

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas  
Programa de Pós-Graduação em Física  
Coordenação de Matéria Condensada, Física Aplicada e Nanociências



TESE DE DOUTORADO

Revestimentos nanométricos e cristalinos de hidroxiapatita em  
substratos metálicos e poliméricos a temperatura ambiente:  
Produção e Espectroscopia óptica de plasmas por  
Laser pulsado de Nd:YAG

Gabriela Cerqueira Gomes

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Mello de Paula Silva  
Coorientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira Borges

Rio de Janeiro – RJ  
Dezembro de 2017

*Dedicado à minha família, por todo amor, apoio e confiança.  
E em memória do professor Ademarlaudo França Barbosa.*

## Agradecimentos

A Deus, minha fonte de sabedoria, fé e principalmente resiliência para concluir essa etapa da minha vida. Apesar da perda lastimável do prof. Laudo no início do doutorado, eu tive muito apoio da minha família, dos meus amigos e dos meus atuais orientadores para recomeçar. Eu agradeço a Deus por ter tudo isso.

Aos meus pais, Valter Gomes e Célia Lima, e meus irmãos, Rodrigo e Beatriz, simplesmente por serem amor e me apoiarem em todos os momentos. À minha grande família também, pelo apoio e por compreender minha ausência durante os períodos de intensa dedicação à tese. Ao Max e sua família, por todo seu apoio e carinho.

Aos meus orientadores Alexandre Mello e Fábio Borges, primeiro por me permitirem recomeçar, e depois por todo apoio para que eu pudesse terminar. Agradeço a confiança, respeito e compreensão para me conduzir em um tema de pesquisa na qual eu não tinha experiência prévia.

Aos pós-docs Fabrício Borghi e Rogélio Ospina, duas pessoas que também me deram muito suporte e ensinamentos valiosos.

Aos professores que muito colaboraram: Cleo Martins, Elena Mavropoulos, Alexandre Rossi.

Aos profs. coordenadores Sinnecker, Sarthour, Roditti, pelo apoio para participar da Conferência de Ablação a Laser (COLA 2015), pois foi quando eu tive uma percepção muito valiosa sobre o meu trabalho de tese.

A todos do grupo do Laboratório de Biomateriais, pelo fornecimento da matéria prima desse trabalho: a hidroxiapatita.

Às meninas do Laboratório de Cultivo de Células por todo carinho, principalmente à Suzana e Melissa pela dedicação durante os testes biológicos.

Aos meus amigos do CBPF pelo grande apoio e amizade durante esses últimos anos, e àqueles que passaram pelo Laboratório de Plasma Aplicado e pelo Laboratório de Superfícies e Nanoestruturas, pela troca de experiências.

A todos que me deram suporte com eficiência e prontidão nos laboratórios e equipamentos do CBPF: Mariana Giffoni e Paula Marques, do Laboratório de Química e Preparação de Amostras; Cilene Labre, do LabNano; Carlos Albuquerque e Anderson Franco, do Laboratório de Criogenia; Francisco de Assis e Thiago Palhares, do Laboratório de Espectrofotometria de FTIR/AA, à Luisa pelo treinamento no XPS, ao Prof. Gomes pelo treinamento no AFM e à toda a equipe do Laboratório de Instrumentação e Materiais Mecânicos (oficina mecânica).

À Bete Vicente, Gil, Viviane Vicente e Ronaldo, da secretaria da COMAN. Às amigas da biblioteca: Edileuza, Rosa e Cida.

A todos os pós-graduandos do CBPF que estiveram à frente da APG-José Leite Lopes durante esse período que, junto com Denise Coutinho, me ajudaram muito.

Aos professores Herman Lima, Paulo Renato e José Brant, e aos meninos Rafael Gama e Victor Ferraz pelo grande apoio no primeiro ano de doutorado.

Ao LNLS, pelos dias de intenso trabalho e aprendizado.

Ao CNPq, pela bolsa de pesquisa.

## Resumo

Os fosfatos de cálcio (CaP) formam uma classe de materiais biocompatíveis frequentemente usados como recobrimentos de implantes ósseos. Dentre as fases de CaP, a hidroxiapatita (HAP) se destaca devido a sua estrutura cristalina similar ao tecido ósseo, baixa solubilidade e osteocondutividade. A técnica de deposição a laser pulsado (*PLD – Pulsed Laser Deposition*) permite produzir recobrimentos de HAP com boa adesão ao substrato e cristalinidade controlada, dependendo dos parâmetros escolhidos para a ablação. Entretanto, a cristalinidade é frequentemente obtida com tratamento térmico durante e/ou após a deposição por PLD, e isso pode provocar a formação de outras fases indesejadas de CaP e óxido de cálcio nos recobrimentos. Além disso, os tratamentos térmicos afetam a adesão e provocam rachaduras e descolamento devido às tensões térmicas na interface entre o implante e o recobrimento.

Neste trabalho, recobrimentos cristalinos de HAP foram produzidos por PLD com alta fluência ( $30 \text{ J/cm}^2$ ) do laser Nd:YAG no comprimento de onda de 532 nm. A cristalinidade foi alcançada em apenas 5 minutos de deposição. A morfologia dos recobrimentos consistiu de partículas micrométricas (com até 10  $\mu\text{m}$  de largura e 4  $\mu\text{m}$  de altura) depositadas sobre uma camada densa de 150 nm de espessura. Os filmes finos cristalinos de HAP foram depositados sobre superfícies de Ti e de ácido polilático (*PLA – polylactic acid*), um polímero bioabsorvível sensível à temperatura. Após a deposição à temperatura ambiente, as superfícies de PLA/HAP se tornaram hidrofílicas e mais apropriadas para aplicações biomédicas. Além disso, os testes de adesão com fita (*tape test*) apresentaram máxima aderência dos filmes sobre os substratos de Si e PLA, seguindo os critérios da norma ASTM D3359. A estrutura cristalina dos recobrimentos foi investigada por Difração de raios X com Incidência Rasante (*GIXRD – Grazing Incidence X-ray Diffraction*), apresentando uma fase única de HAP. Os difratogramas das amostras com tratamento térmico *in situ* de 200 °C e 800 °C confirmaram a ausência de outras fases ocultas sob a componente nanocristalina presente nos recobrimentos não tratados. Outras caracterizações foram realizadas por Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X (*XPS – X-ray Photoelectron Spectroscopy*), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), Microscopia Atômica (*AFM – Atomic Force Microscopy*) e Microscopia

Eletrônica de Varredura (*SEM – Scanning Electron Microscopy*). Testes biológicos preliminares foram realizados para futuras aplicações biomédicas desses recobrimentos.

A transferência da estequiometria do alvo ao recobrimento é apontada como uma das maiores vantagens do PLD. Nesse trabalho, a técnica de Espectroscopia de Plasma Induzido por Laser com Calibração por um Ponto (*OPC-LIBS – One-Point Calibration Laser Induced Breakdown Spectroscopy*) foi usada para analisar a estequiometria e Ca/P dos alvos de HAP. Essa técnica não necessita de preparação da amostra, de forma que o alvo pode ser usado para PLD imediatamente depois da análise por OPC-LIBS. Os alvos de HAP também foram analisados por Espectroscopia de Absorção Atômica (*AAS - Atomic Absorption Spectroscopy*), Espectroscopia UV-visível (*UV-Vis – Ultraviolet Visible Spectroscopy*) e Fluorescência de raios X (*XRF – X-ray Fluorescence*), que são técnicas de análises químicas que necessitam de digestão parcial das amostras. Os resultados obtidos por OPC-LIBS foram comparados às técnicas analíticas, e apresentaram bom ajuste dos dados.

**Palavras-chave:** filmes finos, hidroxiapatita, ablação a laser pulsado; temperatura ambiente, ácido polilático, espectroscopia óptica, método OPC-LIBS (*One-Point Calibration - Laser Induced Breakdown Spectroscopy*).

## Abstract

Calcium phosphates (CaP) form a class of biocompatible materials often used as bone implant coatings. Among the CaP phases, hydroxyapatite (HAP) stands out because of its crystalline structure similar to bone tissue, low solubility and osteoconductivity. The Pulsed Laser Deposition (PLD) technique allows the production of crystalline HAP coatings with good adhesion to the substrate and controlled morphology depending on the parameters chosen for ablation. However, crystallinity is often obtained with heat treatment during and/or after PLD deposition, and this may cause the formation of other undesired phases of CaP and calcium oxide in the coatings. In addition, heat treatments affect adhesion and cause cracking and detachment due to thermal stresses at the interface between the implant and the coating.

In this work, crystalline HAP coatings were produced by PLD with high fluence ( $30 \text{ J/cm}^2$ ) of Nd:YAG laser at 532 nm wavelength. The coatings crystallinity was achieved in only 5 minutes of deposition time. The morphology of the coatings consisted of micrometric particles (up to  $10 \mu\text{m}$  wide and  $4 \mu\text{m}$  high) deposited on a dense layer of 150 nm thickness. The crystalline thin films of HAP were deposited on Ti and polylactic acid (PLA) surfaces, which are temperature sensitive bioabsorbable polymers. After deposition at room temperature, the PLA/HAP surfaces have become hydrophilic and more suitable for biomedical applications. In addition, tape test showed good adhesion of the films on the substrates. The crystalline structure of the coatings was investigated by X-ray diffraction with grazing incidence (GIXRD), presenting a single phase of HAP. GIXRD measurements in samples with  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  *in situ* heat treatment confirmed the absence of other hidden phases under the nanocrystalline component (without diffraction peaks) present in the untreated coatings. Further characterizations were performed with X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Atomic Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Preliminary biological tests were performed for future biomedical applications of these coatings.

The ability to transfer the target stoichiometry to the coating is pointed out as one of the major advantages of the PLD technique. In this work, the laser-induced plasma spectroscopy One-Point Calibration - Laser Induced Breakdown Spectroscopy (OPC-LIBS) technique was used to analyze the stoichiometry and Ca/P of HAP targets. This

technique does not require preparation of the sample, so that the target can be used for PLD immediately after analysis by OPC-LIBS. HAP targets produced in this work were also analyzed by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS), Ultraviolet Visible Spectroscopy (UV-Vis) and X-ray Fluorescence (XRF), which are chemical analysis techniques that require partial digestion of the samples. The results obtained by OPC-LIBS were compared to the analytical techniques, and presented a good data fit.

**Keywords:** thin films, hydroxyapatite, pulsed laser deposition, room temperature, polylactic acid, optical spectroscopy, One-Point Calibration - Laser Induced Breakdown Spectroscopy method.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAS	Espectroscopia de Absorção Atômica
AFM	Microscopia Atômica
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais ( <i>American Society for Testing and Materials</i> )
CaP	Fosfato de cálcio
CF-LIBS	Espectroscopia de Plasma Induzido por Laser sem Calibração ( <i>Calibration Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy</i> )
FRX	Fluorescência de raios X
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GIXRD	Difração de raios X com Incidência Rasante
HAP	Hidroxiapatita
LIBS	Espectroscopia de Plasma Induzido por Laser ( <i>Laser-Induced Breakdown Spectroscopy</i> )
LIPS	Espectroscopia de Plasma Induzido por Laser ( <i>Laser-Induced Plasma Spectroscopy</i> )
LTE	Equilíbrio Termodinâmico Local ( <i>Local Thermodynamic Equilibrium</i> )
MAPLE	Evaporação de Matriz Assistida por Laser Pulsado ( <i>Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation</i> )
MS	<i>Magnetron Sputtering</i>
Nd:YAG	Neodímio-YAG ( <i>neodymium-doped yttrium aluminium garnet</i> )
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia ( <i>National Institute of Standards and Technology</i> )
OPC-LIBS	Espectroscopia de Plasma Induzido por Laser com Calibração por um Ponto ( <i>One-Point Calibration Laser Induced Breakdown Spectroscopy</i> )
PLA	Ácido polilático
PLD	Deposição a laser pulsado ( <i>Pulsed Laser Deposition</i> )
PS	<i>Plasma Spray</i>
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
Si	Silício
Ti	Titânio
UV	Ultravioleta

UV-Vis    Espectroscopia UV/visível  
XPS       Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X

# Sumário

Resumo .....	4
Abstract.....	6
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
3.1. Biomateriais e Hidroxiapatita.....	19
3.2. Deposição a laser pulsado (PLD – Pulsed Laser Deposition) .....	21
3.2.1. Fundamentos da técnica de PLD .....	21
3.2.2. Vantagens e limitações.....	23
3.2.3. Interação da radiação laser com o alvo: processos térmicos e hipertérmicos .....	24
3.2.4. Formação dos aglomerados na produção de filmes finos por PLD...	27
3.2.5. Nucleação e crescimento dos filmes sob influência de processos hipertérmicos .....	28
3.2.6. PLD aplicado a biomateriais .....	30
3.3. Análise da estequiometria dos alvos de HAP por espectroscopia de plasma induzido por laser .....	32
3.3.1. Princípios básicos da análise .....	33
3.3.2. Análise quantitativa por CF-LIBS.....	37
3.3.3. O método de calibração por um ponto OPC-LIBS .....	41
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
4.1. Síntese da HAP.....	45
4.2. Preparação dos alvos de HAP.....	45
4.3. Análise da estequiometria dos alvos de HAP .....	45
4.3.1. Análise estequiométrica por XRF, UV-VIS e AAS.....	46
4.3.2. Análise estequiométrica por OPC-LIBS .....	47
4.4. Preparação e tratamento dos substratos de Si, Ti e PLA.....	48
4.5. Produção dos recobrimentos de HAP por PLD.....	49
4.6. Caracterização físico-química dos filmes produzidos .....	51
4.6.1. Difração de raios-X (XRD) .....	51
4.6.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	52
4.6.3. Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios-X (XPS) .....	53
4.6.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	53

4.6.5.	Microscopia de Força Atômica (AFM).....	53
4.6.6.	Teste de adesão dos recobrimentos .....	54
4.7.	Ensaio preliminar de caracterização biológica .....	54
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>56</b>
5.1.	Análise estequiométrica dos alvos de HAP por OPC-LIBS.....	56
5.1.1.	Análise qualitativa e seleção das linhas .....	56
5.1.2.	Determinação dos parâmetros do plasma: temperatura e densidade.	59
5.1.3.	Cálculo da composição da amostra padrão com a técnica CF-LIBS	63
5.1.4.	Determinação dos parâmetros $P(\lambda)$ com a amostra padrão .....	65
5.1.5.	Determinação da composição dos alvos de HAP.....	66
5.1.6.	Comparação com outras técnicas .....	69
5.2.	Influência dos parâmetros de deposição sobre a cristalinidade dos filmes .....	71
5.3.	Caracterização físico-química dos filmes produzidos à temperatura ambiente .....	77
5.3.1.	Cristalinidade e composição de fase .....	77
5.3.2.	Composição e estequiometria de superfície .....	79
5.3.3.	Morfologia e composição estrutural.....	85
5.3.4.	Teste de adesão do filme ao substrato .....	87
5.3.5.	Teste de ângulo de contato .....	89
5.4.	Ensaio preliminar de adesão e proliferação celular .....	90
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>98</b>
<b>9.</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>104</b>
9.1.	APÊNDICE I: Publicações deste trabalho de tese.....	104
9.2.	APÊNDICE II: Protocolo dos ensaios biológicos .....	105

# 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, novos materiais e tecnologias são desenvolvidos para aumentar a aceitação de implantes ortopédicos e dentais no corpo humano [1-2]. Muitos trabalhos na literatura científica propõem diferentes modificações da superfície de implantes comerciais, geralmente de Ti e suas ligas, com o objetivo de aumentar eficientemente sua função biológica e integração óssea [3-4]. Os fosfatos de cálcio (CaP) formam uma classe de materiais com composição química similar à fase inorgânica do osso humano, por isso eles são adequadamente escolhidos para integrar e reparar danos nos ossos. Os recobrimentos à base de CaP podem ser produzidos com determinado controle sobre suas propriedades, tais como: espessura, composição, cristalinidade, razão Ca/P, microestrutura, porosidade e rugosidade [4-6]. A adesão dos recobrimentos ao substrato também é uma característica muito importante e que pode ser obtida dependendo dos processos e parâmetros de produção.

A hidroxiapatita (HAP), que apresenta a fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , é muito utilizada para o recobrimento de implantes ósseos devido à sua biocompatibilidade e osteocondutividade [2,6-8]. Um implante metálico recoberto com um filme de HAP se beneficia das propriedades de atividade biológica do recobrimento com as propriedades mecânicas dos metais, promovendo a biointegração desse implante em tecidos ósseos [3,8].

Diversas técnicas são usadas para a deposição de filmes finos e recobrimentos de implantes com materiais de CaP, especialmente a HAP [8-9]. As metodologias de recobrimento por plasma mais estudadas atualmente são as técnicas de *Plasma Spray (PS)*, *Magnetron Sputtering (MS)* e de Deposição por Laser Pulsado (*PLD – Pulsed Laser Deposition*) [10]. A técnica de PS é usada comercialmente devido ao seu baixo custo e alta taxa de deposição, produzindo recobrimentos relativamente espessos (5-300  $\mu\text{m}$ ), porosos e com espessura não uniforme [10]. Porém, novos processos de aspersão térmica são desenvolvidos para permitir maior controle da espessura, cristalinidade e homogeneidade dos recobrimentos [10]. A técnica de MS por alvos opostos é apontada como uma alternativa para produzir recobrimentos cristalinos sem a necessidade de tratamento térmico [11-12]. Entretanto, apesar de oferecer menor rugosidade de superfície, essa técnica ainda apresenta baixa taxa de deposição quando comparada à PS

e PLD [10,13]. Por outro lado, a técnica de PLD é conhecida como uma opção bastante eficiente para materiais de estrutura complexa, por preservar e transferir a estequiometria do material do alvo ao recobrimento. A versatilidade do sistema PLD também é comumente citada como uma grande vantagem, pois a possibilidade de modificar os diversos parâmetros do processo permite obter maior controle das características do recobrimento, como a estequiometria, cristalinidade e rugosidade da superfície [14].

Recentemente, avanços significativos foram alcançados para obter implantes biomédicos de alta qualidade com recobrimentos de CaP e HAP por PLD [15-16]. Em geral, a deposição de recobrimentos de HAP por PLD é realizada com tratamentos térmicos *in situ*, para aumentar o processo de difusão e nucleação durante o crescimento do filme, e com tratamentos térmicos após a deposição, para recuperar a cristalinidade do recobrimento [14-15]. Em muitos trabalhos publicados na literatura, esses tratamentos térmicos durante e/ou após a deposição são considerados necessários e até fundamentais para induzir a cristalinidade, com o objetivo de promover menor solubilidade do recobrimento quando implantado [15-16]. No entanto, o uso de tratamento térmico *in situ* pode provocar a formação de uma camada de óxido no implante metálico e de tensões mecânicas induzidas termicamente entre o recobrimento e o implante. Como resultado, fissuras e rachaduras podem ser formadas no revestimento, danificando a adesão do filme e favorecendo sítios para o crescimento de bactérias. Em ambos os casos, os tratamentos térmicos podem formar fases não desejadas de CaP e causar tensões mecânicas nos implantes [17]. Outras desvantagens associadas ao uso de tratamentos térmicos em PLD são o aumento no consumo de tempo e energia durante o processo de produção dos recobrimentos e a limitação na escolha dos substratos.

Na literatura, poucos trabalhos abordam a produção de recobrimentos de HAP por PLD com laser Nd:YAG no comprimento de onda de 532 nm, pois a HAP absorve pouco nesse comprimento de onda e a ablação não é coerente. O uso de baixa fluência de irradiação laser (energia/área) é outra característica em comum encontrada nesses trabalhos [16,18-23].

Neste trabalho, recobrimentos cristalinos de HAP foram produzidos em apenas 5 minutos de deposição por PLD e sem necessidade de tratamentos térmicos. Os filmes foram depositados à temperatura ambiente sobre substratos de Si (100), Ti e substratos poliméricos de PLA (ácido polilático), que são sensíveis a altas temperaturas.

Considerando a vantagem do PLD de transferir a estequiometria do alvo ao recobrimento, a alta densidade dos alvos cerâmicos produzidos com HAP estequiométrica e altamente cristalina foi combinada à alta fluência de irradiação de um laser pulsado. Dessa forma, os recobrimentos cristalinos de HAP foram produzidos usando o segundo harmônico do laser Nd:YAG laser (532 nm) e mais alta fluência de irradiação, em comparação com trabalhos publicados na literatura. A estrutura cristalográfica dos recobrimentos foi investigada por Difração de raios X de luz síncrotron em Incidência Rasante (*GIXRD – Grazing Incidence X-ray Diffraction*). As propriedades químicas foram analisadas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) e Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X (*XPS – X-ray Photoelectron Spectroscopy*). Também foram investigadas as propriedades morfológicas por Microscopia de Força Atômica (*AFM – Atomic Force Microscopy*) e Microscopia Eletrônica de Varredura (*SEM – Scanning Electron Microscopy*). A biocompatibilidade dos filmes foi investigada por experimentos *in vitro*. Como resultado, os recobrimentos foram formados por partículas micrométricas (com até 10 µm de largura e 4 µm de altura) depositadas sobre uma camada densa de 150 nm de HAP, e apresentaram boa adesão sobre os substratos.

Para garantir a transferência de estequiometria do alvo ao recobrimento durante o processo de PLD, os parâmetros da técnica devem ser adequadamente ajustados. Além disso, também é importante certificar que o alvo utilizado tenha a estequiometria desejada. Os alvos produzidos nesse trabalho, e utilizados para a ablação durante a produção dos filmes por PLD, foram caracterizados por uma técnica não destrutiva de análise química elementar. A técnica de Espectroscopia de Plasma Induzido por Laser *LIPS (Laser-Induced Plasma Spectroscopy)*, ou a sigla mais usada *LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy)*, é um tipo de espectroscopia de emissão atômica na qual a composição química é investigada através da interação (atomização e excitação) de um pulso laser sobre a superfície da amostra. Essa técnica é recente e ainda se encontra em desenvolvimento. Nesse trabalho, as vantagens de usar a técnica LIBS para caracterizar os alvos estão na possibilidade de usar o mesmo laser e configuração experimental do sistema de PLD, na rapidez e praticidade da medida, na possibilidade de análise qualitativa e quantitativa *in situ*, na característica de ser uma técnica praticamente não destrutiva e na possibilidade de ser utilizada para uma ampla variedade de substâncias [24].

Em uma espectroscopia LIBS, o espectro de energia da radiação luminosa emitida pela pluma de um plasma (gerado pela interação do feixe laser sobre a superfície da amostra) carrega informações sobre a composição elementar da amostra analisada, pois cada elemento emite um único conjunto de linhas espectrais com comprimentos de onda bem definidos. Em geral, uma análise elementar quantitativa com a técnica LIBS é feita usando curvas de calibração, onde são necessárias várias amostras com a mesma matriz (ou seja, amostras compostas pelos mesmos elementos) em diferentes concentrações do elemento da amostra a ser analisada [25]. Em alguns casos, o sinal LIBS obtido de um elemento apresenta uma resposta linear com a concentração do elemento na amostra, o que permite fazer uma análise quantitativa usando curvas de calibração obtidas de amostras de referência com composição conhecida [25].

De um modo geral, a técnica LIBS ainda apresenta outras vantagens: a flexibilidade na montagem experimental, a rápida análise dos dados, a não necessidade de preparação da amostra, a possibilidade de realizar análises em diversos ambientes: ar, vácuo, fluido, com alta temperatura e pressão, além da possibilidade de ser realizada *in situ* e de forma remota [26]. Além disso, possui sensibilidade da ordem de partes por milhão (ppm) e praticamente não danifica a amostra pois a quantidade de material removido é da ordem de alguns nanogramas. No entanto, essa técnica também possui algumas desvantagens, tais como: a sua dependência com as condições de equilíbrio do plasma, a saturação do sinal devido aos efeitos de auto-absorção (que ocorre para os elementos de alta concentração), o efeito matriz (para amostras muito heterogêneas), o grande número de fenômenos físico-químicos complexos envolvidos nos processos de ablação, formação e evolução da pluma de plasma e a interação do plasma com o ambiente circundante [26].

Com o objetivo de superar as dificuldades em medidas de análise quantitativa por LIBS, alguns pesquisadores italianos criaram em 1999 um método conhecido como Espectroscopia de Plasma Induzido por Laser sem Calibração (*CF-LIBS – Calibration Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*) [27]. Esse método não exige curvas de calibração ou amostras de referência, pois se baseia em um modelo matemático que descreve a emissão do plasma. Desde então, várias outras abordagens e aproximações foram testadas por grupos de diversas nacionalidades e os resultados foram comparados com outras técnicas de análise existentes [28-30]. Recentemente, no ano de 2013, uma variante para a técnica CF-LIBS conhecida como Espectroscopia de Plasma Induzido por Laser usando um Ponto para Calibração (*OPC-LIBS – One Point Calibration Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*) foi proposta por G. H. Cavalcanti e co-autores [31].

Essa aproximação descreve o uso de uma única amostra padrão para corrigir os erros encontrados nos parâmetros atômicos e na curva de calibração. Essa correção é feita antes de se iniciar a análise da amostra desconhecida, o que melhora consideravelmente a exatidão da técnica. Depois das correções realizadas com a amostra padrão, os procedimentos de análise com a aproximação OPC-LIBS passam a ser iguais aos da técnica CF-LIBS e comparáveis a medidas realizadas em equipamentos comerciais de fluorescência de raios-X (*XRF – X-Ray Fluorescence*) [30]. Neste trabalho, a abordagem OPC-LIBS é desenvolvida para análise elementar dos alvos de HAP, regularmente usados para a produção dos recobrimentos de HAP.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho aborda a produção de recobrimentos de fosfatos de cálcio pela técnica de deposição a laser pulsado (PLD) à temperatura ambiente, para serem aplicados em implantes metálicos e poliméricos comumente utilizados em substituições ósseas e reparos ortopédicos. Em geral, para a produção de filmes por PLD, o comprimento de onda do laser deve ser escolhido de acordo com a faixa de absorção do material que compõe o alvo, e assim garantir uma ablação congruente. No caso deste trabalho, os parâmetros da técnica de PLD foram explorados na condição em que o material do alvo, a HAP, absorve pouco no comprimento de onda do laser em 532 nm. Portanto, um dos objetivos específicos foi observar a influência dos parâmetros da técnica sobre as propriedades dos filmes produzidos, e assim, encontrar uma condição ideal de produção que satisfaça condições de uso e aplicação em implantes. Além disso, nos trabalhos comumente encontrados na literatura, tratamentos térmicos durante e/ou após a produção dos filmes de HAP são considerados essenciais para garantir a cristalinidade dos filmes obtidos. Por outro lado, a temperatura das espécies do plasma também fornece uma quantidade de energia que pode contribuir no crescimento, nucleação e formação dos filmes.

Outros objetivos específicos desse trabalho podem ser citados como: analisar as propriedades dos filmes produzidos através de técnicas de caracterização estrutural, morfológica e físico-química; investigar a possibilidade de produção sobre diferentes tipos de superfícies de interesse biológico, como por exemplo, substratos metálicos (Ti e ligas de Ti) e poliméricos sensíveis à temperatura (ácido polilático); além de verificar a propriedade de adesão dos recobrimentos produzidos à temperatura ambiente às diferentes superfícies, sendo esta uma característica muito importante para a aplicação proposta.

De forma complementar a produção e caracterização dos recobrimentos, os alvos de HAP produzidos e utilizados neste trabalho devem ter sua composição validada a fim de garantir a formação de filmes estequiométricos, pois a transferência de estequiometria é uma das principais vantagens na produção de filmes pela técnica de PLD. Entretanto, a análise da composição química dos alvos não pode ser feita por técnicas convencionais que envolvem procedimentos destrutivos de preparação e digestão da amostra. Nesse

contexto, o presente trabalho também tem como objetivo investigar a relação Ca/P dos alvos de HAP com uma variante recente da técnica LIBS, a técnica de espectroscopia óptica OPC-LIBS, através de equações que descrevem as propriedades de plasmas produzidos por laser. Nesse caso, o controle sobre a estequiometria e a relação Ca/P dos alvos de HAP deve ser estabelecido de modo não destrutivo, de forma que as amostras possam ser usadas posteriormente para ablação por PLD. A partir desse propósito, a técnica OPC-LIBS foi aplicada e seus resultados foram validados por comparação com técnicas convencionais de análise elementar (e que exigem digestão parcial da amostra) como as técnicas de AAS e XRF.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

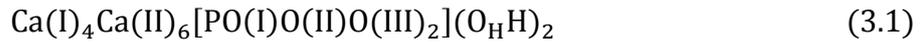
#### 3.1. Biomateriais e Hidroxiapatita

A característica de biocompatibilidade pode ser descrita como a habilidade de um material desempenhar satisfatoriamente uma desejada função em uma aplicação biológica, sem provocar efeito sistêmico ou local indesejado [32]. Em geral, os biomateriais podem ser divididos em três classes primárias: (i) materiais bioativos, que são biocompatíveis e se aderem facilmente aos tecidos do corpo formando ligações químicas e biológicas logo nos estágios iniciais após a implantação. Essa classe compreende a HAP sintética e os vidros cerâmicos. (ii) Os materiais bioinertes, que embora sejam biocompatíveis, não induzem ligações químicas na interface entre o tecido e o implante. Eles também podem exibir adesão e proliferação celular, porém em um grau muito menor do que os materiais bioativos. Exemplos dessa classe de materiais são os implantes compostos de aço inoxidável, zircônia e ligas de titânio. (iii) Os materiais biodegradáveis, que se degradam gradativamente após a implantação e são substituídos por novos tecidos. Exemplos comuns incluem o fosfato tricálcico e polímeros sintéticos biodegradáveis como o PLA (ácido polilático) e o PGA (ácido poliglicólico) [32].

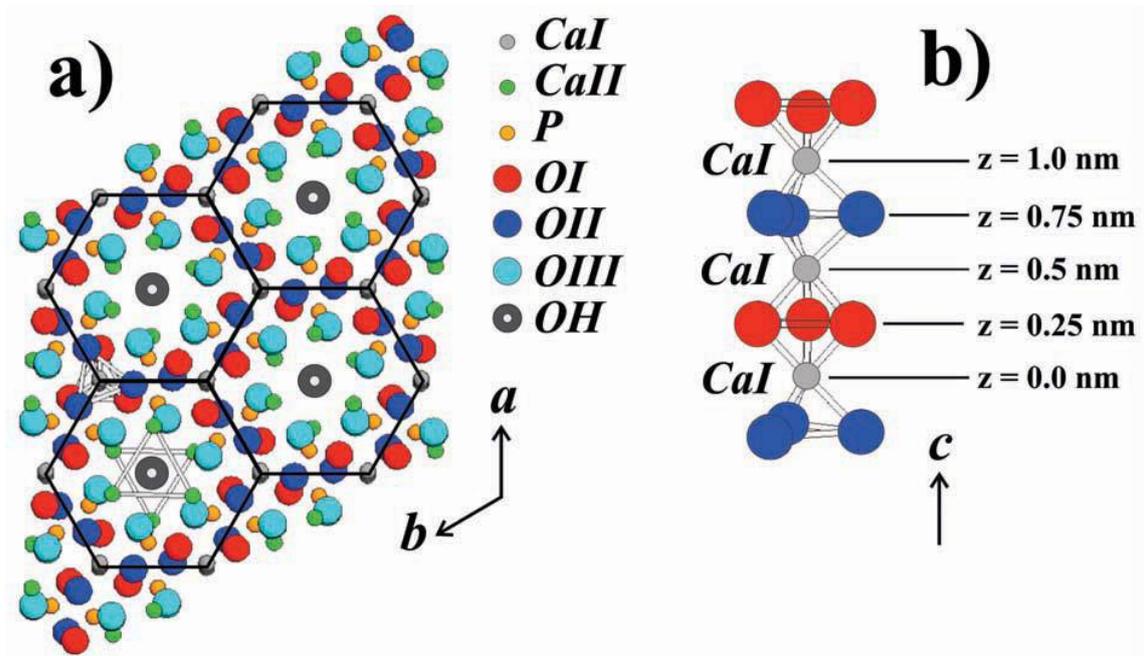
A Hidroxiapatita (HAP) é um fosfato de cálcio hidratado cristalino, sua composição química e estrutura cristalográfica são semelhantes à fase mineral dos ossos e dentes (aproximadamente 70% em volume). Dentre todos os fosfatos de cálcio, a HAP é a mais estável e menos solúvel em meio aquoso [33]. A solubilidade e estabilidade térmica da HAP dependem fortemente da sua composição e da incorporação de impurezas por substituições iônicas e catiônicas na sua estrutura [34, 35]. A decomposição da estrutura em  $\beta$  e  $\alpha$  tricálcio fosfato (TCP) ocorre em temperaturas muito acima de 1100 °C para uma HAP estequiométrica (Ca/P=1,67) e em temperaturas inferiores para HAPs com deficiência em cálcio. O processo de sinterização da HAP e sua transformação em material cerâmico ocorre a partir de 900 °C, com a redução da área específica e porosidade e formação de estrutura granular [34].

A hidroxiapatita HAP, de fórmula unitária  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , cristaliza no sistema hexagonal, grupo espacial  $\text{P6}_3/\text{m}$  com parâmetros de rede:  $a = b = 0,9432 \text{ nm}$  e  $c = 0,6881 \text{ nm}$ . A célula unitária da HAP é formada por dez íons de cálcio  $\text{Ca}^{2+}$ , seis íons de

fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  e dois íons de hidroxila  $\text{OH}^-$ . Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  estão dispostos em dois sítios: quatro íons no sítio do Ca I, e seis íons no sítio do Ca II. Os 24 íons de oxigênio ocupam os sítios OI, OII e OIII na estrutura da HAP. Os 6 íons de fosfato e o grupo  $\text{OH}^-$  ocupam um sítio cada [34]. Considerando os diferentes sítios onde estão o Ca e o O, a fórmula pode ser reescrita como [35]:



O arranjo desses átomos nos planos perpendiculares ao eixo  $c$  é mostrado na Figura 3.1(a). Ao longo das colunas paralelas ao eixo  $c$ , estão os íons hidroxila (eixo OH) e os 4 íons de Ca nos sítios CaI (eixo CaI). Cada CaI ao longo do eixo é conectado com o outro CaI vizinho acima e abaixo, através de 3 átomos de O compartilhados, com sítios de OI de um lado e sítios OII de outro (Figura 3.1b). Os outros 6 átomos de CaII são associados com os grupos OH, e formam coordenações com 1 átomo de OII, 4 átomos de OIII e 1 de  $\text{O}_\text{H}$ . O P tem coordenação com OI, OII e 2OIII formando a estrutura do fosfato  $\text{PO}_4$ , que por sua vez está coordenado com 2 ou 3 átomos de Ca [35, 36].



**Figura 3.1:** (a) Estrutura hexagonal da célula unitária da HAP no plano  $ab$  e (b) colunas de CaI ligadas ao OI e OII ao longo do eixo  $c$  [36].

A característica específica da HAP é que os íons  $\text{OH}^-$  formam canais internos ao longo do eixo  $c$ . Os grupos OH também podem ser substituídos por cloreto ou carbonato

( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{Cl}, \text{CO}_3)$ ), levando à formação de outras formas de apatita com mais alta solubilidade [37]. A hidroxiapatita biológica, presente em tecidos ósseos naturalmente mineralizados, contém íons carbonato ( $\text{CO}_3$ )<sup>2-</sup>, sendo metade deles adsorvidos na superfície do cristal e a outra metade presente no volume, nas posições do ( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup> e do  $\text{OH}^-$ . A substituição é do tipo A quando os íons carbonato substituem parcialmente os íons hidroxila, e do tipo B quando a substituição ocorre no sítio do fosfato [38]. A hidroxiapatita biológica é principalmente do tipo B com uma pequena quantidade do tipo A [32].

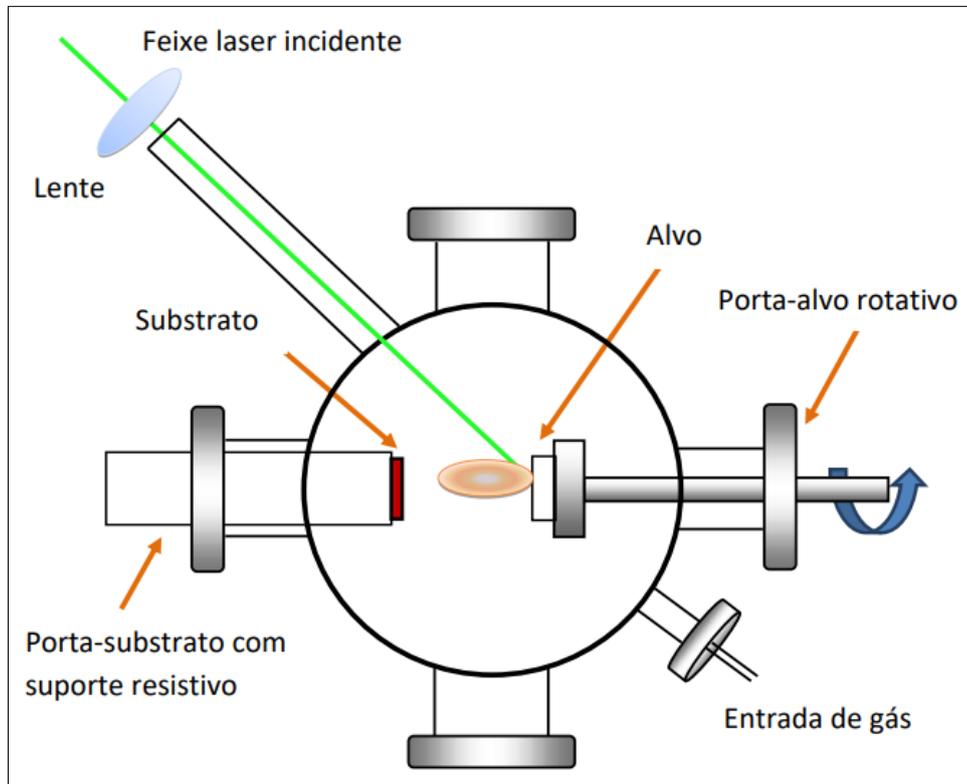
## 3.2. Deposição a laser pulsado (PLD – Pulsed Laser Deposition)

### 3.2.1. Fundamentos da técnica de PLD

A técnica de deposição a laser pulsado (PLD) é considerada simples do ponto de vista experimental. O sistema de PLD consiste de dois suportes, um para o alvo e outro para o substrato, e ambos localizados dentro de uma câmara de vácuo. Um laser de alta potência é usado como uma fonte de energia externa à câmara de deposição. Um conjunto de componentes ópticos é usado para focar o feixe laser sobre a superfície do alvo. Para a entrada do feixe na câmara, é usada uma janela com alta transmitância para todos os comprimentos de onda. O suporte do alvo deve ser acoplado a um sistema de rotação a fim de evitar formação de cratera com a incidência de pulsos sucessivos, e o suporte do substrato pode ser aquecido resistivamente para permitir melhor difusão do material depositado no substrato. Dependendo dos parâmetros do sistema, o recobrimento pode ter a mesma composição do alvo. A Figura 3.2 apresenta um diagrama esquemático de montagem experimental para um sistema de PLD.

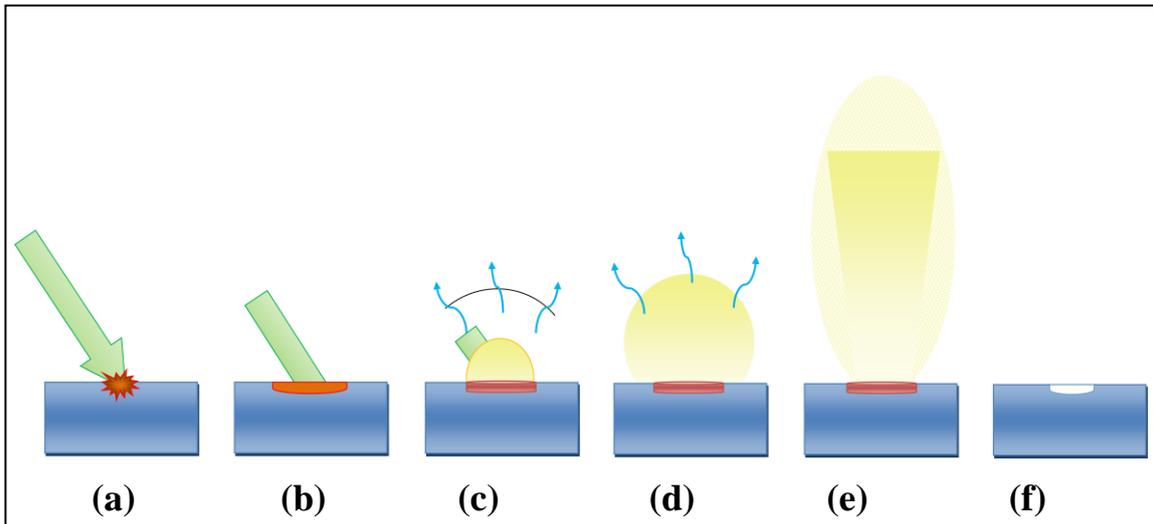
A deposição a laser pulsado é um processo de deposição provocado a partir da interação de um pulso laser com um alvo e envolve fenômenos físicos complexos. O pulso laser com alta densidade de energia é absorvido por um pequeno volume da superfície do alvo. Devido à forte interação, ocorre ejeção de material em direção perpendicular à superfície do alvo. Cada pulso emitido vaporiza e sublima uma pequena quantidade de material criando uma pluma de plasma (Figura 3.3). O plasma geralmente

é formado por átomos, íons, moléculas, além de fragmentos do alvo. Em seguida, o plasma se expande e se condensa no substrato produzindo uma camada fina de recobrimento.



**Figura 3.2:** Esquema de montagem experimental para um sistema de PLD.

O primeiro experimento de PLD foi realizado por Smith e Turner em 1965 com um laser de rubi, e o desenvolvimento da técnica foi impulsionado pela descoberta e evolução dos lasers [14]. Atualmente, o PLD é usado na deposição de óxidos, semicondutores, metais, polímeros e materiais biológicos, e inclusive na produção de nanopartículas em vácuo ou em meio líquido [32]. A simplicidade e flexibilidade do PLD oferecem um grande número de possibilidades de modificar as condições experimentais. Por esse motivo, são diversos os fatores que influenciam a formação e as propriedades dos filmes produzidos por PLD, como por exemplo: as características do material do alvo, os parâmetros do laser (que incluem comprimento de onda, frequência, energia e largura de pulso), a área de interação, a geometria do sistema, a distância alvo-substrato, a atmosfera no interior da câmara de ablação, o tempo de deposição e o tipo e a temperatura do substrato. Dependendo desses parâmetros, o PLD pode fornecer tanto uma deposição a nível atômico quanto altas taxas de deposição.



**Figura 3.3:** Diagrama representativo do processo de interação de um pulso laser com a superfície de um alvo sólido, como ocorre no método de deposição a laser pulsado em vácuo: (a) interação do feixe, (b) absorção e aquecimento: formação de um volume de material derretido, (c) vaporização e ejeção do material: atomização, fragmentação e sublimação, (d) expansão do plasma, (e) ejeção e deposição do material no substrato, (f) formação da cratera no alvo.

### 3.2.2. Vantagens e limitações

A versatilidade da técnica de PLD é comumente apontada como uma grande vantagem, pois o fato de ter a fonte de energia (o laser) independente da câmara de ablação permite escolher diferentes configurações para o sistema. Ele também pode ser operado em conjunto com outras fontes de evaporação em uma abordagem híbrida. Outra vantagem normalmente destacada como uma das mais importantes é a capacidade de transferir a estequiometria do alvo ao recobrimento, inclusive para materiais com estequiometria complexa. Além disso, o PLD pode ser utilizado com atmosfera de gás reativo no interior da câmara de ablação. O gás reativo pode ser usado para participar ativamente da composição química do filme depositado ou para reduzir a energia cinética das espécies do plasma. Geralmente são usados gases inertes ou gases que tem grande influência na formação do filme, como no caso de oxigênio para produção de filmes finos de óxidos. O tipo e a quantidade de gás constituem alternativas que podem ser modificadas para produzir uma fase desejada do recobrimento [14, 32].

Algumas características apontadas como limitações da técnica de PLD são a não uniformidade na espessura do recobrimento produzido e a formação de aglomerados e gotículas no filme. No PLD, a distribuição de espessura dos filmes é não uniforme

devido à natureza de transferência de material da pluma de plasma, mas é simétrica com relação à normal da superfície do alvo e pode ser descrita em termos de uma distribuição  $\cos^n(\theta)$ . Entretanto, várias alternativas são propostas para produzir um PLD de grande área e permitir o seu uso em larga escala. Para citar alguns exemplos, o sistema de ablação pode ser adaptado para permitir uma varredura do feixe no alvo. Outra alternativa é manter o feixe fixo e configurar um movimento de translação em eixos ortogonais x e y para o alvo ou para o substrato [14]. A questão dos aglomerados é abordada com mais detalhes nas Seções 3.2.4 e 3.2.5.

### 3.2.3. Interação da radiação laser com o alvo: processos térmicos e hipertérmicos

No processo de ablação a laser, ocorre uma rápida interação do pulso laser com o alvo. Isso envolve mecanismos de absorção do laser, de dissipação da energia e a consequência no material do alvo depois da irradiação. Todo esse processo depende da duração do pulso laser, e a abordagem é baseada em escalas de tempo de interação. A resposta do material à interação com o feixe laser pode ocorrer em dois regimes [39]:

- 1- Regime térmico, que envolve a abordagem clássica de equilíbrio termodinâmico: aquecimento, derretimento, e conseqüentemente a evaporação térmica.
- 2- Regime hipertérmico, que envolve processos fora do equilíbrio termodinâmico: superaquecimento, explosão de fase e instabilidades entre a superfície e o volume do alvo.

Em processos térmicos o material pode ser analisado como um meio contínuo que, sob absorção da energia do pulso laser  $\Delta E$ , sofre um aumento da sua energia interna  $\Delta U$  dependente da capacidade térmica  $c$  e da massa  $m$  do alvo:  $\Delta E = \Delta U = mc\Delta T$ . O aumento da temperatura  $\Delta T$  é provocado pelas vibrações e quebra das ligações entre átomos e moléculas e favorece as transições de fase do material.

Do ponto de vista atômico, a temperatura é uma medida da energia cinética média dos constituintes do alvo. Depois da primeira excitação por absorção de um fóton, ocorrem muitas colisões de elétrons na rede até que o equilíbrio térmico por colisões seja estabelecido. Isso ocorre em escalas de tempos típicos de 10 a 100 ps. A incidência do laser aumenta a energia dos elétrons do alvo, que por sua vez equilibram as colisões elétron-elétron. As colisões elétron-fônon transferem a energia para a rede,

que equilibra as colisões fônon-fônon. Geralmente, essa transferência de energia dos elétrons para a rede ocorre em escala de tempo muito maior do que a transferência de energia entre elétrons, ou seja, é um processo muito mais lento. Essa abordagem é descrita por equações acopladas no modelo de duas temperaturas que consideram a constante de acoplamento elétron-fônon, e as constantes de capacidade e condutividade térmica para os elétrons e para a rede do cristal. Nessas equações, as condutividades térmicas não são consideradas constantes, mas dependem das temperaturas do elétron e da rede [39].

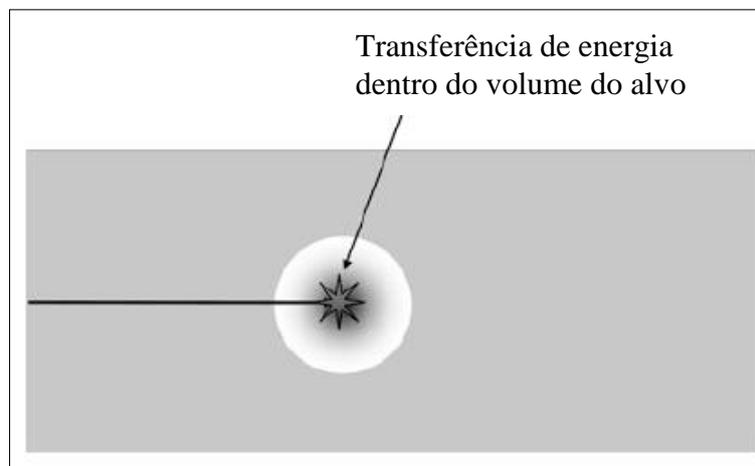
Do ponto de vista clássico, a transferência de calor e conseqüentemente a fusão e evaporação, começam na superfície e é dissipado por difusão térmica no volume do alvo. A excitação acontece no volume de absorção, que é dado pela área de seção transversal do feixe laser e a profundidade de penetração. No entanto, o volume de absorção não corresponde ao volume de ablação, porque nem toda a energia absorvida é usada para evaporar o material. Por isso, a transferência de energia dos elétrons para a rede deve ser considerada em mais detalhes. A energia absorvida pelos elétrons é localmente transferida para os fônons no volume de absorção. A excitação por fônon é dissipada para o volume do alvo por colisões fônon-fônon, aquecendo um volume cada vez maior por difusão térmica, que é dada como um gradiente da temperatura [39].

No PLD, a ablação vai vaporizar a superfície e depositar o filme fino a partir de um valor limiar para a densidade de potência do laser. Dizemos que ocorre evaporação congruente se o volume aquecido, com comprimento de difusão térmica  $L$ , é menor ou igual à espessura da camada ablacionada por cada pulso. O comprimento de difusão térmica  $L$ , na direção perpendicular à área de interação do feixe, é dado por [14]:

$$L[m] = 2\sqrt{D[m^2/s] \times \tau[s]} \quad (3.2)$$

onde  $D$  é a difusividade térmica e  $\tau$  é o tempo de interação da radiação no alvo, determinado pela duração do pulso. Como a evaporação congruente ocorre para um menor volume aquecido, essa condição pode ser obtida com uso de pulsos laser mais curtos e favorece a conservação de estequiometria durante a transferência de massa. Um menor comprimento de onda também fornece menor profundidade de absorção e redução dos aglomerados [14].

Esse modelo assume que existe um tempo entre o início da absorção laser e a vaporização e a duração desse tempo é determinado pela taxa de difusão térmica até que uma temperatura crítica seja atingida. Esse é o modelo mais simples para descrever interações laser-sólido baseado no regime térmico, no entanto não é o que acontece em PLD com alta densidade de potência da radiação laser (tipicamente, acima de  $10^8$  W/cm<sup>2</sup>) [14]. No PLD, essas escalas de tempo dependem muito da duração e intensidade do pulso laser. Sob alta potência do laser, a forte excitação pode fornecer uma alta energia cinética aos elétrons, que penetram no volume do alvo antes que sua energia seja transferida ao fônon e depois convertida em calor. Eles são chamados de elétrons balísticos, pois não perdem sua energia cinética na superfície, mas podem penetrar no volume do alvo. Essa energia fica confinada numa região mais profunda do alvo e rapidamente surge um volume de alta energia envolvido por uma rede fria, que significa um gradiente brusco em termos de ordem atômica (Figura 3.4). O aumento de pressão, por sua vez, aumenta a temperatura e ocorre um superaquecimento e liberação de energia de forma explosiva. Embora esse processo possa ser explicado por princípios termodinâmicos, ele não está em equilíbrio termodinâmico. Esse é um típico processo hipertérmico, de situações que ocorrem em um tempo mais curto do que o tempo necessário para o equilíbrio. Os processos hipertérmicos são caracterizados por rápida acumulação de energia em um volume cercado por uma região mais fria, e a relaxação é rápida e provocada de modo explosivo. Eles são observados para ablação com lasers ultracurtos (<ps) ou com muito alta energia [39].



**Figura 3.4:** Diagrama representativo de um volume de alta energia confinado em uma rede mais fria, típico de um processo em regime hipertérmico [39].

### 3.2.4. Formação dos aglomerados na produção de filmes finos por PLD

No PLD, a pluma de plasma consiste de uma mistura de constituintes altamente energéticos, incluindo átomos, moléculas, elétrons, íons, aglomerados sólidos de tamanho micrométrico e aglomerados fundidos também chamados de gotículas. A ocorrência dos aglomerados e gotículas sobre os filmes produzidos por PLD é uma característica intrínseca do processo e foi observada desde os primeiros experimentos. Por muito tempo, ela foi considerada como um grande problema e apontada como a causa que impedia o desenvolvimento da técnica. Os aglomerados sólidos ou fundidos podem induzir a formação de defeitos durante o crescimento dos filmes e provocar uma morfologia rugosa indesejada. Existem pelo menos três mecanismos que, combinados ou não, causam a formação e deposição dos aglomerados nos substratos [14]:

**1 – Aquecimento em subcamada do alvo:** ocorre se o tempo necessário para transferir a energia do laser em calor é mais curto do que o necessário para evaporar uma camada da superfície. Nessa condição, uma camada abaixo da superfície é superaquecida antes da superfície atingir a fase vapor. Quando a camada superficial vaporiza, micro gotículas da subcamada do alvo são expelidas no substrato.

**2 – Pressão de recuo de uma onda de choque:** Uma onda de choque provocada pela pluma de plasma exerce uma pressão de recuo e expulsa uma camada aquecida da superfície do substrato. Esse mecanismo também forma gotículas micrométricas que se condensam no substrato.

**3 – Esfoliação:** Os aglomerados formados por esfoliação são expelidos do alvo em formato sólido. A taxa de ejeção e o tamanho deles dependem tanto da densidade de potência do laser quanto da morfologia de superfície do alvo. Para a maioria dos materiais, e também para alvos cerâmicos sinterizados, como é o caso do alvo de HAP, a superfície é desgastada pelo acúmulo dos pulsos e pode formar microestruturas de formato alongado nos alvos. Esses detritos podem ser novamente quebrados, ejetados e embutidos na superfície do filme.

Dada a flexibilidade do sistema de PLD, muitas abordagens são propostas para melhorar a morfologia dos filmes reduzindo ou eliminando completamente a ocorrência dos aglomerados, como por exemplo: por uso de filtro mecânico, por manipulação da

geometria de interação entre o feixe e o alvo, aumentando a densidade e superfície do alvo, e outros [14].

### 3.2.5. Nucleação e crescimento dos filmes sob influência de processos hipertérmicos

Em regime de alto vácuo, devido à expansão da pluma de plasma, a cinética de nucleação e crescimento dos filmes, a evolução da sua microestrutura e as suas propriedades são altamente dependentes de características relacionadas às espécies que chegam ao substrato. Essas características são a taxa de deposição e o tipo e energia das partículas condensadas no plasma durante a ablação. Imediatamente após a ablação, as partículas do plasma tem alta energia cinética e podem influenciar muito na formação e crescimento do filme.

As interações entre essas partículas e os sólidos (substratos) que controlam as propriedades dos filmes estão resumidas na Figura 3.5. Essas partículas representam qualquer tipo de espécie atômica que atinge o substrato, como átomos neutros, íons e pequenos aglomerados. Geralmente, as partículas térmicas são aquelas que possuem energia abaixo de 1 eV, enquanto que aquelas que tem energia maior do que 1 keV são os íons acelerados. No intervalo entre elas, na faixa de energia de 1 eV a 1 keV, estão as partículas hipertérmicas e podem ser consideradas as mais típicas em processos de PLD. Alguns dos efeitos provocados por partículas hipertérmicas sobre os filmes produzidos por PLD são [32]:

#### **1- Pré-limpeza de superfície**

Energias típicas de desorção física são  $< 1$  eV e de desorção química são de 1-10 eV. O bombardeamento de partículas com essas energias pode remover contaminantes da superfície e aumentar a adesão do filme no substrato.

#### **2- Crescimento do filme em camadas**

O colapso de aglomerados instáveis com energia 0,1 eV e o deslocamento dos átomos da superfície por colisões balísticas a 10 eV aumentam a mobilidade de átomos adsorvidos, podendo interromper o crescimento por ilhas e favorecer o crescimento do

filme em camadas. Como consequência, pode evitar a absorção de moléculas de gases e água entre as colunas.

### **3- Pulverização**

O limiar de energia das partículas para ejeção de átomos do alvo é inferior a 30 eV para a maioria dos materiais. A pulverização de espécies fracamente ligadas ao filme contribui para formação de uma microestrutura mais densa. Além disso, o material retroespalhado não tem direção de deposição e podem preencher alguns vales que se formam pela ausência de bombardeamento de íons. Esse efeito pode conduzir a mudanças na composição do filme.

### **4- Defeitos estruturais**

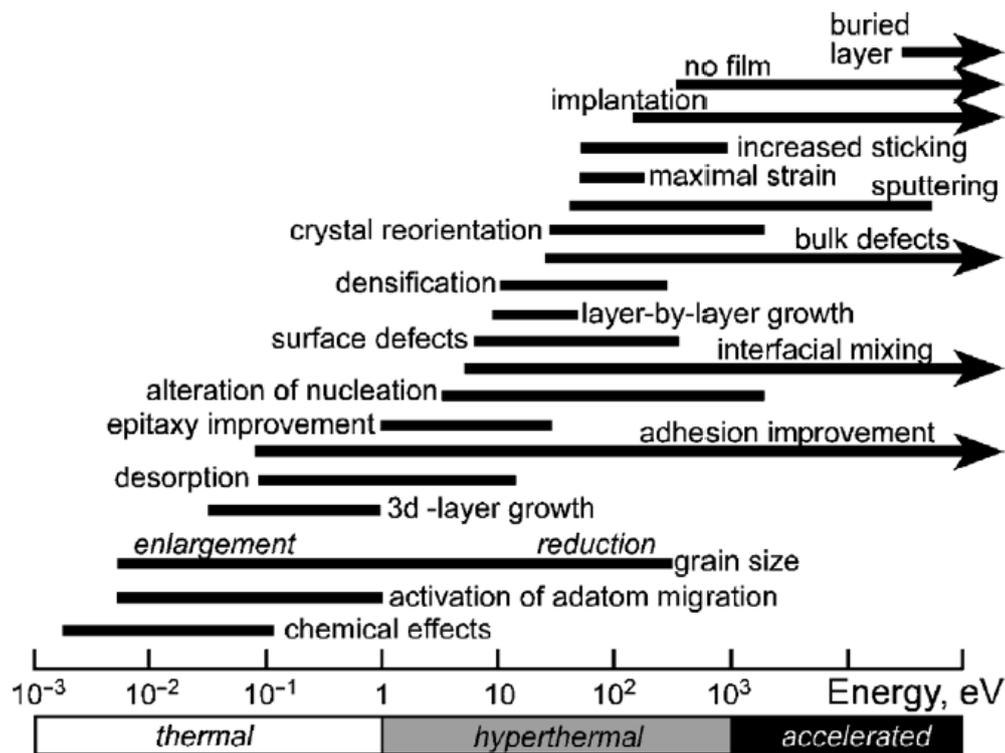
O bombardeamento de íons pode formar defeitos estruturais na superfície e no volume, afetando a microestrutura dos filmes em crescimento.

### **5- Implantação**

As energias de deslocamentos de átomos em metais são da ordem de 20 eV. Para um íon com energia mais alta do que a de energia do deslocamento, eles penetram cada vez mais profundamente no substrato. Isso pode provocar uma nucleação com alta densidade e implantação de mistura de partículas incidentes. Como consequência, pode aumentar a adesão do filme no substrato.

### **6- Modo de crescimento do filme por implantação superficial**

Em vez de serem depositadas na superfície do substrato, as partículas hipertérmicas exibem implantação superficial, ou seja, em poucas camadas inferiores à superfície do material. Como o coeficiente de difusão do volume é bem menor do que o da camada superficial, não pode ocorrer redistribuição significativa dos átomos implantados, em comparação com os átomos na superfície.



**Figura 3.5:** Intervalos de energia para interações entre partículas e sólidos que influenciam mais significativamente as propriedades de filmes finos [32].

Muitos fenômenos induzidos por partículas energéticas podem ocorrer no intervalo de energia hipotérmica (1 a 100 eV). O plasma produzido por PLD não reativo sob alto vácuo, como o produzido neste trabalho para obter os filmes de HAP, representa uma fonte de partículas energéticas na região de energia hipotérmica. Portanto, sob condições que permitem a formação dos aglomerados, o PLD pode ser considerado uma técnica de deposição por feixe de partículas hipotérmicas, que favorecem o crescimento e nucleação dos filmes.

### 3.2.6. PLD aplicado a biomateriais

O uso da técnica de PLD para produção de recobrimentos biocompatíveis teve início com o trabalho de Cottel em 1992. Desde então muitos trabalhos de PLD com HAP produziram resultados importantes e recobrimentos sobre diversos tipos de substratos. Atualmente, na área de biomateriais, o PLD é utilizado com gases inertes, oxigênio, água ou misturas deles, e também com óxido nitroso N<sub>2</sub>O que é mais reativo do que o oxigênio. A espessura típica de um recobrimento é menor do que 1 μm, e a

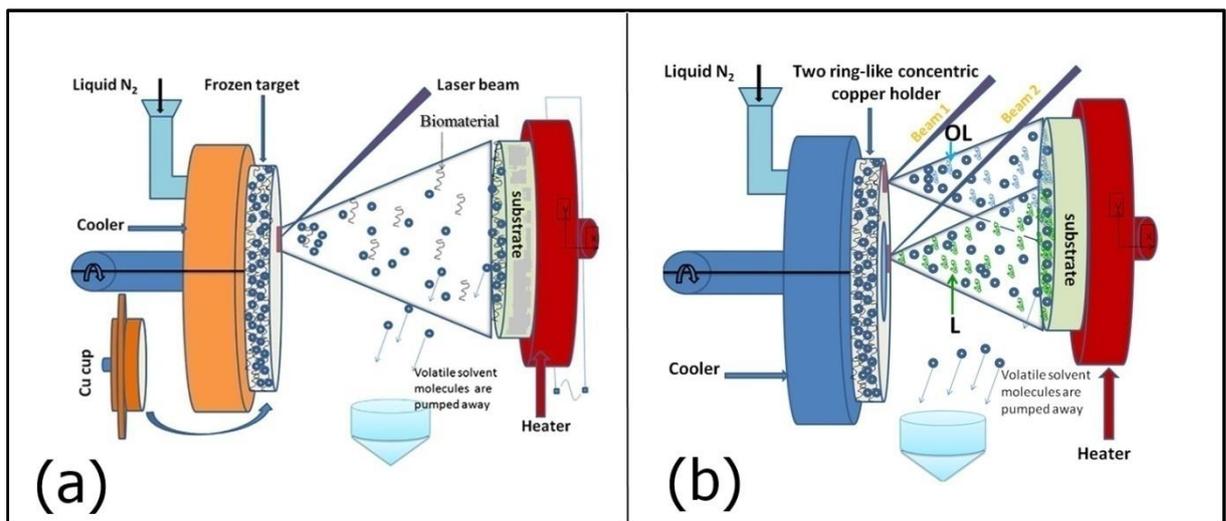
morfologia da superfície pode ser rugosa ou não, uma vez que é fortemente dependente dos parâmetros de deposição e das propriedades do alvo [32].

As principais vantagens associadas à produção de recobrimentos por PLD são: a capacidade de crescer filmes de HAP puros, com alta densidade e cristalinidade, com estequiometria apropriada, razão Ca/P bem controlada, e com excelente aderência e por ser um processo limpo que possibilita controle de temperatura durante o processamento. Além disso, também possui flexibilidade para controlar a morfologia, fase, cristalinidade e composição química de outros componentes de CaP. Como essas características influenciam principalmente as propriedades biológicas, tais como a bioabsorção (ou dissolução envolvida na osseointegração dos recobrimentos), o PLD pode ser usado para fazer biodispositivos em multicamadas, consistindo de diferentes materiais nanoestruturados. Além disso, cerâmicas baseado em HAP nanocristalina (com pequenos tamanhos de grãos) podem apresentar maior resistência e tenacidade, e coeficientes de expansão térmica que praticamente correspondem aos do substrato (Si ou liga de Ti), devido à grande fração de volume de átomos situados nos limites de grão [40]. As principais limitações ainda estão na deposição em grande área e na uniformidade de espessura.

Os parâmetros críticos da técnica para a produção de filmes de CaP são o comprimento de onda do laser, a fluência e a duração do pulso. Os mais diversos tipos de laser com diferentes comprimentos de onda já foram usados para produção desses filmes. No entanto, poucos trabalhos abordaram deposições com fluência acima de 10 J/cm<sup>2</sup> [23,41-43]. Além disso, a maioria utilizou tratamentos térmicos durante e/ou após a deposição. Para os trabalhos produzidos à temperatura ambiente e sem tratamento térmico após a deposição, os recobrimentos não apresentaram a cristalinidade desejada. Abordagens híbridas usando dois feixes laser também já foram testadas. O método de PLD ainda é considerado eficiente e muitos trabalhos nessa área estão concentrados no uso do laser de fs.

O comportamento biológico de um implante é fortemente influenciado por sua química de superfície, que pode ser ajustada através das propriedades dos filmes. Com recentes resultados na área de osseointegração, muitos esforços estão sendo conduzidos em direção de uma nova abordagem do PLD que oferece deposição simultânea de material orgânico e inorgânico. Uma nova geração de recobrimentos bioativos são produzidos por evaporação de matriz assistida por laser pulsado (*MAPLE – Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation*). Nessa abordagem, o feixe laser interage com um

alvo congelado. O alvo é uma matriz que contém moléculas de proteínas em solução (por exemplo, um solvente volátil) e é mantido congelado através de um sistema de refrigeração com nitrogênio líquido. O alvo absorve a energia do feixe UV e o vapor da solução transporta as proteínas em direção ao substrato. As moléculas da solução são eliminadas pelo sistema de vácuo, enquanto os aglomerados de proteínas e sais são transferidos e se condensam no substrato, formando um filme fino. Geralmente a temperatura do substrato é mantida a 30°C para melhor adesão das moléculas e para evaporar as moléculas de água que podem atingir o substrato. Um esquema desse processo pode ser observado na Figura 3.6(a) MAPLE e na Figura 3.6(b) C-MAPLE (*Combinatorial MAPLE*), uma configuração que usa dois lasers para ablação de dois alvos concêntricos. Essa técnica pode ser usada para deposição de drogas, enzimas, citocinas e substâncias farmacêuticas com atividade específica em dispositivos biomédicos, para estimulação direcionada e/ou cicatrização de micro sítios lesionados [44].



**Figura 3.6:** Novas abordagens para uso do PLD na área de biomateriais: (a) MAPLE e (b) C-MAPLE (*combinatorial laser evaporation*) para deposição simultânea de biopolímeros e proteínas [45].

### 3.3. Análise da estequiometria dos alvos de HAP por espectroscopia de plasma induzido por laser

Nesta seção serão apresentados os princípios básicos da análise quantitativa elementar com a técnica LIBS (*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*) e suas

variantes CF-LIBS (*Calibration Free – LIBS*) e OPC-LIBS (*One Point Calibration – LIBS*). A metodologia de análise elementar por OPC-LIBS foi utilizada para cálculo da razão estequiométrica de Ca e P presente nos alvos de HAP.

### 3.3.1. Princípios básicos da análise

A técnica LIBS é um método de diagnóstico elementar a partir da análise da radiação emitida pelo plasma que se origina da interação de um feixe laser intenso com a superfície da amostra. Essa técnica é essencialmente rápida e não destrutiva. Ela não exige a preparação da amostra, que pode ter qualquer formato e estar em estado sólido, líquido ou gasoso.

Uma análise padrão com a técnica LIBS é realizada através de curvas de calibração obtidas de amostras de referência com composição conhecida. Isso só é possível quando a intensidade da radiação emitida por um elemento atômico apresenta uma resposta linear à concentração do elemento na amostra. Essa relação de linearidade nem sempre é satisfeita, devido à propriedade de transitoriedade do plasma. Em alguns casos, é difícil quantificar os componentes de mais alta concentração por causa do chamado efeito-matriz, que são fenômenos não lineares induzidos na intensidade da linha espectral devido a natureza da amostra. Outro fenômeno que representa um problema na análise LIBS é a auto-absorção, que ocorre quando os fótons emitidos pelas espécies atômicas são absorvidos por outros átomos da mesma espécie no plasma. Isso altera a intensidade e o perfil da linha espectral, o que influencia diretamente a determinação da temperatura do plasma e dificulta a análise quantitativa dos elementos principais. Vários métodos foram criados para avaliar e corrigir o efeito da auto-absorção [46-49]. Dessa forma, em uma análise com a técnica LIBS, deve-se selecionar com precisão as linhas de emissão a serem analisadas. Alguns critérios de seleção foram propostos na literatura e são brevemente comentados abaixo [50]:

- Todas as linhas que envolvem transição para o estado fundamental (linhas ressonantes) devem ser excluídas, pois são as mais afetadas pelos fenômenos de auto-absorção.
- Todas as linhas do espectro que apresentem mais alta intensidade quando comparada às demais devem ser consideradas com certo cuidado.

- Todas as linhas com probabilidade de transição inferior a  $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$  não devem ser consideradas para análise quantitativa, uma vez que os correspondentes tempos de emissão podem ser comparáveis ao tempo em que ocorre variações no plasma [51].

A escolha e análise das linhas espectrais devem ser realizadas com muito cuidado, evitando alguns fenômenos não lineares pertinentes ao plasma produzido por laser. Em geral, três aspectos fundamentais devem ser verificados sempre que for realizada uma análise quantitativa ou semi-quantitativa com a técnica LIBS:

### **1- Ablação estequiométrica e homogeneidade do plasma**

Durante a ablação, podem ocorrer efeitos de fracionamento de alguns elementos em função da diferença do ponto de fusão e vaporização dos elementos que compõem o material analisado. Isso depende muito da matriz em estudo e da escolha dos parâmetros de ablação. Para minimizar esses efeitos e realizar uma análise confiável, o processo de remoção de material do alvo para formar o plasma deve ser de forma explosiva (ablação), na qual a temperatura de vaporização da superfície é ultrapassada dentro de uma fração do tempo de duração do pulso laser. Antes que a superfície irradiada possa vaporizar, o material subjacente se aquece e alcança a temperatura de sublimação. O aumento da pressão no pequeno volume irradiado provoca uma explosão sobre a superfície do alvo, a expulsão de material e a formação da pluma de plasma com a mesma composição química do alvo. Sendo assim, a estequiometria do plasma representa a composição da amostra. A definição apropriada dos parâmetros do laser como fluência, comprimento de onda e duração do pulso, é essencial para garantir uma ablação estequiométrica [52][53].

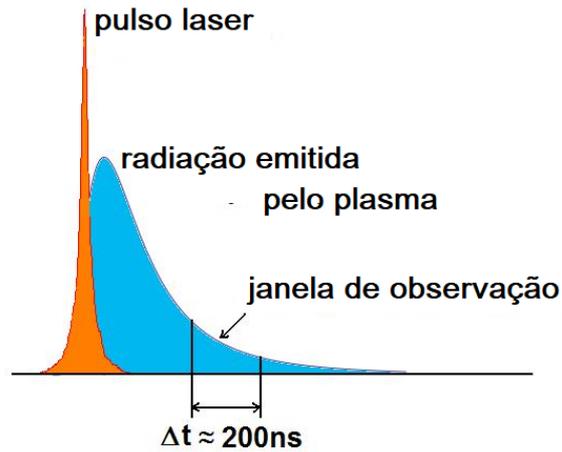
Por outro lado, a homogeneidade do plasma é uma questão mais complexa. De fato, os gradientes espaciais e temporais de temperatura e densidade surgem no plasma devido à sua dinâmica rápida e sua interação com o meio em que foi formado. As zonas periféricas do plasma, mais frias, apresentam um aumento dos processos de recombinação entre íons e elétrons. Como consequência, podem surgir diferenças entre os parâmetros físicos das zonas externa e interna do plasma, mas esses efeitos podem ser contornados através da escolha dos tempos de aquisição do sinal óptico [52].

## 2- Equilíbrio Termodinâmico Local

Para um sistema em equilíbrio termodinâmico, uma mesma temperatura  $T$  é válida para todas as leis de distribuição: de Planck, de população de Boltzmann, de velocidades de Maxwell, e a equação de Saha, que descreve o equilíbrio químico do plasma. Um plasma produzido por laser é dito ser transiente no tempo, ou seja, após receber a energia de um pulso, ele é criado em poucos nanossegundos e evolui em alguns microssegundos até se apagar. Devido a essa natureza transitória, o plasma manifesta um desvio do equilíbrio termodinâmico decorrente da perda de radiação através da emissão espectral e de sua expansão. Com isso, a temperatura e a densidade eletrônicas do plasma gerado por laser também evoluem com o tempo. Se, no plasma, os processos colisionais são mais importantes que os radiativos, ou seja, se pode desprezar a perda por radiação, o plasma é dito estar em equilíbrio termodinâmico local (LTE) [52,54,55]. Nessa condição, se pode considerar que as partículas estão localmente e instantaneamente em equilíbrio que é estabelecido num tempo muito curto quando comparado ao tempo de expansão do plasma. Um plasma transiente pode ser modelado como sendo estacionário ao ser observado depois de decorrido um tempo suficiente em que sua evolução é mais lenta ( $\approx 1 \mu\text{s}$ ), com uma janela temporal pequena o suficiente ( $\approx 200 \text{ ns}$ ) para que a perda de energia seja pequena (Figura 3.7). Nesse estado, digamos quase “estacionário”, a temperatura eletrônica  $T_e$  e a densidade eletrônica  $n_e$  não devem variar apreciavelmente dentro do intervalo de tempo  $\Delta t$ , ou seja:

$$\frac{\Delta T_e}{\Delta t} \approx 0 \quad e \quad \frac{\Delta n_e}{\Delta t} \approx 0. \quad (3.3)$$

Em um plasma no estado de equilíbrio termodinâmico local (LTE), os processos de colisão dominam sobre os processos radiativos, ou seja, um estado excitado tem maior probabilidade de desexcitação por colisão do que por radiação espontânea. As populações e velocidades ainda estão descritas pelas relações de equilíbrio, embora a radiação não seja mais descrita como de corpo negro. Nesse caso, é possível encontrar uma temperatura  $T$  que satisfaça as relações de equilíbrio descritas pelas equações de Maxwell, Boltzmann e Saha.



**Figura 3.7:** Diagrama representativo da evolução do plasma no tempo.

No estado de LTE, deve existir uma densidade mínima de elétrons com maior mobilidade, e as colisões desses elétrons com os átomos e íons do plasma são as responsáveis pela distribuição da energia no interior do plasma. O valor para essa densidade de elétrons,  $n_e$ , pode ser calculado pelo critério de McWhirter dado pela equação [55, 56]:

$$n_e(\text{cm}^{-3}) \geq 1,6 \times 10^{12} \sqrt{T(K)} [\Delta E_{ij}(\text{eV})]^3, \quad (3.4)$$

onde  $T$  é a temperatura do plasma e  $\Delta E_{ij}$  é o intervalo de energia entre os níveis superior  $i$  e inferior  $j$  envolvidos na transição. O critério de McWhirter é apenas uma condição necessária e não suficiente para o LTE, mas seu uso é amplamente documentado [55, 57].

### 3- Plasma opticamente fino

Durante a ablação, o material removido do alvo se expande em direção ortogonal ao alvo e o plasma evolui com o passar do tempo. No início da expansão, o plasma é altamente denso, emite uma radiação contínua e se encontra fora do equilíbrio. Logo depois, o plasma que está evoluindo passa para um regime de equilíbrio colisional com baixa absorção de radiação, onde a maior parte de sua energia é distribuída entre seus átomos e íons pelas colisões com os elétrons livres. Nesse momento o plasma se torna opticamente fino e pode ser descrito por equações de equilíbrio termodinâmico. Um plasma é opticamente fino quando ele é transparente à sua própria radiação, ou seja, a

radiação emitida pelas espécies no plasma o atravessa e escapa sem experimentar uma absorção ou dispersão significativa [52, 57, 58].

Quando um plasma possui alta densidade, ele absorve suas próprias linhas de emissão, e essa auto-absorção tem um efeito negativo no cálculo dos parâmetros do plasma. Esse efeito é conduzido por uma distorção no perfil e na intensidade da linha espectral, aumentando a largura da linha e diminuindo sua altura. Quando isso ocorre com uma linha espectral, dizemos que o plasma é opticamente espesso a esse determinado comprimento de onda. O fenômeno da auto-absorção geralmente afeta as linhas que possuem valores altos de probabilidade de transição e as linhas ressonantes, linhas que estão ligadas ao estado fundamental e possuem baixa energia de excitação. Isso ocorre particularmente para elementos que apresentam uma alta concentração no plasma. Nesse trabalho, a presença de auto-absorção nas linhas é muito pequena e é corrigida pelo emprego do modelo OPC-LIBS, como será visto na Seção 3.3.3.

### 3.3.2. Análise quantitativa por CF-LIBS

A intensidade integrada  $I_{ij}$  de uma linha de emissão óptica de comprimento de onda  $\lambda_{ij}$  está relacionado ao número de portadores no nível superior ou estado excitado  $i$ ,  $n_i$ , por:

$$I_{ij} = F n_i A_{ij}, \quad (3.5)$$

onde  $A_{ij}$  é o coeficiente de emissão espontânea da transição considerada (probabilidade de transição entre os níveis  $i$  e  $j$ ) e  $F$  é um fator experimental que leva em conta a eficiência óptica do sistema de coleta. Para um espectro radiométrico, esse fator é independente do comprimento de onda [59]. Esta relação é válida apenas quando a transição considerada,  $ij$ , é opticamente fina. Em resumo, a intensidade de uma determinada linha de emissão é proporcional à densidade do número de emissores, que por sua vez, é proporcional à concentração do elemento emissor presente na amostra irradiada. Portanto, a concentração de uma dada espécie está linearmente relacionada à intensidade da radiação emitida. Porém, dependendo da matriz da amostra, a linearidade da reta de calibração na análise LIBS pode ser afetada pelos efeitos discutidos anteriormente. Além disso, a reta de calibração exige a preparação de padrões

compatíveis com a matriz da amostra, e essa preparação pode ser inviável ou de difícil fabricação.

Uma alternativa à abordagem LIBS é o método de calibração livre (CF-LIBS), que ainda se baseia na suposição de que o plasma está em LTE, mas a informação quantitativa é obtida através das equações que descrevem o plasma [52, 60]. Na condição de LTE, a densidade do número de emissores é dada pela distribuição de Boltzmann [56]:

$$n_i = \frac{g_i n_s}{Q_s(T)} \exp\left(\frac{-E_i}{kT}\right), \quad (3.6)$$

onde  $g_i$  é o peso estatístico do nível excitado com energia  $E_i$  do qual ocorre a transição,  $n_s$  é a densidade numérica total da espécie  $s$  considerada,  $Q_s(T) = \sum_i g_i \exp(-E_i/kT)$  é a função de partição da espécie  $s$  à temperatura  $T$ , e  $k$  é a constante de Boltzmann. Substituindo a Equação (3.6) na Equação (3.5), temos a relação de dependência da intensidade da linha  $I_{ij}$  com a densidade da espécie no plasma,  $n_s$ :

$$I_{ij} = F n_s \frac{A_{ij} g_i}{Q_s(T)} \exp\left(\frac{-E_i}{kT}\right), \quad (3.7)$$

que pode ser reescrita na forma logarítmica:

$$\ln\left(\frac{I_{ij}}{A_{ij} g_i}\right) = \frac{-E_i}{kT} + \ln\left(\frac{F n_s}{Q_s(T)}\right) \quad (3.8)$$

É possível relacionar a Equação (3.8) com a equação da reta  $y = -ax + b_s$ , identificando as seguintes variáveis:

$$y = \ln\left(\frac{I_{ij}}{A_{ij} g_i}\right) ; \quad a = \frac{1}{kT} ; \quad x = E_i ; \quad b_s = \ln\left(\frac{F n_s}{Q_s(T)}\right) \quad (3.9)$$

Essa linearização é comumente conhecida como ajuste de Boltzmann, onde a temperatura eletrônica do plasma pode ser obtida através da inclinação da reta, e a

concentração da espécie pode ser determinada através do coeficiente linear  $b_s$ . Nesse ajuste, todas as espécies do plasma devem ter a mesma temperatura e o diagrama de Boltzmann para diferentes espécies de um mesmo plasma deve fornecer linhas paralelas com a mesma inclinação e diferentes pontos de interceptação com o eixo  $y$ . Esse método permite a determinação do fator  $F n_s$ , que é obtido a partir dos valores de  $b_s$ . Sendo assim,  $n_s$ , que é a concentração percentual relativa de cada espécie, pode ser obtida pela relação [52, 60]:

$$n_s = \frac{Q_s(T) \exp(b_s)}{F} \quad (3.10)$$

O fator experimental  $F$  é uma constante que leva em consideração a concentração de todas as espécies constituintes da amostra. Ele pode ser determinado pelo procedimento de normalização para as concentrações percentuais de todas as espécies atômicas do plasma [52].

$$\sum_s n_s = \frac{1}{F} \sum_s Q_s(T) \exp(b_s) = 100. \quad (3.11)$$

Geralmente, a energia do laser aplicada nos experimentos não é suficientemente alta para remover mais de um elétron dos átomos. Então a concentração total de um elemento do plasma  $n_T$  é dada pela soma das densidades da sua espécie neutra  $n_I$  com a espécie uma vez ionizada  $n_{II}$ ,

$$n_T = n_I + n_{II}. \quad (3.12)$$

Quando são identificadas apenas as linhas espectrais atômicas, ou seja, as linhas das espécies ionizadas não aparecem na faixa espectral observada, é possível ainda encontrar a densidade das espécies iônicas pela equação de Saha [52]:

$$\frac{n_{II}}{n_I} = \frac{(2\pi m_e kT)^{3/2}}{n_e h^3} \frac{2Q_{II}(T)}{Q_I(T)} \exp\left(-\frac{E_{ion}}{kT}\right), \quad (3.13)$$

onde  $m_e$  é a massa do elétron,  $n_e$  é a densidade de elétrons,  $h$  é a constante de Planck,  $Q_I(T)$  e  $Q_{II}(T)$  são as funções de partição das espécies neutra e iônica, respectivamente, e  $E_{ion}$  é a energia de ionização do elemento neutro.

A precisão na determinação da temperatura do plasma afeta fortemente os resultados da composição da amostra obtida pelo método de CF-LIBS. Geralmente, a temperatura do plasma é determinada através de um ajuste de Boltzmann, que fornece um valor com grande imprecisão por ter em conta apenas as linhas de uma espécie atômica durante os cálculos. Um método mais confiável e que apresenta uma maior precisão é o diagrama de Saha-Boltzmann [52, 61]. Ele é obtido ao se combinar as Equações (3.8) e (3.13), onde são consideradas, no mesmo ajuste, as linhas espectrais atômicas e iônicas. Nesse ajuste, as coordenadas são dadas por:

$$y = \ln\left(\frac{I_{ij}}{A_{ij}g_i}\right) - z \ln\left[\frac{2}{n_e}\left(\frac{2\pi m_e kT}{h^2}\right)^{3/2}\right] \quad (3.14)$$

e

$$x = E_i + zE_{ion} \quad (3.15)$$

onde  $z = 0$  para átomos neutros e  $z = 1$  para íons.

No diagrama de Saha-Boltzmann, a energia de ionização do átomo é adicionada aos valores de energia para os níveis superiores dos íons (Equação 3.15). Assim, a distância no eixo da energia, entre o grupo de pontos ligados aos átomos neutros e aos íons, aumenta, afastando os pontos, e permitindo um ajuste linear mais preciso. Como o valor da temperatura está ligado ao coeficiente angular da reta, isso acarretará na determinação de uma temperatura com uma maior precisão. No entanto, para obter o valor da temperatura a partir da inclinação da reta no diagrama de Saha-Boltzmann, se faz necessário conhecer o valor da densidade do plasma  $n_e$ . Como a segunda parte da Equação (3.14) depende da temperatura, a única forma de resolvê-la é de uma forma iterativa em que o processo é iniciado com uma temperatura inicial  $T_{el}$ , mais imprecisa. Este valor inicial é obtido por um ajuste de Boltzmann. O diagrama de Saha-Boltzmann é bem condicionado e geralmente converge em aproximadamente cinco iterações [62].

Para se realizar um diagrama de Saha-Boltzmann se faz necessário que um dentre os elementos presentes no plasma apresente linhas de emissão atômica e iônica na faixa

espectral observada, e que estas linhas possuam probabilidades de transição experimentalmente determinadas, além do conhecimento prévio da densidade eletrônica do plasma. A densidade eletrônica do plasma é calculada a partir do alargamento Stark associado à linha H $\alpha$  [63]. Isso é possível porque o alargamento das linhas emitidas pelo átomo de hidrogênio depende fortemente da densidade das partículas carregadas em seu entorno [56]. A partir de uma aproximação semi-empírica, a seguinte equação foi determinada [64]:

$$n_e \approx 9,77 \times 10^{22} (\Delta\lambda_{Stark}^{H\alpha})^{1,39} \quad (3.16)$$

onde  $\Delta\lambda_{Stark}^{H\alpha}$  é a largura à meia altura (FWHM) da componente lorentziana da transição.

Para que a abordagem CF-LIBS seja utilizada em medidas quantitativas, as premissas mencionadas na Seção 3.3.1 (de ablação estequiométrica, de condição LTE, de homogeneidade do plasma e de o plasma ser opticamente fino) devem ser rigorosamente obedecidas. A precisão das medidas quantitativas com o método CF-LIBS depende muito do conjunto de suposições apresentadas e pode fornecer apenas resultados semi-quantitativos quando elas não são rigorosamente satisfeitas [65, 66]. Em uma recente publicação de 2016 [67], um grupo italiano fez uma comparação entre três métodos baseados na técnica CF-LIBS. Nesse artigo, foi demonstrado que o método de calibração por um ponto OPC-LIBS apresenta os melhores resultados analíticos. Esse método, descrito na Seção 3.3.3, foi utilizado para obter a estequiometria dos alvos de HAP através de uma análise quantitativa dos elementos Ca e P e posterior verificação da relação Ca/P.

### 3.3.3. O método de calibração por um ponto OPC-LIBS

O ponto de partida do método OPC-LIBS é a equação de Boltzmann (Equação 3.7), que sob a condição de LTE descreve a dependência da intensidade das linhas de emissão com a concentração elementar da espécie analisada [31]. No modelo CF-LIBS, o fator experimental  $F$  é identificado como uma constante de proporcionalidade entre a intensidade medida da linha e a intensidade "real" emitida pelo plasma. Ele é determinado através de uma calibração radiométrica e carrega a eficiência espectral do

sistema de detecção e sua dependência com o comprimento de onda. A abordagem de calibração por um ponto OPC-LIBS parte da consideração de que o parâmetro  $F$  poderia ser redefinido para incluir correções de incerteza dos parâmetros  $A_{ij}$ , correções devido a erros de calibração e pequenas correções de auto-absorção. Sendo assim, a definição de um novo parâmetro  $P(\lambda)$  dependente da transição considerada e que carrega todas essas correções, é determinado a partir de uma única amostra padrão de composição conhecida e permite realizar uma análise mais precisa das amostras com composição desconhecida.

Para determinar o parâmetro  $P(\lambda)$  de uma linha de emissão, partimos da hipótese de que a densidade de uma espécie do plasma determinada por CF-LIBS,  $n_s$ , é diferente do valor real,  $n'_s$ , e a relação entre elas pode ser expressa por [31]:

$$n'_s = \frac{n'_T}{n_T} n_s, \quad (3.17)$$

onde  $n_T$  é a densidade do elemento obtida por CF-LIBS e  $n'_T$  é a densidade real do elemento na amostra analisada. Então o termo  $n'_T/n_T$  é apresentado como a razão que corrige o valor da densidade obtida por CF-LIBS do real valor da densidade da espécie na amostra.

Se multiplicarmos os dois lados da Equação (3.7) por  $n'_T/n_T$  e linearizarmos em um gráfico de Boltzmann, temos:

$$\ln\left(\frac{I_{ij}}{A_{ij}g_i} \frac{n'_T}{n_T}\right) = \frac{-E_i}{kT} + \ln\left(\frac{Fn_s}{Q_s(T)}\right) + \ln\left(\frac{n'_T}{n_T}\right), \quad (3.18)$$

que pode ser identificada como a equação de uma reta,  $y' = -ax + b_s + \ln(n'_T/n_T)$ . Essa nova reta é um deslocamento da primeira reta apresentada na Equação (3.8), com variação no coeficiente linear. A diferença entre as duas retas é dada por:

$$y' - y = \Delta y = \ln\left(\frac{n'_T}{n_T}\right), \quad (3.19)$$

onde  $\Delta y$  é identificado como o deslocamento do ponto  $y = \ln(I_{ij}/A_{ij}g_i)$  para o novo valor corrigido  $y' = \ln(I_{ij}n'_T/A_{ij}g_in_T)$ , como pode ser visto na Figura 3.8. Esse

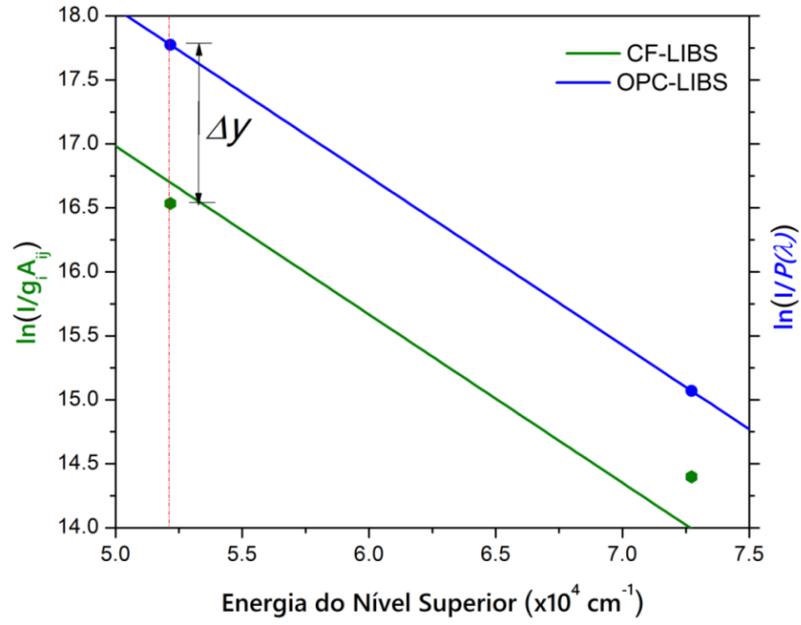
deslocamento dá origem a uma nova reta, e terá um valor diferente corrigindo os erros experimentais para cada ponto no diagrama de Boltzmann. Esse valor é usado para determinar o fator  $P(\lambda)$  correspondente a cada linha espectral estudada:

$$P(\lambda) = A_{ij}g_i \exp(-\Delta y). \quad (3.20)$$

Portanto, encontrar os valores  $\Delta y$  com uma amostra padrão é o mesmo que determinar o fator de correção  $n'_T/n_T = \exp(\Delta y)$  para cada linha espectral das espécies do plasma. Uma vez obtidos os valores de  $P(\lambda)$ , as amostras desconhecidas são analisadas por CF-LIBS convencional através de um novo gráfico de Boltzmann produzido com os  $P(\lambda)$  encontrados no lugar do  $g_i A_{ij}$ :

$$\ln\left(\frac{I_{ij}}{P(\lambda)}\right) = \frac{-E_i}{kT} + \ln\left(\frac{c^{te} n_s}{Q_s(T)}\right). \quad (3.21)$$

Na análise por OPC-LIBS, as possíveis variações de correção dos parâmetros do plasma (temperatura, densidade, composição) são levadas em consideração e são totalmente compensados dentro dos valores de  $P(\lambda)$ . Como essas variações estavam também presentes na amostra padrão, e a amostra padrão fornece um novo valor de  $y'$ , então os resultados obtidos para as amostras desconhecidas não terão a contribuição dessas variações.



**Figura 3.8:** Diagrama representativo para a determinação de  $\Delta y$ , que é a distância entre o valor da medida realizada por CF-LIBS (ponto verde) e a reta calibrada pela amostra padrão no método OPC-LIBS (linha azul).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Síntese da HAP

A síntese de HAP estequiométrica (Ca/P=1.67) foi produzida no Laboratório de Materiais Biocerâmicos do CBPF, conforme procedimentos pré-estabelecidos [34]. O material foi preparado através do método de precipitação por via úmida ( $T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $\text{pH} = 11$ ) a partir de soluções aquosas de nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e fosfato diamônico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ). Após 2 horas, o material precipitado foi separado por filtração, lavado repetidamente com água deionizada fervida (marca Milli-Q) e submetido à secagem a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Após a secagem, o pó foi manualmente macerado e peneirado dentro de uma câmara de fluxo laminar. O material resultante possui partículas com granulometria entre  $77\text{ }\mu\text{m}$  e  $210\text{ }\mu\text{m}$ .

### 4.2. Preparação dos alvos de HAP

Os alvos foram preparados com 5 g de HAP em pó prensada a 5,6 toneladas, em matriz de diâmetro 3,5 cm, formando pastilhas cilíndricas de 0,4 cm de espessura. Em seguida, essas pastilhas foram densificadas por sinterização em forno tipo mufla Carbolite, modelo CWF1300, da Sala de Fornos do CBPF. O procedimento consistiu de aquecimento com rampa de  $3^{\circ}/\text{min}$ , permanecendo em  $700\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, seguido de rampa de  $1^{\circ}/\text{min}$  até  $1150^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Em seguida, as pastilhas permaneceram por 16 horas sob a inércia de resfriamento do forno. Como resultado deste processo, foram obtidas pastilhas cilíndricas de HAP (Ca/P=1,67) com diâmetro de 2,6 cm, espessura de 0,3 cm e densidade de  $2,8\text{ g/cm}^3$ .

### 4.3. Análise da estequiometria dos alvos de HAP

As pastilhas de HAP produzidas neste trabalho foram usadas para a produção de filmes finos pela técnica de PLD. A característica de transferência da estequiometria do alvo ao recobrimento é apontada como uma das principais vantagens dessa técnica. Por esse motivo, investigar a estequiometria dos alvos é importante para garantir a

composição dos recobrimentos produzidos. A estrutura cristalina, composição química e estequiometria da HAP são parâmetros controlados durante a síntese do pó, porém eles podem mudar durante a prensagem e sinterização da pastilha. Assim, a estequiometria das pastilhas já preparadas foi analisada de forma rápida e não destrutiva através de uma variante da técnica CF-LIBS (Calibration Free - Laser Induced Breakdown Spectroscopy), conhecida como OPC-LIBS (One Point Calibration - Laser Induced Breakdown Spectroscopy). Nesse trabalho, a estequiometria de seis alvos de HAP foi analisada e os resultados foram comparados com os obtidos por fluorescência de raios-X (XRF), UV-Vis e absorção atômica (AAS). Devido à característica destrutiva dessas últimas, ou seja, a necessidade de se utilizar uma parte da amostra para digestão em solução, a técnica OPC-LIBS se faz mais vantajosa. A comparação dos resultados obtidos com as diferentes técnicas permitiu a validação da metodologia de análise elementar apresentada neste trabalho e que se aproveita da técnica não destrutiva OPC-LIBS.

#### 4.3.1. Análise estequiométrica por XRF, UV-VIS e AAS

As análises de Fluorescência de Raios-X (XRF), Espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-VIS) e Absorção Atômica (AAS) foram realizadas no Laboratório de Espectrofotometria do CBPF. A técnica analítica de Espectrometria de Absorção Atômica com chama (AAS) foi utilizada para quantificar o elemento cálcio, e UV-VIS para quantificar o fósforo. Ambos os elementos também foram analisados por (XRF).

Nas análises por AAS foi utilizado o espectrômetro modelo AA-6800 da Shimadzu. As amostras foram preparadas em triplicata, por solubilização total (digestão da amostra) em ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ). A análise do cálcio foi realizada em chama de gás acetileno ( $\text{Ar-C}_2\text{H}_2$ ) com fluxo de 2 litros/min no comprimento de onda de 422,7 nm. O fósforo foi analisado por espectrômetro de UV-visível modelo UV-1800 da Shimadzu. A amostra foi tratada com solução de metavanadato de amônio, medindo a absorbância do P em 420 nm. Nas duas análises a leitura foi realizada com curvas de calibração obtidas a partir de padrões de alta pureza da MERCK.

A análise por espectrometria de Fluorescência de Raios-X (XRF) foi realizada com equipamento da Panalytical modelo AxiosMAX, com 3,0 kW de potência, detector sequencial por dispersão de comprimento de onda. As amostras foram quantificadas em

um programa de análise semi-quantitativo utilizando o software Omnian. Os padrões de calibração são preparados exclusivamente para esse programa, que abrange uma varredura completa entre o F e U. A concentração dos elementos é obtida com base nas intensidades de raios-X fluorescentes emitidos pelos elementos presentes dentro de uma área pré-estabelecida da amostra. O detector de fluxo é um detector a gás metano usado para analisar elementos leves. O detector e o cristal são escolhidos de acordo com os elementos que se deseja quantificar e as condições usadas para dosagem do Ca e P são apresentadas na Tabela 4.1:

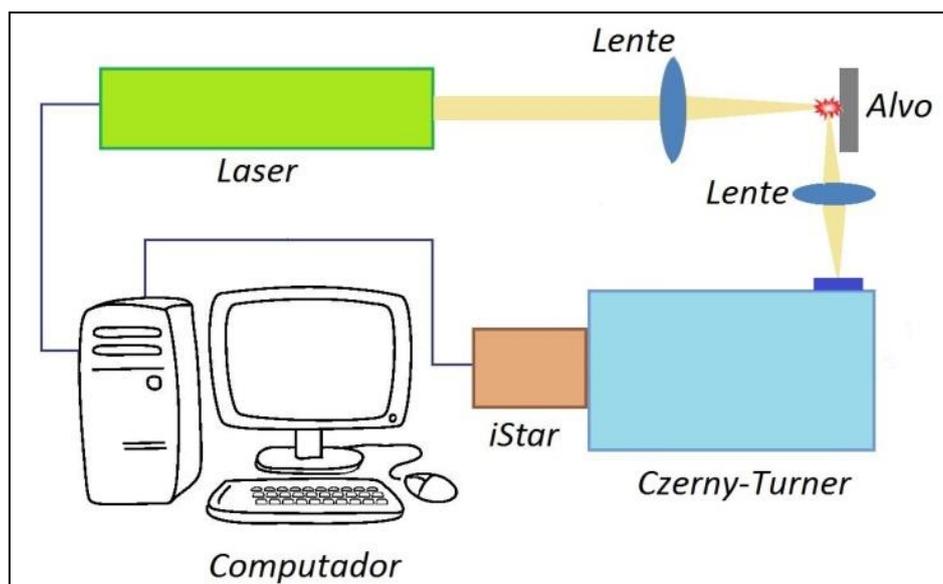
**Tabela 4.1:** Condições para quantificação do cálcio e do fósforo por XRF.

Elemento	Linha	Cristal	Colimador	Detector	kV	mA	ângulo(°)
Ca	$k\alpha$	LiF 200	150 $\mu\text{m}$	Flow	30	70	113,048
P	$k\alpha$	Ge 111	550 $\mu\text{m}$	Flow	24	90	140,985

#### 4.3.2. Análise estequiométrica por OPC-LIBS

Para análise da estequiometria por OPC-LIBS, o primeiro passo é obter os espectros LIBS de cada amostra. Esses espectros foram obtidos no Laboratório de Plasma e Espectroscopia da Universidade Federal Fluminense, RJ. A montagem experimental para uma análise por LIBS é apresentada na Figura 4.1. A configuração constitui de: (1) uma fonte de radiação laser Nd:YAG Q-switched, com pulso de 6 ns e comprimento de onda de 1064 nm; (2) duas lentes ópticas; (3) um monocromador tipo Czerny-Turner que está acoplado a uma câmera intensificada (ICCD) e (4) um computador.

Durante os experimentos, um pulso laser de 1064 nm, 6 ns de largura e 100 mJ de energia foi focalizado sobre o alvo de HAP com uma lente biconvexa de 200 mm, formando um plasma sobre a sua superfície. A luz emitida pelo plasma é recolhida e focada através de uma lente óptica (também de 200 mm) diretamente sobre a fenda de entrada do monocromador. Os parâmetros de aquisição do sinal (tempo de aquisição, tempo de retardo entre o início do plasma e a abertura da ICCD, e o número de acumulações dos espectros) são ajustados via software por meio do computador que se encontra conectado ao espectrógrafo. Nesse caso, os espectros ópticos foram obtidos com uma janela temporal de 200 ns, retardo de 2  $\mu\text{s}$  em relação à incidência do pulso laser sobre a amostra e acumulação de 100 espectros.



**Figura 4.1:** Configuração experimental para análise da estequiometria dos alvos de HAP pela técnica de OPC-LIBS.

Uma vez obtidos os espectros para cada amostra, uma análise CF-LIBS foi realizada com os seguintes passos: 1) escolha das linhas espectrais dos elementos em análise; 2) determinação das suas intensidades; 3) cálculo da densidade eletrônica do plasma; 4) cálculo da temperatura eletrônica do plasma através do plot de Saha-Boltzmann; 5) determinação dos valores de densidade percentual para cada espécie atômica do Ca e do P; 6) quantificação elementar das amostras.

Na análise por OPC-LIBS, a amostra Ap foi escolhida como padrão, pois apresentou  $\text{Ca/P} = 1,67$  de acordo com a quantificação por XRF, AAS e UV. A partir dos valores obtidos por CF-LIBS com a amostra padrão, o procedimento descrito na Seção 3.3.3 (OPC-LIBS) foi usado para calcular os parâmetros  $P(\lambda)$  das demais amostras: A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7.

#### 4.4. Preparação e tratamento dos substratos de Si, Ti e PLA

O protocolo de limpeza dos substratos de Si (001) de 1,2 x 1,2 cm foi realizado com água deionizada e detergente extran na proporção 1:1 em ultrassom por 10 min, 3 lavagens com água deionizada no ultrassom por 8 min cada, em acetona no ultrassom por 10 minutos e secagem com gás nitrogênio comprimido. Em seguida, foram tratados na seguinte sequência: imersão em solução de 5% de HF (ácido hidrofúorídrico) + água

deionizada por 30 segundos, três lavagens com água deionizada no ultrassom por 8 min cada e secagem com gás nitrogênio comprimido [34, 68].

Para os substratos de Ti, pastilhas de 2 mm de espessura foram cortadas a partir de uma peça cilíndrica de titânio puro comercial de 12 mm de diâmetro. O seguinte procedimento de limpeza foi adotado [34, 68]: água deionizada e etanol na proporção 1:1 em ultrassom por 10 min, secagem com ar nitrogênio comprimido, jateamento com partículas de sílica, água deionizada no ultrassom por 15 min, em acetona no ultrassom 15 min, imersão em solução de 2% de HF (ácido fluorídrico) + 8% de HNO<sub>3</sub> (ácido nítrico) + água deionizada no ultrassom por 6 min, três lavagens em água deionizada no ultrassom por 8 min cada e por fim, secagem com gás nitrogênio comprimido. Os substratos de Ti serão usados para os testes biológicos de solubilidade e cultura celular.

Substratos de poliácido láctico (PLA) com diâmetro de 1,2 cm foram obtidos por tecnologia aditiva em impressora 3D do CBPF, usando filamento de biopolímero comercial modelo 4043D da Ingeo™ [69]. Para a limpeza, utilizou-se apenas etanol e água deionizada por 15 min em ultrassom.

#### 4.5. Produção dos recobrimentos de HAP por PLD

Todos os recobrimentos foram produzidos no Laboratório de Plasma Aplicado do CBPF. A montagem experimental e os equipamentos utilizados são mostrados na Figura 3.10. As deposições foram feitas em câmara de alto vácuo de aço inox montada no CBPF [68]. A câmara está equipada com um suporte de substrato acoplado a um aquecedor resistivo, que permite aquecer o substrato até 800°C. Possui também um suporte para seis alvos com movimentos de translação e rotação e uma janela de vidro com alta transmitância em banda larga que permite realizar medidas de espectroscopia de emissão do plasma. A pressão da câmara pode chegar a 10<sup>-6</sup> Pa (10<sup>-8</sup> mbar). A fonte utilizada é um laser Nd:YAG Brilliant b da Quantel com duração de pulso de 5 ns e frequência de até 10 Hz. Um sistema óptico com lentes e espelhos para o comprimento de onda de 532 nm (laser verde) foi utilizado para orientar e direcionar o feixe com ângulo de incidência de 45° e ponto focal de 1 mm<sup>2</sup> sobre a superfície do alvo.



**Figura 4.2:** Montagem experimental para a produção dos recobrimentos de HAP: laser Nd:YAG, espelhos e lentes para  $\lambda=532$  nm e a câmara de deposição por PLD.

Considerando a aplicação proposta neste trabalho de tese, os parâmetros do sistema de deposição foram explorados a fim de encontrar a melhor condição para a produção de recobrimentos cristalinos de HAP por PLD com laser de Nd:YAG 532 nm. Diferentes séries de filmes foram produzidas, enquanto variava-se um parâmetro mantiveram-se fixos os demais (Tabela 4.2). Neste trabalho, os seguintes parâmetros foram considerados: energias de 100 a 380 mJ, distâncias de 2 cm, 3 cm e 4 cm entre alvo e substrato, tempos de deposição de 1 min a 20 min, pressão ambiente de  $10^{-4}$  mbar e  $10^{-6}$  mbar e tratamento térmico *in situ* de 200 °C, 400 °C, 600 °C e 800 °C. Para algumas amostras também foram realizados tratamentos térmicos após a deposição. A melhor condição de deposição à temperatura ambiente foi usada para os ensaios biológicos sobre substratos de Ti e PLA.

**Tabela 4.2:** Séries de amostras de Si/HAP produzidas sob diferentes condições de deposição.

Séries	Energia (mJ)	Tempo (min)	Distância (cm)	Pressão (mbar)	Temperatura (°C)
Primeira	100;150;200; 250;300;350;380	5	3	$3 \times 10^{-6}$	25
Segunda	250	0,25;0,5;1;2;3;4	3	$3 \times 10^{-6}$	25
Terceira	300	0,25;0,5;1;2;3;4	3	$3 \times 10^{-6}$	25
Quarta	250	5	2; 4	$3 \times 10^{-6}$	25
Quinta	300	5	2; 4	$3 \times 10^{-6}$	25
Sexta	250	5	2; 3; 4	$10^{-4}$	25
Sétima	300	5	2; 3; 4	$10^{-4}$	25
Oitava	250	5	3	$3 \times 10^{-6}$	200;400;600;800
Nona	300	5	3	$3 \times 10^{-6}$	200;400;600;800

## 4.6. Caracterização físico-química dos filmes produzidos

Os filmes foram caracterizados quanto à composição química, as fases minerais presentes e o grau de cristalinidade através das técnicas de Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios-X (XPS). A espessura, morfologia de superfície e rugosidade foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM). A adesão dos recobrimentos sobre os substratos de Si e PLA foi analisada por método com fita (tape test).

### 4.6.1. Difração de raios-X (XRD)

A análise estrutural por Difração de Raios-X por Incidência Rasante foi realizada no CBPF em equipamento X-Pert Pro da Panalytical com fonte de radiação Cu ( $K_{\alpha}$ ) e  $\lambda = 0,154$  nm e no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) do Centro de Pesquisas em Materiais (CNPEM) em Campinas-SP. No LNLS, a fonte de radiação síncrotron monocromática da linha XRD2, com energia de 9 keV ( $\lambda = 0,13775$  nm) fornece maior incidência de fótons sobre a amostra. Dessa forma, o difratograma

apresenta maior relação sinal ruído e menor alargamento dos picos de difração, em comparação com o sinal obtido por difratômetro comerciais com fonte de Cu ( $K_{\alpha}$ ). O modo GIXRD (Grazing Incidence X-Ray Diffraction) foi utilizado com ângulo de incidência fixo em  $\theta = 0,5^{\circ}$  e área da fenda incidente de  $1,0 \text{ mm}^2$  ( $2 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm}$ ). Esse modo é geralmente usado para filmes de pouca espessura a fim de aumentar o volume de interação dos fótons incidentes com o material do filme e evitar o sinal dos substratos. Para cada amostra, o detector ( $2\theta$ ) com fenda de entrada de  $0,5 \text{ mm}$  varreu o intervalo de  $8^{\circ}$  a  $55^{\circ}$  com passo de  $0,025^{\circ}$  no tempo de aproximadamente 40 minutos (120.000 contagens/passos). A posição dos picos e a identificação dos índices de Miller foram determinadas utilizando a ficha ICDD número 84-1998.

A cristalinidade relativa entre as amostras foi calculada através da razão entre a contribuição de área dos picos de difração e a área total dentro de um intervalo  $2\theta$  entre  $15^{\circ}$  e  $35^{\circ}$ . Esse intervalo é suficiente porque compreende tanto a contribuição nanocristalina quanto os principais picos de difração da HAP [70].

#### 4.6.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de

Fourier (FTIR) A técnica de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de espectroscopia molecular por energia vibracional que permite identificar características como a composição, algumas impurezas e grau de cristalinidade dos filmes através dos modos de vibração dos grupos iônicos ou moleculares. Foi utilizado o espectrômetro Shimadzu IR-Prestige 21 do CBPF. Para operação no modo de transmissão, os filmes de HAP com aproximadamente  $150 \text{ nm}$  de espessura foram depositados sobre uma fina pastilha de KBr, que é transparente ao infravermelho. Os espectros foram obtidos em uma área  $300 \times 300 \mu\text{m}$ , com comprimento de onda variando de  $400$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$  e com 300 varreduras por amostra. Foram feitas as correções de *smoothing* e atmosférica ( $\text{CO}_2$ ) de acordo com cada amostra.

As amostras de PLA/HAP foram analisadas com o espectrômetro conectado a um microscópio AIM 8800 operando em modo de reflectância total atenuada (ATR – attenuated total reflection). Os espectros foram obtidos em uma área  $432 \times 332 \mu\text{m}$ , 300 varreduras por amostra e com comprimento de onda variando de  $450$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ .

### 4.6.3. Espectroscopia de Fotoelétrons por raios-X (XPS)

A composição elementar e de ligações químicas entre os elementos na superfície do recobrimento foi analisada por Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios-X (XPS) através do espectrômetro SPECS PHOIBOS 100/150 com um analisador hemisférico de 150 mm operando com fonte de raios-X de radiação policromática Al ( $K_{\alpha}$ ) de energia 1486,6 eV e ângulo de tomada de captura de 30°,  $E_{\text{pass}}$  de 30,0 eV, com até 0,5 eV de energia/passos para o espectro total (*survey*) e 0,02 eV de energia/passos para os espectros de alta resolução sobre o pico de cada elemento analisado. A deconvolução dos picos envelopes nos espectros de alta resolução foi realizada através do software CASA-XPS e banco de dados NIST XPS para as energias de ligação dos picos C 1s, Ca 2p, P 2p, e O 1s. A energia de calibração utilizada durante os experimentos foi do carbono orgânico C 1s (284.6 eV). Previamente a resolução do instrumento foi aferida através da banda de energia Ag 3d<sub>5/2</sub>, de uma amostra altamente pura (99,999%) de prata, após limpeza por sputtering de íons de argônio.

### 4.6.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos recobrimentos foi investigada em um Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM) JSM-6490LV JEOL com sinal de elétrons secundários. Devido ao comportamento isolante da HAP, uma amostra de Si/HAP foi recoberta com uma camada de 10 nm de ouro. Para análise da espessura, amostras de Si/HAP foram clivadas imediatamente depois de serem congeladas sob imersão em nitrogênio líquido e imagens da seção transversal foram obtidas com um Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução (FE-SEM) JSM-7100F.

### 4.6.5. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A morfologia e topografia e rugosidade dos recobrimentos também foram analisados por microscopia de força atômica (AFM) com microscópio BRUKER MultiMode 8-HR. As medidas foram feitas em *tapping mode* com ponta de 10 nm. Os parâmetros de calibração como a frequência de ressonância da ponta, fase, amplitude e

ganho foram variados para cada amostra. A rugosidade foi obtida através de análise das imagens com software Gwyddion.

#### 4.6.6. Teste de adesão dos recobrimentos

A qualidade da adesão dos recobrimentos foi avaliada através do método de adesão por fita (tape test) seguindo o método B da norma ASTM D3359. A fita utilizada foi uma fita filamentosa 3M modelo 8934, com força adesiva de 6,5 N/cm conforme exigida pela norma [71]. Uma caneta com ponta de diamante foi usada para cortar quadrados de área  $1 \times 1 \text{ mm}^2$  sobre a superfície dos filmes, porém com pressão suficiente para que o corte chegasse até os substratos. Após os cortes, as amostras passaram por fluxo de ar para retirada de possíveis fragmentos e a fita foi manualmente pressionada sobre a área dos cortes na superfície das amostras. Após um minuto, a fita foi retirada a um ângulo de  $180^\circ$ . Imagens com microscópio óptico foram obtidas antes e depois do teste de adesão.

#### 4.7. Ensaios preliminares de caracterização biológica

Para a caracterização biológica, filmes de HAP foram produzidos em substratos de Ti e PLA sob as mesmas condições de deposição:  $30 \text{ J/cm}^2$  de fluência, 5 minutos de deposição,  $10^{-6}$  mbar de pressão e 3 cm de distância alvo-substrato. Ensaios de adesão e proliferação celular foram realizados em amostras de PLA controle, PLA/HAP, Ti controle e Ti/HAP em tempos de 4 h, 24 h e 48 h com o objetivo de observar a cinética de tempo (veja Tabela 4.3). Antes dos testes, as amostras de Ti controle e Ti/HAP foram colocadas em placas de cultura celular e esterilizadas em raios gama (fonte de cobalto 60, 15 KGy, 19,72 Gy/min) por 12 horas, no laboratório da COPPE no Fundão. As amostras de PLA controle e PLA/HAP foram esterilizadas através de óxido de etileno pela empresa ACECIL, em São Paulo. A resposta biológica dos recobrimentos foi analisada por ensaios de adesão e proliferação celular.

**Tabela 4.3:** Procedimento experimental para os ensaios biológicos.

	1ª Placa		2ª Placa	
	Amostras em sextuplicata		Amostras em sextuplicata	
4h	PLA controle	PLA/HAP	Ti controle	Ti/HAP
24h				
48h				

O tipo de célula usada foi SAOS-2 (célula humana de osso maduro) com densidade inicial de  $0,4 \times 10^4$  células. Para microscopia de fluorescência, as células foram semeadas em placa de 24 poços com clone tubes sobre as amostras. Após os tempos de 4h e 24h todas as amostras foram fixadas em 4% de paraformaldeído, permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100, bloqueadas com 3% de BSA e incubadas com o anticorpo DAPI Fluorshield (marca o núcleo). Nas amostras do tempo de 48h foi realizada a marcação tripla, que corresponde à fixação em 4% de paraformaldeído, permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100, bloqueadas com 3% de BSA e incubadas com o anticorpo anti-vinculina específico (1:200) durante a noite a 4°C. Alexa-Fluor 488 (1:500) foi usado como anticorpo secundário durante 1 hora. Após as etapas de lavagens, as amostras foram incubadas com o anticorpo de Alexa-Fluor 546 conjugado com faloidina (1:80) durante 30 minutos e montadas em laminas de vidro com DAPI Fluorshield. A área de células aderentes foi adquirida digitalmente para quantificação celular (5 campos representativos por amostra), utilizando os filtros fluorescentes para marcações em verdes, vermelhos e azuis. As visualizações foram feitas pelo microscópio Axio Vision 4.8.1 (Zeiss) e o software Imagem Pro Plus 6.0 foi usado para o processamento das imagens e sobreposição. Todos os testes foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do CBPF e os procedimentos do cultivo celular e de marcação com os anticorpos seguiram protocolos previamente estabelecidos (APÊNDICE II).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Análise estequiométrica dos alvos de HAP por OPC-LIBS

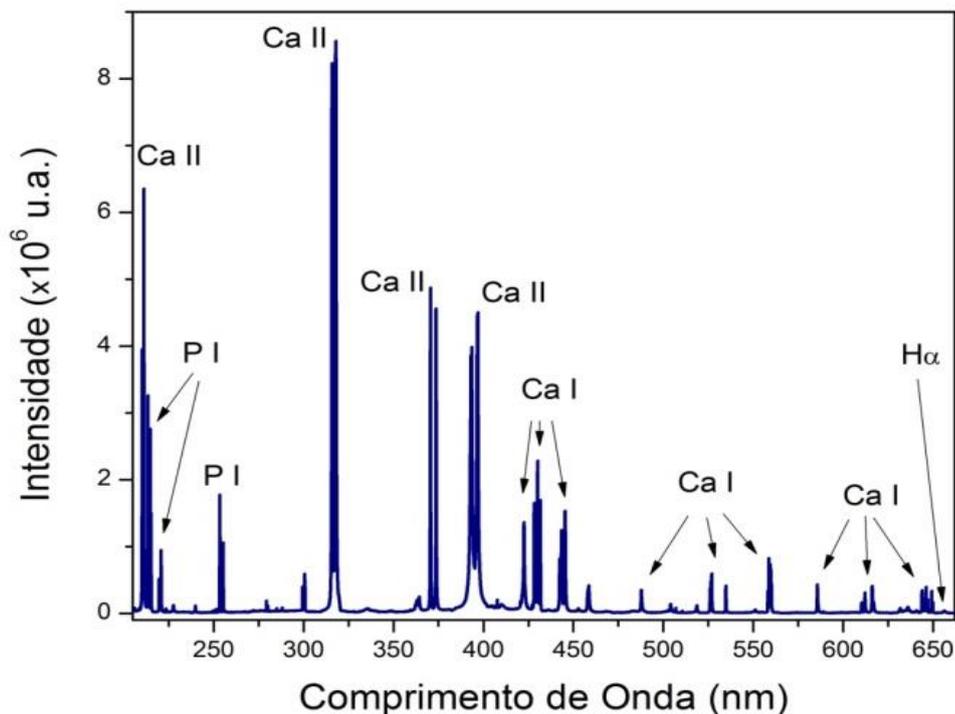
Nesta seção, são apresentados os resultados de quantificação elementar para os alvos de HAP produzidos e utilizados durante esse trabalho de tese. As seguintes subseções determinam os passos para obtenção dos resultados por OPC-LIBS e a última subseção é deixada para apresentar o resultado de comparação entre as técnicas.

#### 5.1.1. Análise qualitativa e seleção das linhas

A análise começa com a realização de experimentos com uma amostra certificada (que chamaremos de amostra padrão, Ap) que tem a mesma matriz e uma composição semelhante a dos alvos a serem analisados. Inicialmente, irradiamos a amostra com um pulso laser de 100 mJ, escolhendo os melhores parâmetros para o experimento. Então, um espectro LIBS é obtido para posterior análise das linhas espectrais de emissão dos elementos do alvo. A Figura 5.1 mostra o espectro de emissão da amostra padrão, na faixa espectral de 205-600 nm com um retardo de 2  $\mu$ s em relação a chegada do feixe laser e uma janela de observação de 200 ns. A partir da análise qualitativa destes espectros podemos identificar linhas de emissão do oxigênio (O I), nitrogênio (N I) e do hidrogênio (H I), que são elementos que provém do ar circundante e da própria amostra que apresenta hidrogênio e oxigênio na sua composição. O espectro apresenta também linhas de emissão características do cálcio (Ca I e Ca II) e do fósforo (P I), elementos que serão quantificados.

A molécula de hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , apresenta uma razão de cálcio por fósforo  $\text{Ca/P} = 1,67$ . Assim, um alvo será dito estequiométrico se a sua razão  $\text{Ca/P}$  se aproximar do valor de 1,67. Neste trabalho, obtivemos um total de oito espectros LIBS para serem analisados: um espectro da amostra padrão Ap e sete das amostras com razão  $\text{Ca/P}$  desconhecida, que denominamos de A1 a A7. Em uma análise OPC-LIBS se faz necessário que todos os experimentos sejam realizados com os mesmos

parâmetros e arranjo experimental para que todos os parâmetros do espectro óptico apresentem valores semelhantes.



**Figura 5.1:** Espectros LIBS da amostra padrão Ap mostrando as linhas espectrais dos elementos identificados na análise qualitativa.

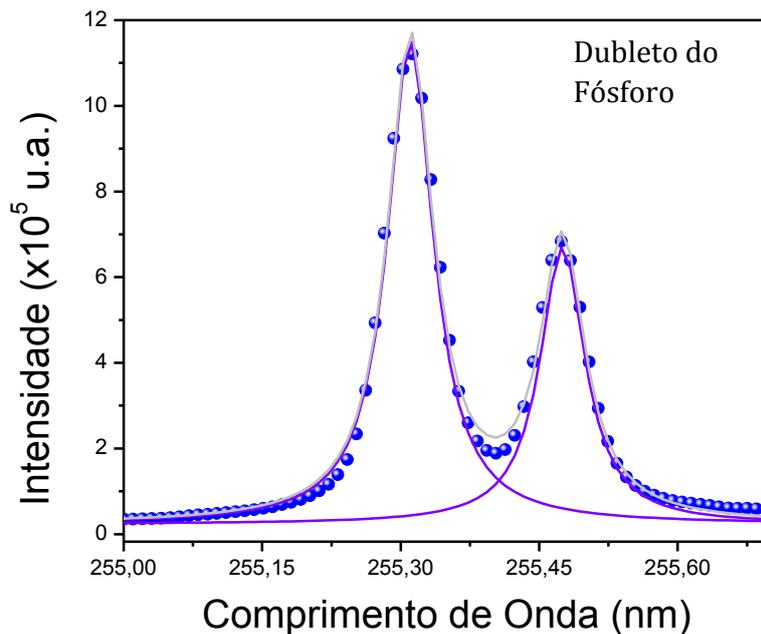
Para se obter uma análise quantitativa, é necessário selecionar apropriadamente as linhas espectrais correspondente a cada espécie atômica dos elementos presentes na amostra. Uma boa linha espectral a ser usada na análise deve estar claramente separada de outras linhas atômicas adjacentes e possuir probabilidade de transição e nível de energia superior catalogados na literatura. Algumas linhas pertencentes às espécies atômicas dos elementos Ca e P foram escolhidas durante a análise do espectro LIBS da amostra padrão (Figura 5.1) e estão especificadas na Tabela 5.1. Nem todas as linhas espectrais encontradas dentro da faixa espectral observada estavam bem isoladas, um exemplo são as linhas 255,326 nm e 255,491 nm, pertencentes ao duplete do fósforo (ver Figura 5.2), que estão muito próximas devido a resolução do nosso espectrógrafo. Quase todas as linhas do fósforo, usadas neste trabalho, apresentam uma pequena sobreposição com outra adjacente. As linhas de fósforo foram deconvolucionadas para determinar suas intensidades.

Os oito espectros experimentais foram analisados e cada linha que está incluída na Tabela 5.1 foi ajustada com uma função analítica Voigt [64,72,73], obtendo sua área (intensidade) e seu perfil espectral com o programa de ajuste gráfico Origin.

**Tabela 5.1:** Parâmetros das linhas espectrais consideradas na análise quantitativa das amostras.

Espécie	$\lambda$ (nm)	$g_i$	$A_{ij} (\times 10^8 \text{ s}^{-1})$	$E_i (\text{cm}^{-1})$	$P(\lambda) (\times 10^8 \text{ s}^{-1})$	Ref.
Ca I	428,301	5	0,434	38551,558	3,591	[74]
Ca I	428,937	3	0,6	38464,808	3,103	[74]
Ca I	431,855	3	0,74	38464,808	3,778	[74]
Ca I	612,222	3	0,287	31539,495	0,726	[74]
Ca I	649,378	5	0,44	35730,454	0,658	[74]
Ca I	649,965	5	0,081	35730,454	0,224	[74]
Ca II	210,324	4	0,82	72722,23	8,135	[74]
Ca II	211,276	6	0,97	72730,93	15,043	[74]
Ca II	315,887	4	3,1	56858,25	5,511	[74]
Ca II	370,603	2	0,88	52166,93	1,116	[74]
Ca II	373,690	2	1,7	52166,93	1,370	[74]
P I	214,914	2	3,18	57876,574	5,308	[74]
P I	215,294	4	0,485	65156,242	2,754	[74]
P I	215,408	6	0,58	65157,126	4,774	[74]
P I	253,397	4	0,2	58174,366	0,8202	[74]
P I	253,560	4	0,95	58174,366	3,043	[74]
P I	255,326	2	0,71	57876,574	1,397	[74]
P I	255,491	2	0,3	57876,574	0,915	[74]

Os principais efeitos que contribuem para o perfil espectral de uma linha são: o alargamento Stark, o alargamento instrumental e o alargamento Doppler. Devido ao peso atômico apresentado pelos elementos em análise, o alargamento Doppler se faz desprezível e as linhas são efetivamente alargadas pela contribuição do efeito Stark e pela função instrumental. O alargamento Stark tem um perfil lorentziano e, de acordo com nossas medidas, o alargamento instrumental segue um perfil gaussiano. Assim, as linhas estudadas possuem um perfil Voigt que é dado pela convolução de uma gaussiana e uma lorentziana.

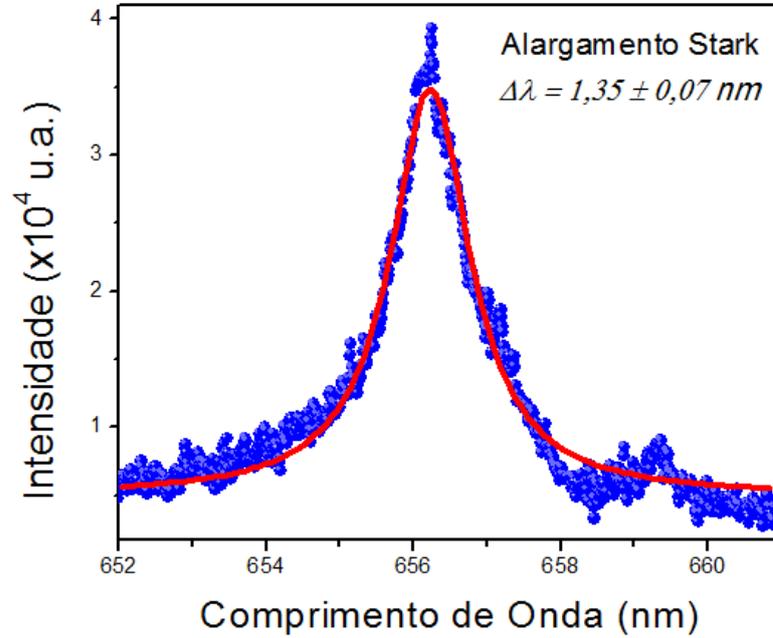


**Figura 5.2:** Deconvolução das linhas de emissão do dubleto do fósforo: 255,326 e 255,491 nm.

### 5.1.2. Determinação dos parâmetros do plasma: temperatura e densidade

A temperatura do plasma é o parâmetro mais importante na análise pela técnica LIBS. Uma análise quantitativa precisa passa pela determinação exata da temperatura que, através do método de Saha-Boltzmann, depende do valor da densidade de elétrons. A densidade foi calculada pela Equação 3.16 da Seção 3.3.2, aonde usamos o alargamento Stark da linha 656,279 nm do hidrogênio ( $H\alpha$ ). Devido à degenerescência do átomo que a emite, essa linha apresenta um alargamento muito mais pronunciado para a resolução do nosso espectrógrafo, fornecendo um valor preciso para a largura a meia altura. Nos experimentos LIBS, o efeito Doppler é desprezível para a maioria dos átomos, o que não acontece para o hidrogênio, o mais leve e de maior mobilidade dentre os átomos. Devido a esse fato, para calcular um valor para a densidade eletrônica, devemos separar os alargamentos instrumental e Doppler do alargamento Stark. A linha espectral  $H\alpha$  apresenta um perfil Voigt gerado pela convolução de um perfil gaussiano, provenientes dos alargamentos Doppler e instrumental, com um perfil lorentziano que provém do alargamento Stark. Usando o software de ajuste gráfico Origin,

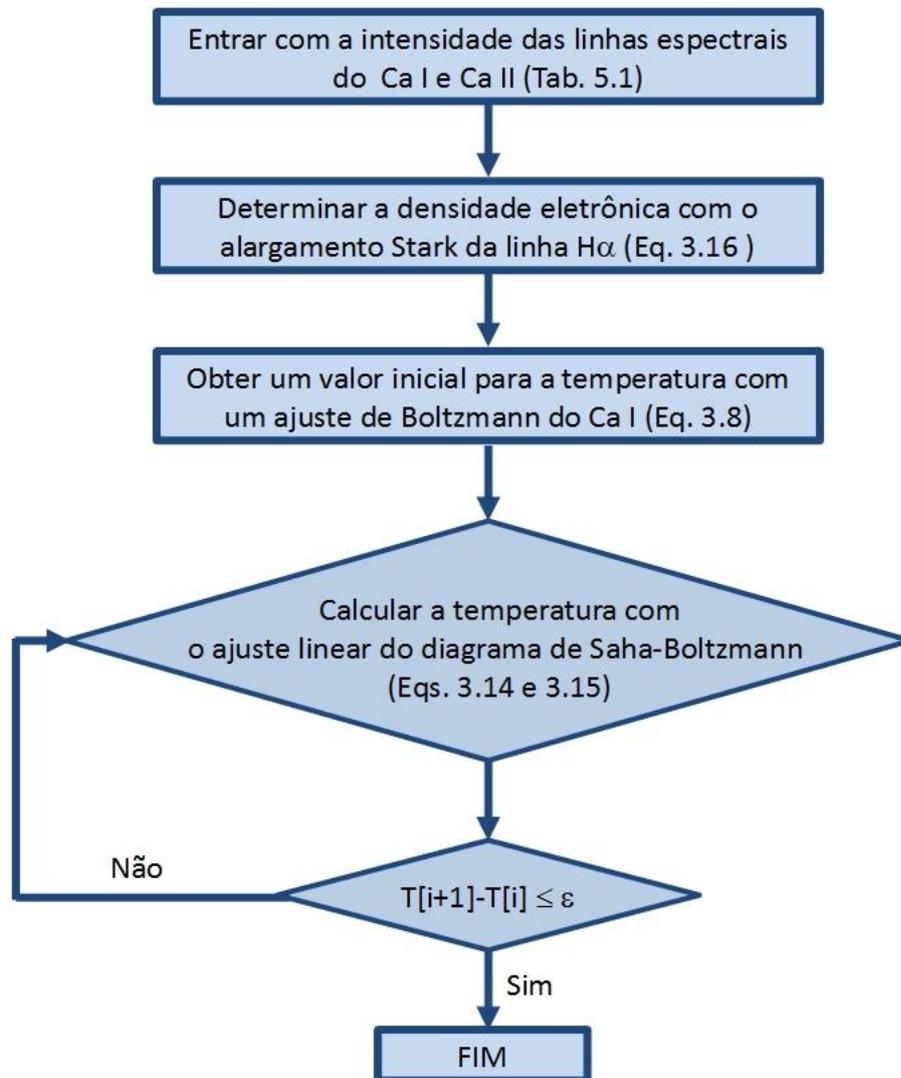
deconvolucionamos as oito linhas H $\alpha$ , pertencente aos espectros de cada amostra. A deconvolução da linha H $\alpha$  do espectro da amostra padrão é mostrada na Figura 5.3. Os valores para o alargamento Stark e a densidade eletrônica são apresentados na Tabela 5.2.



**Figura 5.3:** Função Voigt ajustada aos dados experimentais da linha H $\alpha$  presente no espectro da amostra padrão Ap.

**Tabela 5.2:** Alargamento Stark e densidade de elétrons do plasma para os diferentes espectros investigados. Estes valores foram obtidos através da linha H $\alpha$  presente nos espectros das amostras.

Amostra	Alargamento (nm)	Densidade ( $\times 10^{23} \text{ m}^{-3}$ )
Ap	$1,35 \pm 0,07$	$1,44 \pm 0,03$
A1	$1,42 \pm 0,08$	$1,56 \pm 0,04$
A2	$1,40 \pm 0,02$	$1,52 \pm 0,02$
A3	$1,27 \pm 0,02$	$1,34 \pm 0,04$
A4	$1,23 \pm 0,02$	$1,28 \pm 0,03$
A5	$1,42 \pm 0,01$	$1,56 \pm 0,03$
A6	$1,46 \pm 0,02$	$1,62 \pm 0,03$
A7	$1,41 \pm 0,02$	$1,55 \pm 0,02$

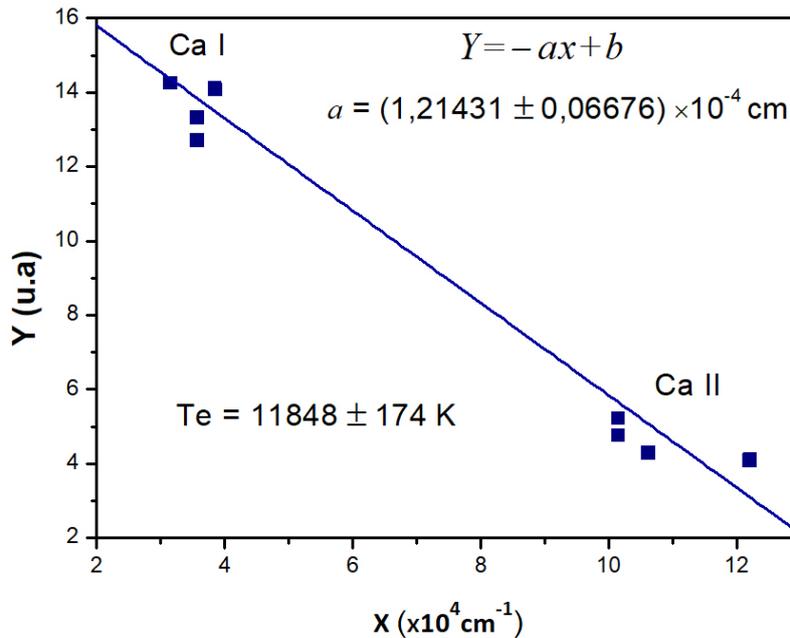


**Figura 5.4:** Fluxograma para o algoritmo de iteração utilizado para resolver o diagrama de Saha-Boltzmann.

O passo seguinte foi obter a intensidade das linhas de emissão das espécies neutra e ionizada do Ca para calcular a temperatura de excitação do plasma. Para isso, o plasma é suposto estar em equilíbrio termodinâmico local durante a janela de observação e o valor para a temperatura será único e igual para todos os demais elementos presentes na pluma. As linhas espectrais do Ca I e Ca II, que foram usadas no cálculo, estão apresentados na Tabela 5.1. Para o cálculo do valor da temperatura, realizamos um diagrama de Saha-Boltzmann assumindo que existe uma relação linear entre as variáveis  $x$  e  $y$  (ver Seção 3.3.2). Uma temperatura inicial é então obtida através de um ajuste de Boltzmann do Ca I com a Equação 3.8. Este valor é utilizado para iniciar os cálculos com o diagrama de Saha-Boltzmann. Como o diagrama de Saha-

Boltzmann (Equações 3.14 e 3.15) depende da temperatura, a única forma de resolvê-lo é através de um código iterativo. Este código é iniciado com a primeira temperatura, dada pelo ajuste de Boltzmann, e depois realizamos um ajuste por Saha-Boltzmann. E seguida, o código entrega um valor mais preciso para a temperatura, que é novamente usado para reiniciar o código e calcular um novo valor de temperatura. Este processo iterativo é realizado até que o critério de parada seja satisfeito ( $\epsilon = 0,001$ ). O valor entregue pelo código após a convergência é a temperatura do plasma  $T_e$ . Na Figura 5.4 apresentamos o fluxograma usado para resolver o diagrama de Saha-Boltzmann. Na Figura 5.5 apresentamos o diagrama de Saha-Boltzmann para as linhas de Ca I e Ca II da amostra padrão. A temperatura encontrada foi utilizada para determinar os valores dos parâmetros  $P(\lambda)$  de calibração OPC-LIBS.

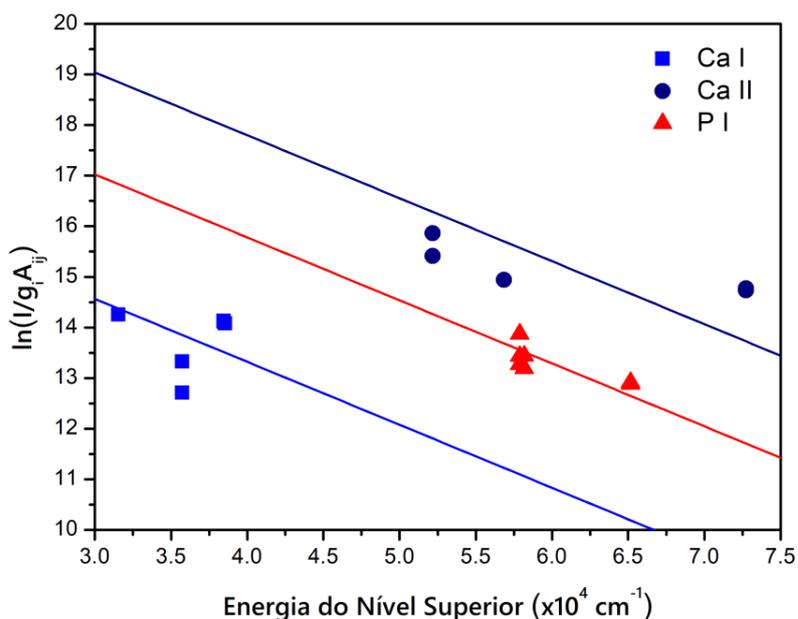
O passo seguinte foi obter a intensidade das linhas de emissão das espécies neutra e ionizada do Ca para calcular a temperatura de excitação do plasma. Para isso, o plasma é suposto estar em equilíbrio termodinâmico local durante a janela de observação e o valor para a temperatura será único e igual para todos os demais elementos presentes na pluma. As linhas espectrais do Ca I e Ca II, que foram usadas no cálculo, estão apresentados na Tabela 5.1. Para o cálculo do valor da temperatura, realizamos um diagrama de Saha-Boltzmann assumindo que existe uma relação linear entre as variáveis  $x$  e  $y$  (ver Seção 3.3.2). Uma temperatura inicial é então obtida através de um ajuste de Boltzmann do Ca I com a Equação 3.8. Este valor é utilizado para iniciar os cálculos com o diagrama de Saha-Boltzmann. Como o diagrama de Saha-Boltzmann (Equações 3.14 e 3.15) depende da temperatura, a única forma de resolvê-lo é através de um código iterativo. Este código é iniciado com a primeira temperatura, dada pelo ajuste de Boltzmann, e depois realizamos um ajuste por Saha-Boltzmann. E seguida, o código entrega um valor mais preciso para a temperatura, que é novamente usado para reiniciar o código e calcular um novo valor de temperatura. Este processo iterativo é realizado até que o critério de parada seja satisfeito ( $\epsilon = 0,001$ ). O valor entregue pelo código após a convergência é a temperatura do plasma  $T_e$ . Na Figura 5.4 apresentamos o fluxograma usado para resolver o diagrama de Saha-Boltzmann. Na Figura 5.5 apresentamos o diagrama de Saha-Boltzmann para as linhas de Ca I e Ca II da amostra padrão. A temperatura encontrada foi utilizada para determinar os valores dos parâmetros  $P(\lambda)$  de calibração OPC-LIBS.



**Figura 5.5:** Diagrama de Saha-Boltzmann para as linhas de cálcio presentes no espectro da amostra padrão.

### 5.1.3. Cálculo da composição da amostra padrão com a técnica CF-LIBS

Com base na temperatura encontrada para a amostra padrão na Seção 3.3.3, a densidade das espécies presentes na pluma de plasma foi avaliada através do coeficiente linear do ajuste de Boltzmann. A densidade relativa do número de átomos pode ser obtida através dos coeficientes lineares  $b_s$  da Equação 3.9. Para encontrarmos os valores destes coeficientes, realizamos ajustes de Boltzmann com as intensidades de cada espécie atômica de P e Ca presentes no espectro experimental. Nesse ajuste, a inclinação da reta é dada por  $-1/kT$ . Então, uma vez obtidos os valor da temperatura para o espectro observado, fica estabelecido o coeficiente angular das retas ( $-1/kT$ ) a serem ajustadas. Se o plasma está em LTE a sua temperatura é a mesma para todas as espécies atômicas presentes na pluma e a inclinação da reta no ajuste de Boltzmann de cada espécie deve ser a mesma. Então, fixamos o valor conhecido para a inclinação da reta no ajuste de cada espécie separadamente e determinamos os coeficientes lineares da reta  $b_s$ . No espectro da amostra padrão foram realizados três ajustes para as espécies de Ca I, Ca II e P I e estão apresentados na Figura 5.6.



**Figura 5.6:** Ajuste de Boltzmann dos dados experimentais obtidos com a amostra padrão.

Uma vez realizados os ajustes de cada espécie, devemos determinar a densidade relativa do número de átomos através das Equações 3.10 a 3.12. Para isso, é necessário conhecer os coeficientes  $b_s$  de cada uma das espécies atômicas dos elementos presentes na análise. Entretanto, muitas vezes isso não é possível por algumas razões, tais como: as linhas espectrais de uma das espécies podem estar fora da faixa espectral observada; as linhas podem estar sobrepostas às demais linhas do espectro experimental ou as linhas podem apresentar muito baixa intensidade e ser confundida com o ruído de fundo. Quando isso acontece, recorreremos à equação de Saha (Equação 3.13) para calcular uma relação entre as densidades das espécies neutras e ionizadas de um mesmo elemento. Neste trabalho, o elemento P apresentou somente linhas de emissão da espécie neutra (P I) devido à limitação da faixa espectral observada, e usamos a equação de Saha para calcular a densidade da espécie ionizada P II.

Os resultados quantitativos para a densidade relativa do número de átomos dos elementos Ca e P foram determinados somando os valores encontrados para as densidades das espécies neutras e ionizadas. Esses resultados estão presentes na Tabela 5.3. Podemos observar que a razão Ca/P não corresponde ao valor real da amostra padrão que tem estequiometria com  $\text{Ca/P} = 1,67$ . Este resultado já era esperado porque CF-LIBS é considerada uma técnica semi-quantitativa.

**Tabela 5.3.** Densidade do número de átomos obtida pela técnica CF-LIBS para os elementos Ca e P da amostra padrão.

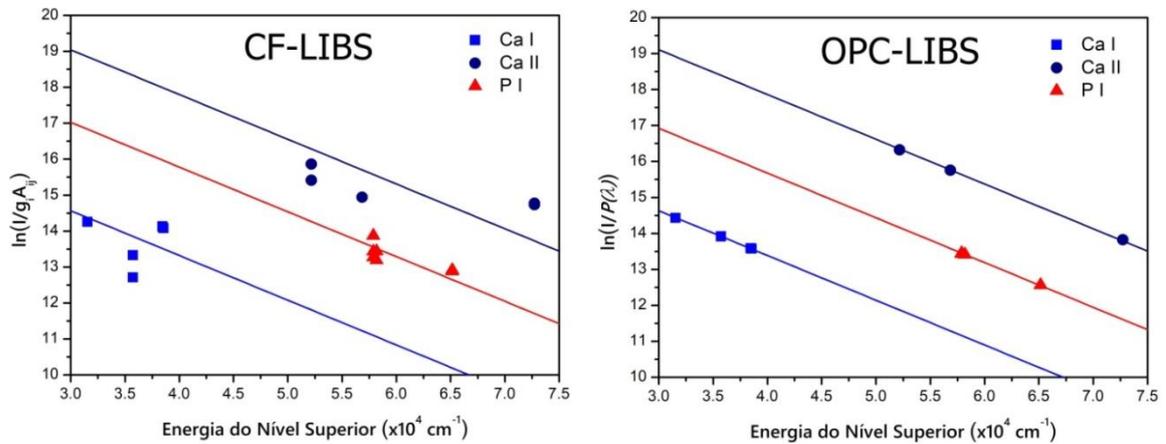
Elemento	Densidade de átomos (%)
Ca	$58,64 \pm 12,31$
P	$41,36 \pm 6,87$
Ca/P	$1,42 \pm 0,38$

#### 5.1.4. Determinação dos parâmetros $P(\lambda)$ com a amostra padrão

A abordagem da técnica OPC-LIBS parte dos desvios de valores entre a quantificação real da amostra padrão e o valor de quantificação obtido por CF-LIBS. A idéia básica da aproximação é a possibilidade de determinar valores para o parâmetro  $P(\lambda)$  (Equação 3.20) a partir do valor real da composição da amostra padrão. Estes valores são então usados para uma análise usual CF-LIBS de amostras desconhecidas. Para determinar os parâmetros  $P(\lambda)$  é necessário reconstruir uma equação para o ajuste de Boltzmann cuja reta está deslocada verticalmente devido ao acréscimo de uma constante. Essa constante é obtida com os valores certificados e os valores calculados por CF-LIBS da amostra padrão (ver equação 3.18). Em seguida encontramos a diferença entre o valor de  $y$ , para cada ponto do ajuste de Boltzmann, e a coordenada  $y'$  para o mesmo ponto com a equação corrigida (Equação 3.19). Este procedimento pode ser visualizado na Figura 3.8. A partir dessas diferenças  $\Delta y$  calculamos o parâmetro  $P(\lambda)$  (Equação 3.20) para cada linha espectral presente neste trabalho. Esses valores de  $P(\lambda)$ , mostrados na Tabela 5.1, foram usados nas análises das amostras A1 a A7.

Para confirmar os valores de  $P(\lambda)$ , produzimos uma análise por OPC-LIBS na amostra padrão, o que deve fornecer um resultado igual ao certificado. Com a temperatura encontrada anteriormente, ajustamos a Equação (3.21). Esse novo ajuste foi realizado com os parâmetros  $P(\lambda)$  no lugar do  $g_i A_{ij}$ , e carrega possíveis correções sobre os parâmetros do plasma. Procedendo como na técnica CF-LIBS, calculamos as concentrações atômicas dos elementos a partir do coeficiente linear dessa reta e obtivemos as densidades para Ca = 62,51% e P = 37,49%. Essa análise forneceu uma razão Ca/P =  $1,67 \pm 0,03$ , que concorda com o valor real da amostra padrão. Na Figura

5.7 podemos observar os ajustes de Boltzmann do Ca I, Ca II e P I com a técnica CF-LIBS e a aproximação OPC-LIBS. Uma vez determinados e testados os valores de  $P(\lambda)$  por OPC-LIBS, estes são usados na análise das amostras com concentração desconhecida.



**Figura 5.7:** Diagrama de Boltzmann para a amostra padrão obtido pelo método CF-LIBS (à esquerda) e OPC-LIBS (à direita).

### 5.1.5. Determinação da composição dos alvos de HAP

Uma vez que já conhecemos os parâmetros  $P(\lambda)$  das linhas, realizamos o cálculo da temperatura  $T_e$  e da densidade  $n_e$  para cada uma das demais amostras desconhecidas: A1 a A7. A densidade  $n_e$  foi calculada a partir do alargamento Stark da linha  $H\alpha$  (Equação 3.16), e a temperatura  $T_e$ , a partir da inclinação da reta no diagrama de Saha-Boltzmann (Equação 3.14). Os valores obtidos para  $T_e$  e  $n_e$  estão apresentados na Tabela 5.4, e os ajustes de Saha-Boltzmann para o cálculo da temperatura são mostrados na primeira coluna da Figura 5.8, aonde temos o valor da temperatura em Kelvin.

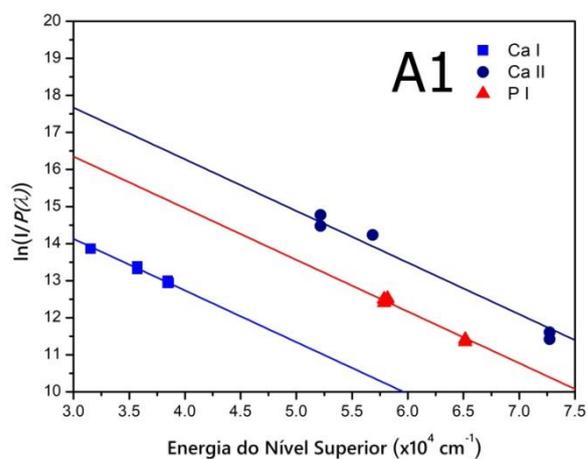
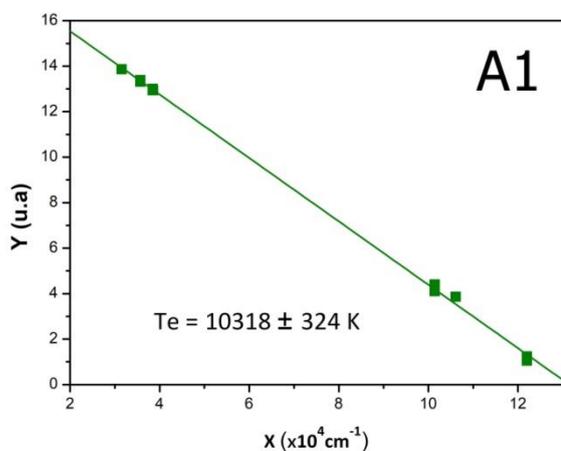
A densidade atômica dos elementos foi calculada a partir dos ajustes de Boltzmann apresentados na segunda coluna da Figura 5.8. Na Tabela 5.5 estão os valores para as concentrações atômicas e a razão Ca/P da amostra padrão  $A_p$  e das amostras analisadas. As concentrações atômicas foram calculadas a partir dos valores de  $P(\lambda)$  da amostra padrão, que já carrega possíveis erros provenientes de auto-absorção das linhas, erros instrumentais e de probabilidade de transição. A razão Ca/P representa uma proporção percentual relativa, que considera apenas a presença dos dois elementos na amostra analisada.

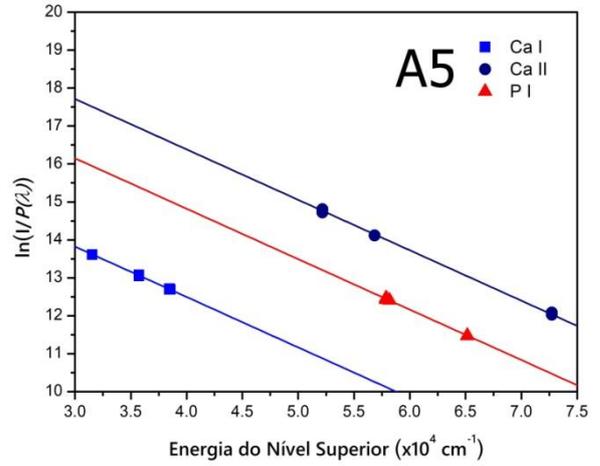
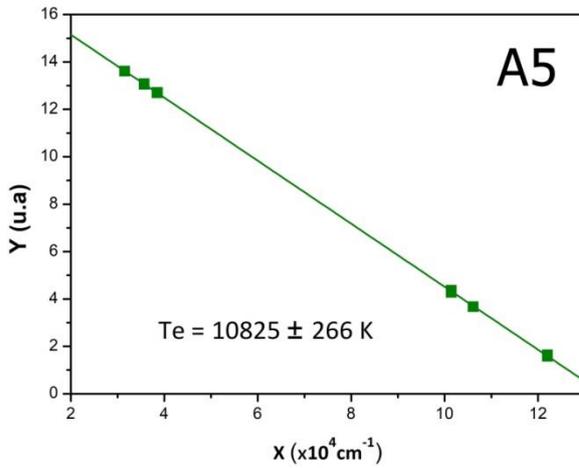
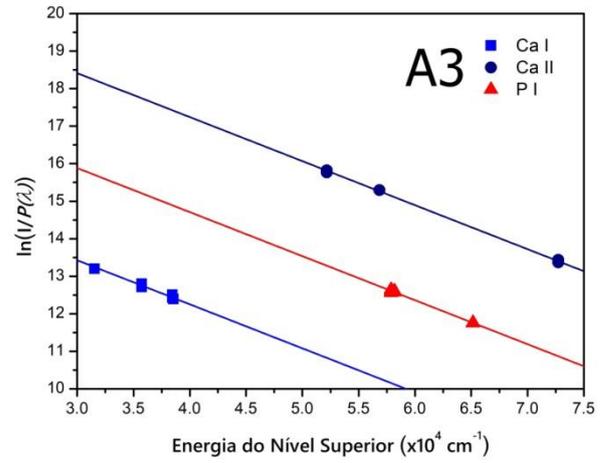
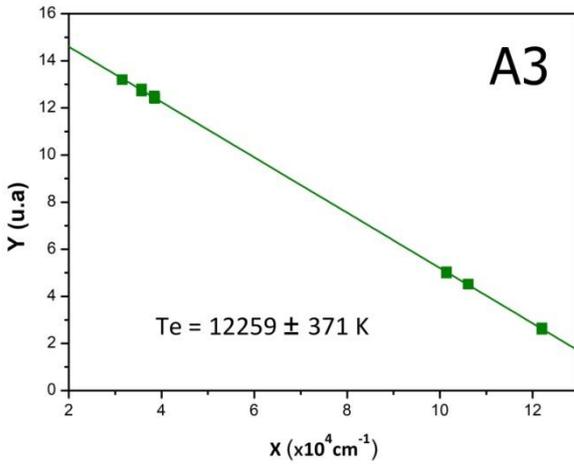
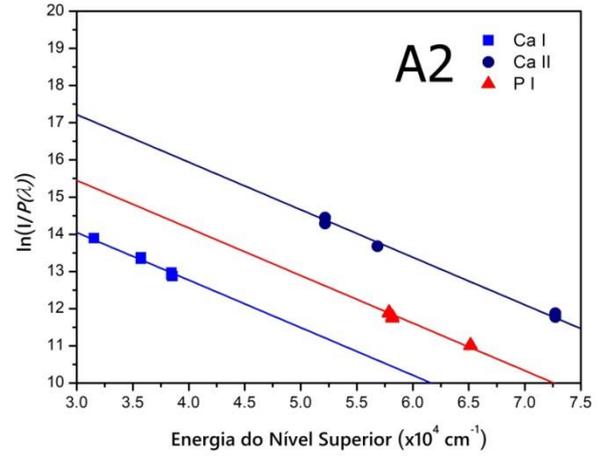
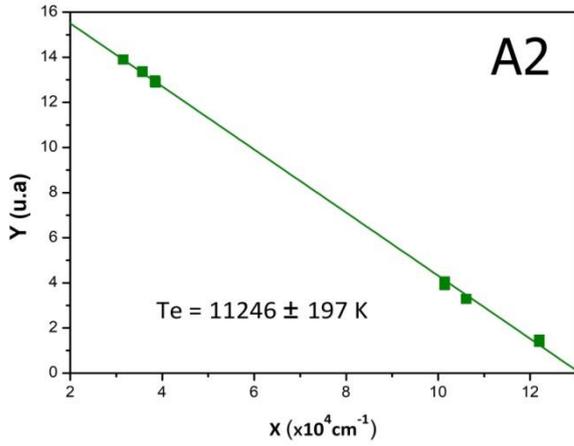
**Tabela 5.4:** Valores da temperatura eletrônica  $T_e$  e densidade eletrônica  $n_e$  para todas as amostras.

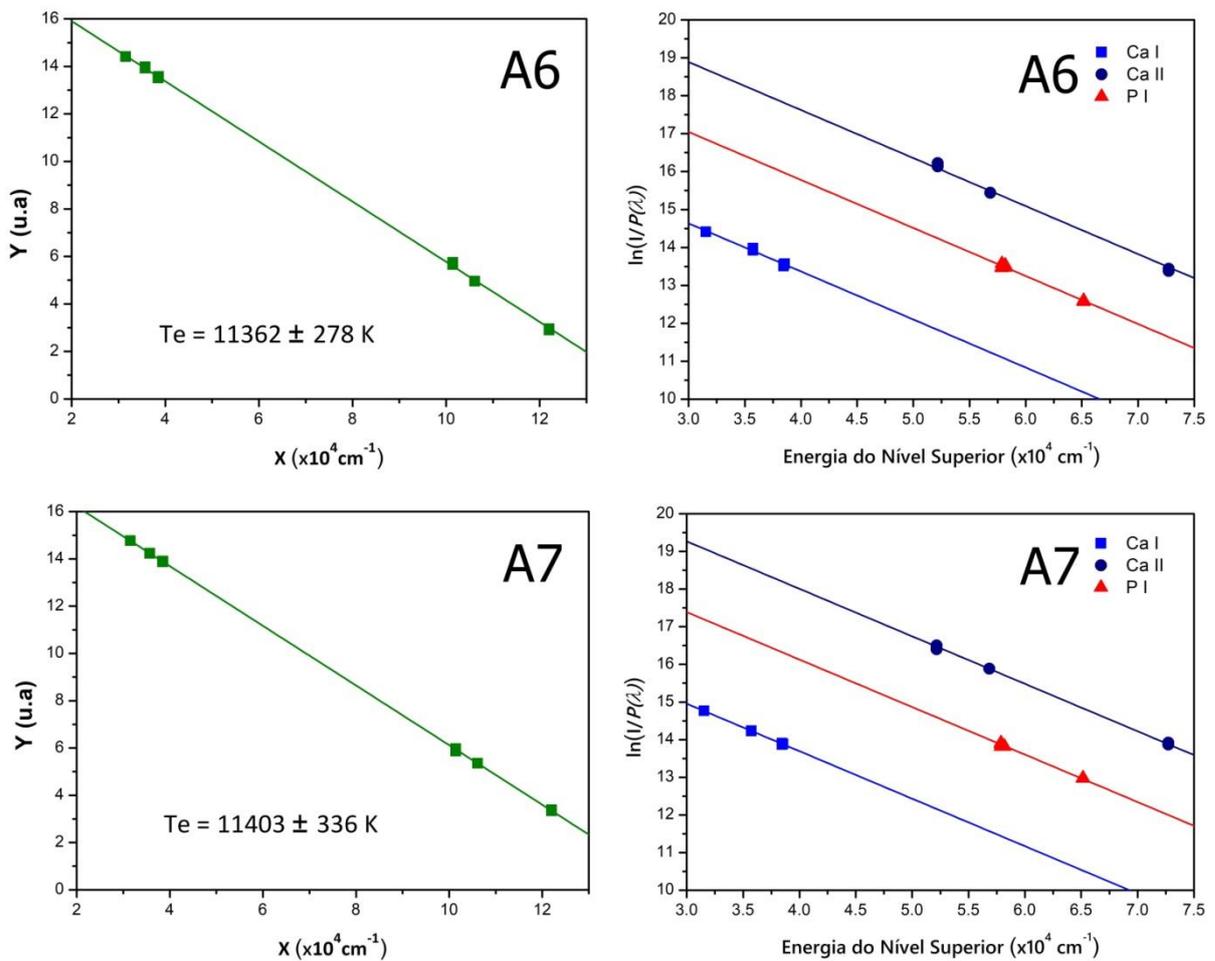
Amostra	$T_e$ (eV)	$n_e$ ( $\times 10^{23} \text{ m}^{-3}$ )
Ap	$1,02 \pm 0,01$	$1,44 \pm 0,03$
A1	$0,89 \pm 0,03$	$1,56 \pm 0,04$
A2	$0,97 \pm 0,02$	$1,52 \pm 0,02$
A3	$1,06 \pm 0,03$	$1,34 \pm 0,04$
A4	$1,01 \pm 0,02$	$1,28 \pm 0,03$
A5	$0,93 \pm 0,02$	$1,56 \pm 0,04$
A6	$0,98 \pm 0,02$	$1,62 \pm 0,03$
A7	$0,98 \pm 0,03$	$1,55 \pm 0,02$

**Tabela 5.5:** Valores das densidades de Ca e P e razão Ca/P medidos por OPC-LIBS.

Amostra	Ca (%)	P (%)	Ca/P
Ap	$62,51 \pm 0,87$	$37,49 \pm 0,67$	$1,67 \pm 0,03$
A1	$61,53 \pm 2,90$	$38,47 \pm 0,91$	$1,60 \pm 0,08$
A2	$63,45 \pm 2,60$	$36,55 \pm 0,75$	$1,74 \pm 0,08$
A3	$62,97 \pm 0,99$	$37,03 \pm 1,26$	$1,70 \pm 0,06$
A4	$61,99 \pm 3,11$	$38,01 \pm 1,06$	$1,63 \pm 0,09$
A5	$62,42 \pm 1,15$	$37,58 \pm 0,58$	$1,66 \pm 0,04$
A6	$63,10 \pm 2,65$	$36,90 \pm 0,74$	$1,71 \pm 0,08$
A7	$62,82 \pm 1,21$	$37,18 \pm 0,75$	$1,69 \pm 0,05$







**Figura 5.8:** Resultados dos diagramas produzidos para as amostras A1 a A7. À esquerda, ajuste de Saha-Boltzmann com informação da temperatura eletrônica do plasma e, à direita, ajuste de Boltzmann produzido com o método OPC-LIBS, cujo coeficiente linear fornece informação da concentração atômica dos elementos.

### 5.1.6. Comparação com outras técnicas

A amostra Ap é uma amostra de composição conhecida e que concorda com o valor teórico de razão Ca/P = 1,67. As amostras A1 a A5 são pastilhas de HAP prensadas e sinterizadas a 1150°C, enquanto que as amostras A6 e A7 são alvos prensados, mas não sinterizados. Essas sete amostras tinham sua composição desconhecida, pois foram tratadas para formar os alvos usados para PLD. As amostras A6 e A7 representam os lotes originais do material, dos quais todos os alvos usados nesse trabalho de tese foram produzidos: A6 (lote 267) e A7 (lote 274). A Tabela 5.6 apresenta os valores da densidade de Ca e P e a razão Ca/P obtidos por OPC-LIBS e esses resultados foram

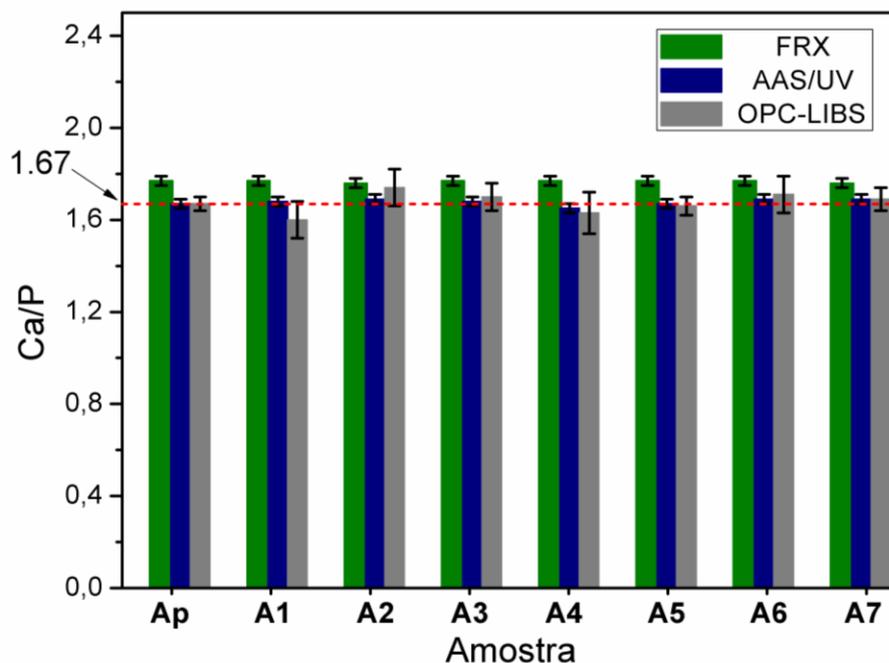
comparados aos obtidos por AAS, UV-VIS e FRX, que são técnicas analíticas mais antigas e já bem consolidadas na comunidade científica.

**Tabela 5.6:** Resultado da quantificação dos elementos Ca e P nas amostras de HAP e comparação entre as técnicas.

	Ca			P			Ca/P		
	FRX	AAS	OPC-LIBS	FRX	UV	OPC-LIBS	FRX	AAS/UV	OPC-LIBS
Ap	63,92 ± 0,65	62,49 ± 0,67	62,51 ± 0,87	36,08 ± 1,05	37,51 ± 0,22	37,49 ± 0,67	1,77 ± 0,02	1,67 ± 0,02	1,67 ± 0,03
A1	63,92 ± 0,65	62,74 ± 0,64	61,53 ± 2,90	36,08 ± 1,05	37,26 ± 0,21	38,47 ± 0,91	1,77 ± 0,02	1,68 ± 0,02	1,60 ± 0,08
A2	63,83 ± 0,65	62,83 ± 0,82	63,45 ± 2,60	36,17 ± 1,05	37,17 ± 0,21	36,55 ± 0,75	1,76 ± 0,02	1,69 ± 0,02	1,74 ± 0,08
A3	63,92 ± 0,65	62,67 ± 0,64	62,97 ± 0,99	36,08 ± 1,05	37,33 ± 0,21	37,03 ± 1,26	1,77 ± 0,02	1,68 ± 0,02	1,70 ± 0,06
A4	63,84 ± 0,65	62,29 ± 0,67	61,99 ± 3,11	36,16 ± 1,05	37,71 ± 0,22	38,01 ± 1,06	1,77 ± 0,02	1,65 ± 0,02	1,63 ± 0,09
A5	63,92 ± 0,65	62,59 ± 0,66	62,42 ± 1,15	36,08 ± 1,05	37,41 ± 0,21	37,58 ± 0,58	1,77 ± 0,02	1,67 ± 0,02	1,66 ± 0,04
A6	63,90 ± 0,65	62,82 ± 0,65	63,10 ± 2,65	36,10 ± 1,05	37,18 ± 0,21	36,90 ± 0,74	1,77 ± 0,02	1,69 ± 0,02	1,71 ± 0,08
A7	63,73 ± 0,65	62,76 ± 0,65	62,82 ± 1,21	36,27 ± 1,05	37,24 ± 0,21	37,18 ± 0,75	1,76 ± 0,02	1,69 ± 0,02	1,69 ± 0,05

Podemos afirmar que os dados de quantificação obtidos por OPC-LIBS concordam aproximadamente com os obtidos por AAS, o que sugere a validade dessa nova abordagem (OPC-LIBS) de uma técnica não-destrutiva (LIBS) com necessidade de apenas uma amostra padrão. Nesse caso, AAS pode ser considerada a mais confiável dentre todas as técnicas usadas. Nas medidas com FRX, as pastilhas foram adaptadas em um porta-amostra de teflon, por possuírem diâmetro menor do que o do porta-amostra do equipamento. Esse fato pode ter ocasionado o desvio nos valores obtidos por FRX com relação às outras técnicas. No entanto, esse erro se repete para todas as

amostras, inclusive para a amostra padrão Ap, sendo portanto considerado um erro sistemático. No contexto desse trabalho, a técnica OPC-LIBS pode ser usada para monitorar a produção de alvos estequiométricos usados em PLD (veja histograma na Figura 5.9).



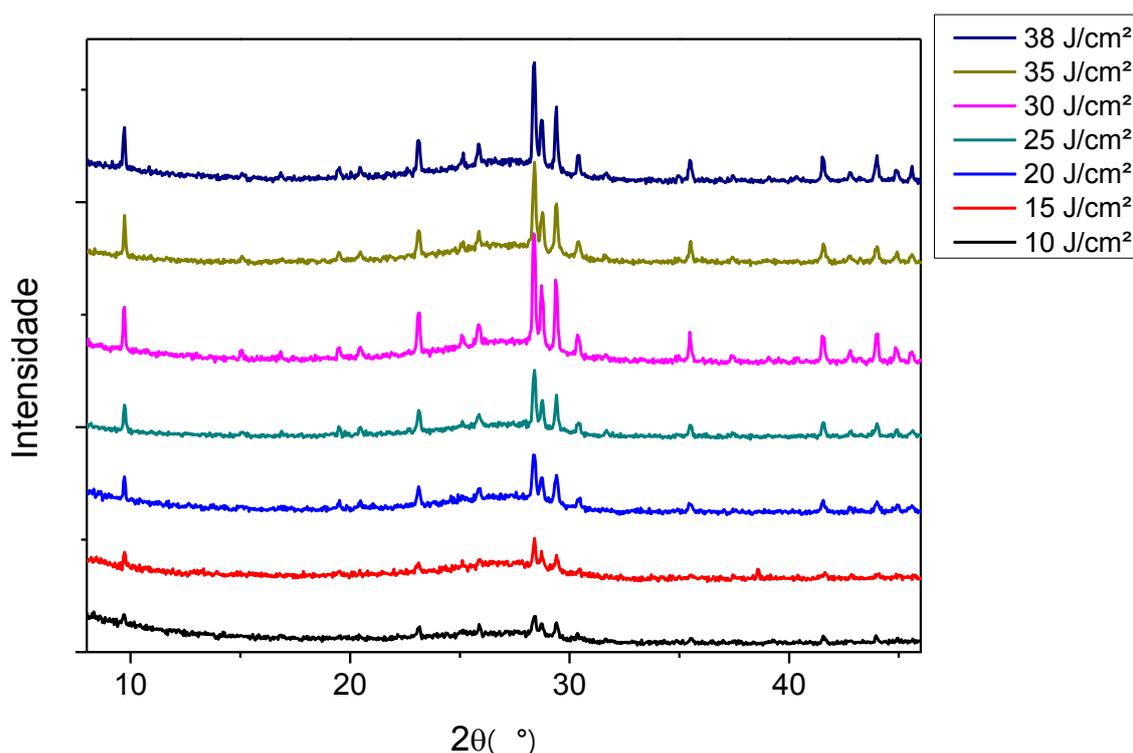
**Figura 5.9:** Histograma da quantificação elemental dos alvos de HAP por FRX, AAS/UV e OPC-LIBS.

## 5.2. Influência dos parâmetros de deposição sobre a cristalinidade dos filmes

Na difração de raios x por incidência rasante GIXRD ( $\theta=0,5^\circ$ ), a radiação interage com a camada superficial da amostra, e fornece informações sobre a estrutura cristalográfica e a composição química dos recobrimentos de muito pouca espessura. Uma maior cristalinidade é expressa pelo aumento no tamanho do cristalito ou aumento de domínio do cristal. Nesta seção, apresentamos o efeito da cristalinidade e composição dos filmes de HAP produzidos à temperatura ambiente, sob influência dos parâmetros de deposição por PLD.

A escolha dos parâmetros de deposição para produzir um filme por PLD é fundamental para definir as características finais do recobrimento. Neste trabalho, a

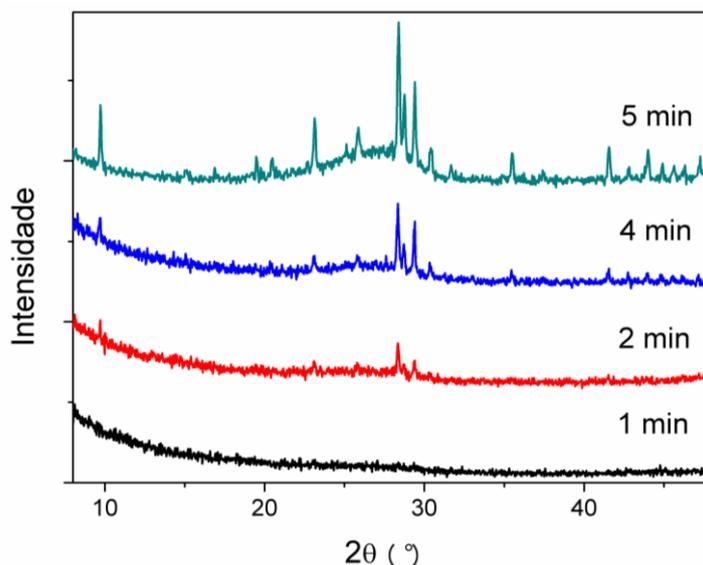
energia do laser foi o primeiro parâmetro a variar, pois a energia fornecida ao alvo durante a ablação tem implicação direta na dinâmica de vaporização do material antes mesmo que o material ejetado entre em contato com o substrato. Para todas as deposições, a área de ablação foi mantida fixa em  $1 \text{ mm}^2$  (área de interação do feixe na superfície do alvo). Dessa forma, uma série de amostras foi produzida variando a fluência de deposição (energia/área) e mantendo fixos os demais parâmetros:  $t = 5 \text{ min}$ ,  $d = 3 \text{ cm}$ ,  $P = 3 \times 10^{-6} \text{ mbar}$  e temperatura ambiente (veja Tabela 4.2). A Figura 5.10 apresenta os difratogramas para os filmes produzidos de 10 a  $38 \text{ J/cm}^2$ . O resultado confirma o aumento na cristalinidade dos recobrimentos devido ao aumento da fluência, pois mais energia está sendo fornecida para formação e cristalização dos filmes. Os filmes dessa série consistiram da fase de HAP com diferentes graus de cristalinidade e nenhuma outra fase foi formada nessas condições de deposição.



**Figura 5.10:** Variação na cristalinidade dos filmes em função do aumento da fluência do laser, para os filmes produzidos à temperatura ambiente. Esses difratogramas exibem apenas os picos de fase cristalina referente à HAP.

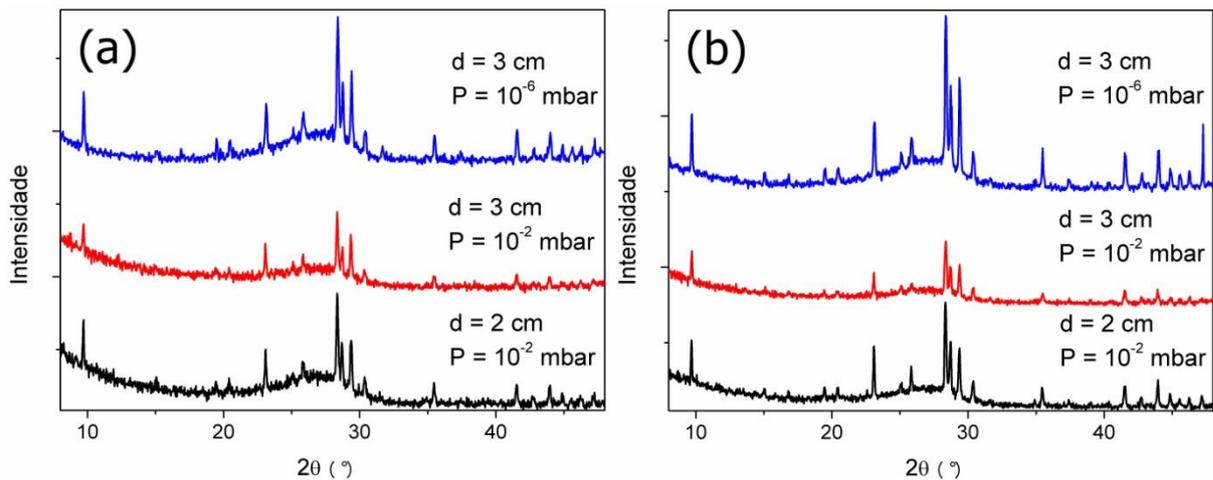
Para conhecer a influência do tempo de deposição na formação da fase cristalina, os filmes produzidos com  $25 \text{ J/cm}^2$  apresentaram cristalinidade a partir de 2 minutos de deposição nos 3 planos mais intensos para a HAP, como mostram os difratogramas da

Figura 5.11. O recobrimento produzido em 2 minutos tem aproximadamente 60 nm de espessura.



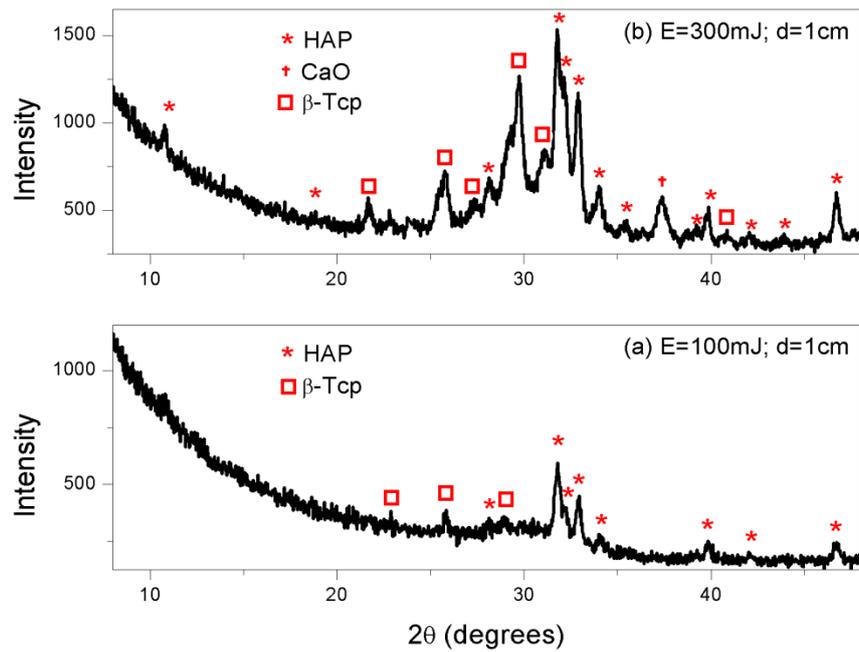
**Figura 5.11:** Difratogramas com variação no tempo de deposição para 25 J/cm<sup>2</sup>. Os picos mais intensos da HAP aparecem a partir de 2 min de deposição. Todos os picos correspondem à fase cristalina da HAP.

Tanto a pressão de deposição quanto a distância entre alvo e substrato influenciam diretamente na formação do filme através do livre caminho médio das partículas da pluma de plasma. Nesse trabalho, considerando que a deposição foi realizada sob alto vácuo e com atmosfera não-reativa, a influência da pressão de deposição pode ser verificada na Figura 5.12 (a) e (b) para os filmes produzidos com 25 e 30 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Sob baixo vácuo de 10<sup>-2</sup> mbar, a quantidade de material depositado e a cristalinidade decrescem significativamente quando a distância alvo-substrato passa de 2 para 3 cm, pois aumenta a interação do plasma com as partículas no interior da câmara, diminuindo o livre caminho médio e aumentando a distância que as partículas energéticas tem que percorrer para alcançar o substrato. De forma análoga, para mais alto vácuo e distância de 3 cm, o plasma tem maior expansão e as partículas chegam ao substrato sem grandes interferências com partículas na atmosfera de deposição.

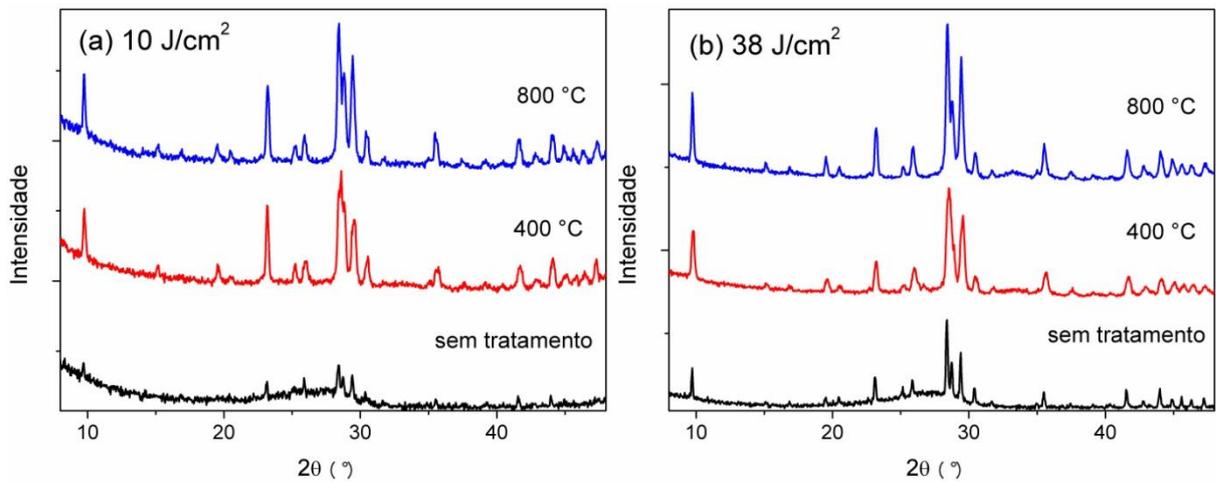


**Figura 5.12:** Influência da pressão de deposição e da distância entre alvo-substrato para filmes depositados com (a)  $25 \text{ J/cm}^2$  e (b)  $30 \text{ J/cm}^2$ . Os resultados apresentam maior quantidade de material depositado sob mais baixa pressão  $P = 10^{-6} \text{ mbar}$  e distância fixa de 3 cm. Todos os filmes apresentaram fase cristalina da HAP.

Para menor distancia alvo-substrato as partículas ejetadas da ablação chegam ao substrato com mais alta energia. Essa energia pode ser suficiente para provocar deposição por implantação de íons e partículas e/ou aumentar a mobilidade dos átomos na superfície dos filmes, produzindo assim filmes mais densos, cristalinos e altamente aderentes ao substrato (veja Seção 3.2.5). Por outro lado, a incidência de partículas com alta energia nos substratos também pode provocar defeitos estruturais durante o crescimento do filme, pulverização por íons retroespalhados e retirar átomos fracamente adsorvidos na camada superficial do recobrimento. Essas características podem saturar a taxa de ablação. Além disso, a energia pode ser suficiente para induzir a formação de outras fases. Isso foi observado quando depositamos o filme sob os mesmos parâmetros, porém com 1 cm de distância entre alvo e substrato. Como consequência desses efeitos, o recobrimento apresentou decomposição da HAP em fases de CaO (ICDD 01-082-1690) e  $\beta$ -Tcp (ICDD 04-008-8714). O resultado é mostrado na Figura 5.13, e o mesmo efeito foi observado para fluências de  $10 \text{ J/cm}^2$  e de  $30 \text{ J/cm}^2$ . Portanto, nesse caso, a decomposição da HAP em outras fases foi provocada por partículas hipertérmicas ( $1 - 10^3 \text{ eV}$ ) produzidas como resultado direto dos parâmetros de deposição [43].



**Figura 5.13:** Difractogramas para dois filmes produzidos com distância alvo-substrato de 1 cm e fluências de (a) 10 J/cm<sup>2</sup> e (b) 30 J/cm<sup>2</sup>. Sob essas condições de deposição, os filmes apresentaram decomposição de fase em β-Tcp e CaO.



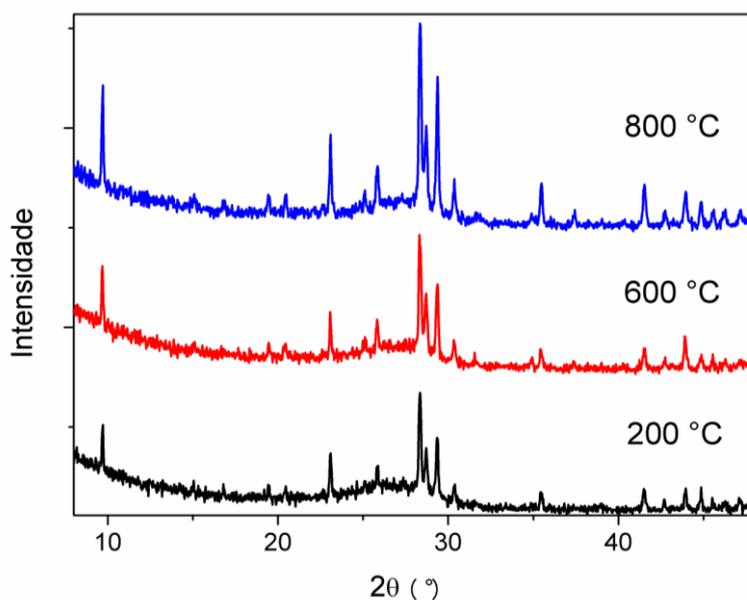
**Figura 5.14:** e ausência de fases ocultas no recobrimento produzido à temperatura ambiente.

Para os recobrimentos produzidos à temperatura ambiente e que apresentaram alto grau de cristalinidade, verificamos a estabilidade com tratamentos térmicos durante e após a deposição.

Os filmes cristalinos produzidos à temperatura ambiente (Figura 5.10) foram submetidos a tratamento térmico após deposição. Os resultados para as amostras de mais baixa (10 J/cm<sup>2</sup>) e mais alta fluência (38 J/cm<sup>2</sup>) são mostrados na Figura 5.14(a) e

(b), respectivamente. Os resultados não mostraram outras fases de CaP que poderiam estar escondidas no intervalo entre 20° a 35°, e que provavelmente se trata de uma fase nanocristalina da HAP.

A Figura 5.15 apresenta os difratogramas de três amostras produzidas com 30 J/cm<sup>2</sup> e aquecimento do substrato a temperaturas de 200, 600 e 800 °C, ou seja, estes são filmes produzidos com tratamento térmico *in situ*. Podemos observar que houve aumento de crescimento orientado dos cristais da HAP e que nenhuma outra fase de CaP foi formada. A temperatura do substrato aumenta o processo de cristalização permitindo melhor difusão dos átomos na superfície do substrato aquecido. Isso significa que a fase da HAP se manteve estável mesmo sob altas temperaturas, para as condições de deposição dessas amostras. Portanto, podemos considerar que esses são parâmetros ótimos de deposição para produzir um filme cristalino de HAP à temperatura ambiente por PLD com laser de ns e  $\lambda = 532$  nm [43].



**Figura 5.15:** Tratamento térmico *in situ* para o filme de 30 J/cm<sup>2</sup> produzido a altas temperaturas de 200, 600 e 800 °C, confirmando o aumento da cristalinidade para elevadas temperaturas do substrato.

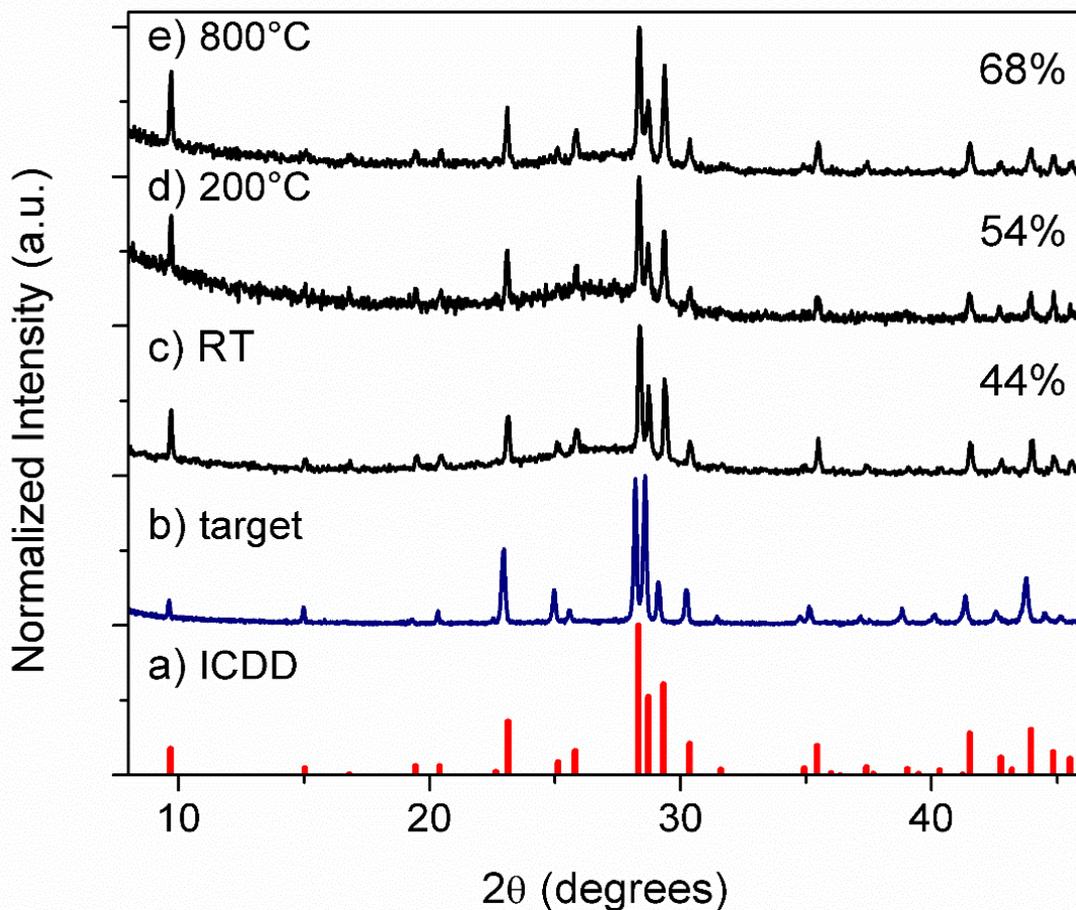
### 5.3. Caracterização físico-química dos filmes produzidos à temperatura ambiente

Após deposição e caracterização dos filmes de HAP em substratos de Si, os recobrimentos foram produzidos sobre substratos de PLA e Ti. Nesta seção, são apresentados os principais resultados sobre os recobrimentos produzidos nas condições ideais de deposição proposta nesta tese.

#### 5.3.1. Cristalinidade e composição de fase

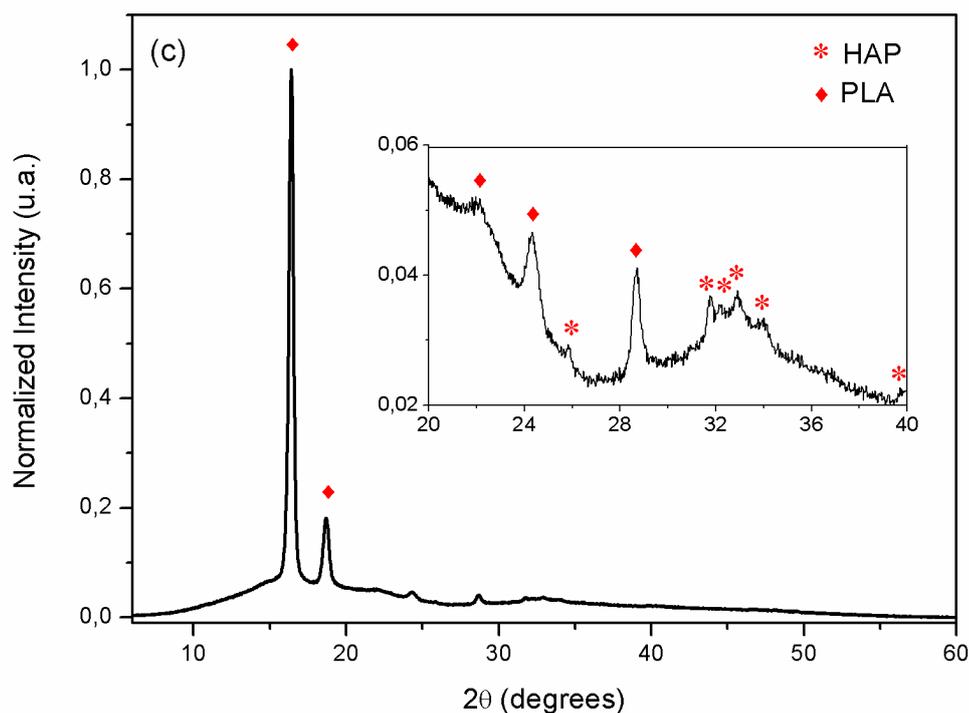
Os padrões de difração do alvo e dos filmes de Si/HAP são apresentados na Figura 5.16 (b-e). Esses difratogramas exibem apenas os picos de fase cristalina referente à HAP, de acordo com a ficha ICDD nº 84-1998, mostrado na Figura 5.16-a. Os filmes apresentam crescimento preferencial ao longo do plano do Si (100) quando comparado ao padrão de difração do alvo (Figura 5.16-b) e uma estrutura larga entre 20° e 35°, que geralmente está relacionada à existência de fosfato de cálcio amorfo. Entretanto, isso também pode representar uma cristalinidade de curto alcance formado por cristais da ordem de 3 a 4 nm [75]. Os difratogramas dos filmes produzidos com substrato aquecido a 200 °C (Figura 5.16-d) e 800 °C (Figura 5.16-e) também mostraram que não há qualquer outra fase de CaP além da HAP. Isso significa que a parte nanocristalina dos recobrimentos é também HAP e não oculta fases de decomposição, como tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP), óxido de cálcio (CaO) e outras.

Para cada amostra, é possível estimar uma quantidade de cristalinidade relativa pela razão entre a área dos picos e a contribuição nanocristalina [70]. Essa quantidade percentual de cristalinidade relativa, apresentada à direita dos difratogramas na Figura 5.16, mostrou que uma temperatura *in situ* mais alta é responsável pelo aumento da cristalinidade a longo alcance (de 44% para 68%), pois a energia disponível permite o aumento do domínio de cristal e reduz a fase nanocristalina.



**Figura 5.16:** (a) difratograma padrão de acordo com a ficha ICDD n° 84-1998. Padrões de difração e respectivas cristalinidades relativas para (b) alvo de HAP, (c) recobrimento de HAP depositado a temperatura ambiente (RT – *room temperature*) com fluência de 30 J/cm<sup>2</sup> e quando depositado com tratamento térmico *in situ* a (d) 200°C e (e) 800°C.

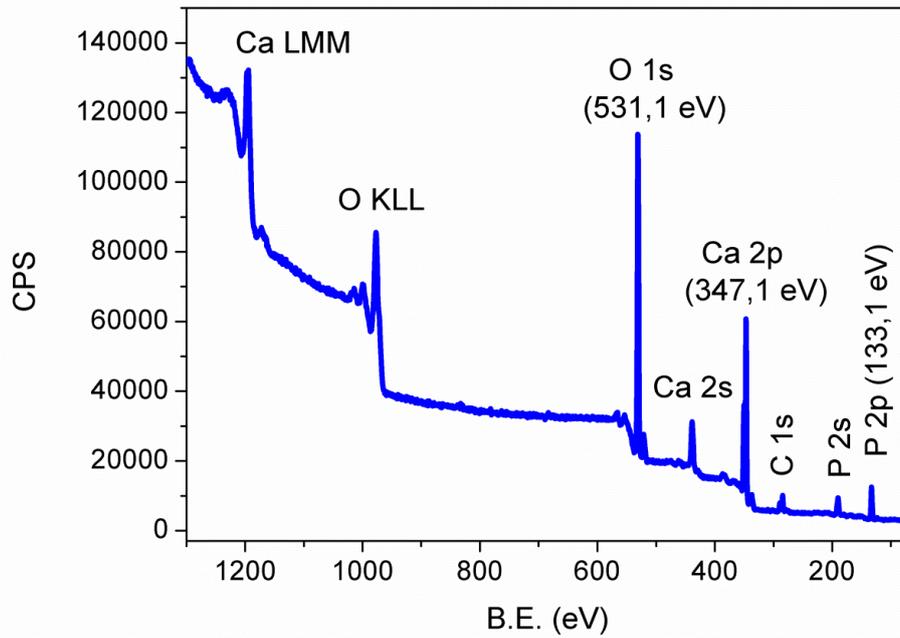
Os filmes produzidos na condição ideal foram depositados sobre substratos de PLA durante 20 minutos. O padrão de difração da amostra PLA/HAP foi obtido com difratômetro comercial com fonte Cu ( $K_{\alpha}$ ) e confirma a existência de uma fase referente a HAP (ICDD n° 09-0432), conforme mostra a Figura 5.17. Os picos de HAP são mostrados no intervalo  $2\theta$  entre 20° e 40° junto com fortes picos cristalinos do substrato de PLA em 16,4° e 18,7° [71]. Estruturas largas são observadas entre 15° e 25° e entre 28° e 40° e podem ser atribuídos a uma estrutura amorfa de PLA ou uma fase com cristalinidade de curto alcance de HAP. Esses resultados, combinados com o espectro EDS da Figura 5.27f confirmam a deposição de HAP cristalina sobre substrato de PLA.



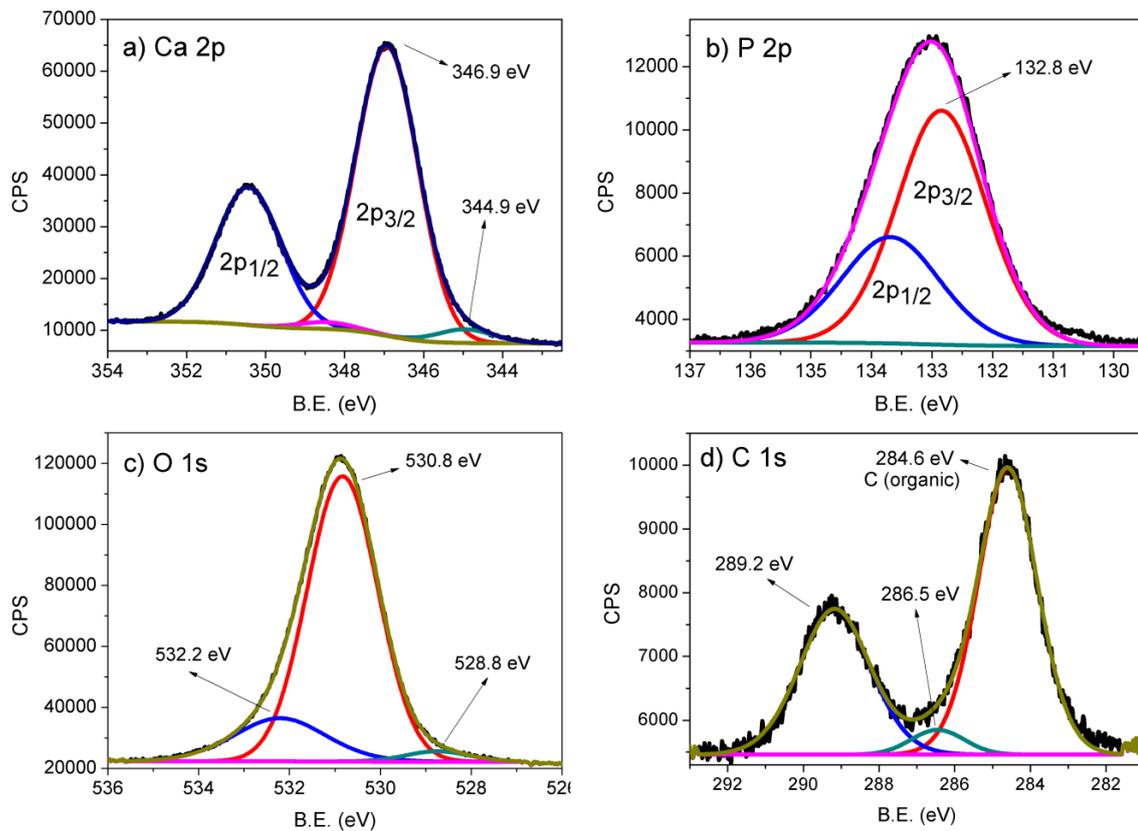
**Figura 5.17:** Recobrimento de PLA/HAP produzido em 20 min de deposição nas condições ideais de deposição.

### 5.3.2. Composição e estequiometria de superfície

A estequiometria e composição de superfície dos recobrimentos foram analisadas por XPS. O espectro total e os espectros de alta resolução de energia, para os recobrimentos produzidos a temperatura ambiente, são apresentados nas Figuras 5.18 e 5.19, respectivamente. A Figura 5.18 mostra a presença dos elementos típicos que compõem a estequiometria da HAP, ou seja, Ca 2p, P 2p e O 1s [77-81]. A partir dos espectros de alta resolução, as energias de ligação correspondentes ao Ca 2p<sub>3/2</sub>, P 2p, e O 1s foram 346,9 eV, 132,9 eV, and 530,9 eV, respectivamente. O pico correspondente ao C 1s em 284,6 eV também foi observado, uma vez que não foi feita uma limpeza iônica da superfície (*sputtering*) antes da medida. O pico C1s é atribuído à contaminação orgânica na superfície, devido à exposição da superfície da amostra ao carbono de origem orgânica presente no ar. Além disso, o espectro de XPS ainda apresenta as linhas espectrais dos elétrons Auger do oxigênio e do cálcio presentes na amostra.



**Figura 5.18:** Espectro total de XPS do recobrimento de HAP produzido por  $30 \text{ J.cm}^{-2}$  com a identificação dos elementos presentes na superfície.



**Figura 5.19:** Espectros de XPS de alta resolução e respectivos ajustes para o recobrimento de HAP produzido com  $30 \text{ J.cm}^{-2}$ : (a) Ca 2p, (b) P 2p, (c) O 1s, e (d) C 1s.

Os picos dos elementos encontrados foram analisados em alta resolução de energia. O pico envelope de Ca 2p<sub>3/2</sub> foi ajustado com dois picos como observado na Figura 5.19-a: (i) 346,9 eV atribuído às ligações de Ca característico da HAP e à ligação de cálcio com íons carbonatos devido a espécies de carbono adsorvidas do ar e (ii) 344,9 eV associado ao cálcio metálico na estrutura da superfície [77,79-83]. O pico P 2p (Figura 5.19-b) foi ajustado com um componente P 2p<sub>3/2</sub> em 132,8 eV, e atribuído às ligações P-O da HAP [77]. Na Figura 5.19-c, o pico O 1s foi ajustado com três picos centrados em (i) 530,8 eV para a energia de ligação do oxigênio nos grupos fosfato (PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup> e grupos OH<sup>-</sup> da estrutura da HAP, como também nos grupos (CO<sub>3</sub>)<sup>2-</sup> adsorvido na superfície da HAP; (ii) 532,2 eV atribuído a O de água adsorvida na superfície da HAP e (iii) a energia de ligação de 528,8 eV, identificada como as ligações de O a átomos de Ca na superfície do revestimento [77,78]. O ajuste do pico na região do C 1s (Figura 5.19-d) mostrou três ligações de energia: (i) 284,6 eV é um pico típico de ligações do tipo C-C e C-H devido a contaminação da superfície com carbono orgânico da atmosfera; (ii) em 286,5 eV atribuído às ligações C-OH e C-O-C e (iii) em 289,2 eV devido às ligações de C-O dos íons carbonato adsorvidos na HAP [78,82]. A Tabela 5.7 mostra os valores de energia de ligação dos picos após a deconvolução, suas composições e possíveis ligações químicas associadas.

**Tabela 5.7:** Identificação dos picos de energia de XPS: energias de ligação e suas atribuições de acordo com a base de dados NIST e respectivas referências.

Pico	Energia de ligação (eV)	Composição	Ligação química	Referências
Ca 2p <sub>3/2</sub>	344,9	Ca	Ca	[80,82,83]
	346,9	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Ca-O	[77,79]
P 2p <sub>3/2</sub>	132,8	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	P-O	[77]
	530,8	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	O-P/O-C	[77]
O 1s	532,2	H <sub>2</sub> O	Ca-OH	[78]
	528,8	CO <sub>3</sub>	C-O	[84]
C 1s	284,6	carbono orgânico	C-C/C-H	[85]
	286,5	C-OH/C-O-C	Ca-OH-C	[78,82]
	289,2	CO <sub>3</sub>	Ca-(CO <sub>3</sub> )	[78]

Os valores das razões atômicas  $Ca/P = 1,85$  e  $C/Ca = 0,17$  foram obtidos a partir do valor da área do pico dividido pelo fator de sensibilidade (F.S.) do respectivo elemento (Tabela 5.8). Os valores de F.S. são tabelados para cada elemento, e considera também a função trabalho do equipamento de XPS utilizado [82]. As razões atômicas representam a proporção atômica na superfície de aproximadamente 2,5 nm de profundidade. Esse valor foi obtido a partir de simulações da trajetória livre média inelástica dos fotoelétrons excitados pela fonte de raios X de  $Al(K\alpha)$  na estrutura do recobrimento de HAP [81,86].

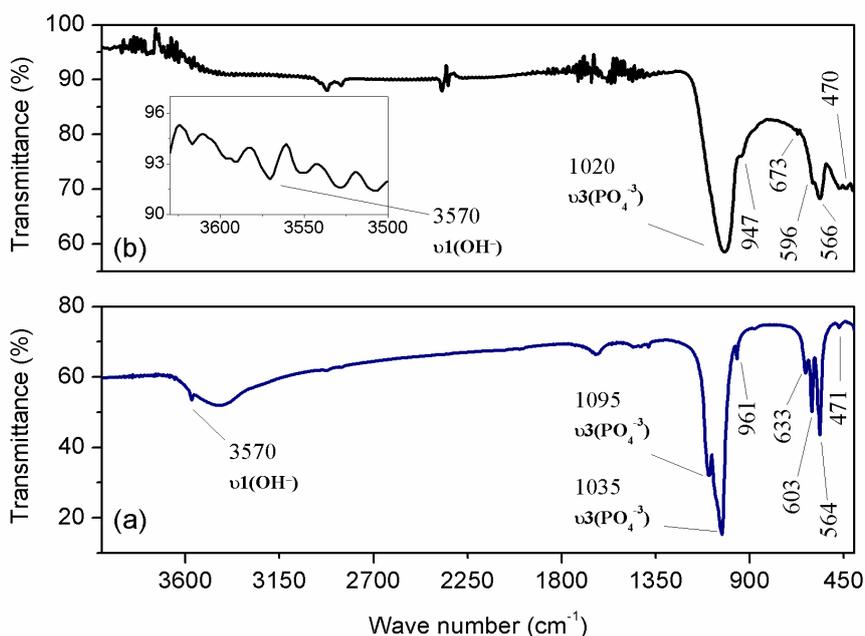
O alto valor da razão  $Ca/P (>1,67)$  pode ser explicado pela adsorção de  $CO_3$ , que entra na superfície do recobrimento e muda a sua estequiometria. Já se sabe que a HAP tem grande afinidade para adsorver os gases  $CO_2$  formando uma HAP carbonatada na sua superfície [87]. Além disso, a técnica de PLD produz recobrimentos rugosos e a grande área de superfície também favorece a adsorção de contaminantes presentes no ar. A partir desses resultados, a seguinte equação de equilíbrio pode ser sugerida para esta superfície:  $Ca^{+2}_{10}(PO_4)^{-3}_{5,4}(CO_3)^{-2}_{1,7}(OH)^{-1}_{0,4}$ . Essa estequiometria é rica em substituição do tipo A, onde os íons carbonato  $(CO_3)^{-2}$  substituem principalmente os íons hidroxila  $(OH)^{-1}$  na superfície do filme [38]. Isso é confirmado pelas medidas de FTIR, onde se observa um decréscimo na intensidade da banda OH em  $3570\text{ cm}^{-1}$  (Figura 5.20a) [88].

**Tabela 5.8:** Área obtida após os ajustes de deconvolução e área corrigida pelo fator de sensibilidade de cada elemento.

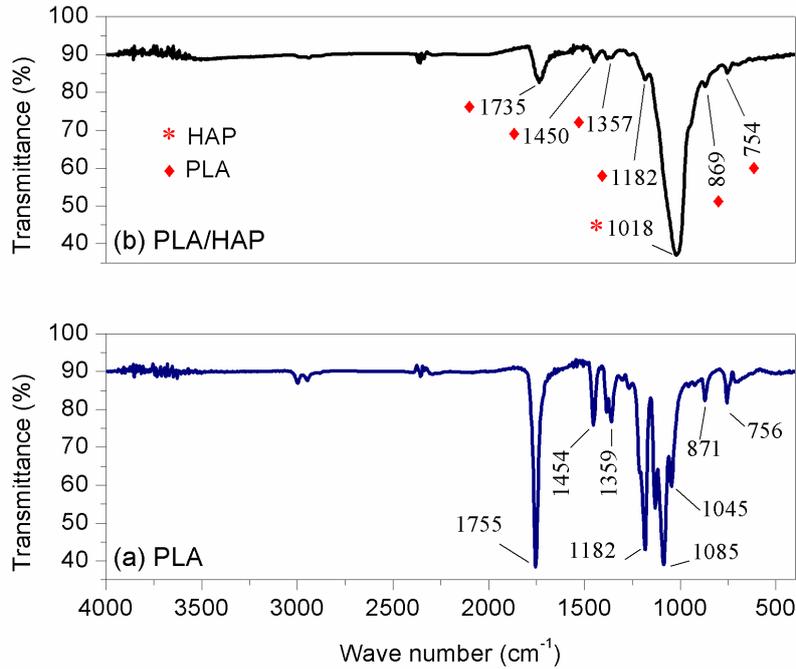
Picos	Área obtida	F.S.	Área corrigida
Ca2p 3/2	110030,1	3,35	32844,8
P2p 3/2	13979,4	0,789	17717,9
O 1s	182021,3	2,93	182021,3
C 1s	5485,6	1	5485,6

A composição química dos recobrimentos também foi analisada por FTIR. Os espectros da HAP em pó e do recobrimento produzido com  $30\text{ J.cm}^{-2}$  de fluência são apresentados nas Figuras 5.20a e b, respectivamente. O recobrimento de HAP apresenta os modos de vibração do fosfato de cálcio  $(PO_4)^{3-}$  em  $1020\text{ cm}^{-1}$ ,  $947\text{ cm}^{-1}$ ,  $596\text{ cm}^{-1}$ ,  $566\text{ cm}^{-1}$  e  $470\text{ cm}^{-1}$  e do grupo iônico (OH) em  $3570\text{ cm}^{-1}$ . Esses modos são tipicamente encontrados no espectro da HAP. Geralmente bandas mais largas como as observadas na Figura 5.20b sugerem a formação de uma estrutura local desordenada.

Nesse caso, porém, o indicativo de que se trata de uma fase com cristalinidade de curto alcance (fase nanocristalina) concorda com os resultados encontrados na difração de raios X (Figura 5.16). É importante notar também que a banda de vibração em  $632\text{ cm}^{-1}$  para a ligação de  $\nu_L(\text{OH}^-)$  é observada no espectro do pó (Figura 5.20a), mas não está presente no espectro do filme (Figura 5.20b). Essa banda OH tende a diminuir em intensidade para uma HAP rica em cálcio e a sua ausência no espectro do filme está de acordo com o aumento da razão Ca/P, observado nas medidas de XPS (Figura 5.19) [89].



**Figura 5.20:** Espectros de FTIR medidos no modo transmissão de (a) HAP em pó e (b) filme de HAP ( $30\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) depositado sobre KBr. As bandas de vibração molecular dos principais grupos iônicos da HAP foram identificadas.



**Figura 5.21:** Espectros de FTIR de (a) substrato de PLA e (b) PLA recoberto com HAP. As atribuições das bandas de vibração molecular identificadas estão na Tabela 5.9.

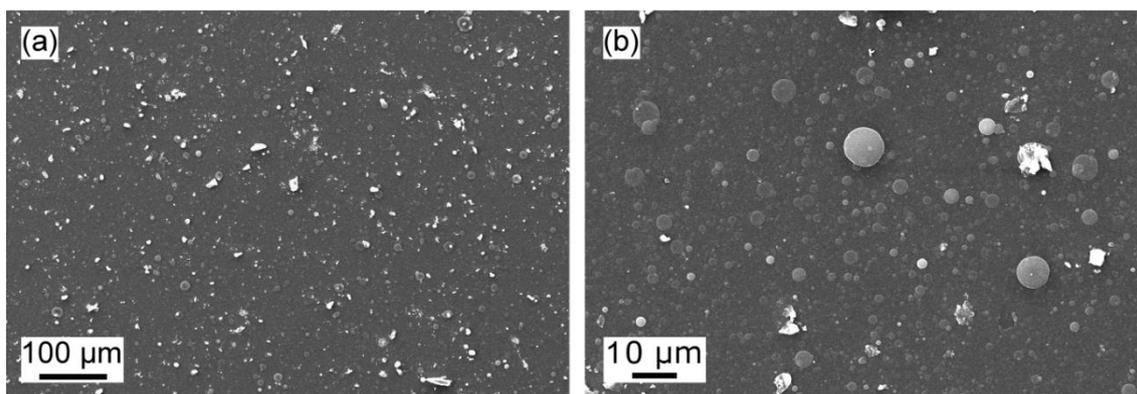
Medidas de FTIR também foram realizadas em amostras de PLA/HAP. O espectro de FTIR do substrato de PLA (Figura 5.21a) apresenta seus modos de vibração típicos [90,91]. Quando recoberto usando o processo de PLD, os modos de vibração do fosfato de cálcio  $(\text{PO}_4)^{3-}$  para uma HAP desordenada com carbonatos estão presentes em uma banda larga centrada em  $1018 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 5.21b) [89]. A Tabela 5.9 apresenta todas as bandas vibracionais para o recobrimento PLA/HAP e suas atribuições de ligação química.

**Table 5.9:** Identificação das bandas vibracionais para o espectro de infravermelho da amostra PLA/HAP na Figura 5.21b.

Posição do pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
1735	-C=O do PLA	[90]
1450	-CH <sub>3</sub> do PLA	[90]
1381, 1357	-CH- do PLA	[90]
1263	-C=O do PLA	[90]
1182	-C-O- do PLA	[90]
1018	P-O da HAP	[89]
869	PLA	[91]
754	PLA	[91]

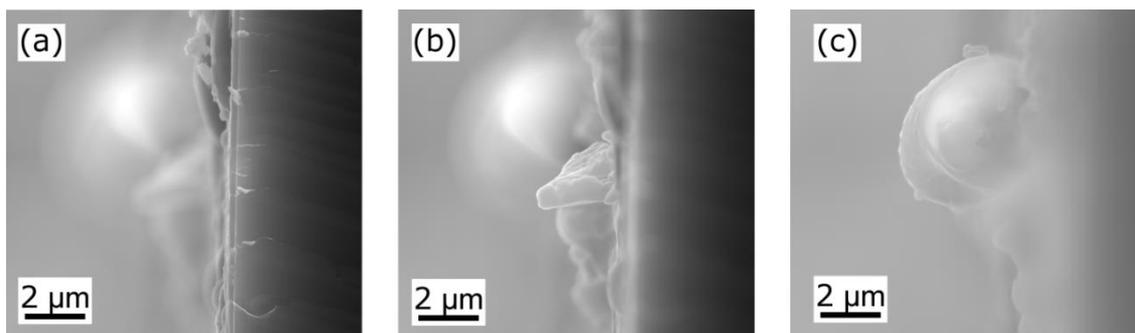
### 5.3.3. Morfologia e composição estrutural

O recobrimento de HAP produzido por PLD, nas condições de deposição estabelecidas nesse trabalho, é indicado como um filme denso, não poroso, homogêneo e rugoso, de acordo com imagens de microscopia eletrônica e de microscopia atômica. A presença de partículas aderidas sobre a superfície do recobrimento é uma característica inerente da técnica. Do ponto de vista morfológico, os filmes podem ser descritos por três componentes: (1) uma camada densa que cobre completamente a superfície do substrato, (2) partículas com tamanhos que variam de nanômetros até 10  $\mu\text{m}$  distribuídas homogênea e uniformemente sobre o recobrimento denso. Essas partículas foram condensadas em formato de roscas ou de discos finos. E (3) partículas maiores agregadas ao filme por energia cinética durante a ejeção. Essas últimas distribuem-se de forma mais espaçada do que as outras (Figura 5.22).



**Figura 5.22:** Imagens de MEV dos filmes de HAP depositados sobre substrato de Si com (a) magnificação de 150x e (b) magnificação de 1000x. As barras de escala são de 100  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

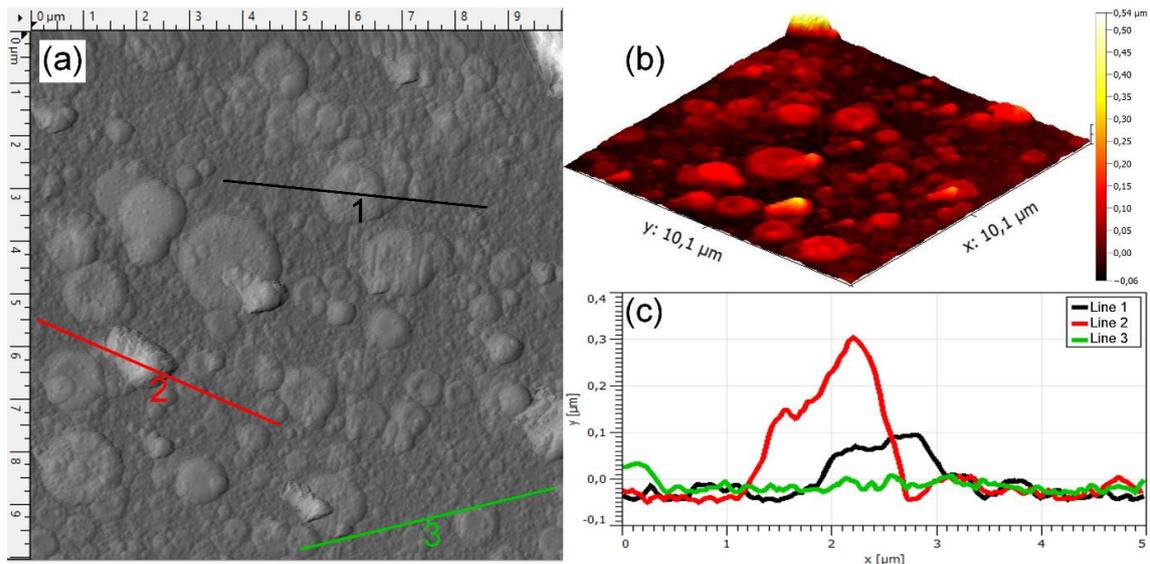
Uma melhor representação das estruturas que formam o recobrimento é apresentada na Figura 5.23, por três imagens observadas em um mesmo ponto em corte transversal, apenas com diferença de distância focal entre elas. Na Figura 5.23a, o foco sobre a superfície clivada permite observar a espessura do filme (~250 nm para 15 min de deposição) que cobre completamente o substrato de Si. Ao variar a distância focal em mais dois estágios sobre a superfície do filme, é possível observar a presença dos dois tipos de partículas agregadas à superfície, que são as partículas ejetadas diretamente do alvo (Figuras 5.23b) e as partículas que foram coalescidas e condensadas sobre a superfície do filme (Figura 5.23c).



**Figure 5.23:** Imagens de seção transversal do recobrimento de HAP com: (a) uma camada densa com espessura de  $\sim 250$  nm, (b) uma partícula micrométrica supostamente não fundida e (c) partícula que passou por processo de fusão antes de se aglomerar ao recobrimento.

A interação do laser pulsado com o alvo de HAP causa um aquecimento local e uma rápida emissão de vapor, aglomerados e micro-grãos ou partículas. Por essa razão, a existência das partículas sobre a superfície é um artefato inerente à técnica PLD, especialmente nesse trabalho, já que o material do alvo tem baixa absorção de fótons no comprimento de onda de 532 nm [20]. A distribuição de tamanho de partículas é uma característica que depende do comprimento de onda do laser, além da temperatura e da superfície do substrato. A morfologia apresentada nas Figuras 5.22 e 5.23 é muito similar aos resultados encontrados na literatura [20].

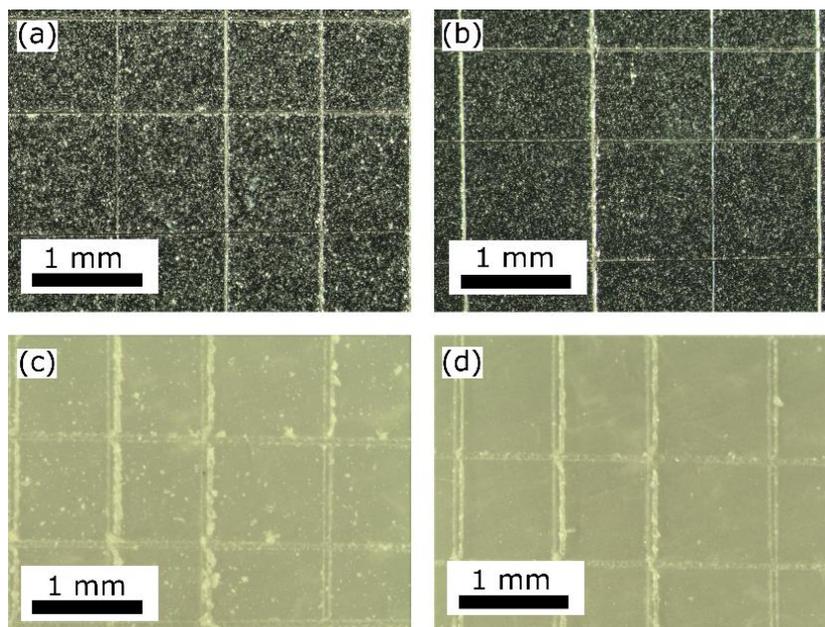
A rugosidade e topografia de superfície também foram investigadas por AFM. A Figura 5.24 mostra que a camada densa é formada pela aglomeração de partículas fundidas, depositadas umas sobre as outras e que cobrem completamente o substrato. Além disso, algumas partículas micrométricas apresentam coalescência, sendo o centro uma região mais plana em relação às bordas. A rugosidade média de 100,4 nm para uma área de  $10 \times 10 \mu\text{m}$  foi calculada com o software Gwyddion.



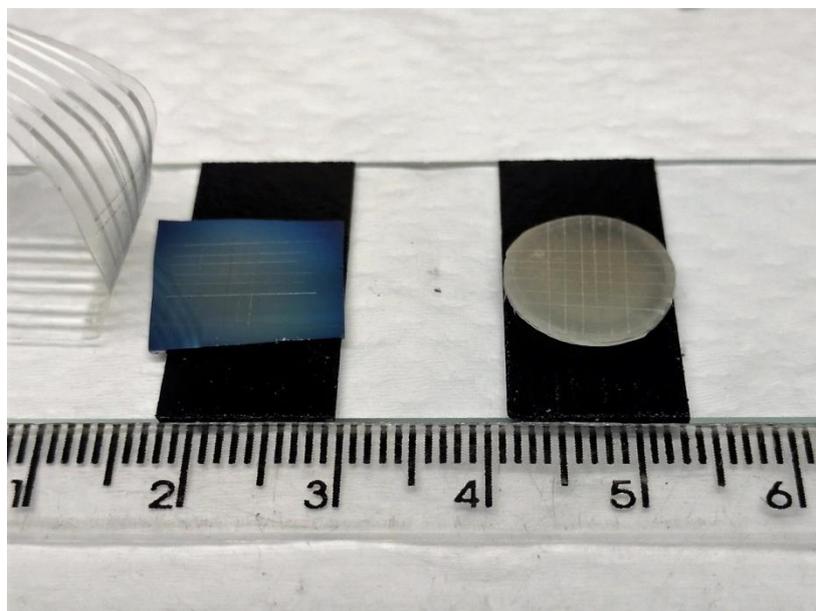
**Figura 5.24:** Medidas de AFM do recobrimento produzido à temperatura ambiente com fluência de  $30 \text{ J.cm}^{-2}$ : (a) representação 2D, (b) representação 3D e (c) perfil linear de rugosidade.

#### 5.3.4. Teste de adesão do filme ao substrato

A adesão do recobrimento ao substrato é considerada um fator importante para fabricação de implantes de alta qualidade porque tem influencia direta na estabilidade a longo prazo dos implantes em meio biológico. Testes de adesão por fita (tape test) foram realizados sobre os filmes depositados em substratos de Si e PLA. O procedimento foi realizado segundo o método B da norma ASTM D3359 [72] e resultados apresentaram boa adesão dos filmes ao substratos, sendo classificados como 5B (nenhum descolamento) As imagens obtidas antes e depois do teste (Figura 5.25) mostraram que alguns aglomerados foram removidos pela fita, mas o filme permaneceu no substrato, como pode ser visto na fotografia da Figura 5.26.



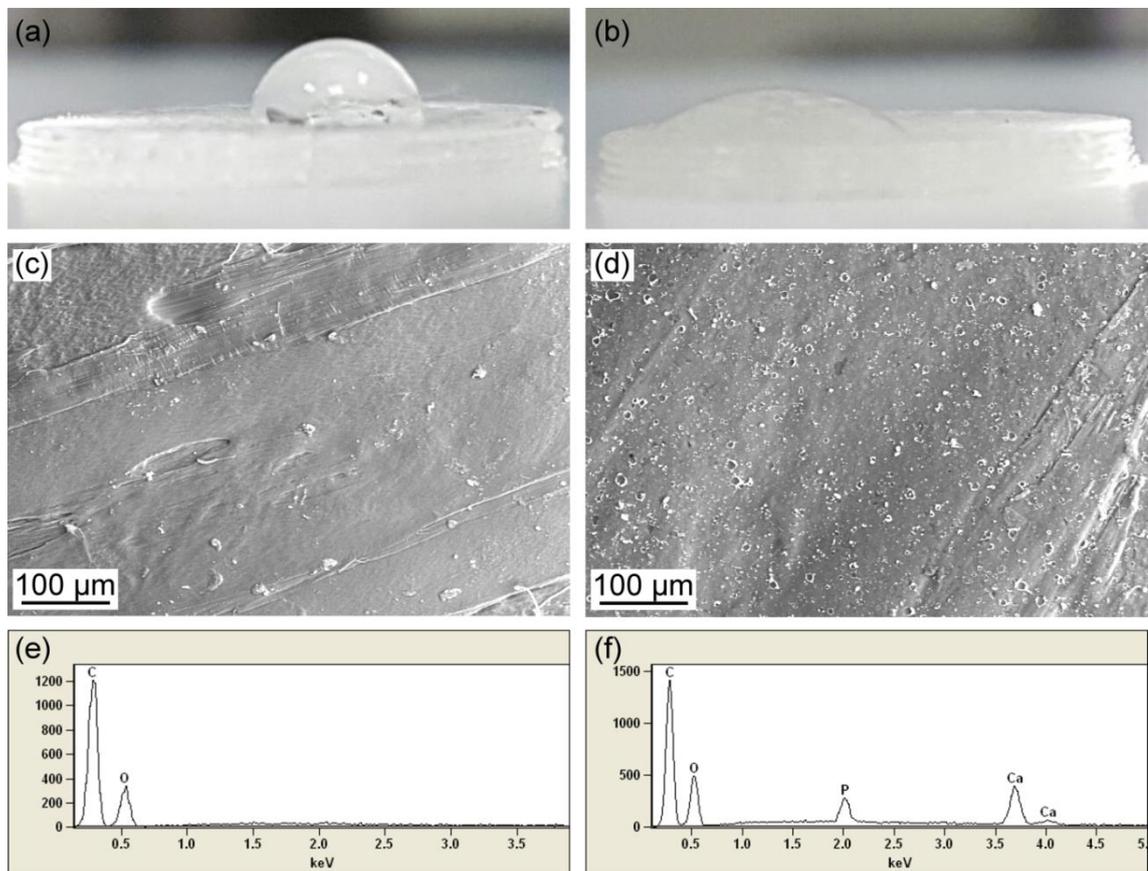
**Figure 5.25:** Imagens dos filmes de HAP depositados sobre Si (a) antes e (b) depois, e sobre PLA (c) antes e (d) depois do teste de adesão



**Figura 5.26:** Fotografia tirada após o teste de adesão dos recobrimentos de HAP produzidos à temperatura ambiente e depositados sobre substratos de Si (à esquerda) e PLA (à direita). O procedimento utilizado seguiu o método B da norma ASTM D3359 [72].

### 5.3.5. Teste de ângulo de contato

Depois de caracterizados em substratos de Si, os recobrimentos foram depositados sobre substrato de PLA para teste de ângulo de contato. O resultado, apresentado na Figura 5.27 a e b apresenta a mudança na hidrofobicidade da superfície devido a existência do recobrimento de HAP no substrato de PLA. Considerando a topografia de superfície, as imagens de MEV (Figuras 5.27 c e d) da amostra de PLA/HAP mostra que o filme de HAP cobre completamente e uniformemente a superfície do substrato de PLA. Na Figura 5.27d as partículas micrométricas previamente descritas são visíveis. Na Figura 5.27 e-f, o espectro EDS mostra os principais elementos presentes nas amostras de PLA e de PLA recoberto com HAP, respectivamente.



**Figure 5.27:** Caracterização do substrato de PLA (à esquerda) e após a deposição do recobrimento de HAP (à direita): (a-b) teste de ângulo de contato (c-d) imagens de MEV e (e-f) espectros EDS.

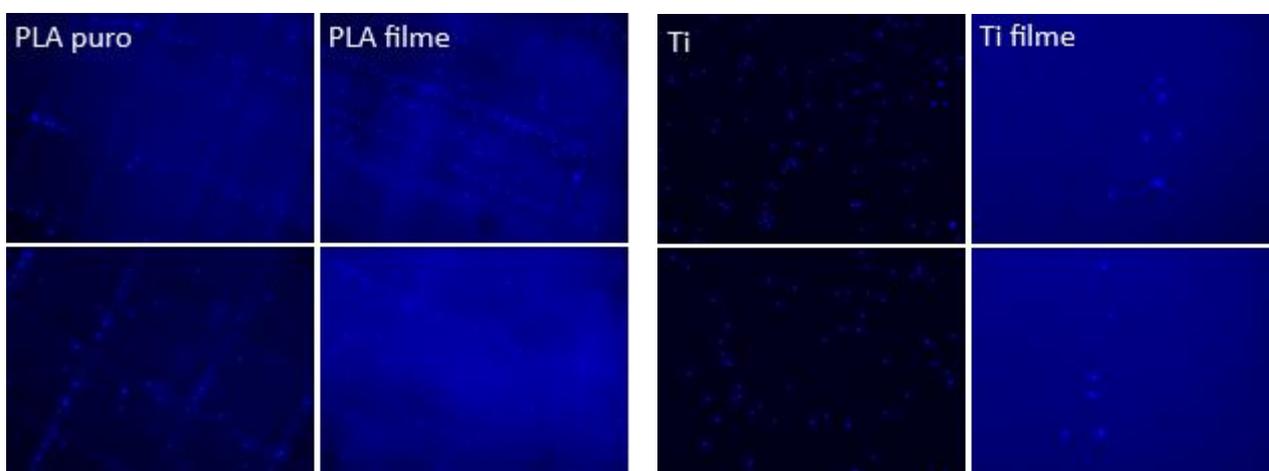
O rápido crescimento da HAP nos filmes produzidos por PLD pode ser associado a alta molhabilidade da superfície. Uma superfície hidrofílica favorece a adesão, migração

e proliferação celular, e os osteoblastos se prendem mais facilmente a superfícies hidrofílicas [44]

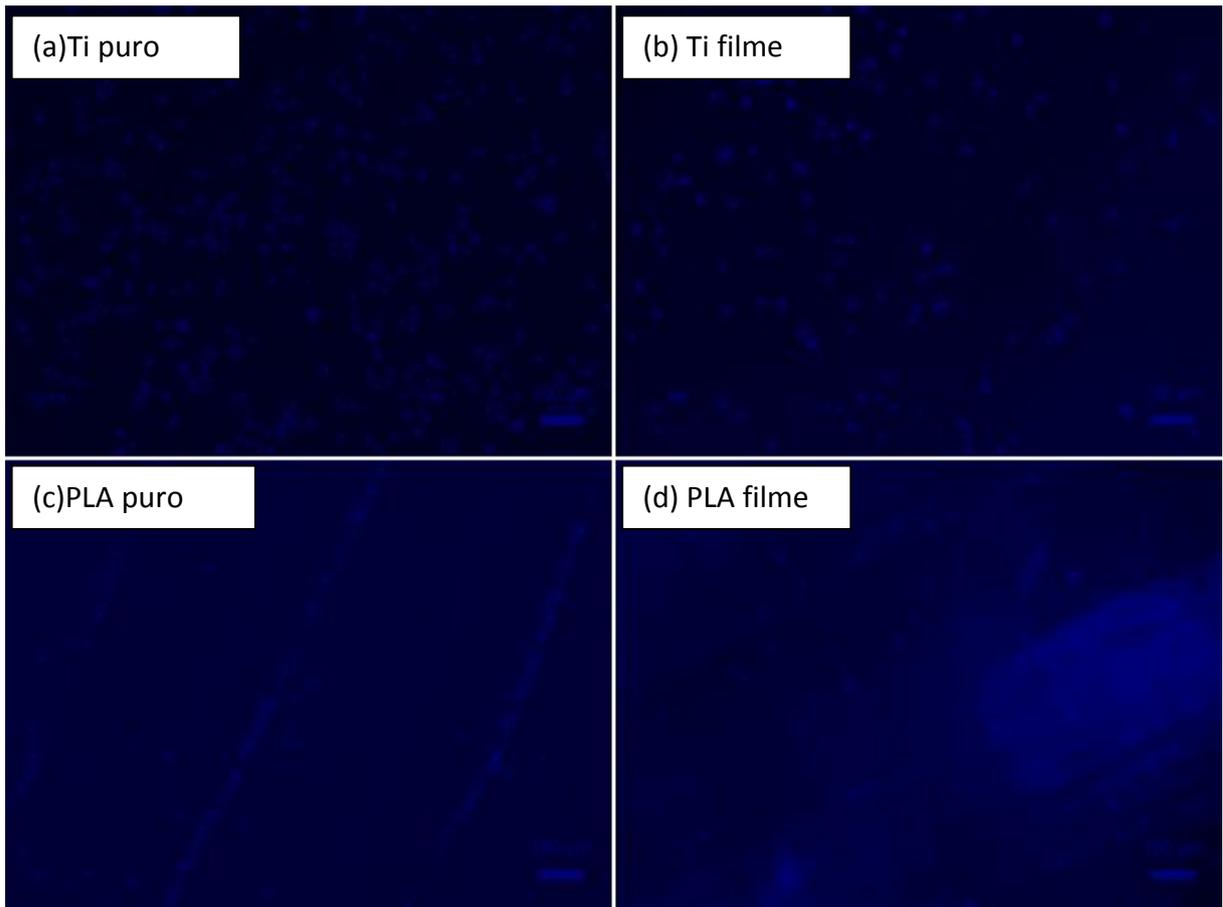
#### 5.4. Ensaios preliminares de adesão e proliferação celular

O procedimento experimental para os primeiros ensaios biológicos (Seção 4.7 do Capítulo 4) foi proposto para observar adesão e cinética de tempo de crescimento e proliferação celular sobre a superfície dos filmes de HAP. Os testes foram realizados em amostras de Ti/HAP (Ti filme), Ti controle (Ti puro), PLA/HAP (PLA filme) e PLA controle (PLA puro) durante tempos de 4h, 24h e 48h.

A Figura 5.28 apresenta duas imagens representativas de cada amostra após 4h em cultura celular. Para ambos os substratos, observamos uma diminuição de população de células nas amostras com filme, quando comparadas às amostras sem o recobrimento de HAP. Entretanto, essa característica é mais evidente entre as amostras de Ti filme e Ti puro. Para as amostras de 24h, foi realizada quantificação por triplicata com cinco imagens para cada amostra, total de 15 imagens. As imagens representativas para as amostras de 24h com marcação DAPI estão apresentadas na Figura 5.29. Entre os tempos de 4h e 24h houve aumento no número de células para as amostras de Ti puro e Ti filme. Porém, o mesmo não se pode afirmar sobre as amostras de PLA puro e PLA filme. A Figura 5.30 apresenta o histograma de contagem celular para as quatro amostras no tempo de 24h. A contagem foi realizada com software Image-Pro Plus para as amostras de Ti puro e Ti filme, e contagem manual/visual foi usada para as amostras de PLA puro e PLA filme.

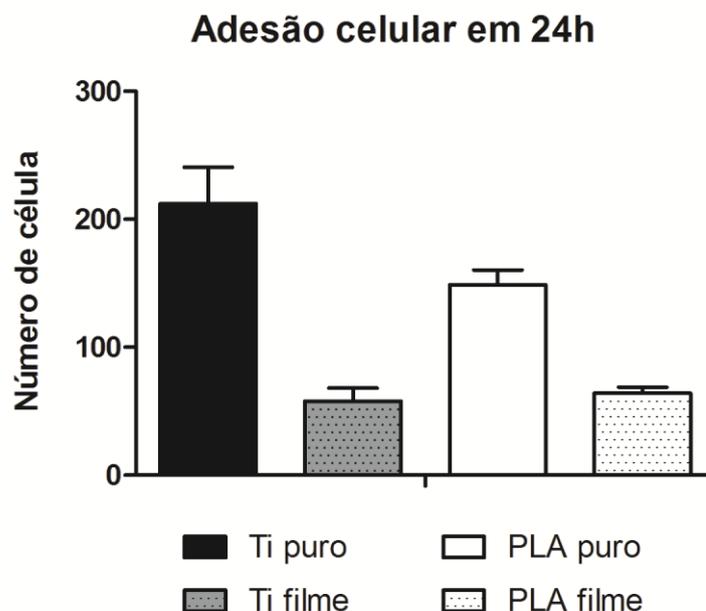


**Figura 5.28:** Imagens representativas das amostras de 4hs. Ampliação de 10x da lente objetiva.



**Figura 5.29:** Imagens representativas para as amostras de 24h com marcação DAPI. Barra de escala de 100  $\mu\text{m}$ .

Nas amostras de 48h, foi realizada marcação tripla para observar os filamentos de actina formados na adesão celular. As imagens representativas para as quatro amostras são apresentadas na Figura 5.31. Os resultados mostram que, com exceção da amostra de Ti, não houve espraiamento celular. Na amostra de PLA filme, o marcador de faloidina (vermelho) está sendo absorvido pelo filme, que pode estar absorvendo também as propriedades ou nutrientes das células, impedindo sua proliferação. Provavelmente, esse mesmo efeito ocorre entre as amostras de Ti puro e Ti filme. Nesse sentido, um processo de cultura dinâmica pode fornecer resultados mais conclusivos.



**Figura 5.30:** Histograma de quantificação celular para as amostras de 24h.

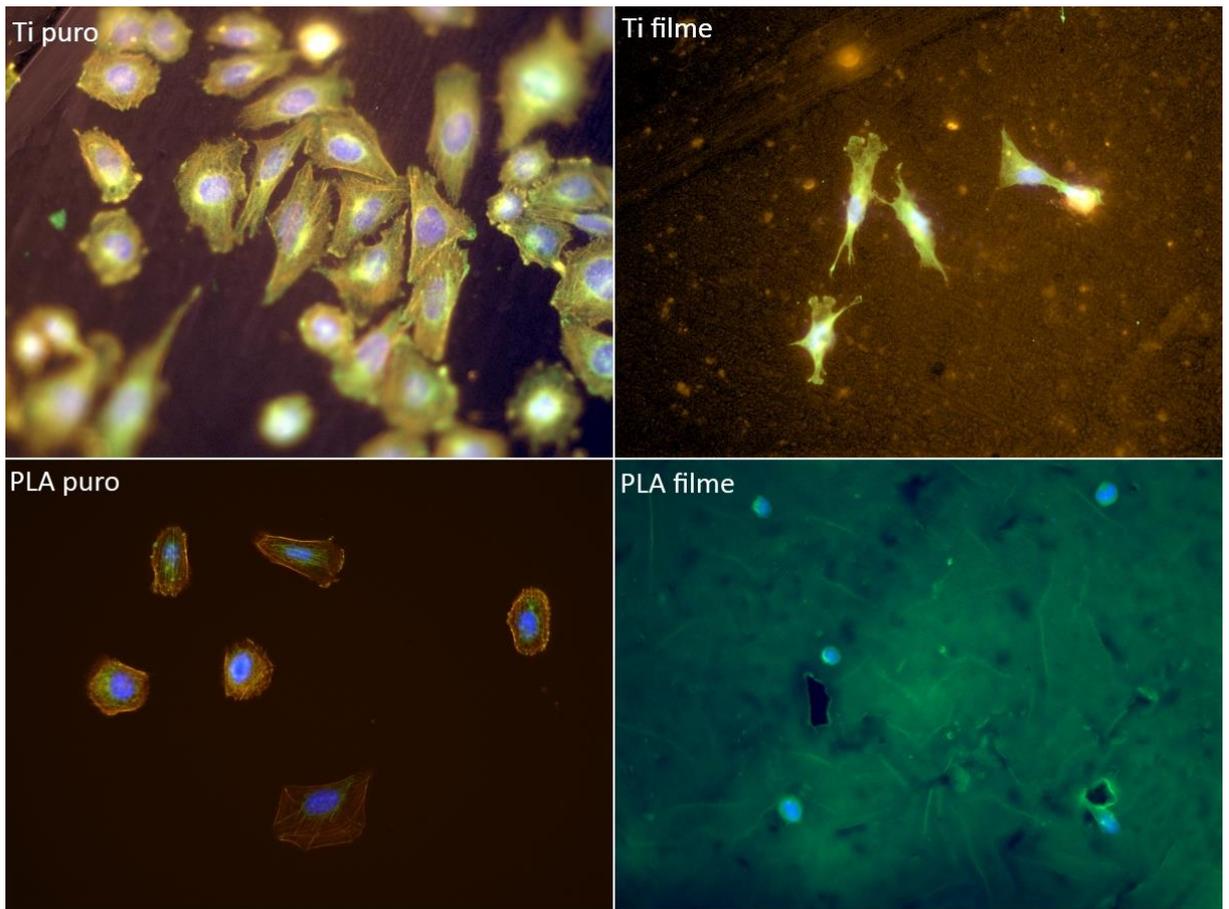
Ao analisarmos os resultados, constatamos a presença de muitos fatores que possivelmente influenciaram a baixa adesão celular nas amostras com o filme de HAP. É importante considerar, por exemplo, a diferença na morfologia e rugosidade entre as quatro amostras, que por sua vez modifica a energia de superfície. De fato, as amostras de Ti foram tratadas com lixa de até 1500 e depois com ataque ácido, o que forneceu rugosidade micrométrica ao substrato. Nas amostras de Ti filme, essa rugosidade foi substituída pela presença do filme, cuja morfologia foi apresentada na Figura 5.22 (Seção 5.3.3) e apresenta mais baixa rugosidade, pois o filme depositado preenche as ranhuras profundas do substrato de Ti lixado. Isso sugere que a maior adesão celular nas amostras de Ti puro pode ser ter sido favorecida pela sua rugosidade.

Nas amostras de PLA, observamos a preferência das células em se alojarem nas fendas da superfície, especialmente nas amostras de PLA puro. Os substratos de PLA apresentam fendas ou sulcos micrométricos provenientes da deposição por filamentos no processo de manufatura aditiva. A partir das imagens nas Figuras 5.28 e 5.29, fica claro que a dimensão desses sulcos é conveniente à adesão celular, quando comparado à “superfície dos filamentos”, apresentada por uma morfologia mais suave. Essa superfície mais suave está mostrada na Figura 5.27d da Seção 5.3.5. Nessa figura, a área foi cautelosamente escolhida para a quantificação por EDS, evitando os sulcos micrométricos da superfície. De certa forma, a presença desses sulcos nos substratos de

PLA não teve influência na caracterização físico-química dos recobrimentos, mas comprometeu a interpretação dos resultados nos testes biológicos. Com relação à morfologia das amostras de PLA filme (PLA/HAP) observa-se maior quantidade de células aderidas sobre a “superfície dos filamentos”, que nesse caso apresentam a rugosidade do filme de HAP, como pode ser observado nas imagens da Figura 5.27(c-d). Dessa forma, podemos afirmar que o PLA puro provocou adesão de maior quantidade de células, porém o PLA filme permitiu maior dispersão da adesão celular. A presença do recobrimento na amostra de PLA filme favoreceu uma distribuição celular de forma mais homogênea, sugerindo que o filme depositado preenche os sulcos existentes no PLA puro. As diferentes rugosidades entre as quatro amostras, e inclusive entre as amostras controle, é uma questão importante que deve ser levada em conta na interpretação dos resultados. De fato, resultados da literatura relatam o efeito relativo da rugosidade na adesão e proliferação celular [92].

Além da cristalinidade e morfologia, a química e a energia de superfície também são propriedades que governam as funcionalidades biológicas de um implante. Uma vez introduzido no corpo humano, a superfície do implante é rapidamente coberta com proteínas pelo sangue ou fluidos intersticiais que constroem uma camada adsorvida uniforme através da qual as células interagem com o implante [44,92]. Em ensaios biológicos, as células induzem a formação e deposição de uma camada de soro protéico sobre a superfície da amostra. Essa camada protéica pode estar sendo absorvida pelo substrato de PLA e/ou pelo filme de HAP. Tanto as características em escala micro quanto em escala nano são importantes porque as células humanas primárias são capazes de reagir com micro e nano topografias, enquanto que a adsorção de proteínas é influenciada pela morfologia em escala nanométrica [92].

Finalmente, a metodologia de contagem de células por área para a quantificação realizada na amostra de 24h não forneceu uma boa estatística. Foram consideradas cinco imagens com área de 1,5 mm<sup>2</sup> cada, de forma que a área total observada para cada amostra é de 7,5 mm<sup>2</sup>. Sendo a amostra uma pastilha de raio 5 mm, então a área total é de 78,54 mm<sup>2</sup>. Portanto, a área observada para quantificação foi cerca de 10% da área total da amostra. A quantificação de células por amostra que considere a área total, obtida com microscópio automático, por exemplo, poderia fornecer uma estatística mais confiável. Portanto, o fato de termos muitas variáveis envolvidas dificulta a interpretação dos dados. Outros ensaios complementares são necessários para correta e efetiva conclusão dos resultados.



**Figura 7.4:** Teste de marcação tripla para as amostras de 48h.

## 6. CONCLUSÕES

- 1) Os objetivos propostos neste trabalho de tese foram alcançados e alguns desses resultados foram publicados na literatura científica [43].
- 2) Esse trabalho descreve a produção de recobrimentos de HAP cristalina à temperatura ambiente usando PLD com alta fluência do laser Nd:YAG 532 nm. Os recobrimentos depositados são caracterizados por microestrutura compacta e bem aderida ao substrato, formada por uma camada nanométrica homogênea com uma superfície irregular que é característico do PLD.
- 3) Tratamentos térmicos realizados durante a deposição mostraram que a componente não cristalina dos recobrimentos consiste de HAP nanocristalina e não degrada em fases indesejadas de CaP e CaO. Tratamentos térmicos realizados após a deposição mostraram que os filmes permaneceram estáveis sob altas temperaturas de 800°C.
- 4) Os tratamentos térmicos foram realizados apenas para verificar a estabilidade do material e a possível presença de outras fases ocultas na parte nanocristalina ou amorfa presentes nos difratogramas, e que são comumente observados nos filmes de HAP produzidos por PLD. Nesse trabalho, os recobrimentos cristalinos de HAP foram produzidos à temperatura ambiente com taxa de deposição de 30 nm/min. Esse resultado é essencial para depositar esses recobrimentos em substratos sensíveis a temperatura como os biopolímeros.
- 5) Apesar de uma ablação conduzida sob baixa absorvância da HAP no comprimento de onda do laser 532 nm, o processo realizado em regime hipertérmico garantiu o mecanismo de expulsão de partículas de alta energia a partir de uma ablação não coerente. Essa condição permite a produção de HAP cristalina devido a transferência de energia cinética das partículas e íons durante a formação e crescimento do filme.

- 6) Um alvo denso e estequiométrico é desejado a fim de suportar a alta fluência do laser e promover o crescimento de recobrimentos puros de HAP. A estequiometria dos alvos de HAP foi analisada por uma técnica não destrutiva de espectroscopia óptica OPC-LIBS, que se mostrou válida quando comparada com técnicas analíticas convencionais, mas que necessitam de digestão da amostra.
- 7) Os recobrimentos foram aplicados a substratos de Ti e de PLA sensível a temperatura e apresentaram boa adesão ao substrato.
- 8) O uso de maior comprimento de onda e fluência gera mais alta taxa de ablação, permitindo a deposição de 150 nm de HAP cristalina em apenas 5 minutos. Esse resultado apresenta taxa de ablação de 30 nm/min que é no mínimo 6 vezes mais alta do que comparado com a técnica de magnetron sputtering. Isso é um fator importante quando consideramos a perspectiva de produção em larga escala, como por exemplo a aplicação comercial desses recobrimentos em implantes biomédicos.
- 9) Os ensaios biológicos realizados nesse trabalho de tese forneceram resultados inconclusivos e mais testes devem ser realizados para efetiva caracterização biológica dos filmes produzidos.

## 7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- 1) PLD com espectrômetro de massa.
- 2) PLD com RHEED.
- 3) Simulação de dinâmica molecular. Os mecanismos básicos da ablação a laser podem ser investigados através de simulações baseadas em processos não lineares de dinâmica molecular. A expansão rápida dos fragmentos em um processo de ablação geralmente é estudada a fim de investigar os processos iniciais de formação de filmes e de nanopartículas produzidas por PLD. As simulações são um meio eficiente de prever e analisar os efeitos obtidos experimentalmente.
- 4) Investigar a dinâmica de crescimento do filme por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os filmes produzidos nesta tese podem ser preparados em FIB (Focused Ion Beam) e observados em TEM, a fim de observar os fenômenos de interação na interface entre o filme e os substratos de Si, Ti e PLA. Além disso, os estágios iniciais de crescimento do filme podem ser observados ao depositar em grades de carbono para TEM. Testes preliminares foram realizados e estão em processo de análise.
- 5) Realizar ensaios mecânicos de adesão e dureza (*scratch tests*).
- 6) Espectroscopia do plasma produzido durante a ablação e crescimento dos filmes. Relacionar as propriedades de temperatura e densidade do plasma às características dos filmes produzidos.
- 7) Testes com células pré-osteoblásticas MC3T3. As células MC3T3 são células de rato pré-osteoblásticas, e menos sensíveis do que as células SAOS.
- 8) Testes de adsorção de proteínas. Já se sabe que a HAP adsorve proteínas, tais como albumina e osteocalcina, enquanto que o Ti e o PLA não adsorvem. Sugere-se que o filme apresente maior aceitação de adesão e proliferação quando em contato prévio com biofilme ou proteínas.
- 9) Testes in-vitro de cultura dinâmica. Um processo de cultura dinâmica tem melhor representatividade de um meio biológico real, pois simula processos inflamatórios e regenerativos com fluxo de células e proteínas, como ocorre dentro do corpo.
- 10) Testes biológicos *in-vivo*. Sugere-se que sejam realizados testes *in-vivo* em calvário de ratos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] N. Eliaz, N. Metoki, Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications, *Materials* 10 (2017) 334.
- [2] W. Habraken, P. Habibovic, M. Epple, M. Bohner, Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?, *Mater. Today* 19 (2016) 69–87.
- [3] R. Bosco, J.V.D. Beucken, S. Leeuwenburgh and J. Jansen, Surface Engineering for Bone Implants- A Trend from Passive to Active Surfaces, *Coatings* 2 (2012) 95-119.
- [4] D. Duraccio, F. Mussano, M.G. Faga, Biomaterials for dental implants: current and future trends, *J. Mater. Sci.* 50 (2015) 4779–4812.
- [5] R.A. Surmenev, M.A. Surmeneva, A.A. Ivanova, Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis - a review, *Acta Biomater.* 10 (2014) 557–579.
- [6] S.V. Dorozhkin, Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C* 55 (2015) 272–326.
- [7] S. Zhang, *Hydroxyapatite Coatings for Biomedical Applications*, CRC Press, 2013.
- [8] A.H. Choi, B. Ben-Nissan, Applications of Hydroxyapatite Nanocoatings and Nanocomposite Coatings in Dentistry, *JSM Dent. Surg.* 1, (2016) 1002.
- [9] V.M. Ievlev, Coatings based on calcium phosphates for metallic medical implants, *Russ. Chem. Rev.* 82 (2013) 131–149.
- [10] R.A. Surmenev, A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication, *Surf. Coatings Technol.* 206 (2012) 2035–2056.
- [11] A. Mello, Z. Hong, A.M. Rossi, L. Luan, M. Farina, W. Querido, J. Eon, J. Terra, G. Balasundaram, T. Webster, A. Feinerman, D. E. Ellis, J. B. Ketterson, C.L. Ferreira, Osteoblast proliferation on hydroxyapatite thin coatings produced by right angle magnetron sputtering, *Biomed. Mater.* 2 (2007) 67-77.
- [12] E.O. López, A. Mello, H. Sendão, L.T. Costa, A.L. Rossi, R.O. Ospina, F.F. Borghi, J.G. Silva Filho, A.M. Rossi, Growth of crystalline hydroxyapatite thin films at room temperature by tuning the energy of the RF-magnetron sputtering plasma, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 9435–9445.
- [13] V. Nelea, C. Morosanu, M. Iliescu, I. N. Mihailescu, Hydroxyapatite thin films grown by pulsed laser deposition and radio-frequency magnetron sputtering: comparative study, *Appl. Surf. Sci.* 228 (2004) 346–356.
- [14] D. B. Chrisey, G. K. Hubler, *Pulsed Laser Deposition of Thin Films*, first ed., John Wiley & Sons, New York, 1994.
- [15] D.G. Wang, W.L. Zhang, H.J. Li, J.H. Zhang, C.Z. Chen, HA/BG composite films deposited by pulse laser under O<sub>2</sub> atmosphere, *Ceram. Int.* 43 (2017) 672–676.
- [16] A. Das, M. Shukla, Surface morphology, bioactivity, and antibacterial studies of pulsed laser deposited hydroxyapatite coatings on Stainless Steel 254 for orthopedic implant applications, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part L J. Mater. Des. Appl.* (2016) 1–8.

- [17] G. P. Dinda, J. Shin, J. Mazumder, Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films on Ti-6Al-4V: Effect of heat treatment on structure and properties, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1821–1830.
- [18] Y. Suda, H. Kawasaki, T. Ohshima, S. Nakashima, S. Kawazoe, and T. Toma, Hydroxyapatite coatings on titanium dioxide thin films prepared by pulsed laser deposition method, *Thin Solid Films*, 506–507 (2006) 115–119.
- [19] L.C. Nistor, C. Ghica, V.S. Teodorescu, S.V. Nistor, M. Dinescu, D. Matei, N. Frangis, N. Vouroutzis, C. Liutas, Deposition of hydroxyapatite thin films by Nd:YAG laser ablation: A microstructural study, *Mater. Res. Bull.* 39 (2004) 2089–2101.
- [20] J. Beltrano, L. Torrisi, and D. Margarone, Biocompatible film deposition by using Nd:YAG pulsed laser, *Radiat. Eff. Defects Solids.* 160 (2005) 545–552.
- [21] J. J. Beltrano, L. Torrisi, A. M. Visco, N. Campo, and E. Rapisarda, Pulsed Laser Deposition (PLD) Technique to Prepare Biocompatible Thin Films, *Adv. Sci. Technol.* 49 (2006) 56–61.
- [22] J.V. Rau, I. Cacciotti, A. De Bonis, M. Fosca, V.S. Komlev, A. Latini, A. Santagata, R. Teghil, “Fe-doped hydroxyapatite coatings for orthopedic and dental implant applications,” *Appl. Surf. Sci.* 307 (2014) 301–305.
- [23] D. Ferro, S. M. Barinov, J. V. Rau, R. Teghil, A. Latini, Calcium phosphate and fluorinated calcium phosphate coatings on titanium deposited by Nd:YAG laser at a high fluence, *Biomaterials* 26 (2005) 805-812.
- [24] E. Tognoni, V. Palleschi, M. Corsi, G. Cristoforetti, Quantitative micro-Analysis by Laser-induced Breakdown Spectroscopy: A Review of the Experimental Approaches. *Spectrochim. Acta B* 57 (2002) 1115-1130.
- [25] R. Fantoni, L. Caneve, F. Colao, L. Fornarini, V. Lazic, V. Spizzichino, Methodologies for laboratory Laser Induced Breakdown Spectroscopy semi-quantitative and quantitative analysis—A review, *Spectrochimica Acta Part B* 63 (2008) 1097-1108.
- [26] F. Anabitarte, A. Cobo, J. M. Lopez-Higuera, *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Fundamentals, Applications, and Challenges 2012* (2012) 1-12.
- [27] A. Ciucci, M. Corsi, V. Palleschi, S. Rastelli, A. Salvetti, E. Tognoni, New Procedure for Quantitative Elemental Analysis by Laser-Induced Plasma Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 960-964.
- [28] R. Gaudiuso, M. Dell'Aglio, O. De Pascale, S. Loperfido, A. Mangone, A. De Giacomo, Laser induced breakdown spectroscopy of archaeological findings with calibration-free inverse method: comparison with classical laser-induced breakdown spectroscopy and conventional techniques, *Anal Chim Acta.* 813 (2014) 15-24.
- [29] C. Aragón, J.A. Aguilera, C Sigma graphs: A new approach for plasma characterization in laser-induced breakdown spectroscopy, *JQRST* 149 (2014) 90-102.
- [30] E. Tognoni, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, V. Palleschi, Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: State of the art 65 (2010) 1-14.
- [31] G.H. Cavalcanti, D.V. Teixeira, S. Legnaioli, G. Lorenzetti, L. Pardini, V. Palleschi, One-point calibration for calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy quantitative analysis, *Spectrochim. Acta B* 87 (2013) 51-56.

- [32] R. Eason, Pulsed Laser Deposition of Thin Films: Applications-Led Growth of Functional Materials, John Wiley & Sons, New Jersey, 2007.
- [33] J.C. Elliott, R.M. Wilson, S.E.P. Dowker, Apatite Structures, JCPDS-International Centre for Diffraction Data, Advances in X-ray Analysis, 45 (2002) 172-181.
- [34] A. Mello, Filmes finos cristalinos de hidroxiapatita: uma abordagem original com *magnetron sputtering* de alvos opostos, tese de doutorado, Instituto Militar de Engenharia, 2007.
- [35] J. Terra, M. Jiang, D.E. Ellis, Philos. Mag. A, 82 (2002) 2357-2377.
- [36] E.O.L. Meza, Influência dos parâmetros do plasma de um *magnetron sputtering* de alvos opostos (RAMS) no controle do crescimento de filmes finos de hidroxiapatita, com substituições iônicas para aplicações biomédicas, tese de doutorado, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, 2014.
- [37] V.S. Bystrov et al., J. Phys. D: Appl. Phys. 48 (2015) 195-302.
- [38] B. Ren, Y. Leng, Carbonated apatite, Type-A or Type-B?, Key Eng. Mater. 493-494 (2012) 293-297.
- [39] M. Castillejo, P.M.Ossi, L.Zhigilei, Lasers in Materials Science, Springer Series in Materials Science, v.191, London, 2014.
- [40] R.J. Narayan, Hydroxyapatite-diamond like carbon nanocomposite films, Mater. Sci. Eng. C 25 (2005) 398-404.
- [41] E.N. Antonov, V.N. Bagratashvili, V.K. Popov, M.D. Ball, D.M. Grant, S.M. Howdle, C.A. Scotchford, Properties of calcium phosphate coatings deposited and modified with lasers, J. Mater. Sci. Mater. Med. 13 (2003) 151-155.
- [42] M. Jelinek et al., Effect of processing parameters on the properties of hydroxylapatite films grown by pulsed laser deposition, Thin Solid Films, 257 (1995) 125-129.
- [43] G.C. Gomes, F.F. Borghi, R.O. Ospina, E.O. López, F.O. Borges, A. Mello, Nd:YAG (532 nm) pulsed laser deposition produces crystalline hydroxyapatite thin coatings at room temperature. Surface & Coatings Technology, 329 (2017) 174-183.
- [44] F. Sima, C. Ristoscu, L. Duta, O. Gallet, K. Ancelme, I.N. Mihailescu, Laser Surface Modification of Biomaterials (2016) 77-125.
- [45] F. Sima et al. Combinatorial matrix-assisted pulsed laser evaporation: Single-step synthesis of biopolymer compositional gradient thin film assemblies, Appl. Phys. Lett. 101(2012).
- [46] H.-Y. Moon, K.K Herrera, N. Omenetto, B.W. Smith, J.D. Winefordner, On the Usefulness of a Duplicating Mirror to Evaluate self-Absorption Effects in Laser Induced Breakdown Spectroscopy. Spectrochim. Acta B 64 (2009) 702-713.
- [47] H. Amamou, A. Bois, B. Ferhat, R. Redon, B. Rossetto, P. Matheron, Correction of self-Absorption Spectral Line and Ratios of Transition Probabilities for Homogeneous and LTE Plasma. J. Quant. Spectrosc. Radiat. 75 (2002) 747-763.
- [48] D. Bulajic, M. Corsi, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, V. Palleschi, A. Salvetti, E. Tognoni, A Procedure for Correcting self-Absorption in Calibration Free-Laser Induced Breakdown Spectroscopy. Spectrochim. Acta B 57 (2002) 339-353.
- [49] F. Bredice, F. O. Borges, H. Sobral, M. Villagran-Muniz, H. O. Di Rocco, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, V. Palleschi, L. Pardini, A. Salvetti and E. Tognoni, Evaluation of self-absorption of

- manganese emission lines in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy measurements, *Spectrochimica Acta Part B* 61(2006) 1294.
- [50] A. De Giacomo, M. Dell'Aglio, O. De Pascale, S. Longo, M. Capitelli, Laser Induced Breakdown Spectroscopy on Meteorites. *Spectrochim. Acta B*, 62 (2007) 1606-1611.
- [51] A. De Giacomo, Experimental Characterization of Metallic Titanium-Laser Induced Plasma by Time and Space Resolved Optical Emission Spectroscopy. *Spectrochim. Acta B*, 58 (2003) 71-83.
- [52] F. O. Borges, Contribuição para o Estudo Teórico-Experimental de Sistemas Atômicos Complexos, tese de doutorado, Universidade Federal Fluminense, 2007.
- [53] R. Noll, Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Fundamentals and Applications, Springer, Londres. 2012.
- [54] L.J. Radziemski, D.A. Cremers, Laser-induced Plasma and Applications, Eds. Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1989.
- [55] G. Cristoforetti, A. De Giacomo, M. Dell'Aglio, S. Legnaioli, E. Tognoni, V. Palleschi, N. Omenetto, Local Thermodynamic Equilibrium in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Beyond the McWhirter Criterion, *Spectrochimica Acta Part B* 65 (2010) 86–95.
- [56] H.R. Griem, Plasma Spectroscopy, Mc Graw Hill, New York, 1964.
- [57] A.P. Thorne, Spectrophysics, Chapman and Hall Ltd, 2ª Edição, Londres, 1988.
- [58] H. Amamou, A. Bois, B. Ferhat, R. Redon, B. Rossetto, M. Ripert, Correction of the self-absorption for reversed spectral lines: application to two resonance lines of neutral aluminium. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* 77 (2003) 365-372.
- [59] P. Fauchais, J. F. Coudert, M. Sardelle, Diagnostic in Thermal Plasma em Plasma Diagnostics, Academic Press, New York, NY, USA, 1989.
- [60] A. Ciucci, M. Corsi, V. Palleschi, S. Rastelli, A. Salvetti, E. Tognoni, New Procedure for Quantitative Elemental Analysis by Laser Induced Plasma Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 53 (2009) 960-964.
- [61] J. Aguilera e C. Aragón, Multi-element Saha-Boltzman and Boltzmann plots in laser-induced plasmas, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62 (2007) 378—385
- [62] B. Praher, V. Palleschi, R. Viskup, J. Heitz, J.D. Pedarnig, Calibration free laser-induced breakdown spectroscopy of oxide materials, *Sprectrochim. Acta B* 65 (2010) 671-679.
- [63] A.M. El Sherbini, H. Hegazy e T.M. El Sherbini, Measurement of electron density utilizing the H $\alpha$ -line from laser produced plasma in air. *Spectrochim. Acta B* 61(2006) 532-539.
- [64] H.J. Kunze, Introduction to Plasma Spectroscopy, Springer Series on Atomic, Optical and Plasma Physics, New York, 2009.
- [65] E. Tognoni, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, V. Palleschi, Calibration-Free Laser-induced Breakdown Spectroscopy: State of the Art, *Spectrochim. Acta B*, 65 (2010) 1-14.
- [66] E. Tognoni, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, V. Palleschi, A. Salvetti, M. Mueller, U. Panne, I. Gornushkin, A Numerical Study of Expected Accuracy and Precision in Calibration-Free Laser-induced Breakdown Spectroscopy in the Assumption of Ideal Analytical Plasma, *Spectrochim. Acta B*, 62 (2007) 1287-1302.

- [67] E. Grifoni, S. Legnaioli, G. Lorenzetti, S. Pagnotta, F. Poggialini, V. Palleschi, From Calibration-Free to Fundamental Parameters Analysis: A comparison of three recently proposed approaches, *Spectrochimica Acta Part B* 124 (2016) 40–46.
- [68] F. Borghi, Recobrimentos cristalinos de hidroxiapatita produzidos a temperatura ambiente por ablação a laser pulsado de Nd:YAG – 532 nm, dissertação de mestrado, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, 2012.
- [69] M. Applications and P. Information, Ingeo™ Biopolymer 4043D Technical Data Sheet 3D Printing Monofilament – General Purpose Grade, 4 (2016) 1–4.
- [70] P. Ahvenainen, I. Kontro, K. Svedström, Comparison of sample crystallinity determination methods by X-ray diffraction for challenging cellulose I materials, *Cellulose*. 23 (2016) 1073–1086.
- [71] R. Neppalli, V. Causin, A. Marigo, M. Meincken, P. Hartmann, A. J. van Reenen, Effect of the electrospun ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) fibres on the structure, morphology and properties of poly (lactic acid) PLA, *Polymer* 54 (2013) 5909-5919.
- [72] Standard Test Methods for Rating Adhesion by tape Test ASTM D3359 (2017).
- [73] H.O. Di Rocco, D. I. Iriarte, and J. Pomarico, General Expression for the Voigt Function that is of Special Interest for Applied Spectroscopy, *Appl Spectrosc* 55 (2001) 822-826.
- [74] E.E. Whiting, An Empirical Approximation to the Voigt Profile, *J Quant Spectros Radiat Tran* 8 (1968) 1379-1384.
- [75] J.E. Sansonetti, and W.C. Martin, Handbook of Basic Atomic Spectroscopic Data, *J Phys Chem Ref Data* 34 (2005) 1559-2259.
- [76] E.O. López, A. Mello, M. Farina, A.M. Rossi, A.L. Rossi, Nanoscale analysis of calcium phosphate films obtained by RF magnetron sputtering during the initial stages of deposition, *Surf. Coatings Technol.* 279 (2015) 16–24.
- [77] T. Hanawa, M. Ota, Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution, *Biomaterials.*, 12 (1991) 767–774.
- [78] A. Demri, D. Muster, XPS study of some calcium compounds, *J. Mater. Process. Technol.* 55 (1995) 311–314.
- [79] M.A. Stranick, M.J. Root, Influence of strontium on monofluorophosphate uptake by hydroxyapatite XPS characterization of the hydroxyapatite surface, *Colloids and Surfaces*, 55 (1991) 137–147.
- [80] Y.A. Teterin, M.I. Sosulnikov, X-ray photoelectron study of Ca, Sr and Ba ion chemical states in high-Tc superconductors, *Phys. C Supercond. its Appl.* 212 (1993) 306–316.
- [81] P.J. Cumpson, M.P. Seah, Elastic Scattering Corrections in AES and XPS. II. Estimating Attenuation Lengths and Conditions Required for their Valid Use in Overlayer/Substrate Experiments, *Surf. Interface Anal.* 25 (1997) 430–446.
- [82] B. Wagner, W.M. Riggs, L.E. Davis, J.F. Moulder, Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy, first ed., Perkin-Elmer Corporation, Minnesota, 1979.
- [83] S. Kaciulis, G. Mattogno, L. Pandolfi, M. Cavalli, G. Gnappi, A. Montenero, XPS study of apatite-based coatings prepared by sol-gel technique, *Appl. Surf. Sci.* 151 (1999) 13–16.
- [84] B. Ren, Y. Leng, Carbonated apatite, Type-A or Type-B?, *Key Eng. Mater.* 493–494 (2012) 293–297.

- [85] C. Hinnen, D. Imbert, J. M. Siffre, P. Marcus, An in situ XPS study of sputter-deposited on graphite, *Appl. Surf. Sci.* 4332 (1994) 219–231.
- [86] <http://lasurface.com/accueil/index.php>
- [87] J. Hsu, P.W. Wang, C. Lee, X-ray photoelectron spectroscopy study of thin TiO<sub>2</sub> films cosputtered with Al, *App. Optics.* 45 (2006) 4303–4309.
- [88] J.C.V. Gilmore, I.S., *Surface Analysis – The Principal Techniques*, second ed. John Wiley & Sons, Chichester, 2009.
- [89] S. Koutsopoulos, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods, *Wiley Periodicals.* February, (2002) 600–612.
- [90] D. Garlotta, A literature review of poly(lactic acid), *Journal of Polymers and the Environment* 9 (2002) 63-84.
- [91] B. Sibeko, Y. E. Shoonara, L. C. Toit, G. Modi, D. Naidoo, R. A. Khan, P. Kumar, V. M. K. Ndesendo, S. E. Iyuke, V. Pillay, Composite Polylactic-Methacrylic Acid Copolymer Nanoparticles for the Delivery of Methotrexate, *Journal of Drug Delivery.* 2012 (2012) 1-18.
- [92] K. Anselme, L. Ploux, A. Ponche, Cell/material interfaces: Influence of surface chemistry and surface topography on cell adhesion, *J. Adhes. Sci. Technol.* 24 (2010) 831–852.
- [93] Prasad D K, Swaminathan AA, Prasad D A. Current trends in surface textures of implants. *J Dent Implant* 2016;6:85-91

## 9. APÊNDICES

### 9.1. APÊNDICE I: Publicações deste trabalho de tese

- 1) **Gomes, G.C.**; Borghi, F.F.; Ospina, R.O.; López, E.O.; Borges, F.O.; Mello, A. *Nd:YAG (532 nm) pulsed laser deposition produces crystalline hydroxyapatite thin coatings at room temperature*. *Surface & Coatings Technology*, v. 329 p.174-183, 2017.
- 2) Borges, Fábio O.; Cavalcanti, Gildo H.; **Gomes, Gabriela C.**; Palleschi, Vincenzo; Mello, Alexandre. *A fast method for the calculation of electron number density and temperature in laser-induced breakdown spectroscopy plasmas using artificial neural networks*. *Applied Physics. B, Lasers and Optics*, v. 117 (1), p. 437-444, 2014.
- 3) Borges, Fábio; Ospina, Johnatann; Cavalcanti, Gildo; Farias, Eliel; Rocha, Anderson; Ferreira, Paula; **Gomes, Gabriela**; Mello, Alexandre. *Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Analysis for Frozen Aqueous Solution Samples by using a Standard Internal Reference and Correcting Self-Absorption Effect*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (Em revisão)

## 9.2. APÊNDICE II: Protocolo dos ensaios biológicos

### **Procedimento do cultivo celular**

As células foram cultivadas rotineiramente em garrafas específicas para cultivo celular e mantidas na incubadora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Duas vezes por semana as células SAOS-2 foram cultivadas em meio McCoy's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Quando confluentes, foram expandidas em garrafas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Para cada passagem, as células foram tripsinizadas em fluxo laminar, com tripsina-EDTA a 0,2%. A tripsinização é um processo enzimático que quebra os pontos de adesão das células e facilita a sua suspensão no meio de cultura celular. O crescimento das células em cultura foi acompanhado diariamente pela observação em microscópio invertido de contraste de fase. Para os experimentos, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e as densidades específicas foram semeadas em placas de 24 poços.

### **Protocolo da fixação dos anticorpos**

Após os tempos de adesão, o meio de cultura foi retirado com cuidado para não agredir as células e os seguintes procedimentos foram realizados:

#### **1) Para as amostras de 30 min, 4hs e 24hs:**

- Lavamos 3x com PBS pH 7.4 (o PBS é uma solução tampão fosfato-salino comumente usado para manter um valor de pH constante);
- Fixamos as células com 0,5 ml de PFA 4% por 10 min em temperatura ambiente (o paraformaldeído PFA serve para bloquear a membrana celular e fixar as células);
- Lavamos 3x com PBS pH 8;
- Adicionamos 500 µl de NH<sub>4</sub>Cl (cloreto de amônio) 20 mM por 10 min em temperatura ambiente.
- Lavamos 3x com PBS pH 8;
- Adicionamos em 500 µl de 0,1% de Triton X-100 + BSA 1% por 10 min (para permeabilizar a estrutura celular);

- Lavamos 3x com PBS pH 8;
- Adicionamos 500 µl BSA 3% por 30 min em temperatura ambiente.
- Lavamos 1x com PBS pH 8.
- Preparamos as amostras para visualização com selante fluorshield com DAPI (solução que já contém o marcador para núcleo).

## 2) Para as amostras de 48hs: Procedimento de marcação tripla

- Realizamos os procedimentos anteriores antes da preparação com DAPI;
- Adicionamos 20 µl do 1º anti-corpo (Anti- Vinculina) 1:200, diluída em solução de BSA 1% (PBS) + 0,1% Triton X-100 e incubada por 1h15 em temperatura ambiente.

- Cálculo da quantidade necessária para a diluição da anti-vinculina:

15 poços × 20 µl de anticorpo = 300 µl de solução final.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \rightarrow V_i = \frac{1}{200} \times 300 = 1,5 \mu\text{l de anticorpo.}$$

300 – 1,5 = 298,5 µl de BSA 1% (PBS) + 0,1% Triton X-100

- Lavamos 3x com PBS pH 8.
- Adicionamos 20 µl do 2º anti-corpo Alexa Fluor 488 (vinculina) 1:500, diluído em solução BSA 1% (PBS) + 0,1% Triton X-100 por 1h em temperatura ambiente.

- Cálculo da quantidade necessária para a diluição da vinculina:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \rightarrow V_i = \frac{1}{500} \times 300 = 0,6 \mu\text{l de anticorpo.}$$

300 – 0,6 = 299,4 µl de BSA 1% (PBS) + 0,1% Triton X-100

- Lavamos 3x com PBS pH 8.

- Adicionamos 20 µl do 3º anti-corpo Alexa Fluor 546 (faloidina) 1:80, diluído em solução BSA 1% (PBS) + 0,1% Triton X-100 por 30 min em temperatura ambiente.

- Cálculo da quantidade necessária para a diluição da faloidina:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \rightarrow V_i = \frac{1}{80} \times 300 = 3,75 \text{ µl de anticorpo.}$$

$$300 - 3,75 = 296,25 \text{ µl de BSA 1% (PBS) + 0,1% Triton X-100}$$

- Lavamos 3x com PBS pH 8.
- Preparamos as amostras para visualização com selante fluorshield com DAPI.

Os anticorpos foram adicionados em placa forrada com parafilme. Os fluorocromos foram descongelados imersos em um suporte com gelo. Devido a sua fotossensibilidade, os fluorocromos foram diluídos e encubados no escuro.