



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

FACULDADE  
DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA

Rodrigo Cristóvão Dias Coelho

# **Estudo de revestimentos de Zr-O para aplicações dentárias**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia de Materiais e apresentada ao Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Orientadores:

Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade

Mestre Sérgio Henrique de Paiva Lourenço

**Coimbra, 2018**

Trabalho desenvolvido no âmbito do projeto



Parceiros de projeto



Apoio



---

## Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças a um conjunto de pessoas e instituições às quais quero deixar o meu agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Ana Paula Piedade por toda a orientação que me deu ao longo da dissertação, chegando muitas vezes a interromper o seu trabalho para me esclarecer dúvidas e dar sugestões acerca de diferentes assuntos, mostrando-se sempre com enorme simpatia, disponibilidade, paciência e interesse. Um muito obrigado por toda a ajuda e por todos os conhecimentos que me transmitiu.

Deixo também o meu agradecimento à Professora Doutora Teresa Viera pelas sugestões e orientações dadas no início deste trabalho, bem como por toda a simpatia e conhecimentos transmitidos ao longo do mestrado.

Ao Mestre Sérgio Paiva Lourenço por toda a ajuda dada no decorrer da dissertação e pela enorme disponibilidade e amabilidade sempre demonstradas.

À ANI, ao projeto bePIM III, à Bioskin, ao Instituto Pedro Nunes, à 3DTech e à Tecnifreza pela oportunidade da realização desta investigação.

Ao CEMUP pela disponibilidade em efetuar os testes de microscopia eletrónica de varrimento e de espectroscopia de fotoeletrão X.

À Professora Doutora Ana Colette pela disponibilidade em efetuar os testes *in vitro*.

Ao Instituto Pedro Nunes pela oportunidade de realizar alguns testes no início da dissertação, nomeadamente ao Engenheiro Carlos Patacas pela disponibilidade e paciência.

A todos os meus colegas do Mestrado de Engenharia de Materiais, pela amizade e pelo apoio ao longo desta jornada.

Aos meus pais e irmãos por todos os sacrifícios feitos e apoio demonstrado ao longo de todo o meu percurso académico.

À Vanessa Montês por ter estado sempre ao meu lado, e por todas as sugestões e ajuda que me deu, sempre com a palavra certa a dizer.

A todos vós, o meu sincero Obrigado!



## Resumo

Este trabalho teve como principal objetivo o estudo de revestimentos de Zr-O para aplicações dentárias. Atualmente, a zircónia ( $ZrO_2$ ) é um dos materiais mais utilizados em implantes dentários, sendo comercializada por empresas de renome como é o caso da Strauman<sup>®</sup>. A ausência, na bibliografia consultada, de referências a materiais com estequiometrias distintas da zircónia, e que sejam empregues na área da medicina dentária, vem reforçar o objetivo deste trabalho, no qual se pretende contribuir para o avanço do conhecimento nesta área específica da interface revestimento/material biológico.

Neste contexto, foram depositados em modo reativo por pulverização catódica rf magnetrão, revestimentos com relações O/Zr inferiores (R1) e superiores (R2) à da zircónia. Os revestimentos produzidos foram comparados com um revestimento obtido a partir de um alvo de zircónia estabilizada com ítria (R3) e usado como controlo. Todos os revestimentos foram caracterizados de modo a estudar a sua morfologia/topografia, estrutura, composição química superficial, molhabilidade e potencial zeta. Por último, foram também testados *in vitro*, utilizando células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária.

A caracterização química das superfícies, efetuada por espectroscopia de fotoeletrão X, revelou a existência de ligações metálicas na superfície do revestimento R1, enquanto que as superfícies R2 e R3 apresentam o zircónio como estando totalmente oxidado e, de acordo com as bases de dados consultadas, sob a forma de  $ZrO_2$ . Na avaliação da molhabilidade, do potencial zeta e do desempenho *in vitro* dos revestimentos, os resultados demonstraram que, apesar das aparentes semelhanças químicas entre as superfícies R2 e R3, elas são distintas.

Na avaliação da citocompatibilidade dos revestimentos, como potenciais candidatos para aplicações em implantes dentários, foi observado que o revestimento R2 apresenta um melhor desempenho do que o revestimento R1, exibindo bons indicadores quanto à interação e adesão celular, podendo apresentar um desempenho, no mínimo, tão bom quanto o revestimento R3.

**Palavras-chave:** Revestimentos de Zr-O, pulverização catódica rf magnetrão, zircónia, química superficial, molhabilidade, osteointegração.

## Abstract

This work had as main objective to study Zr-O coatings for dental applications. Nowadays, zirconia ( $ZrO_2$ ) it's one of the most used materials in dental implants, being commercialized by prestigious companies like Strauman<sup>®</sup>. The absence in the bibliography of materials with stoichiometry different from that of zirconia, to be used in medical dentistry, reinforces the objective of this work, which intends to contribute for the advancement of the knowledge in this specific area of the interface coating/biologic material.

In this context, coatings with O/Zr ratios lower (R1) and higher (R2) than the one of zirconia were deposited in reactive mode by rf magnetron sputtering technique. As a control, thin films obtained from a zirconia stabilized with an yttria target (R3) were also produced.

All the coatings were characterized to evaluate their morphology/topography, structure, surface chemistry, wettability and zeta potential. Finally, they were also tested *in vitro*, using mesenchymal stem cells of the dental pulp.

The analysis of the surface chemistry revealed the presence of metallic bonds in the surface of the coating R1, while R2 and R3 have their surfaces totally oxidized with zirconium in the form of  $ZrO_2$ . In contrast, the evaluation of the wettability, zeta potential and *in vitro* performance of the coatings suggest that the surfaces of R2 and R3 could be in fact distinct from each other. Regarding to the performance as potential application's in implants, it was found that the coating R2 present a better performance than R1 – exhibiting good indicators for cellular adhesion and cellular interaction – being at least as efficient as R3.

**Keywords** Zr-O coatings, rf magnetron sputtering, zirconia, surface chemistry, wettability, osseointegration.



## Índice

Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas .....	x
Simbologia e Siglas.....	xi
Simbologia.....	xi
Siglas .....	xii
Introdução.....	1
1. Estado da Arte.....	3
1.1. A Zircónia .....	4
1.2. Modificação de Superfície .....	6
1.2.1. Tratamentos Mecânicos .....	7
1.2.2. Tratamentos Químicos .....	8
1.2.3. Combinação entre os tratamentos Mecânico e Químico.....	8
1.2.4. Pulverização Catódica.....	9
1.3. Métodos de esterilização a implantes dentários .....	11
1.3.1. Esterilização por Autoclave .....	11
1.3.2. Esterilização por Calor Seco .....	12
1.3.3. Esterilização por Radiação .....	12
1.4. Revestimentos de Zr-O .....	13
2. Materiais e Técnicas Experimentais.....	17
2.1. Técnica de deposição e equipamento.....	17
2.1.1. Alvos e substratos .....	17
2.1.2. Procedimento de deposição .....	18
2.2. Técnicas de Caracterização .....	19
2.2.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento .....	19
2.2.2. Microscopia de Força Atómica .....	20
2.2.3. Difração de raios X.....	21
2.2.4. Potencial Zeta .....	21

---

2.2.5. Ângulo de contacto .....	22
2.2.6. Espectroscopia de Fotoeletrão X .....	23
2.3. Testes <i>In Vitro</i> .....	24
3. Resultados e Discussão.....	25
3.1. Estudo preliminar.....	25
3.2. Morfologia/Topografia.....	26
3.3. Estrutura .....	29
3.4. Química superficial.....	30
3.5. Molhabilidade.....	33
3.5.1. Ângulos de contacto.....	33
3.5.2. Energia de superfície .....	35
3.6. Potencial Zeta .....	36
3.7. Testes <i>In Vitro</i> .....	37
Conclusões.....	41
Bibliografia.....	43
Apêndice A – Deposições preliminares .....	47
Apêndice B – XPS: Espectros de alta resolução .....	49
Anexo A – Diagrama de fase zircónia-íttria.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes tipos de implantes dentários propostos por várias companhias. (A) ETK, implant Aesthetica™, (B) MIS, implantC1™, entre outras. Adaptado de [1].	3
Figura 2. Esquemas de diferentes tipos de modificação de superfícies. Adaptada de [16].	7
Figura 3. Esquema do processo de pulverização catódica em modo reativo. Adaptada de [19].	10
Figura 4. Equipamento de deposição.	17
Figura 5. Máscara utilizada para deposição das lamelas e silício.	18
Figura 6. Modelo da dupla camada elétrica numa interface sólido-líquido. Adaptada de [35].	22
Figura 7. Representação esquemática da determinação do ângulo de contacto. Adaptada de [36].	23
Figura 8. Micrografias de secção transversal e topo dos revestimentos R1 (a, b), R2 (c, d) e R3 (e, f).	27
Figura 9. Imagens de topografia e de fase das superfícies dos revestimentos R1 (a), R2 (b, d) e R3 (c) numa área de 1x1 μm.	28
Figura 10. Difractogramas de raios X dos revestimentos R1 e R2 depositados sobre vidro.	30
Figura 11. Espectro de Zr3d do revestimento R1, após desconvolução.	31
Figura 12. Possível química de superfície do revestimento R1. Adaptada de [43].	33
Figura 13. Imagens de microscopia ótica da superfície dos revestimentos R1 (a), R2 (b), R3 (c) e de uma lamela de vidro (d), após 24h em meio de cultura com células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária.	38
Figura 14. Micrografias de topo da superfície dos revestimentos R1 (a), R2 (b, d e f) e R3 (c, e) após 24h em meio de cultura com células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária.	39
Figura 15. Fotos dos revestimentos R1 (a), R2 (b) e R3 (c) depositados sobre lamelas de vidro.	47
Figura 16. Espectros de Zr3d (a) e O1s (b) do revestimento R1, após desconvolução.	49
Figura 17. Espectros de Zr3d (a) e O1s (b), do revestimento R2, após desconvolução.	49
Figura 18. Espectros Zr3d (a), O1s (b) e Y3d (c) do revestimento R3, após desconvolução.	50
Figura 19. Diagrama de fase zircónia-ítria, (a) diagrama de 1951, (b) diagrama de 1975, (c e d) diagramas mais recentes.	51

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sumário de estudos efetuados a revestimentos de zircónia depositados por diferentes técnicas. ....	6
Tabela 2. Designação e parâmetros de deposição dos filmes finos nas deposições definitivas. ....	19
Tabela 3. Composição química semi-quantitativa dos revestimentos depositados para estudo preliminar. ....	25
Tabela 4. Parâmetros de rugosidade da superfície dos revestimentos R1, R2 e R3. ....	29
Tabela 5. Composição química elementar determinada por XPS. ....	31
Tabela 6. Contribuição de cada tipo de ligação na composição química das superfícies analisadas. ....	32
Tabela 7. Constantes termodinâmicas de formação de compostos de Zr [42]. ....	33
Tabela 8. Valores médios e desvio padrão dos ângulos de contacto estáticos medidos na superfície dos revestimentos R1, R2, R3. ....	34
Tabela 9. Valores da tensão superficial e componentes dispersivas e polares da água e formamida [46]. ....	36
Tabela 10. Energia de superfície dos revestimentos R1, R2 e R3 e respetivas componentes polares e dispersivas. ....	36
Tabela 11. Valores do potencial zeta e desvio padrão nas superfícies dos revestimentos R1, R2 e R3. ....	37
Tabela 12. Designação e parâmetros de deposição dos filmes finos preparados nas deposições preliminares. ....	47

## SIMBOLOGIA E SIGLAS

### Simbologia

$D_{\text{dep}}$  – Densidade de Potência

$D_{hkl}$  – Distância interplanar para o conjunto de planos hkl

$\Delta G_f^0$  – Energia de formação de Gibbs

$\Delta H_f^0$  – Entalpia de formação

$\gamma_L$  – Tensão de superfície do líquido

$\gamma_L^d$  e  $\gamma_L^p$  – Contribuição da componente dispersiva e polar para a tensão de superfície do líquido

$\gamma_{LV}$  – Tensão interfacial líquido-vapor

$\gamma_s$  – Energia de superfície do filme

$\gamma_s^d$  e  $\gamma_s^p$  – Contribuição da componente dispersiva e polar para a energia de superfície

$\gamma_{SL}$  – Tensão interfacial sólido-líquido

$\gamma_{SV}$  – Tensão interfacial sólido-vapor

$k$  – Constante de mola

$\lambda$  – Comprimento de onda da radiação incidente

$n$  – Número inteiro 1, 2, 3...

$P_p$  – Pressão parcial

$S_a$  – Rugosidade média aritmética

$S_z$  – Distância máxima pico vale

$\tau^0$  – Tensão de adesão da água

$\theta$  – Ângulo de Bragg

$\theta$  – Ângulo de contacto

$\theta_Y$  – Ângulo de contacto de Young

$\zeta$  – Potencial Zeta

## Siglas

AFM – Atomic Force Microscopy

bePIM III – be Powder Injection Molding III

BIC – Bone Implant Contact

CEMPD – Células Estaminais Mesenquimatosas da Polpa Dentária

CPS – Counts per second

DC – Direct Current

EBPVD – Electron Beam Physical Vapor Deposition

EDS – Energy Dispersive Spectroscopy

EPD – Electrophoretic Deposition

ICDD – International Centre for Diffraction Data

ISO – International Organization for Standardization

LED&MAT – Laboratório de Ensaios, Desgaste e Materiais

PIM – Powder Injection Molding

SE – Surface Energy

SEM – Scanning Electron Microscopy

SEM-EDS – Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive Spectroscopy

SCCM – Standard Cubic Centimeters per Minute

SLA – Sandblasting and Large Grit Acid Etching

UV – Ultraviolet

UVA – Ultraviolet type A

UVB – Ultraviolet type B

UVC – Ultraviolet type C

UHUV – Universal Homogeneous Ultraviolet

XRD – X-ray Diffraction

XPS – X-ray Photoelectron Spectroscopy

## INTRODUÇÃO

O principal objetivo do presente trabalho é o estudo de revestimentos de Zr-O com estequiometrias distintas da zircónia -  $ZrO_2$ . Esta dissertação tem como base um projeto, cujo acrónimo é bePIM III (*be Powder Injection Molding III*), resultante duma parceria entre a Universidade de Coimbra (Departamento de Engenharia Mecânica) e o Instituto Pedro Nunes (LED&MAT), Bioskin, 3D-Tech e Tecnofreza, que pretende demonstrar a viabilidade de fabrico de novos implantes dentários em zircónia (pilar e implante) a partir de modelação por injeção de pós (*Powder Injection Molding* - PIM).

De acordo com a evolução atual dos materiais usados em implantes dentários é importante tentar analisar se revestimentos com relação O/Zr inferior e superior à estequiometria da zircónia têm potencial para ser usados em aplicações dentárias, e se efetivamente podem ser apresentados como uma alternativa fiável aos materiais já utilizados.

Os revestimentos de Zr-O foram produzidos por pulverização catódica (rádio-frequência, magnetrão) reativa, a partir de um alvo metálico de zircónio, utilizando como gás reativo o oxigénio com diferentes pressões parciais. Como controlo foram depositados filmes finos a partir de um alvo de zircónia estabilizada com ítria. As caracterizações de todos os revestimentos foram efetuadas no que concerne a morfologia, a topografia, a estrutura, a molhabilidade e o potencial zeta. Com estas caracterizações pretendeu-se avaliar o modo como as diferentes razões O/Zr afetam as características/propriedades da superfície. O estudo foi complementado pelos testes *in vitro* com células eucarióticas onde os revestimentos de Zr-O foram comparados com o desempenho de filmes finos de zircónia, estabilizada com ítria.

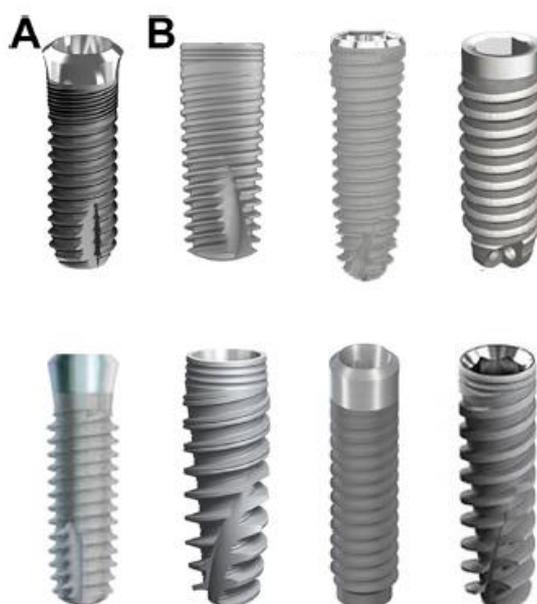
A presente dissertação encontra-se dividida em três capítulos. No primeiro é apresentado o estado da arte no que diz respeito, genericamente, ao uso da zircónia como biomaterial para aplicações dentárias, bem como uma breve resenha da consulta efetuada sobre a produção de filmes finos de Zr-O, com estequiometria distinta da zircónia. O capítulo 2 contém uma breve descrição da metodologia utilizada na parte experimental desta dissertação, bem como as condições experimentais específicas utilizadas em cada técnica.

No terceiro capítulo são apresentados e discutidos os principais resultados decorrentes da investigação desenvolvida.

A dissertação termina com as principais conclusões retiradas do trabalho desenvolvido, bem como breves apontamentos sobre o trabalho que futuramente pode ser efetuado com o objetivo de complementar este trabalho.

## 1. ESTADO DA ARTE

Atualmente os implantes dentários são uma solução recorrente em pacientes que necessitam de reabilitação oral, sendo uma solução viável que permite uma melhoria da qualidade de vida. Os implantes geralmente apresentam uma parte exterior roscada, com maior ou menor diâmetro, com geometria cilíndrica, cônica ou híbrida, existindo uma grande variedade de formas mais ou menos complexas, conforme se exemplifica na figura 1. Os implantes permitem a inserção do pilar que suporta a coroa e através de uma pequena cirurgia podem ser colocados de forma a substituir um dente natural que se encontra danificado ou ausente [1], [2].



**Figura 1.** Diferentes tipos de implantes dentários propostos por várias companhias. (A) ETK, implant Aesthetica™, (B) MIS, implantC1™, entre outras. Adaptado de [1].

Atualmente são usados diversos tipos de materiais em implantes dentários, tais como o titânio e as suas ligas (Ti-6Al-4V, por exemplo) e materiais cerâmicos como a zircónia ( $ZrO_2$ ). Apesar destes materiais serem reportados na literatura como apresentando uma boa biocompatibilidade para com o tecido duro, é importante que tenham uma durabilidade e resistências à fadiga e ao corte significativas, de forma a proporcionar uma

boa qualidade de vida aos seus utilizadores. Assim, de modo a aumentar o tempo de vida útil dos implantes bem como o seu desempenho, é necessário ter em conta alguns fatores tais como a topografia da superfície, o seu tratamento e a tecnologia utilizada na sua esterilização [3]. Com efeito, através da otimização destes fatores, que pode passar pela modificação das propriedades/características de superfície dos implantes, é possível melhorar a biocompatibilidade, para com o tecido duro como mole, e diminuir o período de recuperação dos pacientes [4].

Alguns estudos apresentados na literatura reportam que um aumento da rugosidade da superfície de implantes promove uma melhor interação e adesão celular [3], [5]. Outros trabalhos indicam também que a energia de superfície, carga superficial, molhabilidade, topografia e (nano)cristalinidade têm elevada influência no desempenho de biomateriais, podendo reduzir a adesão de bactérias, melhorar a osteointegração, bem como proteger as superfícies de uma possível libertação de nanopartículas ou iões [2], [6]. Estes estudos reforçam a importância da modificação de superfícies e da técnica utilizada na esterilização dos materiais pré-implantação. Convém ainda salientar que, apesar do implante se encontrar maioritariamente em contacto com o tecido duro, diversos fatores como a idade, hábitos alimentares ou herança genética, podem induzir alguma recessão gengival. Por esta razão é também necessário ter em consideração a compatibilidade biológica entre o implante e as células que constituem a mucosa gengival.

## 1.1. A Zircónia

A zircónia ( $ZrO_2$ ) é um material usado em implantes dentários devido à sua boa biocompatibilidade e resistências à fadiga e ao desgaste [7]. Tem a vantagem de ser um material que apresenta um aspeto estético mais apelativo que os implantes metálicos, graças à sua cor branca, que é similar à cor natural dos dentes [5]. Alguns estudos reportam que implantes de zircónia apresentam melhor biocompatibilidade para com o tecido ósseo e reduzem a adesão de bactérias quando comparados com os implantes de titânio [8]. Esses mesmos estudos também referem que a zircónia é um material com uma maior capacidade osteoindutora.

A zircónia, estruturalmente, pode apresentar três fases: monoclinica, tetragonal e cúbica [5], [9]. A fase monoclinica é estável desde a temperatura ambiente até aos 1170

°C, a fase tetragonal é estável no intervalo 1170-2370 °C e a cúbica ocorre para temperaturas acima de 2370 °C (figura 19 do Anexo A) [8][9]. A transição entre estas fases ocorre com variações dimensionais que originam o aparecimento de fissuras [7][9]. De modo a evitar esta ocorrência, bem como as consequências adversas que a mesma pode despoletar, a zircónia utilizada em implantes dentários é estabilizada na fase tetragonal, sendo o estabilizador mais utilizado a ítria ( $Y_2O_3$ ) [7][9]. Também podem ser usados outros estabilizadores tais como os óxidos de magnésio (MgO), de cálcio (CaO), de cério ( $CeO_2$ ) e de alumínio ( $Al_2O_3$ ). Os estabilizadores são utilizados para manter a estrutura tetragonal da zircónia à temperatura ambiente, dado que, sem o seu uso, nada impediria a transformação da fase tetragonal para a fase monoclínica da zircónia. Esta última ocupa mais volume (cerca de 4%) do que a fase tetragonal, o que resulta na formação de fissuras, conforme referido [7]. Um exemplo deste problema, para o caso da produção de implantes de zircónia sem estabilizadores, seria a sua produção. Com efeito, no fabrico desses implantes, após a etapa de sinterização e durante a fase de arrefecimento iriam ocorrer a formação de fissuras, o que implicaria o descartar dos implantes. A zircónia não estabilizada apresenta o problema acrescido de, quando em contacto com soluções aquosas, sofrer envelhecimento, o que promove a transformação da fase tetragonal para a fase monoclínica, e induz o aparecimento de fissuras [5].

Trabalhos de investigação reportam que, para além da estabilização com os materiais cerâmicos já mencionados, também é possível estabilizar a fase tetragonal da zircónia à temperatura ambiente pela diminuição do tamanho de grão para um tamanho médio crítico menor que 3  $\mu m$ . Este efeito de estabilização pela diminuição de tamanho de grão é conseguido devido à diferença de energia de superfície alcançada [7].

Devido ao desempenho dos implantes de zircónia, e tendo em vista melhorar os implantes metálicos, foram efetuados estudos em que os implantes de titânio são modificados com revestimentos de  $ZrO_2$ . Estes estudos mostraram que, em comparação com o metal não revestido, a presença do revestimento inibia a colonização bacteriana, favorecia o crescimento ósseo e melhorava a estabilidade da interface implante/osso [5], [8], [10]. Na tabela 1 estão sumariados alguns estudos efetuados a revestimentos de zircónia depositados com recurso a diferentes técnicas de deposição. Em todos esses estudos a aplicação de revestimentos conduziu a melhorias na biocompatibilidade e osteointegração dos implantes em relação aos materiais base.

**Tabela 1.** Sumário de estudos efetuados a revestimentos de zircónia depositados por diferentes técnicas.

Técnica de revestimento	Estudo	Substratos	Resultados	Ref.
Suspensão coloidal	Avaliação da osteointegração em tíbias de coelhos;	Implantes de titânio puro	Os implantes revestidos apresentaram osteointegração superior em relação aos não revestidos (controlo);	[11]
Deposição eletroforética (EPD) <sup>1</sup>	Avaliação do binário de remoção e da osteointegração de implantes aplicados em tíbias de coelhos;	Implantes de Ti-6AL-7Nb	Foi registado um aumento da osteointegração e do binário de remoção dos implantes revestidos em relação aos não revestidos;	[12]
Deposição física de vapor por feixe de eletrões (EBPVD) <sup>2</sup>	Molhabilidade da superfície, adesão bacteriana e resistência à corrosão;	Folhas de aço inoxidável 316L	Os revestimentos de ZrO <sub>2</sub> apresentaram: natureza hidrofílica; resistência à corrosão; proteção contra a adesão de alguns tipos de bactérias; e os testes de biocompatibilidade revelaram elevado grau de viabilidade e proliferação celular;	[13]
Plasma <i>spray</i>	Investigação da Osteointegração em implantes de titânio revestidos por zircónia nanoestruturada;	Implantes de titânio puro	Verificaram-se melhorias quanto à rugosidade e molhabilidade dos implantes revestidos em relação aos restantes. Bem como um desenvolvimento ósseo inicial mais rápido (2 a 4 semanas);	[14]
Pulverização catódica	Avaliação da adesão bacteriana (revestimentos de ZrO <sub>2</sub> , e ZrO <sub>2</sub> dopado com cobre ou prata); Análise da molhabilidade dos filmes produzidos;	Implantes de titânio puro	Foram registados ângulos de contacto superiores nas superfícies dos revestimentos dopados e também uma menor adesão bacteriana comparativamente aos revestimentos não dopados (ZrO <sub>2</sub> ) e implantes de titânio não revestidos;	[15]

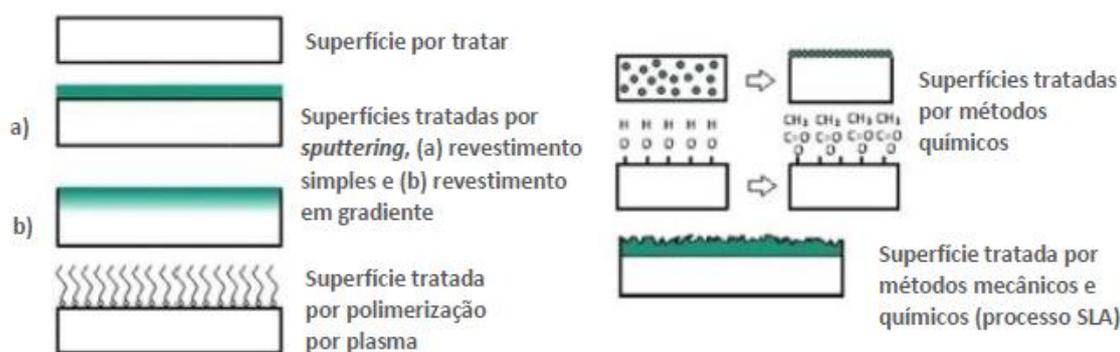
## 1.2. Modificação de Superfície

As modificações da superfície de um material podem ser feitas e classificadas de muitas formas. A título de exemplo, podem ser referidas as modificações mecânicas, as

<sup>1</sup> Do Inglês Electrophoretic Deposition;

<sup>2</sup> Do Inglês Electron Beam Physical Vapour Deposition;

químicas, as que combinam mecânicas e químicas, e modificações em vácuo, das quais se destaca as efetuadas por pulverização catódica (*Sputtering*) (figura 2) [2], [3], [5]. O principal objetivo da modificação de uma superfície, no enquadramento em biomateriais, é sempre o de tentar melhorar o comportamento biológico do implante, sem alterar as propriedades do material base. De um modo geral, as técnicas referidas são utilizadas na modificação da superfície de implantes de zircónia, titânio e outros tipos de materiais.



**Figura 2.** Esquemas de diferentes tipos de modificação de superfícies. Adaptada de [16].

### 1.2.1. Tratamentos Mecânicos

Os tratamentos mecânicos destinam-se, essencialmente, a moldar ou a remover material da superfície dos implantes pela ação de forças de corte, de abrasão ou pela deformação/remoção parcial da superfície, através de bombardeamento por partículas. As técnicas mais conhecidas são a maquinação, a moagem, o polimento e o bombardeamento por partículas ou jatos de areia (*Sandblasting*) [3], [5].

O bombardeamento por partículas é geralmente efetuado a partir do uso de pequenas esferas cerâmicas,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$  ou  $\text{ZrO}_2$ , ou outros materiais duros, com diâmetros compreendidos entre os 10-540  $\mu\text{m}$  [2]. O principal objetivo deste tipo de tratamentos é aumentar a rugosidade das superfícies de forma a melhor a osteointegração. O valor do parâmetro da rugosidade depende de vários fatores, tais como a velocidade e dimensão das partículas, tipo de material utilizado e o ângulo a que atingem a superfície [2], [5].

### 1.2.2. Tratamentos Químicos

Estes tratamentos envolvem uma grande variedade de métodos, tais como: a limpeza pelo uso de solventes, ataque químico (*Wet Chemical Etching*) e a passivação [2], [3], [5]. A limpeza com o uso de solventes tem como principal objetivo a limpeza de óleos e gorduras presentes nas superfícies de implantes, após os processos de produção [3]. Esta é efetuada recorrendo ao uso de solventes químicos orgânicos tais como álcoois, cetonas, hidrocarbonetos alifáticos, detergentes tensoativos e soluções alcalinas de limpeza [3]. Alguns processos de limpeza mais efetiva e eficiente podem ser efetuados a temperaturas elevadas com ou sem uso de ultrassons [3].

Quanto ao ataque químico, este permite a dissolução da camada de óxido naturalmente presente na superfície de implantes metálicos. Este método também é utilizado para promover a micro rugosidade da superfície, bem como para a uniformizar, e dar um acabamento mais estético aos implantes. Para este tratamento podem ser usados ácidos e soluções alcalinas tais como: mistura aquosa de ácido nítrico (10-30% volume), ácido fluorídrico (com 69% de massa e 1-3 % de volume), mistura dos ácidos fluorídrico (18% massa) e nítrico (48% massa), banhos de hidróxido de sódio (com 3-4M a 600 °C durante 24h), e ainda outros ácidos tais como o ácido hidrosulfúrico, ácido nítrico e ácido sulfúrico [3], [5]. A extensão do ataque químico depende do tipo e da concentração dos ácidos usados, da temperatura e do tempo de tratamento [3], [17].

O tratamento por passivação é utilizado para obter uma camada fina de óxido, de forma a melhorar a resistência à corrosão de implantes metálicos. Normalmente é efetuado mergulhando os implantes numa solução de ácido nítrico (20-40% vol.) durante 30 minutos. Após o tratamento, a superfície dos implantes é neutralizada através de enxaguamento e posterior secagem [3].

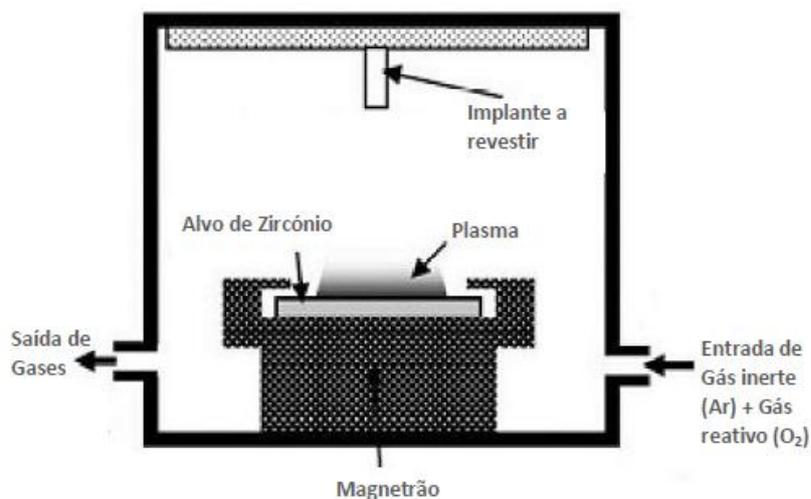
### 1.2.3. Combinação entre os tratamentos Mecânico e Químico

Outro método de tratamento de superfícies consiste na combinação entre o bombardeamento de partículas e o ataque ácido, também conhecido por SLA (*Sandblasting And Large Grit Acid Etching*), patenteado pela Straumann®. Neste processo a superfície dos implantes é bombardeada por partículas de  $Al_2O_3$ , com diâmetros entre os 200-540  $\mu m$  e, logo de seguida, é atacada por uma mistura de dois ácidos (HCl e  $H_2SO_4$ ), provocando um

efeito duplo entre macro-rugosidade (produzida pelo bombardeamento de partículas) e micro-rugosidade (produzida pelo ataque ácido) [2], [4]. O tratamento SLA é também descrito na bibliografia como um processo de referência que serve como termo de comparação entre outros processos de tratamento de superfícies [2].

#### **1.2.4. Pulverização Catódica**

A aplicação de revestimentos de zircónia ( $ZrO_2$ ) em implantes é uma das estratégias mais usadas para melhorar a sua biocompatibilidade e capacidade de osteointegração [2], [5]. A técnica de pulverização catódica é uma técnica bastante apelativa para deposição de filmes finos usados em implantes dentários, pois permite ajustar a rugosidade/topografia da superfície com a nanocristalinidade garantindo uma boa uniformidade aos revestimentos depositados [18]. Neste método de deposição de filmes finos, é formado plasma a partir da ionização de um gás nobre (normalmente argon), e os iões de argon ( $Ar^+$ ) depois de formados são acelerados contra um alvo metálico que contém o material que irá fazer parte do revestimento. Ao chocarem contra o material do alvo, provocam a libertação (ou pulverização) de átomos do mesmo. O material ejetado do alvo condensa na superfície do material a revestir formando um filme fino. Em modo reativo este processo de deposição é similar, no entanto, é adicionado um gás reativo (oxigénio, azoto, metano, etc.), o qual vai reagir com o material pulverizado, pelo que no final o revestimento é constituído pelo material do alvo e do gás reativo utilizado. Na figura 3 está representada uma configuração típica para o processo pulverização catódica em modo reativo.



**Figura 3.** Esquema do processo de pulverização catódica em modo reativo. Adaptada de [19].

Os estudos reportados na bibliografia referem que a aplicação de revestimentos por pulverização catódica aumenta a energia de superfície dos implantes tratados, melhorando a sua molhabilidade comparativamente com outros implantes do mesmo material limpos pelo uso de solventes [3]. Outros estudos referem que pacientes que usam implantes tratados por técnicas de tratamento de superfícies, como por exemplo o processo SLA, apresentam um período de recuperação que varia de 4-8 semanas [20]. Em contraste, pela aplicação de revestimentos por *sputtering* a implantes dentários é possível diminuir este tempo de recuperação para períodos mais curtos, proporcionando uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Estudos efetuados em animais reportam também que implantes revestidos por *sputtering* apresentam uma percentagem de BIC (*Bone Implant Contact*) mais elevada que implantes tratados por outras técnicas [21].

Deve também ser referido que após a deposição de um revestimento, utilizando a técnica de pulverização catódica, o conjunto substrato/filme fino se encontra esterilizado. Deste modo, e desde que em condições assépticas, o implante poderia ser imediatamente embalado para comercialização. No entanto, o procedimento usual, nos implantes comercialmente disponíveis, é o de utilizar outras técnicas de esterilização, conforme o reportado no subcapítulo seguinte.

### 1.3. Métodos de esterilização a implantes dentários

Os implantes têm contacto direto com o osso, tecidos adjacentes e fluídos corporais, por isso é importante que sejam devidamente esterilizados. A esterilização é considerada um acabamento final depois dos processos de fabrico, pois pode modificar a superfície de implantes e conduzir a mudanças físico-químicas que afetam as suas propriedades [22]. Para além disso, a esterilização é um processo importante pois permite que os implantes fiquem livres de micro-organismos que podem levar à falha/rejeição do implante e ainda a infeções e outras complicações em pacientes [22], [23].

Os métodos de esterilização podem ser divididos em três categorias: esterilização por calor, esterilização química, e esterilização de radiação. Os métodos por calor incluem a esterilização por autoclave e calor seco. Os métodos químicos incluem a esterilização por óxido de etileno, ozono, formaldeídos e fenóis. No entanto, estes tratamentos químicos não são recomendados em implantes dentários pela Associação Dentária Americana (*American Dental Association*), uma vez que a monitorização das soluções utilizadas é difícil e o manuseamento dos implantes depois de esterilizados é complexo [22]. Os métodos por radiação incluem a esterilização por radiação UV e por radiação gama, entre outros tipos de radiação.

#### 1.3.1. Esterilização por Autoclave

Este é um dos métodos de esterilização mais utilizado em implantes e dispositivos médicos devido ao seu baixo custo e elevada eficiência (segundo a norma ISO 11134) [23]. A autoclave é um contentor metálico que consegue suportar altas temperaturas e pressões. O processo de esterilização por autoclave consiste na exposição do material a esterilizar a vapor saturado e a temperaturas que variam de 121 °C a 132 °C numa câmara de pressão [23]. Normalmente o processo demora entre 15-30 minutos, podendo o tempo e a temperatura de esterilização variar dependendo dos estabilizadores de vapor utilizados e do *design* do equipamento [23]. Estudos reportam que este método de esterilização pode causar deterioração e corrosão de alguns materiais [22].

### 1.3.2. Esterilização por Calor Seco

Este tipo de esterilização é efetuado expondo o material a esterilizar a altas temperaturas. De forma geral, são utilizadas temperaturas de 170°C e tempos de 60 minutos ou 160°C por 120 minutos [23]. Bobines similares às de fornos convencionais são utilizadas para aquecer o ar no interior da câmara de esterilização [23]. Estas bobines fazem com que o ar se movimente por convecção promovendo trocas de calor entre o ar e os materiais a esterilizar. Algumas câmaras de esterilização têm sistemas de circulação de ar, o que ajuda a melhorar o processo pela diminuição do tempo de esterilização necessário [23]. Estudos reportam que estes métodos de esterilização podem afetar a topografia de superfície dos implantes de titânio [23]. Quando algum material não pode ser esterilizado por autoclavagem devido a risco de oxidação ou corrosão, a primeira opção é a esterilização por calor seco [22].

### 1.3.3. Esterilização por Radiação

A esterilização por radiação consiste na exposição de um implante a radiação ionizante ou de alta energia, geralmente esta exposição é efetuada com recurso a raios gama, ultravioleta (UV) (que pode ser não ionizante ou radiação ultravioleta universal homogénea -UHV), raios X, e irradiação por feixe de eletrões, entre outros tipos de radiação [23].

A esterilização por radiação UV (não ionizante) é uma forma de esterilização muito útil na eliminação de vírus e esporos. Neste método de esterilização, podem ser usados vários comprimentos de onda, tais como: 100-200 nm (UV a vácuo), 200-280 (UVC), 280-315 nm (UVB) e 315-400 nm (UVA), sendo o comprimento de onda da radiação do tipo UVC o mais utilizado devido à sua elevada capacidade antimicrobiana [22]. Os tempos de tratamento variam de 30 minutos a 1 hora, para cada lado do material [22], [23]. A homogeneidade da esterilização é determinada pela distância entre a fonte UV e o material a esterilizar [22], [23].

Quanto ao método de esterilização por radiação gama, pode ser usada uma fonte de cobalto ( $\text{Co}^{60}$ ) ou de céscio ( $\text{Cs}^{127}$ ), sendo as fontes mais utilizadas as de cobalto [23]. A radiação gama é letal para todos os micro-organismos e tem a vantagem de esterilizar sem precisar de temperaturas ou pressões elevadas. Acresce que o seu poder de penetração, em

profundidade, nos materiais é superior ao da radiação UV, o que permite a esterilização de materiais mais densos [23].

No caso de cerâmicos, em particular da zircónia, foi observado que este material foi esterilizado com uma dose de 25 kGy de radiação gama, à temperatura ambiente, apresentou descoloração passando de cor branca para cor castanha, apesar da observação por SEM (*Scanning Electron Microscopy*) não ter evidenciado alterações da morfologia [22]. Para além da alteração da cor, o mesmo estudo registou um aumento de hidrofiliidade e, consequentemente da energia de superfície.

No entanto, estudos efetuados a filmes finos de zircónia, com espessuras próximas a 80 nm, irradiados por radiação gama, com doses de 0,430 Gy, 0,672 Gy, 1,195 Gy e 2,690 Gy, mostraram que a irradiação por este método afeta a morfologia do material, tendo a observação por SEM demonstrado que existe um aumento do tamanho do grão à medida que os revestimentos são irradiados com doses de radiação mais elevadas [24]. Esses testes foram efetuados utilizando uma fonte de cobalto ( $\text{Co}^{60}$ ) a uma distância de 23 cm do material a esterilizar, e as doses de radiação gama foram mínimas por razões de segurança.

A radiação  $\text{Cs}^{127}$  foi também utilizada na esterilização de filmes finos de zircónia, depositados sobre substratos de vidro, com diferentes espessuras: 330, 450 e 550 nm. As caracterizações por XRD (*X-Ray Diffraction*) efetuadas, após exposição a 2,67 Gy, revelaram diminuição do grau de cristalinidade [25].

## 1.4. Revestimentos de Zr-O

Hoje em dia os revestimentos de zircónia produzidos por pulverização catódica são uma solução recorrente em aplicações dentárias, existindo muitos estudos que reportam uma excelente biocompatibilidade entre o implante e tecidos subjacentes [2], [8]. No que concerne a revestimentos de Zr-O, embora estes já sejam produzidos com relações O/Zr distintas da estequiometria da zircónia ( $\text{O/Zr} = 2$ ) [26], [27], na revisão bibliográfica efetuada não foi possível encontrar referências a estudos que utilizassem esses revestimentos em implantes dentários.

Com efeito, as referências bibliográficas reportam a produção de revestimentos de Zr-O, que não zircónia, para avaliar a sua qualidade e funcionalidade, mas com potenciais

aplicações na área da eletrônica e da mecânica. Várias caracterizações foram efetuadas de forma a compreender como a estequiometria dos vários revestimentos de Zr-O variava com a adição de diferentes pressões parciais de oxigênio.

O trabalho de Apreutesei e colaboradores [28], com o intuito de avaliar as propriedades decorativas e mecânicas deste tipo de revestimento, refere a utilização da pulverização catódica reativa em modo dc magnetron, utilizando o oxigênio com fluxos entre 1 e 15 sccm. Os investigadores efetuaram a deposição de 10 filmes finos distintos, tendo observado que para fluxos entre 1 e 8 sccm os filmes eram ricos em Zr, conseguindo uma relação equiatômica de O/Zr, para 8 sccm de gás reativo. A cor dominante destes filmes era designada por metálica. Para teores superiores de oxigênio, os filmes produzidos correspondiam à estequiometria de  $ZrO_2$ , cujas cores eram de interferência. A dureza dos filmes aumentou sempre com o aumento de oxigênio, atingindo o valor máximo de 15 GPa. Deve ainda ser realçado que os filmes depositados para os fluxos mais elevados de oxigênio (entre 8 e 15 sccm) apresentavam todos tensões à compressão.

Na bibliografia consultada, apenas foi encontrado um artigo que reporta a utilização de filmes de  $ZrO_x$  (com  $x \neq 2$ ) numa área relacionada com a medicina. O trabalho é o de Hsu e colaboradores [29] que revestiram elétrodos cirúrgicos de aço inoxidável com filmes finos de óxidos, entre os quais  $ZrO_x$ . O objetivo deste estudo foi o de avaliar se os revestimentos conferiam propriedades antiaderentes aos elétrodos que, durante a cirurgia, tendem a ficar cobertos com tecido humano. Os filmes foram produzidos por pulverização catódica magnetron não balanceada. No que respeita à composição química dos filmes, estes eram constituídos por  $ZrO_x-ZrO_2$  (com  $x < 2$ ), não tendo sido encontrada a ligação Zr metálica. A dureza dos filmes era de 20 GPa e o ângulo estático com a água de  $80^\circ$ . A energia de superfície dos filmes de Zr-O era de cerca de  $43 \text{ mJ/m}^2$ , com uma componente polar de apenas  $8 \text{ mN/m}$ . Os revestimentos  $ZrO_x-ZrO_2$  reduziram, por um fator de 2, a quantidade de tecido aderido ao elétrodo, quando comparado com o elétrodo não revestido. No entanto, este não foi o melhor desempenho, dado que o revestimento de  $CrO_x$  apresentou 5 vezes menos tecido aderido do que o elétrodo de aço inoxidável.

Para além de revestimentos, foi também encontrada na literatura consultada referência a materiais maciços com estequiometria distinta da zircónia. No entanto, os estudos efetuados a esses materiais tinham como objetivo avaliar o seu desempenho para aplicações fotovoltaicas [30].

A fraca, ou mesmo nula, referência na bibliografia ao desempenho de revestimentos de Zr-O quando em contacto com células eucarióticas, reforça o objetivo deste trabalho para contribuir para o avanço do conhecimento nesta área específica da interface revestimento/material biológico.



## 2. MATERIAIS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

### 2.1. Técnica de deposição e equipamento

Os revestimentos em estudo foram depositados por pulverização catódica utilizando um equipamento da marca *Edwards Coating System E306A* (figura 4), o qual é constituído por uma câmara de deposição de geometria cilíndrica e sistema de vácuo. Este é assegurado por uma bomba rotatória e uma turbomolecular. O equipamento possui dois cátodos e um porta substratos, todos assistidos por fonte de potência.



**Figura 4.** Equipamento de deposição.

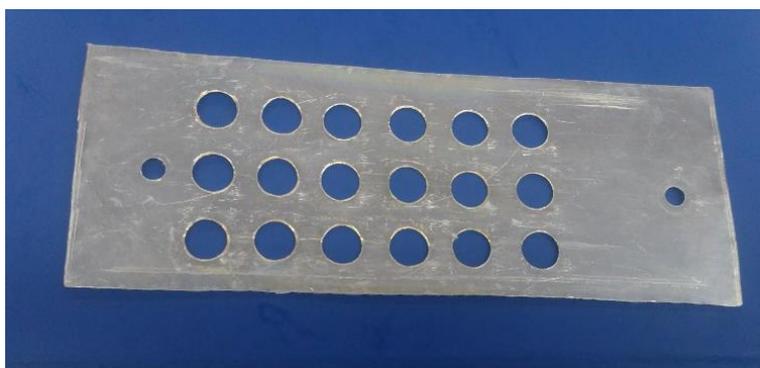
#### 2.1.1. Alvos e substratos

Neste estudo foram utilizados dois alvos, ambos com 100 mm de diâmetro e 3 mm de espessura: (i) alvo de zircónia estabilizada com 3% mol de ítria (99,5% pureza, Testbourne, UK) para revestimentos depositados em modo não reativo, usando apenas o argon como gás de trabalho (99,9999% pureza, Air Liquide, Portugal), e (ii) alvo de zircónio

puro (99,5% pureza, Testbourne, UK) para os revestimentos depositados em modo reativo com oxigénio (99,9999% pureza, Air Liquide, Portugal). Os substratos utilizados foram o silício (10×10 mm, 99,8% pureza, ProLog Semicor, Ucrânia), lâminas de vidro (25×75 mm, Frilabo<sup>®</sup>, Portugal) e lamelas de vidro (Ø 10 mm, 1 mm espessura, Frilabo<sup>®</sup>, Portugal). Antes das respetivas deposições todos os substratos foram sujeitos a limpeza em ultrassons com imersão em acetona, álcool e água MilliQ<sup>®</sup>, sequencialmente, durante 10 minutos em cada líquido. Em seguida foram secos em corrente de ar quente.

### 2.1.2. Procedimento de deposição

As lamelas de vidro e o silício foram colocados sobre um porta substratos de cobre e cobertos com uma máscara de alumínio (figura 5), previamente revestida com ZrO<sub>2</sub>. O diâmetro dos orifícios na máscara era ligeiramente inferior aos das lamelas de vidro. Deste modo conseguiu-se a sua fixação física sem recorrer ao uso de cola que, dada a reduzida espessura destes substratos, iria provocar a fratura dos mesmos aquando da sua remoção do porta substratos. Quando os substratos utilizados eram lâminas de vidro, foram colados diretamente sobre o porta substratos de cobre. Antes do início de cada deposição foi efetuada a limpeza por plasma do alvo e substratos, de forma a remover óxidos ou possíveis impurezas das suas superfícies, durante 5 minutos, a uma pressão de 0,7 Pa, com uma densidade de potência de  $1,9 \times 10^{-2} \text{ W.mm}^{-2}$  e com o anteparo (*shutter*) entre o alvo e os substratos.



**Figura 5.** Máscara utilizada para deposição das lamelas e silício.

Numa primeira etapa foram efetuadas deposições preliminares, sobre substratos de silício, para otimizar a pressão parcial de oxigénio a utilizar nas deposições reativas de

modo a obter uma relação O/Zr inferior e superior à estequiometria da zircónia (tabela 12 do Apêndice A).

Após o estudo preliminar foram selecionadas as pressões parciais de 2,5% e 3% de oxigénio para efetuar as deposições definitivas em modo reativo. Os parâmetros de deposição e as designações dos filmes finos resultantes das deposições em modo reativo e não reativo estão sumariados na tabela 2.

**Tabela 2.** Designação e parâmetros de deposição dos filmes finos nas deposições definitivas.

Designação	Pp O <sub>2</sub> (%)	Pp O <sub>2</sub> (Pa)	Pressão total (Pa)	Tempo (s)	Ddep (W.mm <sup>-2</sup> )
R1	2,5	1,8x10 <sup>-2</sup>	0,7	480	3,2x10 <sup>-2</sup>
R2	3,0	2,1 x10 <sup>-2</sup>	0,7	1320	3,2x10 <sup>-2</sup>
R3	0	0	0,7	900	3,2x10 <sup>-2</sup>

Pp = pressão parcial; Ddep = densidade de potência

## 2.2. Técnicas de Caracterização

### 2.2.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento

A morfologia e a composição química semi-quantitativa dos revestimentos foi avaliada por SEM-EDS (*Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive Spectroscopy*). A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) é uma técnica utilizada de forma a obter imagens de alta resolução. É baseada na emissão de um feixe de eletrões que é gerado a partir de um filamento de tungsténio ou a partir de um cátodo por emissão de campo. Os eletrões gerados são focados num pequeno feixe através de um conjunto de lentes magnéticas e ao atingirem uma superfície interagem com a mesma de diferentes formas. Dessas interações resultam eletrões secundários, eletrões retrodifundidos, eletrões Auger, raios X e outros fotões. Os eletrões secundários são responsáveis pelo contraste em função do relevo enquanto os eletrões retrodifundidos são responsáveis pelo contraste em função do número atómico [31].

A técnica de EDS consiste na análise da energia dos raios X que resultam do bombardeamento por eletrões a um material em estudo no qual se pretende avaliar a sua composição elementar. Quando um material é bombardeado por um feixe de eletrões do

SEM, alguns elétrons dos átomos da superfície da amostra transitam para níveis de energia mais elevados (sendo ejetados), criando lacunas na nuvem eletrônica. Essas lacunas são depois preenchidas por outros elétrons que transitam para níveis de energia mais baixos (ou seja, de uma camada exterior para outra mais interna). São essas transições com energia igual à diferença entre esses dois níveis de transição que resultam na emissão de raios X característicos de cada elemento [32].

De forma a avaliar a composição química semi-quantitativa dos revestimentos produzidos no estudo preliminar foi utilizado um microscópio eletrônico de varrimento da marca *Zeiss, Gemini 2 - Merlin* equipado com um detetor de EDS da *Oxford Instruments*, com um feixe eletrônico com aceleração de 15 kV. Os restantes revestimentos foram analisados num microscópio eletrônico de varrimento de alta resolução de marca *FEI Quanta 400FEG ESEM*, também equipado com um detetor de EDS de marca *EDAX Genesis X4M*.

### 2.2.2. Microscopia de Força Atômica

A topografia/rugosidade dos revestimentos depositados foi avaliada pela técnica de microscopia de força atômica (*AFM-Atomic Force Microscopy*). Esta técnica é baseada na medição de forças entre uma ponta inserida num braço em balanço (cantiléver) e a superfície de um material. Durante um varrimento de superfície o cantiléver tem o comportamento de uma mola (lei de Hook) e sofre deformações que são medidas por um fotodíodo. Tais deformações permitem fazer um mapeamento de superfície quando é realizado um varrimento linha a linha. Os varrimentos podem ser efetuados em diferentes modos (contacto, intermitente e não contacto) e as forças medidas durante cada varrimento dependem das interações interatómicas (atração e/ou repulsão) entre a ponta e a superfície do material em estudo [33].

Para a análise de AFM foi utilizado um equipamento da marca *Veeco di Innova*. Todos os ensaios foram realizados em modo intermitente em áreas de  $5 \times 5 \mu\text{m}$  e  $1 \times 1 \mu\text{m}$ , com uma ponta de silício (*Bruker*) com uma frequência de ressonância de 150 kHz e uma constante de mola  $k$  de  $10 \text{ N.m}^{-1}$ . Para manipulação e tratamento dos dados foi utilizado o programa *Gwyddion*<sup>®</sup>.

### 2.2.3. Difração de raios X

A difração de raios X (*XRD – X-Ray Diffraction*) é uma técnica não destrutiva de análise de materiais que permite obter informação sobre a sua estrutura, tais como as fases cristalinas, parâmetros de rede, e tamanho das cristalites de um material. Os raios X podem ser utilizados para identificar estruturas cristalinas pois o comprimento de onda da radiação é da mesma ordem de grandeza que a distância interplanar entre os átomos da rede cristalina, tal pode ser demonstrado pela lei de Bragg:

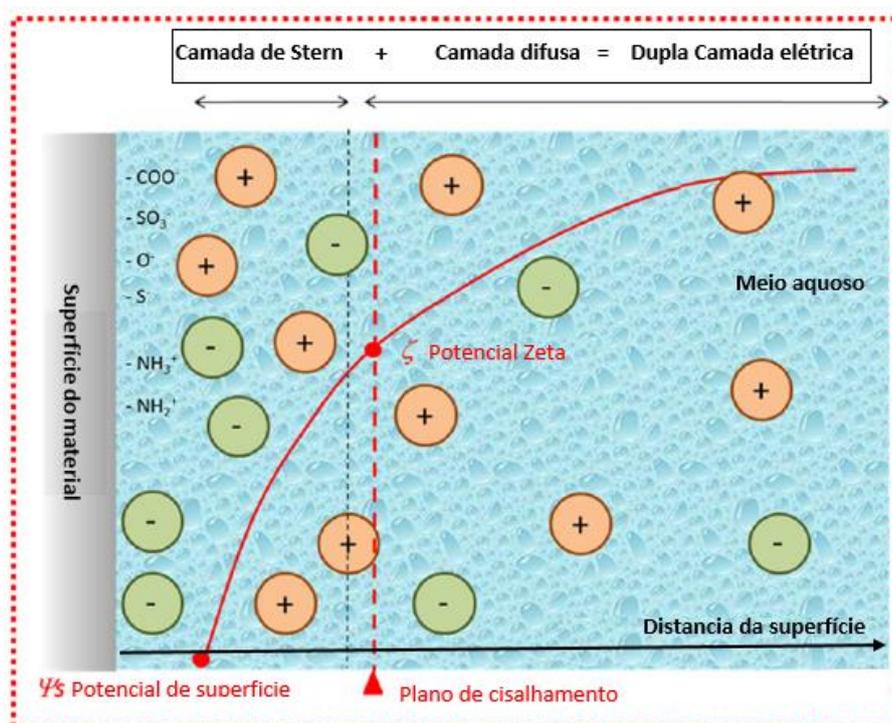
$$n \lambda = 2d_{(hkl)} \sin \theta, \quad (2.1)$$

onde  $n$  representa a ordem de difração (número inteiro 1, 2,3),  $d_{(hkl)}$  a distância interplanar para o conjunto de planos hkl,  $\theta$  o ângulo de Bragg e  $\lambda$  o comprimento de onda da radiação utilizada [34].

O equipamento utilizado foi um difratómetro de marca *X'Pert* da *Panalytical*, com fonte e detetor em configuração convencional  $\theta - 2\theta$ . Na produção de raios X foi utilizado um anti-cátodo de cobre, com a radiação monocromática produzida  $\lambda_{K\alpha 1} = 0,154$  nm, com uma tensão de 45 kV e uma corrente de 40 mA de intensidade. Os dados foram adquiridos num intervalo de  $10^\circ$  a  $100^\circ$  com passos de  $0.1^\circ$  e tempo de aquisição de 3 segundos por passo.

### 2.2.4. Potencial Zeta

O potencial Zeta ( $\zeta$ ) é uma medida indireta da carga de superfície de um material. Este potencial resulta da acumulação de cargas numa superfície que geralmente está em contacto com líquidos ou fluidos corporais. A acumulação de cargas na superfície de um material resulta na formação de duas camadas às quais se dá o nome de dupla camada elétrica (figura 6). O potencial Zeta é medido no plano de cisalhamento da dupla camada elétrica (entre a camada de Stern e a camada difusa) o que faz com que este seja um pouco mais negativo ou um pouco mais positivo que o verdadeiro potencial da superfície [35]. Alguns fatores que afetam o potencial zeta são a concentração de iões e o pH das soluções, sendo que soluções ácidas dão origem a potenciais positivos e soluções básicas a potenciais negativos.



**Figura 6.** Modelo da dupla camada elétrica numa interface sólido-líquido. Adaptada de [35].

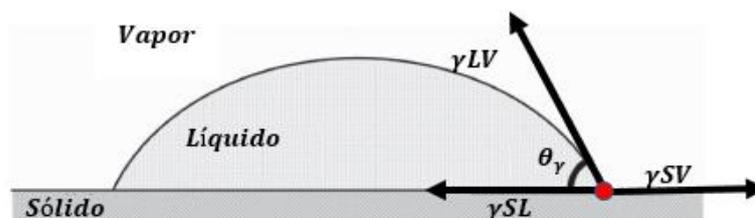
Para medição do potencial zeta foi utilizado um equipamento da marca *Anton Paar surPASS* com uma célula de aperto (*clamping cell*) de poli(metil metacrilato), com uma pressão de 200 mbar, e como eletrólito uma solução 1 mM de KCl, pH = 7,4. Em cada superfície foram efetuadas 8 medições.

### 2.2.5. Ângulo de contacto

O ângulo de contacto estático entre uma gota de água e uma superfície sólida é uma medida da hidrofilicidade/hidrofobicidade da superfície. Geralmente o seu valor é medido na interface entre três fases (líquido, sólido e gás) quando uma gota de um determinado líquido atinge a superfície de um sólido. Dessa forma, a molhabilidade de uma superfície ideal (quimicamente homogênea e suave) pode ser determinada pela equação de Young:

$$\cos \theta_Y = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}}, \quad (2.2)$$

onde  $\theta_y$  representa o ângulo de contacto de um líquido na superfície de um sólido,  $\gamma_{SV}$ ,  $\gamma_{SL}$  e  $\gamma_{LV}$  representam as tensões interfaciais entre sólido-vapor, sólido-líquido e líquido-vapor, respetivamente (figura 7) [36].



**Figura 7.** Representação esquemática da determinação do ângulo de contacto. Adaptada de [36].

Os valores do ângulo de contacto ( $\theta$ ) podem variar entre  $0^\circ$  e  $180^\circ$  sendo que superfícies, quando utilizadas como biomateriais, são consideradas hidrofóbicas para ângulos superiores a  $65^\circ$  e hidrofílicas para ângulos inferiores a  $65^\circ$  [37].

Para medição dos ângulos de contacto estáticos nas superfícies dos diferentes revestimentos foi utilizado um equipamento de marca *DathaPhysics QCA-20* e as medições foram efetuadas com gotas de  $10 \mu\text{L}$  de água destilada e formamida nas respetivas superfícies. Em cada superfície foram ainda efetuadas 7 medições sendo os resultados apresentados na forma de valores médios.

### 2.2.6. Espectroscopia de Foteletrão X

A espectroscopia de foteletrão X (*XPS - X-ray Photoelectron Spectroscopy*) é uma técnica que permite investigar a composição química de superfícies. É baseada no efeito fotoelétrico e consiste na irradiação de uma superfície com raios X com energia tal que provoca a libertação de eletrões. A contagem de eletrões e a medida da sua energia cinética é depois efetuada por detetores próprios dando origem a espetros que permitem identificar o estado de oxidação de cada elemento, por comparação com valores tabelados em bases de dados [38].

Para a análise de XPS foi utilizado um equipamento da marca *Kratos Axis Ultra HSA* equipado com uma fonte de raios X (Al-K) monocromática com comprimento de onda

de 0,83401 nm e com uma energia de 15 kV. Sendo adquiridos dois espectros, um de pesquisa de modo a detetar todos os elementos presentes na superfície do material e outro de alta resolução (*high resolution spectra*) a um dos picos de interesse de modo a identificar (após desconvolução) quais os tipos de ligações em que um elemento específico participa. O tratamento de dados foi efetuado recorrendo ao programa *CasaXPS*.

### 2.3. Testes *In Vitro*

Os testes *in vitro* foram efetuados com células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária. O tecido da polpa dentária foi extraído de dentes definitivos saudáveis, recorrendo a pinças esterilizadas, e dissecado em fragmentos de 1-2 mm recorrendo a um bisturi estéril. Os fragmentos foram então semeados em placas de Petri, com cerca de 2 ml meio de cultura de expansão. Os explantes foram mantidos na estufa, a 37°C, em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi renovado duas vezes por semana e a confluência desejada foi obtida ao fim de 7 a 10 dias. A expansão das culturas celulares foi efetuada até 3 passagens (P3). Em seguida foram colocados 1,5 ml de meio com 10x10<sup>6</sup> células sobre cada uma das superfícies em estudo. Ao fim de 24 horas, o meio foi aspirado e as superfícies lavadas com tampão fosfato pH 7, por 3 vezes. Após remoção do tampão da última lavagem, as superfícies foram fixadas com 1 ml de glutaraldeído (2,5% v/v) e em seguida desidratadas com soluções água: etanol, com percentagens, em volume, crescentes de álcool: 25, 50, 75 e 100%. Após secagem as superfícies foram revestidas, por *sputtering*, com Au/Pd para observação em SEM. Como controlo foram utilizadas superfícies que foram sujeitas exatamente ao mesmo procedimento, exceto que o meio de cultura adicionado não tinha células em suspensão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Estudo preliminar

O objetivo deste trabalho é o de estudar as propriedades de revestimentos Zr-O, com estequiometrias distintas da zircónia. Assim e numa primeira fase foram efetuadas diversas deposições preliminares (tabela 12 do Apêndice A). Estas deposições tinham como fim otimizar as pressões parciais de gás reativo de forma a produzir dois revestimentos diferentes, sub e sobre estequiométricos, em relação à zircónia.

A composição química semi-quantitativa dos revestimentos foi avaliada utilizando a técnica de EDS. As análises foram efetuadas aos filmes depositados sobre silício, utilizando como referência a composição química analisada sobre um implante dentário de zircónia estabilizada com ítria (3% mol). Sobre cada amostra as análises foram efetuadas numa área de 200×200 µm. Os valores médios da composição química, em percentagem atómica (% at.), estão na tabela 3.

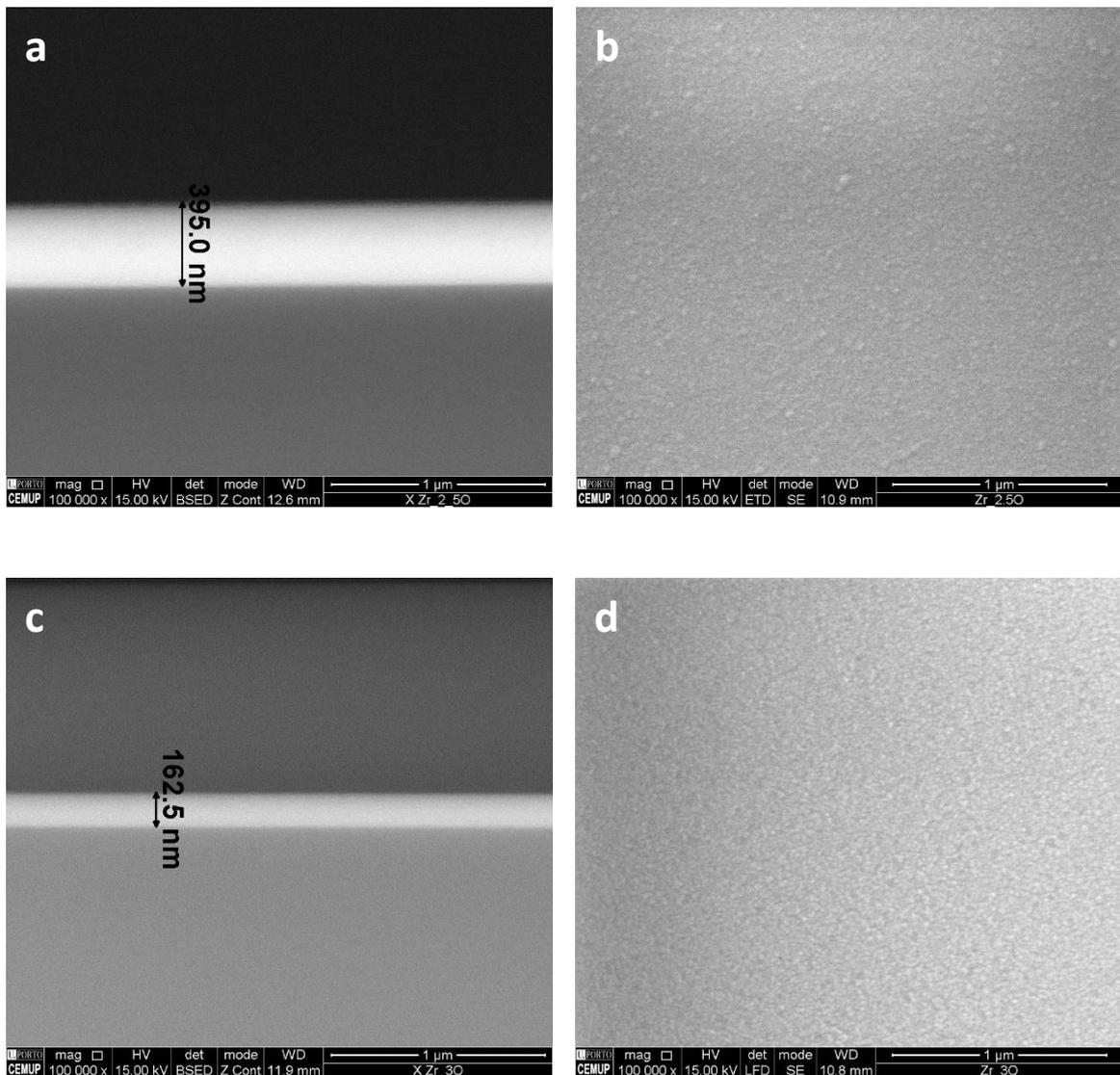
**Tabela 3.** Composição química semi-quantitativa dos revestimentos depositados para estudo preliminar.

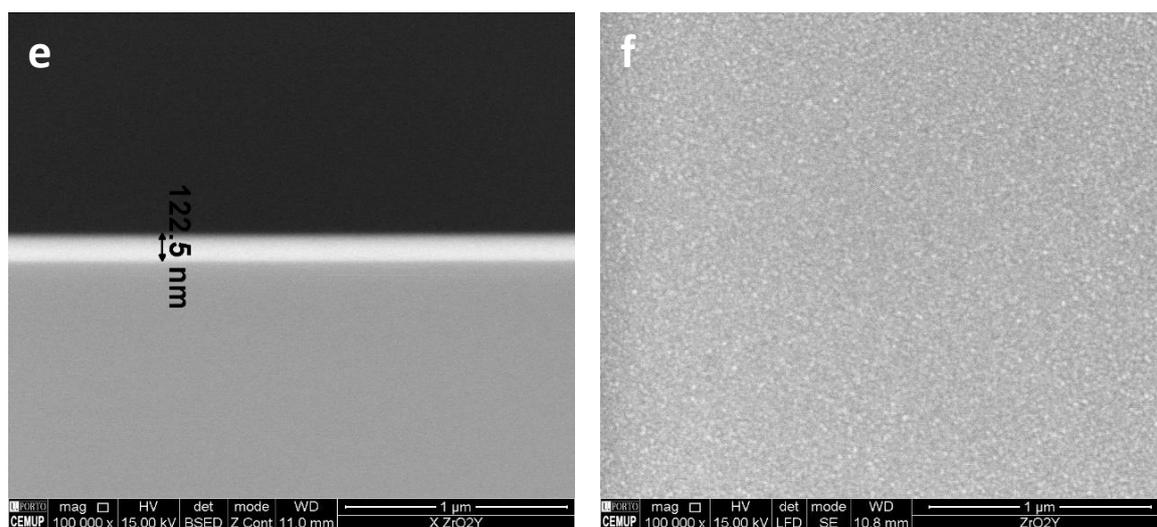
Designação	Composição química (% at.)		Relação (O/Zr)
	O	Zr	
ZrO1,5%	12,8	87,2	0,1
ZrO2,5%	36,7	63,3	0,6
ZrO3%	79,2	20,8	3,8
ZrO5%	79,7	20,3	3,9
Implante	70,8	29,2	2,4

Os resultados desta caracterização preliminar permitiram selecionar as pressões parciais de oxigénio de 2,5% e 3% para as deposições definitivas. Os revestimentos produzidos com 2,5% e 3% de pressão parcial de oxigénio foram designados por R1 e R2, respetivamente. Foram também efetuados revestimentos em modo não reativo, a partir de um alvo de zircónia estabilizada com ítria (3% mol) que foram designados por R3.

### 3.2. Morfologia/Topografia

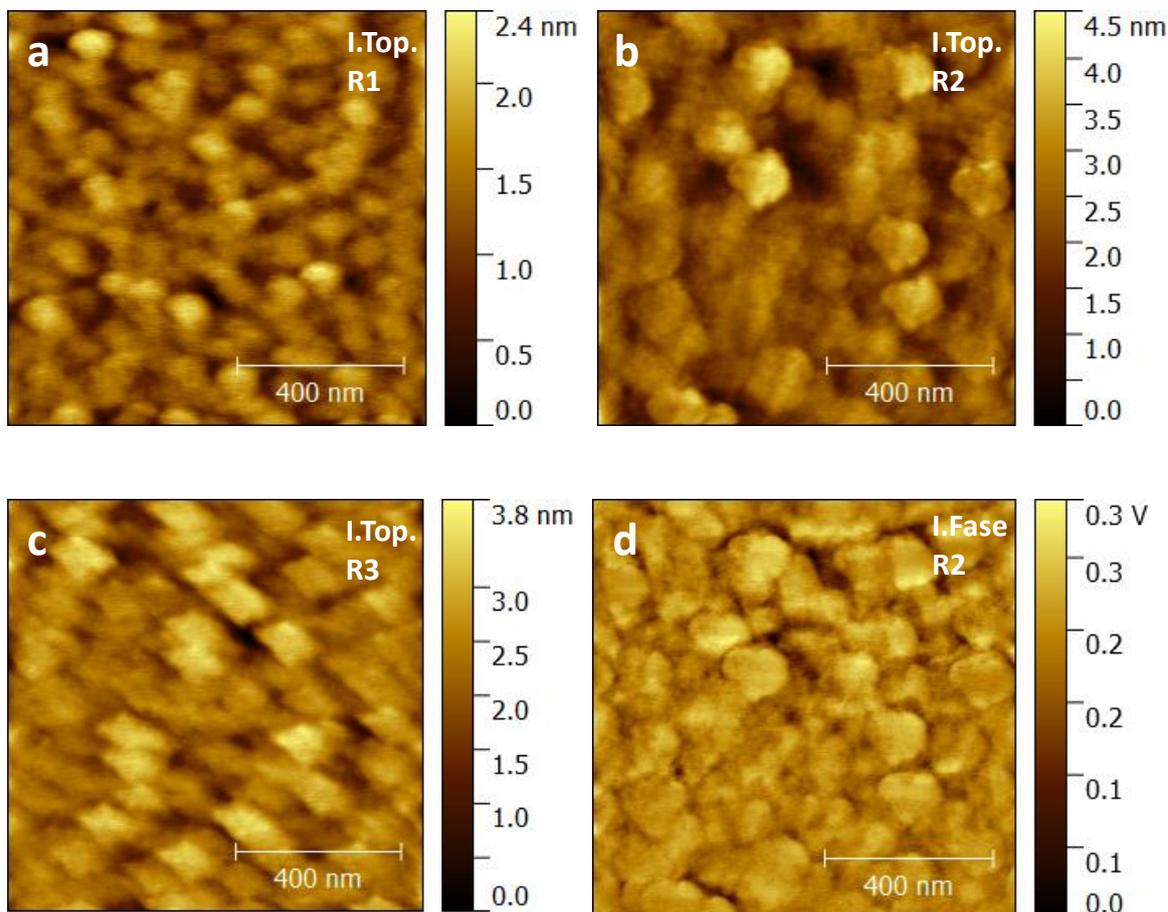
A análise por SEM permitiu avaliar a espessura dos filmes depositados, bem como observar a sua morfologia superficial e da secção transversal. Na figura 8 é possível observar que todos os filmes apresentam uma secção transversal sem morfologia aparente (*featureless*) e que apresentam uma boa adesão ao substrato (vidro).





**Figura 8.** Micrografias de secção transversal e topo dos revestimentos R1 (a, b), R2 (c, d) e R3 (e, f).

Nas micrografias de topo é visível que todas as superfícies têm um aspeto homogéneo e que são constituídas por pequenos aglomerados nanométricos. Estes resultam da coalescência de aglomerados de átomos, por forma a minimizar a energia de superfície. Com efeito, este fenómeno é evidenciado pela caracterização topográfica efetuada por AFM (figura 9). As imagens topográficas realçam a aglomeração dos agregados de átomos que constituem o filme em crescimento, sendo este efeito observado para os três revestimentos analisados. Por outro lado, a imagem de fase (figura 9 d) confirma o que era expectável, isto é, a superfície dos filmes finos é quimicamente homogénea. Quer a deposição tenha sido efetuada em modo reativo ou não reativo, a distribuição dos elementos químicos é superficialmente uniforme.



**Figura 9.** Imagens de topografia e de fase das superfícies dos revestimentos R1 (a), R2 (b, d) e R3 (c) numa área de 1x1  $\mu\text{m}$ .

A análise por AFM também permitiu quantificar os parâmetros de rugosidade, que estão sumariados na tabela 4. Tal como seria de esperar, devido à baixa rugosidade do substrato, todos os revestimentos apresentam superfícies com rugosidade à escala nanométrica, tanto no que concerne a rugosidade média aritmética ( $S_a$ ), bem como a distância máxima pico-vale ( $S_z$ ).

Outra forma de perceber melhor o tipo de topografia de uma superfície é através da análise dos parâmetros adimensionais *Skewness* e *Kurtosis*. O parâmetro *Skewness* mede a simetria entre picos e vales em relação a um plano médio. Quando este parâmetro tem valores positivos indica uma predominância de picos e quando apresenta valores negativos indica uma predominância de vales [39]. Quando é igual a zero indica simetria entre picos e vales. Assim, como os revestimentos R1 e R2 apresentam valores positivos, mas muito próximos de zero, este parâmetro indica que estas superfícies apresentam praticamente o

mesmo número de vales e de picos. O revestimento R3 apresenta valores negativos o que indica uma ligeira predominância de vales em relação aos picos.

O parâmetro *kurtosis* fornece informação acerca da suavidade das superfícies, indicando se têm um caráter arredondado (valores  $< 3$ ), pontiagudo (valores  $> 3$ ), ou misto (valores  $= 3$ ) [39]. Com efeito, como todas as superfícies analisadas têm valores de *kurtosis* inferiores a 3 é possível afirmar que as mesmas têm um perfil arredondado, o que confirma as imagens topográficas de AFM.

**Tabela 4.** Parâmetros de rugosidade da superfície dos revestimentos R1, R2 e R3.

Revestimento	Sa (nm)	Sz (nm)	Skewness	Kurtosis
R1	1,28	2,42	0,02	0,26
R2	2,34	4,51	0,05	0,66
R3	2,31	3,80	-0,13	0,46

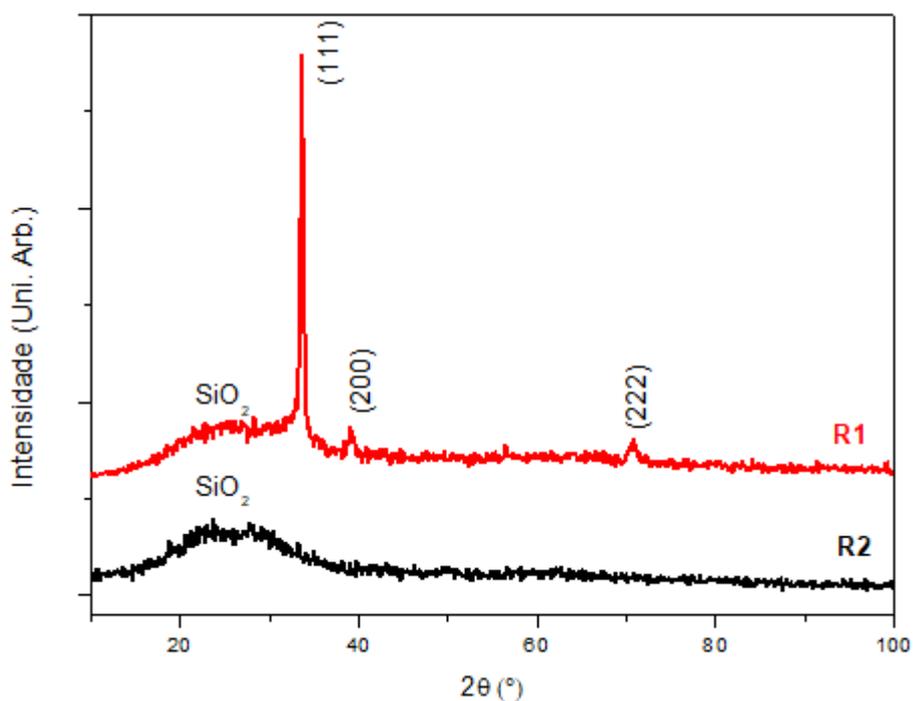
Sz = Diferença entre os picos mais altos e vales mais profundos

### 3.3. Estrutura

A análise da estrutura dos revestimentos depositados sobre os substratos de vidro, foi efetuada pela técnica de difração de raios X (figura 10). O revestimento R2 não apresenta ordem estrutural, pois não foram detetados quaisquer picos de difração, sendo apenas visível a bossa correspondente ao substrato de vidro ( $\text{SiO}_2$ ). Quanto ao revestimento R1, os planos assinalados no difratograma correspondem à fase cubica do óxido de zircónio, de fórmula molecular  $\text{ZrO}$ , (ficha padrão ICDD nº 20-0684), este revestimento apresenta ainda uma orientação preferencial segundo o plano (111) como se observa na figura pela relação de intensidades dos picos de difração. É importante referir que estes dados são também corroborados pela imagem apresentada na figura 15 do Apêndice A, na qual é visível que o revestimento R1 apresenta uma cor metálica enquanto o revestimento R2 é transparente (propriedade ótica típica de materiais amorfos).

O revestimento R3 apresentou um difratograma apenas com um pico de difração pelo que não foi possível efetuar a sua indexação, apesar de poder corresponder ao plano (202) da Zircónia ( $\text{ZrO}_2$ ) tetragonal (ficha padrão ICDD nº 17-0923) como seria expectável,

dado a deposição ter sido efetuada a partir de um alvo estabilizado com ítria. Óticamente, estes revestimentos também são transparentes.



**Figura 10.** Difratogramas de raios X dos revestimentos R1 e R2 depositados sobre vidro.

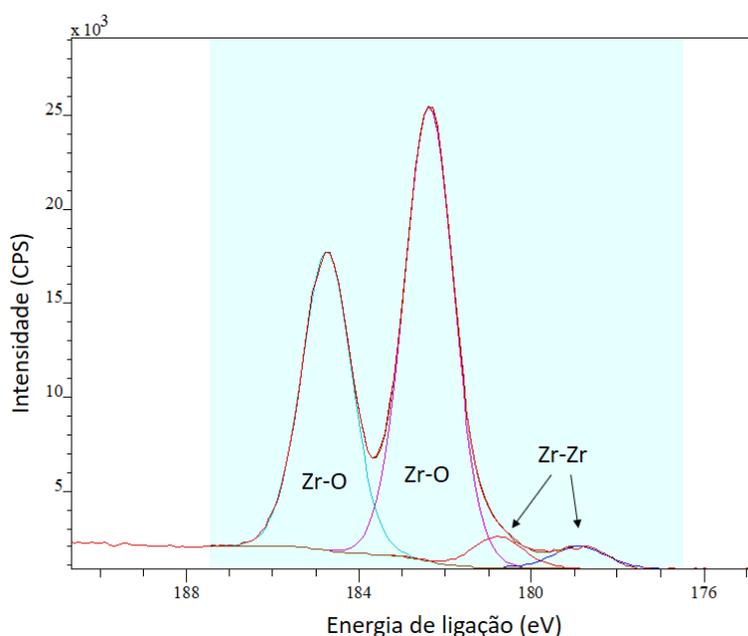
### 3.4. Química superficial

A composição química da superfície, bem como os tipos de ligações químicas presentes foram avaliadas por XPS. A tabela 5 sumaria a composição química dos 3 revestimentos e a figura 11 apresenta a desconvolução do espectro Zr3d do revestimento R1. As desconvolúções dos espectros de cada elemento químico de todos os revestimentos encontram-se nas figuras 16, 17 e 18 do Apêndice B.

**Tabela 5.** Composição química elementar determinada por XPS.

Revestimento	Composição química (% at.)		
	O	Y	Zr
R1	55,1	--	44,9
R2	70,9	--	29,1
R3	69,0	7,0	24,0

A composição química superficial apresenta, em termos globais, algumas diferenças com a composição determinada em volume, efetuada por EDS. De entre elas, destacam-se o revestimento R1 que apresenta uma relação O/Zr um pouco superior a 1. E também o revestimento R2 que apresenta uma relação com um valor ligeiramente superior a 2 e semelhante à do filme R3, após subtrair a percentagem de oxigénio que se encontra combinada com Y. Aparentemente, o revestimento R2, que foi desenhado para apresentar uma relação O/Zr superior a 2, é semelhante ao revestimento obtido a partir do alvo de  $ZrO_2$ , em modo não reativo. No entanto, deve ser tido em consideração que a determinação por XPS diz respeito à composição de uma camada com, no máximo, 10 nm de espessura enquanto a composição por EDS concerne o volume representado por toda a espessura de cada filme.

**Figura 11.** Espectro de Zr3d do revestimento R1, após desconvolução.

A partir da desconvolução dos espectros de alta resolução foi efetuada a identificação e a análise percentual da contribuição de cada tipo de ligação na superfície dos filmes em análise (tabela 6), após indexação de cada pico por comparação com os dados da literatura [40], [41].

**Tabela 6.** Contribuição de cada tipo de ligação na composição química das superfícies analisadas.

Superfície	Tipo de ligação (%)					
	Zr		O		Y	
	Zr-Zr	Zr-O	O-Zr	O-H	O-Y	Y-O
R1	7	93	54	46	--	--
R2	--	100	68	32	--	--
R3	--	100	65	32	3	100

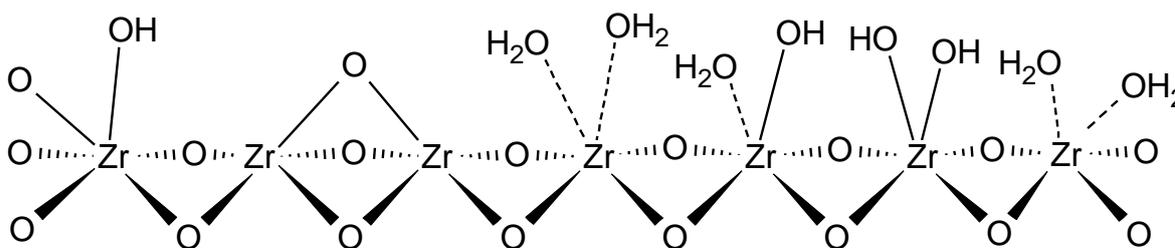
A análise dos resultados demonstra que apenas no revestimento R1 é possível encontrar, na superfície, Zr metálico. No entanto, o tipo de ligação Zr-O é indexado como sendo  $ZrO_2$ , o que não seria expectável dado os resultados da composição química, por EDS, e da caracterização estrutural, onde ambos apontavam para a existência de ZrO. Vários fatores podem explicar esta aparente contradição. Em primeiro lugar, não foi possível obter, na bibliografia consultada, referências credíveis quanto à indexação de óxidos de zircónio com estequiometria distinta da de  $ZrO_2$ . Por outro lado, e convém enfatizar este aspeto, esta caracterização diz respeito apenas à camada mais exterior do filme que, no caso do revestimento R1, corresponderá a cerca de 1/40 da sua espessura total.

As camadas mais exteriores de um revestimento podem apresentar uma química e estrutura diferentes das do “interior” do revestimento. Com efeito, a estrutura cristalina vai apresentar na superfície um tipo de arranjo distinto devido ao facto de ser precisamente o fim do arranjo que se repetia a longa distância. Por outro lado, finda a deposição, as ligações pendentes tendem a reagir com as espécies que se encontram dentro da câmara de deposição. Entre estas, encontra-se atmosfera e vapor de água residuais, dado que os valores de vácuo são da ordem dos  $10^{-4}$  Pa. Para além destes fatores acrescem os dados termodinâmicos respeitantes a compostos de zircónio (tabela 7) em que é visível que a formação de  $ZrO_2$  é, termodinamicamente, mais favorável que a de ZrO e a formação de Zr-OH é ainda mais favorável.

Considerando todos estes fatores, é possível que na superfície o revestimento R1 apresente um arranjo do género do esquematizado na figura 12. Por esta razão, a caracterização por XPS é bastante díspar do revelado por recurso a EDS e XRD.

**Tabela 7.** Constantes termodinâmicas de formação de compostos de Zr [42].

Compostos	Constantes termodinâmicas	
	$\Delta H_f^0$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_f^0$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
ZrO <sub>2</sub> (monocli.)	-1100,6 ± 1,3	-1042,7 ± 1,3
Zr(OH) <sub>2</sub> (aq.)	---	-1008,4 ± 11,0
Zr(OH) <sub>4</sub> (aq.)	---	-1495,6 ± 9,2
ZrO <sub>2</sub> (g)	-290 ± 47	-299 ± 47
ZrO (g)	+56 ± 27	+31 ± 27



**Figura 12.** Possível química de superfície do revestimento R1. Adaptada de [43].

No que concerne aos revestimentos R2 e R3, estes apresentam o zircónio completamente oxidado, em princípio ambos sob a forma de ZrO<sub>2</sub>, de acordo com a bibliografia disponível, pois, conforme referido, não foi possível encontrar referências credíveis sobre a indexação de óxidos sub e sobre estequiométricos.

## 3.5. Molhabilidade

### 3.5.1. Ângulos de contacto

A molhabilidade da superfície de um implante, concebido para contactar tecido duro, é um fator de extrema importância pois influencia a adesão celular e a osteointegração. De forma a prever o comportamento celular numa dada superfície é importante analisar como esta se comporta em contacto com a água. Com esta finalidade, foram medidos os

ângulos de contacto estáticos com água e formamida nas superfícies dos revestimentos R1, R2 e R3.

Os resultados apresentados na tabela 8 permitem constatar que todos os revestimentos são considerados hidrófilos,  $\theta < 65^\circ$ , pois este é o valor máximo considerado para biomateriais dado que, de acordo com Vogler [44] deve ser considerado o papel biofísico da água.

Vários fatores influenciam o ângulo de contacto, de entre os quais se destacam a rugosidade e a química de superfície dos materiais. Neste contexto, como todos os revestimentos apresentam parâmetros de rugosidade ( $S_a$  e  $S_z$ ) com valores muito semelhantes entre si, a principal causa para a diferença dos ângulos de contacto tem que estar relacionada com a química superficial.

**Tabela 8.** Valores médios e desvio padrão dos ângulos de contacto estáticos medidos na superfície dos revestimentos R1, R2, R3.

Superfície	Ângulos de contacto ( $^\circ$ )	
	Água	Formamida
R1	$67 \pm 3$	$44 \pm 2$
R2	$51 \pm 4$	$37 \pm 1$
R3	$24 \pm 3$	$16 \pm 1$

O valor do ângulo de contacto com a água coloca o revestimento R1 na fronteira entre uma superfície hidrófila e hidrófoba, sendo que esta é a única superfície que apresenta Zr metálico. Os valores determinados para R2 e R3 merecem algum detalhe na sua análise. Com efeito, e de acordo com a caracterização efetuada por XPS, ambos são constituídos por  $ZrO_2$ . Se a química da superfície é igual, e dado que a rugosidade não contribui de modo significativo para a avaliação dos ângulos de contacto estáticos, os valores deveriam ser muito semelhantes, o que não é observado. Esta diferença fornece indicações claras que a superfície do revestimento R2 é distinta da do revestimento R3. A distinção pode ser a nível químico, apresentando R2 uma relação O/Zr superior a 2, tal como inicialmente previsto; a nível estrutural, uma vez que é sabido que a presença ou ausência de ordem estrutural dão origem a distintas molhabilidades [45], ou à combinação dos dois efeitos.

No caso de superfícies cuja aplicação final implica o contacto com células eucariotas é bastante importante a avaliação da tensão de adesão da água,  $\tau^0$ , que se obtém

multiplicando a tensão superficial da água ( $\gamma_L = 72,8 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) pelo cosseno do ângulo de contacto que a água apresenta com determinada superfície [44]. O limite de Berg é obtido para o valor de  $\tau^0 = 30 \text{ mJ.m}^{-2}$  e estabelece o limite entre superfícies que permitem a adesão de proteínas, mas não a de células eucariotas  $\tau^0 < 30 \text{ mJ.m}^{-2}$  e as que não permitem a adesão de proteínas, mas são favoráveis à adesão e proliferação daquele tipo de células,  $\tau^0 > 30 \text{ mJ.m}^{-2}$ . O valor de  $30 \text{ mJ.m}^{-2}$  é obtido para um valor de ângulo de contacto de  $65^\circ$ , razão pela qual em biomateriais este valor define o limite entre superfícies hidrófobas e hidrófilas.

No caso das superfícies em estudo os valores de  $\tau^0$  são de 28,4, 45,8 e 66,5  $\text{mJ.m}^{-2}$  para as superfícies R1, R2 e R3, respetivamente. Segundo esta análise a superfície R1 encontra-se ligeiramente abaixo do limite de Berg pelo que será, em princípio a menos favorável à adesão de células. Este facto está de acordo com os resultados de XPS, pois a presença de Zr metálico, à semelhança da maioria dos materiais metálicos, não é favorável para a interface com células eucarióticas.

### 3.5.2. Energia de superfície

A energia de superfície (SE – *Surface Energy*) é um parâmetro que expressa as forças intermoleculares na superfície de um material e depende dos valores de componentes polares e dispersivas. Para uma superfície em análise, menores valores de SE indicam uma superfície mais estável, enquanto valores mais altos indicam uma reatividade superficial acrescida. A energia de superfície de um filme fino pode ser calculada a partir dos ângulos de contacto obtidos por dois líquidos diferentes e recorrendo às equações seguintes:

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p, \quad (3.1)$$

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} + 2 \sqrt{\gamma_s^p \gamma_L^p}, \quad (3.2)$$

Na equação 3.1,  $\gamma_s$  representa a energia de superfície do filme,  $\gamma_s^d$  a contribuição da componente dispersiva, e  $\gamma_s^p$  a contribuição da componente polar. Na equação 3.2,  $\gamma_L$  representa a tensão de superfície dos líquidos usados,  $\gamma_L^d$  e  $\gamma_L^p$  as componentes dispersivas e polares da tensão superficial dos líquidos, e  $\theta$  representa o ângulo de contacto de cada líquido. Os valores de  $\gamma_L$ ,  $\gamma_L^d$  e  $\gamma_L^p$  utilizados no cálculo das energias de superfície estão apresentados na tabela 9.

**Tabela 9.** Valores da tensão superficial e componentes dispersivas e polares da água e formamida [46].

Líquido	$\gamma_L$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_L^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_L^p$ (mJ/m <sup>2</sup> )
Água	72,8	21,8	51,0
Formamida	58,2	39,5	18,7

Com base nos ângulos de contacto medidos e utilizando as equações 3.1 e 3.2 foi efetuado o cálculo da energia de superfície dos revestimentos R1, R2 e R3 cujos valores podem ser consultados na tabela 10. Tal como se pode observar, o revestimento com maior energia de superfície é o R3. No caso de R1 e R2 estes apresentam energias de superfície com valores próximos entre si. No entanto, e mais importante que o valor global da energia de superfície, deve ser feita a análise em termos da evolução das componentes polares e dispersivas. Com efeito, a superfície R1 apresenta uma contribuição baixa da sua componente polar para o valor global da energia de superfície, enquanto a contribuição desta componente nos revestimentos R2 e R3 assume mais que metade do valor total para a energia de superfície. Tal implica que a quantidade de grupos polares na superfície destes dois revestimentos será mais elevada que na superfície de R1. Estes resultados mostram, mais uma vez, que as superfícies R2 e R3 são distintas entre si.

**Tabela 10.** Energia de superfície dos revestimentos R1, R2 e R3 e respetivas componentes polares e dispersivas.

Superfícies	$\gamma_s$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s^p$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s^p$ (%)
R1	43,1	31,4	11,7	27,1
R2	49,6	22,6	27,0	54,4
R3	66,7	18,6	48,1	72,1

### 3.6. Potencial Zeta

Para que um implante induza uma boa osteointegração é preciso ter em conta não só a molhabilidade da sua superfície, mas também a carga superficial adquirida quando em contacto com líquidos ou fluidos corporais. Desse modo, foram medidos os valores do

potencial zeta nas superfícies dos revestimentos R1, R2 e R3. Os valores das medições e respetivos desvios padrão são apresentados na tabela 11.

**Tabela 11.** Valores do potencial zeta e desvio padrão nas superfícies dos revestimentos R1, R2 e R3.

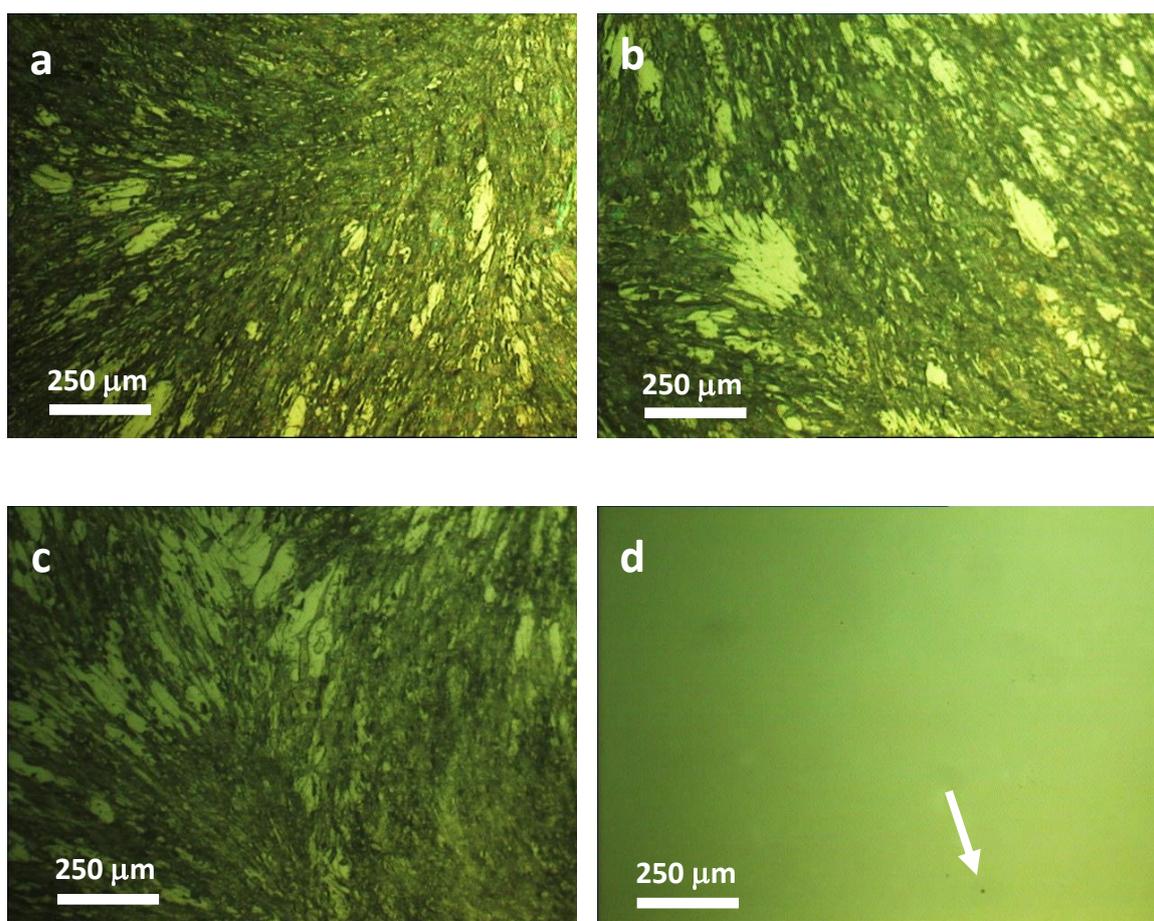
Superfície	R1	R2	R3
Potencial Zeta (mV)	-31,8±3,8	-37,6±6,3	-39,7±3,9

De acordo com os valores determinados, os revestimentos apresentam carga negativa na sua superfície com magnitudes muito semelhantes que poderão ser justificados pela presença de grupos com carga negativa na superfície, tais como =O, =OOH, etc. Estes resultados mostram uma tendência concordante com a observada nos ângulos de contacto com água, uma vez que a superfície que apresenta o valor menos negativo de potencial zeta é a que apresenta ângulos de contacto mais altos e a menor componente polar de energia de superfície. O facto de todas as superfícies apresentarem valores negativos de potencial zeta é um bom indicador para a osteointegração, pois é sabido que cargas superficiais negativas favorecem o desenvolvimento de novo tecido duro [47].

### 3.7. Testes *In Vitro*

De forma a avaliar o desempenho a nível biológico dos revestimentos R1 e R2 comparativamente a um revestimento de zircónia estabilizada com ítria (R3), foram realizados testes *in vitro* com células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária (CEMPD). No final dos testes as superfícies dos revestimentos foram analisadas por microscopia ótica e microscopia eletrónica de varrimento.

A análise por microscopia ótica, cujas imagens se apresentam na figura 13, revela que todas as superfícies se encontram cobertas por células. A imagem (d) da figura é a superfície de uma lamela utilizada como controlo, a qual não apresenta nenhuma célula na sua superfície, sendo apenas detetado um defeito na superfície de vidro que se encontra assinalado por uma seta.



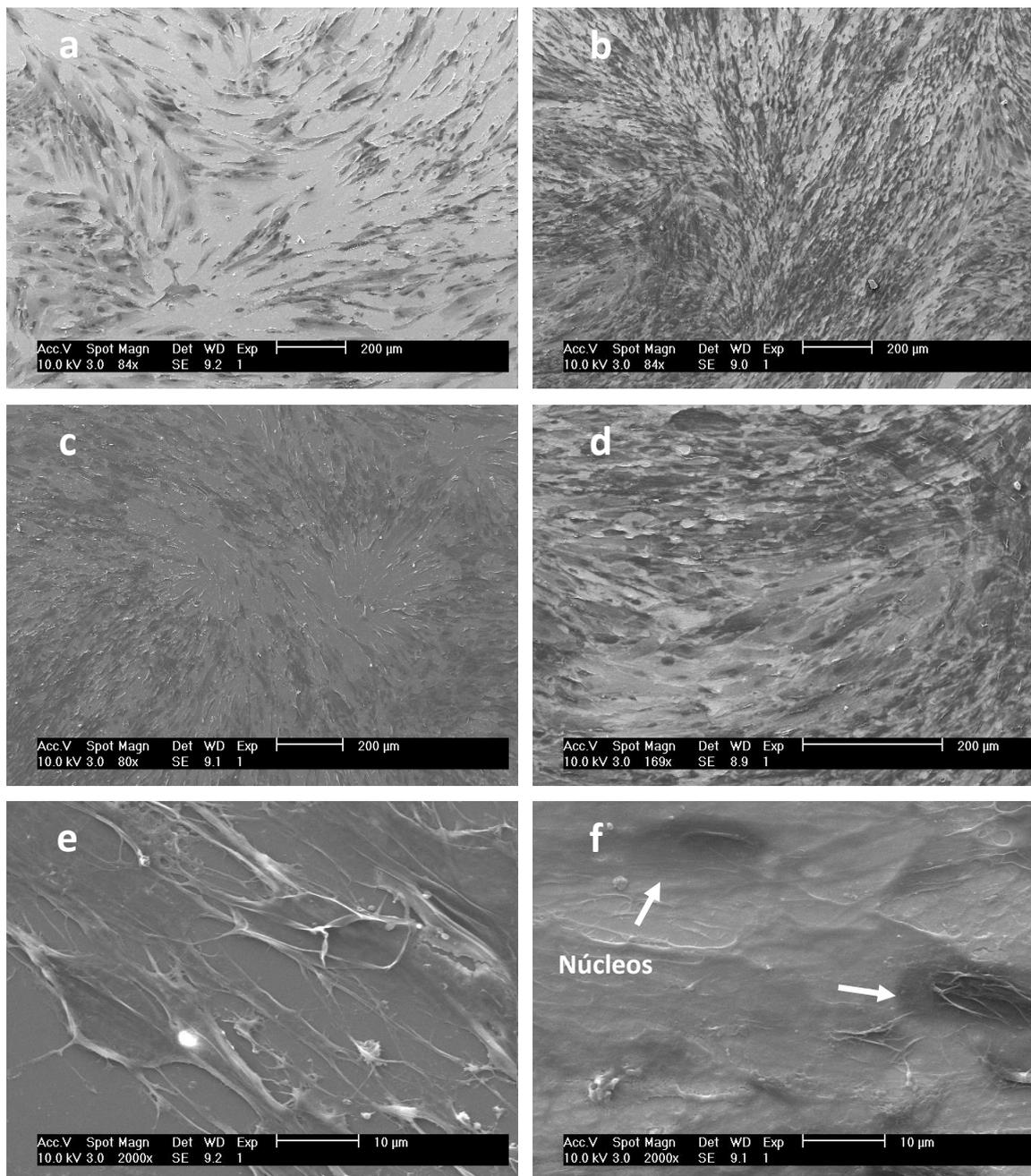
**Figura 13.** Imagens de microscopia ótica da superfície dos revestimentos R1 (a), R2 (b), R3 (c) e de uma lamela de vidro (d), após 24h em meio de cultura com células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária.

Na figura 14 estão representadas as micrografias de SEM dos revestimentos R1 (a) R2 (b, d e f) e R3 (c, e) após incubação com as CEMPD. Tal como se observa, nas zonas analisadas todas as superfícies têm células, sendo que, aparentemente, a superfície R1 apresenta uma menor densidade de células e maior percentagem da superfície ocupada por matriz extracelular. De acordo com os resultados de tensão de adesão da água, esta superfície apresentava-se como sendo a menos favorável para a adesão e proliferação de células. Tal facto prende-se com a muito ligeira hidrofobicidade do revestimento, bem como com a presença de  $Zr^0$ .

Quando se compara a densidade celular nas superfícies R2 e R3, a superfície R2 é a que, aparentemente, apresenta a maior densidade celular. Tal também é verificado nas micrografias a maiores ampliações, onde se observa uma maior quantidade de matriz extracelular e células mais alongadas em R2 (micrografia f) e células mais finas em R3 (micrografia e). Dado que a superfície R3 foi já testada, quer *in vitro* quer *in vivo*, como

revestimento de implantes dentários, pode ser afirmado que a superfície R2 apresenta um desempenho, no mínimo, tão bom quanto o da superfície R3.

Estas observações, juntamente com as caracterizações efetuadas anteriormente, vêm, uma vez mais, reforçar a ideia de que a superfície R2 é distinta da de R3, apesar de neste trabalho não se ter conseguido, inequivocamente, demonstrar esta hipótese.



**Figura 14.** Micrografias de topo da superfície dos revestimentos R1 (a), R2 (b, d e f) e R3 (c, e) após 24h em meio de cultura com células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária.



## CONCLUSÕES

Neste trabalho foram produzidos por pulverização catódica reativa, revestimentos de Zr-O com estequiometria distinta da zircónia. O objetivo era o de avaliar o desempenho das superfícies produzidas em aplicações dentárias, tais como implantes, usando como controlo um revestimento obtido a partir de um alvo cerâmico de  $ZrO_2$ . As principais conclusões retiradas são as seguintes:

- a inspeção visual aos revestimentos produzidos comprova que R1 apresenta uma cor metálica, contrariamente a R2 e R3 que são transparentes. Esta diferença nas propriedades óticas pode dar vantagem aos revestimentos R2 e R3 em comparação a R1, pois de um ponto de vista estético estas superfícies são mais apelativas;
- a caracterização morfológica efetuada aos revestimentos indicou que estes apresentam uma morfologia *featureless* e boa adesão aos substratos; a topografia é caracterizada por picos arredondados, o que é favorável à adesão celular;
- na análise química de superfície foi detetada a presença de ligações metálicas na superfície do revestimento R1, enquanto que R2 e R3 apresentaram superfícies apenas com ligações Zr-O. Estes resultados conferem desvantagem ao revestimento R1, uma vez que a presença de ligações metálicas na superfície não é favorável para a interface com células eucarióticas;
- o estudo da molhabilidade superficial indica que, de entre os três revestimentos, R1 apresenta valores menos favoráveis para a osteointegração;
- os valores dos ângulos de contacto estáticos e o cálculo da energia de superfície aponta para que as superfícies R2 e R3 apresentem diferenças, que podem ser a nível químico, estrutural, ou a ambos, o que lhes confere molhabilidades distintas;

- o cálculo da tensão de adesão da água revelou que as superfícies dos revestimentos R2 e R3 apresentam valores superiores ao limite de Berg, sendo assim favoráveis à adesão celular. O mesmo não se sucede em R1, que é, em princípio, mais favorável à adesão de proteínas;
- os testes *in vitro* realizados permitiram concluir que a superfície de R2 apresenta um desempenho, no mínimo, tão bom quanto o de R3 e uma melhor biocompatibilidade em relação a R1.
- o conjunto das caracterizações realizadas, indicam diferenças entre as superfícies R2 e R3. Embora os testes *in vitro* tenham tido um cariz qualitativo, parecem apontar para que a superfície R2 seja bastante promissora ao nível do desempenho biológico.

Como trabalhos futuros é sugerida uma caracterização que permita diferenciar estruturalmente as superfícies R2 e R3. Ao nível da química da superfície deve ser considerada a hipótese de se efetuar FTIR em modo rasante de modo a clarificar o tipo de grupos químicos funcionais presentes na camada mais exterior dos revestimentos.

Em relação ao desempenho biológico de R2, é importante realizar mais testes quer *in vitro* quer *in vivo*, para se conseguir quantificar o desempenho da superfície R2 quando comparada com a superfície R3.

É ainda sugerido o estudo da avaliação do efeito da esterilização por radiação gama nos revestimentos estudados neste trabalho, pois os revestimentos produzidos por pulverização catódica induzem estruturas metaestáveis que podem evoluir quando sujeitas a radiação energética. A esterilização dos revestimentos, por radiação gama, pode induzir modificações fásicas ou outras e alterar a citocompatibilidade bem como a capacidade osteoindutora e osteointegradora.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] B. Guillaume, «Les implants dentaires : revue», *Morphologie*, vol. 100, n. 331, pp. 189–198, 2016.
- [2] P. Mandracci, F. Mussano, P. Rivolo, e S. Carossa, «Surface Treatments and Functional Coatings for Biocompatibility Improvement and Bacterial Adhesion Reduction in Dental Implantology», *Coatings*, vol. 6, n. 1, p. 7, 2016.
- [3] M. Chadda e R. Patil, «Implant and 3 ' S ( Surface topography , Surface treatment , Sterilization )», *IOSR J. Dent. Med. Sci.*, vol. 13, n. 6, pp. 17–22, 2014.
- [4] I.-S. Yeo, «Reality of Dental Implant Surface Modification: A Short Literature Review», *Open Biomed. Eng. J.*, vol. 8, n. 1, pp. 114–119, 2014.
- [5] G. Soon, B. Pinguan-Murphy, K. W. Lai, e S. A. Akbar, «Review of zirconia-based bioceramic: Surface modification and cellular response», *Ceram. Int.*, vol. 42, n. 11, pp. 12543–12555, 2016.
- [6] S. Lourenço, «Produção e Caraterização de Filmes Finos Ti-Zr para Aplicações Biomédicas», Tese de Mestrado em Engenharia de Materiais, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.
- [7] A. Della Bona, O. E. Pecho, e R. Alessandretti, «Zirconia as a dental biomaterial», *Materials (Basel)*, vol. 8, n. 8, pp. 4978–4991, 2015.
- [8] A. Apratim, P. Eachempati, K. Krishnappa Salian, V. Singh, S. Chhabra, e S. Shah, «Zirconia in dental implantology: A review», *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.*, vol. 5, n. 3, p. 147, 2015.
- [9] J. Chevalier, L. Gremillard, A. V. Virkar, e D. R. Clarke, «The tetragonal-monoclinic transformation in zirconia: Lessons learned and future trends», *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 92, n. 9, pp. 1901–1920, 2009.
- [10] C. Ying Kei Lung, «Surface coatings of titanium and zirconia», *Adv. Mater. Sci.*, vol. 2, n. 2, pp. 1–3, 2017.
- [11] V. Sollazzo *et al.*, «Zirconium oxide coating improves implant osseointegration in vivo», *Dent. Mater.*, vol. 24, n. 3, pp. 357–361, 2008.
- [12] T. I. Hamad, A. A. Fatalla, A. S. Waheed, Z. G. M. Azzawi, Y. guang Cao, e K. Song, «Biomechanical Evaluation of Nano-Zirconia Coatings on Ti-6Al-7Nb Implant Screws in Rabbit Tibias», *Curr. Med. Sci.*, vol. 38, n. 3, pp. 530–537, 2018.
- [13] G. S. Kaliaraj, V. Vishwakarma, K. Kirubaharan, T. Dharini, D. Ramachandran, e B. Muthaiah, «Corrosion and biocompatibility behaviour of zirconia coating by EBPVD for biomedical applications», *Surf. Coatings Technol.*, vol. 334, pp. 336–343, 2018.
- [14] J. Lan *et al.*, «Application of Plasma Sprayed Zirconia Coating in Dental

- Implant : Study in Implant», *J. Oral Implantol.*, vol. 44, n. 2, 2018.
- [15] H. L. Huang, Y. Y. Chang, J. C. Weng, Y. C. Chen, C. H. Lai, e T. M. Shieh, «Anti-bacterial performance of Zirconia coatings on Titanium implants», *Thin Solid Films*, vol. 528, pp. 151–156, 2013.
- [16] Z. A. Uwais, M. A. Hussein, M. A. Samad, e N. Al-Aqeeli, «Surface Modification of Metallic Biomaterials for Better Tribological Properties: A Review», *Arab. J. Sci. Eng.*, vol. 42, n. 11, pp. 4493–4512, 2017.
- [17] R. J. Kohal *et al.*, «Osteoblast and bone tissue response to surface modified zirconia and titanium implant materials», *Dent. Mater.*, vol. 29, n. 7, pp. 763–776, 2013.
- [18] R. Surmenev *et al.*, «Radio Frequency Magnetron Sputter Deposition as a Tool for Surface Modification Implants Frequency Magnetron Sputter Deposition as a Tool for Surface Modification of Medical Implants», *Intech*, pp. 1–35, 2016.
- [19] T. Sakai, K. Okamura, A. Watazu, K. Teraoka, e H. Kido, «The effect of implant surfaces sputter-coated with hydroxyapatite target», *J. Hard Tissue Biol.*, vol. 22, n. 1, pp. 67–77, 2013.
- [20] H. C. Lai, H. H. Tsai, K. Y. Hung, e H. P. Feng, «Fabrication of hydroxyapatite targets in radio frequency sputtering for surface modification of titanium dental implants», *J. Intell. Mater. Syst. Struct.*, vol. 26, n. 9, pp. 1050–1058, 2015.
- [21] V. Perrotti, F. Iaculli, A. Fontana, A. Piattelli, e G. Iezzi, *Introduction to bone response to dental implant materials*. 2017.
- [22] A. Han, J. K. H. Tsoi, J. P. Matinlinna, Y. Zhang, e Z. Chen, «Effects of different sterilization methods on surface characteristics and biofilm formation on zirconia in vitro», *Dent. Mater.*, pp. 1–10, 2017.
- [23] S. Govindaraj e M. S. Muthuraman, «Systematic review on sterilization methods of implants and medical devices», *Int. J. ChemTech Res.*, vol. 8, n. 2, pp. 897–911, 2015.
- [24] D. Abayli e N. Baydogan, «The Characterization of the Irradiated ZrO<sub>2</sub> Transparent Thin Films», *Procedia - Soc. Behav. Sci.*, vol. 195, pp. 2117–2121, 2015.
- [25] H. C. Majed, A. J. Kadhm, e I. A. Abbas, «The Effect of Gamma Rays on the Structural and Optical Properties of ZrO<sub>2</sub> Thin Films with Different Thicknesses», *Int. J. Curr. Eng. Technol.*, vol. 7, n. 2, pp. 402–407, 2017.
- [26] J.-Y. Park, J.-K. Heo, e Y.-C. Kang, «The Properties of RF Sputtered Zirconium Oxide Thin Films at Different Plasma Gas Ratio», *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 31, n. 2, pp. 397–400, 2010.
- [27] S. Venkataraj, O. Kappertz, H. Weis, R. Drese, R. Jayavel, e M. Wuttig, «Structural and optical properties of thin zirconium oxide films prepared by reactive direct current magnetron sputtering», *J. Appl. Phys.*, vol. 92, n. 7, pp. 3599–3607, 2002.
- [28] M. Apreutesei, R. Arvinte, D. Constantin, O. C. Andrei, e D. Munteanu, «Mechanical and decorative properties of ZrO<sub>2</sub> thin films prepared by reactive-

- magnetron sputtering», *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, vol. 13, n. 7, pp. 897–901, 2011.
- [29] Y. L. Hsu, C. H. Lee, S. M. Chiu, Y. C. Sung, K. Y. Yang, e C. W. Chu, «Anti-Sticking Properties of PVD CrWN<sub>x</sub>, CrO<sub>x</sub> and ZrO<sub>x</sub> Coatings on Medical Electrode Application», *Defect Diffus. Forum*, vol. 297–301, pp. 656–663, 2010.
- [30] A. Sinhamahapatra, J. P. Jeon, J. Kang, B. Han, e J. S. Yu, «Oxygen-Deficient Zirconia (ZrO<sub>2-x</sub>): A New Material for Solar Light Absorption», *Sci. Rep.*, vol. 6, n. June, pp. 1–8, 2016.
- [31] D. R. Tobergte e S. Curtis, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, vol. 53, n. 9. 2013.
- [32] W. Boktryckerz, *Analytical Electron Microscopy for Materials Science*. 2000.
- [33] R. G. Reifenberger, *Fundamentals of Atomic Force Microscopy - Part I: Foundations*, vol. Part I. 2015.
- [34] K. S. Yoshio Waseda, Eiichiro Matsubara, *X-Ray Diffraction Crystallography\_ Introduction, Examples and Solved Problems*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
- [35] S. Ferraris, M. Cazzola, V. Peretti, B. Stella, e S. Spriano, «Zeta potential measurements on solid surfaces for in Vitro biomaterials testing: Surface charge, reactivity upon contact with fluids and protein absorption», *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, n. MAY, pp. 1–7, 2018.
- [36] H. Teisala, M. Tuominen, e J. Kuusipalo, «Superhydrophobic Coatings on Cellulose-Based Materials: Fabrication, Properties, and Applications», *Adv. Mater. Interfaces*, vol. 1, n. 1, pp. 1–20, 2014.
- [37] S. Šelimović, *Nanopatterning and Nanoscale Devices for Biological Applications*. New York: CRC Press, 2017.
- [38] H. Konno, *X-ray Photoelectron Spectroscopy*. Tsinghua University Press Limited, 2016.
- [39] P. Zurlini *et al.*, «Titanium and zirconium hard coatings on glass substrates prepared by the sol-gel method», *Thin Solid Films*, vol. 517, n. 20, pp. 5881–5887, 2009.
- [40] J. Liu, M. Liao, M. Imura, A. Tanaka, H. Iwai, e Y. Koide, «Low on-resistance diamond field effect transistor with high-k ZrO<sub>2</sub> as dielectric», *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 2–6, 2014.
- [41] I. Bepalov, M. Datler, S. Buhr, W. Drachsel, G. Rupprechter, e Y. Suchorski, «Initial stages of oxide formation on the Zr surface at low oxygen pressure: An in situ FIM and XPS study», *Ultramicroscopy*, vol. 159, pp. 147–151, 2015.
- [42] P. L. Brown, *Chemical Thermodynamics of Zirconium*, FJ Mompean. France, Issy-les-Moulineaux, 2005.
- [43] ZirChorm, «ZirChrom-PBD Method Development Companion», 2018. [Em linha]. Disponível em: <http://www.zirchrom.com/PBDUse.asp>. [Acedido: 20-Ago-2018].

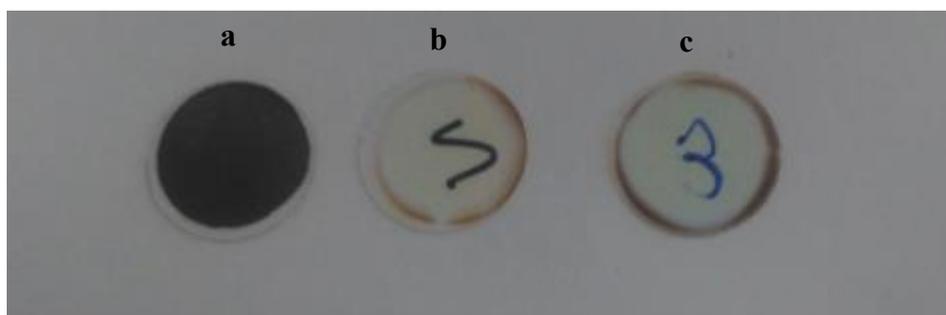
- 
- [44] E. A. Vogler, «Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces», *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 74, n. 1–3, pp. 69–117, 1998.
- [45] V. Puri, A. K. Dantuluri, M. Kumar, N. Karar, e A. K. Bansal, «Wettability and surface chemistry of crystalline and amorphous forms of a poorly water soluble drug», *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 40, n. 2, pp. 84–93, 2010.
- [46] A. Carré, «Polar interactions at liquid/polymer interfaces», *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. 21, n. 10, pp. 961–981, 2007.
- [47] R. Smeets *et al.*, «A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation», *Head Face Med.*, vol. 5, n. 1, pp. 1–8, 2009.

## APÊNDICE A – DEPOSIÇÕES PRELIMINARES

**Tabela 12.** Designação e parâmetros de deposição dos filmes finos preparados nas deposições preliminares.

Designação	Pp O <sub>2</sub> (%)	Pp O <sub>2</sub> (Pa)	Pressão total (Pa)	Tempo (s)	Ddep (W.mm <sup>-2</sup> )
ZrO1.5%	1,5	1,1x10 <sup>-2</sup>	0,7	900	3,2x10 <sup>-2</sup>
ZrO2.5%	2,5	1,8x10 <sup>-2</sup>	0,7	900	3,2x10 <sup>-2</sup>
ZrO3%	3	2,1x10 <sup>-2</sup>	0,7	900	3,2x10 <sup>-2</sup>
ZrO5%	5	3,5x10 <sup>-2</sup>	0,7	900	3,2x10 <sup>-2</sup>

Pp = pressão parcial; Ddep = densidade de potência



**Figura 15.** Fotos dos revestimentos R1 (a), R2 (b) e R3 (c) depositados sobre lamelas de vidro.



## APÊNDICE B – XPS: ESPETROS DE ALTA RESOLUÇÃO

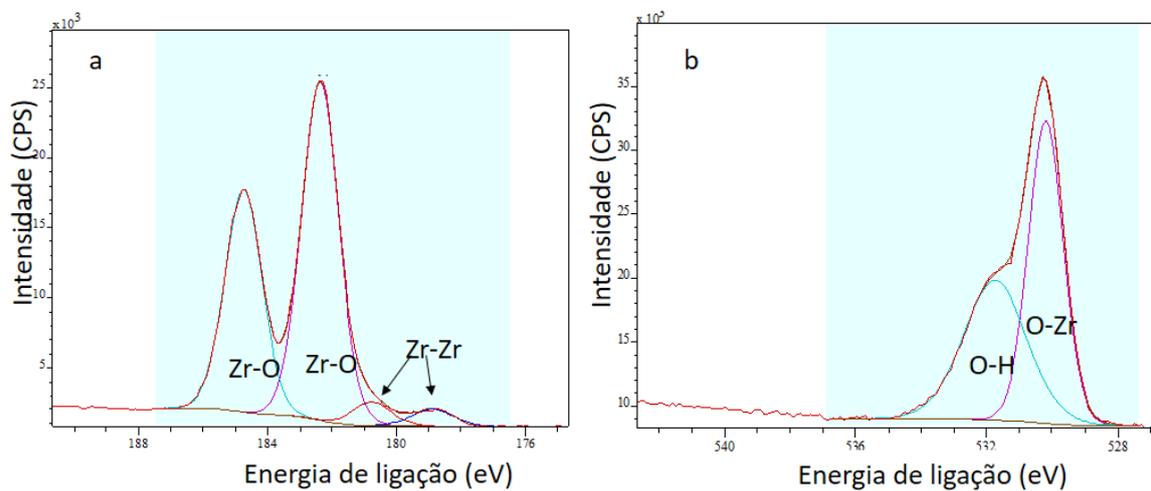


Figura 16. Espectros de Zr3d (a) e O1s (b) do revestimento R1, após desconvolução.

2

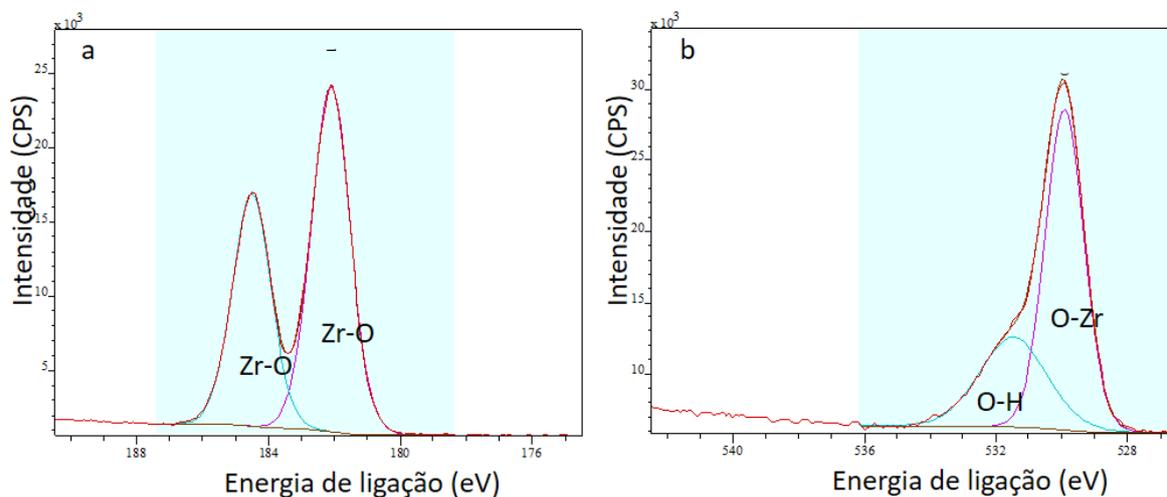
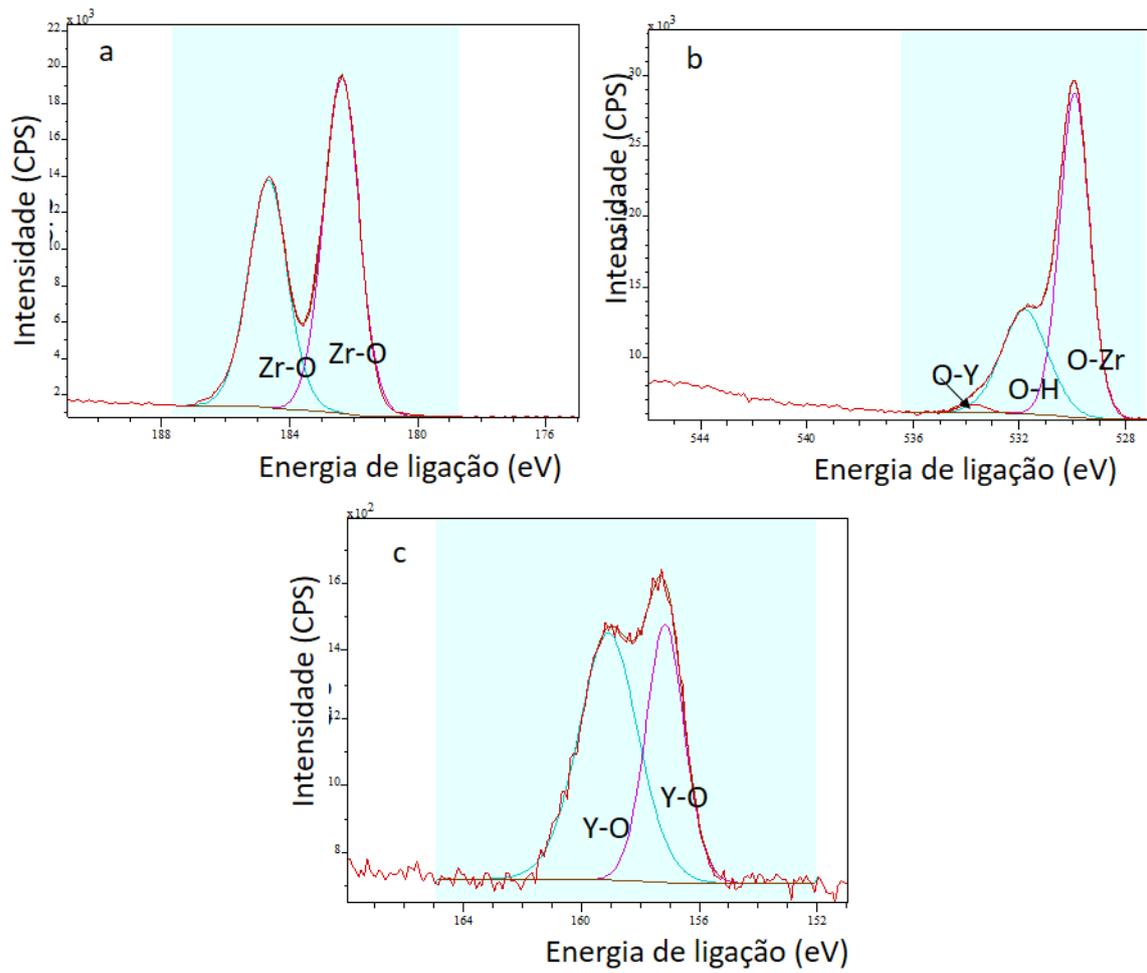
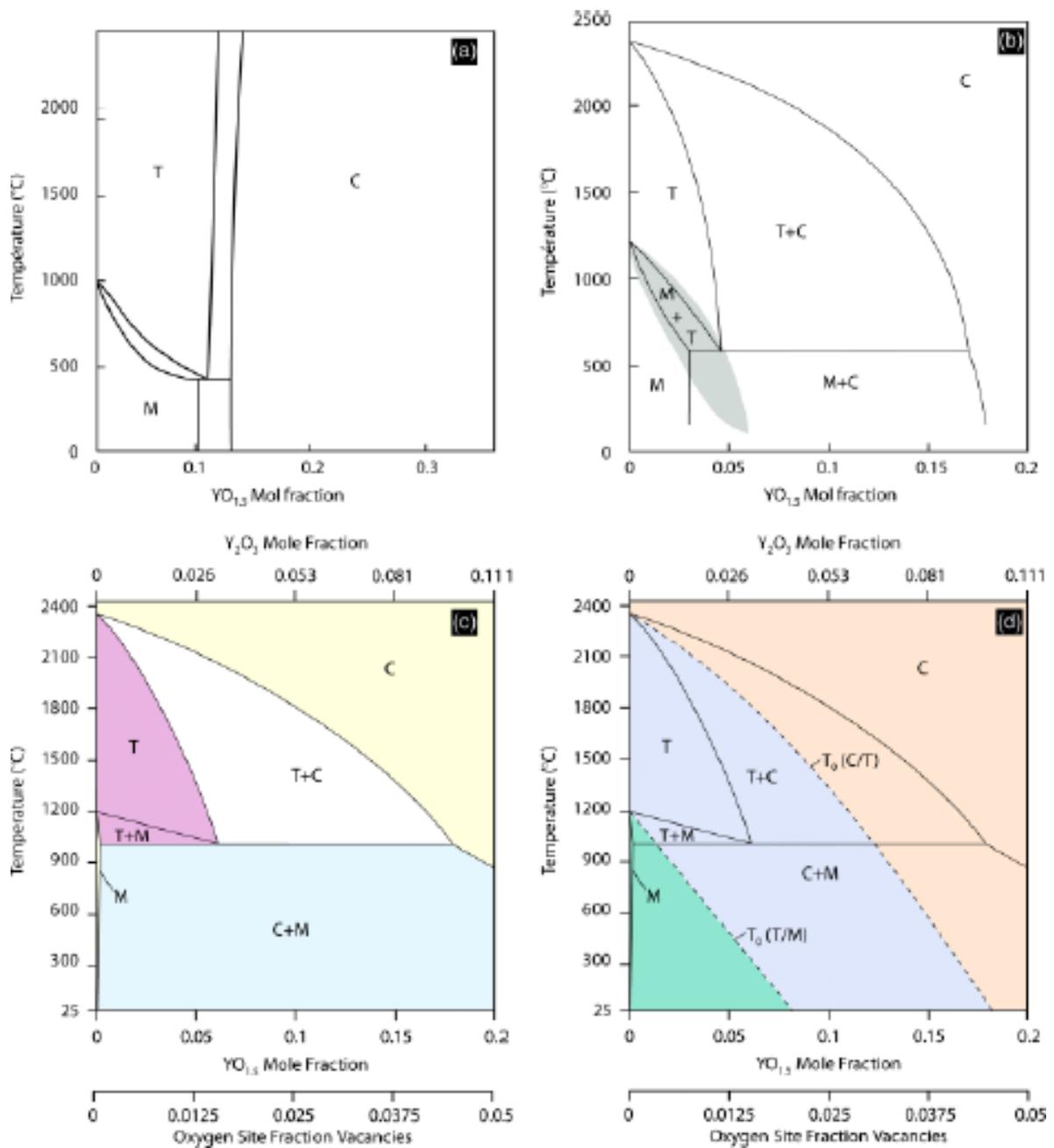


Figura 17. Espectros de Zr3d (a) e O1s (b), do revestimento R2, após desconvolução.



**Figura 18.** Espectros Zr3d (a), O1s (b) e Y3d (c) do revestimento R3, após desconvolução.

## ANEXO A – DIAGRAMA DE FASE ZIRCÓNIA-ÍTRIA



**Figura 19.** Diagrama de fase zircónia-íttria, (a) diagrama de 1951, (b) diagrama de 1975, (c e d) diagramas mais recentes. Adaptada de [9].