

EFEITO DOS PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO NAS
CARACTERÍSTICAS DE CERÂMICAS POROSAS À BASE DE FOSFATO DE
CÁLCIO PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA ÓSSEA

José Fernandes de Oliveira

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Profa. Glória de Almeida Soares, D. Sc.

Dr. Alexandre Malta Rossi, D. Sc.

Profa. Maria Regina Filgueiras, D. Sc.

Profa. Paula Fernandes de Aguiar, D. Sc.

Prof. Ericksson Rocha e Almendra, D. Sc.

Dra. Mônica Calixto de Andrade, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ-BRASIL
MARÇO DE 2003

OLIVEIRA, JOSÉ FERNANDES DE

Efeito dos Parâmetros de Processamento nas Características de Cerâmicas Porosas à Base de Fosfato de Cálcio para Aplicação em Engenharia Óssea [Rio de Janeiro] 2003

X, 138 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D. Sc., Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2003)

Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Fosfato de Cálcio
2. Cerâmica Porosa
3. Testes *in vitro*

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

*Aos meus pais,
Elita Fernandes de Oliveira e Newton Xavier de Oliveira.*

*Aos meus irmãos,
Odete, Suely, Linda e Nilton*

*À minha mais nova família,
Patrícia Ugarte e Camille Ugarte, que está pra nascer.*

*Ao amigo maior Jesus Cristo.
À terceira revelação e ao Lar de Tereza pelo apoio espiritual.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores profa. Glória de Almeida Soares e o pesquisador Alexandre Malta Rossi pela orientação e colaboração durante a realização desta tese, e por contribuírem ainda mais na minha formação profissional.

Às amigas e pesquisadoras de todos os momentos, que gosto muito: Lídia Sena, Elizabeth Moreira e Valéria Conde pela amizade que se consolidou no Rio de Janeiro, e pelas horas de apoio que foram tantas.

À engenheira e amiga Márcia Soares Sader pelo trabalho indispensável no MEV e pela sua amizade, fruto da nossa convivência.

Ao pesquisador Carlos André (NUCAT/PEQ) pelo apoio na técnica de refinamento pelo método de Rietveld, e a técnica Kátia Gamboa pelo suporte na difração de raios-X.

À profa. Paula Fernandes de Aguiar (IQ/UFRJ) pela orientação e aulas sobre planejamento de experimentos e pela sua amizade.

À profa. Maria Regina Filgueiras (IP/UERJ) pela ajuda na interpretação dos espectros de infravermelho.

À Dra. Marisa Monte e à engenheira e amiga Antonieta Middea (CETEM) pelas análises de espectroscopia de infravermelho.

Aos amigos do laboratório de biocerâmicas do CBPF, e em especial: Elisabeth, Elena Mavropolous e Andréa Machado.

À profa. Maria Cecília Nóbrega pelo suporte na prensagem das pastilhas.

Aos funcionários do PEMM: Reinaldo, José Roberto, Robson Araújo, Elias Xavier, Bruno Souza e Claudia Lauria pelo suporte.

Às estagiárias do laboratório de trabalho (I-239) Michelle, Renata e Paola pela ajuda em vários momentos das análises.

Às amizades formadas no decorrer deste trabalho, especialmente: Magna Monteiro, Guaracilei, Tatiana, Jorge Maurício, Ana Cristina, Alexandre, Marília, Frederico, Walney, Euler e outras mais.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Resumo de Tese apresentada a COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D. Sc.)

EFEITO DOS PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO NAS
CARACTERÍSTICAS DE CERÂMICAS POROSAS À BASE DE FOSFATO DE
CÁLCIO PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA ÓSSEA

José Fernandes de Oliveira

Março/2003

Orientadores: Glória de Almeida Soares

Alexandre Malta Rossi

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Cerâmicas porosas de fosfatos de cálcio têm sido largamente empregadas como enxerto ósseo devido a sua similaridade com a parte mineral do osso. Neste trabalho, foi avaliada a influência de parâmetros de processamento como razão Ca/P do material de partida, porcentagem de naftaleno e temperatura de calcinação nas propriedades de pastilhas, utilizando-se um planejamento fatorial 2^3 . As pastilhas foram caracterizadas por difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho (EIV) com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Análise de imagens e medidas de densidade foram usadas para caracterizar a porosidade das amostras. Os testes *in vitro* foram realizados pela imersão das amostras em solução tampão de trishidroximetilaminometano e em solução simuladora de fluido corpóreo (SFC). Com o planejamento fatorial utilizado materiais foram produzidos com diferentes composições de fases, com quantidades e tamanho de poros diferentes e com grau de dissolução variado para atender aplicações onde se requisite materiais com diferentes propriedades.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D. Sc.)

EFFECT OF PROCESSING PARAMETERS ON CHARACTERISTICS OF
POROUS CERAMICS BASE CALCIUM PHOSPHATE FOR
APPLICATION IN BONE ENGINEERING

José Fernandes de Oliveira

March/2003

Advisors: Glória de Almeida Soares

Alexandre Malta Rossi

Department: Metallurgical and Materials Engineering

Porous calcium phosphate ceramics has been widely used as bone substitute due to its similarity with the mineral part of the bone. In this work, it was evaluated the influence of processing parameters as Ca/P ratio of the start material, percentage of naphthalene and calcination temperature in the properties of discs, using a 2^3 factorial design. The discs characterization was carried out by using X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electrons microscopy (TEM). Images analysis and density measurements were used to characterize samples porosity. *In vitro* tests were carried out by immersing the samples in solution trishydroxymethyaminomethane and simulated body fluids (SBF). With The used factorial design materials they had been produced with mixture of phases, with variations in the amounts and sizes of pores and with varied degree of dissolution to be applied where if it requests materials with different properties.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – Biocerâmicas Osteocondutoras usadas em Implantodontia	3
A – Biovidros	4
B – Vitrocerâmicas	6
C – Fosfatos de Cálcio	7
C.1 – Estabilidade dos Fosfatos de Cálcio em Meio Aquoso	9
C.2 – Apatitas	13
C.3 – Fosfato Tricálcico	16
C.4 – Hidroxiapatita	16
C.4.1 – Métodos de Obtenção da Hidroxiapatita	18
C.4.2 – Compactação e Sinterização	19
C.4.3 – Cristalinidade e Solubilidade	24
C.4.4 – Aplicações da Hidroxiapatita	26
C.5 – Fosfato de Cálcio Bifásico (FCB)	28
2.2 – Propriedades de Superfície de Biomateriais	29
A – Molhabilidade	31
B – Mobilidade Superficial	32
C – Composição Química Superficial	34
D – Topografia	34
2.3 – Técnicas de Caracterização de Materiais	35
A – Análise por Difração de Raios-X (DRX)	35
B – Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EIV)	36
C – Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
D – Análise Eletrônica de Transmissão (MET)	38
E – Espectrometria de Emissão por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP)	39
2.4 – Técnicas de Caracterização Biológica	39
A – Cultura de Células	40
B – Testes de Bioatividade (SFC)	44

2.5 – Quimiometria – Conceitos Gerais	46
A – Planejamentos de Experimentos	46
A.1 – Representação do Planejamento Fatorial com Dois Níveis	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4. RESULTADOS	63
4.1 – Calcinação da Hidroxiapatita em Pó	63
4.2 – Pastilhas Densas	70
4.3 – Pastilhas Porosas	74
4.4 – Experimentos de Degradação e Biológico (SFC)	92
5. DISCUSSÃO	98
5.1 – Calcinação dos Pós de Hidroxiapatita	98
5.2 – Pastilhas Densas Calcinadas	102
5.3 – Hidroxiapatita na Forma Porosa	104
5.4 – Experimentos de Degradação e Biológico	108
6. CONCLUSÕES	112
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
9. ANEXOS	129

1 - Introdução

As pesquisas desenvolvidas no campo de biomateriais a partir de materiais poliméricos, cerâmicos, metálicos, macromoléculas naturais e compósitos tiveram um grande desenvolvimento nos últimos 20 anos. Isto se deve à ampla e diversificada aplicação destes materiais na medicina e odontologia como substitutos de partes do corpo humano. O desenvolvimento desses novos materiais foi estimulado pelos problemas associados ao uso dos materiais tradicionais e do seu comportamento quando em contato com os tecidos calcificados.

Os biomateriais mostram-se fundamentalmente importantes no sentido de melhorar a qualidade de vida das pessoas, representada por um aumento na expectativa de vida, e no bem estar da população. Dessa forma, observa-se nos últimos anos um enorme esforço no intuito de produzir novos dispositivos (elementos cerâmicos) para serem usados na implantodontia.

A hidroxiapatita (HA) é, dentre esses materiais um dos que apresenta maior potencial em aplicações médica e odontológica na área de enxertia óssea, devido às suas propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade. A HA na forma porosa é mais reabsorvível e osteocondutora quando comparada à HA densa. Por essa razão, ela tem sido usada como material para promover o crescimento ósseo. Estudos mostram que esse crescimento é favorecido quando os implantes possuem um diâmetro mínimo de poro de 100 μ m. A porosidade na HA é geralmente obtida pela adição de componentes voláteis, como por exemplo, polímero, naftaleno e outros (VAZ et al., 1999).

No Brasil, materiais de enxerto composto de HA são produzidos apenas na forma de pó e fabricado por algumas empresas. Outras formas, apesar de desenvolvidas no país por meio de pesquisa, ainda não são produzidas em escala industrial. Os dispositivos disponíveis atualmente no mercado são produzidos por tecnologia desenvolvidas no exterior. Na última década, foram constituídos grupos de pesquisas em algumas universidades e institutos brasileiros com objetivo de desenvolver conhecimento e tecnologia próprias nessa área. Apesar dos importantes avanços, a nossa produção tecnológica e científica é ainda insuficiente em relação às necessidades atuais e ao

potencial do mercado brasileiro. Dessa forma, fica clara a importância e urgência de se produzir novas formas desses biomateriais e transferir para o setor produtivo.

O presente trabalho tem como objetivo a produção e caracterização de pastilhas de HA com diferentes composições de fases com variações nas quantidades e tamanhos de poros para aplicações biomédicas. Para isso foi utilizado um planejamento de experimentos uma técnica da Quimiometria, que possibilitou a determinação dos fatores envolvidos na produção de HA, que potencialmente influenciariam nas características do produto final, ou seja, pastilhas porosas.

As amostras foram caracterizadas pelas técnicas convencionais de caracterização metalúrgica, dentre elas destacamos: Análise por Difração de Raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) associada a técnicas de Microanálise por Espectrometria Dispersiva (EDS), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A caracterização dos poros foi realizada pelos métodos da Densidade Teórica e Análise de Imagens e a caracterização biológica foi realizada pelos testes de Solubilidades (Degradação e Bioatividade). No teste de degradação foi utilizada uma solução tampão TRIS-HCl e no teste de bioatividade foi utilizada uma solução simuladora do fluido corpóreo (SFC).

Verificou-se que a utilização do planejamento de experimentos é uma metodologia importante na produção de materiais com diferentes características que implicariam num grau de dissolução variado. Observou-se que materiais com alta solubilidade parecem induzir uma precipitação de apatita biológica mais rápida em sua superfície, que poderá contribuir para o processo de neoformação óssea, concordando com os resultados obtidos por outros autores (DUCHEYNE e QIU, 1999).

2 – Revisão Bibliográfica

2.1 – Biocerâmicas osteocondutoras usadas em Implantodontia

As biocerâmicas osteocondutoras encontram-se entre os materiais que vêm sendo amplamente utilizados como substitutos de tecidos ósseos. Dependendo de sua composição química, estrutura e morfologia são biologicamente biocompatíveis e bioativas (CHANG et al., 2000; LU et al., 1999; SUN et al., 1997).

A afinidade das cerâmicas biocompatíveis com o meio fisiológico está associada ao fato de serem compostas de íons também encontrados no meio fisiológico (cálcio, potássio, magnésio, sódio, etc.) e/ou íons que apresentam limitada toxicidade ao corpo humano.

Quando é feito o reparo de um osso fraturado ou quando se aplica algum enxerto para restaurar algum defeito, se inicia uma seqüência de eventos que levará à formação do novo osso, que objetivam a restauração da lesão. Os mecanismos pelos quais os materiais de enxerto atuam sobre o tecido ósseo são: osteocondução e osteoindução.

A osteoindução consiste em estimular o tecido ósseo receptor a formar novo osso pela produção de células osteogênicas, que vão formando a matriz óssea. A osteocondução conduz o crescimento do osso entre as partículas dos materiais, que não são capazes de estimular a neoformação óssea.

Os mecanismos acima citados estão diretamente relacionados com o comportamento e as propriedades dos biomateriais que serão utilizados como implantes.

Os problemas apresentados pelos diferentes tipos de enxertos ósseos (aloenxertos, xenoenxertos) como, por exemplo, risco em potencial de uma imunoresposta contra aloantígenos, transmissão de agentes patogênicos (vírus), determinaram a alternativa de outros materiais naturais ou sintéticos que pudessem substituir esses enxertos com melhores resultados clínicos.

Os enxertos aloplásticos (materiais sintéticos) com propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade são algumas das alternativas promissoras para eliminar

os problemas ocasionados pelo uso de enxertos naturais. Dentre os principais materiais que apresentam essas características destacam-se: cerâmicas de fosfatos de cálcio, biovidros, vitrocerâmicas e compósitos (HA+ TCP e HA + colágeno).

A - Biovidros

São definidos como materiais cerâmicos constituídos principalmente de sílica (SiO_2), cálcio e fosfatos. São produzidos para fornecer uma resposta fisiológica específica, induzindo à formação de uma superfície reativa, devido às características químicas de seus componentes e de um pH alcalino na interface com o tecido.

HENCH e colaboradores (1983) mostraram que um vidro com uma composição química específica, implantado durante seis semanas em fêmures de ratos, não podia ser extraído com facilidade. Esta foi a primeira indicação de que o biovidro induz uma ligação entre o osso e o implante. A composição química conhecida como 45S5, que contém em peso 45% SiO_2 , 24,5% CaO , 24,5% Na_2O e 6% P_2O_5 , foi usada em várias pesquisas, sobre a ligação entre o osso e o biovidro.

Dependendo da composição química do biovidro, diferentes ordens de reatividade e tipo de ligação implante-osso são obtidos, conforme mostra a Figura 2.1, um diagrama de fases trifásico, onde o contorno da ligação osso-implante para os biovidros é relacionado com a composição química em mol % de SiO_2 , Na_2O e CaO , mantendo a quantidade de P_2O_5 constante e igual a 2,6 mols %. O diagrama apresenta cinco regiões, a saber:

Região A → Boa reatividade (ligação no período de 30 dias). Estão os biovidros que possuem composição química que permite uma ligação química com o osso (biovidro 45S5) e a vitrocerâmica ceravital.

Região B → Baixa reatividade (não forma ligação – materiais quase inertes). Estão os vidros silicatos que não apresentam ligação química com o osso, devido a sua baixa reatividade (ex: vidros para janelas e garrafas).

Região C → Alta reatividade (não forma ligação). Os vidros que se dissolvem *in vivo* (vidros reabsorvíveis) no período de 10-30 dias de implantação no organismo.

Região D → Onde estão os materiais que não são vidros e podem ou não apresentar ligação química com o osso, dependendo da sua composição química (materiais que não podem ser usados como implantes).

Região E → A classe de biovidros em que ocorre ligação com ambos os tecidos (duro e mole).

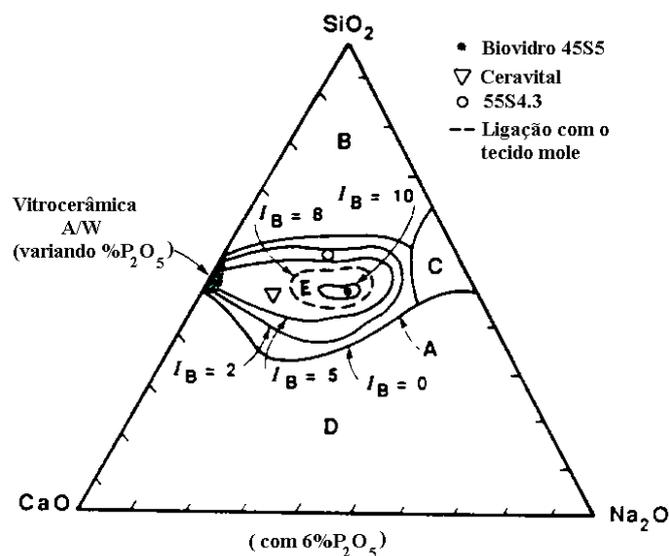


Figura 2.1 – Relação entre a composição química (SiO_2 , Na_2O e CaO) de um material e sua reatividade com o tipo de ligação implante-osso (HENCH, 1999).

Alguns autores (HENCH, 1999; HENCH et al., 1988) propuseram a criação do Índice de Bioatividade (I_B) que fornece uma estimativa sobre o tempo de regeneração do osso, após o biomaterial ter sido implantado. É dado pela relação:

$$I_B = 100/t_{0,5} \quad (1)$$

onde $t_{0,5}$ é o tempo necessário (dias) para que mais de 50% da superfície do material implantado esteja ligado ao osso. Deseja-se que este tempo seja o menor possível, particularmente em tipos de restauração óssea, onde se faz necessária a imobilização do paciente. A Tabela 2.1 apresenta os índices de bioatividade de alguns biomateriais. Quanto maior for I_B mais rápida será a ligação do osso com o tecido.

Tabela 2.1 - Valores de Índice de Bioatividade de alguns Biomateriais (HENCH et al., 1988).

Biomaterial	I_B (100/$t_{0,5}$)
Biovidro 45S5	12,5
Biovidro 55S4. 3	3,7
Vitrocerâmica Ceravital	5,6
Hidroxiapatita	3,1
Aço Inox 316 e Si_3N_4	0,0

Uma das principais aplicações dos biovidros é na substituição de ossículos do ouvido médio (martelo, bigorna e estribo). O conhecimento da biofísica da audição se faz necessário no sentido de entendermos a atuação destes ossículos na transmissão do som. Os biovidros são também utilizados em aplicações ortopédicas, dentais e maxilofaciais.

B - Vitrocerâmicas

As vitrocerâmicas foram desenvolvidas para substituição de ossos e coroas de dentes. Na substituição de ossos são normalmente obtidos a partir de vidros que se cristalizam em uma fase apatítica. São classificadas normalmente em dois grupos: apatita-wollastonita (A-W), desenvolvida pela equipe do pesquisador Kokubo e colaboradores, da Universidade de Kioto (KOKUBO, 1993) e Vitrocerâmicas baseados em Mica (KGS), desenvolvidos por (GROSS e STRUNZ, 1985), para aplicação em coroas de dentes.

As vitrocerâmicas tipo A-W são obtidas a partir de tratamento térmico adequado de vidro em pó compactado com fases MgO-CaO-SiO₂-P₂O₅ presentes. Essa classe de vitrocerâmicas apresenta uma forte ligação química com o tecido ósseo e alta resistência mecânica. São bastante utilizadas em substituição a vértebras da coluna e ossos do quadril como, por exemplo, defeitos no íliaco. No passado, a reconstituição da coluna vertebral era feita utilizando-se uma combinação de materiais metálicos, polímeros (polimetilmetacrilato – PMMA) e/ou alumina. Entretanto, a durabilidade e a eficiência desses materiais não mostraram ser satisfatórias, devido ao deslocamento do material implantado. As vitrocerâmicas A-W foram então desenvolvidas para aplicações clínicas onde é necessária forte ligação química do implante ao tecido ósseo (YAMAMURO, 1994).

C - Fosfatos de Cálcio

As biocerâmicas constituídas de fosfatos de cálcio têm sido usadas nos últimos vinte anos na medicina e na odontologia, devido à similaridade da sua composição química com a fase mineral do tecido ósseo (JARCHO, 1981; HULBERT et al., 1987; DE GROOT e LEGEROS, 1988; LEGEROS, 1998; DE GROOT et al., 1990; LEGEROS e LEGEROS, 1993). Dentro da variedade de aplicações desta biocerâmica pode-se destacar sua função como enxerto em tratamento periodontal, cirurgias ortopédicas e maxilofaciais ou em recobrimentos de implantes dentários. Diferentes fases podem ser formadas, dependendo do tipo de fosfato desejado. Por meio de diagramas de equilíbrio de fases pode-se conhecer as características químicas e a estabilidade química das fases dos fosfatos de cálcio formados.

Os fosfatos de cálcio são sais derivados do ácido fosfórico (H₃PO₄) e são denominados ortofosfatos (HPO₄⁻²; PO₄⁻³). Eles estão presentes no tecido ósseo como CaHPO₄ e Ca₃(PO₄)₂. Eles se classificam como: fosfatos de cálcio hidratados, fosfatos com íons OH⁻ na estrutura cristalina, pertencendo a família das apatitas e os pirofosfatos que são inibidores de nucleação e crescimento de fosfatos de cálcio em meio aquoso. Quando não são dopados, são encontrados na natureza como sólidos de tonalidade variada (branco, verde, marrom e outras), exibindo baixa solubilidade em H₂O e são solúveis em ácido (ELLIOT, 1994).

Os fosfatos de cálcio de aplicação biológica são apresentados abaixo:

- Fosfatos de cálcio amorfo – $\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – FCA
- Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado ou Brushita – $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - HFCD
- Hidrogenofosfato de cálcio anidro ou Monetita – CaHPO_4 - HFCA
- Fosfato tetracálcico – $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ - FTTC
- Fosfato octacálcico – $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - FOC
- Fosfato tricálcico ou Whitlockite – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - FTC
- Pirofosfato de cálcio dihidratado – $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - PFCDH
- Apatita – $(\text{M}^{2+})_{10}(\text{XO}_4^{3-})_6(\text{Z}^-)_2$ - AP
 - Hidroxiapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – HA
 - Fluorapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ - FA
 - Fluohidroxiapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})\text{F}$
 - Carbonatoapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$

Esses fosfatos de cálcio apresentam razões Ca/P variadas, e entre eles as apatitas são as mais estudadas.

Misturas de fosfatos de cálcio para emprego como cimento dentário, tendo a hidroxiapatita como sua fase final, têm sido estudados por vários pesquisadores. Esses estudos se baseiam nos comportamentos de hidrólise de vários ortofosfatos de cálcio, especialmente de $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$. Esses novos cimentos são constituídos de fosfatos tetracálcico, monetita, fosfato octacálcico, brushita, β - α fosfato tricálcico e fosfatos morfos (RAILHAC et al., 1997; SARGIN et al., 1997; WAN et al., 1997; CHOW, 1998).

As características que determinam os cimentos de fosfatos de cálcio como biomateriais atrativos para a reconstrução ou remodelação óssea são: facilidade de manipulação e moldagem, sem ter que dar forma prévia ao implante. A adaptação à forma da cavidade óssea obtendo um contato íntimo entre o osso e o cimento desde os primeiros estágios da implantação (RAILHAC et al., 1997; SARGIN et al., 1997; WAN et al., 1997; CHOW, 1998).

C.1 – Estabilidade dos Fosfatos de Cálcio em Meio Aquoso

Para as aplicações médicas desses fosfatos é de grande importância compreender os mecanismos de sua formação e estabilização durante os testes de caracterização biológica *in vitro* e *in vivo*. Segundo KLEIN et al. (1983; 1993), somente dois fosfatos de cálcio são estáveis à temperatura ambiente em meio aquoso. Essa estabilidade é verificada pelo pH da solução. O hidrogenofosfato de cálcio dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) é mais estável em $\text{pH} < 4,2$ e a hidroxiapatita é mais estável em $\text{pH} > 4,2$, como é ilustrado na Figura 2.2.

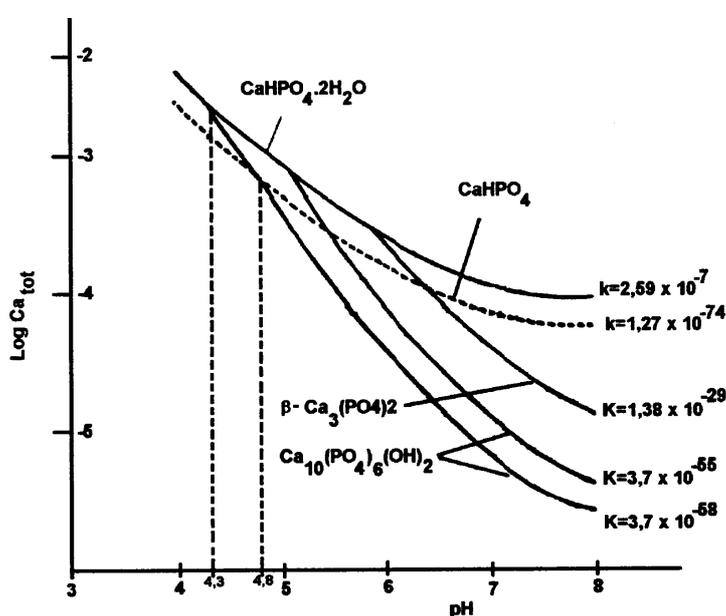
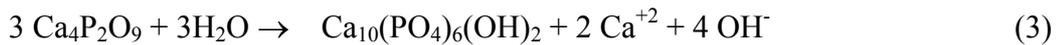


Figura 2.2 – Diagrama de solubilidade de vários fosfatos de cálcio em função do pH (KLEIN et al., 1993).

Em elevadas temperaturas outras fases podem ser formadas, como, β -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfato tetracálcico ($\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$) e o fosfato tricálcico ($\alpha - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

KLEIN et al. (1983; 1993) observaram que em meio aquoso ou em fluido corpóreo, na temperatura de 37°C , esses fosfatos se transformam gradualmente em hidroxiapatita de cálcio, como mostrado pelas reações (2) e (3):





O processo de transformação ocorre pela dissolução inicial na superfície dos fosfatos de cálcio seguida de reprecipitação na forma de hidroxiapatita.

A degradação dos enxertos de fosfato de cálcio, bem como dos recobrimentos é um dos grandes problemas para o uso clínico destes materiais cerâmicos e seus mecanismos não estão definidos completamente. Segundo KLEIN et al. (1983; 1993) os fatores que mais influenciam nesta propriedade são: razão Ca/P, a estrutura cristalina, o grau de porosidade e o ambiente de exposição.

De acordo com DE GROOT et al. (1988) e LEGEROS et al. (1995), a biodegradação dos fosfatos de cálcio é causada por três fatores:

- a) Dissolução físico-química do fosfato, que depende do produto de solubilidade do material e do pH do meio. Nesse processo, novas fases podem ser formadas na superfície dos fosfatos tais como: fosfato de cálcio amorfo, fosfato dicálcico, fosfato octacálcico e substituição aniônica da hidroxiapatita.
- b) Desintegração química de pequenas partículas, como resultado da reação química preferencial nos contornos de grãos.
- c) Fatores biológicos, assim como, a fagocitose, causando diminuição na concentração de H^+ .

A biodegradação dos fosfatos de cálcio está relacionada com a ordem decrescente de solubilidade dos principais fosfatos mostrada a seguir:



Para uma mesma composição, a taxa de biodegradação aumenta quando:

- a) aumenta a área da superfície do fosfato (pó > sólido poroso > sólido denso);
- b) diminui a cristalinidade;

c) quando ocorre substituição iônica de íons CO_3^{2-} , Mg^{+2} e Sr^{+2} na hidroxiapatita.

A taxa de biodegradação diminui quando ocorre:

- a) substituição do íon F^- na hidroxiapatita;
- b) substituição do íon Mg^{+2} no fosfato tricálcico ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$);
- c) diminuição na razão $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{HA}$ em fosfatos de cálcio bifásicos.

A sinterização dos fosfatos de cálcio normalmente ocorre na faixa de temperatura de 1000-1500°C. As fases formadas dependem da temperatura de calcinação, razão Ca/P e da pressão parcial de vapor d'água. No sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ estudado em altas temperaturas, na pressão atmosférica sem a presença de água, vários fosfatos de cálcio podem ser termodinamicamente formados, isso é: fosfato tetracálcico, fosfato tricálcico e mistura de óxido de cálcio com fosfato tetracálcico. Sob essas condições a hidroxiapatita não é termodinamicamente estável. Quando se aumenta a pressão de vapor d'água de 0 para 500 mmHg, como mostra a Figura 2.3, a hidroxiapatita (Ap) pode ser formada, e uma variedade de misturas contendo apatita também pode ser formada.

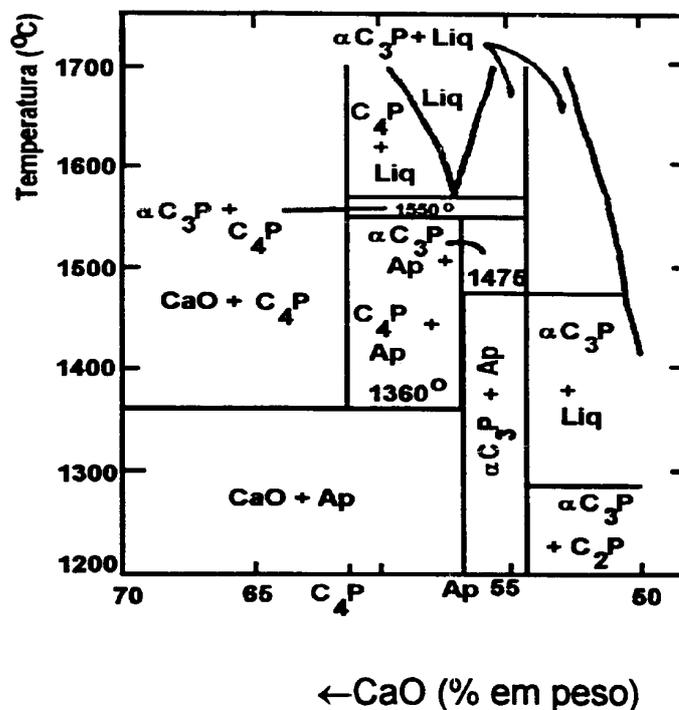
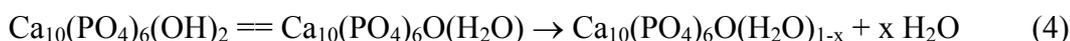


Figura 2.3 – Diagrama de fase do sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ em elevadas temperaturas e $\text{pH}_2\text{O} = 500 \text{ mmHg}$ (RATNER et al., 1996; KLEIN et al., 1993).

De acordo com LEGEROS et al. (1995) a HA estequiométrica se decompõe em temperaturas superiores à 1150°C. Outros autores indicaram que essa decomposição ocorre abaixo de 1250°C, e que a fase β -TCP se transforma em α -TCP em temperaturas superiores a 1250°C sendo a fase α termodinamicamente estável em altas temperaturas (DUCHEYNE et al. 1993).

Na prática são empregados principalmente os fosfatos com razão molar de Ca/P na faixa de 1,5 a 1,7, notadamente a HA e o TCP. O uso de uma dessas fases depende da necessidade de se aplicar um material bioativo ou reabsorvível, uma vez que a HA é menos solúvel que o TCP. A característica de o TCP ser mais reabsorvível está relacionada com sua razão molar e a sua solubilidade em meio fisiológico, no entanto, a presença de microporos na biocerâmica calcinada pode também contribuir para o aumento da solubilidade dos fosfatos.

Com a elevação da temperatura ($\sim 850^\circ\text{C}$) pode ocorrer a desidratação total ou parcial da hidroxiapatita, entretanto a reação é reversível:



com x variando de $0 \leq x \leq 1$.

Diagramas termodinâmicos complementares, como, por exemplo, diagramas Eh – pH são também necessários para o estudo de materiais que serão utilizados em implantes. A importância desses diagramas é de indicar em que condições de potencial e pH um sólido e/ou íon são termodinamicamente estáveis à temperatura do meio fisiológico. Dessa forma, o estabelecimento de tais diagramas implica na necessidade de medidas corretas de pH da solução de cada íon existente na mesma. OLIVEIRA et al. (2000) relataram que o efeito do níquel na adesão osso-implante do aço inoxidável 316L ocorre em uma ampla faixa de pH, favorecendo mais a região alcalina, onde a hidroxiapatita de níquel é termodinamicamente viável em concentrações substanciais de níquel na solução aquosa. VIDIGAL et al. (2000A) no estudo termodinâmico da nucleação e crescimento de hidroxiapatita em tungstênio, com o uso de diagramas Eh - pH verificaram que um filme de tungstato de sódio poderá se formar na superfície do metal tungstênio durante a ativação promovida por um tratamento químico em solução de

NaOH. Na análise termodinâmica sobre o efeito do cobalto na adesão osso-implante da liga Co–Cr–Mo, VIDIGAL et al. (2000B) estabeleceram condições teóricas que favorece a formação de uma ligação osso-implante, na região ácida de pH, onde a hidroxiapatita de cobalto seria termodinamicamente viável, em concentrações elevadas de cobalto na solução aquosa. A complexidade de se prever quais as fases serão estáveis à temperatura ambiente, se deve ao fato que o diagrama termodinâmico não leva em consideração a cinética de formação dos compostos.

C.2 – Apatitas

As apatitas formam uma série de sólidos inorgânicos caracterizados pela fórmula química $(M^{+2})_{10}(XO_4^{-3})_6(Z^-)_2$. O nome de apatitas é justificado pela dificuldade de identificação dos minerais isomorfos, uma vez que eles são frequentemente encontrados na natureza na forma não estequiométrica. Além disso, a estrutura desses compostos pode conter substituições dos sítios M^{+2} , XO_4^{-3} ou Z^- . As espécies M^{+2} são cátions metálicos como, por exemplo: Ca^{+2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , K^+ , etc. As espécies XO_4^{-3} são ânions trivalentes PO_4^{-3} , CO_4^{-3} , SiO_4^{-3} , VO_4^{-3} , etc., e as espécies Z^- são ânions monovalentes: F^- , OH^- , Br^- , Cl^- ou vacâncias (AOKI, 1994).

As apatitas podem ser diferenciadas em relação aos ânions Z^- presentes, isso é: hidroxiapatita (OH^-), fluorapatita (F^-) ou cloroapatita (Cl^-) e a coloração desses compostos pode variar em função dos ânions presentes. As apatitas têm estrutura cristalina hexagonal, mas podem também cristalizar como monoclinica.

A principal característica dos estudos sobre as apatitas é a sua multidisciplinaridade, sendo empregada em diversos campos da ciência tais como: biologia, medicina, catálise química, física do estado sólido, controle ambiental, entre outras. Entre os maiores interesses no estudo das apatitas está o fato da hidroxiapatita ser o principal constituinte dos ossos e dentes e o seu modelo sintético possui aplicação como biomaterial.

A estrutura da hidroxiapatita de cálcio - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (HA) - é usada como modelo para definir a estrutura da apatita biológica: as fases minerais dos tecidos calcificados (esmalte, dentina e ossos) e algumas calcificações patológicas (cálculo dentário humano, pedras salivares e urinárias) são deficientes em cálcio. Entretanto, as duas

estruturas apresentam diferenças de composição, cristalinidade e nas propriedades físicas e mecânicas.

Por meio da técnica de Difração de Raios-X, é possível verificar que apatita do esmalte dentário é menos solúvel do que a da dentina e o osso. A diferença do tamanho do cristal (Tabela 2.2) do esmalte, dentina e osso é atribuída em parte pela influência de impurezas tais como os íons Mg^{+2} e os CO_3^{-2} como mostrado na Tabela 2.2. Esses íons causam uma diminuição na cristalinidade e aumentam a solubilidade nas hidroxiapatitas sintéticas (LEGEROS e LEGEROS, 1993; LEGEROS, 1991).

As apatitas biológicas do esmalte dentário humano podem ser diferenciadas dos seus produtos de sinterização obtidos acima de $800^{\circ}C$. Os produtos de sinterização refletem as diferenças de composição e a deficiência em cálcio do material. Morfologicamente os cristais da apatita do esmalte mudam da forma acicular para a forma hexagonal. Sob tratamento térmico em altas temperaturas, ocorrem mudanças na composição das apatitas biológicas com o desaparecimento da espécie CO_3^{-2} e na formação da fase $\beta-Ca_3(PO_4)_2$ em substituição ao íon Mg^{+2} . A formação do $\beta-Ca_3(PO_4)_2$ após o tratamento térmico do esmalte, dentina, osso e das apatitas deficientes em cálcio é atribuída ao teor de HPO_4^{-2} presente na apatita antes da sinterização (LEGEROS e LEGEROS, 1993).

A composição da hidroxiapatita estequiométrica, em percentagem em peso é: 39,9% Ca, 18,5% P e 3,38% OH, tendo uma razão atômica Ca/P de 1,67. Já o mineral constituinte do tecido ósseo contém, além de Ca^{+2} , PO_4^{-3} e OH^{-} , pequenas quantidades de CO_3^{-2} , Na^{+} ou traços de F e Cl. Devido à presença destes íons substituintes, a razão atômica Ca/P da hidroxiapatita biológica difere do valor estequiométrico, juntamente com a mudança na sua estrutura. O efeito qualitativo da substituição dos íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} e OH^{-} na hidroxiapatita é mostrado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Efeitos das substituições dos íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} e o OH^- na $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (LEGEROS e LEGEROS, 1993).

Substituição	Raio Iônico (Å)	Parâmetro de rede ($\pm 0,003$ Å)		Cristalinidade
		Eixo a	Eixo c	
<i>Ca⁺² por:</i>	0,99	9,438	6,882	-
Sr^{+2}	1,12	(+)	(+)	(nm)
Ba^{+2}	1,34	(+)	(+)	(-)
Pb^{+2}	1,20	(+)	(+)	(-)
K^+	1,33	(nm)	(nm)	(nm)
Na^+	0,97	(nm)	(nm)	(nm)
Li^+	0,68	(nm)	(nm)	(nm)
Mg^{+2}	0,66	(-)*	(-)*	(-)*
Cd^{+2}	0,97	(-)	(-)	(-)
Mn^{+2}	0,80	(-)	(-)	(-)
Zn^{+2}	0,74	(+)*	(+)*	(+)*
Al^{+3}	0,51	(+)	(+)	(-)
<i>OH por:</i>				
F^-	1,36	(-)	(nm)	(+)
Cl^-	1,81	(+)	(-)	(nm)
<i>PO₄⁻³ por:</i>				
CO_3^{-2}	-	(-)	(+)	(-)
HPO_4^{-2}	-	(+)	(nm)	(nm)

(+) – aumenta; (-) – diminui; (nm) – não ocorre mudança.

* FTC formado em adição à AP

A substituição de PO_4^{-3} pelo CO_3^{-2} tem importantes reflexos na atividade metabólica do tecido. Os minerais constituintes das áreas mais ativas como por exemplo a dentina, são menos cristalinos que aqueles das áreas menos ativas e mais cristalizadas, como o esmalte. Em consequência da substituição, a quantidade de CO_3^{-2} e o valor da razão atômica Ca/P influenciam na reatividade da apatita (LEGEROS e LEGEROS, 1993).

A substituição de OH^- por F^- na hidroxiapatita afeta também a reatividade e, provavelmente, a solubilidade das apatitas. As substituições iônicas também acarretam mudanças nos parâmetros de rede da hidroxiapatita: a substituição do íon OH^- pelo íon F^- , causa uma contração no **eixo a** e nenhuma contração no **eixo c**. A solução sólida formada (fluorapatita) nessa substituição é menos solúvel que a hidroxiapatita sendo por isso utilizada na odontologia para combater a degradação da fase mineral dos dentes, provocada por bactérias acidogênicas responsáveis pela ocorrência de cáries dentárias.

As substituições de Ca^{+2} pelo Sr^{+2} explicam o mecanismo de incorporação no esqueleto humano do composto β -estrôncio. Por ser um composto radioativo, pode induzir processos cancerosos nos tecidos ósseos quando submetido a irradiação prolongada.

C.3 – Fosfato Tricálcico

O fosfato tricálcico (TCP) com composição química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, com razão atômica Ca/P igual a 1,5 encontrado nas formas alotrópicas α e β é um biomaterial extremamente biocompatível. Devido em parte à sua estrutura cristalina, a velocidade de biodegradação é muito maior que a da HA. Seu mecanismo de biodegradação ainda não é muito claro. Alguns autores sugeriram que quando aplicado em meio ácido se dissolve “*in situ*” (JARCHO, 1981).

EGGLI et al. (1988), em seus estudos observaram a aposição direta do osso no período de 3 a 6 semanas com aumento da formação óssea à medida que o implante de TCP era absorvido.

O TCP demonstra bioatividade caracterizada pela osteocondução, servindo como substrato para o crescimento vascular do novo osso. Apesar de que boa parte do implante de TCP seja absorvida no primeiro mês, a parte restante permanece no sítio por longos períodos até que seja incorporada dentro da estrutura do osso formado (SANTOS e GUERRA-LÓPEZ, 1992).

Devido sua biocompatibilidade e bioreabsorção, o TCP é utilizado para o preenchimento de cavidades onde uma rápida reabsorção é desejada, como por exemplo, na odontologia para o preenchimento de defeitos causados por enfermidades periodontais, assim como fissuras (ROMERO ROJANO et al., 2000).

C.4 – Hidroxiapatita

A hidroxiapatita de cálcio possui destacada importância científica devido à diversidade de suas aplicações tecnológicas. Ela é encontrada na natureza como formadora de rochas ígneas e sedimentares, podendo ser também sintetizada artificialmente. A hidroxiapatita cristaliza no sistema hexagonal, no grupo espacial $P6_3/m$. A célula

unitária, de dimensões $a = b = 0,942 \text{ \AA}$, $c = 0,688 \text{ \AA}$, é definida por um paralelepípedo imaginário, onde o ângulo entre a e b é de 120° e entre ab e c é igual a 90° , contendo a base unitária de íons (ELLIOT,1994).

A estrutura da hidroxiapatita projetada sobre o plano ab é mostrada na Figura 2.4. Os íons OH^- , na projeção, estão situados nos vértices da base da célula unitária, ao longo de colunas perpendiculares ao plano basal e paralela ao eixo c . Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons óxidos e de íons cálcio estão ligados entre si por íons fosfatos. Os íons OH^- ocupam o centro dos triângulos de cálcio.

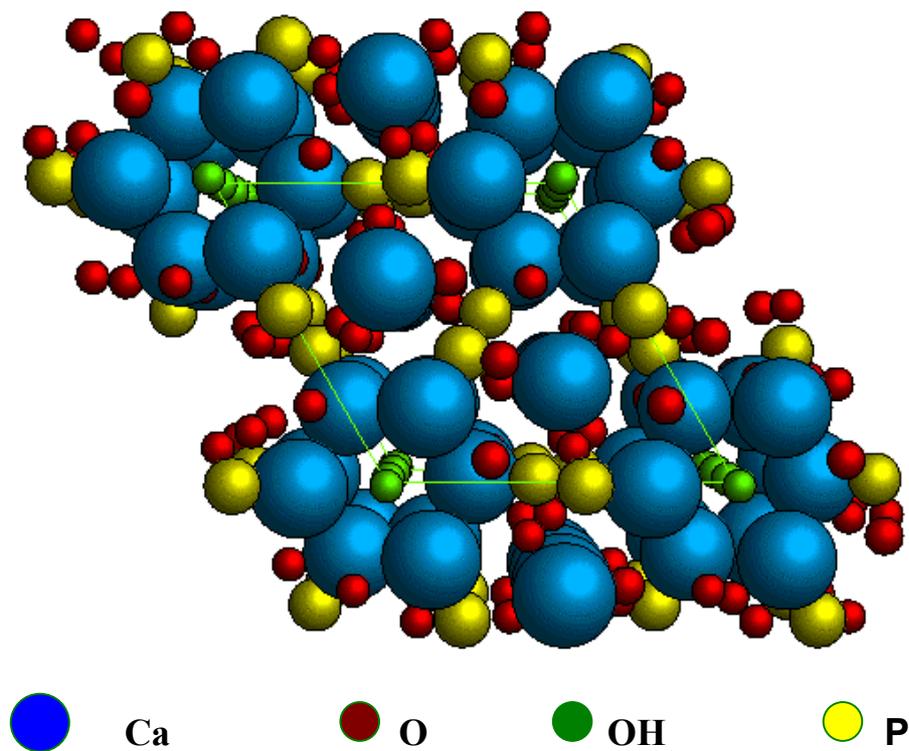


Figura 2.4 – Célula unitária da hidroxiapatita (KAY e YOUNG, 1964).

Substituições do grupo hidroxila (OH^-) por íons F^- e Cl^- levam à formação da fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) e da Cloroapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$) respectivamente, sendo os arranjos atômicos similares a da estrutura da hidroxiapatita.

A hidroxiapatita estequiométrica apresenta razão molar Ca/P de 1,67. No entanto, a hidroxiapatita não-estequiométrica (deficiente em cálcio) é de grande interesse biológico, uma vez que a razão molar Ca/P, é mais próxima à dos ossos e dentes.

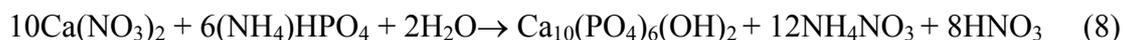
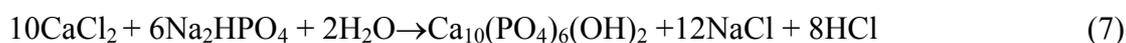
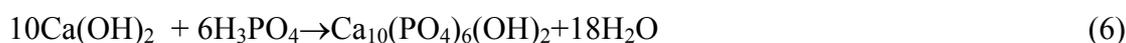
Várias teorias têm sido desenvolvidas para explicar variações nas razões Ca/P das hidroxiapatitas deficientes. Elas levam em conta fases cristalinas não detectadas, adsorção na superfície, substituição na rede e misturas intercristalinas de hidroxiapatita e o fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), cujo padrão de Difração de Raios-X é similar ao da hidroxiapatita; fosfato de cálcio amorfo (ACP), cujo padrão de Raios-X não apresenta os picos de periodicidade da rede discerníveis e pequenas quantidades de hidrogenofosfato de cálcio dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (ELLIOT, 1994). A fórmula que melhor descreve a composição dessas apatitas deficiente em cálcio é dada pela reação abaixo:



C.4.1 – Métodos de Obtenção da Hidroxiapatita

1) Método Úmido

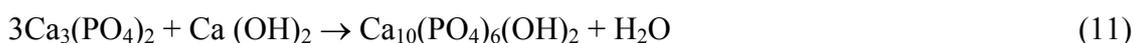
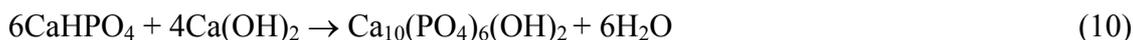
O método úmido, também denominado método de coprecipitação, é caracterizado por produzir pequenos pós cristalinos ou amorfos de hidroxiapatita. Nesse processo temos as seguintes reações:



O método baseado na reação (6), reação do hidróxido de cálcio com ácido fosfórico tem despertado interesse industrial por apresentar como sub-produto apenas a água. O controle da reação é feito através do pH e da quantidade de H_3PO_4 adicionada.

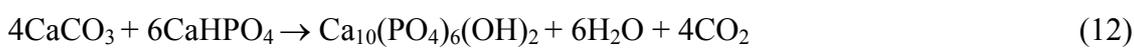
2) Método Seco

Esse método produz pós finos de hidroxiapatita de alta cristalinidade e implica em reações no estado sólido. As reações a seguir, realizadas acima de 950°C descrevem esse método:



3) Método da Síntese Hidrotérmica

As reações a seguir podem ser realizadas hidrotérmicamente na temperatura de 275°C e pressão de 40 atm. O carbonato de cálcio (CaCO_3), na presença de quantidade apropriada de CaHPO_4 ou $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ pode ser convertido em hidroxiapatita (HA):



A síntese hidrotérmica de HA tem despertado grande interesse, pois promove o crescimento de cristais de HA com formato e tamanhos desejados. No entanto, a eficiência da conversão é baixa e o equipamento complexo.

O fosfato tricálcico ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e fosfato tetracálcico ($\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ ou $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$), podem também ser convertidos sob condições hidrotérmicas.

C.4.2 – Compactação e Sinterização

A preparação de pós de hidroxiapatita a partir de reagentes químicos pode ser feita conforme os métodos descritos anteriormente (C.4.1 – métodos de obtenção de hidroxiapatita). Os pós podem ser compactados e sinterizados conforme sua aplicabilidade.

A hidroxiapatita pode ser preparada na forma densa ou porosa. A HA densa é descrita com uma microporosidade máxima de 5% por volume, com os microporos medindo aproximadamente 1µm de diâmetro que são decorrentes da etapa de sinterização (LEGEROS e LEGEROS, 1993). A HA porosa pode ser obtida pela adição de componentes voláteis na mistura de pós de HA, antes da etapa de compactação, como por exemplo, partículas de naftaleno, peróxido de hidrogênio e polímeros. A volatilização destas substâncias em baixas temperaturas produz uma porosidade que consiste em estreitos canais que se comunicam internamente no material. Estudos mostram, que o crescimento ósseo é favorecido em implantes de HA porosa com tamanho de poro de diâmetro mínimo de 100 µm e que, o mesmo pode ser obtido dependendo da quantidade adicionada dos componentes voláteis na mistura (TSUMGA et al., 1997; GAUTHIER et al., 1998; VAZ et al., 1999).

Uma outra forma de se obter HA porosa é a partir de esqueletos de invertebrados marinhos, isto é, corais marinhos do tipo: Goniopora, Porites, Favites e Lobofilia. Estes corais contêm 99% de carbonato de cálcio (CaCO_3) na forma de arogonita e 1% de materiais orgânicos. O carbonato de cálcio é então convertido em HA sob condições precisas de temperatura e pressão (síntese hidrotérmica), na presença de fosfato de amônia. Os componentes orgânicos destes corais são removidos com hipoclorito de sódio. A HA resultante porosa, difere da cerâmica HA em composição e cristalinidade (LEGEROS et al., 1995).

A família de corais Porites e Goniopora apresenta uma estrutura porosa interconectada tridimensionalmente muito similar a do osso esponjoso, cujos poros variam de diâmetro entre 230 a 600 µm (Goniopora) e aproximadamente 200µm (Porites), enquanto que, a família de corais Favites e Lobofilia tem uma estrutura densa similar a do osso cortical.

A compactação uniaxial ou compressão de pós de HA é realizada dentro de moldes específicos com pressões que variam de 60 a 80 MPa. Antes da compactação, aglomerantes são adicionados na mistura como, por exemplo, amido com água ou hidrocarbonetos de baixas massas moleculares. O compactado é então sinterizado pelo método convencional em temperaturas que variam de 950°C a 1300°C com taxas de aquecimentos e resfriamentos de 100°C por hora.

Outras técnicas de compactação e sinterização simultânea são usadas, como por exemplo: pressão a quente e pressão isostática a quente.

A pressão a quente é usada quando se deseja obter uma biocerâmica densa em baixas temperaturas, quando comparadas com as obtidas pelo método convencional (900°C – 1300°C). Entretanto, a densificação feita em baixas temperaturas leva a formação de outros fosfatos de cálcio (α e β $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_6$), que são normalmente formados quando a HA é sinterizada em temperaturas acima de 900°C (LEGEROS e LEGEROS , 1993). Como desvantagem, essa técnica tem custo elevado do equipamento e limitada obtenção de diferentes formas do compactado sinterizado.

A técnica de compactação e sinterização utilizando pressão isostática a quente consiste em que materiais sejam compactados e sinterizados em elevadas pressões e em altas temperaturas simultaneamente. O produto obtido é de excelente qualidade (boa densificação e alta compactação) quando comparado com o produto obtido pelo método convencional.

Utilizando as técnicas descritas acima, obtem-se produtos de HA de várias formas (esféricas, bastões, blocos e outras). Formas irregulares são obtidas a partir de blocos que foram submetidos à etapa de usinagem. Blocos de HA são empregados na fabricação de componentes de implantes do ouvido médio, no aumento do rebordo alveolar para ajuste dentário e em cirurgias ortopédicas como enxerto ósseo. A HA - na forma de discos ou pastilhas - é usada em testes *in vitro* (cultura de células) para avaliar a adesão, o crescimento e a proliferação celular nessas amostras.

Análise por difração de raios-X mostram que HA coralina é uma carbonato-apatita contendo também estrôncio e uma mistura de fase CO_3 – apatita com pequenos traços de β – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Fazendo uma comparação entre os produtos comerciais de HA em relação à cristalinidade, observa-se que a cristalinidade de HA coralina Interpore é menor do que a cristalinidade da HA densa Calcicite, indicando diferenças entre o tamanho de cristal desses produtos. As diferenças de composição e propriedades desses materiais são decorrentes do processo de sua preparação tais como a temperatura de síntese e sinterização, a composição de reagentes e pH. A resposta biológica desses materiais é inerentemente diferente da HA densa, devido ao favorecimento de

crescimento ósseo entre os poros da cerâmica. Porosidade e interconectividade são parâmetros que influenciam neste crescimento. Como exemplo pode-se citar um estudo de implantes de HA 200 (diâmetro de poro igual a 200 μ m) e HA 500 (diâmetro de poro igual a 500 μ m) ambos com interconectividade de poro. Foi observado que o crescimento do tecido fibrovascular se inicia entre o terceiro ou quarto dia. Por volta do vigésimo-oitavo dia, o crescimento em torno do implante se completa e a aposição do osso sobre as paredes dos poros se inicia (SHORS e HOLMES, 1993). Isso mostra que a aposição do osso sobre as paredes do implante, leva a incorporação deste último. Estudos em cães indicam que o crescimento ósseo se completa dentro dos poros num período de 3 meses, o que é equivalente a um período de 6 meses em humanos (SHORS e HOLMES, 1993).

A estrutura de HA porosa é mais reabsorvível e mais osteocondutora quando comparada com a HA densa. Com essas características a HA porosa tem sido usada como material para promover o crescimento ósseo em muitos testes clínicos. Ao facilitar a passagem do tecido para o interior do implante, a resistência mecânica aumenta consideravelmente com a formação do novo osso, possibilitando o uso de HA porosa para restaurar fragmentos ósseos como, por exemplo, em neurocirurgia. Por outro lado, a partir das estruturas corálicas pode se obter diferentes tipos de materiais tanto reabsorvíveis quanto não reabsorvíveis com propriedades biomecânicas similares aos diferentes tipos de ossos.

CHANG et al. (2000) analisaram a osteocondução de blocos de HA porosa de diâmetros e formas de poros diferentes. Através de análises histomorfológicas eles verificaram mudanças no crescimento ósseo nas diferentes formas e diâmetros de poros estudadas. Em implantes com tamanho de poro igual a 50 μ m de forma cilíndrica, a osteocondução ocorreu de forma significativa, já os implantes com diâmetro de poro igual a 300 μ m (forma cilíndrica) são considerados ótimos para o crescimento ósseo.

GAUTHIER et al. (1998) estudaram a influência do diâmetro de macroporos e a percentagem de poros no crescimento ósseo com cerâmicas de fosfato de cálcio bifásico (HA/ β -FTC) implantados em fêmur de coelhos. Seus resultados indicaram que a osteocondução é mais eficiente nos implantes com diâmetro de poro igual a 565 μ m com

uma porosidade de 40%. Além de promover o crescimento ósseo, a resistência mecânica se mostrou satisfatória.

A porosidade da HA coralina apresenta vantagens e desvantagens. Uma das vantagens descrita anteriormente é o crescimento ósseo em implantes que tenha tamanho e interconectividade de poro uniformes. O diâmetro de um osteônio cortical varia de 190 a 230 μm . Para que o crescimento ósseo dentro da estrutura cerâmica ocorra, será necessário que a mesma tenha um diâmetro de poro mínimo de 100 μm , enquanto que a porosidade admitida nos enxertos que visam substituir o osso esponjoso varia entre 500 e 600 μm de diâmetro (TOTH et al., 1995). Uma das desvantagens da HA coralina é a composição química dos corais. Íons como, por exemplo, magnésio, sódio, cloro e flúor presentes na água do mar podem ser incorporados nos corais e contribuir de forma negativa na etapa de conversão hidrotérmica do carbonato de cálcio, como também provocar algum efeito na resposta biológica.

LU et al. (1999) em seus estudos *in vitro* com células osteoblásticas mostraram que a interconectividade de poros (20 - 100 μm) de HA e β - FTC com porosidade de 50% e tamanho de poro (100 – 300 μm) favorecem a proliferação e o crescimento celular da seguinte forma: as células osteoblásticas humanas penetram nas amostras com interconectividade de poro na faixa estudada, sendo mais visível e favorável nas amostras com 40 μm . Testes *in vivo* indicaram ser mais favorável as amostras com interconectividade de 50 μm , como foi verificado pela mineralização óssea.

Alguns estudos têm mostrado que existe uma dependência da taxa de osteointegração com a densidade de implantes de HA porosa com interconectividade de poros. Essa dependência foi observada pela redução na taxa do crescimento ósseo em implantes mais densos e, pelos ensaios de compressão foi verificado que esse crescimento é mais presente em implantes menos densos. Vários autores concordam que uma relação ótima entre porosidade e resistência mecânica pode ser obtida (HING et al., 1999; FLAUTRE et al., 1999; METSGER et al., 1999).

O comportamento mecânico de vários fosfatos de cálcio (hidroxiapatita e fosfato tricálcico) depende também do processo de compactação e sinterização e da porosidade

dos fosfatos. Essa porosidade pode ser de microporos (diâmetro menor que 1 μm) ou macroporos (diâmetro maior que 100 μm). Segundo DE GROOT et al. (1990), a correlação entre resistência a compressão (σ_C) e o volume total de poros (V_p) é dada pela equação:

$$\sigma_C = 700 \exp(-5 V_p) \quad (\text{MPa}) \quad (14)$$

E a resistência à tração depende da fração volumétrica dos microporos (V_m), podendo ser representada pela equação:

$$\sigma_T = 220 \exp(-20 V_m) \quad (\text{MPa}) \quad (15)$$

C.4.3 – Cristalinidade e Solubilidade

A cristalinidade das biocerâmicas de fosfatos de cálcio, principalmente HA, depende dos métodos de sintetização. Através da Difração de Raios-X pode se analisar a cristalinidade de HA e outras fases presentes, como α e β $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_6$ e determinar também seus parâmetros de rede.

Como complemento da análise por difração de raios-X, as técnicas de espectrometria de transformada de fourier por Raios-Infravermelho (FTIR) e Raman (FT-Raman) podem dar informações importantes sobre o material cerâmico. Ambas fornecem um detalhamento espectral. Com a obtenção de espectros em tempos mais curtos, aumento do sinal e maior precisão, obtêm-se informações sobre as vibrações moleculares das amostras analisadas.

A solubilidade dos fosfatos de cálcio está relacionada diretamente com a sua cristalinidade fosfatos. A solubilidade pode ser analisada por meio dos potenciais de dissoluções dos fosfatos. Alguns estudos mostraram uma taxa de dissolução considerável de vários fosfatos de cálcio, em diferentes soluções tampão com materiais similares e em pH iguais, onde foi observado que a degradação dos fosfatos pode ocorrer por meio da desintegração dos implantes em pequenos fragmentos ou a partir da dissolução físico-química. A dissolução dos implantes depende do pH e da composição da solução; da relação superfície da amostra/volume de solução e da cristalinidade do

material (De GROOT et al. 1990) e se relaciona com a biocompatibilidade do material (AOKI, 1994). Segundo De GROOT (1990), o material ideal para implantes é aquele em que a degradação se desenvolve gradualmente e o material sintético é substituído pelo osso.

O entendimento da influência que a cristalinidade e a biodegradação dos fosfatos exercem sobre a resposta celular é um requisito importante no projeto de um biomaterial. CHOU et al. (1999) indicam a existência contraditória a respeito das diferentes taxas de dissolução dos fosfatos de cálcio e sua relevância biológica. Alguns estudos *in vivo* mostram que implantes deficientes em cálcio reabsorvíveis apresentam resistência de ligação ao osso menor do que aqueles obtidas com hidroxiapatita estequiométrica. Adicionalmente, quanto maior a solubilidade dos fosfatos de cálcio, menor a atividade da fosfatase alcalina, indicador da atividade celular. Outros estudos, no entanto, mostraram que a dissolução dos implantes de fosfatos de cálcio desempenham um papel importante sobre o aprimoramento da ligação ao osso e sobre a camada de célula associada à mineralização (HING 1999).

As propriedades de dissolução dos fosfatos de cálcio *in vitro* dependem da composição química do fosfato, da sua cristalinidade, da presença de poros em sua superfície, do pH, do grau de saturação do meio. No entanto, a biodegradação e a bioreabsorção dos fosfatos não dependem apenas da sua solubilidade *in vitro*. Em vivo, a ação celular pode promover a solubilização parcial dos fosfatos de cálcio.

No caso de revestimentos feitos com fosfatos de cálcio, sua estabilidade pode ser influenciada pelos fatores descritos acima. Isso pode ser verificado principalmente nos revestimentos contendo relativamente altas concentrações de fases mais solúveis, isso é: fosfato de cálcio amorfo, fosfato tetracálcico e fosfato tricálcico que são menos estáveis, que os revestimentos feitos com HA cristalina.

Estudos *in vitro* em solução tampão com vários fosfatos de cálcio (FA, HA, FTTC) analisaram o efeito da distribuição do tamanho de partículas, a razão atômica Ca/P e o tratamento térmico sobre a influência na estabilidade do revestimento, por meio da solubilidade, e da cristalinidade. Nos revestimentos feitos com FA, antes e após o tratamento térmico, não ocorreram mudanças significativas na cristalinidade e

solubilidade. Nos revestimentos feitos com HA o tratamento térmico influenciou no aumento da cristalinidade e conseqüentemente na diminuição da solubilidade do revestimento (KLEIN et al., 1993).

C.4.4 - Aplicações da Hidroxiapatita

As aplicações das biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, principalmente a hidroxiapatita, devido à sua excelente biocompatibilidade e bioatividade tem sido na área médica. Entretanto, sua utilização tem se restringido somente a aplicações cujos esforços mecânicos são limitados. Isso se deve ao fato da hidroxiapatita possuir baixa resistência mecânica e baixa tenacidade à fratura. Dentro do campo de aplicações na medicina destacamos seu uso como (AOKI, 1994):

- osso artificial
 - articulações artificiais
- material de enxerto ósseo
 - promover a formação óssea
- vaso sangüíneo artificial
 - traquéia artificial
- bioeletrodos
 - dispositivos transcutâneos
- sistemas de liberação de drogas
 - aumento do rebordo alveolar
- reconstituição do ouvido médio

Na odontologia destacamos o uso da hidroxiapatita em (AOKI, 1994):

- pasta de dente
 - cimento dentário
- enchimento de canais
 - enchimento de osso
- recobrimento de raiz de dentes artificiais
 - restaurações dentárias

Em regiões do corpo humano submetidas a elevadas solicitações mecânicas, o recobrimento de hidroxiapatita sobre substratos metálicos é a opção mais adequada para se ter um implante com elevada resistência mecânica e com a superfície bioativa. Dessa forma, obtendo-se uma biointegração do material com o tecido ósseo.

Entre os processos utilizados no recobrimento de hidroxiapatita sobre substratos metálicos, destacam-se os que utilizam aspersão térmica, conhecidos como “plasma spray”. Essas técnicas englobam processos em que metais, cerâmicos ou polímeros na forma de pós são aquecidos a temperaturas elevadas e acelerados contra uma superfície (substrato), fazendo-se uma deposição em camadas. As propriedades do recobrimento dependerão da técnica e do material a ser depositado. Como vantagem das técnicas por aspersão térmica, destaca-se o curto tempo de deposição e como principal desvantagem o custo elevado do equipamento. Por outro lado métodos alternativos de obtenção de recobrimento têm sido testados, como: Deposição por Eletroforese, Deposição Eletrolítica e Deposição Biomimética (DA SILVA, 1999; MORAES, 1999; ANDRADE, 1999) com o objetivo de atenuar ou eliminar as limitações dos recobrimentos “plasma spray” disponíveis no mercado.

A biointegração dos materiais recobertos com HA por deposição biomimética consiste na união bioquímica do tecido ósseo com a superfície do implante, a qual é independente de mecanismo de união mecânica, e que se torna identificável no MEV. A retenção bioativa é alcançada por materiais bioativos como a HA e os biovidros, que se unem diretamente ao osso. A matriz óssea fica depositada por meio de uma interação físico-química entre o colágeno do osso e os cristais do material (DUCHEYNE e QIU, 1999).

A HA é um material policristalino que fica incorporado no tecido ósseo. Uma das características comuns das superfícies bioativas consiste na alteração cinética, que ocorre após a implantação. Em sua superfície forma uma camada de carbonato apatita, que promove a união da interface com o tecido. Essa camada formada é quimicamente e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso. Essa equivalência torna-se responsável pela união interfacial (DUCHEYNE e QIU, 1999).

C.5 – Fosfato de Cálcio Bifásico (FCB)

O fosfato de cálcio bifásico constituído pela mistura de HA + TCP é biocompatível e osteocondutor. Sua velocidade de reabsorção se situa entre a da HA e do TCP puros, podendo-se obter taxas de degradação variáveis, dependendo do teor de HA e TCP na mistura.

KRAJENOSKI et al. (1988), utilizaram uma proporção HA: TCP de 10:1 e encontraram uma fixação firme em 13 de 17 implantes que foram implantados em defeitos localizados em fêmures de coelhos. PASSUTI et al. (1989), investigaram o uso de FCB (HA:TCP/6:4) no tratamento de pacientes com escoliose e no preenchimento de cavidades ósseas. Seus resultados indicaram um contato íntimo entre o leito ósseo e o implante, resultando em uma forte fixação e boa estabilização do material.

Apesar de que o mecanismo de biodegração do FCB ainda não ser muito claro, estudos se concentram com este objetivo. A dissolução *in vitro* e *in vivo* do sistema FCB indica ser dependente dos fatores: composição, cristalinidade e pH da solução. No entanto, muitos estudos têm mostrado que os enxertos de HA depois de implantados no corpo humano apresentaram uma taxa de biodegração muito baixa. Por outro lado, a taxa de dissolução do TCP é muito rápida para ocorrer a ligação óssea. Com isso para se obter bons resultados da resorbabilidade do material, estudos se concentram no sistema FCB (YANG et al., 1998; KIVRAK et., 1998; FRAYSSINET et al. 1993).

A síntese do pó de HA tem sido extensamente estudada, mas a do pó de TCP e do sistema FCB ainda estão sendo pesquisadas. No entanto, pode-se obter TCP pela reação do estado sólido ou por decomposição térmica. Na decomposição utiliza-se o fosfato de cálcio amorfo (FCA) ou a hidroxiapatita deficiente em cálcio, que são obtidos em condições de sínteses em meio neutro ou ácido (YANG et al., 1998; KIVRAK et al., 1998; ELLIOT, 1994).

O sistema FCB é geralmente obtido pela mistura física dos pós puros de HA mais TCP ou pela calcinação da HA deficiente em cálcio com razão Ca/P na faixa de 1,5 a 1,67 na temperatura acima de 700°C (DOROZHKLIN, 2001; LEGEROS, 1991). A HA

deficiente em cálcio pode ser sintetizada pelo método úmido (coprecipitação) ou pela hidrólise do hidrogenofosfato de cálcio dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (ELLIOT, 1994).

2.2 – Propriedades de Superfícies de Biomateriais

O conhecimento das propriedades de superfície (molhabilidade, mobilidade superficial, composição química superficial, topografia e outras), obtidas por meio da caracterização da superfície do material é importante para se entender como a mesma afeta a formação de tecido da região implantada. Esse conhecimento é usado para a fabricação de materiais usados em implantodontia por influenciar na resposta biológica (HUNTER, 1993; CHERHRONDI e BURNETTE, 1995; LEE e LEE, 1995; MUSTER e DEMRI, 1995; ADAMSON, 1998).

As técnicas mais comumente utilizadas na caracterização superficial são mostradas na Tabela 2.3 (RATNER et al., 1996A; GRAINGER e HEALY, 1998). Além destas técnicas, a Difração de Raios-X (DRX) e a Análise Termogravimétrica (TGA) são também empregadas para se obter informações a respeito das propriedades estruturais do material cerâmico. A análise quantitativa das fases cristalinas presentes no material pode ser feita pela Difração de Raios-X, no entanto, essa análise é complexa e vai depender da cristalinidade e da diferença dos coeficientes da absorção das espécies envolvidas. A Análise Termogravimétrica informa os teores de água superficial ou estrutural incorporada aos sistemas apatíticos, o grau de carbonatação e a estabilidade da estrutura da hidroxiapatita. Técnicas de dissolução são utilizadas para obtenção da solubilidade do material e técnicas de Microanálise (Espectroscopia por Energia Dispersiva – EDS) acopladas ao MEV, são usadas em análise qualitativa e semiquantitativa.

No item 2.3 (técnicas de caracterização de materiais) será feita uma abordagem das técnicas que foram utilizadas neste trabalho.

Tabela 2.3 – Principais Técnicas de Caracterização Superficial de Biomateriais (RATNER et al., 1996A; GRAINGER e HEALY, 1998).

TÉCNICA	PRINCÍPIO FÍSICO	MEDIDA QUANTITATIVA	PROFUND. ANALISADA
ÂNGULO DE CONTATO	molhabilidade da superfície pelo líquido é usada para estimar a energia superficial	tensão superficial	0,3-2 nm
XPS (ESCA)	efeito fotoelétron incidente no raios-x causam a emissão de elétrons	energia cinética dos elétrons emitidos	1-10 nm
AES	elétrons incidentes causam a emissão de elétrons auger	energia cinética de elétrons auger	0,5-5 nm
SIMS	íons incidentes emitem íons secundários de diferentes massas	razão massa/carga dos íons emitidos	1 nm - 1µm
FTIR-ATR	radiação IR é absorvida em excitação de vibrações moleculares	absorvância em função do número de ondas	1-5µm
AFM	topografia da superfície induzida por deflexão de um cantilever é detectada por reflexão de laser e um fotodiodo	imagens tri-dimensionais da superfície e propriedades físicas	profundidade ou resolução lateral igual a 0,1 nm
STM	medição de corrente de tunelamento quântico entre a ponta do metal e a superfície condutiva	detalhes atômicos e processos de adsorção	0,1 nm
ELIPSOMETRIA	detecta mudança na polarização da luz coerente refletida sobre a superfície	espessuras da camada recobertas, cinéticas de adsorção e propriedades ópticas	Å - µm
SEM	emissão de elétrons secundários causados por um foco de feixes de elétrons é medida e espalhada na imagem	morfologia e análises topográficas	1 nm

Onde:

Espectroscopia de Raios-X por Fotoelétrons (XPS) ou Análise Química por Espectroscopia de Elétrons (ESCA);

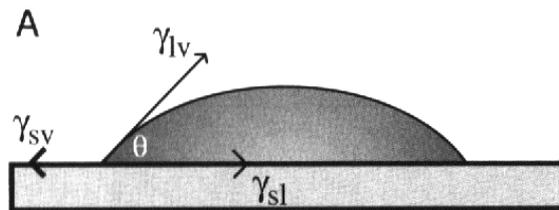
Espectroscopia por Elétrons Auger (AES);

Espectroscopia de Massa de Íon Secundário (SIMS);

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR/ATR);
 Microscopia de Força Atômica (AFM);
 Microscopia de Varredura por Tunelamento (STM);
 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).

A - Molhabilidade

A molhabilidade de uma superfície sólida é definida em termos do ângulo de contato θ , produzido por uma gota líquida parada em uma superfície sólida conforme mostrada na Figura 2.5. Essa figura ilustra o contato entre as três fases: sólido, líquido e vapor. O ângulo de contato pode variar de 0 a 180° e depende da tensão superficial ou energia livre superficial (γ), das três interfaces. Podemos equacionar os componentes horizontais dessas tensões pela equação de Young Dupré. O ângulo de contato, que dá uma medida da hidrofobicidade do material, pode ser calculado pela essa equação utilizando o método da gota (sessile drop). A equação de Young é válida para um sistema ideal, onde todos os efeitos gravitacionais estão ausentes e as três fases em equilíbrio. (HUNTER, 1993; LEE e LEE, 1995; MUSTER e DEMRI, 1995)



$$\gamma_{LG} \cos\theta = \gamma_{SG} - \gamma_{SL}$$

γ_{LG} – tensão superficial líquido/gás

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}}$$

γ_{SG} – tensão superficial sólido/gás

γ_{SL} – tensão interfacial sólido/líquido

Figura 2.5 – Ângulo de contato do líquido sobre uma superfície sólida (HUNTER, 1993).

O ângulo de contato também pode ser medido por outras técnicas como, por exemplo: método da ascensão capilar, método das placas de Wilhelmy e outras. A medição dos ângulos de contato é mais precisa se a superfície sólida for razoavelmente extensa, uniforme e quimicamente homogênea. No entanto, as medidas são complicadas em virtude dos seguintes fatores (HUNTER, 1993; LEE e LEE, 1995; MUSTER e DEMRI, 1995):

1) A contaminação da superfície líquida tende a diminuir o ângulo de contato, pois diminui a tensão superficial entre a líquido e o gás.

2) Superfícies sólidas diferem de superfícies líquidas por mostrarem um grau maior de heterogeneidade, mesmo depois de etapas de polimento rigorosas.

3) Superfícies sólidas, rugosas, quimicamente heterogêneas, mostram variações nos ângulos de contato com a fase líquida, devido às diferenças existentes em suas superfícies. Nesses sistemas macroscópicos o ângulo de contato θ_M , pode ser diferente daquele obtido pela equação de Young. Os ângulos de contato maiores e os menores são relativamente reproduzidos e são denominados respectivamente de ângulo de avanço (θ_U) e ângulo de retrocesso (θ_L). Esses ângulos podem ser obtidos pela inclinação da gota na superfície sólida. A diferença entre os ângulos $\theta_U - \theta_L$ é denominada de histerese de ângulo de contato. A magnitude dessa diferença é usualmente considerada ser uma medida da rugosidade física e/ou heterogeneidade química da superfície; entretanto, pode ser também uma medida da quantidade de líquido nos poros da superfície sólida.

B - Mobilidade Superficial

A mobilidade superficial corresponde ao movimento e as interações que ocorrem na superfície e interface entre os elementos de um determinado sistema com o meio em que o mesmo está envolvido. Pode-se destacar como exemplo a hidrofobicidade, hidrofobicidade e o potencial da superfície, que pode ser representado pelo potencial zeta. No estudo de biomateriais sintetizados a importância de conhecer essas interações com o meio aquoso é importante para o estudo da adsorção de células sobre as

superfícies de biomateriais e na resposta biológica. Como por exemplo: um material com superfície hidrofóbica, ou seja, com baixa energia livre de superfície em um meio aquoso, pode adsorver ou repelir células em sua superfície dependendo da ligação química entre a interface material/célula.

Os termos hidrófobo (aversão a líquido) e hidrófilo (atração por líquido) são usados com frequência para indicar a tendência de uma superfície ou de um grupo funcional de se umedecer ou solvatar. É possível transformar superfícies hidrófilas em hidrófobas e vice-versa. Por exemplo, superfícies limpas de vidros, hidrófilas, podem ser convertidas em superfícies hidrófobas revestindo-as com uma camada de cera.

Essa terminologia torna-se bastante útil quando consideramos o fenômeno da tensão superficial. As moléculas de substâncias tensoativas apresentam uma forte afinidade por superfícies de separação (interfaces), pois elas contêm regiões hidrófilas e hidrófobas.

O potencial zeta é uma propriedade eletrocinética da dupla camada elétrica. Ele pode ser obtido pela diferença de potencial existente entre a superfície de uma partícula carregada eletricamente, localizada no plano de cisalhamento, e a solução que a envolve.

O valor do potencial zeta (ζ) pode ser calculado utilizando a equação abaixo (HUNTER, 1993):

$$\zeta = \frac{\mu\pi\eta}{f\varepsilon} \quad (16)$$

Para isso é necessário medir a mobilidade eletroforética das partículas (μ) em um sistema, sujeitas a um dado gradiente de potencial de voltagem elétrica aplicada e, também, conhecer os valores da viscosidade dinâmica (η) e a constante dielétrica (ε) do líquido em questão. O valor f representa o fator de correção, que depende da forma das partículas, da sua orientação no campo elétrico, das suas propriedades condutoras, da concentração do eletrólito e da temperatura.

C - Composição Química Superficial

A composição química superficial de materiais sintéticos fabricados a partir de materiais metálicos, poliméricos e cerâmicos usados em implantes médicos é determinada por várias técnicas, incluindo: Espectroscopia Fotoeletrons de Raios-X (XPS), Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier, Espectroscopia Raman. O principal objetivo dessas técnicas é determinar dados quantitativos e qualitativos de espécies superficiais. Esses dados são importantes na determinação das interações que ocorrem na superfície entre a interface biomaterial/tecido (CHERHRONDI e BURNETTE, 1995; ADAMSON, 1998). Na composição superficial pode-se determinar informações dos elementos principais, elementos minoritários, elementos traços, espécies inorgânicas e espécies orgânicas.

D – Topografia

A adesão de células e tecidos na superfície de biomateriais pode ser obtida por meio da modificação na superfície dos materiais (cerâmicos, polímeros, metais, vidros, etc.) por métodos físicos e/ou químicos. Estudos com titânio e suas ligas com superfícies rugosas obtidas por jateamento de óxido de alumínio e superfícies lisas, mostraram que em testes de cultura de células a adesão celular é maior em superfícies rugosas (TSUJII, 1998; GRAINGER e HEALY, 1998).

Os parâmetros que influenciam na topografia de superfícies rugosas estão relacionados com o material que constitui o substrato e o método de obtenção de rugosidade. O mesmo material pode apresentar topografia diferente em várias regiões da superfície rugosa, com isso apresentando parâmetros de rugosidade diferentes. Conseqüentemente, a força de adesão celular pode ser alterada. Isso pode implicar no crescimento celular e crescimento de tecido fibroso na região do implante. A superfície rugosa deve ser homogênea e apresentar topografia uniforme, isso pode ser obtido com um tratamento químico feito com reagentes apropriados, após o jateamento da superfície, minimizando assim, as depressões e os picos da superfície rugosa.

2.3 – Técnicas de Caracterização de Materiais

A - Análise por Difração de Raios-X (DRX)

Os raios-X podem ser produzidos quando partículas carregadas com alta energia cinética são desaceleradas rapidamente. Os elétrons são as partículas normalmente empregadas com este propósito e eles são acelerados pela aplicação de um campo diferencial de potencial elétrico acima de 10KV. Quando esses elétrons colidem com um alvo, grande parte da energia cinética é convertida em calor e somente 1% chega a ser transformada em raios-X. Os raios-X emitidos normalmente consistem de um espectro contínuo, denominado de radiação branca, pois é formado por ondas de diversos comprimentos. Esse espectro resulta do progresso da desaceleração que não é uniforme para todos os elétrons. Alguns são parados depois de um único impacto enquanto outros sofrem impactos consecutivos com perdas progressivas da energia cinética (AZÁROFF, 1968).

A análise por DRX serve para identificar e quantificar fases e composições de fases, medir os parâmetros de rede, calcular o tamanho do cristalito e o grau de cristalinidade do material usando programas de refinamentos, como por exemplo, refinamento por Rietveld, que consiste em se minimizar a diferença entre padrões de difração medido e calculado, passo a passo, num difratograma digital. A grande vantagem desse método é que ele utiliza todos os pontos do padrão de difração, superposição de picos, que usualmente inviabilizam outros métodos de quantificação por difração de raios-X. O método de Rietveld é muito empregado nas análises que envolvem difração de raios-X e de neutrons de materiais policristalinos. A análise de difratogramas de policristais utilizando esse método conduz a uma análise mais detalhada na interpretação quantitativa dos padrões obtidos. Além das análises citadas anteriormente, esse método permite, que se faça a caracterização de imperfeições na estrutura cristalina, refinamento das posições e ocupações dos lugares associados aos átomos das estruturas cristalinas simples e complexas. No caso de difração de neutrons, permite o estudo de fenômenos magnéticos.

Baseada no conhecimento das propriedades de superfícies de materiais usados em implantes, a biocompatibilidade de substratos sólidos está relacionada com as

propriedades de superfícies, dependendo, principalmente da molhabilidade da superfície. Isso foi observado em estudos das interações com diferentes tipos de cultura de células sobre substratos poliméricos da seguinte forma: a bioadesão está relacionada com a energia de superfície e que materiais com baixa energia superficial mostram baixa ligação celular. Isso implica em dizer, que a adesão celular ocorre preferencialmente em substratos hidrofílicos. Estudos do gradiente da molhabilidade de superfície mostram que a adsorção de proteínas, assim como adesão e proliferação de células sobre substratos sólidos dependem dessas propriedades de superfície (CHERHRONDI e BURNETTE, 1995; LEE e LEE, 1995; RUARDY et al., 1995).

Como descrito anteriormente, as interações que ocorrem em diferentes tipos de proteínas ou células sobre vários substratos sólidos dependem das características da superfície. Na maioria dos casos é necessário que se faça um tratamento superficial do material através de métodos físicos e/ou químicos, com o objetivo de melhorar a adesão celular (TSUJII, 1998; GRAINGER e HEALY, 1998).

No caso de implantes, a forma e a estrutura são fatores que também influenciam na adesão celular. Alguns autores têm investigado a influência da forma dos implantes bem como de seu acabamento superficial, na tentativa de se atingir a melhor condição superficial possível (WENNERBERG, 1993; WENNERBERG, 1995).

B – Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EIV)

A radiação infravermelha (IV) é absorvida em excitação de vibrações moleculares. A utilização dessa técnica permite que somente comprimentos de ondas muito específicos de luz infravermelha possam ser absorvidos quando um determinado tipo de molécula está no caminho de radiação. A informação da molécula é dada pela absorbância versus o comprimento de onda. A técnica de EIV é reconhecida como técnica analítica para aplicação biomédica por requerer uma quantidade de amostra mínima, por tanto, é uma técnica complementar de caracterização de materiais (SLOSARCZYK et al. 1996).

A EIV permite caracterizar as vibrações atômicas e moleculares. É indicada para identificar substituições ou alterações nos fosfatos de cálcio, como por exemplo, a

detecção de grupamentos químicos como CO_3^{-2} , HPO_4^{-2} e OH^- . No caso dos grupos CO_3^{-2} pode-se determinar qual sítio será substituído na HA. A EIV utiliza transformada de Fourier para ampliar o limite de detecção do método.

A EIV pode ser realizada pelos métodos de transmissão, reflexão e emissão. No caso do método de transmissão, uma parte da radiação que atravessa a amostra é detectada. Para se obter informações utilizando-se amostras sólidas, a razão área superficial/volume deve ser maximizada. Neste caso, a técnica mais adotada é a de pastilhas de KBr, junto com o pó da amostra.

Para se obter informações da superfície de amostras rugosas, o método de reflectância difusa pode ser utilizado. O método de reflectância difusa permite uma análise rápida de muitas amostras sólidas, incluindo pós, fibras e principalmente superfícies rugosas. A radiação incidente proveniente do espectrômetro é focada na superfície da amostra e a energia é então coletada. A energia refletida pode ser classificada como especular ou difusa. A reflectância especular resulta de energia que é refletida pelas partículas, mas que não é absorvida. A energia que penetra em uma ou mais partículas é coletada e denomina-se reflectância difusa. Uma das grandes vantagens da mesma é a possibilidade de analisar amostras em quantidades extremamente pequenas de pós, sem necessidade de prensa ou bomba a vácuo (RATNER et al. 1996A).

C – Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é geralmente utilizado para observação de amostras espessas, ou seja, não transparentes a elétrons. Resumidamente, pode-se dizer que o MEV consiste de uma fonte que gera um feixe de elétrons que é colimado ao passar por lentes eletromagnéticas, sendo focalizado em uma região muito pequena da amostra. Bobinas adequadamente colocadas promovem a varredura desse feixe sobre a área da amostra a ser examinada. A interação feixe-amostra gera uma série de sinais, como, por exemplo, elétrons secundários, que são captados por um detetor. Após a ampliação, esse sinal modula o brilho de um tubo de raios catódicos (TRC), que é varrido sincronizadamente com a varredura da superfície da amostra, gerando uma imagem ponto a ponto da superfície examinada (GOLDSTEIN, 1981).

Utilizado para produzir informações superficiais, o MEV possui como característica principal sua profundidade de campo, cerca de 300 vezes melhor que o microscópio ótico, permitindo a obtenção de imagens com aspecto tridimensional, que é muito utilizada no estudo topográfico das amostras.

Além disso, o MEV possui alta resolução, com valores usuais da ordem de 10nm, ou seja, cerca de 100 vezes a do microscópio ótico (GOLDSTEIN, 1981).

Vários tipos de contrastes podem ser obtidos utilizando essa técnica, dependendo da finalidade da análise. Por exemplo, na análise de pós e pastilhas pode-se obter imagens com contraste de elétrons secundários e elétrons retroespalhados (BSE). No caso da análise com contraste por elétron retroespalhados, são coletados elétrons de maior energia da profundidade da amostra, permitindo a identificação de fases com diferentes composições químicas (GOLDSTEIN, 1981).

D – Análise Eletrônica de Transmissão (MET)

Em linhas gerais o MET consiste em que um feixe eletrônico convergente incida sobre uma determinada amostra, obtendo-se dessa forma, imagens de transmissão. Em termos de informações sobre a morfologia de amostras, destaca-se seu uso para a observação de defeitos estruturais. O MET também é muito usado na caracterização cristalográfica das fases presentes em um determinado material. Seu uso, porém, é limitado, atinge usualmente resolução de 1 a 20nm, exigindo amostras transparentes ao feixe eletrônico extremamente finas e trabalhosas de serem obtidas, ou seja, a espessura das amostras é um parâmetro muito importante na obtenção das imagens.

Uma das maiores diferenças entre O MET e o MEV, é que no primeiro a imagem é construída de uma só vez (aquisição de dados em paralelo) enquanto que, no MEV os dados são coletados ponto a ponto e linha por linha, seqüencialmente, sendo originários de uma série de sinais elétricos captados por detectores diversos e que, portanto, podem ser amplificados, modificados e armazenados com certa facilidade. (GOLDSTEIN, 1981).

E - Espectrometria de Emissão por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP – AES)

A espectrometria de emissão por meio de chamas de combustão convencionais, arco e centelha como fontes de excitação não fornecem energia necessária para a excitação conveniente de muitos elementos de tabela periódica. A necessidade de uma temperatura mais alta determinou a utilização do plasma como fonte de excitação espectroscópica (BOSS e FREDEEN, 1999). Essa técnica é baseada na capacidade que os átomos têm de emitir radiação quando seus elétrons são excitados pelo plasma. Os plasmas físicos podem ser formados por meio de radiofrequência (ICP), corrente contínua (DCP) e microondas (MIP).

A maioria das análises é feita no ICP-AES por ser distintamente superior aos outros plasmas em muitos aspectos. O mais importante deles é a dificuldade em injetar o aerosol na amostra para a parte mais quente do plasma, isto resulta em efeitos de interferência química familiar às experiências com chamas químicas.

Além de alta temperatura a técnica de ICP-AES apresenta outras vantagens tais como: análise simultânea ou seqüencial de vários elementos, determinação de alguns elementos difíceis de se obter por outra técnica, faixa linear dinâmica na ordem de quatro ordens de grandeza, identificação qualitativa de amostras desconhecidas, estabilidade da chama e a utilização de gás inerte (argônio).

2.4 – Técnicas de Caracterização Biológica

As reações que ocorrem na interface entre o biomaterial e as células podem ser estudadas em testes *in vitro*. Esses testes fornecem informações importantes relacionadas com a biocompatibilidade do material utilizado em implante. Como vantagens: permitem maior reprodutibilidade, quantificação dos dados obtidos, rapidez, simplicidade e menor custo, quando comparados com testes *in vivo*.

Dependendo do tipo e da duração do contato da interface biomaterial/tecido, uma seqüência de testes é então utilizada. A biocompatibilidade de um material pode ser avaliada por meio de cultura de células e soluções que simulam o plasma humano, seguido de testes *in vivo*. Os testes *in vitro* podem avaliar uma ou mais das seguintes

propriedades: citotoxicidade, hemotoxicidade, genotoxicidade e a mutagenicidade do material, enquanto que, os testes *in vivo* avaliam toxicidade sistêmica aguda, toxicidade crônica, sensibilização e a carcinogenicidade do material (CANNAS et al., 1995).

A – Cultura de Células

Os testes de cultura de células podem avaliar o efeito do material sobre as células no que se refere à proliferação, toxicidade e adesão. A escolha de linhagem celular a ser usada em testes *in vitro* deve levar em consideração três parâmetros: o emprego designado para o material, a facilidade de crescimento e manutenção da cultura e a possibilidade de padronização (CANNAS et al., 1995).

As células mais usadas no estudo de biomaterias são: osteoblastos, fibroblastos, linfócitos, macrófagos e bactérias por simularem as condições biológicas de contato com a material. Os osteoblastos são células osteogênicas, responsáveis pela formação óssea, que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea. Concentram cálcio e fosfato, participando principalmente da mineralização da matriz.

As interações entre as células e os biomateriais são favorecidas pela química de adsorção de proteínas às superfícies. Entre as biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (Ca/P =1,67) é a que tem maior capacidade de adsorver proteínas em sua superfície (TAKASHIMA et al., 1996).

As propriedades de superfície do material como topografia, energia ou química de superfície influenciam diretamente na interação biomaterial/tecido, na adesão, proliferação, espalhamento e diferenciação celular (ANSELME, 2000).

Um estudo comparativo do comportamento de diferentes tipos de células sobre vários substratos mostrou que essas células reagem diferentemente nesses substratos com diferentes rugosidades na superfície. Análise de microscopia eletrônica de varredura revelou que o espalhamento de células ósseas é maior em substratos com superfícies rugosas, do que sobre substratos com superfícies lisas (MEYLE et al., 1993; CHESMEL et al., 1995; HEALY et al., 1996; THOMAS et al., 1997). Entretanto, a adesão celular é

influenciada pelo parâmetro rugosidade, assim como, pela adsorção de proteínas. Estudos da adesão celular sobre substratos rugosos, usando o método imunohistoquímico, mostraram a presença de actina e vinculina em cultura de células osteoblásticas nesses substratos. A ordem crescente da adesão celular obtida foi: Ligas Ti-6Al-4V > Polietileno > Ligas Co-Cr-Mo (ANSELME, 2000).

Termodinamicamente, o processo de adesão e espalhamento celular em substratos sólidos é descrito conforme a equação:

$$\Delta F_{ad} = \gamma_{CS} - \gamma_{CL} - \gamma_{SL} \quad (17)$$

onde ΔF_{ad} é a energia interfacial de adesão, γ_{CS} é a energia interfacial entre o sólido e a célula, γ_{CL} é a energia interfacial entre o líquido e a célula, γ_{SL} é a energia interfacial entre o sólido e o líquido. A adesão e o espalhamento celular são favorecidos quando $\Delta F_{ad} < 0$. Alguns autores observaram essa condição pela interação biológica envolvendo uma região hipotética de biocompatibilidade ótima dos materiais, como mostrado na Figura 2.6. A região não adesiva (A) desta figura, com tensão crítica superficial compreendida entre 20-30 N/m, representa os substratos de biomateriais hidrofóbicos, enquanto que, a região (B) representa os biomateriais com boas propriedades de adesão celular (substratos hidrofílicos). Pela figura, pode-se observar sob o ponto de vista termodinâmico que, para que ocorra a adesão celular será necessário que os biomateriais apresentem uma tensão superficial mínima.

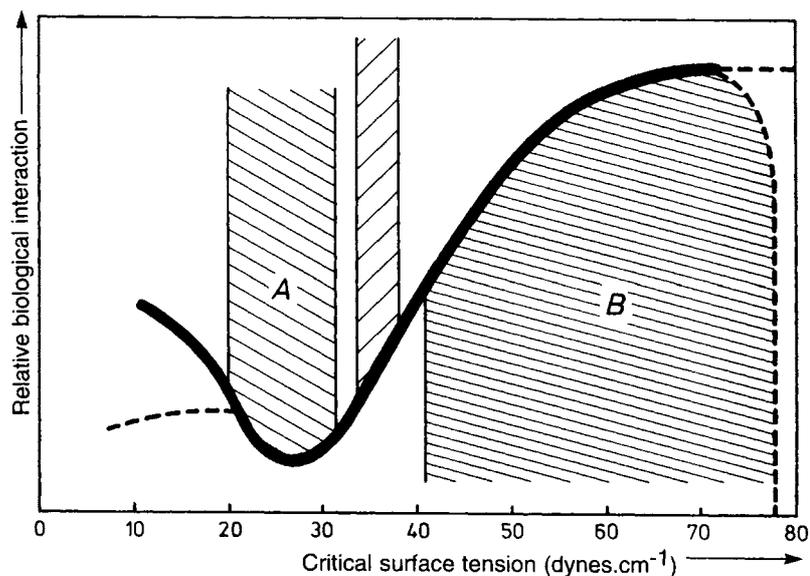


Figura 2.6 – Relação entre interação biológica relativa e a tensão superficial crítica. A região (A) representa a não adesão celular, enquanto que, a região (B) representa os biomateriais com boas propriedades de adesão celular (RATNER et al., 1996B).

Estudos mostram que a cristalinidade da hidroxiapatita influencia no crescimento celular de células ósseas, e está correlacionada com o potencial de dissolução da hidroxiapatita (ANSELME et al., 1997; CHANG et al., 1999; CHOU et al., 1999).

O teor de CO_3^{2-} também influencia na adesão celular quando substituído pela HA como mostra HING et al. (1999). Células osteoblásticas humanas são sensíveis a essa substituição devido ocorrer alteração na solubilidade do material. Um teor ótimo de carbonato foi identificado como o similar encontrado no osso mineral. No entanto, testes *in vivo* seriam necessários para comprovar esse resultado.

Pesquisadores analisaram o efeito do tamanho de partículas de vários fosfatos de cálcio ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) no crescimento de células osteoblásticas. Os resultados da biocompatibilidade desses fosfatos foi verificada pela contagem celular das células osteoblásticas, baseada na detecção bioquímica da fosfatase alcalina (ALP) no meio de cultura (SUN et al., 1997). As mudanças mais significativas foram nos fosfatos de cálcio $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

A avaliação da adesão celular em substratos pode ser feita por vários métodos, como ilustra a Tabela 2.4. Esses métodos servem para quantificar a adesão celular. A microscopia eletrônica de varredura também analisa, de forma qualitativa, a adesão e a morfologia celular dos processos celulares ligados às superfícies dos substratos.

Tabela 2.4 - Técnicas utilizadas para separação celular e avaliação quantitativa da adesão celular (ANSELME, 2000).

TÉCNICA	TIPO DE CÉLULA
<i>Aspiração com Micropipeta</i>	células sangüíneas humanas células endoteliais da aorta suína fibroblastos humanos normais da derme
<i>Centrifugação</i>	fibroblastos e células gliais macrófagos e eritrócitos humanos
<i>Placas Paramagnéticas</i>	fibroblastos osteoblastos células semelhantes à osteoblastos
<i>Fluxo de Fluido</i>	fibroblastos de linhagem 3T3 células endoteliais da aorta bovina linhagem de células de macrófagos de ratos
<i>Separação Enzimática</i>	células osteoblásticas humana primordiais extrato da aorta de embrião de frango extrato do osso trabecular de frango e humano
<i>Manipulação de Microplacas</i>	fibroblastos de frango
<i>Microcantilever</i>	fibroblastos de camundongo L929

A avaliação de crescimento e proliferação celular é feita baseada no DNA. Essa análise pode ser marcada com Timedina Tritiada ($[^3\text{H}]\text{-RdR}$), que é seletivamente incorporada ao núcleo celular durante o ciclo celular (HUANG, 1997).

Uma outra forma de avaliar o crescimento e a proliferação celular é pelo método colorimétrico Sal Tetrazólico - MTT, que utiliza uma solução de (3 - [4,5 - dimetiltiazol] - 2,5 - dimetil brometo tetrazólico). Nesse método o sal tetrazólico penetra na célula e vai ser metabolizado na mitocôndria de células viáveis (reagem com a desidrogenase mitocondrial dando um produto de coloração azul). Ocorre uma reação de oxiredução nas células, tendo como produtos cristais de formazam. A quantidade de formazam produzida é proporcional ao número de células vivas em cultura. No entanto, é importante ressaltar, que cada tipo celular vai apresentar um metabolismo característico, sendo necessário padronizar o método.

Para avaliar o uso de novos materiais aplicados como enxerto ósseo, novas técnicas têm sido desenvolvidas. Essas técnicas permitem que interações com células osteoblásticas possam ser estudadas baseadas no efeito da proliferação e diferenciação de osteoprogenitores (OREFFO e TRIFFITT, 1999).

B – Testes de Bioatividade

Uma outra forma de avaliar a bioatividade de um material é feita por imersão do mesmo em soluções que simulam os fluidos do corpo humano (SFC), visto que, os implantes estarão em contato na maioria dos casos, com o plasma sanguíneo. A principal solução utilizada foi desenvolvida pelo pesquisador Kokubo (DUCHEYNE e KOKUBO, 1992). A Tabela 2.5 mostra as concentrações iônicas do plasma sanguíneo e das principais soluções SFC usadas no teste de bioatividade dos biomateriais. Após imersão em SFC, a superfície do biomaterial é analisada por técnicas de caracterização superficial (MEV, DRX, AFM e FTIR).

Tabela 2.5 – Concentrações iônicas do plasma sanguíneo e soluções SFC (DUCHEYNE e KOKUBO, 1992; TRAUCHIGER et al. 1999).

	Concentrações Iônicas (mM/l)							
	Na^+	K^+	Ca^{+2}	Mg^{+2}	Cl	HCO_3^-	HPO_4^{-2}	SO_4^{-2}
Kokubo	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Ringer	132,0	5,4	2,4	-	113,0	28,7	-	-
Hanks*	142,8	5,8	1,3	0,2	146,0	4,2	0,3	0,2
Plasma Sanguíneo	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5

* mais 0,4 mM/L de $H_2PO_4^-$ e 5,55 mM/L de $C_6H_{12}O_6$

As soluções que simulam o plasma sanguíneo podem ser preparadas em laboratório, dissolvendo-se em água destilada quantidades adequadas das seguintes substâncias: $NaCl$, KCl , $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2$, Na_2SO_4 . O pH é ajustado para 7,25 com mistura de Trishidroximetilaminometano – $(CH_2OH)_3CNH_2$ – e HCl e temperatura de 37°C.

Os testes em SFC são chamados testes de bioatividade porque se avalia a precipitação ou não de carbonato apatita a partir da solução SFC. Quando ocorre essa precipitação, o

material é considerado bioativo, como mostram os estudos *in vitro* de biovidros e vitrocerâmicas (EBISAWA et al., 1990; OLIVEIRA et al., 1995; SALINAS et al., 2000). A Figura 2.7 mostra o mecanismo de formação de apatita na superfície de biovidros e vitrocerâmicas em SFC.

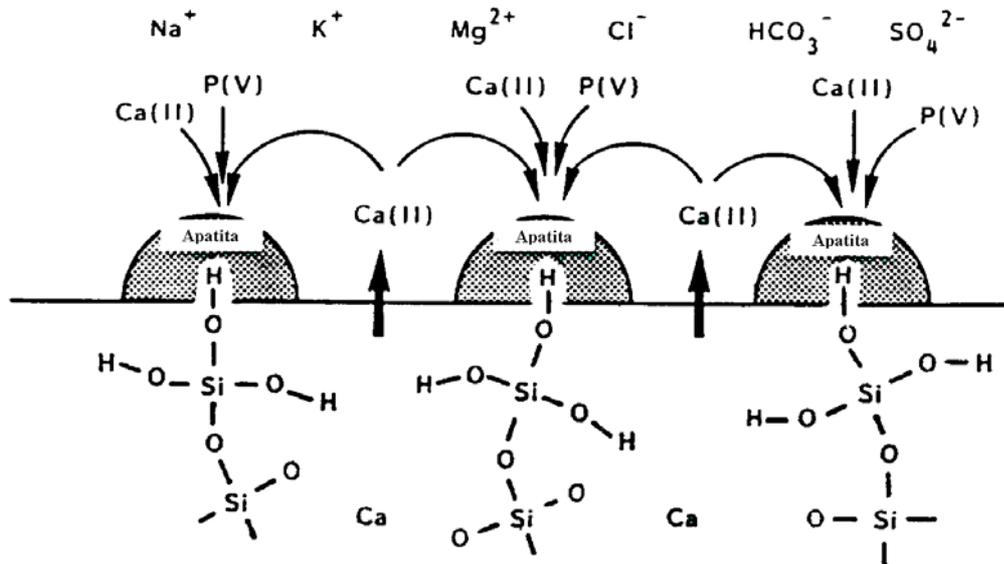


Figura 2.7 – Mecanismo de formação de apatita na superfície de biovidros e vitrocerâmicas CaO-SiO_2 em SFC (DUCHEYNE e KOKUBO, 1992).

Testes *in vivo* mostraram que no caso de biovidros e vitrocerâmicas a ligação química com o osso está associada com a ligação do colágeno com a hidroxiapatita e, posteriormente ao crescimento de hidroxiapatita na interface tecido ósseo-implante (HENCH, 1990). Desse modo, a ligação química formada entre o implante bioativo e o osso ocorrem devido à camada de apatita que se desenvolve quando o implante é imerso em meio aquoso. A formação dessa camada será uma das etapas de uma seqüência de reações que irão ocorrer na superfície do material bioativo. As forças de ligação variam conforme o material, dependendo da sua composição química e estrutura. Uma das etapas é a aglomeração e ligação química de estruturas biológicas dentro da camada de apatita que está em crescimento, levando à incorporação de fibrilas produzidas por osteoblastos ou fibroblastos. Os cristalitos de hidroxiapatita nucleiam-se e ligam-se a metabólicos interfaciais (mucopolissacarídeos, glicoproteínas e colágeno). Esse mecanismo de incorporação de constituintes biológicos ocorre muito rapidamente

dentro da junção das camadas de hidroxiapatitas e de sílica, e é o estágio inicial para a formação da interface tecido-implante (HENCH, 1990).

2.5 – Quimiometria – Conceitos Gerais

Quimiometria é uma das subdivisões da química e, consiste na aplicação de técnicas matemáticas e estatísticas empregadas no tratamento de dados e planejamentos de experiências para (MASSART et al., 1997; AGUIAR e MASSART, 1998):

- a) Otimizar métodos analíticos;
- b) Extrair o maior número possível de informações a partir de um grupo de dados;
- c) Obter conhecimento suficiente sobre um determinado sistema químico estudado.

O primeiro passo é definir quantos e quais experimentos devem ser feitos. A maneira mais razoável de se fazer esta seleção é pelo uso de planejamentos de experimentos que geram resultados chamados de respostas, e que podem ser expressos pela geração de um modelo matemático. Por meio desse modelo, os resultados dos experimentos são relacionados com as variáveis experimentais chamadas de fatores. Baseado nessas informações, o analista pode então compreender melhor o sistema estudado, assim como interferir sobre o mesmo conforme suas necessidades.

A – Planejamentos de Experiências

O planejamento de experiências é aplicado a fim de determinar as condições necessárias para gerar um determinado produto com características ótimas. Para isso torna-se necessário o conhecimento das seguintes observações:

- a) Entender os efeitos da variação dos fatores sobre a resposta;
- b) Modelar a relação entre a resposta e os fatores.

Os fatores ou parâmetros são as variáveis que podem ser controladas e são usadas para verificar o efeito da variação dos fatores na variação das respostas estudadas. As respostas são as variáveis que descrevem o desempenho do sistema estudado. São dependentes enquanto que, os fatores são independentes. Quando selecionamos os

fatores e as respostas, esperamos que eles estejam relacionados uns com os outros numa relação que possa ser representada por:

$$(y_1, y_2, \dots, y_p) = f(x_1, x_2, \dots, x_p) \quad (18)$$

onde y corresponde à resposta e x corresponde ao fator. Pela relação proposta o modelo é então obtido.

Vários planejamentos de experiências foram desenvolvidos conforme a variedade de sistemas a serem estudados em diferentes condições. Os mais conhecidos e aplicados são os Planejamentos Fatoriais. Estes Planejamentos têm como objetivo principal, detectar os fatores cuja variação influencia significativamente na resposta estudada e de estimar esta influência. Dentre eles, o mais conhecido é o Planejamento Fatorial Completo a dois níveis. Neste tipo de Planejamento, cada fator pode assumir dois níveis: um nível alto (representado por +) e um nível baixo (representado por -). As experiências são executadas a cada combinação destes dois níveis. O número de experiências é dado pela relação $n = 2^k$ onde n representa o número de experiências, 2 o número de níveis e k o número de fatores (MASSART et al., 1997; AGUIAR e MASSART, 1998).

A aplicação de planejamento de experiências supõe que os erros experimentais são independentes e constantes em todas as experiências. No entanto, certos sistemas estudados podem ser influenciados por perturbações não aleatórias que produzirão erros sistemáticos.

A.1 – Representação do Planejamento Fatorial com dois níveis

Em um determinado sistema teórico, deseja-se estimar os efeitos de três fatores (X_1 , X_2 e X_3) na resposta Y do determinado sistema com dois níveis (-) e (+). O Planejamento Fatorial é dado por 2^3 resultando num total de oito experiências. A matriz de planejamento correspondente a este exemplo é mostrada a seguir:

<i>Experiência</i>	X_1	X_2	X_3	Y	<i>Efeito</i>
01	-	-	-	Y_1	b_0
02	+	-	-	Y_2	b_1
03	-	+	-	Y_3	b_2
04	+	+	-	Y_4	b_3
05	-	-	+	Y_5	b_{12}
06	+	-	+	Y_6	b_{13}
07	-	+	+	Y_7	b_{23}
08	+	+	+	Y_8	b_{123}

As combinações de (+) e (-) identificam uma experiência. Por exemplo, uma experiência (+ - +) significa que os fatores X_1 e X_3 estão nos níveis mais altos, enquanto que o fator X_2 se encontra no seu nível mais baixo. O modelo obtido é então dado pela equação abaixo (MASSART et al., 1997; AGUIAR e MASSART, 1998), sendo que os efeitos podem ser calculados por regressão linear.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \quad (19)$$

onde:

Y = resposta desejada

b_0 = valor médio da resposta Y

b_i = representa o efeito do fator i

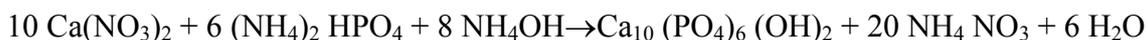
b_{ij} = representa o efeito da interação entre X_i e X_j

b_{ijk} = representa o efeito da interação entre X_i , X_j e X_k

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

As hidroxiapatitas (HA) utilizadas neste estudo foram sintetizadas pelo método da precipitação segundo a reação:



As sínteses foram realizadas no Laboratório de Biocerâmicas do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF, onde foram preparadas por meio de um planejamento de experimentos, com variações nos parâmetros de sínteses (razão Ca/P, temperatura de síntese, pH, tempo de digestão, velocidade de adição e concentração dos reagentes). Foram propostos modelos que puderam prever satisfatoriamente os resultados experimentais. Estes modelos foram estabelecidos pela análise dos efeitos dos parâmetros de síntese estudados, calculados por regressão linear multivariada (RLM). A HA obtida na forma de pó foi caracterizada com o uso de técnicas convencionais (ERLON, 1991).

Para a produção das pastilhas densas e porosas foram utilizadas duas hidroxiapatitas, uma estequiométrica (E – HA) e outra deficiente em cálcio (CD – HA). Os parâmetros estruturais das hidroxiapatitas são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Parâmetros Estruturais dos Pós de Hidroxiapatitas.

Parâmetros Estruturais	Razão Atômica Ca/P	Parâmetros de rede		Área BET (m ² /g)
		a = b (nm)	c (nm)	
E - HA	1,66 ± 0,02	0,94194	0,68771	65
CD – HA	1,58 ± 0,02	0,94407	0,68877	34

Os padrões de Difração de Raios -X (DRX) das hidroxiapatitas são mostrados na Figura 3.1, sendo que foi identificada apenas uma fase: hidroxiapatita (cartão JCPDS 9-432).

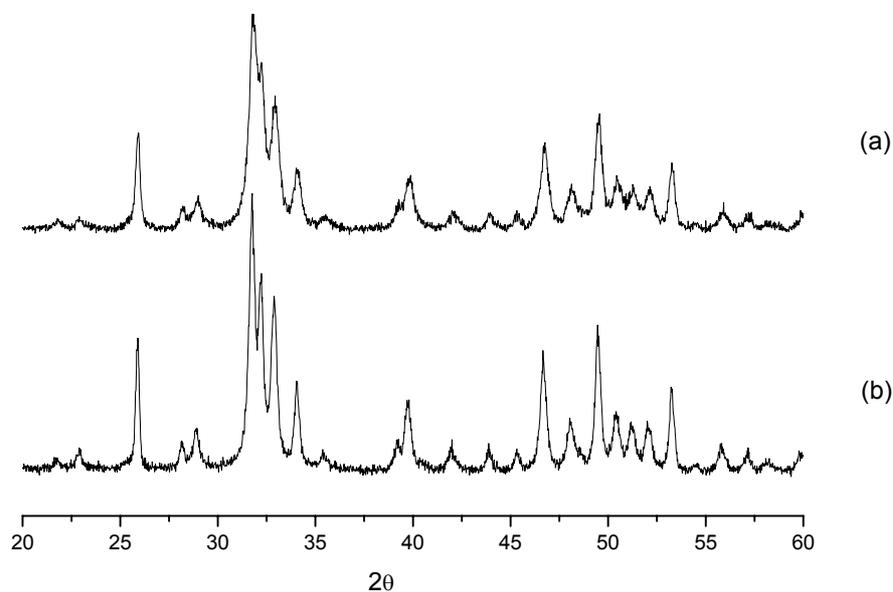


Figura 3.1 - Padrões de Difração de Raios – X: (a) E-HA e (b) CD-HA.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 – Calcinação dos pós de Hidroxiapatita

Foi realizada em forno mufla microprocessado, modelo Q-318S21 nas temperaturas de 1000 e 1150°C, com taxas de aquecimentos de 1,6 e 2,1°C/min, respectivamente. O tempo à temperatura escolhida foi de 2 horas e o resfriamento foi feito no próprio forno até a temperatura ambiente. Após a calcinação do pó, foram feitas análises de DRX, EIV e MET.

3.2.2 – Processo de obtenção de pastilhas densas

O processamento das pastilhas densas é similar ao processo de obtenção das pastilhas porosas descrito no item 3.2.3 deste capítulo, sem adição de aditivo formador de poros. As pastilhas densas foram analisadas por DRX.

3.2.3 – Processo de obtenção de pastilhas porosas

Nessa etapa foi feito um trabalho preliminar que consistiu na determinação dos parâmetros necessários para a produção das pastilhas porosas. Os parâmetros estudados com suas respectivas variações foram: granulometria dos componentes: HA (125-250 μ m); nafataleno (125-450 μ m), quantidade de naftaleno (20-50% em peso), carga de compactação (2000-5000Kg), tempo de compactação (1-30 minutos) e varias rampas de calcinação com diferentes taxas de aquecimento utilizando temperaturas de 1000⁰C e 1150⁰C. A partir desse estudo preliminar determinou-se os parâmetros para a produção das pastilhas porosas.

Por meio de um planejamento de experimentos (planejamento fatorial com dois níveis) se estabeleceram relações entre os fatores selecionados para a produção da hidroxiapatita porosa. Nesse tipo de planejamento, cada fator assumiu dois níveis: um nível (+) e um nível (-). Os experimentos foram executados a cada combinação destes dois níveis e o número de experimentos foi dado pelo fatorial 2³. Os fatores considerados para esta produção com seus respectivos níveis de variações foram:

Fatores	Níveis	
	-	+
X1	1,58	1,66
X2	1000	1150
X3	20	40

onde:

X1 = razão atômica Ca/P

X2 = temperatura de calcinação (⁰C)

X3 = quantidade de naftaleno (% em peso)

A escolha desses fatores foi função de se querer produzir uma biocerâmica com características para aplicações biomédicas, principalmente visando ao preenchimento de cavidades ósseas. Segundo alguns autores (KURASHINA et al., 2002; GAUTHIER et al., 1998) cerâmicas porosas com fosfato bifásico HA/TCP, com diâmetro de poro na

faixa de 100 a 300µm, são capazes de promoverem a osteocondução, favorecendo o crescimento ósseo.

O planejamento fatorial com dois níveis foi selecionado para realização dos experimentos por ser mais simples e por obter informações sobre a influência de cada fator na resposta, variando-se simultaneamente os fatores. O modelo do planejamento proposto é dado pela equação:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (3.1)$$

onde: Y = resposta desejada

b_0 = valor médio de resposta Y

b_1, b_2 e b_3 = representam os efeitos dos fatores x_1, x_2 e x_3

b_{12}, b_{23} = representam os efeitos das interações entre os fatores (x_1x_2) e (x_2x_3)

b_{123} = representa o efeito da interação entre os fatores x_1, x_2 e x_3

Os efeitos representam os coeficientes do modelo proposto. Esses efeitos são calculados segundo a equação (3.2), e a matriz para o cálculo dos efeitos é apresentada na Tabela 3.2.

$$\text{Efeito} = (\sum \text{respostas para o nível (+)} - \sum \text{respostas para o nível (-)}) / r^{k-1} \quad (3.2)$$

onde: r (representa o número de níveis) e k (número de variáveis).

Tabela 3.2 – Matriz para o cálculo dos efeitos.

EXP	I	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	Y
1	+	-	-	-	+	+	+	-	y ₁
2	+	+	-	-	-	-	+	+	y ₂
3	+	-	+	-	-	+	-	+	y ₃
4	+	+	+	-	+	-	-	-	y ₄
5	+	-	-	+	+	-	-	+	y ₅
6	+	+	-	+	-	+	-	-	y ₆
7	+	-	+	+	-	-	+	-	y ₇
8	+	+	+	+	+	+	+	+	y ₈
Ef	b_0	b_1	b_2	b_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_{123}	

Obs: Para o cálculo de I, utilizou-se r^k no lugar de r^{k-1} na equação (3.2).

A matriz do planejamento e a de experimentos correspondente ao planejamento fatorial com dois níveis e três fatores dada por oito experimentos, serão respectivamente:

Tabela 3.3 – Matriz de planejamento.

Experimento	X1	X2	X3	Y
01	-	-	-	y ₁
02	+	-	-	y ₂
03	-	+	-	y ₃
04	+	+	-	y ₄
05	-	-	+	y ₅
06	+	-	+	y ₆
07	-	+	+	y ₇
08	+	+	+	y ₈

Tabela 3.4 – Matriz de experimentos.

Experimento	X1	X2	X3	Y	Denominação
01	1,58	1000	20	y ₁	CD-HA-20-1000
02	1,66	1000	20	y ₂	E-HA-20-1000
03	1,58	1150	20	y ₃	CD-HA-20-1150
04	1,66	1150	20	y ₄	E-HA-20-1150
05	1,58	1000	40	y ₅	CD-HA-40-1000
06	1,66	1000	40	y ₆	E-HA-40-1000
07	1,58	1150	40	y ₇	CD-HA-40-1150
08	1,66	1150	40	y ₈	E-HA-40-1150

O processamento das pastilhas de HA porosas consistiu das seguintes etapas:

A - Mistura dos Componentes: foram utilizados dois componentes na mistura (HA e naftaleno). As hidroxiapatitas utilizadas foram submetidas ao peneiramento com malha menor que 75µm, para facilitar a densificação das amostras na etapa de calcinação. O naftaleno foi empregado como aditivo formador de poros em duas

porcentagens (20 e 40% em massa). Suas partículas foram mantidas com tamanho $\geq 250\mu\text{m}$, obtidas também por peneiramento, para obter poros nas hidroxiapatitas maiores que $100\mu\text{m}$. Para facilitar a desmoldagem das pastilhas, foi utilizado o ácido esteárico ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$) como agente lubrificante. Nessa etapa a massa total dos componentes foi de 1,0g.

B - Compactação: foi realizada utilizando a técnica de prensagem uniaxial, com carga correspondente a 28MPa e tempo de 30 minutos, em uma prensa hidráulica operada manualmente modelo 3912 da CARVER, com capacidade para até 11t. Utilizou-se uma matriz cilíndrica de aço inoxidável 316L com diâmetro interno de 15 mm.

C – Calcinação. Constou de duas etapas:

C.1 – Aquecimento lento até temperatura de 400°C com taxa de aquecimento de $0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$, para liberação do componente formador de poros (naftaleno).

C.2 – Sinterização das amostras nas temperaturas de 1000 e 1150°C , com taxas de aquecimentos de 1,6 e $2,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ respectivamente.

O resfriamento das amostras ocorreu até a temperatura ambiente realizado no próprio forno mufla microprocessado, modelo Q-318S21 programado para incrementos de temperatura de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingir a temperatura desejada e pelo tempo desejado.

Como produto final do processamento foram obtidas pastilhas porosas de HA com diâmetros de $14\pm 0,3$ e $11\pm 0,4$ mm calcinadas nas temperaturas de 1000 e 1150°C respectivamente, como apresentado na Figura 3.2.

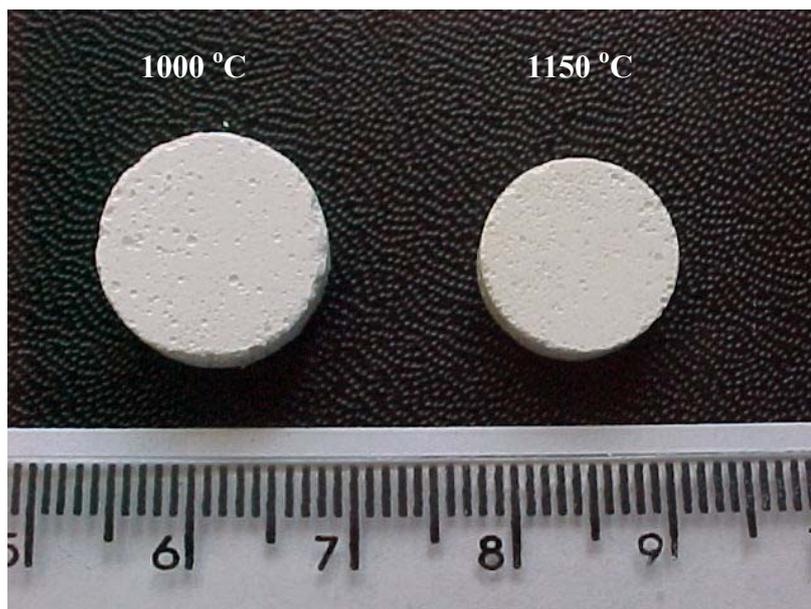


Figura 3.2 – Pastilhas porosas de HA.

3.2.4 – Técnicas usadas na caracterização das amostras

A – Análise por Difração de Raios – X (DRX)

As fases presentes foram identificadas e quantificadas utilizando-se um difratômetro de Raios – X, modelo Miniflex da Rigaku, operando com radiação $\text{CuK}\alpha$ (30KV e 15mA). O ângulo de detecção variou entre 10 e 100° com passo de 0,02°, e com um intervalo de 1 segundo entre os passos.

Por meio da identificação das linhas de difração correspondentes aos espaçamentos interplanares dos materiais cristalinos, tem-se o padrão resultante, composto de espaçamentos planares (eixo x) e intensidade (eixo y), que é comparado a padrões do Comitê da Junta de Padrões de Difração de Pós (JCPDS) da ASTM (American Society for Testing and Materials) para os vários fosfatos de cálcio. A localização e a intensidade dos picos fornecerão um padrão característico que será utilizado na análise qualitativa.

A análise quantitativa das fases presentes no padrão de DRX e a razão atômica Ca/P das pastilhas foram obtidas por meio da comparação dos padrões obtidos com a curva da calibração produzida (ver Anexo 1) e pelo método de refinamento Rietveld. Os cálculos

do refinamento de Rietveld foram executados com o uso do Software FULLPROF (RODRIGUEZ-CARVAJAL, 1996) que incluem cálculos de diversas magnitudes que caracterizam a confiabilidade dos resultados obtidos. O programa FULLPROF permite modelar padrões teóricos e refinar estruturas a partir de padrões experimentais. A difração pode ser de raios-X ou neutrons. As aplicações mais usadas são: refinamento de estruturas cristalinas e magnéticas (difração de neutrons), análise quantitativa de fases, medidas precisas dos parâmetros reticulares, caracterização de texturas e investigações de microdeformações, e tamanho de cristalitos. O conhecimento do grupo espacial e as posições atômicas das fases são imprescindíveis para que faça o refinamento pelo método de Rietveld.

A estimativa do tamanho do cristal (TC) das fases que constituem os sistemas estudados (pó, denso e poroso), foi feita por DRX. Os dados obtidos a partir das reflexões em duas regiões são mostrados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Dados das reflexões para estimar o tamanho do cristal.

Fase	Reflexão	Região Angular (°)
HA	(002)	24-27
HA	(300)	31-34
α -TCP	(034)	29-32
α -TCP	(261)	23-26
β -TCP	(0210)	30-33
β -TCP	(220)	33-35

Os valores de TC_{hkl} (tamanho de cristalito nos planos h,k,l) dos sistemas estudados foram calculados usando a equação de Scherrer (DOROZHKIN, 2002):

$$TC_{hkl} = K\lambda / \beta_{1/2} \cos\theta \quad (3.3)$$

onde λ é o comprimento de onda de raios-x, $\beta_{1/2}$ é a meia altura da intensidade máxima, θ é o angulo de difração, e K a constante da forma do cristal igual a 0,9.

B – Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EIV)

Para caracterizar as vibrações atômicas e moleculares, as substituições ou alterações nas hidroxiapatitas estudadas, foi utilizada a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EIV), com acessório de reflectância difusa. Essa técnica permite a determinação relativa de alguns grupos funcionais, como CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} e OH^- . A análise qualitativa do fosfato TCP - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nas formas alotrópicas α e β foi realizada com base nos espectros de IV obtidos para essas duas formas (ver Anexo 2).

O equipamento utilizado neste estudo consistiu de um espectrofotômetro de marca BOMEM, modelo MB102, com Transformada de Fourier e Detetor DTGS (alanina dopada com sulfato de triglicina deuterada) e janelas de iodeto de césio (CsI).

Para a obtenção dos espectros, 20mg de pó de hidroxiapatita foram misturados com 220 mg de KBr. Em seguida, a mistura foi transferida para o recipiente do acessório da reflectância difusa, RD. Foram realizados 1000 varreduras para cada amostra a uma velocidade de 20 varreduras/min e resolução de 4 cm^{-1} . O espectro foi analisado na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

C – Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Essa técnica foi empregada para caracterizar morfologicamente as pastilhas produzidas e a porosidade resultante. Essa análise foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura, marca CARL ZEISS modelo DSM 940A, a 20 KV. Foram obtidas imagens com aumento de 50, 200 1000 e 2000 vezes.

A análise dos pós e pastilhas foi feita usando-se imagens obtidas com elétrons secundários e elétrons retroespalhados (BSE). As imagens de BSE geram menor informação topográfica, mas são úteis para identificar fases com diferentes composições químicas ou, como o pretendido aqui, imagens com alto contraste para quantificação de poros.

D – Análise Eletrônica de Transmissão (MET)

Para caracterização morfológica e cristalográfica das fases presentes nos pós e nas pastilhas produzidas, fez-se uso do MET, modelo JEOL 2000FX operando em 200KV. Na preparação das amostras foi empregada a técnica que consiste da dispersão de um pó muito fino em álcool etílico, sendo então colocada uma gota na dispersão numa grade de cobre com 3 mm de diâmetro e 300 mesh recoberta com um filme fino de carbono.

E – Determinação da Porosidade

Para a caracterização dos poros foram utilizados dois métodos. A saber:

E.1) Método da Densidade Teórica

A porosidade das amostras foi calculada como porcentagem da densidade teórica da HA pura ($\delta_{teórica} = 3,156\text{g/cm}^3$) ou da mistura de HA com fosfato tricálcico (TCP) ($3,113\text{g/cm}^3$). Para tanto, foram medidos o diâmetro e a altura de oito amostras de cada condição do planejamento de experimentos proposto para o processamento das pastilhas porosas, assim como os seus respectivos pesos. Essas medidas foram utilizadas para calcular a densidade real (δ_{real}) das amostras, a partir da fórmula:

$$\delta_{real} = \frac{\text{massa(g)} / \text{volume(cm}^3\text{)}}{\delta_{teórica}} \times 100 \quad (3.4)$$

A partir da densidade real da amostra, a porcentagem de porosidade total foi calculada utilizando-se a fórmula:

$$P_{total} = 1 - (\delta_{real} / \delta_{teórica}) \times 100 \quad (3.5)$$

Histogramas de porosidade total versus temperatura de calcinação foram construídos.

E.2) Análise de Imagens

Nessa análise utilizou-se imagem de elétrons retroespalhados obtidas em MEV com aumento de 50 vezes. Foram obtidas 9 imagens de cada uma amostras porosas calcinadas a 1000⁰C como mostrado esquematicamente na Figura 3.4a. A porcentagem de poros com diâmetro <100, 100-200, 200-300, 300-400 e >400µm foi calculada, com auxílio do Software GLOBAL LAB (Data Translation, Marlboro, USA) como ilustra a Figura 3.3b, destacando as regiões com os poros contornados. Histogramas com a distribuição do diâmetro de poros foram então construídos.

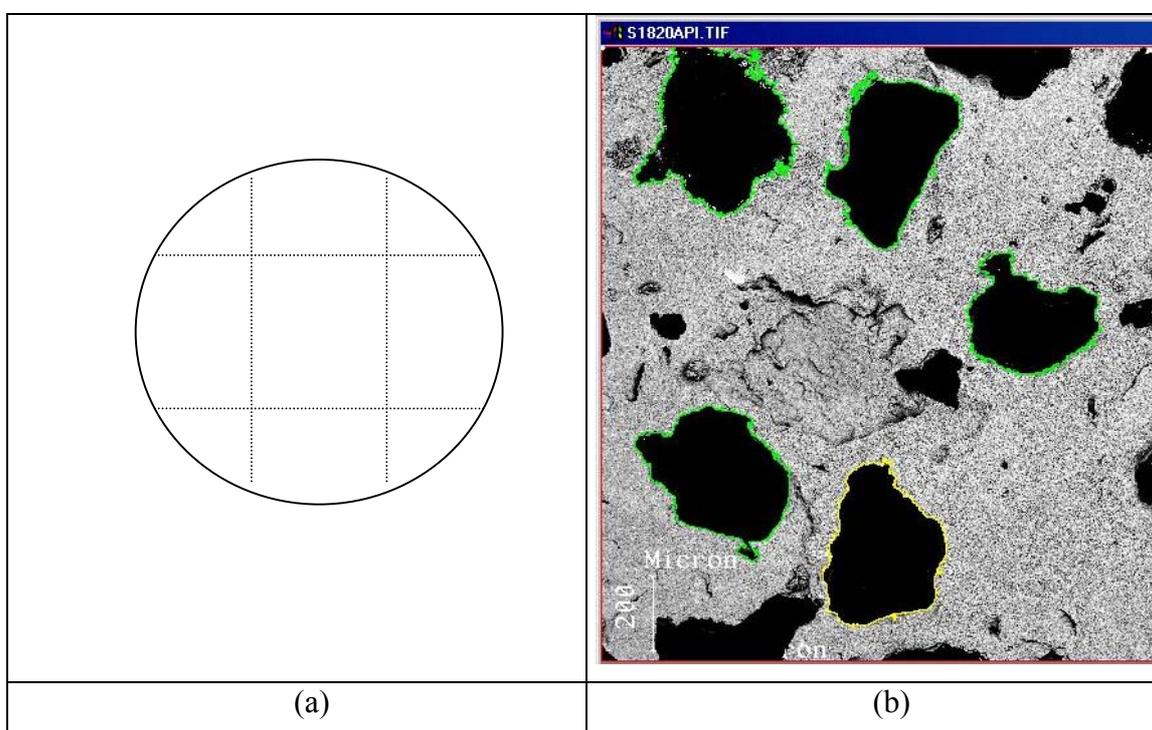


Figura 3.3 – (a) Esquema da pastilha mostrando as nove regiões onde imagens foram obtidas e (b) Imagem mostrando os poros analisados em cada região.

F – Comportamento *in vitro*

Do conjunto de oito condições produzidas por meio do planejamento de experimentos foram selecionadas três condições de pastilhas porosas com 40% de naftaleno, que geraram relação de fases distintas e a estas três amostras somada, uma pastilha porosa com 40% de naftaleno produzida com HA estequiométrica, de razão atômica Ca/P igual 1,72 e

área BET ($83,18\text{m}^2/\text{g}$). A pastilha sob essa nova condição foi calcinada a 1000°C não apresentando decomposição de fases, como mostra o padrão de DRX e espectro de IV apresentados nas Figuras 3.4 e 3.5. A porosidade total das amostras dessa condição foi de 74,62%. A Tabela 3.6 mostra as condições das pastilhas porosas usadas no teste de caracterização *in vitro*. Nas quatro condições foram realizados: o teste de degradação de materiais cerâmicos segundo a norma (ISO/FDIS – 10993-14 de 2001), que avalia a identificação e quantificação da degradação de produtos cerâmicos, e o teste biológico, por meio de imersão dos materiais em soluções simuladoras de fluidos corpóreos (SFC).

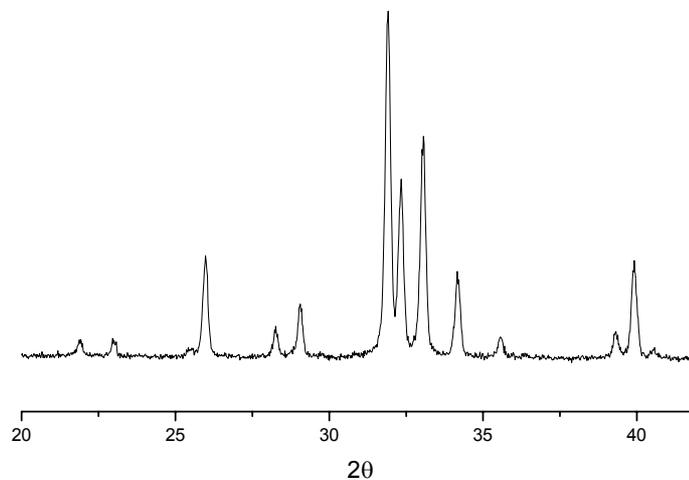


Figura 3.4 - Padrão de DRX da pastilha porosa E-HA calcinada a 1000°C com 40% naftaleno (condição a).

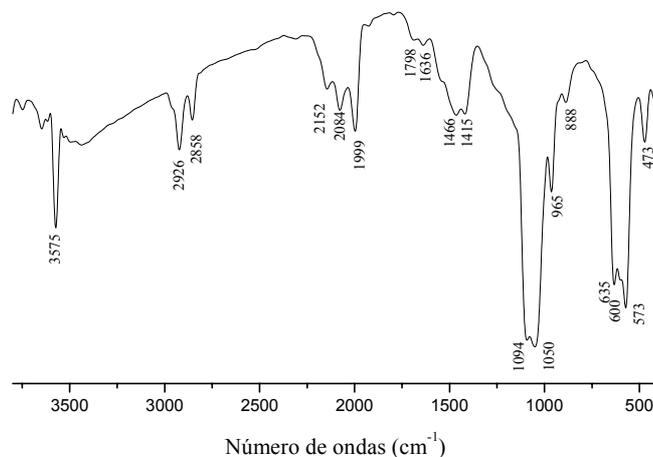


Figura 3.5 - Espectro de IV da pastilha porosa E-HA calcinada a 1000°C com 40% naftaleno (condição a).

Tabela 3.6 – Condições das pastilhas porosas usadas para avaliação do comportamento *in vitro*.

Condição	Composição Química	T (°C)
a *	HA	1000
b	HA + α	1000
c	HA + β	1000
d	HA + α	1150

* condição não pertencente ao planejamento fatorial original.

F.1) Teste de Degradação

Consiste em avaliar a degradação das amostras (quatro condições) em meio aquoso, solução tamponada de TRIS (Trishidroximetilaminometano), em temperatura de 37°C e pH igual a 7,4. O pH da solução foi ajustado com solução de HCl 1M. Para cada condição a massa usada foi 0,250g com granulometria na faixa de 350-450 μ m (triplicata) para um volume de 7ml de solução TRIS. O teste de degradação foi realizado em banho maria com agitação linear modelo Q-226D da QUIMIS no período de 120 horas, com temperatura do banho de 37°C. A porcentagem da perda de massa das amostras foi obtida por meio da equação: $(M_i - M_f / M_i \times 100)$, onde M_i é a massa inicial das amostras antes da imersão na solução TRIS, e M_f a massa depois de imersas.

F.2) Teste Biológico em solução simuladora de fluido corpóreo (SFC)

A bioatividade dos materiais tem sido avaliada pela maior ou menor capacidade que esses materiais apresentam de induzir a formação em sua superfície da apatita “biológica”. Para avaliarmos a dissolução e reprecipitação de quatro condições de amostras descritas na Tabela 3.6, fez-se uso da solução simuladora de fluido corpóreo (SFC), com composição química descrita na Tabela 3.7. Nesse teste utilizou-se triplicata de uma massa correspondente a 1/4 de pastilha porosa usada nas quatro condições, para um volume de 20ml de solução SFC para cada condição. O teste de bioatividade foi realizado em banho maria com agitação linear modelo Q-226D da QUIMIS no período 168 horas, com temperatura do banho de 37°C. O pH da solução das amostras foi analisado e medido periodicamente. Gráficos de pH versus tempo de imersão foram construídos. O ganho de

massa das amostras foi obtido pela equação: $(M_i - M_f / M_i \times 100)$, onde M_i é a massa inicial das amostras antes de imersas na solução SFC, e M_f a massa depois de imersas. As amostras foram caracterizadas em EIV e MEV, e o teor de cálcio e fósforo foi analisado por ICP-AES.

Tabela 3.7 - Composição química da solução simuladora de fluido corpóreo (SFC) para 1000ml (ANDRADE, 1999).

Reagente químico	Massa (g)
NaCl	7,94
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,3088
KCl	0,372
Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	0,245
CaSO ₄ . 2H ₂ O	0,086
NaHCO ₃	0,353
CaCl ₂	0,20

G – Espectrometria de Emissão por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES)

Os teores de cálcio e fósforo nas soluções das amostras (fragmentos porosos) depois de imersas em SFC foram determinados por ICP-AES, utilizando-se um Espectrômetro marca PERKIN, modelo Optima 3000 da EMBRAPA-RJ. Nesse tipo de equipamento o plasma é formado eletromagneticamente pela indução de uma corrente de alta frequência por meio de um gerador de radiofrequência acoplado ao gás argônio. Esta técnica é baseada na capacidade que os átomos têm de emitir radiação quando seus elétrons são excitados pelo plasma. A intensidade de luz emitida num dado comprimento de onda, que é específico para cada elemento, é medida e usada para determinar a concentração de cada elemento na amostra.

4 – RESULTADOS

O objetivo deste trabalho foi a produção de pastilhas porosas para aplicações biomédicas, visando principalmente o preenchimento de cavidades ósseas. Essas pastilhas foram produzidas com diferentes relações de fases com quantidades e tamanhos de poros variados, para verificar a correlação de suas propriedades com a caracterização em solução simuladora de fluido corpóreo. Para compreendermos o efeito da porosidade na dissolução e reprecipitação nesse meio, foi necessário caracterizar primeiramente o pó e pastilhas densas calcinados em condições idênticas às empregadas na produção de pastilhas porosas. Neste capítulo, primeiramente serão apresentados os resultados referentes à calcinação do pó, seguido dos resultados da calcinação das pastilhas densas e os resultados do planejamento de experimentos usado no processamento das pastilhas porosas. Para finalizar é apresentada a caracterização “in vitro” de três condições do planejamento de experimentos que geraram relação de fases distintas mais uma condição onde praticamente não houve decomposição de fases.

4.1 – Calcinação da hidroxiapatita em pó

As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam os padrões de Difração de Raios –X dos pós de HA (E-HA e CD-HA) calcinados às temperaturas de 1000 e 1150⁰C respectivamente por 2 horas, revelando a transformação parcial das hidroxiapatitas estudadas em fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂) (TCP). Nas Figuras 4.1 e 4.2 foram acrescentados os padrões de DRX do pó de HA não-calcinado (pó de partida). A hidroxiapatita estequiométrica (E-HA) transformou-se parcialmente em α -TCP e a hidroxiapatita deficiente em cálcio (CD-HA) em β -TCP, sendo essa transformação mais intensa na temperatura de 1150⁰C e para a HA deficiente em cálcio. As fases presentes nos padrões de DRX foram associadas aos cartões JCPDS: (9-432 – HA), (29-0359 - α -TCP) e (9-169 - β -TCP). A porcentagem das fases presentes nos padrões de DRX das Figuras 4.1 e 4.2 determinada segundo as metodologias descritas no item 3.2.4 A e Anexo 1 é mostrada na Tabela 4.1. Nessa Tabela são também indicado os tamanhos de cristalito (TC) da fase HA calculado nas direções (002) e (300).

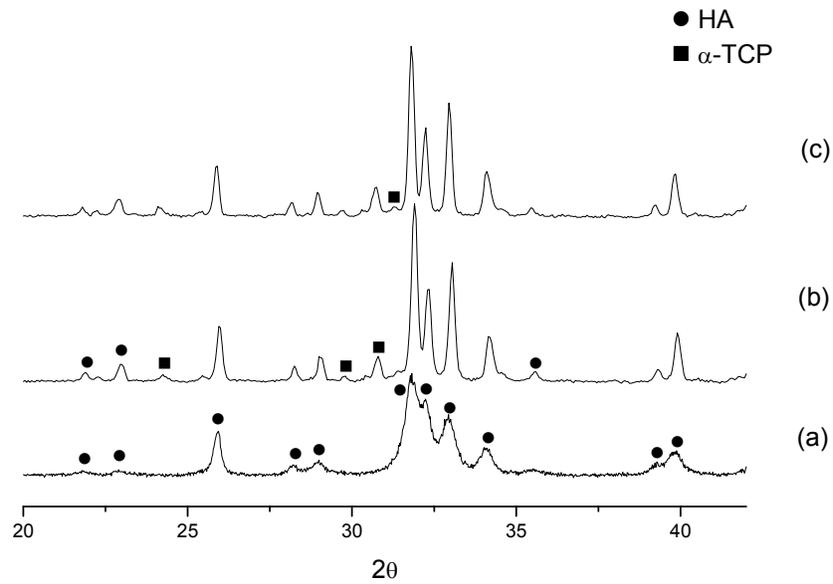


Figura 4.1- Padrões de DRX do pó de E-HA: (a) não calcinado; (b) calcinado a 1000°C e (c) calcinado a 1150°C.

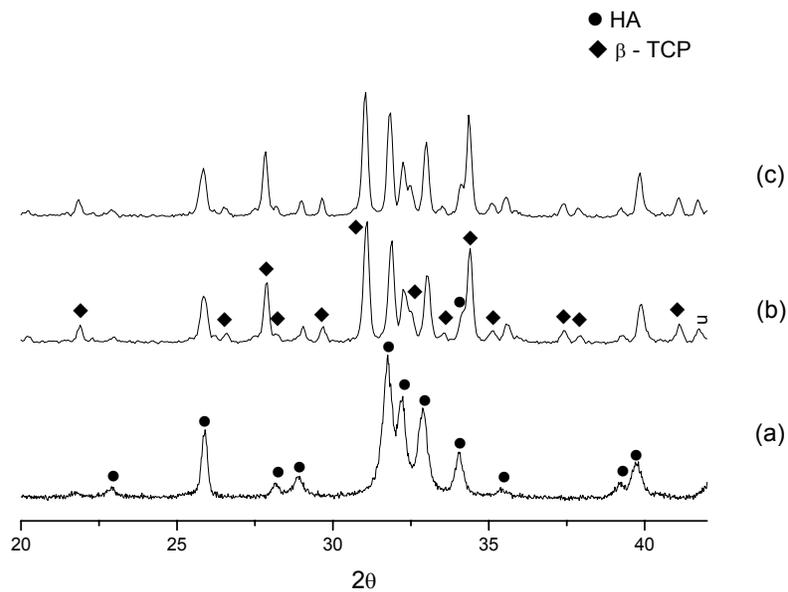


Figura 4.2 – Padrões de DRX do pó de CD-HA: (a) não calcinado; (b) calcinado a 1000°C e (c) calcinado a 1150°C.

Tabela 4.1 – Quantificação das fases identificadas nos padrões de DRX do pó calcinado e tamanho de cristalito (TC) calculado nas direções (002) e (300) de HA.

Amostra	T (°C)	Fases Presentes (%)						T C (nm)	
		Curva de Calibração			Rietveld			(002)	(300)
		HA	α -TCP	β -TCP	HA	α -TCP	β -TCP		
E-HA	1000	89,6	10,4	--	84,0	16,0	--	39,3	44,3
E-HA	1150	87,7	12,3	--	77,7	22,3	--	42,8	46,3
CD-HA	1000	45,7	--	54,3	42,5	--	57,5	54,3	34,5
CD-HA	1150	44,8	--	55,2	42,0	--	58,0	44,8	39,3

Os parâmetros de rede das fases presentes após calcinação do pó de HA (E-HA e CD-HA), calculados por simulação usando o método de Rietveld são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Parâmetros de rede das fases formadas no pó calcinado.

Fase	Parâmetros de Rede	
	Rietveld (a, b e c - nm)	Padrão (a, b e c - nm) (JCPDS)
HA	0,9416; 0,9416 e 0,6880	0,9418; 0,9418 e 0,6884 (9-432)
α -TCP	0,12887; 0,27280 e 0,15219	0,12887; 0,27280 e 0,15219 (29-0359)
β -TCP	10,434 e 37,39	10,429 e 37,38 (9-169)

As Figuras 4.3 e 4.4 apresentam os respectivos espectros de IV dos pós-calcinados da HA estequiométrica (E-HA) e da HA deficiente em cálcio (CD-HA) a 1000 e 1150°C. Em cada uma das Figuras estão apresentados os espectros do pó de partida (a), calcinado a 1000°C (b) e calcinado a 1150°C (c).

No espectro do pó de partida da E-HA, Figura 4.3 (a), pode se observar os picos em 635 e 3572 cm^{-1} do grupo OH^- da HA e em 1646 cm^{-1} indicando a presença da ligação O-H. Também observamos os picos em 1422, 1454 e 1487 cm^{-1} típicas do grupo carbonato (CO_3^{2-}) nos sítios A e B e outro pico em 873 cm^{-1} que corresponde à presença do carbonato no sítio A. O pico em 1329 cm^{-1} indica a presença de NH_4^+ decorrente do processo de

sintetização da HA. Outros picos da HA são observadas em 473, 567, 605, 965, 1036 e 1093 cm^{-1} correspondentes ao grupo do fosfato (PO_4^{3-}).

Quando calcinado a 1000°C , Figura 4.3 (b), observa-se a diminuição na banda larga do grupo OH^- (3572 cm^{-1}), eliminação do CO_3^{2-} na região ($1422\text{-}1487 \text{ cm}^{-1}$), estreitamento na banda do grupo PO_4^{3-} na região de $965\text{-}1093 \text{ cm}^{-1}$ e a diminuição do pico do CO_3^{2-} em 873 cm^{-1} . O surgimento de novo pico é observado na região de 715 cm^{-1} , indicando a presença do $\beta - \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Esse comportamento foi também observado a 1150°C , figura 4.3 (c), com a formação de novos picos em 1200 cm^{-1} , correspondente ao $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 710 e 1062 cm^{-1} a $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Na região de $965\text{-}1093 \text{ cm}^{-1}$ observa-se o alargamento na banda do grupo PO_4^{3-} .

No espectro do pó de partida da CD-HA Figura 4.4 (a), são observadas os picos em 3574 e 635 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} indicando respectivamente a presença do grupo OH^- da HA e a ligação O-H. Em 1423 e 1453 cm^{-1} , observa-se os picos de fraca intensidade características do carbonato de cálcio no sítio B; em 1213 cm^{-1} o pico característico do hidrogeno fosfato de cálcio dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), em 1030 e 1140 cm^{-1} picos do pirofosfato de cálcio ($\gamma - \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), em 1063 cm^{-1} pico do hidrogeno fosfato de cálcio (CaHPO_4). O pico do hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) aparece em 870 cm^{-1} . Outros picos da HA são observados em 473 , 567 , 604 , 961 e 1098 cm^{-1} correspondentes ao grupo do PO_4^{2-} .

Quando calcinada a 1000°C , Figura 4.4 (b), e 1150°C , Figura 4.4 (c), observa-se uma redução na banda de OH^- da HA (3574 cm^{-1}), bandas da ligação O-H (1642 cm^{-1}); a eliminação dos picos de carbonatos referentes aos sítios B (1423 e 1453 cm^{-1}) e o desaparecimento dos picos dos fosfatos CaHPO_4 e $\gamma - \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ e do pico de HPO_4^{2-} . O aparecimento de novos picos foi observado nas duas temperaturas de calcinação. A 1000°C ; 1102 cm^{-1} pico característico do pirofosfato ($\beta - \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), 1037 cm^{-1} pico correspondente aos fosfatos HA e $\beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 977 cm^{-1} ao $\beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\beta - \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, e um pico muito fraco de $\beta - \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ em 719 cm^{-1} . Assim como em E-HA, a 1000°C foi observado o estreitamento na banda do grupo PO_4^{3-} na região de $965\text{-}1093 \text{ cm}^{-1}$. A 1150°C , em 1030 e 1105 cm^{-1} a presença de $\beta - \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ e em 980 e 1042 cm^{-1} ; picos $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. A HA aparece também em 1042 cm^{-1} ; e em 712 cm^{-1} temos o pico muito fraco do $\beta - \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

Assim como em E-HA, o alargamento na banda do grupo funcional PO_4^{3-} foi observado nessa temperatura.

A Tabela 4.3 resume as identificações feitas nos espectros apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4.

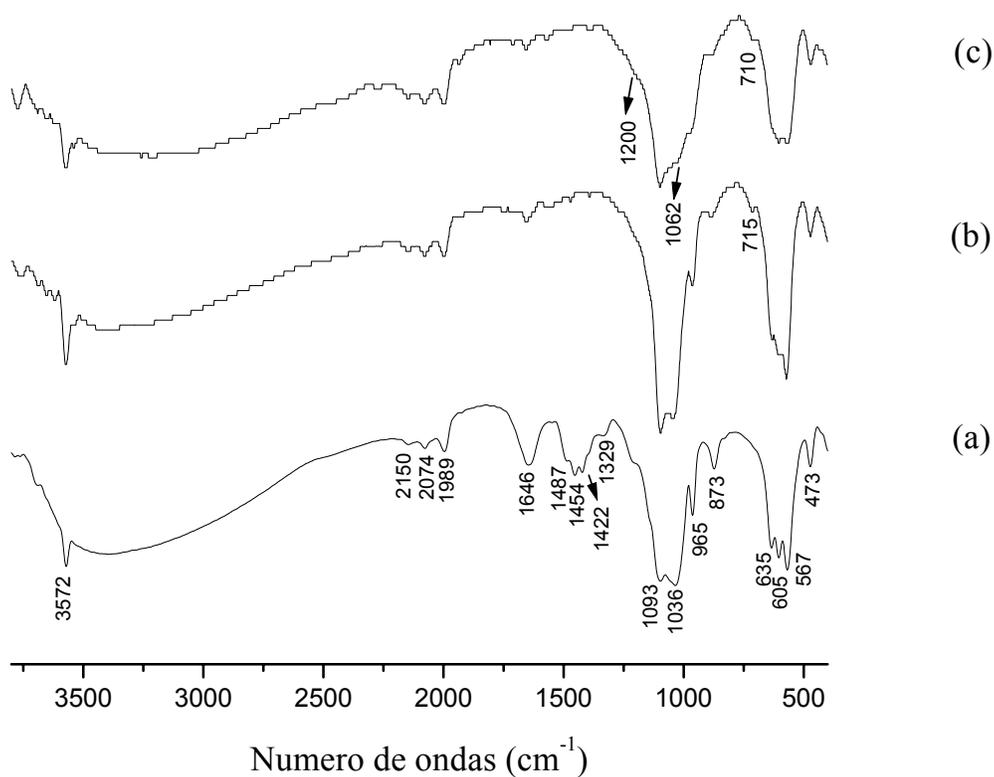


Figura 4.3 - Espectros de IV de E-HA: (a) Pó de partida; (b) Pó calcinado a 1000°C e (c) Pó calcinado a 1150°C .

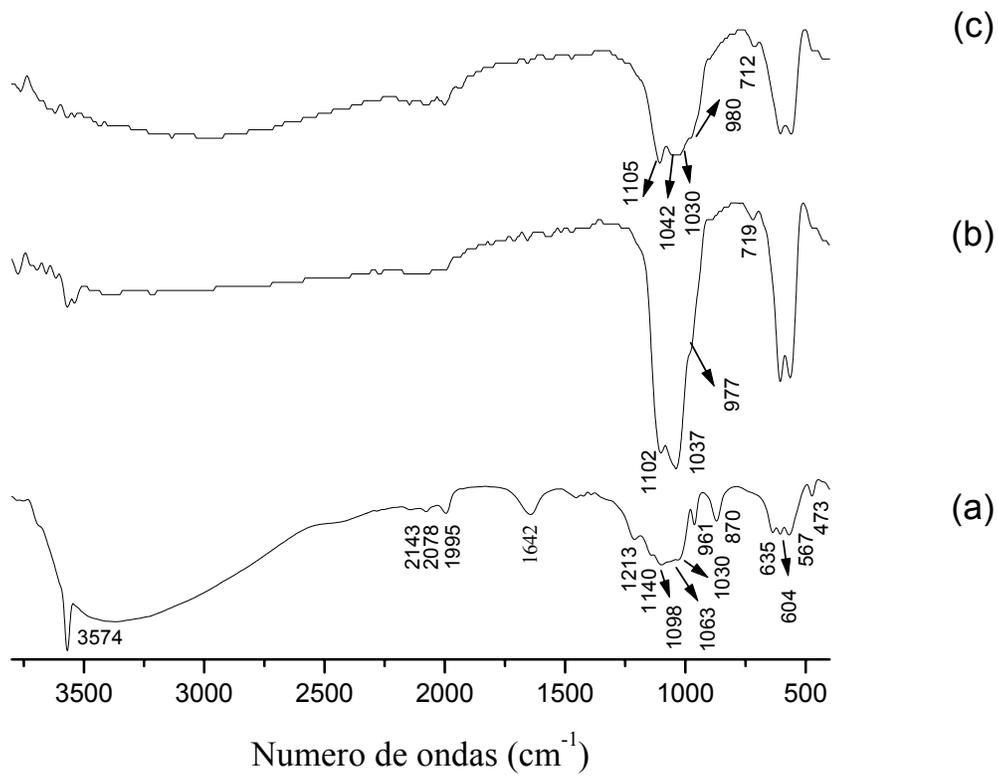


Figura 4.4 - Espectros de IV de CD-HA: (a) Pó de partida; (b) Pó calcinado a 1000⁰C e (c) Pó calcinado a 1150⁰C.

Tabela 4.3 - Picos identificados nos espectros IV do pó de partida de E-HA e CD-HA, e após calcinação a 1000 e 1150⁰C. Somente são indicadas as bandas que aparecem em decorrência do processo de calcinação.

Pó de E-HA, picos (cm⁻¹)	Grupamento ou Fases
3572, 635	OH ⁻
2150, 2074, 1989	HA
1646	ligação O-H
1487, 1454, 1422, 873	CO ₃ ²⁻
1329	NH ₄ ⁺
1093, 1036, 965, 605, 567, 473	PO ₄ ³⁻ (HA)
calcinado a 1000⁰C	
715	β-Ca ₂ P ₂ O ₇
calcinado a 1150⁰C	
1200, 1062	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂ , β-Ca ₂ P ₂ O ₇
710	β-Ca ₂ P ₂ O ₇
Pó de CD-HA, picos (cm⁻¹)	Grupamento ou Fases
3574, 635	OH ⁻
1642	ligação O-H
2143, 2078, 1995	HA
1453, 1423	CO ₃ ²⁻
1140, 1030	γ- Ca ₂ P ₂ O ₇
1213, 1063	CaHPO ₄
1098, 961, 604, 567, 473	PO ₄ ³⁻ (HA)
870	HPO ₄ ²⁻
calcinado a 1000⁰C	
1102	β-Ca ₂ P ₂ O ₇
1037	HA, β- Ca ₃ (PO ₄) ₂
977	β- Ca ₃ (PO ₄) ₂ , β-Ca ₂ P ₂ O ₇
719	β-Ca ₂ P ₂ O ₇
calcinado a 1150⁰C	
1105, 1030	β-Ca ₂ P ₂ O ₇
1042	HA, β- Ca ₃ (PO ₄) ₂
980	β- Ca ₃ (PO ₄) ₂ , β-Ca ₂ P ₂ O ₇
712	β-Ca ₂ P ₂ O ₇

A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos pós de partidas (E-HA e CD-HA) não calcinados, mostrando a morfologia dos cristais é apresentada na Figura 4.5. Na Figura 4.5 (a) temos o pó E-HA em forma de agulhas, com comprimento na faixa 20-150 nm, enquanto que, na Figura 4.5 (b) podem ser observadas partículas mais grosseiras do pó de CD-HA.

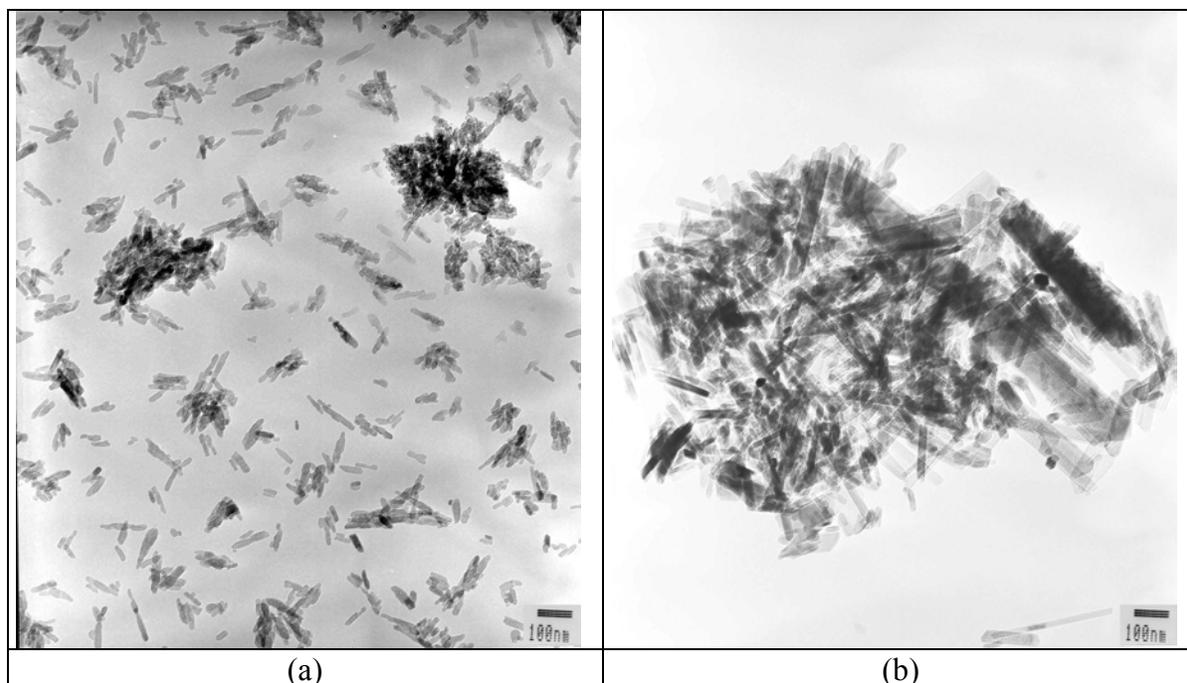


Figura 4.5 – Imagens dos cristais do pó de partida não calcinado:
(a) E-HA e (b) CD-HA. (MET 50000 X)

4.2 – Pastilhas Densas

Assim como verificado no pó calcinado das hidroxiapatitas, nas pastilhas densas também ocorreu a decomposição das hidroxiapatitas em fosfato tricálcico (TCP), nas formas alotrópicas α e β , quando calcinadas em 1000 e 1150^oC. A forma α predomina nas amostras E-HA, enquanto que, a forma β nas amostras CD-HA.

Os padrões de DRX estão mostrados nas Figuras 4.6 e 4.7, e a porcentagem das fases identificadas e o tamanho médio do cristalito na Tabela 4.4.

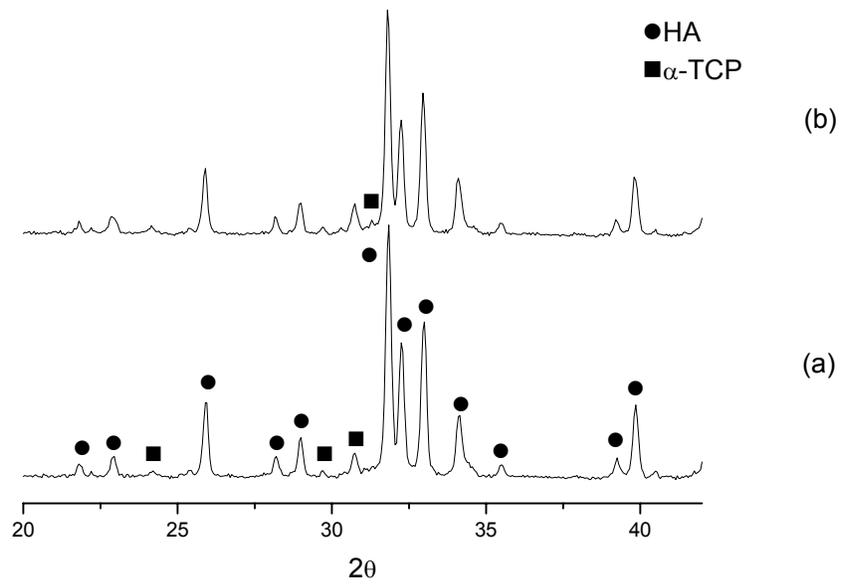


Figura 4.6 - Padrões de DRX das pastilhas densas E-HA: (a) Calcinada a 1000°C e (b) Calcinada a 1150°C .

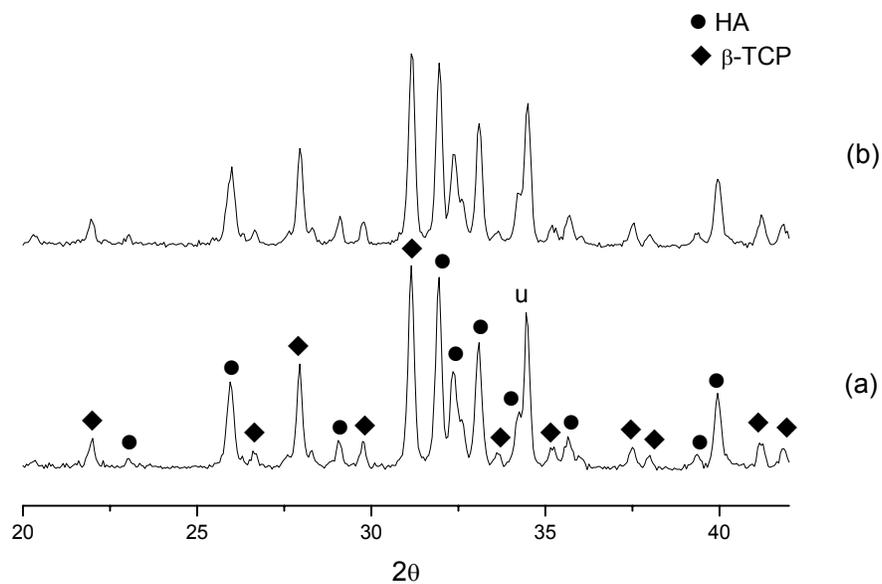


Figura 4.7 - Padrões de DRX das pastilhas densas CD-HA: (a) Calcinada a 1000°C e (b) Calcinada a 1150°C .

Tabela 4.4 - Porcentagens das fases identificadas nos padrões de DRX das pastilhas densas com tamanho de cristalito (TC) calculado nas direções (002) e (300) de HA.

Amostra	T (°C)	Fases Presentes (%)						T C (nm)	
		Curva de Calibração			Rietveld			(002)	(300)
		HA	α -TCP	β -TCP	HA	α -TCP	β -TCP		
E-HA	1000	94,0	6,0	--	87,5	12,5	--	37,8	48,0
E-HA	1150	90,0	10,0	--	82,0	18,0	--	42,9	45,3
CD-HA	1000	48,0	--	52,0	45,6	--	54,4	35,5	46,4
CD-HA	1150	48,1	--	51,9	45,0	--	55,0	30,0	48,1

A porosidade (micro) das pastilhas densas observada em MEV é mostrada nas Figuras 4.8 e 4.9. Essas Figuras ilustram respectivamente a microporosidade das pastilhas E-HA e CD-HA observadas na superfície com aumentos de 2000 e 5000 vezes.

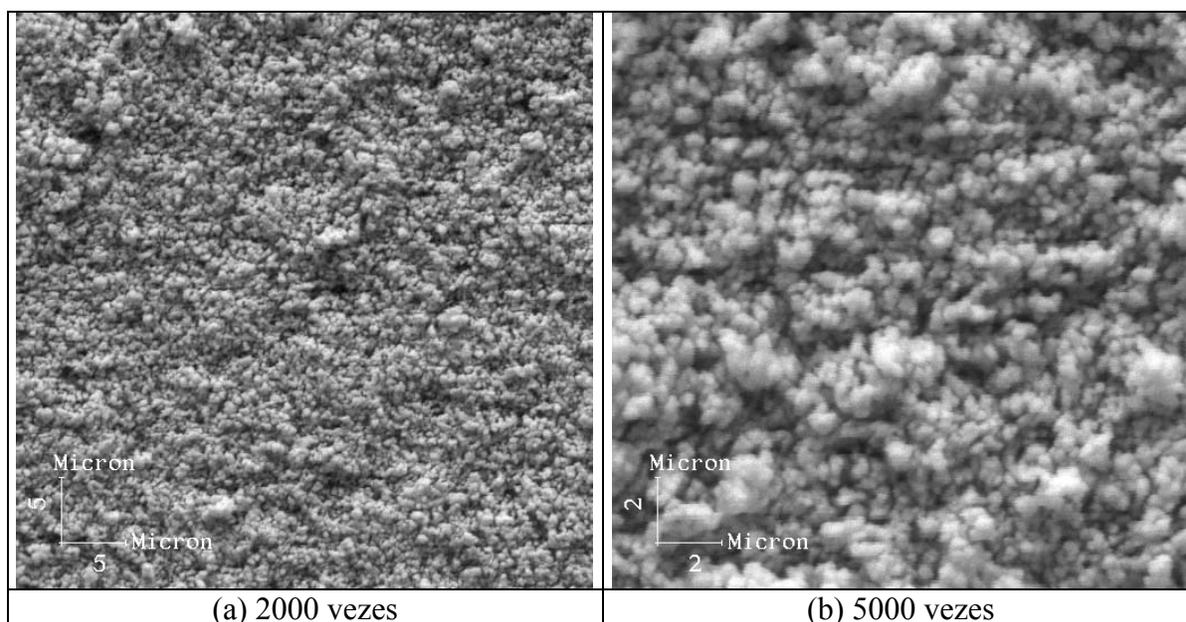


Figura 4.8 - Imagens em MEV da microporosidade observadas na superfície das pastilhas densas E-HA.

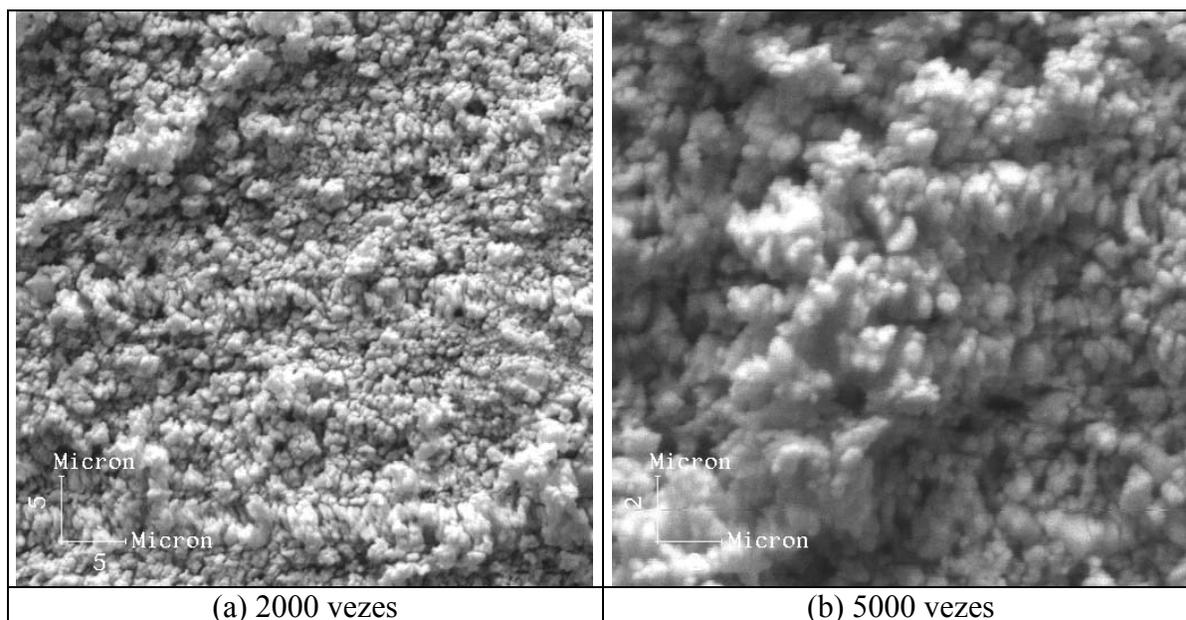


Figura 4.9 – Imagens em MEV da microporosidade observadas na superfície das pastilhas densas CD-HA.

A porosidade das pastilhas densas calculada como porcentagem da densidade teórica da HA pura ($3,156 \text{ g/cm}^3$) ou da mistura HA e TCP ($3,113 \text{ g/cm}^3$) é apresentada na Tabela 4.5 a seguir. Com o aumento de temperatura há uma maior densificação das pastilhas, com conseqüente diminuição da porosidade.

Tabela 4.5 – Porosidade (micro) das pastilhas densas medida pela densidade teórica da HA pura ou do binário HA + TCP.

Amostra	Temperatura (°C)	Densidade Relativa (%)	Porosidade (%)
E-HA	1000	$55,7 \pm 0,5$	$44,2 \pm 0,5$
E-HA	1150	$67,9 \pm 1,0$	$32,0 \pm 0,9$
CD-HA	1000	$57,4 \pm 0,8$	$42,5 \pm 1,1$
CD-HA	1150	$69,8 \pm 0,6$	$30,2 \pm 0,5$

4.3 – Pastilhas Porosas

A análise por DRX mostrou que as pastilhas porosas também foram parcialmente transformadas em fosfato tricálcico, similarmente ao observado com o pó calcinado e as pastilhas densas. A hidroxiapatita estequiométrica (E-HA) se decompõe em α -TCP, enquanto que, a hidroxiapatita deficiente em cálcio em β -TCP. As Figuras 4.10 a 4.13 apresentam os respectivos padrões de DRX das pastilhas porosas E-HA e CD-HA calcinadas a 1000 e 1150^oC. Para efeito comparativo, em cada figura é apresentado o padrão de DRX do pó calcinado nas mesmas temperaturas. As porcentagens das fases identificadas nas oito condições empregadas pelo planejamento de experimentos estão resumidamente mostradas na Tabela 4.6.

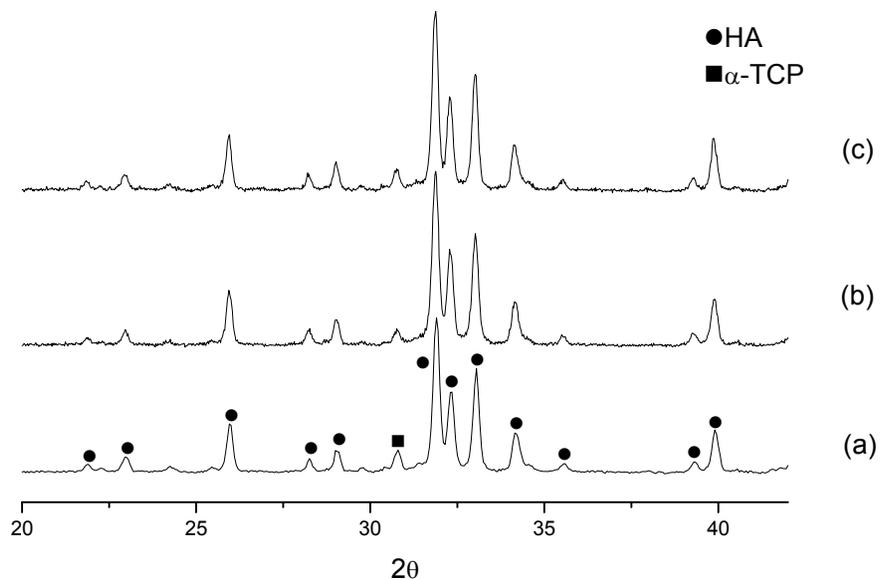


Figura 4.10 - Padrões de DRX de E-HA a 1000^oC: (a) pó calcinado; (b) pastilha porosa calcinada com 20% naftaleno e (c) pastilha porosa calcinada com 40% naftaleno.

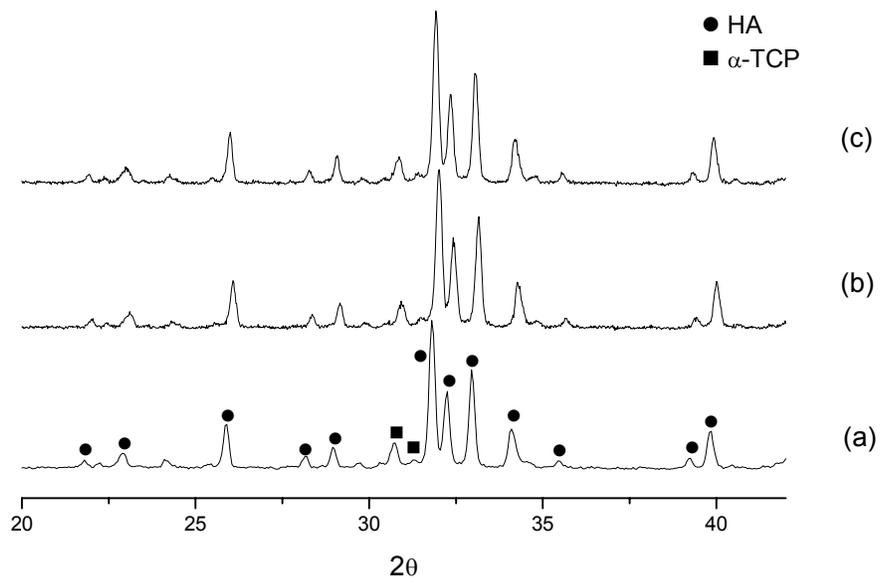


Figura 4.11 - Padrões de DRX de E-HA a 1150⁰C: (a) pó calcinado; (b) pastilha porosa calcinada com 20% naftaleno e (c) pastilha porosa calcinada com 40% naftaleno.

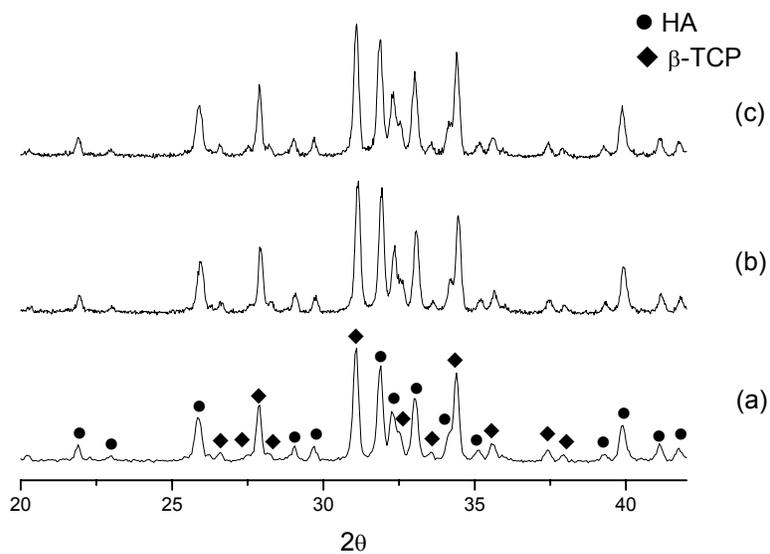


Figura 4.12 - Padrões de DRX de CD-HA a 1000⁰C: (a) pó calcinado; (b) pastilha porosa calcinada com 20% naftaleno e (c) pastilha porosa calcinada com 40% naftaleno.

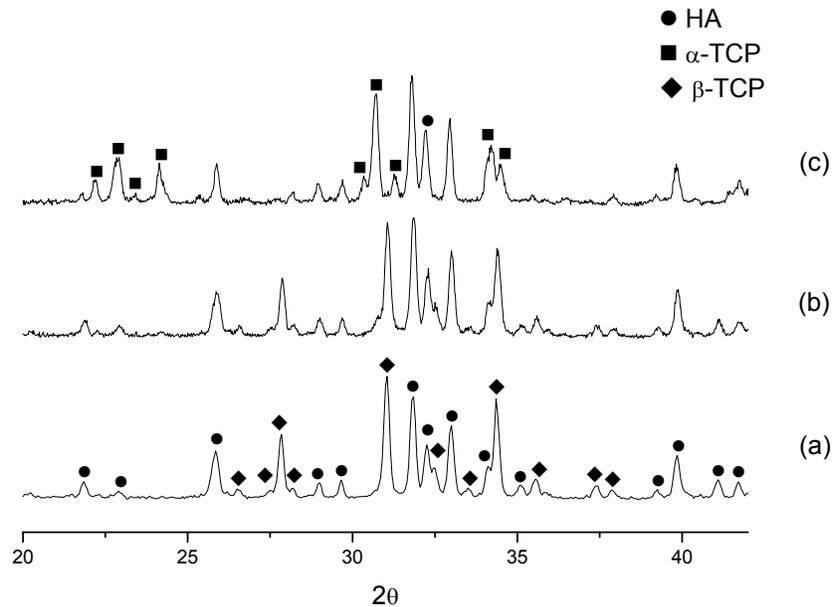


Figura 4.13 - Padrões de DRX de CD-HA a 1150⁰C: (a) pó calcinado; (b) pastilha porosa calcinada com 20% naftaleno e (c) pastilha porosa calcinada com 40% naftaleno.

Tabela 4.6 - Porcentagens das fases identificadas nos padrões de DRX das pastilhas porosas com tamanho de cristalito (TC) calculado nas direções (002) e (300) de HA.

Amostra	Fases Presentes (%)						T C (nm)	
	Curva de Calibração			Rietveld			(002)	(300)
	HA	α-TCP	β-TCP	HA	α-TCP	β-TCP		
CD-HA-20-1000	48,0	--	52,0	45,3	--	54,7	40,5	37,6
E-HA-20-1000	93,7	6,3	--	89,5	10,5	--	39,6	40,4
CD-HA-20-1150	49,7	*	50,3	45,1	6,5	48,4	36,8	39,1
E-HA-20-1150	87,7	12,3	--	81,3	18,7	--	43,0	43,3
CD-HA-40-1000	46,5	--	53,5	45,2	--	54,8	61,0	37,3
E-HA-40-1000	92,0	8,0	--	85,9	14,1	--	43,7	43,9
CD-HA-40-1150	53,0	47,0	--	44,5	55,5	--	48,8	45,3
E-HA-40-1150	88,3	11,7	--	80,7	19,3	--	47,7	47,8

* foram identificados traços de α-TCP não considerados para a quantificação

A correlação entre os resultados de quantificação de fases pelo método de Rietveld e as variáveis do planejamento fatorial pode ser melhor entendida com a observação da Figura 4.14. Essa Figura representa os fatores estudados e seus níveis (-) e (+). Cada vértice do cubo representa uma experiência do planejamento. Os valores encontrados para as respostas estudadas (HA, α -TCP e β -TCP) aparecem na seguinte ordem: HA, α -TCP e β -TCP. O símbolo (-) significa fase não encontrada.

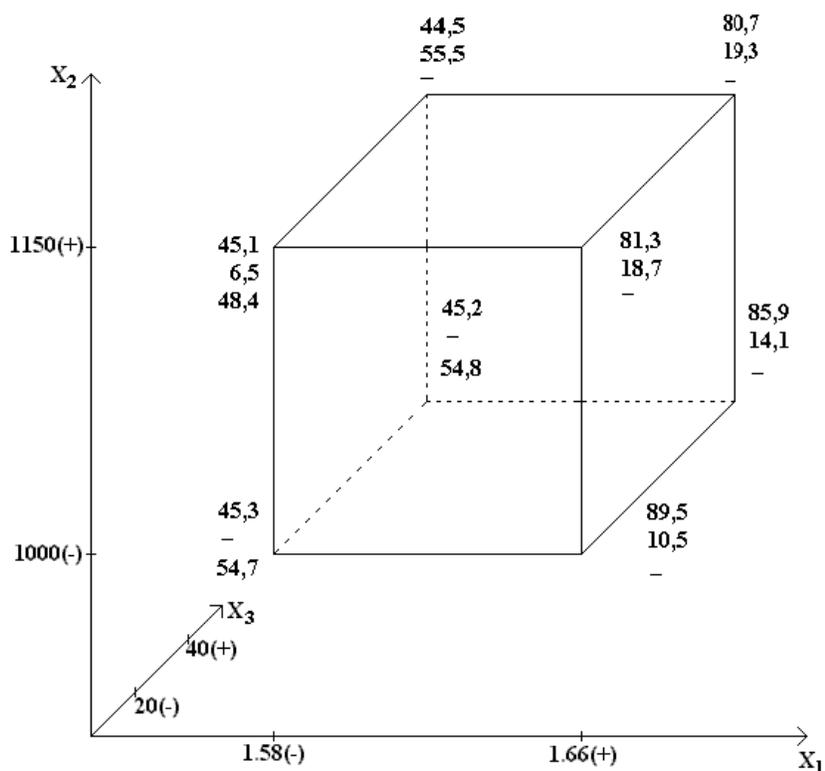


Figura 4.14 – Representação gráfica para a porcentagem de fases medida pelo método de Rietveld das experiências executadas de acordo com o planejamento de experimento. X1, X2 e X3 são respectivamente: razão Ca/P, temperatura de calcinação e porcentagem de naftaleno.

A análise dos efeitos nos coeficientes do modelo proposto do planejamento fatorial com dois níveis (conforme definido no capítulo 3), para a resposta da porcentagem de HA obtida pelo

método de Rietveld é apresentada na Tabela 4.7 a seguir. Essa Tabela mostra os efeitos principais e interações.

Tabela 4.7 – Principais efeitos e interações na resposta HA.

EXP	I	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	HA (%)
1	+	-	-	-	+	+	+	-	45,3
2	+	+	-	-	-	-	+	+	89,5
3	+	-	+	-	-	+	-	+	45,1
4	+	+	+	-	+	-	-	-	81,3
5	+	-	-	+	+	-	-	+	45,2
6	+	+	-	+	-	+	-	-	85,9
7	+	-	+	+	-	-	+	-	44,5
8	+	+	+	+	+	+	+	+	80,7
Efeito	64,68	39,325	3,575	1,225	-3,125	0,125	0,625	0,875	

Os efeitos foram calculados pela equação:

$$\text{Efeito} = (\sum \text{respostas para nível (+)} - \sum \text{respostas para o nível (-)}) / r^{k-1} \quad (4.1)$$

onde K representa o número de variáveis e r o número de níveis. Neste caso K=3 e r=2.

Os resultados da análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EIV) das pastilhas porosas estão apresentados nas Figuras 4.15 a 4.18 da seguinte forma: cada Figura mostra os espectros de IV das amostras E-HA e CD-HA com a porcentagem do agente formador de poros e a temperatura em que foi realizada a calcinação.

Nos espectros de E-HA a 1000⁰C, com 20 e 40% de naftaleno, Figura 4.15, são observados os picos de HA em 640 e 3575 cm⁻¹ correspondente ao grupo de OH⁻ e 1994, 2079 e 2194 cm⁻¹; banda em 1650 cm⁻¹ indicando a presença da ligação O-H. Observamos também os picos na faixa de 1392-1545 cm⁻¹ do grupo carbonato nos sítios A e B e outro pico em

875 cm^{-1} do carbonato no sítio A. Outros picos correspondentes ao grupo fosfato são observadas em: 1060, 1104, 1139, 1162 e 1208 cm^{-1} ; picos do pirofosfato de cálcio ($\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), 475, 573, 602, 960, 1036, 1044, 1092, e 1104 cm^{-1} ; picos da HA, 960, 1060, 1104, 1139 e 1208 cm^{-1} ; picos correspondentes ao fosfato tricálcico, TCP ($\alpha\text{-Ca}_3\text{PO}_4$).

Nos espectros de E-HA a 1150 $^{\circ}\text{C}$, com 20 e 40% de naftaleno, Figura 4.16, as bandas identificadas foram semelhantes às bandas observadas na Figura 4.15.

Nos espectros CD-HA a 1000 $^{\circ}\text{C}$, com 20 e 40% de naftaleno, Figura 4.17, são observados os picos de HA em 631 e 3572 cm^{-1} correspondente ao grupo de OH^- e 1997, 2076 e 2150 cm^{-1} . Observamos também as bandas na faixa de 1416-1488 cm^{-1} do grupo carbonato nos sítios A e B. Outros picos correspondentes ao grupo fosfato são observados em: 433, 604, 948, 971, 1042, 1102 e 1120 cm^{-1} ; picos do TCP ($\beta\text{-Ca}_3\text{PO}_4$); 473, 562, 574, 604, 962, 1042 e 1095 cm^{-1} ; picos de HA; 971, 1065 e 1200 cm^{-1} ; picos do pirofosfato de cálcio ($\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$); 447, 962 e 1200 cm^{-1} ; picos do TCP ($\alpha\text{-Ca}_3\text{PO}_4$).

Nos espectros de CD-HA a 1150 $^{\circ}\text{C}$, com 20 e 40% de naftaleno, Figura 4.18, as bandas identificadas foram semelhantes às bandas observadas na Figura 4.17. Os picos identificados nos espectros de IV das pastilhas porosas estão resumidamente mostrados na Tabela 4.8.

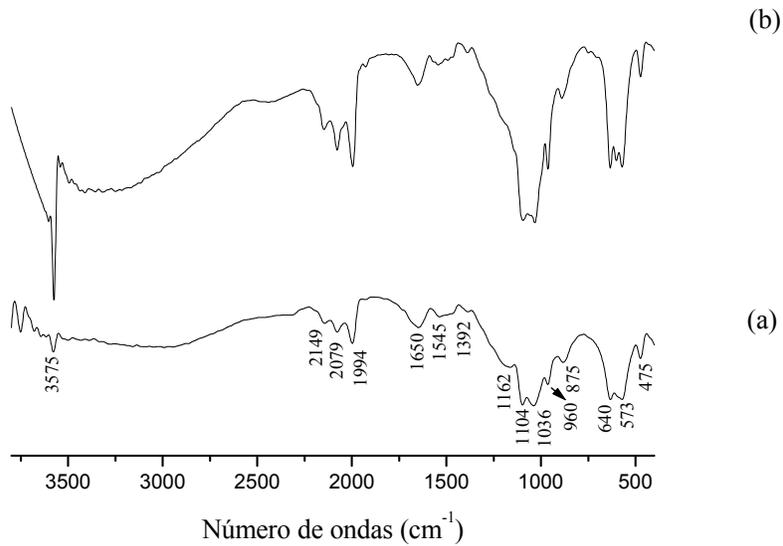


Figura 4.15 – Espectros de IV das pastilhas porosas E-HA calcinadas a 1000°C :
 (a) com 20% de naftaleno e (b) com 40% de naftaleno.

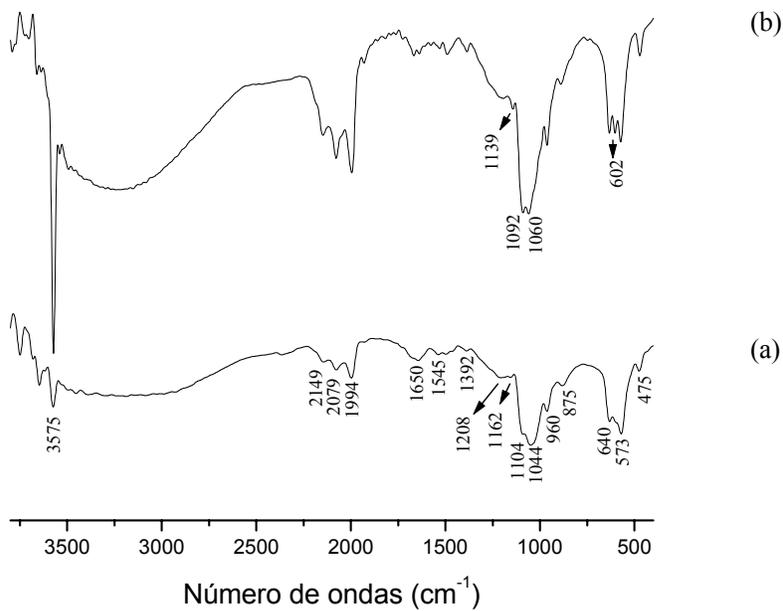


Figura 4.16 – Espectros de IV das pastilhas porosa E-HA calcinadas a 1150°C :
 (a) com 20% de naftaleno e (b) com 40% de naftaleno.

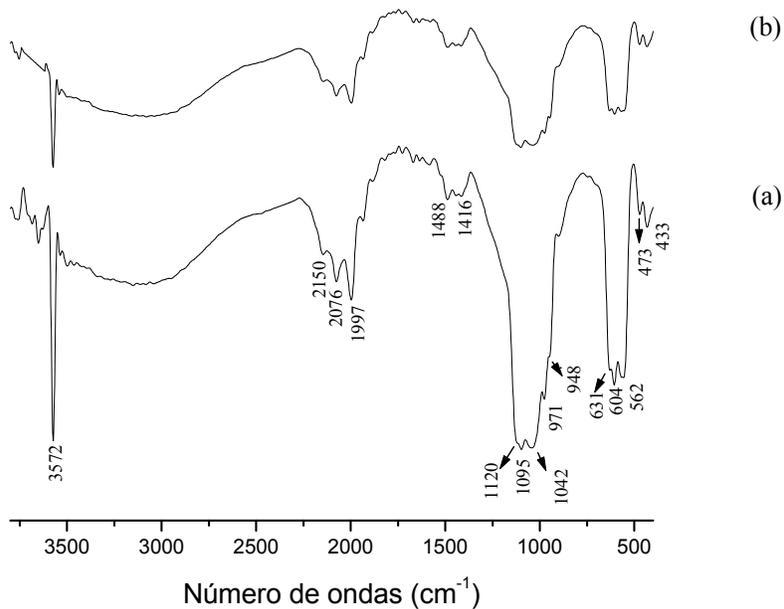


Figura 4.17 – Espectros de IV das pastilhas porosas CD-HA calcinadas a 1000^oC:
 (a) com 20% de naftaleno e (b) com 40% de naftaleno.

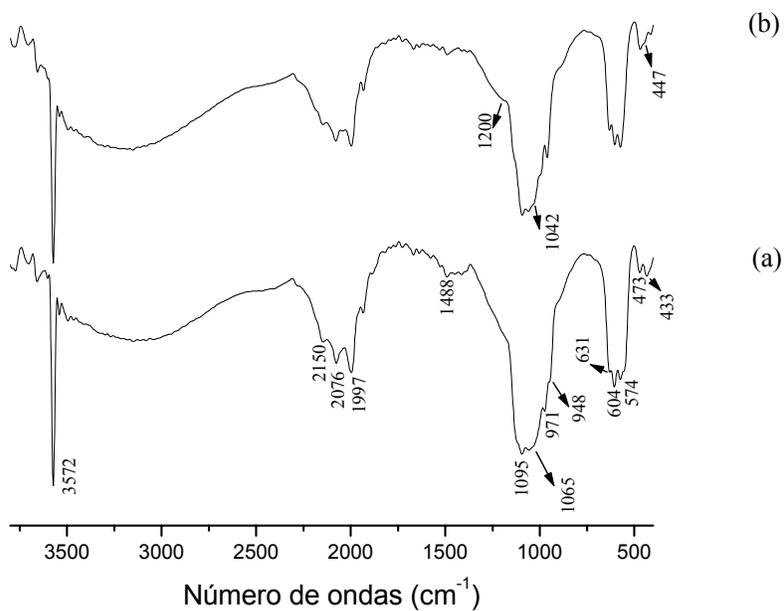


Figura 4.18 – Espectros de IV das pastilhas porosas CD-HA calcinadas a 1150^oC:
 (a) com 20% de naftaleno e (b) com 40% de naftaleno.

Tabela 4.8 – Picos identificados nos espectros IV das pastilhas porosas E-HA e CD-HA calcinadas a 1000 e 1150⁰C.

E-HA, picos (cm⁻¹)	Grupamento ou Fases
3575, 640	OH ⁻
2149, 2079, 1994	HA
1650	ligação O-H
1545-1392, 875	CO ₃ ²⁻
1208, 1139, 1162, 1104, 1060	β-Ca ₂ P ₂ O ₇
1104, 1092, 1044, 1036, 960, 602, 573, 475	PO ₄ ³⁻ (HA)
1208, 1139, 1104, 1060, 960	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂
CD-HA, picos (cm⁻¹)	Grupamento ou Fases
3572, 631	OH ⁻
2150, 2076, 1997	HA
1488-1416	CO ₃ ²⁻
1120, 1102, 1042, 971, 948, 604, 433	β- Ca ₃ (PO ₄) ₂
1200, 1065, 971	β-Ca ₂ P ₂ O ₇
1200, 962, 447	α- Ca ₃ (PO ₄) ₂
1095, 1042, 962, 604, 574, 562, 473	PO ₄ ³⁻ (HA)

Para análise por MET duas pastilhas porosas E-HA e CD-HA com 40% de naftaleno calcinadas a 1000⁰C foram trituradas e montadas numa grade de cobre. A Figura 4.19 mostra a morfologia das fases α e β obtidas pela decomposição das hidroxiapatitas em decorrência do processo de calcinação.

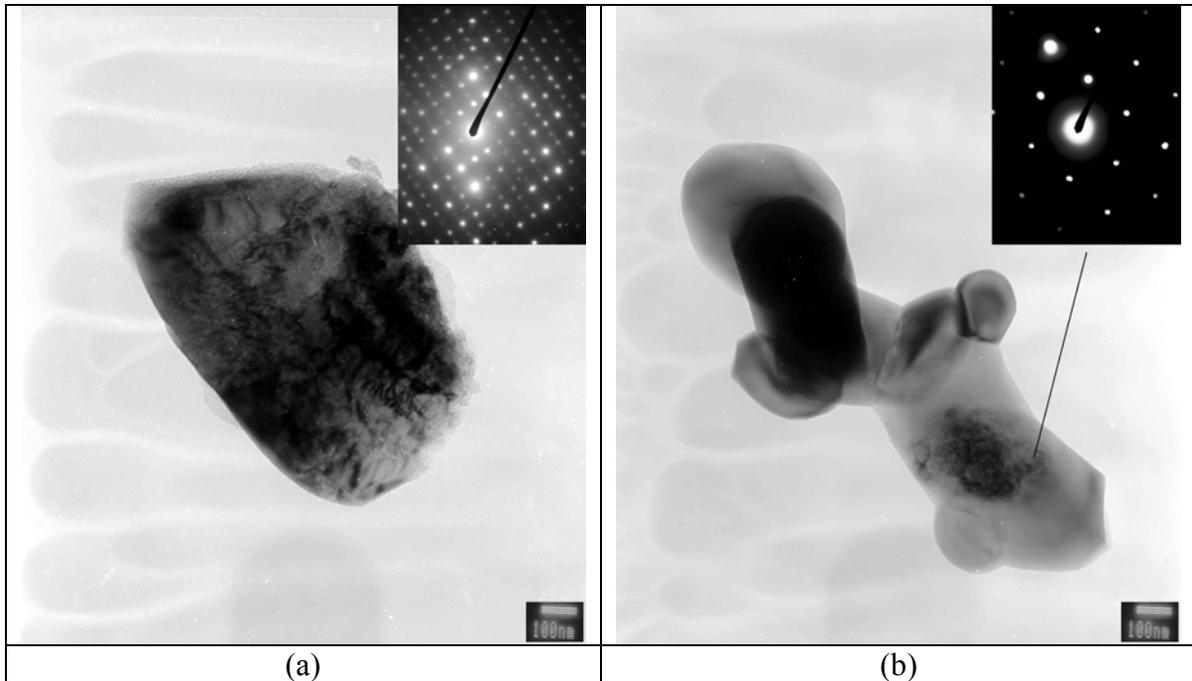


Figura 4.19 – Imagens em MET da morfologia das fases formadas nas pastilhas porosas com 40% de naftaleno calcinadas a 1000⁰C e respectivas figuras de difração: (a) Fase α -TCP (E-HA) e (b) Fase β -TCP (CD-HA). (50000X)

A caracterização da porosidade das pastilhas porosas, por meio de imagens obtidas em MEV é mostrada nas Figuras 4.20 a 4.27. Pode-se observar a variação no tamanho e forma de poros na superfície e na seção transversal das amostras E-HA e CD-HA, com a seção transversal apresentando poros de forma elipsoidal. Também se pode observar a tendência ao aumento na quantidade de poros com o aumento no teor de naftaleno e com a redução na temperatura de calcinação. Além de macroporos, as pastilhas porosas apresentam microporos, na superfície e em sua seção transversal, como ilustrado na Figura 4.28.

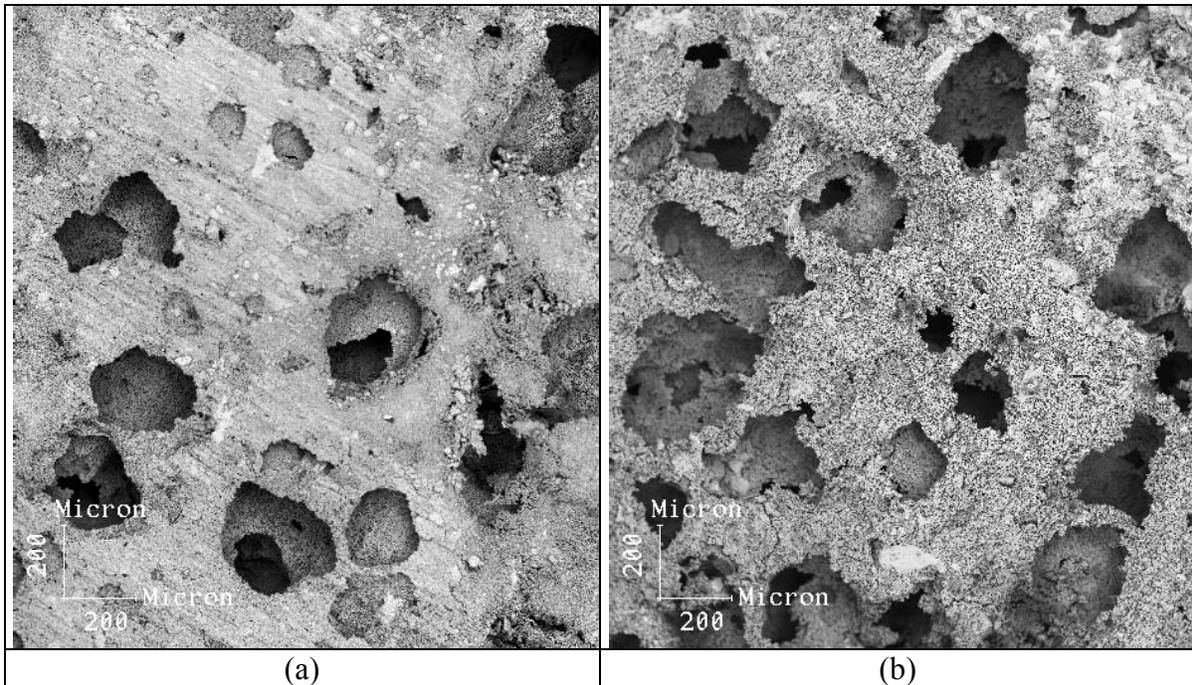


Figura 4.20 – Imagens da superfície das pastilhas porosas E-HA calcinadas a 1000⁰C:

(a) 20% naftaleno e (b) 40% naftaleno. (MEV 50X)

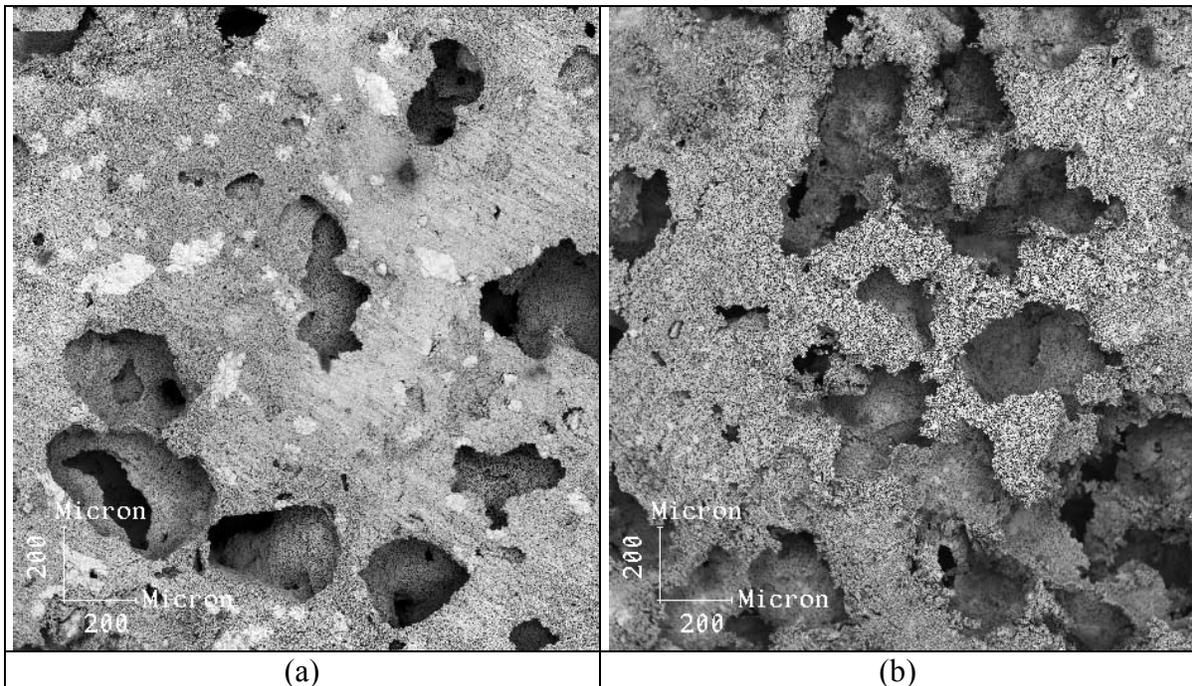


Figura 4.21 - Imagens da superfície das pastilhas porosas E-HA calcinadas a 1150⁰C:

(a) 20% naftaleno e (b) 40% naftaleno. (MEV 50X)

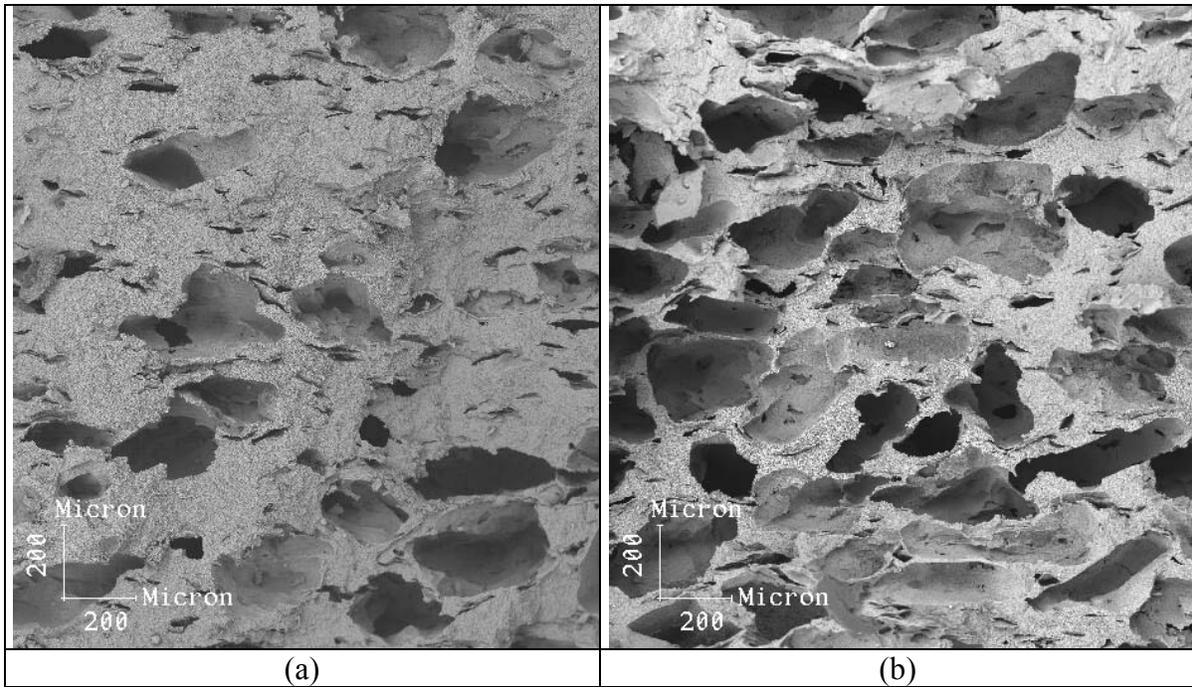


Figura 4.22 - Imagens da seção transversal das pastilhas porosas E-HA calcinadas a 1000°C :
(a) 20% naftaleno e (b) 40% naftaleno. (MEV 50X)

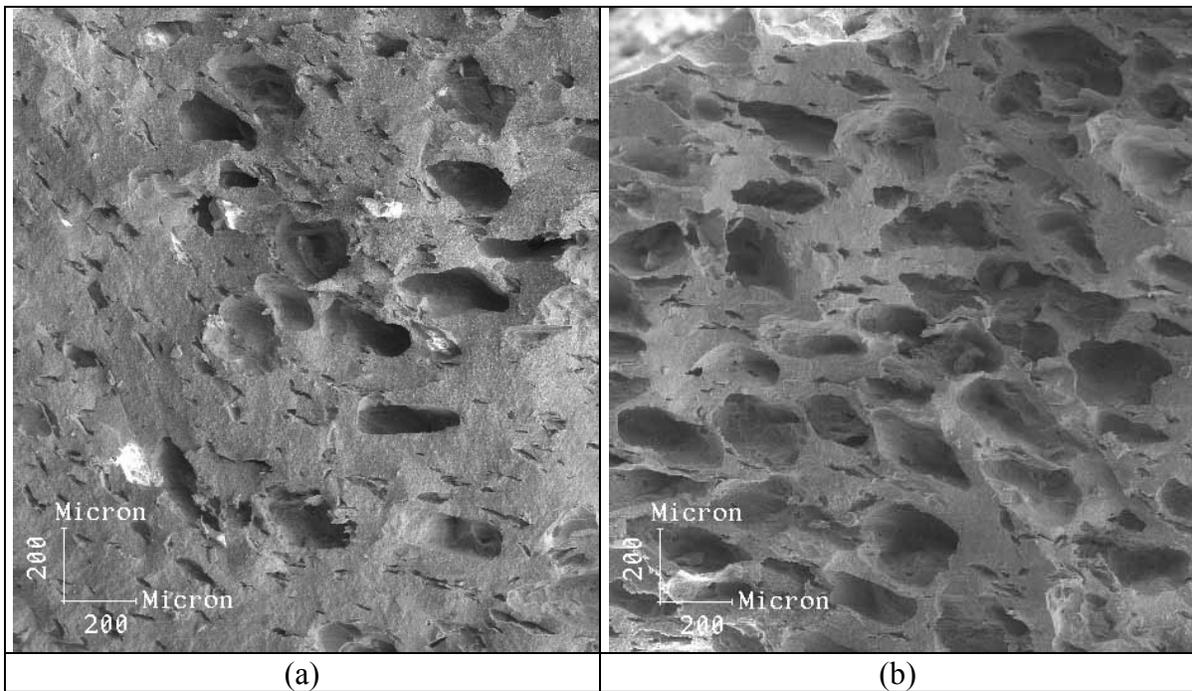


Figura 4.23 - Imagens da seção transversal das pastilhas porosas E-HA calcinadas a 1150°C :
(a) 20% naftaleno e (b) 40% naftaleno. (MEV 50X)

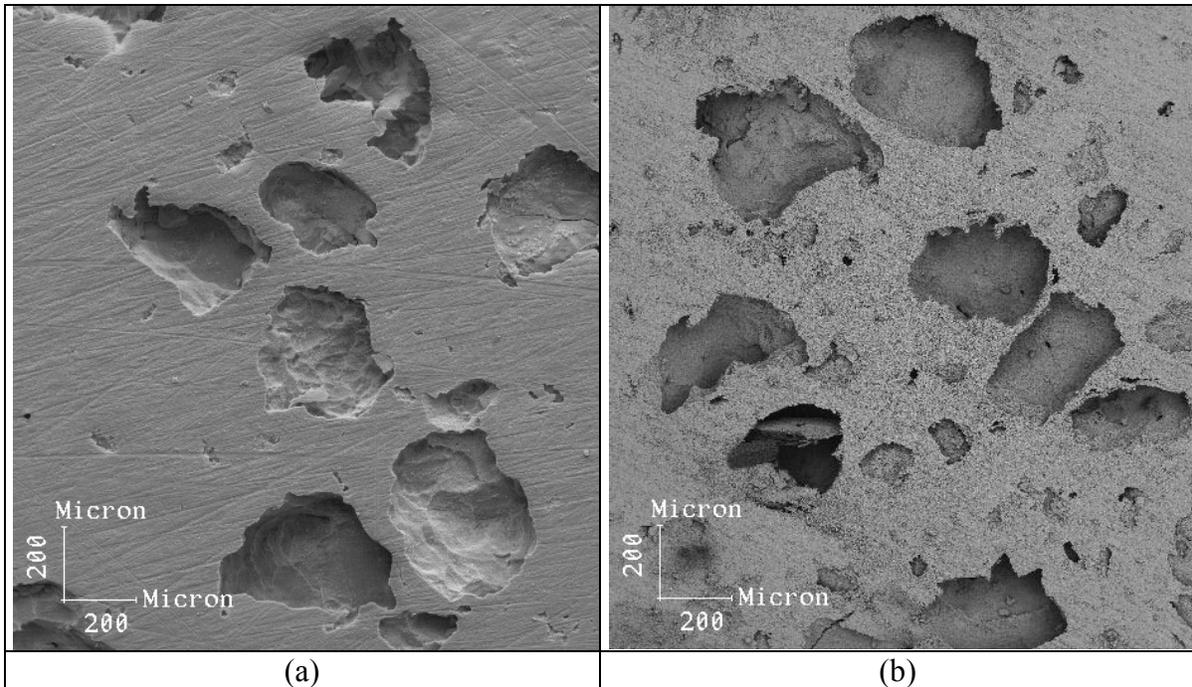


Figura 4.24 – Imagens da superfície das pastilhas porosas CD-HA calcinadas a 1000⁰C:
 (a) 20% naftaleno e (b) 40% naftaleno. (MEV 50X)

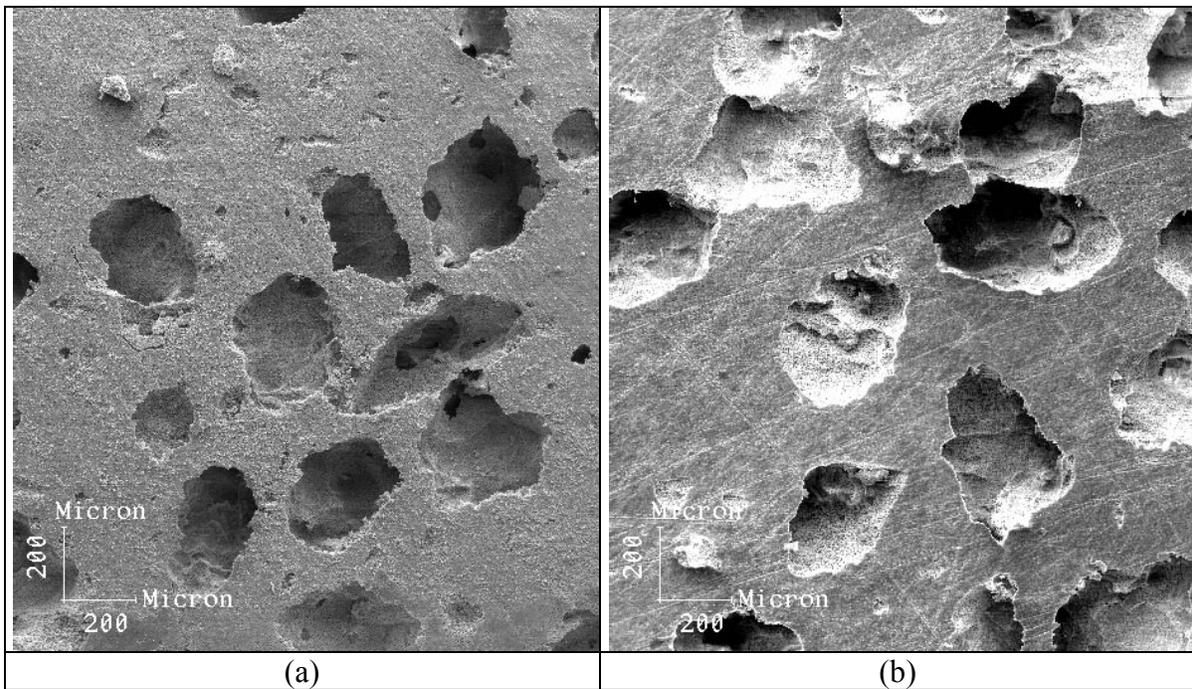


Figura 4.25 - Imagens da superfície das pastilhas porosas CD-HA calcinadas a 1150⁰C:
 (a) 20% naftaleno e (b) 40% naftaleno. (MEV 50X)

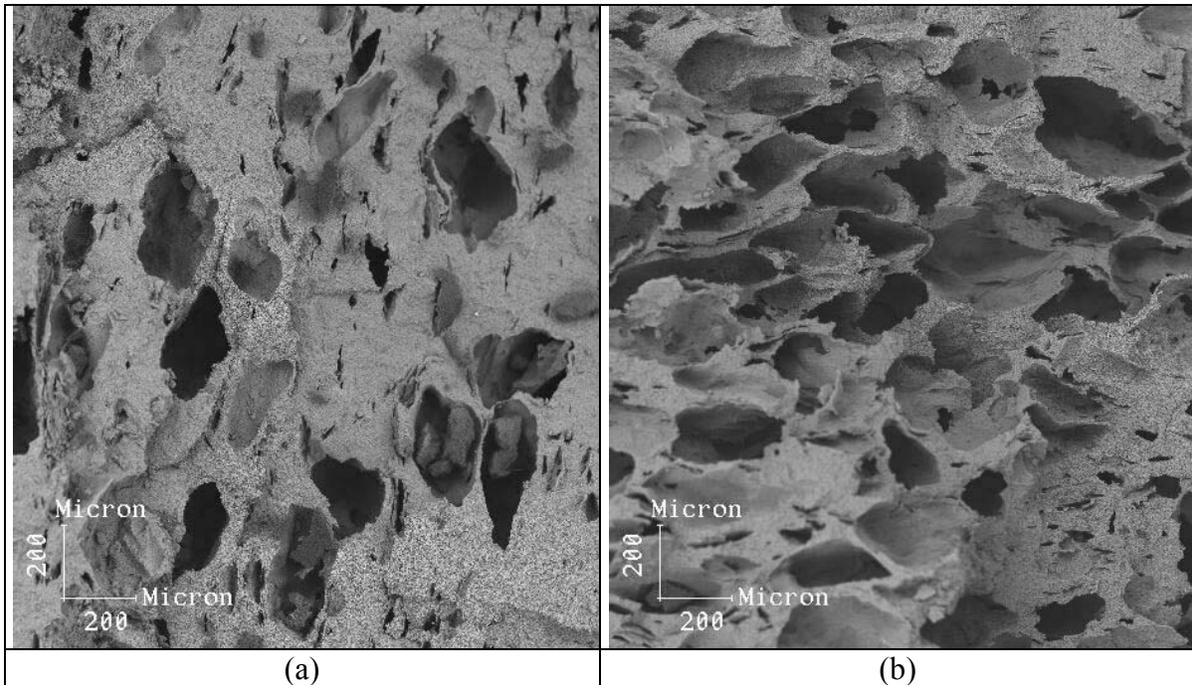


Figura 4.26 - Imagens da seção transversal das pastilhas porosas CD-HA calcinadas a 1000°C : (a) 20% naftaleno e (b) 40% naftaleno. (MEV 50X)

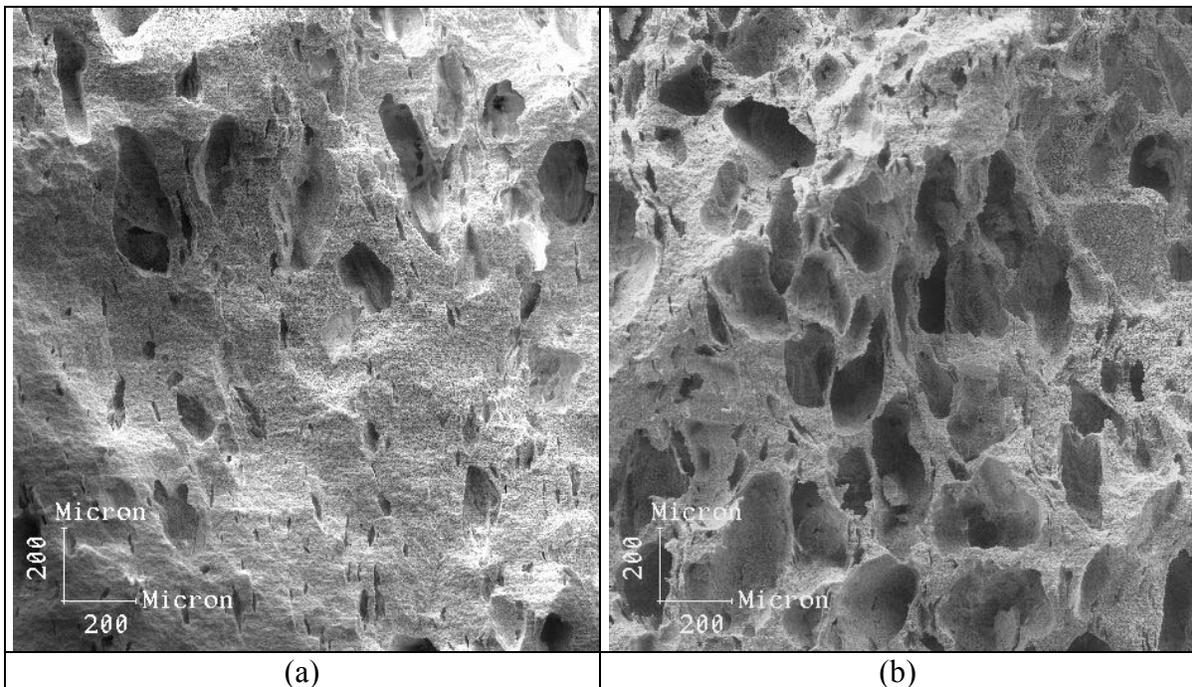


Figura 4.27 - Imagens da seção transversal das pastilhas porosas CD-HA calcinadas a 1150°C : (a) 20% naftaleno e (b) 40% naftaleno. (MEV 50X)

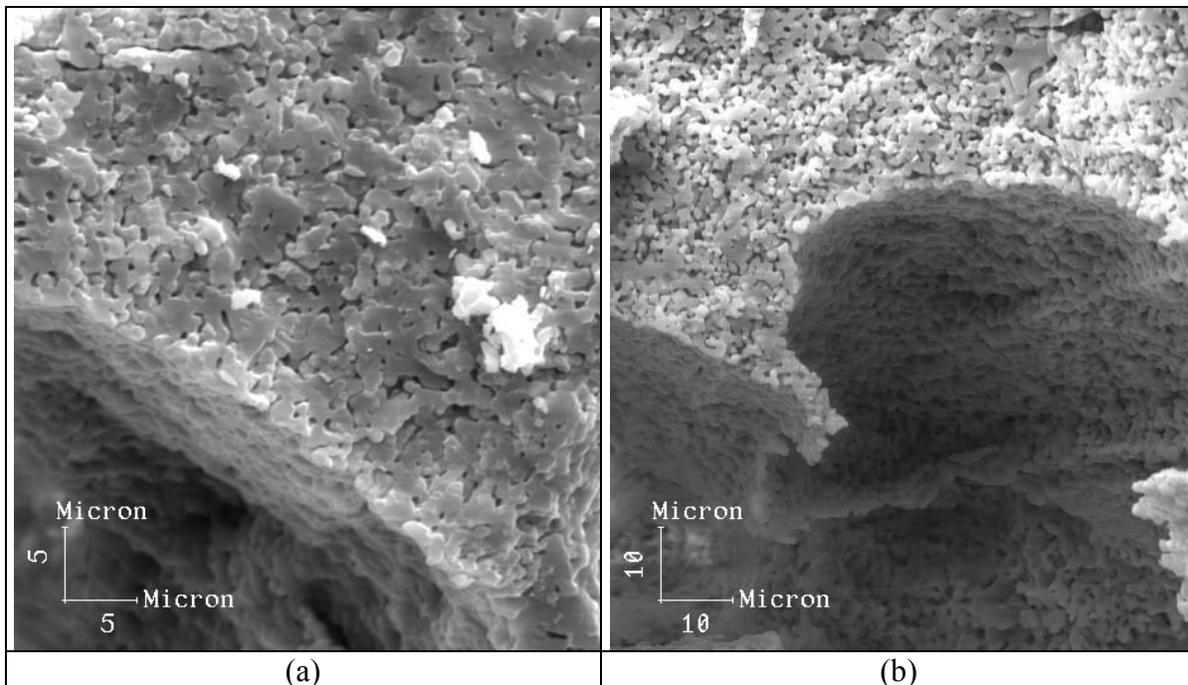


Figura 4.28 - Imagens da microporosidade observada na superfície das pastilhas porosas:

(a) E-HA e (b) CD-HA. (MEV 2000X)

A macroporosidade foi quantificada por análise de imagens verificando-se a distribuição dos tamanhos de poros nas faixas <100; 100-200; 200-300; 300-400; e >400 μm . As Figuras 4.29 e 4.30 mostram a distribuição obtida para as pastilhas E-HA e CD-HA, respectivamente. A quantidade total de macroporosidade se situou na faixa de 20-40%.

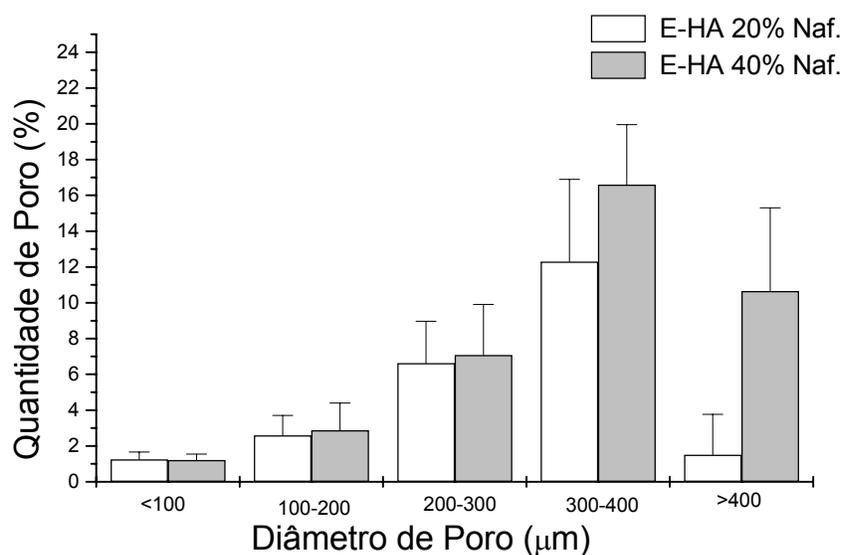


Figura 4.29 - Histograma da distribuição de poros para pastilhas E-HA para temperatura de 1000°C . Porosidade total: 24,2 para 20% naftaleno e 38,4 para 40% naftaleno.

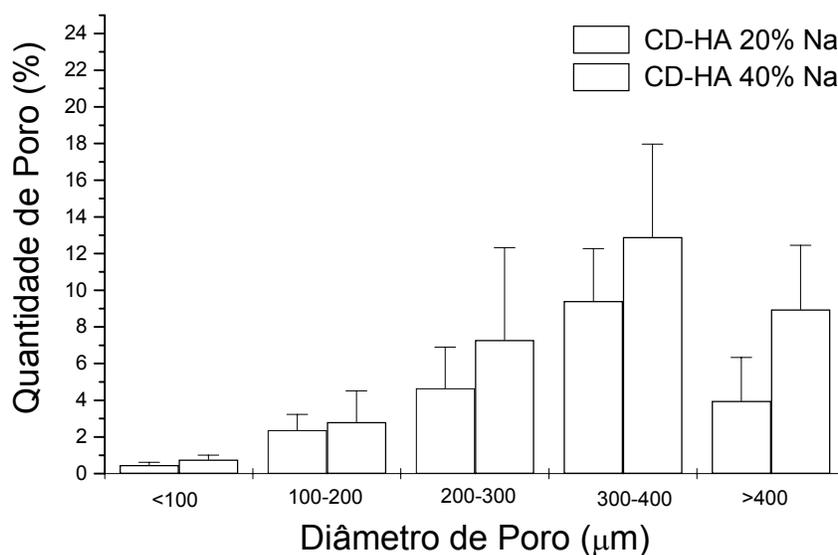


Figura 4.30 - Histograma da distribuição de poros para pastilhas CD-HA para temperatura de 1000°C . Porosidade total: 29,8 para 20% naftaleno e para 40% naftaleno.

As Figuras 4.31 e 4.33 apresentam os histogramas com os valores de porosidade total das pastilhas porosas medida pela expressão $(1 - \delta_r / \delta_t) \times 100$, onde δ_r = densidade real e δ_t é a densidade teórica da HA para a E-HA e CD-HA respectivamente. Nessa medida estão incluídos os poros quantificados por análise de imagens (Figuras 4.29 e 4.30) e os microporos como os mostrados na Figura 4.28.

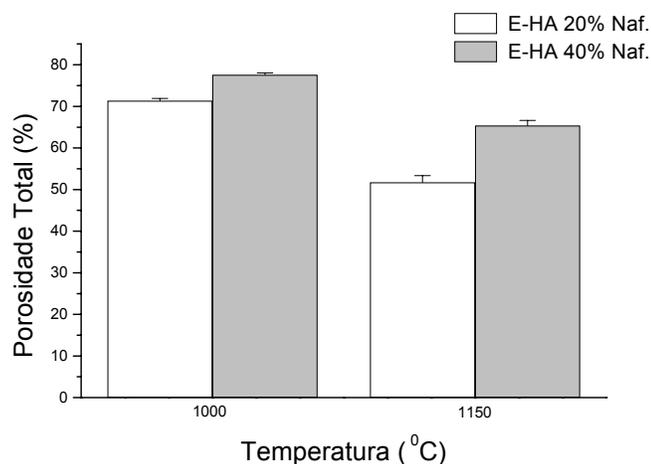


Figura 4.31 - Histograma com os valores de porosidade total para as pastilhas produzidas com E-HA.

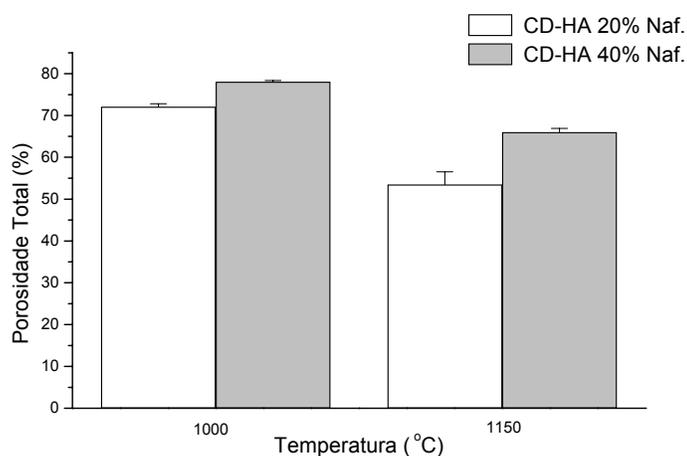


Figura 4.32 - Histograma com os valores de porosidade total para as pastilhas produzidas com CD-HA.

A correlação dos resultados da porosidade total mostrados nas Figuras 4.31 e 4.32 com as variáveis do planejamento fatorial é apresentada na Figura 4.33 a seguir:

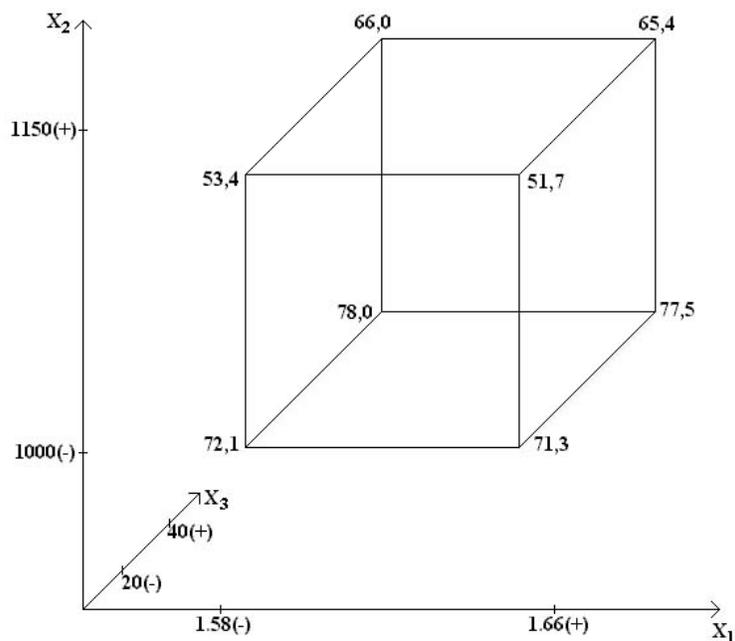


Figura 4.33 - Representação gráfica para a porosidade total (PT) das experiências executadas de acordo com o planejamento de experimento. X₁, X₂ e X₃ são respectivamente: razão Ca/P, temperatura de calcinação e porcentagem de naftaleno.

A análise dos efeitos nos coeficientes do modelo proposto do planejamento fatorial com dois níveis (conforme definido no capítulo 3) para a resposta porosidade total (PT) é apresentada na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Principais efeitos e interações na resposta porosidade total.

EXP	I	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	PT(%)
1	+	-	-	-	+	+	+	-	72,1
2	+	+	-	-	-	-	+	+	71,3
3	+	-	+	-	-	+	-	+	53,4
3	+	+	+	-	+	-	-	-	51,7
5	+	-	-	+	+	-	-	+	78,0
6	+	+	-	+	-	+	-	-	77,5
7	+	-	+	+	-	-	+	-	66,0
8	+	+	+	+	+	+	+	+	65,4
Efeito	66,93	-0,9	-15,9	9,6	-0,25	0,35	3,55	0,2	

4.4 – Experimentos de Degradação e Biológico

Quatro condições de pastilhas porosas obtidas com 40% de naftaleno foram submetidas aos testes de degradação e biológico em SFC. As condições **b**, **c** e **d** são oriundas do planejamento fatorial e a condição **a** para efeito comparativo.

A perda de massa das amostras porosas trituradas e obtidas a partir do teste de degradação em solução TRIS realizado em triplicata pelo período de 120 horas, é apresentada na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Perda de massa (x) das amostras porosas trituradas das quatro condições em solução TRIS.

Condição	Fases (%)	X (%)
a	HA	3,55±0,17
b	85,9 HA +14,1 α -TCP	4,81±0,41
c	45,2 HA +54,8 β - TCP	5,14±0,64
d	44,5 HA + 55,5 α -TCP	3,07±0,67

Os resultados da Tabela 4.10 mostraram que a perda de massa das diferentes amostras foi de 3-5% da massa total do material, quando colocadas em solução TRIS. Portanto, a dissolução não apresentou fortes mudanças frente à variação da temperatura de calcinação e a transformação do sistema monofásico em bifásico. A Tabela 4.10 mostra ainda que o aumento da concentração de TCP na amostras calcinadas a 1000 °C torna o material um pouco mais solúvel. A solubilidade diminui com o aumento da temperatura de calcinação.

Na Tabela 4.11 é apresentado o resultado do ganho de massa do fragmento poroso após a imersão em solução simuladora de fluido corpóreo (SFC) após período de 168 horas. As amostras apresentaram comportamento similar em SFC. Em todos os casos a massa total das amostras aumentou em relação ao seu valor inicial, indicando a precipitação do cálcio na superfície externa e interna do fragmento como é apresentado nas Figuras 4.35 e 4.36.

Tabela 4.11 – Ganho de massa (x) das quatro condições de pastilhas porosas após imersão em SFC por 168 horas.

Condição	Fases (%)	X (%)
a	HA	3,11±0,12
b	85,9 HA +14,1 α -TCP	1,78±0,11
c	45,2 HA +54,8 β - TCP	3,12±0,06
d	44,5 HA + 55,5 α -TCP	2,32±0,07

Os teores de cálcio e fósforo da solução SFC determinados por ICP, após a imersão dos fragmentos porosos no período de 168 horas é mostrado na Tabela 4.12. Os teores de cálcio dos fragmentos **a** e **c**, apresentaram valores similares concordando com os resultados obtidos para o ganho de massa apresentados na Tabela 4.11. Esta concordância não foi verificada para as amostras **b** e **d**. Além disso, não foi verificada uma relação direta entre a massa de precipitado e/ou consumo de cálcio da solução SFC, com a temperatura de calcinação e a composição de fases das amostras.

Outras contradições entre os resultados obtidos podem ser levantadas: o resultado do MEV (Figura 4.35b) mostrou que a amostra da condição **b** apresentou pequena precipitação de fosfato de cálcio. No entanto, adsorveu uma menor quantidade de cálcio em solução de SFC e teve o menor aumento de massa após a dissolução. Estes comentários serão abordados no capítulo de discussão.

Tabela 4.12 –Teores de cálcio e fósforo da solução SFC após a imersão das amostras porosas no período de 168 horas.

Condição	Fases	Cálcio (ppm)	Fósforo (ppm)
Solução (SFC)	--	67,60±2,01	25,00±3,91
a	HA	30,70±0,60	1,57±0,05
b	HA + α -TCP	18,85±0,05	3,01±0,10
c	HA + β - TCP	30,30±0,20	4,21±0,02
d	HA + α -TCP	29,03±0,15	2,03±0,03

A Figura 4.34 ilustra graficamente a variação do pH da solução SFC com o tempo de imersão das amostras das quatro condições usadas no teste em meio biológico. O pH da solução SFC aumentou de 8,15 a 8,40 nas primeiras 50 horas, indicando a ocorrência do processo envolvendo o consumo de íons da solução. Após este estágio o pH caiu para

valores na faixa de 7,85-7,70. Este comportamento é levemente modificado com a presença dos fragmentos cerâmicos. Observa-se, entretanto, uma tendência à diminuição do pH que pode ser atribuída à acidez natural do sistema cerâmico. As amostras da condição **b** foram as que mais ocasionaram queda de pH.

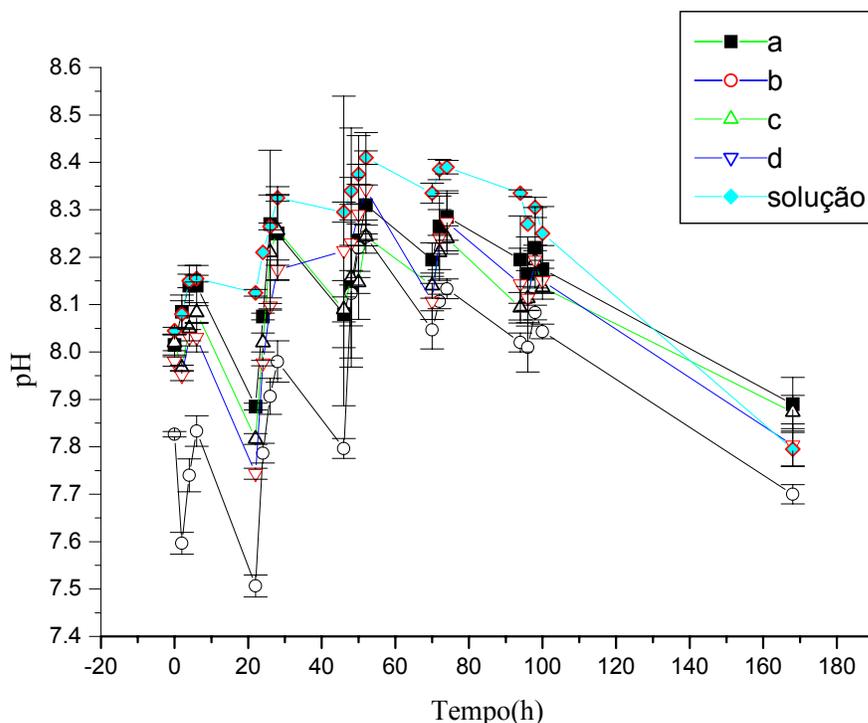


Figura 4.34 – Comportamento do pH da solução SFC com o tempo de imersão das amostras usadas nas quatro condições.

Nas Figuras 4.35 e 4.36 são mostradas as micrografias das amostras porosas, observadas em MEV após a imersão em solução simuladora de fluido corpóreo (SFC) por 168 horas. Nessas micrografias é observada a morfologia dos precipitados de fosfato de cálcio formados a partir da solução SFC na superfície das amostras porosas.

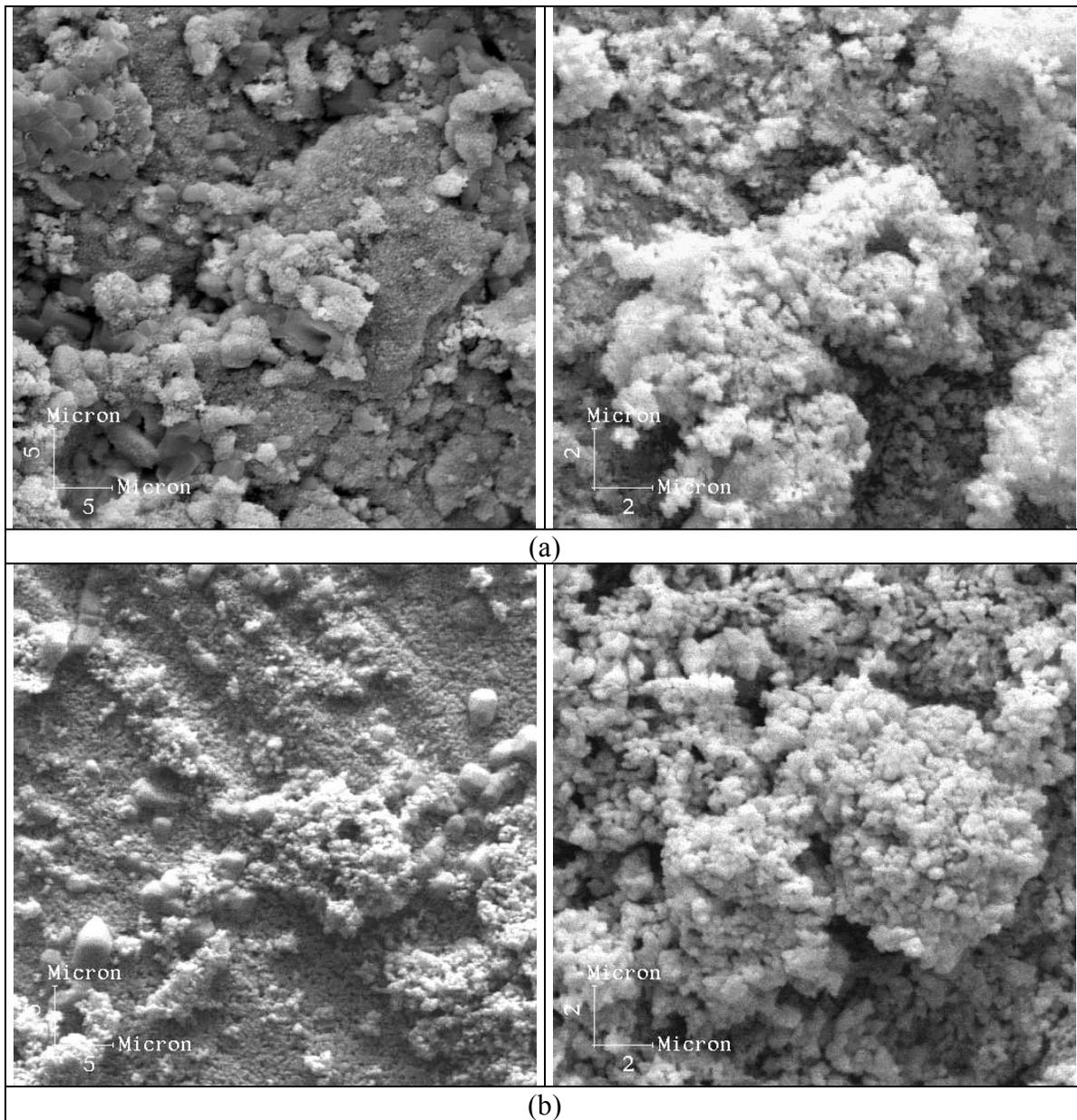


Figura 4.35 – Micrografias das amostras porosas com precipitados de cálcio formados na superfície após a imersão em SFC por um período de 168 horas: (a) condição **a** e (b) condição **b** (MEV 2000 e 5000X).

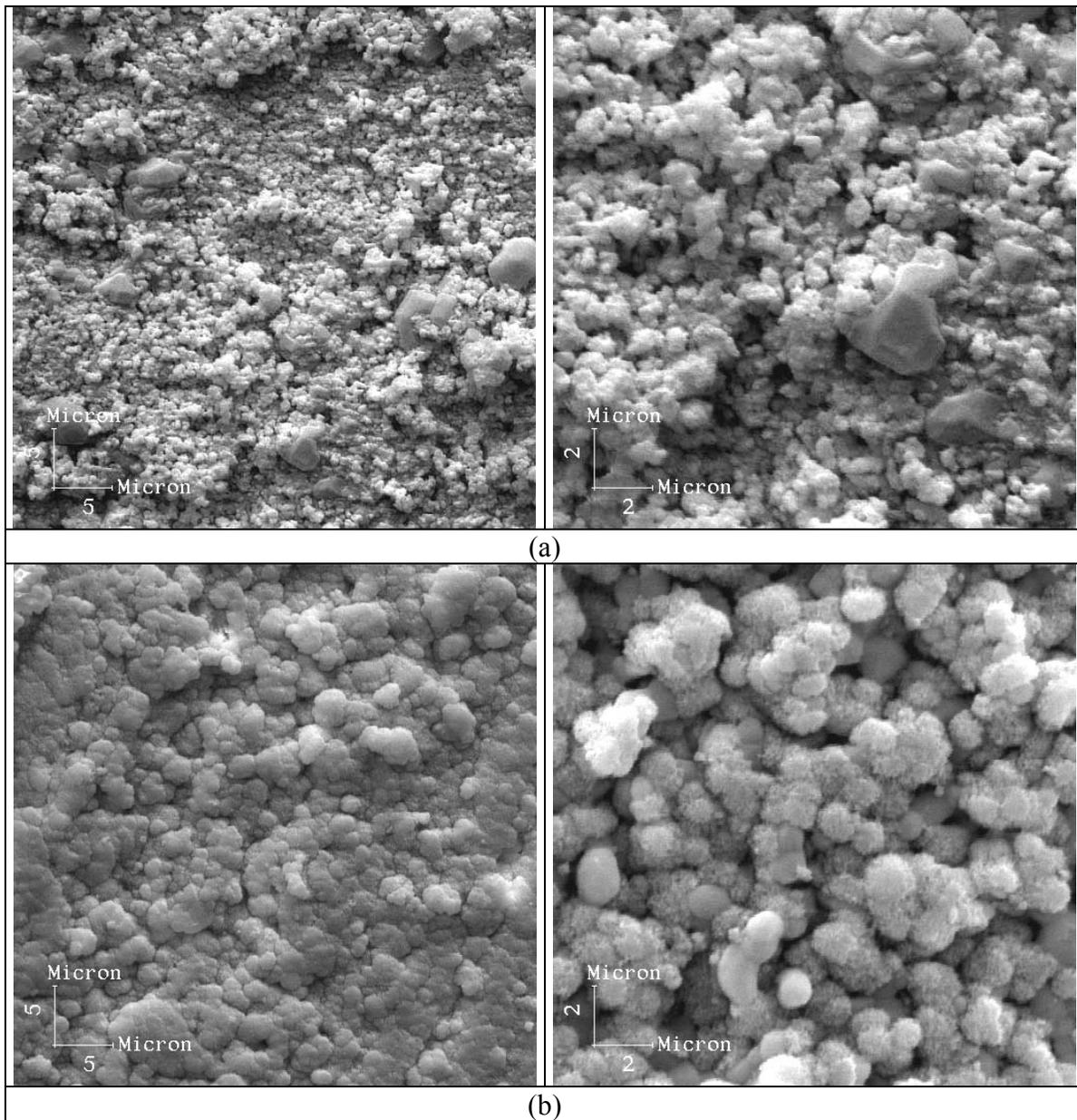


Figura 4.36 – Micrografias das amostras porosas com precipitados de cálcio formados na superfície após a imersão em SFC por um período de 168 horas: (a) condição **c** e (b) condição **d** (MEV 2000 e 5000X).

5 – DISCUSSÃO

Primeiramente, são analisados os resultados referentes à calcinação da hidroxiapatita em pó, seguido dos resultados da análise da calcinação da hidroxiapatita na forma de pastilhas densas e porosas. Finalmente, são discutidas as características de degradação e bioatividade das quatro condições de pastilhas porosas (três constantes do planejamento de experimentos utilizado na produção das pastilhas porosas, e uma quarta que após calcinação praticamente não apresentou decomposição de fases).

5.1 – Calcinação dos pós de Hidroxiapatita

Os padrões de DRX, Figuras 4.1 e 4.2 mostraram, respectivamente, que as hidroxiapatitas E-HA e CD-HA na forma de pó se decompuseram parcialmente em fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - TCP) quando calcinadas a 1000 e 1150^oC. A hidroxiapatita estequiométrica (E-HA), de razão atômica Ca/P igual a 1,66 se decompôs em α -TCP, estrutura monoclinica, na faixa de 16-22% com pico de difração principal em $2\theta = 30,735^\circ$. Conforme DUCHEYNE et al. (1993) essa fase é termodinamicamente estável na faixa de temperatura de 1120-1470^oC.

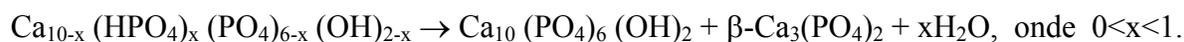
Já segundo os autores PETROV et al. (2001); RAYNAUD et al. (2002) e LEGEROS et al. (1995) essa decomposição pode ser viável de ocorrer em temperaturas na faixa de 1050-1200^oC; e pode ser atribuída a pequenas quantidades de fosfato de cálcio amorfo (FCA) presente na amostra. Conforme PETROV et al. (2001), a mudança observada na composição de fase na faixa de temperatura estudada, também pode estar relacionada com alterações locais na estequiometria da hidroxiapatita e provavelmente na perda de íons.

A hidroxiapatita deficiente em cálcio (CD-HA), de razão atômica Ca/P igual a 1,58 se decompôs em β -TCP na faixa de 54-55% com pico de difração principal em $2\theta = 31,052^\circ$. Há na literatura várias razões para explicar essa transformação. Segundo YOSHIMURA et al. (1998); METSGER et al. (1999) e RODRIGUEZ-LORENZO et al. (2001), a estequiometria das hidroxiapatitas verificada pela razão Ca/P é uma delas, e depende

diretamente do processo de sintetização do pó de HA. Conforme os autores, a razão Ca/P deve ser bem próxima do valor teórico (1,67) para evitar que ocorram transformações. Um outro parâmetro importante é a temperatura de calcinação na qual o material se decompõe.

De acordo com DUCHEYNE et al. (1993) e LEGEROS et al. (1995) a fase β -TCP é termodinamicamente estável em temperaturas inferiores a 1120°C. Essa decomposição também foi observada por RAYNAUD et al. (2002); GIBSON et al. (2000) e DOROZHKIN et al. (2002) na mesma faixa de temperatura de calcinação empregada e, podendo ser consequência de um ou mais dos seguintes fatores: área superficial específica, estequiometria e perfeição cristalográfica. Conforme esses autores, a deficiência em cálcio contribui para a desordem estrutural de CD-HA pela substituição do grupo tetraedro PO_4 pelo grupo planar CO_3 .

De acordo com RAYNAUD et al. (2002), pós de hidroxiapatitas com $1,50 < \text{Ca/P} < 1,67$ se decompõem no sistema fosfato de cálcio bifásico (FCB) β -TCP/HA, quando calcinados na faixa de temperatura de 1000-1200°C por um período de 1-4 horas, segundo a reação global:



Além disso, segundo o autor a reprodutibilidade do sistema FCB, depende fortemente dos parâmetros de síntese: pH, temperatura e razão Ca/P dos reagentes. Devido a sua similaridade química com o osso humano e boa bioresorbabilidade (LEGEROS, 1991; ELLIOT, 1994), o sistema FCB na proporção 50% de HA e 50% β -TCP tem sido bastante usado na medicina como enxerto ósseo.

Para analisarmos o comportamento do tamanho e da morfologia do cristal do pó de HA (partida e calcinado), é apresentado na Tabela 5.1 o tamanho médio do cristalito estimado ao longo das direções: (002) e (300) para HA, (034) e (261) para α -TCP e (0210) e (220) para β -TCP.

Tabela 5.1-Tamanho médio do cristalito (TC) estimado para o pó de HA ao longo das direções: (002) e (300) para HA, (034) e (261) para α -TCP e (0210) e (220) para β -TCP em (nm).

Amostra	(002) HA	(300) HA	(002)/(300) HA	(034) α -TCP	(261) α -TCP	(0210) β -TCP	(220) β -TCP
Pó E-HA	31,3	16,3	1,92	-	-	-	-
calc.1000 ⁰ C	39,3	44,3	0,89	33,2	33,3	-	-
calc.1150 ⁰ C	42,8	46,3	0,92	37,2	31,8	-	-
Pó CD-HA	36,6	24,1	1,52	-	-	-	-
calc. 1000 ⁰ C	54,3	34,5	1,57	-	-	44,9	38,7
calc. 1150 ⁰ C	44,8	39,3	1,14	-	-	46,2	46,5

Na Tabela 5.1 observa-se que ocorreu mudança no tamanho e morfologia do cristalito no pó de E-HA nas duas temperaturas de calcinação, principalmente a 1150° C, onde foi verificado o aumento do tamanho do cristalito nas direções (002) e (300). A razão (002)/(300) diminuiu de 1,92 para 0,92 quando comparado com o pó de partida, indicando uma tendência à esferoidização.

Assim como no pó de E-HA também foram observadas mudanças no tamanho e morfologia do cristalito do pó de CD-HA nas duas temperaturas de calcinação, como mostrado na Tabela 5.1. A 1000⁰C o tamanho de cristalito aumenta nas duas direções (002) e (003) quando comparado com os valores do pó de partida. A razão (002)/(003) é igual a 1,57 e indica uma morfologia do tipo bastonete ou agulhas nas duas direções. A 1150⁰C ocorre uma diminuição na medida da direção (002) e um ligeiro aumento em (003), a razão (002)/(300) diminui em relação à 1000⁰C, isso pode estar indicando que o crescimento do cristal ocorre preferencialmente na direção (300) da HA.

GIBSON et al. (2000) também observaram em seus estudos uma variação no tamanho e morfologia do cristalito da apatita deficiente em cálcio, em função do aumento de temperatura na faixa de 500 a 1100° C. De acordo com YUBAO et al. (1994), essa variação é decorrente da transformação parcial da apatita deficiente em cálcio em β - TCP, dependente principalmente da razão atômica Ca/P.

A análise dos dados apresentados na Tabela 5.1 tem que levar em conta o erro associado e esse tipo de estimativa (não conhecido) e o fato de se estar lidando com valores médios. As Figuras 4.5a e 4.5b com imagens obtidas por MET para os pós não calcinados confirmam a morfologia tipo agulha para esses pós. Entretanto, no caso do pó cálcio deficiente (CD-HA) a micrografia mostra desde partículas esféricas com pouquíssimos nanômetros de diâmetro a bastões ou placas com cerca de 500nm de comprimento.

Mais acentuada ainda é a discrepância entre os valores apresentados na Tabela 5.1 e as imagens da Figura 4.19 para as fases α -TCP e β -TCP, com a primeira mostrando uma única partícula com forma massiva e dimensões da ordem de 600x 900nm.

Nas Figuras 4.3 e 4.4 foram apresentados os respectivos resultados de EIV dos pós E-HA e CD-HA calcinados a 1000 e 1150° C. Modificações foram observadas nas bandas dos grupos funcionais OH⁻, PO₄³⁻ e CO₃²⁻ nessas temperaturas, quando comparadas com os espectros do pó de partida: diminuição na banda larga de H₂O, localizada em torno de 3572 cm⁻¹, desaparecimento dos íons CO₃²⁻ na faixa de 1422-1487 cm⁻¹, diminuição do pico de CO₃²⁻ em 873 cm⁻¹ (E-HA), desaparecimento do pico de água de cristalização na faixa de 1642-1646 cm⁻¹ e eliminação do pico de HPO₄²⁻ em 870 cm⁻¹ (CD-HA). Essas modificações foram também observadas pelos autores PETROV et al. (2001); RAYNAUD et al., (2002) e LEGEROS et al. (1995) quando caracterizando hidroxiapatitas calcinadas na faixa de temperatura de 1050-1200°C.

Teoricamente a pirâmide (de base triangular) de íons PO₄³⁻ tem os seguintes modos vibracionais: ν_1 (estiramento simétrico P-O), ν_2 (ligações OPO duplamente degeneradas), ν_3 (estiramento triplamente degenerados P-O) e ν_4 (ligações OPO triplamente degeneradas). Todos esses modos são ativos no Infravermelho e Raman e as frequências observadas são: ν_1 980 cm⁻¹, ν_2 363 cm⁻¹, ν_3 1080 cm⁻¹ e ν_4 515 cm⁻¹ (GIBSON et al., 2000).

No espectro da Figura 4.3 (b) do pó E-HA calcinado a 1000°C, foi observado a variação no espectro (estreitamento de bandas) na região de 965-1093 cm⁻¹, que provavelmente são

componentes do estiramento simétrico P-O e/ou estiramento degenerados P-O, onde se situam os modos vibracionais ν_1 e ν_3 correspondentes ao grupo funcional PO_4^{3-} . Similarmente na região de $567\text{-}635\text{ cm}^{-1}$, que são provavelmente componentes da ligação PO_4 triplamente degeneradas, onde se situa o modo vibracional ν_4 do PO_4^{3-} . Em conseqüência do estreitamento de bandas, têm-se uma maior definição dos picos presentes nas bandas dos fosfatos, e a cristalinidade do pó aumenta quando comparada com o pó de partida. Com o aumento da temperatura para 1150°C , Figura 4.3 (c), ocorre o alargamento de bandas no espectro na região de $965\text{-}1093\text{ cm}^{-1}$, decorrente da transformação de fases, com a formação de novos picos em 1062 e 1200 cm^{-1} , identificados como α -TCP e β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, sendo que o α -TCP foi produto da decomposição da E-HA (FLOWLER and BROWN, 1966; DUCHEYNE et al. 1993).

A mesma variação foi observada nos espectros do pó de CD-HA, calcinado a 1000°C , com a formação dos picos 977 , 1037 e 1102 cm^{-1} identificados como β -TCP e β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. A 1150°C , com a formação dos picos 1105 , 1030 e 1042 cm^{-1} identificados também como β -TCP e β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

As mudanças observadas nos espectros IV das hidroxiapatitas (E-HA e CD-HA), após a calcinação podem ser somente em parte atribuídas às transformações identificadas na análise por DRX nas duas temperaturas estudadas. Dessa forma fica clara a importância da espectroscopia de IV como complemento às informações obtidas por DRX.

5.2 – Pastilhas densas calcinadas

Assim como foi verificado no pó de HA, calcinado a 1000 e 1150°C , as hidroxiapatitas na forma densa se decompuseram em TCP nas formas alotrópicas α e β , como foi mostrado nas Figuras 4.6 e 4.7, sendo que essa transformação foi maior na CD-HA, como visto na temperatura de calcinação 1150°C (52,0% em β - TCP).

Comparadas as Tabelas 4.4 e 4.1 que apresentam respectivamente a porcentagem de fases presentes nas pastilhas e pós calcinados, verifica-se menor decomposição do material na

forma de pastilhas do que na forma de pó. Esse fato deve decorrer da compactação efetuada que diminuiria a área de reação das partículas. Outro fato que vale a pena ressaltar é que os valores obtidos pelo uso da curva de calibração (Anexo 1) tendem a ser inferiores aos valores obtidos usando o método de Rietveld, que apresenta maior precisão.

A microporosidade que foi observada nas pastilhas densas, Figuras 4.8 e 4.9, está relacionada com o processo de densificação das hidroxiapatitas, que ocorreu parcialmente nas temperaturas estudadas. De acordo com LANDI et al. (2000), o mesmo se completa em temperaturas superiores a 1200°C.

Na Tabela 4.5 foi mostrada a porosidade das amostras densas medida pela densidade teórica das fases presentes. A composição química da HA e a morfologia dos cristais empregados neste estudo não parecem afetar a densificação final, sendo essa dependente da pressão de compactação e da temperatura de calcinação. Conforme RODRIGUEZ – LORENZO et al. (2001), essa microporosidade pode ser reduzida quando se aumenta a temperatura de calcinação. Em seus estudos os autores obtiveram blocos de HA calcinada a 1300°C com densidade de 95%.

A microporosidade observada nas pastilhas densas parece ser também importante para o crescimento ósseo, por contribuir no processo de reabsorção do biomaterial. De acordo com LE GEROS et al. (1995) e JARCHO (1990), a microporosidade de fosfatos de cálcio formada pela mistura de HA + β -TCP contribui na taxa de dissolução in vitro e na bioreabsorção in vivo. Ambas mostraram ser diretamente proporcionais à quantidade de microporos e ao teor de β -TCP presentes nas amostras. ROSA et al. (2002), verificaram que a osteointegração e a osteocondução são influenciadas por mudanças na microporosidade de implantes densos de HA quando implantados em fêmures de coelhos, principalmente nos implantes com maior porcentagem de microporos.

As pastilhas densas com microporosidade produzidas com diferentes composições de fases podem ser aplicadas na forma de pastilhas trituradas na forma de grânulos com diferentes

tamanhos na reparação de defeitos ósseos, principalmente na odontologia e em cirurgias maxilo-crânio-facial.

5.3 – Hidroxiapatita na forma porosa

As pastilhas porosas obtidas por meio do planejamento de experimentos fatorial com 3 variáveis (razão Ca/P, temperatura de calcinação e porcentagem de naftaleno) a dois níveis cada, foram analisadas por DRX e EIV e a porosidade medida pela relação densidade real/densidade teórica e também por análise de imagens. A Figura 4.14 representa graficamente o resultado da quantificação de fases das experiências realizadas. A análise dessa figura permite concluir que:

i) Com o a diminuição da razão Ca/P ocorre um aumento na instabilidade da HA traduzida por um aumento na decomposição da HA. Isto também foi verificado pelo cálculo do efeito para a resposta HA (Tabela 4.7), que analisou os coeficientes do modelo proposto (conforme definido no capítulo 3), onde se pode observar que a variável mais importante na decomposição de fases foi à razão atômica Ca/P (x_1) por apresentar um maior efeito (39,325). Isso nos leva a concluir que, dentre as três variáveis estudadas (Ca/P, temperatura de calcinação e porcentagem de naftaleno), a decomposição de fases é mais dependente da variável x_1 e que a maior decomposição ocorreu para Ca/P =1,58 (CD-HA).

ii) Nas pastilhas produzidas com E-HA o produto de decomposição, a exemplo do que foi observado com os pós e as pastilhas densas é o α -TCP.

iii) Dada a maior instabilidade de CD-HA, o aumento na temperatura de calcinação de 1000 para 1150°C não provoca alteração significativa na quantidade de fases. Esse aumento de temperatura altera, entretanto, a cinética de transformação do TCP que passa da forma alotrópica β para α .

iv) A porcentagem de naftaleno, nos níveis empregados (20 ou 40% em peso) não afeta significativamente a decomposição de HA. Somente na CD-HA com 40% de naftaleno a

maior porosidade associada à maior quantidade de naftaleno parece ter favorecido a transformação β -TCP $\rightarrow\alpha$ -TCP.

De modo análogo, a observação da Figura 4.33 que representa graficamente o resultado da porosidade total das experiências realizadas, somado aos histogramas apresentados nas Figuras 4.31 e 4.32 permite concluir que:

i) O aumento na temperatura da calcinação diminui 15,6% em média a porosidade total das pastilhas e o aumento na porcentagem de naftaleno de 20 para 40% se traduz num aumento de 9,6% em média na porosidade total.

ii) A porosidade total medida pela variação na densidade é bastante superior à porosidade medida por análise de imagens indicando a presença de grande quantidade de microporos não detectados no aumento (50X) empregado na obtenção das imagens para o processamento digital.

iii) Comparando os resultados da porosidade total de E-HA e CD-HA, não se observa diferença na porosidade quando se trabalha com essas hidroxiapatitas. Este comportamento é esperado, pois os fatores que podem interferir na porosidade são o agente formador de poros e a temperatura de calcinação. Isso foi confirmado pelo cálculo dos efeitos (Tabela 4.10) utilizando-se a resposta porosidade total. Esta tabela indicou pelos valores dos efeitos, que as variáveis temperatura (x_2) e porcentagem de naftaleno (x_3) são as mais importantes. Também foi observada a existência do efeito da interação entre essas duas variáveis (x_2x_3) na resposta estudada, embora este influencie menos na porosidade total da HA.

iv) A forma e a distribuição de poros é muito similar para todas as condições. A maior parte dos poros tem diâmetro na faixa de 300-400 μ m, tamanho suficiente para promover o crescimento ósseo (HING et al. 1999). Além de macroporos, as pastilhas apresentaram microporos na superfície e em sua seção transversal, como foi ilustrado na Figura 4.28. De

acordo com DOYDE et al. (1999), a contribuição de microporos pode ser positiva para o favorecimento do crescimento ósseo. Embora o mecanismo de crescimento ósseo dentro de microporos não seja muito claro, acredita-se que haja uma desintegração da HA ao redor desses microporos. GAUTHIER et al (1998), verificaram em seus estudos que a biodegradação não depende só das propriedades de macroporos, a microporosidade tem um efeito importante na taxa de dissolução do biomaterial, quando em contato com o fluido biológico.

v) A variação observada na morfologia dos poros da superfície em relação à seção transversal (poros de forma elipsoidal) das amostras, Figuras 4.20 a 4.27 e a distribuição de tamanho de poros assimétrico de 300-400 μ m na região central, foi provavelmente decorrente do processo de compactação. O uso de prensagem uniaxial, onde a carga atua somente em uma direção, diferente de outros métodos de compactação, como por exemplo, pressão isostática a quente, onde a carga atua em várias direções, tende a promover poros alongados. BARREILLE et al. (1998), em seus estudos, produziram pastilhas porosas de β -TCP com morfologia de poros similar utilizando o método de compactação uniaxial.

Analisando os resultados da Tabela 4.6, observou-se que em todas condições há formação de TCP, sendo que algumas condições geraram misturas próximas à relação HA/TCP = 50/50. Esses materiais têm sido empregados especialmente em aplicações que demandem razoável degradação do material. Segundo os autores KURASHINA et al. (2002) a osteogênese pode ser acelerada por estruturas porosas de materiais formados por sistema bifásico (HA/TCP) sendo a taxa de degradação desse sistema um dos fatores determinantes na indução do processo de formação óssea.

De acordo com KURASHINA et al., (2002); GAUTHIER et al. (1999) e GAUTHIER et al. (1998), a taxa de degradação do sistema fosfato de cálcio bifásico (FCB) deve-se desenvolver concomitantemente com a formação do novo osso. Isto pode ser ajustado pela escolha de uma proporção entre as fases HA e TCP que apresentem diferentes graus de biodegradação, uma vez que o TCP é mais solúvel que a HA. Além disso, deve-se considerar que o sistema (FCB) com maior porosidade é mais capaz de promover a

atividade celular (KURASHINA et al., (2002); GAUTHIER et al. (1999) e GAUTHIER et al. (1998)).

Analisando os valores das porcentagens de fases obtidos pela curva de calibração e método de Rietveld para os três sistemas estudados: pó, denso e poroso, mostrados nas Tabelas 4.1, 4.4 e 4.6, observa-se que esses valores não apresentam diferença significativa quando os sistemas são comparados entre si. Isso quer dizer, que o processo de compactação não é crítico na transformação de fases das hidroxiapatitas estudadas. A relação entre fases HA e TCP formadas nos três sistemas para a CD-HA foram, em todos os casos próximos a 1:1.

Nos espectros de IV do sistema compactado (poroso), foi verificado que os picos de OH⁻ (3572 cm⁻¹) das hidroxiapatitas estudadas são mais intensos, quando comparados com os picos do sistema pó. Isso pode ser atribuído a menor área superficial disponível do sistema compactado para que ocorra a reação. Desta forma a desidroxilação (saída das hidroxilas) ocorre mais lentamente. De acordo com RUYS et al. (1995), a mesma só ocorre a partir da temperatura de 1350⁰C e começa na faixa de temperatura entre 300-680⁰C.

O tamanho de cristalito calculado ao longo das direções (002) e (300) de HA para os três sistemas estudados, como mostrado nas Tabelas 4.1, 4.4 e 4.6. Mostrou que a presença de outra fase decorrente do processo de decomposição influencia no comportamento e morfologia do cristal. Isso ocorre devido a alterações causadas nos padrões de DRX pela presença da segunda fase, como por exemplo, alargamento nos picos (GIBSON et al. 2000).

Quando se pensa em aplicação clínica precisa-se associar a uma mistura de fases conveniente, resistência mecânica para garantir integridade estrutural do componente e porosidade que permita promover crescimento ósseo no seu interior. A Resistência à compressão varia inversamente com a quantidade de poros e diretamente com a temperatura de calcinação. De acordo com GAUTHIER et al. (1999), a resistência à compressão de implantes de fosfato de cálcio bifásico (FCB) com poros na faixa de 300-565µm é maior quando calcinados a 1150⁰C, devido a aumentar a cristalinidade do

material, quando comparado à calcinação em temperaturas inferiores. Conforme BOULER et al. (1996), quando se utiliza o sistema FCB poroso, dependendo do método de preparação, pode-se chegar a uma resistência a compressão de 5MPa. BAREILLE et al. (1998), quando trabalhou com β -TCP poroso obteve valores na faixa de 2,6 a 3,5 MPa quando utilizou um ligante para incorporar o agente formador de poros.

Comparando os resultados das porcentagens de naftaleno das experiências CD-HA-20-1150 e CD-HA-40-1150, parece ser mais vantajoso trabalhar com teores da ordem de 40% de naftaleno, pois como descrito anteriormente, estudos têm mostrado que materiais com maior porosidade da ordem de 250-400 μ m com resistência mecânica são mais capazes de favorecer a osteointegração com o tecido ósseo. Desta forma, uma boa opção seria a produção de elementos cerâmicos usando HA deficiente em cálcio com 40% de naftaleno calcinada na temperatura de 1150°C.

5.4 – Experimentos de Degradação e Biológico

Na Tabela 4.10 foi apresentado o resultado da degradação obtido a partir da imersão em solução tampão TRIS das quatro condições das pastilhas porosas como 40% de naftaleno, calcinadas a 1000°C (condição **a**, **b** e **c**) e 1150°C (condição **d**) e trituradas. A perda de massa ocorreu em todas as amostras, pelo mecanismo de dissolução das fases presentes, liberando cálcio e fósforo para a solução.

Os resultados dos experimentos mostram que a dissolução do sistema cerâmico, puro e calcinado a 1000 °C ou bifásico e calcinado a 1000 °C e 1150 °C é da ordem de 3 a 5 % da massa total das amostras, para o tempo de 120 horas. Este valor é baixo quando comparado com sistemas similares, mas não calcinados. Isso indica que a calcinação tem forte influência na diminuição da solubilidade dos fosfatos, diminuindo, assim, as diferenças entre as solubilidades da HA e do TCP.

Observa-se que a degradação do sistema bifásico (condições **b** e **c**) é maior que a da HA pura (condição **a**) quando as duas amostras são calcinadas a mesma temperatura (1000°C).

Esse resultado concorda com estudos relatados na literatura sobre a dissolução da HA e de compósitos HA e TCP calcinados, na forma de pó e grânulos, em temperaturas superiores a 900°C (LEGEROS et al. 1995; DUCHEYNE et al. 1993; AOKI, 1994). Os valores similares obtidos para a degradação das amostras **a** e **d** são aparentemente contraditórios, pois no primeiro caso temos uma HA pura, menos solúvel, e no segundo um sistema bifásico HA +TCP, mais solúvel. Esta aparente contradição pode ser levantada se considerarmos que a amostra **d** foi calcinada a uma temperatura maior (1150°C) o que provoca um aumento na densificação da pastilha, e a amostra **a** calcinada a 1000 °C. Novamente fica evidente o forte efeito da calcinação sobre a diminuição da solubilidade do material. No caso da amostra **d** ela contrabalança o efeito do aumento de solubilidade devido à solubilidade da fração TCP. Segundo CHERN et al. (2001) a cristalinidade do material aumentou e deve ter também interferido na dissolução do material.

Uma outra explicação para a degradação das amostras da condição **a** foi a presença de outra fase não identificada pela DRX, o CaO, que é produto da decomposição da HA rica em cálcio (Ca/P=1,72). O CaO em presença de umidade, se hidrata formando Ca (OH)₂ que não é determinado por DRX. Na análise de EIV (Figura 3.5) foram identificados outros picos diferentes da HA em 2926 e 2858 cm⁻¹ que indicam ser do Ca(OH)₂. SLOSARCZYK et al. (1996), também identificaram em HA com razão atômica Ca/P>1,70 a decomposição de fases da HA em CaO. Segundo esses autores fases como CaO e Ca (OH)₂ aumentam a dissolução da HA.

Os experimentos de dissolução das quatro condições de amostras em meio biológico (SFC), usando 1/4 de pastilha mostraram que fragmentos porosos podem apresentar propriedades de dissolução muito diferentes das amostras em pó, como foi empregado no teste de degradação. Neste último sistema, quando a HA é colocada em meio biológico observa-se um aumento da concentração de cálcio em solução devido à dissolução da HA. Numa segunda etapa do processo, ocorre uma diminuição dos teores de cálcio em solução porque a precipitação de fosfatos de cálcio se torna dominante em relação à dissolução da HA. Estes mecanismos são também muito sensíveis as características do material cerâmico tais como temperatura de calcinação e composição de fases.

Diferenças não foram observadas nos resultados de dissolução apresentados nas Tabelas 4.11 e 4.12. As amostras das quatro condições apresentaram ganhos de massa e capturaram cálcio e fósforo da solução indicando que fosfatos de cálcio foram precipitados nas superfícies de todas as amostras após o contato com a solução. Entretanto, as quantidades relativas do material precipitado não apresentaram uma relação coerente com a composição e a temperatura de calcinação de cada uma das amostras. Exemplo disto foi a amostra **b** que apresentou o menor ganho de massa, mas capturou menos cálcio da solução que as amostras **a**, **c** e **d**.

Os testes de imersão em solução de fluido corpóreo (SFC) têm sido empregados como uma medida da bioatividade nas superfícies das amostras. Considera-se mais bioativa a superfície capaz de induzir a formação de maior quantidade de apatita a partir da seqüência de reações: dissolução, precipitação e troca iônica (DUCHEYNE et al., 1993; RADIN et al., 1993). A formação espontânea de apatita foi verificada em superfícies metálicas recobertas com HA, cerâmicas, biovidros e vitro-cerâmicas por vários autores (HENCH et al. 1988; RADIN et al. 1991; DE GROOT et al., 1990; SENA et al. 2003).

As amostras submetidas ao teste de imersão em SFC por 168 horas apresentaram em sua superfície depósitos ricos em Ca e P, compatíveis com a presença de apatita biológica. Nas condições **a** e **b** os depósitos foram mais irregulares (Figura 4.35). Enquanto que, na condição **d** (Figura 4.36 b) se observa a superfície da pastilha totalmente recoberta por um “tapete” homogêneo de partículas.

WENG et al. (1997) avaliaram a formação da camada de fosfatos de cálcio, em solução SBF, sobre implantes recobertos com fosfatos de cálcio com diferentes razões atômicas Ca/P(1,59 e 1,73). Nos recobrimentos com razão Ca/P igual a 1,73 não houve deposição de fosfatos de cálcio, já no recobrimento com menor razão Ca/P houve formação de uma camada de fosfatos de cálcio, após 24 horas de imersão. Os autores concluíram que a evolução da camada de apatita sobre os recobrimentos ocorre simultaneamente em vários núcleos, que crescem rapidamente e se fundem para em seguida formarem novos núcleos de crescimento. Os autores também observaram que o crescimento inicial da camada de

apatita ocorre em varias regiões de poros, depressões ou de defeitos, onde as condições de supersaturação são alcançadas mais rapidamente.

Segundo DUCHEYNE e QUI (1999), quanto maior a dissolução do material, maior deverá ser a precipitação de apatita em sua superfície. A maioria dos autores se refere à dissolução em água. De acordo com DUCHEYNE et al. (1993), o comportamento da degradação, verificado pela taxa de dissolução de biocerâmicas a base de fosfatos de cálcio em solução TRIS na forma de pós e grânulos de sistema monofásico, cresce na seguinte ordem: E-HA → CD-HA → OHA → β -TCP → α -TCP → TTCP. No caso de sistema bifásico formado pela mistura de HA + β -TCP, β -TCP + α -TCP e α -TCP + TTCP, a taxa de dissolução e o produto iônico de solubilidade podem ser substancialmente afetados pela taxa de dissolução do componente mais solúvel e aumenta com o teor desse componente. Por isso, optou-se por testar a dissolução das amostras em solução TRIS seguindo a orientação da norma ISO/FDIS 10993-14.

A dificuldade de se correlacionar os resultados das experiências de dissolução das quatro condições das amostras em solução SFC pode ser explicado pelo uso de fragmentos porosos nos experimentos. Ao contrário de pó e grânulos, estes sistemas possuem a maior parte de sua área superficial no interior da amostra. Nestes casos, as reações de dissolução e reprecipitação ocorrem principalmente dentro de poros internos, em volumes pequenos e em condições de saturação e pH um pouco diferentes da parte exterior do fragmento, onde o contato é feito diretamente com a solução na sua composição original. Portanto, resultados diferentes daqueles obtidos com amostras em pó ou em grânulos podem ser obtidos. Em consequência, estes efeitos podem modificar o comportamento biológico dos materiais cerâmicos à base de fosfatos de cálcio, quando são usados em aplicações médicas, na forma de pastilhas porosas.

6 – CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos neste trabalho permitiu tirar-se uma série de conclusões sobre a produção de pastilhas porosas, utilizando um planejamento fatorial 2^3 para se avaliar o efeito da razão Ca/P, a porcentagem de naftaleno e a temperatura de calcinação nas propriedades das pastilhas.

- 1- Com a utilização do Planejamento de Experimentos com 3 variáveis (razão atômica Ca/P, temperatura de calcinação e porcentagem de naftaleno) com dois níveis (-) e (+) usado no processamento de pastilhas porosas, materiais foram produzidos com diferentes composições de fases e com variações nas quantidades e tamanhos de poros.
- 2 - O cálculo dos efeitos para a resposta das porcentagens de HA calculadas pelo método de Rietveld, mostrou que dentre as três variáveis estudadas (Ca/P, temperatura e a porcentagem de naftaleno), a decomposição de fases depende principalmente da variável razão atômica Ca/P.
- 3 - As hidroxiapatitas estudadas se decompuseram em fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ –TCP) nas formas alotrópicas α e β quando calcinadas na temperatura de 1000 e 1150°C, sendo essa decomposição maior na hidroxiapatita deficiente em cálcio (CD-HA).
- 4 - A compactação não foi um fator crítico na transformação de fases das hidroxiapatitas quando comparamos os sistemas pó e compactado, uma vez que no pó e nas pastilhas densas observou-se instabilidade similar.
- 5 - Analisando o efeito das três variáveis estudadas na resposta porosidade total, verificou-se que as variáveis temperatura de calcinação e a porcentagem de naftaleno são as mais importantes. O aumento da temperatura de calcinação reduz, como esperado, a porosidade total.

- 6 - A maior parte dos poros teve diâmetros na faixa de 300-400 μ m, tamanho suficiente para promover o crescimento ósseo. No entanto, foi observada a presença de microporos na superfície e na seção transversal das pastilhas, que também podem influenciar de forma positiva no processo de crescimento ósseo *in vivo*.
- 7- A porcentagem de 20 e 40% de naftaleno utilizada para produzir poros nas hidroxiapatitas, não interferiu significativamente na cinética de transformação de fases. Somente no material poroso (CD-HA) dado a sua instabilidade, o aumento na porcentagem de naftaleno de 20 para 40% contribuiu para a transformação da forma alotrópica β para α no TCP, na temperatura de 1150°C.
- 8 - Sobre todas as superfícies expostas a SFC por 168 horas formaram-se partículas ricas em cálcio e fósforo. A morfologia da camada depositada na pastilha da condição **d** é similar à observada em outros trabalhos da literatura.
- 9 - Em resumo, das condições analisadas a condição **d** produzida a partir de CD-HA com 40% de naftaleno parece reunir boa correlação de fases (44,5%HA + 55,5% TCP), elevada porosidade (66,0%) e camada homogênea de precipitados de cálcio e fósforo. Apesar de não ter se medido as propriedades mecânicas desses materiais o fato de ter sido calcinada a 1150°C indica que nesse aspecto deve ser possível seu uso no preenchimento de cavidades ósseas.

7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1 – Utilização de outras técnicas de compactação no processamento de pastilhas, como por, exemplo, prensagem isostática.
- 2 – O processamento de pastilhas com outros aditivos químicos como formadores de poros como: uréia, polímeros de grau médico, ácido esteárico e outros.
- 3 – Ensaio mecânicos para medir a resistência à compressão das pastilhas porosas.
- 4 – Testes de caracterização biológica *in vitro* em meio de cultura de células.
- 5 – Testes *in vivo*.

6 - Referências Bibliográficas

AOKI, H., 1994, “Medical Applications of Hydroxyapatite”, Takayama Press System Center Co, Japan, pp.1 – 12.

ADAMSON, A. W., 1998, “Physical Chemistry of Surfaces”, John Wiley and Sons, New York, 5^a Ed.

ANDRADE, M. C., 1999, “Nucleação e Crescimento de Hidroxiapatita em Titânio”, COPPE/ UFRJ; Tese de D. Sc.

ANSELME, K., 2000, “Osteoblast Adhesion on Biomaterials”, Biomaterials 21, pp. 667 – 681.

ANSELME, K., SHARROCK., HARDOUIN, P., et al., 1997, “In vitro growth of human adult bone - derived cells on hydroxyapatite plasma – sprayed coatings” , J. of Biomedical Materials Research, 34, pp. 247 – 259.

AGUIAR, P. F., MASSART, D. L., 1998, “Experimental Design”. In: The Encyclopedic of Computational Chemistry, Ed. John Wiley & Sons, cap. III.

AZÁROFF, L. V., 1968, “Elements of X-Ray Crystallography”, McGraw-Hill Book Company, Inc.

BAREILLE, R., SOUS, M., ROUSAIS, R., et al., 1998, “Celular biocompatibility and resistance to compression of macroporous β - tricalcium phosphate ceramics”, Biomaterials, Vol. 19, pp. 2147-2153.

BOULER, J. M., TRÉCANT, M., et al., 1996, “Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of five synthesis parameters on compressive strength”, Biomaterials, Vol. 32, pp. 603-609.

BOSS, B. C. and FREDEEN, J. K., 1999, "Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry", 2^a Edition, Edited by PERKIN ELMER CORPORATION.

BOYDE, A., CORIS, A., et al., 1999, "Osteoconduction in Large Macroporous Hydroxyapatite Ceramic Implants: Evidence for a Complementary Integration and Disintegration Mechanism", *Bone*, Vol. 6, pp. 579-589.

CANNAS, M., PIGATTO, A., MASSÉ, A., 1995, "Evaluation of Biocompatibility Using Cell Culture Assay Notes". In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, (eds) by D. L. Wise et al., Part A, Vol. 1, Cap. 13.

CHANG, Y. L., STANFORD, C. M., WEFEL, J. S., et al., 1999, "Osteoblastic Cell Attachment to Hydroxyapatite – Coated Implant Surfaces In Vitro" *The International J. of Oral & Maxillofacial Implants*, 14, pp. 239 – 247.

CHANG, B. S., LEE, C. K., HONG, K.S., et al., 2000, "Osteoconduction at Porous Hydroxyapatite with various Pore Configurations", *Biomaterials*, 21, pp. 1291 – 1298.

CHERHRONDI, B. and BURNETTE, D. M. ,1995, "Effects of Surface Topography on Cell Behavior", *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, vol. 1, part. A, cap. 22, Marcel Dekker Inc., New York.

CHER LIN, J. H., KUO, K. H., et al., 2001, " Surface reaction of stoichiometric and calcium-deficient hydroxyapatite in simulated body fluid", *J. of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 12, pp. 731-741.

CHESMEL, K. D., CLARK, C. C., BRIGHTON, C. T., et al., 1995, "Celular Responses to Chemical and Morphologic Aspects of Biomaterial Surfaces", *J. Biomed. Mater. Res.*, 29, pp. 1101 – 1110.

CHOU, L., MAREK, B., WAGNER, W. R., 1999, "Effects of hydroxyapatite coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency and proliferation in vitro", *Biomaterials*, 20, pp. 977 – 985.

CHOW, L. C., 1998, "Calcium Phosphate Cements: Chemistry and Applications", In: Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramic in Medicine", New York, EUA, pp. 45 – 49.

DA SILVA, M. H. P., 1999, "Recobrimento de Titânio com Hidroxiapatita: Desenvolvimento do Processo de Deposição Eletrolítica e Caracterização Biológica in Vitro", COPPE/UFRJ, Tese de D. Sc.

DE GROOT, K., 1983, "Bioceramics of Calcium-Phosphate", CRC Press, Boca Raton, FL.

DE GROOT, K., and LEGEROS, R., 1988, Position Papers in Bioceramics: "Materials Characteristics versus In – Vivo Behavior", P. Ducheyne and J. Lemons, Eds. Ann. New York, Acad. Sci., Vol. 523, pp. 227 – 272.

DE GROOT, K., KLEIN, C. P. A. T., WOLKE, J. G. G. and DE BLIECKHOGERVORST, J., 1990, "Chemistry of Calcium Phosphate Bioceramics, in Handbook on Bioactive Ceramics" T. Yamamuro, L. L. Hench, and J. Wilson, Eds. CRC Press, Boca Raton, FL, Vol. II, Cap.1.

DOROZHKIN, S. V. and DOROZHKINA, E. I., 2002, Mechanism of the Solid-State Transformation of a Calcium-Deficient Hydroxyapatite (CDHA) into Biphasic Calcium Phosphate (BCP) at Elevated Temperatures", Chemical Materials, Vol. 14, pp. 4267-4272.

DUCHEYNE, P. KOKUBO T., 1992, " Bioactivity of glasses and glass ceramics", In: KOKUBO, T. (ed), Bone – Bonding Biomaterials, Reed Healthcare Communications, Berlin, pp. 31 – 46.

DUCHEYNE, P., RADIN, S. and KING, L., 1993, "The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution", Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 27, pp. 25-34.

DUCHEYNE, P. and QIU, Q., 1999, "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function", *Biomaterials*, Vol. 20, pp. 2287-2303.

EBISAWA, Y., KOKUBO, T., 1990, "Bioactivity of CaO.SiO₂ based glasses: in vitro evaluation", *J. of Materials Science: Materials in Medicine*, 1, pp. 239 – 244.

EGGLI, P. S., MILLER, W., SCHENK, R. K., 1988, "Porous Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Cylinders with two different pore size ranges implanted in the Cancellous Bone in rabbits", *Clin. Orthop.*, Vol. 232, pp. 127-137.

ELLIOT, J. C., 1994, "Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates", Ed. Elsevier, Amsterdam, Holanda, pp. 1 – 7.

FLOWLER, B. O., MORENO, E. C., BROWN, W. E., 1966, "Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate", *Arch. Oral Biol.* Vol. 11, pp. 477-492.

FLAUTRE, B., ANSELME, K., DELECOURT, C., et al., 1999, "Histological aspects in bone regeneration of an association with porous hydroxyapatite and bone marrow cells", *J. of Materials Science: Materials in Medicine*, 10, pp. 811 – 814.

FRAYSSINET, P., TROUILLET, J. L., ROUQUET, N., AZIMUS, E., et al., 1993, "Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition", *Biomaterials*, Vol. 14, pp. 423-429.

FRAUCHIGER, L., TABORELLI, M., ARONSSON, B. O., DESCOUTS, P., 1999, "Ion adsorption on titanium surfaces exposed to a physiological solution", *Applied Surfaces Science*, Vol. 143, pp. 67-77.

GAUTHIER, O., BOULER, J. M., AGUADO, E., et al., 1998, "Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity", *Biomaterials*, 19, pp. 133 – 139.

GAUTHIER, O., BOULER, J. M., AGUADO, E., et al., 1999, "Elaboration conditions influence physicochemical properties and in vivo bioactivity of macroporous biphasic calcium phosphate ceramics", J. of Materials Science: Materials in Medicine, Vol. 10, pp. 199-204.

GIBSON, I. R., REHMAN, I., et al., 2000, "Characterisation of the Transformation from Calcium-deficient apatite to β -tricalcium phosphate", J. of Materials Science: Materials in Medicine, Vol. 12, pp. 799-804.

GOLDSTEIN, J. L. NEWBURG, T. E., et al., 1981, "Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis", 2^a, Plenum Press.

GRAINGER, D. W. and HEALY, K. E., 1998, "Biomaterial Surface Analysis", Handbook of Biomaterials Evolution, cap. 07, Taylor & Francis Publication, USA.

GROSS, V., and STRUNZ, V., 1985, "The Interface of Various Glass and Glass-Ceramics with a Bony Implantation", J. Biomed. Mater. Res. 19, pp. 251.

HENCH, L. L., 1999, "Medical Materials for Next Millennium", MRS BULLETIN, pp. 13-19.

HILL, R. J., 1987, "Quantitative Phase Analysis from Neutron Powder Diffraction Data Using the Rietveld Method", J. Applied Cryst., 20, pp. 467-474.

HENCH, L. L., 1988, Bioactive Ceramics, Part. II, in "Bioceramic Materials Characteristics Versus in Vivo Behavior", Annals N.Y. Acad. of Sc.,523, Edit. P. Ducheyne and J. Lemons, New York, pp. 54 – 71.

HENCH, L. L., 1990, "Bioactive Glasses and Glass – Ceramics: A Perspective", Handbook of Bioactive Ceramics, Vol. I, CRC Press. Inc, Florida, pp. 7 – 22.

HULBERT, S. F., 1993, " The Use of Alumina and Zirconia in Surgical Implants", In: HENCH, L. L., WILSON, J. (eds), An Introduction to Bioceramics, vol.1, chapter 2, Gainesville, USA, World Scientific, pp. 25 – 40.

HULBERT, S. F., HENCH, L. L., et al., 1983, “History of Bioceramics – Ceramics in Surgery”, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp. 3 – 29.

HULBERT, S. F., BOKROS, J. C., HENCH, L. L., WILSON J., 1987, “ Ceramics in Clinical Applications: Past, Present and Future”, in High Tech Ceramics, P. Vincenzini, Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 189 – 213.

HING, K. A., BEST, S. M., BONFIELD, W., 1999, “Characterization of Porous Hydroxyapatite”, J. of Materials Science: Materials in Medicine, 10, pp. 135 – 145.

HING, K. A., BEST, S. M., BONFIELD, W., et al., 1999, “Quantification of bone ingrowth within bone-derived porous hydroxyapatite implants of varying density”, J. of Materials Science: Materials in Medicine, 10, pp. 663 – 670.

HING, K. A., MERRY, J. C., GIBSON, I. R., et al., 1999, “Effect of Carbonate Content on the Response of Human Osteoblast-like Cells to Carbonate Substituted Hydroxyapatite”, Bioceramics, 12, pp. 195 – 198.

HUNTER, R. J., 1993, “Introduction to Modern Colloid Science”, Oxford Science Publications, New York .

HEALY, K. E., THOMAS, C. H., REZANIA, A., et al., 1996, “Kinetics of Bone Cell Organization and Mineralization on Materials with Patterned Surface Chemistry”, Biomaterials 17, pp. 195 – 208.

HUANG, J., 1997, “Characterization and Evaluation of Hydroxyapatite and Bioglass Reinforced Polyethylene Composites for Medical Implants”, Ph.D. dissertation, QMW, University of London, U.K.

INTERNATIONAL STANDARD ISO/FDIS 10993-14, 2001, “Biological Evaluation of Medical Devices. Part 14: Identification and Quantification of Degradation and Products from Ceramics”.

ISHIKAWA, K., DUCHEYNE, P., RADIN, S., 1993, "Determination of the Ca/P ratio in Calcium-Deficient Hydroxyapatite using X-Ray Diffraction Analysis", *J. of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol, 4, pp. 165 – 168.

JARCHO, M., 1981, "Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics", *Clinical Orthop. Relat. Res.*, 157, pp. 259-278.

KAY, M.I.; YOUNG, R.A.; POSNER, A.S., 1964, *Nature*, 204, pp 1050-1052.

KOKUBO, T., 1993, "A/W Glass-Ceramics : Processing and Properties", In: HENCH, L. L., WILSON, J. (eds), *An Introduction to Bioceramics*, vol.1, chapter 5, Gainesville, USA, World Scientific, pp. 75 – 88.

KIVRAK, N. and TAS, A. C., 1998, "Synthesis of calcium hydroxyapatite-tricalcium phosphate (HA-TCP) composite bioceramic powders and their sintering behavior", *Journal Am. Ceramics Society*, Vol. 81, pp. 2245-2252.

KURASHINA, K., KURITA, H., et al., 2002, "Ectopi Osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits", *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 407-412.

KLEIN, C. P. T., VAN DER LUBE, H. B. M., et al., 1983, "Biodegradation Behaviour of Various Calcium Phosphate Materials in Subcutaneous Tissue", *Ceramic in Surgery*, pp. 105 – 115.

KLEIN, C. P. T., WOLKE, J. G. C., and DE GROOT, K., 1993, "Stability of Calcium Phosphate Ceramics and Plasma Sprayed Coating", In: HENCH, L. L., WILSON, J.(eds), *An Introduction to Bioceramics*, vol.1, chapter 11, Gainesville, USA, World Scientific, pp. 202 – 205

KRAJEWSKI, A., RAVAGLIOLI, A., MONGIORGI, R., MORONI, A., 1988, "Mineralization and calcium fixation within a porous apatitic ceramic material after implantation in the femur of rabbits", *Journal Biome. Mater. Res.*, Vol. 22, pp. 445-457.

LANDI, E., TAMPIERI, A., CELOTTI, G., SPRIO, S., 2000, “Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites”, *Journal of European Ceramic Society*, Vol. 20, pp. 2377-2387.

LEGEROS, R. Z., 1988, “Calcium Phosphate Materials in Restorative Dentistry: A Review”, *Adv. Dent. Res.*, 2, pp. 164 – 180.

LEGEROS, R. Z., and LEGEROS, J. P., 1993, “Dense Hydroxyapatite”, In: HENCH, L. L., WILSON, J.(eds), *An Introduction to Bioceramics*, vol.1, chapter 9, Gainesville, USA, World Scientific, pp. 139 –180.

LEGEROS, R. Z., LEGEROS, J. P., et al., 1995, “Calcium Phosphate Biomaterials: Preparation, Properties and Biodegradation”, In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Ed. By D. L. Wise et al., Part. A Vol. 2, Cap. 43.

LEGEROS, R. Z., 1991, “Calcium Phosphate in Oral Biology and Medicine”, Ed. H. M. Myers, Karger, Vol. 15, Cap. 6.

LU, J. X., FLAUTRE, K., ANSELME, P., et al., 1999, “Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo”, *J. of Materials Science: Materials in Medicine*, 10, pp. 111 – 120.

LEE, B. H. and LEE, J. H., 1995, “Biocompatibility of Solid Substrates Based on Surface Wettability”, *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, vol. 1, part. A, cap. 11, Marcel Dekker Inc., New York.

MASSART, D. L., VANDEGINSTE, B. G. M., BUYDENS, L. M. C., et al., 1997 “Two - level Factorial Designs”. In: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Ed. Elsevier, Amsterdam, Holanda, cap. 22.

METSGER, D. S., RIEGER, M. R., FOREMAN, D. W. M., 1999, “Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic”, *J. of Materials Science: Materials in Medicine*, 10, pp. 9 – 17.

MEYLE, J., GULTIG, K., WOLBURG, H., et al., 1993, “Fibroblast Anchorage to Microtextured Surfaces”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 27, pp. 1553 –1557.

MILLER, J. N. and MILLER, J. C., 2000, “Statistics for Analytical Chemistry”, Edited Prentice Hall, Fouth Edition.

MORAES, S. V. M., 1999, “Revestimento de Nióbio com Hidroxiapatita por Eletroforese”, COPPE / UFRJ; Tese M. Sc.

MUSTER, D. and DEMRI, B., 1995, “ Physicochemical Characterization of Surface and Interface on Biomaterials and Coatings”, *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, vol. 1, part. A, cap. 21, Marcel Dekker Inc., New York.

McCUSKER, L. B., VON DREELE, R. B., COX, D. E. et al., 1999, “Rietveld refinement guidelines”, *J. Applied Cryst.* , 32, pp. 36-50.

OLIVEIRA, J. F., JUNIOR, G. M., SOARES, G. A., et al., 2000, “O Efeito do Níquel na Adesão Osso-Implante do Aço Inoxidável 316 L: Revisão Termodinâmica”, 44^o Congresso Brasileiro de Cerâmica, São Pedro, SP, Brasil.

OLIVEIRA, J. M., CORREIA, R. N., FERNANDES, M. H., 1995, “Surface Modifications of a Glass and Glass- Ceramic of the $MgO - 3 CaO.P_2O_5 - SiO_2$ System in a Simulated Body Fluid”, *Biomaterials* 16, pp. 849 – 854.

OREFFO, R. O. C., TRIFFITT, J. T., 1999, “In vitro and in vivo methods to determine the interactions of osteogenic cells with biomaterials”, *J. of Materials Science: Materials in Medicine*, 10, pp. 607 – 611.

PASSUTI, N., DACULSI, G., ROGEZ, J. M., MARTIN, S., BAINVEL, J. V., 1989, “Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion”, *Clin. Orthop.*, Vol. 248, pp. 169-176.

PETROV, O. E., DYULGEROVA, E., PETROV, L. POPOVA, R., 2001, "Characterization of Calcium Phosphate Phases Obtained During the Preparation of Sintered biphase Ca-P Ceramics", *Materials Letters*, Vol. 48, pp. 162-167.

PHILIPPO, S., NAND, J. and VERKAEREN, J., 1997, "Geochemical Evaluation of the Lueshe Niobium Deposit by Rietveld Quantitative X-ray Diffraction", *Applied Geochemistry*, 12(2), 175-180.

RAYNAUD, S., CHAMPION, E., BERNACHE-ASSOLLANT, D., THOMAS, P., 2002, "Calcium Phosphate Apatites With Variable Ca/P Atomic Ratio I. Synthesis Characterisation and Thermal Stability of Powders", *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 1065-1072.

RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN, F. J., LEMON, J. E., 1996A, "Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine", Academic Press, USA, pp. 73 – 79.

RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN, F. J., LEMON, J. E., 1996B, "Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine", Academic Press, USA, pp. 142 – 147.

RAILHAC, J. J., SHARROCK, P., GALY- FOURCADE, D., et al., 1997, "Injectable Chitosamine Hydroxyapatite Bone Paste", In: *Proceedings of the 10th International Symposium on Ceramic in Medicine*", Paris, França, pp. 507 – 510.

RADIN, S. R. and DUCHEYNE, P., 1993, "The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 27, pp. 35-45.

RADIN, S. R. and DUCHEYNE, P., 1994, "Effect of bioactive ceramic composition and structure on in vitro behavior. III. Porous versus dense ceramics", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 28, pp. 1303-1309.

RADIN, S. R. and DUCHEYNE, P., 1991, "Plasma spraying induced changes of calcium phosphate characteristics and the effect on in vitro stability", *Material Med.*, Vol. 3, pp. 33-42.

REIS, E. G., 1991, "Preparação e Caracterização da Hidroxiapatita Cerâmica", Projeto Final de Curso, Departamento de Química Inorgânica (IQ-UFRJ).

RODRIGUEZ LORENZO, L. M., VALLET REGI, M., FERREIRA, J. M. F., 2001, "Fabrication of Hydroxyapatite Bodies by Uniaxial Pressing from a Precipitated Powder", *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 583-588.

RODRIGUEZ-CARVAJAL, J., 1996, "Reference Guide for the Computer Program FullProf", Laboratoire Léon Brillouin, CEA-CNRS, Saclay, France.

ROMANO ROJANO, J. F., 2000, "Injertos ósseos: revision bibliográfica", *Medicina Oral*, Vol. II, No. 4, pp. 114-118.

ROSA, A. L., BELOTI, M. M., OLIVEIRA, P.T., 2002, "Osseointegration and Osseointegration of Hydroxyapatite of Different Microporosities", *J. of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 13, pp. 1071-1075.

RUARDY, T. G., SCHAKENRAAD, J. M. et al., 1995, "Adhesion and Spreading of Human Skin Fibroblast on Physicochemical Characterized Gradient Surfaces", *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, pp. 1415 – 1423.

RUYS, A. J., WEI, M., SORRELL, C. C., et al., 1995, "Sintering effects on the strength of hydroxyapatite", *Biomaterials*, Vol. 16, pp. 409-415.

SALINAS, A. J., RAMAN, J., VALLET-REGI, M., et al., 2000, "In vitro bioactivity of glass and glass – ceramics of the $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 - \text{CaO} \cdot \text{SiO}_2 - \text{CaO} \cdot \text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2$ system", *Biomaterials*, 21, pp. 231 – 257.

SANTOS, G. R. y GUERRA-LÓPEZ, J. G., 1992, “Materiales bioactivos para implantes óseos. Características y aplicaciones”, Laboratorio de Biomateriales. Centro de Investigaciones Científica, Cuba.

SARGIN, J., KIZILYALLI, M., TELL, C., et al., 1997, “A new method for the Solid-State Synthesis of Tetracalcium Phosphate, a Dental Cement: X- Ray Powder Diffraction and IR Studies”, Journal of the European Ceramic Society, Vol. 17, pp. 963 – 970.

SENA, L. A., ROCHA, N. C. C., ANDRADE, M. C., SOARES, G. A., 2003, “Bioactivity assessment of titanium sheets electrochemically coated with thick oxide film”, 166, pp. 254 -258.

SHORS, E. C., and HOLMES, R. E., 1993, “Porous Hydroxyapatite”, In: HENCH, L. L., WILSON, J.(eds), An Introduction to Bioceramics, vol.1, chapter 10, Gainesville, USA, World Scientific, pp. 181 - 189

SUN, J. S., TSUANG, Y. H., LIAO, C. J., et al.,1997, “The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts”, J. of Biomedical Materials Research, 37, pp. 324 – 334.

SLOSARCZYK, ANNA., PALUSZKIEWICS, CZESLAWA, et al., 1996, “The FTIR Spectroscopy and QXRD Studies of Calcium Phosphate Basead Materials Produced from the Powder Precursors with Different Ca/P Ratios”, Ceramics International, Vol. 23, pp. 297-304.

TSUMGA, E., TAKITA, H., ITOH, H., al., 1997, “Pore size of porous hydroxyapatite as the celul – substratum controls BMP – induced osteogenesis”, J. Biochemics, 121, pp. 317 – 324.

TOTH, J. M., LYNCH, K. L., DEVINE, T. R., 1995, “Mechanical and Biological Charaterization of Calcium Phosphate for use as Biomaterials”. In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, (eds), by D. L. Wise.

TAKASHIMA, S. et al., 1996, “Adsorption of Proteins by Calcium Phosphate with Varied Ca to P Ratios”, *Bioceramics*, Vol. 9, pp. 217 – 220.

THOMAS, C. H., MCFARLAND, C. D., JENKINS, M. L., et al., 1997, “The Role of Vitronectin in the Attachment and Spatial Distribution of Bone-Derived Cells on Materials with Patterned Surface Chemistry”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 37, pp. 81 – 93.

TSUJII, K., 1998, “Surface Activity”, Academic Press, USA.

VAZ, L., LOPES, A.B., et al., 1999, “Porosity control of hydroxyapatite implants”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10, pp. 239 – 242.

VIDIGAL, G. M., DE OLIVEIRA, J. F., SOARES, G. A. et al., 2000A, “Nucleação e Crescimento de Hidroxiapatita em Tungstênio: Análise Termodinâmica”, 44^o Congresso Brasileiro de Cerâmica, São Pedro, SP, Brasil.

VIDIGAL, G. M., DE OLIVEIRA, J. F., SOARES, G. A. et al., 2000B, “O efeito do Cobalto na Adesão Osso-Implante da Liga Co – Cr – Mo: Revisão Termodinâmica”, 44^o Congresso Brasileiro de Cerâmica, São Pedro, SP, Brasil.

WENNERBERG, A., ALBREKTSSON, T., and ANDERSSON, B., 1993, “Design and Surface Characteristics of 13 Available Oral Implant Systems”, *The International of Oral & Maxillofacial Implants*, Vol. 8, 622 – 633.

WENNERBERG, A., ALBREKTSSON, T., and ANDERSSON, B., 1995, “An Animal Study of C.P. Titanium with Different Surface Topographies”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 6, pp. 302 – 309.

WAN, A. C. A., KHOR, E., HASTINGS, G. W., 1997, “Manufacture of a Hydroxyapatite – Chitin Composite”, In: *Proceedings of the 10th International Symposium on Ceramic in Medicine*, Paris, França, pp. 511 – 514.

YAMAMURO T., 1994, A/W Glass Ceramic: “Clinical Applications, A-W Glass- Ceramic – Development, Characterization, Modification and Clinical Applications”, Ed. By Takao Yamamuro, Kyoto, pp. 974 – 987.

YANG, X. and WANG, Z., 1998, “Synthesis of biphasic ceramics of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate with controlled phase content and porosity”, Journal Mater. Chemical, Vol. 8, pp. 2233-2237.

YUBAO, L., KLEIN, P. A. T. et al., 1994, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Vol. 5, p. 263.

YOUNG, R. A., 1995, “The Rietveld Method”, IUCr Monographs on Crystallography, Edited by Oxford Science Publications.

YOSHIMURA, M. and SUCHANCE, W., 1998, “Processing and Properties of Hydroxyapatite based Biomaterials for use as Hard Tissue Replacement Implants”, Journal Mater. Res., Vol. 13(1), pp. 94-117.

ANEXO 1

Quantificação das fases nos padrões de DRX

Para quantificar as fases presentes nos padrões de Difração de Raios – X das amostras estudadas, foram construídas duas curvas de calibrações, uma para α - TCP e outra para β - TCP, conforme a metodologia descrita a seguir (ISHIKANA et al. 1993).

1) Calcinação do pó de hidroxiapatita ($\text{Ca/P} = 1,68 \pm 0,02$) a $1000^{\circ}\text{C}/2\text{h}$ para a obtenção da hidroxiapatita pura, calcinação do pó de hidroxiapatita ($\text{Ca/P} = 1,49 \pm 0,02$) a $1300^{\circ}/2\text{h}$ para obter α - TCP e por $1000^{\circ}\text{C}/2\text{h}$ para obtenção da fase β - TCP. Os padrões de DRX das amostras padrões calcinadas são apresentados na Figura A1.

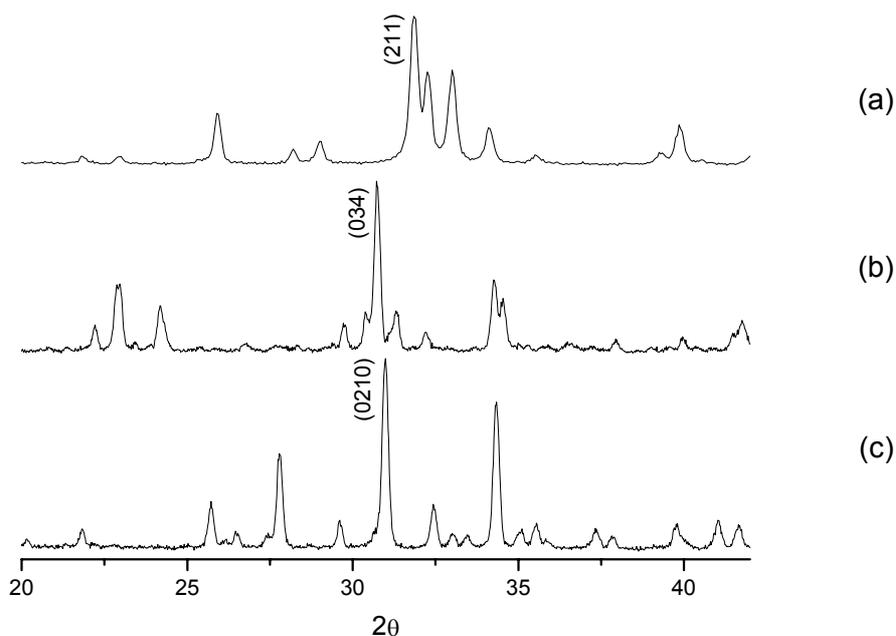


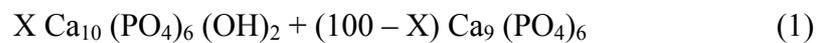
Figura A.1 – Padrões de DRX: (a) HA calcinada a 1000°C ; (b) α - TCP obtido a 1300°C e (c) β - TCP obtido a 1000°C .

2) Misturas dos pós padrões de HA com α - TCP e HA com β - TCP de composição conhecida, na faixa de 20 a 80% em peso de HA.

3) As linhas de difração selecionadas, foram os planos (2 1 1) para HA ($2\theta = 31,8$), (0 2 10) para β - TCP ($2\theta = 31,0$) e (0 3 4) para α - TCP ($2\theta = 30,7$). A escolha foi baseada nas seguintes considerações: são as linhas mais intensas de cada fase, e representa a cristalinidade de cada fase. Os padrões de DRX indicando a posição dos picos de cada fase, foram mostrados na figura A1.

4) Construção das curvas de calibrações

Sabendo-se X é a porcentagem de HA na mistura a 1000°C e $(100 - X)$ a porcentagem de β - TCP a 1000°C ou α - TCP a 1300°C , a composição da mistura é determinada por:



A relação entre a razão atômica Ca/P e X pode ser determinada por:

$$\text{Ca/P} = 900 + X/600 \quad (2)$$

As razões de intensidades relativas (RIR) das linhas mais intensas foram calculadas pelo parâmetro ρ .

$$\rho_{\beta} = \frac{I_{211}(\text{HA})}{I_{211}(\text{HA}) + I_{0210}(\beta - \text{TCP})} \quad (3)$$

$$\rho_{\alpha} = \frac{I_{211}(\text{HA})}{I_{211}(\text{HA}) + I_{034}(\alpha - \text{TCP})} \quad (4)$$

As Tabelas A.1 e A.2 apresentam as misturas padrões preparadas para as curvas de β - TCP, α - TCP, os valores de intensidades integradas obtidas a partir dos difratogramas dos padrões de HA, β - TCP e α - TCP e os valores de ρ (RIR).

Tabela A.1 – Mistura dos Padrões HA e β - TCP e os valores de intensidade e de intensidade relativa (RIR).

Padrão	%HA	% β - TCP	$I_{HA(211)}$	$I_{\beta - TCP(0210)}$	ρ (RIR)
A	20	80	355	1514	0,190
B	30	70	553	1347	0,291
C	40	60	801	1145	0,412
D	50	50	1066	984	0,520
E	60	40	1265	840	0,601
F	70	30	1475	557	0,726
G	80	20	1635	351	0,823

Tabela A.2 – Mistura dos Padrões HA e α - TCP e os valores de intensidade e de intensidade relativa (RIR).

Padrão	%HA	% α - TCP	$I_{HA(211)}$	$I_{\alpha - TCP(034)}$	ρ (RIR)
A	20	80	420	1222	0,256
B	30	70	574	1050	0,353
C	40	60	644	816	0,441
D	50	50	733	725	0,502
E	60	40	946	641	0,596
F	70	30	1087	543	0,666
G	80	20	1268	412	0,754

Quando valores de X são plotados em função dos valores de ρ (RIR), uma reta pode ser ajustada aos pontos, como mostra as figuras A3 e A4, determinando as seguintes equações:

$$X_{\beta} = 94,516 \rho + 1,891 \text{ para } \beta - \text{TCP} \quad (5)$$

$$X_{\alpha} = 122,749 \rho - 12,63 \text{ para } \alpha - \text{TCP} \quad (6)$$

com coeficientes de correlações iguais a 0,99926 e 0,99892 respectivamente.

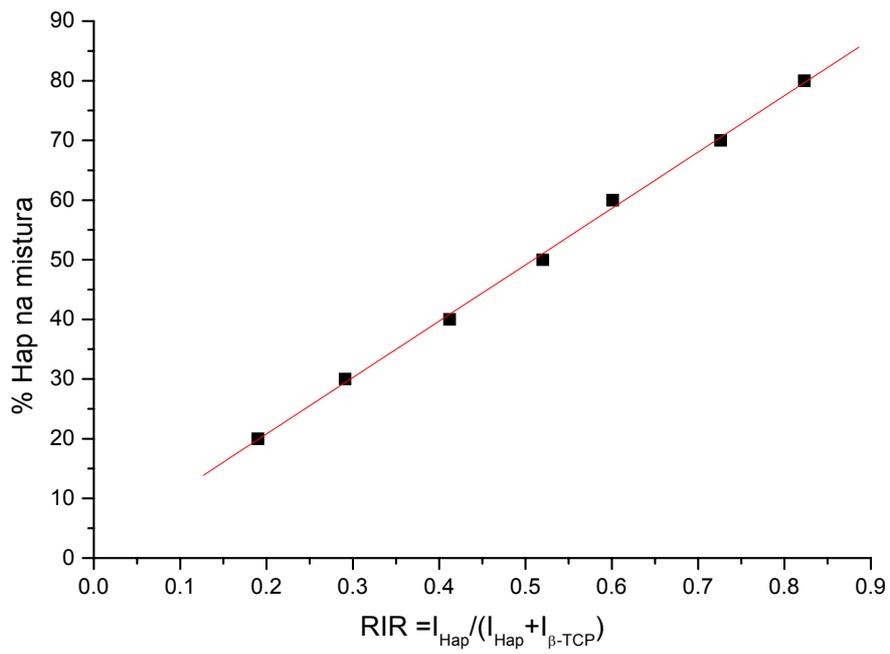


Figura A.2 – Curva de Calibração para β - TCP.

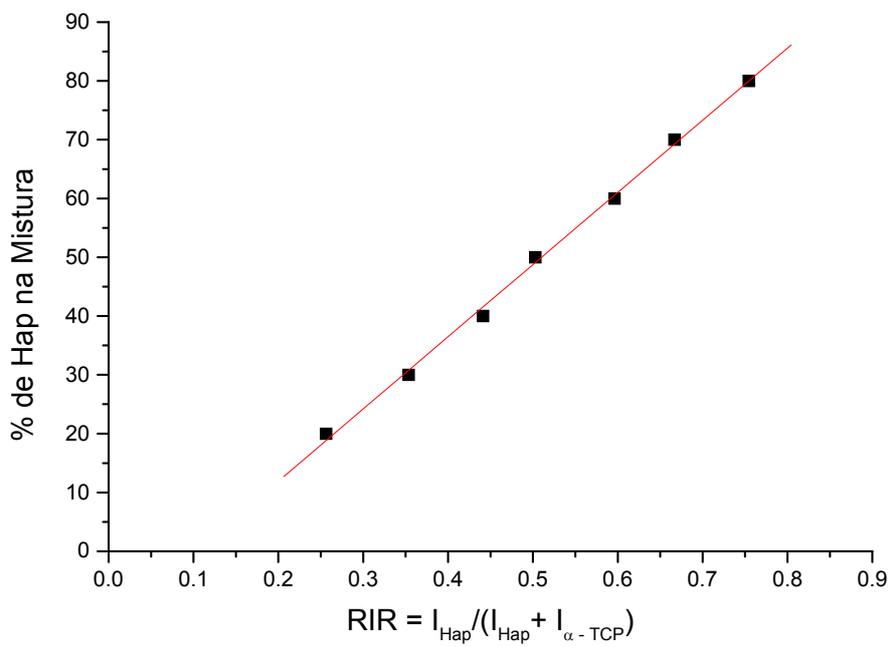


Figura A.3 – Curva de Calibração para α - TCP.

Substituindo os valores de X das equações (5) e (6) na equação (2), obtém-se as razões Ca/P em função de ρ para β - TCP e α - TCP respectivamente.

$$\text{Ca/P} = 0,157 \rho + 1,503 \quad (7)$$

$$\text{Ca/P} = 0,205 \rho + 1,479 \quad (8)$$

Aplicando essas equações no cálculo das razões atômicas Ca/P das hidroxiapatitas estudadas, foi observado que não ocorreu mudança nos valores das razões, quando comparado com as razões obtidas pela análise química.

ANEXO 2

Espectros de IV de β - TCP e α - TCP

Os espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier (EIV) de β - TCP e α - TCP obtidos pela técnica de refletância difusa são apresentados na Figura A.1. Esses espectros obtidos pela calcinação do pó de HA foram considerados como referências para as análises dos espectros de IV das hidroxiapatitas estudadas neste trabalho.

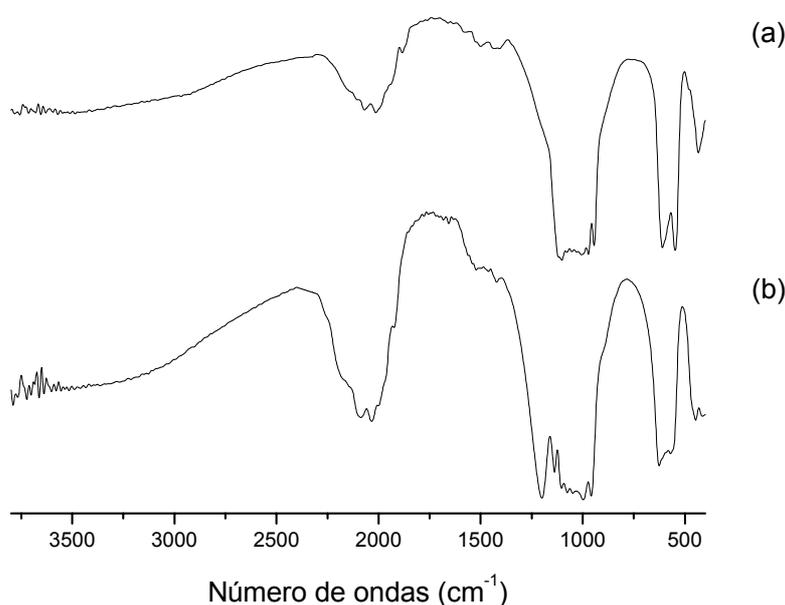


Figura A.1 – Espectros de EIV: (a) β - TCP e (b) α - TCP.

Os picos identificados nos espectros estão mostrados na Tabela abaixo:

Espectro β -TCP, picos (cm^{-1})	Grupamento ou Fases
1506 e 1430	CO_3^{2-}
1120, 1078, 944 e 433	β -TCP
1102, 1055	β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
1030, 1003, 972, 608 e 540	β -TCP e β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
Espectro α -TCP, picos (cm^{-1})	Grupamento ou Fases
1532 e 1419	CO_3^{2-}
1202, 1137, 1105, 1077, 1051, 1000	α -TCP e β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
958, 626, 571 e 447	α -TCP

ANEXO 3

Quantificação das fases cristalinas nos padrões de DRX das amostras E-HA e CD-HA utilizando o método de Hugo Rietveld

O método de Hugo Rietveld utiliza os padrões de difração e, tem como característica fundamental a adoção de um modelo adequado ao estudo a realizar, que por meio de modelamento e refinamento permiti extrair dos padrões de difração informações detalhadas da estrutura cristalina e informações analíticas dos materiais. A qualidade do padrão de difração obtido para a fase em estudo é de fundamental importância, por ser ele comparado com o padrão de difração de referência. O método de Rietveld, usado para o refinamento da estrutura cristalina e das características do perfil da reflexão do fundo, foi uma das primeiras técnicas analíticas de difração de agregados policristalinos (HILL, 1987; McCUSKER et al., 1999).

O modelo estrutural adotado por Hugo Rietveld inclui vários tipos de parâmetros destacando-se (YOUNG 1995):

- a) Parâmetros de estrutura cristalina: coordenadas (x, y, z) da posição dos átomos na célula unitária, deslocamentos vibratórios dos átomos, densidade ocupacional das posições atômicas, dimensões (a, b, c) da célula unitária e ângulos (α , β , γ) entre os vetores.
- b) Parâmetros do perfil das reflexões: largura das reflexões, assimetria e forma.
- c) Parâmetros globais: função do fundo que engloba o comprimento de onda (α_1 , α_2) e o zero da escala 2θ .
- d) Parâmetros de intensidade: inclui o fator de escala, que ajusta a altura de todas as reflexões do padrão de DRX calculado às do padrão de DRX observado.
- e) Parâmetro de correção da orientação dos cristalitos da amostra.

Os parâmetros acima listados permitem que se calcule por meio de algoritmos, um padrão modelo adequado à fase que queremos estudar, o qual é comparado com o padrão observado e a diferença entre ambos é minimizada fazendo variar os parâmetros

no modelo estabelecido, utilizando o processo de refinamento baseado no princípio dos mínimos quadrados segundo a Equação a seguir:

$$S_y = \sum_i W_i (y_i - y_{ci})^2$$

(A.1)

onde:

W_i = fator de peso no ajuste $1/y_i$

Y_i = intensidade observada

Y_{ci} = intensidade calculada

A Equação (A.1) permite o ajustamento da intensidade em cada ponto minimizando o quadrado da diferença entre observado e calculado.

A solução fundamental para uma estrutura ou a refino de um padrão de difração é a intensidade dos picos de Bragg. A precisão da medida de intensidade do pico pode ser melhorada aumentando o número de passos ou a intensidade medida em cada passo (tempo) (YOUNG 1995).

Análise quantitativa de fases

Para a modelação e o ajuste dos padrões de DRX assim como a quantificação das fases presentes nos padrões (HA, α -TCP e β -TCP) das amostras E-HA e CD-HA dos três sistemas estudados (pó, denso e poroso) foi utilizado o programa FULLPROF (RODRIGUEZ – CARVAJAL, 1996). Para executar esse programa é necessário o conhecimento da estrutura cristalina das fases presentes na mistura (grupo espacial e os parâmetros estruturais), os dados do padrão experimental e os comandos de refinamento (dados de entrada).

O programa FULLPROF é um dos mais importantes programas para o refinamento de Rietveld e, pode ser obtido pela Internet. A última versão do FULLPROF se encontra disponível no seguinte endereço: <http://www-llb.cea.fr> .

O programa FULLPROF permite modelar padrões teóricos e refinar estruturas a partir de padrões experimentais. Utiliza difração de raios-X e neutrons. As principais

aplicações são: refinamento de estruturas cristalinas, estruturas magnéticas (difração de neutrons), análise quantitativa de fases, medição precisa de parâmetros reticulares, caracterização de texturas, investigações de deformações e tamanhos de cristalito.

A quantificação pelo método de Rietveld se baseia em três aspectos iniciais (PHILIPPO et al., 1997):

- 1) Cada estrutura cristalina tem seu próprio padrão de difração que é caracterizado pelas posições e intensidades de cada pico de difração.
- 2) A superposição dos padrões de difração faz-se por simples adição, sem interferência.
- 3) A integral da superfície do padrão de cada fase é proporcional à porcentagem da fase na mistura.

Os dados quantitativos são deduzidos de fatores de escala, após a superposição e minimização de diferenças de padrões medido e calculado, este obtido a partir de modelamento de cada fase na mistura.

Na análise quantitativa a fração ponderal das fases presentes na mistura é calculada pela Equação A.2

$$W_k = \frac{S_j Z_j M_j V_j / t_j}{\sum_i (S_i Z_i M_i V_i) / t_i}$$

(A.2)

onde:

S_j = são os fatores de escala de cada fase

Z_j = número de moléculas em cada célula unitária

M_j = massa molecular

V_j = volume de cada célula unitária

t_j = fator de Brindley para o contraste de absorção (tabelado)

Arquivos de entrada do refinamento

1) O primeiro arquivo de entrada é o padrão de difração de raios-X. Esse arquivo contém os dados do experimento, o passo entre as medidas e a lista das intensidades que foram calculadas ponto a ponto. Normalmente esse arquivo tem a extensão “**.DAT**”.

2) O segundo arquivo (nome da amostra **.PCR**) contém os dados do experimento e da amostra (como os grupos espaciais indicando as posições atômicas dos cristais investigados como também os parâmetros cristalinos de cada fase).

O processo de refinamento implica em editar um número de vezes o arquivo com extensão PCR até que se refinem poucos parâmetros e gradualmente se vai ajustando o calculado (experimental), à medida que se refina mais e mais parâmetros instrumentais, cristalográficos e da amostra.

Arquivos de saída do refinamento

1) Arquivo de extensão “**.SUM** ”: contém de forma reduzida o resultado do refinamento dos parâmetros”.

2) Arquivo de extensão “**.OUT** ”: contém todos os resultados e os cálculos que foram gerados no refinamento.

3) Arquivo de extensão “**.Prf** ”: contém os padrões de difração de raios-X calculado simulado e a diferença entre os dois.

O refinamento das amostras E-HA e CD-HA dos três sistemas estudados (pó, denso e poroso) foi feito utilizando-se arquivos de entrada elaborado pelo pesquisador Carlos André do NUCAT/PEQ.