

**Compósitos biocerâmicos de β -TCP
reforçados com zircónia.
Fabrico e caracterização física, mecânica,
microestrutural e biológica**

(Versão final após defesa)

Vanessa Sofia Cordeiro Mão de Ferro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Abílio Manuel Pereira da Silva
Co-orientador: Mestre Natanael Filipe Ferreira Fernandes
Co-orientador: Mestre Duarte Félix Macedo

novembro de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Vanessa Sofia Cordeiro Mão de Ferro, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11594 do 2º ciclo de estudos de mestrado em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 28 /11 /2023

Vanessa Mão de Ferro

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Agradecimentos

A realização desta dissertação contou com importantes apoios, sem os quais não teria sido possível concluir esta etapa do meu percurso académico e aos quais estarei eternamente grata.

Ao meu orientador, o professor Doutor Abílio Manuel Pereira da Silva, por ter acreditado no meu potencial e pela oportunidade de poder trabalhar consigo, pela permanente disponibilidade e compreensão sempre que necessitei de ajuda, pelo esclarecimento de dúvidas, pela partilha de conhecimentos e incentivo ao longo de todo este tempo. Ao meus co-orientadores, Mestre Duarte Félix Macedo e Mestre Natanael Filipe Ferreira Fernandes, pelo apoio a nível laboratorial, pela disponibilidade sempre que necessitei de respostas e esclarecimentos de dúvidas e procura de soluções para chegarmos aos resultados pretendidos.

Ao C-MAST-UBI (*Centre for Mechanical and Aerospace Science and Technologies*) e ao CICS-UBI (Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior) pela disponibilização de todas as condições necessárias à realização desta dissertação.

Ao laboratório de microscopia eletrónica do Centro de Ótica da UBI, em particular à Doutora Ana Paula Gomes, pela preparação das amostras, disponibilização dos equipamentos e realização de ensaios de difração de raios-X e microscopia eletrónica de varrimento.

Um agradecimento especial aos meus pais pela educação transmitida, apoio e carinho que sempre me deram ao longo da vida, pelo incentivo e por me proporcionarem todas as condições necessárias para concluir mais esta etapa.

Para concluir, quero deixar uma palavra de agradecimento aos colegas de laboratório com quem me cruzei pela ajuda e partilha de conhecimentos, à Margarida, Rita, Helga e Diana e ainda ao meu namorado, João Pedro, pelo apoio, paciência, compreensão e pelas palavras de incentivo.

A todos, o meu sincero Obrigada!

Resumo

Com o crescente aumento da expectativa de vida e aliado ao envelhecimento da população, surgem complicações de saúde, principalmente associadas à regeneração óssea. Por esse motivo, é importante encontrar alternativas viáveis que proporcionem bem-estar e que contribuam para uma vida saudável.

O TCP é uma biocerâmica bastante estudada pelas suas características bioativas, osteoindutoras, bioreabsorvíveis e semelhança com o tecido ósseo. A sua bioatividade permite-lhe estabelecer ligações com o tecido envolvente, e aliado a isto, pela sua natureza reabsorvível, parte do material é dissolvido fornecendo matéria-prima para o crescimento e manutenção do novo tecido, facilitando o processo de osteocondução.

As biocerâmicas inertes, como a ZrO_2 , não reagem com o organismo, tornando-as aceitáveis para uso biomédico. As propriedades físicas, químicas e mecânicas, como a elevada resistência à compressão, elevada tenacidade à fratura e estabilidade em ambiente fisiológico, tornam a ZrO_2 um material de interesse para o fabrico de próteses ortopédicas e odontológicas.

Vários estudos já comprovaram que as biocerâmicas TCP- ZrO_2 permitem obter cerâmicas bioativas com boa resistência mecânica. Neste trabalho, produziram-se biocompósitos densos com cinco composições diferentes (10T, 9T1tZ, 8T2tZ, 9T1cZ e 8T2cZ) nas quais foram usadas duas ZrO_2 , 3YSZ e 8YSZ, com duas percentagens diferentes. Com a intenção de produzir também biocompósitos porosos, foi adicionado PMMA a cada uma das cinco composições.

Os resultados obtidos revelaram que a resistência mecânica apresentou um máximo de 20 MPa, a porosidade máxima foi de 29 % e a viabilidade celular para todos os casos foi sempre elevada, quase 100 % para todos os biocompósitos produzidos.

Palavras-chave

Compósitos biocerâmicos; TCP; ZrO_2 ; iões metálicos; porosidade; regeneração óssea; resistência mecânica; biocompatibilidade.

Abstract

With the increase of life expectancy and allied to the aging of the population, health complications arise, mainly associated with bone regeneration. For this reason, it is important to find viable alternatives that provide well-being and contribute to a healthy life.

TCP is a bioceramic widely studied for its bioactive, osteoinductive, bioresorbable characteristics and similarity with bone tissue. Its bioactivity allows it to establish connections with the surrounding tissue, and allied to this, by its resorbable nature, part of the material is dissolved, providing raw material for the growth and maintenance of the new tissue, facilitating the process of osteoconduction.

Inert bioceramics, such as ZrO_2 , do not react with the body, making them acceptable for biomedical use. The physical, chemical, and mechanical properties, such as high compressive strength, high fracture toughness, and stability in the physiological environment, make ZrO_2 a material of interest for manufacturing orthopedic and dental prostheses.

Several studies have already proven that TCP- ZrO_2 bioceramics can obtain bioactive ceramics with good mechanical resistance. In this work, dense biocomposites were produced with five different compositions (10T, 9T1tZ, 8T2tZ, 9T1cZ and 8T2cZ), in which two ZrO_2 , 3YSZ and 8YSZ were used, with two different percentages. To also produce porous biocomposites, PMMA was added to each of the five compositions.

The results revealed that the mechanical strength showed a maximum of 20 MPa, the maximum porosity was 29 %, and cell viability for all cases was always high, almost 100 % for all biocomposites produced.

Keywords

Bioceramic composites; TCP; ZrO_2 ; metal ions; bone regeneration; mechanical strength; biocompatibility.

Índice

Capítulo 1.....	25
Introdução.....	
1.1. Enquadramento.....	25
1.2. Objetivos.....	27
1.3. Questões de investigação.....	28
1.4. Organização da dissertação.....	28
Capítulo 2.....	30
Estado da arte.....	
2.1. Biocerâmicas.....	30
2.1.1. Biocerâmicas inertes.....	31
2.1.2. Biocerâmicas ativas.....	33
2.1.3. Misturas de zircónia e fosfatos de cálcio.....	40
2.1.4. Biocerâmicas porosas.....	41
Capítulo 3.....	44
Materiais e metodologia.....	
3.1. Materiais.....	44
3.1.1. Matérias-primas.....	44
3.1.2. Planeamento experimental das misturas.....	45
3.1.3. Fabrico das amostras.....	46
3.2. Propriedades físicas.....	49
3.2.1. Contração diametral.....	49
3.2.2. Densidade, porosidade e absorção de água.....	49
3.3. Propriedades mecânicas.....	52
3.3.1. Tensão de rutura.....	52
3.4. Propriedades microestruturais.....	53
3.4.1. Difração de raios-X.....	53
3.4.2. Microscopia eletrónica de varrimento.....	55
3.5. Propriedades biológicas.....	56
3.5.1. Ensaio de citocompatibilidade.....	56
3.5.2. Análise estatística.....	58
3.5.3. Análise da fixação celular.....	59
Capítulo 4.....	60
Resultados e discussão.....	
4.1. Propriedades físicas.....	60

4.1.1. Contração diametral	60
4.1.2. Relação entre o diâmetro e a espessura.....	62
4.1.3. Densidade, porosidade e absorção de água	64
4.2. Propriedades mecânicas	72
4.2.1. Tensão de rutura.....	72
4.3. Propriedades microestruturais.....	75
4.3.1. Difração de raios-X.....	75
4.3.2. Microscopia eletrónica de varrimento	77
4.4. Propriedades biológicas.....	80
4.4.1. Ensaio de citocompatibilidade.....	80
4.4.2. Análise da fixação celular.....	81
Capítulo 5	83
Considerações finais	
5.1. Conclusões.....	83
5.2. Perspetivas futuras	84
Referências bibliográficas	86
Apêndice I	97
Imagens das superfícies de fratura	97
Imagens sem e com fixação celular	104

Lista de Figuras

Figura 2.1. Representação esquemática das células unitárias das fases cristalinas da ZrO_2 : a) monoclinica (m); b) tetragonal (t) e c) cúbica (c), com indicação dos grupos espaciais, eixos, ângulo e temperaturas de transição. As esferas azuis e laranjas representam átomos de O e Zr, respetivamente. Adaptado de [25, 26].	32
Figura 2.2. Deslocamento das posições de pico do padrão de DRX do β -TCP pela adição de Mg^{2+} na sua estrutura e as alterações resultantes nos parâmetros de rede. A síntese ocorreu por reação de estado sólido num forno de câmara sob condições sintéticas padronizadas a uma $T_{Syn.} = 1025 \pm 10^\circ C$. Adaptado de [52].	37
Figura 2.3. Padrão de raios-X do β -T(Ca,Mg)P (Whitlockite dopado com 20l %mol de Mg^{2+}) e da fase secundária Stanfieldit $[(CaMg)_3(PO_4)_2]$. A síntese foi realizada por reação de estado sólido num forno de câmara sob condições sintéticas padronizadas a uma $T_{Syn.} = 1025 \pm 10^\circ C$. Adaptado de [52].	38
Figura 2.4. Influência da substituição de Ca^{2+} por Mg^{2+} nos parâmetros de rede a e c da estrutura do β -TCP, calcinado a uma temperatura de $1025 \pm 10^\circ C$. Adaptado de [52].	38
Figura 2.5. Ocupação por Mg^{2+} em sítios de Ca(5) e Ca(4) na estrutura do β -TCP, dependendo do conteúdo de Mg^{2+} determinado pelo método de Rietveld com abordagem de parâmetro fundamental. Adaptado de [52].	39
Figura 2.6. Cerâmicas macroporosas de β -TCP produzidas com esferas de diâmetro igual a a) 100-200 μm ; b) 300-400 μm ; c) 500-600 μm e d) 700-800 μm . Adaptado de [71].	42
Figura 3.1. Layout experimental das distribuições das amostras [44].	45
Figura 3.2. a) e b) Ilustração do processo de prensagem uniaxial; c) biocompósito cilíndrico denso; d) biocompósito cilíndrico poroso.	48
Figura 3.3. Ilustração do processo de medição da massa imersa dos biocompósitos.	50
Figura 3.4. a) Ilustração do ensaio de compressão diametral. Adaptado de [90]; b) e c) aspeto de uma amostra densa válida após o ensaio de compressão diametral; d) e e) aspeto de uma amostra porosa válida após o ensaio de compressão diametral.	52
Figura 3.5. Curva força-deslocamento típica do ensaio de compressão diametral. 1) região elástica não linear; 2) região elástica linear; 3) início da rutura do material; 4) força máxima suportada pelo material/ rutura do material; 5) fim do ensaio. Adaptado de [89].	53
Figura 3.6. Esquema da geometria da DRX. Adaptado de [93].	54
Figura 3.7. Diferentes sinais gerados pela interação entre a amostra e o feixe de eletrões [26].	55

Figura 3.8. Representação da organização de uma placa de 48 poços utilizada.....	57
Figura 3.9. Estruturas químicas da resazurina e da resorufina. a) Alamar Blue não reduzido corresponde à resazurina; b) Alamar Blue reduzido corresponde à resorufina. Adaptado de [99].	58
Figura 4.1. Evolução da contração diametral nos biocompósitos: a) densos dopados com 3YSZ; b) porosos dopados com 3YSZ; c) densos dopados com 8YSZ e d) porosos dopados com 8YSZ.	61
Figura 4.2. Evolução da relação entre o diâmetro e a espessura nos biocompósitos densos: a) dopados com 3YSZ e b) dopados com 8YSZ.	63
Figura 4.3. Evolução da densidade aparente nos biocompósitos: a) densos dopados com 3YSZ; b) porosos dopados com 3YSZ; c) densos dopados com 8YSZ e d) porosos dopados com 8YSZ.	64
Figura 4.4. Evolução da absorção de água nos biocompósitos: a) densos dopados com 3YSZ; b) porosos dopados com 3YSZ; c) densos dopados com 8YSZ e d) porosos dopados com 8YSZ.	66
Figura 4.5. Evolução da porosidade aparente nos biocompósitos: a) densos dopados com 3YSZ; b) porosos dopados com 3YSZ; c) densos dopados com 8YSZ e d) porosos dopados com 8YSZ.	68
Figura 4.6. Evolução da densidade relativa nos biocompósitos: a) densos dopados com 3YSZ; b) porosos dopados com 3YSZ; c) densos dopados com 8YSZ e d) porosos dopados com 8YSZ.	70
Figura 4.7. Evolução da tensão de ruptura nos biocompósitos: a) densos dopados com 3YSZ; b) porosos dopados com 3YSZ; c) densos dopados com 8YSZ e d) porosos dopados com 8YSZ.	73
Figura 4.8. Difractogramas dos biocompósitos densos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ e difractogramas dos cartões teóricos #37-1484, #50-1089, #49-1642, #09-0432, #09-0169 e #09-0348, correspondentes a m-ZrO ₂ , t-ZrO ₂ , c-ZrO ₂ , HA, β-TCP e α-TCP, respetivamente.....	75
Figura 4.9. Imagens das superfícies de fratura características dos biocompósitos densos e porosos obtidas por SEM, com ampliações de 1000x e 5000x para os densos, e, 100x e 200x para os porosos.....	78
Figura 4.10. Avaliação da citocompatibilidade dos biocompósitos a) densos dopados com 3YSZ e 8YSZ e b) porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ.	80
Figura 4.11. Imagens de SEM da fixação celular aos biocompósitos porosos com 3 dias de incubação e sem fixação celular, com ampliações de 3000x, 5000x e 1200x, respetivamente.....	81

Figura 0.1. Superfície de fratura do biocompósito denso 10T obtida por SEM, com uma ampliação de 1000x.	97
Figura 0.2. Superfície de fratura do biocompósito denso 10T obtida por SEM, com uma ampliação de 5000x.	98
Figura 0.3. Superfície de fratura do biocompósito poroso 10T obtida por SEM, com uma ampliação de 100x.	98
Figura 0.4. Superfície de fratura do biocompósito poroso 10T obtida por SEM, com uma ampliação de 200x.	99
Figura 0.5. Superfície de fratura do biocompósito denso 9T1tZ obtida por SEM, com uma ampliação de 1000x.	99
Figura 0.6. Superfície de fratura do biocompósito denso 9T1tZ obtida por SEM, com uma ampliação de 5000x.	100
Figura 0.7. Superfície de fratura do biocompósito poroso 9T1tZ obtida por SEM, com uma ampliação de 100x.	100
Figura 0.8. Superfície de fratura do biocompósito poroso 9T1tZ obtida por SEM, com uma ampliação de 200x.	101
Figura 0.9. Superfície de fratura do biocompósito denso 9T1cZ obtida por SEM, com uma ampliação de 1000x.	101
Figura 0.10. Superfície de fratura do biocompósito denso 9T1cZ obtida por SEM, com uma ampliação de 5000x.	102
Figura 0.11. Superfície de fratura do biocompósito poroso 9T1cZ obtida por SEM, com uma ampliação de 100x.	102
Figura 0.12. Superfície de fratura do biocompósito poroso 9T1cZ obtida por SEM, com uma ampliação de 200x.	103
Figura 0.13. Imagem SEM do biocompósito poroso 10T sem incubação com hOB, com uma ampliação de 1200x.	104
Figura 0.14. Imagem SEM do biocompósito poroso 9T1tZ sem incubação com hOB, com uma ampliação de 1200x.	105
Figura 0.15. Imagem SEM do biocompósito poroso 8T2tZ sem incubação com hOB, com uma ampliação de 1200x.	105
Figura 0.16. Imagem SEM do biocompósito poroso 9T1cZ sem incubação com hOB, com uma ampliação de 1200x.	106
Figura 0.17. Imagem SEM do biocompósito poroso 8T2cZ sem incubação com hOB, com uma ampliação de 1200x.	106
Figura 0.18. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 10T ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 3000x.	107

Figura 0.19. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 10T ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 5000x.	107
Figura 0.20. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 9T1tZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 3000x.	108
Figura 0.21. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 9T1tZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 5000x.	108
Figura 0.22. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 8T2tZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 3000x.	109
Figura 0.23. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 8T2tZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 5000x.	109
Figura 0.24. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 9T1cZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 3000x.	110
Figura 0.25. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 9T1cZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 5000x.	110
Figura 0.26. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 8T2cZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 3000x.	111
Figura 0.27. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 8T2cZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 5000x.....	111

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Aplicações biomédicas das biocerâmicas. Adaptado de [21].....	30
Tabela 2.2. Composição química típica (%wt) da fase inorgânica do osso humano. Adaptado de [40].	35
Tabela 3.1. Composições das amostras utilizadas em função dos íons metálicos. Adaptado de [44].	46
Tabela 3.2. Nomenclatura e composição dos materiais estudados em fração molar (x_i), fração volumétrica (v_i) e fração mássica (w_i).	47
Tabela 4.1. Análise quantitativa (%vol) de DRX dos compósitos biocerâmicos densos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ, obtida por refinamento de Rietveld.	76
Tabela 4.2. Análise química elementar dos compósitos biocerâmicos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ, obtida por EDX.	79

Lista de Abreviaturas

Nomenclatura

Ab	Antibiótico
ANOVA	<i>One-way analysis of variance</i>
ASTM	Sociedade americana para testes e materiais (<i>American Society for Testing and Materials</i>)
C-MAST	<i>Centre for Mechanical and Aerospace Science and Technologies</i>
CICS	Centro de Investigação em Ciências da Saúde
DCDT	Teste de compressão diametral de discos (<i>Diametral Compression of Discs Test</i>)
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DOE	<i>Design of Experiments</i>
DRX	Difração de raios-X
EDX	Espectroscopia de raios-X por energia dispersiva
FBS	Soro Fetal Bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HA	Hidroxiapatite
hOB	Osteoblastos humanos (<i>Human osteoblasts</i>)
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
K ⁺	Controlo positivo
K ⁻	Controlo negativo
LTD	Degradação a baixa temperatura (<i>Low Temperature Degradation</i>)
PMMA	Polimetilmetacrilato
PSZ	Zircónia parcialmente estabilizada (<i>Partially Stabilized Zirconia</i>)
PTFE	Politetrafluoretileno
SBF	Fluido biológico simulado (<i>Simulated Body Fluid</i>)
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
TCP	Fosfato tricálcico
UV	Ultravioleta
YFSZ	Zircónia totalmente estabilizada com ítrio (<i>Yttrium Full Stabilized Zirconia</i>)
YSZ	Zircónia estabilizada com ítrio (<i>Yttrium Stabilized Zirconia</i>)

ZTA	Zircónia endurecida com alumina (<i>Zirconia Toughened Alumina</i>)
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
χ^2	Qui quadrado, erro das análises de Difração de raios-X
3DP	Impressão tridimensional (<i>three-Dimensional Printing</i>)
3YSZ	Zircónia estabilizada com 3 %mol de ítrio, zircónia tetragonal
8YSZ	Zircónia estabilizada com 8 %mol de ítrio, zircónia cúbica

Símbolos químicos

Al^{3+}	Ião de alumínio
Al_2O_3	Óxido de alumínio, alumina
c- ZrO_2	Zircónia cúbica
Ca^{2+}	Ião de cálcio
CaO	Óxido de cálcio, cálcia
$CaZrO_3$, CZ	Zirconato de cálcio
CO_3^{2-}	Carbonato
Fe^{3+}	Ião de ferro III
m- ZrO_2	Zircónia monoclinica
Mg^{2+}	Ião de magnésio
MgO	Óxido de magnésio, periclase, magnésia
Mn^{2+}	Ião de manganês
Na^{2+}	Ião de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
Sc_2O_3	Óxido de escândio III
Sr^{2+}	Ião de estrôncio
t- ZrO_2	Zircónia tetragonal
Ti^{2+}	Ião de titânio
Y	Ítrio
Y_2O_3	Óxido de ítrio, ítria
$Y(OH)_3$	Hidróxido de ítrio
Zn^{2+}	Ião de zinco
Zr	Zircónio
ZrO_2	Zircónia, Óxido de zircónio
$ZrSiO_4$	Zircão
$\alpha-Al_2O_3$	Fase α da alumina
α -TCP	Fase α do fosfato tricálcico

α' -TCP	Fase α' do fosfato tricálcico
β -TCP	Fase β do fosfato tricálcico

Símbolos em equações

A_a	Absorção de água [%]
C_d	Contração diametral [%]
d	Diâmetro [mm]
D_a	Densidade aparente [g/cm ³]
d_f	Diâmetro final [mm]
d_{hkl}	Distância entre os planos dos cristais de índices de <i>Miller</i>
d_i	Diâmetro inicial [mm]
D_r	Densidade relativa [%]
D_t	Densidade teórica [g/cm ³]
$D_{t\text{ TCP:3YSZ}}$	Densidade teórica dos biocompósitos dopados com zircónia estabilizada com 3 %mol de ítrio [g/cm ³]
$D_{t\text{ TCP:8YSZ}}$	Densidade teórica dos biocompósitos dopados com zircónia estabilizada com 8 %mol de ítrio [g/cm ³]
e	Espessura [mm]
F	Força máxima aplicada [N]
M_1	Massa a seco [g]
M_2	Massa imersa [g]
M_3	Massa saturada [g]
n	Ordem de difração
P_a	Porosidade aparente [%]
v	Fração volúmica
θ	Ângulo da radiação incidente [°]
λ	Comprimento de onda da radiação incidente [nm]
ρ	Densidade [g/cm ³]
σ_x	Resistência à tração [MPa]
%mol	Percentagem molar
%vol	Percentagem volúmica
%wt	Percentagem mássica

Capítulo 1

Introdução

No presente capítulo é feito o enquadramento do problema em causa, mais especificamente, são dadas a conhecer as alternativas viáveis atualmente existentes para a limitação da regeneração óssea, que passam pela implementação de biomateriais, mais propriamente de biocerâmicas. São também definidos os objetivos do trabalho bem como as questões de investigação, e, por fim, mencionam-se os conteúdos abordados ao longo de cada capítulo.

1.1. Enquadramento

Desde cedo, o ser humano procura continuamente o desenvolvimento de novas metodologias, a fim de, dar resposta a todas as exigências e dificuldades que surgem nas mais diversas áreas. Na regeneração óssea, é do conhecimento geral que as dificuldades associadas a este tema são bastantes, e, por esse motivo, é importante encontrar alternativas viáveis que proporcionem bem-estar e que contribuam para uma vida saudável.

A expectativa de vida humana tem aumentado, levando ao envelhecimento da população mundial. O segmento da população mais idosa, apresenta complicações de saúde, grande parte relacionadas com as articulações e o tecido ósseo, como por exemplo, osteoartrite e osteoporose [1, 2]. Tais patologias provocam a degeneração da cartilagem articular e diminuição da densidade mineral óssea, tornando a estrutura óssea mais porosa e, conseqüentemente, mais frágil, ou seja, mais suscetível a fraturas e tumores tanto na cartilagem como no tecido ósseo [1–3]. Registou-se um aumento no número de cirurgias de implantes artificiais para tratamento de distúrbios musculoesqueléticos (por exemplo, 4,9 milhões em 2002 para 39,7 milhões em 2010) [4]. Além disso, espera-se que o número de cirurgias de revisão de implantes de próteses de quadril e joelho aumente exponencialmente, 137 % e 601 %, respetivamente, entre 2005 e 2030 [5]. Implantes com maior durabilidade e propriedades otimizadas, podem ser uma boa abordagem terapêutica, já que, contribuirão para reduzir o número de cirurgias de revisão, os custos associados, desconforto e dor do paciente [1, 6].

O tecido ósseo tem capacidade de regenerar-se, contudo, esta capacidade regenerativa é limitada pelo tamanho da lesão. Defeitos ósseos extensos, provocados por traumas, infeções, neoplasias e anomalias do desenvolvimento, não conseguem regenerar-se espontaneamente, representando um problema para a medicina e odontologia [7]. Em virtude desta desvantagem, verifica-se a necessidade de encontrar alternativas que ultrapassem este desafio. Surge assim, o conceito de biomaterial nesta área, que se define como um material natural ou sintético, destinado a interagir com sistemas biológicos de forma temporária ou definitiva, com a intenção de avaliar, tratar,

umentar ou substituir um tecido, órgão ou função melhorando ou mantendo a qualidade de vida do paciente [8].

Na produção de materiais para aplicações biomédicas, é crucial que o material consiga fornecer suporte estrutural para a formação do novo tecido, assim como melhorar o processo de cicatrização através da interação com as células. Dado isto, um material ideal, para além de biocompatível, deve ser poroso, de modo a promover adesão e proliferação celular, e deve ainda possuir resistência mecânica suficiente para suportar as forças exercidas durante o processo de regeneração [1, 9, 10]. Assim sendo, estes biomateriais devem combinar porosidade e resistência mecânica [1].

Uma vez que, o osso não consegue regenerar-se se um defeito com tamanho crítico estiver presente, um *scaffold* poroso ao qual as células possam aderir e proliferar para preencher e reconstruir o defeito existente, é considerado uma excelente solução para este problema. Conforme as células se infiltram no *scaffold* e proliferam, este vai-se degradando e consequentemente, libertando espaço para o crescimento celular e formação de novos tecidos [11].

Visto que a reparação óssea adequada requer a existência de suporte de carga durante a cicatrização, o *scaffold* poroso deve deformar-se de forma similar ao osso saudável quando aplicada uma determinada carga, ou seja, o implante deve possuir um módulo de elasticidade semelhante ao osso [11, 12]. *Scaffolds* com módulo de elasticidade muito alto ou muito baixo, podem fornecer muito ou pouco suporte ao osso limitando o crescimento celular, prolongando assim a cicatrização. As propriedades mecânicas ideais de um *scaffold* variam de acordo com a aplicação clínica já que o módulo de elasticidade do osso humano difere consoante a localização anatômica [11, 13]. De referir que a resistência do osso humano está bastante relacionada com a porosidade, assim sendo, e de acordo com a literatura, a resistência à compressão apresenta um valor compreendido entre 1 e 6 MPa e entre 0,5 e 3,5 MPa para ossos “saudáveis” e ossos “osteoporóticos”, respetivamente [14]. Já no que diz respeito à resistência à tração do osso esponjoso e do osso compacto, os valores típicos variam entre 10 e 20 MPa e entre 50 e 150 MPa, respetivamente [15].

Uma classe importante de biomateriais, são as biocerâmicas, que dadas as suas propriedades são amplamente utilizadas tanto na medicina como na odontologia. Propriedades essas como, a baixa densidade, estabilidade química, alta resistência ao desgaste e biocompatibilidade, sendo esta última causada pela composição rica em iões encontrados em ambiente fisiológico, por exemplo, iões de cálcio, Ca^{2+} , iões de potássio, K^+ , iões de magnésio, Mg^{2+} e iões de sódio, Na^+ , e de outros iões que apresentam toxicidade limitada para com os tecidos corporais, tais como iões de alumínio, Al^{3+} e iões de titânio Ti^{2+} [16, 17]. A pesquisa e o desenvolvimento destas biocerâmicas, trouxeram contribuições significativas para a saúde e qualidade de vida humana, podendo destacar-se os fosfatos de cálcio e a zircónia (ZrO_2), duas matérias-primas utilizadas neste trabalho, a alumina (Al_2O_3) e ainda os biovidros 45S5 [18].

A biocompatibilidade e a semelhança que os fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatite (HA) e o fosfato tricálcico (TCP), apresentam comparativamente com a fase mineral do osso, tornam-nos adequados para serem aplicados ao organismo humano sem risco de rejeição por parte deste [18, 19].

Contudo, as biocerâmicas quando utilizadas em tecidos vivos, além da compatibilidade com o meio biológico, devem possuir capacidade de suportar tensões complexas no local onde vão ser aplicadas [16, 19], e, quando tal não acontece, existe a necessidade de encontrar meios que melhorem as suas propriedades mecânicas. A ZrO_2 , uma cerâmica bioinerte, é um dos materiais mais utilizado como agente de reforço pelas características que possui, tais como, elevada tenacidade à fratura, dureza, resistência ao desgaste, inércia química e baixa condutividade térmica [16, 20].

1.2. Objetivos

Nesta dissertação propõe-se o fabrico, a caracterização e análise de uma matriz de TCP reforçada pela adição de ZrO_2 , e, pretende-se ainda dopar esta biocerâmica com diversos iões metálicos e avaliar o efeito que a sua presença provoca. Posteriormente, propõe-se a adição de um agente indutor de porosidade. Primeiramente será feita uma revisão da literatura, a fim de, compreender a importância, as vantagens e as limitações das biocerâmicas, em particular as baseadas em fosfatos de cálcio, assim como o contexto em que estas são usadas na área biomédica e o tipo de caracterização experimental comumente utilizado na avaliação mecânica e biológica. De seguida, pretende-se fabricar diversos biocompósitos na forma quase densa e de *scaffolds*, realizar a respetiva caracterização e discutir os resultados tendo por base a literatura da especialidade. Em suma, os objetivos concretos desta dissertação são:

- enquadrar a importância das biocerâmicas na área biomédica, ou seja, reconhecer que estas possuem um papel crucial na eficiência da regeneração óssea e promoção de uma vida saudável;
- definir o conceito de biocerâmica, fazendo referência à sua composição, às diversas aplicações e funções e ainda aos benefícios aquando da sua utilização no setor da saúde;
- identificar as características e propriedades físicas, mecânicas e biológicas, que as biocerâmicas, em particular as baseadas em fosfatos de cálcio, devem possuir para que possam ser utilizadas na resolução de problemas encontrados na medicina e odontologia;
- justificar a escolha das matérias-primas, das diferentes composições e técnicas de fabrico utilizadas ao longo do trabalho para obtenção dos biocompósitos;

- fabricar os diversos biocompósitos e proceder à caracterização física, mecânica, microestrutural e biológica, de modo experimental;
- equiparar e discutir os resultados obtidos com base na literatura da especialidade.

1.3. Questões de investigação

Para a concretização dos objetivos anteriormente mencionados é necessário responder às seguintes questões:

- Qual a importância da utilização de cerâmicas baseadas em fosfato de cálcio na área biomédica?
- Qual a influência provocada pela adição de ZrO_2 e de diversos iões metálicos a estas biocerâmicas?
- Qual o efeito da porosidade provocada pelo agente porogénio?
- Que matérias-primas e respetivas composições, vão ser utilizadas para obtenção dos biocompósitos?
- Que ensaios vão ser realizados para permitirem o fabrico dos biocompósitos e a caracterização física, mecânica, microestrutural e biológica?
- Quais as diferenças entre os valores obtidos experimentalmente e os valores presentes na literatura?
- Quais as linhas de orientação para futuros trabalhos?

1.4. Organização da dissertação

A presente dissertação divide-se em 5 capítulos. A sua estrutura e indicação do conteúdo dos diversos capítulos que a constituem são discriminadas em seguida.

No primeiro capítulo, é apresentado o enquadramento do tema em causa, expondo a sua importância no setor da medicina e odontologia, mais concretamente no que diz respeito à regeneração óssea. São também enunciados os objetivos e as questões de investigação necessárias para alcançar tais objetivos. Efetua-se ainda uma descrição clara e concisa da estrutura que compõe este trabalho.

O segundo capítulo resulta da pesquisa de artigos científicos referentes ao tema da dissertação, isto é, realiza-se a revisão da literatura, enunciando as bases científicas e teóricas que sustentam

este trabalho. Inicialmente é realizada uma abordagem sobre as biocerâmicas, mencionando a sua composição, as suas propriedades e as mais diversas aplicações bem como alguns conceitos associados a estas, tais como, cerâmicas bioinertes. Posteriormente, é feita referência à utilização da ZrO_2 como meio de reforço e ainda aos iões metálicos adicionados às matérias-primas selecionadas.

No capítulo 3, referente à parte experimental desta dissertação, são enunciadas as técnicas de fabrico para obtenção das amostras, as diferentes composições utilizadas e ainda as propriedades mecânicas, físicas microestruturais e biológicas destas cerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio reforçadas com ZrO_2 . Além disto, são dadas a conhecer as matérias-primas utilizadas.

No quarto capítulo, os resultados obtidos são expostos e analisados, bem como a sua análise e discussão em relação a outros trabalhos já publicados.

Por fim, no quinto capítulo que compõe esta dissertação, são apresentadas as principais conclusões retiradas sobre o trabalho desenvolvido relativo a compósitos biocerâmicos de β -TCP reforçados com ZrO_2 e apresentam-se propostas consideráveis para servirem de base a trabalhos futuros.

Capítulo 2

Estado da arte

Neste capítulo apresenta-se uma abordagem sucinta sobre as biocerâmicas, em particular as baseadas em fosfatos de cálcio, com especial destaque para o fosfato tricálcico, e as suas vastas aplicações. Abordam-se ainda alguns conceitos relacionados com estes biomateriais, dando ênfase à zircónia estabilizada com ítrio e à adição de iões metálicos que vão melhorar diversas propriedades destas cerâmicas.

2.1. Biocerâmicas

A classe das cerâmicas destinada à reparação e substituição de partes doentes e danificadas do sistema musculoesquelético é conhecida como biocerâmica. Estas, tornaram-se uma classe bastante diversa de biomateriais, e incluem 3 tipos básicos: as biocerâmicas inertes conhecidas pela sua elevada resistência, em particular resistência à compressão e ao desgaste, as biocerâmicas ativas que formam ligações químicas diretas com o osso ou até com o tecido mole de um organismo vivo e ainda as biocerâmicas reabsorvíveis que participam ativamente nos processos metabólicos do organismo [21, 22]. A Al_2O_3 e a ZrO_2 , são conhecidas por serem bioinertes [2, 21]. Por sua vez, a HA, o TCP e os biovidros 45S5 ($45SiO_2-24,5Na_2O-24,5CaO-6P_2O_5$ %wt (percentagem mássica), também conhecida como composição de *Hench*), são bioativos [2, 22, 23]. Os fosfatos de cálcio, tal como a HA e o TCP, e os biovidros, também apresentam características bioreabsorvíveis [21, 22].

Após diversas avaliações *in vitro* e *in vivo*, as biocerâmicas tornaram-se um grupo de materiais aceite pela comunidade médica para aplicações biomédicas, principalmente no que diz respeito a implantes em ortopedia e odontologia [21]. Na Tabela 2.1 encontram-se algumas das aplicações biomédicas destas cerâmicas.

Tabela 2.1. Aplicações biomédicas das biocerâmicas. Adaptado de [21].

Dispositivos	Função	Biomaterial
Anca total artificial, joelho, ombro, cotovelo, pulso	Reconstruir articulações artríticas ou fraturadas	Al_2O_3 de alta densidade, revestimentos de biovidro metálico
Placas ósseas, parafusos, fios	Reparar fraturas	Compósito biovidro-metal, compósito polisulfona-carbono
Hastes intramedulares	Alinhar fraturas	Compósito biovidro-metal, compósito polisulfona-carbono
Haste <i>Harrington</i>	Corrigir a curvatura crónica da coluna	Compósito biovidro-metal, compósito polisulfona-carbono

Membros artificiais implantados permanentemente	Substituir extremidades ausentes	Compósito biovidro-metal, polisulfona-carbono
Separadores e extensores de vértebras	Corrigir deformações congénitas	Al ₂ O ₃
Fusão espinhal	Imobilizar as vértebras para proteger a medula espinhal	Biovidro
Substituição óssea alveolar, reconstrução mandibular	Restaurar o rebordo alveolar para melhorar o ajuste da prótese	Politetrafluoretileno (PTFE) - composto de carbono, Al ₂ O ₃ porosa, biovidro, apatite densa
Implantes endósseos para substituição dentária	Substituir dentes doentes, danificados ou soltos	Al ₂ O ₃ , biovidro, HA densa, carbono vítreo
Estabilização ortodôntica	Fornecer locais para aplicação de tensão necessária para alterar deformações	Biovidro revestido com Al ₂ O ₃ , biovidro revestido com <i>vitallium</i>

Da Tabela 2.1, observa-se que as aplicações incluem, por exemplo, substituições de joelhos, dentes e quadris, correções da curvatura crónica da coluna e de deformações congénitas e reconstrução mandibular.

2.1.1. Biocerâmicas inertes

As biocerâmicas inertes não formam ligações bioquímicas com os tecidos circundantes, ou seja, não reagem com o organismo, tornando-as vantajosas para o uso biomédico. A propriedade mais importante destas biocerâmicas é a retenção das suas características durante o tempo que permanecem no organismo. A duração deste período tem por base o facto de que a utilização de uma biocerâmica não tem limitações de idade e inclui um grande número de doenças. Contudo, pela sua elevada biocompatibilidade, estas biocerâmicas são bastante úteis, por exemplo, para pacientes com sistemas imunitários enfraquecidos e crianças [22].

Pelo contributo de trabalhos anteriores [24] sabe-se que o nome zircónio deriva da palavra persa “Zar”-“gun”, tendo como significado “cor dourada”. Este elemento é encontrado em minérios sob a forma de zircão (ZrSiO₄) e *baddeleyite*. Foi descoberto em 1789 pelo químico *Martin Heinrich Klaproth*, em Berlim, contudo, só mais tarde, em 1824, foi isolado pela primeira vez pelo químico sueco *Jöns Jacob Berzelius*.

A ZrO₂ tem sido amplamente estudada e utilizada em múltiplas aplicações nas mais diversas áreas, e, as ciências biomédicas não são exceção. As suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, tais como, elevada resistência à compressão, ao desgaste e à corrosão, dureza, módulo de elasticidade semelhante ao do aço, coeficiente de expansão térmica semelhante ao do ferro,

elevada tenacidade à fratura e estabilidade em ambiente fisiológico, tornam esta cerâmica um material de interesse tanto para o fabrico de próteses ortopédicas como odontológicas [2, 24].

Em função da temperatura a que é submetida, a ZrO_2 pode apresentar diferentes fases polimórficas: monoclinica (m), tetragonal (t) ou cúbica (c) [20], conforme apresentado na Figura 2.1.

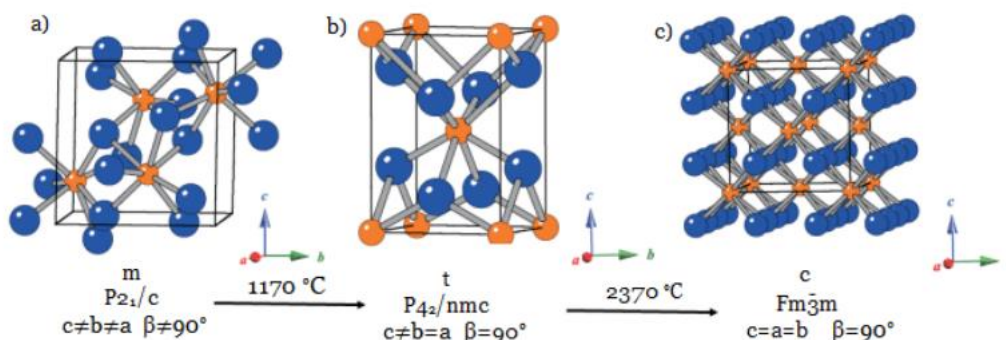


Figura 2.1. Representação esquemática das células unitárias das fases cristalinas da ZrO_2 : **a)** monoclinica (m); **b)** tetragonal (t) e **c)** cúbica (c), com indicação dos grupos espaciais, eixos, ângulo e temperaturas de transição. As esferas azuis e laranjas representam átomos de O e Zr, respetivamente. Adaptado de [25, 26].

À temperatura ambiente e na sua forma pura, a ZrO_2 possui uma estrutura cristalina monoclinica sendo estável até $1170^\circ C$. Ao atingir esta temperatura, verifica-se a mudança de estrutura para tetragonal, que permanece estável até $2370^\circ C$. Acima de $2370^\circ C$ forma-se então a fase cúbica [20, 24]. Assim sendo, de acordo com a temperatura obtém-se m- ZrO_2 , t- ZrO_2 e/ou c- ZrO_2 . A t- ZrO_2 e a c- ZrO_2 têm propriedades mecânicas, térmicas e óticas superiores quando comparadas à m- ZrO_2 nomeadamente no que diz respeito à tenacidade e resistência à fratura [27].

A m- ZrO_2 não é adequada para aplicações a altas temperaturas devido à expansão de volume associada à transformação de t- ZrO_2 para m- ZrO_2 [27, 28], sendo esta alteração de fase conhecida como transformação martensítica [20]. Aquando desta transformação observa-se um aumento do volume de aproximadamente 4,5 % durante o arrefecimento [28] o que acaba por ser prejudicial para o comportamento mecânico da ZrO_2 porque as tensões induzidas durante a transformação de fase induzem a formação de fissuras [20].

Para inibir esta transformação de fase, é importante estabilizar as fases de alta temperatura a temperatura ambiente. Tal estabilização é possível através da adição de estabilizadores ou dopantes, como o óxido de cálcio (CaO), óxido de magnésio (MgO), óxido de ítrio (Y_2O_3) e o óxido de escândio III (Sc_2O_3) dando origem a zircónia parcialmente estabilizada (*PSZ - Partially Stabilized Zirconia*) [20, 27, 29].

Pelas vantagens que o Y_2O_3 apresenta na transformação de t- ZrO_2 para m- ZrO_2 , e no aumento da tenacidade da ZrO_2 , este tem sido o estabilizador usado com maior frequência [29, 30]. A adição deste óxido leva a que parte dos átomos de Zr^{+4} sejam substituídos por átomos de Y^{+3} , estabilizando as modificações polimórficas da ZrO_2 quando submetida a temperaturas elevadas, evitando assim as variações de volume causadas pelas transformações de fase [31]. Assim, quando a ZrO_2 é estabilizada por Y_2O_3 , pelo facto de o componente estrutural ser o ítrio (Y), esta recebe o nome de zircónia estabilizada com ítrio (YSZ - *Yttrium Stabilized Zirconia*) [29].

Desde 1975, a cerâmica de Al_2O_3 provou as suas propriedades bioinertes [21]. A Al_2O_3 de alta densidade e com uma pureza >99,5 %, conhecida como α - Al_2O_3 , foi a primeira biocerâmica a ser amplamente utilizada em meio clínico [32]. Esta biocerâmica é usada em implantes ósseos e dentários pela combinação de propriedades que apresenta, tais como, biocompatibilidade, alta resistência ao desgaste e corrosão, inércia química e elevada dureza [21, 32].

Uma Al_2O_3 cujo tamanho médio do grão seja <4 μm e a pureza >99,7 % apresenta uma boa resistência à flexão e excelente resistência à compressão. No entanto, se o tamanho do grão aumentar para um valor >7 μm , tal facto pode levar a que as propriedades mecânicas desta cerâmica diminuam em aproximadamente 20 % [32].

A biocompatibilidade da Al_2O_3 foi estudada por muitos investigadores. Por exemplo, *Noiri et al.* [33] avaliaram histopatologicamente a biocompatibilidade de um material cerâmico composto por Al_2O_3 implantando-o em órbitas oculares de coelhos albinos, durante 8 semanas. Os resultados demonstraram que não existiu rejeição do implante ou prolapso do material implantado. Após 4 semanas de implantação, observou-se proliferação de fibroblastos e invasão vascular, e, passadas oito semanas, observou-se crescimento de tecido nos poros do implante [21, 33].

Os compósitos de alumina endurecida com zircónia (*ZTA - Zirconia Toughened Alumina*) têm demonstrado resultados favoráveis para serem utilizados como substitutos do polietileno de peso molecular ultraelevado e das ligas de crómio-cobalto na produção de articulações artificiais de anca, por reunirem um conjunto de boas propriedades destas 2 biocerâmicas inertes, como a boa biocompatibilidade, elevadas propriedades mecânicas e resistência ao desgaste [2, 21, 34].

2.1.2. Biocerâmicas ativas

As biocerâmicas ativas possuem a capacidade de estabelecer ligações com o tecido circundante e sofrem uma degradação progressiva à medida que o novo tecido é formado [35].

Materiais de fosfatos de cálcio têm despertado o interesse da comunidade científica pela sua composição química semelhante à do mineral ósseo, componente inorgânico do tecido ósseo [36], podendo ser usados para substituir e aumentar o tecido ósseo [21]. Cerâmicas à base de fosfato

de cálcio e, sobretudo, a HA e o TCP, são utilizados em diversas aplicações biomédicas como cimentos ósseos injetáveis, revestimentos osteocondutores em próteses metálicas, peças densas para reparação óssea (*bulk components*), implantes ortopédicos e dentários, *scaffolds* para crescimento ósseo e ainda veículos para libertação controlada de fármacos [35, 37, 38].

As propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio são a biorreabsorção e a bioatividade que lhes é característica. Estes 2 fenómenos são sobretudo dinâmicos e dependem bastante de parâmetros biológicos. Quando estes biomateriais são colocados em contacto com tecidos vivos, desencadeiam-se diversas interações [21].

Uma vez que, a HA e o TCP possuem um produto de solubilidade menor do que o produto iónico dos fosfatos de cálcio dos fluidos corporais, induzem a formação de uma apatite de fosfato de cálcio na sua superfície, a partir dos iões presentes nesses fluidos. A primeira etapa corresponde à interação com o colagénio e posterior acumulação de proteínas e células na superfície do material seguido da reabsorção do material e formação óssea. A composição dos próprios cristais é um fator importante e normalmente existe uma relação entre a reabsorção e a solubilidade dos biomateriais. Os cristais dos minerais ósseos apresentam um tamanho reduzido, no entanto, possuem uma área de superfície grande. Contrariamente, os biomateriais baseados em fosfato de cálcio apresentam uma área de superfície baixa, mas fortes ligações cristalinas [21].

Pressupõe-se que o fenómeno de reabsorção resulta de 2 processos: a desintegração de partículas em cristais e a dissolução dos cristais. Na etapa da dissolução está envolvida a atividade celular, porém alguns fosfatos de cálcio insolúveis, como apatite ou pirofosfatos de cálcio, não conseguem ser facilmente eliminados pelas células. A biorreabsorção dos fosfatos de cálcio difere pelas diferenças existentes na taxa de desagregação devido às características do biomaterial e à força das ligações cristal-cristal desenvolvidas [21].

Outra classe de biocerâmicas ativas que também possuem características bioreabsorvíveis e que podem apresentar diversas aplicações na área biomédica, são os biovidros 45S5 [22].

Baino et al. [14] desenvolveram *scaffolds* macroporosos semelhantes ao osso, usando como material base, vidro bioativo de silicato conhecido como CEL2 e com uma composição molar de, 45 % SiO₂, 3 % P₂O₅, 26 % CaO, 7 % MgO, 15 % Na₂O e 4 % K₂O [14]. Importante mencionar, que a composição deste vidro bioativo foi originalmente projetada por *Vitale-Brovarone et al.* [39] no Politécnico de Turim.

O principal requisito para que os materiais baseados em fosfato de cálcio sejam bioativos e se liguem ao osso, é a formação de uma camada óssea semelhante à apatite na sua superfície [21].

As biocerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio têm a capacidade de atrair osteoblastos e osteoclastos, processo ao qual se dá o nome de quimiotaxia. A quimiotaxia envolve mediadores

que estão presentes na matriz óssea ou então no fluido ósseo, que vão determinar a reabsorção ou a formação óssea. Acredita-se que o passo inicial deste processo seja a adsorção de mediadores na superfície mineral. Diversos fatores, tais como, a carga superficial, a microporosidade, a composição e alterações na composição molecular, podem alterar o processo de adsorção [21].

A HA tem despertado interesse à comunidade científica por apresentar uma composição química semelhante ao osso humano, induzir crescimento ósseo e ter estabilidade em condições fisiológicas, tais como, temperatura, pH e em contato com fluidos biológicos. Contudo, apresenta baixa resistência mecânica e alta fragilidade, o que limita a sua aplicação em áreas onde é necessária maior tensão mecânica [1, 7, 19]. Quimicamente a HA é representada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, apresenta uma razão Ca/P de 1,67 e possui uma estrutura hexagonal [21].

A composição básica do mineral ósseo pode ser definida como sendo aproximadamente uma HA. No caso dos minerais ósseos, a razão Ca/P varia entre 1,37 e 1,87 %mol, o que indica que os minerais ósseos podem conter na sua composição outros íons adicionais, como estrôncio, Sr^{2+} , zinco, Zn^{2+} , e carbonato, CO_3^{2-} [40]. Na Tabela 2.2 encontra-se resumida a composição química típica do osso humano.

Tabela 2.2. Composição química típica (%wt) da fase inorgânica do osso humano. Adaptado de [40].

Elemento	%wt
Ca^{2+}	34,8
P	15,2
Na^+	0,9
Mg^{2+}	0,72
K^+	0,03
F^-	0,03
Cl	0,13
CO_3^{2-}	7,4
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	0,07
H_2O	10
Sr^{2+}	vestígios
Zn^{2+}	vestígios
Entre outros	vestígios

As estruturas cristalinas e as propriedades físico-químicas da HA têm alguns efeitos no seu desempenho biológico e podem afetar o comportamento das células ósseas. Como exemplo, uma superfície rugosa vai facilitar a interação material–células [41–43].

O TCP, é uma cerâmica derivada da HA e é bastante estudada como biocerâmica, podendo encontrar-se em cimentos e implantes ósseos pelas suas propriedades bioativas, osteoindutoras e bioreabsorvíveis [44, 45]. Pela natureza reabsorvível que apresenta, parte do material é dissolvido

fornecendo assim matéria-prima para o crescimento e manutenção do novo tecido, facilitando o processo de osteocondução [35, 46].

Quimicamente o TCP é representado por $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e é caracterizado por uma relação Ca/P de 1,5 [21]. Em função da temperatura a que é submetido pode apresentar 3 formas polimórficas: β -TCP, estável a baixa temperatura ($\sim < 1150^\circ\text{C}$), α -TCP que se forma a temperaturas elevadas ($\sim 1150\text{-}1460^\circ\text{C}$) e α' -TCP que permanece estável a temperaturas ainda mais elevadas ($\sim > 1460^\circ\text{C}$) [37, 47].

O β -TCP, também conhecido como β -*whitlockite*, apresenta um padrão de raio-X consistente com uma estrutura cristalina hexagonal [19, 21], enquanto o α -TCP apresenta-se na fase monoclinica estando relacionada à *glaserite* [37, 48].

O polimorfo α' -TCP não apresenta grande interesse tecnológico pela sua reconversão em α -TCP após arrefecimento [37]. Em contrapartida, tanto o β - como o α -TCP têm sido estudados para aplicações a baixa temperatura, sendo a fase polimórfica α muitas vezes retida à temperatura ambiente num estado metaestável [37, 49]. Esta irreversibilidade faz com que a transição de β para α , a 1150°C , seja o principal problema tecnológico encontrado durante a consolidação/densificação dos componentes desta biocerâmica, sobretudo em processos ocorridos a alta temperatura [36, 37]. A transição de β para α vai afetar o comportamento de sinterização e as propriedades mecânicas finais dos componentes do TCP. Pelo aumento do volume da célula, a transição está associada a uma expansão volumétrica ($\sim 7\%$), que reduz a retração e evita que o TCP fique mais denso [37, 50].

Monma et al. [51] estudaram a transição da fase β para α em TCP puro, onde foi demonstrado que esta transformação de fase segue uma cinética de primeira ordem com um caráter reconstrutivo, envolvendo uma reorganização geral da estrutura cristalina com uma energia de ativação aparente de 250 kcal/mol. A transformação reversa de α em β é inibida cineticamente por arrefecimento e o α -TCP permanece metaestável à temperatura ambiente também durante o arrefecimento moderado a $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Estes autores estudaram também a cinética de reconversão de α em β , durante um processo de hibridização isotérmica realizado em pós de α -TCP puros. Uma temperatura máxima de taxa de transformação de $\sim 870^\circ\text{C}$, permite que a reconversão completa ocorra em 2h. Também foi demonstrado que esta transformação pode ser promovida pela introdução de tensões na amostra inicial de α -TCP, por trituração [37, 51].

A diferença estrutural entre as 2 formas polimórficas (α - e β -TCP) é responsável por uma resposta biológica diferente. O α -TCP apresenta elevada solubilidade a 25°C o que leva a que seja considerado inadequado para implantes cirúrgicos, sendo geralmente usado como componente para cimentos ósseos [37, 38]. Como o β -TCP apresenta uma degradação lenta, é considerado ideal para substitutos ósseos, promovendo o crescimento ósseo [19, 35].

Iões metálicos de Mg^{2+} podem substituir os iões Ca^{2+} , permitindo o aumento da temperatura da transformação de fase β em α , contribuindo para estabilizar o β -TCP, aumentar a resistência mecânica, melhorar a função osteoblástica [44, 52, 53] e a biocompatibilidade [54, 55]. Como o Mg^{2+} aumenta a estabilidade do polimorfo β , tal facto permite atingir uma densificação superior durante os processos de sinterização dos pós de TCP dopados com Mg^{2+} [37].

Em trabalhos anteriores [56] foram testados *in vivo*, componentes bifásicos compostos por HA/ β -TCP dopados com MgO que continham aproximadamente 9,5 %mol de Mg^{2+} , os quais demonstraram boa biodegradabilidade sem existência de citotoxicidade ou inflamação [37].

De acordo com *Enderle et al.* [52], uma vez que, todos os membros sintetizados da solução sólida de β -T(Ca,Mg)P demonstraram ser monofásicos por difração de raios-X (DRX) e não foi detetada nenhuma fase amorfa, o Mg^{2+} foi totalmente incorporado na estrutura do β -TCP. Na Figura 2.2, está representado o efeito da incorporação do Mg^{2+} na estrutura do β -TCP, isto é, na mudança dos parâmetros de rede detetados através de DRX [52].

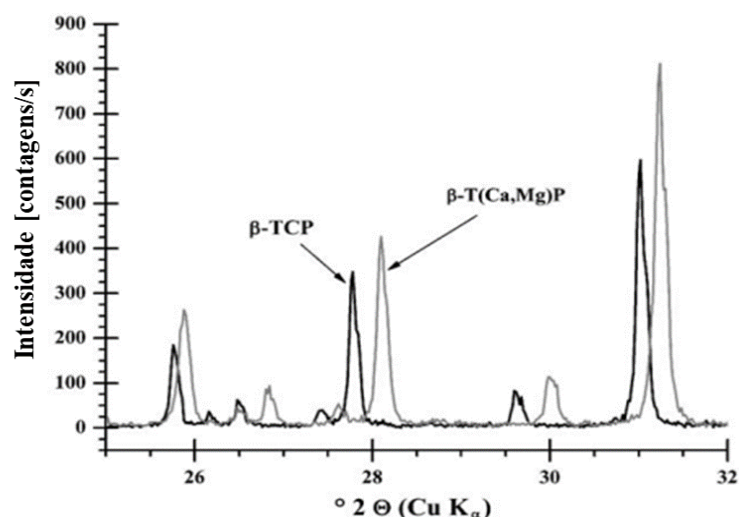


Figura 2.2. Deslocamento das posições de pico do padrão de DRX do β -TCP pela adição de Mg^{2+} na sua estrutura e as alterações resultantes nos parâmetros de rede. A síntese ocorreu por reação de estado sólido num forno de câmara sob condições sintéticas padronizadas a uma $T_{Syn.} = 1025 \pm 10^\circ C$. Adaptado de [52].

Pela substituição do Ca^{2+} por Mg^{2+} , nas posições 4 e 5 dos carbonos na estrutura do β -TCP, o parâmetro de rede a acaba por diminuir à medida que o teor de Mg^{2+} aumenta, passando de $10,441$ para $10,315 \times 10^{-10}$ m. Com 8 %mol, também o parâmetro de rede c diminui, de $37,395 \times 10^{-10}$ m passa a apresentar um valor de $37,175 \times 10^{-10}$ m, contudo, aumenta para $37,306 \times 10^{-10}$ m quando se verifica uma substituição de Ca^{2+} com 14 %mol [52, 57]. Não se observou substituição por Mg^{2+} em sítios de Ca^{2+} com percentagens molares superiores 14 %. Os parâmetros de rede do β -TCP não mudaram, mas a fase secundária *Stanfieldit* $(CaMg)_3(PO_4)_2$ pode ser detetada por DRX [52], tal como ilustrado na Figura 2.3.

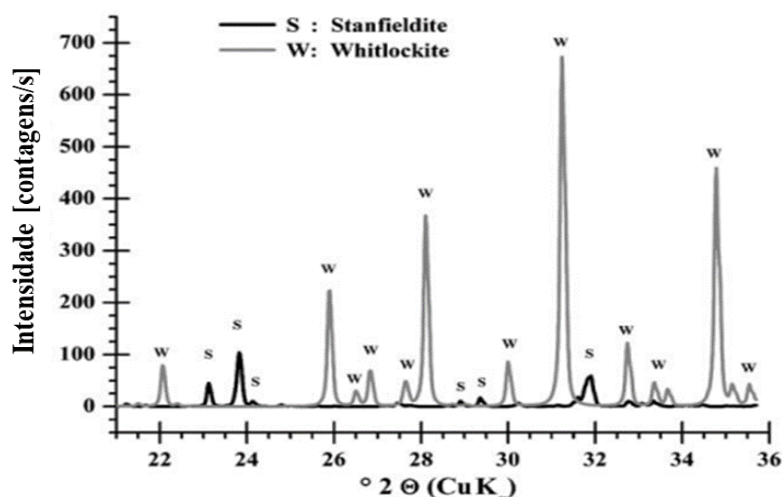


Figura 2.3. Padrão de raios-X do β -T(Ca,Mg)P (*Whitlockite* dopado com 20l %mol de Mg^{2+}) e da fase secundária *Stanfieldit* $[(CaMg)_3(PO_4)_2]$. A síntese foi realizada por reação de estado sólido num forno de câmara sob condições sintéticas padronizadas a uma $T_{syn.} = 1025 \pm 10^\circ C$. Adaptado de [52].

A Figura 2.4 ilustra a mudança dos parâmetros de rede a e c , em função da dependência da incorporação de Mg^{2+} nos sítios correspondentes a Ca^{2+} , na estrutura do β -TCP. O comportamento incomum do parâmetro de rede c , pode ser explicado, pelo facto de que o Ca^{2+} na presença de até 10 %mol de Mg^{2+} ser preferencialmente substituído no lugar ocupado pelo $Ca(5)$ coordenado 6 vezes, resultando numa diminuição dos 2 parâmetros de rede [52].

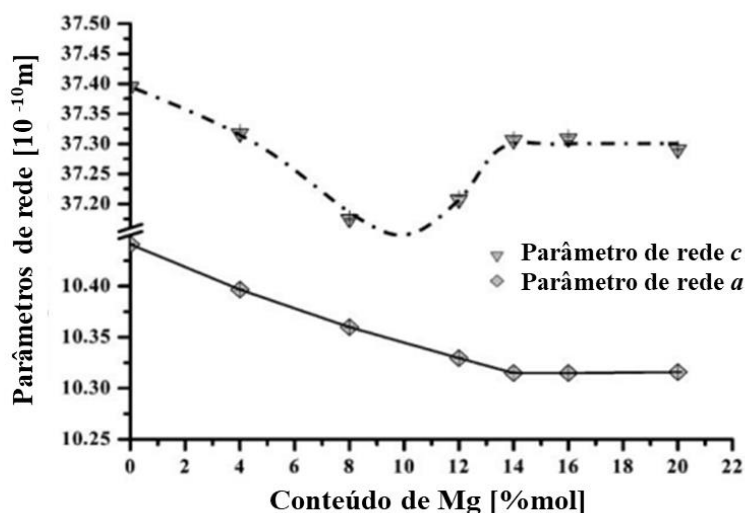


Figura 2.4. Influência da substituição de Ca^{2+} por Mg^{2+} nos parâmetros de rede a e c da estrutura do β -TCP, calcinado a uma temperatura de $1025 \pm 10^\circ C$. Adaptado de [52].

A substituição do Ca^{2+} por Mg^{2+} na posição do $Ca(4)$ coordenado 9 vezes, não ocorre significativamente até que o lugar do $Ca(5)$ seja ocupado na totalidade por Mg^{2+} [52], tal como está demonstrado na Figura 2.5.

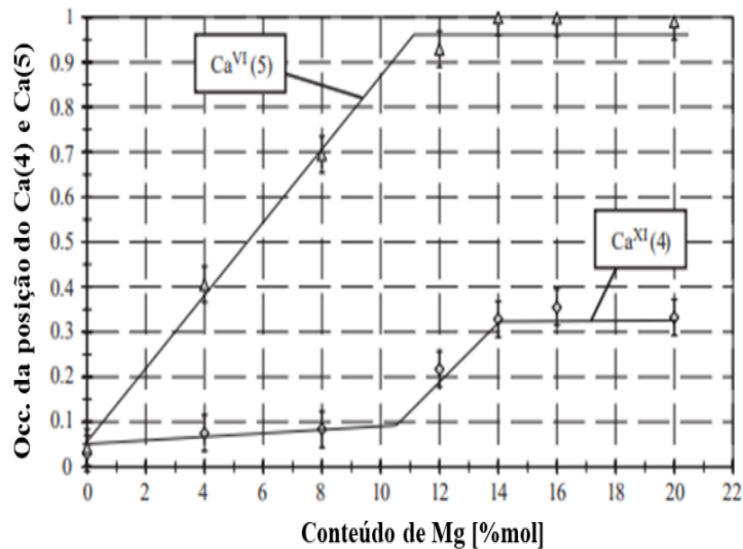


Figura 2.5. Ocupação por Mg^{2+} em sítios de Ca(5) e Ca(4) na estrutura do β -TCP, dependendo do conteúdo de Mg^{2+} determinado pelo método de *Rietveld* com abordagem de parâmetro fundamental. Adaptado de [52].

Para valores superiores a 10 %mol de Mg^{2+} , o sítio do Ca(4) coordenado 9 vezes, é ocupado por Mg^{2+} e o parâmetro de rede c aumenta até ao valor da substituição máxima. A substituição máxima estruturalmente possível por Mg^{2+} , na posição Ca(5), corresponde a 9,25 %mol, e diz respeito ao valor determinado de 10 %mol no trabalho desenvolvido por *Enderle et al.* [52].

Outros íões metálicos, tais como manganês (Mn^{2+}), Zn^{2+} , ferro (Fe^{3+}) e Sr^{2+} podem também ser utilizados para melhorar as propriedades destas biocerâmicas [41, 44].

Íões de Mn^{2+} foram escolhidos a fim de melhorarem as propriedades mecânicas e a resistência à corrosão [44, 53], o Zn^{2+} porque melhora a função dos osteoblastos, a resistência à corrosão e apresenta ação antibacteriana [44, 53], o Fe^{3+} foi escolhido porque preserva a estabilidade estrutural da biocerâmica e aumenta a osseointegração [58] e o Sr^{2+} pode atuar como inibidor de reabsorção óssea, bem como estímulo para a proliferação de osteoblastos e formação óssea [41, 59].

De acordo com *Macedo et al.* [44] chegou-se à conclusão de que, para minimizar a porosidade e maximizar a densidade e o desempenho mecânico, ou seja, resistência à compressão e dureza, é necessário aumentar o teor de Fe^{3+} [44].

Outros autores [59], sintetizaram um novo *scaffold* de TCP dopado com Sr-Mg, no qual foi usada uma tecnologia de impressão tridimensional (3DP) e quando comparado com um *scaffold* de TCP puro, este novo demonstrou acelerar o processo de mineralização *in vivo* e promover a expressão de osteocalcina e colagénio tipo I [41].

2.1.3. Misturas de zircónia e fosfatos de cálcio

Compósitos cerâmicos de HA reforçados por partículas ou fibras de zircónia totalmente estabilizada com ítrio (YFSZ - *Yttrium Full Stabilized Zirconia*) combinam a biocompatibilidade da HA com a alta resistência e tenacidade à fratura da ZrO_2 [1, 60]. As cerâmicas de ZrO_2 estabilizadas com Y_2O_3 podem exibir uma resistência de mais de 1000 MPa com uma tenacidade de cerca de 6 a 10 $MPa/m^{1/2}$ [61].

Contudo, vários estudos descrevem que o uso do Y_2O_3 apresenta desvantagens principalmente na sua degradação a baixas temperaturas, sendo esse fenómeno conhecido como “Fenómeno do Envelhecimento” ao passo que o seu uso é limitado pelo comportamento imprevisível no organismo [1, 61]. As principais características desta degradação a baixa temperatura (LTD – *Low Temperature Degradation*) são as seguintes:

- (i) a transformação ocorre mais rapidamente a temperaturas entre 200-300°C e é dependente do tempo;
- (ii) o vapor de água ou a água aumentam a transformação;
- (iii) a transformação prossegue da superfície para o interior dos materiais de ZrO_2 ;
- (iv) maior quantidade de estabilizador ou um grão mais fino aumentam a resistência à transformação [61].

Neste contexto, as moléculas de água reagem com o Y_2O_3 e formam aglomerados ricos em hidróxido de ítrio ($Y(OH)_3$), que vão afetar a estabilidade da $t-ZrO_2$ induzindo a transformação para $m-ZrO_2$ [62]. Outras limitações associadas ao Y_2O_3 estão relacionadas com a decomposição da HA em TCP a uma temperatura de $\sim 1300^\circ C$ [1].

Vassal *et al.* [1] produziram 3 diferentes biocompósitos de HA-zirconato de cálcio (HA-CZ). Foram utilizadas composições com 10 e 20 %wt de CZ e 100 %wt de HA (90HA10CZ, 80HA20CZ e 100HA), respetivamente. Os resultados obtidos através do teste de compressão diametral de discos (DCDT- *Diametral Compression of Discs Test*) mostraram que os compósitos com 10 %wt de CZ são significativamente mais fortes que as outras composições produzidas, apresentando uma resistência superior a 37,5 MPa. Com o aumento da porosidade, tal como acontece nas amostras de 80HA20CZ, o valor da resistência diminui, passando a ser de 24,4 MPa. Os testes de dureza de *Vickers* demonstraram que os biocompósitos 90HA10CZ apresentam uma dureza ligeiramente superior em relação ao biocompósito 100HA, assim como um aumento da porosidade com valores de 4,6 GPa e 4,2 GPa, respetivamente. Tal como nos resultados obtidos pelo DCDT, com o aumento do teor de CZ (80HA20CZ) a dureza diminui, passando o seu valor a ser de 2,6 GPa. De referir que as amostras 80HA20CZ apresentam o valor máximo de porosidade, sendo ele de 16 %, e, conseqüentemente o menor valor de densidade ($2,79 \text{ g/cm}^3$) das 3 composições produzidas. Também a densidade relativa diminui consideravelmente com a adição

de CZ. Através dos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que para teores de CZ superiores a 10 %wt tanto as propriedades mecânicas quanto as biológicas começam a diminuir.

No trabalho desenvolvido por *Castkova et al.* [63] foram produzidos compósitos com diferentes rácios de peso, tais como, 100:0, 25:75, 50:50, 75:25 e 0:100 de ZrO₂/HA, respetivamente. Pelos resultados obtidos verificou-se que nos compósitos com Y-ZrO₂/HA a fase t-(Y-ZrO₂) manteve-se em toda a gama de concentrações de HA (25-75 %wt) embora a HA se tenha decomposto em α - e β -TCP. Os testes de interação com fluido biológico simulado (SBF- *Simulated Body Fluid*) mostraram que os compósitos Y-ZrO₂/HA com teor de HA <75 % não formaram uma camada de HA na sua superfície. Por outro lado, na superfície dos compósitos com teor de HA >75 % uma nova camada de HA foi formada. Os resultados mostraram que mesmo uma pequena quantidade de Y-ZrO₂ no compósito 25Y-ZrO₂/75HA pode causar uma grande diminuição da adesão celular o que permite concluir que a atividade biológica aumentou com o aumento da quantidade de Ca²⁺ nos compósitos [63].

2.1.4. Biocerâmicas porosas

Para aplicações bem-sucedidas de *scaffolds* ósseos, estes devem apresentar porosidade de maneira a permitirem o crescimento ósseo nos poros interconectados tridimensionalmente e devem ainda ter propriedades mecânicas semelhantes às do osso hospedeiro [64]. Contudo, a compensação entre a porosidade e as propriedades mecânicas é encarada como um grande desafio no fabrico de *scaffolds* [65].

Entre os vastos materiais alternativos propostos para reconstrução óssea, o polimetilmetacrilato (PMMA) foi considerado como ideal devido às suas características desejáveis, como por exemplo, resistência suficiente para fornecer suporte mecânico, moldável para preencher defeitos complexos, baixo custo e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) [66, 67].

Pelas características já referidas, este polímero tem sido bastante usado como material adesivo em ortopedia, podendo fazer uma ligação entre o osso e os implantes ou preencher defeitos ósseos causados por osteoporose ou cancro [68, 69]. Também pelas excelentes propriedades mecânicas que apresenta, tem desempenhado um papel crucial em aplicações de suporte de carga, como implantes de substituição de joelho e quadril [68, 70]. Para além destas propriedades, apresenta uma eliminação térmica limpa e fácil a elevadas temperaturas e ainda uma dissolução química considerável com muitos solventes [71].

Contudo, chegou-se à conclusão de que o PMMA apresenta algumas propriedades inadequadas. A sua polimerização aumenta a temperatura provocando danos térmicos nos tecidos envolventes [66], e, pelo facto de ser bioinerte, ou seja, não apresenta bioatividade, pode causar fibrose em torno do biomaterial implantado, provocando uma má adesão do tecido ósseo à superfície do material e afrouxamento assético deste mesmo material [72]. Em imagens de raios-X, por ser um

polímero transparente, o PMMA é difícil de diferenciar tornando a interface entre o osso circundante e o material implantado, impercetível [68].

Como tal, a modificação deste cimento ósseo despertou o interesse dos investigadores [66]. Aditivos com alta radiopacidade, como ZrO_2 ou sulfato de bário ($BaSO_4$), são frequentemente incorporados em cimentos ósseos de PMMA para melhorar a radiopacidade. No entanto, este tipo de aditivos têm uma osteocondutividade baixa para serem usados em casos clínicos ortopédicos [73].

Em contrapartida, nos últimos anos, têm sido usadas cerâmicas de fosfatos de cálcio, devido à sua excelente biocompatibilidade e osteocondutividade, como matéria-prima principal às quais são adicionados os agentes formadores de poros, como o PMMA [74, 75].

Estudos anteriores [71], utilizaram PMMA para construir a estrutura polimérica, sendo que a sua forma esférica permite controlar a dimensão, a homogeneidade e a morfologia da estrutura polimérica.

Na Figura 2.6 estão ilustradas cerâmicas porosas de β -TCP com diferentes tamanhos de poros [71].

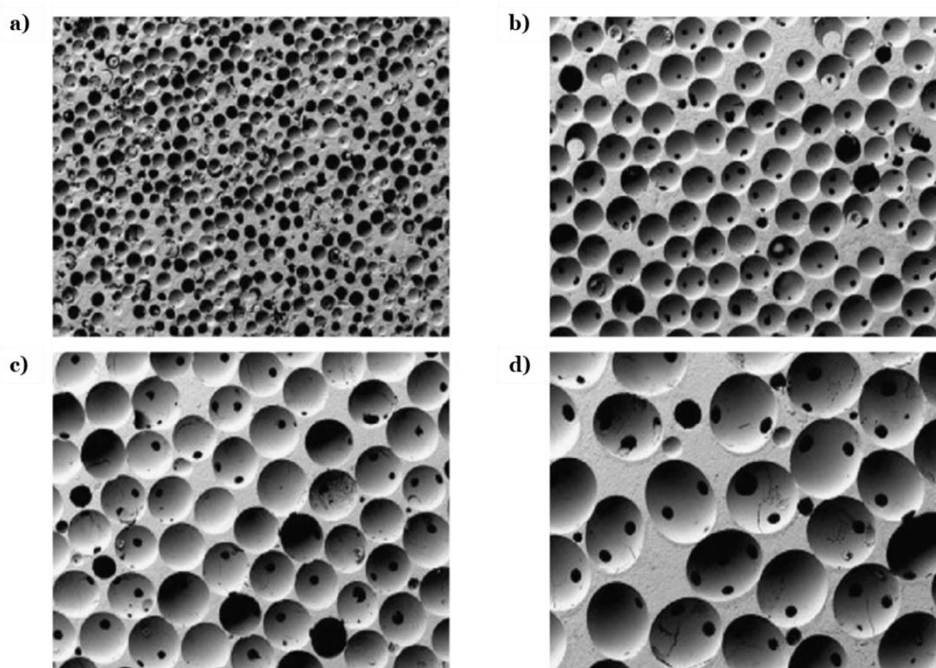


Figura 2.6. Cerâmicas macroporosas de β -TCP produzidas com esferas de diâmetro igual a **a)** 100-200 μm ; **b)** 300-400 μm ; **c)** 500-600 μm e **d)** 700-800 μm . Adaptado de [71].

Implantes com estruturas que apresentam um gradiente poroso e interconexão suficiente, permitem reproduzir o mais possível as funções e a estrutura do osso, seja ele cortical ou esponjoso. Elevada porosidade presente nos implantes possibilita o crescimento ósseo e porções menos densas permitem uma capacidade de carga semelhante à do osso natural [71].

A osteocondução do implante, isto é, a colonização do material pelo novo tecido ósseo, é garantida pela estrutura porosa do material em uso. Desta maneira, o implante poroso estabelece uma interface estável com os tecidos conjuntivos e serve como *scaffold* para a colonização e formação de tecido ósseo. De modo a beneficiar a penetração vascular e celular, que garante o crescimento ósseo no interior dos poros, a arquitetura porosa do implante deve ser bem controlada, nomeadamente, a dimensão dos poros e as interconexões entre estes [71].

Porém, a maioria dos estudos sugere que o crescimento do tecido ósseo e a colonização celular apenas acontecem se o tamanho dos macroporos estiver compreendido entre 100–200 μm [7, 76, 77] e se a interconectividade for superior a 50 μm [78].

Trabalhos anteriores [64] nos quais cerâmicas de fosfatos de cálcio foram dopadas com esferas de PMMA, demonstraram que os microporos nestes *scaffolds* foram bem-criados pela remoção das esferas utilizadas, e, que quanto maior o teor de esferas adicionadas maior a fração de microporos. Elevados níveis de porosidade interconectada oferecem caminhos favoráveis para o fornecimento de sangue, oxigénio e nutrientes e para o crescimento celular, permitindo uma regeneração óssea mais rápida [79].

Para produzir um material poroso, existem diversos métodos sintéticos, tais como, formação de espuma [7], agentes porogénicos [71], reação sólida [80], protótipo 3D [59], consolidação de amido [81], queima da fase orgânica [82] e replicação de esponjas [83].

Capítulo 3

Materiais e metodologia

Neste capítulo apresentam-se as matérias-primas base deste estudo, é exposto o planeamento experimental de misturas e descreve-se ainda, o processo de fabrico dos biocompósitos assim como os métodos de caracterização física, mecânica, microestrutural e biológica dos compósitos biocerâmicos. Conclui-se este capítulo mencionando as técnicas utilizadas para a caracterização das propriedades de interesse.

3.1. Materiais

3.1.1. Matérias-primas

Tendo por base as matérias-primas e os resultados obtidos em estudos anteriores, neste trabalho, adotaram-se as mesmas metodologias. Assim, dopou-se o TCP com 10 %mol de MgO e 5 %mol de uma mistura composta por Zn^{2+} , Mn^{2+} e Fe^{3+} , perfazendo desta forma, um total de 15 %mol de iões metálicos, sendo que, este valor corresponde à quantidade máxima de iões Ca^{2+} que conseguem ser substituídos na estrutura do TCP [44].

Para tal, carbonato de cálcio ($CaCO_3$, fornecido pela *PanReac AppliChem*), fosfato de amónio dibásico ($(NH_4)_3HPO_4$, 98+%, fornecido pela *Acros Organics*), óxido de magnésio (MgO, pureza mínima de 96 %, fornecido pela *Alfa Aesar*), óxido de manganês (II) (MnO, pureza de 99 %, fornecido pela *Alfa Aesar*), óxido de ferro III (Fe_2O_3 , 99,9 %, fornecido pela *Alfa Aesar*) e óxido de zinco (ZnO, 99,9 %, fornecido pela *Alfa Aesar*) foram misturados numa fração molar de 10 %mol de MgO (MgO em relação ao TCP formado) e outros óxidos, de acordo com a Tabela 3.1. Dado que, Fe_2O_3 tem 2 iões Fe^{3+} por cada unidade, a percentagem molar vai ser metade da Tabela 3.1 [37, 44].

Com o intuito de melhorar certas propriedades do TCP, procedeu-se à sua dopagem com 2 tipos de ZrO_2 . ZrO_2 estabilizada com 3 %mol de ítrio (3YSZ) fornecida pela *TOSOH* (Japão) com o LOT: Z308782P e ZrO_2 estabilizada com 8 %mol de ítrio (8YSZ) também fornecido pela *TOSOH* (Japão) com o LOT: Z807724P.

Com a intenção de induzir porosidade nas amostras, foram adicionadas esferas de PMMA, fornecidas pela *Acros Organics*.

Para melhor compreensão dos diferentes biocompósitos fabricados, foram adotadas 2 denominações, os biocompósitos densos, uma vez que, apresentam baixa porosidade e

biocompósitos porosos, nos quais a porosidade foi induzida através de esferas de PMMA e o seu valor é significativamente superior comparando com os biocompósitos nos quais não foi induzida porosidade.

3.1.2. Planeamento experimental das misturas

No seguimento de trabalhos anteriores realizados no grupo de investigação, foi usado TCP dopado com 10 %mol de MgO como matriz cerâmica que promove o aumento do teor de HA, densificação da microestrutura em cerca de 90 % e pela força mecânica de 27 MPa [44].

A adição de 5 %mol dos iões metálicos à matriz inicial, foi avaliada através de análise estatística na qual foi aplicada *design of experiments* (DOE), dado ser uma boa ferramenta para avaliar o efeito simultâneo de múltiplos fatores. Assim, foi utilizada para analisar a evolução da porosidade, densidade, compressão diametral e dureza [44]. De maneira a otimizar uma boa proporção das quantidades destes 3 iões recorreu-se a um sistema ternário, que tem como base modelos mais simples, tais como, o modelo linear quadrático, cúbico especial e cúbico total, a fim de garantir o maior grau de certeza estatística [44].

Utilizou-se um intervalo de confiança de 95 % e um erro máximo de 5 % ($p < 0,05$), a fim de se obterem as equações que caracterizam a dependência destes 3 iões. Esta metodologia é definida por um pequeno número de amostras que representam as diferentes composições. Considerando uma matriz cerâmica de 95 %, neste caso, TCP dopado com 10 %mol de MgO, foi selecionado um intervalo entre um mínimo de 0,25 e um máximo de 4,5 %mol de cada um dos 3 iões metálicos. Obteve-se um *design of a simplex*, numa distribuição equitativa planar com 7 pontos, correspondentes a cada uma das amostras, de acordo com a Figura 3.1 [44].

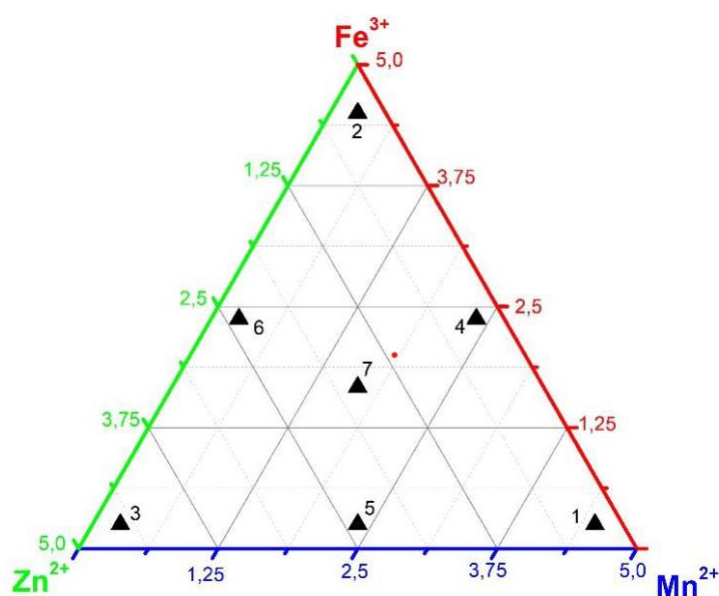


Figura 3.1. Layout experimental das distribuições das amostras [44].

Na Tabela 3.1 encontra-se a composição de cada amostra, representada pelos pontos de 1 a 7 na Figura 3.1 [44].

Tabela 3.1. Composições das amostras utilizadas em função dos iões metálicos. Adaptado de [44].

Amostras	Mn ²⁺ (%mol)	Fe ³⁺ (%mol)	Zn ²⁺ (%mol)
1	4,5	0,25	0,25
2	0,25	4,5	0,25
3	0,25	0,25	4,5
4	2,375	2,375	0,25
5	2,375	0,25	2,375
6	0,25	2,375	2,375
7	1,667	1,667	1,667

Foram utilizadas composições em que o teor de iões é diferente de zero, desta forma, garantimos que em todas as amostras a influência depende dos 3 reagentes. As amostras 1, 2 e 3 são as mais representativas da adição de Mn²⁺, Fe³⁺ e Zn²⁺, respetivamente, por sua vez, a amostra 7, sendo ela o centro da distribuição triangular, representa igualmente estes 3 iões.

3.1.3. Fabrico das amostras

Primeiramente e para que fosse possível produzir todos os biocompósitos, efetuou-se a pesagem dos diferentes reagentes (matérias-primas) com o auxílio de uma balança analítica (*Oertling*, capacidade máxima: 200 g, resolução: 0,0001 g). Em seguida, procedeu-se à seguinte mistura no interior de um vaso cerâmico de moagem (*Fritsch*, capacidade máxima: 250 ml, Alemanha): mistura com a respetiva massa de cada uma das seis matérias-primas perfazendo uma mistura de 50 g, 50 g de esferas de YSZ (*Fritsch*, Alemanha), com 3 mm de diâmetro, e 100 g de álcool isopropílico (*Labchem*, Portugal). De modo a facilitar o processo de mistura, foram então utilizadas esferas de YSZ e álcool isopropílico. O processo de moagem realizou-se num moinho de bolas de alta energia (*Fritsch, Pulverisette 6*, Alemanha) a 500 rpm durante 150 min, sendo que foram realizadas paragens a cada 30 min de modo a garantir o não sobreaquecimento do conteúdo no interior do vaso cerâmico. A mistura foi seca numa estufa (*Carbolite*, NR200-F, Reino Unido) a 60°C durante 48h. Após este processo, a mistura foi peneirada utilizando diversos peneiros (*Retsch*, AS200, Alemanha) com malhas de 75 µm, 150 µm e 300 µm. A peneiração vibratória permitiu separar as esferas de YSZ anteriormente colocadas e eliminar possíveis impurezas e/ou aglomerados presentes na mistura.

O procedimento descrito anteriormente foi repetido 3 vezes. Dado isto, todo o pó previamente peneirado foi colocado em cadinhos e calcinado em forno elétrico (*Termolab*, MLR, Portugal) a 1000°C durante 10h. Após a calcinação o conteúdo foi desenformado e colocado novamente no vaso cerâmico juntamente com novas esferas de YSZ e moído durante 1 min a 500 rpm de modo

a remover possíveis aglomerados que se tenham formado. Em seguida, recorrendo a um peneiro de mão o pó foi peneirado e devidamente armazenado.

Aquando deste último procedimento, iniciou-se o processo de dopagem com 3YSZ e 8YSZ. As composições e nomenclaturas usadas ao longo deste trabalho encontram-se resumidas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Nomenclatura e composição dos materiais estudados em fração molar (x_i), fração volumétrica (v_i) e fração mássica (w_i).

Materiais	Fração molar			Fração volumétrica			Fração mássica		
	x_i			v_i			w_i		
	TCP	3YSZ	8YSZ	TCP	3YSZ	8YSZ	TCP	3YSZ	8YSZ
10T	1	0	0	1	0	0	1	0	0
9T1tZ	0,7814	0,2186	0	0,9473	0,0527	0	0,9	0,1	0
8T2tZ	0,6138	0,3862	0	0,8888	0,1112	0	0,8	0,2	0
9T1cZ	0,7814	0	0,2186	0,9468	0	0,0532	0,9	0	0,1
8T2cZ	0,6138	0	0,3862	0,8877	0	0,1123	0,8	0	0,2

Assim, para a produção dos biocompósitos, tanto densos como porosos, vão ser utilizadas 5 composições diferentes, sendo elas, 10T que corresponde à amostra padrão, 9T1tZ e 8T2tZ com a adição de ZrO₂ maioritariamente com fase cristalina tetragonal (3YSZ) e 9T1cZ e 8T2cZ com a adição de ZrO₂ rica em fase cristalina cúbica (8YSZ).

Para cada uma das composições que possuem YSZ, ao pó anteriormente calcinado foi adicionada 3YSZ e 8YSZ de acordo com a fração mássica correspondente. A pesagem das matérias-primas efetuou-se recorrendo à balança analítica *Oertling*. Em seguida, procedeu-se à seguinte mistura no interior de um vaso cerâmico de moagem *Fritsch*: 15 g das matérias-primas de acordo com a fração mássica, 15 g de esferas de YSZ e 30 g de álcool isopropílico. Para facilitar o processo de mistura, foram utilizadas esferas de YSZ e álcool isopropílico. O processo de moagem realizou-se num moinho de bolas de alta energia *Fritsch, Pulverisette 6* a 500 rpm durante 150 min [84], sendo que foram realizadas paragens a cada 30 min de modo a garantir o não sobreaquecimento do conteúdo no interior do vaso cerâmico. A mistura foi seca numa estufa *Carbolite* a 60°C durante 48h. De seguida, a mistura foi peneirada utilizando diversos peneiros *Retsch* com malhas de 75 µm, 150 µm e 300 µm. A peneiração vibratória permitiu separar as esferas de YSZ anteriormente colocadas e eliminar possíveis impurezas e/ou aglomerados presentes na mistura. Este procedimento foi repetido para cada uma das composições que possuem YSZ. Após este processo obteve-se um tamanho de partícula, nas diferentes composições, inferior a 10 µm [44].

Com a intenção de produzir biocompósitos porosos, a cada uma das 5 composições anteriormente referidas, foi adicionado PMMA. As matérias-primas foram pesadas com o auxílio da balança analítica anteriormente utilizada, de acordo com a fração mássica 60:40, em que 60 % corresponde a cada uma das 5 composições e 40 % corresponde ao agente indutor de porosidade, o PMMA. As matérias-primas foram colocadas no interior do vaso cerâmico de moagem *Fritsch* e moídas durante cerca de 20 s a 500 rpm no moinho de bolas de alta energia *Fritsch*, de maneira a garantir uma mistura homogénea.

De forma a obter biocompósitos cilíndricos densos e porosos, de cada uma das 5 composições para posterior caracterização física, mecânica, microestrutural e biológica, utilizou-se a técnica de prensagem uniaxial. Esta, foi usada para compactar a mistura inserida numa matriz, através da aplicação de uma pressão uniaxial com recurso a uma máquina universal de testes eletromecânicos (*Shimadzu*, AGS-X, Japão), tal como ilustrado na Figura 3.2.

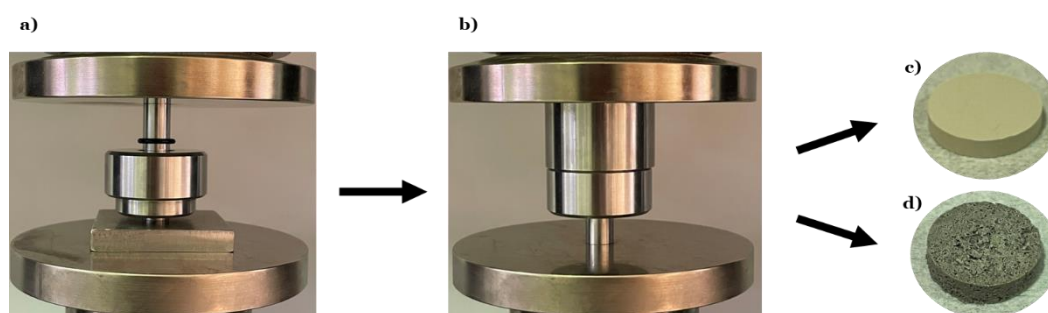


Figura 3.2. a) e b) Ilustração do processo de prensagem uniaxial; c) biocompósito cilíndrico denso; d) biocompósito cilíndrico poroso.

Cada biocompósito cilíndrico, com cerca de 0,65 g de massa, 13 mm de diâmetro e 3 mm de espessura, foi obtido através de uma matriz de aço inoxidável com 13 mm de diâmetro na qual foi aplicada uma pressão uniaxial de 50 MPa durante 10 s. Utilizou-se a mesma balança analítica para garantir que todas as amostras tinham uma massa de aproximadamente 0,65 g.

Posteriormente, as amostras foram sinterizadas em forno elétrico (*Termolab*, Portugal) com taxa de aquecimento de 5°C/min desde a temperatura ambiente até à temperatura de sinterização, 1300°C, na qual permaneceram durante 120 min. Sinterização pode definir-se como um processo de consolidação físico e químico, em que um determinado material adquire a resistência mecânica por difusão atômica e coalescência na presença de elevadas temperaturas [26]. Este processo elimina os espaços vazios entre as partículas, originando assim, um corpo rígido e denso [26, 85].

Durante este processo ocorrem determinadas reações termoquímicas que provocam alterações na dimensão dos materiais. Por esse motivo, recorreu-se a um paquímetro digital (*Powerfix Profi*, Portugal, resolução: 0,01 mm) para medir cada biocompósito após o processo de sinterização. No total foram contabilizados 35 biocompósitos densos e 50 biocompósitos porosos.

3.2. Propriedades físicas

3.2.1. Contração diametral

Durante o processo de sinterização ocorrem reações físicas e termoquímicas que provocam alterações na dimensão dos materiais. Por esse motivo, aquando da sinterização e em conformidade com a norma ASTM C179-04 [86], determinou-se a contração diametral, C_d , de acordo com a equação (1), onde d_f corresponde ao diâmetro final e d_i ao diâmetro inicial, ou seja, ao diâmetro da matriz utilizada.

$$C_d = \frac{d_f - d_i}{d_i} \times 100\% \quad (1)$$

Os resultados considerados correspondem à média de 7 e 10 biocompósitos, para o caso dos materiais densos e porosos, respetivamente. Os erros (desvio padrão) resultam da propagação do erro.

3.2.2. Densidade, porosidade e absorção de água

A porosidade pode apresentar benefícios nomeadamente quando se realizam ensaios biológicos, uma vez que, a porosidade dos materiais pode contribuir para uma melhor adesão celular tanto à superfície como ao interior do material. No entanto, também pode condicionar determinadas propriedades, como por exemplo, as mecânicas. Neste caso, uma porosidade elevada vai provocar uma diminuição na resistência dos materiais, mas permite que as suas funções sejam diferenciadoras em relação às amostras densas.

Em conformidade com o procedimento descrito na norma ASTM C20-00 [87] foram determinadas as seguintes propriedades físicas: densidade aparente, absorção de água e porosidade aparente. Em todas as pesagens foi sempre utilizada a balança analítica *Oertling*.

A massa a seco de cada biocompósito foi obtida após retirar os biocompósitos do forno elétrico no fim da sinterização, garantindo assim a inexistência de água no seu interior. Após esta medição, os biocompósitos foram colocados em água quente durante 24h. Removeram-se as gotas de água na superfície dos biocompósitos com o auxílio de um papel e determinaram-se as massas saturadas. Relativamente à massa imersa, esta foi obtida colocando os biocompósitos imersos em água com o auxílio de um fio de cobre que se localiza abaixo da balança analítica *Oertling*, conforme ilustrado na Figura 3.3.



Figura 3.3. Ilustração do processo de medição da massa imersa dos biocompósitos.

Quando os materiais são imersos, os poros são progressivamente preenchidos por água, fenómeno que contribui para que o valor exibido no mostrador da balança demore a estabilizar [26]. Este método de medição baseia-se na Lei de Arquimedes que afirma: “Todo o corpo mergulhado num fluido recebe, da parte deste, uma impulsão vertical de baixo para cima e de intensidade igual ao valor do peso do volume de fluido deslocado pelo corpo” [88]. Qualquer corpo quando imerso num fluido apresenta um peso inferior ao seu peso real, sendo, por esse motivo, designado de peso aparente [26].

A densidade aparente, D_a , foi determinada através do quociente entre a massa a seco, M_1 , e a diferença entre a massa a seco e a massa imersa, M_2 , equação (2). Assim, inclui tanto o volume do material como o dos poros fechados e é expressa em g/cm^3 .

$$D_a = \frac{M_1}{M_1 - M_2} \quad (2)$$

A absorção de água, A_a , calculou-se através da equação (3), que se refere ao quociente entre a diferença da massa saturada (M_3) e a seco e a massa a seco. Esta medida considera a quantidade de água absorvida pelos poros abertos do material expressa em percentagem da massa a seco.

$$A_a = \frac{M_3 - M_1}{M_1} \times 100\% \quad (3)$$

A porosidade aparente, P_a , determinou-se através do quociente entre a diferença da massa saturada e a seco e a diferença entre a massa saturada e imersa, equação (4). Traduz-se no volume de poros abertos expresso em percentagem do volume total do corpo.

$$P_a = \frac{M_3 - M_1}{M_3 - M_2} \times 100\% \quad (4)$$

A densidade teórica dos biocompósitos dopados com 3YSZ e 8YSZ, $D_{t\ TCP:3YSZ}$ e $D_{t\ TCP:8YSZ}$, respetivamente, foi calculada através da equação (5) e (6), onde v representa a fração volumétrica das respetivas matérias-primas e ρ_{TCP} corresponde a 3,07 g/cm³ (cartão teórico #09-0169), ρ_{3YSZ} a 6,134 g/cm³ (cartão teórico #50-1089) e ρ_{8YSZ} a 6,069 g/cm³ (cartão teórico #49-1642). Neste trabalho, a densidade relativa também foi calculada baseando-se nas frações molares. Nesse caso, na equação, v , corresponde à fração molar das respetivas matérias-primas.

$$D_{t\ TCP:3YSZ} = v_{TCP} \times \rho_{TCP} + v_{3YSZ} \times \rho_{3YSZ} \quad (5)$$

$$D_{t\ TCP:8YSZ} = v_{TCP} \times \rho_{TCP} + v_{8YSZ} \times \rho_{8YSZ} \quad (6)$$

A densidade relativa, D_r , calculou-se através do quociente entre a densidade aparente e a densidade teórica, D_t , equação (7). Esta medida permite avaliar percentualmente a porosidade total do material.

$$D_r = \frac{D_a}{D_t} \times 100\% \quad (7)$$

Em relação aos biocompósitos densos, calculou-se a relação entre a espessura, e , e o diâmetro, d , que deve ser $\leq 0,25$ mm [89], equação (8). Esta relação apenas é válida para obter a fratura na direção perpendicular à força de tração durante o ensaio mecânico de compressão diametral para materiais densos.

$$\frac{e}{d} \leq 0,25 \quad (8)$$

Para cada composição foram usadas 7 amostras, assim, os resultados obtidos correspondem à média das 7 medições e o desvio padrão corresponde à propagação do erro. No caso dos biocompósitos porosos, os resultados correspondem à média de 10 medições por cada composição e o desvio padrão ao erro.

De maneira a garantir que todo o PMMA adicionado tinha sido removido, foi realizado o processo de lixiviação primeiramente apenas nos biocompósitos da composição 10T, que correspondem aos biocompósitos porosos padrão. Assim, os biocompósitos foram colocados em água quente a uma temperatura constante de 80°C durante cerca de 2h, sendo que em ciclos de 30 min os biocompósitos foram colocados no aparelho de ultrassons (*Argo Lab*, AU-65, Itália) cerca de 30 s. Em seguida, foram colocados na estufa *Carbolite* a 40°C durante 24h para que toda a água evaporasse. Quando totalmente secos, com o auxílio da balança analítica *Oertling*, a massa a seco de cada biocompósito foi medida. Ao comparar com as massas a seco anteriores, verificou-se que se obteve uma redução mínima, cerca de 2,9 %, dentro do intervalo de confiança, por esse motivo,

pode dizer-se que o PMMA adicionado foi removido durante o ciclo de sinterização, e, assim, não se procedeu à lixiviação nos restantes biocompósitos porosos.

3.3. Propriedades mecânicas

3.3.1. Tensão de rutura

O estudo da resistência mecânica é bastante pertinente nomeadamente em aplicações para substitutos ósseos, já que estes têm de apresentar resistência mecânica suficiente para suportarem as forças exercidas ao longo do processo de regeneração óssea.

A caracterização mecânica de materiais frágeis, tal como as cerâmicas, experimentalmente é encarada como uma tarefa complexa, dado que a dureza e a fragilidade associada complicam o manuseamento das amostras [26]. Por forma a determinar a resistência mecânica deste tipo de materiais pode ser aplicada a técnica de compressão diametral, também designada por ensaio brasileiro [89].

Durante o ensaio de compressão diametral, um disco é comprimido através de 2 placas planas ao longo de um diâmetro, até que ocorra rutura, tal como é observável na Figura 3.4 a). A rutura ocorre ao longo do plano diametral e os discos partem-se em 2 partes semelhantes [90], Figura 3.4 b), c), d) e e). A compressão induz uma tensão de tração, a qual é perpendicular ao diâmetro comprimido, e constante numa vasta região em torno do centro do disco [89].

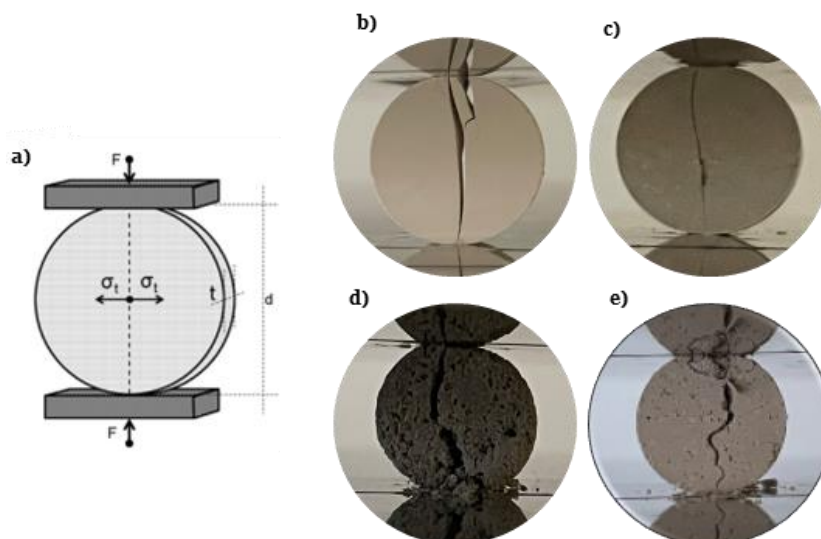


Figura 3.4. a) Ilustração do ensaio de compressão diametral. Adaptado de [90]; b) e c) aspeto de uma amostra densa válida após o ensaio de compressão diametral; d) e e) aspeto de uma amostra porosa válida após o ensaio de compressão diametral.

No instante em que ocorre a rutura do material, é observada uma queda de carga na curva força-deslocamento registada durante este ensaio [90], tal como é ilustrado na Figura 3.5.

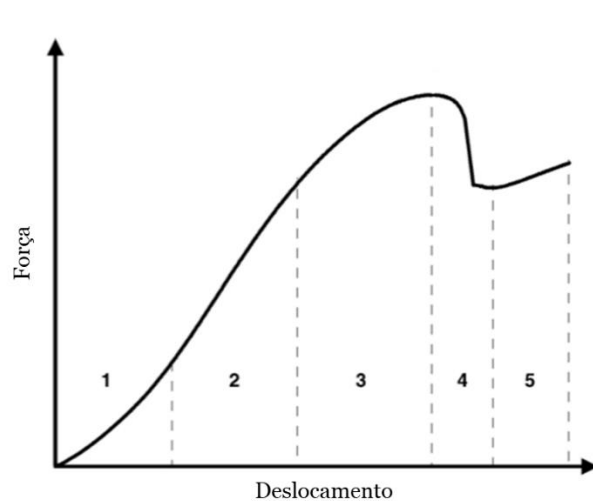


Figura 3.5. Curva força-deslocamento típica do ensaio de compressão diametral. **1)** região elástica não linear; **2)** região elástica linear; **3)** início da rutura do material; **4)** força máxima suportada pelo material/ rutura do material; **5)** fim do ensaio. Adaptado de [89].

A resistência à tração (tensão de rutura) é calculada baseando-se no facto de que a rutura se inicia no ponto de tensão de tração máxima, ou seja, no centro do disco [91]. No caso em que se verificam as condições específicas, o ensaio é considerado válido e a resistência à tração, σ_x , pode ser calculada através da equação (9), onde F corresponde à força máxima aplicada, ou seja, a tensão máxima que a amostra suporta até ocorrer a rutura, d , o diâmetro e, e , a espessura da amostra cilíndrica.

$$\sigma_x = \frac{2F}{\pi de} \quad (9)$$

O ensaio de compressão diametral realizou-se com uma máquina universal de testes eletromecânicos (*Shimadzu*, AGS-X, Japão), com uma célula de carga de 10000 N [89] a uma taxa de deslocamento do travessão da prensa de 0,5 mm/min [90]. Este ensaio foi realizado tanto para as 7 amostras dos biocompósitos densos de cada composição como para as 10 amostras dos biocompósitos porosos de cada composição.

3.4. Propriedades microestruturais

3.4.1. Difração de raios-X

Para confirmar se a reação de dopagem ocorreu, foi realizado o teste de DRX nos biocompósitos densos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ (composição detalhada na Tabela 3.2), uma vez que as composições 8T2tZ e 8T2cZ têm a maior concentração de cada ZrO_2 estudada e a composição 10T a mesma concentração de cada ião sem a adição de 3YSZ e 8YSZ.

A DRX consiste numa técnica de análise versátil, rápida e não-destrutiva, em que as suas principais aplicações são a análise quantitativa e qualitativa das fases cristalinas presentes num vasto tipo de amostras [26, 92].

Quando os átomos constituintes de um material cristalino, tal como a cerâmica, são irradiados por um feixe de raios-X com um ângulo específico, ocorre a dispersão da radiação em todas as direções. As ondas de raios-X dispersas pelos distintos planos cristalinos interferem entre si originando interferências construtivas ou destrutivas. No primeiro caso, verifica-se um aumento na intensidade da onda e no segundo uma diminuição ou até mesmo extinção da intensidade da onda. A interferência construtiva dos raios-X dispersos, origina a difração. Tal interferência apenas se verifica quando a relação expressa pela lei de *Bragg* é satisfeita, a qual enuncia que a diferença na distância percorrida pelas 2 ondas difratadas pelos átomos A e B tem de ser um múltiplo inteiro do comprimento de onda. Assim, a lei de *Bragg*, equação (10), relaciona o ângulo da radiação incidente, θ , a distância entre os planos dos cristais de índices de *Miller*, d_{hkl} , o comprimento de onda da radiação incidente, λ , e a ordem de difração, n [26, 92].

$$n\lambda = CB + BD = 2d_{hkl}\text{sen}(\theta) \quad (10)$$

Na Figura 3.6, está representado o esquema da geometria associada à DRX.

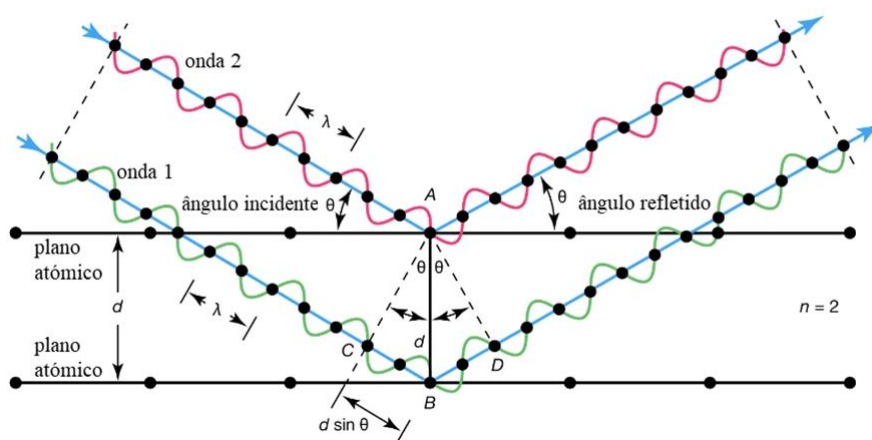


Figura 3.6. Esquema da geometria da DRX. Adaptado de [93].

Por observação da Figura 3.6, ressalta-se que o ângulo da radiação incidente é igual ao ângulo do feixe difratado/refletido [92].

Quando as amostras são submetidas a raios-X com um λ específico, é possível obter um difractograma com a representação da intensidade da radiação difratada em função do ângulo de difração 2θ . Para uma difração máxima, ou seja, quando a lei de *Bragg* é satisfeita, é possível calcular a(s) distância(s) interplanare(s) das fases cristalinas presentes na amostra. Já que cada substância cristalina possui distâncias interplanares específicas, é possível identificá-las comparando-as com valores tabelados [26, 92].

Tal como referido anteriormente, a técnica de DRX foi utilizada para confirmar se a reação de dopagem ocorreu nos biocompósitos densos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ sendo estes reduzidos a pó manualmente com a ajuda de um conjunto pilão/almofariz. Os ensaios de DRX foram realizados através de um difratómetro de raios-X (DMAX III/C, *Rigaku*, Japão) que utiliza a geometria horizontal *Bragg–Brentano* ($\theta/2\theta$). O tubo de raios-X operou a 40 kV a 30 mA utilizando radiação CuK α . A intensidade da radiação difratada em função do ângulo de difração 2θ foi obtida numa gama entre 5° e 90°. Os difractogramas obtidos pela realização desta técnica, foram comparados com os cartões teóricos disponíveis na base de dados ICDD (*International Centre for Diffraction Data*) do software de análise MDI/JADE 6, em que #37-1484 refere-se à m-ZrO₂, #50-1089 t-ZrO₂, #49-1642 c-ZrO₂, #09-0432 à HA, #09-0169 ao β -TCP e #09-0348 ao α -TCP. Os teores de cada fase cristalina das composições em percentagem volúmica (%vol) foram quantificados através de refinamentos de *Rietveld* utilizando o software *FullProf* [94].

3.4.2. Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) consiste numa técnica poderosa para a observação de superfícies e análise de características morfológicas, topográficas e microestruturais, entre elas o tamanho de grão, porosidade e presença de diferentes fases. A técnica de SEM utiliza um feixe de eletrões que percorre toda a superfície das amostras sob a forma de varrimento. A interação entre o feixe de eletrões e o material proporciona a obtenção de um vasto conjunto de informações, que após o processamento origina imagens de elevada ampliação relacionadas à superfície da amostra analisada [95]. Os diferentes sinais gerados pela interação entre a amostra analisada e o feixe de eletrões são ilustrados na Figura 3.7.

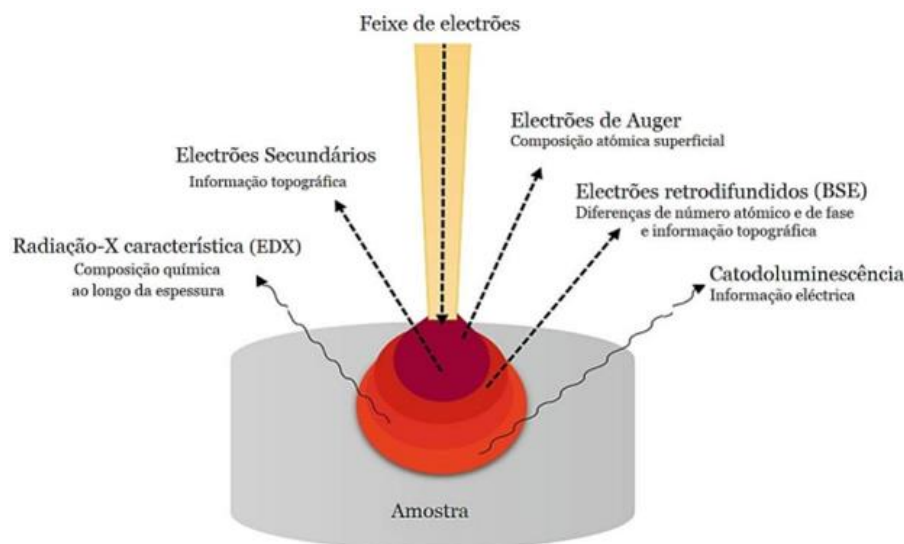


Figura 3.7. Diferentes sinais gerados pela interação entre a amostra e o feixe de eletrões [26].

Neste trabalho, as amostras dos biocompósitos fraturados anteriormente pelo ensaio de compressão diametral, foram analisadas por SEM de maneira a garantir que as fraturas não foram originadas por esmagamento local extensivo perto dos pontos de carga [1].

Como as biocerâmicas não apresentam condutividade elétrica, a sua superfície foi revestida com ouro utilizando um *turbomolecular pumped coater* (*Quorum Technologies*, Q150R ES, Reino Unido). As imagens da superfície dos compósitos biocerâmicos densos com ampliações de 1000x e 5000x e dos compósitos biocerâmicos porosos com ampliações de 100x e 200x, foram obtidas no microscópio eletrónico de varrimento (*Hitachi*, S-3400 N, Japão) no modo BSE 3D (*Backscattered electrons*) com uma tensão de aceleração de 20 kV.

A análise química das amostras foi realizada recorrendo a SEM com uma sonda de dispersão de energia de raios-X (EDX, *Brucker Quantax 400*, EUA). A análise EDX foi realizada utilizando uma área, onde os picos de ouro não foram considerados e todos os outros picos correspondentes a Ca²⁺, P e O e também os iões metálicos de Mg²⁺, Mn²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ e ZrO₂ adicionados na composição foram quantificados. Neste tipo de análise, o hidrogénio (H⁺) não é detetado [96].

Para além disto, neste trabalho, a fixação celular aos compósitos biocerâmicos porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ foi também avaliada por análise de SEM. O procedimento detalhado encontra-se descrito na secção 3.5, referente às propriedades biológicas.

3.5. Propriedades biológicas

3.5.1. Ensaio de citocompatibilidade

Com base em estudos anteriores [1, 97], adotaram-se as mesmas metodologias para a caracterização biológica dos compósitos biocerâmicos produzidos. Assim, para ser possível realizar o ensaio para avaliar a citocompatibilidade dos compósitos biocerâmicos, foi necessário semear uma linha celular e realizar diversas tripsinizações com o intuito de manter as células estáveis e viáveis.

Para tal, foram utilizados como matérias-primas e materiais para a caracterização biológica, uma linha celular primária de osteoblastos humanos (*human osteoblasts*, hOB) (adquiridos à *Cell Applications, Inc.*, San Diego, Estados Unidos da América (EUA)), *t-flasks* de 75 cm³ de cultura celular (adquiridos à *Orange Scientific, Braine-l'Alleud*, Bélgica), *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM-F12, adquirido à *Sigma-Aldrich*, Sintra, Portugal), bicarbonato de sódio (NaHCO₃, adquirido à *Labchem*, Santo Antão do Tojal, Portugal), água duplamente desionizada (água ultrapura, obtida utilizando um sistema de purificação de água ultrapura *Milli-Q Advantage A10*, filtrada a 0,22 µm e 18,2 MΩ cm a 25°C), soro fetal bovino (FBS, adquirido à *Biochrom AG*, Berlim, Alemanha), tripsina (adquirida à *Sigma-Aldrich*, Sintra, Portugal), resazurina (adquirida à *Sigma-Aldrich*, Sintra, Portugal), espectrofluorímetro (Espectrofluorímetro *SpectraMax Gemini EM* adquirido à *Molecular Devices*, San José, Califórnia (CA), (EUA)).

Assim, a linha celular de hOB foi semeada num *t-flask* de 75 cm³ onde foram adicionados 10 ml de meio DMEM-F12, suplementado com NaHCO₃, água duplamente desionizada, 10 % FBS e 1 %

de Ab. Posteriormente, o *t-flask* com as células foi colocado na incubadora a 37°C com 5 % CO₂. Para manter as células estáveis, viáveis e para evitar que estas morressem por confluência, foram realizadas diversas tripsinizações.

Nestes ensaios, foi utilizada a tripsina, e, neste caso, foram adicionados 5 ml de tripsina ao *t-flask* com as células, os quais atuaram durante 5 min, a 37°C com 5 % CO₂. A tripsina é uma enzima proteolítica, cujo intuito é quebrar as ligações célula-célula e célula-*t-flask*. Esta enzima é produzida a partir da proenzima, o tripsinogénio, secretada pelas células exócrinas pancreáticas e atua no lado C-terminal da lisina ou da arginina. A atividade ótima da tripsina é atingida a 37°C, logo, quando pré aquecida acelera a quebra das ligações [98]. Quando a tripsinização está completa, as células encontram-se em suspensão, e, por esse motivo, apresentam uma forma arredondada, podendo confirmar-se tal facto pela observação ao microscópio ótico. A incubação a longo prazo com tripsina, danifica as células através da remoção das proteínas da superfície celular acabando por matá-las [98]. Para evitar que tal aconteça, é necessário parar a ação desta enzima através da adição de meio na mesma quantidade de tripsina adicionada anteriormente, neste caso, 5 ml de DMEM-F12.

Para avaliar a citocompatibilidade dos biocompósitos produzidos acima em hOB, usou-se o ensaio de resazurina [99]. Para esse fim, após realizar a tripsinização, o conteúdo resultante desse ensaio (5 ml de tripsina + 5 ml DMEM-F12 + células em suspensão) foi transferido para um tubo de *falcon* de 50 ml estéril e centrifugado durante 5 min a 1500 rpm a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi diluído em 1 ml de meio. Em seguida, 20 µl desta mistura foram transferidos para um *ependorfa* aos quais foram adicionados 180 µl de corante *trypan blue* a fim de realizar-se a contagem celular com o auxílio de uma câmara de *neubauer*. Posteriormente, as células foram semeadas numa densidade de 15 000, 10 000 e 2500 células/poço em 3 placas de 48 poços, e ficaram na incubadora durante 24h a 37°C para estas aderirem ao fundo dos poços. Após este tempo, o meio foi retirado e as células foram incubadas com os biocompósitos (10 % de material em relação à área do poço [100]), em seguida foram colocados 300 µl de meio em todos os poços. Para cada uma das composições produzidas anteriormente foram utilizados 5 poços, assim como para o controlo negativo (K⁻), totalizando 30 poços por cada uma das placas utilizadas, tal como representado na Figura 3.8. Adicionalmente foi feita uma placa para realizar os controlos positivos (K⁺), onde foi adicionado lixívia a todos os poços para promover a morte das células.

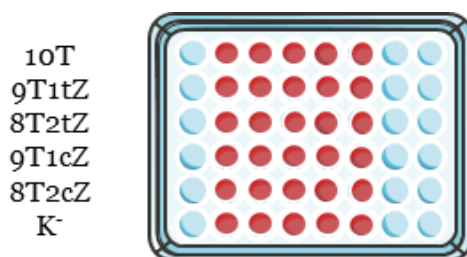


Figura 3.8. Representação da organização de uma placa de 48 poços utilizada.

Importante realçar que, antes das células serem incubadas com os materiais, estes foram esterilizados por irradiação ultravioleta (UV) durante 1h [1]. Ao fim de 1, 3 e 7 dias de incubação, o meio e o material foram retirados e os hOB foram incubados com 220 µl de resazurina 10 % (v/v) [97, 99].

O *Alamar Blue* é um dos reagentes mais utilizados em ensaios de viabilidade celular que contém o corante azul permeável às células, não tóxico e não fluorescente, mais conhecido como resazurina. A resazurina é usada como um indicador de oxidação-redução e sofre uma alteração de cor em resposta à redução metabólica celular. A forma reduzida, a resorufina, tem cor rosa, é altamente fluorescente e a intensidade da fluorescência produzida é proporcional ao número de células vivas [99, 101]. Na Figura 3.9 estão representadas as estruturas químicas da resazurina e da resorufina.

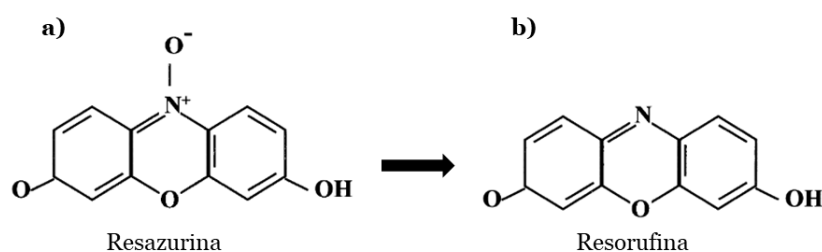


Figura 3.9. Estruturas químicas da resazurina e da resorufina. **a)** Alamar Blue não reduzido corresponde à resazurina; **b)** Alamar Blue reduzido corresponde à resorufina. Adaptado de [99].

Após 4h de incubação da resazurina nas células determinou-se a viabilidade celular através da medição da fluorescência da resorufina com um comprimento de onda de excitação e emissão (λ_{ex} e λ_{em}) de 545 nm e 590 nm, respetivamente [97, 99]. Para isso, foi usado o Espectrofluorímetro *SpectraMax Gemini EM*, onde 80 µl do conteúdo de cada poço das placas de 48 poços foi transferido para uma placa de 96 poços preta de fundo transparente (placa adequada para fazer estas leituras).

De referir que, a placa correspondente ao dia 1 de incubação com material contém uma densidade de 15 000 células/poço, a de dia 3, 10 000 células/poço e a placa de dia 7, 2500 células/poço.

Todo o procedimento descrito anteriormente foi realizado primeiramente para os biocompósitos densos e posteriormente para os porosos.

3.5.2. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos realizou-se com o *GraphPad Prism* versão 8.0 (versão de teste, *GraphPad Software*, CA, EUA). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (s.d.). *One-way analysis of variance* (ANOVA) com o teste *Student–Newman–Keuls* foi utilizada para comparar diferentes grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo [97].

3.5.3. Análise da fixação celular

Tal como referido anteriormente, a fixação celular aos compósitos biocerâmicos porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ foi também avaliada por SEM.

Para tal, amostras dos 5 biocompósitos porosos, previamente esterilizadas nas mesmas condições usadas anteriormente, foram colocados em placas de 24 poços e incubados com 100µl de DMEM-F12 + células e colocados na incubadora durante 3h a 37°C. De referir que os 100 µl foram colocados sobre as amostras do material de maneira a garantir que as células iriam crescer naquela região e utilizou-se uma densidade celular de 15 000 células/poço. Passadas 3h, foram adicionados a cada poço 400 µl de DMEM-F12 e colocados novamente na incubadora por 3 dias a 37°C. Após este tempo, o meio foi removido e de maneira a fixar as células aos biocompósitos, foram adicionados 500 µl de glutaraldeído a 2,5% (v/v) a cada poço durante 1 h. Em seguida, estas amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol (50, 70 e 99%) durante 5 min cada, congeladas a -80°C durante 1 h e liofilizadas durante 3 h. Por fim, as amostras foram revestidas com ouro através do *turbomolecular pumped coater* utilizado anteriormente.

As imagens da fixação celular aos compósitos biocerâmicos porosos com ampliações de 3000x e 5000x, foram obtidas no microscópio eletrónico de varrimento utilizado anteriormente, com as mesmas condições descritas na secção 3.4.2.

Capítulo 4

Resultados e discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados experimentais obtidos através das metodologias descritas no capítulo 3. Os resultados foram analisados e comparados entre si e ainda com resultados presentes na literatura da especialidade. Relativamente aos desvios padrão associados a cada uma das propriedades estudadas neste capítulo, pelo facto de em alguns casos o valor ser muito pequeno, para melhor interpretação dos gráficos, foi usado um marcador gráfico de menor dimensão para que este ficasse mais evidente.

4.1. Propriedades físicas

4.1.1. Contração diametral

Os resultados referentes à contração diametral dos biocompósitos densos e porosos, apresentados na forma de gráficos na Figura 4.1, foram obtidos de acordo com o que se encontra descrito na secção 3.2. Assim, na Figura 4.1 está demonstrada a evolução da contração diametral nos biocompósitos dopados com 3YSZ e 8YSZ, de acordo com a percentagem de 3YSZ e 8YSZ adicionada, respetivamente.

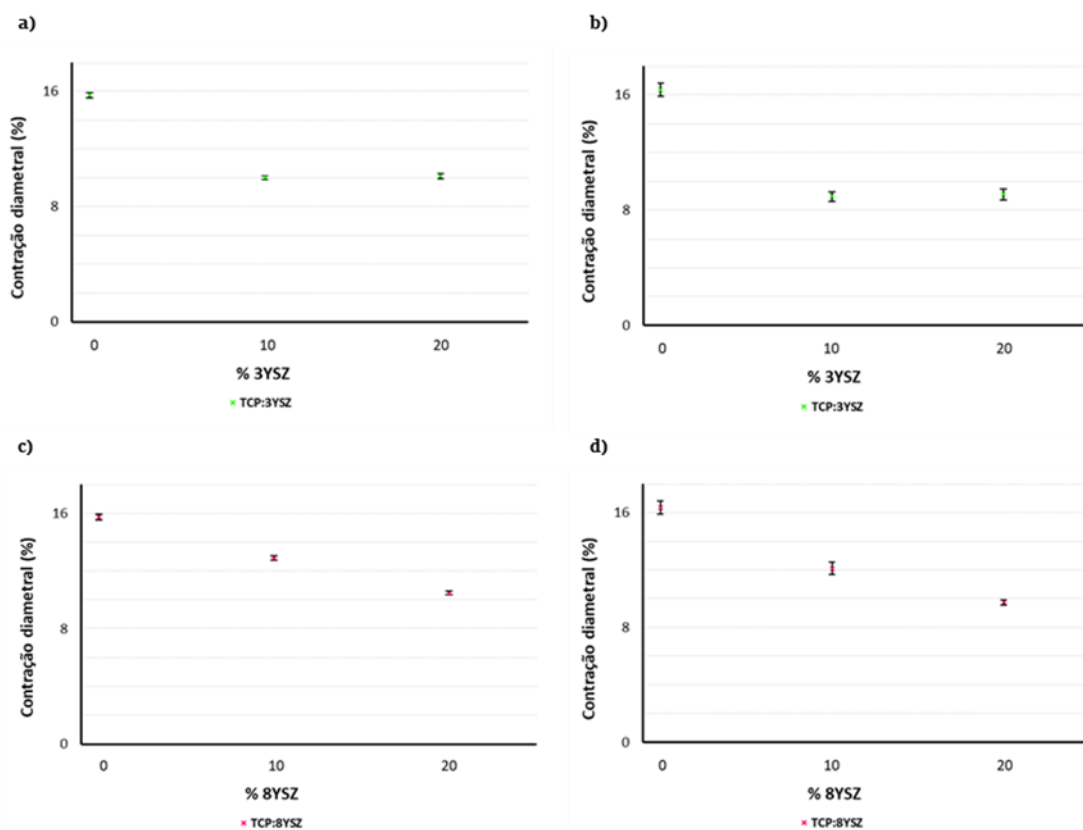


Figura 4.1. Evolução da contração diametral nos biocompósitos: **a)** densos dopados com 3YSZ; **b)** porosos dopados com 3YSZ; **c)** densos dopados com 8YSZ e **d)** porosos dopados com 8YSZ.

Durante a sinterização dos biocompósitos densos e porosos dopados com 3YSZ, Figura 4.1 a) e b), verificou-se uma contração diametral compreendida entre 10,01 % e 15,74 %, e 8,95 % e 16,36 % nos biocompósitos densos e porosos, respetivamente. Em ambos os casos o menor valor corresponde aos biocompósitos 9T1tZ e o maior aos 10T, ou seja, aos materiais que não foram dopados com 3YSZ. Com a adição de ZrO₂ a contração diminui, contudo, comparando os biocompósitos 9T1tZ e 8T2tZ, existe um ligeiro aumento, cerca de 0,1 % e 0,17 %, na contração dos biocompósitos densos e porosos, respetivamente, ao elevar a quantidade de 3YSZ para 20 %.

Relativamente ao desvio padrão, os biocompósitos densos apresentaram valores entre $\pm 0,11$ e $\pm 0,19$ e os porosos entre $\pm 0,34$ e $\pm 0,44$. Para os densos o menor valor de desvio padrão corresponde aos biocompósitos 9T1tZ e o maior aos 10T e 8T2tZ, já que estes apresentam o mesmo valor. Para os porosos, o desvio padrão diminui, passando de $\pm 0,44$ para $\pm 0,34$, nos biocompósitos 10T e 9T1tZ, respetivamente, mas sofreu um ligeiro aumento, passando o seu valor para $\pm 0,38$ nos biocompósitos 8T2tZ.

À semelhança dos biocompósitos anteriores, também nos biocompósitos densos e porosos com 8YSZ, Figura 4.1 c) e d), verificou-se uma contração com valores entre 10,48 % e 15,74 %, e 9,75 % e 16,36 % nos biocompósitos densos e porosos, respetivamente. Nos 2 casos o valor mais baixo corresponde aos biocompósitos 8T2cZ e o mais alto aos 10T. Por observação da Figura 4.1 c) e d) é notório que, com o aumento de 8YSZ a contração diametral tende a diminuir.

Os biocompósitos densos com 8YSZ apresentaram o mesmo intervalo de valores para o desvio padrão que os biocompósitos densos com 3YSZ e nos porosos com 8YSZ o desvio padrão apresentou valores compreendidos entre $\pm 0,16$ e $\pm 0,44$. Em ambos os casos, à medida que a quantidade de 8YSZ aumentou o desvio padrão diminuiu passando de $\pm 0,19$ para $\pm 0,14$ e por fim $\pm 0,11$, nos biocompósitos densos 10T, 9T1cZ e 8T2cZ, respetivamente, e, de $\pm 0,44$ para $\pm 0,43$ e por fim $\pm 0,16$, nos biocompósitos porosos 10T, 9T1cZ e 8T2cZ, respetivamente.

Comparando as duas ZrO_2 usadas em ambos os tipos de biocompósitos fabricados, verifica-se que os biocompósitos dopados com 8YSZ apresentaram um comportamento mais constante à medida que ia sendo adicionada ZrO_2 tanto para o valor da contração diametral como para o valor do desvio padrão, em que ambos foram diminuindo com a adição de 8YSZ, o mesmo não aconteceu com os biocompósitos dopados com 3YSZ. Os valores da contração diametral e do desvio padrão diminuíram para os biocompósitos 9T1tZ em relação ao padrão, mas com 20 % de 3YSZ ambos os valores tiveram um ligeiro aumento.

Contudo, é de ressaltar que os biocompósitos densos dopados tanto com 3YSZ como com 8YSZ, apresentaram valores de contração diametral com um intervalo de confiança menor, e, relativamente aos desvios padrão, nestes biocompósitos os valores foram bem menores comparando com os porosos.

Vários estudos já comprovaram que para cerâmicas com 3YSZ e 8YSZ em que seja utilizada uma temperatura de sinterização entre $1350-1550^\circ C$ os valores de contração diametral vão estar compreendidos entre $\sim 15-31$ % sendo que estes aumentam de acordo com o aumento da temperatura [102, 103]. Neste trabalho e tal como referido anteriormente, foi utilizada uma temperatura de sinterização de $1300^\circ C$, o que à partida significaria que o intervalo de valores relativos à contração diametral seria menor, e tal foi verificado. Para os biocompósitos densos com 3YSZ e 8YSZ verificaram-se valores entre $\sim 10-15,74$ % e para os biocompósitos porosos com 3YSZ e 8YSZ, $8,95-16,36$ % e $10,48-16,36$ %, respetivamente. É, portanto, notório que com temperaturas de sinterização menores e com a adição das ZrO_2 os valores da contração diametral tendem a diminuir. Por outro lado, *Ayoub et al.* [60] também verificaram uma diminuição na contração de matrizes de fosfatos de cálcio na presença de partículas de YSZ.

4.1.2. Relação entre o diâmetro e a espessura

Nesta subsecção, os resultados apresentados na forma de gráficos foram obtidos de acordo com o que se encontra descrito na secção 3.2.

Os resultados referentes à relação entre o diâmetro e a espessura dos biocompósitos densos dopados com 3YSZ e 8YSZ são apresentados na forma de gráficos na Figura 4.2. Assim, na Figura 4.2 está demonstrada a evolução da relação entre o diâmetro e a espessura dos biocompósitos

dopados com 3YSZ e 8YSZ, de acordo com a percentagem de 3YSZ e 8YSZ adicionada, respetivamente.

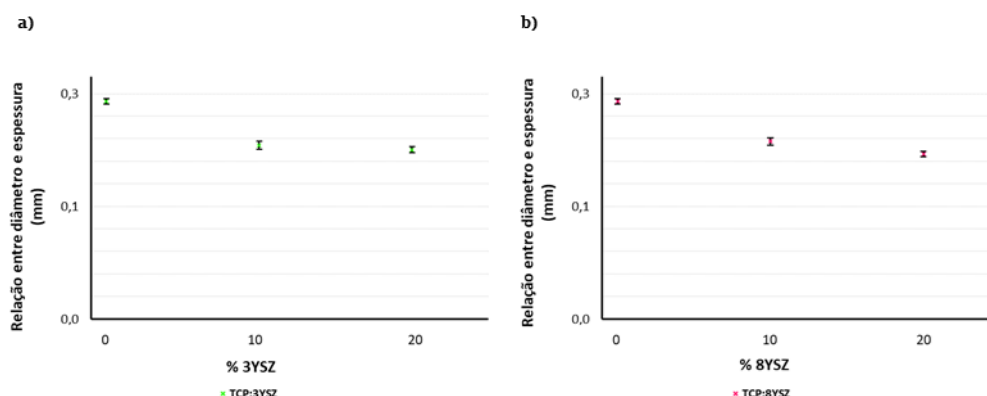


Figura 4.2. Evolução da relação entre o diâmetro e a espessura nos biocompósitos densos: **a)** dopados com 3YSZ e **b)** dopados com 8YSZ.

Por observação da Figura 4.2 a) e b), é notório que com a adição de 3YSZ e 8YSZ, respetivamente, a relação entre o diâmetro e a espessura diminui gradualmente em relação ao padrão. Em ambos os casos, verificaram-se valores compreendidos no intervalo de confiança entre 0,20 e 0,26 mm, o que está em concordância com a literatura [89] que enuncia que esta relação deve ter valores $\leq 0,25$ mm, sendo que o menor valor corresponde aos biocompósitos com 20 % da respetiva ZrO_2 e o maior aos 10T.

Relativamente ao desvio padrão, os biocompósitos com 3YSZ apresentaram valores entre $\pm 0,004$ e $\pm 0,005$. Com a adição de 10 % de 3YSZ o desvio padrão aumentou comparativamente ao padrão para $\pm 0,005$ e com 20 % de 3YSZ o desvio padrão voltou a diminuir para $\pm 0,004$, apresentando o mesmo valor que o padrão. Os biocompósitos com 8YSZ, apresentaram valores de desvio padrão compreendidos entre $\pm 0,003$ e $\pm 0,005$. Com a adição de 10 % de 8YSZ o desvio padrão passou de $\pm 0,004$ para $\pm 0,005$, mas com 20 % desta ZrO_2 diminuiu para $\pm 0,003$. Dado isto, os biocompósitos com uma menor relação entre o diâmetro e a espessura são também aqueles que apresentam o menor desvio padrão.

Comparando as duas ZrO_2 usadas, o comportamento de ambas foi extremamente semelhante. Em ambos os casos os valores da relação seguiram a mesma tendência, ou seja, com o aumento da respetiva ZrO_2 os biocompósitos sofreram diminuição gradual no valor da relação entre o diâmetro e a espessura em comparação com o padrão e apresentaram exatamente os mesmos valores. No que concerne ao valor do respetivo desvio padrão, em ambos os casos, com a presença de 10 % da respetiva ZrO_2 , este aumentou $\pm 0,001$ em relação ao padrão e com a adição de 20 %, diminuiu $\pm 0,001$ em relação aos biocompósitos com 10 % igualando desta forma o valor do padrão, no caso dos biocompósitos com 3YSZ, e diminuiu $\pm 0,001$ em relação ao padrão no que diz respeito aos biocompósitos com 8YSZ.

4.1.3. Densidade, porosidade e absorção de água

Também nesta esta subsecção, os resultados apresentados na forma de gráficos foram obtidos de acordo com o que se encontra descrito na secção 3.2.

Os resultados referentes à densidade aparente dos biocompósitos densos e porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ são apresentados na forma de gráficos na Figura 4.3. Assim, na Figura 4.3 está demonstrada a evolução da densidade aparente nos biocompósitos dopados com 3YSZ e 8YSZ, de acordo com a percentagem de 3YSZ e 8YSZ adicionada, respetivamente.

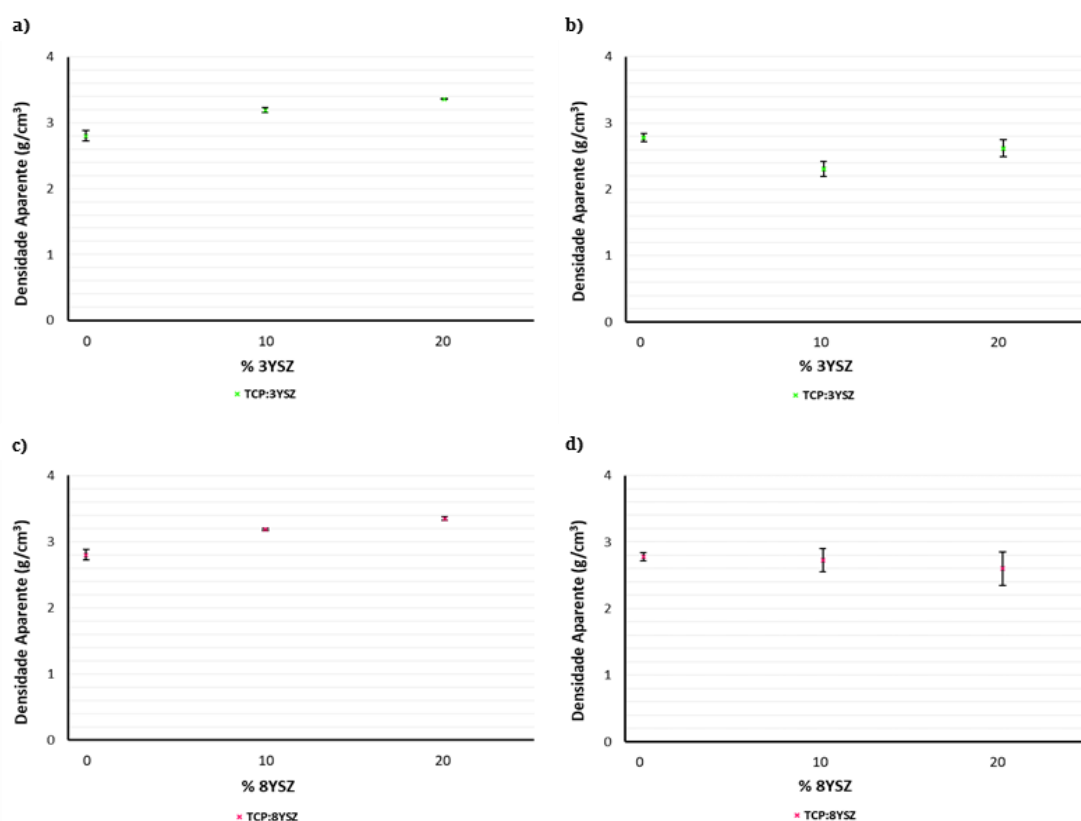


Figura 4.3. Evolução da densidade aparente nos biocompósitos: **a)** densos dopados com 3YSZ; **b)** porosos dopados com 3YSZ; **c)** densos dopados com 8YSZ e **d)** porosos dopados com 8YSZ.

Observando a Figura 4.3 a) e c) é notório que à medida que a percentagem de 3YSZ e 8YSZ aumenta, a densidade dos biocompósitos densos também aumenta de forma gradual. Verificaram-se valores compreendidos no intervalo de confiança entre 2,80 e 3,36 g/cm³, e, entre 2,80 e 3,35 g/cm³ para os biocompósitos dopados com 3YSZ e 8YSZ, respetivamente. Em ambos os casos, o menor valor corresponde aos biocompósitos 10T e o maior aos biocompósitos com 20 % da respetiva ZrO₂, ou seja, 8T2tZ e 8T2cZ, fazendo destes os mais densos.

Em ambos os casos o desvio padrão apresentou valores entre $\pm 0,01$ e $\pm 0,08$. Com o aumento da percentagem de 3YSZ o desvio padrão foi diminuindo passando de $\pm 0,08$, para $\pm 0,03$ e por fim $\pm 0,01$, nos biocompósitos 10T, 9T1tZ e 8T2tZ, respetivamente. Dado isto, os biocompósitos com maior densidade aparente possuem o menor desvio padrão e os biocompósitos com a menor

densidade, o maior desvio padrão. Por outro lado, com a adição de 10 % de 8YSZ o desvio padrão diminuiu de $\pm 0,08$ para $\pm 0,01$, no entanto, nos biocompósitos 8T2cZ, este sofreu um ligeiro aumento, passando o seu valor a ser de $\pm 0,03$.

Por observação da Figura 4.3 b) e d), verifica-se que com a adição de 3YSZ e 8YSZ, o valor da densidade aparente dos biocompósitos porosos tende a diminuir em relação ao padrão. Verificaram-se valores compreendidos no intervalo de confiança entre 2,30 e 2,78 g/cm³ para os biocompósitos com 3YSZ, sendo que o menor valor corresponde aos biocompósitos 9T1tZ e o maior aos 10T, ou seja, ao padrão. Com a adição de 10 % desta ZrO₂ o valor da densidade diminuiu, mas ao aumentar a percentagem para 20 %, este valor aumentou para 2,62 g/cm³, contudo permaneceu inferior ao valor dos biocompósitos 10T. Por outro lado, nos biocompósitos com 8YSZ verificaram-se valores no intervalo de confiança entre 2,60 e 2,78 g/cm³, sendo que o menor valor corresponde aos biocompósitos 8T2cZ e o maior ao padrão.

Relativamente aos valores do desvio padrão, verificou-se que em ambos os casos, com a adição da respetiva ZrO₂, estes foram aumentando gradualmente. Para os biocompósitos com 3YSZ, o desvio padrão apresentou valores compreendidos entre $\pm 0,06$ e $\pm 0,13$, sendo que o valor passou de $\pm 0,06$, para $\pm 0,11$ e por fim $\pm 0,13$, nos biocompósitos 10T, 9T1tZ e 8T2tZ, respetivamente. Nos biocompósitos com 8YSZ, o desvio padrão apresentou valores entre $\pm 0,06$ e $\pm 0,13$. Neste caso, o desvio padrão passou de $\pm 0,06$, para $\pm 0,18$ e por último $\pm 0,25$, nos biocompósitos 10T, 9T1cZ e 8T2cZ, respetivamente.

Olhando para os resultados obtidos nos 2 tipos de biocompósitos fabricados depreende-se que a tendência seguida para os densos não é a mesma para os porosos, tanto nos dopados com 3YSZ como com 8YSZ. Enquanto nos densos, à medida que foi adicionada a respetiva ZrO₂, o valor da densidade aumentou e do desvio padrão diminuiu em relação ao padrão, nos porosos ocorreu o contrário, ou seja, a densidade diminuiu e o desvio padrão aumentou.

Os resultados referentes à absorção de água dos biocompósitos densos e porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ são apresentados na forma de gráficos na Figura 4.4. Assim, na Figura 4.4 está demonstrada a evolução da absorção de água nos biocompósitos dopados com 3YSZ e 8YSZ, de acordo com a percentagem de 3YSZ e 8YSZ adicionada, respetivamente.

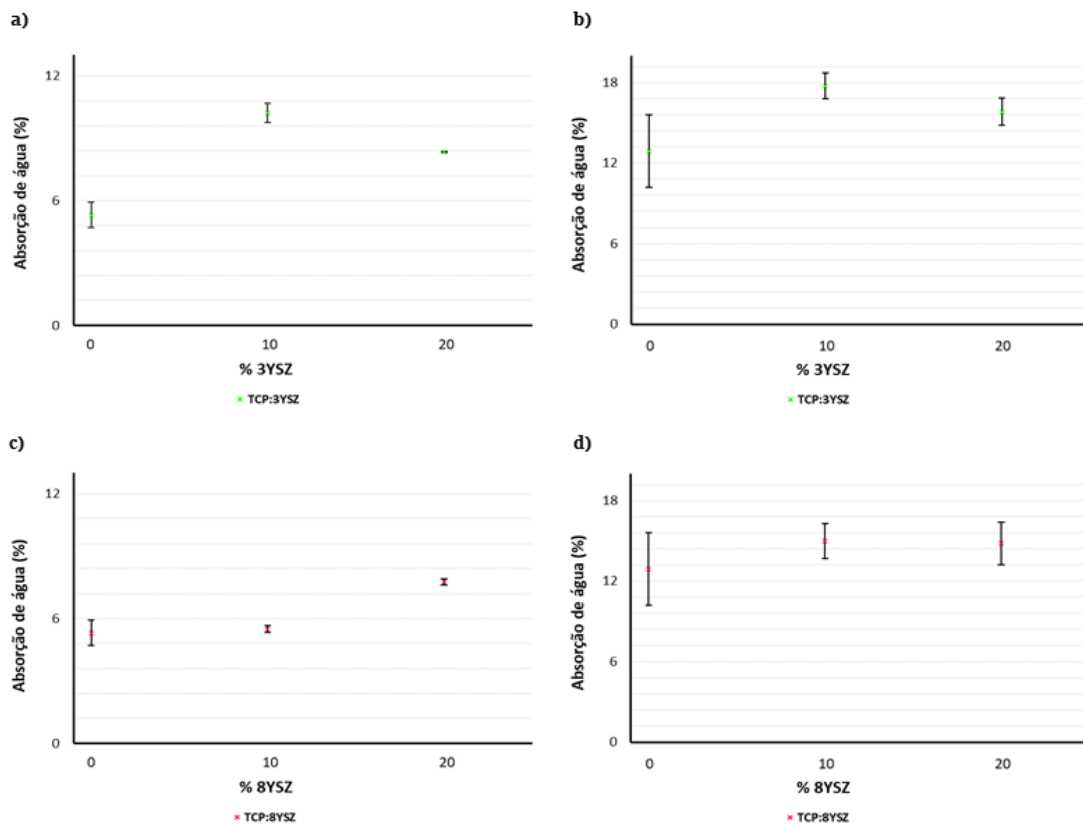


Figura 4.4. Evolução da absorção de água nos biocompósitos: **a)** densos dopados com 3YSZ; **b)** porosos dopados com 3YSZ; **c)** densos dopados com 8YSZ e **d)** porosos dopados com 8YSZ.

Observando todos os resultados presentes na Figura 4.4 depreende-se que em todos os casos, com o aumento da respetiva ZrO₂ o valor da absorção de água aumentou relativamente ao padrão. Verificaram-se valores compreendidos no intervalo de confiança entre 5,31 e 10,23 % para os biocompósitos densos dopados com 3YSZ, entre 12,89 e 17,74 % para os biocompósitos porosos com 3YSZ, entre 5,31 e 7,77 % para os biocompósitos densos com 8YSZ e entre 12,89 e 14,95 % para os biocompósitos porosos com 8YSZ. Nos 2 primeiros casos, Figura 4.3 a) e b) com a adição de 10 % de 3YSZ o valor da absorção aumentou, mas com a adição de 20 % desta ZrO₂, este valor diminuiu para 8,33 % e 15,82 %, nos biocompósitos densos e porosos, respetivamente, contudo, estes valores permaneceram superiores ao valor dos biocompósitos 10T. Assim, de acordo com a Figura 4.3 a), b) e d) é notório que o menor valor de absorção de água corresponde aos biocompósitos 10T e o maior aos biocompósitos dopados com 10 % da respetiva ZrO₂, ou seja, 9T1tZ e 9T1cZ. Por sua vez, de acordo com a Figura 4.3 c) verifica-se que o menor valor corresponde aos biocompósitos 10T e o maior aos biocompósitos 8T2cZ.

Relativamente aos valores do desvio padrão, verificou-se que nos biocompósitos densos dopados com 3YSZ e 8YSZ, com a adição da respetiva ZrO₂, estes foram diminuindo gradualmente. Para os biocompósitos com 3YSZ o desvio padrão apresentou valores entre $\pm 0,03$ e $\pm 0,62$, sendo que passou de $\pm 0,62$, para $\pm 0,47$ e por fim $\pm 0,03$, nos biocompósitos 10T, 9T1tZ e 8T2tZ, respetivamente. Nos biocompósitos com 8YSZ, o desvio padrão apresentou valores

compreendidos entre $\pm 0,14$ e $\pm 0,62$, passando de $\pm 0,62$, para $\pm 0,18$ e por último $\pm 0,14$, correspondendo aos biocompósitos 10T, 9T1cZ e 8T2cZ, respetivamente.

Para os biocompósitos porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ, também o desvio padrão foi diminuindo em relação ao padrão com a adição da respetiva ZrO_2 , contudo, com a adição de 20 % de 3YSZ e 8YSZ, o valor do desvio padrão aumentou ligeiramente, mas ainda assim, permaneceu inferior ao valor do padrão. Assim, para os biocompósitos com 3YSZ, o desvio padrão apresentou valores entre $\pm 0,97$ e $\pm 2,70$. Com o aumento da ZrO_2 o desvio padrão passou de $\pm 2,70$, para $\pm 0,97$ e por fim $\pm 1,00$, nos biocompósitos 10T, 9T1tZ e 8T2tZ, respetivamente. Nos biocompósitos com 8YSZ, o desvio padrão apresentou valores compreendidos entre $\pm 1,30$ e $\pm 2,70$, passando de $\pm 2,70$, para $\pm 1,30$ e por último $\pm 1,58$, nos biocompósitos 10T, 9T1cZ e 8T2cZ, respetivamente.

Olhando para os resultados obtidos nos 2 tipos de biocompósitos fabricados depreende-se que a tendência seguida é a mesma para todos os biocompósitos, ou seja, com o aumento da respetiva ZrO_2 , aumentou a absorção de água e diminui o desvio padrão relativamente aos valores registados para os biocompósitos padrão. Contudo, nos biocompósitos densos e porosos dopados com 3YSZ, com a adição de 20 % desta ZrO_2 o valor da absorção diminui em relação aos biocompósitos com 10 % de ZrO_2 , mas mesmo assim o valor continuou superior ao valor do padrão. No que concerne aos valores dos desvios padrão, apesar da tendência ser a mesma para todos os biocompósitos, os biocompósitos densos demonstraram valores inferiores de desvio padrão.

Os resultados referentes à porosidade aparente dos biocompósitos densos e porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ são apresentados na forma de gráficos na Figura 4.5. Assim, na Figura 4.5 está demonstrada a evolução da porosidade aparente nos biocompósitos dopados com 3YSZ e 8YSZ, de acordo com a percentagem de 3YSZ e 8YSZ adicionada, respetivamente.

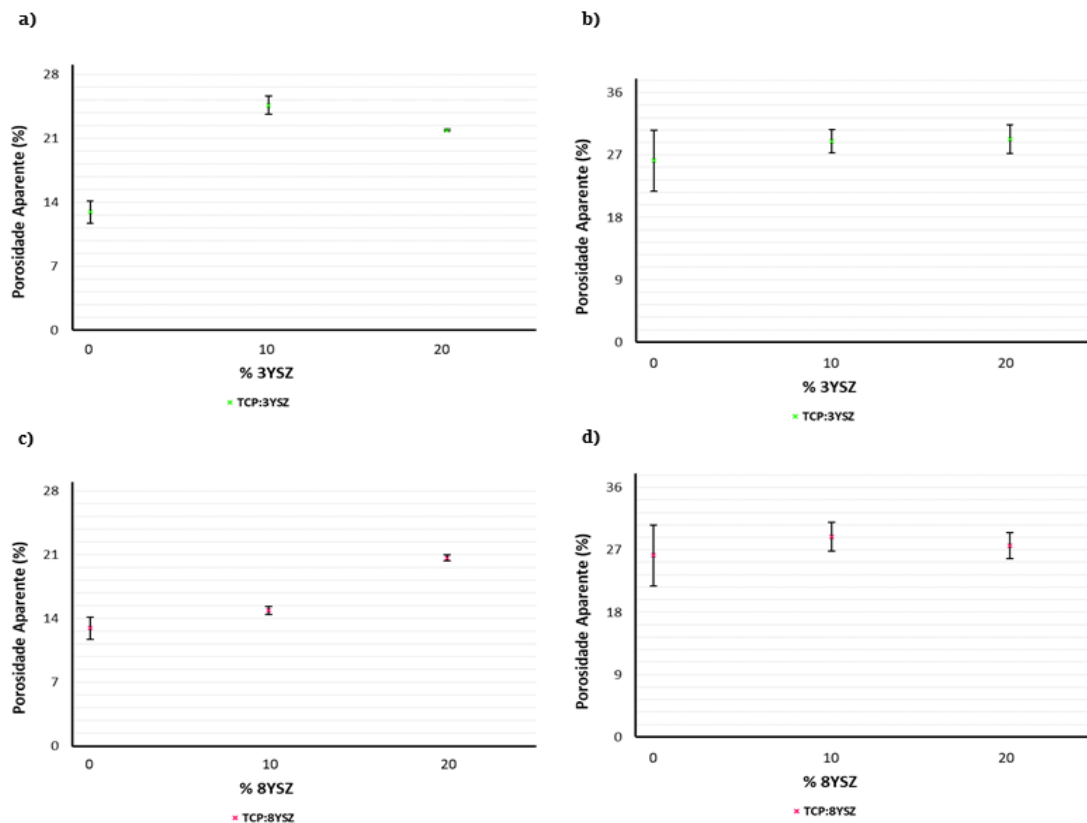


Figura 4.5. Evolução da porosidade aparente nos biocompósitos: **a)** densos dopados com 3YSZ; **b)** porosos dopados com 3YSZ; **c)** densos dopados com 8YSZ e **d)** porosos dopados com 8YSZ.

Observando todos os resultados presentes na Figura 4.5 verifica-se que em todos os casos, com o aumento da respectiva ZrO₂ o valor da porosidade aparente aumenta relativamente ao padrão. Verificaram-se valores de porosidade aparente compreendidos no intervalo de confiança entre 12,93 e 24,61 % e entre 26,19 e 28,87 %, para os biocompósitos densos com 3YSZ e porosos com 8YSZ, respetivamente. Em ambos os casos, Figura 4.5 a) e d), o menor valor corresponde aos biocompósitos 10T e o maior aos biocompósitos com 10 % da respectiva ZrO₂, 9T1tZ e 9T1cZ, e, embora a porosidade aparente aumente com a adição de 3YSZ e 8YSZ, observou-se uma descida no seu valor, passando para 21,88 % e para 27,61 %, aquando da adição de 20 % de 3YSZ e 8YSZ, respetivamente, comparativamente com os biocompósitos com 10 %. Por outro lado, verificaram-se valores de porosidade aparente compreendidos no intervalo de confiança entre 26,19 e 29,27 % e entre 12,93 e 20,65 %, nos biocompósitos porosos com 3YSZ e nos densos com 8YSZ, respetivamente. Nestes 2 casos, Figura 4.5 b) e c), o menor valor corresponde aos biocompósitos 10T e o maior aos biocompósitos com 20 % da respectiva ZrO₂.

Relativamente ao desvio padrão, em todos os casos, com o aumento da percentagem de 3YSZ e 8YSZ, o valor do desvio padrão foi diminuindo gradualmente em relação aos biocompósitos padrão. Contudo, nos biocompósitos porosos com 20 % de 3YSZ, 8T2tZ, verificou-se uma ligeira subida em relação aos 9T1tZ, contudo o seu valor continuou inferior ao dos 10T. Assim, para os biocompósitos densos com 3YSZ, porosos com 3YSZ, densos com 8YSZ e porosos com 8YSZ

verificaram-se valores de desvio padrão compreendidos entre $\pm 0,09$ e $\pm 1,21$, entre $\pm 1,69$ e $\pm 4,37$, entre $\pm 0,33$ e $\pm 1,21$ e entre $\pm 1,89$ e $\pm 4,37$, respetivamente.

No que concerne aos biocompósitos com 3YSZ, nos densos, o desvio padrão diminuiu de $\pm 1,21$, para $\pm 1,00$ e por fim $\pm 0,09$, nos biocompósitos 10T, 9T1tZ e 8T2tZ, respetivamente. Nos porosos o desvio padrão passou de $\pm 4,37$, para $\pm 1,69$ e por fim aumentou ligeiramente para $\pm 2,05$, nos biocompósitos 10T, 9T1tZ e 8T2tZ, respetivamente. Por outro lado, para os biocompósitos com 8YSZ, verificou-se que o desvio padrão dos biocompósitos densos foi diminuindo passando de $\pm 1,21$, para $\pm 0,42$ e por fim $\pm 0,33$, nos biocompósitos 10T, 9T1cZ e 8T2cZ, respetivamente. E o desvio padrão dos biocompósitos porosos passou de $\pm 4,37$, para $\pm 2,08$ e por último $\pm 1,89$, nos biocompósitos 10T, 9T1cZ e 8T2cZ, respetivamente.

Analisando os resultados obtidos nos 2 tipos de biocompósitos fabricados depreende-se que na generalidade a tendência seguida é a mesma para todos, ou seja, com o aumento da respetiva ZrO_2 , aumenta a porosidade aparente e diminui o desvio padrão relativamente aos valores dos biocompósitos padrão. Contudo, no que concerne aos biocompósitos dopados com 3YSZ, no caso dos densos, na presença de 20 % de 3YSZ, houve uma ligeira descida no valor da porosidade, mas ainda assim este permaneceu superior ao padrão. Já nos porosos, a pequena diferença observada corresponde ao valor do desvio padrão, que na presença de 20 % de 3YSZ, aumentou ligeiramente, mas ainda assim este permaneceu inferior ao do padrão. Por sua vez, nos biocompósitos dopados com 8YSZ, a única variação verificada recai nos biocompósitos porosos, que, com a adição de 20 % de 8YSZ, o valor da porosidade aparente diminui ligeiramente, mas ainda assim permaneceu superior ao do padrão. Tal como era esperado, os biocompósitos porosos apresentaram valores de porosidade aparente superiores aos dos biocompósitos densos, no entanto, também os valores do desvio padrão foram consideravelmente superiores.

Os resultados referentes à densidade relativa dos biocompósitos densos e porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ são apresentados na forma de gráficos na Figura 4.6. Assim, na Figura 4.6 está demonstrada a evolução da densidade relativa nos biocompósitos dopados com 3YSZ e 8YSZ, de acordo com a percentagem de 3YSZ e 8YSZ adicionada, respetivamente.

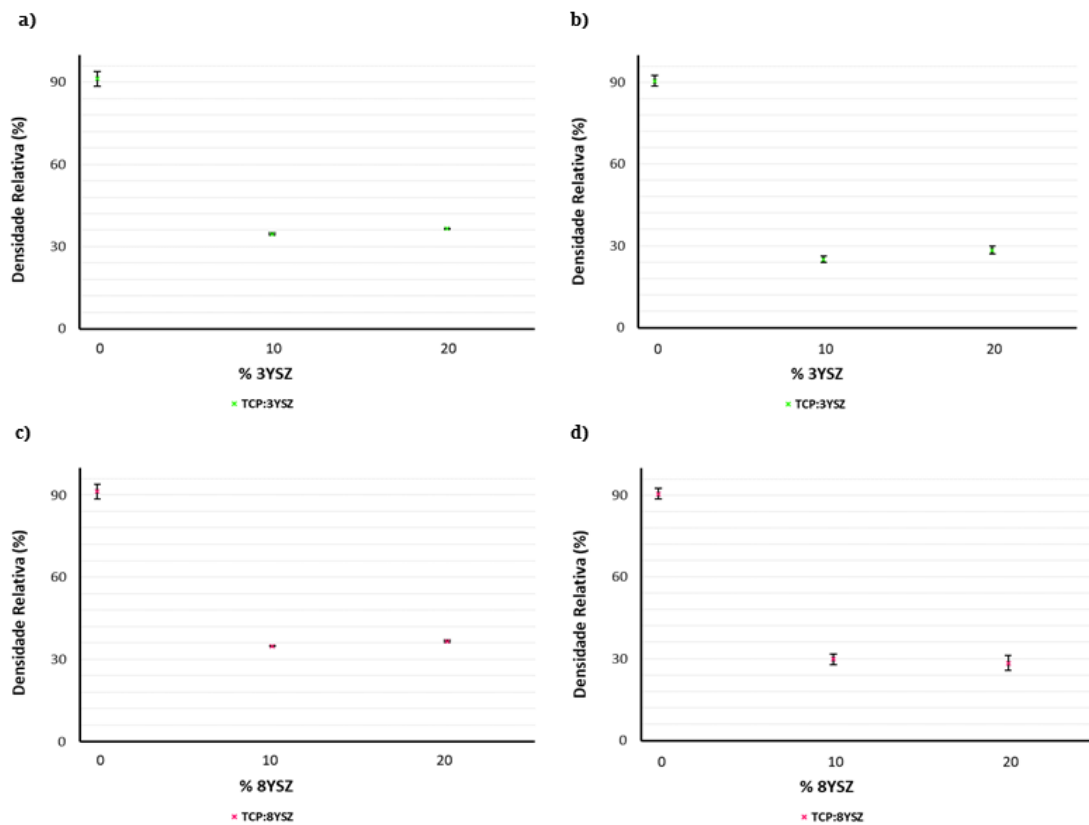


Figura 4.6. Evolução da densidade relativa nos biocompósitos: **a)** densos dopados com 3YSZ; **b)** porosos dopados com 3YSZ; **c)** densos dopados com 8YSZ e **d)** porosos dopados com 8YSZ.

De acordo com todos os gráficos presentes na Figura 4.6 é notório que com a adição de 3YSZ e 8YSZ a densidade relativa de todos os biocompósitos diminui acentuadamente em relação ao padrão. Verificaram-se valores de densidade relativa compreendidos no intervalo de confiança entre 34,68 e 91,27 % nos biocompósitos densos com 3YSZ, entre 25,02 e 90,56 % nos biocompósitos porosos com 3YSZ, entre 34,83 e 91,27 % nos biocompósitos densos com 8YSZ e por último, valores no intervalo de confiança entre 28,45 e 90,56 % nos biocompósitos porosos com 8YSZ. Nos primeiros 3 casos, por observação da Figura 4.6 a), b) e c) depreende-se que o menor valor corresponde aos biocompósitos com 10 % da respetiva ZrO_2 e o maior aos 10T. No último caso, Figura 4.6 d), o menor valor corresponde aos biocompósitos com 20 % de 8YSZ e o maior aos 10T. Embora a densidade relativa diminua acentuadamente com a adição da respetiva ZrO_2 , no caso dos biocompósitos densos e porosos com 3YSZ, observou-se um aumento no seu valor, passando para 36,53 % e para 28,45 %, respetivamente, aquando da adição de 20 % de 3YSZ relativamente aos biocompósitos com 10 %, contudo este valor permaneceu inferior ao dos 10T.

Relativamente aos valores do desvio padrão nos biocompósitos com 3YSZ, para os densos verificou-se que, com o aumento da ZrO_2 o desvio padrão diminuiu consideravelmente passando de $\pm 2,64$, para $\pm 0,37$ e por fim $\pm 0,07$, nos biocompósitos 10T, 9T1tZ e 8T2tZ, respetivamente, apresentando assim valores compreendidos entre $\pm 0,07$ e $\pm 2,64$. Dado isto, os biocompósitos com maior densidade relativa possuem também o maior desvio padrão. Nos porosos, o desvio padrão apresentou valores compreendidos entre $\pm 1,23$ e $\pm 1,93$, os quais foram diminuindo

passando de $\pm 1,93$, para $\pm 1,23$ e por fim $\pm 1,41$, nos biocompósitos 10T, 9T1tZ e 8T2tZ, respetivamente, verificando-se assim um ligeiro aumento nos biocompósitos 8T2tZ, mas mesmo assim o valor continuou inferior ao dos 10T.

Para os biocompósitos com 8YSZ, o desvio padrão dos biocompósitos densos apresentou valores entre $\pm 0,15$ e $\pm 2,64$. Este foi diminuindo com a adição de 8YSZ, passando de $\pm 2,64$, para $\pm 0,15$ e por fim $\pm 0,32$, nos biocompósitos 10T, 9T1cZ e 8T2cZ, respetivamente, verificando-se assim um ligeiro aumento nos biocompósitos 8T2cZ, mas ainda assim o valor do desvio padrão continuou inferior ao dos 10T. Assim, os biocompósitos com maior densidade relativa possuem o maior desvio padrão associado. Por sua vez, os biocompósitos porosos apresentaram um desvio padrão compreendido entre $\pm 1,93$ e $\pm 2,74$. Com a adição de 8YSZ o desvio padrão foi aumentando em relação ao padrão, passando de $\pm 1,93$, para $\pm 1,96$ e por fim, para $\pm 2,74$. Neste caso, os biocompósitos com maior densidade relativa possuem o menor valor de desvio padrão e os de menor densidade, o maior valor de desvio padrão.

Analisando os resultados obtidos nos 2 tipos de biocompósitos fabricados depreende-se que na generalidade a tendência seguida é a mesma para todos, ou seja, com o aumento da respetiva ZrO_2 , diminui a densidade relativa em comparação com os valores dos biocompósitos padrão. Contudo, no que concerne aos biocompósitos densos, na presença de 20 % da respetiva ZrO_2 , houve um ligeiro aumento no valor da densidade relativa, mas ainda assim este permaneceu inferior ao padrão. Tal facto foi também verificado para os biocompósitos porosos dopados com 3YSZ. Relativamente aos valores do desvio padrão, com a adição das ZrO_2 estes diminuíram. No entanto, verificaram-se algumas variações nesta tendência nos biocompósitos densos com 8YSZ e nos porosos com 3YSZ. No caso dos porosos com 8YSZ, com a adição da ZrO_2 , o desvio padrão vai aumentando gradualmente. Tal como era esperado, os biocompósitos porosos apresentaram valores de densidade relativa inferiores aos dos biocompósitos densos, e os valores do desvio padrão foram consideravelmente superiores.

A título de exemplo, foi calculada a densidade teórica através das frações volumétricas obtidas pelo refinamento de *Rietveld* e com os respetivos cartões teóricos para os biocompósitos densos 8T2tZ e 8T2cZ. Para os biocompósitos 8T2tZ a densidade teórica apresentou um valor de $3,77 \text{ g/cm}^3$ e para os 8T2cZ $3,59 \text{ g/cm}^3$.

No geral, verifica-se que os biocompósitos 10T, densos e porosos, são aqueles que apresentam menor porosidade aparente e conseqüentemente menor absorção de água. Já os 9T1tZ e 8T2cZ densos e os 9T1cZ porosos são aqueles que apresentam maior porosidade aparente e conseqüentemente maior absorção de água, o que afetou a resistência mecânica dos biocompósitos porosos.

Os resultados obtidos estão em concordância com o que foi relatado por outros autores [1, 37, 64, 96]. Foi comprovado que com a adição de 10 e 20% de CZ a porosidade aparente aumentava e

consequentemente a densidade aparente diminuía, e foi o que aconteceu com os biocompósitos porosos analisados neste trabalho. Para os densos tal não se verificou, uma vez que com a adição das duas ZrO_2 apesar da porosidade ter aumentado, também a densidade aparente aumentou, o que pode ser explicado pela presença dos iões metálicos, nomeadamente do Mg^{2+} que já demonstrou ter influência na densificação de materiais [37, 96]. Outra das explicações para os resultados da porosidade aparente nos biocompósitos porosos recai sobre a percentagem de PMMA utilizada (40%). *Lee et al.* [64] demonstraram que com diferentes teores de PMMA, começando com 40%, a porosidade tende a aumentar gradualmente, e mesmo com 40% o seu valor já é bastante considerável.

4.2. Propriedades mecânicas

4.2.1. Tensão de rutura

Nesta subsecção, os resultados apresentados na forma de gráficos foram obtidos de acordo com o que se encontra descrito na secção 3.3.

Os resultados referentes à resistência mecânica (tensão de rutura em ensaio de compressão diametral) dos biocompósitos densos e porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ são apresentados na forma de gráficos na Figura 4.7. Assim, na Figura 4.7 está demonstrada a evolução da tensão de rutura nos biocompósitos dopados com 3YSZ e 8YSZ, de acordo com a percentagem de 3YSZ e 8YSZ adicionada, respetivamente.

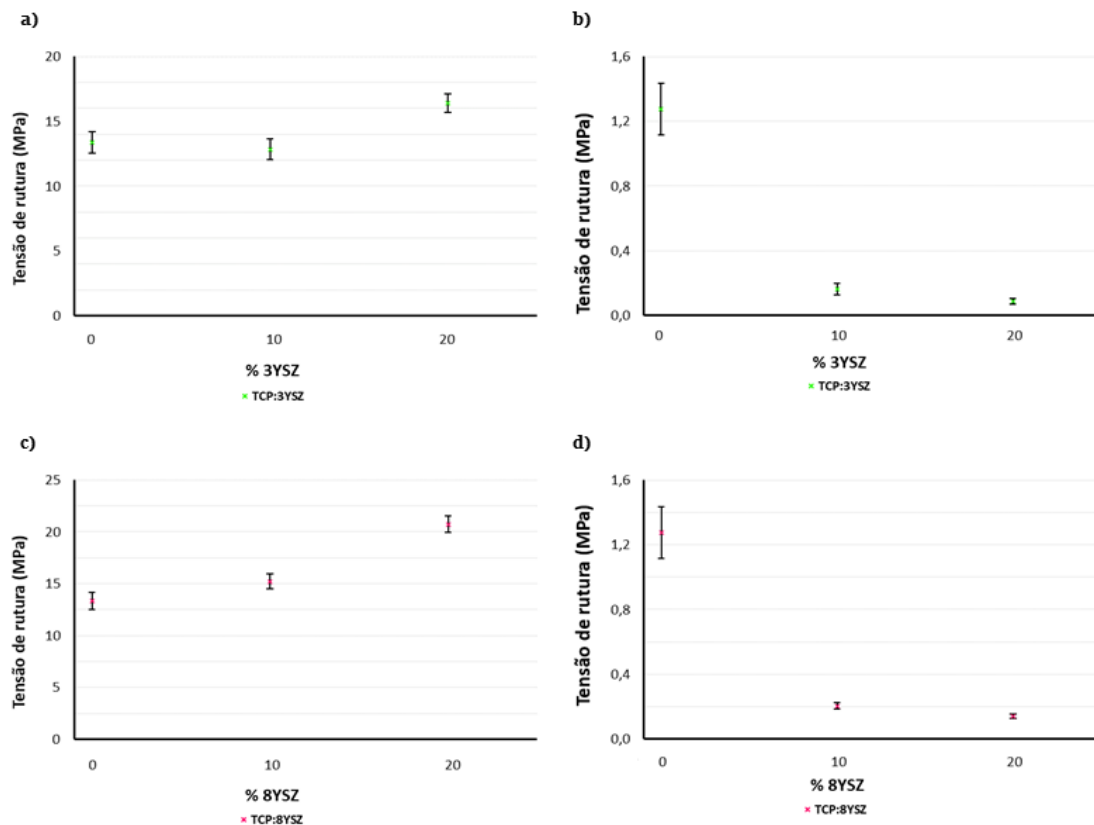


Figura 4.7. Evolução da tensão de rutura nos biocompósitos: **a)** densos dopados com 3YSZ; **b)** porosos dopados com 3YSZ; **c)** densos dopados com 8YSZ e **d)** porosos dopados com 8YSZ.

Observando a Figura 4.7 a), verifica-se que os valores de tensão de rutura dos biocompósitos densos com 3YSZ estão compreendidos no intervalo de confiança entre 12,85 e 16,40 MPa, sendo que o menor valor corresponde aos biocompósitos 9T1tZ e o maior aos 8T2tZ, fazendo com que estes últimos possuam maior tensão de rutura, ou seja, maior resistência mecânica. É notório que com a adição de 10 % de 3YSZ o valor da tensão de rutura diminui, passando a ser de 12,85 MPa, relativamente ao valor dos biocompósitos padrão e com 20 %, aumenta. Como pode verificar-se através da Figura 4.7 c), existe um aumento gradual da tensão de rutura dos biocompósitos densos à medida que a percentagem de 8YSZ aumenta. Verificaram-se valores compreendidos no intervalo de confiança entre 13,36 e 20,74 MPa, sendo que o menor valor corresponde aos 10T e o maior aos 8T2cZ, fazendo destes últimos os mais resistentes.

De acordo com a Figura 4.7 b) e d) depreende-se que com a adição de 10 % e 20 % de 3YSZ e 8YSZ a tensão de rutura dos biocompósitos porosos diminui gradualmente. Assim, para os biocompósitos com 3YSZ verificaram-se valores compreendidos no intervalo de confiança entre 0,09 e 1,28 MPa e para os biocompósitos com 8YSZ valores no intervalo de confiança entre 0,14 e 1,28 MPa. Em ambos os casos, o menor valor corresponde aos biocompósitos com 20 % da respetiva ZrO_2 e o maior aos 10T, fazendo com que estes últimos possuam maior tensão de rutura, ou seja, maior resistência mecânica.

Posto isto, e à semelhança do que foi verificado em estudos anteriores, biocompósitos com ZrO_2 , possuem maior resistência mecânica do que biocompósitos “puros”, ou seja, biocompósitos sem a presença de ZrO_2 [1, 60, 63], sendo que neste estudo os biocompósitos mais resistentes continham 20% de 3YSZ ou 8YSZ. Por outro lado, estes resultados também são explicados pela presença de 10 %mol de MgO, que já demonstraram aumentar a resistência mecânica dos biocompósitos [96]. No que diz respeito aos biocompósitos com PMMA, a baixa resistência mecânica já tinha sido reportada por *Lee et al.* [64], estando certamente associada à porosidade presente nos biocompósitos e à quantidade de PMMA utilizada.

Para esta propriedade, os biocompósitos densos com 3YSZ apresentaram valores de desvio padrão entre $\pm 0,70$ e $\pm 0,82$. Nos biocompósitos 9T1tZ, o valor do desvio padrão foi bastante semelhante ao dos biocompósitos 10T, ou seja, $\pm 0,81$, contudo, nos biocompósitos 8T2tZ este valor diminuiu e passou a ser de $\pm 0,70$. Por sua vez, os biocompósitos densos com 8YSZ, apresentaram valores de desvio padrão semelhantes aos anteriormente mencionados, entre $\pm 0,72$ e $\pm 0,82$. Nos biocompósitos 9T1cZ o desvio padrão diminuiu em relação aos 10T, passando de $\pm 0,82$ para $\pm 0,72$, mas nos 8T2cZ aumentou ligeiramente para $\pm 0,77$, mas ainda assim este valor permaneceu inferior ao valor registado nos biocompósitos padrão.

Relativamente aos biocompósitos porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ, verificou-se que o desvio padrão apresentou valores bastante semelhantes, sendo eles compreendidos entre $\pm 0,02$ e $\pm 0,16$ e entre $\pm 0,01$ e $\pm 0,16$, para os biocompósito com 3YSZ e 8YSZ, respetivamente. Em ambos os casos, com a adição da respetiva ZrO_2 o valor do desvio padrão diminuiu gradualmente em relação ao padrão. Para os biocompósitos com 3YSZ com a adição de 10 % de 3YSZ o desvio padrão passou de $\pm 0,16$ para $\pm 0,04$ e por fim para $\pm 0,02$. E nos biocompósitos com 8YSZ, aquando da adição de 10 % de 8YSZ o desvio padrão passou de $\pm 0,16$ para $\pm 0,02$ e por fim para $\pm 0,01$. Dado isto, nos 2 casos, os biocompósitos com maior tensão de rutura são também aqueles que possuem o maior valor de desvio padrão assim como os biocompósitos com menor tensão de rutura são os que apresentam o menor valor de desvio padrão.

Olhando para os resultados obtidos nos 2 tipos de biocompósitos fabricados depreende-se que a tendência seguida para os densos não é a mesma para os porosos relativamente ao valor da tensão de rutura, tanto nos dopados com 3YSZ como com 8YSZ. Enquanto nos densos, à medida que foi adicionada a respetiva ZrO_2 , o valor da tensão de rutura aumentou em relação ao padrão, com exceção dos 9T1tZ. Já nos porosos ocorreu o contrário, ou seja, a tensão de rutura diminuiu gradualmente. Relativamente ao valor do desvio padrão, em ambos os casos, este valor diminuiu com a adição da respetiva ZrO_2 com exceção dos 8T2cZ densos.

4.3. Propriedades microestruturais

4.3.1. Difração de raios-X

Para confirmar a presença das fases cristalinas da ZrO_2 nos biocompósitos densos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ efetuaram-se ensaios de DRX. Na Figura 4.8 são apresentados os difractogramas dos biocompósitos analisados que representam a intensidade da radiação difratada em função de 2θ , e os difractogramas dos cartões teóricos #37-1484, #50-1089, #49-1642, #09-0432, #09-0169 e #09-0348, correspondentes à $m-ZrO_2$, $t-ZrO_2$, $c-ZrO_2$, HA, β -TCP e α -TCP, respetivamente, para facilitar a identificação de cada fase. Além disto, recorrendo ao refinamento de *Rietveld* utilizando o *software FullProf*, quantificaram-se as principais fases dos biocompósitos analisados, Tabela 4.1.

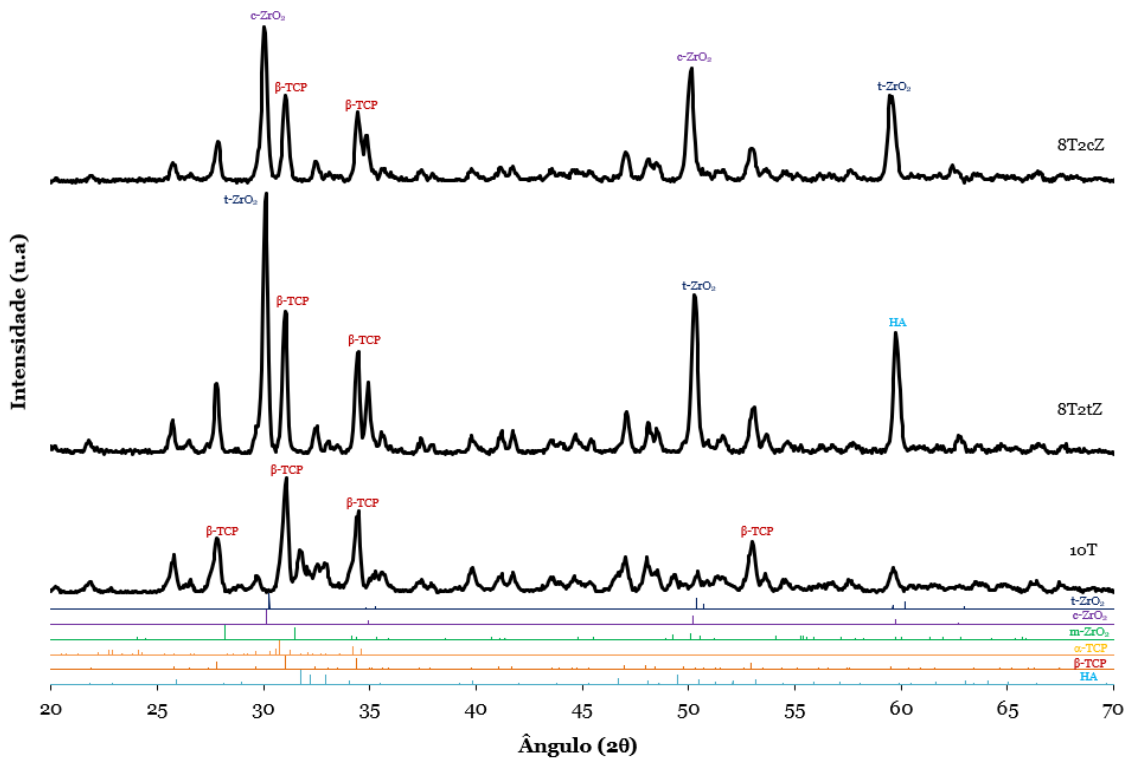


Figura 4.8. Difractogramas dos biocompósitos densos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ e difractogramas dos cartões teóricos #37-1484, #50-1089, #49-1642, #09-0432, #09-0169 e #09-0348, correspondentes a $m-ZrO_2$, $t-ZrO_2$, $c-ZrO_2$, HA, β -TCP e α -TCP, respetivamente.

Da análise da Figura 4.8 relativamente aos biocompósitos 10T, identificam-se 4 picos principais, de maior intensidade, para $2\theta = 27^\circ$, 32° , 34° e 53° que correspondem ao β -TCP e são coincidentes com o cartão teórico do β -TCP. Neste biocompósito, a estrutura predominante é o β -TCP (~78 %vol de acordo com a Tabela 4.1), contudo também estão presentes HA, sendo esta a segunda fase mais presente e α -TCP, com um valor bastante baixo, podendo ser desprezado face à incerteza inerente às aproximações realizadas na análise quantitativa de *Rietveld*. Tal facto está em concordância com a literatura [52, 96], onde a transformação de β -TCP para α -TCP está

intimamente relacionada com a expansão de volume que acaba por provocar microfissuras que reduzem a resistência mecânica. Este facto limita a aplicação de cerâmicas de TCP puro em implantes cirúrgicos que necessitam de elevada resistência mecânica. No entanto, não era esperada a existência da estrutura de α -TCP, já que o TCP foi dopado com 10 % de MgO. Neste caso, de acordo com a literatura [52], o esperado era que com a adição de Mg^{2+} ao TCP, aumentasse a temperatura de transformação de β -TCP em α -TCP até temperaturas mais elevadas. No que concerne aos biocompósitos 8T2tZ e 8T2cZ, por observação da Figura 4.8, identificam-se 4 picos principais para $2\theta = 30^\circ, 32^\circ, 50^\circ$ e 60° que correspondem a t-ZrO₂, β -TCP, t-ZrO₂ e HA, respetivamente, para 8T2tZ, e no 8T2cZ identificam-se picos principais para $2\theta = 30^\circ, 32^\circ, 50^\circ$ e 59° , correspondentes a c-ZrO₂, β -TCP, c-ZrO₂ e t-ZrO₂, respetivamente. Para ambos os casos, estes picos coincidem com os respetivos cartões teóricos.

É visível que, com a adição das ZrO₂ a intensidade dos picos aumentou, sendo que o biocompósito com picos de maior intensidade foi o 8T2tZ, ou seja, o biocompósito dopado com maior quantidade de t-ZrO₂.

Denota-se ainda a existência de picos de baixa intensidade associados a m-ZrO₂, nos biocompósitos 8T2tZ e 8T2cZ. Tal facto por ser explicado pela redução a pó dos biocompósitos com a ajuda de um conjunto pilão/almofariz para poder efetuar-se o ensaio de DRX, deste modo, pode ter ocorrido uma expansão volumétrica inerente à transformação de fase t para m induzida por tensões mecânicas. Recorreu-se ao método de análise de DRX com a amostra em pó, uma vez que é o mais frequentemente usado pela comunidade científica [92], permitindo um elevado número de cristalites com diferentes orientações [26].

Tabela 4.1. Análise quantitativa (%vol) de DRX dos compósitos biocerâmicos densos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ, obtida por refinamento de *Rietveld*.

Fases (%vol)	10T	8T2tZ	8T2cZ
β -TCP	77,60 \pm 0,00	71,09 \pm 1,00	77,50 \pm 0,00
HA	21,69 \pm 0,00	3,05 \pm 0,02	-
α -TCP	0,72 \pm 0,00	-	-
t-ZrO ₂	-	25,86 \pm 0,54	1,48 \pm 0,00
c-ZrO ₂	-	-	21,02 \pm 0,00

De acordo com a Tabela 4.1, verifica-se que nos biocompósitos analisados a fase predominante é o β -TCP, apresentando valores de 77,60, 71,09 e 77,50 %vol para os biocompósitos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ, respetivamente.

Relativamente à quantidade de HA, e de acordo com os valores resultantes do refinamento de *Rietveld*, esta fase não foi detetada nos biocompósitos dopados com 8YSZ, 8T2cZ, no entanto, nos biocompósitos 8T2tZ e 10T apresentaram valores de 3,05 e 21,69 %vol, respetivamente. Assim,

os biocompósitos padrão, 10T, são aqueles com maior teor de HA, apresentando um valor consideravelmente elevado comparando com os outros biocompósitos.

No que concerne à quantificação das duas ZrO_2 utilizadas, nos biocompósitos dopados com 8YSZ, ou seja, c- ZrO_2 , maioritariamente está presente a fase correspondente a esta ZrO_2 cujo valor é de 21,02 %vol, no entanto, também se verificou a presença de uma pequena percentagem de t- ZrO_2 (1,48 %vol), o que indica que durante o processo de fabrico dos biocompósitos, a c- ZrO_2 foi convertida em t- ZrO_2 provavelmente devido às elevadas temperaturas. Por sua vez, nos biocompósitos 8T2tZ, ou seja, naqueles que foram dopados com 3YSZ, apenas foi quantificada 3YSZ com um valor de 25,86 %vol. Assim, e tal como era esperado, nos biocompósitos dopados com 8YSZ, a fase das ZrO_2 predominante é a c- ZrO_2 e nos que foram dopados com 3YSZ, a fase das ZrO_2 predominante é a t- ZrO_2 .

Por fim, e tal como referido anteriormente, a fase referente ao α -TCP nos biocompósitos 10T também está presente, no entanto, como o seu valor é muito baixo, 0,72 %vol, pode ser desprezado. O α -TCP forma-se a temperaturas elevadas (~1159-1460°C) [37, 47] e neste trabalho foi utilizada uma temperatura de sinterização de 1300°C, pois a adição de MgO contribui para a estabilização da fase β -TCP a temperaturas mais baixas [37], o que também pode ter contribuído para o aparecimento desta fase polimórfica.

O erro das análises de DRX (χ^2) apresentou valores de 2,21, 3,13 e 1,97 para os biocompósitos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ, respetivamente, sendo que os que contém t- ZrO_2 possuem um χ^2 maior e os que contém c- ZrO_2 possuem um χ^2 menor.

A partir dos resultados da Figura 4.8 e da Tabela 4.1, não foi possível detetar óxidos metálicos, incluindo o MgO, o que está de acordo com a literatura da especialidade, indicando que durante o processo de calcinação, os iões de Ca^{2+} foram substituídos pelos iões metálicos de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} na estrutura cristalina do β -TCP. Para mais, a presença de MgO promove um forte crescimento da fase de HA que está diretamente relacionada com a melhoria da biocompatibilidade e da osteoindução, importantes na reconstrução óssea [1, 37, 96].

4.3.2. Microscopia eletrónica de varrimento

Na Figura 4.9 exibem-se as superfícies de fratura dos compósitos biocerâmicos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ densos e porosos, obtidas por SEM, com uma gama de ampliação de 1000x e 5000x para os densos, e, 100x e 200x para os porosos. As imagens em maior detalhe, adquiridas por SEM, podem ser consultadas no Apêndice I.

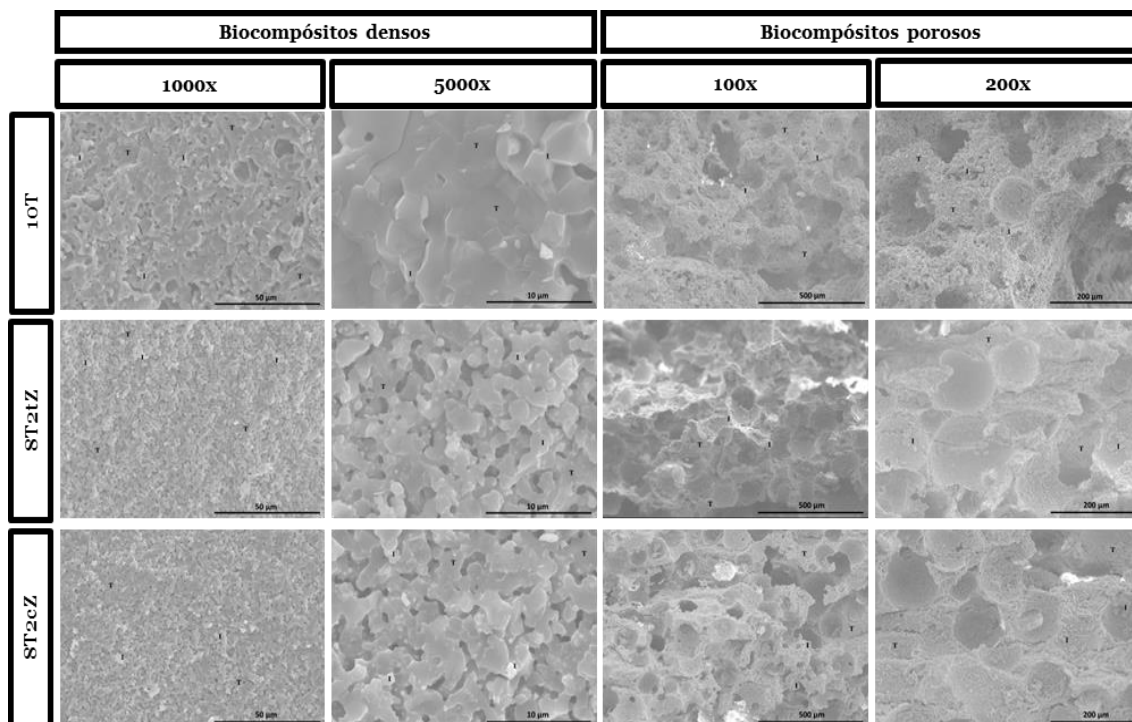


Figura 4.9. Imagens das superfícies de fratura características dos biocompósitos densos e porosos obtidas por SEM, com ampliações de 1000x e 5000x para os densos, e, 100x e 200x para os porosos.

Nas imagens adquiridas por SEM dos biocompósitos analisados, observa-se que estes são multifásicos, já que os diferentes tons de cinza existentes nas imagens indicam a presença de diferentes fases cristalinas. O β -TCP corresponde possivelmente ao cinza mais escuro e os 2 tipos de ZrO_2 usadas, ao tom mais brilhante, uma vez que átomos com maior número atômico aparecem mais brilhantes neste tipo de imagem [26, 95].

Observando a Figura 4.9 verifica-se que em todos os casos existem superfícies de fratura mistas, ou seja, fraturas transgranulares e intergranulares, identificadas na Figura 4.9 com as letras T e I, respectivamente. No caso das transgranulares, as fraturas atravessam/cortam o grão e nas intergranulares, as fraturas ocorrem pela fronteira do grão [56].

No que concerne à porosidade, é evidente a existência de uma rede de porosidade interconectada mesmo nos biocompósitos densos, ou seja, naqueles em que não foi induzida porosidade através da utilização de PMMA. Para além de poros perfeitamente esféricos, ou seja, poros provocados pelas esferas de PMMA, observam-se também poros mais alongados. Por observação da Figura 4.9, verifica-se que com o aumento do teor de 3YSZ e 8YSZ a porosidade aumentou, o que está em concordância com os resultados obtidos para as propriedades físicas, Figura 4.5.

Por sua vez, nos biocompósitos porosos foi possível medir os macroporos provocados pelas esferas de PMMA, apresentando um tamanho médio de 100 μm , entre 120-150 μm e entre 110-140 μm para os biocompósitos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ, respectivamente, de acordo com as escalas presentes na Figura 4.9. Em conformidade com a literatura [7, 76, 77], o crescimento ósseo e a colonização celular tendem a ocorrer se o tamanho dos macroporos estiver compreendido entre

100-200 μm , e, uma vez que, o tamanho dos macroporos dos biocompósitos analisados se encontram nesse intervalo de valores, é possível admitir que o crescimento ósseo e a colonização celular tem boas condições para ocorrer, o que foi comprovado pelos resultados obtidos para as propriedades biológicas.

A análise química elementar obtida por EDX dos biocompósitos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ é apresentada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Análise química elementar dos compósitos biocerâmicos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ, obtida por EDX.

Elemento	10T			8T2tZ			8T2cZ		
	%wt	%mol	erro %wt	%wt	%mol	erro %wt	%wt	%mol	erro %wt
Ca	46,7	30,02	2,2	36,8	24,61	2,01	37,93	28,65	2,03
P	17,43	14,5	1,12	10,42	9,02	0,79	11,24	10,95	0,84
O	33,51	53,97	9,09	36,33	60,87	9,76	27,59	52,04	7,85
Mg	0,78	0,82	0,15	0,65	0,72	0,14	0,62	0,78	0,13
Mn	0,47	0,22	0,11	0,35	0,17	0,09	0,25	0,14	0,09
Fe	0,48	0,22	0,11	0,14	0,07	0,08	0,31	0,17	0,09
Zn	0,64	0,25	0,13	0,37	0,15	0,11	0,55	0,25	0,12
Zr	-	-	-	14,95	4,39	1,1	21,5	7,11	1,52

Tal como era esperado, da análise química elementar, Tabela 4.2, verifica-se a presença dos elementos Ca, P, Zr e dos restantes íons metálicos adicionados. Os elementos Ca e P provém da fórmula química do TCP, $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$, e o Zr da dopagem com os 2 tipos de ZrO_2 usada.

De acordo com a literatura [40], os minerais ósseos apresentam uma razão Ca/P que varia entre 1,37 e 1,87 %mol. No entanto, tendo em consideração os valores presentes na Tabela 2.2, a razão Ca/P dos minerais ósseos pode ter um valor de 2,29 %wt.

Para os biocompósitos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ verificou-se uma relação Ca/P em %wt de 2,68, 3,53 e 3,37, respetivamente e de 2,07, 2,73 e 2,60 %mol para os biocompósitos 10T, 8T2tZ e 8T2cZ, respetivamente.

Com a adição da respetiva ZrO_2 , 3YSZ ou 8YSZ, esta relação tende a aumentar, sendo o seu valor mais elevado nos biocompósitos dopados com 3YSZ, ou seja, 8T2tZ. Por outro lado, na presença de ZrO_2 os biocompósitos são naturalmente mais estáveis o que vai contribuir para que estes possuam uma maior durabilidade em relação aos que não possuem ZrO_2 .

4.4. Propriedades biológicas

4.4.1. Ensaio de citocompatibilidade

Os resultados referentes ao ensaio de citocompatibilidade dos biocompósitos densos e porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ, apresentados na forma de gráficos na Figura 4.10, foram obtidos de acordo com o procedimento descrito na secção 3.5. Assim, na Figura 4.10 está demonstrada a viabilidade celular dos hOB incubados com os biocompósitos ao longo de 1, 3 e 7 dias.

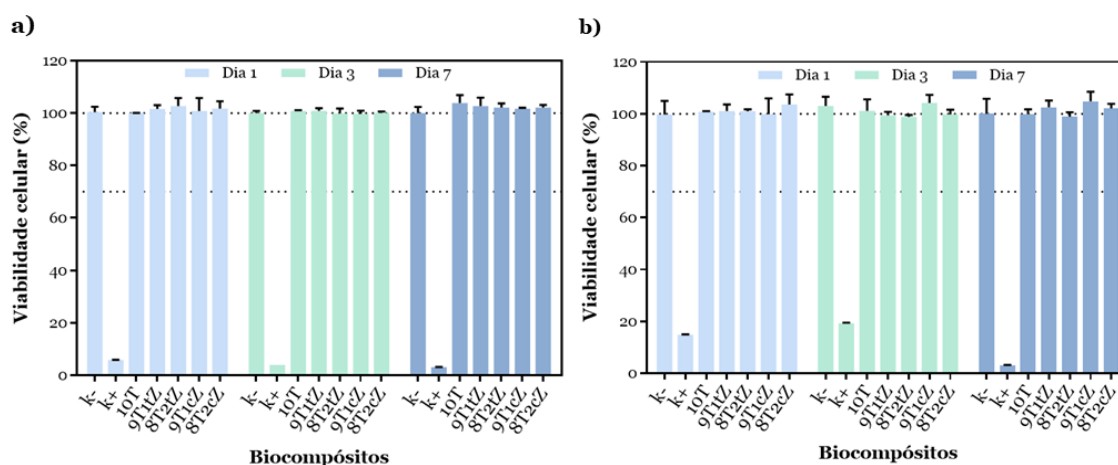


Figura 4.10. Avaliação da citocompatibilidade dos biocompósitos **a)** densos dopados com 3YSZ e 8YSZ e **b)** porosos dopados com 3YSZ e 8YSZ.

A biocompatibilidade dos biocompósitos cerâmicos foi avaliada através do ensaio de resazurina. Neste caso, os hOB foram utilizados como células modelo 2D, uma vez que estas células são responsáveis pela produção e remodelação da matriz óssea [9], essencial no processo de osseointegração.

De acordo com as Figuras 4.10 a) e b) observa-se que, mesmo após 7 dias de incubação os hOB permaneceram metabolicamente ativos em contato com os biocompósitos, quer densos quer porosos, apresentando uma viabilidade celular consideravelmente acima de 70 %. Para produzir os biocompósitos porosos, tal como já foi referido, foram utilizadas esferas de PMMA, e, de acordo com a literatura [72] este polímero poderia prejudicar a biocompatibilidade e a bioatividade do material. No entanto, os resultados obtidos a partir do ensaio de resazurina revelaram que os 2 tipos de biocompósitos com diferentes frações mássicas de β -TCP, 3YSZ e 8YSZ não afetaram a viabilidade dos hOB ao longo dos diferentes dias de incubação, estando por isso de acordo com trabalhos anteriores, onde foi estudada a citotoxicidade *in vitro* de biocompósitos que continham na sua composição β -TCP, ZrO_2 e PMMA [1, 69, 96].

Para além disto, a elevada viabilidade celular era esperada pela gama de concentrações molares dos iões incorporados na estrutura cristalina do β -TCP, e que estão naturalmente presentes na composição do osso humano [44, 96, 104].

4.4.2. Análise da fixação celular

Na Figura 4.11 observam-se as imagens da fixação celular aos biocompósitos porosos, ao fim de 3 dias de incubação, adquiridas por SEM e com uma gama de ampliação de 3000x e 5000x. Para termos de comparação, na Figura 4.11 também são apresentadas imagens SEM dos biocompósitos sem hOB com uma ampliação de 1200x. As imagens em maior detalhe, podem ser consultadas no Apêndice I.

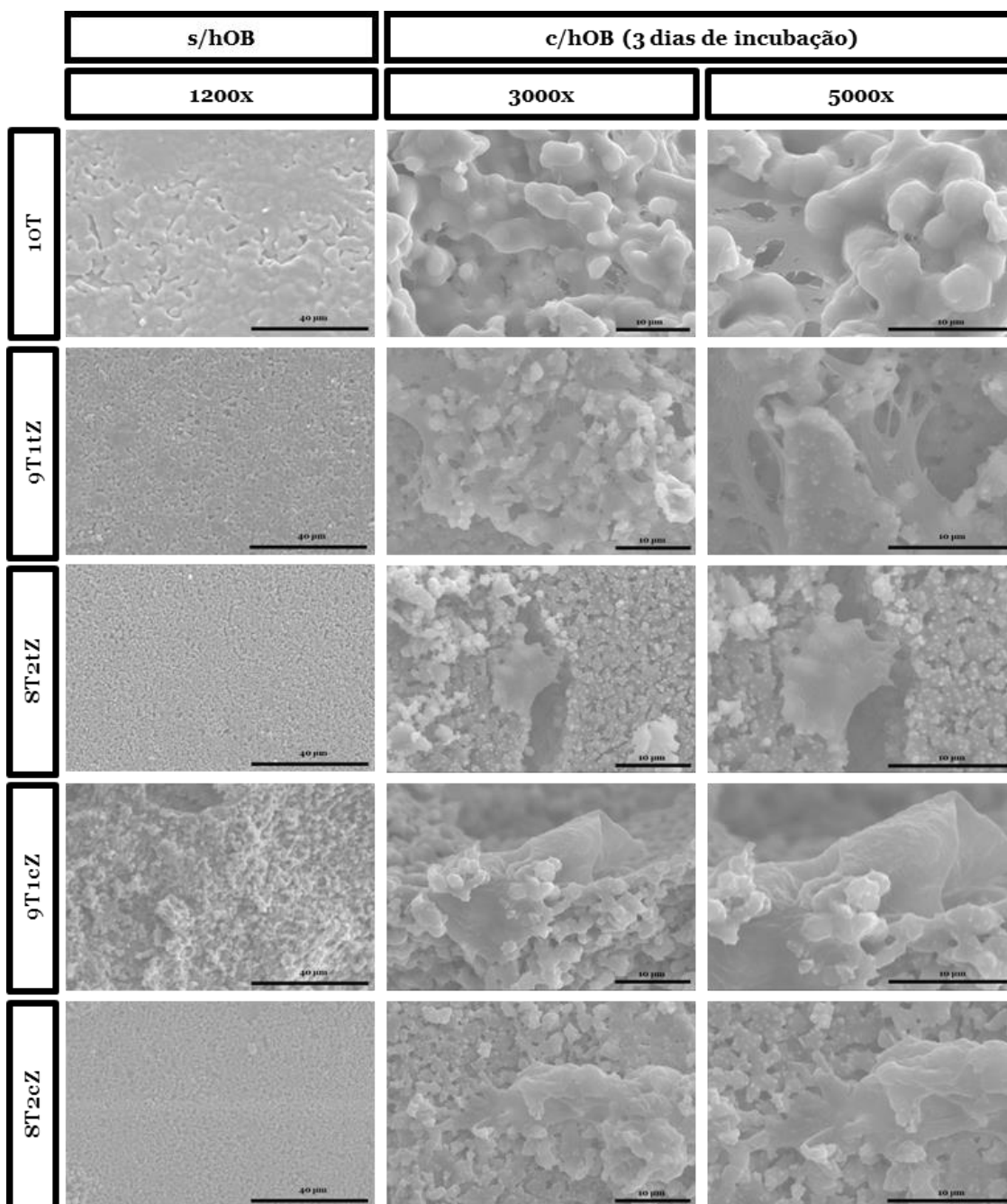


Figura 4.11. Imagens de SEM da fixação celular aos biocompósitos porosos com 3 dias de incubação e sem fixação celular, com ampliações de 3000x, 5000x e 1200x, respetivamente.

Para além de avaliar a citocompatibilidade dos biocompósitos fabricados foi também importante verificar se existia adesão celular a estes materiais já que quando utilizados, por exemplo, para regeneração óssea, pretende-se que este tipo de biocompósitos confirmem às células a capacidade, não só de aderirem ao material como de crescerem pelo seu interior.

Por observação da Figura 4.11, verifica-se que os hOB conseguiram crescer e espalhar-se pela superfície e pelo interior dos biocompósitos ao longo dos dias, o que está em concordância com estudos anteriores onde também foi usado β -TCP [78]. Estes resultados podem também estar associados à porosidade presente nos materiais, cujos macroporos apresentam um tamanho médio ideal para o crescimento celular, e de acordo com a literatura [7, 76, 77] tal facto influencia diretamente a proliferação celular, proporcionando um local para a adesão e crescimento celular.

Analisando a Figura 4.11 e a informação retirada da Figura 4.10 e 4.9 comprova-se mais uma vez que os biocompósitos produzidos conferem condições ideais para serem aplicados *in vivo*.

Capítulo 5

Considerações finais

Neste capítulo apresentam-se as principais conclusões obtidas acerca do trabalho desenvolvido relativo a compósitos biocerâmicos de β -TCP reforçados com ZrO_2 . São ainda apresentadas perspectivas futuras sobre este mesmo tema.

5.1. Conclusões

Com o crescente aumento da expectativa de vida e aliado ao envelhecimento, surgem complicações de saúde, principalmente associadas à regeneração óssea. Em virtude disto, é importante encontrar alternativas viáveis que proporcionem bem-estar e que contribuam para uma vida saudável.

Para utilização de biomateriais como substitutos ósseos, para além de toda avaliação física e mecânica, é também importante proceder à caracterização biológica. Para tal, procedeu-se à análise dos biocompósitos densos e porosos com e sem as duas ZrO_2 utilizadas, ou seja, biocompósitos densos e porosos padrão e dopados com diferentes frações mássicas de 3YSZ e 8YSZ.

Em termos dos resultados obtidos para os biocompósitos padrão, conclui-se que estes apresentaram valores de contração e densidade relativa superiores aos dos dopados com as duas ZrO_2 . Por outro lado, foram aqueles com menor absorção de água e conseqüentemente menor porosidade aparente, ou seja, volume de poros abertos. Pela análise de DRX, foi no padrão que se quantificou maior quantidade de β -TCP e HA, contudo a diferença para com os outros biocompósitos com 20% das respectivas ZrO_2 foi mínima no que diz respeito à quantidade de β -TCP. Por sua vez, através da análise química elementar, estes biocompósitos apresentaram a razão Ca/P mais baixa, 2,68 %wt e 2,07 %mol, sendo que nos restantes biocompósitos esta razão variou entre 3,37 e 3,53 %wt e entre 2,60 e 2,73 %mol.

No que concerne à utilização de 3YSZ e 8YSZ, comparando estas duas ZrO_2 em ambos os tipos de biocompósitos fabricados, para as propriedades físicas, verifica-se que os biocompósitos com 8YSZ tiveram um comportamento mais constante para a contração diametral à medida que ia sendo adicionada ZrO_2 já que os valores para esta propriedade diminuíram gradualmente com a adição de 8YSZ. Com a adição da respetiva ZrO_2 , o valor da densidade aparente aumentou nos biocompósitos densos e diminuiu nos porosos. Por outro lado, com a adição de 3YSZ ou 8YSZ os valores da absorção de água e porosidade aparente aumentaram em relação aos valores padrão, nos 2 tipos de biocompósitos. Contrariamente, com a adição das duas ZrO_2 a densidade relativa dos biocompósitos diminuiu acentuadamente em relação ao padrão.

A análise química elementar revelou que com a adição de 3YSZ ou 8YSZ a relação Ca/P tende a aumentar, sendo o seu valor mais elevado nos biocompósitos dopados com 3YSZ, cujo valor é de 3,53 %wt e 2,73 %mol.

Em termos da resistência mecânica, obtida pelo ensaio de compressão diametral, concluiu-se que à medida que foi adicionada a respectiva ZrO_2 , o valor da tensão aumentou nos densos e diminuiu acentuadamente nos porosos, apresentando um valor máximo de 20,74 MPa para os biocompósitos densos dopados com 20% de 8YSZ. Tal como era esperado, os biocompósitos porosos apresentaram valores de porosidade aparente superiores aos dos biocompósitos densos e consequentemente uma tensão de rutura bastante inferior.

Ao produzir os biocompósitos porosos, como foram utilizadas esferas de PMMA, a biocompatibilidade e a bioatividade do material poderiam ficar comprometidas. No entanto, os resultados obtidos a partir do ensaio de resazurina revelaram que os 2 tipos de biocompósitos produzidos não afetaram a viabilidade dos hOB ao longo dos diferentes dias de incubação, apresentando uma viabilidade celular, na maioria dos casos, de 100 %. Para além disto, as imagens SEM da análise da fixação celular, demonstraram que as células foram capazes de crescer e proliferar pela superfície e interior dos biocompósitos ao longo dos dias. Tais resultados podem também estar associados à rede de porosidade interconectada e ao tamanho ideal dos macroporos, 100-150 μm , que influencia diretamente a adesão e crescimento celular.

Em suma, de acordo com o trabalho desenvolvido e com os resultados obtidos, apesar de em alguns casos a tendência seguida ser a mesma para os biocompósitos com 3YSZ e 8YSZ, os biocompósitos que demonstraram um comportamento mais constante para as propriedades analisadas foram os biocompósitos dopados com 8YSZ. Importante mencionar que para todas as propriedades analisadas, o desvio padrão associado a cada resultado foi inferior a 5 %. Deste modo, este trabalho apresenta elevada repetitividade e é ainda possível afirmar que os resultados obtidos são de grande confiança.

5.2. Perspetivas futuras

Como sugestão para futuras investigações e com a intenção de compreender melhor o comportamento dos biocompósitos fabricados no âmbito desta dissertação de mestrado, dado que estes apresentam elevado potencial como *scaffolds* ósseos, sugerem-se as seguintes propostas:

- Aumentar o número de biocompósitos produzidos, tanto densos como porosos;
- Utilizar esferas de PMMA de diferentes tamanhos para criar macroporos de diferentes tamanhos e avaliar o seu efeito na resistência mecânica dos biocompósitos e na adesão celular a estes;

- Utilizar outras técnicas para induzir porosidade, por exemplo, impressão 3D, esponjas ou até mesmo tomografia computacional para imprimir a peça com o pó cerâmico desejado;
- Realizar ensaios da dureza de *Vickers*, tenacidade à fratura e comparar com os resultados da compressão diametral;
- Avaliar a microestrutura dos biocompósitos através de SEM e tomografia computacional para obtenção de volumes elementares representativos (*Digital Twin*);
- Fazer a análise de DRX nos biocompósitos porosos e compreender se o PMMA teve influência nas diferentes fases cristalinas;
- Realizar a distribuição dos tamanhos de porosidade e a área superficial dos biocompósitos;
- Estudar a influência do tamanho de grão;
- Avaliar a fixação celular nos biocompósitos densos e comparar com os resultados obtidos para os biocompósitos porosos;
- Comprovada a elevada biocompatibilidade dos biocompósitos, proceder à avaliação *in vivo*.

Referências bibliográficas

- [1] M. F. Vassal, J. Nunes-Pereira, S. P. Miguel, I. J. Correia, e A. P. Silva, “Microstructural, mechanical and biological properties of hydroxyapatite – CaZrO₃ biocomposites”, *Ceramics International*, vol. 45, nº 7, p. 8195–8203, 2019, doi: 10.1016/j.ceramint.2019.01.122.
- [2] V. P. Mantripragada, B. Lecka-Czernik, N. A. Ebraheim, e A. C. Jayasuriya, “An overview of recent advances in designing orthopedic and craniofacial implants”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 101, nº 11, p. 3349–3364, 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34605.
- [3] U. Tarantino, M. Celi, C. Rao, M. Feola, I. Cerocchi, E. Gasbarra, A. Ferlosio, e A. Orlandi, “Hip osteoarthritis and osteoporosis: Clinical and histomorphometric considerations”, *International Journal of Endocrinology*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/372021.
- [4] M. Geetha, A. K. Singh, R. Asokamani, e A. K. Gogia, “Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review”, *Progress in Materials Science*, vol. 54, nº 3, p. 397–425, 2009, doi: 10.1016/j.pmatsci.2008.06.004.
- [5] S. Kurtz, K. Ong, E. Lau, F. Mowat, e M. Halpern, “Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030”, *Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 89, nº 4, p. 780–785, 2007, doi: 10.2106/JBJS.F.00222.
- [6] C. Lavernia, D. J. Lee, e V. H. Hernandez, “The increasing financial burden of knee revision surgery in the United States”, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, Lippincott Williams and Wilkins, nº 446, p. 221-226, 2006, doi: 10.1097/01.blo.0000214424.67453.9a.
- [7] T. M. Volkmer e L. A. Dos Santos, “Influence of the induction time on the properties of porous hydroxyapatite obtained by gelcasting foams”, *Cerâmica*, vol. 53, nº 328, p. 429–435, 2007, doi: 10.1590/s0366-69132007000400015.
- [8] D. F. Williams, “On the nature of biomaterials”, *Biomaterials*, vol. 30, nº 30, p. 5897–5909, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- [9] T. Albrektsson e C. Johansson, “Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration”, *European Spine Journal*, vol. 10, p. S96–S101, 2001, doi: 10.1007/s005860100282.
- [10] J. Caetano-Lopes, H. Canhão, e J. Eurico Fonseca, “Osteoblasts and Bone Formation”, *Acta Reumatológica Portuguesa*, vol. 32, nº 2, p. 103-111, 2007.

- [11] J. G. Dellinger, A. M. Wojtowicz, e R. D. Jamison, “Effects of degradation and porosity on the load bearing properties of model hydroxyapatite bone scaffolds”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 77, nº 3, p. 563–571, 2006, doi: 10.1002/jbm.a.30658.
- [12] L. J. Gibson e M. F. Ashby, “*Cellular Solids: Structure and Properties*”, 2nd Edition, Cambridge: Cambridge University Press, 1997, doi: 10.1017/CBO9781139878326.
- [13] S. C. Cowin, “*Bone Mechanics Handbook*”, 2nd Edition, Boca Raton, FL: CRC Press, 2001.
- [14] F. Baino, S. Caddeo, G. Novajra, e C. Vitale-Brovarone, “Using porous bioceramic scaffolds to model healthy and osteoporotic bone”, *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 36, no 9, p. 2175–2182, 2016, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2016.01.011.
- [15] S. Mohamed e B. H. Shamaz, “Bone Tissue Engineering and Bony Scaffolds”, *International Journal of Dentistry and Oral Health*, vol. 1, nº 1, p. 01–06, 2015, doi: 10.25141/2471-657X-2015-1.0001.
- [16] R. F. Bonan, P. R. F. Bonan, A. U. D. Batista, J. E. Oliveira, R. R. Menezes, e E. S. Medeiros, “Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita (Methods of microstructural strengthening of hydroxyapatite)”, *Cerâmica*, vol. 60, p. 402–410, 2014.
- [17] M. Wang, “Developing bioactive composite materials for tissue replacement”, *Biomaterials*, vol. 24, nº 13, p. 2133–2151, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00037-1.
- [18] A. Farzadi, M. Solati-Hashjin, F. Bakhshi, e A. Aminian, “Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation”, *Ceramics International*, vol. 37, nº 1, p. 65–71, 2011, doi: 10.1016/j.ceramint.2010.08.021.
- [19] S. J. Kalita, A. Bhardwaj, e H. A. Bhatt, “Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 27, nº 3, p. 441–449, 2007, doi: 10.1016/j.msec.2006.05.018.
- [20] P. Christel, A. Meunier, M. Heller, J. P. Torre, e C. N. Peille, “Mechanical properties and short-term in vivo evaluation of yttrium-oxide-partially-stabilized zirconia”, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 23, nº 1, p. 45–61, 1989, doi: 10.1002/jbm.820230105.
- [21] T. V Thamaraiselvi e S. Rajeswari, “Biological Evaluation of Bioceramic Materials- A Review”, *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, vol. 18, nº 1, p. 9-17, 2004.

- [22] V. A. Dubok, “Bioceramics - yesterday, today, tomorrow”, *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, vol. 39, n° 7, p. 381-394, 2000, doi: 10.1023/A:1026617607548.
- [23] L. L. Hench, “The story of Bioglass”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 17, n° 11, p. 967–978, 2006, doi: 10.1007/s10856-006-0432-z.
- [24] M. Hisbergues, S. Vendeville, e P. Vendeville, “Review zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, vol. 88, n° 2. p. 519–529, 2009, doi: 10.1002/jbm.b.31147.
- [25] H. Ikeno, M. Krause, T. Höche, C. Patzig, Y. Hu, A. Gawronshi, I. Tanaka, e C. Rüssel, “Variation of Zr-L 2,3 XANES in tetravalent zirconium oxides”, *Journal of Physics Condensed Matter*, vol. 25, n° 16, 2013, doi: 10.1088/0953-8984/25/16/165505.
- [26] F. Alexandra Barbosa Balça, “Otimização de compósitos multifásicos de zircónia para aplicações termomecânicas aeronáuticas”, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Aeronáutica. Universidade da Beira Interior, 2022.
- [27] K. Boobalan, R. Vijayaraghavan, K. Chidambaram, U. M. K. Mudali, e B. Raj, “Preparation and characterization of nanocrystalline zirconia powders by the glowing combustion method”, *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 93, n° 11, p. 3651–3656, 2010, doi: 10.1111/j.1551-2916.2010.03947.x.
- [28] J. R. Kelly e I. Denry, “Stabilized zirconia as a structural ceramic: An overview”, *Dental Materials*, vol. 24, n° 3. p. 289–298, 2008, doi: 10.1016/j.dental.2007.05.005.
- [29] R. Filipe Loureiro dos Santos, “Síntese de nanopartículas de zircónia por estratégias SSP (soft solution processing)”, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, Universidade de Coimbra, 2014.
- [30] J. Vleugels, Z. X. Yuan, e O. Van Der Biest, “Mechanical properties of Y₂O₃/Al₂O₃-coated Y-TZP ceramics”, *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 22, n° 6, p. 873-881, 2002, doi: 10.1016/S0955-2219(01)00389-2.
- [31] B. S. Vasile, E. Andronescu, C. Ghitulica, O. R. Vasile, L. Curechiu, R. Scurtu, E. Vasile, R. Trusca, L. Pall, e V. Aldica, “Microstructure and electrical properties of zirconia and composite nanostructured ceramics sintered by different methods”, *Ceramics International*, vol. 39, n° 3, p. 2535–2543, 2013, doi: 10.1016/j.ceramint.2012.09.013.
- [32] L. L. Hench, “Bioceramics”, *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 81, n° 7, p. 1705–1728, 1998, doi: 10.1111/J.1151-2916.1998.TB02540.X.

- [33] A. Noiri, F. Hoshi, H. Murakami, K. Sato, S.-I. Kawai, e K. Kawai, “Biocompatibility of a mobile alumina-ceramic orbital implant”, *Folia Ophthalmologica Japonica*, vol. 53, n° 6, p. 476–480, 2002.
- [34] Y. Hong, M. Bai, S. Wang, Q. Chang, X. Zhang, X. Zhao, e Y. Wang, “Improved ageing-resistance and fracture toughness of zirconia-toughened alumina bioceramics via composition and microstructure design”, *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 43, n° 5, p. 2208–2221, 2023, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2022.12.051.
- [35] C. S. Delfino, C. Ribeiro, G. F. Vieira, A. H. A. Bressiani, e M. L. Turbino, “The use of new materials for pulp capping (hydroxyapatite–HAp and tricalcium phosphate-β-TCP)”, *Cerâmica*, vol. 56, n° 340, p. 381–388, 2010.
- [36] E. Champion, “Sintering of calcium phosphate bioceramics”, *Acta Biomaterialia*, vol. 9, n° 4, p. 5855–5875, 2013, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2012.11.029.
- [37] M. Frasnelli e V. M. Sglavo, “Effect of Mg²⁺ doping on beta-alpha phase transition in tricalcium phosphate (TCP) bioceramics”, *Acta Biomaterialia*, vol. 33, p. 283–289, 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.01.015.
- [38] S. V. Dorozhkin, “Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations: Cements, Concretes, Pastes and Putties”, *International Journal of Materials and Chemistry*, vol. 1, n° 1, p. 1–48, 2012, doi: 10.5923/J.IJMC.20110101.01.
- [39] C. Vitale-Brovarone, E. Verné, L. Robiglio, P. Appendino, F. Bassi, G. Martinasso, G. Muzia, e R. Canuto, “Development of glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering: Characterisation, proliferation of human osteoblasts and nodule formation”, *Acta Biomaterialia*, vol. 3, n° 2, p. 199–208, 2007, doi: 10.1016/j.actbio.2006.07.012.
- [40] S. Wu, X. Liu, K. W. K. Yeung, C. Liu, e X. Yang, “Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering”, *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 80, n° 1, p. 1–36, 2014. doi: 10.1016/j.mser.2014.04.001.
- [41] J. Ran, P. Jiang, G. Sun, Z. Ma, J. Hu, X. Shen, e H. Tong, “Comparisons among Mg, Zn, Sr, and Si doped nano-hydroxyapatite/chitosan composites for load-bearing bone tissue engineering applications”, *Materials Chemistry Frontiers*, vol. 1, n° 5, p. 900–910, 2017, doi: 10.1039/c6qm00192k.
- [42] Q. Hu, Z. Tan, Y. Liu, J. Tao, Y. Cai, M. Zhang, H. Pan, X. Xu, e R. Tang “Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells”, *Journal of Materials Chemistry*, vol. 17, n° 44, p. 4690–4698, 2007, doi: 10.1039/b710936a.
- [43] H. Yuan, H. Fernandes, P. Habibovic, J. de Boer, A. M. C. Barradas, A. de Ruiter, W. R. Walsh, C. A. Van Blitterswijk, e J. D. de Bruijn, “Osteoinductive ceramics as

- a synthetic alternative to autologous bone grafting”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, n° 31, p. 13614-13619, 2010, doi: 10.1073/pnas.1003600107.
- [44] D. F. Macedo e A. P. Silva, “Analysis of the effect of doped metal ions in the tricalcium phosphate bioceramic”, *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 1960, n° 1, 2021, doi: 10.1088/1742-6596/1960/1/012014.
- [45] S. H. Kwon, Y. K. Jun, S. H. Hong, e H. E. Kim, “Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders”, *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 23, n° 7, p. 1039–1045, 2003, doi: 10.1016/S0955-2219(02)00263-7.
- [46] M. Alcaide, M. C. Serrano, R. Pagani, S. Sánchez-Salcedo, M. Vallet-Regí, e M. T. Portolés, “Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials”, *Biomaterials*, vol. 30, n° 1, p. 45–51, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.012.
- [47] M. Yashima e A. Sakai, “High-temperature neutron powder diffraction study of the structural phase transition between α and α' phases in tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ”, *Chemical Physics Letters*, vol. 372, n° 5–6, p. 779–783, 2003, doi: 10.1016/S0009-2614(03)00505-0.
- [48] B. M. Mathew, L. W. Schroeder, B. Dickens, e W. E. BaOWN, “The Crystal Structure of α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ”, *Acta Crystallographica Section B*, vol. 33, n° 5, p. 1325-1333, 1977, doi: 10.1107/S0567740877006037.
- [49] N. Döbelin, L. Galea, U. Eggenberger, J. M. F. Ferreira, e M. Bohner, “Recrystallization of amorphized α -TCP”, *Key Engineering Materials*, vol. 493-494, p. 219–224, 2012, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.219.
- [50] H.-S. Ryu, H.-J. Youn, K. S. Hong, B.-S. Chang, C.-K. Lee, e S.-S. Chung, “An improvement in sintering property of β -tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate”, *Biomaterials*, vol. 23, n° 3, p. 909-914, 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00201-0.
- [51] H. Monma e M. Goto, “Behavior of the α - β Phase Transformation in Tricalcium Phosphate”, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, vol. 91, n° 10, p. 473–475, 1983.
- [52] R. Enderle, F. Götz-Neunhoeffler, M. Göbbels, F. A. Müller, e P. Greil, “Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of β -TCP ceramics examined by Rietveld refinement”, *Biomaterials*, vol. 26, n° 17, p. 3379–3384, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.017.

- [53] D. Arcos e M. Vallet-Regí, “Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants”, *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 8, nº 9, p. 1781–1800, 2020, doi: 10.1039/c9tb02710f.
- [54] S. S. Banerjee, S. Tarafder, N. M. Davies, A. Bandyopadhyay, e S. Bose, “Understanding the influence of MgO and SrO binary doping on the mechanical and biological properties of β -TCP ceramics”, *Acta Biomaterialia*, vol. 6, nº 10, p. 4167–4174, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.05.012.
- [55] S. Bose, S. Tarafder, S. S. Banerjee, N. M. Davies, e A. Bandyopadhyay, “Understanding in vivo response and mechanical property variation in MgO, SrO and SiO₂ doped β -TCP”, *Bone*, vol. 48, nº 6, p. 1282–1290, 2011, doi: 10.1016/j.bone.2011.03.685.
- [56] H. S. Ryu, K. S. Hong, J.-K. Lee, D. J. Kim, J. H. Lee, B.-S. Chang, D.-h. Lee, C.-K. Lee, e S.-S. Chung, “Magnesia-doped HA/ β -TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility”, *Biomaterials*, vol. 25, nº 3, p. 393–401, 2004, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00538-6.
- [57] L. W. Schroeder-F, B. Dickens, e W. E. Browns, “Crystallographic Studies of the Role of Mg as a Stabilizing Impurity in β -Ca₃(PO₄)₂ II. Refinement of Mg-Containing β -Ca₃(PO₄)₂”, *Journal of Solid State Chemistry*, vol. 22, nº 3, p. 253–262, 1977, doi: 10.1016/0022-4596(77)90002-0.
- [58] R. K. Singh, M. Srivastava, N. K. Prasad, S. Awasthi, A. Dhayalan, e S. Kannan, “Iron doped β -Tricalcium phosphate: Synthesis, characterization, hyperthermia effect, biocompatibility and mechanical evaluation”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 78, p. 715–726, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.04.130.
- [59] S. Tarafder, N. M. Davies, A. Bandyopadhyay, e S. Bose, “3D printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds: Effect of SrO and MgO doping on in vivo osteogenesis in a rat distal femoral defect model”, *Biomaterials Science*, vol. 1, nº 12, p. 1250–1259, 2013, doi: 10.1039/c3bm60132c.
- [60] G. Ayoub, D. Veljovic, M. L. Zebic, V. Miletic, E. Palcevskis, R. Petrovic, e D. Janackovic, “Composite nanostructured hydroxyapatite/yttrium stabilized zirconia dental inserts – The processing and application as dentin substitutes”, *Ceramics International*, vol. 44, nº 15, p. 18200–18208, 2018, doi: 10.1016/j.ceramint.2018.07.028.
- [61] J. Chevalier, B. Cales, e J. M. Drouin, “Low-Temperature Aging of Y-TZP Ceramics”, *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 82, nº 8, p. 2150–2154, 2004, doi: 10.1111/j.1151-2916.1999.tb02055.x.
- [62] F. F. Lange, G. L. Dunlop, e B. I. Davis, “Degradation During Aging of Transformation-Toughened ZrO₂-Y₂O₃ Materials at 250°C”, *Journal of the*

- American Ceramic Society*, vol. 69, n° 3, p. 237-240, 1986, doi: 10.1111/J.1151-2916.1986.TB07415.X.
- [63] K. Castkova, H. Hadraba, A. Matousek, P. Roupčova, Z. Chlup, L. Novotna, e J. Cihlar, “Synthesis of Ca,Y-zirconia/hydroxyapatite nanoparticles and composites”, *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 36, n° 12, p. 2903-2912, 2016, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2015.12.045.
- [64] Y. H. Lee, J. W. Lee, S. Y. Yang, H. Lee, Y. H. Koh, e H. E. Kim, “Dual-scale porous biphasic calcium phosphate gyroid scaffolds using ceramic suspensions containing polymer microsphere porogen for digital light processing”, *Ceramics International*, vol. 47, n° 8, p. 11285-11293, 2021, doi: 10.1016/j.ceramint.2020.12.254.
- [65] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman, e A. P. Tomsia, “Toward strong and tough glass and ceramic scaffolds for bone repair”, *Advanced Functional Materials*, vol. 23, n° 44, p. 5461-5476, 2013, doi: 10.1002/adfm.201301121.
- [66] Y. Sa, F. Yang, J. R. De Wijn, Y. Wang, J. G. C. Wolke, e J. A. Jansen, “Physicochemical properties and mineralization assessment of porous polymethylmethacrylate cement loaded with hydroxyapatite in simulated body fluid”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 61, p. 190-198, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.12.040.
- [67] M. Shi, J. D. Kretlow, A. Nguyen, S. Young, L. S. Baggett, M. E. Wong, F. K. Kasper, e A. G. Mikos, “Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate constructs for osseous space maintenance and infection control”, *Biomaterials*, vol. 31, n° 14, p. 4146-4156, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.112.
- [68] I. G. Kang, C. Il Park, H. Lee, H. E. Kim, e S. M. Lee, “Hydroxyapatite microspheres as an additive to enhance radiopacity, biocompatibility, and osteoconductivity of poly(methyl methacrylate) bone cement”, *Materials*, vol. 11, n° 2, 2018, doi: 10.3390/ma11020258.
- [69] M. Jäger e A. Wilke, “Comprehensive biocompatibility testing of a new PMMA-HA bone cement versus conventional PMMA cement in vitro”, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 14, n° 11, p. 1283-1298, 2003, doi: 10.1163/156856203322553491.
- [70] S. Saha e S. Pal, “Mechanical properties of bone cement: A review”, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 18, n° 4, p. 435-462, doi: 10.1002/jbm.820180411.
- [71] M. Descamps, T. Duhoo, F. Monchau, J. Lu, P. Hardouin, J.C. Hornez, e A. Leriche, “Manufacture of macroporous β -tricalcium phosphate bioceramics”,

- Journal of the European Ceramic Society*, vol. 28, n° 1, p. 149-157, 2008. doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2007.05.025.
- [72] A. Sugino, T. Miyazaki, G. Kawachi, K. Kikuta, e C. Ohtsuki, “Relationship between apatite-forming ability and mechanical properties of bioactive PMMA-based bone cement modified with calcium salts and alkoxy silane”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 19, n° 3, p. 1399–1405, 2008, doi: 10.1007/s10856-007-3257-5.
- [73] M. Ginebra, L. Albuixech, E. Fernandez-Barragan, C. Aparicio, F.J. Gil, J. San Román, B. Vazquez, e J.A. Planell, “Mechanical performance of acrylic bone cements containing different radiopacifying agents”, *Biomaterials*, vol. 23, n° 8, p. 1873-1882, 2002, doi: 10.1016/s0142-9612(01)00314-3.
- [74] G. V. Franks, C. Tallon, A. R. Studart, M. L. Sesso, e S. Leo, “Colloidal processing: enabling complex shaped ceramics with unique multiscale structures”, *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 100, n° 2, p. 458-490, 2017, doi: 10.1111/jace.14705.
- [75] P. Colombo, “Conventional and novel processing methods for cellular ceramics”, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 364, n° 1838, p. 109-124, 2006, doi: 10.1098/rsta.2005.1683.
- [76] B. Flautre, M. Descamps, C. Delecourt, M. C. Blary, e P. Hardouin, “Porous HA ceramic for bone replacement: Role of the pores and interconnections - experimental study in the rabbit”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 12, n° 8, p. 679-682, 2001, doi: 10.1023/a:1011256107282.
- [77] J. J. Klawitter, J. G. Bagwell, A M Weinstein, e B. W. Sauer, “An Evaluation of Bone Growth into Porous High Density Polyethylene”, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 10, n° 2, p. 311-323, 1976, doi: 10.1002/jbm.820100212.
- [78] J. X. Lu, B. Flautre, K. Anselme, P. Hardouin, A. Gallur, M. Descamps, e B. Thierry, “Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 10, n° 2, p. 111-120, 1999, doi: 10.1023/a:1008973120918.
- [79] T. M. Freyman, I. V Yannas, e L. J. Gibson, “Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering”, *Progress in Materials Science*, vol. 46, n° 3-4, p. 273-382, 2001, doi: 10.1016/S0079-6425(00)00018-9.
- [80] S. Pollick, E. C. Shors, R. E. Holmes, e R. A. Kraut, “Bone Formation and Implant Degradation of Coralline Porous Ceramics Placed in Bone and Ectopic Sites”, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 53, n° 8, p. 915-922, 1995, doi: 10.1016/0278-2391(95)90281-3.

- [81] C. Vitale-Brovarone, S. Di Nunzio, O. Bretcanu, e E. Verne, “Macroporous glass-ceramic materials with bioactive properties” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 15, nº 3, p. 209-217, 2004, doi: 10.1023/b:jmsm.0000015480.49061.e1.
- [82] F. Baino, E. Verné, e C. Vitale-Brovarone, “3-D high-strength glass-ceramic scaffolds containing fluoroapatite for load-bearing bone portions replacement”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 29, nº 6, p. 2055-2062, 2009, doi: 10.1016/j.msec.2009.04.002.
- [83] F. Baino e C. Vitale-Brovarone, “Mechanical properties and reliability of glass-ceramic foam scaffolds for bone repair”, *Materials Letters*, vol. 118, p. 27-30, 2014, doi: 10.1016/j.matlet.2013.12.037.
- [84] J. Nunes-Pereira, P. M. C. Carneiro, A. Maceiras, C. Baudín, e A. P. Silva, “Modelling of elastic modulus of CaZrO₃-MgO composites using isotropic elastic and anisotropic models”, *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 40, nº 15, p. 5882-5890, 2020, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2020.05.050.
- [85] D. Rafaela Telha de Babo, “Projeto e caracterização de um material gradiente funcional para escudos térmicos aeroespaciais”, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Aeronáutica. Universidade da Beira Interior, 2018.
- [86] ASTM, “Standard Test Method for Drying and Firing Linear Change of Refractory Plastic and Ramming Mix Specimens”, ASTM C179-04, p. 1-2. Disponível em: www.astm.org
- [87] ASTM, “Standard Test Methods for Apparent Porosity, Water Absorption, Apparent Specific Gravity, and Bulk Density of Burned Refractory Brick and Shapes by Boiling Water”, ASTM C20-00, p. 1-3, 2005. Disponível em: www.astm.org
- [88] M. Ferreira, “Impulsão e Lei de Arquimedes”, *Revista de Ciência Elementar*, vol. 2, nº 4, 2014, doi: 10.24927/rce2014.074.
- [89] P. Jonsén, H. Å. Häggblad, e K. Sommer, “Tensile strength and fracture energy of pressed metal powder by diametral compression test”, *Powder Technology*, vol. 176, nº 2-3, p. 148-155, 2007, doi: 10.1016/j.powtec.2007.02.030.
- [90] I. H. García-Páez, R. G. Carrodeguas, A. H. De Aza, C. Baudín, e P. Pena, “Effect of Mg and Si co-substitution on microstructure and strength of tricalcium phosphate ceramics”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 30, p. 1-15, 2014, doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.10.011.

- [91] C. Fairhurst, “On the validity of the ‘Brazilian’ test for brittle materials”, *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences & Geomechanics Abstracts*, vol. 1, n° 4, p. 535-546, 1964, doi: 10.1016/0148-9062(64)90060-9.
- [92] H. Tiago Carolo Fonseca, “Quantificação de fases por difração de raios X dum cerâmico”, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Materiais. Universidade de Aveiro, 2011.
- [93] “X-ray Diffraction | Definition, Diagram, Equation, & Facts | Britannica”. <https://www.britannica.com/science/X-ray-diffraction> (Acedido a 7 de junho de 2023).
- [94] J. Rodriguez-Carvajal, “Recent developments of the program FULLPROF, commission on powder diffraction”, *Commission on Powder Diffraction (IUCr), Newsletter*, p. 12-19, 2001.
- [95] H. Henriques Ferreira, “Importância do estudo em Microscopia Eletrónica de Varrimento de amostras incluídas em parafina para fins de diagnóstico”, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologias Biomédicas, Instituto Superior Técnico, 2016.
- [96] D. F. Macedo, A. F. Cunha, J. F. Mano, M. B. Oliveira, e A. P. Silva, “Tricalcium phosphate doped with Mg²⁺ and combinations of Mn²⁺, Zn²⁺ and Fe³⁺: A DoE study on sintering, mechanical, microstructural and biological properties”, *Ceramics International*, vol. 48, n° 14, p. 20467-20477, 2022, doi: 10.1016/j.ceramint.2022.04.004.
- [97] N. Fernandes, C. F. Rodrigues, D. de Melo-Diogo, I. J. Correia, e A. F. Moreira, “Optimization of the GSH-Mediated Formation of Mesoporous Silica-Coated Gold Nanoclusters for NIR Light-Triggered Photothermal Applications”, *Nanomaterials*, vol. 11, n° 8, 2021, doi: 10.3390/nano11081946.
- [98] “Cell Dissociation Protocol using Trypsin”. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-dissociation-with-trypsin> (Acedido a 18 de abril de 2023).
- [99] J. O’Brien, I. Wilson, T. Orton, e F. Pognan, “Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity”, *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, n° 17, p. 5421-5426, 2000, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
- [100] R. S. Sequeira, S. P. Miguel, C. S. D. Cabral, A. F. Moreira, P. Ferreira, e I. J. Correia, “Development of a poly(vinyl alcohol)/lysine electrospun membrane-based drug delivery system for improved skin regeneration”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 570, 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118640.

- [101] “What is alamarBlue? | Bio-Rad”. https://www.bio-rad-antibodies.com/alarablue-cell-viability-assay-resazurin.html?JSESSIONID_STERLING=5A737EFA4B2AE59019525C3C87022AF2.ecommerce1&evCntryLang=PT-en&cntry=PT&thirdPartyCookieEnabled=true (Acedido a 26 de abril de 2023).
- [102] T. K. Gupta, J. H. Bechtold, L. H. Cadoff, e B. R. Rossing, “Stabilization of tetragonal phase in polycrystalline zirconia”, *Journal of Materials Science*, vol. 12, p. 2421-2426, 1977, doi: 10.1007/BF00553928.
- [103] L. F. Hu e C. A. Wang, “Effect of sintering temperature on compressive strength of porous yttria-stabilized zirconia ceramics”, *Ceramics International*, vol. 36, n° 5, p. 1697-1701, 2010, doi: 10.1016/j.ceramint.2010.03.009.
- [104] K. Hurle, J. M. Oliveira, R. L. Reis, S. Pina, e F. Goetz-Neunhoeffler, “Ion-doped Brushite Cements for Bone Regeneration”, *Acta Biomaterialia*, vol. 123, p. 51-71, 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.01.004.

Apêndice I

Por forma a não interferir com a organização padronizada da estrutura desta dissertação, neste apêndice apresenta-se um conjunto de micrografias obtidas por SEM com maior ampliação. Desta forma, o leitor pode visualizar algumas das características referidas ao longo do texto.

Imagens das superfícies de fratura

Nas Figuras 0.1 a 0.12 estão assinaladas superfícies de fratura transgranulares e intergranulares, T e I, respetivamente.

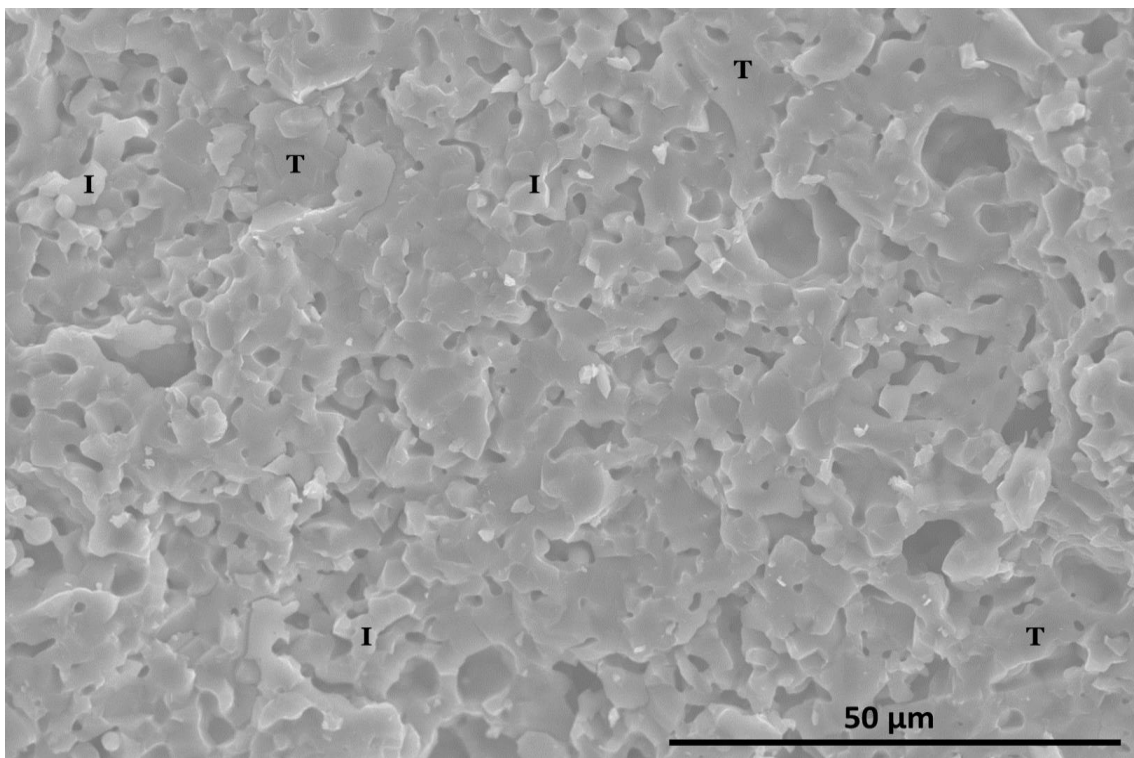


Figura 0.1. Superfície de fratura do biocompósito denso 10T obtida por SEM, com uma ampliação de 1000x.

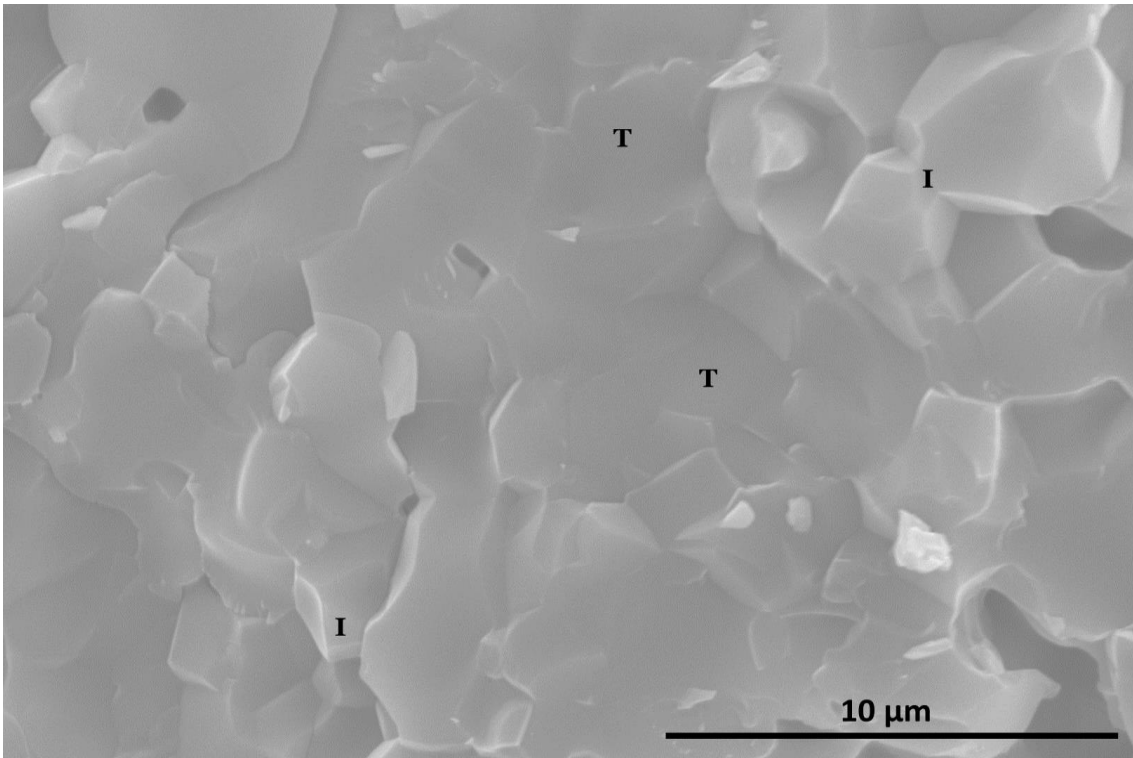


Figura 0.2. Superfície de fratura do biocompósito denso 10T obtida por SEM, com uma ampliação de 5000x.

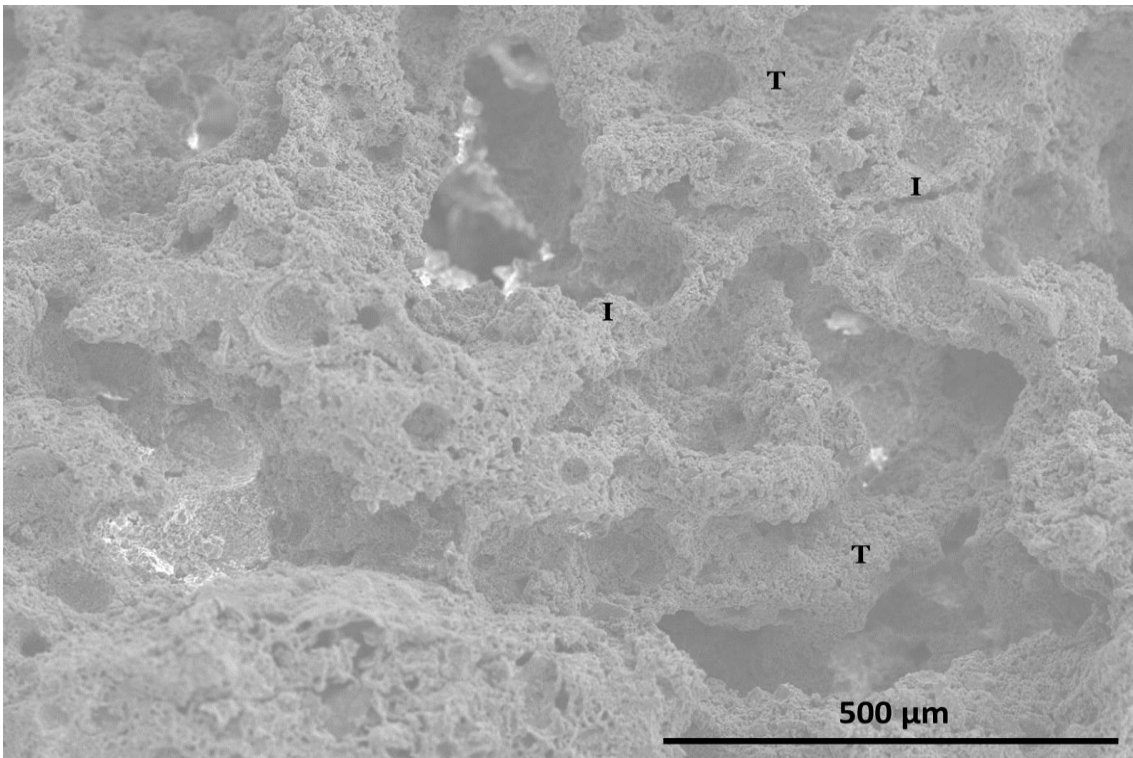


Figura 0.3. Superfície de fratura do biocompósito poroso 10T obtida por SEM, com uma ampliação de 100x.

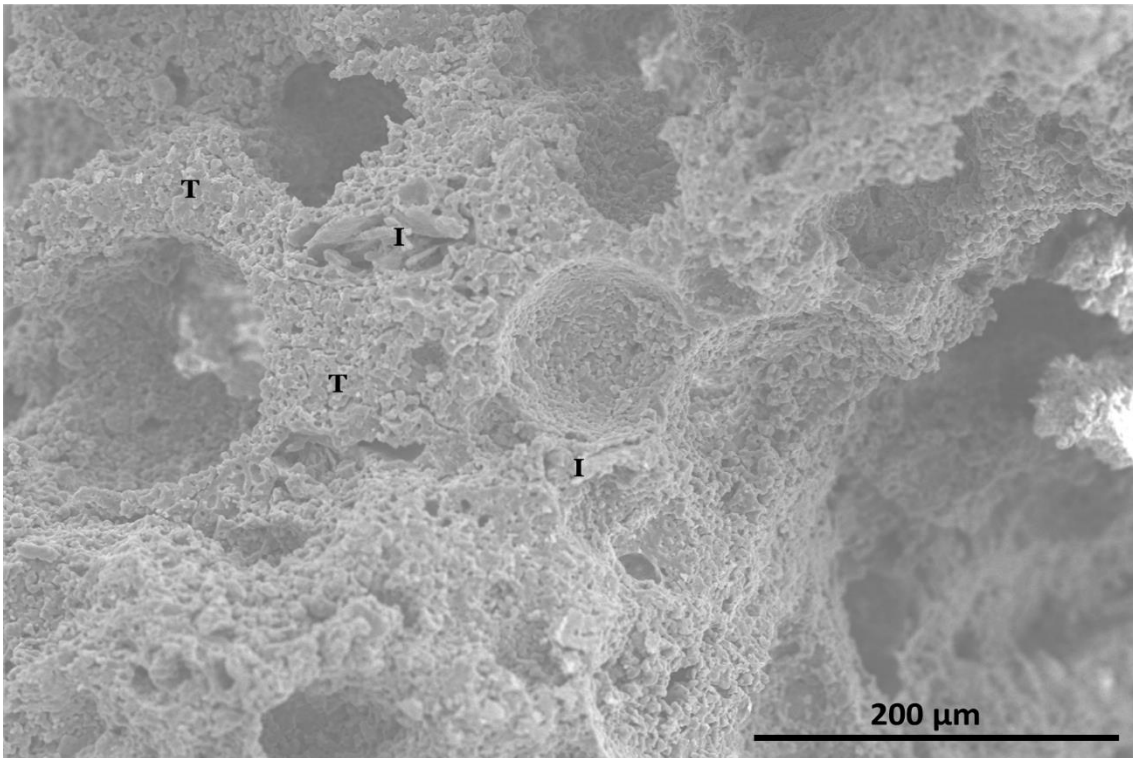


Figura 0.4. Superfície de fratura do biocompósito poroso 10T obtida por SEM, com uma ampliação de 200X.

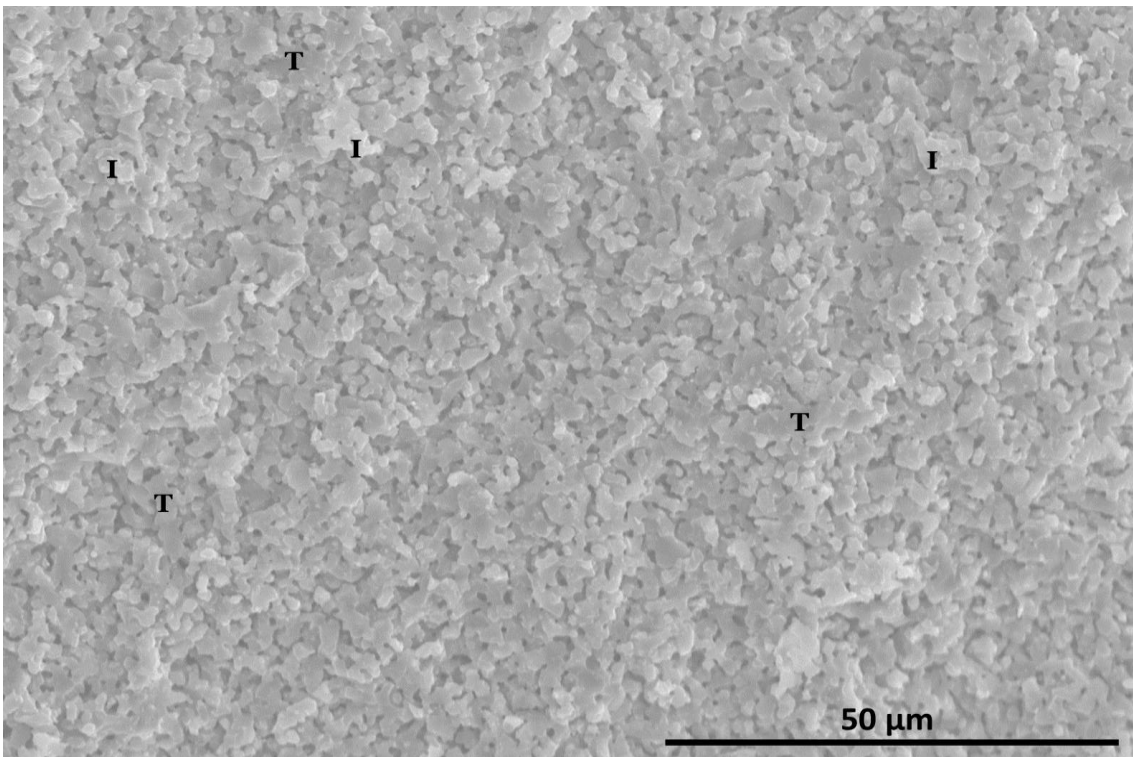


Figura 0.5. Superfície de fratura do biocompósito denso 9T1tZ obtida por SEM, com uma ampliação de 1000X.

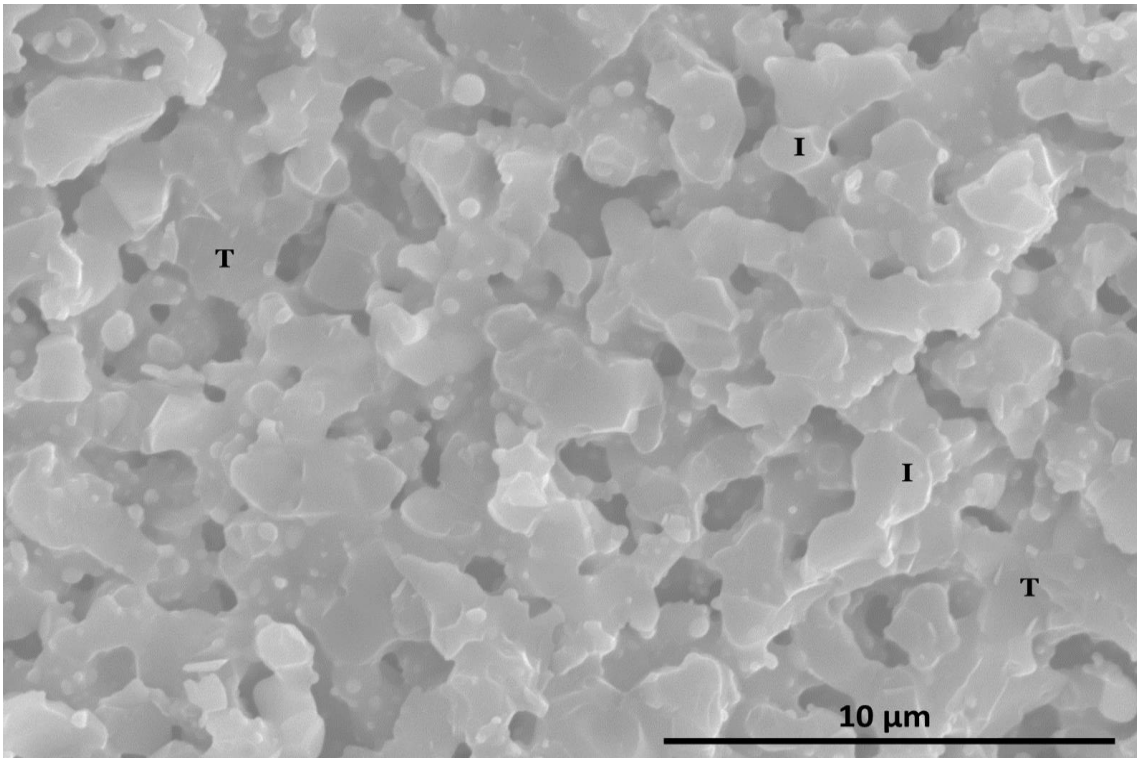


Figura 0.6. Superfície de fratura do biocompósito denso 9T1tZ obtida por SEM, com uma ampliação de 5000x.

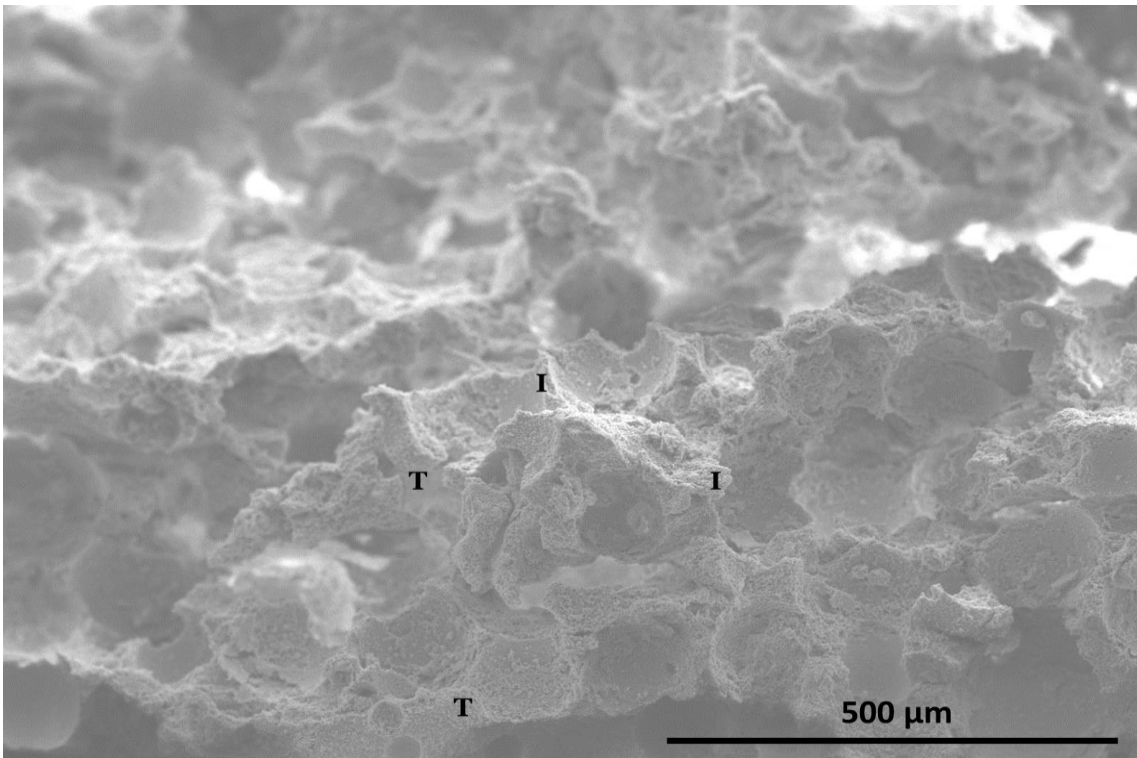


Figura 0.7. Superfície de fratura do biocompósito poroso 9T1tZ obtida por SEM, com uma ampliação de 100x.

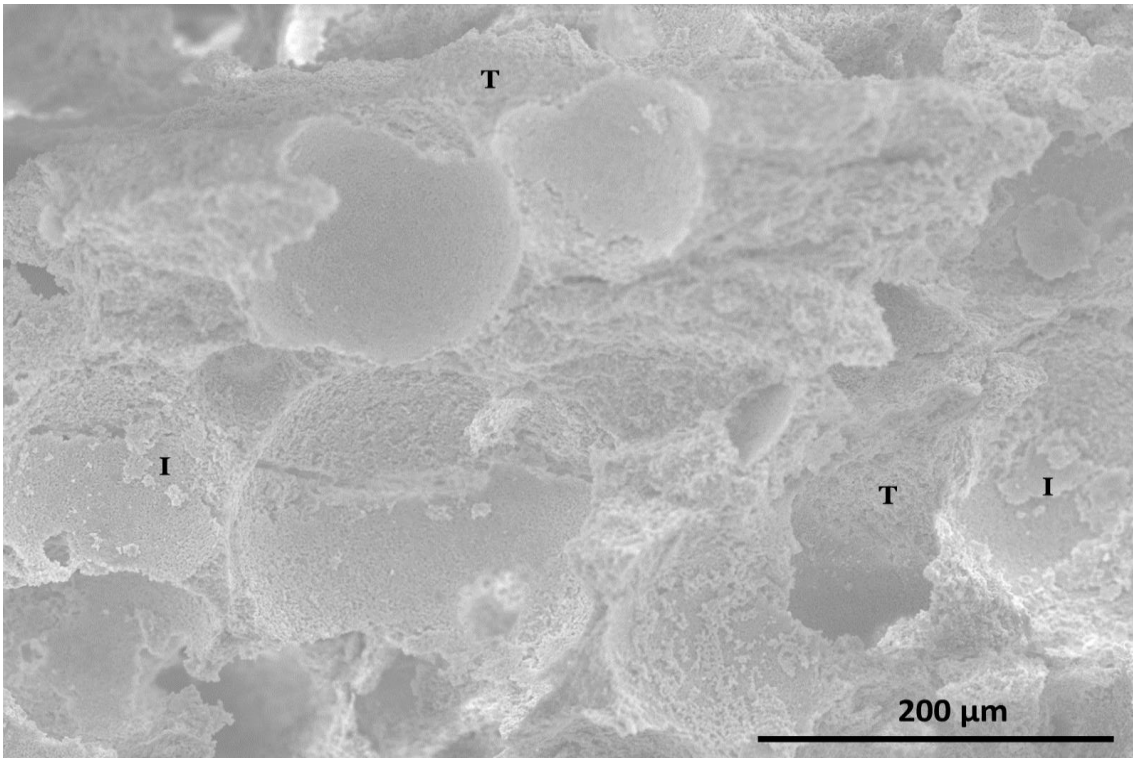


Figura 0.8. Superfície de fratura do biocompósito poroso 9T1tZ obtida por SEM, com uma ampliação de 200x.

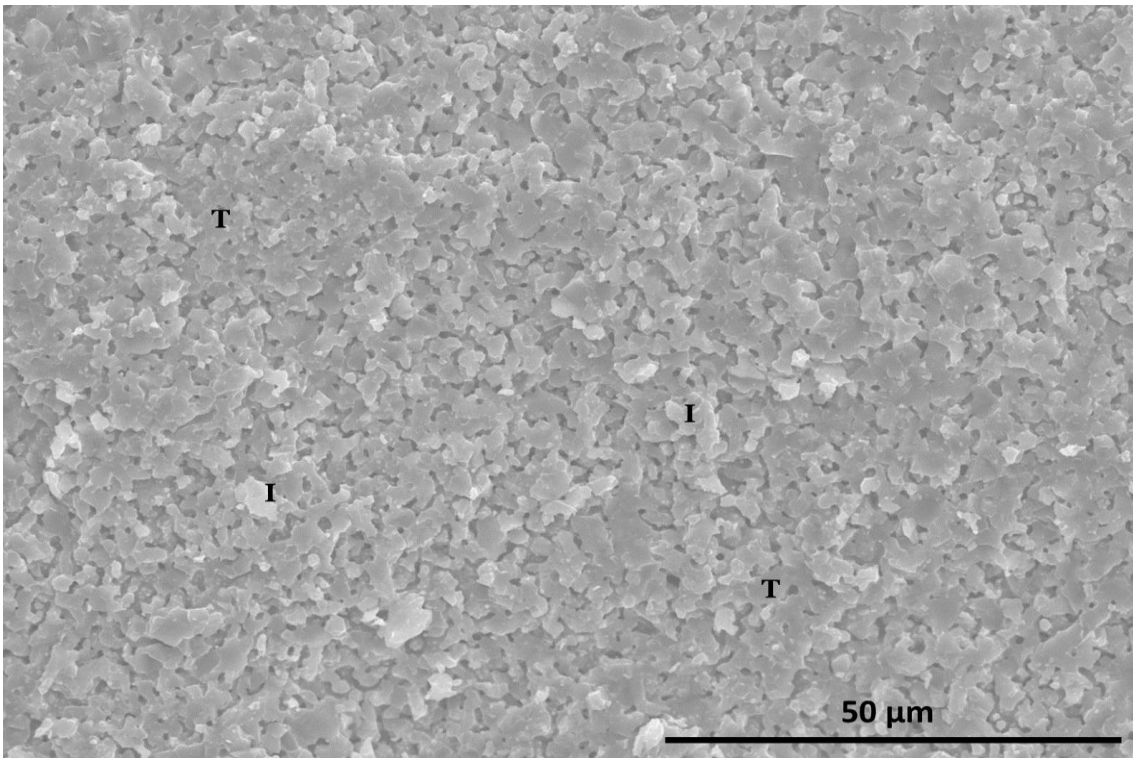


Figura 0.9. Superfície de fratura do biocompósito denso 9T1cZ obtida por SEM, com uma ampliação de 1000x.

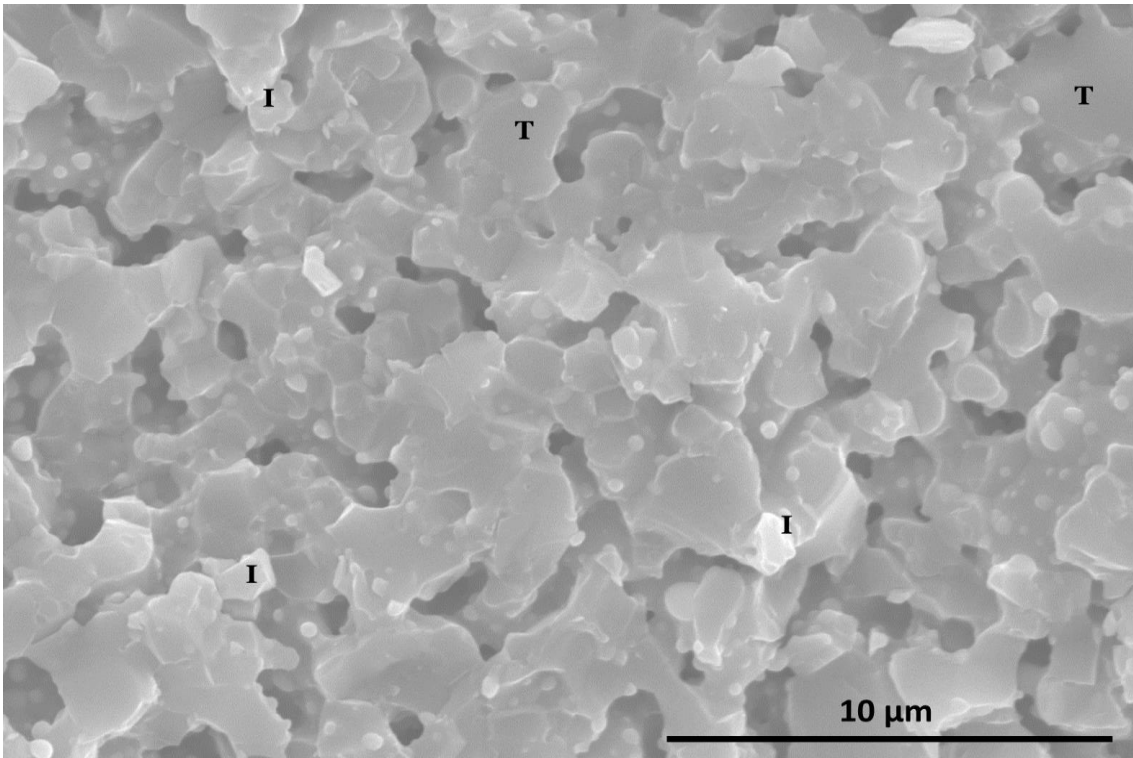


Figura 0.10. Superfície de fratura do biocompósito denso 9T1cZ obtida por SEM, com uma ampliação de 5000x.

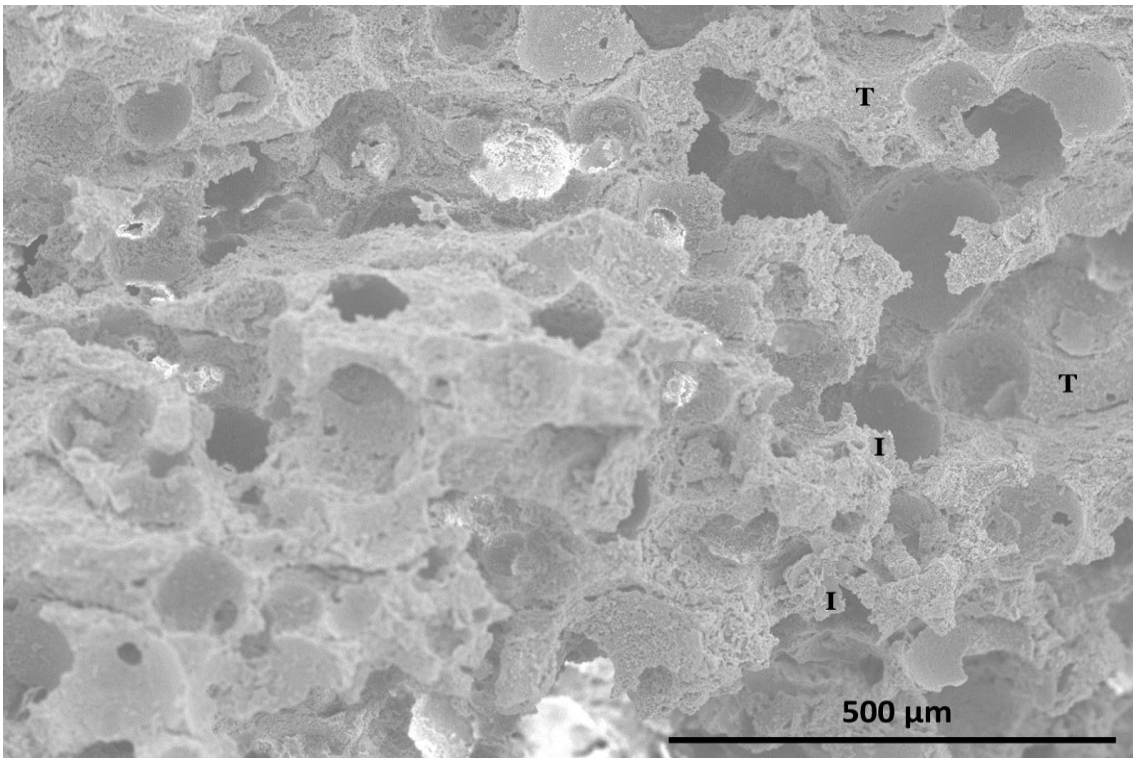


Figura 0.11. Superfície de fratura do biocompósito poroso 9T1cZ obtida por SEM, com uma ampliação de 100x.

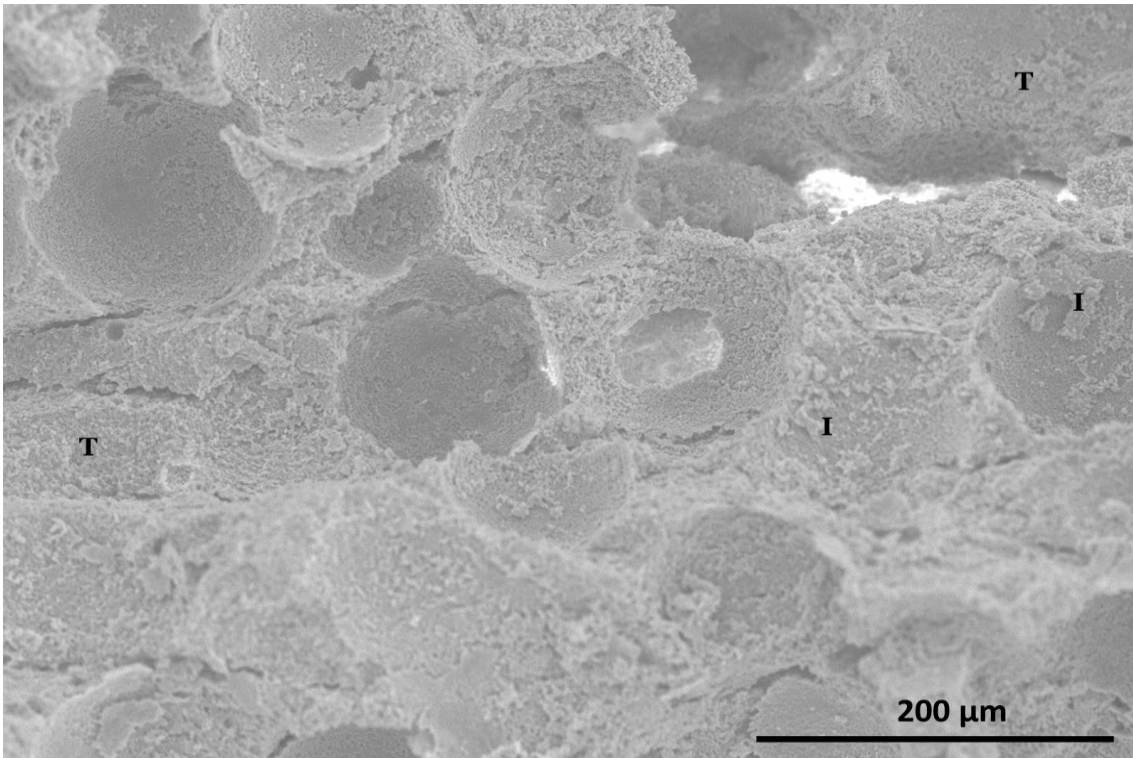


Figura 0.12. Superfície de fratura do biocompósito poroso 9T1cZ obtida por SEM, com uma ampliação de 200x.

Imagens sem e com fixação celular

As Figuras 0.13 a 0.17 ilustram os biocompósitos porosos sem incubação com hOB e as Figuras 0.18 a 0.27 ilustram a fixação celular aos biocompósitos porosos ao fim de 3 dias de incubação.

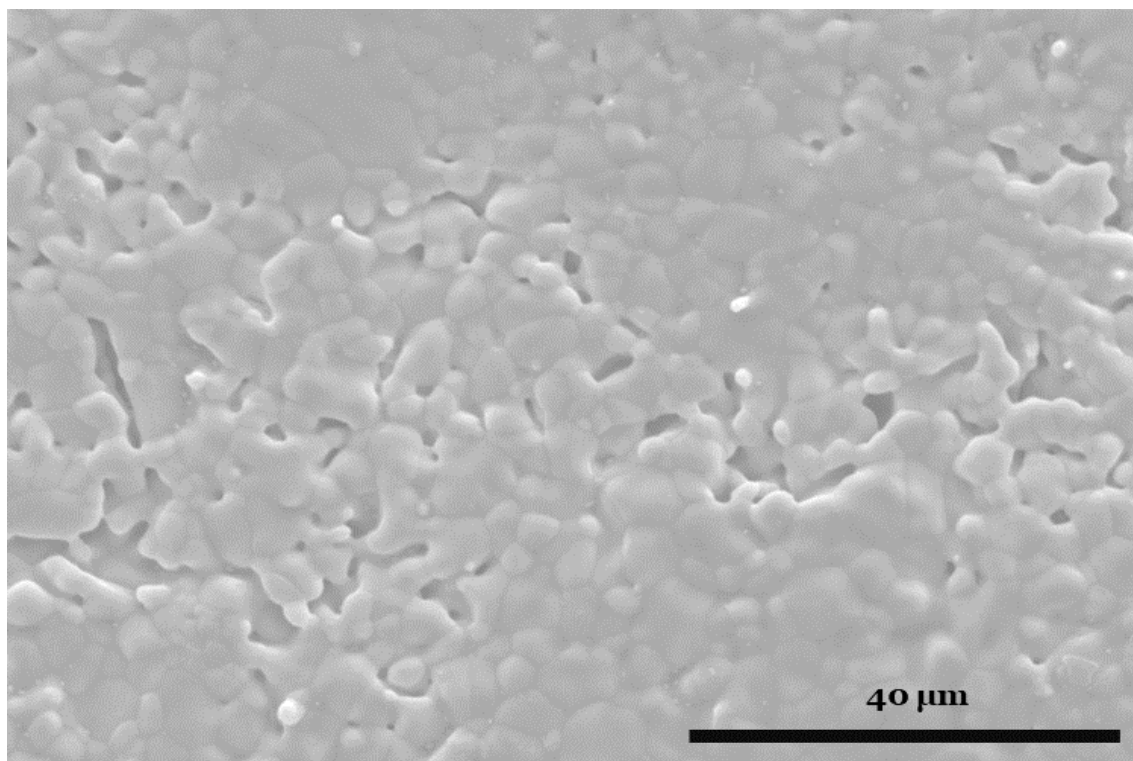


Figura 0.13. Imagem SEM do biocompósito poroso 10T sem incubação com hOB, com uma ampliação de 1200X.

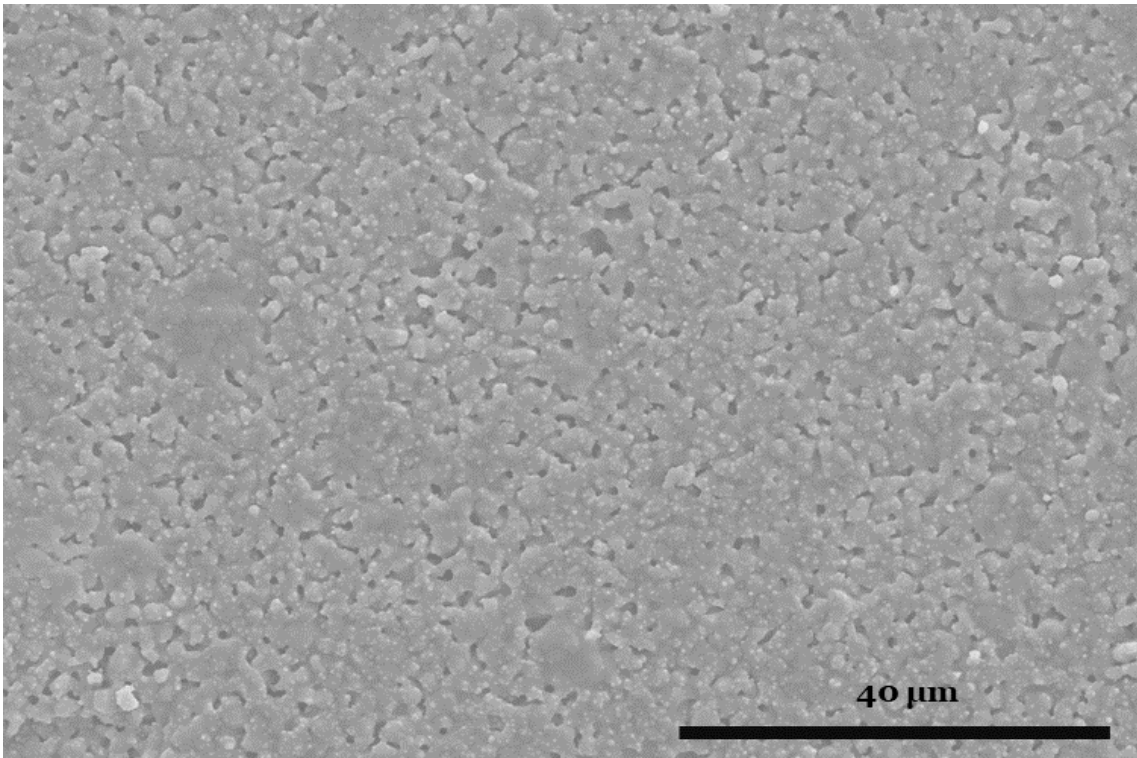


Figura 0.14. Imagem SEM do biocompósito poroso 9T1tZ sem incubação com hOB, com uma ampliação de 1200x.

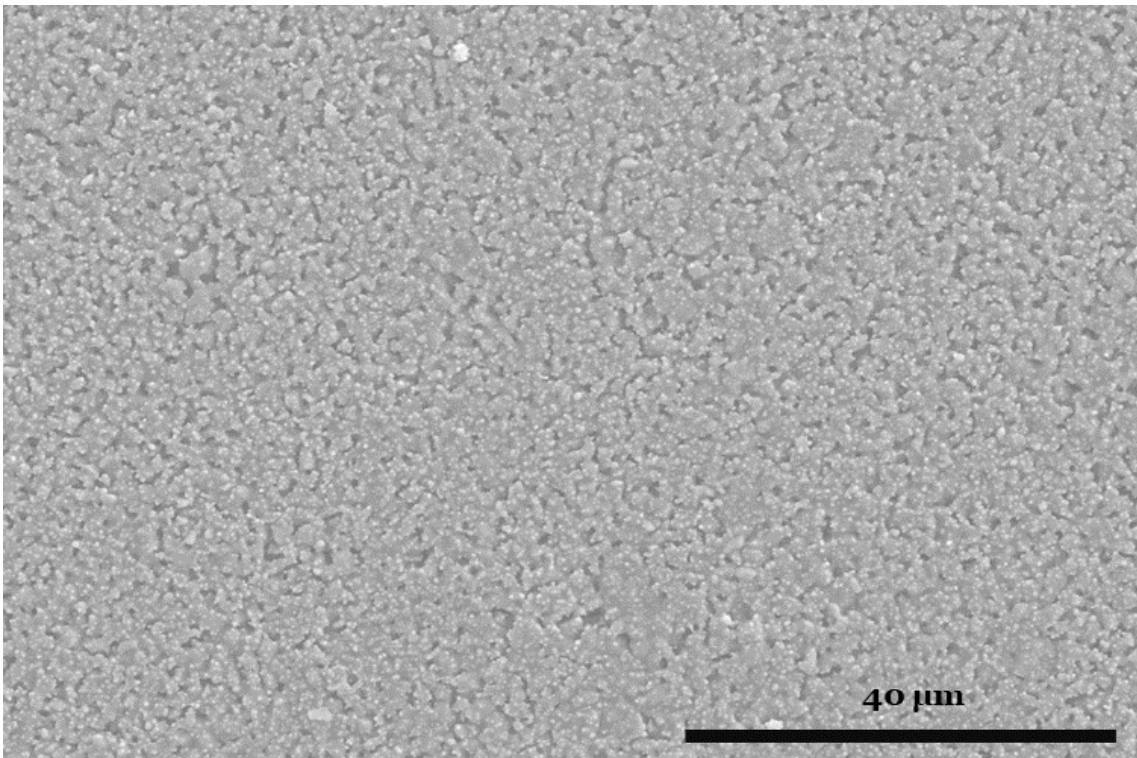


Figura 0.15. Imagem SEM do biocompósito poroso 8T2tZ sem incubação com hOB, com uma ampliação de 1200x.

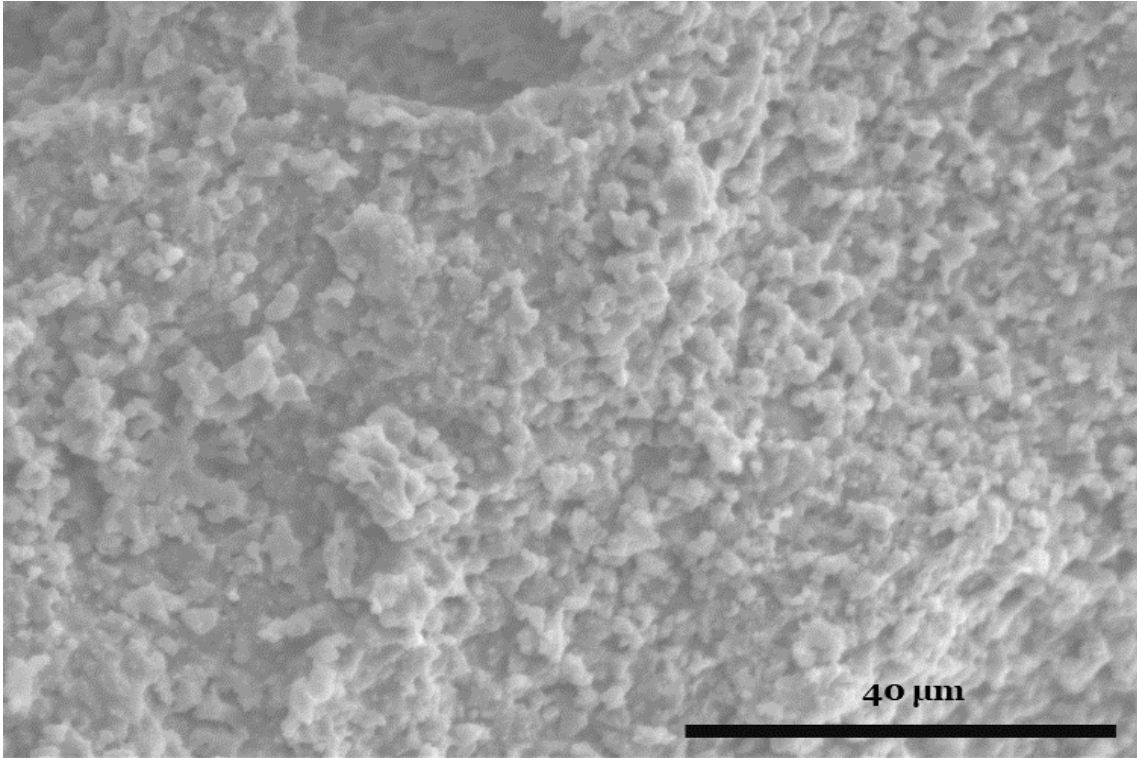


Figura 0.16. Imagem SEM do biocompósito poroso 9T1cZ sem incubação com hOB, com uma ampliação de 1200x.

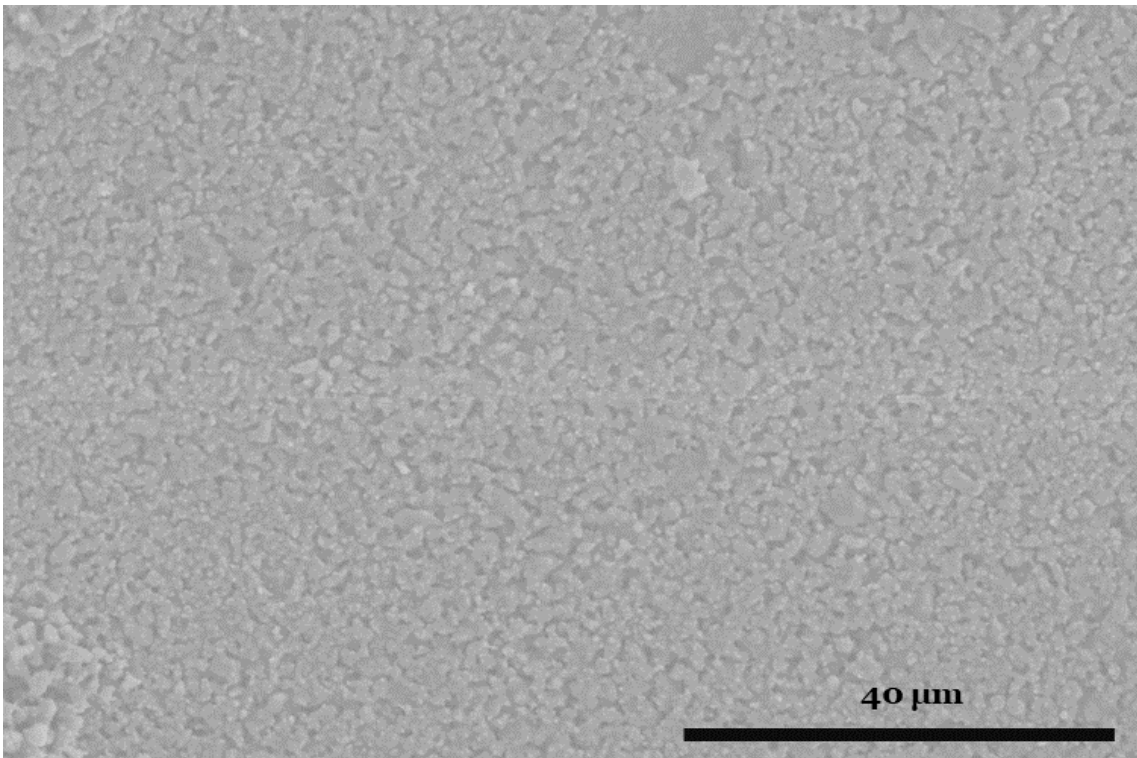


Figura 0.17. Imagem SEM do biocompósito poroso 8T2cZ sem incubação com hOB, com uma ampliação de 1200x.

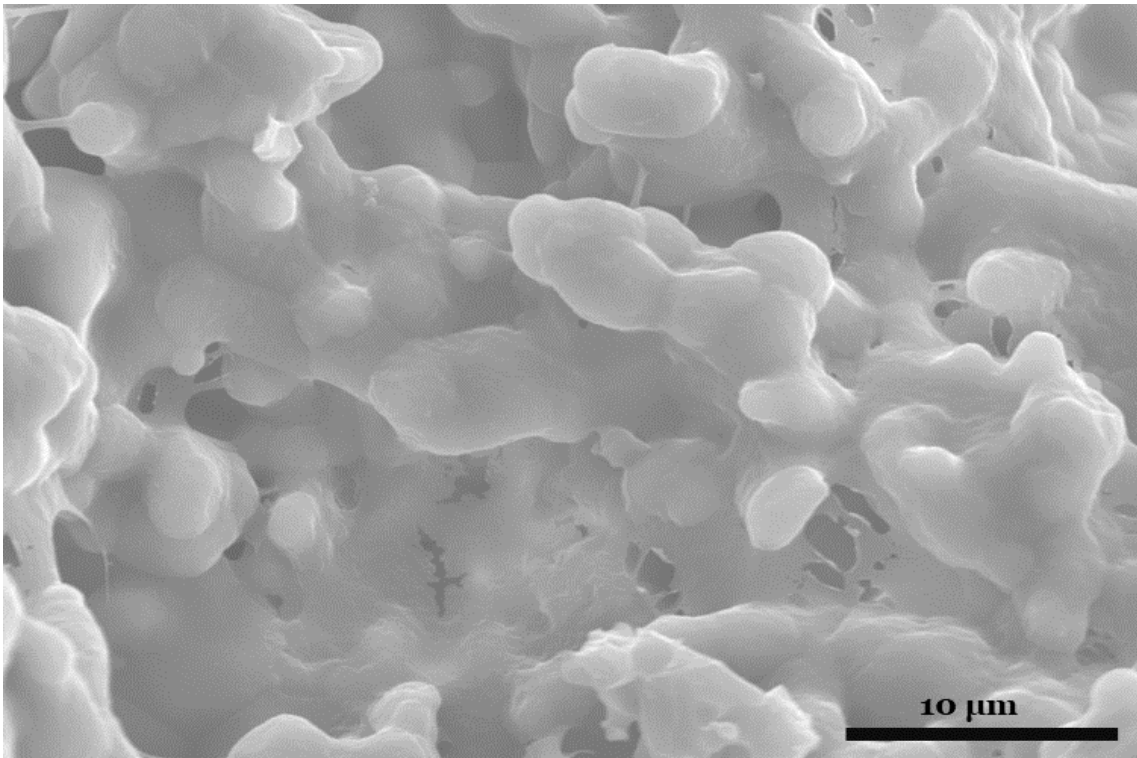


Figura 0.18. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 10T ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 3000x.

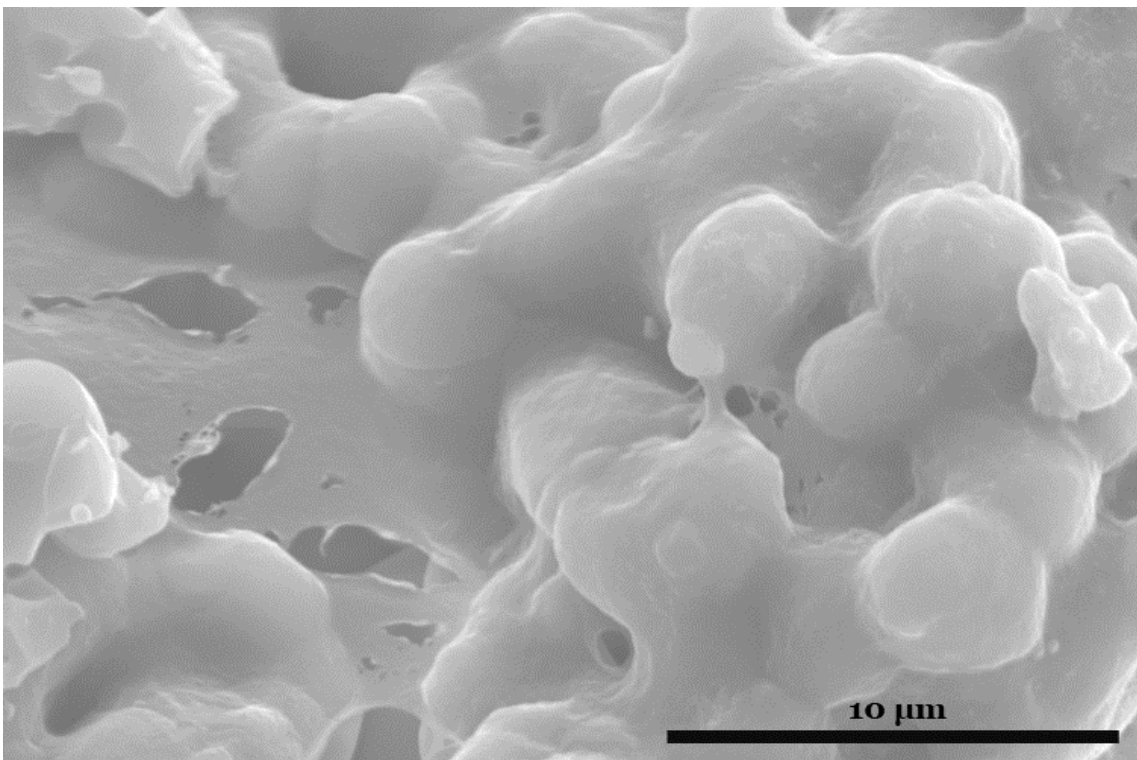


Figura 0.19. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 10T ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 5000x.

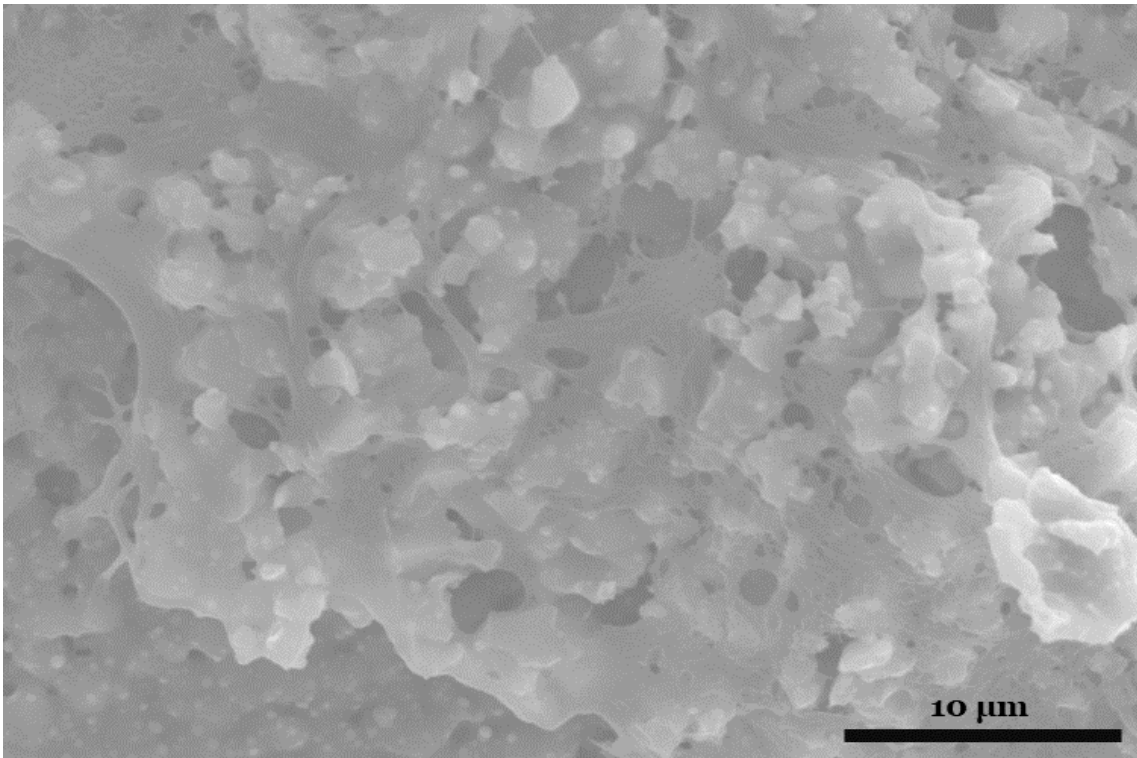


Figura 0.20. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 9Ti1Z ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 3000x.

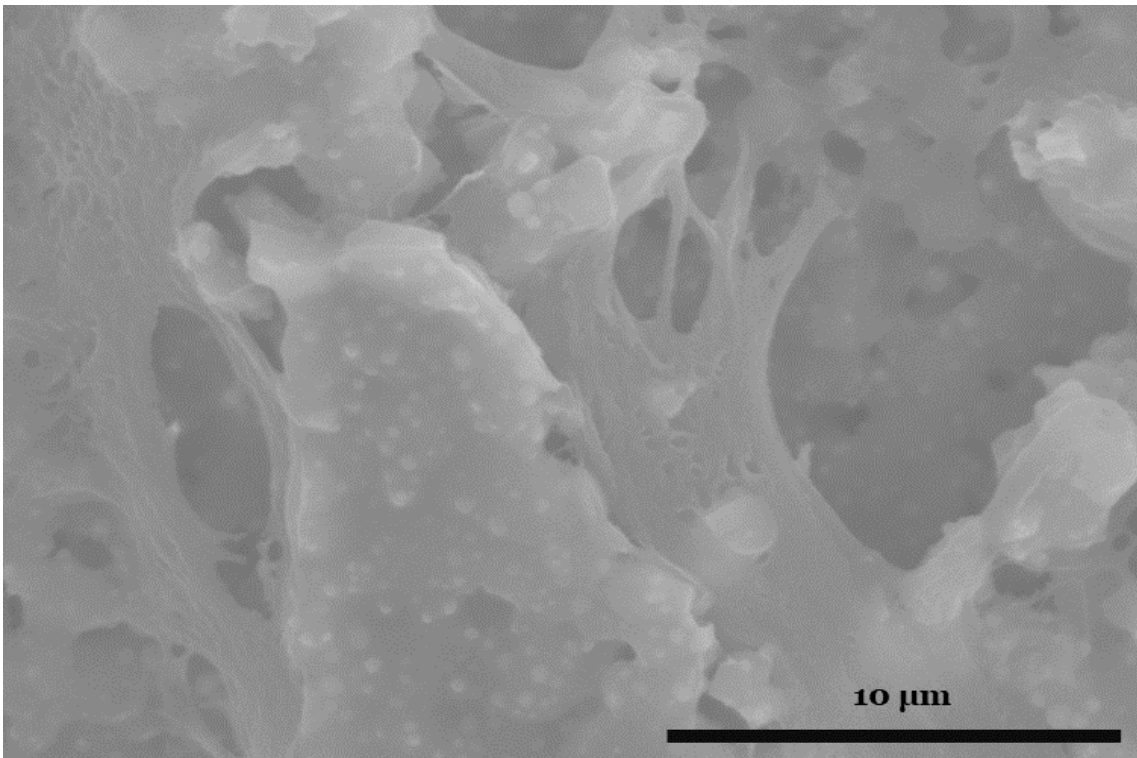


Figura 0.21. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 9Ti1Z ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 5000x.

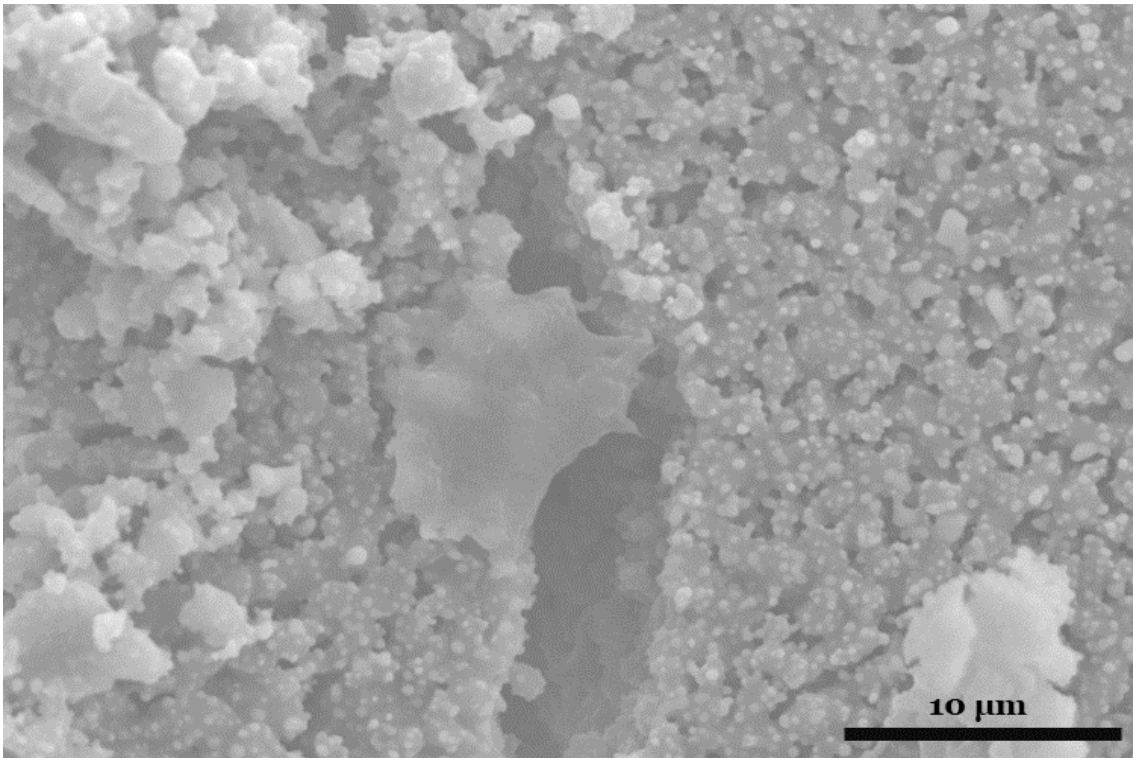


Figura 0.22. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 8T2tZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 3000x.

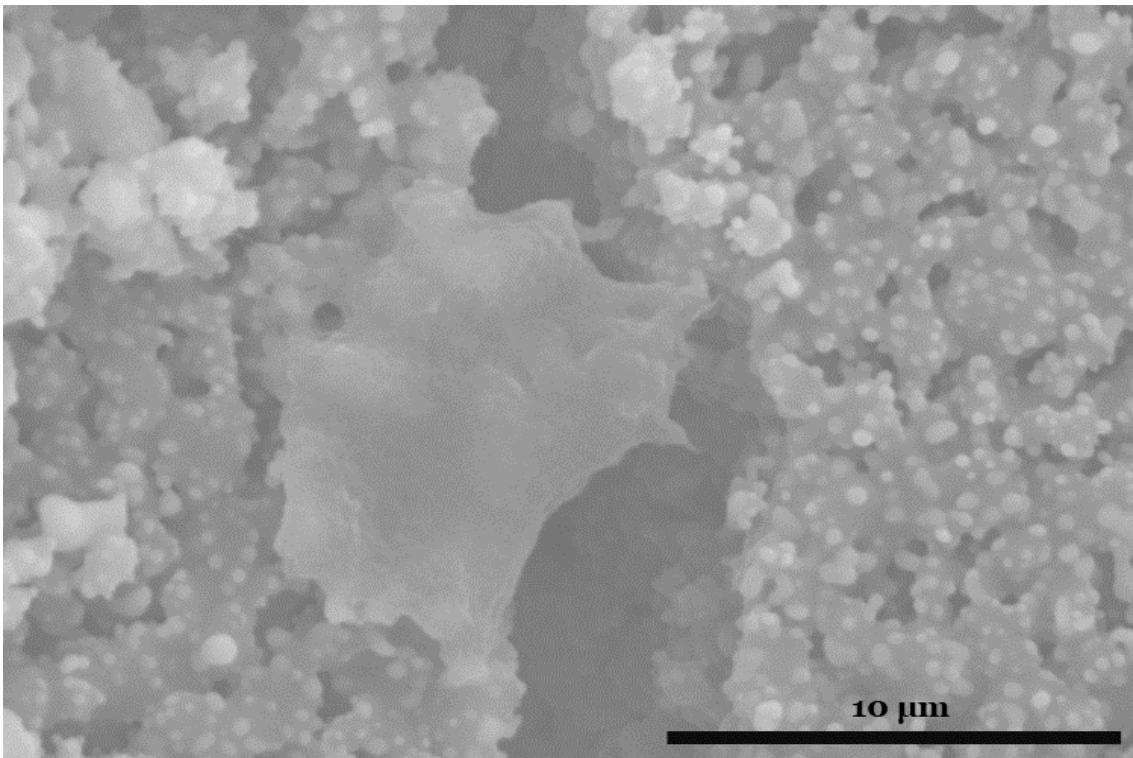


Figura 0.23. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 8T2tZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 5000x.

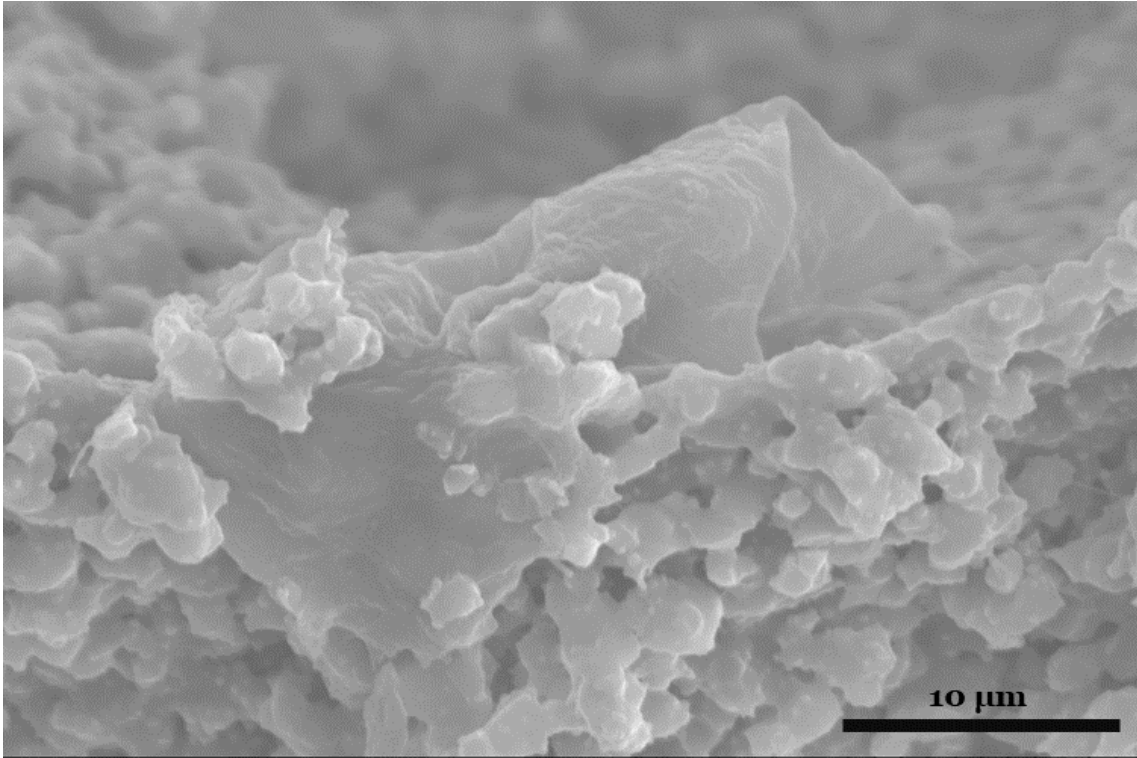


Figura 0.24. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 9T1cZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 3000x.

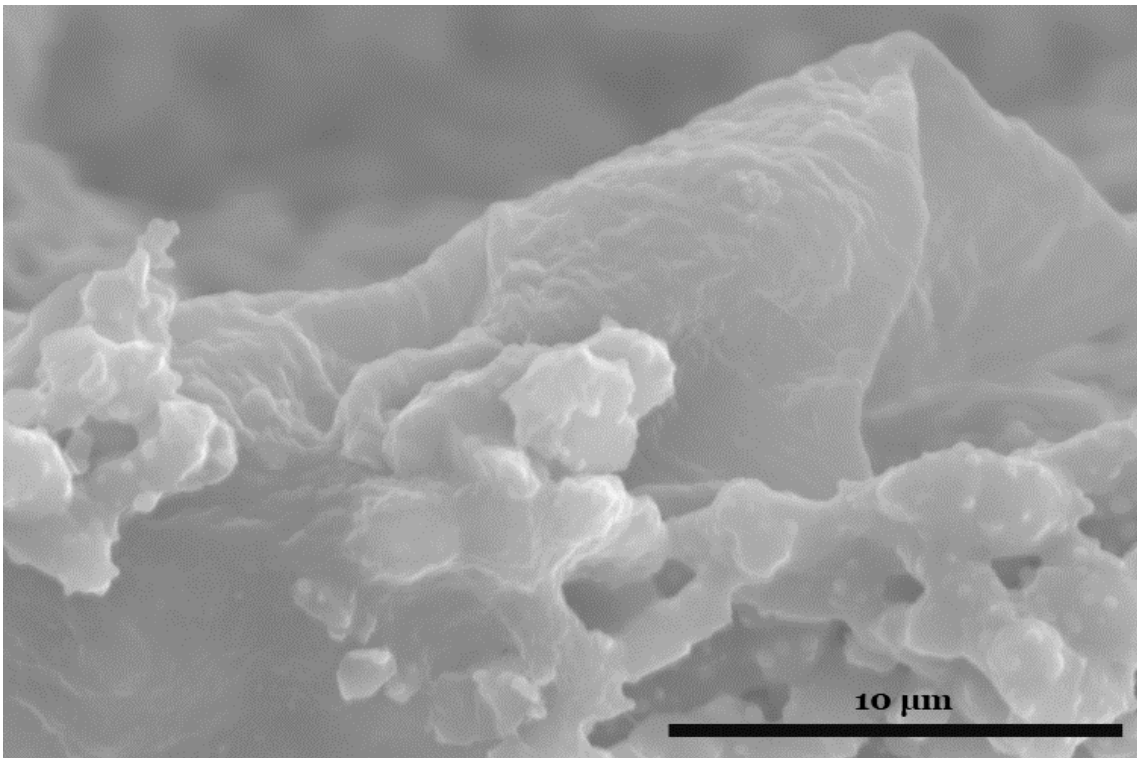


Figura 0.25. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 9T1cZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 5000x.

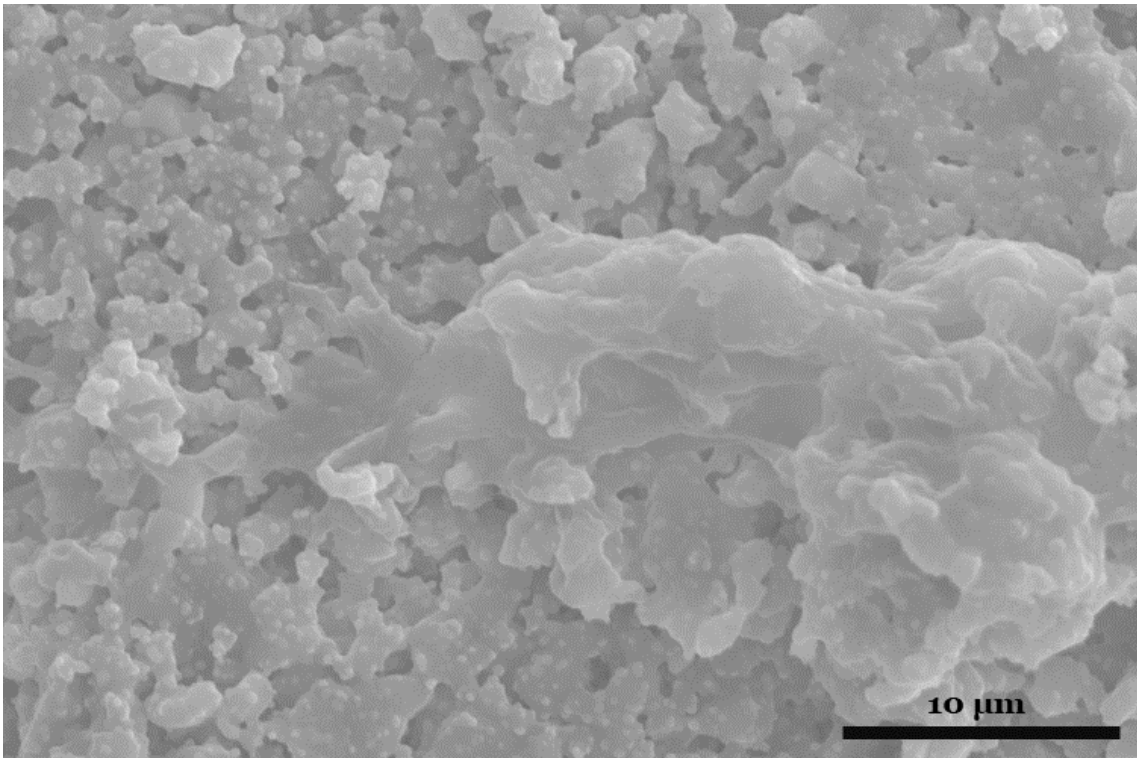


Figura 0.26. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 8T2cZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 3000x.

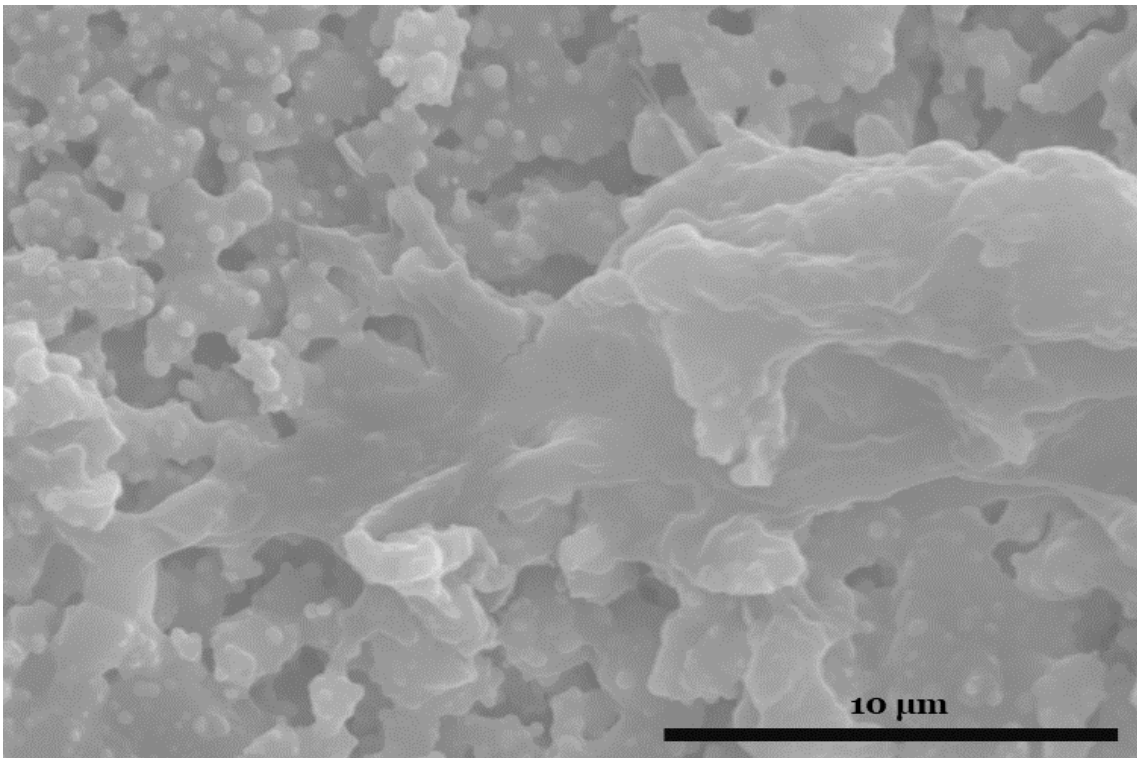


Figura 0.27. Imagens de SEM da fixação celular ao biocompósito poroso 8T2cZ ao fim de 3 dias de incubação, com uma ampliação de 5000x.