custos [3].

Em geral, existem duas maneiras possíveis para controlar a corrosão/degradação das ligas de Mg:

1. Adaptar a composição e microestrutura, incluindo o tamanho do grão e a textura do material de base; não apenas tendo a liga em consideração, mas também através do desenvolvimento de métodos de fabrico otimizados [3];
2. Realizar tratamentos de superfície ou aplicar revestimentos, que produzem camadas de proteção que podem ser de natureza cerâmica, polimérica ou compósita [3].

Foram estudadas várias técnicas promissoras de produção nos últimos anos, sendo no entanto ainda necessária a realização de uma grande investigação sistemática [3]. Como as ligas de magnésio são um desafio devido à sua baixa solubilidade o estudo de revestimentos torna-se importante, e uma maneira muito atrativa para diminuir a velocidade de corrosão e formar superfícies biocompatíveis e funcionais. A maioria dos revestimentos em ligas de Mg, descritos na literatura, ainda não foram sujeitos a transferência tecnológica para aplicações médicas e não estão disponíveis no sector dos dispositivos biomédicos.

Até hoje, o magnésio e as suas ligas têm sido muito estudados no desenvolvimento de stents cardiovasculares, de materiais de fixação de tecido ósseo e de matrizes porosas para a reparação do osso [7].

1.2. Revestimentos para ligas de magnésio

Os revestimentos, para aplicações biomédicas, devem possuir características específicas tais como, permitir a biodegradação a uma taxa desejada, aumentar a biocompatibilidade, osseointegração e possuir bioatividade. Podem também ser funcionalizados para ter a capacidade de libertar de fármacos [3].

No desenvolvimento de novos biomateriais à base de Mg, o objetivo do revestimento é criar uma superfície temporária (revestimento) que se degrada naturalmente sem produzir efeitos tóxicos [4]. No entanto, as propriedades dos revestimentos muitas vezes não são suficientes no *design* de superfícies e o substrato deve passar também a ser considerado em conjunto com o revestimento como uma única entidade [4].

Os materiais à base de magnésio revestidos podem ser inseridos em diferentes partes do organismo, logo características como a resistência mecânica e a biocompatibilidade dos revestimentos devem ser adaptadas, consoante o meio em que estão inseridos. Como exemplo temos o caso dos stents cardiovasculares em que deve ser assegurada a anticoagulação e a integridade mecânica [4]. Bem como nos revestimentos para implantes ósseos, que devem ser osteogénicos.

Os revestimentos podem, normalmente, dividir-se em duas classes: (1) revestimentos de conversão e (2) revestimentos depositados [3].

Os revestimentos de conversão são formados por reações específicas entre o material base e o meio. Usualmente, as superfícies dos substratos metálicos são convertidas numa camada de óxido durante um processo químico ou eletroquímico. Em relação à superfície do metal original, a camada de óxido vai crescer simultaneamente para o exterior e interior desta alterando a geometria do componente. As camadas produzidas são inorgânicas e comportam-se como materiais cerâmicos [3]. Um exemplo deste tipo de revestimento é o tratamento da superfície com ácido fluorídrico. Por este método a taxa de corrosão diminui devido à formação de uma camada protetora de fluoreto de magnésio (MgF_2) na superfície do substrato [10].

Quanto à natureza dos revestimentos depositados, estes podem ser divididos em orgânicos, inorgânicos ou metálicos [3]. Este trabalho irá centrar-se nos revestimentos inorgânicos, existindo várias tecnologias ou processos que permitem a deposição deste tipo de revestimento, como se pode visualizar na figura 1.2.

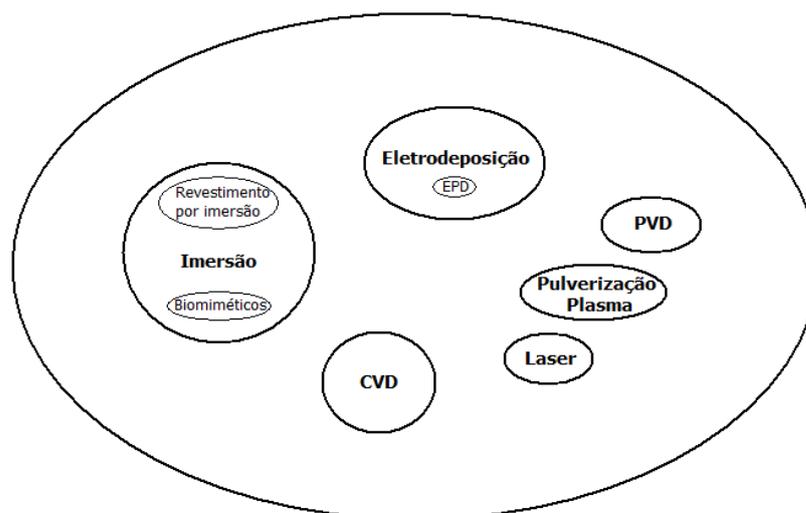


Figura 1. 2 - Tecnologias para a deposição de revestimentos inorgânicos (adaptado de [1])

A deposição de revestimentos inorgânicos em fase gasosa ou outros métodos físicos como pulverização de plasma e a aplicação do laser não são apropriados para componentes geometricamente complexos como implantes ou *scaffolds* porosos. Estes métodos envolvem grande consumo de energia, custos elevados e, também, instalações complexas [3].

Portanto, os principais processos a ter em conta para utilização em implantes médicos são os biomiméticos, o revestimento por imersão, a eletrodeposição e a eletroforese havendo no entanto outros [3]. Neste trabalho iremos focar-nos apenas na eletrodeposição e eletroforese.

A eletrodeposição (ED) consiste num processo de deposição de um filme sob um substrato, utilizando corrente elétrica e tendo como base a eletrólise. Neste processo algumas reações químicas ocorrem de forma espontânea podendo ser utilizadas para produzir energia elétrica, enquanto outras necessitam de energia externa para ocorrerem [11]. O resultado final deste processo vai ser a eletrodeposição dum filme metálico no cátodo a partir dos iões do sal em solução e dos catiões do metal dissolvido do ânodo.

Por sua vez, a técnica de deposição por eletroforese (EDP) permite a formação de filmes com diferentes espessuras sobre substratos condutores. A EDP envolve essencialmente a migração de partículas carregadas em direção a um substrato condutor de carga oposta, no qual ocorre a deposição [12, 13].

1.3. Revestimentos inorgânicos à base de fosfatos

Os revestimentos têm vindo a ser amplamente investigados de modo a aumentarem a taxa de degradação, a biocompatibilidade, promoverem a proliferação celular e diminuïrem a produção de partículas de desgaste.

A formação de revestimentos à base de fosfatos consiste então num dos possíveis revestimentos que pode ser utilizado para controlar a degradação de várias ligas metálicas nomeadamente o magnésio e suas ligas. Este tipo de revestimento funciona como camada base/barreira que facilita a adesão de proteínas e células. Para além disso pode ser funcionalizado com nanopartículas ou partículas sub-micrométricas que lhe darão diferentes características e aplicações. No entanto, revela-se de extrema importância a escolha da solução de fosfatos utilizada para formar o revestimento dado que as soluções de fosfatos mais usadas contêm substâncias perigosas. A formação de revestimentos de fosfatos com soluções não tóxicas já foi reportada por Ishizaki *et al.* [14]. Nesse estudo os autores obtiveram um filme anticorrosivo na superfície da liga de magnésio AZ31 utilizando uma suspensão de H_3PO_4 e partículas de α -TCP. Song *et al.* [15] que também obteve um filme de fosfato em ligas de magnésio usando uma suspensão de nitrato de cálcio ($Ca(NO_3)_2$) e hidrogeno fosfato de amónio ($NH_4H_2PO_4$) [16, 17].

Este tipo de revestimento é amplamente utilizado em aplicações na industria automóvel e aeronautica, no entanto, a escolha de uma solução de fosfatos não tóxica permite também a sua utilização em aplicações biomédicas.

Outro tipo de revestimento muito estudado atualmente em implantes ósseos é o revestimento à base de fosfatos de cálcio (Ca-P). O seu desenvolvimento deve-se à sua excelente biocompatibilidade, não toxicidade, taxa de degradação variável, bioatividade e osteocondução [18]. Os revestimentos de Ca-P são atualmente um dos compostos mais estudados e utilizados como biomateriais na regeneração de tecido ósseo. Os revestimentos à base de cálcio e fósforo são considerados biologicamente relevantes, porque existem no nosso organismo incluindo nos dentes e nos ossos. Como se sabe, o osso é composto por uma componente inorgânica, apatites biológicas (Ca-P) e uma componente orgânica constituída principalmente por colagénio e água [11]. Devido a sua semelhança com a apatite existente no tecido ósseo e por terem a capacidade de

diminuir a degradação das ligas de base e por aumentar a biocompatibilidade em aplicações ortopédicas [11]. A HAp foi durante muito tempo o único fosfato de cálcio a ser utilizado como biomaterial na regeneração de tecidos ósseos porém atualmente existe interesse em aplicar outros fosfatos de cálcio como o fosfato octacálcico (OCP) e os fosfatos tricálcicos (TCP) [19]. Na tabela 1.3 estão presentes os fosfatos de cálcio usados para revestimentos biomédicos [11].

Tabela 1. 3 - Fosfatos de cálcio utilizados em aplicações biomédicas (adaptado de: [11])

Nome	Fórmula	Relação Ca/P
Fosfato de Cálcio dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
Fosfato de Cálcio anidro	CaHPO_4	1.0
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Fluorapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1.67
Hidroxiapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67

Resultados de estudos já realizados comprovam que o revestimento de implantes com fosfatos de cálcio provoca o aumento da biocompatibilidade bem como o crescimento celular na zona de implantação [11, 19]. Especialmente, revestimentos de Ca-P depositados por métodos biomiméticos demonstram que além da excelente biocompatibilidade este revestimento possui, também, capacidade para promover a osseointegração [20].

O revestimento de fosfatos de cálcio em ligas de magnésio está reportado em vários estudos [3, 11, 18, 19, 21]. Desses estudos retira-se que as ligas de magnésio promovem e aceleram a deposição de cálcio e fosfato. A deposição de fosfatos de cálcio é influenciada por fatores como: (1) relação Ca/P, (2) presença de íons inorgânicos como o Mg^{2+} , (3) pré-tratamento de superfície e (4) tratamento após revestimento [18].

Na tabela 1.4 resume-se as principais características dos revestimentos de fosfato de cálcio obtidos por diferentes métodos em substratos de magnésio. É também possível verificar a composição do revestimento obtido pelos diversos autores [3].

Tabela 1. 4 - Revestimento de fosfatos de cálcio por diferentes métodos em diferentes substratos (adaptado de [3])

Substrato	Espessura	Método	Camada	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Conversão química					
Mg	-		Ca amorfo/Fosfato de Mg	X	
WE43	>20 μm		Ca carbonatado amorfo/fosfato de Mg		
Mg	-		Ca e P	X	
AZ31	-	Imersão	Ca amorfo/Fosfato de Mg		X
Mg,AZ31 e AZ61	3- 4,0 μm		HA/Mg(OH) ₂ , β -TCP		
AZ31	10 nm < x < 3 μm		Ca cristalino/ Mg-HAp		
Mg	200-300 nm		HAp Ca-deficiente/ Mg(OH) ₂		
Eletrodeposição					
AZ91	-		ED:DCPD e β -TCP Pós-tratamento: HAp		
AZ31	10 μm	ED e imersão	ED:DCPD Pós-tratamento: HAp		
AZ91	10-20 μm		ED:DCPD Pós-tratamento: HAp		
Sol gel					
Mg4Y	50 μm	Síntese e tratamento de calor	β -TCP e HAp	X	

1.4. Nova geração de revestimentos multifuncionais para aplicações biomédicas

1.4.1. Funcionalizados com nanopartículas de Hidroxiapatite

Como mencionado anteriormente, a hidroxiapatite (HAp) é o principal componente mineral do osso, representa grande parte da massa dos ossos e dos dentes e é um dos fosfatos de cálcio que tem merecido maior destaque no revestimento de implantes [11]. A fórmula química estequiométrica da hidroxiapatite é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tem razão Ca/P igual a 1,67 sendo o fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel [22].

A hidroxiapatite sintética é usada em revestimentos de implantes e próteses, porque apresenta uma grande semelhança com a fase cristalina presente nos tecidos ósseos, adicionalmente estimula o crescimento de tecido ósseo (osteocondução). A regeneração do tecido também é induzida pela hidroxiapatite, pois a sua superfície permite interações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água, proteínas e colagénio sejam absorvidas. Além disso, entre os biomateriais cerâmicos a HAp é característica pela sua bioatividade, biocompatibilidade e bio-reabsorção.

Podem ser considerados dois tipos de hidroxiapatite, as sintetizadas a altas temperaturas, com boa cristalinidade e as sintetizadas a baixas temperaturas, que apresentam baixa cristalinidade. A hidroxiapatite que precipita a baixa temperatura tem características idênticas ao tecido ósseo e dentário [22].

Contudo, estão atualmente a ser investigadas e desenvolvidas novas partículas de HAp de modo a possuírem características mais próximas às existentes no osso, pois os fosfatos de cálcio no osso apresentam dimensões nanométricas. As nanopartículas de hidroxiapatite desenvolvidas (figura 1.3) possuem normalmente dimensões de cerca de 50x20 nm. Adicionalmente essas nanopartículas têm propriedades de osteocondução, biocompatibilidade diferentes às obtidas a uma escala superior. Devido às suas características podem controlar as interações das proteínas (absorção, configuração e bioatividade) modelando conseqüentemente a adesão de osteoblastos e a funcionalidade a longo termo [22].

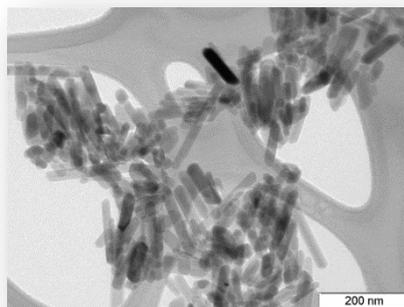


Figura 1.3 - Nanopartículas de HAp

A hidroxiapatite sob a forma de nanopartículas reúne assim excelentes características para ser utilizada em revestimentos de implantes pois promove um bom crescimento ósseo devido à sua estequiometria, morfologia e pureza. Ao serem incorporadas num revestimento as nanopartículas de HAp promovem a passivação da

superfície formando um revestimento de composição química semelhante à do osso [23, 24]. Consoante a função a desempenhar pelas nanopartículas de hidroxiapatite, estas podem ser aplicadas em revestimentos sozinhas ou em conjunto com outros tipos de materiais. A figura 1.4 apresenta um esquema que ilustra a diferença entre um implante biodegradável sem revestimento e um implante biodegradável com revestimento de HAp. Quando não existe revestimento, apesar da formação óssea se iniciar a taxa de degradação é muito elevada levando à formação de lacunas na superfície do implante [21]. Com o revestimento de HAp existe uma redução da taxa de degradação permitindo o desenvolvimento do osso formado inicialmente e a contínua formação óssea. Pode então dizer-se que o revestimento de HAp é bioativo e biocompatível [21].

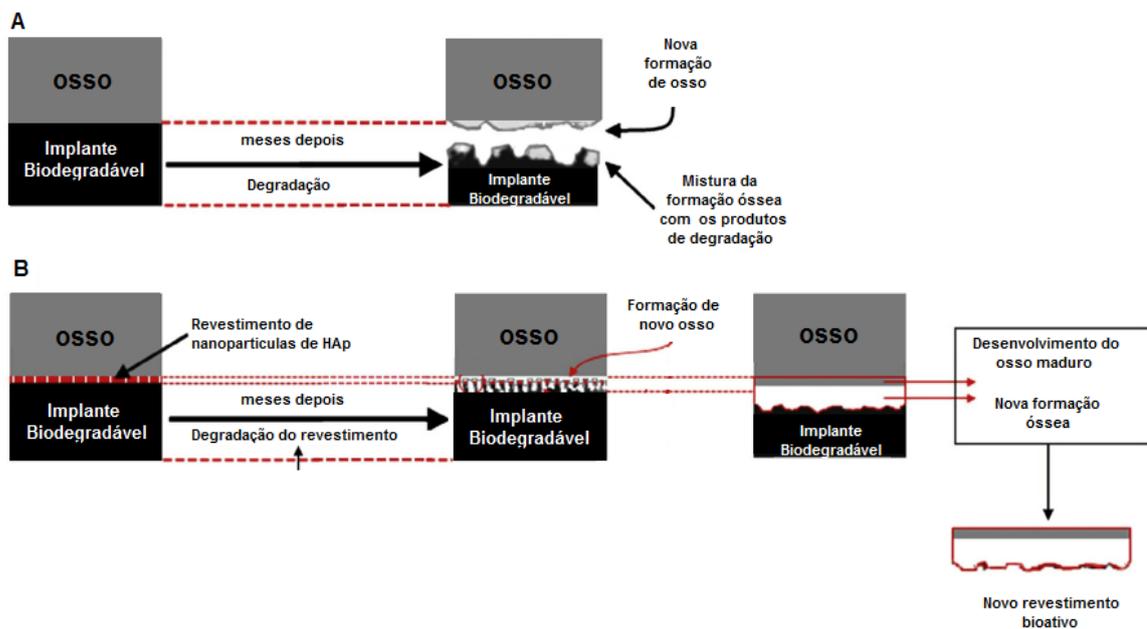


Figura 1. 4 – Esquema que ilustra o comportamento *in vivo* entre um implante biodegradável de Mg e suas ligas. (A) Implante biodegradável sem revestimento e (B) implante biodegradável com revestimento de HAp (adaptado de [21])

Estes revestimentos podem ser depositados por métodos já mencionados anteriormente como o plasma-spray, sol-gel, deposição por laser pulsado, eletroforese e eletrodeposição [25]. A eletrodeposição e a eletroforese surgem como um processo barato e simples, que pode ser efetuado à temperatura ambiente, e a espessura e composição química do revestimento de HAp podem ser controladas através do ajuste dos parâmetros de eletrodeposição/eletroforese [25].

A partir de uma revisão da literatura, como se pode observar na tabela 1.5, verifica-se que existem alguns estudos realizados sobre desenvolvimento de revestimentos de HAp mas poucos utilizando o Mg e suas ligas como substrato. Nos estudos apresentados podemos verificar que o substrato mais utilizado é o aço inoxidável.

Tabela 1. 5 - Condições utilizadas no processo de formação por eletroforese de revestimentos de hidroxiapatite

Ref	Substrato	Espessura	Método	Camada
[26]	AZ91	82,67 ±1,33 µm	- Nanopartículas de HAp (50g/l) dispersa em metanol; - 1º Passo: da EDP executado a 50Vcm ² durante 3 min; -2º Passo: da EDP executado a 30Vcm ² ;	HAp Elementos identificados: O, P, Ca
[27]	Aço inoxidável 316L		- EDP numa solução de 400 ml de etanol absoluto e 5g de nanopartículas de HAp; - EDP até 4 s;	HAp
[28]	Aço inoxidável 316L	4-89 µm	- Nanopartículas de HAp sintetizadas; - A suspensão de HAp (10 g/L) foi preparada em metanol, etanol, isopropanol e butanol por adição de 1 g de nanopartículas em 100 mL de álcool; - EPD a 20 e 60 V/cm por 30, 120, 240, 360, 480 e 600 s;	HAp
[24]	Aço Inoxidável	50µm	- Nanopartículas de HAp sintetizadas pelo método de <i>spray</i> plasma termal; - Concentração de HAp na suspensão a 20g/l (HAp/etanol); - EDP com densidade de corrente aplicada controlada a 0,05-1,5 mA/cm ² .	HAp, β- fosfato tricálcico

1.4.2. Funcionalização com GO

Além da hidroxiapatite existem outros materiais que são atualmente investigados com propriedades interessantes e que poderão num futuro próximo serem usados em aplicações biomédicas nomeadamente em revestimentos de implantes formando camadas funcionais que exibem biocompatibilidade e bioatividade. Um material novo muito promissor é o grafeno. Estudos recentes demonstram que o grafeno exhibe uma

excelente integração em ambientes biológicos pois estimula a adesão de proteínas e possui elevada reatividade melhorando as funções celulares [29].

O grafeno é considerado um material quimicamente inerte, tem excelente estabilidade química e térmica, boa flexibilidade e impermeabilidade a moléculas pequenas tornando-o favorável para a formação de camadas que protegem os metais da oxidação e corrosão em ambientes adversos [30]. Este material forma uma barreira natural proporcionando uma separação física entre o metal e o ambiente fisiológico, tornando-se um material vantajoso a utilizar no revestimento de implantes. Vários autores já estudaram este tipo de revestimento em substratos de cobre e biovidro utilizando a técnica de eletroforese para a sua formação [29, 30].

Além do grafeno são também utilizados os seus derivados como possíveis materiais a utilizar em revestimentos, nomeadamente o óxido de grafeno (GO) que é também um material muito promissor. O GO é constituído por uma só camada de óxido de grafite e é normalmente produzido por tratamento químico da grafite através da sua oxidação e da sua subsequente dispersão e esfoliação em água ou solventes orgânicos adequados. Essa monocamada de óxido de grafite contém grupos funcionais de oxigénio nos planos basais e nos extremos (figura 1.5) [31].

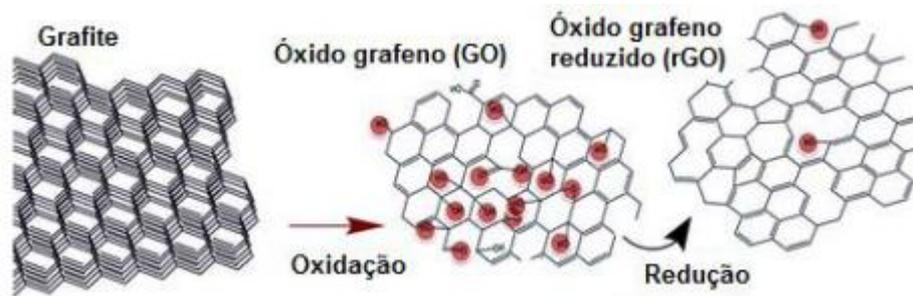


Figura 1.5 – Esquema estrutural do Grafeno e do Óxido de Grafeno (adaptado de [32])

Comparado com o grafeno, os grupos funcionais do GO podem na verdade dar origem a defeitos na estrutura mas também favorecer a sua capacidade de dispersão em muitos solventes, nomeadamente na água devido às suas propriedades hidrofílicas. Esta propriedade é muito importante quando existe mistura do material com matrizes cerâmicas ou polímeros para tentar melhorar as suas propriedades elétricas e mecânicas.

Por outro lado, em termos de condutividade elétrica, o óxido de grafeno é frequentemente descrito como um isolante elétrico, devido à quebra das ligações sp^2 . Para recuperar a sua forma hexagonal, e assim a condutividade elétrica, tem de ser conseguida a redução do óxido de grafeno. No entanto, com a redução do GO grande parte dos grupos de oxigénio são removidos, e este torna-se mais difícil de dispersar, devido à sua tendência para criar agregados.

O GO além das propriedades já referidas como capacidade de dispersão e boas propriedades elétricas possui ainda: (1) boas propriedades ópticas, (2) biocompatibilidade, (3) propriedades antibacterianas, (4) boas propriedades mecânicas e (4) alta flexibilidade [33].

O óxido de grafeno pode também ser funcionalizado e as suas propriedades radicalmente alteradas. Deste modo, pode tornar-se mais adaptável para uma série de aplicações. Este pode ser funcionalizado dependendo da aplicação desejada, sendo que nos últimos anos têm existido um crescente interesse na funcionalização do óxido de grafeno para aplicações médicas e biomédicas. Todas estas propriedades tornam as folhas de GO muito promissoras, sendo utilizadas por vários autores, para efetuar revestimentos apresentando bons resultados na diminuição das taxas de corrosão e funcionalização de superfícies [33, 34].

Para aplicações biomédicas, nomeadamente em implantes biodegradáveis, torna-se interessante a funcionalização de revestimentos de óxido de grafeno com hidroxiapatite de modo a promover o crescimento e diferenciação de células e reforçar a biocompatibilidade (figura 1.6).

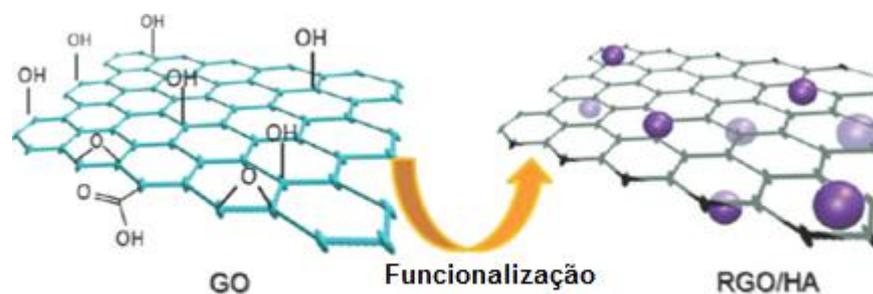


Figura 1. 6 – Funcionalização do óxido de grafeno (adaptado de [35])

Segundo um estudo recente, a utilização de óxido de grafeno e hidroxiapatite em revestimentos para implantes não apresenta citotoxicidade e permite reforçar a biocompatibilidade [35]. Como se pode observar na figura 1.7, para concentrações elevadas das soluções de óxido de grafeno e óxido de grafeno com hidroxiapatite a viabilidade celular aumenta em relação ao grupo de controlo [35].

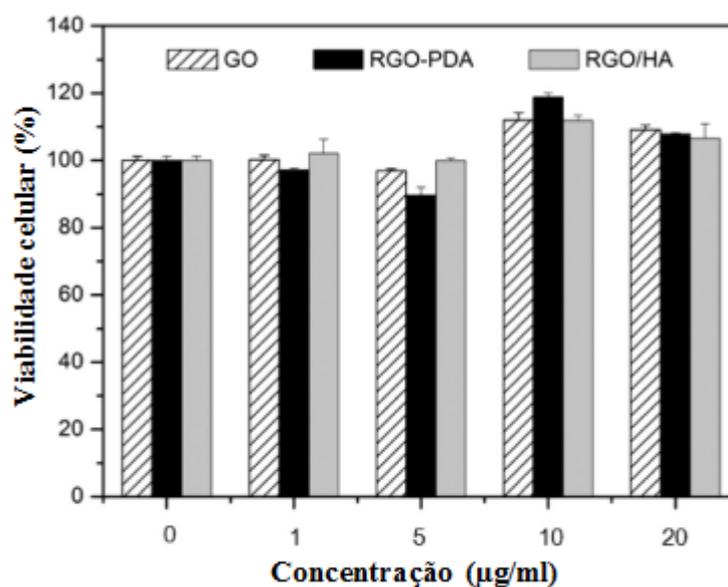


Figura 1.7 – Viabilidade celular em meios contendo óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido por polimerização de dopamina e óxido de grafeno reduzido com HAp (adaptado de [35])

Os revestimentos de HAp e GO em comparação com os revestimentos de HAp revelam melhores propriedades mecânicas, dureza mais elevada, bem como, elasticidade e tenacidade à fratura [34]. Considera-se então que a junção da HAp e GO num só revestimento pode vir a ser bastante promissora para utilização em implantes devido a conter características próximas do tecido ósseo.

Revestimentos de GO em Mg não foram encontrados na literatura, sendo atualmente o material mais utilizado como substrato, o titânio. Na tabela 1.6 podemos ver as condições utilizadas, por diferentes autores, para efetuar os revestimentos de GO

e HAp por eletroforese em titânio (Ti). A partir da técnica de eletroforese, em ambos os estudos, se conseguiu obter revestimentos constituídos por HAp e GO.

Tabela 1. 6 - Condições utilizadas no processo de eletroforese para revestimentos de GO

Ref	Substrato	Espessura	Método	Camada
[33]	Ti		<ul style="list-style-type: none"> - EDP executada a 30V; - Tempos de deposição de 1 a 5 min em soluções HAp (3mg/ml) numa mistura etanol-água (70 vol.% etanol); - Solvente contém 0.5 mg/ml HYNá e 0-1,5 peso% de folhas de GO; 	HAp pura,GO e fosfatos
[34]	Ti puro	35,1-52,8 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Foram preparadas 3 tipos de suspensões (5g/ml) com HAp e 2GO/HAp e 5GO/HAp contendo 0 peso%, 2 peso% e 5 peso% de plaquetas de GO, respetivamente; - A HAp e o GO foram colocados em 120ml de etanol e submetidos a ultrassons; - pH ajustado a 3-4; - EDP a 30 V durante 1 a 5 min com fonte de energia a voltagem constante. 	HAp,GO e fosfatos

1.5. Comportamento dos revestimentos à base de fosfatos sobre Magnésio em condições fisiológicas

O comportamento dos revestimentos à base de fosfatos em magnésio em meios fisiológicos é atualmente muito estudado. Para analisar o comportamento dos revestimentos existem vários métodos como testes de imersão, estudos de polarização ou espectroscopia de impedância. Estes testes são realizados em condições fisiológicas (37°C), a pH 7,4 e utilizando soluções simuladoras do fluido humano como a solução de SBF e de Hanks. A composição, concentração e volume de eletrólito, bem como, o tempo do teste e outros parâmetros podem variar. Esta variação nas condições experimentais torna difícil a comparação de resultados publicados [3].

A partir de uma revisão da literatura é possível afirmar que a funcionalidade alcançada pelos revestimentos à base de fosfatos provoca a redução da velocidade de corrosão, o que se pode verificar pelos valores do potencial de corrosão obtidos através de ensaios eletroquímicos. Os substratos de Mg com revestimento apresentam

potenciais mais nobres (tabela 1.7). O aumento da resistência à corrosão do Mg revestido com revestimentos à base de fosfatos significa que a degradação do Mg se torna mais lenta aumentando consequentemente a osteointegração como comprovado em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Além disso, alguns estudos comprovam a biocompatibilidade e bioatividade destes revestimentos [23, 36-38].

Tabela 1. 7 – Degradação de diferentes substratos de Mg sem revestimento e com revestimento à base de fosfatos (adaptado de: [3, 20, 23, 26, 37])

Solução fisiológica	Substrato	E_{corr}	Método de Revestimento	E_{corr} após revestimento
Hanks, 37°C	AZ31	-1,60 V	Eletrodeposição Ca-P	-1,42 V
SBF, 37°C	CP-Mg	-1,77 V	Eletrodeposição HAp	-1,05 V
SBF, 37°C	AZ91	-1,44 V	Eletroforese n-HAp	-1,32 V
SBF, 37°C	AZ91D	-1,36 V	Eletrodeposição HAp	-1,30 V
SBF, 37°C	ZK60	-1,53 V	Biomimético Ca-P	-1,42 V

No entanto, existem estudos em que os revestimentos à base de fosfatos de cálcio apresentam resultados insatisfatórios, normalmente devido à formação de fissuras ou ao controlo deficiente da fase de formação dos revestimentos de fosfato de cálcio. A maioria destes estudos concentra-se apenas numa ou duas propriedades do revestimento e não em todas as suas funcionalidades e propriedades em simultâneo [3].

Para uso em implantes é muito importante uma caracterização completa dos revestimentos não só quanto à taxa de corrosão, mas também quanto à natureza química da superfície, à adesão e à morfologia [3].

Pode concluir-se então que o revestimento à base de fosfatos por eletrodeposição/eletroforese no Mg é um método que necessita de mais estudo e otimização mas pode ser bastante eficaz e económico. Estes revestimentos temporários podem vir a ser muito úteis clinicamente nomeadamente em implantes dado que permitem uma optimização das propriedades e uma adequação que ocorre *in vivo* [4].

1.6. Objetivos e principais metas a alcançar na tese

O objetivo principal a atingir neste trabalho consistiu em desenvolver um revestimento funcionalizado, biodegradável e temporário que contribui para controlar a taxa de degradação da liga AZ31 e do MgUP em meio fisiológico. Pretende-se também melhorar a resposta biológica permitindo a sua posterior utilização em implantes biodegradáveis. Outro dos objetivos é produzir os revestimentos em simultâneo e num só passo pelo processo de eletrodeposição/eletroforese que é um processo simples e de baixo custo.

Os revestimentos obtidos têm por base fosfato e foram funcionalizados com nanopartículas de HAp e folhas submicrométricas de óxido de grafeno.

Posteriormente, os revestimentos obtidos foram caracterizados por diferentes técnicas de caracterização como SEM/TEM (Microscopia eletrónica), EDS (Espectroscopia de Energia Dispersiva), Microscopia confocal de Raman e submetidos a medidas de ângulos de contacto e degradação em condições fisiológicas.

Capítulo 2

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

As amostras utilizadas foram cortadas de um varão da Liga de magnésio AZ31, bem como de um varão de magnésio ultra puro (MgUP) com áreas entre os 0,41 a 0,71 cm². A composição química da liga AZ31 e do MgUP estão sumarizadas na tabela 2.1.

Tabela 2. 1 - Composição química da liga AZ31 e do MgUP [39]

Designação	Composição Química (%peso)							
	Al	Zn	Mn	Cu	Fe	Ni	Ca	Y
AZ31	3	1	0,2	-	-	-	-	-
MgUP	1,3x10 ⁻⁵	0,0036	0,00014	9,00x10 ⁻⁶	0,00012	1,0x10 ⁻⁵	2,5x10 ⁻⁵	<0,01

Na parte superior de cada uma destas amostras foi colado um fio de cobre, usando cola de prata de modo a permitir o contacto elétrico. Posteriormente, estas amostras foram montadas em resina epoxídica a fim de garantir um manuseamento e isolamento adequados apresentando o aspeto que se pode observar na figura 2.1.

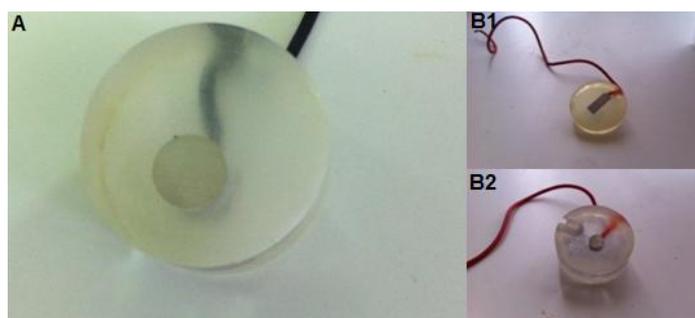


Figura 2. 1 - Exemplo de amostras montadas em resina: (A) liga AZ31, (B1) amostra do MgUP com corte transversal e (B2) MgUP em varão

As amostras foram também desbastadas com diferentes lixas antes da realização dos ensaios. No final da etapa de desbaste e antes da realização do ensaio as amostras foram limpas com acetona e secas com um fluxo de ar quente.

2.2. Preparação das nanopartículas de HAp

As nanopartículas de HAp neste estudo foram preparadas usando o método hidrotermal. Para a preparação da solução foram utilizados os seguintes reagentes: (1) 0,6M de ácido cítrico, (2) 0,2 M de Nitrato de cálcio e (3) 0,2 M de hidrogênio fosfato de amônia. O procedimento experimental seguido foi o descrito por *C. Santos et al.*[40]. Após preparada a solução, esta foi colocada em quatro autoclaves e, posteriormente, inserida numa estufa a 180°C durante 24 horas. Terminado esse tempo, as autoclaves foram retiradas da estufa e a suspensão com as partículas foi centrifugada, duas vezes, durante 2 minutos a 10.000 rpm.

No final, as nanopartículas obtidas foram secas num exsiccador.

2.3. Eletrólitos

Para se efetuar a passivação e o revestimento das amostras da liga AZ31 e do MgUP foram testados eletrólitos com composição e valor de pH diferentes: (1) Hidróxido de Potássio (KOH) com concentração de 5 M e pH 14; (2) Fosfato de amônio dibásico ($H_9N_2O_4P$) com concentração de 0,06 M e pH 8; (3) Fosfato de amônio dibásico com Hidróxido de potássio de pH 10.

A fim de se avaliar o efeito da composição do eletrólito nas características do revestimento foram estudadas diferentes composições a utilizar e, conseqüentemente, diferentes valores de pH. Assim foram realizados ensaios de polarização potenciodinâmica, que permitiram analisar o comportamento eletroquímico da liga de magnésio AZ31 e do MgUP nesses eletrólitos. Após este estudo verificou-se que a superfície se torna passiva quando é utilizado um eletrólito com pH 10. Deste modo selecionou-se essa composição para efetuar os diferentes revestimentos na superfície da liga AZ31 e do MgUP, pelo método potencioestático.

Para formar o revestimento na superfície da liga AZ31 e do MgUP com incorporação de nanopartículas de HAp, a 100 ml da solução referida anteriormente, foi adicionada 0,03 g de HAp, obtendo-se assim uma suspensão.

Por sua vez, o revestimento com HAp e óxido de grafeno foi desenvolvido utilizando uma solução com a mesma concentração e quantidade de nanopartículas da anterior, sendo que a 100 ml desta solução se adicionou, também em suspensão, 1ml de uma solução aquosa contendo 4mg/ml óxido de grafeno (GO) produzido pela companhia *Graphenea* [41]. As principais características do GO estão descritas na tabela 2.2 e a sua análise elementar está presente na tabela 2.3 para uma preparação de 2 g de 4 % peso de GO em água, foram secas por vácuo a 60 °C durante a noite.

Tabela 2. 2 - Propriedades do GO [41]

Forma	Dispersão de folhas de óxido de grafeno
Dimensão da folha	Variável
Cor	Amarelo-castanho
Odor	Inodoro
Dispersão	Solventes polares
Solventes	Água (250ml)

Tabela 2. 3 - Análise elementar do GO [41]

Concentração	4mg/ml
Carbono	49-56%
Hidrogénio	0-1%
Nitrogénio	0-1%
Enxofre	0-2%
Oxigénio	41-50%

2.4. Métodos de preparação dos revestimentos

2.4.1. Eletrodeposição

A eletrodeposição (ED) consiste num processo de deposição de um revestimento sob um substrato, utilizando corrente elétrica e tendo como base a eletrólise. Neste processo algumas reações químicas ocorrem de forma espontânea podendo ser utilizadas para produzir energia elétrica, enquanto outras necessitam de energia externa para ocorrerem. O uso de energia elétrica para a produção de reações químicas designa-se de eletrólise.

De acordo com a Lei de Faraday para a eletrólise, a quantidade de todos os elementos libertados no cátodo ou no ânodo durante a eletrólise é proporcional à quantidade de eletricidade que passa através da solução. A lei de Faraday é dada pela equação 2.1:

$$Q = \int I dt = mn_e F \quad (2.1)$$

em que a corrente I é a medida da taxa de reação na célula, Q é a carga a que a reação ocorreu, t o tempo pelo qual a carga passa, m as moles de um produto e n_e o número de cargas envolvidas na reação.

Na figura 2.2, pode observar-se uma célula eletrolítica. Esta é constituída por uma solução eletrolítica (eletrólito) e por dois elétrodos. O elétrodo que está ligado ao pólo positivo da fonte de tensão é chamado de ânodo, podendo ser um material da natureza da solução ou do metal a depositar, onde será produzida a oxidação. Por sua vez, o elétrodo ligado ao pólo negativo da fonte é designado por cátodo, sendo o local onde é colocado o substrato a revestir [11, 39].

A circulação dos eletrões é então feita do ânodo para o pólo positivo da fonte, ou seja, o cátodo produzindo um catião do metal da solução. O catião trata-se de uma espécie iónica positiva que por efeito do campo elétrico migra para o cátodo. O anião pelo contrário é uma espécie iónica negativa que por efeito do campo elétrico migra para o ânodo. Os eletrões, através do polo negativo da fonte atingem o cátodo e também as cargas positivas dos iões metálicos (catiões) na solução, transformando estes iões em átomos do metal. Estes átomos são depois removidos da solução ao serem atraídos pelo cátodo.

A movimentação dos aniões e cationes provoca uma corrente elétrica que atravessa a solução, permitindo assim, o fecho do circuito elétrico.

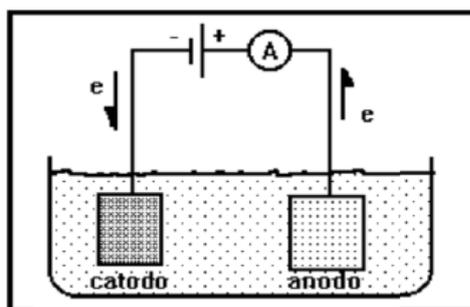


Figura 2. 2 - Célula eletrolítica (adaptado de [39])

O resultado final deste processo vai ser a eletrodeposição dum revestimento metálico no cátodo a partir dos iões do sal em solução e dos catiões do metal dissolvido do ânodo.

Existem vários fatores que vão influenciar a eletrodeposição, nomeadamente: a composição e pH do eletrólito, temperatura, o potencial aplicado entre os elétrodos, a densidade de corrente e o tipo de corrente (pulsada ou contínua). Consoante as condições experimentais usadas o filme obtido pode ser cristalino ou amorfo, metálico ou não metálico.

No processo de eletrodeposição deve ter-se ainda em consideração o substrato, onde os efeitos de fragilização pelo potencial de hidrogénio são preocupantes. Bem como, a interface do substrato, onde a aderência do revestimento e a interdifusão entre o revestimento e o substrato são relevantes. Deve também ter-se em conta o revestimento, onde fatores como a composição e microestrutura determinam propriedades como a tensão, a fase de transformação e o crescimento do grão. Por fim, o ultimo fator a ter em conta é a interface com o meio, em que a interação do revestimento na sua aplicação deve ser considerada em termos de corrosão e/ou desgaste.

Os principais aspetos que definem a qualidade dos fatores acima mencionados são a porosidade, a fragilização pelo hidrogénio e a adesão.

A porosidade pode influenciar sensivelmente a resistência à corrosão, as propriedades mecânicas, as propriedades elétricas e as características da difusão. No entanto, esta pode também ser influenciada pelo substrato, a solução de deposição, os procedimentos operacionais e o tratamento pós-deposição [11, 39].

A fragilização por hidrogénio está ligada aos procedimentos de preparação dos substratos. As operações de ataque químico e de limpeza por ultrassons podem introduzir hidrogénio, na forma atómica, no substrato e originar a fragilização. No entanto, esta pode também ocorrer pelo efeito de bolhas de hidrogénio introduzido pela eletrodeposição.

Para que um revestimento seja funcional no seu desempenho, a sua adesão tem que suportar tensões mecânicas, esforços estáticos e plásticos, o ambiente onde se insere e de possuir resistência térmica. Uma boa adesão depende da ligação atómica, módulo de elasticidade, estado de tensão, espessura, pureza e resistência à fratura da região da interface [39].

2.4.2. Eletroforese

A técnica de deposição por eletroforese (EDP) permite a formação de revestimentos com diferentes espessuras sobre substratos condutores. A EDP envolve essencialmente a migração de partículas carregadas em direção a um substrato condutor de carga oposta, no qual ocorre a deposição. Quando as partículas estão carregadas positivamente ocorre deposição sobre o cátodo designada de deposição eletroforética catódica enquanto que, quando estas estão negativamente carregadas existe deposição sobre o ânodo chamada de deposição eletroforética anódica (figura 2.3) [12, 13].

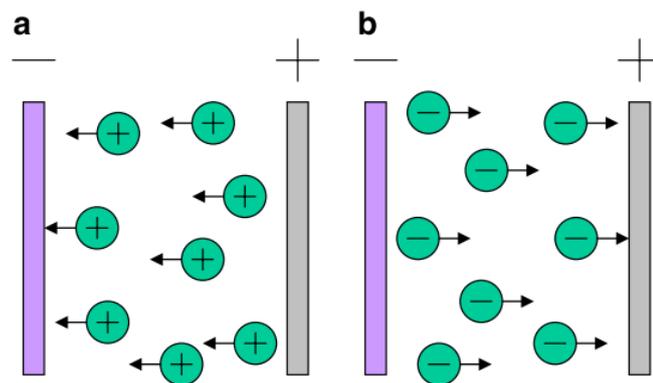


Figura 2. 3 - Ilustração esquemática do processo de deposição por Eletroforese: (a) EDP catódica e (b) EDP anódica (adaptado de [13])

Este processo foi descoberto, em 1807, por Reuss que descobriu que partículas carregadas suspensas em água migram numa direção específica quando submetidas a

um campo elétrico. No entanto, só na década de 40 é que a EDP começou a ser utilizada como um processo de deposição cerâmica. Depois de efetuados alguns ajustes nas décadas seguintes a deposição por eletroforese é estabelecida como sendo um processo de revestimento simples, de custo reduzido e flexível. São possíveis taxas de deposição rápidas na ordem dos segundos ou minutos e a espessura dos revestimentos obtidos pode ser variada entre 1µm e 500 µm, sendo possível ter controlo de espessura e morfologia dos revestimentos. Nestes revestimentos são possíveis de obter várias formas, complexos 3D e estruturas porosas [12].

A EPD é assim um processo de duas etapas. Na primeira etapa as partículas carregadas são dispersas num eletrólito adequado e migram em direção ao eletrodo com carga oposta sob a aplicação de um campo elétrico. Na segunda etapa, por sua vez, as partículas depositam e formam uma camada relativamente densa (figura 2.4).

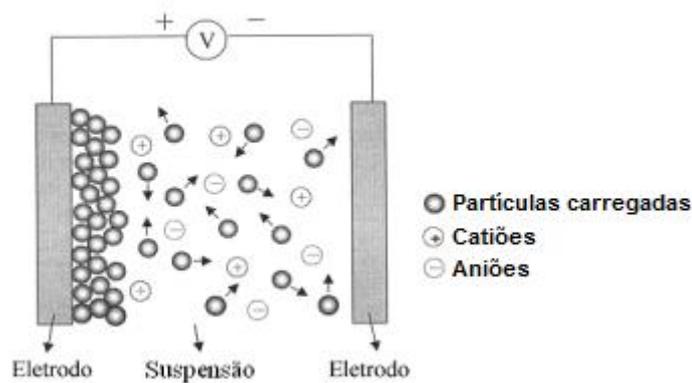


Figura 2. 4 - Esquema da deposição por eletroforese [42]

A cinética da EDP segue a equação de Hamaker (2.2),

$$\frac{dw}{dt} = f\mu cAE \quad (2.2)$$

em que μ é a mobilidade eletroforética das partículas, c é a concentração da suspensão, A é a área de deposição, E é o campo elétrico aplicado e f é o fator introduzido na equação para ter em conta que nem todas as partículas enviadas para o substrato (eletrodo) participam na formação do revestimento [43].

A mobilidade eletroforética das partículas é dada pela equação 2.3,

$$\mu = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta} \quad (2.3)$$

em que ε_0 é a permissividade do vácuo (8.854×10^{-12} F/m), ε_r é a constante dielétrica do meio, ζ é o potencial zeta das partículas e η é a viscosidade do meio [43].

Existem então vários fatores que influenciam este processo tais como: (1) o tamanho das partículas a serem depositadas, devem ser pequenas de modo a permanecerem em suspensão durante o processo (2) o eletrólito/solução utilizado para suspender as partículas durante a deposição eletroforética e (3) os parâmetros físicos como a natureza elétrica dos eletrodos e as condições elétricas utilizadas (relação voltagem/intensidade, tempo de deposição) [12, 13, 43].

Este processo apresenta várias vantagens como: (1) simplicidade, (2) custo reduzido, (3) capacidade de ajustar o processo através da simples alteração de parâmetros como o tempo de deposição e o potencial aplicado e (4) não existirem reações eletrodo/partículas pelo que as partículas não perdem a carga ao serem depositadas [13].

Segundo a literatura, esta técnica já foi utilizada com sucesso em revestimentos de sílica, revestimentos de hidroxiapatite em substratos metálicos para aplicações biomédicas, materiais luminescentes, filmes supercondutores, sensores, compósitos de múltiplas camadas e filmes de nanotubos de carbono, entre outros [12].

Neste estudo para os ensaios eletroquímicos foi utilizada uma célula eletroquímica a três eletrodos que como o nome indica permitiu efetuar uma montagem (figura 2.5) de três eletrodos: (1) o eletrodo de trabalho (amostra); (2) o contra-eletrodo que permite a imposição de um dado potencial através da passagem de corrente; (3) o eletrodo de referência, eletrodo saturado de calomelanos (SCE), que permite a medição do potencial da amostra.

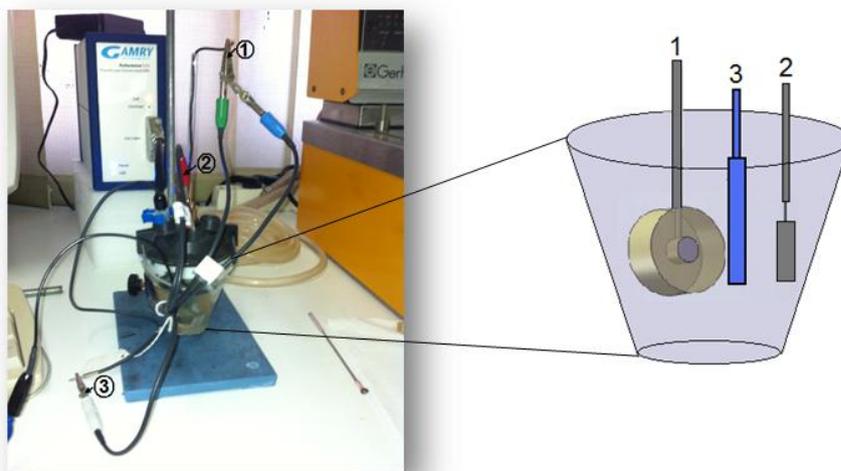


Figura 2. 5 - Potencióstato e célula eletroquímica com a montagem a três elétrodos: (1) Elétrodo de trabalho; (2) Contra-elétrodo; (3) Elétrodo de referência.

Todos os ensaios foram realizados utilizando o equipamento Gamry 600 como potencióstato que interage com o computador via USB permitindo a aquisição automática de dados.

Durante os ensaios foram realizadas curvas de polarização com varrimento do potencial no sentido positivo (anódicas) e no sentido negativo (catódicas) a uma velocidade de 1mV/s, ou curvas potenciodinâmicas e, foi também monitorizado o potencial de circuito aberto (OCP) de modo a verificar se o sistema se encontrava estável.

O revestimento da superfície da liga de magnésio AZ31 e do MgUP foi realizado por eletrodeposição/eletroforese, pelo método potencioestático, utilizando como eletrólito as soluções referidas anteriormente.

2.5. Técnicas de caracterização do revestimento

Para caracterizar os diferentes revestimentos obtidos neste estudo foram utilizadas diferentes técnicas de caracterização com o objetivo de determinar a sua morfologia e analisar a sua composição química.

2.5.1. Microscopia eletrônica de varrimento/Técnica de energia dispersiva (SEM/EDS)

O microscópio eletrônico de varrimento (SEM) é um instrumento muito utilizado no apoio à investigação científica. Esta técnica permite obter diversas informações acerca da caracterização estrutural da amostra nomeadamente a sua morfologia externa (textura), composição química e orientação dos materiais que a compõem. As amostras podem ser metais, cerâmicos e compósitos [44, 45].

Na maioria das aplicações, os dados são recolhidos ao longo de uma área selecionada da superfície da amostra sendo formada uma imagem 2D que mostra as suas variações espaciais. As áreas selecionadas podem variar entre 1 cm a 5 μm de largura que podem ser analisadas num modo de varrimento, utilizando técnicas convencionais de SEM (amplificação de 20x a 30.000x, resolução espacial de 50 a 100 nm). Com a utilização da SEM é possível também efetuar análises de regiões (zonas específicas) através de pontos, linhas ou áreas selecionados sobre a amostra. Para uma análise semi-quantitativa dos elementos químicos existentes na superfície dos materiais esta técnica está normalmente associada à técnica de espectroscopia dispersiva de Raios-X (EDS).

A microscopia eletrônica de varrimento usada na caracterização dos revestimentos permite determinar a espessura, analisar a microestrutura, identificar defeitos e impurezas, avaliar os estados de adesão dos revestimentos ao substrato e também a análise de degradação da superfície, como corrosão e fratura [45].

Nesta técnica, um feixe de elétrons focado através de um sistema de lentes eletromagnéticas é acelerado por uma tensão que varia entre 0 a 40 kV. Este feixe transporta quantidades significativas de energia cinética que vai ser dissipada na forma de uma variedade de sinais produzidos pela interação entre os elétrons e a matéria (amostra) (figura 2.6). Estes sinais incluem elétrons secundários (ES que produzem imagens SEM), elétrons retro-difundidos (ER que permitem a distinção, na amostra em análise, da presença de regiões de átomos leves e pesados), fótons (raios X característicos, que são utilizados para a análise elementar e contínua dos raios-X), a luz visível (catoluminescência), e calor. Os elétrons secundários são utilizados para

adquirir a morfologia e topografia de amostras enquanto os elétrons retro-difundidos são usados para ilustração de contrastes na composição de amostras multifásicas [44].

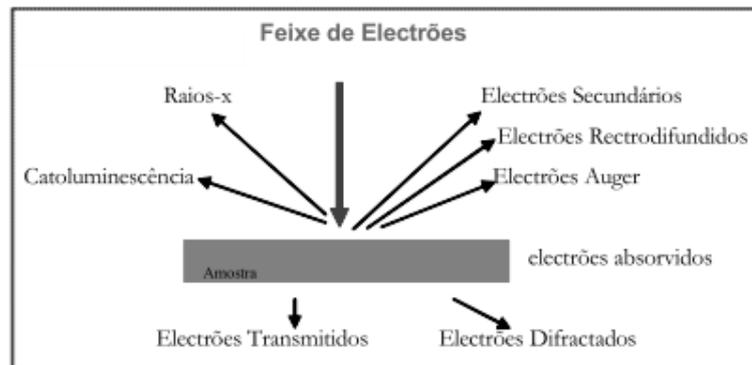


Figura 2. 6 - Tipos de radiação emitida pela matéria quando submetida a um feixe de elétrons REF

A geração de raios-X é produzida por colisões inelásticas dos elétrons incidentes com os elétrons das orbitais discretas dos átomos na amostra. À medida que os elétrons excitados diminuem os estados de energia, produzem raios-X que têm um comprimento de onda fixo característico de cada elemento na amostra. A análise de SEM é considerada "não-destrutiva", ou seja, os raios-X produzidos por interações de elétrons não levam à perda de massa da amostra [44, 45].

As amostras para poderem ser caracterizadas por SEM têm de apresentar boa condutividade elétrica superficial mas quando tal não acontece existe a necessidade de recobrir essas mesmas amostras, através da aplicação de um revestimento ultra-fino, de Au ou C. As amostras devem também suportar o alto vácuo utilizado devido a esta técnica utilizar um feixe de elétrons e devem possuir estabilidade física e química, nas condições de observação / interação com o feixe eletromagnético [44, 45].

Neste estudo, a morfologia e composição do revestimento depositado sobre a superfície do material foram identificadas por SEM/EDS usando o equipamento JEOL 7001F-FEG-SEM com uma tensão de aceleração de 15.0 e 20.0 kV (figura 2.7).



Figura 2. 7 - Microscópio eletrônico de varrimento do ICEMS/IST

2.5.2. Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)

A Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM) é uma técnica que permite observar detalhes à escala atómica. O princípio básico desta técnica de análise baseia-se na transformação da intensidade eletrónica em intensidade luminosa num alvo, sendo posteriormente registada ou gravada [46].

Um microscópio eletrónico de transmissão consiste num feixe de eletrões e num conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe. O feixe e as lentes eletromagnéticas encontram-se numa coluna em vácuo à pressão de cerca de 10^{-5} mm Hg.

Neste equipamento os eletrões são libertados pelo aquecimento de um filamento metálico em vácuo. Estes são depois submetidos a uma diferença de voltagem, onde são acelerados. Ao atravessarem um pequeno orifício, forma-se um feixe de eletrões que percorre o tubo do microscópio. Já no interior do tubo, os eletrões passam por bobines elétricas chamadas lentes eletromagnéticas, que os desviam de maneira análoga. A configuração do microscópio é semelhante à do microscópio ótico, no entanto o trajeto dos eletrões é de cima para baixo [46].

Nesta técnica o feixe de eletrões atravessa o material a observar, resultando a imagem da maior ou menor absorção dos eletrões ao incidirem na superfície da amostra. Ao incidir na amostra o feixe provoca a libertação de uma vasta gama de sinais (figura 2.8).

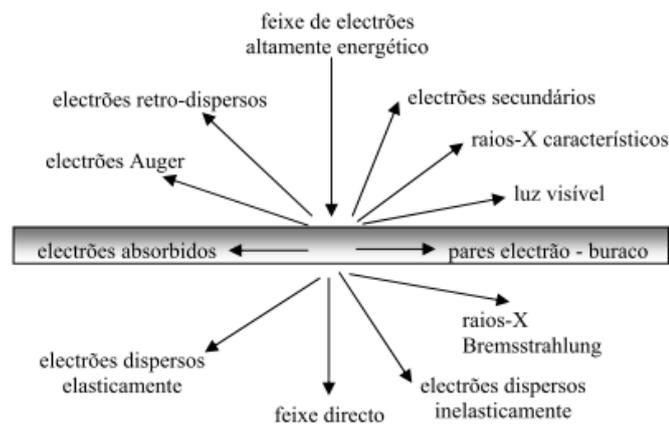


Figura 2. 8 - Gama de sinais emitidos durante a interação de um feixe altamente energético de eletrões com um material (adaptado de [46])

A imagem obtida é dada pela interação dos eletrões com o material. Em relação ao contraste as imagens formadas em TEM têm diferentes origens, tais como a diferença de espessura, de densidade ou de coeficiente de absorção de eletrões (contraste de massa), difração e campos elásticos de tensão. As imagens são observadas através de um ecrã fluorescente e/ou registadas através de uma camara [46].

A maioria dos equipamentos utilizados no estudo de materiais (metálicos, cerâmicos e poliméricos) dispõe de uma tensão de aceleração até 300 kV. Os TEM utilizados em biologia (materiais orgânicos naturais) operam normalmente com tensões de aceleração mais baixas entre 60 e 80 kV.

O microscópio eletrónico de transmissão tem basicamente duas partes: (1) parte eletrónica e (2) parte do vácuo.

A parte eletrónica é constituída por:

- Feixe de eletrões, que é o tipo de radiação utilizada;
- Filamento de tungsténio, ligado a alta voltagem (40KV a 120KV) sendo levado à incandescência através de aquecimento e conduzindo a emissão de eletrões.

- Lentes eletrostáticas, proporcionam a formação do feixe de elétrons – canhão de elétrons.
- Lentes eletromagnéticas, cilindros ocos e metálicos percorridos por uma corrente elétrica que cria um campo magnético permitindo a deflexão do feixe eletrônico. A focagem do feixe é conseguida através da variação da corrente que passa nas lentes.

Por sua vez, a parte do vácuo no TEM é constituída por:

- Bombas rotativas e bombas de difusão;
- Pontos na coluna onde o ar é “aspirado”;
- Aparelhos de medida;
- Reservatórios;
- Válvulas;

A Microscopia Eletrónica de transmissão foi a técnica utilizada para analisar a morfologia das nanopartículas de hidroxiapatite produzidas, os revestimentos e verificar se as nanopartículas de hidroxiapatite faziam parte da sua constituição. O modelo utilizado foi um Hitachi H8100/Thermo Noran System SIX representado na figura 2.9. E a tensão de aceleração usada na observação das amostras foi de 200 Kv. Todas as amostras analisadas foram dispersas em grelhas de cobre perfuradas.



Figura 2. 9 - Microscópio de transmissão eletrónico utilizado no ICEMS/IST

2.5.3. Microscopia confocal de Raman

A microscopia confocal de Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional utilizada normalmente para determinar o tipo e a quantidade de ligações presentes nas estruturas moleculares de materiais orgânicos ou inorgânicos. Esta técnica tem por base a dispersão inelástica de luz monocromática podendo ser aplicada em materiais no estado sólido, líquido ou gasoso .

Quando a luz incide na matéria podem ocorrer vários fenómenos de interação como a absorção ou dispersão desta ou então não existir qualquer tipo de interação. A espectroscopia de Raman baseia-se nos fenómenos de dispersão que ocorrem quando a luz interage com a matéria, tais como: (1) o fenómeno de dispersão inelástica ou dispersão de Raman e (2) o fenómeno de dispersão elástica ou dispersão de Rayleigh [47].

O fenómeno de dispersão elástica ou de Rayleigh ocorre quando a frequência do fóton disperso é armazenada após a interação com a molécula, sendo o tipo de dispersão mais comum. Por sua vez, o fenómeno de dispersão inelástica ou de Raman ocorre quando após interação com a matéria o fóton disperso sofre uma alteração. Este tipo de fenómeno é pouco usual em relação ao de dispersão elástica e encontra-se subdividido em dois fenómenos distintos: (1) a dispersão de Stokes em que após a incidência na molécula o nível de energia desta passa para um estado vibracional acima do inicial; (2) a dispersão de anti-Stokes que ocorre quando após o fóton incidir na matéria existe a passagem para um estado vibracional abaixo do inicial. Esta dispersão é um fenómeno menos frequente devido a relacionar-se com uma redução do estado vibracional e ocorre normalmente quando o material é submetido a diferentes temperaturas (figura 2.10).

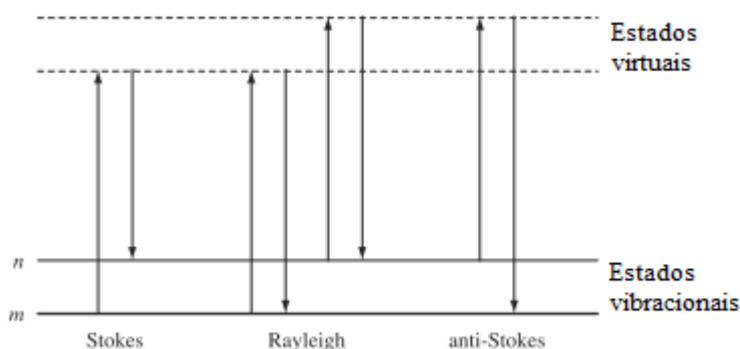


Figura 2. 10 - Dispersão de Stokes, anti-Stokes e Rayleigh (Adaptado de [48])

No processo de espectroscopia de Raman a molécula é excitada para um nível vibracional virtual quando a radiação incide, voltando depois a descer ao seu estado vibracional inicial ou diferente. O número de vibrações possíveis neste processo depende de fatores como o número de átomos presentes e a sua geometria.

Existem dois tipos de vibrações para uma molécula sendo estes: (1) Extensões que provocam variações no comprimento de ligação entre dois átomos da estrutura podendo ser simétricas ou assimétricas. Os picos de Raman relacionados com extensões ocorrem para energias superiores; (2) Deformações são fenómenos de menor energia em que os picos de Raman ocorrem para energias inferiores.

Para se obterem os resultados desejados e ser possível comparar os valores obtidos com os valores tabelados ou presentes na bibliografia, o equipamento utilizado é um espectrómetro (figura 2.11). Este equipamento é constituído por: (1) uma fonte de luz monocromática, que regra geral é um laser. Este pode operar numa gama do espectro entre 1064 e 180 nm; (2) um sistema ótico de lentes e filtros; (3) um sistema de porta amostra; (4) um espectrómetro e sistema de deteção e (5) um sistema de controlo para análise de dados [48].

Neste equipamento como se pode observar na figura, a luz laser atravessa um divisor de feixe incidindo na amostra, mas essa mesma luz vai atravessar o filtro sendo eliminada a dispersão de Rayleigh e apenas detetada e transmitida a dispersão de Raman.

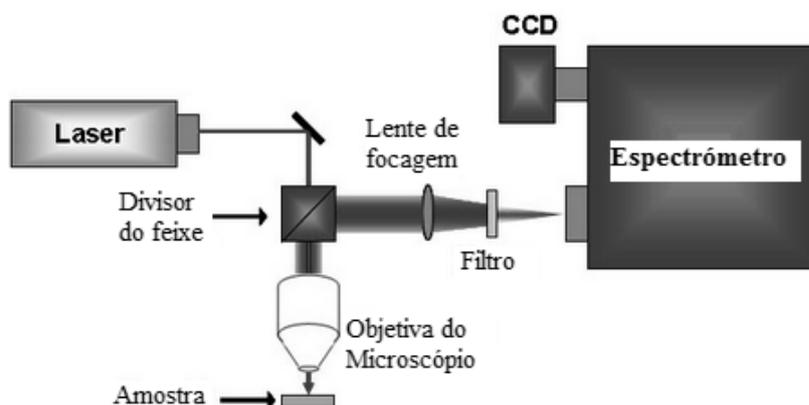


Figura 2. 11 - Esquema da montagem da Espectroscopia de Raman (Adaptado de [48])

De modo a determinar o tipo de ligações presentes nas estruturas moleculares dos revestimentos obtidos e assim identificar os seus constituintes foi utilizada a Espectroscopia de Raman.

2.5.4. Molhabilidade/Teoria do ângulo de contacto

A molhabilidade de uma superfície pode ser quantificada pela medida do ângulo de contacto formado entre a fase líquida (um líquido orgânico ou inorgânico) e a fase sólida (o substrato). A molhabilidade da superfície depende da energia de superfície e influencia o grau de contato entre o sólido e o meio, por exemplo o implante e o ambiente fisiológico [49]. Quanto maior a molhabilidade, maior será a interação da superfície do implante com o ambiente biológico. Em consequência, a tensão crítica da superfície pode ser usada para avaliar a energia da superfície [50].

A molhabilidade de um sólido por um líquido é possível determinar através de um parâmetro designado ângulo de contato. Quando este apresenta um valor constante para uma determinada situação, é obtido o equilíbrio termodinâmico na interface (Aurenty et al,1997). A equação de Young (2.4) estabelece a relação entre o ângulo de contacto e as componentes da tensão superficial:

$$\cos \theta \gamma_{LV} = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (2.4)$$

em que γ_{LV} representa a tensão superficial entre a interface liquido/vapor, γ_{SV} a tensão superficial da interface sólido/vapor e γ_{SL} a tensão superficial da interface sólido/liquido (figura 2.12).

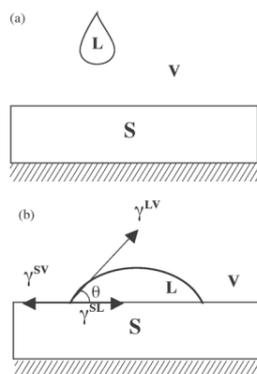


Figura 2. 12 - Representação do teste de Molhabilidade (a) antes e (b) depois da adesão (adaptado de [51])

Através de técnicas experimentais e propostas teóricas é possível entender os mecanismos envolvidos neste processo assim como correlacionar o ângulo de contacto com a natureza da superfície. No entanto, a medição e interpretação destes ângulos são questões complexas.

O ângulo de contato entre uma gota de um líquido e uma superfície sólida vai depender das tensões, entre o líquido e a superfície sólida em qualquer ponto da linha que separa as fases sólidas e líquidas, bem como das tensões entre o sólido e a fase de vapor. Por definição tem-se que: quando $\theta > 90^\circ$, não há a molhabilidade do sólido pelo líquido, ou seja, o líquido não se espalha; quando $\theta < 90^\circ$, há molhabilidade e o líquido espalha-se espontaneamente; quando $\theta \approx 0^\circ$, o líquido espalha-se indefinidamente sobre o sólido, ou seja, a molhabilidade é total (figura 2.13).

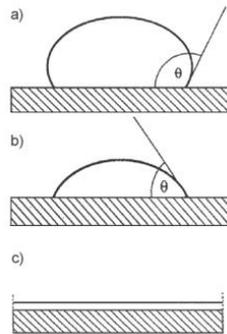


Figura 2. 13 - Representação do ângulo de contato (a) maior do que 90° , (b) menor do que 90° e (c) molhabilidade total (adaptado de [51])

A alteração do ângulo de contato ao longo do tempo fornece informações sobre a molhabilidade pois permite relacionar a energia, rugosidade e heterogeneidade das superfícies [50].

Neste estudo a molhabilidade dos diferentes revestimentos foi testada pela realização de medidas do ângulo de contato utilizando o método de gota sessile estático, em que é colocada uma quantidade de água destilada em contato com o material, formando uma gota sobre a sua superfície [51]. Para efetuar este teste as amostras estiveram numa câmara de vácuo durante 24h sendo posteriormente medida a variação do valor do ângulo de contato com auxílio do software MATLAB ao longo de 30s, durante os quais eram executadas oito medidas em cada amostra.

2.5.5. Degradação em condições fisiológicas

Os revestimentos na liga de magnésio AZ31 e no magnésio ultra puro foram caracterizados de modo a investigar a sua degradação através da realização de ensaios eletroquímicos utilizando uma solução fisiológica designada de SBF (*Simulated Body Fluid* ou Fluido Corporal Simulado) à temperatura de 37°C e a pH 7,4. Para se garantir a temperatura da solução SBF foi utilizada uma célula de parede dupla que permite a circulação de água a 37°C. Na tabela 2.4 apresenta-se composição química desta solução. Para ajustar o pH da solução foi utilizada uma solução de HCl (ácido clorídrico) com concentração de 1 M.

Tabela 2. 4 - Composição da solução SBF em termos dos reagentes utilizados [52]

Composição do SBF (g/L)							
NaCl	NaHCO ₃	KCl	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	MgCl ₂ ·6H ₂ O	CaCl ₂	Na ₂ SO ₄	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂
7.996	0.350	0.224	0.228	0.305	0.278	0.071	6.057

Os ensaios eletroquímicos realizados para forçar a degradação das amostras foram polarizações potenciodinâmicas com varrimento do potencial no sentido positivo até a amostra corroer, sendo obtidas as respetivas curvas de polarização deste processo.

Capítulo 3

3. Resultados e Discussão

De modo a obter um revestimento nanoestruturado biocompatível e osteocondutor para a liga AZ31 e para o MgUP que permita a biodegradação destes a uma taxa controlada, foram inicialmente estudados os efeitos do potencial aplicado e da concentração do eletrólito no revestimento. Após verificadas as condições experimentais ideais para a deposição foram efetuados três tipos de revestimento – fosfatos, fosfatos com Hap e fosfatos com Hap e grafeno - e, posteriormente, realizada a sua caracterização por diferentes técnicas.

3.1. Efeito do potencial na morfologia dos revestimentos

Utilizando como eletrólito uma solução de fosfatos e sabendo por ensaios de polarização potenciodinâmica previamente realizados que a superfície da liga AZ31 e do MgUP se encontra passiva até o potencial de 2 V, foram depositados durante duas horas, pelo método potencioestático à temperatura ambiente, vários revestimentos. Numa primeira fase e com o objetivo de avaliar o efeito do potencial aplicado na morfologia dos revestimentos obtidos foram aplicados diferentes potenciais (1,0 V e 1,8 V) para uma concentração de 0,06 M de fosfato.

Na figura 3.1 e 3.2, estão representadas as curvas potencioestáticas obtidas para a liga AZ31 e para o MgUP com aplicação de 1,0 V e 1,8 V de potencial. Observa-se que, para o potencial aplicado de 1 V tanto na liga AZ31 como no MgUP, os valores da corrente elétrica são da ordem dos microamperes o que indica que existe um processo de passivação a ocorrer na superfície. Para o potencial de 1,8 V a carga elétrica envolvida é superior, ou seja, potenciais mais elevados correspondem a correntes com maiores transientes e a taxas mais elevadas de redução das espécies químicas no eletrodo. Comparando a liga AZ31 com o MgUP, verifica-se que para o MgUP a corrente é ligeiramente superior em ambos os potenciais.

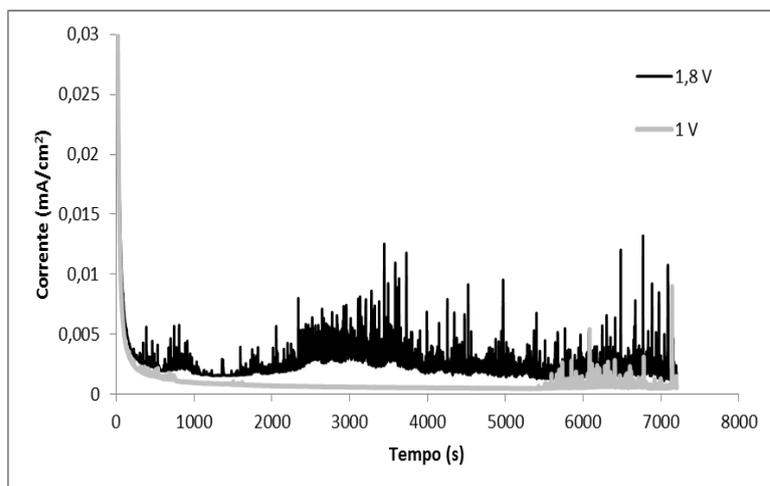


Figura 3. 1 - Curvas potenciostáticas obtidas para a liga de magnésio AZ31 a diferentes potenciais.

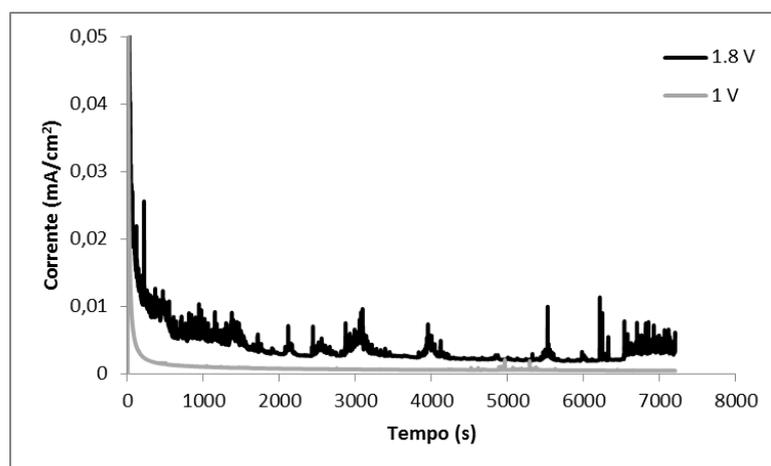


Figura 3. 2 - Curvas potenciostáticas obtidas para o MgUP a diferentes potenciais.

De modo a visualizar e caracterizar a morfologia do revestimento formado sobre a superfície da liga de magnésio AZ31 e do MgUP, as amostras submetidas aos ensaios potenciostáticos foram analisadas por microscopia electrónica de varrimento (SEM).

Na figura 3.3 e 3.4, pode observar-se a morfologia dos revestimentos obtidos na liga AZ31 e no MgUP para os diferentes potenciais aplicados (1 V e 1,8 V). Nas figuras 3.3A e A1 observa-se a morfologia do revestimento depositado ao potencial de 1 V para a liga AZ31. Verifica-se que a superfície está completamente recoberta por estruturas aciculares finas, ou seja, estruturas ramificadas em forma de agulha. Observa-se também a formação de um revestimento espesso na superfície das amostras com um crescimento preferencial ao longo dos defeitos (marcas de polimento) deixados na superfície da amostra após a etapa de desbaste e polimento.

Para o potencial aplicado mais elevado de 1,8 V, (figuras 3.3B e B1), é possível verificar que o revestimento obtido reveste toda a superfície da amostra não sendo visíveis as irregularidades deixadas pela etapa de desbaste e de polimento na superfície como observado para o potencial mais baixo. No entanto, continuam presentes as estruturas aciculares em forma de arbusto.

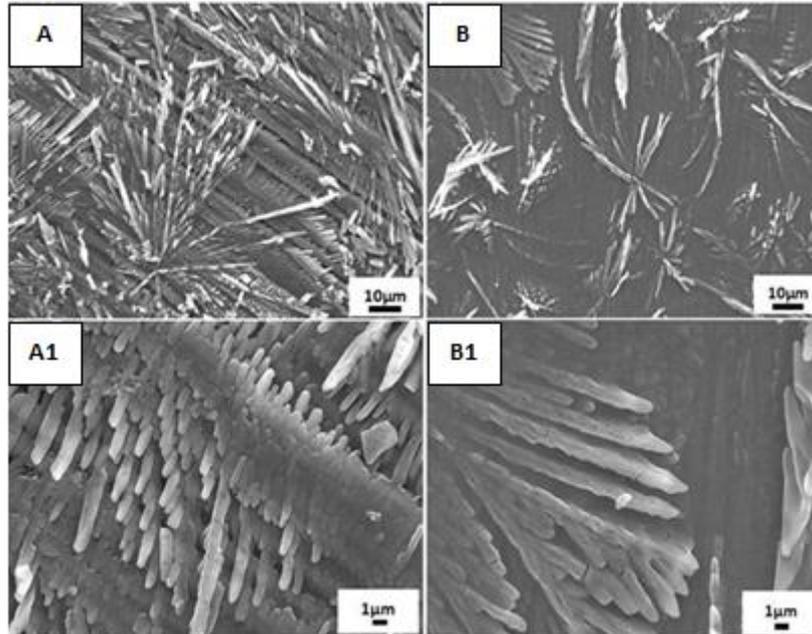


Figura 3. 3 - Imagens SEM da morfologia da liga de magnésio AZ31 aplicando: (A,A1) potencial de 1V e (B,B1) potencial de 1,8V

Na figura 3.4, pode observar-se a morfologia do revestimento obtido para amostras de MgUP quando aplicados os potenciais de 1,0 V e de 1,8 V. Nas figuras 3.4A e A1, para o potencial de 1,0 V observa-se que as estruturas existentes na superfície, são arbóreas e cobrem a superfície, sendo no entanto visíveis algumas irregularidades provenientes do polimento da amostra. Fazendo uma análise comparativa das morfologias obtidas para os dois substratos em estudo (AZ31 e MgUP) observa-se que o revestimento no MgUP se altera quando se compara com o existente na superfície da liga AZ31 para o mesmo potencial. Para o potencial de 1,8 V, figuras 3.4B e B1, observa-se que o revestimento da amostra é total pois não existem regiões por revestir. Adicionalmente, verifica-se a presença de estruturas ramificadas aciculares que são constituídas por diversas ramificações principais que contêm ramificações

secundárias. No entanto é visível que para potenciais superiores (1,8 V) as estruturas ramificadas são de menor dimensão.

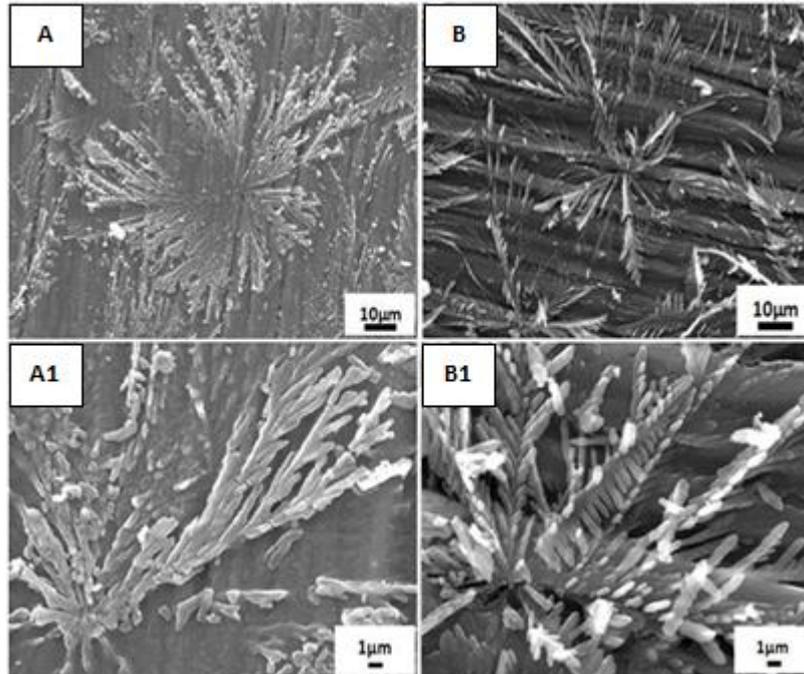


Figura 3. 4 - Imagens SEM da morfologia do MgUP aplicando: (A,A1) potencial de 1V e (B,B1) potencial de 1,8 V

Com base na análise morfológica verifica-se, que aplicando potenciais mais elevados as superfícies de magnésio (AZ31 e MgUP) ficam completamente recobertas e as estruturas ramificadas depositadas são de menores dimensões, pelo que se optou por aplicar o potencial de 1,8 V durante as deposições dos revestimentos.

3.2.Efeito da concentração do eletrólito na morfologia dos revestimentos

Para se avaliar o efeito da concentração do eletrólito nas características do revestimento foram estudadas duas concentrações da solução de fosfatos (0,06 M e 1 M) aplicando o potencial de 1.8 V. Deste modo foram obtidas as correspondentes curvas de polarização para as concentrações em estudo, na liga AZ31 e no MgUP (figura 3.5).

Na figura 3.5, observa-se que para uma concentração de fosfatos de 0,06 M o potencial de corrosão (E_{corr}) da liga AZ31 é de -1,04 V. Adicionalmente, é visível um patamar de passivação, para valores de densidade de corrente próximos de 10^{-6} A/cm², o que significa que se formou um filme passivo na superfície da amostra. Para a concentração de 1 M, observa-se um patamar de passivação semelhante com valores de densidade de corrente da mesma ordem de grandeza mas ligeiramente inferiores. Relativamente ao E_{corr} o valor é menos negativo (E_{corr} de -854 mV) quando comparado com uma solução menos concentrada.

No caso do MgUP observa-se, na figura 3.5, que para uma concentração de 0,06 M de fosfatos este apresenta um E_{corr} de -1,64 V e um patamar de passivação para valores de densidade de corrente de 10^{-5} A/cm². Para a concentração de 1 M observa-se o patamar de passivação para valores de 10^{-6} A/cm² e um E_{corr} de -1,49 V. A partir da análise dos gráficos apresentados nas figuras, observa-se também que o potencial de corrosão (E_{corr}) da liga AZ31, para ambas as concentrações, é mais nobre quando comparado ao magnésio Ultra puro.

Estes resultados permitem mostrar que até potenciais próximos de 2 V a liga AZ31 e o MgUP formam revestimentos passivos estáveis em eletrólitos com concentrações de fosfatos de 0,06 e 1 M.

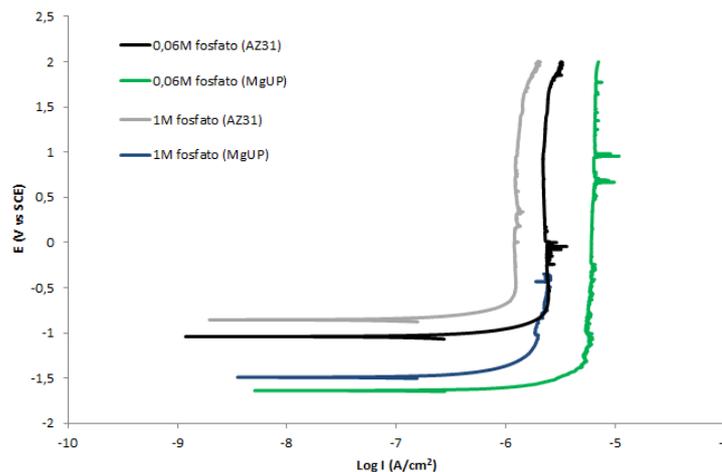


Figura 3. 5 - Comportamento eletroquímico da liga AZ31 e do MgUP variando a concentração de fosfato no eletrólito

Na figura 3.6, estão representadas as curvas potenciostáticas obtidas para a liga AZ31 utilizando como eletrólito uma solução de fosfatos com duas concentrações (0,06 M e 1 M) e aplicando o potencial de 1,8 V. Pode observar-se que os valores da corrente elétrica para as duas concentrações em estudo são da ordem dos microamperes. Para a concentração de 1 M a carga elétrica envolvida no processo é superior indicando que concentrações mais elevadas correspondem a correntes com maiores transientes.

Para o MgUP (figura 3.7) o comportamento observado é semelhante ao da AZ31 no entanto verifica-se que para uma concentração de 0,06 M os valores de carga elétrica envolvida são superiores aos obtidos para a concentração de 1 M, comportamento contrário ao observado para a liga AZ31.

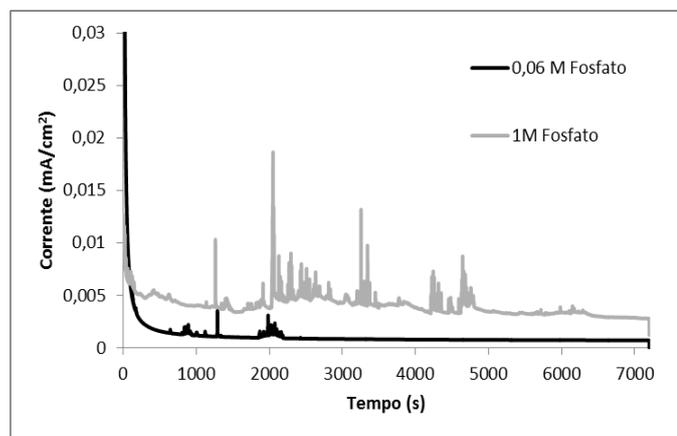


Figura 3. 6 - Formação do revestimento de fosfato na liga AZ31 para diferentes concentrações de fosfato

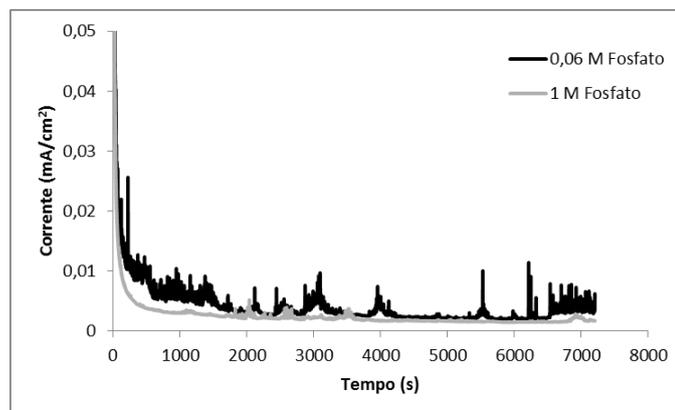


Figura 3. 7 - Formação do revestimento de fosfato no magnésio Ultra puro para diferentes concentrações de fosfato

Na figura 3.8, observa-se a morfologia dos revestimentos obtidos na liga AZ31 aplicando o potencial de 1,8 V, durante 2 h, e utilizando como eletrólito a solução de fosfatos com concentrações de 0,06 M e 1 M. Estes revestimentos podem ser observados na figura 3.8A e A1 e figura 3.8B e B1, respectivamente. Da análise morfológica do revestimento formado na liga AZ31 (figuras 3.8A e A1) para a menor concentração de fosfatos verifica-se que a superfície está totalmente revestida por um revestimento contínuo composto por estruturas aciculares finas. O aumento da concentração de fosfatos no eletrólito para 1M, (figura 3.8B1 e B2), permitiu também a deposição de um revestimento contínuo composto por estruturas tridimensionais em forma de flor. Estruturas essas de maiores dimensões quando comparadas com as depositadas com concentrações inferiores (0,06 M).

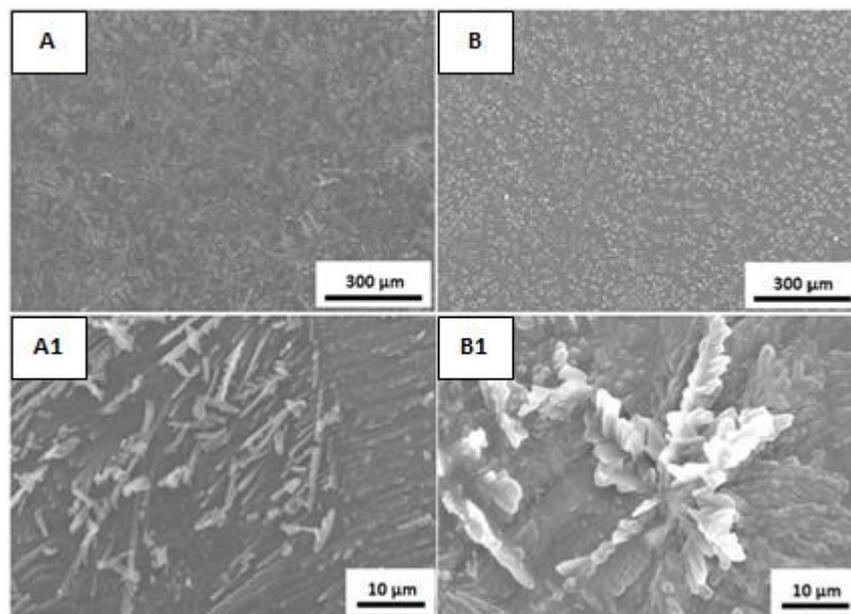


Figura 3. 8 - Imagens SEM da morfologia do revestimento na liga AZ31 utilizando um eletrólito com concentração de: (A,A1) 0,06M e (B,B1) 1M

Por sua vez, na figura 3.9, observa-se a morfologia do revestimento obtido no MgUP aplicando o potencial de 1,8 V durante 2h e utilizando o eletrólito de fosfato com concentrações de 0,06 e 1 M.

A partir da análise morfológica do revestimento obtido no MgUP para a concentração de 0,06 M observa-se que este é constituído por múltiplas estruturas

arbóreas, ou seja, estruturas muito ramificadas (figura 3.9) e reveste totalmente a superfície (figura 3.9A1). Para uma concentração mais elevada de fosfatos (1 M) o revestimento formado reveste igualmente toda a superfície da amostra (figura 3.9B) e é composto por estruturas tridimensionais em forma de flor (figura 3.9B1) tal como foi verificado na liga AZ31 para as mesmas condições.

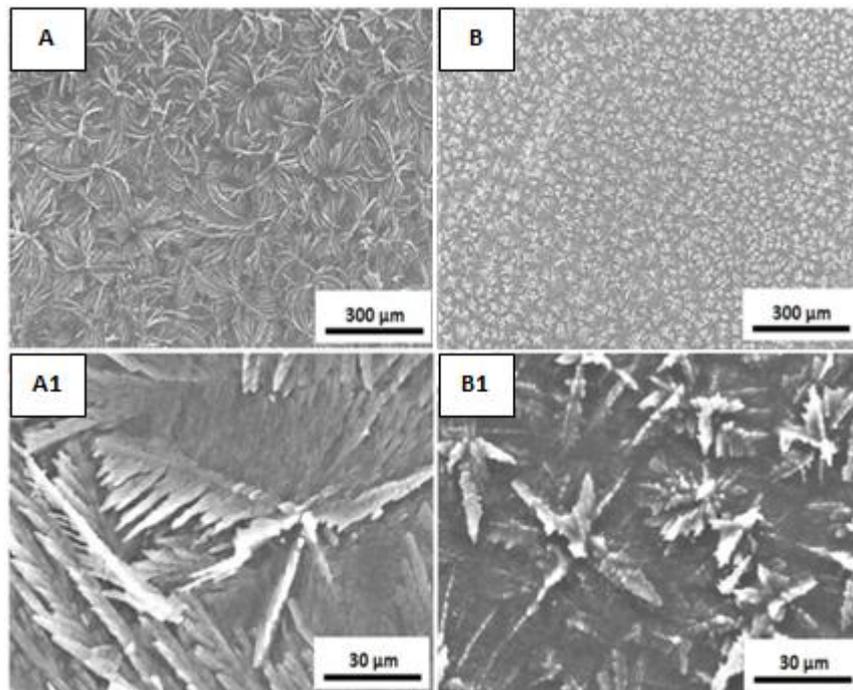


Figura 3. 9 - Imagens SEM da morfologia do revestimento no MgUP utilizando um eletrólito com concentração de: (A,A1) 0,06M e (B,B1) 1M

A fim de avaliar a composição elementar dos revestimentos foram realizadas análises de EDS em amostras revestidas com diferentes concentrações de fosfatos (tabela 3.1). A partir desta análise verificou-se que os elementos constituintes do revestimento são magnésio (Mg), fosfato (P), oxigénio (O) e potássio (K). Este resultado permitiu também fazer uma análise qualitativa da espessura do revestimento. Dessa análise verificou-se, que ao utilizar como eletrólito a solução de fosfatos com 1 M o revestimento obtido deverá ser mais espesso, pois a percentagem de magnésio detetada (contribuição maioritária do substrato) foi inferior comparativamente à concentração de 0,06 M. No entanto, esse aumento da espessura não é espectável nas

amostras de magnésio puro. De acordo com a análise de EDS a espessura dos dois revestimentos depositados no MgUP deverá ser muito semelhante.

Tabela 3. 1 - Análise EDS das amostras da liga AZ31 e do MgUP para diferentes concentrações de fosfatos

	Concentração de fosfatos (M)	Elementos [% at. norm]			
		Mg	P	O	K
Liga AZ31	0,06	83,82	1,16	14,92	0,14
	1	60,83	5,19	31,59	2,44
MgUP	0,06	62,30	5,29	29,73	2,68
	1	60,45	5,25	31,79	2,51

3.3. Funcionalização dos revestimentos com HAp e GO

Após uma profunda análise das características dos revestimentos obtidos a 1,0 e 1,8 V e com concentrações de fosfatos de 0,06 M e 1 M optou-se por selecionar a concentração de 0,06 M e o potencial de 1,8 V, como condições experimentais de deposição mais adequadas para obtenção de revestimentos.

A morfologia do revestimento de fosfatos obtido, na liga AZ31, está representada nas figuras 3.10A e A1. É possível visualizar que a superfície se encontra totalmente coberta e que é constituído por estruturas ramificadas com crescimento em todas as direções e com ramificações com cerca de 10-20 μm .

O revestimento de fosfatos obtido no MgUP, está representado na figura 3.10B e B1. Este apresenta uma morfologia ligeiramente diferente comparadamente ao da liga AZ31 pois embora as estruturas cresçam em todas as direções, as ramificações principais são de maior dimensão com cerca de 30 a 40 μm de comprimento e as ramificações secundárias são de menores dimensões. Neste revestimento são visíveis algumas irregularidades na superfície da amostra o que pode indicar que o revestimento obtido é fino.

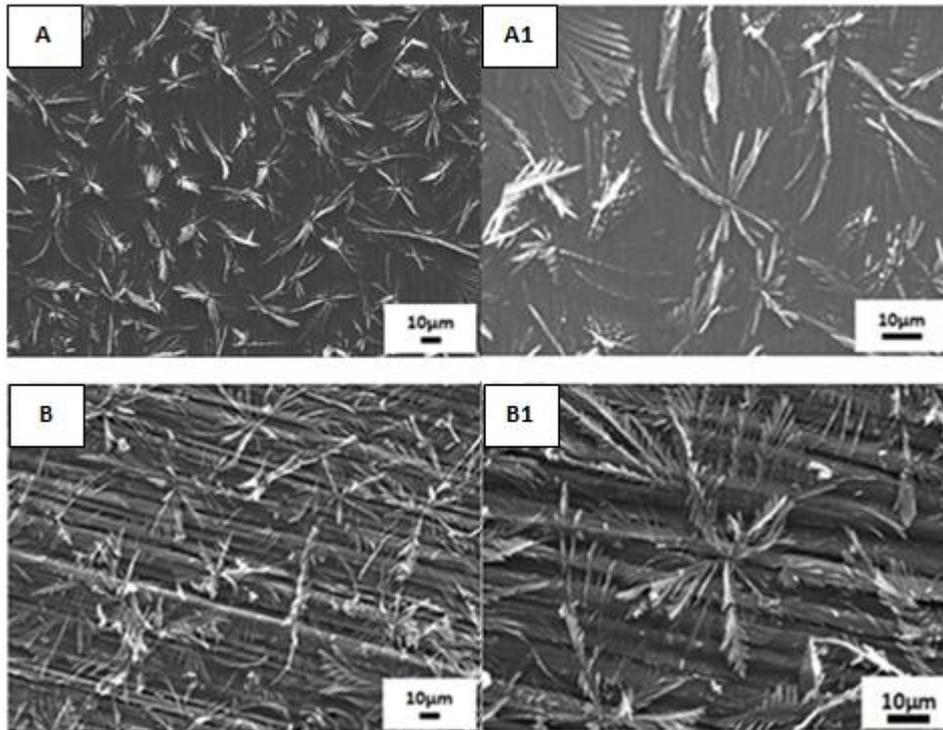


Figura 3. 10 - Imagens SEM da morfologia do revestimento de fosfatos na liga AZ31 (A,A1) e no MgUP (B,B1)

Para uma melhor caracterização morfológica do revestimento de fosfatos foram efectuadas análises de TEM (figura 3.11). Da análise de TEM verifica-se que estas estruturas são porosas e, que por sua vez, são constituídas por um conjunto de estruturas tubulares ramificadas. A porosidade das estruturas presentes nos revestimentos poderá ser propícia ao crescimento de células ósseas e consequentemente ajudar na regeneração do tecido ósseo [53].

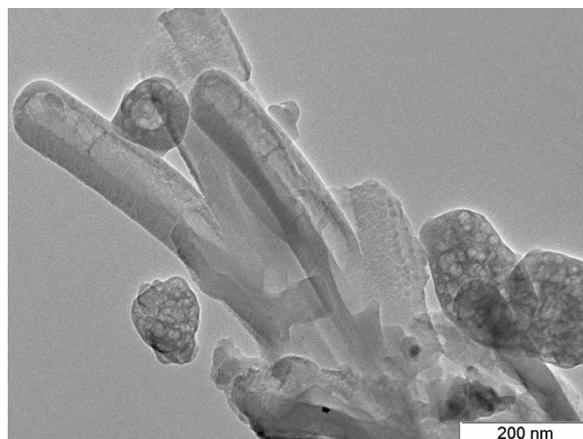
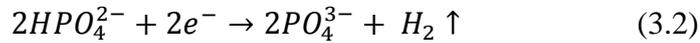
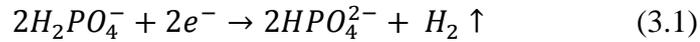


Figura 3. 11 - Imagem de TEM de uma das estruturas constituintes do revestimento

Segundo a literatura as reações de eletrodeposição que levam à formação do revestimento de fosfatos na superfície do Mg sugeridas por *Song et al.* são [37]:

- Reações de redução do $H_2PO_4^-$ e do HPO_4^{2-} :



Os revestimentos de fosfatos funcionam como uma camada base que permite, posteriormente, depositar as nanopartículas de HAp e o óxido de grafeno. Os novos dois revestimentos funcionalizados formados serão compostos por (1) fosfatos e hidroxiapatite e (2) fosfatos com hidroxiapatite e grafeno.

Na figura 3.12 e 3.13, estão representadas as curvas potenciostáticas da liga AZ31 e do MgUP obtidas durante a deposição usando electrólitos com diferentes composições. Para a liga AZ31 verifica-se (figura 3.12), que para os três revestimentos formados os valores da corrente elétrica são da ordem dos microamperes ao longo do processo de deposição. No entanto, nesta liga o revestimento de fosfatos com HAp e GO é o que apresenta valores de corrente mais elevados inicialmente e o revestimento de fosfatos com HAp o que apresenta maiores transientes de corrente.

Para o MgUP (figura 3.13), a corrente elétrica envolvida é da ordem dos amperes sendo estes valores sempre mais elevados quando comparados aos da liga AZ31. O revestimento de HAp e GO é o que apresenta maiores transientes de corrente, contudo apenas se observa na parte final da deposição.

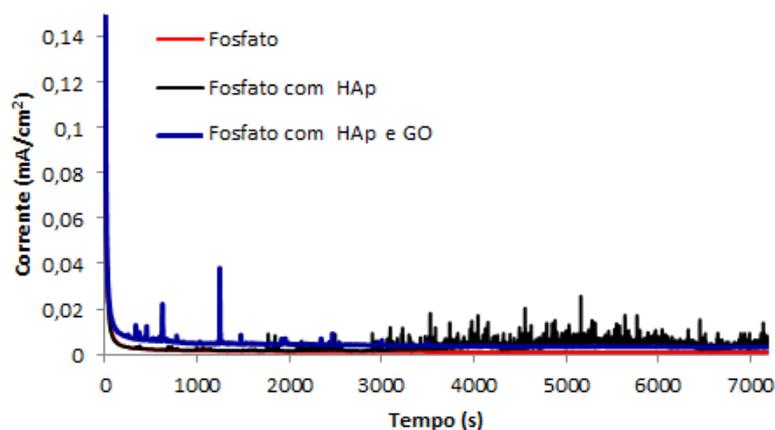


Figura 3. 12 - Formação dos diferentes revestimentos na liga AZ31

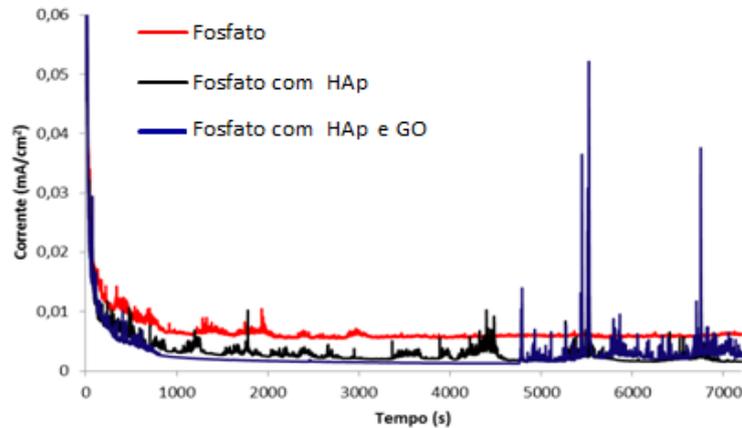


Figura 3. 13 - Formação dos diferentes revestimentos no MgUP

3.3.1. Liga AZ31

Nas figuras 3.14A e A1, está presente o revestimento de fosfatos com HAp na liga AZ31. Pode observar-se que este revestimento é constituído por estruturas finas ramificadas, ou seja, aciculares tal como no revestimento só de fosfatos mas que tendem a crescer numa direção preferencial. Nestas imagens, é também, possível observar algumas estruturas hexagonais. De acordo com a literatura essas estruturas podem ser fosfato de magnésio pois de acordo com Tamimi, *F., et al.* para valores de pH e temperatura idênticos aos utilizados neste estudo é esperado que este se forme fosfatos de magnésio com umas estruturas idênticas às observadas nas figuras 3.14A e A1 [54]. No entanto, segundo Tamimi, *F., et al.* pequenas variações nas condições experimentais (pH, temperatura, ou concentração de fosfatos) são suficientes para obter estruturas com morfologias muito diferentes. Observa-se também que o revestimento obtido cobre totalmente a superfície não sendo visível qualquer irregularidade que possa advir do substrato.

O revestimento de fosfatos com HAp e grafeno depositado na liga AZ31 (figuras 3.14B e B1), é composto por estruturas ramificadas semelhantes às observadas no revestimento de fosfatos só com HAp. No entanto, são também visíveis algumas folhas na superfície da amostra (figura 3.14C). A presença dessas folhas sub-micrométricas, são indicativas da presença de óxido de grafeno no revestimento. Segundo a literatura o óxido de grafeno apresenta uma morfologia semelhante a descrita [41, 55].

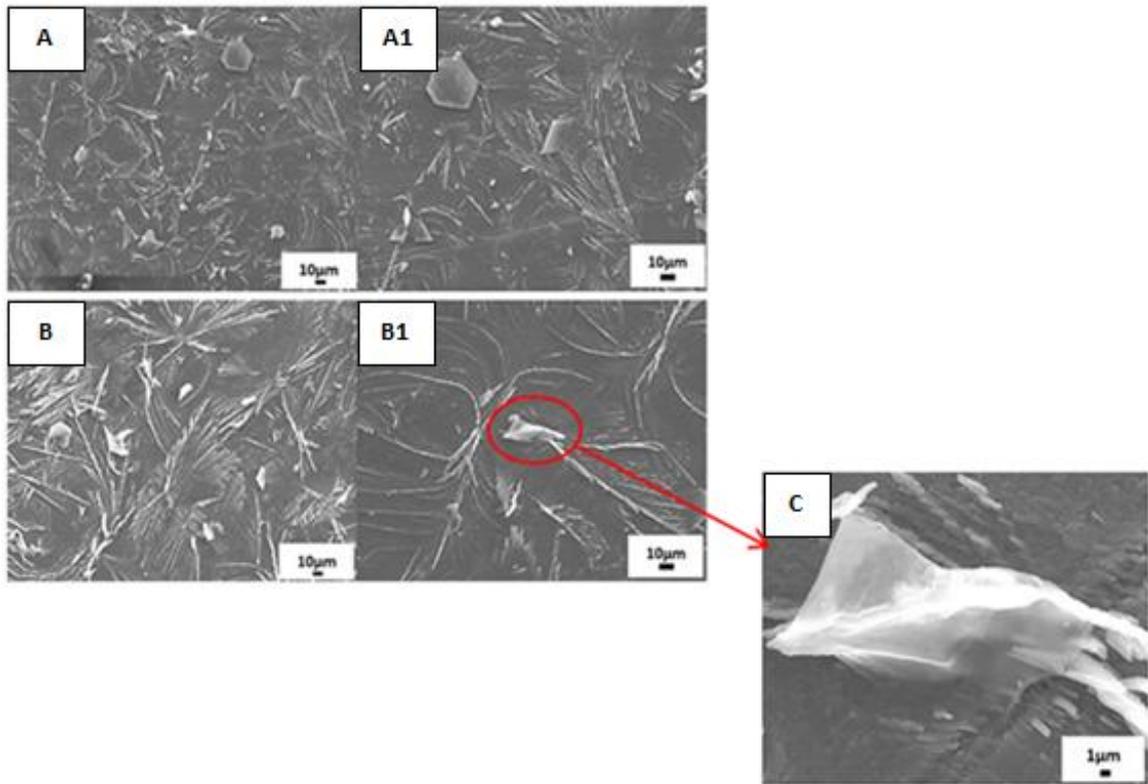


Figura 3. 14 - Imagens de SEM do revestimento com fosfato e HAp (A,A1) e com fosfato, HAp e grafeno (B, B1) na liga AZ31. Ampliação de uma folha de Go presente no revestimento com fosfato, HAp e GO (C)

Na figura 3.15A pode observar-se uma das estruturas hexagonais presentes no revestimento. Na figura 3.15B comprova-se que estas estruturas são correspondentes a fosfatos pois o sinal de fosfato tem maior intensidade nesta zona. Pode também observar-se que a amostra esta toda revestida por fosfato. Na figura 3.15C está presente o sinal do magnésio emitido pelo substrato, a partir da observação desta imagem comprova-se que o revestimento é pouco espesso pois o substrato é detetado em toda a superfície. Na figura 3.15D está visível o sinal do elemento oxigénio emitido.

Na figura 3.16 está representada a análise EDS em que se comprova que os elementos presentes no revestimento são o magnésio (Mg), o fosfato (P), o oxigénio (O) e o potássio (K). A presença deste último elemento, deve-se ao hidróxido de potássio (KOH) utilizado para ajustar a solução de fosfatos a pH10.

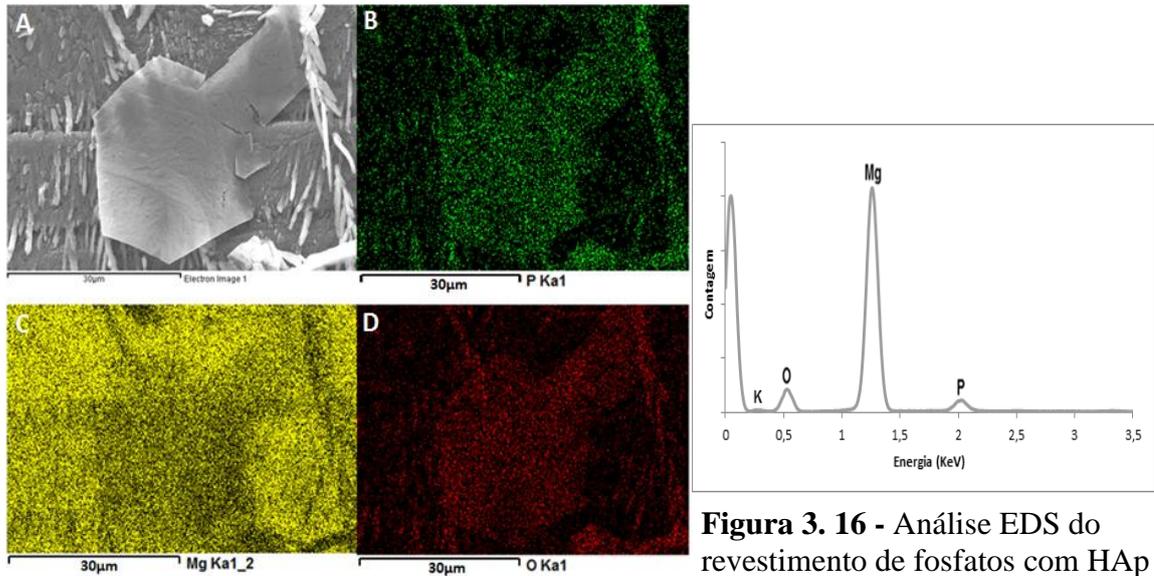


Figura 3. 15 - Imagem SEM do revestimento de fosfatos com HAp na liga AZ31 (A) e mapa EDX do fosfato, magnésio e oxigénio, respetivamente (B, C e D)

Figura 3. 16 - Análise EDS do revestimento de fosfatos com HAp na liga AZ31

Na figura 3.17A observa-se uma folhas do óxido de grafeno presente na liga AZ31 como referido anteriormente. Na figura 3.17 (B,C,D,E) é possível observar os mapas EDX dos vários elementos constituintes dos revestimentos. O sinal de carbono, que corresponde à presença de óxido de grafeno, é visível na figura 3.17B com mais intensidade na zona da folha de GO. Este sinal deve-se também ao facto das amostras terem sido revestidas com carbono para serem caracterizadas por SEM. Na figura 3.17C está representado o sinal do elemento de fosfato que é detetado em toda a superfície e com maior intensidade em algumas zonas da folha de GO. Na figura 3.17D está presente o sinal do magnésio proveniente do substrato em estudo verificando-se que na zona onde existe a folha de GO este demonstra menos intensidade. Por fim, na figura 3.17E está representado o sinal do oxigénio.

Na figura 3.18 está representada a análise EDS para esta mesma zona da amostra em que se comprova que os elementos presentes no revestimento são o carbono (C), o magnésio (Mg), o fosfato (P), o oxigénio (O) e o potássio (K).

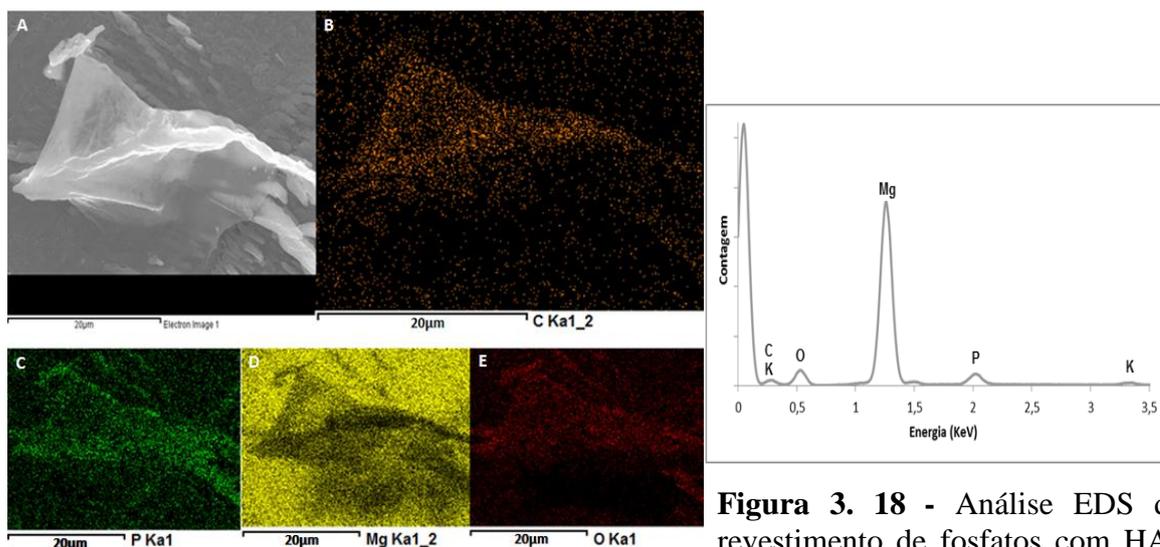


Figura 3. 17 - Imagem SEM do revestimento de Fosfatos com HAp e grafeno na liga AZ31 (A) e mapa EDX do carbono, fósforo, magnésio e oxigênio, respectivamente (B, C,D e E)

Figura 3. 18 - Análise EDS do revestimento de fosfatos com HAp e grafeno na liga AZ31

3.3.2. MgUP

Nas figuras 3.19A e A1 está representado o revestimento de fosfatos com HAp no MgUP. Analisando a morfologia deste revestimento observa-se que é composto por estruturas arbóreas e de maiores dimensões em comparação com o mesmo revestimento depositado na liga AZ31. Como se pode observar as ramificações principais têm um crescimento numa direção preferencial e apresentam um comprimento de $\approx 60 \mu\text{m}$ enquanto que as ramificações secundárias são menores, possuem tamanhos da ordem dos $10 \mu\text{m}$. Observa-se também cobertura total da superfície.

A morfologia do revestimento de fosfatos com HAp e GO obtido no MgUP, está representada nas figuras 3.19B e B1. A superfície está totalmente coberta por este revestimento, no entanto, apresenta alterações em relação ao revestimento de fosfato com HAp dado que as estruturas deixam de possuir ramificações secundárias (figura 3.19B). São visíveis, também, na superfície da amostra alguns defeitos originados pela etapa de desbaste e polimento o que pode significar que o revestimento obtido é mais fino. Na figura 3.19B1 é possível observar, também, folhas de óxido de grafeno. Detalhes da morfologia do GO encontra-se presente na figura 3.19C.

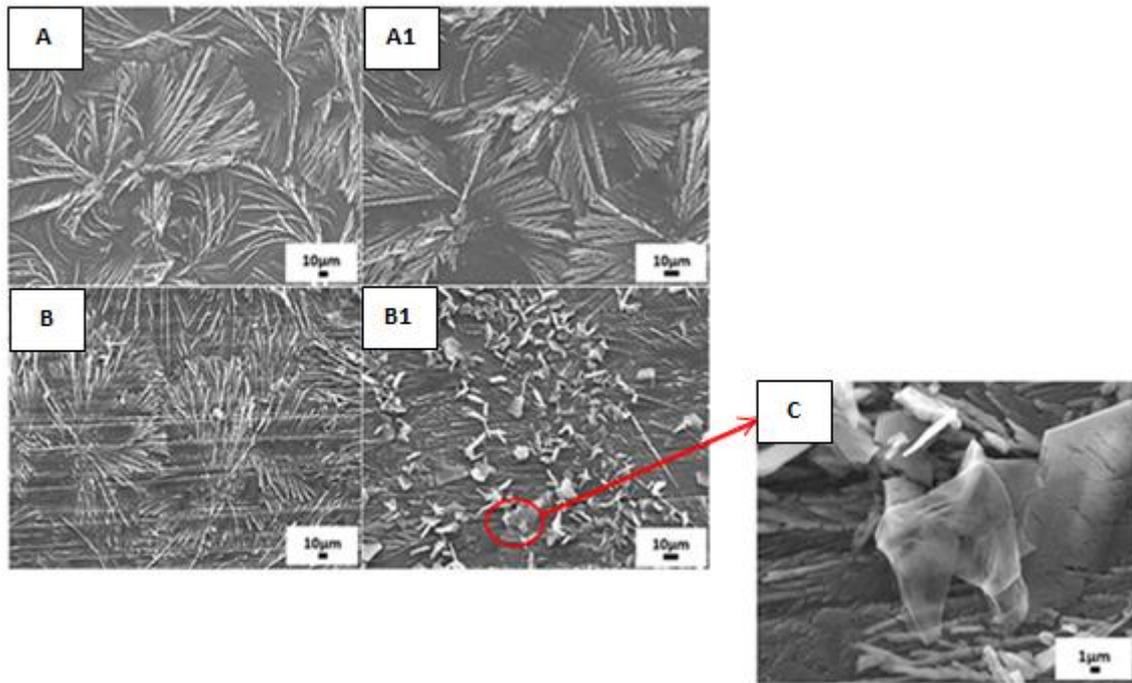


Figura 3. 19 - Imagens de SEM do revestimento com fosfato e HAp (A,A1) e com fosfato, HAp e grafeno (B, B1) no MgUP. Ampliação de uma folha de GO presente no revestimento com fosfato, HAp e GO (C)

Estes revestimentos foram analisados com maior detalhe por microscopia electronica de varrimento. Na figura 3.20 é possível observar uma das ramificações, ou seja, uma das estruturas tubulares presentes nos revestimentos de fosfatos com HAp. Através de imagens TEM, na figura 3.20A1 e A3 é igualmente possível visualizar algumas das nanopartículas de hidroxiapatite, partículas essas que não eram detectadas nas análises de SEM devido ao seu tamanho muito reduzido e de não se encontrarem aglomeradas. Por fim, na figura 3.20A2 e A3 é visível que o revestimento se mantém poroso, mas o tamanho de poros é menor.

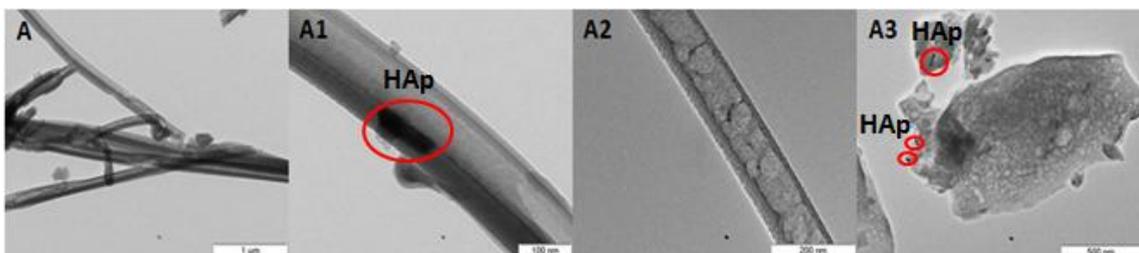


Figura 3. 20- Imagens TEM de uma das estruturas ramificadas constituinte do revestimento com nanopartículas de hidroxiapatite (A,A1,A2, A3)

Para comprovar que as nanopartículas identificadas eram de hidroxiapatite, foi feita uma análise TEM/EDS (figura 3.21) em que foi identificado o elemento cálcio, o que significa que existe hidroxiapatite no revestimento pois esta é um fosfato de cálcio e é o único constituinte com cálcio existente no eletrólito.

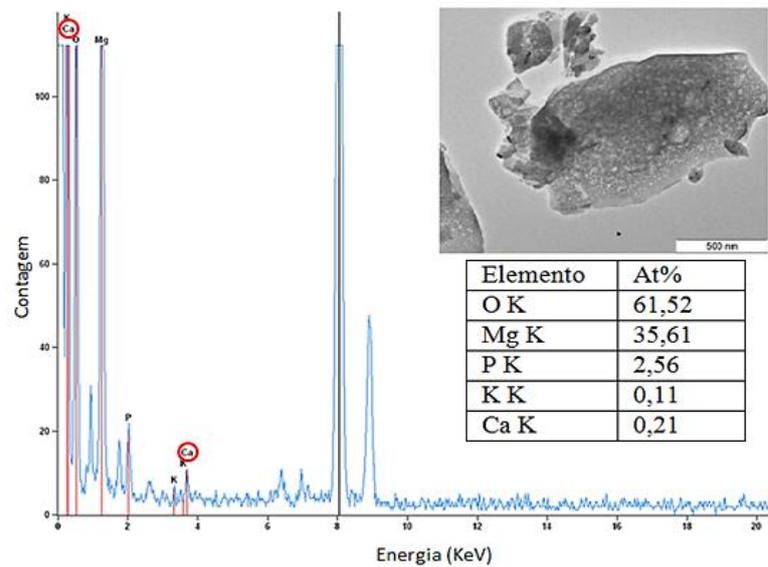


Figura 3. 21- Análise EDS do revestimento com fosfato e HAp

Na figura 3.22A está representada uma das folhas de GO visíveis no MgUP. Nas figuras 3.22 (B,C,D e E) é possível observar os sinais dos diferentes elementos detetados. Na figura 3.22B é visível o sinal de carbono com maior intensidade na zona da estrutura referida o que comprova que se trata de uma folha de GO. Na figura 3.22C verifica-se que o sinal de fosfato é detetado em toda a superfície, ou seja, confirma-se que a amostra está totalmente revestida por fosfato. A detecção do sinal do magnésio está representada na figura 3.22D em que se verifica que o revestimento obtido é pouco espesso pois este elemento é detetado em toda a superfície apresentando menos intensidade nas zonas onde está presente a folha de GO. Por fim, está representado o sinal de oxigénio detetado no revestimento (figura 3.22E).

Na figura 3.23 está representada a análise EDS em que se comprova que os elementos presentes no revestimento são o carbono (C), o magnésio (Mg), o fosfato (P), o oxigénio (O) e o potássio (K).

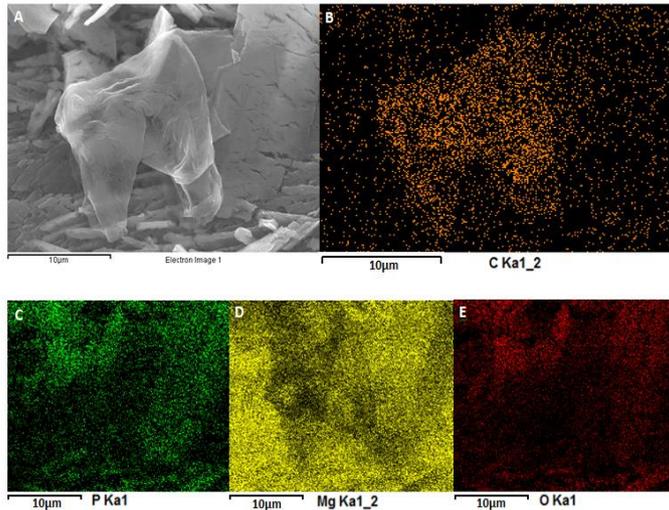


Figura 3. 22 - Imagem SEM do revestimento de fosfatos com HAp e grafeno no MgUP (A) e mapa EDX do carbono, fosfato, magnésio e oxigénio, respetivamente (B, C,D e E)

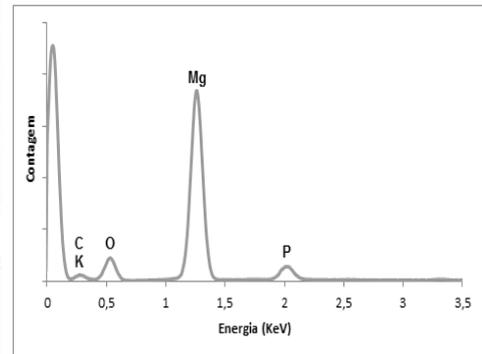


Figura 3. 23 - Análise EDS do revestimento de fosfatos com HAp e grafeno no MgUP

O resultado da análise do revestimento com fosfato, HAp e grafeno da liga AZ31 e do MgUP por espectroscopia de Raman de modo a comprovar a existência de fosfato e grafeno está presente na figura 3.24. A partir desta análise foram identificadas, segundo a literatura, as bandas Raman dos fosfatos e as respetivas bandas D e G referentes ao grafeno [56, 57] o que significa que como pretendido o revestimento é constituído por estes elementos. Os picos de Raman característicos dos fosfatos, em ambos os substratos (AZ31 e MgUP), apresentam-se no espectro a comprimentos de onda de 558 cm^{-1} e 945 cm^{-1} e, por sua vez, os picos característicos do grafeno apresentam-se a comprimentos de onda de 1344 cm^{-1} e 1597 cm^{-1} que representam as bandas D e G, respetivamente. A banda D deve-se a vibrações dos átomos de carbono com ligações pendentes nas terminações planas da grafite desordenada e a banda G, por sua vez, deve-se à vibração da ligação sp^2 dos átomos de carbono [35]. Verifica-se, também, que os picos de Raman dos fosfatos estão mais definidos na liga AZ31 e os picos de Raman do grafeno demonstram maior intensidade no MgUP.

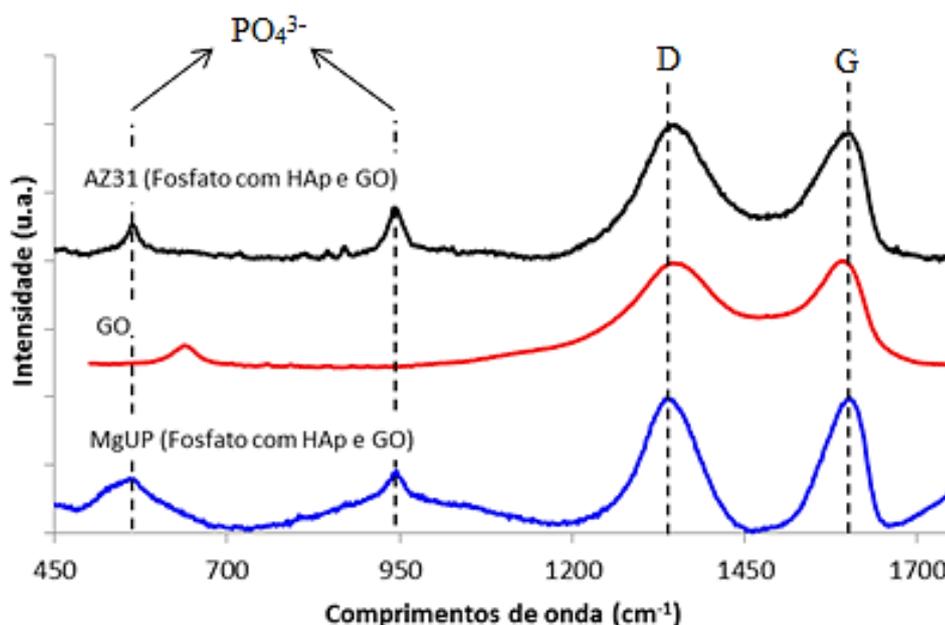


Figura 3. 24 - Espectro de Raman da liga AZ31 e do MgUP revestidos com fosfatos, HAp e grafeno

3.3.3. Molhabilidade

Neste estudo o líquido utilizado foi a água bidestilada e os substratos a liga AZ31 e o MgUP. Os testes de molhabilidade foram realizados para todos os tipos de revestimento em ambos os substratos.

A figura 3.25 mostra a média dos valores do ângulo de contacto medido e do desvio padrão obtidos para os três tipos de revestimentos e para a liga AZ31 sem revestimento. A liga AZ31 sem revestimento apresenta um ângulo de contacto de 51°. Os revestimentos de fosfatos, fosfatos com HAp e fosfatos com HAp e GO apresentam ângulos de contacto de 26°, 18° e 26°, respectivamente. De acordo com a literatura sabe-se que quanto maior o ângulo de contacto menor é a molhabilidade logo a liga AZ31 é a que apresenta menor molhabilidade e o revestimento de fosfatos com HAp o que possui maior molhabilidade tornando a superfície mais hidrofílica. No entanto, todos os valores medidos revelam que existe molhabilidade da liga AZ31 e dos revestimentos por parte da água [50].

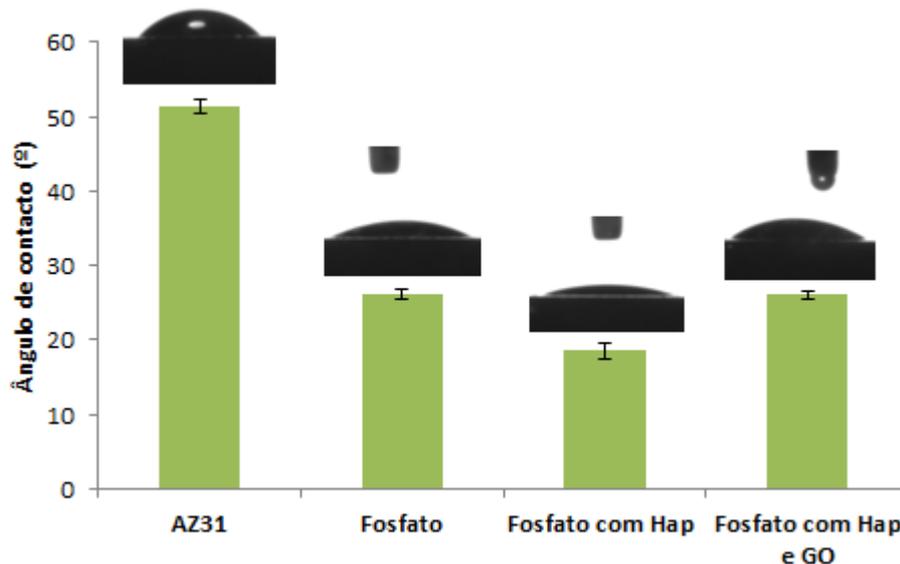


Figura 3. 25 - Variação dos ângulos de contacto da água coma liga AZ31 sem revestimento e com os revestimentos de fosfato, fosfato com HAp e fosfato com HAp e grafeno

As medidas dos ângulos de contacto do MgUP sem revestimento e com os diferentes tipos de revestimentos estão representadas na figura 3.26. O MgUP sem revestimento possui um ângulo de contacto com a água de 61,5°. Os revestimentos de fosfatos, fosfatos com HAP e fosfatos com HAp e GO no MgUP apresentam ângulos de contacto de 21°, 19° e 30°, respetivamente. Através da análise das medidas obtidas verifica-se que o MgUP sem revestimento apresenta menor molhabilidade seguindo-se o revestimento de fosfatos com HAp e GO, o revestimento com fosfato e por fim o revestimento de fosfatos com HAp que é o que apresenta maior molhabilidade. O revestimento de fosfatos com HAp e GO apresenta um ângulo de contacto com a água superior aos restantes revestimentos devido ao GO ser hidrofóbico.

Fazendo uma análise comparativa entre os resultados obtidos para ambos os substratos verifica-se que o MgUP é mais hidrofóbico que a liga AZ31 pois possui menor molhabilidade. Em relação aos revestimentos o comportamento é idêntico em ambos os substratos sendo os revestimentos de fosfatos com HAp os que apresentam maior molhabilidade e conseqüente tornam a superfície mais hidrofílica.

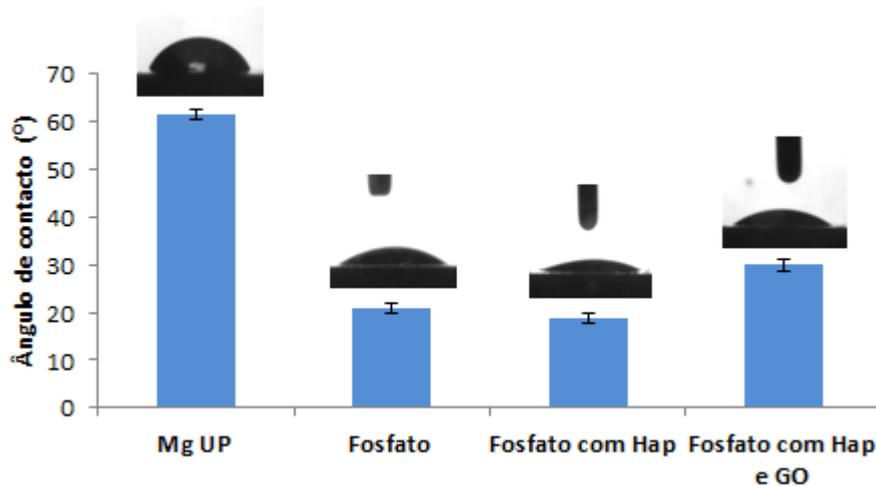


Figura 3. 26 - Variação dos ângulos de contacto da água como MgUP sem revestimento e com os revestimentos de fosfato, fosfato com HAp e fosfato com HAp e grafeno

Segundo diversos autores a medida do grau de molhabilidade é um dos parâmetros de avaliação da biocompatibilidade: quanto maior a molhabilidade, maior será a interação da superfície do implante com o ambiente biológico [49]. Neste caso, comprova-se que tanto ao revestir a superfície da liga AZ31 como o MgUP a molhabilidade vai ser superior, o que pode significar que ao utilizar estes tipos de revestimentos em implantes biodegradáveis a interação entre a superfície destas e o ambiente fisiológico vai também ser superior.

3.3.4. Degradação em condições fisiológicas

Para avaliar a taxa de degradação da liga AZ31 e do MgUP e dos diferentes revestimentos desenvolvidos foram efetuados ensaios de degradação em condições fisiológicas utilizando uma solução simuladora do fluido humano, SBF (pH 7,4 e 37°C).

Na figura 3.27, estão representadas as curvas de potencial de circuito aberto (OCP) obtidas para a amostra de AZ31 sem revestimento e para as amostras com revestimento de fosfatos, fosfatos com HAp e fosfatos com HAp e GO. A partir da observação da evolução do potencial com o tempo pode verificar-se que as amostras revestidas apresentam todas potenciais mais nobres que a amostra sem revestimento. Verifica-se ainda que o revestimento com fosfato, HAp e grafeno inicialmente tem

potenciais mais nobres que as revestidas com fosfato e com fosfato e HAp mas, no entanto, ao final dos 300 s tendem a convergir para o mesmo valor de potencial de cerca de -1,80 V.

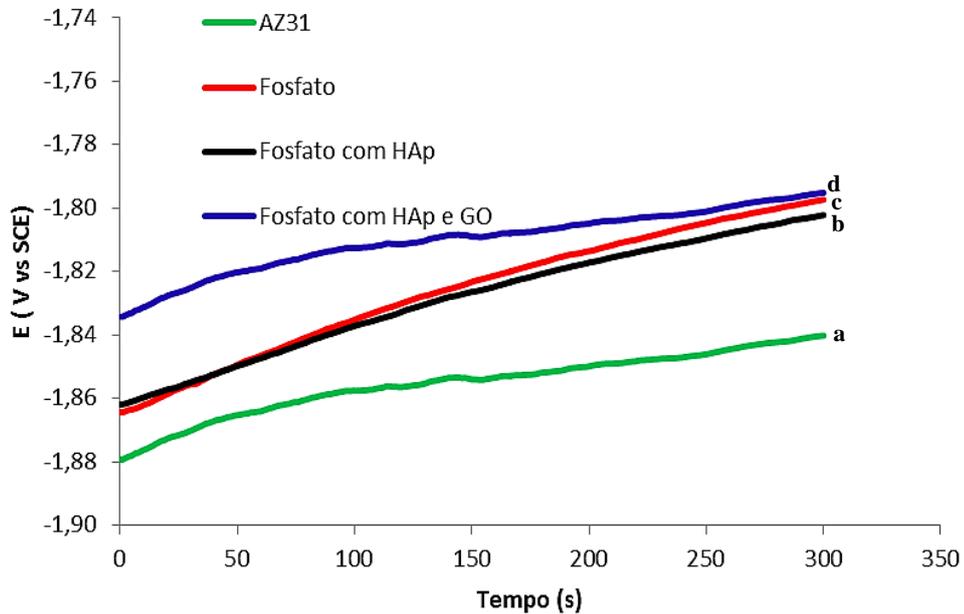


Figura 3. 27 - Curvas OCP dos diferentes revestimentos na liga AZ31 em que: a) sem revestimento, b) fosfato com HAp, c) fosfato e d) fosfato com HAp e GO

Na figura 3.28, estão representadas as curvas de polarização em SBF obtidas para a amostra sem revestimento e para todos os diferentes revestimentos em estudo. A partir das curvas pode observar-se que a amostra sem revestimento apresenta um E_{corr} de -1,84 V semelhante a alguns valores encontrados na literatura [58, 59]. Por sua vez, as amostras com revestimento de fosfatos, de fosfatos com HAp e de fosfatos com HAp e GO apresentam um E_{corr} de -1,79 V, -1,79 V e -1,80 V, respetivamente. A deslocação do potencial de corrosão das amostras revestidas para potenciais mais nobres significa que a taxa de degradação da liga AZ31 diminui, ou seja, esta torna-se mais resistente à corrosão em SBF quando revestida. Em relação, aos valores de densidade de corrente verifica-se que também diminuem com o revestimento da liga, independentemente, de qual seja o tipo de revestimento o que comprova que a liga AZ31 fica menos susceptível à corrosão após ser revestida. O revestimento de fosfato com HAp e GO é o que apresenta valores de densidade de corrente mais baixas o que

vai de encontro a estudos já realizados que afirmam que a presença de GO torna o revestimento mais resistente à corrosão [34].

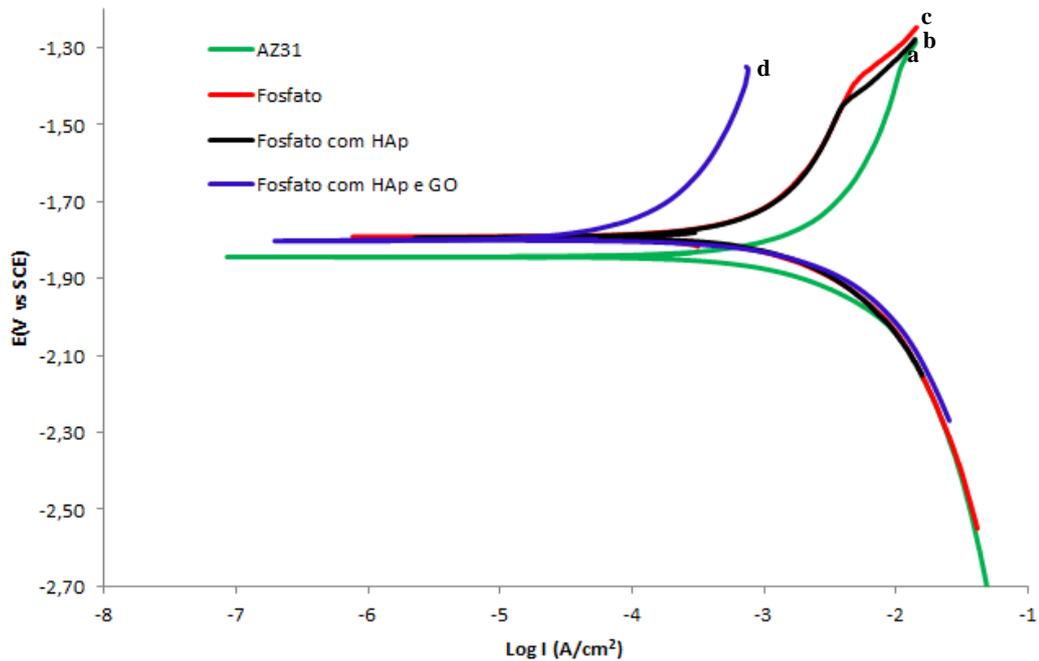


Figura 3. 28 - Curvas de polarização dos diferentes revestimentos na liga AZ31 em que: a) sem revestimento, b) fosfato com HAp, c) fosfato e d) fosfato com HAp e GO

As curvas OCP obtidas para o MgUP (figura 3.29), mostram tal como na liga AZ31 que as amostras revestidas, inicialmente, têm potenciais mais nobres quando comparadas à amostra sem revestimento. A amostra de MgUP revestida com fosfato e HAp é a que apresenta inicialmente um potencial mais nobre seguindo-se a amostra revestida com fosfato e depois a revestida com fosfato, HAp e grafeno. Apesar de inicialmente todas as amostras apresentarem diferentes potenciais, ao fim de 300 s todas as amostras tendem a convergir para o mesmo potencial de cerca de -2,01 V. Fazendo uma comparação entre o MgUP e a liga AZ31 verifica-se que esta última apresenta potenciais mais nobres quer para a amostra sem revestimento como para as amostras com os diferentes tipos de revestimento.

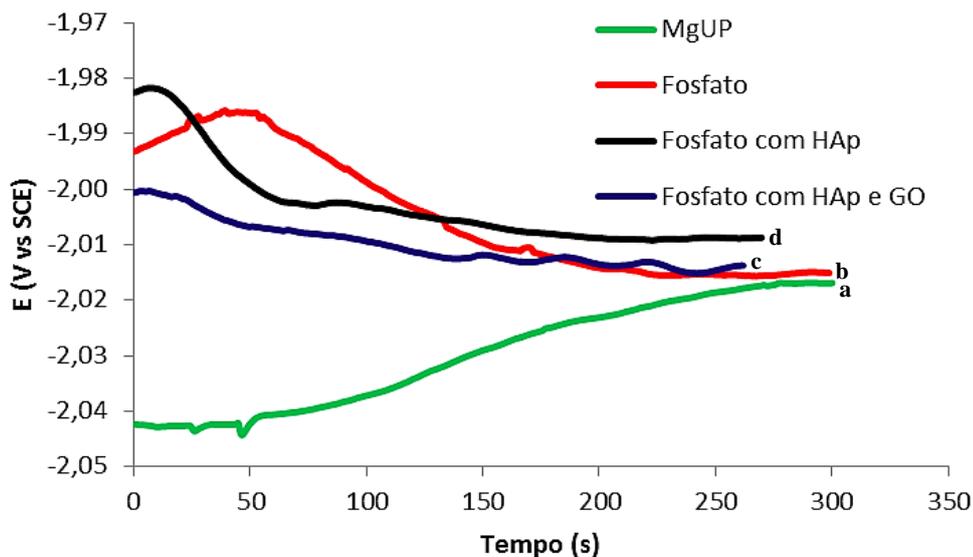


Figura 3. 29 - Curvas de OCP dos diferentes revestimentos no MgUP em que: a) sem revestimento, b) fosfato, c) fosfato com HAp e GO e d) fosfato com HAp

Na figura 3.30, estão representadas as curvas de polarização obtidas em SBF para o MgUP. Verifica-se que para este substrato ao nível do potencial de corrosão não existem alterações significativas. A amostra sem revestimento apresenta um E_{corr} de -2,00 V que vai de encontro a resultados de outros autores em que o E_{corr} varia entre -1,96 a -2,00 V [4, 60]. As amostras com revestimento de fosfatos, fosfatos com HAp e fosfatos com HAp e GO apresentam um E_{corr} de -2,02 V, -2,01 V e -2,01 V, respetivamente. Segundo os dados obtidos pode afirmar-se que ao revestir o MgUP não vão existir alterações significativas ao nível do valor do potencial de corrosão.

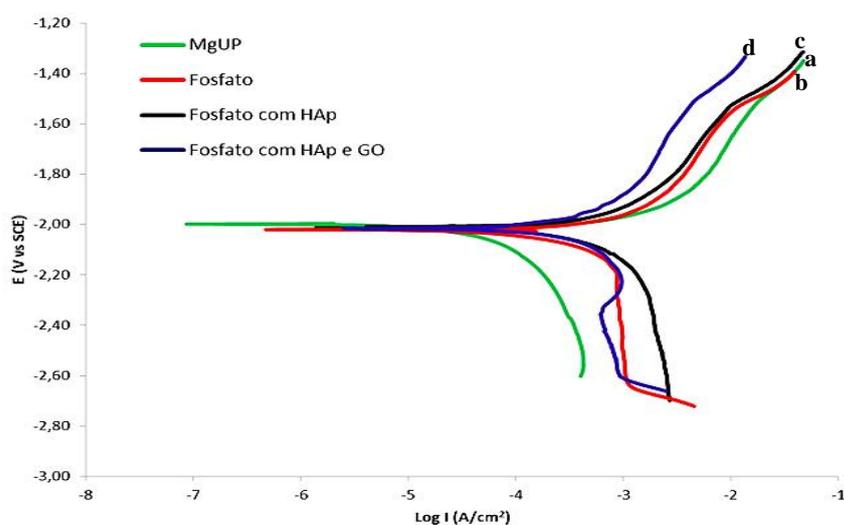


Figura 3. 30 - Curvas de polarização dos diferentes revestimentos no MgUP em que: a) sem revestimento, b) fosfato, c) fosfato com HAp e d) fosfato com HAp e GO

Comparando os valores de densidade de corrente anódica observa-se que estes são menores para as amostras com revestimento sendo a amostra com revestimento de fosfatos com HAp e GO a que apresenta valores menores, tal como já verificado na liga AZ31 [34]. A diminuição dos valores de densidade de corrente resultante do revestimento das amostras revela que, apesar do potencial de corrosão não se alterar, existe uma tendência para a diminuição da taxa de degradação do MgUP.

Apesar do MgUP mesmo com revestimento apresentar uma taxa de degradação elevada *in vitro* não significa que *in vivo* esse comportamento se mantenha. Um estudo recente relata que este tipo de material tem um bom comportamento à corrosão *in vivo* apresentando uma taxa de corrosão inferior à obtida *in vitro* [9].

Conclusão

Desenvolveu-se em MgUP e na liga AZ31 biodegradáveis, pelo processo de eletrodeposição/eletroforese, simultaneamente e num só passo, um revestimento inovador de fosfato com nanopartículas de hidroxiapatite e óxido de grafeno.

Os revestimentos foram depositados à temperatura ambiente controlando a composição do eletrólito, o potencial e o tempo de deposição.

Os revestimentos desenvolvidos à base de fosfato, em substratos biodegradáveis de MgUP e na liga AZ31, apresentam uma morfologia acicular, tridimensional e arbórea, com cobertura total da superfície.

A morfologia do revestimento de fosfato com HAp, na liga AZ31, apresentou estruturas semelhantes ao revestimento de fosfato que tendem a crescer numa direção preferencial. O revestimento de fosfato com HAp e GO é composto pelas mesmas estruturas ramificadas contendo folhas submicrométricas de GO.

Em relação ao MgUP, a morfologia do revestimento de fosfatos com HAp apresentou estruturas arbóreas com uma ramificação principal e ramificações secundárias e de maiores dimensões em comparação com o mesmo revestimento depositado na liga AZ31. No revestimento de fosfatos com HAp e GO as estruturas deixam de possuir ramificações secundárias e são visíveis folhas de GO.

As medidas de ângulo de contacto realizadas mostraram que ao revestir a superfície da liga AZ31 e do MgUP a molhabilidade aumenta. O ângulo de contacto do revestimento de fosfatos e fosfatos com HAp diminui para cerca de metade do valor do ângulo de contacto de ambos os substratos. O revestimento de fosfatos com HAp é o que apresenta o menor ângulo de contacto, em ambos os substratos, e logo maior molhabilidade. Estes resultados podem significar que a interação entre a superfície de implantes revestidos e o ambiente fisiológico pode ser também superior.

Após os ensaios eletroquímicos em condições fisiológicas verificou-se que para o revestimento da superfície da liga AZ31 o potencial de corrosão se desloca para potenciais mais nobres e os valores de densidade de corrente anódica diminuem cerca de duas ordens de grandeza, ou seja, existe uma redução da taxa de degradação. Quanto

ao MgUP verificou-se que ao revestir este substrato não vão existir alterações significativas ao nível do valor do potencial de corrosão mas que os valores de densidade de corrente anódica diminuem ligeiramente. A diminuição da densidade de corrente de cerca de duas ordens de grandeza do revestimento de fosfato com HAp e GO revela que existe uma diminuição da taxa de degradação.

Estes resultados demonstram que ao formar superfícies biodegradáveis (revestimentos) no Mg e suas ligas a taxa de degradação vai tornar-se mais lenta levando ao aumento de durabilidade do implante. Este método é bastante útil clinicamente pois não apresenta efeitos clínicos adversos, não necessita da realização de uma segunda cirurgia e contribui para uma redução de custos na saúde pública.

Trabalhos Futuros

Na sequência deste trabalho surgiram alguns aspetos que seriam interessantes estudar como o efeito da composição dos revestimentos na resposta celular, avaliar o comportamento *in vivo* dos revestimentos funcionalizados e estudar a sua genotoxicidade.

Seria também interessante, utilizar no desenvolvimento dos revestimentos nanopartículas de hidroxiapatite comerciais em substituição das sintetizadas.

Bibliografia

1. Witte, F., *The history of biodegradable magnesium implants: a review*. Acta Biomater, 2010. **6**(5): p. 1680-92.
2. Judas, F., H. Figueiredo, and R. Dias, *Biomateriais em Cirurgia Ortopédica Reconstitutiva*. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2009.
3. Hornberger, H., S. Virtanen, and A.R. Boccaccini, *Biomedical coatings on magnesium alloys - a review*. Acta Biomater, 2012. **8**(7): p. 2442-55.
4. Wu, G., J.M. Ibrahim, and P.K. Chu, *Surface design of biodegradable magnesium alloys — A review*. Surface and Coatings Technology, 2013. **233**: p. 2-12.
5. Bakhsheshi-Rad, H., et al., *Effect of fluoride treatment on corrosion behavior of Mg-Ca binary alloy for implant application*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2013: p. 699-710.
6. Li, N. and Y. Zheng, *Novel Magnesium Alloys Developed for Biomedical Application: A Review*. Journal of Materials Science & Technology, 2013. **29**(6): p. 489-502.
7. Song, G., *Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys*. Corrosion Science, 2007. **49**(4): p. 1696-1701.
8. Gu, X.-N. and Y.-F. Zheng, *A review on magnesium alloys as biodegradable materials*. Frontiers of Materials Science in China, 2010. **4**(2): p. 111-115.
9. Abidin, N., et al., *The in vivo and in vitro corrosion of high-purity magnesium and magnesium alloys WZ21 and AZ91*. Corrosion Science, 2013. **75**: p. 354-366.
10. Bakhsheshi-Rad, H.R., et al., *Effect of fluoride treatment on corrosion behavior of Mg-Ca binary alloy for implant application*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2013. **23**(3): p. 699-710.
11. Shadanbaz, S. and G.J. Dias, *Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review*. Acta Biomater, 2012. **8**(1): p. 20-30.
12. Corni, I., M.P. Ryan, and A.R. Boccaccini, *Electrophoretic deposition: From traditional ceramics to nanotechnology*. Journal of the European Ceramic Society, 2008. **28**(7): p. 1353-1367.
13. Besra, L. and M. Liu, *A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD)*. Progress in Materials Science, 2007. **52**(1): p. 1-61.
14. Ishizaki, T., I. Shigematsu, and N. Saito, *Anticorrosive magnesium phosphate coating on AZ31 magnesium alloy*. Surface and Coatings Technology, 2009. **203**(16): p. 2288-2291.
15. Song, Y., et al., *Formation mechanism of phosphate conversion film on Mg-8.8Li alloy*. Corrosion Science, 2009. **51**(1): p. 62-69.
16. Xue-jun, C., et al., *Phosphate film free of chromate, fluoride and nitrite on AZ31 magnesium alloy and its corrosion resistance* Trans. Nonferrous Met. Soc. China 2012. **22**: p. 2713-2718.
17. Amini, R. and A.A. Sarabi, *The corrosion properties of phosphate coating on AZ31 magnesium alloy: The effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) as an eco-friendly accelerating agent*. Applied Surface Science, 2011. **257**(16): p. 7134-7139.
18. Chun-Yan, Z., et al., *Comparison of calcium phosphate coatings on Mg-Al and Mg-Ca alloys and their corrosion behavior in Hank's solution*. Surface and Coatings Technology, 2010. **204**(21-22): p. 3636-3640.
19. Song, Y., et al., *Electrodeposition of Ca-P coatings on biodegradable Mg alloy: in vitro biomineralization behavior*. Acta Biomater, 2010. **6**(5): p. 1736-42.
20. Ou, C., et al., *Effect of Ca and P Ion Concentrations on the Structural and Corrosion Properties of Biomimetic Ca-P Coatings on ZK60 Magnesium Alloy*. Int. J. Electrochem. Sci, 2013.
21. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphate coatings on magnesium and its biodegradable alloys*. Acta Biomater, 2014. **10**(7): p. 2919-34.

22. Ferraz, M.P., F.J. Monteiro, and C.M. Manuel, *Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies*. Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics, 2004.
23. Jamesh, M., S. Kumar, and T.S.N. Sankara Narayanan, *Electrodeposition of hydroxyapatite coating on magnesium for biomedical applications*. Journal of Coatings Technology and Research, 2011. **9**(4): p. 495-502.
24. Wang, C., et al., *Thick hydroxyapatite coatings by electrophoretic deposition*. Materials Letters 57 (2002) 99–105, 2002.
25. Wen, C., et al., *Characterization and degradation behavior of AZ31 alloy surface modified by bone-like hydroxyapatite for implant applications*. Applied Surface Science, 2009. **255**(13-14): p. 6433-6438.
26. Rojaee, R., M. Fathi, and K. Raeissi, *Electrophoretic deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on AZ91 magnesium alloy implants with different surface treatments*. Applied Surface Science, 2013. **285**: p. 664-673.
27. Mondragón-Cortez, P. and G. Vargas-Gutiérrez, *Selective Deposition of Hydroxyapatite Nanoparticles by Electrophoretic Deposition*. Advanced Engineering Materials, 2003.
28. M., F.-R. and S. T., *Effect of suspension medium on the electrophoretic deposition of hydroxyapatite nanoparticles and properties of obtained coatings*. Ceramics International 40 3031-3039, 2014.
29. Fabbri, P., et al., *45S5 Bioglass(R)-derived scaffolds coated with organic-inorganic hybrids containing graphene*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013. **33**(7): p. 3592-600.
30. Singh, B.P., et al., *The production of a corrosion resistant graphene reinforced composite coating on copper by electrophoretic deposition*. Carbon, 2013. **61**: p. 47-56.
31. Chen, D., H. Feng, and J. Li, *Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications*. Chem Rev, 2012. **112**(11): p. 6027-53.
32. Kauppila, J. V. (s.d.). *www.utu.fi. Obtido de Turun Yliopisto University of Turku: <http://www.utu.fi/en/units/sci/units/chemistry/research/mcca/Pages/Sub-pages%20of%20Functional%20Materials/Graphenes.aspx>*
33. Li, M., et al., *Electrophoretic deposition and electrochemical behavior of novel graphene oxide-hyaluronic acid-hydroxyapatite nanocomposite coatings*. Applied Surface Science, 2013. **284**: p. 804-810.
34. Li, M., et al., *Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications*. Carbon, 2014. **67**: p. 185-197.
35. Veerapandian, M., et al., *Synthesis, characterization and electrochemical properties of functionalized graphene oxide*. Carbon, 2012. **50**(11): p. 4228-4238.
36. Kwok, C.T., et al., *Characterization and corrosion behavior of hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V fabricated by electrophoretic deposition*. Applied Surface Science, 2009. **255**(13-14): p. 6736-6744.
37. Song, Y.W., D.Y. Shan, and E.H. Han, *Electrodeposition of hydroxyapatite coating on AZ91D magnesium alloy for biomaterial application*. Materials Letters, 2008. **62**(17-18): p. 3276-3279.
38. Wang, H.X., et al., *In vitro degradation and mechanical integrity of Mg-Zn-Ca alloy coated with Ca-deficient hydroxyapatite by the pulse electrodeposition process*. Acta Biomater, 2010. **6**(5): p. 1743-8.
39. Caldeira, J., *Estudo da Resistência à Corrosão de Ligas de Magnésio para a Indústria Automóvel*. Tese de Mestrado em Engenharia Mecânica. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa,, 2011.
40. Santos, C., et al., *Relevance of the sterilization-induced effects on the properties of different hydroxyapatite nanoparticles and assessment of the osteoblastic cell response*. J R Soc Interface, 2012. **9**(77): p. 3397-410.
41. Graphenea. *Graphene Oxide (GO) Product Datasheet [online]*. . In the Graphenea Homepage. [Consult. 28 Julho 2014] Disponível em:<<http://www.graphenea.com/collections/graphene-oxide>>.

42. van der Biest, O., et al., *Electrophoretic deposition for coatings and free standing objects*. Journal of Materials Science, 2004. **39**(3): p. 779-785.
43. Farrokhi-Rad, M. and T. Shahrabi, *Effect of suspension medium on the electrophoretic deposition of hydroxyapatite nanoparticles and properties of obtained coatings*. Ceramics International, 2014. **40**(2): p. 3031-3039.
44. Egerton, R.F., *Physical principles of electron microscopy : an introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer, 2005: p. 17-25.
45. Goldstein, J.I., et al., *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. A text for biologists, materials scientists, and geologists*. 1981: Plenum Publishing Corporation.
46. Williams, D.B. and C.B. Carter, *Transmission Electron Microscopy*. Plenum Press, New York, 1996.
47. Smith, E. and G. Dent, *Introduction, Basic Theory and Principles*, in *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. 2005, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-21.
48. Payne, C. and A.R. Barron, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Study of Surface Chemistry*. Physical Methods in Chemistry and Nano Science, 2014.
49. Kwok, D.Y. and A.W. Neumann, *Contact angle measurement and contact angle interpretation*. Advances in Colloid and Interface Science, 1999. **81**(3): p. 167-249.
50. Rahaman, M.N., *Ceramic Processing and Sintering Rahaman*. 2^a ed. 2003, New York, EUA: Marcel Dekker.
51. Yuan, Z., W.L. Huang, and K. Mukai, *Wettability and reactivity of molten silicon with various substrates*. Applied Physics A, 2004. **78**(4): p. 617-622.
52. Kokubo, T., et al., *Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3*. Journal of Biomedical Materials Research, 1990. **24**(6): p. 721-734.
53. Guan, S., et al., *Mg Alloys Development and Surface Modification for Biomedical Application*. Magnesium Alloys - Corrosion and Surface Treatments, Frank Czerwinski (Ed.), 2011.
54. Tamimi, F., et al., *Biocompatibility of magnesium phosphate minerals and their stability under physiological conditions*. Acta Biomaterialia, 2011(7): p. 2678–2685.
55. Li, C., J. Adamcik, and R. Mezzenga, *Biodegradable nanocomposites of amyloid fibrils and graphene with shape-memory and enzyme-sensing properties*. Nature NanoTechnology, 2012. **Vol 7**.
56. Buchwald, T., et al., *Identifying compositional and structural changes in spongy and subchondral bone from the hip joints of patients with osteoarthritis using Raman spectroscopy*. Journal of Biomedical Optics, 2012. **17**(1): p. 0170071-0170077.
57. Childres, I., et al., *Raman Spectroscopy of Graphene and related materials*, J.I. Jang (Ed.) , *Developments in photon and materials research, 978-1-62618-384-1*, Nova Science Publishers, 2013.
58. Xin, R., et al., *Texture effect on corrosion behavior of AZ31 Mg alloy in simulated physiological environment*. Materials Letters, 2012. **72**: p. 1-4.
59. Zhang, X., et al., *Preparation and characterizations of bioglass ceramic cement/Ca-P coating on pure magnesium for biomedical applications*. ACS Appl Mater Interfaces, 2014. **6**(1): p. 513-25.
60. Xin, Y., T. Hu, and P.K. Chu, *Degradation behaviour of pure magnesium in simulated body fluids with different concentrations of HCO₃⁻*. Corrosion Science, 2011. **53**(4): p. 1522-1528.