ESTUDO TEÓRICO - EXPERIMENTAL DE DUAS SOLUÇÕES PARA TESTES DE BIOATIVIDADE E REVESTIMENTO DE METAIS

Cristiane Xavier Resende

DISSERTAÇÃO 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 MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Prof. Glória de Almeida Soares, D.Sc.

Prof. Ericksson Rocha e Almendra, D.Sc.

Prof. Gustavo Mendes Platt, D.Sc.

Prof. Nelson Heriberto Almeida Camargo, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL FEVEREIRO DE 2007

RESENDE, CRISTIANE XAVIER

Estudo Teórico - Experimental de duas Soluções para Testes de Bioatividade e Revestimento de Metais [Rio de Janeiro] 2007

XV, 82 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2007)

Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE.

1.Titânio

- 2. Bioatividade
- 3. Revestimento

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

"Se você quer os acertos, esteja preparado para os erros"

(Carl Yastrzemski)

"Você não pode ensinar nada a um homem; você pode apenas ajudá-lo a encontrar a resposta dentro dele mesmo"

(Galileu Galilei)

À mamãe, Homeriza, por ser a maior ensinadora da minha vida, pela sua simplicidade, humildade e pelo esforço que fez para que eu pudesse realizar mais um sonho. Te amo!!!

À memória de papai, Dudé, que sempre estará vivo dentro de mim.

À Rogério pela dedicação, amor e por tornar as coisas mais simples.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida

À Professora Glória pelo acolhimento, preocupação com a minha estada aqui no Rio e orientação. Te admiro pelo jeito com que vê a ciência.

Ao professor Ivan pela orientação e discussões durante a realização desse trabalho.

Ao grande Euler por ter me acolhido, desde os primeiros dias que cheguei ao Rio. Te adoro menino!!!

À Márcia Sader pela amizade, discussões e, principalmente, pela facilidade com que resolve as coisas.

À família Russoni pelo acolhimento, principalmente, nos momentos que só precisava de um aconchego familiar. Em especial à Ingrid, pelos momentos de descontração e pela sua amizade. Te adoro menina.

Aos meus irmãos pela união, incentivo e por compreenderem a minha ausência em momentos importantes de suas vidas. Vocês são os responsáveis por mais uma conquista. Amo vocês, Clara, Dora, Bete, Rose, Cristina, Wagner e Wagson.

Aos amigos do laboratório pela convivência e aprendizado: Alessandro, Aline, Doris, Euler, Fabíola, Helena, Ingrid, Lígia, Márcia, Manu, Sinara e as calouras, Tarsila e Larrisa.

Á Lídia pela sua simplicidade e acolhimento, além das análises de DRX.

À Aline pelo auxílio durante a análise de AAS.

Ao Marcelo pelas explicações durante a análise de XPS.

Ao Professor Farias por disponibilizar o UV-Vis.

Aos amigos da turma de mestrado por tudo que passamos durante as disciplinas. Moniquinha, Fernanda, Cleciano, Carla, Felipe, Milena, Gerfesson, Rayland, João e Maria.

À colônia Sergipana, por tornar o ambiente familiar: Marcelo, Marília, Euler, Jerê, Micheli, Iran, Shirleny, Izabel, Led, Milena, Angélica e Nilson.

À professora Neide por ser tão especial e pelos ensinamentos.

Aos amigos de Sergipe que ficaram na torcida, especialmente a Tatá, Mael, Jack, Nessa, Carlos.

Aos professores Eunice e Reinaldo, que me orientaram durante a graduação e me apresentaram ao mundo da pesquisa. Obrigada.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ESTUDO TEÓRICO - EXPERIMENTAL DE DUAS SOLUÇÕES PARA TESTES DE BIOATIVIDADE E REVESTIMENTO DE METAIS

Cristiane Xavier Resende

Fevereiro/2007

Orientadores: Glória de Almeida Soares Ivan Napoleão Bastos

Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Foi estudada a substituição da solução clássica que simula o fluido corpóreo acelular, SBF, por uma solução avaliadora de bioatividade, SAB, de composição mais simples, visando revestir superfícies de titânio. Por meio de simulações computacionais foi estudado teoricamente o equilíbrio químico das espécies envolvidas e a estabilidade de fosfatos de cálcio na SAB, que são fatores que influenciam na deposição biomimética. Nos ensaios experimentais foram utilizadas amostras de titânio ativadas com NaOH 5,0 M e tratadas a 600 °C por 1 hora. Posteriormente elas foram imersas nas soluções SAB e SBF durante 1, 7, 14, 21 e 28 dias a 37°C. Em seguida as soluções foram analisadas por espectroscopia de absorção atômica e espectroscopia de ultravioleta-visível para quantificação do cálcio e fósforo, respectivamente. As superfícies foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, espectroscopia de infravermelho, difração de raios-X e espectroscopia de fotoelétrons por raios-X. Observou-se que as amostras imersas na SAB já estavam revestidas com 7 dias de imersão, enquanto que para a SBF o revestimento só foi obtido após 14 dias, o que mostra a eficiência da SAB para revestir superfícies metálicas. O fosfato de cálcio obtido experimentalmente com a SAB, neste caso o fosfato octacálcio, foi previsto teoricamente nas simulações. Nenhum precipitado foi observado sobre o controle negativo (Ti sem tratamento químico) após exposição na SAB, o que indica a possibilidade de utilização dessa solução para avaliar a bioatividade.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

EXPERIMENTAL AND THEORETICAL STUDY OF TWO SOLUTIONS FOR BIOACTIVITY TESTS AND COATINGS ON METALS

Cristiane Xavier Resende

February/2007

Advisors: Glória de Almeida Soares Ivan Napoleão Bastos

Department: Metallurgy and Materials Engineering

A new solution for bioactivity evaluation (SBE) of coated Ti surfaces was investigated. This solution was compared to the conventional simulated body fluid (SBF). The chemical equilibrium and calcium phosphate stability in SBE, which are important parameters to biomimetic deposition, were studied by computational simulation. Titanium samples were chemically treated in 5.0M NaOH and heated at 600°C for 1 h. The specimens were soaked in SBE and SBF solutions for 1, 7, 14, 21 and 28 days at 37°C. Calcium and phosphorus concentrations were determined by atomic absorption spectroscopy and spectrophotometry ultraviolet-visible, respectively. Further, the samples were analyzed by scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, X-ray diffraction analysis, X-ray photoelectron spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. Uniform octacalcium phosphate (OCP) coatings were formed in SBE after 7 days. However, similar layers were obtained in SBF only after 14 days. These results confirm that SBE is able to cover metallic titanium surfaces. As expected by the calculations, OCP layers were formed using SBE. Also SBE can be suitable to bioactivity evaluation because it was not observed any calcium phosphate layer formation onto non-treated Ti samples.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	3

CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 - Biomateriais	. 4
2.1.1 - Classificação dos Biomateriais	5
2.1.2 - Fosfatos de Cálcio	7
2.1.3 - Titânio e suas Ligas	13
2.2 - BIOMIMETISMO	15
2.2.1 - Soluções Simuladoras do Fluido Corpóreo	16
2.2.2 - Processo de Nucleação dos Fosfatos de Cálcio	19

CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA	
3.1 - SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DA SOLUÇÃO AVALIADORA DE BIOATI	VIDADE (SAB)
	25
3.2 - MATERIAIS	
3.3 - MÉTODOS	
3.3.1 - Preparação das Amostras de Titânio	
3.3.2 - Preparação das Soluções para Testes de Bioatividade	
3.4 - CARACTERIZAÇÕES	

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO
4.1 - Estudo Teórico da Precipitação de Fosfato de Cálcio na Solução
AVALIADORA DA BIOATIVIDADE (SAB)
4.2 - Estudo Experimental da Formação de Fosfato de Cálcio na Solução Avaliadora de Bioatividade (SAB) E SBF
4.3 - Considerações Finais

|--|

,	A	
$C \land DITII \land C$		72
CAPITULUO	KEFEKENUIAS	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1- Solubilidade de várias fases de fosfatos no sistema Ca(OH) ₂ -H ₃ PO ₄ -H ₂	$_{2}O$
em função da concentração de cálcio e pH (5525148, 1996)	. 9

Figura 3. 1 – Tela principal do programa utilizado neste trabalho, SimSe. 26

Figura 4. 2 - Grau de supersaturação do OCP e HA na SAB, em função do pH. 37

Figura 4. 7 - Espectros da superfície do	substrato após tratamento	alcalino: (A) EDS e
(B) DRX		

Figura 4.	11	- M	licrogr	afias,	MEV,	das	amostras	s de	Ti	com	21	dias	de	imersão	SAB
(esquerda) e S	BF	⁻ Kokub	o (dir	eita) c	om a	umentos	dife	ren	tes	•••••			•••••	50

Figura 4. 13 - Micrografia,	da amostra imersa n	a SAB por 7 dias	, com detalhes	sobre o
crescimento do revestimente	<i>э e os mapas</i>			53

Figura 4.	14 -	Micrografia	е	EDS	do	Ti	sem	tratamento	químico	após	14	dias	de
imersão na	i SAB		••••										54

Figura 4. 15 - FTIR do Ti ativado após imersão na SAB em diferentes tempos...... 55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2. 1 - Características das principais fases de fosfato de cálcio (DOROZHKIN e
<i>EPPLE</i> , 2002)
Tabela 2. 2 - Freqüências de vibração ativa em infravermelho da HA e OCP
(SLOSARCZYK et al., 2005, STOCH et al., 2000, MARQUES, 2003, MARKOVIC et al.,
2004)
Tabela 2. 3 - Comparação do módulo de elasticidade do osso com materiais utilizados
como implantes (RATNER, 2004) 14
Tabela 2. 4 - Concentrações das espécies auímicas, em mmol L^{-1} , das soluções
simuladas em comparação com o plasma sanguíneo (modificada de Marques, 2003). 17
Tabela 3-1 - Ordem de adição dos reagentes auantidade e grau de pureza para
preparar 11 da solução SRF convencional
preparar 12 au solação 521 contenencional
Tabela 3. 2 - Reagentes utilizados para preparar 1 L da SAB
Tabela 4 1 - Composição original da SAB em comparação com SAB modificada SAB1
e SAB2 utilizada nas simulações teóricas
e 5/102 anneau nus sinauções reorieus
Tabela 4. 2 - Composição dos elementos da superfície do Ti ativada após imersão na
SBF

LISTA DE SÍMBOLOS

Ti-cp	Titânio comercialmente puro
OCP	Fosfato octacálcio
HA	Hidroxiapatita
CDHA	Hidroxiapatita deficiente em cálcio
DCPA	Hidrogenofosfato de cálcio anidro
DCPD	Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
β- ΤСΡ	β-fosfato tricálcio
α- ΤСΡ	α-fosfato tricálcio
Ca/P	Razão cálcio-fósforo
TRIS	(Tri-hidroximetil)aminometano
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
S/V	Razão area-volume
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
DRX	Difração de raio-X
UV-Vis	Espectroscopia de ultravioleta-visível
AAS	Espectroscopia de absorção atômica
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
S	Área do substrato
NaOH	Hidróxido de sódio
SAB	Solução avaliadora da bioatividade
SBF	Fluido corpóreo simulado
SimSe	Simulador de soluções eletrolíticas

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Alguns materiais artificiais implantados no osso tendem a ser encapsulados com tecidos fibrosos que os isolam do contato direto com a matriz óssea. Conseqüentemente, eles não aderem ao osso devido à ausência de ligação química na interface material/tecido ósseo. Dentre os materiais que apresentam tais características estão o titânio e suas ligas, o aço inoxidável, as ligas de Co-Cr-Mo e o polietileno, que são considerados bioinertes (KOKUBO *et al.*, 2004).

Por volta de 1970, Hench *et al.* mostraram que o osso pode se ligar espontaneamente com alguns biovidros, sem que eles sejam encapsulados com fibras. Esses biovidros ou ainda todos os materiais que apresentam características semelhantes são conhecidos como bioativos, visto que são capazes de promover a ligação entre o osso e o implante, e ainda, em alguns casos, podem induzir uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo. Dessa forma, o tecido ósseo é capaz de interagir intimamente com o material implantado sem a intervenção da camada de tecido fibroso (LEGEROS, 2002, SHIRTLIFF e HENCH, 2003). Os biovidros, vidros cerâmicos e alguns fosfatos de cálcio, bem como as apatitas são exemplos desses materiais.

Segundo KOKUBO *et al.* (2000), um dos pré-requisitos para um material ligar-se ao osso é a formação de uma camada de apatita biologicamente ativa na interface material/osso, usualmente conhecida como *"bone-like apatite"*. Tal camada de apatita é similar à fase mineralizada do tecido ósseo, em composição e estrutura. Acredita-se que ela atua como sinalizadora de proteínas e células para iniciar a cascata de eventos que resulta na formação da estrutura óssea. Ou seja, os osteoblastos, células ósseas responsáveis pela produção do tecido ósseo, proliferam preferencialmente e se diferenciam produzindo apatita e colágeno sobre a camada de apatita formada

anteriormente, o que favorece a união do implante com o osso. Quando isso ocorre, uma ligação química é formada entre o osso e a camada de apatita, reduzindo a energia interfacial entre elas (KOKUBO *et al.*, 2003).

Desde então, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de avaliar *in vitro*, por meio de testes de bioatividade, a capacidade de formação da camada de apatita biológica sobre a superfície de diversos materiais, prevendo, assim o potencial bioativo de cada um deles. Os testes *in vitro* de bioatividade se tornaram muito populares a partir da década de 90 pela sua relativa simplicidade. Entretanto, os resultados nem sempre apresentam uma boa reprodutividade, conseqüentemente, não são claramente compreendidos, o que dificulta bastante o estabelecimento de uma relação de unicidade entre os resultados *in vitro* e o comportamento *in vivo*.

Um teste usual de bioatividade consiste na utilização de uma solução que simula o fluido corpóreo acelular ou ainda de soluções supersaturadas de íons cálcio e fósforo. Contudo, a simulação do comportamento dos materiais *in vitro* desconsidera vários fatores devido à dificuldade de reproduzir fielmente os parâmetros biológicos. Apesar dessa dificuldade, os testes *in vitro* são imprescindíveis por questões éticas e econômicas, bem como por serem capazes de estabelecer possíveis mecanismos da interação interfacial entre o implante e o tecido ósseo (MASUDA *et al.*, 1998, FUJIBAYASHI *et al.*, 2003). As informações obtidas nesta fase são particularmente úteis como uma etapa preliminar à realização dos testes *in vivo*.

A presente pesquisa se insere no conjunto de estudos voltados para a produção de materiais artificiais usados na correção ou substituição de partes danificadas do corpo humano. Especificamente, toma como objeto a análise de mecanismos químicos, como a formação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície de implantes metálicos, que são considerados facilitadores da ligação entre o implante e o organismo vivo. Assim, compreender as reações do organismo ao material implantado exige um esforço no sentido de rever as contribuições da literatura já produzida sobre esse assunto.

1.1 - Justificativa e Objetivo

Neste trabalho, foi avaliada a possibilidade da utilização de uma solução proposta por (BASTOS *et al.*, 2005) nos testes de bioatividade. Essa solução foi nomeada avaliadora de bioatividade (SAB), que é constituída por um número menor de reagentes quando comparada com a solução convencional de Kokubo (SBF, fluido corpóreo simulado), que é a mais utilizada nos testes *in vitro*. A SAB além de ser mais simples no que se refere ao modo de preparação, também apresenta baixo custo, o que está relacionado com a menor quantidade de reagentes utilizados. Também é importante ressaltar que esta solução não é isotônica em relação aos fluidos corporais.

Neste sentido, os objetivos principais desta dissertação foram:

- Estudar teoricamente a fase de fosfato de cálcio mais estável na SAB por meio da variação da energia livre de Gibbs, ΔG, e outros parâmetros termodinâmicos. Para tanto, foi utilizado um programa computacional desenvolvido por PLATT e BASTOS (2006), denominado SimSe.
- Caracterizar os revestimentos obtidos com a SAB e SBF, por meio da deposição biomimética.
- Avaliar se a SAB poderá ser utilizada nos testes de bioatividade;
- Realizar experimentos com a solução clássica, SBF, para comparar os resultados com os da solução proposta.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Biomateriais

Vários achados arqueológicos comprovaram que a preocupação do homem em restaurar ou substituir partes danificadas do tecido ósseo é uma prática muito antiga. Como exemplo, podemos citar a utilização do ouro na odontologia por astecas, romanos e chineses por volta do ano 5. Implantes de ferro também foram encontrados em um cadáver na Europa, o qual foi datado como sendo do ano 200. Outros dados demonstraram que os maias já produziam dentes obtidos de conchas do mar em torno de 600. Foi demonstrado que alguns tipos de implantes promoveram a integração com o osso (RATNER, 2004). Apesar de serem empregados desde a antigüidade, só após a Segunda Guerra Mundial e com os conhecimentos de ciências dos materiais é que houve grande avanço no desenvolvimento de biomateriais.

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas realizada em 1982, os biomateriais são definidos como toda substância (com exceção de drogas ou fármacos) ou combinação de substâncias, de origens naturais ou sintéticas, que, durante um período de tempo indeterminado, são empregados como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais. Assim, é um material não-tóxico usado como aparelho médico caracterizado por interagir com sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987).

Para um material ser enquadrado na categoria de biomateriais ele deve apresentar algumas características como: ser compatível com o organismo vivo de forma a provocar a mínima reação adversa ao organismo; além disso, o material deve ser biofuncional, ou seja, deve ser capaz de exercer a função que lhe é incumbida como se fosse próprio do organismo.

2.1.1 - Classificação dos Biomateriais

Os biomateriais utilizados clinicamente induzem diferentes respostas do tecido e, em função do tipo de interface tecido/implante desenvolvida, podem ser classificados em:

Bioinertes

São materiais que são tolerados pelo organismo e que praticamente não liberam nenhum tipo de componente. No entanto, esses materiais tendem a ser envolvidos por uma cápsula fibrosa que o isolam do meio vivo. A espessura da camada fibrosa depende de muitos fatores como as condições do implante, tecido e carga mecânica existente na interface (HENCH e WILSON, 1993, CASTNER e RATNER, 2002).

Bioativos

São os materiais que favorecem a ligação química entre o material implantado e o tecido ósseo (osteointegração), sem a presença de invólucros fibrosos. Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio de recobrimento por células ósseas. Quando o material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorrem na interface implante/tecido. Essas reações eventualmente resultam em uma ligação interfacial de natureza química e não física (HENCH e WILSON, 1993). Os materiais bioativos podem ainda serem classificados em:

Materiais Osteoindutores- são materiais que promovem uma resposta intracelular e extracelular na interface. Por meio desse processo uma superfície bioativa é colonizada pelas células troncos livres no ambiente defeituoso como resultado de

intervenções cirúrgicas. Como exemplo estão os biovidros que podem ligar-se com tecido macio e também com o osso.

Materiais osteocondutores- Os materiais osteocondutores promovem uma superfície biocompatível que favorece o desenvolvimento das células ósseas. Isso ocorre quando um material promove somente uma resposta extracelular na interface. Como exemplo podemos citar a hidroxiapatita sintética (CAO e HENCH, 1996).

Reabsorvíveis

Implantes reabsorvíveis são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo após certo período de contato com o tecido. Esses materiais são muito importantes em aplicações clínicas em função de serem desnecessárias novas intervenções cirúrgicas para a retirada do material implantado. São exemplos desses materiais os fosfatos tricálcio (HENCH e WILSON, 1993).

Segundo SHIRTLIFF e HENCH (2003) a classificação de biomateriais em bioinertes ocorreu na primeira geração de biomateriais cuja meta principal era conseguir uma combinação das propriedades que fossem próximas a do tecido que seria substituído, de forma a provocar a mínima reação tóxica possível. Já os materiais reabsorvíveis e bioativos pertencem à segunda geração de biomateriais. Desde então, vários materiais foram enquadrados em uma dessas categorias, o que promoveu um avanço na produção de dispositivos para aplicações biomédicas, e conseqüentemente uma melhora na qualidade de vida das pessoas. Apesar desse avanço, observou-se que tais materiais possuíam vida curta e falhavam em torno de 10-25 anos após implantado, o que levava o paciente a uma outra intervenção cirúrgica. Além disso, eles não respondem a uma mudança fisiológica ou estímulo bioquímico, ao contrário do tecido vivo. Devido a essas limitações surgiu recentemente a terceira geração de biomateriais que tem como foco principal melhorar a capacidade de regeneração do tecido pela estimulação de genes, os quais iniciam o reparo do tecido danificado ou doente.

2.1.2 - Fosfatos de Cálcio

Alguns fosfatos de cálcio têm sido muito utilizados nestes últimos anos como biomateriais, principalmente, porque muitas das suas fases químicas estão presentes em alguns tecidos como, por exemplo, nos ossos e dentes. Entretanto, os fosfatos podem cristalizar-se irregularmente em regiões indesejáveis dando origem às calcificações patológicas (como a osteoporose, cálculo urinário, e a cárie dental que resulta da substituição de uma apatita dura e menos solúvel por uma mais solúvel (DOROZHKIN e EPPLE, 2002). Dentre os fosfatos de cálcio mais importantes para aplicações biomédicas estão hidrogenofosfato de cálcio dihidratado [CaHPO4.2H₂O, DCPD], hidrogenofosfato de cálcio anidro [CaHPO4, DCPA], fosfato de cálcio amorfo [ACP], fosfato octacálcio [Ca₈ H₂ (PO4)₆.5H₂O, OCP] e hidroxiapatita [Ca₁₀ (PO4)₆ (OH)₂, HA] (LEGEROS, 1991, ELLIOTT, 1994). Além disso, esses fosfatos têm sido identificados como as principais fases que se precipitam durante os testes de bioatividade realizados *in vitro*. Na Tabela 2.1 estão apresentadas algumas características importantes das principais fases de fosfatos de cálcio.

Tabela 2. 1 - Características	das principais	fases de	fosfato	de cálcio	(DOROZHKI	N e
EPPLE, 2002).						

Nome	Fórmula	Razão molar Ca/P	Solubilidade a 37°C, -log(K _{ps})		
Hidroxiapatita (HA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	117,2		
Hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA)	$Ca_{10-x} (HPO_4)_x (PO_4)_{6-x} (OH)_{2-x} (0 < x < 1)$	1,5-1,67	85,1		
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\operatorname{Ca}_{x}(\operatorname{PO}_{4})_{y}.n\mathrm{H}_{2}\mathrm{O}$	1,2-2,2	-		
α -Fosfato tricálcio (α- TCP)	α -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	25,5		
β- Fosfato tricálcio (β- TCP)	β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	29,5		
Fosfato octacálcio (OCP)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ .5H ₂ O	1,33	95,9		
Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	CaHPO ₄ .2H ₂ O	1,0	6,63		
Hidrogenofosfato de cálcio anidro (DCPA)	CaHPO ₄	1,0	7,02		

As fases de fosfatos de cálcio dispostas na Tabela 2.1 podem ser precipitadas em soluções aquosas com exceção da α - TCP e β - TCP, que são obtidas a partir de uma outra fase quando submetida a tratamento térmico.

A razão cálcio/fósforo (Ca/P) é um parâmetro importante, pois com ela é possível determinar a fase de fosfato presente, bem como a sua solubilidade (VALLET-REGI e GONZALEZ-CALBET, 2004). Se a razão for menor que 1, a solubilidade é alta; o contrário ocorre se esta for próxima de 1,67.

É bem conhecido que o tipo de fase de fosfato formada vai depender das condições do meio, tais como: temperatura, pH, concentração de íons, razão molar Ca/P, dentre outros. Neste contexto, os diagramas de fases são úteis para ilustrar o mecanismo pelo qual a HA se forma por meio das reações de precipitação/dissolução e expressam a variação da solubilidade molar do componente mais relevante em função do pH. No caso dos fosfatos, a variação da solubilidade é expressa em termos do íon comum a todos os componentes, neste caso, o íon cálcio (BROWN, 1999). Além disso, este tipo de gráfico pode prever a fase de fosfato de cálcio mais estável sob condições especificas de pH e grau de supersaturação dos íons cálcio e fósforo. Como exemplo, podemos observar a estabilidade dos fosfatos de cálcio à temperatura ambiente (25 °C) em soluções aquosas no sistema Ca(OH)₂-H₃PO₄-H₂O como ilustra a Figura 2.1.



Figura 2. 1- Solubilidade de várias fases de fosfatos no sistema $Ca(OH)_2$ -H₃PO₄-H₂O em função da concentração de cálcio e pH (5525148, 1996).

Observa-se que dentre os sais de fosfato de cálcio a hidroxiapatita é a fase menos solúvel e, conseqüentemente, a mais estável, na faixa de pH 4,5-13. Já quando o pH da solução é inferior a 4,5, as fases com maiores estabilidades são DCPA (CaHPO₄) e o DCPD, (CaHPO₄.2H₂O), as quais predominam nessa faixa de pH.

Apesar de a hidroxiapatita ser a fase termodinamicamente mais estável em quase toda a faixa de pH mencionada, a sua velocidade de formação é menor do que o DCPD, DCPA, OCP, ACP, α - TCP e β - TCP. O processo de formação da hidroxiapatita pode ser acelerado com o aumento da concentração de fosfatos na solução, o que favorece uma elevação do pH da solução e, conseqüentemente, a precipitação (5525148, 1996).

Contudo, estudos experimentais sobre a formação dos fosfatos de cálcio em ambiente fisiológico não têm indicado claramente as condições específicas da formação dessas fases. Porém, alguns fatores, como por exemplo, a presença de algumas espécies iônicas tem sido considerada como interferente durante esse processo. Alguns desses fatores serão discutidos mais adiante.

Hidrogenofosfato de Cálcio Dihidratado (DCPD)

O DCPD, CaHPO₄.2H₂O, se encontra na natureza como o mineral bruxita e pode ser obtido normalmente em soluções de fosfatos de cálcio ligeiramente ácidas à temperatura ambiente. O DCPD pode se converter em DCPA quando exposto a uma temperatura superior à 80 °C. Uma das suas principais aplicações é revestir implantes metálicos utilizados na área ortopédica e, na forma de cimentos de fosfatos de cálcio, ele também pode ser utilizado na área odontológica. LU e LENG (2005) mostraram que esta fase tem sido encontrada como fase precursora da HA, ou fase metaestável do fosfato de cálcio. Esta fase é geralmente encontrada em calcificações patológicas como cálculo dental e pedras urinária (DOROZHKIN e EPPLE, 2002).

Hidrogenofosfato de Cálcio Anidro (DCPA)

O DCPA, CaHPO₄, existe na natureza como o mineral monetita, sendo também considerado um material precursor durante a formação da hidroxiapatita. Ele é utilizado como um dos componentes dos cimentos ortopédicos baseados em fosfatos de cálcio (MARQUES, 2003).

Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)

O fosfato de cálcio amorfo pode ser precipitado em soluções aquosas supersaturadas contendo íons, cálcio e fósforo, a pH elevado e temperatura ambiente. Depois de precipitado, o ACP também se converte em HA ou OCP. Em relação à sua estrutura cristalina, ainda existem muitas controvérsias, sendo, portanto, considerada uma fase difícil de ser caracterizada, principalmente porque se forma em várias soluções com composições variadas.

Fosfato Octacálcio (OCP)

O OCP, $Ca_8 (HPO_4)_2(PO_4)_4$.5H₂O, consiste de camadas apatíticas (com arranjo atômico dos íons cálcio e fósforo similar ao da HA) separadas por camadas hidratadas. Esta fase foi descorbeta por Berzelius em 1863, contudo a sua existência só foi aceita no final do século XX e a sua importância só foi observada no final da década de 50 (ELLIOTT, 1994). Acredita-se que o OCP desempenhe o papel de precursor da HA na mineralização óssea, devido a sua similaridade com essa fase, bem como a facilidade com que o OCP se transforma em HA. Alguns estudos sugerem a presença de OCP em dentes e ossos (SUZUKI *et al.*, 2006). Implantes de OCP tem sido utilizados, na forma de grânulos ou de revestimento de implantes metálicos, por facilitar o processo de formação óssea e promover o reparo de defeitos críticos no osso em testes *in vivo* (LIU *et al.*, 2007). Na Tabela 2.2 são apresentadas algumas bandas características tanto do OCP quanto da HA, no entanto, algumas bandas são típicas de apenas uma fase, neste caso, a fase identificada está entre parênteses. O parâmetro v indica a freqüência de ressonância de determinada molécula.

Tabela 2. 2 - Freqüências de vibração ativa em infravermelho da HA e OCP (SLOSARCZYK *et al.*, 2005, STOCH *et al.*, 2000, MARQUES, 2003, MARKOVIC *et al.*, 2004).

Bandas (cm ⁻¹)	Interpretação
3568-3574, 3550, 3536	OH (v ₁)
3500	H ₂ O
2400-3200	РО-Н
1635-1640	H ₂ O
1534-1548, 1455	CO_3^{2-} (v ₃) sítio A
1515	$\mathrm{CO}_3^{2-}\mathrm{AB}$
1350-1540, 1498-1500, 1470-1471, 1465-1467, 1449- 1460, 1414-1430, 1417-1419, 1410-1412, 1321	CO_3^{2-} sítio B
1143-1145	$\mathrm{HPO}_{4}^{2-}(v_{3})$
1138, 1126, 1108, 1105, 1075	HPO_4^{2-} (OCP)
1090-1100, 1096, 1088-1092, 1085, 1077-1081, 1052-1065, 1064, 1057-1061, 1048-1053, 1034-1046, 1041-1045, 1032- 1034, 1036, 999-1004, 1095, 960-1200 1038, 1022, 1025, 920	$PO_4^{3-}(v_3)$ $PO_4^{3-}(OCP)$
1020	HPO_{4}^{2-} (HA deficiente em Ca)
950-1000, 980-982, 959-966	PO_{4}^{3-} (v ₁)
878-883	CO_3^{2-} (v ₂) sítio A
872-877, 870	CO_3^{2-} (v ₂) sítio B
866-870	Vibração P-OH em HPO ₄ ²⁻
629-635, 342	OH
629-633, 614-615, 600-608, 590-592, 580-581, 573-574, 568	$PO_{4}^{3-}(v_{4})$
540-550, 520-535	HPO_4^{2-}
467-472, 446-450, 431-433	$PO_{4}^{3-}(v_{2})$

Hidroxiapatita (HA)

A HA, Ca_{10} (PO₄)₆ (OH)₂, é um dos materiais utilizados pelos vertebrados para compor o esqueleto, devido à sua capacidade de atuar como reserva de cálcio e fósforo. Além disso, a hidroxiapatita biológica contém ainda íons diversos, tais como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} e outros.

Além de ser considerada a fase mais estável em ambiente fisiológico, sendo, portanto, o componente principal do mineral ósseo, a HA possui propriedades de biocompatibilidade e bioatividade. Dessa forma, ela é capaz de favorecer o crescimento ósseo nos locais em que se encontra (osteocondutividade), estabelecer ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioatividade), permitindo assim a proliferação das células ósseas (osteoblastos, fibroblastos e outras), as quais não a distinguem da superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superfícial. Contudo, a baixa resistência mecânica dessas cerâmicas tem limitado suas aplicações como implantes (JARCHO, 1992).

A hidroxiapatita presente no tecido ósseo vivo se diferencia da obtida por métodos sintéticos por sua maior cristalinidade e a presença de substituições iônicas em sua estrutura. Essas peculiaridades desempenham um papel importante em seu comportamento biológico (LEGEROS, 1991). Dessa forma, as apatitas biológicas não são puras, visto que acomodam facilmente uma grande variedade de substituições catiônicas e aniônicas na sua estrutura, o que interfere nas suas propriedades cristalinas, morfológicas e os parâmetros de rede. Por exemplo, a incorporação de íons carbonato, CO₃²⁻, na estrutura da HA, dá origem à hidroxiapatita carbonatada e esse íon pode ser incorporado por meio de dois sítios, PO₄²⁻ substituição do tipo B e OH⁻ do tipo A (AOKI, 1994). Este último tipo de substituição ocorre em reações de síntese de HA realizadas a temperaturas elevadas e em atmosfera de dióxido de carbono, originando um material bastante cristalino, enquanto que o primeiro tipo ocorre nas reações de precipitação em meio aquoso e é referida por diminuir a cristalinidade e o tamanho do precipitado. As apatitas carbonatadas do tipo A são encontradas tipicamente em osso velho, enquanto que a do tipo B é mais abundante no osso jovem.

2.1.3 - Titânio e suas Ligas

O titânio foi descoberto em 1790 na Inglaterra pelo químico William Gregor ao analisar uma amostra de areia da região do vale de Manaccan na Cornualha. Ele pode ser encontrado sob mais de uma forma, pois possui propriedades alotrópicas. À temperatura ambiente, a sua estrutura cristalina mais estável é a hexagonal compacta (hc), a qual se constitui na fase α . Alguns elementos químicos estabilizam a fase β , a qual possui estrutura cúbica de corpo centrado (CCC) e que, no titânio puro, só é estável a temperaturas maiores que 883 °C.

Quimicamente, o titânio é um elemento de transição pertencente ao grupo 4 B da tabela periódica e ao quarto período. Possui camada de valência incompleta, o que confere a sua alta reatividade. Devido a sua alta reatividade, quando exposto, o titânio reage com o oxigênio formando espontaneamente um filme uniforme de óxido sobre a sua superfície (passivação espontânea). Geralmente, o óxido mais estável é o TiO₂ (LIU *et al.*, 2004).

Titânio e suas ligas têm sido muito utilizados para produzir componentes biomédicos, principalmente na área odontológica e ortopédica, pois exibem algumas propriedades interessantes como resistência à tenacidade ($40MPa.m^{1/2}$), biocompatibilidade, resistência à corrosão, estabilidade química em ambiente fisiológico e módulo de elasticidade mais próximo ao do osso, se comparado com o aço inoxidável ou com a liga de Co-Cr-Mo, Tabela 2.3 (FENG *et al.*, 1999, YAN *et al.*, 1997, AOKI, 1994). O que confere a biocompatibilidade e a resistência à corrosão do titânio e suas ligas é a existência de uma camada de óxido formada na sua superfície. Na Tabela 2.3 é apresentado o módulo de elasticidade de alguns materiais biomédicos.

Materias	Módulo de elasticidade (GPa)
Osso cortical	15,2-40,8
Ti-cp	110
Ti6Al4V	116
Aço inoxidável F138	190
Co-Cr-Mo	210

Tabela 2. 3 - Comparação do módulo de elasticidade do osso com materiais utilizados como implantes (RATNER, 2004).

Apesar das referidas propriedades interessantes, o titânio passivado não apresenta bioatividade, dificultando a ligação do implante com o osso, o que pode conduzir ao fracasso do mesmo a longo prazo. Essa característica limita o seu uso como um biomaterial. Por essa razão, várias metodologias têm sido desenvolvidas com o intuito de promover a bioatividade da superfície do titânio e de suas ligas. Isto pode ser possível quando estes materiais são submetidos a alguns tipos de pré-tratamento, incluindo tratamento térmico, tratamento com soluções alcalinas e ácidas.

Várias técnicas foram propostas com a finalidade de revestir substratos não bioativos com fosfatos de cálcio, já que estes possuem propriedades osteocondutoras e habilidade de ligar-se quimicamente com o osso vivo. Entretanto, os fosfatos são frágeis e apresentam baixa resistência à fratura, o que limita a sua utilização como implante. Por outro lado, embora os metais como titânio e suas ligas tenham propriedades mecânicas superiores, não se ligam ao osso, exceto sob condições específicas (YAN *et al.*, 1997). Segundo TAS (2000), a razão para revestir implante metálico com fosfato de cálcio é produzir uma superfície que promova o crescimento ósseo e induza uma maior velocidade na união direta entre o implante e o tecido ósseo.

Dentre algumas técnicas utilizadas, encontram-se sol-gel, *íon sputtering*, eletroforese, e o *plasma spray*, sendo que esta última tem sido utilizada para fins comerciais. Entretanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens, tais como: inexistência de ligação química entre o metal e o fosfato de cálcio, o que comprometerá a adesão do revestimento; impossibilidade de revestir implantes porosos, além da degradação dos fosfatos devido à elevada temperatura do processo, o que afeta a sua bioatividade e dificulta o controle da composição do revestimento (BARRERE *et al.*, 2001).

2.2 - Biomimetismo

No início da década de 70, iniciou a busca por implantes que agregassem tanto propriedades bioativas, apresentadas pelos fosfatos de cálcio, como também boas propriedades mecânicas, provenientes geralmente dos metais, sendo que o primeiro implante com essas características foi obtido em 1972. Desde então, algumas técnicas de recobrimentos foram propostas com a finalidade de conjugar as propriedades do titânio e suas ligas, como a sua resistência à fratura, que é cerca de 40 vezes maior do que a HA, com a bioatividade de algumas cerâmicas, para, dessa forma, obter um material compósito, o qual pode ser utilizado como biomaterial (AOKI, 1994).

Esse método, que foi desenvolvido por ABE *et al.* (1990), consiste na imersão do substrato em uma solução que simula a parte inorgânica acelular do fluido corpóreo, a fim de mimetizar o processo de formação de apatitas biológicas. Com tal método, podese avaliar a bioatividade de diversos materiais, além de ser utilizado para revestir materiais bioinertes (MULLER e MULLER, 2006). Esta técnica tem sido proposta por apresentar algumas vantagens em relação às demais (RIGO *et al.*, 1999, BARRERE *et al.*, 2002, LU e LENG, 2005, YAN *et al.*, 1997, LIU *et al.*, 2003). Por ser realizado em condições fisiológicas, a temperatura utilizada fica em torno de 37 °C, o que possibilita revestir materiais sensíveis à temperatura como os polímeros; apresenta baixo custo; pode ser utilizado para revestir materiais que apresentem geometria complexa; e os revestimentos apresentam boa uniformidade e adesão, devido à existência de ligação química que é responsável pela união do revestimento ao substrato, além disso, existe a possibilidade de incorporar moléculas orgânicas, como proteínas, na estrutura dos cristais A deposição biomimética de fosfatos de cálcio foi realizada sobre diferentes tipos de substratos como biovidro, sílica gel, titânio, tântalo, membranas de politetrafluoretileno e polietilenotereftalato (JIANG *et al.*, 2005).

A camada de apatita formada na superfície do titânio, quando em contato com o fluido corpóreo simulado, é mais próxima à composição do osso, se comparado com o revestimento obtido por *plasma spray* (LIANG *et al.*, 2003). Além disso, acredita-se que ela possua melhores propriedades osteocondutoras (BARRERE *et al.*, 1999).

Quando o método biomimético é utilizado para revestir implantes metálicos, um dos pontos críticos é a questão do tempo, que é considerado relativamente grande para recobrir todo o substrato. Em função dessa problemática, vários trabalhos têm sugerido alguns tratamentos com o objetivo de diminuir o tempo de formação da apatita, como por exemplo, imergir os substratos em soluções cujas concentrações são maiores que as dos fluidos corpóreos, ou apenas de algumas espécies (BARRERE *et al.*, 2002, STOCH *et al.*, 2000, KASUGA *et al.*, 2002).

2.2.1 - Soluções Simuladoras do Fluido Corpóreo

Algumas soluções, que simulam o fluido corpóreo simulado, têm sido preparadas com proteínas, visto que a adsorção de proteína na superfície dos biomateriais influencia o processo de mineralização, e constitui-se num dos primeiros passos de uma série de processos biofísicos e bioquímicos que determinam a resposta biológica do organismo ao biomaterial (MARQUES, 2003).

A proteína mais empregada com tal finalidade tem sido a albumina, pois ela é a mais abundante no sangue e também a proteína que possui vários sítios de ligação com o cálcio, o que pode interferir no processo de mineralização (MARQUES, 2003). Além do uso das proteínas, algumas soluções utilizadas no meio de cultivo (KIZUKI *et al.*, 2003) também têm sido empregadas para produzir uma camada de apatita sobre a superfície da

HA. Apesar desses parâmetros serem importantes não se constituem objeto de estudo nesta dissertação.

As soluções simuladoras do fluido corpóreo acelular, com concentração igual ou próxima à do plasma sanguíneo, têm reproduzido bem os resultados obtidos *in vivo* (KASUGA *et al.*, 2002).

Dentre as soluções desenvolvidas com a mesma finalidade, encontram-se a de Ringer (JUN *et al.*, 2003), Neuman (MARQUES, 2003) e a de Kokubo ((FENG *et al.*, 1999). Esta última é a que tem sido mais utilizada, pois é a que mais se aproxima da composição iônica do plasma, e está sendo proposta como uma norma ISO para avaliar se determinado material é bioativo, porém, até o momento, não foi aprovada. Sendo que as soluções simulam apenas a parte inorgânica acelular do fluido corpóreo, componentes como proteínas, glicose, vitaminas e outros são excluídos. A seguir, estão apresentadas na Tabela 2.4 as composições dessas soluções.

Tabela 2. 4 - Concentrações das espécies químicas, em mmol L^{-1} , das soluções simuladas em comparação com o plasma sanguíneo (modificada de Marques, 2003).

	Na ⁺	K^+	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl	HCO ⁻ ₃	HPO ₄ ²⁻	$\mathrm{SO_4}^{2-}$
Plasma sanguíneo humano	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
Kokubo (SBF convencional)*	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Kokubo (SBF revisada)**	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
Ringer	133,5	5,0	2,6	1,0	142,2	2,4	1,14	-
Neuman	125,0	25	0,48	0,4	130,0	24,0	1,8	-

*Tampão utilizado: tris-(hidroximetil)aminometano / ácido clorídrico

**Tampão utilizado: HEPES [2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil ácido sulfônico etano)].

É importante enfatizar que a quantidade de alguns íons como K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ e HPO₄²⁻ no fluido corpóreo pode variar de acordo com o sexo, idade e nutrição dos indivíduos e cada um desses desempenham papel importante durante o processo de formação óssea. O íon carbonato está presente no osso e pode variar em torno de ~ 3-8 % em massa de acordo com a idade do indivíduo.

Alguns autores propuseram soluções mais simples para revestirem a superficie de materiais bioinertes, devido, principalmente, à interferência de alguns íons no processo de mineralização dos fosfatos de cálcio. Segundo MARQUES (2003), as espécies mais importantes no processo de nucleação são Ca²⁺, PO₄²⁻ e H⁺, sendo que as espécies referidas como interferentes, ou seja, que inibem a cinética de formação das fases de fosfatos de cálcio, são Mg²⁺, Na⁺, K⁺ e HCO₃⁻. Apesar disto, elas conferem ao precipitado maior similaridade com a fase mineralizada do tecido ósseo.

O efeito do íon Mg^{2+} , no processo de mineralização *in vitro*, pode estar relacionado com a adsorção desses íons na camada do fosfato o que reduz a solubilidade do ACP (fosfato de cálcio amorfo), inibindo assim a sua conversão em OCP e/ou HA. Além disso, é conhecido que o aumento na concentração dos íons magnésio pode promover a formação do MgHPO₄.3H₂O em detrimento do OCP ou da HA. Quando a razão Mg/Ca é superior a 0,2, o processo de conversão do ACP \rightarrow HA é inibido (QUEIROZ, 2005).

BARRERE *et al.* (1999) estudaram várias composições de soluções simuladas com o propósito de avaliar a influência dos íons Mg^{2+} e HCO_3^- no processo de mineralização dos fosfatos de cálcio. Assim, eles observaram que a camada de apatita formada sobre a superfície do Ti 6Al 4V variou de acordo com a solução utilizada. Quando a solução era isenta dos íons Mg^{2+} e HCO_3^- , a camada de fosfato era densa e apresentava cristalitos alongados. Já quando apenas uma dessas espécies era excluída da solução, a camada de fosfato formada apresentava cristalitos menores, e não estava totalmente revestida, sendo que esse comportamento foi mais pronunciado quando o magnésio estava em solução. LU e LENG (2005) também se referem ao magnésio como um inibidor durante o processo de nucleação e crescimento dos fosfatos de cálcio em solução aquosa.

BASTOS *et al.* (2005) realizaram um estudo teórico, por meio de modelagem computacional, com duas soluções que simulam o fluido corpóreo. As soluções estudadas foram a de Kokubo e uma solução avaliadora de bioatividade, SAB, proposta pelos autores. As comparações realizadas mostraram que os perfis das propriedades termodinâmicas, coeficiente de atividade, variação da energia livre de Gibbs e produto

iônico, de ambas as soluções, apresentaram comportamento similares. Desta forma, os autores sugerem que a solução proposta pode ser uma forte candidata a ser usada em precipitação heterogênea, pois é mais simples e mais efetiva durante o processo de formação do revestimento.

LI *et al.* (2002) formularam uma solução simplificada composta pelos seguintes reagentes, NaHCO₃, CaCl₂ e NaH₂PO₄, que foi utilizada para revestir a superfície do titânio modificado quimicamente com NaOH. Os autores observaram que o NaHCO₃ aumentou o pH da solução gradualmente, elevando assim a supersaturação em relação aos íons cálcio, o que acelerou o processo de formação do revestimento. Por meio do método biomimético, foi possível obter revestimentos de fosfatos de cálcio com espessura na faixa de 30-40 μ m. Os autores também comentam que é possível alterar a composição do revestimento por meio da proporção de CaCl₂, NaH₂PO₄ e NaHCO₃ utilizada para preparar a solução.

O uso de azida de sódio, NaN₃, para conservar a SBF, foi proposto no trabalho de MULLER e MULLER (2006). Os autores demonstraram que a ausência de NaN₃ na SBF aumentou a densidade de células na forma de bactérias anaeróbias, as quais consomem fósforo na solução reduzindo a concentração desta espécie, que é importante no processo de formação do fosfato de cálcio.

2.2.2 - Processo de Nucleação dos Fosfatos de Cálcio

Embora numerosos estudos tenham sido conduzidos sobre o titânio a fim de compreender a formação da camada de apatita sobre a sua superfície, o seu mecanismo ainda não está definido (LU e LENG, 2004). Os mecanismos de formação de apatita sobre diversas superfícies são considerados essenciais para desenvolver materiais bioativos com novas funções físicas, químicas, e biológicas (KOKUBO *et al.*, 2000).

As dificuldades para entender este mecanismo está relacionada com as diferentes fases de fosfatos que podem ser precipitadas, dependendo de algumas condições da solução como concentração e pH. Para desenvolver estudos nesse campo, é importante utilizar soluções com composição variada (FENG *et al.*, 1999), nem que seja para entender pelo menos o papel da composição química no processo de deposição.

A superfície de alguns implantes metálicos, especificadamente do titânio, não induz naturalmente a nucleação de fosfato de cálcio em ambiente fisiológico simulado ou em soluções supersaturadas em cálcio e fósforo. Para contornar esta situação, vários métodos têm sido proposto para tratar a superfície do titânio de forma a ancorar alguns grupos específicos na sua superfície, que são responsáveis por induzir a nucleação dos fosfatos de cálcio. Dentre estes grupos, destacam-se as hidroxilas (Ti-OH, Si-OH, Zr-OH, Nb-OH, Ta-OH), carboxílas (-COOH) e os ortorfosfatos H₂PO₄⁻. Estes grupos funcionais possuem pares de elétrons livres que atraem os íons cálcio da solução formando assim uma camada de cálcio amorfo. Sendo que o método mais reportado na literatura é o tratamento alcalino com NaOH (ANDRADE, 1999, FENG *et al.*, 1999, LEE *et al.*, 2003) que promove a formação do TiOH, favorecendo assim a formação do revestimento de fosfato de cálcio quando imerso em solução que simula o fluido corpóreo ou supersaturada em cálcio e fósforo.

Outro método foi desenvolvido por BARRERE *et al.* (1999) e consiste de duas etapas para produzir tal revestimento na superfície do substrato. Nesse método, a superfície do substrato é pré-tratada com uma solução com alta concentração de fósforo e cálcio por um período curto de tempo, e depois é imersa na solução simulada ou supersaturada. A primeira etapa favorece a nucleação dos íons cálcio e fósforo, diminuindo assim o tempo de formação do revestimento. O método mais recente utilizado é a oxidação anódica, que consiste em produzir uma camada micro porosa de TiO₂ na superfície do titânio, o que acelera o processo de formação do fosfato de cálcio na superfície do substrato, minimizando o tempo de formação do revestimento (LU *et al.*, 2006).

Um dos mecanismos proposto para explicar a formação dos núcleos de fosfatos de cálcio sobre o titânio tratado com NaOH é descrito a seguir, e pode ser representado pela Figura 2.2.



Figura 2. 2 - Representação esquemática da interação do titânio ativado com a solução SBF. Adaptada de KOKUBO *et al.* (2007).

Quando o titânio é submetido a um tratamento alcalino, o óxido presente na sua superfície reage com NaOH presente na solução segundo a Equação 1.

$$NaOH + TiO_2 \rightarrow HTiO_3^- + Na^+$$
 (Eq. 1)

gerando assim uma camada de titanato de sódio amorfo, quando submetido a um tratamento térmico. Após imersão desse material em SBF, haverá troca iônica dos íons Na⁺ da camada amorfa com os íons H_3O^+ presentes na solução, o que resultará na formação de uma camada de Ti-OH sobre a superfície do titânio. Em virtude da troca iônica, o pH da solução aumentará, pois os íons H_3O^+ são removidos da solução, o que favorecerá o processo de nucleação de alguns fosfatos. Em seguida os grupos Ti-OH reagem com os íons cálcio da solução (formando um composto de cálcio amorfo), que por sua vez reagirão com os íons fósforo e carbonato da solução dando origem à camada de apatita (JONASOVA *et al.*, 2004).

De fato, WANG *et al.* (2003) mostraram que o tratamento alcalino é essencial para favorecer a nucleação da apatita na superfície da liga Ti6Al4V após imersão na SBF. A mesma liga sem tratamento e exposta na SBF por 8 semanas não apresentou depósito, logo os autores concluíram que o tratamento alcalino torna a superfície da liga bioativa.

Um estudo termodinâmico sobre os sistemas Na-Ti-H₂O, Ca-Ti-H₂O e Ca-P-Ti- H₂O foi realizado por ANDRADE (1999), a fim de entender a estabilidade dessas fases durante tratamento do titânio com solução alcalina, tratamento térmico e com soluções
simuladas. No presente trabalho foi demonstrado, por meio de diagramas de fases, que a superfície do titânio metálico é susceptível ao ataque alcalino, formando o titanato de sódio. Posteriormente, a camada de titânio tende a se transformar em titanato de cálcio, quando submetido ao contato com uma solução aquosa contendo suficiente teor de cálcio e um valor adequado de pH, visto que a região de estabilidade do titanato de cálcio é mais extensa que a do titanato de sódio.

KIM *et al.* (2000) demonstraram que o titânio tratado quimicamente com hidróxido de sódio e submetido posteriormente a tratamento térmico apresenta limite de resistência à fratura e ao escoamento semelhante ao titânio não tratado.

FENG *et al.* (1999) mostraram que alguns fatores favorecem o crescimento dos cristais de fosfatos sobre a superfície do titânio tratado com NaOH, dentre os quais, encontramse: a elevação da concentração da solução NaOH, o tempo de imersão do Ti nessa solução, bem como a temperatura da mesma. O aumento da concentração dos íons Ca²⁺ na solução simulada também favoreceu a formação do revestimento.

A influência do tratamento metalográfico, como polimento na superfície do substrato, no processo de nucleação de fosfatos de cálcio foi descrito no trabalho de VERCIK (2004). Os resultados indicaram que o polimento do substrato diminui algumas qualidades do revestimento, como uniformidade e aderência, ou seja, quanto menos lisa for a superfície melhor as características do revestimento.

Segundo MARQUES (2003), a diminuição da relação superficie/volume, além da agitação do sistema (material/solução), favoreceu a cinética de formação da camada de apatita. Também foi observado que a cinética de mineralização foi influenciada pelo tipo de recipientes utilizados, os quais possuíam geometria diferente, influenciando o acesso da solução aos cerâmicos. Marques também sugeriu que o material de que é constituído o recipiente também pode ter influenciado a cinética de deposição do revestimento.

LISTE *et al.* (2005) também demonstraram que a razão superficie/volume influencia o processo de nucleação dos fosfatos de cálcio. Para tanto, eles utilizaram diferentes volumes de SBF e colocaram em contato com uma superfície de vidro, sendo que os demais fatores foram mantidos constantes. As razões entre as áreas das superfícies e os volumes (A/V) estudados foram 2,5; 1,25; 0,62; 0,37; 0,31; 0,20 e 0,15 cm⁻¹. De acordo com os dados, os autores perceberam que, quando a razão era menor que 0,5 cm⁻¹, o processo de nucleação do fosfato de cálcio era completo, já para razões maiores que 0,5cm⁻¹, uma pequena camada de fosfato foi formada.

SERRO e SARAMAGO (2003) estudaram experimentalmente a influência dos processos de esterilização (autoclave, radiação γ e *plasma*) da superfície do titânio sobre a mineralização de fosfato de cálcio após imersão em soluções que mimetizam o fluido corpóreo acelular, além de estudar a influência do tampão TRIS. Para realização de seu estudo, eles utilizaram placas de titânio como substrato e três soluções que mimetizam o fluido corpóreo acelular, a saber: SBF Kokubo, SBF Kokubo sem TRIS e a solução de Hanks, HBSS, que é menos saturada em cálcio e fósforo se comparada com a de Kokubo. Com relação ao processo de esterilização, foi observado que o plasma foi mais eficiente para remover as impurezas da superfície, apesar disso, o processo de esterilização não influenciou o processo de mineralização. Foi observado ainda que a SBF sem TRIS favoreceu a formação do revestimento de fosfato de cálcio, o que pôde ser explicado pela maior quantidade de íons cálcio disponível na solução, devido à inexistência de TRIS para complexar esse íon. Enquanto que, para as demais soluções, nenhum revestimento foi observado no tempo estudado, o que está relacionado com a menor quantidade de íons cálcio.

De modo geral, pôde-se observar que vários parâmetros podem interferir no processo de nucleação dos fosfatos de cálcio como, tipo de tratamento do substrato, pH da solução, tempo e natureza de exposição (estático ou dinâmico), além da razão entre a área da amostra/volume da solução, (MULLER e MULLER, 2006).

XIN *et al.* (2005) realizaram um estudo com seis cerâmicas, as quais são consideradas bioativas. Os diferentes materiais foram avaliados por meio de testes *in vitro* e *in vivo*,

quanto à habilidade de formação de fosfato de cálcio, para fins comparativos. As superfícies das biocerâmicas estudadas, biovidro, vidrocerâmica, hidroxiapatita (HA), α - TCP, β -TCP e HA/TCP, foram analisadas com o microscópio eletrônico de varredura antes e após realização dos testes in vitro e in vivo. Nos testes in vitro as amostras ficaram em contato com a solução SBF durante alguns dias definidos. Por meio das micrografias, foi possível visualizar a precipitação de fosfatos de cálcio em todas as biocerâmicas, excetuando-se o β-TCP. Sendo que a vidrocerâmica, hidroxiapatita e HA/TCP apresentaram-se mais hábeis durante a precipitação. Os precipitados foram avaliados por meio da quantidade e dos tamanhos de grânulos. Com relação aos testes in vivo, as cerâmicas foram implantadas no músculo do coelho e, depois de removidas, elas foram analisadas. De modo geral, observou-se que nos testes in vivo a formação de fosfato de cálcio na superfície dos materiais estudados foi inferior aos dos testes in vitro. Neste caso, os materiais que mais estimularam a precipitação foram HA/TCP e α-TCP. Segundo os autores os resultados em SBF não são consistentes com os resultados in vivo, apesar de terem observados que em ambos os testes o β-TCP não estimulou a precipitação dos fosfatos de cálcio. Também foi observado que tanto nos testes in vitro quanto nos *in vivo* as biocerâmicas foram revestidas com fosfato octacálcio, OCP.

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA

Neste capítulo são apresentadas as metodologias, teóricas e experimentais, utilizadas na realização do presente trabalho, bem como os materiais empregados e técnicas de caracterização.

3.1 - Simulação Computacional da Solução Avaliadora de Bioatividade (SAB)

Um programa computacional desenvolvido por PLATT e BASTOS (2006) foi utilizado com o objetivo de estudar a estabilidade termodinâmica de algumas fases de fosfato de cálcio que podem ser formadas na SAB, tendo em vista a dificuldade de obter estes parâmetros experimentalmente. Este programa foi denominado Simulador de Soluções Eletrolíticas, *SimSe*.

A tela principal do programa denominado SimSe está apresentada na Figura 3.1. Com o programa é possível calcular as condições de equilíbrio das diversas espécies químicas considerando uma interação iônica do tipo Debye-Hückel estendido. Assim, pode-se obter, além da concentração de cada espécie, o coeficiente de atividade e a atividade das espécies envolvidas. Além disto, quando se considera a presença de fases sólidas, do tipo fosfato de cálcio, é possível calcular a variação da energia livre de Gibbs, (ΔG), de cada fase, e o seu grau de supersaturação. De forma inovadora este programa considera a presença do agente tamponante e complexante de cálcio, TRIS, e seu efeito nas diversas reações em equilíbrio.

Entra	Saída	
osfatos de interesse biomédico	Composição SBF (mol/L)	
Foslato Octacálcico (OCP) Hidroxispatita (HA) Hidroxenelosílato de Célcio Arádio	Carbono 0.0042	Concentrações
Alla-Fosfato Tricálicico Deta-Fosfato Tricálicico	Cálcio 0.0025	Coeficientes de Atrividades
Bnuhła	Fósforo 0.0010	🖙 Graux de Supersaturação
lodelos de Coef. Atividade	Sódio 0.1420	🗭 Variação de Energia Livre de Gibbs
7. Debye-Hückel estendido Güntelberg	Cloro 0.1478	para:
Davier	Enxofre 0.0005	IV Cálcio I Erecite IV Fóstoro I Polássio IT Sódio IT Tas
oH 8 min 6 e máx 12	Potassio 0.0050	
	TRIS 0.0000	
Condições A	ssumidas	Executa
erão 1.1 2006	Desenvolvido por: Gustavo Mendes Platt Man Napoleão Bastos	

Figura 3. 1 – Tela principal do programa utilizado neste trabalho, SimSe.

As fases de fosfatos de cálcio que podem ser simuladas são OCP, HA, DCPA e DCPD. Para a utilização do programa, o usuário deve indicar a composição da solução, o pH e a fase sólida simulada. Posteriormente, deve-se especificar os dados que pretende obter, que são os dados de saída. Este programa é útil na previsão da estabilidade das fases de fosfato de cálcio para uma grande gama de soluções, com composições químicas variadas, capazes de testar a bioatividade de materiais candidatos a implantes ortopédicos.

3.2 - Materiais

Foram utilizadas chapas de titânio comercialmente puro (Ti-cp), de dimensão ($8 \times 8 \times 1$) mm³, como substrato e reagentes químicos com grau de pureza analítica para o preparo das soluções utilizadas nos testes de bioatividade.

3.3 - Métodos

3.3.1 - Preparação das Amostras de Titânio

Chapas de Ti-cp, 8 x 8 mm foram lixadas com uma lixa de carbeto de silício número 600.

A fim de remover todas as impurezas presentes na superfície das amostras, elas foram colocadas no ultra-som em três etapas: primeiro com acetona, em seguida, foram lavadas com água destilada e colocadas em álcool e por último com água destilada, totalizando 30 minutos de lavagem. Para ativar a superfície do titânio, as amostras foram submetidas a um tratamento com uma solução alcalina de hidróxido de sódio, NaOH 5,0M (FENG *et al.*, 1999). Para tanto, as amostras foram imersas, individualmente, em 3,3 mL desta solução e colocadas no banho termostático a 60°C, sob agitação constante, durante 24 horas. Após o tratamento alcalino, as amostras foram lavadas individualmente com 50 mL de água Milli-Q. Após essa etapa, elas foram secas em estufa a 40 °C, e em seguida foram submetidas a um tratamento térmico durante 1 hora a 600 °C em forno de mufla, a uma taxa de aquecimento de 5°C/min. Suas superfícies foram subseqüentemente analisadas por MEV/EDS e DRX.

Como amostras controle, foram utilizadas chapas de titânio lixadas até 600 sem nenhum tratamento químico, as quais foram limpas usando o mesmo procedimento descrito anteriormente. Entretanto, tal condição superficial não favorece a formação do fosfato de cálcio na superfície de materiais não bioativos (WANG *et al.*, 2003, UCHIDA *et al.*, 2002), e é útil para testar a efetividade da solução em precipitar apatita. Nesta etapa, pretendeu-se avaliar se a SAB, que é uma solução de composição química mais simples que a SBF (solução simuladora de fluido corpóreo) poderia ser utilizada como solução capaz de testar a bioatividade de superfícies metálicas.

3.3.2 - Preparação das Soluções para Testes de Bioatividade

A solução SBF convencional proposta por (ABE *et al.*, 1990) foi preparada de acordo com a metodologia descrita na proposição de norma internacional ISO (ISO FDIS 23317, 2005). Na Tabela 3.1 estão apresentados os reagentes utilizados segundo a ordem de adição, quantidade e a pureza de cada um deles para preparar um litro da solução.

Ordem	Reagentes	Quantidade (g)	Pureza (%)
1°	NaCl	8,035	99,5
2°	NaHCO ₃	0,355	99,5
3°	KCl	0,225	99,5
4°	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,231	99,0
5°	MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,311	98,0
6°	HCl 1,0 M	-	-
7°	CaCl ₂	0,292	95,0
8°	Na_2SO_4	0,072	99,0
9°	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,118	99,0
10°	HCl 1,0M	0-5	-

Tabela 3. 1 - Ordem de adição dos reagentes, quantidade e grau de pureza para preparar1L da solução SBF convencional.

Com relação à preparação da solução proposta por BASTOS *et al.* (2005) , SAB, os seguintes reagentes foram utilizados: CaCl₂, NaHCO₃, K₂HPO₄, HCl e (CH₂OH)₃CNH₂. A quantidade de cada reagente utilizado, bem como a pureza de cada um, está apresentada na Tabela 3.2.

Tabela 3. 2 - Reagentes utilizados para preparar 1 L da SAB.

Reagentes	Quantidade (g)	Pureza (%)
CaCl ₂	0,2890	96
NaHCO ₃	0,3525	99,7
K ₂ HPO ₄	0,2305	99
HCl	gotas	-
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,118	99,0

De acordo com a Tabela 3.2, as concentrações dos íons cálcio, potássio, sódio, cloreto, bicarbonato e hidrogenofosfato presentes na SAB são 2,5, 2,0, 4,2, 5,0, 4,2 e 1,0 mmol L^{-1} , respectivamente. O procedimento utilizado foi similar ao descrito pela proposição

de norma ISO (ISO FDIS 23317, 2005). Um método de preparação inapropriado pode induzir a formação de precipitados, uma vez que estas soluções são supersaturadas em relação aos íons cálcio e fósforo, devendo descartar a solução caso isso ocorra.

Ambas as soluções foram filtradas com uma membrana de tamanho de poro $0,2 \mu m$, antes de serem utilizadas no teste de bioatividade.

3.3.3 - Imersão das Chapas de Titânio nas Soluções

Cada chapa de titânio tratada quimicamente foi imersa em um frasco de polietileno contendo 16 mL da solução SBF. O volume da solução adequado para imergir as placas foi determinado mediante a seguinte relação expressa pela Equação 2 (ISO FDIS 23317, 2005):

$$v_{s} = \frac{S_{a}}{10}$$
 (Eq. 2)

Onde,

 $v_s = volume SBF (mm^3)$

 $S_a =$ área total da superfície da amostra

Estas amostras ficaram em contato com a solução durante 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Os ensaios foram realizados em condições fisiológicas, ou seja, a 37 °C e pH em torno de 7,4. O mesmo procedimento foi utilizado com a SAB. Também foi realizado um teste em branco para os mesmos períodos de tempo, pois a solução por si poderia induzir à precipitação. Estes testes foram conduzidos em recipientes sem amostra metálica.

No caso das chapas de titânio sem tratamento químico, isto é, apenas lixada, elas foram imersas somente na SAB durante 1, 7 e 14 dias.

Depois de atingido o tempo pré-determinado, as amostras foram lavadas com água Milli-Q e secas à temperatura ambiente. O pH da solução foi medido para cada tempo de contato com o substrato e, posteriormente, a solução foi conservada com uma solução de HNO₃ 12,5 %, para posterior determinação de cálcio por espectroscopia de

absorção atômica. Além disso, a concentração de fósforo também foi quantificada por espectroscopia de absorção molecular, UV-Vis.

Todos os ensaios foram realizados em quintuplicatas, exceto o experimento com o titânio sem tratamento químico, que foi em triplicata.

3.3.4 - Estudo Cinético

Com os valores da concentração de cálcio e fósforo, determinados por espectroscopia de absorção atômica e molecular, respectivamente, foi possível realizar o estudo cinético para entender como ocorre a adsorção destes íons na superfície do substrato em função do tempo de imersão.

No estudo de adsorção, uma massa conhecida do sólido (adsorvente) é imersa num volume conhecido do solvente (adsorbato), em uma dada temperatura, até que não haja mais variação na concentração da solução sobrenadante. Os dados experimentais são expressos usualmente em termos de isoterma aparente de adsorção, que representa graficamente a quantidade do soluto adsorvido por unidade de massa do adsorvente. A quantidade adsorvida é calculada através da concentração inicial e final do sobrenadante em relação ao volume da solução e massa do adsorvente, neste caso utilizamos a área. A fórmula empregada é apresenta a seguir pela Equação 3.

$$N_t = \frac{(C_i - C_f)V}{S}$$
(Eq. 3)

Onde:

 N_t é a quantidade de íons adsorvida na superfície do substrato;

 C_i é a concentração inicial dos íons na solução;

 C_t é a concentração dos íons na solução em cada tempo;

V é o volume da solução;

S é a área do adsorvente ou substrato.

Construindo o gráfico da quantidade de íons adsorvidos em função do tempo de contato do substrato com a solução, é possível obter informações acerca da cinética de formação da fase de fosfato de cálcio.

3.4 - Caracterizações

3.4.1 - Espectroscopia de Absorção Atômica

Para determinar a concentração de cálcio presente na solução antes e após o contato com as placas de titânio, utilizou-se um espectrofotômetro de absorção atômica, modelo AA 6800, do Laboratório de Análises Químicas do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM/UFRJ). A análise foi realizada com chama de acetileno e o comprimento de onda foi de 442,7 nm. Desta forma, foi possível avaliar a concentração de cálcio nos tempos pré-definidos, 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Para tanto, utilizou-se um padrão de cálcio fabricado pela MERCK para preparar a curva padrão de cálcio de 1, 2, 3, 4 e 5 ppm, e todas as amostras foram diluídas com um fator de diluição de 25 para que pudessem ser analisadas.

Com o objetivo de eliminar a interferência do fósforo, que pode provocar uma diminuição significativa no teor de cálcio, foi necessário adicionar uma solução de cloreto de estrôncio 0,1 % nas amostras, pois este reagente mascara o fósforo e os íons Ca^{2+} podem ser quantificados (BARRERE *et al.*, 2001). Além dessa solução, pode-se utilizar também uma solução de cloreto de lantânio.

3.4.2 - Espectroscopia de Ultravioleta – Visível (UV-Vis)

Com o espectrofotômetro UV-Vis usando comprimento de onda de 700 nm foi possível quantificar as concentrações de fosfato nas soluções, antes e após imersão dos substratos nos tempos determinados. Para tal determinação, foi preparada uma solução padrão de fósforo (1000ppm) com o reagente KH₂PO₄, que foi aquecido a 120 °C durante 24 horas. Assim, foi possível preparar uma solução estoque de 100ppm, que foi utilizada para obter a curva de calibração, 2-10 ppm, por meio de diluições sucessivas.

As amostras analisadas foram diluídas com um fator de diluição de 34,7 e em seguida alíquotas de 3mL de cada uma foram transferidas para um recipiente opaco, devido à fotossensibilidade do composto formado na etapa seguinte. Posteriormente, foi adicionado 3mL da solução de sulfato de ferro 4% e 3mL da solução de molibdato de amônio a 2%. A adição do molibdato e sulfato de ferro são imprescindíveis na análise,

pois eles são responsáveis pela formação do complexo que torna possível a determinação do fosfato.

3.4.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta técnica foi utilizada para visualizar a morfologia do revestimento. Algumas amostras foram selecionadas e analisadas antes e após imersão nas soluções estudadas nos seguintes tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias. O equipamento utilizado foi JEOL - JSM 6460, acoplado a um sistema de análise espectroscópica por energia dispersiva de raios-X - EDS. Para obtenção das imagens, foi aplicada uma voltagem de 15 kV.

Além desta caracterização corriqueira de superfícies de titânio, foi também realizada, para amostra exposta na SAB por 7 dias, a análise da profundidade do depósito, empregando o microscópio eletrônico Philips (FIB/Environmental SEM). Pôde-se, assim, obter imagens da seção transversal da camada depositada e mapear a distribuição de cálcio e fósforo nesta superfície.

3.4.4 - Difração de Raios-X (DRX)

Os espectros de DRX das amostras selecionadas foram obtidos no Inmetro. Para obter o espectro de DRX com tubo de Cu variou 20 de 10 a 60°. Além destas medidas de difração de raios-X consideradas usuais, também foi empregada para a amostra de titânio, imersa na SAB por 7 dias, a técnica de baixo ângulo, onde 20 variou de 2-55°. Para tanto, a amostra foi enviada ao Laboratório da Universidade de Bruxelas, na Bélgica.

A identificação das fases cristalinas presentes nos espectros de DRX foi possível por comparação com espectros das fichas de padrões contidas no JPDS - International Center for Diffraction Data (2000). Na ficha de cada padrão, estão especificadas algumas informações como, tipo de célula unitária, distâncias interplanares e os índices de Miller dos planos correspondentes, dentre outras.

3.4.5 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica foi utilizada para identificar a composição molecular dos revestimentos obtidos após imersão nas soluções estudadas. Os espectros de FTIR foram obtidos em uma faixa de 400-4000 cm⁻¹. O instrumento utilizado foi um espectrômetro NICOLET Magna IR-760 do Laboratório de Análise de Química - IQ/UFRJ.

Para facilitar a análise das bandas referentes aos revestimentos obtidos neste trabalho, foram utilizados dados das literaturas que estão resumidos na Tabela 2.2.

3.4.6 - Microscopia Eletrônica de Transmissão

Uma amostra de titânio tratada quimicamente, que ficou em contato com a SAB durante 7 dias, foi imersa em álcool etílico e submetida a vibrações ultra-sônica durante 3 minutos para que o revestimento fosse removido do substrato. Posteriormente, a suspensão, contendo o revestimento, foi gotejada em uma grade de cobre revestida com filme de carbono para exame por microscopia eletrônica de transmissão, MET. A análise foi realizada no laboratório de microscopia eletrônica do PEMM/UFRJ com o equipamento TEM JEOL 2000 FX com tensão de aceleração de 200kV e EDS da Noran.

A partir da difração obtida no MET, foi possível calcular as distâncias interplanares e identificar a fase de fosfato de cálcio que constitui o revestimento, para tanto a seguinte relação foi usada, Equação 4.

$$\lambda L = rd$$
 (Eq. 4)

Onde,

 λ é o comprimento de onda do feixe de elétrons (0,0251 A°)

L é o comprimento da câmera (100 cm)

r é o valor medido no negativo

d é a distância entre os planos

3.4.7 - Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios-X (XPS)

O princípio básico da técnica de XPS é o efeito fotoelétrico, descrito por Einsten no início do século XX. Quando um feixe de raios-X atinge a amostra, a energia do fóton incidente é absorvida por um elétron de uma camada eletrônicas mais interna (cerne) do átomo. Se a energia do fóton, hv, for suficientemente alta, esse elétron escapará do átomo, sendo emitido da superfície do material. O elétron emitido com energia cinética E_K é chamado de fotoelétron. A técnica de XPS utiliza fotoionização e análise da dispersão de energia do fotoelétron emitido para estudar a composição e o estado eletrônico da superfície de um material. A energia cinética, E_K , do fotoelétron que deixa o átomo alvo depende da energia do fóton incidente, hv, e é expressa pela lei fotoelétrica de Einstein, Equação 5.

$$hv = E_{BE} + E_K \tag{Eq. 5}$$

Com essa relação é possível determinar a energia de ligação, $E_{\rm BE}$.

Assim, os elementos presentes na superfície da amostra são caracterizados diretamente pela determinação das energias de ligação dos picos fotoelétricos, típico de cada elemento ou grupamento molecular.

A superfície do titânio ativado e imerso na SBF por 7 dias foi analisada no equipamento de XPS analisador PHOIBOS 100 e XR50 da SPECS do laboratório de superfícies do PEMM/UFRJ. O feixe de elétrons incidido sobre a amostra foi de alumínio. Esta análise foi importante na determinação de cálcio e outras espécies não detectadas por FTIR.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo é subdividido em duas partes, na primeira são apresentados os resultados obtidos na simulação teórica da precipitação de fosfatos de cálcio na solução avaliadora de bioatividade, SAB. Na próxima seção são apresentados os resultados experimentais referentes à SAB e a solução simuladora do fluido corpóreo, SBF.

4.1 - Estudo Teórico da Precipitação de Fosfato de Cálcio na Solução Avaliadora da Bioatividade (SAB)

4.1.1- Estabilidade dos Fosfatos de Cálcio na SAB

A composição da solução avaliadora de bioatividade, SAB, utilizada para simular teoricamente a estabilidade dos fosfatos de cálcio apresentados na Figura 4.1, foi a mesma do trabalho experimental, disposta na Tabela 3.2. Na Figura 4.1 (A), pode-se observar a variação da energia livre de Gibbs (Δ G) do fosfato octacálcio (OCP), hidroxiapatita (HA), monetita (DCPA) e bruxita (DCPD) em função do pH de interesse da deposição biomimética para cada fosfato estudado, já na Figura 4.1 (B), observa-se essa variação em uma faixa de pH maior.



(A)



(B)

Figura 4. 1- Variação da energia livre de Gibbs dos fosfatos de cálcio em função do pH (A) de deposição biomimética e (B) em uma faixa maior de pH .

Pela Figura 4.1 (A) pode-se afirmar que, na faixa de pH estudada, os fosfatos de cálcio estáveis são hidroxiapatita, HA, e fosfato octacálcio, OCP, porém, observa-se que o OCP é a fase mais estável termodinamicamente seguida da HA, enquanto que a formação do hidrogenofosfato de cálcio anidro, DCPA, e hidrogenofosfato de cálcio dihidratado, DCPD, não é termodinamicamente estável, embora estas fases sejam consideradas como precursoras da HA (LU e LENG, 2005). Além disso, pode-se afirmar que a mudança no pH de 7,4-8,0 tende a aumentar a variação da energia livre de Gibbs dos fosfatos estudados, sendo que para o OCP e HA essa variação tende a ir para o mesmo valor em pH igual a 8. Esse fato é visto com mais detalhe na Figura 4.1 (B), onde percebe-se claramente que este pH separa duas regiões distintas de estabilidade, onde a pH inferior a 8 o OCP prevalece, enquanto que a um pH superior a fase mais estável é a HA. Este fenômeno pode está relacionado com o grau de supersaturação de ambas as fases, OCP e HA, na solução que depende do pH, veja Figura 4.2.



Figura 4. 2 - Grau de supersaturação do OCP e HA na SAB, em função do pH.

De fato, quando o pH é inferior a 8, o grau de supersaturação do OCP na solução é maior, sendo similar ao da HA em pH igual a 8. Com valores superiores a 8, o grau de supersaturação da HA na solução aumenta em relação ao OCP.

Outras simulações foram realizadas com o objetivo de estudar alguns parâmetros que podem influenciar o processo de deposição biomimética, porém o DCPA e DCPD foram excluídos das simulações, já que a variação da energia livre de Gibbs permaneceu positiva em toda a faixa de pH estudada mostrando assim a inviabilidade de formação dessas fases.

Alguns autores (BIGI *et al.*, 2005, CHOU *et al.*, 2004, STOCH *et al.*, 2000, KASUGA *et al.*, 2002) utilizam soluções mais concentradas como forma de diminuir o tempo de formação do revestimento sobre diversos substratos metálicos. Para estudar a influência da concentração da SAB no processo de deposição biomimética, outras simulações foram realizadas. Na Tabela 4.1, é apresentada a composição da SAB original, a composição da SAB1, onde apenas a concentração do cloreto de cálcio é aumentada, e a composição da SAB2, onde a concentração de todos os componentes é quatro vezes maior.

Tabela 4. 1 - Composição original da SAB em comparação com SAB modificada, SAB1 e SAB2 utilizada nas simulações teóricas.

Ions	SAB (mmol/L)	SAB1 (mmol/L)	SAB2 (mmolL ⁻)
Ca ²⁺	2.5	10	10
Cl	5.0	20	20
Na^+	4,2	4,2	16,8
HCO ₃ ⁻	4,2	4,2	16,8
K^+	2.0	2,0	8,0
HPO ₄	1,0	1,0	4,0

O perfil da variação da energia livre de Gibbs em função do pH é apresentado na Figura 4.3: (A) para a SAB1 mais concentrada em cloreto de cálcio, (B) quando a solução é quatro vezes mais supersaturada em relação a todos os seus componentes, SAB2.



(A)



(B)

Figura 4. 3 - Variação da energia livre de Gibbs dos fosfatos em função do pH quando: (A) apenas a concentração de cloreto de cálcio é quadruplicada, SAB1, e (B) quando todas as concentrações dos reagentes são quadruplicadas.

O efeito da concentração de cálcio é observado na Figura 4.3 (A), onde pode ser notado que o aumento apenas da concentração de cálcio é suficiente para provocar um decréscimo na variação da energia livre de Gibbs para ambas as fases, HA e OCP, em torno de 2 kJ mol⁻¹, quando comparado com os dados apresentados na Figura 4.1 (A). Contudo, um decréscimo mais pronunciado, em torno 3 kJ mol⁻¹, na variação da energia livre dessas fases, HA e OCP, é observado quando a concentração de todos os constituintes da SAB é quatro vezes maior.

A influência do cálcio na estabilidade dos fosfatos também foi observada no trabalho de LU e LENG (2005), no qual foi estudada teoricamente a nucleação heterogênea dos fosfatos de cálcio em várias soluções que diferem entre si em composição química. Os resultados demonstraram que as fases termodinamicamente favoráveis são HA e OCP, quando o pH é igual a 10. Entretanto, no pH igual a 7,4, a fase DCPD também torna-se termodinamicamente estável, e a estabilidade teoricamente calculada no trabalho cresce na ordem DCPD, OCP e HA. De modo geral, foi observado que um aumento na concentração dos íons cálcio e fósforo acarretou na diminuição da energia livre da HA, OCP e DCPD, ou seja, a formação destes fosfatos são favorecidas com o aumento da razão molar Ca/P.

O aumento da concentração das soluções utilizadas nos testes de bioatividade ou ainda supersaturada em cálcio e fósforo tem sido relatado na literatura. O objetivo principal é diminuir o tempo de obtenção do revestimento de fosfato de cálcio em superfícies metálicas, o que foi observado nos trabalhos de BARRERE *et al.*, (2002, BIGI *et al.*, 2005, CHOU *et al.*, 2004).

4.1.1 - Efeito do tampão na formação dos fosfatos de cálcio

Na Figura 4.4, pode-se observar a influência do tampão TRIS na atividade dos íons cálcio e fósforo em função do pH. Estas espécies foram escolhidas por serem as mais importantes durante o processo de nucleação dos fosfatos de cálcio. A reação de complexação do tampão com o cálcio pode ser representada pelas equações, onde k representa a constante de dissociação:

$$HL^{+} \longleftrightarrow H^{+} + L \tag{Eq. 6}$$

$$\operatorname{Ca}^{2+} + L \xleftarrow{k} \operatorname{Ca}(L)^{2+}$$
 (Eq. 7)

2.0 1.5 Ca/sem TRIS Atividade (mmol L⁻¹) P/ sem TRIS Ca/ TRIS P/ TRIS 1.0 0.5 0.0 7 ģ 10 12 8 11 6 pН

Neste caso L representa o tampão e $Ca(L)^{2+}$ representa o complexo de cálcio.

Figura 4. 4 – Influência do TRIS na atividade iônica do cálcio e fósforo em função do pH.

A atividade do cálcio, na solução isenta do TRIS, permanece praticamente constante na faixa de pH estudada, 6-12, sendo alterada apenas quando a região é mais alcalina. Porém, quando há TRIS na solução, a disponibilidade dos íons cálcio na solução diminui significativamente quando o pH está entre 6 - 8, e depois permanece constante, mas com baixa atividade.

Isso pode ser explicado devido à presença de alguns grupos ligantes, como amina e hidroxilas na estrutura deste tampão, que podem atuar como seqüestradores de íons metálicos nas soluções. Desta forma, o TRIS forma complexo com os íons cálcio, o que pode comprometer a formação do revestimento de fosfato de cálcio, já que terá menos íons Ca^{2+} disponíveis na solução. Ainda é importante enfatizar que os grupos hidroxilas

participam efetivamente da reação de complexação, pois não há impedimento estérico (SIGEL *et al.*, 1982). Quanto ao íon fósforo, a atividade permanece constante em ambas as soluções, com e sem TRIS e apresentam o mesmo comportamento. O que era de se esperar, pois o tampão só forma complexo com os metais alcalinos e alcalinos terrosos.

SCHELLER *et al.* (1980) estudaram experimentalmente a interação de alguns metais alcalinos e alcalinos terrosos com os tampões utilizados na área médica, como o TRIS, BISTRIS e TEA. Eles observaram que a estabilidade dos complexos formados com os íons alcalinos, como Na⁺ e K⁺, é baixa, enquanto que a estabilidade dos metais alcalinos terrosos com o TRIS foi significativa e a ordem decrescente é $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$. Em virtude destes resultados, decidiu-se apenas estudar a reação de complexação com os íons cálcio da solução avaliadora de bioatividade, SAB.

Outra simulação foi realizada empregando-se a solução SAB, onde variou apenas a concentração do TRIS de 0,050 mol L⁻¹ a 1,0 mol L⁻¹ em função da variação da energia livre de Gibbs e da atividade do cálcio, Figura 4.5 (A) e (B). Nestes extremos estão a concentração usada para precipitar os fosfatos de cálcio, 0,050 mol L⁻¹ (ISO FDIS 23317, 2005), e para degradar os fosfatos a 1,0 mol L⁻¹ (ISO 10993-9, 1999). No teste de degradação a solução é supersaturada em TRIS, o que vai favorecer a dissolução do fosfato de cálcio.



(B)

Figura 4. 5 - (A) Variação da energia livre de Gibbs da HA e OCP em função da concentração de TRIS na SAB e (B) atividade dos íons cálcio em função da concentração do TRIS na SAB.

À medida que a concentração de TRIS aumenta, a formação tanto do OCP quanto da HA é desfavorecida, pois há um aumento na variação da energia livre de Gibbs para a HA e OCP, esse fenômeno está relacionado com a quantidade de cálcio que deve estar complexado com o TRIS. Na Figura (B) é notado o efeito da concentração de TRIS na atividade dos íons cálcio, que tende a diminuir com o aumento da concentração do TRIS.

4.2 - Estudo Experimental da Formação de Fosfato de Cálcio na Solução Avaliadora de Bioatividade (SAB) e SBF

4.2.1-Ativação da superfície do titânio

Na Figura 4.6, são apresentadas as micrografías obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, MEV, da superfície do titânio, lixada (A), tratada quimicamente com NaOH 5,0 M e submetida a tratamento térmico a 600 °C durante 1 hora com diferentes aumentos (B e C). É visível a modificação na superfície do titânio após o tratamento alcalino e térmico, pois a superfície do titânio tornou-se rugosa e é similar às obtidas nos trabalhos de outros autores (FENG *et al.*, 1999, JONASOVA *et al.*, 2004). No entanto, algumas amostras, após tratamento alcalino e térmico, não se mostraram uniforme visualmente e foram excluídas.



Figura 4. 6 - Micrografias, MEV, da superfície do Ti- lixado 1000x (A) e do Ti ativado com NaOH 5,0M e submetido a tratamento térmico com diferentes aumentos 1000 x (B) e 3000 x (C).

A falta de uniformidade deste tratamento já tem sido comentada por alguns autores (YANG *et al.*, 2006, JONASOVA *et al.*, 2004), os quais acreditam que a mesma pode estar relacionada com a etapa de processamento do metal. Como alternativa para solucionar este problema, JONASOVA *et al.* (2004) propuseram um método no qual eles tratam a superfície do substrato com ácido antes de submeter ao tratamento alcalino. Desta forma, eles conseguiram obter uma superfície uniforme após o tratamento alcalino, o que favoreceu a formação da camada de apatita carbonatada.

Na Figura 4.7, estão os espectros de EDS e DRX da superfície do Ti tratado com solução alcalina e submetida a tratamento térmico.



Figura 4. 7 - Espectros da superfície do substrato após tratamento alcalino: (A) EDS e (B) DRX.

Após o tratamento alcalino, pode-se observar a presença de elementos essenciais na formação da camada de titanato, como oxigênio e sódio, Figura 4.7(A). Já com o espectro de DRX pode-se identificar a presença de picos intensos referentes ao titânio localizados a 38 ° (002), 40 ° (101) e 52,48 ° (102). Já o pico localizado a 27 °(110) é característico do óxido de titânio.

4.2.2- Imersão dos substratos nas soluções avaliadoras de bioatividade

A morfologia das amostras, após exposição nas soluções avaliadoras de bioatividade, SAB (esquerda) e na SBF (direita) pode ser observada nas Figuras 4.8 - 4.12. Esses resultados são apresentados em função do tempo de imersão e com aumentos diferentes.



Figura 4. 8 - Micrografias, MEV, da superfície do Ti ativado com 1 dia de imersão na SAB (esquerda) e na SBF Kokubo (direita) com aumentos diferentes.



Figura 4. 9 - Micrografias, MEV, das amostras de Ti com 7 dias de imersão na SAB (esquerda) e SBF Kokubo (direita) com aumentos diferentes.



Figura 4. 10 - Micrografias, MEV, das amostras de Ti com 14 dias de imersão SAB (esquerda) e SBF kokubo (direita) com aumentos diferentes.



Figura 4. 11 - Micrografias, MEV, das amostras de Ti com 21 dias de imersão SAB (esquerda) e SBF Kokubo (direita) com aumentos diferentes.



Figura 4. 12 - Micrografías, MEV, das amostras de Ti com 28 dias de imersão SAB (esquerda) e SBF Kokubo (direita) com aumentos diferentes.

Após um dia de imersão na SAB, pode-se observar a formação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície do substrato, cuja morfologia apresenta forma de placas, porém a superfície apresenta pequenas regiões sem revestimento. Após imersão na SBF por 1 dia, não houve formação de fosfato de cálcio, apesar de se visualizar uma mudança na superfície do substrato, que pode está relacionada com a adsorção inicial dos íons presentes na solução.

As imagens da superfície dos substratos com 7 dias de imersão nas soluções avaliadoras de bioatividade estão na Figura 4.9. Pode-se notar que após imersão na SAB, a superfície do substrato está totalmente revestida com o fosfato de cálcio e começa a surgir umas rosetas, o que está relacionado com o crescimento da camada. Já em relação a solução SBF, observa-se a presença de alguns núcleos sobre a sua superfície, o que caracteriza o primeiro estágio de nucleação heterogênea do revestimento. Posteriormente, estes núcleos se aglomeram dando origem ao revestimento, como pôde ser observado na Figura 4.10, a qual apresenta as micrografias da superfície dos substratos com 14 dias de imersão nas soluções.

A morfologia do revestimento obtido sobre as chapas de titânio ativadas e imersas na SAB durante 14 dias se mantém praticamente inalterada. Já no caso da solução SBF, o intervalo entre 7 e 14 dias é determinante para a formação da camada de fosfato de cálcio. A superfície do substrato se encontra revestida com aglomerados esféricos de fosfato de cálcio, até então não observados. A morfologia do revestimento, bem como a presença de algumas trincas são similares aos trabalhos encontrados na literatura que utilizam a SBF (BARRERE *et al.*, 2002, UCHIDA *et al.*, 2002). À medida que a camada cresce, aumenta a tendência à trinca durante o resfriamento, isso pode estar relacionado com a morfologia do revestimento, que, por ser mais densa, pode favorecer o trincamento, ao contrário do revestimento obtido com a SAB, que, por apresentar cristais maiores, é menos denso (LIU *et al.*, 2007). Após 21 e 28 dias de imersão, a morfologia dos revestimentos se mantém como observado nas Figuras 4.11 e 4.12.

De modo geral, pode-se observar que a morfologia de ambos os revestimentos é bem distinta. Com a SAB, a morfologia apresenta formato tipo placa pouco compacta,

enquanto que, com a SBF o revestimento é constituído por aglomerados esféricos e densos. Na Figura 4.13 é apresentado detalhes sobre o revestimento obtido com a SAB e o mapa de composição química ao longo da espessura do revestimento é apresentado.



Figura 4. 13 - Micrografia, da amostra imersa na SAB por 7 dias, com detalhes sobre o crescimento do revestimento e os mapas.

Na imagem acima pode-se observar a presença do substrato, na base, e uma camada amorfa seguida pela presença de placas, que crescem. O revestimento tem uma espessura de aproximadamente 15 μ m. Como observado nos mapas, os seguintes elementos foram identificados: Ti, no substrato, e o Ca e P na camada revestida. É

geralmente aceito que cristais com morfologia tipo placa estão relacionados com a fase característica do OCP (LU *et al.*, 2006, BROWN, 1966).

As amostras de titânio sem tratamento químico ficaram em contato com a SAB durante 1, 7 e 14 dias. Nesta etapa, pretendeu-se avaliar se a solução proposta era propícia a revestir superfície de qualquer natureza química, o que não indicaria seu uso como solução avaliadora de bioatividade. Na Figura 4.14, é mostrada a micrografia e o espectro de EDS obtido após 14 dias de imersão do substrato na solução.



Figura 4. 14 - Micrografia e EDS do Ti sem tratamento químico após 14 dias de imersão na SAB.

Como pôde ser observado, Figura 4.14, não houve formação do revestimento de fosfato de cálcio sobre a superfície do Ti sem tratamento químico, e a análise de EDS revelou apenas a presença de titânio na amostra. Assim, fica confirmado que as características da superfície é um parâmetro importante neste tipo de deposição. Em virtude deste resultado, acredita-se que a solução proposta, SAB, possa ser utilizada nos testes de bioatividade, já que ela foi seletiva com relação à superfície do substrato, pelo menos para o titânio não previamente tratado.

Os espectros de infravermelho referentes às superfícies de Ti ativadas que foram imersas na SAB durante 1, 7, 14, 21 e 28 dias são apresentados na Figura 4.15. Para

análise dos espectros, foram utilizados os resultados dispostos na Tabela 2.2, que fornecem informações sobre a localização dos grupamentos químicos.



Figura 4. 15 - FTIR do Ti ativado NaOH após imersão na SAB em diferentes tempos.

De acordo com os espectros de FTIR das amostras imersas na SAB, observou-se que, com um dia de imersão, surge uma banda na região 1450 cm⁻¹, que é atribuída ao modo vibracional do grupo carbonato, indicando a sua incorporação na rede da apatita com substituição do tipo B, que aumenta de intensidade com o tempo de imersão. Já as bandas nas regiões 1108 e 1138 cm⁻¹ são características do HPO₄²⁻ presente na estrutura do OCP, enquanto que uma banda pouco intensa na região de 528 cm⁻¹ referente também ao mesmo grupamento aumenta de intensidade nos demais tempos. Entretanto, nesta região do espectro não é possível distinguir se o pico é característico do OCP ou da HA. Bandas na região de (950-1000) cm⁻¹ são atribuídas ao modo vibracional da molécula do PO₄³⁻ na freqüência de ressonância (v₁). Também as bandas na região de

614- 603 cm⁻¹ são características do modo de ligação do PO_4 com v_4 . Espectros de infravermelho referentes às amostras de Ti ativada e que foram imersas na SBF por diferentes tempos são apresentadas na Figura 4.16.



Figura 4. 16 - FTIR da superfície do Ti ativada com NaOH após imersão na SBF por diferentes tempos.

Nos primeiros dias de imersão, 1 e 7 dias, nenhuma banda característica da apatita foi observada, o que está de acordo com os resultados obtidos no EDS. Já com 14 dias surgem bandas características do carbonato, hidrogenofosfato e fosfato, que permanecem nos tempos posteriores. Com o aumento do tempo de imersão, há uma diminuição na intensidade das bandas de PO_4^{3-} , na freqüência de ressonância (v₁) a 991 cm⁻¹, como conseqüência da substituição por íons carbonato.

Comparando os espectros de FTIR de ambas as soluções, observou-se que existe a

presença de grupamentos característicos da apatita após um dia de imersão na SAB, enquanto que na SBF estes picos só aparecem com 14 dias de imersão. A substituição do carbonato é favorecida com o aumento do tempo de imersão para ambas as soluções. Na região de aproximadamente 1645 e 3500 cm⁻¹ surgem bandas características da molécula de água em ambos os revestimentos, o que é explicado pelo fato do revestimento ter sido obtido em meio aquoso e não ter sido submetido, posteriormente, a nenhum tipo de tratamento térmico.

A existência de bandas na região 3568-3574, 3550, 3536 cm⁻¹ é característica do grupo OH⁻ presente na HA ou OCP, porém nenhuma banda foi encontrada nesta região para ambos os revestimentos, o que indica que os depósitos são deficientes em OH⁻. É importante ainda ressaltar que a apatita do osso é deficiente em OH⁻ e enriquecida em HPO₄²⁻, o que sugere que os revestimentos obtidos neste trabalho apresentam similaridade com o osso (PASTERIS *et al.*, 2004).

Há relatos de que a presença de íons carbonato nas apatitas sintéticas influencia o comportamento de decomposição, solubilidade, sinterabilidade e na reatividade biológica. Eles provocam uma diminuição na cristalinidade e um aumento na solubilidade, tanto nos testes *in vitro* quanto nos testes *in vivo* (SLOSARCZYK *et al.*, 2005, LANDI *et al.*, 2004).

Os espectros de DRX dos revestimentos obtidos com a SAB e SBF são apresentados nas Figuras 4.17 e 4.18, respectivamente. O espectro do revestimento obtido com SAB, Figura 4.17, foi obtido variando 20 de 2 a 55°, com a finalidade de identificar se a fase de fosfato de cálcio formada sobre o substrato era OCP, já que a morfologia tipo placa, observada no MEV, é característica desta fase. A realização da análise com baixo ângulo foi importante, pois, a aproximadamente 5°, existe um plano (100) típico do OCP, que o diferencia da HA, pois essas fases possuem características similares e alguns picos se confundem, por exemplo para 20 = 25,88 ° temos a HA(002), enquanto que em 26,08 ° está o OCP (002). Já para HA (211) = 31,77 ° enquanto que para o OCP (402) = 31,66 °. A dificuldade de obter espectros de DRX com ângulo baixo se reflete nos trabalhos que não conseguem distinguir estas duas fases (XIN *et al.*, 2005, LU,
2004).



Figura 4. 17 - Espectro de DRX do titânio ativado com NaOH e imerso na SAB durante 7 dias.

Por meio do espectro de DRX, Figura 4.17, foi possível identificar um pico característico do OCP em 4,7° cujo plano de difração é (100). Outros picos também foram identificados como sendo desta fase a 16,18 ° (110), 28,31° (521), 32,3° (312), 34,11° (422), 38,15 (232) e 49,58° (642). Além disso, dois picos de titânio foram detectados a 38,2 (002) e 40,1°(101).



Figura 4. 18 - Espectros de DRX das amostras imersas na SBF em diferentes tempos.

O revestimento obtido com a solução SBF apresenta baixo grau de cristalinidade, o que pode ser observado nos espectros de DRX, Figura 4.18. Com o aumento do tempo de imersão, os picos característicos da apatita carbonatada, localizados entre 31-32° e 33,17° aumentam de intensidade, enquanto que os picos do titânio localizados a 38 e 40°, cujos planos são (002) e (101), respectivamente, desaparecem com 28 dias de imersão, o que indica o crescimento do revestimento.

Análise de microscopia eletrônica de transmissão, MET, do revestimento obtido na SAB, após 7 dias de imersão, foi realizada. A princípio também seria realizada a análise com a amostra imersa na SBF, mas, devido à dificuldade de remover o revestimento do substrato, não foi possível prosseguir tal análise. A Figura 4.19 mostra a imagem do MET e a difração dos cristais tipo placa que recobriam a superfície do titânio ativado.



Figura 4. 19 - Micrografia do MET e padrão de difração do revestimento obtido na superfície do Ti ativado com NaOH e imerso na SAB por 7 dias.

A morfologia do cristal é do tipo placa irregular. E a menor distância entre pontos na difração de elétrons foi de 0,266 mm, que corresponde a uma distância interplanar de aproximadamente 0,94 nm. A segunda menor distância com medida igual a 0,38mm corresponde a um $d_{(001)}$ de 0,67nm, que pode ser tanto da fase OCP quanto da HA, pois ambas possuem plano (001) com distância interplanar em torno de 0,688 nm. Mas, o que diferencia estas fases é a distância interplanar com 0,9 nm que é característica do OCP (LENG *et al.*, 2003), o que indica que a difração de elétrons corresponde à fase OCP e não à hidroxiapatita. Como a difração foi tirada com aumento baixo não foi possível confirmar os ângulos de 90,15, 92,54 e 108,65° da estrutura triclínica do OCP.

Revestimento biomimético, sobre liga de Ti6Al4V, composto por OCP, tem mostrado ser mais efetivo na adesão e proliferação de células do osso, quando comparado com apatita carbonatada revestida biomimeticamente sobre a mesma liga (DEKKER *et al.,* 2005). Após cultivo de células, ambos os materiais, Ti6Al4V revestido com OCP e Ti6Al4V revestido com apatita carbonatada amorfa, foram implantados *in vivo* e, após 4 semanas, nenhuma reação inflamatória foi observada. Ainda segundo estes autores a

formação de osso novo foi maior no material revestido com OCP do que na liga revestida com apatita, ambos com células aderidas, o que sugere que a liga revestida com OCP é mais interessante para a engenharia de tecido ósseo se comparado com a apatita carbonatada.

Apesar de ser observada, com o auxílio do MEV, uma mudança na superfície do substrato ativado com NaOH e exposto na SBF por 7 dias, a análise por EDS e FTIR não foi capaz de detectar a presença de Ca e P na superfície do substrato. Para tanto, foi necessário recorrer a técnicas mais sensíveis, como o XPS, que é capaz de determinar a composição química a níveis de camada atômica. Os resultados obtidos com esta técnica estão dispostos na Tabela 4.2, como a composição percentual dos elementos detectados no XPS referente à amostra e às suas respectivas energia de ligação.

Tabela 4. 2 - Composição dos elementos da superfície do Ti ativada após imersão na SBF.

	SBF (7 dias)/ (%)	Energia de ligação/ (eV)
Ca2p	2,88	348
P2p	1,47	134
O1s	51,73	531
C1s	30,72	286
Ti2p	43,09	459

Os resultados da análise confirmaram a presença dos íons cálcio e fósforo na superfície do titânio. Isso sugere que os núcleos observados na Figura 4.9 são constituídos por esses íons. A presença intensa de carbono na amostra deve estar relacionada com algum tipo de impureza, pois não foi realizado o *sputtering* na superfície da amostra.

Na Figura 4.20, estão os espectros de XPS referente à amostra imersa na SBF por 7 dias, (A) espectro geral, (B) deconvolução do pico de titânio, (C) deconvolução do pico de oxigênio, (D) deconvolução do pico de cálcio e (E) deconvolução do pico de fósforo.



Figura 4. 20 - Espectros de XPS obtido do titânio tratado com NaOH e imerso por 7 dias na SBF.

No espectro geral de XPS, cinco elementos foram observados, são eles, O 1s, Ti 2p, Ca 2p, C 1s e P 2p. Com a deconvolução do pico do Ti 2p, dois picos foram identificados com energia de ligação de 459 e 465 eV, que são atribuídas a ligação do Ti-O. Esta ligação se deve à presença do titanato de sódio amorfo formado na superfície do titânio após tratamento com NaOH e subseqüente tratamento térmico (LEE *et al.*, 2003). Na deconvolução do pico O1s, três subpicos foram observados com as seguintes energias 531, 532.4 e 534 eV. O pico mais intenso a 531 eV, pode ser tanto da ligação de OH⁻ quanto do PO₄³⁻ (LI *et al.*, 2004, TAKADAMA *et al.*, 2001), enquanto que a 532.8 eV é referente à ligação do HPO e 534 eV é da H₂O. Também o espectro de cálcio foi obtido com mais detalhe, e foi observado a presença de pico duplo com energia de ligação Ca 2p (351,9 e 348 eV), o que está de acordo com os dados da HA encontrados na literatura (LEE *et al.*, 2003, TAKADAMA *et al.*, 2001). Já para o P2p, o pico presente à 134,4 eV é típico dos fosfatos de cálcio.

Por meio dos resultados de XPS, pode-se afirmar que o revestimento obtido com a SBF começou a se formar com 7 dias de imersão, o que não foi observado com as técnicas de FTIR e EDS. A dificuldade de identificar os íons cálcio na superfície do revestimento após 7 dias de imersão com o EDS já havia sido mencionada no trabalho de SARAMAGO e SERRO (2003), que apenas identificaram essas espécies por XPS.

A variação na concentração dos íons cálcio e fósforo, em função do tempo de exposição com a superfície do titânio ativado, é apresentada na Figura 4.21 (A) e (B). A Figura (A) corresponde a variação dos íons cálcio na SAB e SBF e a (B) corresponde a variação dos íons fósforo em ambas as soluções. A redução dos íons cálcio e fósforo na solução é um dos critérios adotados em vários trabalhos para identificar a precipitação dos fosfatos de cálcio na superfície dos substratos (JONASOVA *et al.*, 2004, TAKADAMA *et al.*, 2001, VANZILLOTTA *et al.*, 2006). Esse fenômeno é notado na Figura 4.21 para ambas as soluções, SAB e SBF, onde foi observada uma redução estatisticamente significativa na concentração destes íons ao longo do tempo de exposição.



(B)

Figura 4. 21 - Concentração de cálcio e fósforo na SAB e SBF em função do tempo de imersão dos substratos.

Para a SAB, há uma diminuição da quantidade de cálcio na solução bastante pronunciada já no primeiro e sétimo dia de imersão, variando em torno de 20 e 27 ppm, respectivamente. E depois de 14 dias, fica praticamente constante, pois observa-se uma relativa estabilização das curvas, o que denota uma menor atividade da precipitação. Para o tempo posterior a 21 dias, acredita-se que a quantidade de íons na solução seja insuficiente para adsorver no substrato, pois pode-se ter atingido um estágio de equilíbrio. Já na SBF a variação de cálcio nos primeiros dias, 1 e 7, é a mesma, ficando em torno de 5 ppm, enquanto que, com 14 dias, a variação é pronunciada. Em relação à redução dos íons fósforo na SAB, foi notada uma diminuição significativa no primeiro dia de imersão, sendo que essa concentração permanece praticamente inalterada com 21 dias de imersão. O contrário acontece com a SBF, onde nos primeiros tempos de imersão do substrato, 1 e 7, a quantidade de fósforo praticamente é a mesma da solução inicial, enquanto que, após 14 dias, a concentração de fósforo diminuiu drasticamente.

De modo geral, pôde-se perceber que a concentração inicial de íons cálcio na SBF foi inferior à SAB na ordem de 30 ppm, embora ambas as soluções tenham sido preparadas de forma a ter as mesmas concentrações de cálcio. Essa diferença na concentração da SBF pode ter influenciado a cinética de formação da camada de fosfato de cálcio sobre a superfície do titânio ativado, após exposição nessa solução, já que a camada de fosfato de cálcio sobre de cálcio só foi obtida com 14 dias como observado pelas micrografias do MEV. Também a presença de alguns íons como Mg²⁺ na SBF podem ter contribuído, pois estes íons são considerado inibidores do processo de nucleação (BARRERE *et al.*, 1999). JONASOVA *et al.* (2004) também utilizaram a SBF e só conseguiram obter o revestimento sobre a superfície do titânio após 10 dias, sendo que a superfície não estava totalmente revestida, o que indica que a cinética de formação do fosfato de cálcio na SBF é inferior à da SAB. Logo, para o objetivo de revestimento a solução proposta, SAB, é mais eficiente do que a SBF.

Os resultados da variação da concentração de cálcio e fósforo na SAB permitiram calcular a quantidade desses íons por área de substrato, Figura 4.22. Para isso utilizou-se a Equação 3.



Figura 4. 22 - Quantidade de íons cálcio, N_{ca} , e fósforo, N_P , por área do substrato em função do tempo de imersão.

De acordo com a Figura 4.22, pode-se afirmar que a adsorção dos íons cálcio é seguida pela adsorção dos íons fósforo, indicando assim que não há formação de uma camada de cálcio para que os íons fósforos sejam adsorvidos. Também foi observado que a quantidade de íons cálcio adsorvidos no substrato é superior a do fósforo, isto pode estar relacionado com a facilidade com que os íons cálcio se movem no seio da solução em direção à superfície do substrato, o que se deve ao seu menor raio atômico. Além disso, há uma maior quantidade de íons Ca²⁺ disponível na solução.

Com um dia de imersão, a quantidade de íons cálcio na superfície do substrato é aproximadamente 0,003 mg mm⁻², ao passo que, para os íons fósforo, foi 0,001 mg mm⁻². A extração dos íons cálcio da solução se deve à presença de grupos funcionais, como hidroxilas na superfície do substrato, os quais se ligam quimicamente com íons metálicos, neste caso o cálcio.

Os resultados da variação da concentração de cálcio e fósforo indicaram que o

revestimento obtido com a SAB cresce até 21 dias e, após esse tempo a espessura da camada deve permanecer constante. Apesar da SAB está supersaturada em ambas as fases, OCP e HA, como visto na Figura 4.2, a velocidade de reação do OCP é maior (5525148, 1996), o que pode ter favorecido a formação da mesma em detrimento da HA. A reação de formação do OCP é descrita a seguir, Equação 8:

$$8Ca^{2+} + 6PO_4^- + 2H^+ \overleftrightarrow{Ca_8}H_2(PO_4)_6 \qquad (Eq. 8)$$

KAMAKURA *et al.* (2005) e SUZUKI *et al.* (2006) mostraram que o OCP pode ser facilmente convertido em HA via reação de hidrólise, quando exposto em meio aquoso à 70 °C, ou ainda por meio de tratamento térmico (APARECIDA, 2006).

Ainda, no trabalho de SUZUKI *et al.* (2006) foi estudado o comportamento de ambos os materiais, OCP e OCP convertido em HA, em testes *in vitro* e *in vivo*. Os resultados sugerem que o OCP está mais propenso a formar osso novo, se comparado com a HA obtida na hidrólise do OCP. Também foi observada a conversão do OCP \rightarrow HA após ser implantado *in vivo*, baseado nesses resultados os autores sugerem que o processo de conversão do OCP em HA após ser implantado *in vivo*, baseado nesses resultados os autores sugerem que o processo de conversão do OCP em HA após ser implantado *in vivo* pode estimular a diferenciação de osteoblastos, o que favorece o bom desempenho desse material.

4.3 - Considerações Finais

Alguns trabalhos teóricos têm estudado o processo de formação dos fosfatos de cálcio e os fatores que podem influenciar no tipo de fosfato a ser depositado, como o aumento na concentração dos íons cálcio e fósforo. Entretanto, o efeito do tampão, TRIS, ainda não tinha sido levado em consideração nas soluções que simulam a parte inorgânica acelular do fluido corpóreo, como por exemplo, a sua reação de complexação com os íons Ca²⁺. A presença do TRIS, como visto na Figura 4.4, reduz a disponibilidade de cálcio para precipitação. Dessa forma, seria ideal determinar, para cada solução, a atividade dos íons em vez de somente a sua concentração.

Devido à baixa atividade da superfície do titânio, é necessário formar uma camada intermediária na sua superfície, por meio do tratamento com solução alcalina, que favorece a nucleação dos fosfatos de cálcio e apresenta excelente aderência com o substrato e a apatita precipitada.

A identificação dos revestimentos obtidos em meio biomimético é uma etapa criteriosa, uma vez que os fosfatos de cálcio apresentam propriedades semelhantes, o que dificulta a sua caracterização. Como exemplo, foi citado a similaridade na localização dos planos cristalinos da HA e OCP identificados por meio da técnica de DRX. Além disso, muito comumente está presente mais de uma fase tornando ainda mais complexa a identificação inequívoca de um fosfato.

Revestimentos de OCP sobre implantes metálicos podem desempenhar papel importante durante a regeneração do tecido ósseo, já que esta fase tende a se converter em HA quando implantada *in vivo*. Porém, trabalhos devem ser desenvolvidos a fim de elucidar o papel do OCP quando implantado *in vivo*

A inexistência de uma norma que padronize as condições para realização dos testes *in vitro* tem dificultado a comparação dos resultados obtidos na literatura. A proposta de norma ISO feita por KOKUBO (ISO FDIS 23317, 2005) ainda está em discussão. As etapas propostas por esta norma, para a realização de teste, mesmo que seguida

cuidadosamente ainda não garantem a reprodutibilidade dos resultados, o que se deve, principalmente, ao fenômeno de precipitação que pode ocorrer durante a preparação da solução.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos durante a realização deste trabalho pode-se afirmar que:

As simulações teóricas, referentes à solução avaliadora de bioatividade (SAB) proposta por BASTOS *et al.* (2005), foram capazes de descrever a fase de fosfato de cálcio mais estável termodinamicamente. No caso, o fosfato octacálcio (OCP), na faixa de pH da deposição biomimética. Os resultados obtidos pela simulação corroboraram os experimentos realizados com essa solução.

Foi observado, com os dados da simulação teórica, o efeito do tampão TRIS no processo de deposição biomimética, pois ele forma complexos com os íons cálcio sob a forma Ca (TRIS)²⁺ e, portanto, parte desses íons está indisponível para precipitar como fosfato de cálcio.

O tempo de formação de uma camada de fosfato de cálcio com a SAB foi inferior ao da SBF, o que pode ser explicado pela isenção dos íons magnésio na SAB, que é considerado um inibidor no processo de nucleação dos fosfatos de cálcio. O menor tempo de obtenção do revestimento com a SAB juntamente com a quantidade de reagentes utilizados são indicativos de que o uso dessa solução para revestir implantes metálicos é vantajoso.

Conforme mostrado na Figura 4.14, as chapas de titânio sem tratamento com solução alcalina não promoveram a formação de fosfato de cálcio após exposição na SAB por 14 dias, o que sugere que essa solução pode ser utilizada em testes de bioatividade.

O revestimento obtido com a SAB possui morfologia tipo placa, característica do OCP, enquanto que o obtido com a SBF possui morfologia esférica e foi identificada como apatita carbonatada.

•

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar experimentalmente a influência do tampão TRIS no processo de nucleação dos fosfatos de cálcio. Com ênfase nas reações de complexação dos íons cálcio.

Estudar o processo de dissolução dos revestimentos obtido com a solução avaliadora de bioatividade, SAB.

Avaliar a resposta celular de osteoblastos humanos frente aos revestimentos obtidos com a solução avaliadora de bioatividade, SAB.

Por meio de hidrólise converter a fase de OCP em hidroxiapatita para estudar o processo de adsorção de proteínas em ambos os materiais.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS

- ABE, Y., KOKUBO, T., YAMAMURO, T., 1990, "Apatite Coating on Ceramics, Metals and Polymers Utilizing A Biological Process", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 1, n. 4, pp. 233-238.
- ANDRADE, M.C., 1999, *Nucleação e crescimento de hidroxiapatita em titânio*. tese de doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- AOKI, H., 1994, *Medical Applications of Hydroxyapatite*. Tokyo, St. Louis, Ishiyaku Euroamerica.
- APARECIDA, A.H., 2006, Recobrimento de Apatitas Empregando-se o Método Biomimético:Estudo da Influência dos Íons K⁺, Mg²⁺, SO4 ²⁻ e HCO₃ ⁻ na Formação de Hidroxiapatita. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil.
- BARRERE, F., LAYROLLE, P., VAN BLITTERSWIJK, C.A. et al. 2001, "Biomimetic coatings on titanium: a crystal growth study of octacalcium phosphate", Journal of Materials Science-Materials in Medicine, v. 12, n. 6, pp. 529-534.
- BARRERE, F., LAYROLLE, P., VAN BLITTERSWIJK, C.A. *et al.* 1999,
 "Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: A crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg2+ and HCO3-", *Bone*, v. 25, n. 2, pp. 107S-111S.

- BARRERE, F., VAN BLITTERSWIJK, C.A., DE GROOT, K. *et al.* 2002, "Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution", *Biomaterials*, v. 23, n. 9, pp. 1921-1930.
- BASTOS, I.N., PLATT, G.M., SOARES, G.A., 2005, "Thermodynamics study of simplified SBF solutions", Ouro Preto, MG, 6 Nov.11/11/2005
- BIGI, A., BOANINI, E., BRACCI, B. *et al.* 2005, "Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method", *Biomaterials*, v. 26, n. 19, pp. 4085-4089.
- BROWN, P.W., 1999, "Hydration behavior of calcium phosphates is analogous to hydration behavior of calcium silicates", *Cement and Concrete Research*, v. 29, n. 8, pp. 1167-1171.
- BROWN, W.E., 1966, "Crystal growth of bone mineral", *Clinical Orthopedic Related Research*, v. 44205-220.
- CAO, W., HENCH, L.L., 1996, "Bioactive materials", *Ceramics International*, v. 22, n. 6, pp. 493-507.
- CASTNER, D.G., RATNER, B.D., 2002, "Biomedical surface science: Foundations to frontiers", *Surface Science*, v. 500, n. 1-3, pp. 28-60.
- CHOU, Y.F., CHIOU, W.A., XU, Y.H. *et al.* 2004, "The effect of pH on the structural evolution of accelerated biomimetic apatite", *Biomaterials*, v. 25, n. 22, pp. 5323-5331.
- 5525148, 1996, Self-setting calcium phosphate cements and methods for preparing and using them.

- DEKKER, R.J., DE BRUIJN, J.D., STIGTER, M. *et al.* 2005, "Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs", *Biomaterials*, v. 26, n. 25, pp. 5231-5239.
- DOROZHKIN, S.V., EPPLE, M., 2002, "Biological and medical significance of calcium phosphates", *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 41, n. 17, pp. 3130-3146.
- ELLIOTT, J.C., 1994, "Carbonate apatites from aqueous systems". In: Elliot, J.C. (eds), *Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates*, Amsterdan, Elsevier Science Pub Co.
- FENG, Q.L., WANG, H., CUI, F.Z. *et al.* 1999, "Controlled crystal growth of calcium phosphate on titanium surface by NaOH-treatment", *Journal of Crystal Growth*, v. 200, n. 3-4, pp. 550-557.
- FUJIBAYASHI, S., NEO, M., KIM, H.M. et al. 2003, "A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na2O-CaO-SiO2 glasses", *Biomaterials*, v. 24, n. 8, pp. 1349-1356.
- HENCH, L.L., WILSON, J., 1993, An Introduction to Bioceramics., World Scientific Publishing Company.
- ISO FDIS 23317, 2005, Implants for surgery In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials.
- ISO 10993-9, 1999, Biological evaluation of medical devices Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products.
- JARCHO, M., 1992, "Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications", *Dent.Clin.North Am.*, v. 36, n. 1, pp. 19-26.

- JIANG, Z.Z., GE, D.T., SHI, W. *et al.* 2005, "Apatite/polypyrrole composite prepared by a biomimetic process", *Synthetic Metals*, v. 151, n. 2, pp. 152-155.
- JONASOVA, L., MULLER, F.A., HELEBRANT, A. *et al.* 2004, "Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium", *Biomaterials*, v. 25, n. 7-8, pp. 1187-1194.
- JUN, Y.K., KIM, W.H., KWEON, O.K. *et al.* 2003, "The fabrication and biochemical evaluation of alumina reinforced calcium phosphate porous implants", *Biomaterials*, v. 24, n. 21, pp. 3731-3739.
- KAMAKURA, S., SASANO, Y., SUZUKI, O., 2005, "Synthetic octacalcium phosphate (OCP) is an effective scaffold to regenerate bone", *International Congress Series*, v. 1284, pp. 290-295.
- KASUGA, T., KONDO, H., NOGAMI, M., 2002, "Apatite formation on TiO2 in simulated body fluid", *Journal of Crystal Growth*, v. 235, n. 1-4, pp. 235-240.
- KIM, H.M., SASAKI, Y., SUZUKI, J. *et al.* 2000, "Mechanical properties of bioactive titanium metal prepared by chemical treatment", *Key engineering materials*, vol. 192, pp. 227-230.
- KIZUKI, T., OHGAKI, M., KATSURA, M. *et al.* 2003, "Effect of bone-like layer growth from culture medium on adherence of osteoblast-like cells", *Biomaterials*, v. 24, n. 6, pp. 941-947.
- KOKUBO, T., KIM, H.M., KAWASHITA, M., 2003, "Novel bioactive materials with different mechanical properties", *Biomaterials*, v. 24, n. 13, pp. 2161-2175.
- KOKUBO, T., KIM, H.M., KAWASHITA, M. et al. 2000, "What kinds of materials exhibit bone-bonding?". In: Davies, J.E. (eds), Bone Engineering, Toronto, Canadá.

- KOKUBO, T., KIM, H.M., KAWASHITA, M. et al. 2004, "Bioactive metals: preparation and properties", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 15, n. 2, pp. 99-107.
- KOKUBO, T., MATSUSHITA, T., TAKADAMA, H., 2007, "Titania-based bioactive materials", *Journal of the European Ceramic Society*, v. 27, n. 2-3, pp. 1553-1558.
- LANDI, E., TAMPIERI, A., CELOTTI, G. *et al.* 2004, "Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite", *Biomaterials*, v. 25, n. 10, pp. 1763-1770.
- LEE, B.H., KIM, Y.D., LEE, K.H., 2003, "XPS study of bioactive graded layer in Ti-In-Nb-Ta alloy prepared by alkali and heat treatments", *Biomaterials*, v. 24, n. 13, pp. 2257-2266.
- LEGEROS, R.Z., 1991, "Calcium phosphates in oral biology and medicine". *Monographs in Oral Science*, S Karger Pub.
- LEGEROS, R.Z., 2002, "Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates", *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 395, pp. 81-98.
- LENG, Y., CHEN, J., QU, S., 2003, "TEM study of calcium phosphate precipitation on HA/TCP ceramics", *Biomaterials*, n. 13, pp. 2125-2131.
- LI, F., FENG, Q.L., CUI, F.Z. *et al.* 2002, "A simple biomimetic method for calcium phosphate coating", *Surface & Coatings Technology*, v. 154, n. 1, pp. 88-93.
- LI, S.J., YANG, R., NIINOMI, M. *et al.* 2004, "Formation and growth of calcium phosphate on the surface of oxidized Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy", *Biomaterials*, v. 25, n. 13, pp. 2525-2532.

- LIANG, F., ZHOU, L., WANG, K., 2003, "Apatite formation on porous titanium by alkali and heat-treatment", *Surface and Coatings Technology*, v. 165, n. 2, pp. 133-139.
- LISTE, S., GONZALEZ, P., SERRA, J. *et al.* 2005, "In vitro test of bioactive glasses. The role of the acellular solution volume", Sorento, Itália, 11 Sept.
- LIU, X.Y., CHU, P.K., DING, C.X., 2004, "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications", *Materials Science & Engineering R-Reports*, v. 47, n. 3-4, pp. 49-121.
- LIU, Y., HUNZIKER, E.B., RANDALL, N.X. *et al.* 2003, "Proteins incorporated into biomimetically prepared calcium phosphate coatings modulate their mechanical strength and dissolution rate", *Biomaterials*, v. 24, n. 1, pp. 65-70.
- LIU, Y., COOPER, P.R., BARRALET, J.E. *et al.* 2007, "Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells", *Biomaterials*, v. 28, n. 7, pp. 1393-1403.
- LU, X., 2004, *Engineering Titanium Surfaces for Improving Osteointegration*. Tese de Doutorado, Hong Kong University, Hong Kong.
- LU, X., LENG, Y., 2005, "Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid", *Biomaterials*, v. 26, n. 10, pp. 1097-1108.
- LU, X., LENG, Y., 2004, "TEM study of calcium phosphate precipitation on bioactive titanium surfaces", *Biomaterials*, v. 25, n. 10, pp. 1779-1786.
- LU, X., ZHAO, Z., LENG, Y., 2006, "Biomimetic calcium phosphate coatings on nitric-acid-treated titanium surfaces", *Materials Science and Engineering: C*, v. In Press, Corrected Proof.

- MARKOVIC, M., FOWLER, B.O., TUNG, M.S., 2004, "Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material", *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, v. 109, n. 6, pp. 553-568.
- MARQUES, P.A.d.A.P., 2003, *Reacções de superfície de cerâmicos de fosfato de cálcio em plasma simulado*. tese de doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.
- MASUDA, T., YLIHEIKKILA, P.K., FELTON, D.A. *et al.* 1998, "Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies", *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 13, n. 1, pp. 17-29.
- MULLER, L., MULLER, F.A., 2006, "Preparation of SBF with different HCO3content and its influence on the composition of biomimetic apatites", *Acta Biomaterialia*, v. 2, n. 2, pp. 181-189.
- PASTERIS, J.D., WOPENKA, B., FREEMAN, J.J. *et al.* 2004, "Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials", *Biomaterials*, v. 25, n. 2, pp. 229-238.
- PLATT, G.M., BASTOS, I.N., 2006, Simulador de Soluções Eletrolíticas, SimSeUniversidade estadual do Rio de Janeiro, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil.
- QUEIROZ, C.M.G.A., 2005, Cristalização de Biomateriais Vitrocerâmicos e Mineralização em Meio Fisiológico Simulado acelular. Tese de doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.
- RATNER, B.D., 2004, "A History of Biomaterials". In: Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemos, J.E. (eds), *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2 ed.,

- RIGO, E.C.S., OLIVEIRA, L.C., SANTOS, L.A. *et al.* 1999, "Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita", *Revista de Engenharia Biomédica*, v. 1521-29.
- SCHELLER, K.H., ABEL, T.H., POLANYI, P.E. et al. 1980, "Metal ion/buffer interactions. Stability of binary and ternary complexes containing 2-[bis(2hydroxyethyl)amino]-2(hydroxymethyl)-1,3- propanediol (Bistris) and adenosine 5'-triphosphate (ATP)", FEBS Journal, v. 107, n. 2, pp. 455-466.
- SERRO, A.P., SARAMAGO, B., 2003, "Influence of sterilization on the mineralization of titanium implants induced by incubation in various biological model fluids", *Biomaterials*, v. 24, n. 26, pp. 4749-4760.
- SHIRTLIFF, V.J., HENCH, L.L., 2003, "Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair", *Journal of Materials Science*, v. 38, n. 23, pp. 4697-4707.
- SIGEL, H., SCHELLER, K.H., PRIJS, B., 1982, "Metal ion/buffer interactions. Stability of alkali and alkaline earth ion complexes with triethanolamine (tea), 2amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (tris)and 2-[bis(2-hydroxyethyl)-amino] 2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Bistris) in aqueous and mixed solvents", *Inorganica Chimica Acta*, v. 66, pp. 147-155.
- SLOSARCZYK, A., PASZKIEWICZ, Z., PALUSZKIEWICZ, C., 2005, "FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods", *Journal of Molecular Structure*, v. 744, pp. 657-661.
- STOCH, A., JASTRZEBSKI, W., BROZEK, A. et al. 2000, "FTIR absorptionreflection study of biomimetic growth of phosphates on titanium implants", *Journal of Molecular Structure*, v. 555, pp. 375-382.
- SUZUKI, O., KAMAKURA, S., KATAGIRI, T. *et al.* 2006, "Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Cadeficient hydroxyapatite", *Biomaterials*, v. 27, n. 13, pp. 2671-2681.

- TAKADAMA, H., KIM, H.M., KOKUBO, T. et al. 2001, "XPS study of the process of apatite formation on bioactive Ti-6Al-4V alloy in simulated body fluid", Science and Technology of Advanced Materials, v. 2, n. 2, pp. 389-396.
- TAS, A.C., 2000, "Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 degrees C in synthetic body fluids", *Biomaterials*, v. 21, n. 14, pp. 1429-1438.
- UCHIDA, M., KIM, H.M., MIYAJI, F. *et al.* 2002, "Apatite formation on zirconium metal treated with aqueous NaOH", *Biomaterials*, v. 23, n. 1, pp. 313-317.
- VALLET-REGI, M., GONZALEZ-CALBET, J.M., 2004, "Calcium phosphates as substitution of bone tissues", *Progress in Solid State Chemistry*, v. 32, n. 1-2, pp. 1-31.
- VANZILLOTTA, P.S., SADER, M.S., BASTOS, I.N. *et al.* 2006, "Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments", *Dental Materials*, v. 22, n. 3, pp. 275-282.
- VERCIK, L.C.O., 2004, Estudo do recobrimento de hidroxiapatita sobre superfície de Ti c.p. e liga Ti-Al-4V, sem e com deposição de TiO₂ por plasma-spray. tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.
- WANG, C.X., WANG, M., ZHOU, X., 2003, "Nucleation and growth of apatite on chemically treated titanium alloy: an electrochemical impedance spectroscopy study", *Biomaterials*, v. 24, n. 18, pp. 3069-3077.
- WILLIAMS, D.F., 1987, Definitions in biomaterials. Elsevier ed. Amsterdam,
- XIN, R., LENG, Y., CHEN, J. *et al.* 2005, "A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo", *Biomaterials*, v. 26, n. 33, pp. 6477-6486.

- YAN, W.Q., NAKAMURA, T., KAWANABE, K. *et al.* 1997, "Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants", *Biomaterials*, v. 18, n. 17, pp. 1185-1190.
- YANG, X.J., HU, R.X., ZHU, S.L. *et al.* 2006, "Accelerating the formation of a calcium phosphate layer on NiTi alloy by chemical treatments", *Scripta Materialia*, v. 54, n. 8, pp. 1457-1462.