



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CERÂMICAS
À BASE DE HIDROXIAPATITA E FOSFATO-TRICÁLCICO**

CHRISTIANE RIBEIRO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais.

Orientadora:
Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani

**São Paulo
2003**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CERÂMICAS À BASE DE
HIDROXIAPATITA E FOSFATO-TRICÁLCICO**

CHRISTIANE RIBEIRO



Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear- Materiais

Orientadora:

Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani

SÃO PAULO

2003

*A meus pais queridos, Luiz Carlos
e Tânia e a Jackson, meu noivo
dedico esta conquista.*

AGRADECIMENTOS

Após a realização de um trabalho como este, percebemos que houve muitas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para esta conquista, às quais gostaria de humildemente agradecer, externando todo o meu reconhecimento e gratidão.

À Dra Ana Helena A. Bressiani pela oportunidade de um novo aprendizado, exemplo de profissionalismo, por me ensinar o verdadeiro significado de uma pesquisa e, pelas críticas e postura rigorosa sempre em prol do desenvolvimento do trabalho e amadurecimento profissional. Muito obrigada pela confiança, apoio incondicional, compreensão nos momentos difíceis e orientação durante todo este percurso. E que a competência com a qual me orientou seja a mesma, nesta nova etapa que se aproxima.

Ao CNPq e principalmente à Fapesp pelo auxílio financeiro a este trabalho.

Ao Dr José Carlos Bressiani pela oportunidade de conhecer o Grupo de Materiais Cerâmicos do IPEN, exemplo e apoio dado ao desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Pilar A. Sepulveda pela co-orientação, amizade e confiança, pelas discussões enriquecedoras que muito colaboraram para o meu aprendizado, pelo incentivo e exemplo de humildade e profissionalismo.

À Dra Magali C. Valente e Dra Eliana C.S. Rigo pela colaboração ao desenvolvimento deste trabalho, com as análises de ICP-AES e FTIR, pelas sugestões sempre pertinentes e nova amizade.

A todos os colegas do Grupo de Materiais Cerâmicos que me receberam de maneira calorosa, marcada pela simpatia e coleguismo; pela amizade e convívio durante este tempo, pelo incentivo, ajuda e sugestões.

Aos colegas Marcelo Carbonari e Cláudia Patrícia Ossa pelas discussões e troca de experiência a respeito da ampla área de biomateriais e amizade.

As minhas amigas conterrâneas Andreza P. Ribeiro e Luciana A. Farias, sendo uma das poucas testemunhas do nervosismo que passei em alguns momentos para administrar as mudanças na vida pessoal e profissional, pela postura fraternal que tiveram comigo

nestes momentos difíceis, pela insistência, incentivo, convívio, apoio incondicional e também àqueles momentos de descontração que passamos juntas.

À Dra Mitiko Saiki e equipe pela realização das análises de cálculo adotando a técnica AAN.

Aos colegas, pesquisadores, alunos de Iniciação Científica e aos técnicos do CCTM que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, grata pela ajuda ou pelo simples convívio durante este período.

A todos os primos paulistanos e em especial à tia Maria que me acolheram em seus lares tornando a distância da família suportável, grata pela atenção, pelos momentos de alegria e exemplo de vida e perseverança.

A Jackson Marcelo Vidal pela presença constante em minha vida que mesmo à distância tem me proporcionado confiança e segurança. Agradeço pela paciência que teve ao vivenciar esta vida acadêmica, pelos conselhos, incentivo eterno aos estudos e principalmente o amor sincero que muito tem colaborado, me fortalecendo para alcançar este novo objetivo.

Minha eterna gratidão a todos os meus familiares que contribuíram decisivamente para a conquista deste trabalho: Luise Carla (irmã), Camila (irmã), Lucas Augusto (irmão) e em especial a meus pais Luiz Carlos e Tânia pela oportunidade de chegar até aqui, pelas constantes demonstrações de carinho, dedicação, incentivo e orações.

Aos meus sobrinhos Matheus e Isabelle pelos momentos de descontração e fonte inesgotável de alegria.

Aos queridos avós, tios e primos que sempre torceram por mim.

De uma maneira especial a Deus pelo privilégio de chegar onde estou, pela força, saúde, inspiração, ... enfim por tudo que me proporcionou e tem proporcionado, minha sincera e eterna gratidão.

A pirâmide da elevação tão somente se alteia, com a necessária segurança,
quando erguida em quatro ângulos distintos:

compreender;

aceitar;

amar;

servir.

(Emmanuel)

PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CERÂMICAS À BASE DE HIDROXIAPATITA E FOSFATO-TRICÁLCICO

Christiane Ribeiro

RESUMO

Cerâmicas de fosfatos de cálcio, bioativas e reabsorvíveis possuem uma infinidade de aplicações na área médica, como substitutos ósseos devido a biocompatibilidade e osteocondução, permitindo a proliferação de células sobre a superfície destes materiais, e em sistemas complexos para liberação de fármacos. Neste trabalho, foram processadas amostras cerâmicas de hidroxiapatita (HAp), β -fosfato - tricálcico (TCP) e cerâmicas bifásicas (HAp/TCP), em diversas proporções. Os materiais de partida foram caracterizados por Difractometria de Raios X (DRX), distribuição do tamanho médio de partículas, por difração a laser, área de superfície específica, por BET, espectroscopia de infravermelho e de emissão atômica por plasma induzido e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os pós de HAP, TCP e suas misturas foram homogeneizados via úmida, prensados uniaxial e isostaticamente a frio (200 MPa) na forma de corpos cilíndricos de 7 e 12 mm de diâmetro. Os parâmetros de sinterização em forno com atmosfera oxidante foram definidos por estudo dilatométrico. As amostras atingem alto grau de retração durante a sinterização, alcançando alta densidade final (~95% pt), a densificação aumenta com a diminuição da quantidade de TCP. As amostras sinterizadas foram caracterizadas por DRX e MEV. Não foi detectada a formação de novas fases nas amostras sinterizadas. A cinética de dissolução e reatividade *in vitro* das cerâmicas foi investigada a partir da imersão dos corpos cerâmicos em SBF - “Solution Body Fluid” mantidos a 37°C, por até 3 semanas. O estudo de dissolução foi feito a partir de leituras de pH e análise quantitativa de cálcio por ativação neutrônica das soluções e variação de massa das amostras. A superfície das cerâmicas foi analisada por FTIR e MEV-EDS. Os resultados de dissolução mostram que as cerâmicas de TCP apresentam cinética de dissolução mais rápida que as demais cerâmicas, sendo que as bifásicas apresentam maior tendência a formação da camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) neste período de imersão.

Palavras-Chave: hidroxiapatita, fosfato-tricálcico e bioatividade.

PROCESSING AND CHARACTERIZATION OF CERAMICS BASED HYDROXYAPATITE AND TRICALCIUM PHOSPHATE

Christiane Ribeiro

ABSTRACT

Calcium phosphate bioactive and resorbable ceramics find an infinity of applications in the medical area, such as bone substitutes due to its biocompatibility and osteoconduction capacity, which enable cell proliferation on the surface of these materials and in complex drugs delivery systems. In this work, samples were prepared using hydroxyapatite (Hap), β -tricalcium phosphate (TCP) and biphasic ceramics (Hap/TCP) in different ratios. Starting materials were characterized by X-ray diffractometry (XRD), particle size distribution by laser diffraction, specific surface area by BET, infrared spectroscopy (FTIR) and of inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) and by scanning electron microscopy (SEM). The powders of HAp, TCP and their mixtures were homogeneized, uniaxially and cold isostatically pressed (200 MPa) into cylindrical green bodies of 7 and 12 mm. Parameters of sintering in oxidative atmosphere furnace were defined after dilatometric studies. The samples exhibited high degree of shrinkage during sintering which enable to achieve high final densities ($\sim 95\%$ pt). The densification increases with the decreasing of TCP content. The sintered samples were characterized by XRD and SEM. Formation of other phases weren't detected in any of the sintered samples. The dissolution kinetics and in vitro reactivity of ceramics were investigated using simulated body fluid (SBF) at 37°C for 3 weeks. The dissolution study was investigated by means of pH and neutron activation analysis (NAA) to calcium quantitative analysis, of the solutions and weight variation of the samples. The surfaces of the samples were investigated by FTIR and SEM-EDS. The results of dissolution demonstrated that TCP ceramics show dissolution kinetics quicker than the other samples, and biphasic ceramics demonstrated major tendency to the formation of the hydroxycarbonateapatite (HCA) layer within the immersion period.

Key words: hydroxyapatite, tricalcium phosphate and bioactivity.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	6
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 Considerações Gerais	8
3.2 Tecido ósseo	10
3.2.1 Características físicas	10
3.2.2 Composição	11
3.3 Implantes	13
3.4 Cerâmica densa como Biomaterial	14
3.5 Materiais Cerâmicos Implantáveis	16
3.6 O significado da Bioatividade	18
3.7 Cerâmicas a base de fosfatos de cálcio	21
3.8 Cerâmicas Bifásicas	26
3.9 Testes <i>in vitro</i> de Biocompatibilidade e Bioatividade	28
3.10 Dissolução	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Caracterização das matérias-primas	38
4.1.1 Difração de raios-X	38
4.1.2 Espectroscopia de emissão por plasma induzido (ICP-AES)	38
4.1.3 Distribuição de tamanho de partículas	39
4.1.4 Área superficial específica	39

	Página
<i>4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	40
<i>4.1.6 Espectroscopia de Infravermelho</i>	40
4.2 Processamento dos pós	41
4.3 Obtenção dos corpos de prova	42
4.4 Experimentos <i>in vitro</i>	42
4.5 Caracterização dos corpos de prova	45
4.6 Análise das soluções de SBF	46
<i>4.6.1 Medidas de pH</i>	46
<i>4.6.2 Análise por Ativação Neutrônica (AAN)</i>	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Caracterização física e química dos pós	49
5.2 Sinterização	58
5.3 Caracterização dos corpos sinterizados	62
5.4 Experimentos <i>in vitro</i>	66
6 CONCLUSÃO	90
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

Aqui é feita uma breve contextura sobre a origem e desenvolvimento da linha de pesquisa multidisciplinar que envolve os Biomateriais, com um retrospecto histórico sobre a importância das próteses obtidas a partir de diferentes materiais que deram início ao desenvolvimento de novos implantes, sobretudo os cerâmicos. Enfatiza-se também o progresso alcançado pela Engenharia, destacando as necessidades que hoje têm impulsionado o mercado de próteses e implantes, em específico e os aspectos sociais e de saúde das populações de todo mundo, que apresentam, cada vez mais, uma predisposição à doenças ou traumas que acometem o tecido ósseo.

1 INTRODUÇÃO

Os materiais têm acompanhado a evolução do homem, desde as civilizações anteriores a era cristã, sendo de grande importância para o desenvolvimento atual, seja ele, utilitário ou funcional para uso cotidiano e aplicações tecnológicas para fins industriais, inclusive voltados à área médica ¹.

Desde há muito tempo, o homem tem procurado restaurar funções do corpo humano, danificado por trauma ou doença, com o uso de próteses. A origem da palavra PRÓTESE vem da cultura grega, sendo: *pros* – em lugar de, e *tithemi* – colocar, ou seja o significado de prótese quer dizer “para colocar em lugar de” ².

O conceito da substituição de um membro perdido é muito antigo. O Historiador romano Heródoto relatou em 484 a.C. sobre um homem persa que escapou das algemas de ferro que prendiam sua perna cortando fora seu pé, e substituindo-o por um pé de madeira. A mais antiga prótese a sobreviver até os tempos modernos foi uma perna de cobre e madeira, datada do terceiro século a.C. Da época do renascimento, já há exemplos de próteses mais sofisticadas, especialmente do ponto de vista estético ².

A funcionalidade das próteses anteriores ao século XX sempre foi bastante limitada pela falta de materiais específicos, conhecidos da engenharia e fisioterapia, indispensáveis a uma boa protetização e, principalmente, pelo estágio rudimentar da medicina, como o desconhecimento da assepsia e antibióticos, provocando a morte da maior parte dos candidatos à amputação. Foi apenas no século XIX que se passou a utilizar o torniquete de forma sistemática; antes de 1600 não se conhecia nem o enfaixamento do coto para estancar o sangramento, sendo usados métodos precários, como cauterização e esmagamento ^{2,3}.

Após as duas grandes Guerras Mundiais, havia um grande contingente de indivíduos com lesões ósseas graves e amputados que necessitava de uma prótese ou de materiais que restabelecessem a função das porções ósseas danificadas. Na época da primeira guerra, já existiam próteses com articulações de joelho, porém seu custo era elevado: os componentes eram confeccionados individualmente, em aço. Assim, o público em geral, ficava restrito ao uso de pernas de madeira, ou de alumínio ^{2,3,4}.

Estes dois episódios históricos das duas Guerras marcaram o desenvolvimento dos materiais para fins médicos. A necessidade de se evitar a amputação de membros que haviam perdido suas funções, fez com que o homem utilizasse praticamente todos os elementos disponíveis. Os danos provocados à saúde dos pacientes, por muitos dos

materiais utilizados nos atos cirúrgicos, foram considerados catastróficos. Esses resultados fizeram com que em 1947 fosse recomendada oficialmente a utilização de aços inoxidáveis. Após esse período, além dos metais, outros materiais considerados adequados foram desenvolvidos ^{3,4}.

Todo material “não viável” utilizado em dispositivos médicos, com a intenção de integração com sistemas biológicos pode ser chamado de biomaterial ⁵. Os biomateriais sintéticos envolvem compostos metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos. Eles devem apresentar características específicas para cada tipo de função desejada e não devem: sofrer modificações físico-químicas durante esterilização, produzir radicais livres, ser cancerígeno, incitar reações inflamatórias, sofrer desgaste superficial, apresentar falhas mecânicas, formar trombos, ou qualquer outro sinal de rejeição ^{3,4,6}.

Na ausência de um único material que possa suprir todas as exigências do sistema, torna-se necessário combinar materiais, explorando ao máximo o potencial de cada um.

O uso de biomateriais para regeneração de tecidos e órgãos é chamado de engenharia de tecido, um campo interdisciplinar no qual os princípios de engenharia e as ciências da vida são aplicadas voltadas à geração de substitutos biológicos dirigidos para a criação, preservação ou restauração da perda da função de um órgão ou tecido ⁶.

O ímpeto desta área é fornecido pela carência de transplantes de órgãos e tecidos. Também a propagação de doenças incuráveis tem estimulado o desenvolvimento de implantes, inclusive os ósseos, apesar das doenças ortopédicas serem de menor apelo público por não serem consideradas fatais. O reparo ou substituição do tecido ósseo lesado por trauma ou idade é de particular interesse devido ao crescente aumento estatístico de patologias ósseas que atinge centenas de milhões de pessoas pelo mundo. As doenças articulares representam 50% das infecções de condição crônica em pessoas com mais de 65 anos e as dores nas costas são a segunda causa de falta ao trabalho por doença ⁷.

O reparo do tecido ósseo permite a necessidade da utilização de materiais capazes de substituí-lo com sucesso. O comportamento variável do tecido ósseo, cujas propriedades (mecânicas e biológicas) podem variar mais de 100 vezes (ponto a ponto) permite que uma margem muito grande de materiais possa ser utilizada para esta finalidade ⁸.

À medida que as técnicas de processamento para materiais cerâmicos foram sendo inovadas, com o passar dos anos, dando abertura às cerâmicas avançadas com melhores propriedades e conseqüentemente um maior interesse em aplicações diversas, houve uma revolução para o uso de cerâmicas projetadas especialmente para reparar, reconstruir e substituir porções ósseas acometidas por alguma patologia ou traumatismos diversos. As

cerâmicas utilizadas com este propósito são chamadas de biocerâmicas. Mais de 25% dos implantes atualmente realizados são feitos com este tipo de material ^{9, 10}.

Tem-se conhecimento do uso de cerâmicas para implantes ósseos datados de 1894 com a utilização do gesso como substituto para ossos. Contudo, o gesso apresenta baixa resistência e é rapidamente absorvido pelo organismo, o que gerava a fragmentação e a degradação desse material em pouco tempo ¹⁰. As cerâmicas começaram a ser exploradas para o uso clínico por volta de 1970, consideradas como implantes de 3ª geração, depois de detectar falhas graves com o uso dos materiais disponíveis no mercado como: aço inoxidável, ligas de cobalto e polimetilmetacrilato (PMMA). Um dos materiais mais promissores empregados como “ossos artificiais”, conhecidos como materiais cerâmicos de “fronteiras inteligentes” são as cerâmicas bioativas como a hidroxiapatita e o biovidro, capazes de desenvolver ligações na interface, osso/implante ^{6, 9}.

O principal avanço no campo dos biomateriais atualmente, deve-se ao desenvolvimento sócio-econômico como conseqüência da expansão no tratamento clínico de um número de pacientes cada vez mais acentuado, seja por serviços de saúde pública, ou seguros de saúde privados. A quantidade de pacientes tem aumentado, em virtude do aumento da expectativa de vida, e padrão de vida em certas regiões do mundo, principalmente em países mais desenvolvidos. O aumento na expectativa de vida têm resultado num extraordinário número de casos de pacientes com osteoporose e lesões do tecido ósseo decorrentes da idade, situação na qual o tecido ósseo fica vulnerável às fraturas, devido a perda de densidade e resistência. As fraturas relacionadas à osteoporose dobraram na última década, estima-se que mais de 40% delas ocorram em mulheres com mais de 50 anos ^{7, 11}.

Levando-se em conta também, o enorme aumento do número de veículos motorizados e em contrapartida o aumento de acidentes de trânsito, fica evidente porque o número de próteses e patologias ósseas é alarmante nos últimos anos. No Brasil, foram realizados 3500 implantes para reconstrução de quadril e joelho só no primeiro trimestre de 2002. A projeção das despesas de saúde em cuidados com trauma para o ano de 2010, nos países desenvolvidos, indica um gasto 25% maior. Atualmente o mercado mundial de próteses cirúrgicas é estimado em 11 bilhões de dólares ¹¹.

O desenvolvimento no campo de biomateriais exige uma cuidadosa cooperação de especialistas com diferentes formações, visto que cada problema deve ser considerado em diferentes aspectos gerando a pluridisciplinaridade deste campo.

É concebível que no futuro seja possível usar com facilidade, produtos sintéticos ou órgãos crescidos e tecidos para substituir aqueles danificados por doença ou trauma. As pessoas não sucumbirão à morte devido a não disponibilidade de órgãos ou tecidos para transplantes. Estas são metas nobres com implicações de alcance que já estão sendo atingidas na atualidade com a tecnologia disponível e também com o uso adequado de biomateriais.

Um dos principais questionamentos que aflora quando é analisada a viabilidade de um material para fins médicos (odontológico ou ortopédico) é a resposta do organismo do hospedeiro à sua presença. Um material cerâmico contendo as fases de fosfatos de cálcio, hidroxiapatita (HAp) e fosfato-tricálcico (TCP), torna-se atrativo, já que estes materiais são capazes de responder diferentemente às complexas reações do organismo, sem qualquer dano prejudicial. O TCP atua com sua natureza reabsorvível, fazendo com que parte do material seja dissolvido, fornecendo matéria-prima para o crescimento do osso, enquanto a HAp de natureza bioativa, promove uma excelente fixação, permanecendo no local para dar sustentação ao implante. Tendo em vista as particularidades destas cerâmicas, este trabalho tem como objetivo, o processamento de corpos cerâmicos constituídos de HAp e TCP em diferentes proporções, sem modificar as características de cada fase, e a avaliação da reatividade destes materiais em testes *in vitro* com SBF – “ Solution Body Fluid ”, no sentido de compreender melhor a atuação conjunta destas fases.

Foram selecionados tópicos considerados mais apropriados para compor este capítulo e dar embasamento teórico para este trabalho de mestrado, tendo em vista a complexidade do tema. Abordou-se alguns conceitos importantes, de maneira sucinta, como: biofuncionalidade, bioatividade e biocompatibilidade que podem caracterizar um biomaterial, bem como os materiais que são destinados a aplicações médicas, em especial as cerâmicas constituídas de hidroxiapatita (HAp) e fosfato-tricálcico (TCP), cujas propriedades também foram destacadas e mereceram um tópico, à parte. Para compreender melhor a atuação destes seletos materiais é necessário conhecimento sobre as particularidades do tecido ósseo, que também foi descrito neste capítulo, visando também facilitar o entendimento da reatividade das cerâmicas HAp/TCP, envolvendo processos de dissolução, que é compatível com o metabolismo ósseo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Considerações Gerais

As situações que requerem a utilização de biomateriais são muitas, indo de problemas estéticos, até extração de tumores, sistemas de liberação de fármacos de maneira controlada, enfermidades que ocasionam danos irreversíveis, defeitos congênitos com deficiências funcionais e atrofia com perda gradual de tecidos. Esses diferentes casos clínicos podem ser satisfeitos com biomateriais que desempenhem a função desejada e, para isto é necessário que o mesmo possua um conjunto de propriedades específicas, isto é, seja biofuncional. Algumas das propriedades que asseguram a *biofuncionalidade* são: transmissão de cargas e distribuição de tensões, articulação com baixo atrito, preenchimento de cavidades, geração e aplicação de estímulos elétricos, transmissão de sons, transporte e emissão de drogas, guia para regeneração de tecidos, etc.^{12, 13}.

A capacidade de um material funcionar, em uma aplicação específica, com uma resposta apropriada do hospedeiro é chamada de *biocompatibilidade*. Quando os materiais utilizados como implantes apresentam biocompatibilidade, mas no entanto, são *bioinertes*, o organismo vivo isola o dispositivo, com a formação de uma camada de tecido fibroso pouco vascularizado, de espessura variável. A aceitação é menor quanto maior a espessura^{14, 15, 16}.

Os materiais bioinertes mantêm suas propriedades físicas e mecânicas durante a vida útil do implante clínico; possuem reatividade bioquímica mínima com o tecido hospedeiro, sendo considerados estáveis. Nessa categoria, encontram-se os óxidos, como: alumina (Al_2O_3), titânia (TiO_2), zircônia tetragonal policristalina (ZrO_2 -TZP) e os materiais carbonosos. Os materiais bioinertes são usados tanto em funções de revestimento, como de sustentação mecânica, principalmente em ortopedia, como cabeça de fêmur em implantes de quadril. Estas aplicações são possíveis, pois os materiais cerâmicos podem apresentar alta densidade relativa e facilidade de polimento, o que permite diminuir o coeficiente de atrito entre a cabeça de fêmur cerâmica e o componente acetabular, de polietileno ou cerâmica, comparado às cabeças de fêmur produzidas a partir de materiais metálicos^{9, 17}.

Os materiais *biotolerantes*, representados principalmente por metais e polímeros, apresentam reações bioquímicas na interação com o tecido vivo. Embora algumas dessas reações sejam nocivas, são toleradas pelo meio biológico. Esses materiais são utilizados em função das propriedades mecânicas de sustentação. Os metais mais usados são: aço

inoxidável, ligas de Vitalium (Cr-Co) e ligas de titânio. Usualmente, emprega-se o polimetilmetacrilato (PMMA) como polímero biotolerante ^{9,17}.

Os materiais *bioativos* são aceitos pelo tecido hospedeiro e não produzem reações tóxicas ou nocivas. Esses materiais são divididos em dois grupos, os *reabsorvíveis* e os de *superfície ativa*. As características dos materiais reabsorvíveis e bioativos possibilitam preenchimento das cavidades ósseas, servindo de suporte e condutor ósseo. Esses materiais implantados são absorvidos e transformados naturalmente em novo tecido ósseo, os principais são fosfato-tricálcico (TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e sulfato de cálcio, $(\text{CaSO}_4)_n \cdot \text{H}_2\text{O}$. Os materiais de superfície ativa, em geral, não são absorvidos, mas desenvolvem ligações químicas com o tecido vivo. Essas ligações auxiliam no processo de união e fixação da prótese. Fazem parte desse grupo: hidroxiapatita (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, fluorapatita, $\text{F}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ e o biovidro ^{9, 18, 19, 20}.

Os biomateriais de superfície ativa são propensos à nucleação *in situ* e crescimento de cristais de carbonato apatita na superfície, a partir de fluidos corpóreos. A atividade biológica da maioria desses materiais cerâmicos bioativos está relacionada com a sua capacidade de promover a formação de cristais de carbonato apatita análogos ao mineral ósseo e também associações específicas a proteínas ósseas, sendo o ponto inicial para a reconstrução do tecido ^{20, 21}.

A formação de carbonato apatita reflete na propriedade de bioatividade dos biomateriais e na importância do desenvolvimento da interface implante/tecido para os materiais que apresentam esta propriedade em particular. O mecanismo envolvido apresenta as etapas de: acidificação do meio, como uma consequência da interação celular com o material; dissolução de materiais à base de fosfato de cálcio e formação de carbonato apatita, associada com uma matriz orgânica. Esta matriz pode incorporar íons carbonato ou Mg do fluido biológico, necessários à produção de uma matriz extracelular (proteína de colágeno e sem colágeno) e conseqüentemente à mineralização simultânea de fibrilas de colágeno e incorporação de cristais de HCA (hidroxicarbonatoapatita), recém formados no remodelamento do novo osso ^{14, 20, 21}.

3.2 Tecido Ósseo

3.2.1 Características físicas

O tecido ósseo é uma variedade do tecido conjuntivo constituinte do esqueleto, sendo um dos tecidos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Serve de suporte para as partes moles, protege órgãos vitais, aloja e protege a medula óssea. Além dessas funções, proporciona apoio aos músculos, transformando suas trações em movimentos úteis ^{22, 23}.

Como os ossos variam em formato, sua aparência macroscópica conduziu a um tradicional agrupamento em ossos: longos, curtos, planos e irregulares. No entanto, esta classificação consagrada pelo tempo não tem grande mérito. Obviamente, o material ósseo difere de indivíduo para indivíduo, sobretudo entre sexo e idade. A forma da amostra ser conduzida a um teste, também varia, podendo estar na forma de ossos inteiros ou blocos de osso cortical (denso ou compacto- porção externa da matriz óssea) ou trabecular (poroso ou esponjoso- porção interna da matriz óssea), ou mistura destes, obtendo-se diferentes comportamentos e valores de suas propriedades.

Na sua estrutura e forma, os ossos são afetados por fatores genéticos, metabólicos e mecânicos, e cada osso apresenta uma longa história funcional através de incontáveis gerações sucessivas. Por isso, existe uma grande demanda de materiais para implantes ósseos para que possam atingir sua funcionalidade e suprir da melhor forma possível, o seu desempenho perante o histórico do indivíduo.

As propriedades do osso vivo foram muito estudadas quanto à estrutura macroscópica, microscópica e ultra-estrutural, especialmente em relação a fatores mecânicos. Sua íntima mistura de componentes inorgânicos duros e orgânicos elásticos, resistentes quase que igualmente à compressão e tensão, difere da maioria dos materiais fabricados pelo homem, que são geralmente melhores em um aspecto ou em outro. Na resistência à tração, os ossos se assemelham ao ferro fundido, e possuem apenas um terço de sua densidade. A resistência à ruptura é de 240 a 300 MPa. Em flexibilidade, os ossos se assemelham ao aço mas possuem apenas a metade da sua resistência. Na compressão são semelhantes às cerâmicas, mas os ossos possuem ampla margem de segurança para suportar peso e impacto. Os músculos em contração são os maiores agentes de pressão, mesmo em articulações que suportam peso, especialmente no movimento ativo ⁸.

Apesar da resistência às tensões e da dureza do osso, o tecido ósseo é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que estão submetidos normalmente. Essas propriedades são possíveis porque o osso é um material compósito. A HAp óssea é resistente à compressão, com baixa resistência à tração e possui módulo de elasticidade elevado. O colágeno, por outro lado, tem limite de resistência à tração elevado, mas baixo módulo de elasticidade. A combinação resulta em um material compósito com alta resistência à tração e alto módulo de elasticidade, leve e bastante flexível. As trincas nos cristais de HAp não se propagam nas fibras adjacentes de colágeno, pois estas podem ser deformadas, sem necessariamente serem rompidas ^{24, 25, 26}.

Os ossos devem ser estudados isoladamente com relação às demandas funcionais. Além disso, as propriedades físicas do tecido ósseo (deformação plástica e elástica, dureza e propriedades compressivas) variam em diferentes regiões de um mesmo osso. Devido à complexidade estrutural de qualquer elemento esquelético, incluindo as variações na espessura, densidade, modelagem cortical e trabeculação interna, alguns pesquisadores consideram os dados experimentais do comportamento mecânico do osso obtidos por meio de métodos de engenharia, assim como os valores úteis significativos para as propriedades físicas em qualquer osso individual, como improváveis ⁸.

3.2.2 Composição

A matriz óssea é constituída de uma substância fundamental, altamente mineralizada, na qual estão engastadas numerosas fibras colágenas, geralmente ordenadas em arranjos paralelos. No osso maduro, a matriz é moderadamente hidratada, com 10-20% de sua massa sendo água; em seu peso seco, 60-70% são compostos de material inorgânico, sais minerais (cristais semelhantes a hidroxiapatita e fosfato de cálcio amorfo), 30-40% são colágeno e o restante (aproximadamente 5%) são proteínas e carboidratos, principalmente conjugados com glicoproteínas (osteonectina, osteocalcina, etc). As proporções destes diversos componentes variam com a idade, localização e condição metabólica. Nos estágios iniciais da formação do osso, antes da mineralização, a matriz é denominada de osteóide. Nos ossos adultos, a quantidade de osteóide é muito pequena, refletindo a remodelação local do osso na qual a mineralização se processa e rapidamente segue a deposição da matriz orgânica. Em certos estágios doentes, onde a mineralização é

prejudicada, notavelmente no raquitismo, a quantidade de osteóides é muito superior a uma condição saudável^{8, 27}. A Figura 3.2.1, apresenta uma matriz totalmente mineralizada⁹.

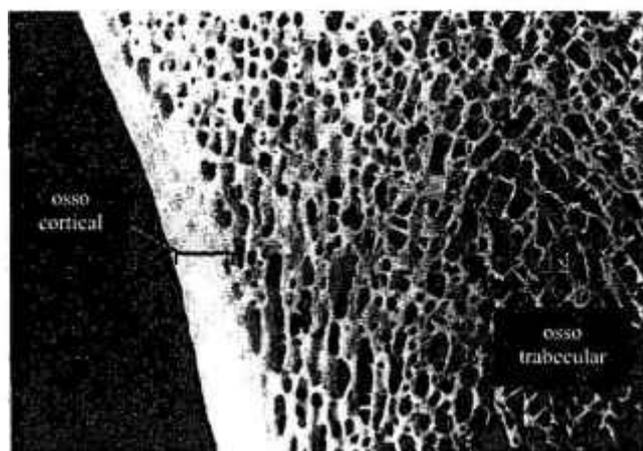


Figura 3.2.1 – Matriz óssea constituída de microestruturas densa (compacta) e porosa (trabecular)⁹.

Os sais do osso formam os constituintes inorgânicos da matriz óssea, conferindo ao osso sua dureza e muito de sua rigidez. Os íons principais que compõem a parte mineral do osso incluem: cálcio, fosfato, hidroxila e carbonato; os íons menos numerosos são relativos ao citrato, que é responsável pela captura de íons cálcio, formando um complexo que serve de base à formação da HAp do osso, ao magnésio, sódio, potássio, fluoreto, cloreto, ferro, zinco, cobre, alumínio, chumbo, estrôncio, silício e boro, muitos destes estando presentes apenas em quantidades muito pequenas^{28, 29}.

O íon cálcio é importante para o funcionamento de diversos sistemas enzimáticos, inclusive os responsáveis pela contração muscular e pela transmissão de impulso nervoso, coagulação do sangue e adesão celular^{30, 31}.

Na porção mineral dos ossos maduros, os cristais ósseos tomam a forma de agulhas alongadas, placas delgadas ou estruturas semelhantes a lâminas de aproximadamente 10nm de comprimento por 1,5-3nm de espessura. Eles freqüentemente estão aglomerados, com os eixos longos paralelos aos das fibras colágenas vizinhas, ou localizando-se dentro delas. Os estreitos espaços entre os cristais contêm água e macromoléculas orgânicas. A difração de raios X mostra que eles possuem uma subestrutura prismática hexagonal que, embora muito semelhante à da hidroxiapatita mineral, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, difere em alguns aspectos, como, por exemplo, na presença de quantidades substanciais de outros íons, como o

carbonato. Os íons fluoreto podem ser substituídos pelos íons hidroxila, e vários outros íons podem ser mantidos dentro do arranjo cristalino ⁸.

O metabolismo afeta o crescimento do osso em todos os estágios do desenvolvimento. A disponibilidade de cálcio, fósforo e vitaminas A, C e D são essenciais à osteogênese e, portanto definem a forma e dimensão do esqueleto ⁸.

As composições e propriedades das partes orgânicas e inorgânicas, também sofrem diferenciação com a idade, sexo, tipo de tecido, dieta alimentar e hábitos saudáveis ou não do indivíduo ^{8, 24, 27}.

Na maioria dos vertebrados, o esqueleto não é apenas um conjunto de peças bem articuladas entre si, mas também um banco dinâmico de reservas minerais, no qual o organismo armazena 90% de cálcio na forma de hidroxiapatita e o libera quando necessário ^{24, 27}.

3.3 Implantes

A colocação de dispositivos no corpo humano é uma prática de longa data. As ligas metálicas tornaram-se mais utilizadas entre 1875 e 1925 coincidindo com avanços nas técnicas cirúrgicas. Hoje o número de biomateriais utilizados cresceu muito, e como consequência, as áreas médicas e odontológicas têm à sua disposição inúmeros dispositivos implantáveis, que variam na forma, tamanho, tipo de material e preço. A grande diversidade obtida em termos de materiais implantáveis só foi possível a partir da interação e cooperação de profissionais especializados de diferentes áreas. Muitos problemas já foram superados, ou estão sendo resolvidos, e outros ainda não podem ser solucionados, com a tecnologia disponível ^{32, 33}.

Os fatores que determinam o sucesso do implante e influenciam na resposta do hospedeiro, após o ato cirúrgico, estão relacionados diretamente ao material, cirurgia e paciente ⁹. Em relação ao material, deve-se ter um controle rigoroso durante o processamento para que a composição química seja de alta pureza, minimizando danos teciduais. Na utilização de material particulado, na faixa de 1 a 4 μm , estimula-se a fagocitose e a formação de macrófagos, isto é, as células identificam as partículas como material estranho e tentam eliminá-las, incitando reações inflamatórias independente do biomaterial ^{16, 34}.

A atividade celular também é afetada pelo formato das partículas; o esférico é preferido ao pontiagudo, pois evita o aparecimento de lesões no citoplasma das células.

Um tipo de atividade celular é o aparecimento de uma camada de tecido fibroso, encapsulando e isolando o implante do tecido adjacente. Este comportamento é prejudicial pois perde-se a possibilidade de fixação do implante no tecido hospedeiro; ocorre principalmente nas interfaces com materiais bioinertes ou biotolerantes^{16, 35}.

Sob o aspecto mecânico do implante, a maior dificuldade na definição do tipo de material está relacionada com a intensa variação das solicitações de tensão sobre o material, considerando as diferentes direções de tensões, a idade e uma diversidade de atividades desempenhadas pelos pacientes^{36, 37}.

A contribuição do cirurgião está relacionada, principalmente, a observação e escolha de técnicas cirúrgicas de sucesso estatístico, além da conservação do acabamento superficial do implante durante a manipulação e colocação do mesmo. Em relação ao paciente, os fatores mais importantes e inerentes são: idade, sexo e raça, outros como hábitos alimentares também influenciam^{36 - 38}.

Para evitar problemas de contaminação e infecção de materiais implantáveis é feita a esterilização dos implantes, podendo ser realizada por aumento da temperatura (estufa seca ou a vapor), por produtos químicos (óxido de etileno) ou por radiação gama. Os biomateriais, metálicos e cerâmicos, não devem sofrer alterações em temperaturas na faixa de 160 a 190°C para a esterilização a seco, que é o método mais simples e econômico. Os polímeros, mesmo na utilização de vapor em temperaturas mais baixas, na faixa de 120 a 135°C, sofrem mudanças em suas propriedades, restando a utilização de produtos químicos ou radiação gama, que pode gerar ação tóxica ou degradante^{9, 36 - 39}.

3.4 Cerâmica densa como biomaterial

Materiais cerâmicos de alta densidade têm sido investigados, ao longo dos anos, para as mais diversas finalidades, sobretudo, cerâmicas capazes de um bom desempenho no enfoque médico, ou seja, desde instrumentação para diagnósticos e análises clínicas, até substitutos funcionais para o reparo de diferentes porções do esqueleto⁶.

As cerâmicas densas de uso clínico são consideradas multifuncionais e podem pertencer a diferentes categorias: óxidos simples, covalentes, sais de cálcio, silicatos, vitro-cerâmicas e compósitos⁴⁰.

Algumas cerâmicas, mesmo com boa densificação e microestrutura adequada são incapazes de apresentar alto desempenho mecânico, como é o caso da HAp e demais

fosfatos de cálcio. Embora esta desvantagem pareça um pré-requisito eliminatório, ela apenas estabelece limitações ao seu uso, mas não impede sua aplicação, sendo considerado um material de prioridade dentro de focos estratégicos na área médica.

As deficiências de caráter mecânico, normalmente estão associadas a porosidade do material. Várias propriedades mecânicas (dureza, tenacidade, resistência à flexão e à compressão, etc.) demonstram uma redução com o aumento da microporosidade ⁴¹.

Algumas propriedades mecânicas das principais cerâmicas utilizadas na área médica comparadas ao tecido ósseo são apresentadas na TAB. 3.4.1. ^{9,41}.

TABELA 3.4.1- Propriedades mecânicas de algumas cerâmicas usadas em implantes cirúrgicos e do tecido ósseo.

Propriedades	Alumina ⁴¹	Zircônia (TZP) ⁴¹	Hidroxiapatita ⁴¹	Osso cortical ⁹	Osso trabecular ⁹
Densidade	3,98 g/cm ³	6,05 g/cm ³	3,16 g/cm ³	1,6 – 2,1 g/cm ³	-
Resistência a compressão	4250 MPa	2000 MPa	100-200 MPa	100-230 MPa	2-12 MPa
Resistência a flexão	>595 MPa	1000 MPa	< 100 MPa	50-150 MPa	10-20 MPa
Tenacidade a fratura	5 MPa m ^{1/2}	7 MPa m ^{1/2}	< 1 MPa m ^{1/2}	2-12 MPa m ^{1/2}	-
Módulo elástico	400 GPa	150 GPa	Máx.100 GPa	7-30 GPa	0,05 - 0,5 GPa
Dureza	> 2400 HV	1200 HV	500 HV	-	-

As propriedades atingidas por uma cerâmica de baixa porosidade são de maior interesse para fins estruturais. A principal aplicação das cerâmicas densas na área médica é para substituição, reparo e preenchimento de pequenas porções ósseas. A hidroxiapatita, o β -fosfato-tricálcico e a mistura destes representam os fosfatos de cálcio mais empregados na área médica, porém não são recomendados em aplicações que requerem grande sustentação de cargas ⁹.

Na década de setenta, as cerâmicas densas obtidas inicialmente a partir de diferentes fosfatos de cálcio comerciais foram designadas como TCP ou fosfato-tricálcico. Estas cerâmicas eram constituídas de uma mistura de hidroxiapatita e β - fosfato-tricálcico e representaram as primeiras cerâmicas desta natureza destinadas ao uso clínico ⁹.

Os fosfatos de cálcio podem ser obtidos na forma densa ou porosa. A forma densa, também chamada de microporosa, é caracterizada em função de uma microporosidade máxima de 5% em volume, com microporos de aproximadamente 1µm de diâmetro e cristais de tamanho superior a 2000Å . A microporosidade é dependente da temperatura e tempo de sinterização ^{9,41} .

A hidroxiapatita é capaz de atingir alta densidade quando, no processo de prensagem de seu pó, são adotadas pressões entre 50-80 MPa. Normalmente, a hidroxiapatita é sinterizada entre temperaturas de 950°C a 1300°C, sendo o patamar e as taxas de aquecimento e resfriamento estabelecidas de acordo com as propriedades exigidas e da matéria-prima utilizada . É importante enfatizar que novas técnicas têm surgido para otimizar a metodologia de processamento cerâmico, sendo possível obter, por exemplo, HAp com alta densidade quando sinterizada com pressão de vapor de água, ~ 500mm Hg, em temperaturas bem inferiores às utilizadas no método convencional de sinterização.

As cerâmicas densas de hidroxiapatita podem ser obtidas na forma de blocos, esferas, grânulos, entre outras. A hidroxiapatita densa, na forma de blocos, é recomendável para implantes de ouvido médio; esculpida na forma de dente, tem sido utilizada como substituto imediato de raízes do dente para minimizar a reabsorção do canal alveolar e também para manter suas dimensões evitando grande perda óssea. Grânulos de HAp também são utilizados para esta função, além do uso em cirurgia ortopédica e maxilofacial ⁹ .

3.5 Materiais Cerâmicos Implantáveis

Materiais cerâmicos são largamente utilizados em implantes por apresentarem aspectos como, alta resistência à compressão, propriedades anti-corrosivas, biocompatibilidade e por apresentarem diferentes interações com o tecido vivo. As principais cerâmicas utilizadas em implantes são alumina, zircônia, biovidros, hidroxiapatita e fosfatos de cálcio ⁴¹ .

A alumina (Al₂O₃) possui como principal vantagem sobre os metais e polímeros, a baixa taxa de desgaste, produzindo baixa concentração de partículas desgastadas (fragmentos) ao redor do tecido adjacente. A alumina para ser utilizada em implantes cirúrgicos deve apresentar pequeno tamanho de grão, alta densidade relativa e alto grau de

pureza. Essas exigências precisam ser observadas criteriosamente durante o processo de fabricação já que irão refletir na biocompatibilidade do material ^{9, 41}.

A zircônia (ZrO_2) estabilizada na fase tetragonal é um material qualificado para implantes de sustentação. A vantagem, em relação à alumina, é possuir maiores resistência à fratura e tenacidade. A zircônia gera um certo nível de radiação gama proveniente de pequenos traços de tório, que são difíceis de serem eliminados pelas técnicas químicas de purificação da matéria-prima. Essa radiação embora seja pequena e inofensiva proporciona desconfiança na classe médica e nos pacientes ^{9, 17, 41}.

Os vidros de composição próxima a 45% de SiO_2 , 24,5% de Na_2O , 24,5% de CaO e 6% de P_2O_5 são chamados de biovidros e têm a capacidade de formar ligações químicas estáveis com o osso adjacente. Os vidros com essa composição são chamados 45S5. Vidros bioativos podem ter qualquer contato que se ligam ao tecido. Há composições variadas, desde 100% sílica em sol-gel ou 70:30 $SiO_2:CaO$, ou 58S $SiO_2:CaO:P_2O_5$, sem soda. Estes materiais são mais utilizados em próteses de ouvido médio e implantes ortodônticos ^{9, 18, 42}.

A hidroxiapatita também é utilizada na área médica e odontológica, como material de revestimento de implantes metálicos ou no preenchimento de cavidades ósseas. As aplicações incluem bolsas periodonticas ou fraturas onde o preenchimento é necessário, permitindo, a partir da osseointegração, a reestruturação óssea local. Parafusos de titânio, aplicados em implantes dentais e ortopédicos, revestidos com HAp, apresentam torque de remoção significativamente maior do que os de titânio sem revestimento. A HAp também pode ser utilizada em implantes de ouvido médio, formando um selo contra bactérias ^{9, 20, 22, 43, 44}.

As principais aplicações clínicas de algumas cerâmicas estão apresentadas na Figura 3.5.1 ⁹.

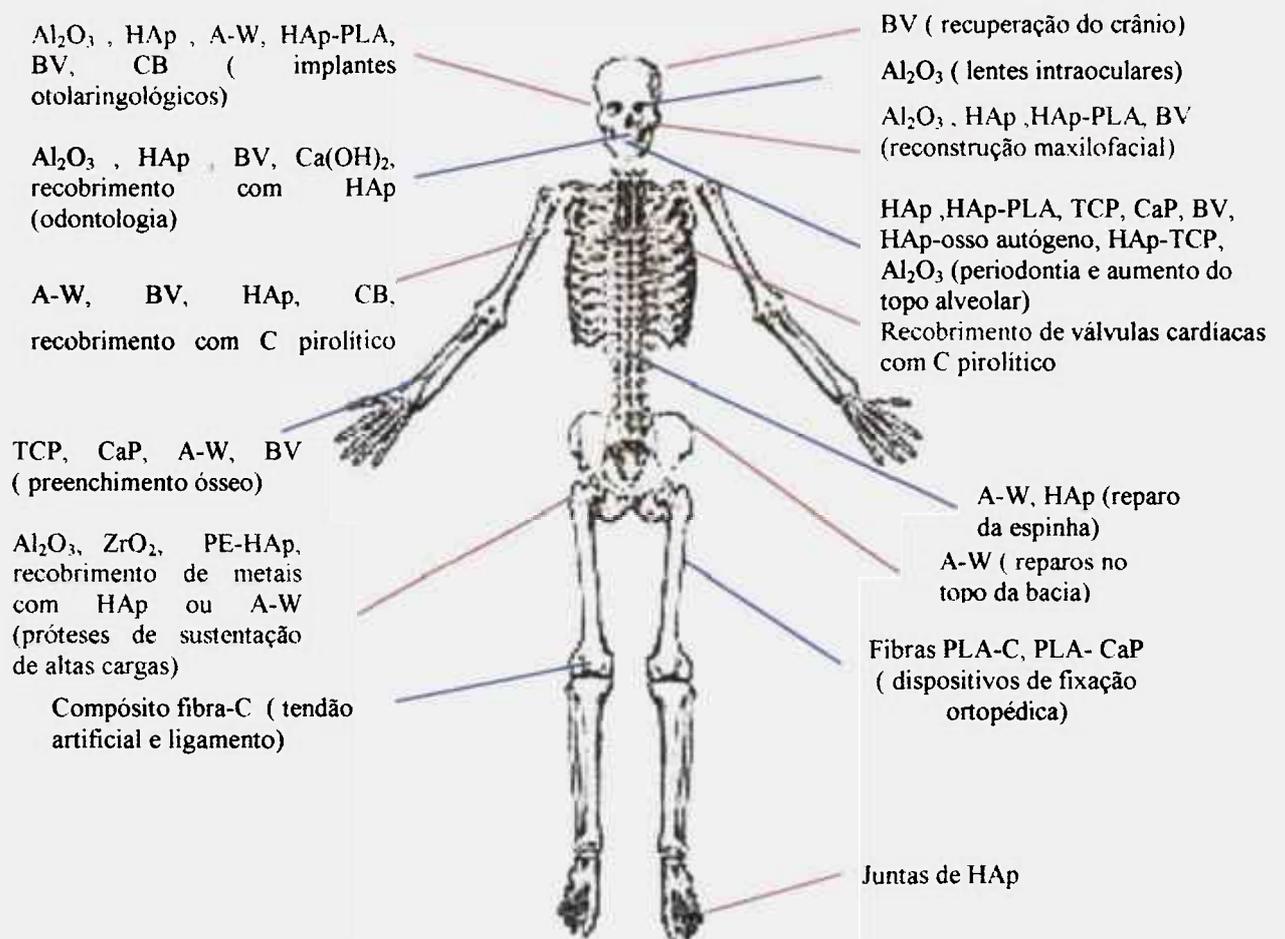


Figura 3.5.1- Aplicações clínicas dos materiais cerâmicos: Hidroxiapatita: HAp; Vidros bioativos: BV; Vitro-cerâmicas: A-W; Fosfato-tricálcico: TCP; Compósitos bioativos: CB; Fosfatos de cálcio: CaP; Polietileno: PE; Poliacido-láctico: PLA⁹.

3.6 O Significado da Bioatividade

Fenômenos de superfície, como aqueles que ocorrem na interface: material/meio biológico auxiliam na compreensão das diferentes respostas de biocompatibilidade e bioatividade.

A bioatividade está associada aos fenômenos que ocorrem na interface do material. Normalmente, ela é definida como a habilidade de um material ligar-se quimicamente ao osso, através da formação de uma camada de fosfato de cálcio, promovendo uma osteogênese verdadeira. Esta camada é conhecida como hidroxiapatita biológica ou

hidroxicarbonato-apatita (HCA), já que apresenta grupos CO_3^{-2} , em sua estrutura cristalina^{9, 43}. A composição e característica estrutural desta camada de apatita são similares àquela da apatita presente no mineral ósseo. Portanto, a condição essencial para um material artificial ligar-se ao tecido ósseo é pela formação desta ligação, chamada bioativa, decorrente da apatita depositada na superfície^{41, 42}.

Tem sido estabelecido que a bioatividade ocorre somente dentro de certos limites de composição. Sabe-se que biovidros podem apresentar elevado índice de bioatividade (I_B), ou seja, maior que 8 e incitar reações que permitem também ligar-se a tecidos moles, além dos duros, devido a sua capacidade de osteoindução (formação óssea sobre material implantado em sítios aonde não existem células osteogênicas), enquanto a HAp apresenta índice de bioatividade inferior a 8, que permite apenas a ligação com tecidos duros^{42, 45}. Estes índices na verdade servem de artifício para auxiliar a comparação de materiais em testes *in vitro* e *in vivo*, mas dependem significativamente da condição do estudo, sendo então valores relativos

De um modo geral, o nível de bioatividade de um material em específico tem sido relacionado ao tempo levado para mais de 50% da interface ligar-se ao osso⁴⁵.

É possível avaliar a habilidade de ligação de um material ao tecido ósseo, por experimentos *in vitro*. Nestes experimentos, meios fisiológicos simulados, de composições próximas a do plasma sanguíneo humano, como o SBF - "Simulated Body Fluid", por exemplo, podem ser utilizados, favorecendo a formação da apatita biológica sobre a superfície do material. Esta solução salina (SBF) foi desenvolvida por Kokubo e colaboradores, sendo constituída de íons em concentração crítica para ocorrer precipitação, quando em contato com materiais bioativos^{46, 47}. Intensas investigações tem sido feitas sobre fatores como: tipo, concentração, capacidade ou não de tamponamento, pH e grau de saturação da solução adotada^{45 - 47}.

A reatividade *in vitro* da HAp torna possível uma avaliação preliminar da sua reatividade também em meio biológico e é governada por vários fatores considerando dois aspectos: natureza do meio simulado e propriedades do material²⁰.

A formação da HAp biológica envolve processos espontâneos de dissolução e precipitação. As composições bioativas liberam íons para a solução. Este processo de troca iônica aumenta o pH na interface do implante ($> 7,4$)⁴⁸. A taxa de dissolução e velocidade das reações que ocorrem neste processo dependem da relação Ca/P, tamanho e forma do cristal, solubilidade, pH, temperatura, porosidade e habilidade de absorção de grupos carboxilatos. Da mesma forma, estes parâmetros podem afetar também no tempo para

osseointegração (incorporação bem sucedida do implante no leito ósseo sem evidência de tecido fibroso) ^{20, 43, 49}.

Os íons presentes na superfície do material interagem com os íons constituintes do meio fisiológico. Estas interações ocorrem principalmente em nível molecular e numa zona interfacial muito estreita ($< 1\text{nm}$) ⁵⁰.

O mecanismo *in vitro* para formação da camada de HCA envolve a liberação de íons alcalinos, como Ca^{2+} , presentes no material, para a solução, com conseqüente aumento do pH. Posteriormente, há a diminuição gradativa dos íons cálcio e fósforo da solução salina necessários para formação da camada.

Durante a reação de precipitação, os íons Ca e P do material, somados aos íons da solução, formam uma camada rica de fosfato de cálcio na superfície. Esta fase depositada sobre a superfície da cerâmica, na formação *in vitro*, é inicialmente amorfa e posteriormente é cristalizada sob a forma de HCA pela incorporação de íons carbonato presentes na solução ⁴⁹.

Os mecanismos, *in vitro* e *in vivo*, são bastante similares no que diz respeito ao crescimento da camada de HCA ^{41, 46, 47}.

O esquema, a seguir, apresenta as etapas, descritas anteriormente, para a formação desta ligação bioativa entre o material e o tecido ⁴⁹.

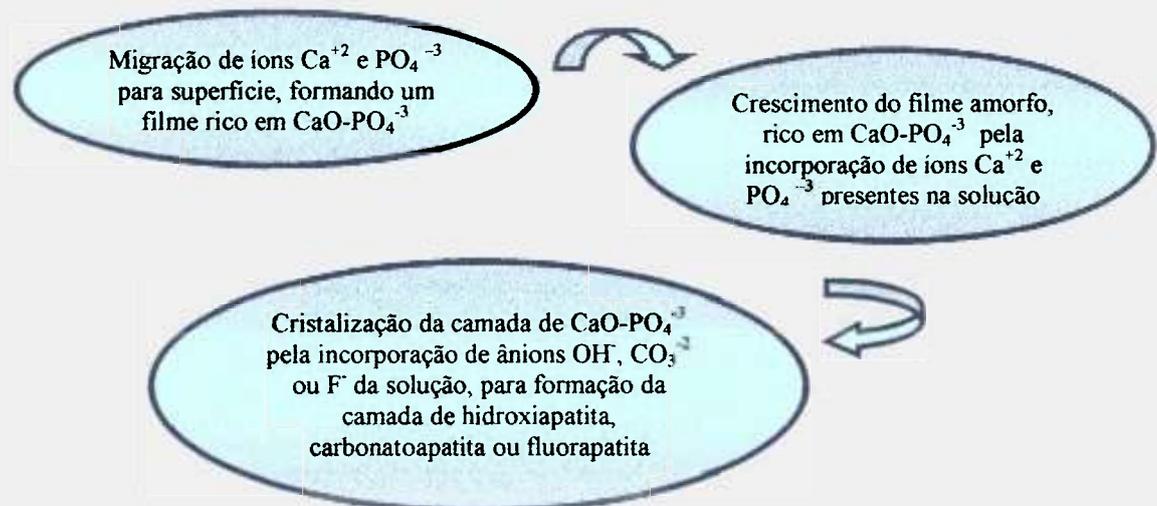


Figura 3.5.2 – Esquema representativo da seqüência para formação da ligação bioativa, prevista em testes *in-vitro* ⁴⁹.

Após as etapas descritas, se o material bioativo já se encontra em meio biológico vivo, ou seja, atua como implante no hospedeiro, células biológicas mesenquimais

começam a adsorver na camada de HCA. Inicia-se então, a ação dos macrófagos, crescimento e diferenciação celular, ocorrendo a formação e posterior cristalização da matriz e finalmente a proliferação e crescimento do osso ⁴⁹.

3.7 Cerâmicas à Base de Fosfato de Cálcio

Muitos compostos à base de fosfato de cálcio são atualmente empregados na área médica, sobretudo, na ortopedia e odontologia, sendo os mais utilizados: hidroxiapatita e o fosfato-tricálcico, por isso alguns aspectos serão abordados neste capítulo ^{20, 41}.

O sucesso na reparação óssea a partir de um fosfato de cálcio foi descrito pela primeira vez, em 1920 por Albee. Em 1969, Levitt et al. e Monroe, em 1971, descreveram um método de preparação de uma apatita cerâmica a partir do mineral fluorapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, e sugeriram o seu possível uso em aplicações médicas e odontológicas ⁹.

O termo apatita é utilizado para descrever uma família de compostos com estrutura similar, mas não necessariamente de composições idênticas ⁵¹. O grupo das apatitas compreende espécies de fórmula geral $\text{R}_5\text{Y}(\text{XO}_4)_3 = (\text{RY})\text{R}_4(\text{XO}_4)_3$, onde R = Ca, Mg, Pb e Mn; Y = F, Cl, Br e OH e X = P, As e V. As apatitas mais comuns são: $(\text{CaF})\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3$ - fluorapatita; $(\text{CaCl})\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3$ - cloroapatita; $(\text{CaOH})\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3$ - hidroxiapatita ^{12, 51}.

Na hidroxiapatita, o fósforo é cercado por quatro átomos de oxigênio situados nos vértices de um tetraedro, Figura 3.6.1. O tetraedro simples $(\text{PO}_4)^{3-}$ é chamado de ortofosfato, as cadeias simples P-O-P são polifosfatos e os anéis são metafosfatos ¹².

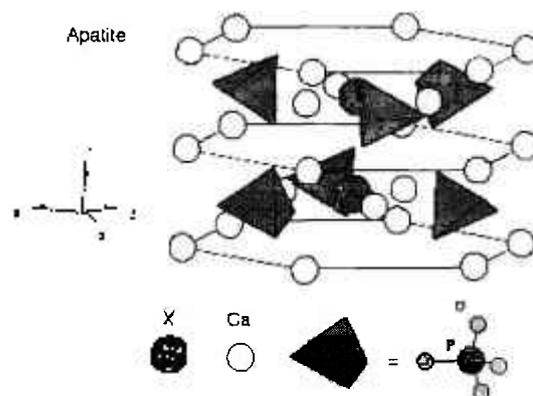


Figura 3.6.1 - Estrutura cristalina da apatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{X})_2]$; X = OH, F, Cl e Br ¹².

As fases estáveis de cerâmicas de fosfato de cálcio dependem da temperatura e quantidade de água presente após o processo de obtenção ou no meio onde se encontram.

À temperatura do corpo apenas dois fosfatos de cálcio são estáveis em contato com o meio aquoso, assim como nos fluidos corpóreos: a fase $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fosfato dicálcico – DCPD), estável em $\text{pH} < 4,2$ e a fase HAp, estável em $\text{pH} > 4,2$. Em altas temperaturas, outras fases como o β -TCP e $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (fosfato tetracálcico, TTCP) são estáveis, Figura 3.6.2. As fases de fosfato de cálcio não hidratadas podem interagir com a água, ou fluidos do corpo, a 37°C , para formar HAp⁴⁹.

Quando a água está presente na atmosfera de sinterização, a HAp pode ser formada permanecendo estável acima de 1360°C , como mostra o diagrama parcial de equilíbrio para o CaO e P_2O_5 com 500mmHg (66KPa) $p_{\text{H}_2\text{O}}$, Figura 3.6.2. O intervalo de temperatura de estabilidade da HAp aumenta com a pressão parcial de água ($p_{\text{H}_2\text{O}}$), como a faixa de transição de fase TCP ou TTCP para HAp. Frequentemente é difícil prever a fração de fases que são formadas a alta temperatura durante a sinterização, quando resfriada a temperatura ambiente^{9,49}.

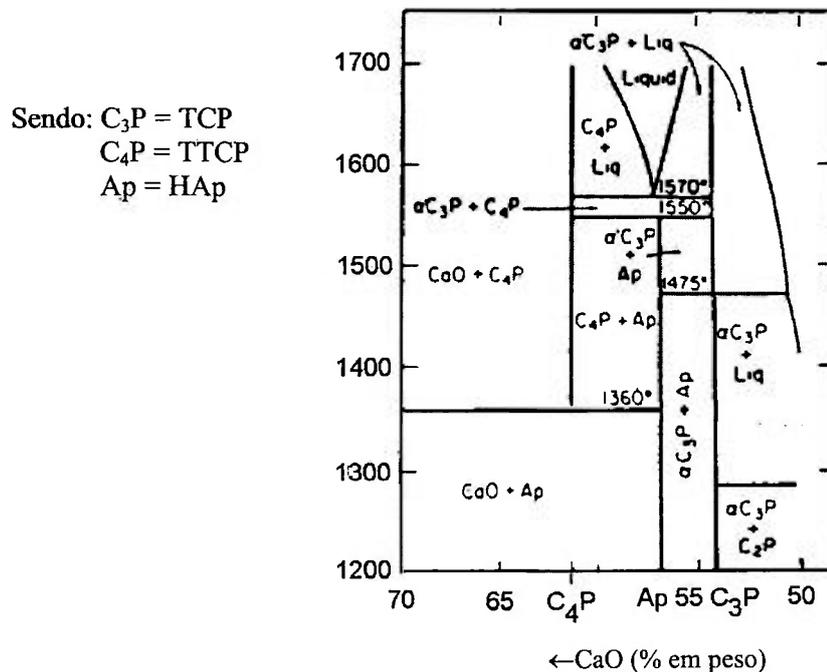


Figura 3.6.2 – Diagrama de fase parcial do sistema $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ em alta temperatura ($^\circ\text{C}$ no eixo vertical). Pressão de vapor de água = 500mmHg ⁹.

A razão Ca/P da hidroxiapatita estequiométrica estabelecida por difração de raios X e de nêutrons é de 1,67, no entanto as hidroxiapatitas deficientes em cálcio (até 10%) são as de maior interesse biológico, porque a razão Ca/P no osso é mais próxima de 1,5⁹.

O balanço eletrônico das cargas pode ser obtido pela ausência de grupos hidroxilas (OH^-) ou alternativamente pela presença do ânion hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) no lugar do PO_4^{3-} . O cálcio pode também ser substituído, principalmente por cátions de magnésio, sódio e estrôncio. A hidroxila pode ser substituída por ânions como carbonato, ortofosfato, fluoreto ou cloreto. A análise química do osso apresenta composição de 4 a 6% de carbonato, 0,9% de citrato, 0,5% de magnésio, 0,7% de sódio e traços de flúor, cloro, potássio, estrôncio e outros íons metálicos ⁹.

Estas substituições, que ocorrem na estrutura da apatita, normalmente resultam em alterações de suas propriedades como: solubilidade, morfologia, parâmetro de rede, porém sem mudança significativa da simetria hexagonal. O grupo CO_3^{2-} , por exemplo, pode substituir uma posição estrutural de um grupo OH (tipo A) assim como substituir uma posição ocupada pelo grupo PO_4^{3-} , neste caso, designada como HAp do tipo B ^{9,51}.

Substituições de Ca^{+2} por K^+ ou Na^+ não causam alterações no parâmetro de rede da HAp, já o Mg além de reduzir o parâmetro de rede, também diminui a cristalinidade.

Substituições de OH^- por Cl^- alteram o parâmetro de rede, sem modificar a cristalinidade. As substituições de PO_4^{3-} por CO_3^{2-} são acompanhadas por mudanças no parâmetro de rede que diminuem a cristalinidade; e a substituição por HPO_4^{2-} não altera a cristalinidade da HAp, mas aumenta o parâmetro de rede no sentido do eixo -a ^{9,20}.

A HAp sintética, com presença de carbonato na rede cristalina, sofre tensão na rede, o que explica o aumento da taxa de dissolução no sistema “*in vitro*” quando o CO_3^{2-} está presente. Esta associação de elementos é mais acentuada nos ossos, que também têm muitos outros elementos substituídos na estrutura ^{41, 52, 53}.

Como mencionado anteriormente, a HAp sintética é um dos materiais mais utilizados com sucesso em implantes por formar ligações químicas com a HAp óssea, promovendo a osseointegração. Essas ligações químicas, de natureza covalente, possibilitam à interface tecido vivo/implante suportar esforços mecânicos significativos, além de estimular o crescimento ósseo ^{43, 54, 55}.

Outra cerâmica pertencente a esta classe de material é o fosfato-tricálcico (TCP), composição nominal $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e razão Ca/P de 1,5. O TCP pode ocorrer em duas estruturas cristalinas: monoclinica (α -TCP) e romboédrica (β -TCP), sendo esta mais estável. O β -TCP pertence ao grupo espacial R3c com célula unitária, $a=10,439(1)$, $c=37,375(6)$ Å (posição hexagonal) apresentando 21 fórmulas unitárias por célula unitária

hexagonal. Ele apresenta um papel importante no processo de biomineralização óssea, sendo o precursor direto da apatita biológica ⁵¹.

O β -TCP permite substituição de 15% de Ca^{+2} por Mg^{+2} sem alterar essencialmente sua estrutura, quando a substituição excede este valor ocorre a diminuição do parâmetro de rede, a , de 10,436 para 10,308 Å e do c , de 37,42 para 37,07 Å. Os íons Ca^{+2} não são substituídos aleatoriamente, ocupando as posições Ca(4) e Ca(5) ⁵¹.

O β -TCMP (β -TCP com substituições de Mg^{+2}) apresenta menor solubilidade que o β -TCP, isto reflete no aumento da estabilidade da rede quando a posição Ca(5) é substituída por um cátion menor, neste caso, o Mg^{+2} . Este efeito de estabilidade estrutural pelo magnésio explica a ocorrência de cálculos dentários e várias calcificações patológicas ⁵¹.

Cristalograficamente, a HAp é mais similar ao osso natural do que o β -TCP, porém, a razão de reabsorção da HAp é extremamente baixa comparada com a do β -TCP. A velocidade de dissolução do β -TCP é de 3 a 12 vezes mais rápida do que para HAp estequiométrica ⁹ e um implante ósseo constituído de HAp permanecerá mesmo depois de 3 ou 4 anos de implantação, o TCP, por outro lado, sendo reabsorvível, desaparecerá parcialmente, em períodos de 6 a 15 semanas dependendo da estequiometria e porosidade ⁵⁶. Foi avaliada, em estudos comparativos, a reabsorção dos implantes *in vivo* em função da composição, sendo observado um comportamento de reabsorção da seguinte forma: HAp < β -TCP < α -TCP, embora esta tendência também seja influenciada pela densidade, distribuição de tamanho de poros e área de superfície específica ^{57, 58, 59}.

Do ponto de vista cristalográfico, alguns pesquisadores acreditam que o TCP na presença de água é instável, podendo se converter em HAp, de acordo com a reação:



Alguns trabalhos da literatura apoiam a hipótese do TCP se converter em HAp ou formar uma camada de apatita sobre sua superfície em meio aquoso, podendo ser classificada também, como uma cerâmica de superfície ativa. Outros autores consideram o TCP com razão Ca/P de 1,5 não como TCP, mas como uma hidroxiapatita deficiente em cálcio ⁶⁰.

de Groot⁵⁷ sugeriu que toda cerâmica de fosfato de cálcio com razão Ca/P entre 1 e 2 teria a formação de uma superfície de apatita depois de imersa em “serum” (solução constituída de íons sódio, potássio, cálcio e glicose). Outros pesquisadores tem observado que mesmo para cimentos de TCP há o aparecimento de cristais de apatita depois da cura do cimento⁶⁰.

Kohri et al.⁶¹ em estudo envolvendo cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (β -TCP e HAp) observou que a fase pura de β -TCP e a mistura β -TCP/HAp foram gradualmente convertidas em HAp quando imersas em água destilada ou solução Ringer's. Em outro estudo, Driessen et al.⁶² ao sintetizar o β -TCP observou a presença de uma fase de apatita. Neste estudo o β -TCP foi caracterizado como instável a temperatura ambiente e umidade atmosférica.

Nas décadas de 70 e 80, a aplicação de substratos cerâmicos, parcialmente biodegradáveis, envolveu vários aluminatos de cálcio, que foram testados primeiramente como materiais porosos para implantes ósseos e depois empregados como recobrimento de próteses. A partir daí, uma série de pesquisadores propôs o uso de cerâmicas de fosfato-tricálcico altamente porosa para o mesmo tipo de aplicação. Os corpos cerâmicos porosos, como implantes à base de TCP, foram processados com tamanho de poros distintos, poros de dimensões maiores para a melhor penetração do osso e microporos para melhor penetração do fluido através da estrutura e com isso, afetando também no tempo de biodegradação da cerâmica²¹.

Nas últimas décadas, vários estudos envolvendo fosfato-tricálcico têm sido realizados, pois além de possuírem propriedades de biocompatibilidade e capacidade de preenchimento de cavidades ósseas, eles podem apresentar propriedades de endurecimento, no caso de cimentos, que são desejáveis nas aplicações cirúrgicas onde se requer boa remodelagem e adaptação. A estabilidade e endurecimento destes materiais são controlados por reações químicas de dissolução/precipitação e envolvem transformação de fase cristalina^{13, 21, 63}.

Outro trabalho, agora relacionando a solubilidade das cerâmicas de diferentes sais de fosfatos de cálcio, não incluindo a HAp, evidencia que a maioria deles, exceto o β -TCP, apresenta solubilidade mais alta que a taxa de regeneração do tecido ósseo, não sendo assim adequados para o preenchimento de cavidades ósseas e substituição de novos tecidos duros⁶⁴.

A partir dos resultados apresentados na literatura tem-se que existe maior interesse em sais ortofosfatos, no desenvolvimento de materiais para implante, já que pirofosfatos e metafosfatos se hidrolizam em fluidos corpóreos e a existência de alta concentração destes íons pode resultar em calcificação indesejada^{57, 58, 64, 65, 66}.

3.8 Cerâmicas Bifásicas HAp/TCP

O reparo de defeitos ósseos com o uso de material artificial compatível com o osso natural contribui com a redução de complicações no que diz respeito a infecção e rejeição. A HAp e o β -TCP são materiais bastante estudados porque, além da composição química semelhante à fase mineral óssea, fornecem respostas diferenciadas e satisfatórias; a combinação de suas propriedades possibilita o crescimento do osso e facilita a integração do implante^{67, 68}.

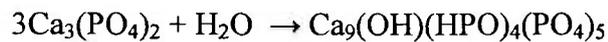
Propriedades combinadas de HAp e TCP num único material resultam em uma cerâmica reabsorvível e ao mesmo tempo de superfície ativa, capaz de desenvolver uma fixação bioativa entre tecido / implante e quando porosas, uma fixação biológica, característica de materiais com grande quantidade de poros interconectados em sua microestrutura. Esta combinação reflete na reatividade destas cerâmicas bifásicas que respondem mais rapidamente quando expostas ao meio fisiológico^{69, 70, 71}.

Nas cerâmicas bifásicas HAp/TCP, a velocidade de reabsorção do implante deve ser compatível com a velocidade de formação do osso para que a redução de resistência do implante seja compensada pelo aumento da resistência do osso formado. Com este intuito, compósitos desses materiais têm sido alvo de estudo para que possam ser utilizados em diferentes regiões do corpo, de acordo com a velocidade de formação óssea^{70 - 72}.

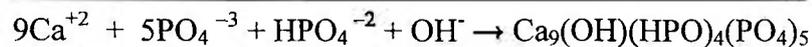
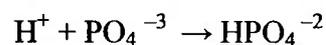
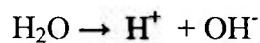
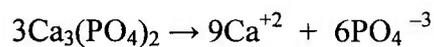
Primeiramente, a mistura bifásica de HAp e TCP contida numa única cerâmica foi produzida com sucesso, baseada no conceito de biodegradação parcial da fase TCP que melhorou a curto e longo prazo aplicações com fins de reposição óssea^{69, 72}.

Recentemente, cerâmicas bifásicas constituídas de HAp/ β -TCP ou HAp/ α -TCP têm sido avaliadas na presença do tecido ósseo e em tecidos moles. Os resultados apresentados por Li Yubao et al.⁷³ demonstram que as cerâmicas bifásicas são biologicamente mais ativas que HAp pura, além disso o comportamento biológico da cerâmica bifásica contendo α -TCP pode facilitar a nova formação óssea. Este fenômeno pode estar relacionado a sua propriedade de dissolução mais rápida e também a hidrólise

da fase TCP, acompanhada pela mudança de fase estrutural e da morfologia durante a hidrólise. As reações abaixo apresentam as etapas de conversão do TCP em uma nova estrutura, apatita-TCP; durante esta reação de hidrólise, duas moléculas de água combinadas com três moléculas de TCP dão origem a molécula de apatita-TCP, contendo água na rede cristalina ⁷³,



ou



A presença de vacâncias de Ca^{+2} e OH^- , na molécula de apatita-TCP permite que moléculas de H_2O ocupem estes sítios. A incorporação de H_2O nas vacâncias também aumenta a estabilidade da estrutura cristalina apatita-TCP.

A apatita presente nos ossos é pouco cristalina, não estequiométrica e contém água incorporada na rede, assim a apatita contendo a fase TCP pode ser mais análoga a hidroxiapatita mineral encontrada em humanos, podendo ser esta a razão pela qual cerâmicas bifásicas contendo a fase TCP apresentam desempenho superior a HAp na formação do novo tecido ósseo ⁷³.

Apesar das propriedades particulares de cada fase, os dois materiais (HAp e TCP) apresentam a mesma evolução e adaptação para os tecidos. Os fenômenos interfaciais (osso/implante) envolvem a presença de íons cálcio e fósforo na interface e representam um processo dinâmico, incluindo processos físico-químicos, interações cristal/proteína, colonização de células e tecidos, remodelamento ósseo e finalmente contribuição para a resistência da interface ^{72, 74}.

Em estudos de reatividade, envolvendo cerâmicas bifásicas, foi demonstrado que a abundância de cristais de HCA sobre a superfície destas cerâmicas é influenciada pela razão de TCP/HAp. Desta forma, quanto maior a razão TCP/HAp, maior a quantidade de

micro-cristais de HCA. Isto se deve a maior propriedade de dissolução do componente TCP, gerando desta forma um aumento na concentração de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} no meio, resultando a precipitação de carbonato-apatita⁹.

Os cristais de carbonato apatita estão associados aos materiais cerâmicos formados pelo processo de dissolução e precipitação: (1) dissolução parcial de cristais de HAp ou β -TCP da cerâmica causa um aumento imediato do nível de supersaturação no meio onde se encontra o implante, conseqüentemente, conduz à precipitação de novos cristais de apatita, podendo incorporar outros íons (CO_3 , Mg, HPO_4 do fluido biológico) durante o processo e/ou (2) a precipitação de novos cristais de apatita, com ou sem a dissolução de cristais cerâmicos, onde as partículas cerâmicas atuam como agentes nucleadores no processo de crescimento epitaxial e hetero-epitaxial^{72, 74}.

No campo de aplicação, as cerâmicas bifásicas, HAp/TCP, possuem potencial para serem utilizadas, no organismo, com finalidade de liberação de diferentes fármacos ou biomoléculas de interesse. Hidroxiapatita porosa já é utilizada como substrato para incorporação e liberação de fármacos, como é o caso do cis-diamino-dicloro-platina (CDDP), empregada no tratamento de câncer. A distribuição de poros na microestrutura, neste caso, é o principal requisito para a eficiência de sistemas de liberação de substâncias⁷⁵. As cerâmicas bifásicas podem ser utilizadas para a mesma finalidade. Sendo, neste caso, a HAp, fase responsável em manter a integridade física por período de tempo mais longo, atuando como substrato e TCP, fase reabsorvível, que leva a substância incorporada até os sítios ativos, através da circulação sanguínea no organismo ou difusão pelos tecidos adjacentes.

Estudos voltados para este tipo de cerâmica, visando uma diversidade de aplicações, são efetuados como uma perspectiva futura de uma nova opção para as questões de natureza médica e farmacêutica.

3.9 Testes *in vitro* de Biocompatibilidade e Bioatividade

No desenvolvimento de materiais, antes de serem testados como implantes, o material deve ser avaliado quanto à citotoxicidade. Normalmente, um biomaterial é avaliado, de início, por testes *in vitro*, que são caracterizados por apresentarem um fácil controle e alta reprodutibilidade, fornecerem dados de maneira rápida e precisa sobre interações biológicas, além da vantagem de serem mais acessíveis financeiramente e eliminarem a necessidade de animais em pesquisa⁷⁶.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* fornecem informações de caráter qualitativo e quantitativo do material em estudo, com respeito às reações sistêmicas do organismo, como hipersensibilidade, toxicidade e carcinogenicidade. São efetuados como testes de triagem na fase de avaliação da biocompatibilidade. Em caso de reprovação no teste, o material é dito incompatível, geralmente não merecendo uma avaliação *in vivo* ^{76, 77}.

Na ausência de incompatibilidade do material, alteração ou morte celular, modificação na permeabilidade da membrana ou inibição enzimática, pode ser dada seqüência aos experimentos, envolvendo então testes *in vivo*, que podem fazer uso de diferentes espécies de animais ⁷⁶.

Muitos testes de citotoxicidade para os fosfatos de cálcio de diferentes origens já foram realizados exaustivamente por vários pesquisadores. Atualmente, já se tem conhecimento de que as cerâmicas de fosfatos de cálcio não causam danos ao organismo humano, como sinais de degeneração de tecido, infecção ou uma não hemocompatibilidade, características estas, que acarretam sinal de incompatibilidade ^{78, 79}.

Um exemplo de teste *in vitro* de biocompatibilidade que pode analisar a citotoxicidade de um material é apresentado na Figura 3.9.1, neste caso é estudado o comportamento da hidroxiapatita na presença de células. Este teste é feito a partir de um teste de supressão de colônias, no qual é possível estimar quantitativamente o potencial citotóxico de diferentes materiais, com base em dados da porcentagem relativa do número de colônias visíveis, formadas em função das concentrações diferentes no extrato – $IC_{50(\%)}$.

A sigla $IC_{50(\%)}$ representa a concentração mínima de extrato que inibe o crescimento e a posterior formação de colônias de 50% da população, levando à morte celular. No teste foi adotada Al_2O_3 de alta pureza, como padrão de controle negativo e solução de fenol (0,02% vol) como controle positivo, com $IC_{50(\%)}$ em torno de 50, enquanto a Al_2O_3 apresenta $IC_{50(\%)}$ >100 ⁸⁰.

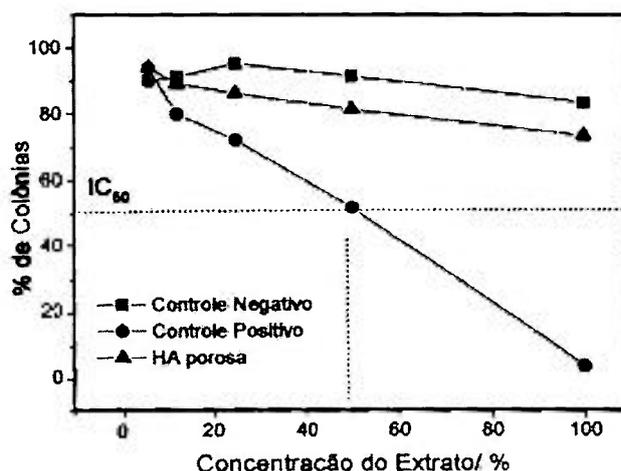


Figura 3.9.1- Curva de supressão de colônias na avaliação da citotoxicidade da HAp⁸⁰.

A partir do gráfico apresentado, observa-se que a hidroxiapatita se encontra num intervalo bem próximo do controle negativo Al_2O_3 $IC_{50}(\%) > 100$, apresentando também a mesma ordem de grandeza para o índice $IC_{50}(\%)$, possuindo desta forma um comportamento atóxico⁸⁰.

O mesmo comportamento ocorre com os demais fosfatos de cálcio, considerando também, a sua natureza química semelhante a HAp. Estas cerâmicas, quando implantadas, não são reconhecidas facilmente pelo organismo do hospedeiro, como corpos estranhos, sem despertar, portanto, reações adversas⁷⁸.

Outro teste *in vitro*, agora para testar a bioatividade dos materiais, envolve a sua exposição por um certo período de tempo em um meio simulado. Nestes experimentos, pode-se adotar uma série de soluções especiais, sendo a mais comum, a solução SBF (“Simulated Body Fluid”) que é uma solução sintética fisiológica, de composição próxima a do plasma sanguíneo humano. O SBF foi obtido por Kokubo e colaboradores⁴⁶ em 1990, depois da reprovação de uma solução, até então, já empregada em experimentos *in vitro*, mas que não comprovou em condições simuladas a bioatividade de uma vitro-cerâmica, caracterizada como bioativa, em experimentos *in vivo* realizados anteriormente. Para realização deste teste, *in vitro*, que não obteve êxito, Kokubo utilizou a solução chamada de “Tris-buffer”, que é uma solução tampão preparada com água deionizada, ácido clorídrico e tris-hidroximetil-aminometano, mantendo um pH igual a 7,25. Kokubo, a partir de uma série de soluções aquosas, acrescidas do tampão tris-hidroximetil-aminometano, do Tris-buffer, obteve várias composições, com concentrações de íons

próximas à do plasma sanguíneo. Essas soluções foram denominadas de SBF – “Simulated Body Fluid” e passaram a ser utilizadas com maior sucesso nestes experimentos ^{46,47}.

A composição do SBF mais próxima do plasma sanguíneo difere apenas pela alta concentração de íons cloreto e baixa concentração de HCO_3^- presente na solução simulada ⁴⁶. Atualmente, novos estudos têm dirigido seus objetivos à obtenção de soluções cada vez mais próximas das condições biológicas. Os estudos com SBF, envolvendo a precipitação da apatita biológica também sugerem um processo de recobrimento na obtenção de uma fina camada de HCA sobre o implante. Os precipitados de fosfato de cálcio resultantes de um experimento de dissolução/precipitação são usados na prática como uma indicação do potencial ósseo para biomateriais ^{46, 81}.

Uma das dificuldades no estudo da dissolução refere-se ao comportamento instável das soluções de SBF, que oscilam entre estados de insaturação/supersaturação. Estes estados podem ser avaliados pela atividade iônica presente nas soluções, sendo monitoradas por meio de leituras de pH. Quando são avaliadas as características superficiais e microestruturais dos materiais em estudo e é realizada análise química da solução, SBF torna-se possível prever a bioatividade *in vivo* desses materiais ⁴⁶.

Normalmente, para hidroxiapatita, fosfatos de cálcio, alguns compósitos e vitro-cerâmicas com a fase apatita, os testes de bioatividade são efetuados empregando-se o SBF, já que nenhuma alteração estrutural da superfície foi notada com o uso da solução Tris-buffer, para materiais desta natureza ⁴⁷.

3.10 Dissolução

O estudo dos mecanismos de dissolução de apatitas tem contribuído na prevenção e simulação de processos, como: produção de fertilizantes, formação de cáries dentárias, osteoporose, biodegradação de materiais *in vivo* e *in vitro* e avaliação da bioatividade de materiais de interesse ⁸².

Um dos parâmetros mais importantes envolvidos na propriedade de dissolução de sólidos é a constante termodinâmica de solubilidade (Kps). Diferentemente da dissolução, a solubilidade é determinada em condições de equilíbrio, enquanto a dissolução só ocorre em condições adversas, sendo influenciada por inúmeras variáveis, incluindo a constante de solubilidade do sólido ²⁰.

O diagrama de fase, Figura 3.10.1, baseado em considerações termodinâmicas é muito útil na previsão de fases estáveis de fosfatos de cálcio em condições específicas de pH e grau de saturação com respeito a íons cálcio e grupos fosfatos (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}). Estudos revelam que estas variáveis são parâmetros decisivos para o estudo de dissolução²⁰. Por este diagrama é previsto que a temperatura ambiente (25°C), $\text{pH}=6$ e concentração de Ca^{+2} igual a 10^{-2} M, o DCPD é a fase de fosfato de cálcio mais estável, em outras condições de pH, concentrações de cálcio e fosfatos, outras fases podem ser mais estáveis.

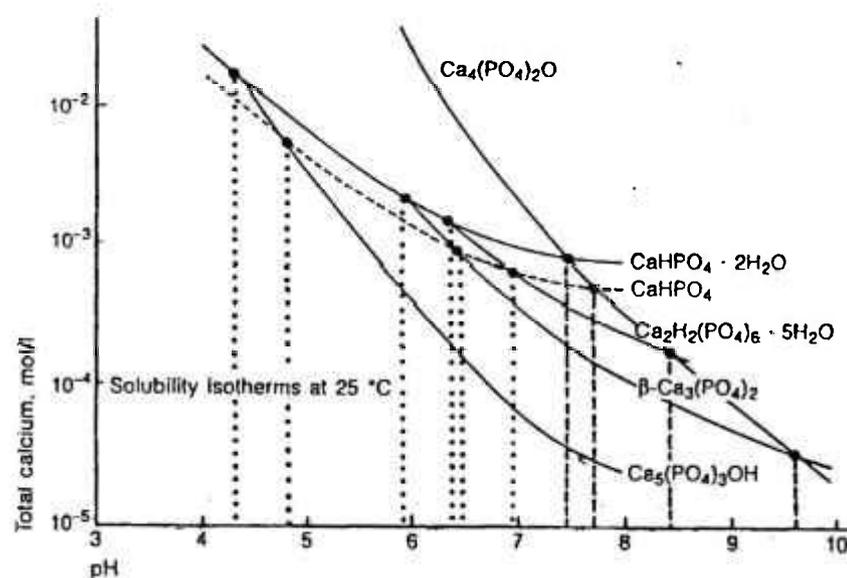


Figura 3.10.1 - Diagrama de fase de solubilidade para o sistema: $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ à 25°C , apresentando a estabilidade das fases de fosfatos de cálcio em diferentes pHs e concentrações de cálcio²⁰.

A estabilidade dos fosfatos de cálcio também está associada a diferentes valores de pH, como citado anteriormente. Cada fosfato apresenta um grau de alcalinidade diferente, ou seja, ela aumenta de acordo com a razão Ca/P de 0,5; 1; 1,33; 1,5; 1,67 e 2, para os seguintes fosfatos, respectivamente: fosfato-monocálcico monohidratado (MCPM) $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ e fosfato-monocálcico anidro (MCPA) < (DCPD) $\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e fosfato-dicálcico (DCP) < fosfato octacálcico (OCP) $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ < (α -TCP) e (β -TCP) < (HAp) < fosfato-tetracálcico (TTCP) $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$ ^{58, 65}. Isto significa que em condições de dissolução a HAp é menos solúvel que o MCPM, por exemplo.

Assim como o pH, existem também diferentes parâmetros que podem afetar reciprocamente na taxa de dissolução e na precipitação de uma fase de fosfato de cálcio, estes parâmetros estão descritos na TAB. 3.10.1 ⁸².

TABELA 3.10.1– variáveis envolvidas na descrição dos mecanismos de dissolução.

SOLUÇÃO	SÓLIDO	SUPERFÍCIE
pH	composição	defeitos
composição	crystalinidade	adsorção de íons
saturação	porosidade	transformação de fases
propriedades hidrodinâmicas		

As variáveis citadas na TAB. 3.10.1 estão envolvidas na compreensão de diferentes modelos propostos para dissolução de apatitas. Porém, os modelos apresentados na literatura ainda não esclarecem o seu mecanismo de um modo geral, devido a participação simultânea de todas estas variáveis. A maioria dos modelos de dissolução não é específica, mas sim complementar.

Grande parte destes modelos citados pela literatura descreve a formação de uma camada intermediária de fosfato de cálcio. Estes estudos demonstraram que a dissolução é caracterizada por uma associação de processos, como: transporte de massa, fenômenos de adsorção/dessorção, reações heterogêneas e transformações químicas sucessivas de fases intermediárias. Estes modelos foram estudados em condições propícias à dissolução, ou seja, meio ácido ou próximo ao pH neutro, ou também sob condições transitórias de saturação/insaturação ⁸².

O meio ácido é o ambiente mais favorável à dissolução e apresenta as seguintes etapas ⁸²:

- 1- difusão de reagentes (H^+ e A^{n-}) da solução para interface;
- 2- adsorção de espécies sobre a superfície
- 3- transformações químicas na superfície
- 4- dessorção de produtos (Ca^{2+} e PO_4^{3-}) da superfície
- 5- difusão na solução

Estas etapas tendem a se tornar mais complexas quando a difusão vem acompanhada de transformações químicas que são muito sensíveis a variações de pH. Também, as

interações iônicas tendem a aumentar o pH na interface e ocasionar variações de pH na solução, que dependem da distância interfacial sólido/líquido; quanto mais próximo da superfície do sólido, maior o pH.

A distinção entre os diferentes processos de dissolução pode ser possível de acordo com a identificação do mecanismo determinante na taxa de dissolução, normalmente é regido por uma ou mais das etapas (1-5) descritas anteriormente. Desta forma, quando fenômenos superficiais começam a atuar, o processo de difusão é mínimo, ou vice-versa ⁸².

A difusão é definida pelo transporte de íons (isolados ou agrupados) pela camada de difusão de Nernst movida por diferentes gradientes de concentração. Assim, a taxa de dissolução é determinada pelo transporte das espécies químicas presentes.

As reações superficiais, de acordo com Dorozhkin ⁸², descreve modelos regidos por parâmetros cinéticos. Estes parâmetros são definidos pelas transformações químicas sobre a superfície e a resistência a adsorção de íons que depende do tamanho (mobilidade) e eletronegatividade. Este mecanismo é ativado pela existência de gradientes de potencial químico entre superfície e volume da solução ⁸².

Superfícies cerâmicas de HAp sintética podem se transformar em apatita biológica por meio de uma série de reações incluindo: dissolução, precipitação e troca iônica, como acontece em experimentos que envolvem a formação da camada responsável pela ligação bioativa. Ambiente com alto teor de acidez ou o próprio fluido corpóreo, que é caracterizado pela sua natureza agressiva, são favoráveis à degradação ou à dissolução das cerâmicas de fosfatos de cálcio pela desintegração física de pequenas partículas, resultante do ataque químico preferencial dos contornos de grãos ⁶⁰. Este fenômeno ocorre no estágio inicial para formação da camada de fosfato de cálcio. A medida que a dissolução avança, variações na concentração iônica e no pH são evidentes, tendo a participação efetiva de íons cálcio e fósforo ⁸².

Durante a dissolução, além dos íons mais comuns: Ca^{+2} , PO_4^{-3} , OH^- , H^+ , HPO_4^{-2} , H_2PO_4^- , íons complexos como $\text{CaH}_2\text{PO}_4^+$ e CaOH^+ são encontrados pela camada hidratada ao redor do implante. As apatitas biológicas também apresentam esta camada hidratada que contribui para o desenvolvimento de cargas superficiais, também sobre o implante de HAp, influenciando na atividade celular envolvida na formação óssea na interface ⁹.

Parâmetros como: geométrico, definido pela razão entre a área de superfície do sólido e o volume da solução (S/V), natureza da solução (SBF, “tris-buffer” ou outra), composição e microestrutura da amostra, condições de ensaio (temperatura, tempo, sistema

estático ou dinâmico) são decisivos na avaliação da dissolução do material em estudo, podendo alterar os resultados da análise a medida que são definidas condições de ensaio diferentes²⁰.

A literatura tem demonstrado que a taxa de dissolução é inversamente proporcional ao raio de curvatura da amostra, enquanto a nucleação e o crescimento da hidroxicarbonato-apatita (HCA) ocorrem mais facilmente sobre a superfície de amostras com raios de curvatura menor. Em geral, a alta razão S/V permite um rápido aumento de pH na solução e acelera o processo de dissolução quando comparada a razões (S/V) mais baixas. Deste modo, valores baixos da razão S/V promovem a formação de uma camada mais espessa, porém com cinética mais lenta, enquanto valores maiores desta razão promovem uma rápida formação da camada, mas de baixa espessura. Assim, a razão S/V pode determinar diretamente a velocidade de dissolução^{45, 83}.

O tamanho de partícula também exerce influência na dissolução. Partículas menores conduzem a formação de uma camada de fosfato de cálcio de maneira lenta, além disso, estas partículas apresentam rápida dissolução, podendo ser facilmente reabsorvidas pelo organismo, enquanto as maiores promovem a formação de uma camada mais espessa e estimulam o crescimento ósseo^{20, 45}.

De maneira geral, a taxa de dissolução pode aumentar em função de diferentes parâmetros, tais como²⁰ :

- Aumento na área de superfície específica (pó > sólido poroso > sólido denso)
- Redução da cristalinidade ou defeitos no cristal
- Diminuição do tamanho de grão e do cristalito
- Substituições de CO_3^{-2} , Mg^{+2} , Sr^{+2} , e aumento da razão β -TCP/HAp, no caso de cerâmicas bifásicas; já as substituições por F^- em HAp e Mg^{+2} em β -TCP reduzem a dissolução da cerâmica.

Em termos de cristalinidade, a dissolução de cristais de HAp sintética não é localizada. A dissolução é observada tanto na superfície quanto no interior do cristal, porém os cristais de apatita biológica apresentam uma dissolução localizada, preferencialmente no núcleo do cristal⁹.

O processo pelo qual a dissolução procede é orientado pelos mesmos mecanismos, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, porém é importante enfatizar dois aspectos que devem ser levados em conta quando se compara a dissolução de uma apatita em meio biológico com

a que ocorre em meio simulado. Primeiro, o processo de dissolução *in vivo* ocorre em sistema termodinamicamente aberto, ou seja, existe um fluxo de massa constante de fluidos do corpo ao redor do implante e possivelmente através dele; neste sistema nenhum equilíbrio é alcançado. Já, em um sistema fechado, a apatita pode atingir o equilíbrio a partir de seus íons dissolvidos na solução salina ao redor do material. Segundo, as concentrações fisiológicas de cálcio e fósforo são tais que a precipitação é mais esperada que a dissolução, e isto tem sido observado ao longo de vários estudos *in vivo* ⁸⁴.

Apesar do impacto positivo dos modelos de dissolução para compreensão da osteoporose e formação de cáries dentárias, sob aspectos médicos, existem ainda poucas informações a respeito dos parâmetros globais que envolvem o embasamento teórico e as diferenciações entre cada modelo. A ausência de técnicas experimentais capazes de fornecer dados precisos de maneira direta sobre os eventos que acontecem a nível de superfície, difusão e a nível atômico conduz a descrições com base somente em medidas indiretas e/ou cálculos matemáticos ⁸².

O emprego de ferramentas de uso analítico comum, somada a descrição dos parâmetros mais importantes de dissolução, como: pH, natureza da solução e do material, variação de massa e análise de superfície do sólido podem sugerir um caminho prático para descrição de diferentes eventos como aqueles envolvidos no processo que define a reatividade de cerâmicas a base de fosfatos de cálcio, sendo uma das abordagens deste trabalho.

Neste capítulo é descrita a metodologia utilizada para o cumprimento dos objetivos propostos. Dessa forma, são apresentadas as técnicas e a metodologia para caracterização física e química das matérias primas, o processamento para obtenção das cerâmicas à base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico, além das técnicas utilizadas para caracterizar os materiais processados e a metodologia para avaliar a reatividade *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização das matérias-primas

As matérias primas utilizadas foram: Hidroxiapatita (Strem Chemicals) e β -fosfato tricálcico (Fluka).

4.1.1 Difração de raios-X

Os pós foram caracterizados por difração de raios-X (difratômetro Bruker- AXS modelo D8 Advance), adotando parâmetros de 10-80° (2 θ) e passos: 0,05/5s , com o objetivo de verificar as fases cristalinas majoritárias: hidroxiapatita e fosfato-tricálcico, e de detectar fases secundárias nos materiais de partida.

O princípio físico desta técnica é baseado na lei de Bragg que expressa uma relação simples entre a distância das camadas adjacentes de átomos, o comprimento de onda da radiação X e o ângulo de difração, através da equação (4. 1.1):

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen}\theta \quad (4.1.1)$$

onde, θ é o ângulo de difração para um espaçamento d , λ é o comprimento de onda do raio X e n é geralmente igual a um e corresponde ao raio difratado de primeira ordem, no qual o ângulo de difração é menor ^{85, 86}.

Grande parte do conhecimento sobre estrutura dos materiais cristalinos é proveniente desta técnica, mesmo a análise por DRX apresentando limitações quanto a quantidade detectável de fases presentes, ou seja, cerca de 1% em massa ^{85, 86}.

4.1.2 Espectrometria de emissão por plasma induzido (ICP-AES)

A técnica de espectrometria de emissão atômica (ICP-AES) foi utilizada para analisar quimicamente os materiais de partida.

A metodologia consiste em dissolver o pó, obtendo uma solução que é injetada como um aerossol dentro do canal axial de um plasma de argônio. A dissolução do pó e a preparação da solução são etapas críticas ⁸⁷.

Os macroconstituintes: cálcio e fósforo presentes no β - fosfato-tricálcico e na hidroxiapatita foram quantificados, sendo o cálcio determinado na forma de CaO e o fósforo na forma de P_2O_5 . Para as análises, foi utilizada como padrão uma amostra de rocha fosfática certificada pelo IPT, número de referência 0726 denominada IPT-18B, que apresenta Ca e P de mesma ordem de grandeza da HAp.

Para essas análises a curva de calibração foi obtida com padrões de Ca e P próprios para o ICP.

4.1.3 Distribuição de tamanho médio de partículas

Foram realizados ensaios para a distribuição de tamanho de partículas/aglomerados, pela técnica de difração à laser em equipamento Cilas 1064.

Esta técnica permite a determinação da distribuição do tamanho de partículas na faixa de 0,1 a 500 μm , assumindo formato esférico para partículas cujo diâmetro seja maior que o comprimento de onda (λ). Também assume um movimento aleatório das partículas as quais permanecem distantes o suficiente umas das outras, difratando a luz com a mesma eficiência. O princípio da medição por laser é aplicado para pós que se dispersam em água ou ar e também para suspensões e emulsões^{88, 89}.

Para a análise, cada amostragem (~ 0,5g) de pó (HAp ou TCP) foi dispersa em meio aquoso com adição de pirofosfato de sódio (0,05% em peso), como dispersante e permanecendo por 1 minuto em ultrassom (Vibracell Sonics & Materials).

4.1.4 Área Superficial Específica

A área superficial específica foi determinada adotando o método de adsorção gasosa (BET – Micromeritics modelo ASAP 2010), utilizando gás N_2 como adsorvedor.

Esta técnica é baseada na teoria proposta por Brunauer, Emmet, Teller, na qual as forças atrativas durante a condensação das moléculas gasosas adsorvidas na superfície do sólido são responsáveis pela energia de ligação entre as múltiplas camadas^{87, 89}.

Conhecendo o volume da monocamada (V_m), ou seja o volume ocupado pelas moléculas de gás que formam uma camada monomolecular completa sobre a superfície, é possível determinar a área superficial específica, multiplicando a área ocupada por uma molécula do gás pelo total de moléculas que formam a monocamada, conforme a equação (4.1.2).

$$AE = \frac{V_m NA A_{ef}}{VM} \quad (4.1.2)$$

Onde:

NA: Número de Avogadro ($6,023 \cdot 10^{23}$ molec./mol)

A_{ef} : Área efetiva da molécula do gás ($N_2 = 16,2 \cdot 10^{-20} \text{m}^2/\text{molec.}$)

VM: Volume molar ($22414 \text{cm}^3/\text{mol}$)

4.1.5 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos pós foi observada por microscopia eletrônica de varredura, equipamento Philips–XL 30, com espectroscopia de energia dispersiva (EDS) marca EDAX. Uma pequena quantidade de pó foi dispersa em etanol e depositada, com auxílio de conta-gotas, sobre o porta-amostra, e após secagem ao ar, foi realizado recobrimento com Au.

4.1.6 Espectroscopia de Infravermelho

A técnica de caracterização por espectroscopia de infravermelho foi realizada no Departamento de Química da UMC, utilizando espectrofotômetro Thermo Nicolet 670 – FTIR – NEXUS, para verificar a presença de grupos funcionais característicos de P-O, O-H, P-O-H, H-O-H e sobretudo C-O, característico do grupo carbonato, que pode ter grande influência nas propriedades do material, afetando sobretudo, nos testes de bioatividade.

Os espectros de infravermelho são gerados como resultado simultâneo da multiplicidade de diferentes modos de vibração, rotação, flexão e “twisting” de átomos ou grupos de átomos presentes em uma molécula ao interagir com a radiação^{20, 87}.

Os pós de hidroxiapatita e β -fosfato-tricálcico foram misturados em KBr, prensados na forma de pastilhas e analisados por técnica de transmitância, adotando intervalo de medida de $4000\text{-}500 \text{cm}^{-1}$.

4.2 Processamento dos pós

Os pós de hidroxiapatita e β - fosfato-tricálcico foram misturados em diferentes composições, conforme a TAB. 4.2.1, e de acordo com as etapas apresentadas no fluxograma da Figura 4.2.1.

TABELA 4.2.1. Composições das misturas de HAp e TCP.

Códigos	H	8H	7H	6H	5H	T
%-massa HAp	100,0	87,5	75,0	62,5	50,0	-
%-massa TCP	-	12,5	25,0	37,5	50,0	100,0

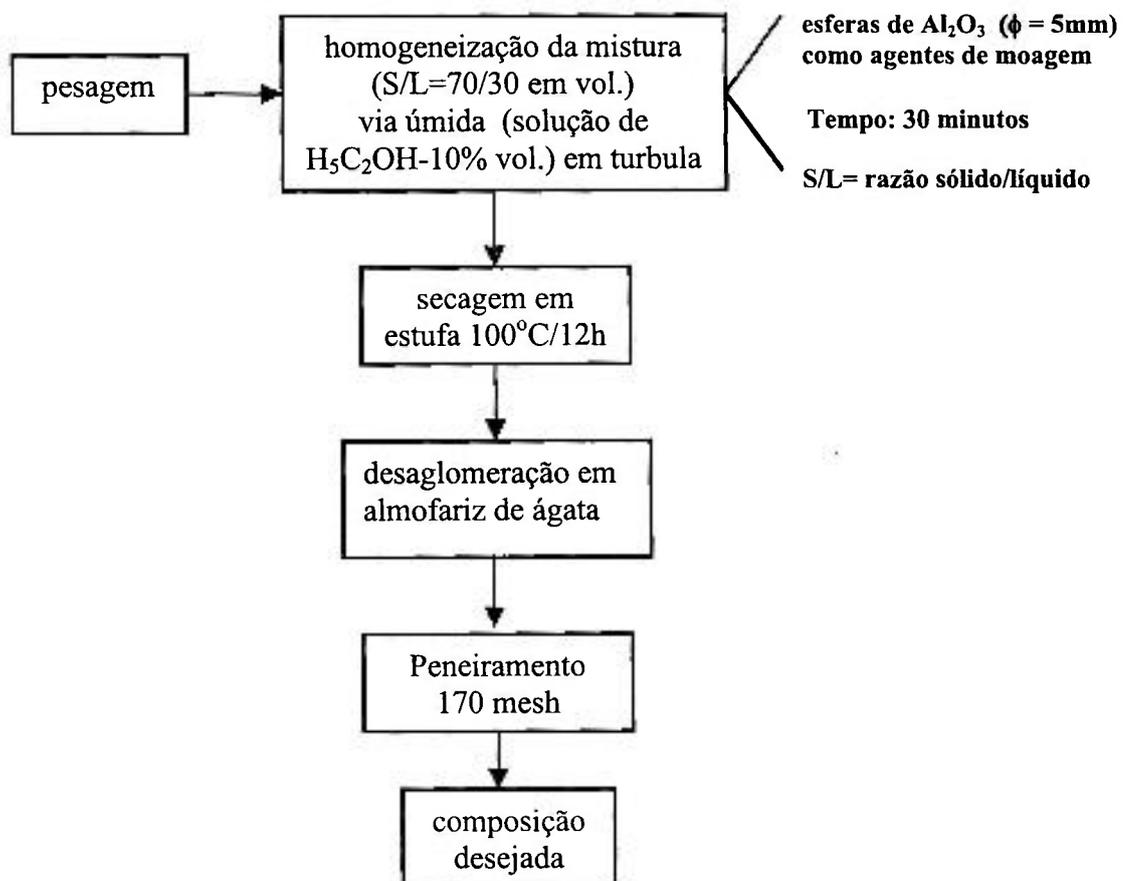


Figura 4.2.1- Fluxograma do processo de obtenção das misturas bifásicas com diferentes composições de HAp e TCP.

4.3 Obtenção dos corpos de prova

As misturas foram conformadas em matrizes cilíndricas ($\phi = 7$ e 12mm) por prensagem uniaxial (20MPa) e prensagem isostática a frio (200MPa). A temperatura e o tempo de sinterização são parâmetros fundamentais que devem ser analisados para obtenção de um material com densidade adequada. Para tanto, foram realizadas análises dilatométricas das amostras: H, T e do compósito 5H em dilatômetro (Netzsh –DIL 402 E/7), com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ e patamar de $1250^\circ\text{C}/15\text{min}$. Os resultados obtidos pela sinterização em dilatômetro permitem determinar a temperatura de sinterização das amostras estudadas. Os dados obtidos foram usados para facilitar o desenvolvimento de amostras bifásicas densificadas.

Corpos cerâmicos de diferentes composições foram prensados na forma de pastilhas e sinterizados em forno tubular Lindberg em atmosfera oxidante a diferentes temperaturas, para verificar a dependência da densidade com o tratamento térmico estabelecido.

Após sinterização, os corpos cerâmicos foram caracterizados por difração de raios X, adotando os mesmos parâmetros dos pós de partida, microscopia eletrônica de varredura, para análise da microestrutura e da porosidade da amostra fraturada e da superfície, com recobrimento de Au, e medidas de densidade (ρ), pelo princípio de Arquimedes, de acordo com a equação 4.3.1 ⁸⁹:

$$\rho = [m_s / (m_u - m_i)] \cdot \rho_{\text{H}_2\text{O}} \quad (4.3.1)$$

sendo: m_s = massa da amostra seca

m_u = massa da amostra úmida

m_i = massa da amostra submersa

$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ = densidade da água na temperatura do ensaio

4.4 Experimentos *in vitro*

Para a avaliação do comportamento bioativo dos corpos obtidos, foi preparada a solução específica para o teste, SBF –“Simulated Body Fluid”, de acordo com o método proposto por Kokubo e colaboradores ⁴⁶. Foi utilizada a solução SBF designada com o nº.9, de acordo com Kokubo, sendo esta, a que mais se aproxima da composição do plasma

sangüíneo humano ⁴⁶. A TAB. 4.4.1 apresenta os valores correspondentes aos íons presentes na solução, SBF, e no plasma sangüíneo humano.

TABELA 4.4.1- Concentrações iônicas da solução empregada e do plasma (mmol.dm⁻³) ⁴⁶.

	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ²⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	4,2	148,0	1,0	0,5
Plasma	142,0	5,0	2,5	1,5	27,0	103,0	1,0	0,5

A TAB. 4.4.2, apresenta os reagentes necessários, utilizados para a obtenção do SBF, sendo apresentados na ordem em que foram adicionados à solução. Todos os reagentes utilizados são de grau analítico.

O preparo do SBF é dividido em etapas. A primeira consiste na obtenção de uma solução, com metade do volume final, contendo os cinco primeiros sais, além do ácido clorídrico, respeitando sempre a ordem da adição em água deionizada, em temperatura de 37°C e agitação constante para facilitar a dissolução e evitar a precipitação do sal. Após a dissolução completa do sal, o próximo é adicionado.

A segunda etapa refere-se a preparação de uma solução, contendo os dois últimos sais num pequeno volume de água, também deionizada, mantendo a mesma condição de temperatura e agitação da primeira.

Na última etapa, estas soluções são misturadas sendo adicionado o tris-hidroximetilaminometano, até atingir um pH de 7,25 ajustado para 37°C, em volume de 1 litro.

TABELA 4.4.2 – Reagentes analíticos e suas respectivas massas para a obtenção do SBF.

Reagentes	SBF (g)
NaCl	7,9946
NaHCO ₃	0,3528
KCl	0,2236
K ₂ HPO ₄	0,1742
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,3050
HCl 0,1M	10 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,3676
Na ₂ SO ₄	0,0701
NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ 0,05M	Até pH=7,25

Após a obtenção do SBF, o mesmo é guardado em frasco de polietileno e mantido em geladeira. Esta solução apresenta uma vida útil de 30 dias para a realização dos testes e também para sua caracterização, depois do contato com o material bioativo ⁴⁶.

Foram preparados corpos cilíndricos em matriz de 12 mm de diâmetro e com área de superfície geométrica, superior a 11,5 mm²; normalmente a área mínima exigida para efetuar o teste de bioatividade é de 10 mm² ⁸³. De acordo com a literatura, o volume de solução deve ser, no mínimo, 10 vezes maior que a área disponível da amostra ⁸³. Neste trabalho, está sendo utilizado um volume cerca de 20 vezes maior com relação a área de contato da amostra.

Para estimar o tempo inicial de formação da camada de HCA, nas cerâmicas em estudo, foram analisadas todas as composições em duplicata, adotando a seguinte metodologia: os testes foram realizados em um período de 3 semanas, renovando as soluções a cada 3 dias e mantendo uma razão de área geométrica das cerâmicas com relação ao volume de solução, S/V igual a 0,05 cm⁻¹.

Os corpos de prova imersos em SBF foram acondicionados em frascos novos de polietileno, previamente limpos, mantidos em ultrassom por 3 minutos, com grande volume de água deionizada, e secos em estufa de baixa temperatura, 50°C.

Os corpos de prova foram limpos, em ultrassom, em água deionizada, por 1 minuto, e em acetona por 20 segundos e mantidos em estufa a 40°C até o momento do

experimento. Os recipientes, para assegurar uma boa assepsia e evitar presença de resíduos indesejáveis, passaram por etapa de enxágüe com um pouco de solução SBF, antes dos experimentos.

Durante os experimentos, os frascos contendo os corpos de prova com SBF foram mantidos em banho maria, em recipiente com água, para monitorar a temperatura da solução. No decorrer do ensaio, foi acrescentado um termômetro no banho, para visualizar a temperatura real do sistema. Durante todo o experimento, o sistema foi mantido em estufa de cultura/ bacteriologia à temperatura fixa de 36,5- 37,0°C e, com agitação esporádica dos frascos que continham as amostras.

4.5 Caracterização dos corpos de prova

Após os testes *in vitro*, os corpos de prova foram secos ao ar e guardados em pequenos frascos de polietileno para evitar contato direto com poeira ou outras impurezas. Para as análises de espectroscopia de infravermelho e análise microestrutural, as amostras eram previamente levadas a estufa à temperatura de 50°C, para eliminar a umidade superficial.

Para analisar a superfície das cerâmicas bioativas em função do tempo de permanência em SBF foi utilizada a técnica de espectroscopia de infravermelho por reflexão difusa e não especular. O modo por reflexão difusa é particularmente útil quando existe um espalhamento considerável pela camada da superfície da amostra. Este é um dos métodos mais versáteis, rápidos e precisos, para análise de superfícies. Não é destrutivo, não necessita de vácuo ou preparação da amostra, além de ser aplicável para amostras de qualquer dimensão, ou mesmo com curvatura ⁹.

Esta técnica analisa a superfície de vidros ou cerâmicas com profundidade de aproximadamente 0,5 μm , dependendo do índice de refração e densidade da camada superficial ⁹.

A técnica permite uma análise comparativa do biomaterial antes e depois de testes *in vitro*, e fornece dados importantes com respeito a mudanças de fases na camada superficial e sobre a evolução da camada de fosfato de cálcio, possibilitando um estudo da bioatividade dos materiais ^{9, 20}. Com este objetivo, foi utilizado o equipamento Perkin Elmer Spectrum GX (FT-IR system) do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar.

4.6 Análise das soluções de SBF

4.6.1 Medidas de pH

Leituras de pH permitem a previsão do tipo de interação existente entre íons da solução e do material, em função do tempo de dissolução.

Foram realizadas leituras de pH a 37°C das soluções SBF que mantiveram contato com as cerâmicas. Adotou-se intervalos de tempos diferentes para as leituras: primeiras 12 horas e intervalos de 72 horas por até 3 semanas, com a utilização de pHmetro (Digimed DM-20; tipo: escoamento/difusão; sistema Ag/AgCl barreira iônica; faixa de temperatura: 0 a 100°C).

As leituras das soluções foram realizadas após agitação com a presença da amostra nas soluções e também após período de acondicionamento das mesmas, em geladeira, neste caso na ausência da amostra com o objetivo de observar a estabilidade das soluções salinas de SBF. Em todos os casos as leituras foram realizadas em período inferior a 30 dias e em temperatura igual a corpórea ($\pm 37^\circ\text{C}$). Após as leituras, as soluções foram acondicionadas em frascos de polietileno, sendo mantidas em geladeira até o momento da análise química das soluções pela técnica de ativação neutrônica.

Alíquotas das soluções, SBF, que restavam das renovações das soluções, portanto sem o contato com as amostras, foram mantidas em geladeira e também controladas por medidas de pH (37°C). Durante todo o período em que permaneceram em geladeira não foi observado sinal de precipitação das soluções SBF.

4.6.2 Análise por ativação neutrônica (AAN)

A técnica nuclear por ativação neutrônica tem sido empregada na caracterização de biomateriais e amostras biológicas, devido a alta precisão e sensibilidade na detecção de elementos presentes em quantidades mínimas, como por exemplo, concentrações em ppt⁹⁰.

A análise por ativação com nêutrons (AAN) é um método analítico que se diferencia da maior parte dos métodos usuais, em virtude de se basear em reações que ocorrem com núcleos atômicos. Esta técnica é um dos métodos mais importantes para a análise de traços, apresentando como principais vantagens a capacidade de determinação

multielementar com alta sensibilidade e a eliminação do “branco analítico”, ou seja, a não contaminação por materiais reagentes ⁹¹.

A determinação qualitativa e quantitativa dos nuclídeos formados é feita por detectores de alta resolução, constituídos por cristais de germânio-lítio ou germânio hiperpuro, acoplados a sistema de contagem com analisadores multicanais e eletrônica associada.

Emprega-se freqüentemente o método de análise comparativa, considerado como um método exato para quantificar as concentrações elementares. Neste método, uma quantidade conhecida do elemento que se quer determinar é irradiada juntamente com a amostra, durante o mesmo tempo e sob o mesmo fluxo de partículas ativadoras. Após a irradiação, amostra e padrão são medidos sob condições geométricas idênticas com o mesmo detector. Este método elimina incertezas nos parâmetros nucleares e na eficiência do detector ⁹¹.

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para quantificar a concentração de cálcio, um dos íons mais significativos para formação da HCA, nas soluções salinas de SBF. O procedimento foi realizado pela Dra. Mitiko Saiki do Departamento do CRPq do IPEN e irradiadas no reator de pesquisa IEA-R1.

Alíquotas de 15 mL de cada amostra foram pipetadas em frascos de polietileno e submetidas a secagem por liofilização. O resíduo (pó branco) obtido após liofilização foi pesado em invólucro de polietileno e irradiado juntamente com padrão sintético de cálcio (500,1 µg) sob fluxo de nêutrons térmicos de 5.10^{12} n cm⁻² s⁻¹ no reator IEA-R1, do IPEN. Após cerca de 10 dias de decaimento, as amostras e o padrão de Ca foram medidos usando detector de Ge hiperpuro ligado a um espectrômetro de raios gama. O cálcio foi analisado pela medida do isótopo ⁴⁷Ca de meia vida de 4,54 dias e a concentração do elemento foi calculada pelo método comparativo. Neste método foram analisadas as soluções SBF de 4 composições, sendo duas bifásicas: 5H e 7H e as composições puras de HAp e TCP.

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos e as discussões orientadas pela teoria envolvida na obtenção e caracterização destas cerâmicas. Inicialmente, são apresentados os resultados de DRX, MEV, análise da distribuição do tamanho de partículas e da área de superfície específica, ICP-AES e FTIR que caracterizam os materiais de partida. Os resultados do ensaio dilatométrico das amostras são apresentados. As amostras foram processadas em forno resistivo e atmosfera oxidante e caracterizadas por DRX, MEV e, reatividade *in vitro*, este estudo envolveu a análise das soluções simuladas, por medidas de pH e AAN e das amostras por variação de massa e a formação da camada bioativa por MEV-EDS e FTIR.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização física e química dos pós

Foram obtidos difratogramas dos pós de hidroxiapatita e β -fosfato-tricálcico para confirmar a presença das fases características destes materiais e observar a coexistência de fases secundárias indesejáveis, como o fosfato tricálcico, presença comum em HAp comerciais, ou CaO e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ empregados para atingir a razão estequiométrica ideal de Ca/P no material^{20,51}.

Os difratogramas obtidos são apresentados na Figura 5.1.1 – (a) e (b), onde é possível observar apenas os picos característicos do β -fosfato tricálcico e da hidroxiapatita, respectivamente.

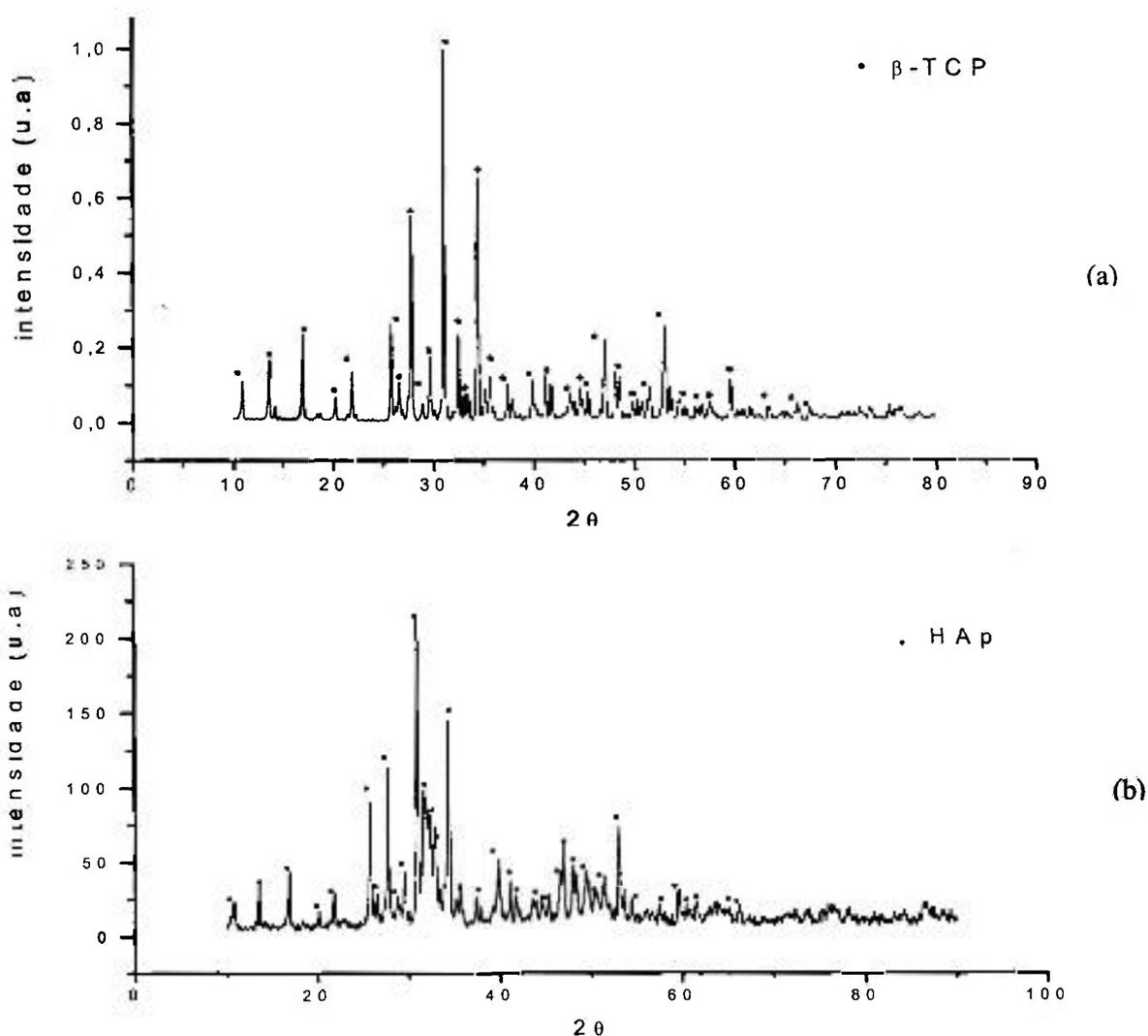


Figura 5.1.1– Difratograma dos pós de β -fosfato-tricálcico (a) e hidroxiapatita (b), respectivamente.

Os pós, Figura 5.1.2, apresentam morfologias diferentes, sendo a HAp de forma mais esférica, superfície com característica rugosa e presença de aglomerados, enquanto o TCP possui superfícies mais lisas e formato acicular.

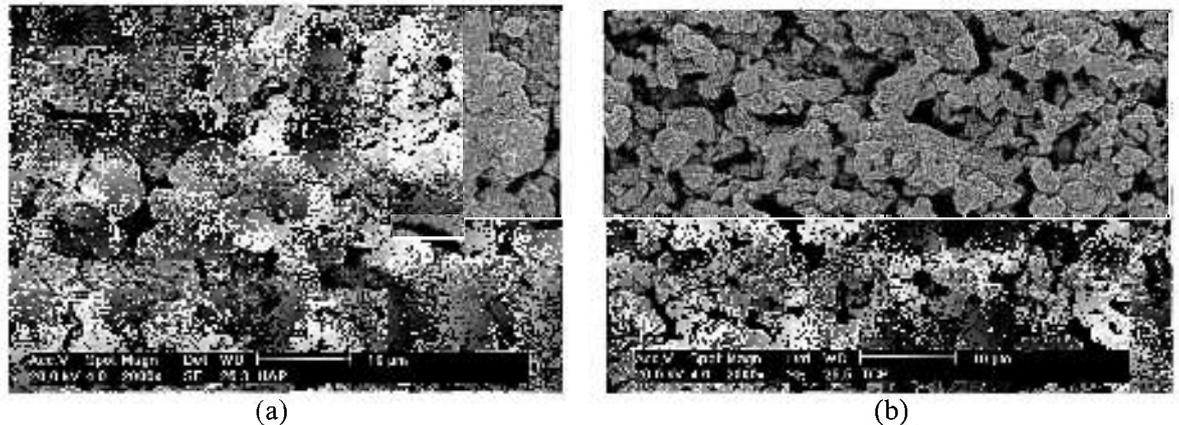


Figura 5.1.2 - Micrografias dos pós de partida, sendo (a) HAp e (b) TCP.

A área de superfície específica dos pós foi obtida pelo método de BET. Não foi observado desvio na linearidade na curva da isoterma de adsorção, Figura 5.1.3, sugerindo superfícies homogêneas dos pós, não havendo condensação nos poros ou quimiossorção. O valor da constante C, que corresponde a energia de condensação, é de 52 para a HAp e 13 para o TCP. Estes valores numéricos se encontram no intervalo ótimo de medida, não implicando maior afinidade entre as moléculas do próprio gás (N_2) utilizado no ensaio que do gás/sólido e nem posições preferenciais de adsorção, o que torna o resultado confiável.

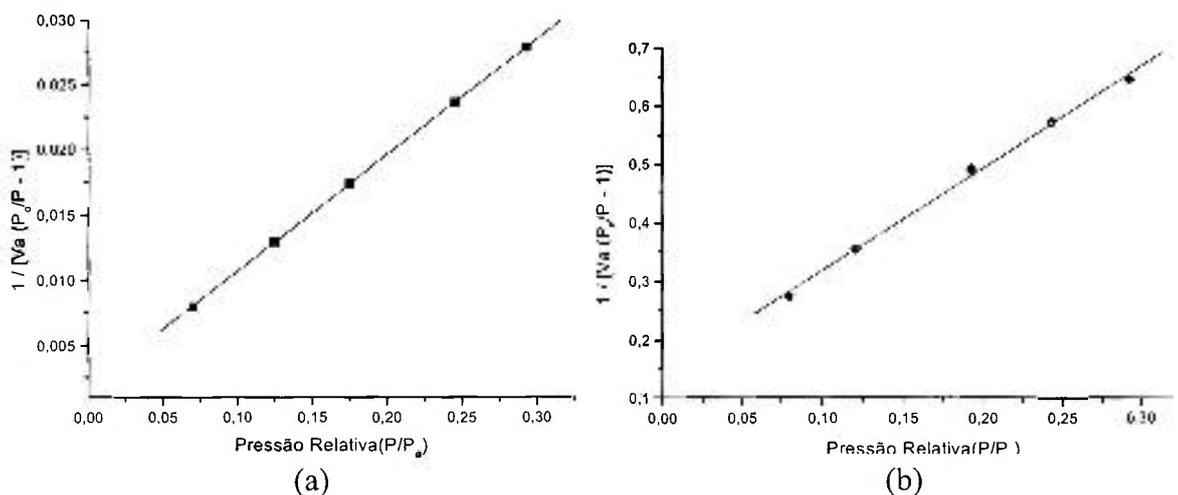


Figura 5.1.3 – Área superficial específica determinada pela regressão linear; (a) hidroxapatita e (b) β -fosfato-tricálcico.

Os valores numéricos obtidos nesta técnica são representativos de uma correlação linear positiva, apresentando coeficiente de correlação linear, $R^2 = 99,99\%$ para a amostra de hidroxiapatita (HAp) e $R^2 = 99,85\%$, para a amostra de β -fosfato-tricálcico (TCP).

A presença de rugosidade, principalmente no pó de HAp, influenciou na medida de área superficial, já que esta técnica considera as microrugosidades superficiais, aumentando a área superficial disponível para a adsorção do N_2 .

A distribuição do tamanho de partículas dos pós de hidroxiapatita e β -fosfato-tricálcico, obtida pelo método de difração a laser, é apresentada na Figura 5.1.4, onde se observa uma distribuição bimodal para o β - TCP e uma larga distribuição de caráter polidisperso para HAp.

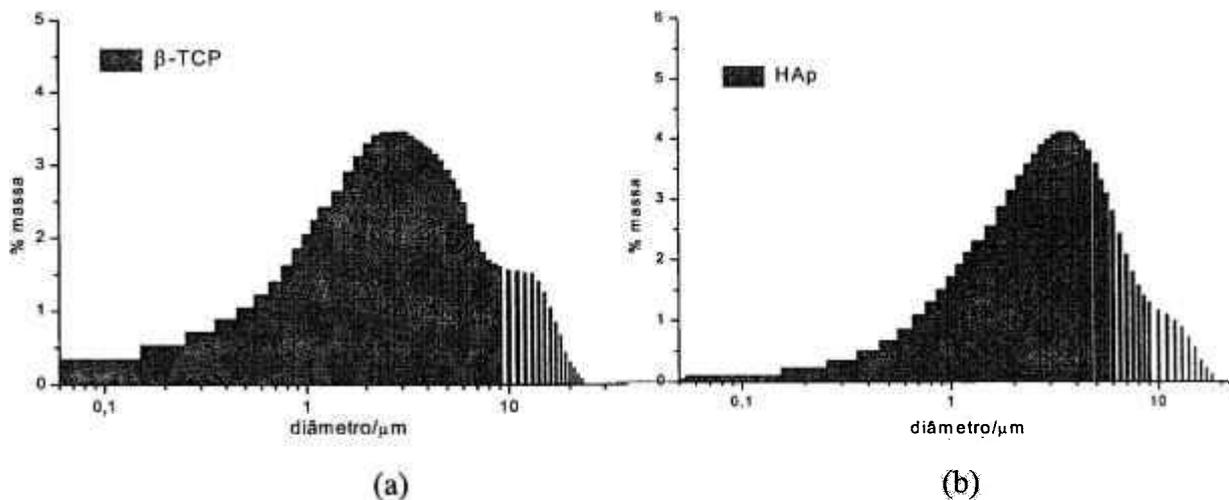


Figura 5.1.4 – Histogramas (diâmetro em função dos valores de % em massa) dos pós, (a) β -TCP e (b) HAp.

Os resultados destas duas análises, discutidas anteriormente, são apresentados na TAB. 5.1.1.

TABELA 5.1.1- Resultados obtidos das análises por BET e Cilas.

Parâmetros avaliados	Hidroxiapatita –HAp	Tricalciofosfato – TCP
Tamanho de partículas D 90% (μm)	7,37	9,77
Tamanho de partículas D 50% (μm)	2,83	2,67
Tamanho de partículas D 10% (μm)	0,80	0,60
Diâmetro médio partículas (μm)	3,59	4,0
Área superficial BET (m^2/g)	$45,7 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$

Estas técnicas forneceram resultados que estão associados ao estado de aglomeração dos pós, principalmente na HAp, indicando a presença de aglomerados densos, já que não foram rompidos depois da passagem em ultrassom.

As partículas muito finas tendem a se aglomerar em decorrência da maior intensidade das forças atrativas sobre as repulsivas, devido a distribuição de cargas nas superfícies. Normalmente, partículas de dimensões pequenas suspensas em meio líquido tendem a se movimentar rapidamente e aleatoriamente decorrente do impacto das moléculas do líquido contra a superfície, facilitando a aglomeração. A intensidade do impacto é mais significativa para partículas pequenas e com isso a aglomeração é favorecida⁹².

Um dos fatores muito discutido atualmente e que pode ter grande influência na resposta ao hospedeiro é a relação molar Ca/P do material implantado. Determinando-se a razão estequiométrica é possível prever o comportamento do material *in vitro* e *in vivo*; e até estabelecer uma aplicação específica em função da taxa de absorção^{9,93}.

A análise química dos pós foi realizada por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-AES), os resultados são apresentados na TAB.5.1.2 .

Para estas análises a curva de calibração foi obtida com padrões de Ca e P próprios para o ICP. Os valores obtidos, expressos em porcentagem de CaO para Ca e P₂O₅ para P, referentes a rocha padrão, apresentaram pequeno desvio em relação ao padrão certificado pelo IPT (52,6 - 52,8 % para o CaO e 35,6 – 35,8% para o P₂O₅) .

TABELA 5.1.2– Análise de cálcio e fósforo por espectrofotometria de emissão atômica com fonte de plasma induzido (ICP-AES).

<i>Amostra</i>	<i>Concentração (ppm) do material analisado</i>	<i>% (peso) Cã</i>	<i>% (peso) P₂O₅</i>	<i>Razão Ca/P</i>
<i>Rocha padrão</i>	10	50,98 ± 0,04	36,31 ± 0,02	1,78
	50	55,39 ± 0,05	38,39 ± 0,02	1,84
	100	55,7 ± 0,4	38,4 ± 0,1	1,84
<i>HAp</i>	10	50,70 ± 0,03	38,57 ± 0,01	1,66
	50	55,2 ± 0,1	41,00 ± 0,06	1,71
	100	55,2 ± 0,2	40,2 ± 0,2	1,74
<i>β- TCP</i>	10	49,66 ± 0,03	44,89 ± 0,01	1,40
	50	52,9 ± 0,1	46,28 ± 0,07	1,45
	100	53,77 ± 0,06	47,22 ± 0,08	1,44

A última coluna (razão molar Ca/P) foi obtida a partir da relação:

$$\text{Ca} - m_{\text{CaO}} \times \frac{m.a_{(\text{Ca})}}{m.a_{(\text{CaO})}} = m' \text{ (g de Ca)} \rightarrow \frac{m'}{m.a_{(\text{Ca})}} = x_{\text{Ca}} \text{ (mol de Ca)}$$

$$\text{P} - m_{\text{P}_2\text{O}_5} \times \frac{m.a_{(\text{P}_2)}}{m.a_{(\text{P}_2\text{O}_5)}} = m' \text{ (g de P)} \rightarrow \frac{m'}{m.a_{(\text{P})}} = x_{\text{P}} \text{ (mol de P)}$$

$$\text{Ca/P} = x_{\text{Ca}}/x_{\text{P}}$$

Sendo:

m_{CaO} = massa correspondente a % em peso expressa na 3^a. coluna da Tabela 5.1.2.

$m_{\text{P}_2\text{O}_5}$ = massa correspondente a % em peso expressa na 4^a. coluna da Tabela 5.1.2.

$m.a$ = massa atômica

m' = massa calculada

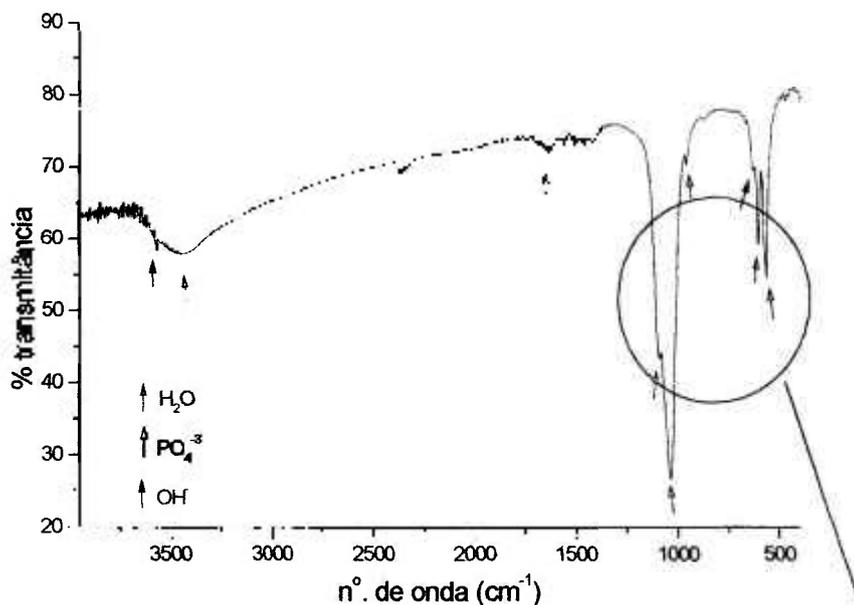
Observa-se que para maioria dos resultados obtidos há um aumento nas concentrações dos elementos Ca e P quando analisadas na seqüência de 10, 50 e 100 ppm. A amostra de β - TCP com concentração de 100 ppm apresentou valores para Ca e P que

somam pouco mais de 100%, isto provavelmente se deve a falhas operacionais e inerentes a metodologia utilizada, como por exemplo na diluição seqüencial, tanto para as análises de Ca, como para as de P.

Observou-se para a HAp, uma razão estequiométrica Ca/P de 1,66, para uma concentração de 10 ppm, cujo valor é muito próximo da razão teórica (1,67). Admitindo-se o valor médio entre as medidas, (1,7) a HAp é considerada rica em cálcio. Normalmente, hidroxiapatitas com esta característica, apresentam a fase CaO. Esta fase, porém não foi observada por difratometria de raios X da HAp, sugerindo que os desvios observados são decorrentes da rocha padrão.

O comportamento inverso foi observado para o β -TCP, apresentando uma razão estequiométrica média de 1,43, enquanto a teórica corresponde a 1,50. Valores mais baixos da razão Ca/P, eram previstos para o TCP, já que um padrão com razão molar estequiométrica de Ca/P mais próxima da hidroxiapatita, foi utilizado, obtendo valores menores para as quantidades de cálcio e fósforo.

Realizou-se também a obtenção dos espectros de transmissão por infravermelho para HAp, TCP e 5H. As Figuras 5.1.5-5.1.7 apresentam os espectros obtidos e os picos característicos de reflexão.



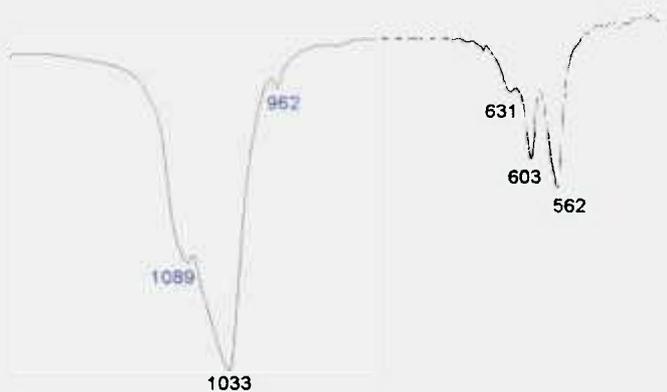


Figura 5.1.5 – Espectro de transmissão obtido por FTIR da HAP (material de partida).

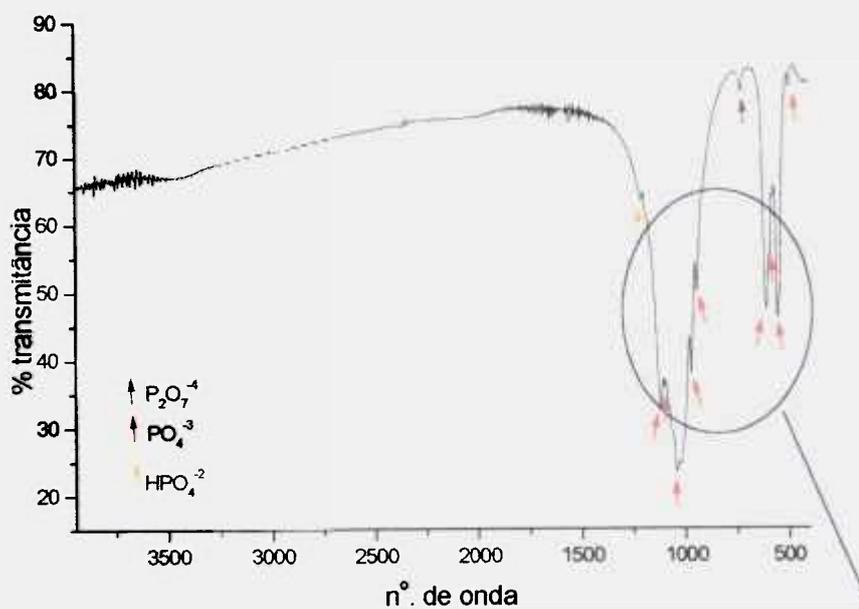


Figura 5.1.6 – Espectro de transmissão obtido por FTIR do β -TCP (material de partida).

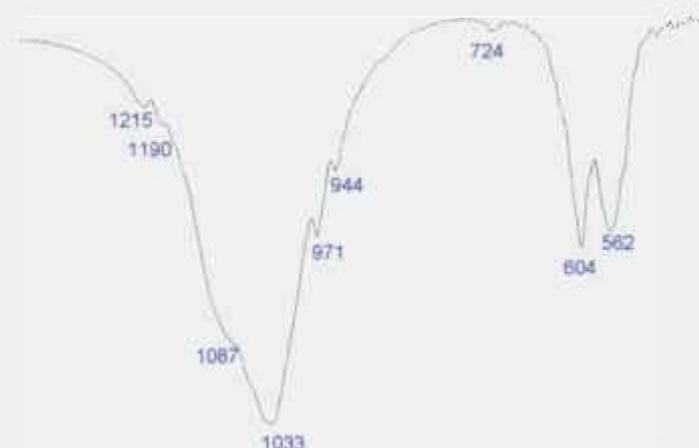
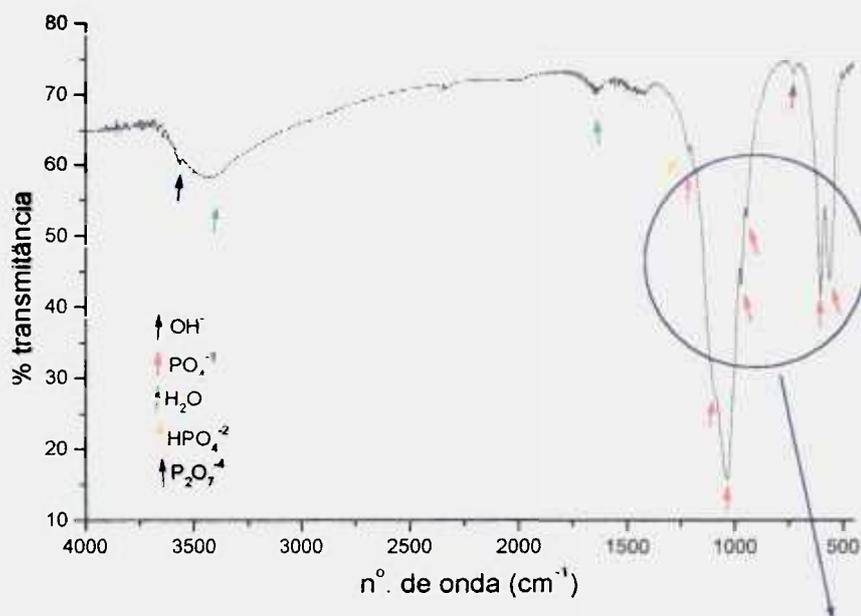


Figura 5.1.7 – Espectro de transmissão obtido por FTIR do mistura 5H dos materiais de partida.

Os principais picos de reflexão identificados nas três amostras: HAp, 5H e TCP são atribuídos aos grupos funcionais de ortofosfatos (PO_4^{3-}), hidroxilas (OH^-), hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) e provável pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), estes dois últimos em quantidade traço, já que seus picos não são expressivos e nem observados em outras posições do espectro, características destas espécies. A presença de carbonato não foi observada nos materiais de partida.

No espectro da amostra de HAp, Figura 5.1.5, são observadas suas bandas características em: 561, 603 e 631 (cm^{-1}) que correspondem aos modos de deformação tripla degenerada de ligações O-P-O de grupos fosfatos do tipo ν_{4c} e ν_{4a} e ao modo ν_L , do tipo rotacional da ligação O-H, respectivamente. Em 3572 cm^{-1} é observada a banda

decorrente também do grupo OH^- , referente a seu modo de estiramento, ν_s . A banda observada em 962 cm^{-1} , de baixa intensidade em amostras de HAp, é decorrente do modo, ν_1 , correspondente ao estiramento simétrico não degenerado de ligações P-O de grupos fosfatos. As bandas em 1033 e $1089 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ representam os modos de estiramento assimétrico triplo degenerado, ν_{3c} e ν_{3a} , respectivamente, das ligações P-O de grupos fosfatos⁹⁴.

Foi observada a presença de água nos materiais de partida pela existência de bandas associadas a ruídos nas regiões de $1590 - 1630 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$, modo de deformação ν_2 e banda larga por volta de 3400 cm^{-1} , sugerindo a presença de moléculas de água adsorvidas na amostra de HAp. A ausência de bandas nas regiões de $610-615$, 800 , 1102 e $1144 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ descarta a possibilidade de uma HAp deficiente em cálcio^{20, 94}, e a ausência de bandas nas posições: 680 , 715 , $745 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ e de uma banda de forte intensidade em $3544 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$, também elimina a possibilidade de tratar-se de uma HAp rica em cálcio^{20, 94}, conforme resultado de duas medidas na análise por absorção atômica.

Na amostra de TCP, a ausência de bandas em 460 e $740 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ e de uma banda isolada, $\sim 600 \text{ cm}^{-1}$, características do α -TCP, indica que o material de partida refere-se ao β -TCP. Este fosfato de cálcio é facilmente identificado por apresentar uma banda larga de $900-1200 \text{ cm}^{-1}$ ²⁰. Observa-se a presença do pico em 724 cm^{-1} , característico do modo simétrico $\nu(\text{P-O-P})$ atribuído a harmônicos de deformação P-O. A presença desta espécie ($\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$), pode ser decorrente da associação de tetraedros de PO_4^{-3} em dímeros de $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ ^{95, 96}. Já o pico em 1214 cm^{-1} é característico do modo não degenerado de deformação plana de hidrogênio em grupos: $-\text{OPO-H} \cdots \text{O-PO}_3$, comum em íons HPO_4^{-2} ⁹⁴. A presença desta espécie pode ser uma consequência da interação de moléculas de água na estrutura, alterando algumas vizinhanças na rede cristalina, já que o espectro, Figura 5.1.6 apresenta diferentemente das outras amostras, uma banda pouco significativa de água adsorvida na superfície, podendo ser incorporada à rede, associando-se às espécies vizinhas. Apesar destes dois picos serem detectados no espectro, seus grupos $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ e HPO_4^{-2} não foram confirmados em outras posições do espectro.

Na mistura 5H, observa-se as bandas características da HAp e do β -TCP. Desta forma, o espectro identificado é característico de uma HAp não estequiométrica devido a presença do β -TCP e a ausência da banda em 631 cm^{-1} do grupo OH^- ^{20, 94}. A interação

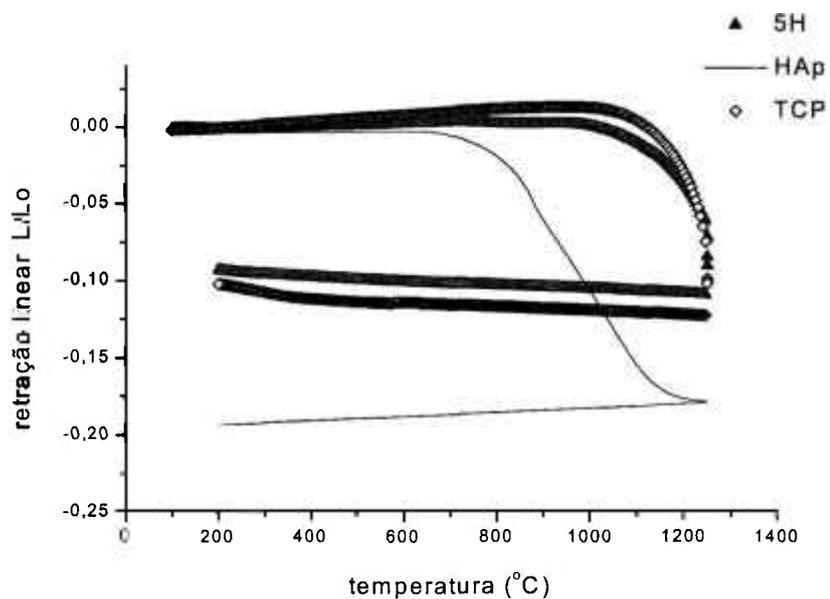
entre as espécies de fosfatos e átomos vizinhos promoveu a redução da banda em 724 cm^{-1} , detectada na amostra de TCP.

5.2 Sinterização

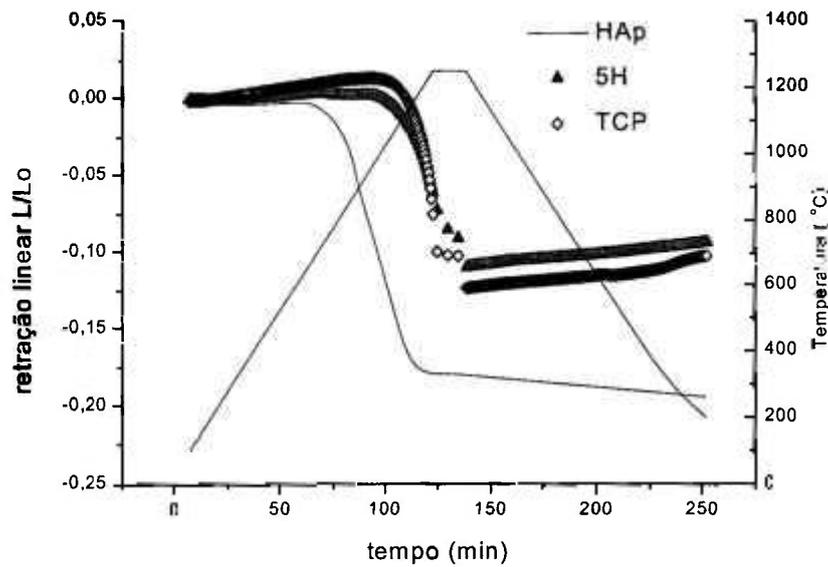
A análise dilatométrica das amostras de HAp, TCP e da mistura 5H foi realizada com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, até uma temperatura de 1250°C mantendo patamar por 15 minutos e resfriamento também com taxa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

As amostras contendo TCP apresentaram melhor compactação (67% densidade teórica), com o mesmo processo de prensagem para todas as amostras; e a HAp atingiu 56 % da densidade teórica, TAB. 5.2.1. Este comportamento pode ser atribuído a morfologia e tamanho de suas partículas, que resultaram em menor empacotamento. Sabe-se que quanto maior a distribuição do tamanho de suas partículas, maior o empacotamento do pó⁸⁹.

Os gráficos da retração linear em função da temperatura e em função do tempo e as curvas das taxas de retração em função do tempo são apresentados nas Figuras 5.2.1 e 5.2.2, respectivamente.



(a)



(b)

Figura 5.2.1 – Curvas de retração linear; (a) em função da temperatura e (b) em função do tempo (min), para diferentes composições.

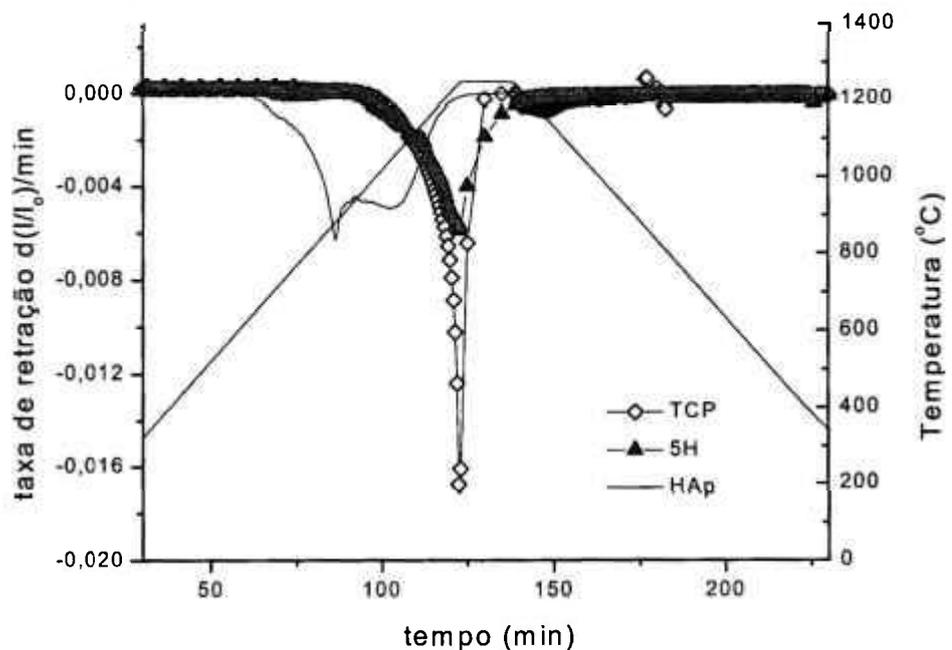


Figura 5.2.2 - Curvas das taxas de retração em função do tempo para diferentes composições.

Pode-se observar, que a HAp inicia o processo de retração a temperaturas mais baixas, por volta de 700°C (Figuras 5.2.1 e 5.2.2), e possui maior retração do que as amostras contendo TCP, densificando mais facilmente que a mistura e o TCP. Este fenômeno pode ser atribuído ao processo de difusão envolvido nos mecanismos de

sinterização, responsável em promover a densificação. A difusão em cerâmicas à base de TCP tem início em temperaturas mais elevadas, já que a sua temperatura de fusão é 1670°C, superior a da HAp, 1470°C.

É observado, pelos perfis das curvas de retração, Figura 5.2.2, que na HAp predominam dois mecanismos de sinterização que levam a densificação do material, devido o aparecimento de dois picos, o primeiro próximo a 800°C e o segundo acima de 900°C, enquanto no TCP existe apenas um mecanismo atuante (um pico), sendo este, basicamente o mesmo comportamento observado para a mistura, 5H.

Para a mistura 5H, nota-se que a presença do TCP inibe o início da retração do corpo cerâmico, em relação à HAp. Pelos ensaios dilatométricos, a sinterização das amostras contendo TCP a temperaturas mais altas, pode atingir maiores densidades, já que durante o patamar (1250°C) a retração ainda ocorre.

Com o objetivo de avaliar a densidade e as fases presentes nas diversas composições, as amostras foram submetidas à diferentes condições de sinterização. Os valores de densidade atingidos para cada composição e perdas de massa decorrentes dos diferentes parâmetros de sinterização são apresentados na TAB. 5.2.1.

TABELA 5.2.1- Valores de densidade e perda de massa das composições estudadas em diferentes condições de sinterização.

Densidade (ρ) Perda de massa (Δm)	H	8H	7H	6H	5H	T
ρ teórica (g/cm ³)						
ρ_t	3,156 ⁵¹	3,145	3,134	3,123	3,113	3,07 ⁵¹
% ρ_t (à verde)	56 ± 1	58 ± 2	63 ± 2	62 ± 2	65 ± 1	67 ± 2
% ρ_t - 1100°C/1h	95,00 ± 0,02	84,6 ± 0,02	81,40 ± 0,02	78,40 ± 0,01	78,50 ± 0,01	79,00 ± 0,03
(%) Δm - 1100°C/1h	7,6 ± 0,4	6,50 ± 0,02	5,5 ± 0,1	4,70 ± 0,01	3,9 ± 0,1	0,34 ± 0,02
% ρ_t - 1200°C/30min	98,50 ± 0,01	94,00 ± 0,01	95,00 ± 0,01	91,00 ± 0,01	85,10 ± 0,01	83,00 ± 0,02
% Δm - 1200°C/30min	7,9 ± 0,3	7,20 ± 0,02	5,9 ± 0,1	5,0 ± 0,1	4,3 ± 0,1	0,36 ± 0,05
% ρ_t - 1250°C/15min	98,50 ± 0,01	97,50 ± 0,02	97,60 ± 0,02	96,40 ± 0,02	93,40 ± 0,01	93,50 ± 0,03
% Δm - 1250°C/15min	7,9 ± 0,3	7,40 ± 0,02	6,2 ± 0,1	5,50 ± 0,01	4,50 ± 0,01	0,36 ± 0,05

Para cada composição foram feitas seis amostras e os valores tabelados correspondem as médias dos valores obtidos, com seus respectivos desvios, para densidade e perda de massa.

A HAp apresentou maior perda de massa durante o processo de sinterização. Sabe-se que a temperaturas superiores a 1100°C já podem ser observadas outras fases, como

β -TCP, que surge da decomposição da HAp; ou CaO, presente em apatitas ricas em Ca, porém a presença destas fases depende da estabilidade térmica e pureza do material. As amostras de TCP não apresentaram grandes variações de perda de massa, mesmo com tratamentos térmicos diferentes.

A presença do TCP propicia um aumento da densidade à verde proporcional a quantidade desta fase. Este comportamento já era esperado considerando que o TCP apresenta uma distribuição bimodal de tamanho de partículas (Figura 5.1.4) que facilita a compactação.

A HAp, apesar da menor densidade à verde, apresenta após sinterização a 1100°C/1h, maior densidade, ou seja 95 % da densidade teórica. Este comportamento se deve a temperatura de tratamento térmico, que é muito próxima às temperaturas de taxa de retração máxima. A densificação para o TCP nas mesmas condições de sinterização (1100°C/1h) foi baixa já que o tratamento térmico foi realizado em temperatura com taxa de retração mais baixa.

A medida que aumenta a concentração de TCP na amostra, há uma redução nos valores de densidade e perda de massa. Para a HAp, nas condições de sinterização em 1200°C/30 min e 1250°C/15min não há modificações na densidade e perda de massa das amostras, este comportamento se deve ao fato da HAp a temperatura de 1200°C já atingir a máxima retração.

Para realização dos testes de bioatividade foram selecionados tratamentos térmicos para que as amostras apresentassem densidades finais próximas de 95% da densidade teórica. Assim, para as composições que apresentam retrações menores durante os tratamentos térmicos, foram empregadas temperaturas de sinterização mais elevadas. Para a composição HAp, que densifica mais facilmente, foi utilizada temperatura de sinterização de 1100°C. As taxas de aquecimento e resfriamento foram mantidas as mesmas para as diferentes misturas e para as composições monofásicas.

As condições adotadas foram: 1100°C/1h, para HAp; 1200°C/30min, para as misturas 8H e 7H; e 1250°C/15min para o TCP e as misturas 6H e 5H; na Figura 5.3.4 e na TAB. 5.2.1 estas condições estão evidenciadas (linha cinza). Os valores de densidade, calculados pela regra das misturas, apresentam uma variação máxima de 3% nos valores de ρ_t (densidade teórica).

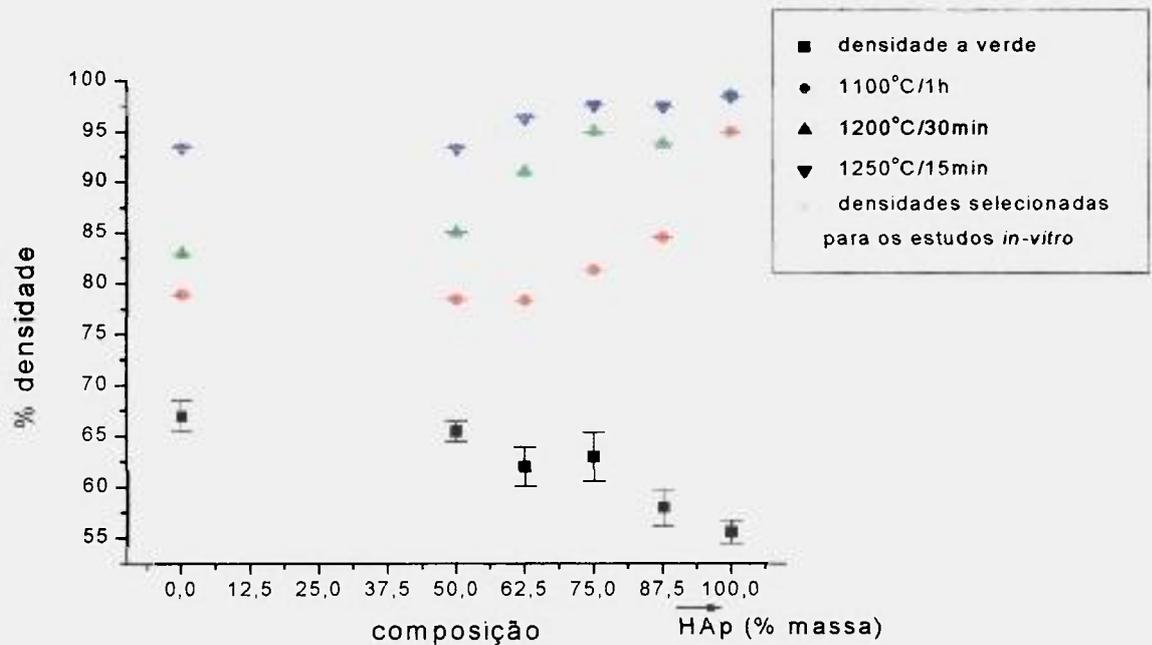


Figura 5.3.4 – Valores de densidade em diferentes condições de tratamento térmico para as diversas composições estudadas (HAp:TCP).

Amostras de diferentes composições obtidas por sinterização, nas temperaturas mencionadas acima, são apresentadas na Figura 5.3.5.

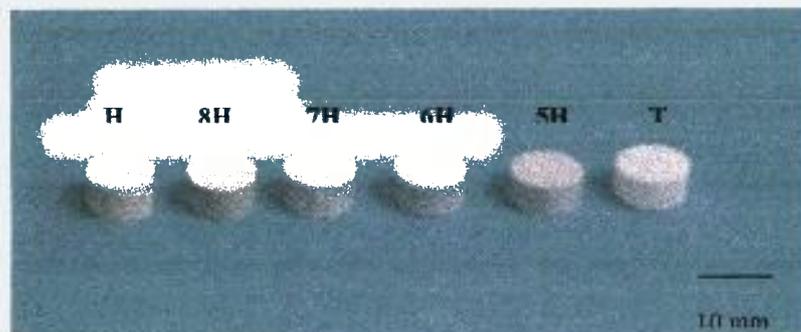


Figura 5.3.5 – Amostras obtidas após sinterização.

5.3 Caracterização dos corpos sinterizados

Foi realizada a investigação das fases formadas durante a sinterização para análise da estabilidade térmica dos materiais estudados, utilizando a técnica de difração de raios-X.

Nas Figuras 5.3.1- 5.3.3 estão apresentados os difratogramas para as amostras de HAp, β -TCP e da mistura 5H.

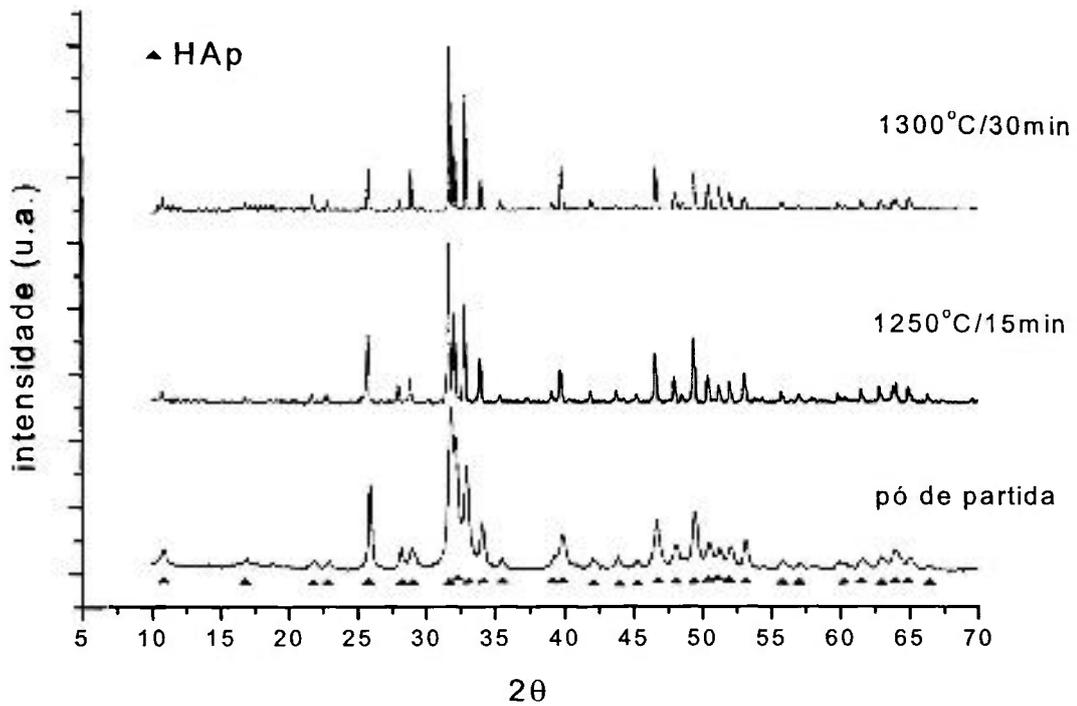


Figura 5.3.1 – Difratomogramas de raios X das amostras de HAp; sem tratamento térmico, após tratamentos térmicos: 1250°C/15 min e 1300°C/30 min.

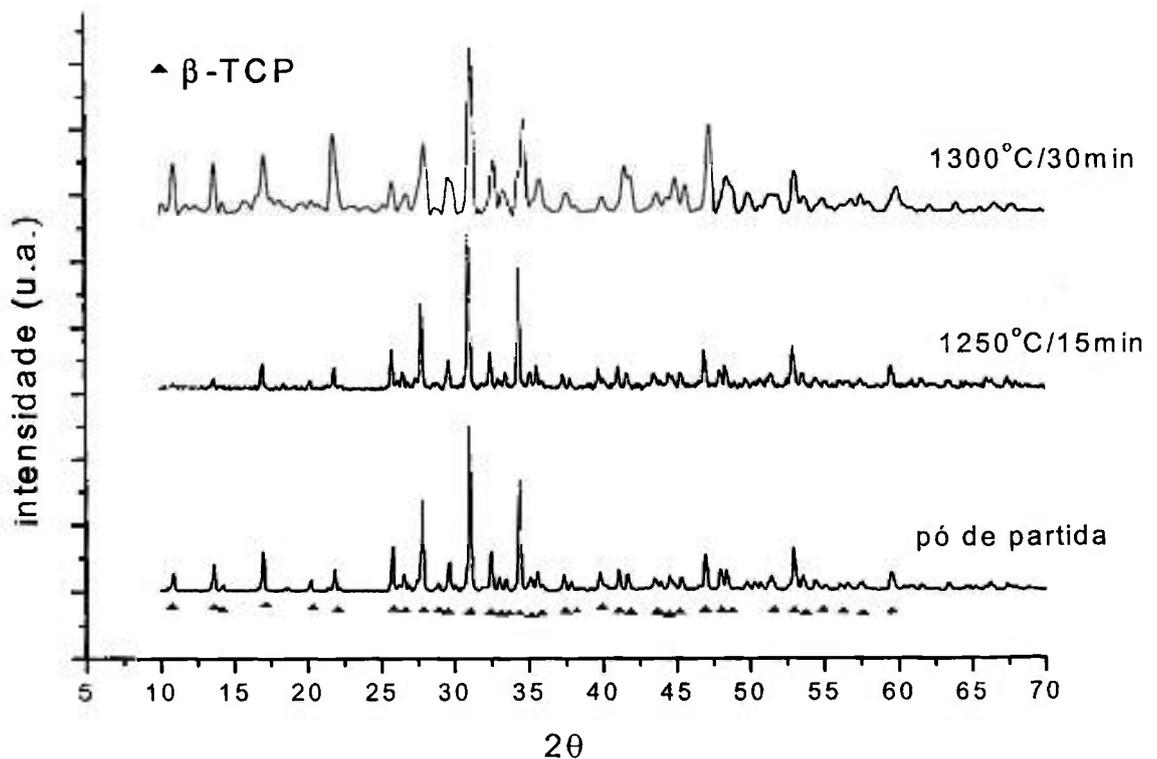


Figura 5.3.2 - Difratomogramas de raios X para as amostras de β-TCP; sem tratamento térmico, após tratamentos térmico: 1250°C/15 min e 1300°C/30 min.

Não foi detectada a fase α -TCP, nas amostras T, em alta temperatura e nem o β -TCP nas amostras de HAp após os tratamentos térmicos, confirmando a estabilidade térmica das matérias primas.

Para uma melhor avaliação do efeito da presença conjunta das duas fases (HAp e β -TCP), foram obtidos os difratogramas das amostras bifásicas, Figura 5.3.3. Neste caso, foi obtido também, o perfil de difração referente ao tratamento térmico a $1100^{\circ}\text{C}/1\text{h}$, já que as análises químicas dos pós indicaram a presença de uma hidroxiapatita rica em cálcio e um β -TCP de natureza deficiente em cálcio. Caso, fosse observada a presença de qualquer outra fase, este estudo em diferentes temperaturas poderia esclarecer a evolução das fases, assim como a formação de fases transientes ou metaestáveis, porém este comportamento não foi observado.

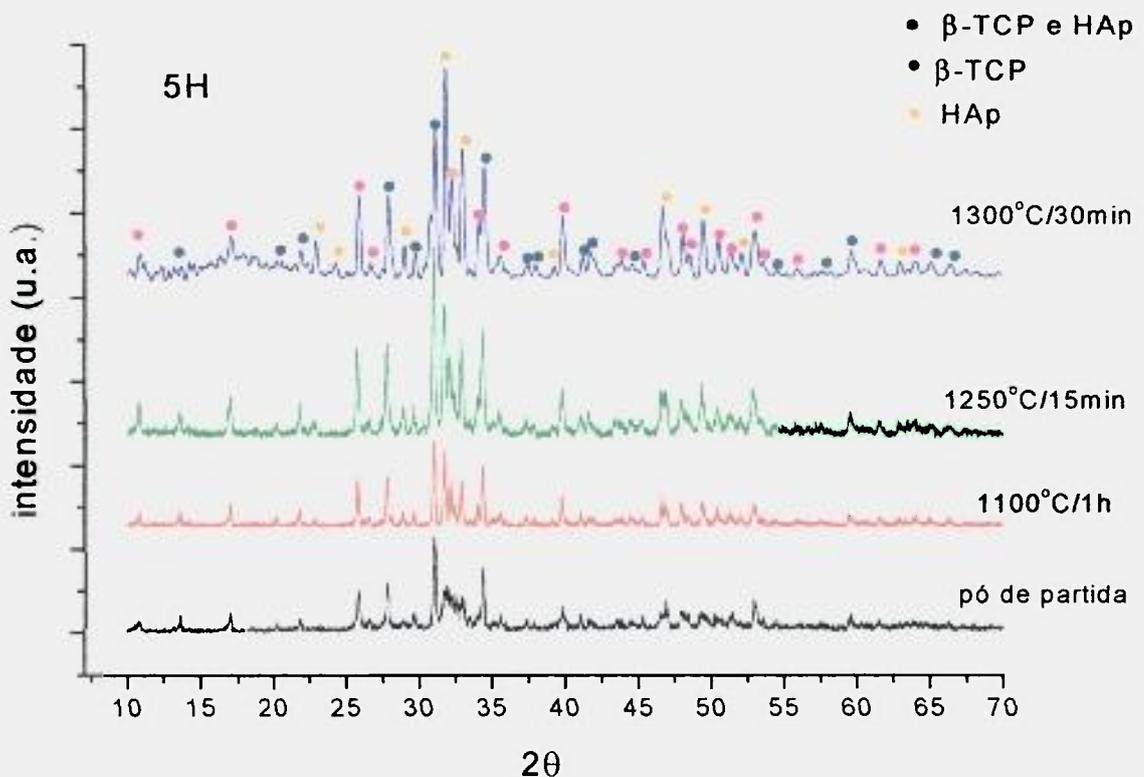


Figura 5.3.3 - Difratogramas de raios X para a mistura 5H sem tratamento térmico; após tratamentos térmicos: $1100^{\circ}\text{C}/1\text{h}$; $1250^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$ e $1300^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$.

A microestrutura dos corpos sinterizados foi observada por microscopia eletrônica de varredura. Algumas micrografias representativas são apresentadas na Figura 5.3.6.

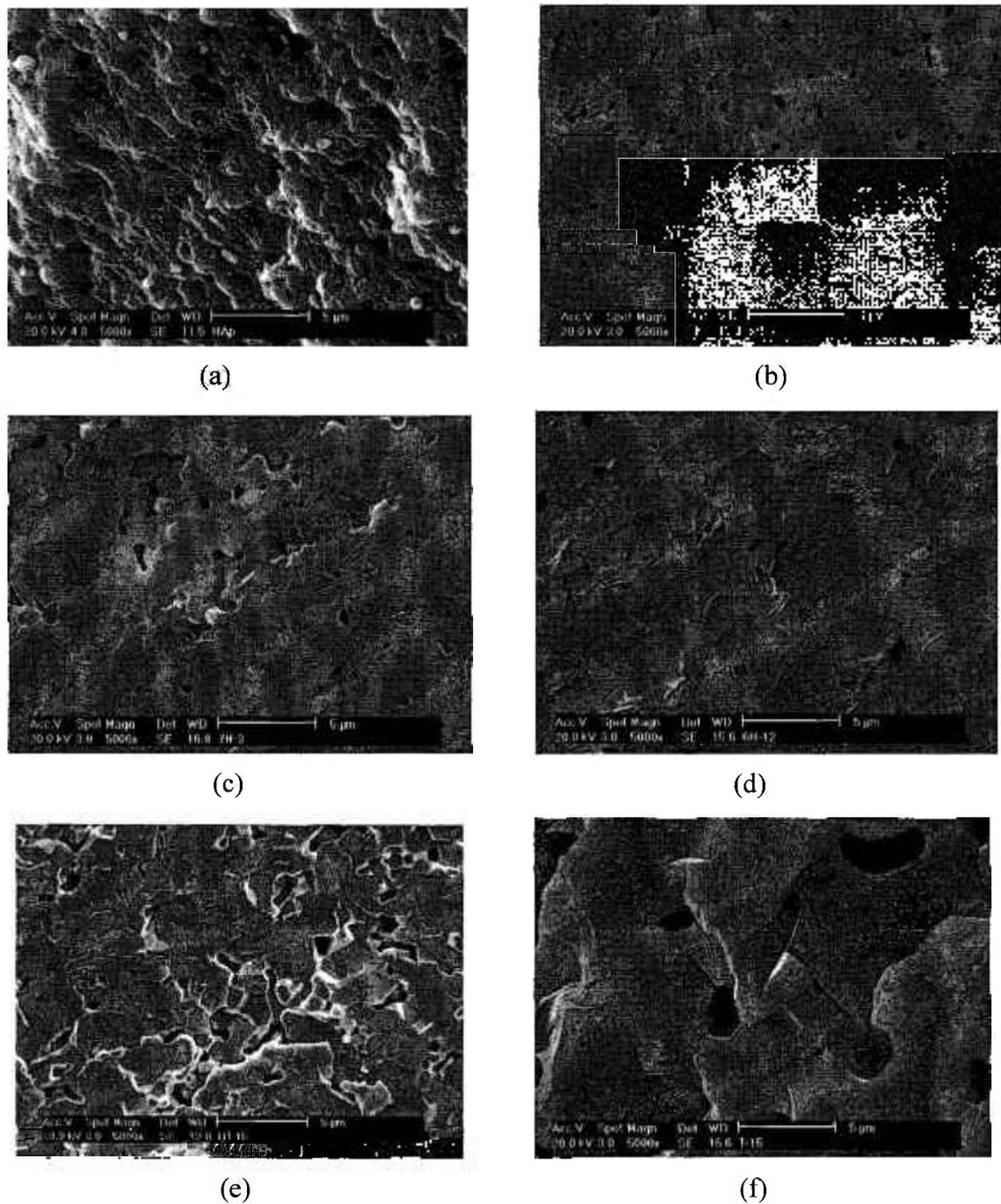


Figura 5.3.6 – Micrografias de superfície fraturada das amostras: (a) H - 1100°C/1h; (b) 8H - 1200°C/30min; (c) 7H - 1200°C/30min; (d) 6H - 1250°C/15min; (e) 5H - 1250°C/15min e (f) T - 1250°C/15min.

As amostras bifásicas apresentam microestruturas semelhantes nas temperaturas de sinterização adotadas (1200 e 1250°C), já as amostras de HAp e β -TCP apresentam microestruturas diferenciadas; amostra de β -TCP apresenta um tamanho de grão maior e também poros de dimensões maiores, mas em menores quantidades. À medida que diminui a quantidade de β -TCP das amostras são observados grãos e poros de dimensões menores

em quantidade maior. Estas características da microestrutura não implicam em valores de porosidades muito diferentes, havendo entre as diferentes amostras uma compensação na distribuição de poros, ou seja, entre quantidade e dimensão dos poros, resultando em densidades próximas de 95% pt para todas as amostras. Manter microestruturas semelhantes é um parâmetro importante para a avaliação da reatividade destes materiais, em função das diferentes proporções entre as fases de HAp e TCP. Muitas variáveis, neste caso, implicariam em dificuldades na avaliação do caráter bioativo para cada composição²⁰.

As cerâmicas apresentam porosidade fechada, característica comum em materiais que atingiram o último estágio de sinterização^{86, 89}. A presença da quantidade de poros observada nas micrografias está de acordo com os resultados calculados de densidade. Todas as amostras apresentaram 5% de porosidade, podendo ser caracterizadas como cerâmicas de alta densidade, ou microporosas, e utilizadas em aplicações médicas de acordo com a literatura⁹. As amostras bifásicas e de HAp apresentaram maior parte dos poros com diâmetro da ordem de 1µm (microporos), já as amostras de β-TCP apresentaram dimensão maior de poros ~ 2,5µm. Sob o ponto de vista biológico, a porosidade presente nas amostras pode desempenhar função importante na vascularização e manutenção do tecido pelo fornecimento de nutrientes que podem migrar mais facilmente através dos poros^{9, 32}. A porosidade presente, nas amostras contendo a fase reabsorvível, pode desempenhar esta função, mesmo na presença de poros fechados, devido à solubilização da fase TCP.

5.4 Experimentos *in vitro*

O conhecimento de características de dissolução e reatividade de cerâmicas bifásicas a partir de experimentos *in vitro* contribuem para a avaliação do comportamento *in vivo*, como a formação óssea após colocação de implantes.

A reatividade e dissolução dos corpos cerâmicos na presença de SBF, foi estudada por leituras de pH, análise quantitativa de Ca das soluções salinas de SBF, e medidas de massa das amostras, em função do tempo; as superfícies das amostras foram analisadas por MEV e FTIR em diferentes períodos.

A temperatura, fixada em 36,5°C (± 0,5 °C) e o pH inicial de 7,25 do SBF, foram monitorados durante este estudo. Condições não bem controladas destes parâmetros podem implicar em resultados não reprodutíveis. Os valores de pH, por exemplo, se abruptamente

reduzidos a níveis muito baixos, podem favorecer a dissolução da HAp a partir da protonação dos grupos carbonato e fosfatos, dando origem aos seus respectivos ácidos, situação que não deve ocorrer nos ensaios de reatividade com SBF⁹⁷.

Os resultados de variação de pH e de massa em períodos de até 72 horas de contato das amostras com a solução SBF, prazo estabelecido para renovação das soluções, são apresentados na Figura 5.4.1 e 5.4.2, respectivamente.

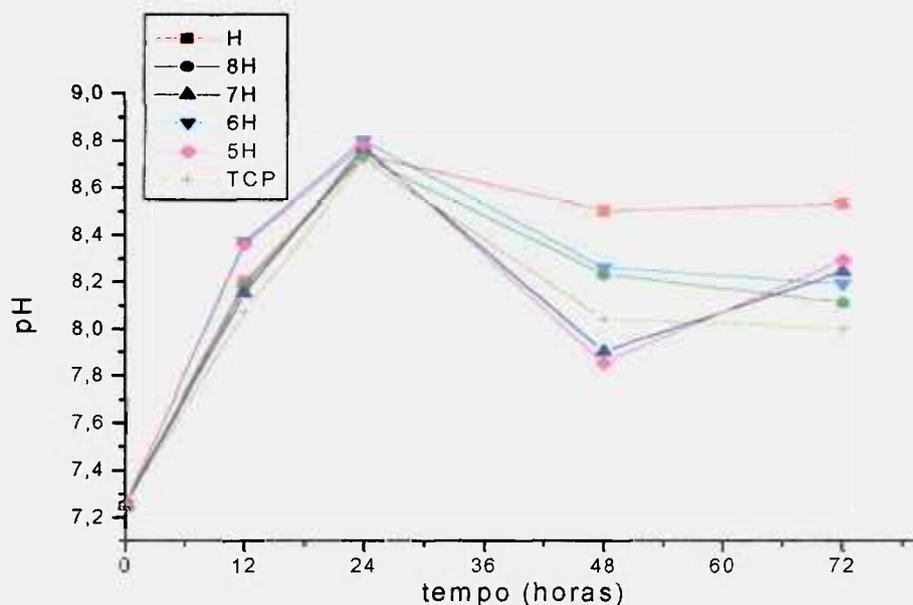


Figura 5.4.1 – Variação de pH do SBF a 36,5°C com diferentes amostras imersas, em função do tempo (até 72 horas).

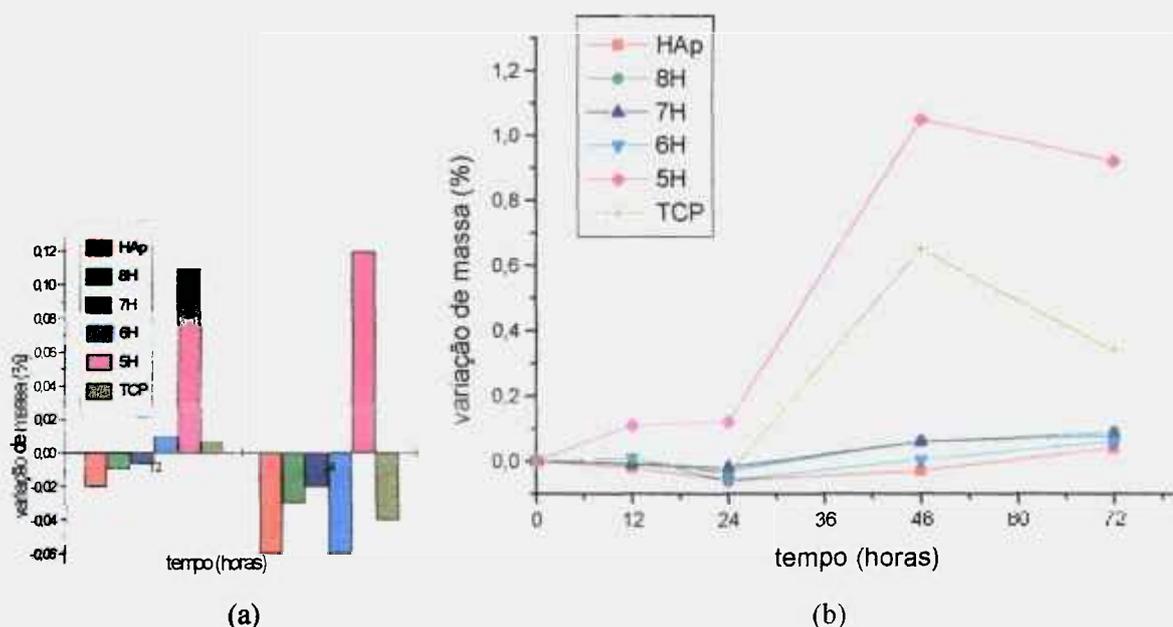


Figura 5.4.2 - Variação de massa para as diferentes cerâmicas, em função do tempo; (a) primeiras 24 horas e (b) período de até 72 horas

No período de até 48 horas, Figura 5.4.1, todas as amostras apresentaram comportamento semelhante, ou seja, aumento na saturação das soluções salinas de SBF até 24 horas de imersão, e após este período, redução do pH nas soluções.

As composições bifásicas: 5H e 7H apresentaram reatividades diferentes das demais amostras no período de 48-72 horas, sendo observado um aumento de pH, enquanto as demais apresentam neste mesmo intervalo de tempo, uma tendência a se estabilizarem. Este comportamento indica maior sensibilidade destas cerâmicas nos valores de pH neste período de tempo, podendo exercer um efeito maior de difusão de espécies alcalinas para a solução.

Na Figura 5.4.2-(a) e (b), são observadas oscilações nos valores de variação de massa para as diferentes cerâmicas. Este comportamento pode ser explicado pela atuação do processo de dissolução sobre a formação de material mínimo precipitado e ainda não estável nestas condições, sendo ainda sensíveis aos efeitos da dissolução, sobretudo, variações de pH na interface sólido/líquido⁸². Após 24 horas todas as amostras apresentam ganho de massa.

O aumento de pH em tempos de 12 horas vem acompanhado de ganho de massa para as composições que contêm maiores quantidades de fase TCP (mais solúvel). Num período de até 72 horas a cerâmica bifásica 5H e a cerâmica monofásica TCP apresentam maior ganho de massa. Este comportamento é decorrente da saturação mais rápida das soluções e conseqüente precipitação.

Nas Figuras 5.4.3 e 5.4.4 são apresentados os valores de pH das soluções e variação de massa, em períodos mais longos, de até 3 semanas, medidos a cada 72 horas, no momento que antecede a renovação das soluções.

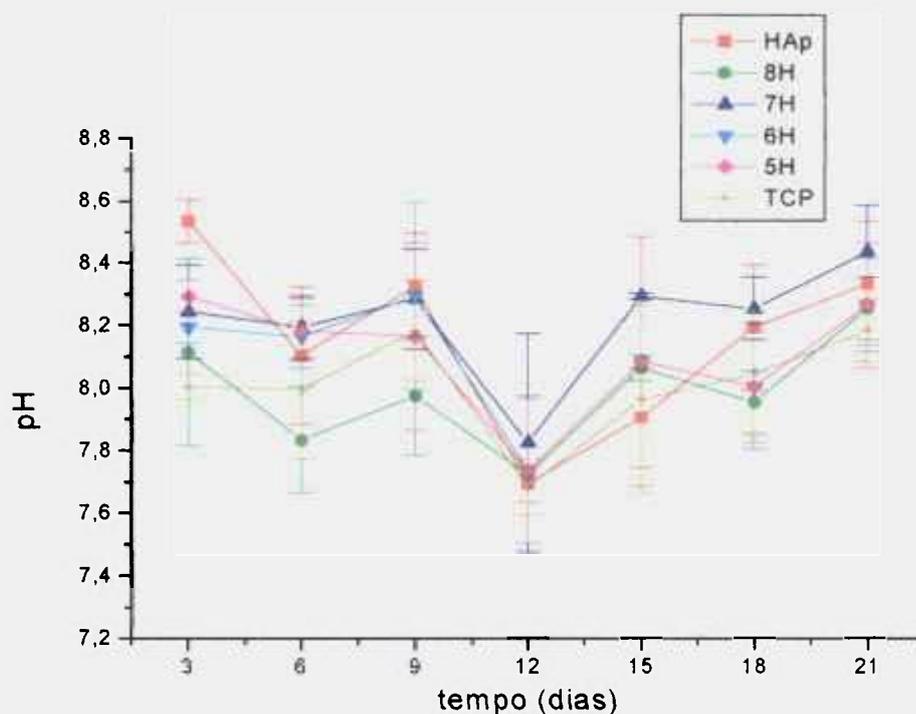


Figura 5.4.3 – Medidas de pH das soluções de SBF com diferentes cerâmicas imersas a 36,5°C, em função do tempo.

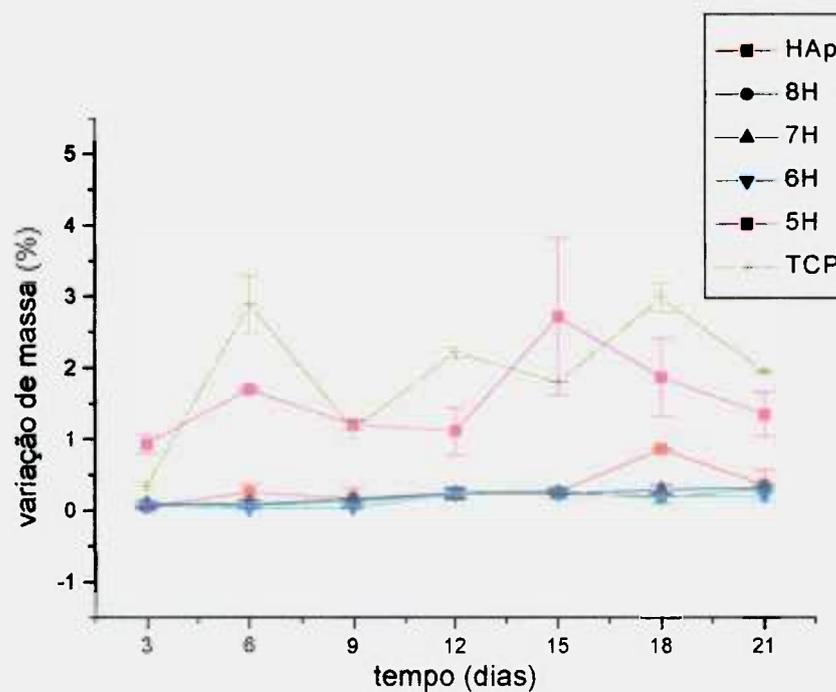


Figura 5.4.4 – Medidas de variação de massa em função do tempo para as diferentes cerâmicas.

Foram observados valores dispersos nas medidas de pH das soluções e de variação de massa das amostras, em função do tempo. As oscilações dos valores de pH podem ser justificadas pelos seguintes fenômenos: variações das concentrações de íons na solução,

decorrente dos processos de dissolução/precipitação característicos de cada cerâmica; formação de fases intermediárias na solução e reposição de íons presentes no SBF devido a sua renovação a cada 3 dias.

No período de 21 dias a variação de massa manteve comportamento semelhante ao período inicial de 72 horas, ou seja, as composições 5H e TCP mantiveram ganho maior de massa, enquanto as demais apresentaram ganho de massa pouco significativo, com comportamento quase linear. As cerâmicas reabsorvíveis com maiores quantidades da fase TCP apresentam maior desvio nas medidas (Figura 5.4.4). Este comportamento pode estar relacionado à cinética de dissolução mais favorável para estas cerâmicas e instabilidade de compostos intermediários, dificultando a obtenção de valores de medida constantes ou próximos.

A velocidade de formação da camada é influenciada significativamente pela supersaturação inicial, estágio no qual a difusão é predominante. Em tempos mais longos, o efeito de supersaturação exerce pouca influência, provavelmente devido a presença da camada sobre a superfície, que inibe a difusão ⁸².

As variações de pH, nesta condição, podem implicar em sensibilidades diferentes para cada composição, devido às etapas que descrevem o processo para formação da camada de fosfato de cálcio, como: formação de fases intermediárias na solução e fenômenos de adsorção/dessorção, mudança de fase e cristalização no sólido ^{9, 20, 82}. Durante todo o experimento foi observada uma distinção no comportamento entre as cerâmicas, que pode ser atribuída a reatividades diferentes de cada amostra.

Outro fator que pode afetar na dissolução é o comportamento da cerâmica quando a solução atinge um valor de pH muito próximo de seu ponto isoelétrico (pH_{pcz}), dificultando assim, a atuação de fenômenos na interface. No valor de pH_{pcz} as reações de protonação e desprotonação na superfície da apatita são mínimas, assim a velocidade de dissolução é reduzida. Nesta condição, duas espécies diferentes são possíveis de existirem na superfície da apatita: Ca-OH^{+2} e P-O^- e mostram um pH_{pcz} de 8,15 ou 7,13. Dados da literatura afirmam que sítios protonados de fosfatos estão presente em intervalo de 5 a 7 de pH para formar P-OH, enquanto sítios desprotonados de cálcio se encontram em intervalos de 8 a 10 de pH para formar Ca-OH. Nenhuma outra espécie na superfície da apatita é prevista ⁹⁸.

As diferenças na supersaturação das soluções SBF podem acarretar em espessuras e cristalinidades diferentes da camada precipitada.

O cálcio é um dos principais elementos presentes no SBF e em materiais bioativos, cuja participação é bastante efetiva no processo de dissolução/precipitação. A liberação deste íon representa um dos principais fatores responsáveis pela formação da camada biologicamente ativa e estímulo para o crescimento ósseo^{41, 99}. A concentração de cálcio no SBF, determinada por ativação neutrônica é apresentada na Figura 5.4.5.

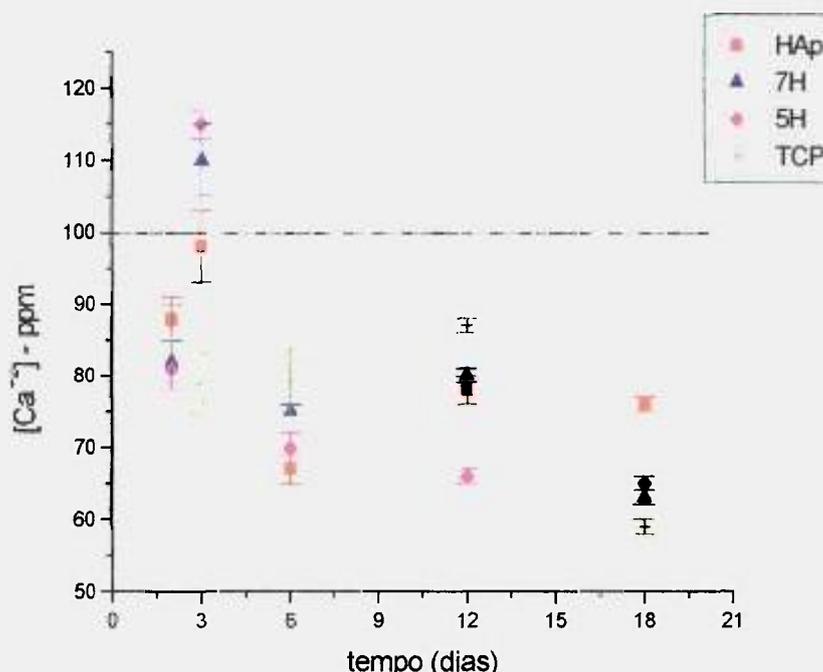


Figura 5.4.5 – Gráfico representativo da concentração de cálcio em diferentes períodos de tempo, no decorrer do ensaio de reatividade.

As soluções salinas de SBF apresentam concentração inicial de Ca^{+2} igual a 2,5 mmol/L, quantidade equivalente a 100 ppm (zona pontilhada no gráfico, Figura 5.4.5). Nos primeiros 2 dias é observada uma redução na concentração de cálcio nas soluções (SBF) para as composições estudadas. Este mesmo comportamento é observado em todos os períodos analisados, exceto com 3 dias de imersão em SBF para as composições bifásicas: 5H e 7H, que apresentaram maiores concentrações de cálcio na solução, indicando, possivelmente, a atuação de um processo mais intenso de dissolução das cerâmicas. A queda na saturação para íons Ca^{+2} nas soluções é indicativo de um processo de precipitação sugerido pelas Figuras 5.4.2 e 5.4.4, pelo ganho de massa das amostras e na Figura 5.4.3, pelas quedas de pH em períodos de 6, 12 e 18 dias para a maioria das amostras.

A relação entre concentração de cálcio com as medidas de pH pode ter sido comprometida pela formação de fases secundárias na solução e pelo comportamento instável das soluções mesmo mantidas em geladeira, fenômeno constatado pelo

monitoramento do pH, Figura 5.4.6 – (a) em alíquotas das soluções que foram analisadas pela técnica de AAN.

Diferentemente das condições anteriores de leitura, Figura 5.4.3, na presença da amostra, nesta outra situação, as leituras foram efetuadas após períodos de armazenamento em geladeira e na ausência da amostra, respeitando o prazo de vida útil das soluções, ou seja, 30 dias.

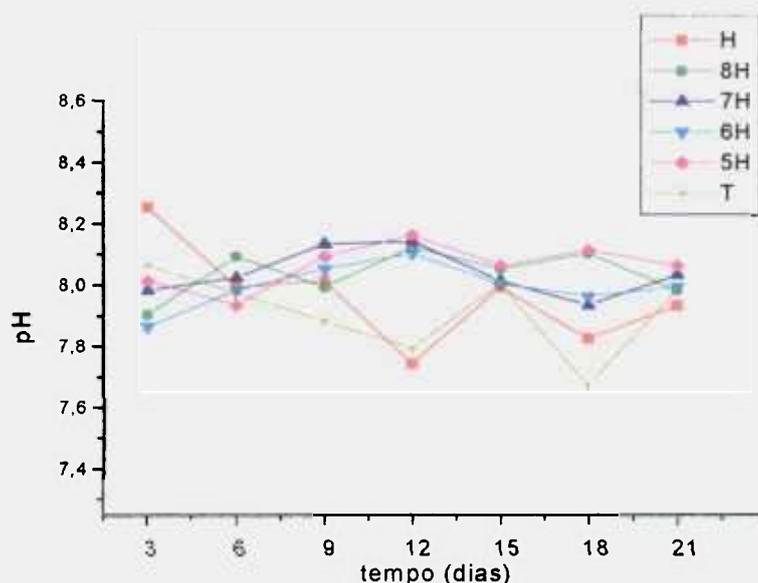


Figura 5.4.6 – Medidas de pH a 36,5°C das soluções mantidas em geladeira após análise de cálcio por AAN

Uma das maiores dificuldades no estudo de dissolução, diz respeito ao comportamento instável das soluções, que oscilam entre estados de insaturação/supersaturação^{81, 82, 100}. As leituras de pH das soluções, após períodos de armazenamento em geladeira, comprovaram a instabilidade dessas soluções, mesmo na ausência de amostras. As medidas foram feitas após os ensaios de dissolução, dentro do período de vida útil das soluções. Nesta situação, Figura 5.4.6, foi possível identificar o comportamento previsto pela literatura, ou seja, as soluções que antes continham as cerâmicas bifásicas apresentam comportamento semelhante e maior tendência a alcalinidade das soluções, enquanto as soluções que mantiveram contato com as cerâmicas de HAP e TCP apresentam variação em pHs mais baixos.

Variações mínimas de pH podem atuar de maneira significativa nos mecanismos envolvidos no processo de dissolução/precipitação, considerando que as reações envolvidas durante a formação e/ou transformação de fases em condições próximas às biológicas processam-se em pHs diferentes. A fase metaestável ACP (fosfato de cálcio amorfo) é convertida para OCP (precursor da HAP), com redução do pH da solução, da

mesma forma que a hidrólise do OCP para a formação da hidroxiapatita, na reação 5.4.1, é acompanhada pela diminuição do pH ¹⁰¹.



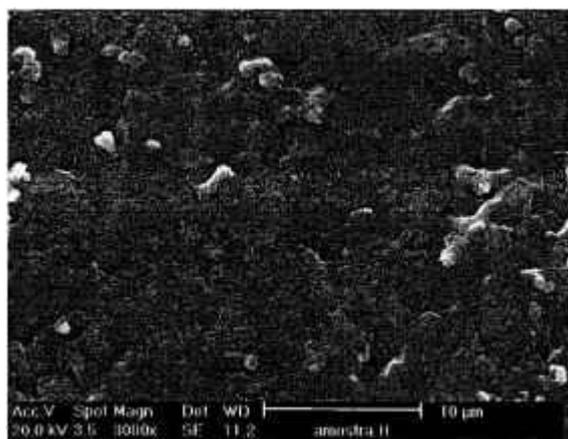
O aumento do pH observado nos ensaios pode ter favorecido a incorporação de íons Mg^{+2} em precipitados do fosfatos de cálcio amorfos, conforme estudos da literatura ^{20, 51}.

A heterogeneidade química, também presente na HAp óssea, pode ter grande influência sobre a taxa de dissolução; normalmente é observada uma relação de proporcionalidade entre a heterogeneidade química e a dissolução, assim as substituições de íons na estrutura podem levar ao aumento da taxa de dissolução. A presença de íons afins com o sólido, presentes na solução podem influenciar nos mecanismos envolvidos no processo de dissolução/precipitação e cristalização. Assim como a HAp apresenta alta afinidade com os íons CO_3^{-2} , presentes na solução e com isto há formação da HCA, ou hidroxiapatita biológica, o TCP apresenta alta afinidade com o Mg^{+2} , formando o TCP biológico, conhecido como TCMP ²⁰.

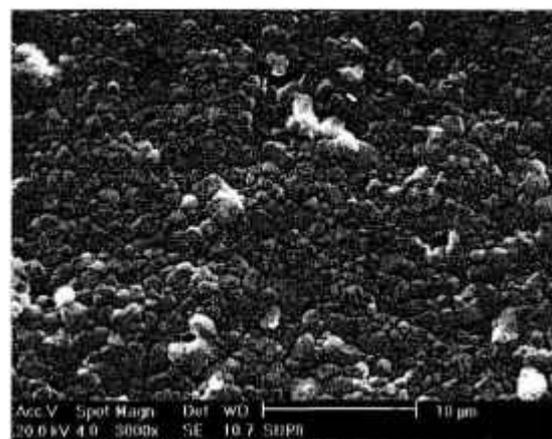
Quando ocorre a entrada de Mg^{+2} na rede cristalina do TCP, é observado um aumento na solubilidade e inibição da cristalização, deste modo, a taxa de dissolução é maior que a de cristalização ^{20, 51}.

Alguns íons podem levar a efeitos antagônicos ou sinérgicos sobre a cristalinidade, como é o caso do F^- com o CO_3^{-2} e CO_3^{-2} com o Mg^{+2} , respectivamente ²⁰.

Para análise da formação da camada de hidroxicarbonato-apatita na superfície das amostras, foram observadas as superfícies das cerâmicas, antes da imersão em SBF, por microscopia eletrônica de varredura, Figura 5.4.7.



(a)



(b)

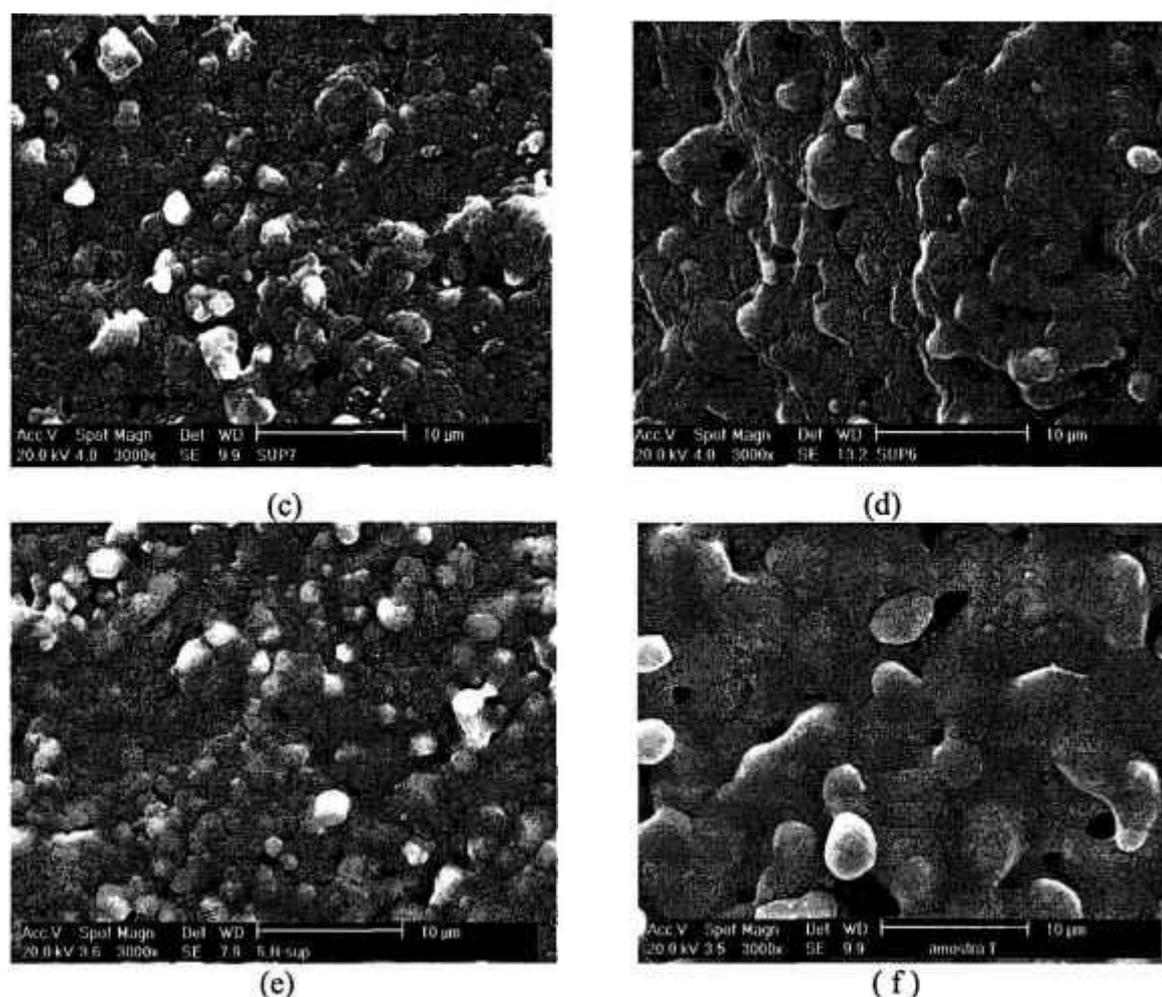


Figura 5.4.7 – Micrografias eletrônicas de varredura representativas das superfícies das cerâmicas antes da imersão em SBF; (a) H, (b) 8H, (c) 7H, (d) 6H, (e) 5H e (f) T.

Algumas características da superfície podem esclarecer a dissolução diferenciada em algumas amostras. A presença de defeitos é um dos parâmetros que pode atuar na taxa de dissolução. Os defeitos podem ser definidos em termos de: heterogeneidade química, que aumenta a taxa de dissolução pela introdução de outros elementos (impurezas); neste caso, é considerada a natureza da amostra; ou rugosidades na superfície, servindo como núcleos para dissolução^{20, 82}.

Outro fator influente na dissolução é a microestrutura, ou seja, tamanho de grão e distribuição de poros, sabe-se que uma porosidade elevada e grãos de pequenas dimensões aumentam a taxa de dissolução^{20, 86}. Poros nanométricos, também podem atuar como sítios iniciantes para nucleação e crescimento de cristais de apatita²⁰.

Nos estudos de reatividade, modificações na superfície do sólido, após imersão em SBF, podem ser resultantes da atuação do processo de dissolução que vem acompanhado de difusão e reações na interface ^{82, 102}.

Quando um sólido de natureza bifásica e, portanto com diferentes potenciais químicos é mantido em condições de não equilíbrio, por exemplo, em solução de SBF, vários fatores podem colaborar para uma rápida dissolução/precipitação e uma posterior cristalização da camada precipitada ⁵¹.

Para verificar a formação da camada decorrente dos processos de dissolução e precipitação, as superfícies das cerâmicas foram caracterizadas por MEV, após imersão em SBF. Micrografias representativas das superfícies das amostras após diferentes períodos de imersão em SBF são apresentadas nas Figuras 5.4.8 – 5.4.13.

A presença das fases, HAp e TCP, em um único material, por exemplo, confere comportamentos diferenciados em relação às fases isoladas, conforme observado nas micrografias das Figuras 5.4.8-5.4.13, sendo mais evidentes no período inicial onde as características da superfície e o efeito da supersaturação são predominantes na formação da camada de fosfato de cálcio ⁸². Apesar da natureza química muito similar entre estas duas fases, cada uma possui estrutura cristalina diferente, a HAp possui estrutura hexagonal, enquanto o β -TCP possui estrutura romboédrica. Isto confere ao TCP uma energia superficial muito mais alta e uma atividade iônica mais intensa que para a HAp, já que na estrutura hexagonal o arranjo cristalino é mais compacto e mais estável termodinamicamente ⁵¹. Estas diferenças podem resultar em um comportamento específico para cada composição num processo de dissolução e cristalização, gerando uma particular dissolução, nucleação e crescimento para cada material.

O β -TCP apresenta produto de solubilidade, $K_{ps} = 2,83 \cdot 10^{-30}$, enquanto a HAp apresenta $K_{ps} = 3,37 \cdot 10^{-58}$, dessa maneira, os íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} do TCP, em condições de não equilíbrio, tendem a migrar mais facilmente para interface sólido/líquido reduzindo sua energia livre ^{51, 102}. A migração destes íons gera vazios na estrutura, que podem facilitar a penetração da fase líquida (solução simulada ou líquidos fisiológicos) e, no caso da solução SBF, promover a nucleação. A taxa de nucleação neste caso, é controlada pela difusão de íons ⁸².

HAp

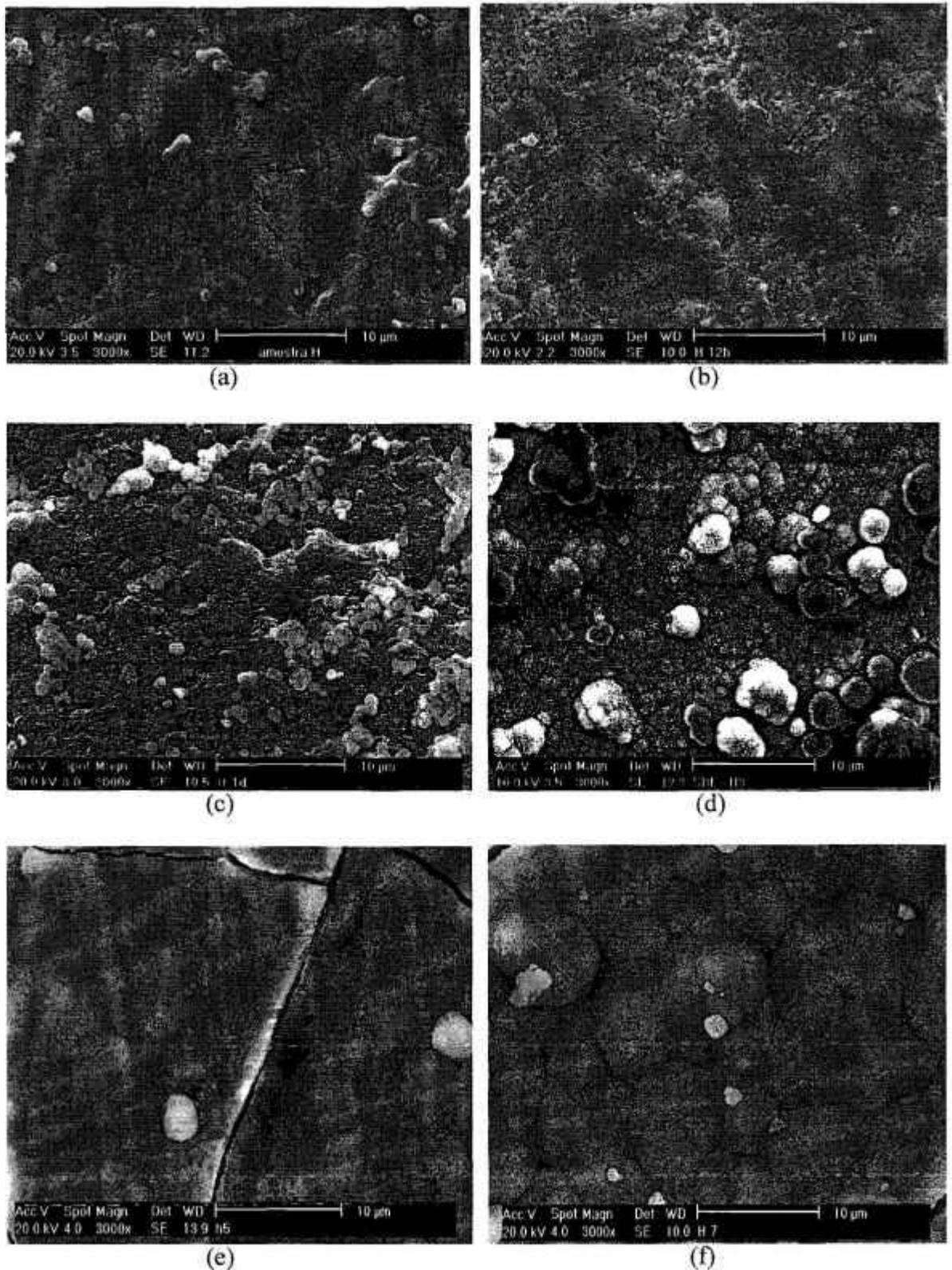


Figura 5.4.8 – Micrografias eletrônicas de varredura representativas das superfícies das amostras de HAp em diferentes períodos de imersão em SBF: (a) antes da imersão; (b): 12 horas; (c): 1 dia; (d): 3 dias; (e): 15 dias; (f): 21 dias.

8H

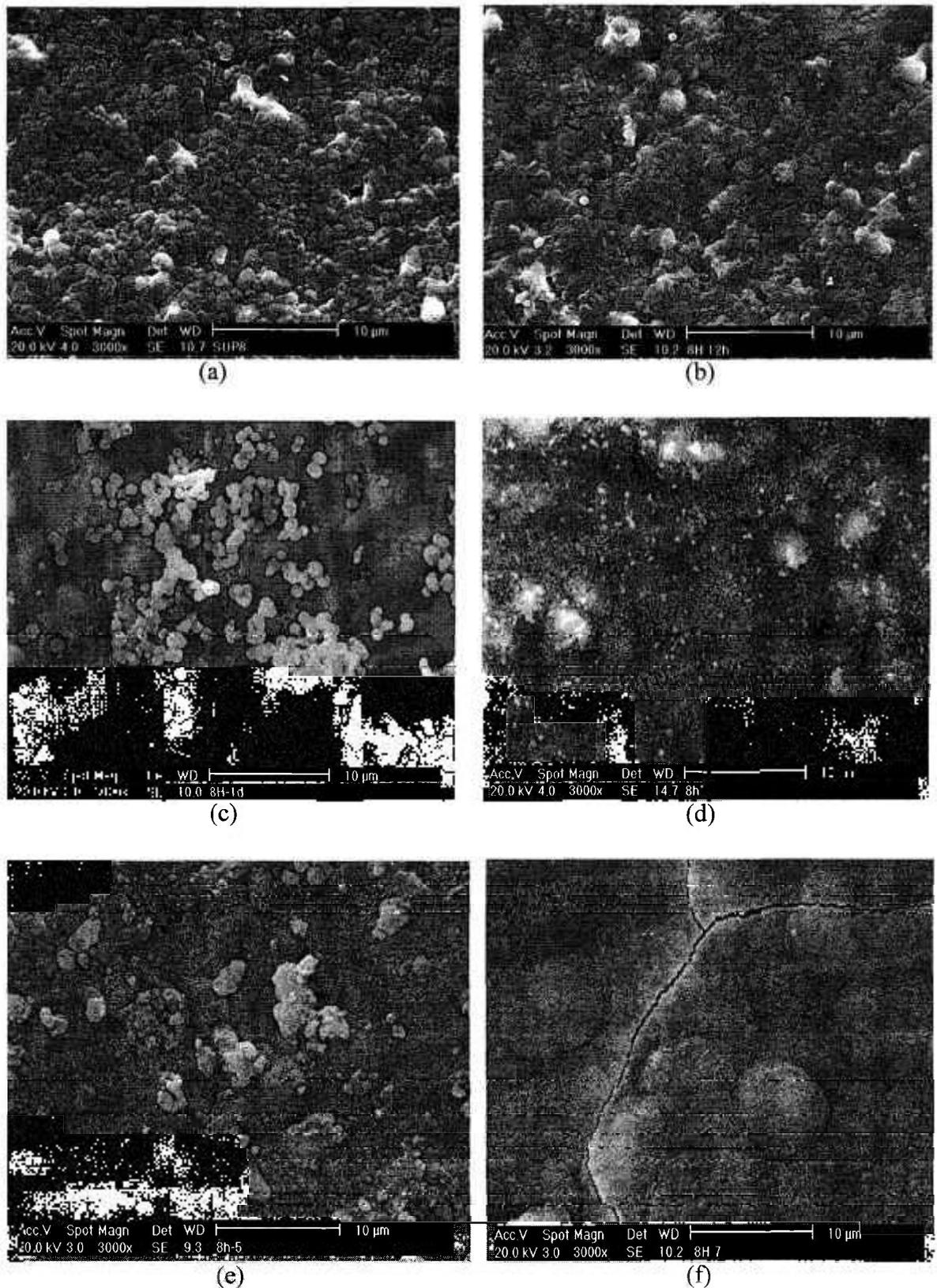


Figura 5.4.9 – Micrografias eletrônicas de varredura representativas das superfícies das amostras 8H em diferentes períodos de imersão em SBF: (a) antes da imersão; (b): 12 horas; (c): 1 dia; (d): 3 dias; (e): 15 dias; (f): 21 dias.

7H

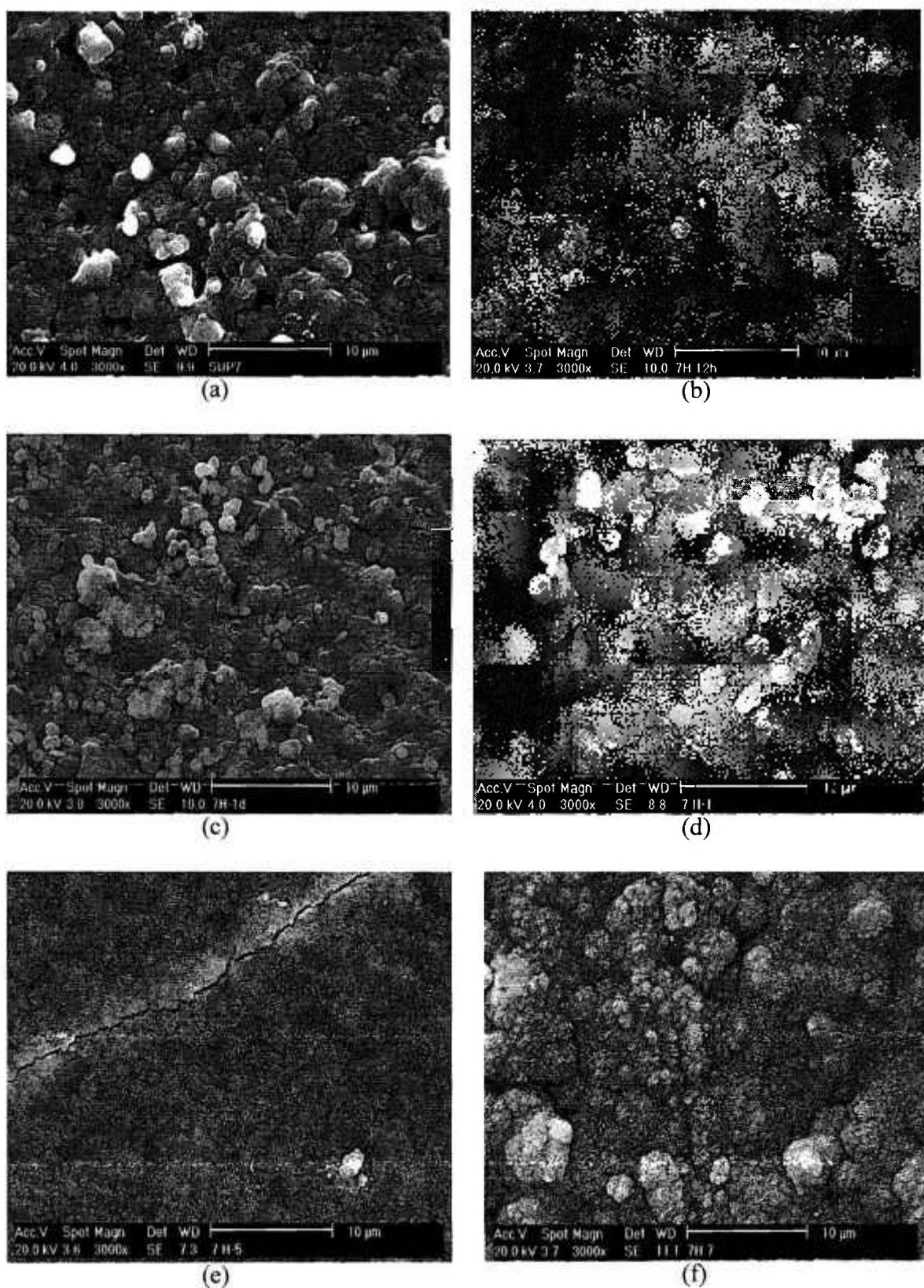


Figura 5.4.10 – Micrografias eletrônicas de varredura representativas das superfícies das amostras 7H em diferentes períodos de imersão em SBF: (a) antes da imersão; (b): 12 horas; (c): 1 dia; (d): 3 dias; (e): 15 dias; (f): 21 dias.

6H

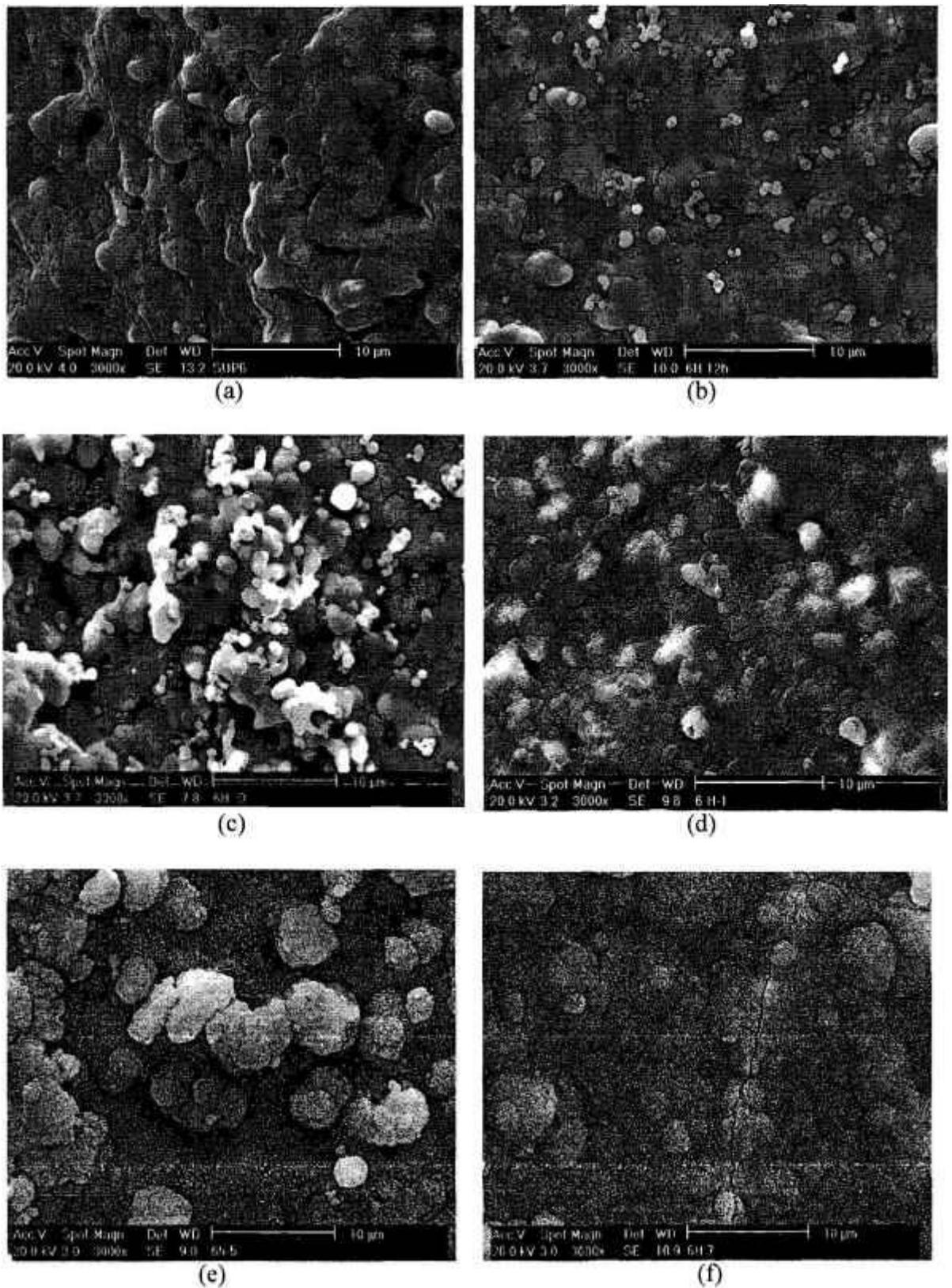


Figura 5.4.11 – Micrografias eletrônicas de varredura representativas das superfícies das amostras 6H em diferentes períodos de imersão em SBF: (a) antes da imersão; (b): 12 horas; (c): 1 dia; (d): 3 dias; (e): 15 dias; (f): 21 dias.

5H

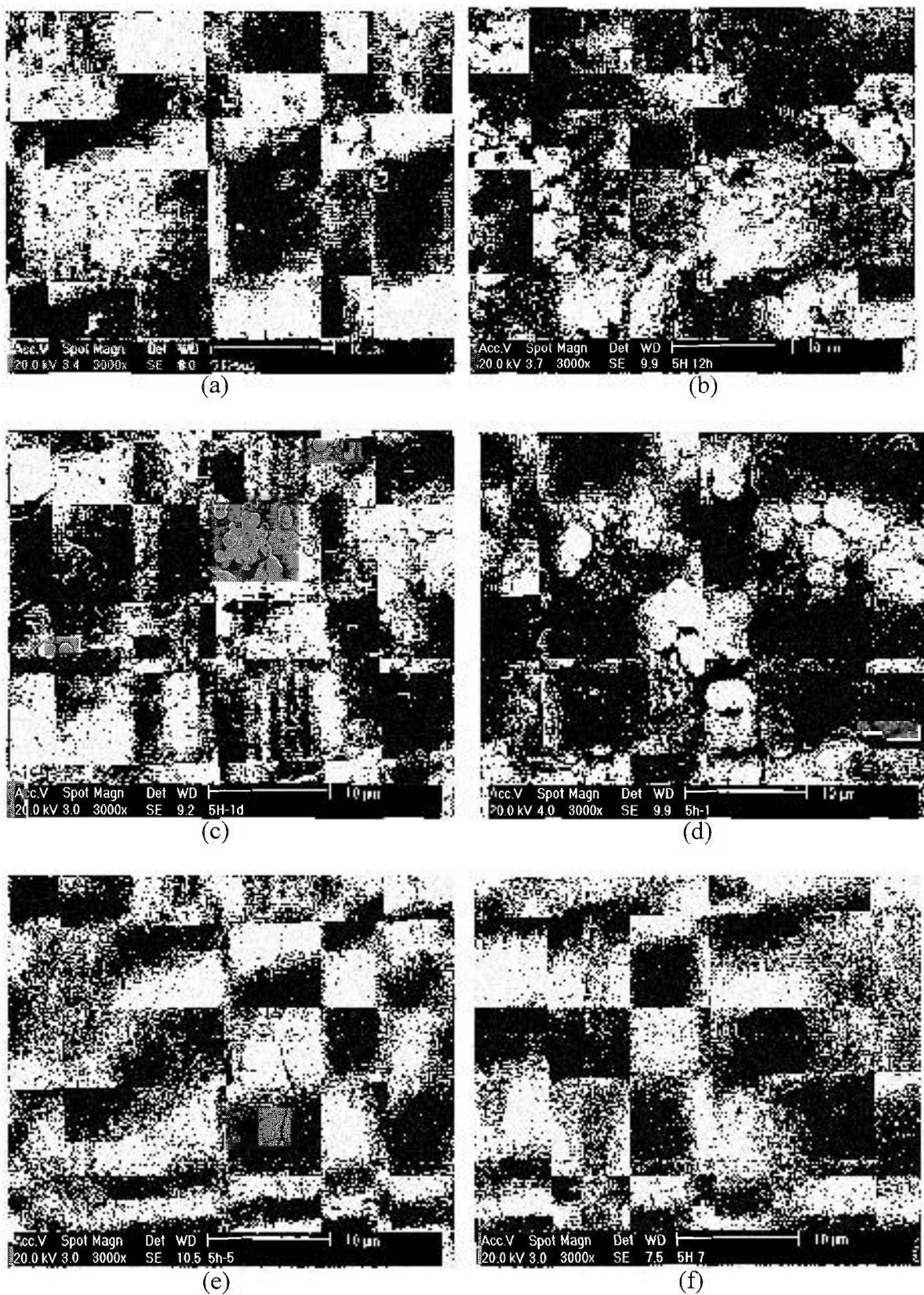


Figura 5.4.12 – Micrografias eletrônicas de varredura representativas das superfícies das amostras 5H em diferentes períodos de imersão em SBF: (a) antes da imersão; (b): 12 horas; (c): 1 dia; (d): 3 dias; (e): 15 dias; (f): 21 dias.

TCP

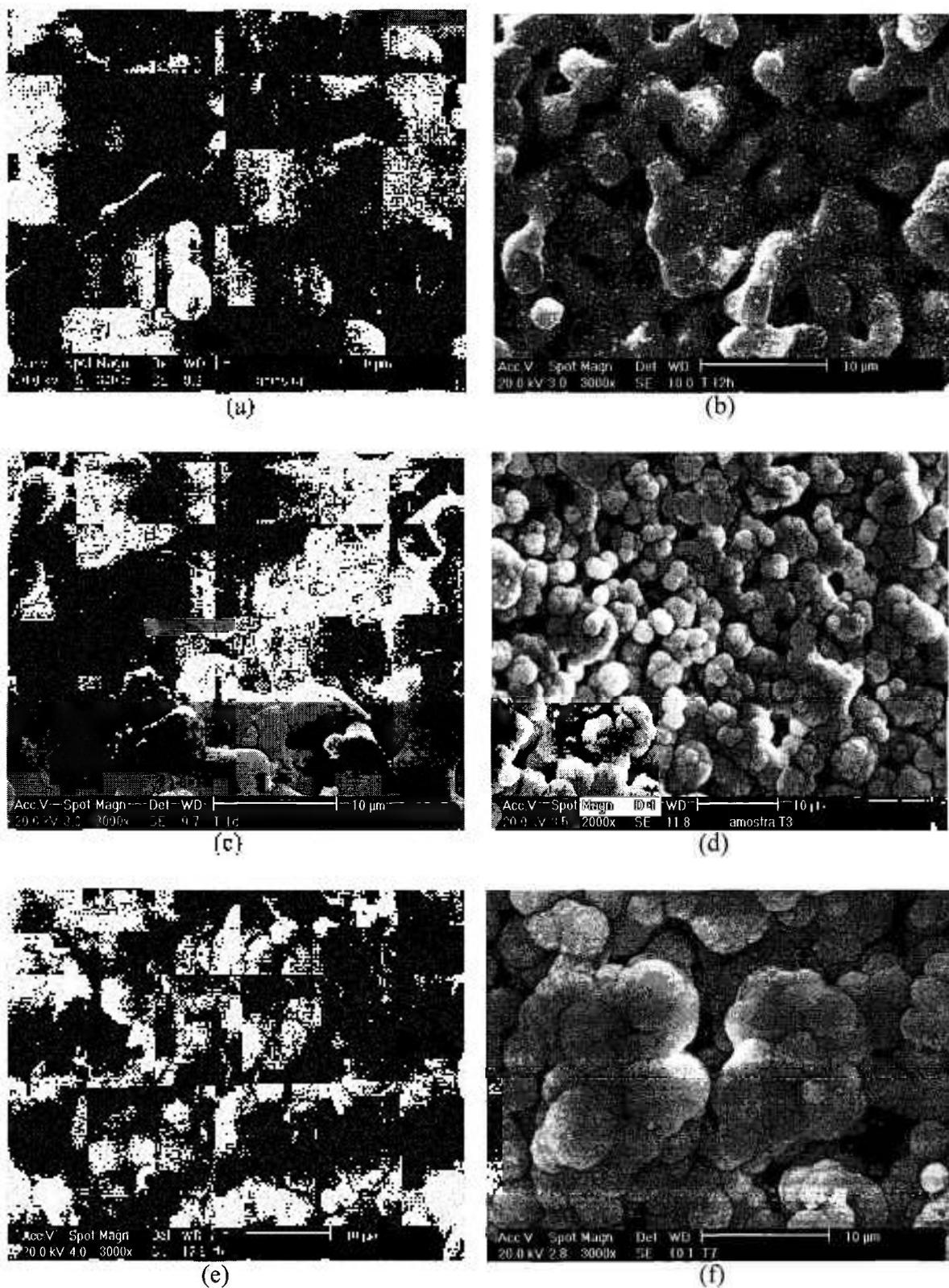


Figura 5.4.13 – Micrografias eletrônicas de varredura representativas das superfícies das amostras de β -TCP em diferentes períodos de imersão, em SBF: (a) antes da imersão; (b): 12 horas; (c): 1 dia; (d): 3 dias; (e): 15 dias; (f): 21 dias.

No período inicial do ensaio *in vitro* é observada uma menor definição dos contornos de grãos, regiões de alta energia e mais susceptíveis à dissolução.

As amostras que possuem HAp como fase majoritária não apresentaram grandes variações de massa, apesar das variações de pH das soluções, dificultando a formação de precipitados na superfície no estágio inicial; Figuras 5.4.8-5.4.10 (b). Este comportamento pode ser descrito pela regra de dissolução que afirma: ao se aumentar a razão de β -TCP/HAp maior será a taxa de dissolução. Isto se deve a propriedade de degradabilidade da fase, β -TCP^{9, 20, 51}.

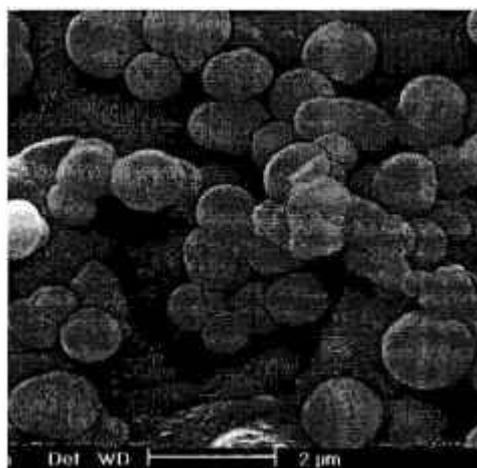
As cerâmicas, com precipitação em 12 horas, são as mesmas que apresentaram ganho de massa (TCP, 5H e 6H), Figura 5.4.2. A superfície da amostra de TCP apresenta grande quantidade de núcleos, porém de menor tamanho. Este comportamento pode estar associado ao estado de saturação do sistema (definido como a razão do produto de atividade iônica e o produto de solubilidade no equilíbrio) que exerce grande influência no processo de nucleação e crescimento¹⁰².

Em processos de precipitação ou cristalização de uma fase sólida a partir de uma solução, existe uma competição entre os fenômenos de nucleação e crescimento de cristais. A concorrência entre estes dois fenômenos, em diferentes estados de saturação determina o tamanho e a morfologia do cristal¹⁰². Este fato pode esclarecer o comportamento das amostras de TCP, nas quais os precipitados iniciais são instáveis, seja pela sensibilidade ao pH e/ou pelo fato dos núcleos não atingirem o raio crítico necessário para formação de núcleos estáveis, sendo dissolvidos e reprecipitados. Após 24 horas de imersão em SBF, observa-se morfologia semelhante às demais amostras; micrografia (c), Figura 5.4.13. A nucleação, nestas condições, pode estar ocorrendo de maneira diferente para as amostras de TCP. É muito provável que o TCP apresente uma energia interfacial maior que as outras amostras, favorecendo a nucleação. A rápida saturação do meio fornecida pelo TCP aumenta o valor de ΔG , ocorrendo uma acentuada redução, tanto no raio crítico como na energia máxima para nucleação, assim quanto maior o estado de saturação do sistema, maior a probabilidade de nucleação e menor o raio crítico^{51, 102}.

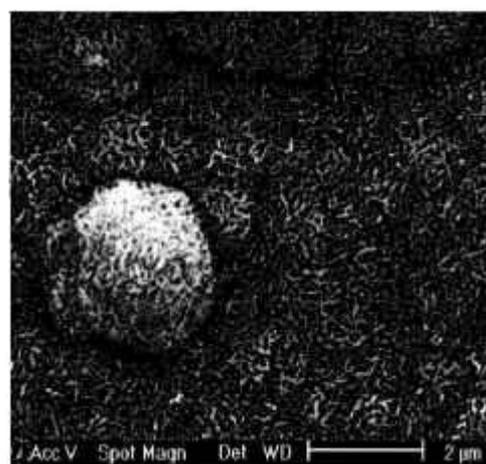
Se em meio biológico, ocorrer a mesma situação que aconteceu com as amostras de TCP, ou seja a presença de núcleos pequenos, pode se desencadear a rápida ação dos macrófagos que tendem a realizar o processo de fagocitose, resultando em uma maior tendência à reabsorção que ao estímulo do crescimento ósseo⁴⁵.

A cerâmica 5H apresentou comportamento, em relação ao pH e ganho de massa, semelhante a cerâmica reabsorvível, TCP, Figuras 5.4.2 e 5.4.4. A maior solubilidade desta fase acelera a saturação da solução e conseqüente precipitação sobre a superfície. Após 15 dias de imersão é observado que as cerâmicas bifásicas e a bioativa (HAp), apresentam maior tendência a formação de uma camada compacta, sendo observada uma periodicidade semelhante entre estas amostras, no que diz respeito a evolução da camada precipitada.

Foi acompanhada a morfologia das partículas constituintes dos precipitados até a formação de glóbulos, Figura 5.4.14 - (a-c), que são característicos da camada obtida para materiais bioativos. A morfologia é semelhante para todas as amostras. Análise por espectroscopia por energia dispersiva (EDS) foi realizada na superfície das amostras, revelando a presença de uma camada de natureza semelhante à biologicamente ativa, ou seja, HCA. A camada obtida é constituída predominantemente de íons cálcio e fósforo e, em pequena quantidade, íons: O^{-2} , C^{+4} , Na^{+} , Mg^{+2} , e Cl^{-} , esperados devido a sua presença, em SBF e afinidade química existente entre os elementos. Estes elementos também podem ser encontrados comumente em tecidos ósseos^{9, 20}. Diversos espectros foram obtidos, nas diferentes condições, apresentando características bastante semelhantes, Figura 5.4.14.



(a)



(b)

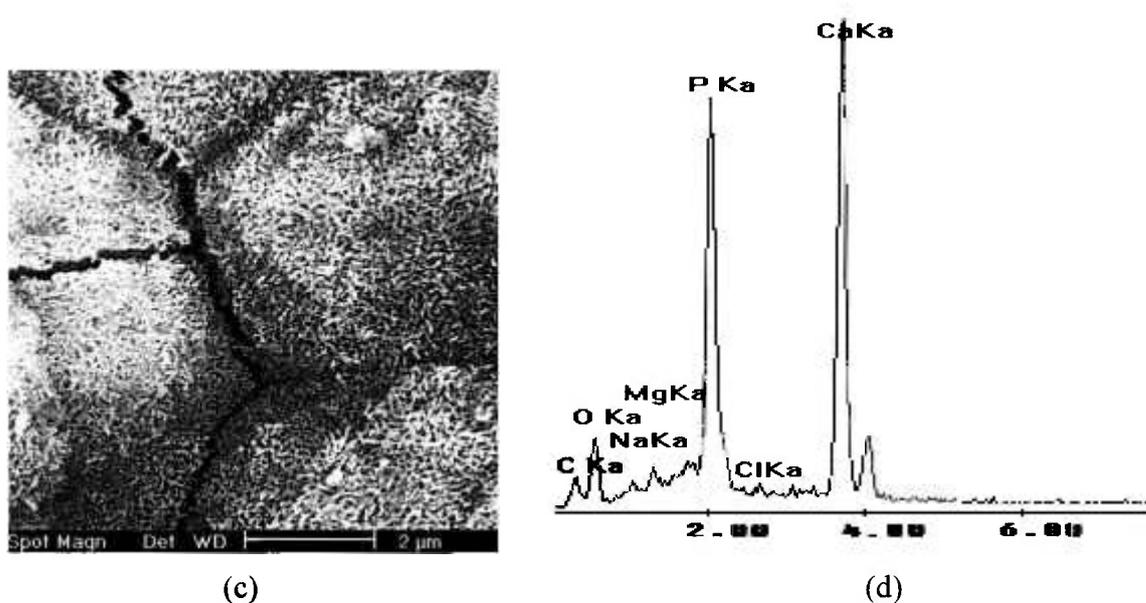


Figura: 5.4.14 – Micrografias obtidas por MEV das superfícies de amostras de HAp em SBF nos períodos. (a) 12 horas; (b) 15 dias; (c) 3 semanas e (d) Espectro obtido por EDS, da superfície da amostra H, após 15 dias em SBF.

Após 3 semanas de imersão em SBF, todas as amostras apresentam camada superficial de fosfato de cálcio formada, sendo a superfície da amostra de TCP não uniforme, com presença de glóbulos, dispostos de maneira desordenada.

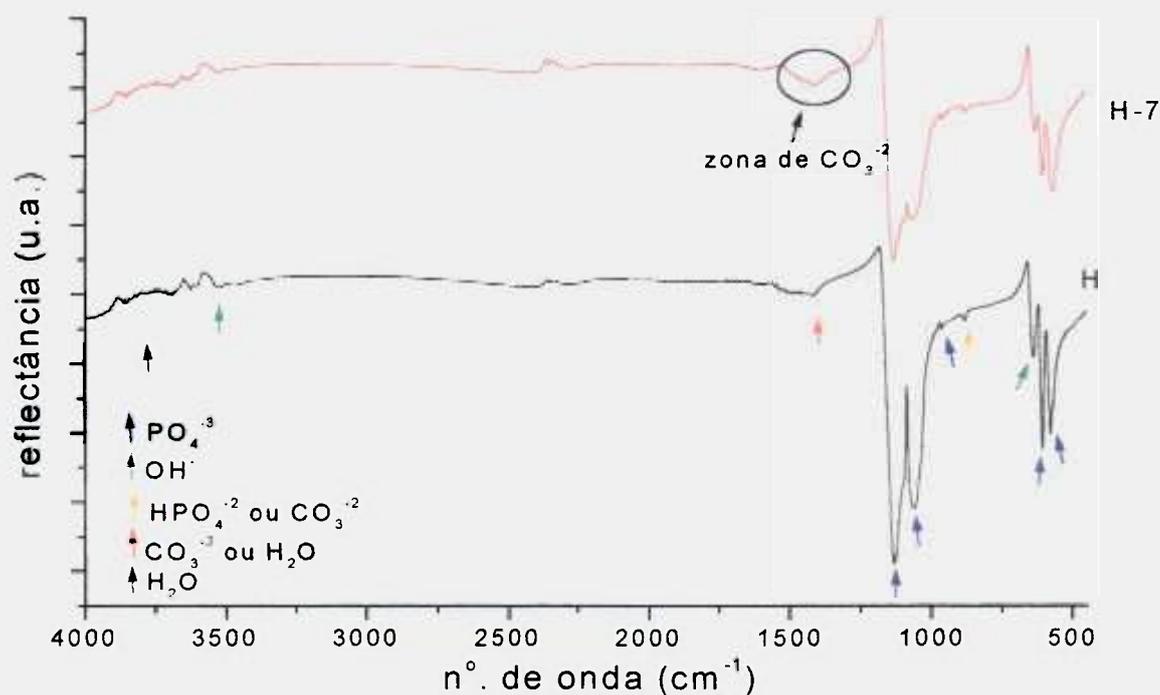
Algumas amostras possuem trincas nas superfícies, decorrentes da desumidificação que ocorre, em vácuo, na preparação e observação das amostras em MEV, aparecimento comum também em dentes ou outros materiais biológicos²⁰. O aumento na espessura da camada pode favorecer o aparecimento de trincas na superfície. Baixos valores da razão entre área de superfície da amostra e volume de SBF (S/V), como foi utilizado neste estudo, promovem a formação de camadas mais espessas, porém a cinética é mais lenta^{45, 83}.

Pela morfologia das camadas pode ser observado que os glóbulos são constituídos de um arranjo de camadas sobrepostas e permeáveis, permitindo mesmo após 3 semanas de ensaio, a continuidade para os processos de dissolução/reprecipitação e cristalização, se ainda na presença do meio simulado, SBF. O precipitado formado inicialmente em todas as amostras apresenta-se na forma de agregados planos, forma característica dos precipitados de fosfato octacálcico (OCP) e fosfatos dicálcicos, que são caracterizados como precursores da hidroxiapatita, nestas condições^{20, 67, 101}. Em períodos mais longos em SBF há modificação da morfologia dos precipitados, nesta etapa, apresentando aspecto mais globular, forma característica da apatita biológica^{20, 67}.

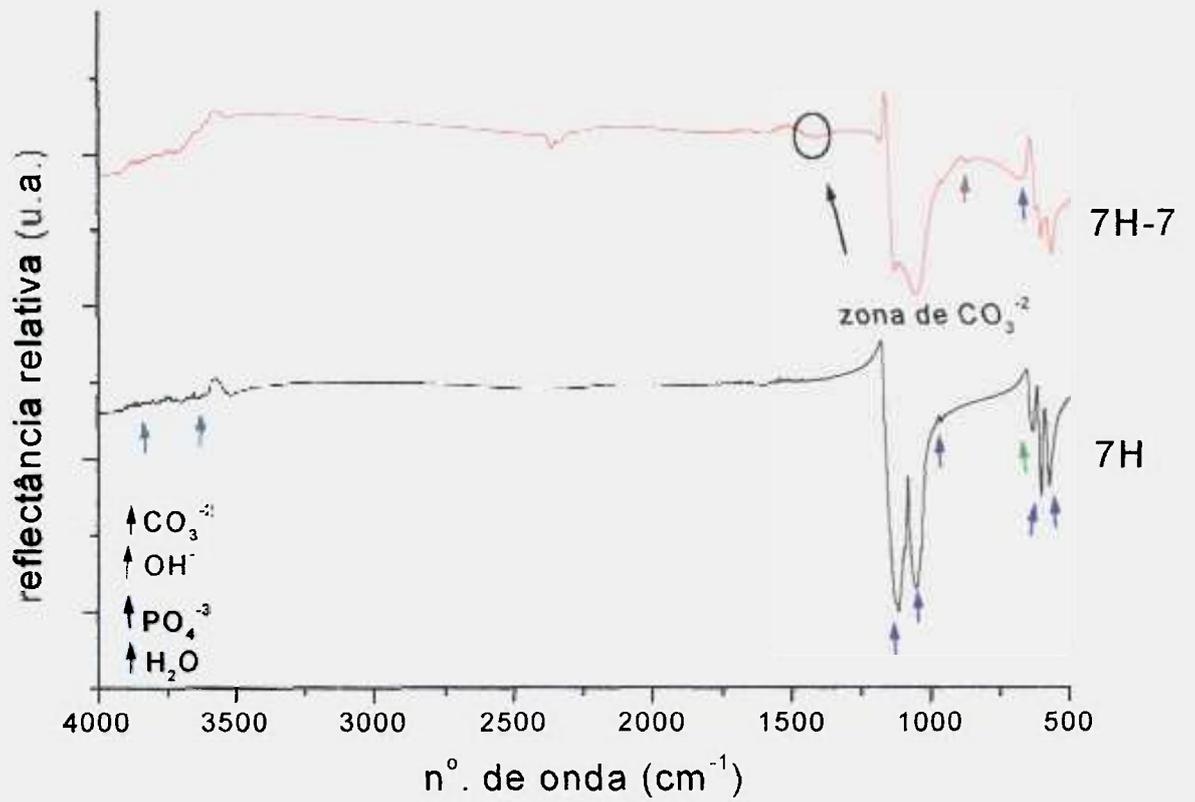
Espectroscopia de infravermelho foi utilizada para analisar a superfície das amostras após a imersão em SBF. Para isso, também foram obtidos os espectros das superfícies das amostras, antes de submetidas aos experimentos.

A espessura, cristalinidade e rugosidade da superfície são parâmetros que podem comprometer na obtenção dos espectros, de acordo com a literatura^{20, 99}. Os espectros de infravermelho, Figura 5.4.15, revelam uma camada, após imersão em SBF, de natureza pouco cristalina e de pequena espessura, resultando na baixa definição dos espectros. Em geral, nos testes *in vitro*, a fase depositada sobre as superfícies das cerâmicas é inicialmente amorfa, podendo ser cristalizada sob a forma de HCA, em tempos mais longos, pela incorporação de CO_3^{2-} , a presença desta fase caracteriza o comportamento bioativo que permite ao material uma integração com o tecido ósseo a partir de ligações químicas^{20, 103}.

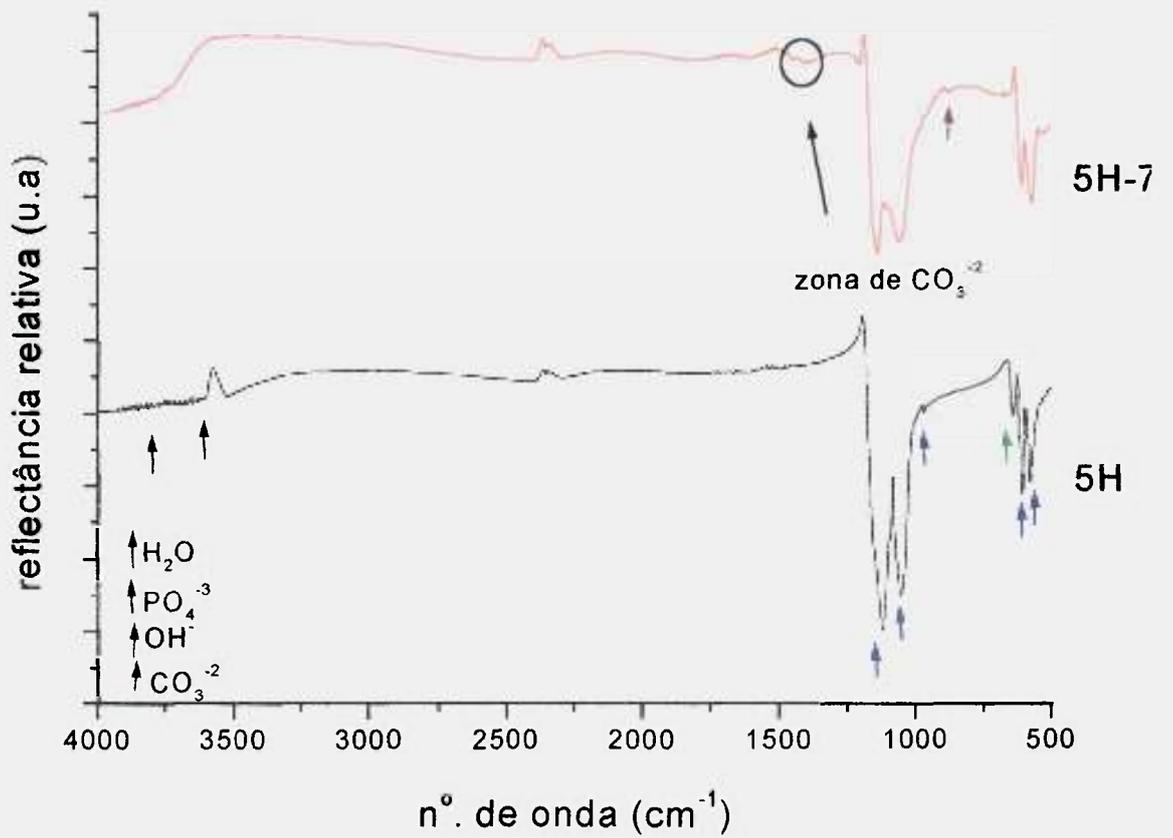
Este comportamento indica que a camada formada não apresenta, neste período, uma estrutura totalmente definida, sendo ainda permeável ao transporte de íons, podendo não apresentar completa estabilidade, observada pelas oscilações de pH e massa, Figuras: 5.4.3 e 5.4.4. Estas características facilitam as transformações de fase, sensíveis a variações de pH, podendo mudar também o aspecto morfológico da camada depositada.



(A)



(B)



(C)

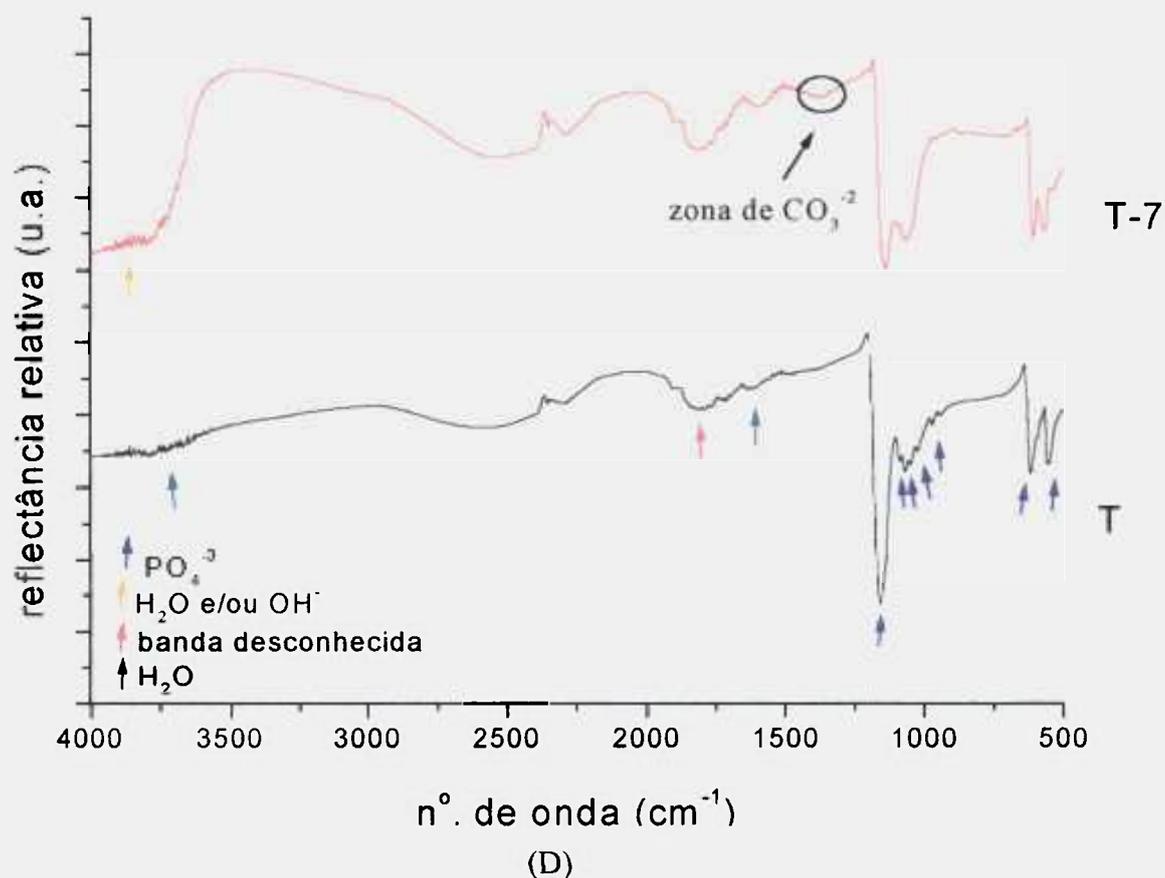


Figura 5.4.15 – Espectros de infravermelho por reflexão difusa das amostras: (A) - HAp; (B) - 7H; (C) - 5H e (D) - TCP, sendo os sufixos (sup.) = superfície da amostra antes da imersão e (7) = superfície da amostra, imersa 21 dias em SBF (7ª troca).

Os espectros das amostras obtidos antes dos ensaios em SBF são diferentes, em relação aos espectros obtidos anteriormente dos materiais de partida, Figuras 5.1.5-5.1.7. Apesar do princípio físico diferente adotado para tomada de medidas, neste caso por reflectância difusa, não eram esperados modificações nos espectros; somente na amostra de HAp é observada a presença ambígua do pico de HPO_4^{-2} e CO_3^{-2} em relação ao pó de partida. O grupo $\text{CO}_3^{-2} \sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ pode ter sido incorporado na estrutura durante o processo de sinterização em ar.

As causas possíveis para as alterações observadas nos espectros das amostras sinterizadas de TCP antes do ensaio *in vitro* são desconhecidas, assim como a observação da banda na região de 1800 cm^{-1} .

Os espectros de infravermelho apresentam bandas de difícil distinção, com alguns modos vibracionais ativos em mesma frequência, podendo ser identificados diferentes grupos funcionais em posições idênticas, devido o alargamento dos picos.

O alargamento das bandas de vibração é interpretado em termos de uma distribuição de ângulos de ajuste entre os átomos com disposição desordenada dos elementos que apresentam um arranjo espacial não bem definido ⁹⁶.

A presença de modos vibracionais característicos da água (~ 1615 e ~ 3400 cm^{-1}) nas amostras de TCP pode favorecer a formação da HAp a longo prazo. Alguns autores consideram que o TCP na presença de água ou de soluções aquosas é instável, podendo se converter em hidroxiapatita deficiente em cálcio ^{60, 104}; neste período, pelo perfil obtido do espectro do TCP após 3 semanas em SBF não foram observadas mudanças estruturais significativas, porém o aumento de intensidade da banda acima de 3500 cm^{-1} pode sugerir a presença da hidroxila na camada hidratada ⁹⁹. A banda em 1800 cm^{-1} permaneceu estável, apresentando-se da mesma forma que a amostra sinterizada, antes de imersa em SBF.

As amostras de TCP e a mistura 5H, após imersão em SBF, apresentaram um aumento na intensidade da banda característica de água ~ 3600 cm^{-1} , este comportamento sugere a formação de uma camada mais hidratada para estas amostras, decorrente da maior quantidade da fase TCP ⁹⁹.

O TCP é mais reativo em sistemas aquosos, podendo, ao ser hidrolisado, formar uma mistura de fases de DCPA, DCPD, OCP e HAp deficiente em cálcio, em várias proporções, fases que a princípio podem constituir uma camada hidratada sobre a superfície do material, representando os precursores da apatita biológica em condições simuladas ^{9, 104}. É importante acrescentar que ^{9, 104} algumas destas fases são estáveis em meio biológico, como a HAp e o DCPD, as demais são fases transientes, mas necessárias ao ciclo de biomineralização ^{20, 67}.

Os espectros das amostras de HAp e das amostras bifásicas, 5H e 7H apresentam melhor definição do que os espectros de TCP; isto pode ser explicado pela formação de uma camada com disposição desordenada dos glóbulos e pela cristalização mais difícil deste material. A estrutura e características da HAp (amostra) e da HAp precipitada são as mesmas, assim a energia necessária para a nucleação e crescimento de seus cristais sobre a superfície da HAp é menor do que a energia necessária para cristalização sobre a superfície do TCP ^{67, 105}.

Apenas as amostras bifásicas, 5H e 7H analisadas após imersão em SBF, apresentam picos característicos de carbonato, indicando maior reatividade *in vitro* comparadas as amostras de HAp e β -TCP, comportamento observado também pela literatura ⁹⁹.

A presença de bandas pouco significativas de grupos CO_3^{2-} (~ 875 e ~ 1400 cm^{-1}), sugere a formação de uma HAp substituída, ou seja, de acordo com estas posições de

freqüência, os grupos CO_3^{2-} podem ocupar posições de grupos OH^- , dando origem a HAp substituída do tipo-A e posições de grupos PO_4^{-3} , HAp do tipo-B^{20, 51, 103}. A medida que ocorrem estas substituições, há uma redução na intensidade dos picos do espectro, principalmente de OH^- , como é observado nos espectros das amostras H, 7H e 5H, Figura 5.4.15 (A, B e C). As amostras bifásicas: 7H e 5H após 3 semanas em SBF seguem comportamento mais próximo da amostra H-7 e não da cerâmica reabsorvível para formação da camada, sendo identificadas mesmas espécies químicas nas amostras, confirmando novamente um caráter bioativo superior a degradabilidade destas cerâmicas.

O alargamento das bandas permite que ainda seja considerada a presença de espécies diferentes, comuns em regiões ($865, 957, 1069, 1140 \text{ cm}^{-1}$) como o HPO_4^{-2} , resultante da hidrólise de fosfatos que ocorre em SBF e meio biológico^{20, 94, 96}, além das bandas características das fases de HAp e β -TCP. A presença destas espécies e de outros íons complexos é comum na camada hidratada ao redor do sólido. As apatitas biológicas também são caracterizadas por apresentarem esta camada hidratada, que contribui no desenvolvimento de cargas superficiais sobre o implante para formação óssea⁹. Grupos funcionais específicos de: fosfato dicálcico - DCPD ou DCPA ($\sim 1053, 1137 \text{ cm}^{-1}$), fosfato octacálcico - OCP ($\sim 1053, 1131, 1182, 1191 \text{ cm}^{-1}$) e apatitas deficientes em cálcio podem estar presentes neste período. No entanto, a comprovação destas espécies exige outras caracterizações, como por exemplo, DRX em baixo ângulo. De maneira geral, os espectros tendem a se aproximar mais aos da fase HAp^{20, 94, 96}.

Durante este estudo, o tempo para formação da camada esteve associado aos parâmetros adotados para análise, ou seja, razão S/V, tipo e período de renovação, da solução, microestrutura e principalmente, composição das amostras, podendo afetar também na espessura da camada. Estes resultados demonstraram que é possível uma avaliação preliminar da reatividade das cerâmicas, podendo indicar seu comportamento de interação com o meio biológico.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

A metodologia empregada na obtenção das cerâmicas bifásicas constituídas de hidroxiapatita e β -fosfato-tricálcico em diferentes proporções mostrou-se bastante viável na produção de cerâmicas densas com microestrutura controlada, além de um fácil controle das etapas envolvidas no processamento, sendo mantida a estabilidade das fases presentes.

Os tratamentos térmicos adotados permitiram atingir alta densidade para todas as amostras (~95% pt). As amostras contendo somente a HAp foram sinterizadas mais facilmente que as amostras contendo a fase TCP, sendo necessárias temperaturas mais elevadas para promover o mesmo grau de densificação.

A microestrutura de todas as cerâmicas bifásicas e da HAp apresentou poros de dimensões menores em relação a microestrutura do TCP que apresentou um crescimento de grão mais acentuado.

As cerâmicas estudadas apresentaram reatividades diferentes na presença de SBF; as cerâmicas bifásicas e a totalmente reabsorvível, TCP apresentam condições cineticamente mais favoráveis a nucleação, devido a maior tendência a saturação de suas soluções pela maior solubilidade desta fase, facilitando a precipitação, mesmo em períodos de até 12 horas em SBF.

A resposta *in vitro* das composições estudadas envolveu os mesmos mecanismos descritos por Hench ⁴⁹ para formação da ligação bioativa e as amostras bifásicas apresentaram o mesmo comportamento de reatividade previsto por Daculsi ⁷⁰, ou seja, uma reatividade melhor para as bifásicas que as cerâmicas monofásicas de HAp ou TCP.

A camada depositada apresenta aspecto globular sendo constituída, inicialmente, por agregados planos (núcleos) de morfologia característica de fases precursoras da apatita biológica nestas condições.

Os espectros de infravermelho obtidos das superfícies das amostras indicam a formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfa. As superfícies das amostras de TCP

apresentaram glóbulos dispostos de maneira desordenada resultando em superfícies não uniformes, afetando na definição dos espectros.

As amostras bifásicas apresentaram maiores indícios da espécie “carbonato” devido a presença de bandas, pouco definidas, em posições do espectro que são características destas espécies. A presença destas bandas pode sugerir a formação de uma hidroxiapatita substituída tanto do tipo A, quanto do tipo B.

As amostras com maior quantidade de TCP apresentaram a formação de uma camada mais hidratada que as demais composições, após os ensaios *in vitro*, apresentando um aumento na intensidade das bandas de água.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 OHRING, M. *Engineering Materials Science*, Academic Press, 1ª. edição, 1995.
- 2 A protetização no amputado de membro inferior; disponível no endereço: sites.uol.com/suzanaf/jan2000/protese.htm; data de acesso: 18/03/2003.
- 3 MEARS, D.C. *Materials and Orthopaedic Surgery*. Baltimore.: Williams and Wilkins Co., 1979.
- 4 BOSCHI, A.O. *O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial? ANAIS DO III ENCONTRO NACIONAL DE BIOMATERIAIS*,. Out. 15., São Paulo, p. 63-75, 1993.
- 5 WILLIAMS D, F. “Definições em Biomateriais”. Conference of the European Society for Biomaterials, mar. 3-5, Chester, England, Elsevier, Amesterdam, n.6, p. 49-59, 1987.
- 6 BUDDY D. RATNER, ALLAN S. HOFFMAN, FREDERICK J. SCHOEN, JACK E. LEMONS; *Biomaterials Science, An introduction to Materials in Medicine*; editora Academic Press; cap. 2; 1996.
- 7 TEIXEIRA P. ISABEL – informativo nº. 41 – A importância da ortopedia; nota sobre academia americana de cirurgia ortopédica de 1999, disponível no endereço: www.sindihospa.com.br/inform_41htm, data de acesso: 21 /03/2003.
- 8 WILLIAMS; WARWICK; DYSON; BANNISTER; GRAY. *Anatomia 37º Edição*, Guanabara Koogan Editora, 1995.
- 9 L.L. HENCH, J. WILSON, *Introduction to Bioceramics*. World Scientific Publishing Co. , 1ed. 1993.
- 10 CERÂMICA BRASIL – *Cerâmica Interessante/ Tecnologia*; disponível no endereço: www.ceramicabrasil.com/revista/index.php?edição=2, data de acesso:18/03/2003.
- 11 NOTÍCIAS; www.hospitalar.com.br, data de acesso: 18/03/2003.
- 12 CAMPOS, M. *Síntese de hidroxiapatita e sua aplicação como biomaterial*. 1999. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

- 13 FERNANDEZ, E. ; GIL, F. G. ; GINEBRA, M. P. ; DRIESSENS, F. C. M. ; PLANELL, J. A.; BETS, S. M. *Calcium phosphate bone cements for clinical applications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 10, p. 169 – 176, 1999.
- 14 ALBREKTSSON, T. ; ALBREKTSSON, B. *Osseointegration of bone implants*. Acta Orthopedic Scand., v. 58, p. 567-577, 1987.
- 15 TWEDEN, K. S. ; MAZE, G. I. ; McGEE, T. D. ; RUNYON, C. L. ; NIYO, Y. *Evaluation of the tissue response of organic, metallic, ceramic and osteoceramic tooth roots*. Materials Science Forum, v. 293, p. 17–36, 1999.
- 16 SAVARINO, L.; STEA, S. ; GRANCHI, D. ; DONATI, M. E. ; CERVELLATI, M. ; MORRONI, A. ; PAGANETTO, G. ; PIZZOFRERATO, A. *X-ray diffraction of bone at the interface with hydroxyapatite – coated versus uncoated metal implants*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 9, p. 109-115, 1998.
- 17 G. WILMANN. *Medical –Grade ceramics-what every engineer should know*. Supplement to Inter. Ceram. 47, 1998.
- 18 S. WRITER, *Biointegrated materials project*. Techno Japan, 30, p. 10-20, 1997.
- 19 W.L. HUKINS, J.C. LEAHY, K.J. MATHIAS, *Biomaterials- defining the mechanical properties of natural tissues and selection of replacement materials*, J. Mater. Chemistry, 9, p. 629-636, 1999.
- 20 LEGEROS R. Z., *Calcium phosphates in oral biology and medicine*. Monographs in Oral, 15 , 1991.
- 21 JACK E. LEMONS. *Ceramics: past, present, and future*. Bone Vol. 19, no.1 Suppl. July, 121S-128S, 1996.
- 22 CHAMBERS, T. J.; PATH, M. R. C. *The cellular basis of bone resorption*. Clinical Orthopaedics and Related Research, Sept, v.151, p. 283-293,1980.
- 23 ALMEIDA JUNIOR, A. ; FERREIRA, A. *Elementos de Anatomia e Fisiologia humanas*. São Paulo, S.P.: Edição Nacional, p. 41-66, 1983.
- 24 GÜNTER, H. ; KLEIN, C. P. A. T. ; GROOT, K. *Osseo-integrated implants*. In: *Implants in oral and ENT surgery*, Bioactive Ceramics. CRC Press – Implant systems Based on, n. 2, v. 7: p. 193-208, 1990.

- 25 WALSH, W. R. ; OHNO, M. ; GUZELSU, N. *Bone composite behaviour: effects of mineral-organic bonding*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 5, p. 72-79, 1994.
- 26 EL-KHOLY, M. B. ; KHALIL, A. A. ; HASHEM, A. M. *Thermochemistry of bovine teeth and synthesis of hydroxyapatite*. Interceramics, n. 1, v. 47, p. 29-32, 1998.
- 27 BOSKEY, A. L. *Bone mineral and matrix, are they altered in osteoporosis. pathologic fractures in metabolic bone disease*. The Orthopedic Clinics of North America, v. 21, p. 19-29, 1990.
- 28 PARK, E. ; CONDRATE, S. R. ; R. A ; HOELZER, D. T. ; FISCHIMAN, G. H.; *Interfacial characterization of plasma-spray coated calcium phosphate on Ti-6-Al-4V*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 9, p. 643-649, 1998.
- 29 HOOT, M.; NOEL, B.; BERANACHE-ASSOLANT, D.; MARIE, P.J. ; REY, C. *Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite*. Journal Biomedical Material Research, v. 37, p. 508-516, 1997.
- 30 BODEN, S. D. ; KAPLAN, F. S., *Calcium homeostasis; pathologic fractures in metabolic bone disease*. The Orthopedic Clinics of North America, Jan., v. 21, p. 31-42, 1990.
- 31 MARTIN, R. B. *Bone as a ceramic composite material*. Materials Science Forum, v. 293, p. 5-16, 1999.
- 32 CABRINI, R. L; GUGLIELMONTTI, M. B. *Aspectos biológicos da osseointegração – sua importância na Implantologia*. Atualização em Clínica Odontológica, p. 163-173, 1994.
- 33 SHACKELFORD, J. F. *Bioceramics: an historical perspective*. Materials Science Forum, v. 293, p. 1-4, 1999.
- 34 D. F. WILLIAMS. *Introduction: Implantable materials and infection*. Injury, Vol.27, Suppl.3. 1996.
- 35 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3 ed., p. 132-155, 1973.
- 36 SIQUEIRA, J.T.T.; STIVAL, N.; DIAS, P.V. *Considerações sobre limpeza de superfícies de implantes dentários jateados*. IBI , jan.-fev., n. 6, 1996.

- 37 KASEMO, B.; LAUSMAA, J. *Biomaterial and implant surfaces: On the role of cleanliness, contamination and preparation procedures*. Journal Biomedical Material Reserach, v. 22, p. 145-158, 1988.
- 38 ISO/TR 9325 (1989) *Implants for surgery – Partial and total hip joint prostheses – Recomendations for simulators for evaluation of hip joint prostheses*.
- 39 ZAVAGLIA, C. A. C. *Aplicações de biocerâmicas em próteses ortopédicas*. Campinas: 1993. Tese(Livre Docência) – Universidade Estadual de Campinas.
- 40 RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. *Bioceramics: Materials, properties, applications*, Chapman & Half, 1992.
- 41 HENCH, L. L. *Bioceramics: from concept to clinic*. Journal of the American Ceramic Society, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
- 42 HENCH, L. L. *Bioactive glasses and glass ceramics*. Materials Science Forum , v. 293, p. 37-64,1999.
- 43 LEGEROS, R.; DACULSI, G.; ORLY, I.; WALTERS, M.; LEGEROS, J. P; *Bioceramics-tissue interfaces: characterization of ultrastructural properties*. Proceedings of the 6th International Symposium on Ceramics in Medicine Philadelphia: Nov., p. 79-84, 1993.
- 44 DONATH, K. *A comparison of tissue-implant interface of osseous integrated titanium and hydroxyapatite coated titanium dental implants*. Oral Implantology and Biomaterials. Progress in Biomedical Engineering, Haruyuki Kawahara, Amsterdam. v. 7, p. 193-196, 1989.
- 45 HENCH, L.L.; JONES, J. R.; SEPULVEDA, P. *Bioactive materials for tissue Engeneering scaffolds*, cap.1, p. 3-22, 2001; disponível no end.: www.icpress.co.uk/books/engineering/etxtbook/p252; data de acesso: 14/04/03
- 46 KOKUBO, T.; KUSHITAMI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T. and YAMAMURO, T. *Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioctive glass-ceramic A-W*. Journal of Biom. Mater. Res.V-24, 721-734, 1990.
- 47 KOKUBO, T.; KUSHITAMI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T. and YAMAMURO, T. *Ca, P- rich layer formed on high- strenght bioactive glass-ceramic A-W*. Journal of Biom. Mater. Res.V-24, 331-343; 1990.

- 48 PEITL O.F.; *Vitro-Cerâmica bioativa de alto desempenho mecânico*. Tese Doutorado. UFSCar, Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais, São Carlos, p. 370; 1995
- 49 HENCH, L.L. *Bioceramics*, J Am. Ceram. Soc. 81, Vol.7, 1705-28, 1998.
- 50 HANAWA T. *Titanium and its oxide film a substrate for formation of apatite*. The Bone-Biomaterial interface, chapter4, J.E Davies (Ed.) University of Toronto Press, Toronto-Buffalo-London.49-61, 1991.
- 51 ELLIOTT, J. C. *Structure and Chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Elsevier Science B.V.,1994.
- 52 DOI, Y.; SHIBUTANI, T. MORIWAKI, Y.; KAJIMOTO, T.; IWAYAMA, Y. *Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes*. Journal Biomedical Materials Research, v. 39, p. 603-610, 1998.
- 53 MERRY, J. C.; GIBSON, I. R.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. *Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 9, p. 779-783, 1998.
- 54 BERNDT, C. C.; GROSS, K. A. *Characteristics of hydroxyapatite*. Bio-coatings. Proceedings of the Internacional Thermal Spray Conference Exposition, , 28 May – 5 June, Orlando, Florida, 1992.
- 55 PLAFF, H. G.; WILLMANN, G.; PÖTHING, R. *Properties of HA-coatings*. Bioceramics, v.6, p. 420-424, 1993.
- 56 LAVERNIA, CARLOS E SCHOENUNG, JULIE M. – *Calcium Phosphate ceramics on bone substitutes* – Ceramic Bulletin, vol. 70,nº. 1, 1991.
- 57 DE GROOT. K. *Clinical usefulness of calcium phosphate ceramics*. Zahnarzl Mitteil; 75, p. 1938-40, 1985.
- 58 TENHUISEN, KEVOR S., BROWN, P. W. – *Formation of calcium-deficient hydroxyapatite from α -tricalcium phosphate*, Biomaterials 19; p. 2209-17, 1998.
- 59 RENOO, J.W, HOOGENDOORN HA, VISSER WJ, LENTFERINK RHF. WITTEBOL. P. *Bioresorption of ceramic strontium - 85- labeled calcium phosphate implants in dog femoral*. Clin. Orthopedic Relat Res. 197,p. 272-285; 1985.

- 60 FENG-HUEI LIN, CHUN-JEN LIAO, KO-SHAO CHEN, JUI-SHENG SUN, CHUN-PIN LIN. *Petal-like apatite formed on the surface of tricalcium phosphate ceramic after soaking in distilled water*. Biomaterials 22, 2981-2992, 2001.
- 61 KOHRI, M; MIKI, K; WAITE, D.E.; NAKAJIMA, H.; OKABE, T. *In vitro stability of biphasic calcium phosphate ceramics*. Biomaterials, v. 14; 4, p. 299-304, 1993.
- 62 DRIESSEN, A.A.; KLEIN, C. P.A.T.; de GROOT, K. *Preparation and some properties of sintered beta whitlockite*. Biomaterials, 3; p. 113-116, 1983.
- 63 CHOW L.C. *Development of self-setting calcium phosphate cements*. J Ceram. Soc. Japan. 99, p. 954-64; 1991.
- 64 KHAIRON, I.; DRIESSENS, F. C. M.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A.; WENZ, R. *Additon of cohesion promotors to calcium phosphate cements*. Biomaterials, 20, p. 2147-2153, 1999.
- 65 TENHUISEN, K.S.; BROWN, P.W. *Hydrolysis of α - tricalcium phosphate in NaF solutions*. Biomaterials, 20, p. 427-434, 1994.
- 66 PAUCHIN, E., WANG. T., CHAKI K., *Sintering behaviour and mechanical properties of HAP and DCP*; J. Mater. Sci.: Mater. in Medicine, 4; p.150-158; 1993.
- 67 RAVAGLIOLI A., KRAJEWSKI A.; *A phisico-chemical study of crystal growth of hydroxyapatite bioceramic*; Biomaterial, 2; p. 105-11; 1981.
- 68 M. SOUS, R. BAREILLE, F. ROAIS, O. CLÉMENT, J. AMÉDEE, B. DUPUY, CH. BAQUEY. *Cellular biocompatibility and resistance to compression of macroporous β - tricalcium phosphate ceramics*. Biomaterials, 19, p. 2147-2153; 1998.
- 69 YUAN, H.; KURASHINA, KENJI; DE BRUIJN, J. D.; YUBAO LI, K.; DE GROT, XINGDOG ZHANG. *A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics*. Biomaterials, 20, p. 1799-1806, 1999.

- 70 DACULSI G, LE GEROS R. Z, NERY E. , LYNCH K., KEREBEL B., *Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization*. J. Biomed. Mater. Res. 23, p. 883-94; 1989.
- 71 BOULER, JEAN-MICHEL; DACULSI, GUY. *In vitro carbonated apatite precipitation calcium phosphate pellets presenting various HAp- β -TCP ratios*; Key Engineering Materials 192-195; p. 119-22, 2001.
- 72 NERY E. B., LE GEROS R. Z., LYNCH K., LEE., *Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with diferent ratios of HAp-TCP in periodontal osseous defects*; J. Periodontal , 62; p. 729-35, 1992.
- 73 LI YUBAO, ZHANG XINGDONG, K DE GROOT. *Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate*. Biomaterials, v 18, 10, p. 737-741, 1997.
- 74 DACULSI, G. *Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute*. Biomaterials, 19, p. 1473-1478, 1998.
- 75 UCHUDA, A., SHENTO, Y.; KONO N. A. *Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic*. Journal of orthopedic research. V-10, 440-445, 1992.
- 76 GROTH, T.; FALCK, P.; MIETHKE, R. *Cytotoxicity of biomaterials – basic mechanisms and in vitro methods: a review*. ATLA 23,790-799, 1995.
- 77 ISO document 10993-5, 1992. *Biological evaluation of medical devices, Part. 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods*.
- 78 SANTOS L. A. *Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área Médico- Odontológica*; 2002. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 79 ROGERO, S.O; BRAGA, F.J.C.; HIGA, O.Z. *Cytotoxicity test for bioceramics of calcium phosphate*. Mater. Sci. Forum, 299-300: 44-47,1999.
- 80 ROGERO, SIZUE O; SEPULVEDA P.; HIGA, OLGA Z.; PANDOLFELLI, V. C.; BRESSIANI J. C. – *Avaliação Citotóxica de Hidroxiapatita Porosa Produzida através de*

Gelcasting de Espumas - 42º Congresso Bras. de Cerâmica, 4º Ibero – Americano de cerâmica, vidros e refratários, Poços de Caldas, 1998..

81 HELEBRANT, ALES; JONÁSOVÁ, LENKA; SANDA, LUDVÍK. *The influence of simulated body fluid composition on carbonated hydroxyapatite formation*. *Ceramics – Silikáty*, 46 (1), p. 9-14, 2002.

82 DOROZHKIN, S.V. *A Review on the dissolution models of calcium apatites*. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Material*. 45-61, 2002.

83 GREENSPAN, D.C.; ZHONG, J.P.; LA TORRE, G.P. *Effect of surface area to volume ratio on in vitro surface reactions os bioactive glass particulates*, *Bioceramics*, V.7, edited by Ö. H. Andersson and Yli Urpo, Turku, Filand, jully, p.55-60, 1994.

84 FULMER, MARK.T.; ISON, IRA C.; HANKERMAYER,CHRISTINE R.; CONSTANTZ, BRENT R.; ROSS, JOHN. *Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites*. *Biomaterials* 23, p. 751-755, 2002.

85 JOHN B. RUSSEL. *Química Geral- 2ª edição v.1*, Makron Books editora Ltda,p. 411-416, 1994.

86 REED J.S. *Principles of Ceramics Processing*. Segunda edição. John Wiley & Sons Inc. Estados Unidos. 1995.

87 MALGHAN S.G. *Charaterization of Ceramic Powders*. *Engineered Materials Handbook*. Volume 4 Ceramics and Glasses. ASM International. Estados Unidos,1991.

88 Cilas Laser Particle Size Analyses - *History & Priciple* – www.cilas.com; data de acesso: 12/05/2002.

89 GERMAN R.M. *Powder Metallurgy Science*. Metal Powder Industries Federation. Estados Unidos. 1989.

90 IRIGARAY, J.L.; OUDADESSE, V.B. *Nuclear methods to characterize biomaterials*. *Biomaterials* 22 , p. 629-640; 2001.

- 91 BODE, P. – “*Instrumental organizational aspects of a neutron activation analysis laboratory*”. Delft University of Technology, Delft, The Netherlands, p. 147; 1996.
- 92 OLIVEIRA I. R., STUDART A. R., PILEGGI R. G., PANDOLFELLI V. C. *Dispersão e Empacotamento de Partículas - Princípios e Aplicações em Processamento Cerâmico*. Fazenda Arte Editorial, 2000.
- 93 S. RAYNAUD, E. CHAMPION, D. BERNACHE-ASSOLLANT, P. THOMAS. *Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders*. Biomaterials, 23, p. 1065-1072, 2002.
- 94 KOUTSOPOULOS, S. *Synthesis And Characterization Of Hydroxyapatite Crystals: A Review Study On The Analytical Methods*. Journal of Biomedical Materials Research. v.62, 600-612, 2002.
- 95 SENE, F. F. *Síntese e caracterização de vidros niobofosfatos de bário e potássio para aplicação como matriz hospedeira de íons de terras raras*. Tese (Doutorado) 2002. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 96 DAYANAND, C.; BHIKSHAMAIHAH, G.; TYAGARAJU, V. J.; SALAGRAM, M.; MURTHY A.S.R K. *Review Structural investigations of phosphate glasses: a detailed infrared study of the $x(\text{PbO})-(1-x)\text{P}_2\text{O}_5$ vitreous system*. Journal of Materials Science, 31, p. 1945-1967, 1996.
- 97 HANKERMAYER, C.R; OHASHI, L. K; DELANEY, C. D; ROSS, J; CONSTANTZ, R. B. *Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid*. Biomaterials 23, p. 743-750; 2002.
- 98 VALSAMI E. J. *The dissolution of apatite in the presence of aqueous metal cations at pH 2-7*. Chemical Geology. v. 151, p. 215-233, 1998.
- 99 STOCH, A.; JASTRZESKI, W.; BROZEK, A.; TRYBALSKA, B.; SZARAWARA, E. *FTIR monitoring of the growth of the carbonate containing apatite layers from simulated and natural body fluids*. Journal of Molecular Structure 511,p. 287-294, 1999.
- 100 LI, JIANGUO; HAILHONG, LIAO AND SJÖSTROM, MALENA. *Characterization of calcium phosphates precipitated from simulated body fluid of different buffering capacities*. Biomaterials 18, p. 743-747,1997.

- 101 HORVATH, L. et al. *Effect of cationic surfactant on the transformation of octacalcium phosphate*. Journal of Crystal Growth 219, p. 91-97; 2000.
- 102 WU, WENJU AND NANCOLLAS, GEORGE H. *Interfacial free energies and crystallization in aqueous media*. Journal of Colloid and Interface Science. v.182, p. 365-373, 1996.
- 103 LIU D-M., YANG Q., TROCYNSKI T., TSENG W. J. *Structural evolution of sol-gel derived hydroxyapatite*. Biomaterials, 23, p. 1679-1687, 2002.
- 104 FENG-HUEI LIN, CHUN-JEN LIAO, KO-SHAO CHEN, JUI-SHENG SUN, CHUN-PIN LIN. *Petal-like apatite formed on the surface of tricalcium phosphate ceramic after soaking in distilled water*. Biomaterials 22, 2981-2992, 2001.
- 105 BLEACH, N. C.; ET AL. *Effect of the filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate-poly lactide composite*. Biomaterials 23,1579-1585, 2002.

