



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCERÂMICAS  
POROSAS À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO  
PROCESSADAS COM A UTILIZAÇÃO DE  
ALBUMINA**

**CHRISTIANE RIBEIRO**

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

Orientadora:  
Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani

**São Paulo  
2008**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCERÂMICAS POROSAS À BASE  
DE FOSFATOS DE CÁLCIO PROCESSADAS COM A UTILIZAÇÃO DE  
ALBUMINA**

**CHRISTIANE RIBEIRO**



**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear – Materiais.**

**Orientadora:  
Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani**

**SÃO PAULO**

**2008**

*Dedico este trabalho a  
meus pais queridos, Luiz Carlos  
e Tânia e ao meu marido Jackson  
que me apoiaram incondicionalmente  
durante esta longa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

Após a realização deste trabalho, percebe-se que muitas pessoas contribuíram direta ou indiretamente para esta conquista, às quais gostaria de humildemente agradecer, externando todo o meu reconhecimento e gratidão.

Agradeço à minha orientadora Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani, exemplo de profissionalismo e dedicação, pela confiança e oportunidade de amadurecimento.

Ao CNPq pelo auxílio concedido na forma de bolsa.

A todos os colegas do Grupo de Materiais Cerâmicos, especialmente a Deiby, Tamiye, Dra. Juliana e Dr. Luis A. Gênova, que fazendo parte do Grupo de Biomaterias, tiveram oportunidade de vivenciar mais de perto meu trabalho; pela amizade, troca de sugestões, convívio e incentivo durante esta etapa.

Ao Dr. José Carlos Bressiani pelo exemplo e apoio dado ao desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Walter Israel R. Cabrera pelos ensaios *in vitro* e discussões enriquecedoras que colaboraram para o meu aprendizado, além da amizade e confiança, sou muito grata.

À Dra. Chieko, Dra. Eliana C.S. Rigo e doutorando Walter Y. Kenji pelas sugestões sempre pertinentes, pela amizade, incentivo e exemplo de humildade e profissionalismo.

Ao Dr. Nelson Lima Batista e Amanda A. Aguiar pela troca de experiência a respeito da atividade de pesquisa, pela colaboração com as análises de DRX e amizade.

À Dra Sônia H. M. Castanho e equipe de reologia, em especial Walter Y. Kenji, pela realização das medidas de mobilidade eletroforética.

A todos os colegas do IPEN, pesquisadores, alunos de Iniciação Científica e aos técnicos do CCTM, em especial ao Pedrinho, que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, grata pela ajuda, pelos momentos de descontração ou pelo simples convívio durante mais esta etapa.

Ao, meu marido, Jackson Marcelo Vidal pela presença constante em minha vida, agradeço mais uma vez pela paciência que teve durante esta nova etapa, pelos conselhos, incentivo eterno 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, minhas irmãs: Luise Carla e Camila, meu irmão: Lucas Augusto 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 avós queridos, 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 tem me proporcionado, minha sincera e eterna gratidão.

**“ Primeiro surge um pensamento. Quando esse pensamento é forte ocorre uma ação.  
Se essa ação é praticada com disciplina, transforma-se em hábito...  
E nossos hábitos nos conduzem a um destino”**

**(Sivananda)**

## PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento desta tese permitiu a participação em diferentes Congressos e elaboração de alguns trabalhos que foram publicados em diferentes fontes bibliográficas.

RIBEIRO, Christiane, BRESSIANI, José Carlos, BRESSIANI, Ana Helena. A study of the consolidation method with albumin to obtain porous B-TCP ceramics. **Materials Research**. , v.10, p.01/887 - 04, 2007.

RIBEIRO, Christiane, BRESSIANI, José Carlos, BRESSIANI, Ana Helena. Characterization of the calcium phosphate porous ceramic obtained by foam consolidation using albumin. **Key Engineering Materials**. , v.361-63, p.971 - 974, 2007.

RIBEIRO, Christiane., BRESSIANI, José Carlos, BRESSIANI, Ana Helena de Almeida. Obtention of TCP porous ceramic using albumin. **Journal Materials Science Forum** Vols. 530-531 p. 587-592, 2006.

RIBEIRO, Christiane, BRESSIANI, José Carlos, BRESSIANI, Ana Helena. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE CERÂMICAS POROSAS DE FOSFATO DE CÁLCIO OBTIDAS POR TÉCNICA DE CONSOLIDAÇÃO DE ESPUMAS VIA ALBUMINA In: 51 Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2007, Salvador. **Anais do 51º Congresso Brasileiro de Cerâmica**. , 2007.

MESQUITA, R. M., RIBEIRO, Christiane, BRESSIANI, Ana Helena, Genova, L. A. Produção de nitreto de silício poroso pela técnica do gelcasting In: 51 Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2007, Salvador. **Anais do 51º Congresso Brasileiro de Cerâmica**. , 2007.

RIBEIRO, Christiane, BRESSIANI José Carlos, BRESSIANI, Ana Helena. Estudo da técnica de consolidação utilizando albumina na obtenção de cerâmicas porosas de  $\beta$ -TCP. **17º.Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**. Foz do Iguaçu, Paraná, novembro de 2006.

RIBEIRO, Christiane, BRESSIANI, José Carlos, BRESSIANI, Ana Helena. Obtention of TCP porous ceramic using albumin In: Fifth International Latin-american Conference on Powder Technology, 2005, Costa do Sauípe-BA. **Proceedings Fifth International Latin-american Conference on Powder Technology**. 2005.

RIBEIRO, Christiane; CARBONARI, Marcelo; SEPULVEDA, Pilar; KÖNIG JR, Bruno; BRESSIANI, José Carlos; BRESSIANI, Ana Helena. Avaliação da Osteointegração em espumas cerâmicas à base de alumina e zircônia. In: **III CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS**, 2004, Campinas. Programa e livro de resumos. Campinas: 2004.

## RESUMOS

RIBEIRO, Christiane, BRESSIANI, José Carlos, BRESSIANI, Ana Helena. Avaliação de cerâmicas porosas de fosfatos de cálcio obtidas pela técnica de consolidação de espumas In: I Encontro Nacional de Engenharia Biomecânica, 2007, Petrópolis. **Anais do I Encontro Nacional de Engenharia Biomecânica - ENEBI**. Rio de Janeiro, 2007.

RIBEIRO Christiane, BRESSIANI José Carlos, BRESSIANI, Ana Helena. Estudo da obtenção e caracterização de cerâmicas porosas de fosfato de cálcio. **IV CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS - COLAOB**. Caxambu, Minas Gerais, agosto de 2006.

RIBEIRO, Christiane, SEPULVEDA, Pilar, BRESSIANI, José Carlos, BRESSIANI, Ana Helena. Estudo reológico de suspensões cerâmicas à base de fosfatos de cálcio obtidas por gelcasting In: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais- CBECIMAT, 2004, Porto Alegre. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais- CBECIMAT**. , 2004.

RIBEIRO, Christiane, SEPULVEDA, Pilar, BRESSIANI, José Carlos, BRESSIANI, Ana Helena. Suspensões cerâmicas à base de fosfatos de cálcio obtidas por gelcasting In: 48 Congresso Brasileiro de Cerâmica, **Livro de Resumos dos Anais do 48 Congresso Brasileiro de Cerâmica**. Curitiba, 2004.

# OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCERÂMICAS POROSAS À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO PROCESSADAS COM A UTILIZAÇÃO DE ALBUMINA

Christiane Ribeiro

## RESUMO

A reação previsível e positiva das cerâmicas de fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (HAp) e  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), em relação ao meio biológico tem motivado o desenvolvimento de variadas tecnologias visando a obtenção de diferentes microestruturas. Uma microestrutura porosa para estas cerâmicas pode tornar o processo de osteocondução e a resposta de reparação mais acelerada. O processamento coloidal tem sido uma das técnicas mais exploradas no preparo de suspensões para obtenção de cerâmicas porosas devido à pequena quantidade de orgânicos (~5% vol.) e alto teor de sólidos (mínimo 50% vol.), minimizando os riscos de formação de trincas e de retrações exageradas durante o processo de secagem e sinterização. Neste trabalho foi desenvolvida uma nova técnica baseada na metodologia do *gelcasting*, utilizando a ovalbumina como agente de consolidação e de ação espumante simultânea. Para garantir suspensões dispersas com máxima concentração de sólidos foram analisados diferentes fatores como: características do pó, quantidade de dispersante, teor de sólidos e tempo de preparo das suspensões, sendo verificada uma sedimentação mais rápida para suspensões de  $\beta$ -TCP. Para estabelecer a melhor condição de estabilidade e homogeneidade na obtenção das suspensões, mantendo teor de sólidos adequado e viscosidade suficiente para a formação de espuma, foram realizadas medidas de mobilidade eletroforética, sendo obtidos valores de potencial zeta. Em seguida foram feitos estudos reológicos, onde se verificou que suspensões de HAp apresentam viscosidades mais altas que suspensões de  $\beta$ -TCP. Foi observado que as curvas de potencial zeta das suspensões de HAp apresentam ponto isoelétrico em pH de 8,6 e uma condição de maior mobilidade em intervalos de pH acima de 10; para o  $\beta$ -TCP os resultados indicaram um deslocamento do ponto isoelétrico para regiões mais ácidas. Estudo reológico com base no comportamento elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) do agente de consolidação também foi realizado. Foi verificado que a concentração de 6% de albumina é a mais eficaz para produção e estabilidade da espuma, esta variável também foi definida, analisando sua distribuição de tamanho de poros. As espumas obtidas foram caracterizadas quanto às fases cristalinas, por DRX, a microestrutura, por MEV e, por porosimetria de intrusão de mercúrio, obteve-se a distribuição de tamanho de poros. As amostras obtidas foram caracterizadas *in vitro* quanto à dissolução e bioatividade em SBF. Foi selecionada a amostra de composição bifásica, com mesma proporção das fases HAp e  $\beta$ -TCP, para análise de biocompatibilidade e citotoxicidade em ensaios de cultura na presença de osteoblastos. Os resultados desta pesquisa demonstram que a técnica desenvolvida é eficiente na obtenção de cerâmicas porosas de fosfatos de cálcio, podendo ser aplicada a outras cerâmicas e também para outras finalidades. Os ensaios *in vitro* com SBF comprovaram a reatividade das cerâmicas e os ensaios com osteoblastos revelaram que os materiais processados apresentam biocompatibilidade inicial, podendo ser testados *in vivo* com a expectativa de respostas promissoras tanto como substitutos ósseos, quanto *scaffolds* para engenharia de tecidos.

# OBTENTION AND CHARACTERIZATION OF POROUS BIO-CERAMICS BASED CALCIUM PHOSPHATE PROCESSING BY USING ALBUMIN

Christiane Ribeiro

## ABSTRACT

The predictive and positive reaction of calcium phosphate ceramic as hydroxyapatite (HAp) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP), related to the biological environment, has motivated the development of various technologies, regarding the obtention of different microstructures. A porous microstructure for these ceramics can supply bone tissue ingrowth, improving osteoconduction and reparation process. Colloidal processing has been one of the most investigated technique to prepare suspensions for the obtention of porous ceramics due to small amount of organics (5% vol.) and high solids content (minimum 50% vol.), reducing the formation of cracks and shrinkages during drying and sintering. In this work, a new technique was developed, based on gelcasting methodology, using ovalbumin as both consolidator and foaming agent. Dispersed suspensions with maximum concentration of solids were guaranteed by analysis of different factors, as powder characteristics, amount of dispersant, solids content and time of preparation of the suspensions. A faster sedimentation was verified for suspensions of  $\beta$ -TCP. In order the best stability condition and homogeneity to obtain the suspensions was established by suitable solids content and viscosity to foam formation, zeta potential measurements were also performed, followed by rheological studies. It was observed that suspensions of HAp presented higher viscosities than suspensions of  $\beta$ -TCP. The zeta potential results for HAp suspensions showed isoelectric point in pH of 8.6 and an improvement of mobility condition in pH range increase to 10; the  $\beta$ -TCP presented a displacement of the isoelectric point for a more acid range. Rheological study was performed, by elastic ( $G'$ ) and viscous ( $G''$ ) behavior for consolidation agent. It was verified that the concentration of 6% of albumin is the most effective for production and stability of the foam and this variable was also defined by pore size distribution analyses. The sintered foams were evaluated for crystalline phases, by XRD; the microstructure, by SEM and pores size distribution by mercury intrusion porosimetry. The samples obtained were characterized *in vitro* for bioactivity and dissolution in SBF. The samples of biphasic composition with same proportion of HAp and  $\beta$ -TCP phases were selected to biocompatibility and cytotoxicity tests with osteoblasts culture. The results of this research showed that the technique developed is efficient to obtain porous ceramics based on calcium phosphate. In addition, it can be used for other ceramics and different purposes. The *in vitro* tests showed the reactivity of the ceramics in the presence of SBF; the tests in the presence of osteoblasts revealed that the materials obtained present biocompatibility and can be *in vivo* tested with good expectation as bone substitutes or scaffolds for tissue engineering.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 TECIDO ÓSSEO.....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Histologia	
2.1.2 Reparação tecidual	
2.1.3 Fenômenos atuantes na regeneração óssea	
<b>2.2 CERÂMICAS DE FOSFATOS DE CÁLCIO COMO BIOMATERIAIS.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 CERÂMICAS BIFÁSICAS HAp/TCP.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 IMPLANTES POROSOS.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5 PROCESSAMENTO COLOIDAL.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 REOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7 IMPORTÂNCIA DOS SURFACTANTES NO PREPARO DE SUSPENSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>2.8 ESPUMAS.....</b>	<b>33</b>
2.8.1 Formação de espuma	
2.8.2 Efeito Gibbs-Marangoni	
2.8.3 Maturação e Estabilidade da Espuma	
<b>2.9 SISTEMAS DE CONSOLIDAÇÃO CERÂMICA.....</b>	<b>41</b>
2.9.1 <i>Gelcasting</i>	
2.9.2 Cerâmicas Porosas e <i>Gelcasting</i> de Espumas	
<b>2.10 MECANISMO DE CONSOLIDAÇÃO A PARTIR DE PROTEÍNA.....</b>	<b>45</b>
2.10.1 Estrutura das Proteínas	
2.10.2 Atuação das Proteínas	
2.10.3 Albumina procedente do ovo	
2.10.4 Suspensões solidificadas pela ação da Albumina	

<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
	4.1 Materiais.....	56
	4.2 Caracterização física das matérias-primas.....	56
	4.3 Caracterização da albumina.....	57
	4.4 Análise dos surfactantes.....	58
	4.5 Preparo e Caracterização das suspensões.....	58
	4.5.1 Mobilidade eletroforética (potencial zeta)	
	4.5.2 Estudos reológicos	
	4.6 Obtenção e caracterização da espuma.....	61
	4.6.1 Avaliação da Porosidade	
	4.7 Ensaio <i>in vitro</i> .....	63
	4.7.1 Dissolução e Bioatividade em SBF	
	4.7.2 Ensaio de cultura com osteoblastos	
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
	5.1 Caracterização dos materiais de partida .....	68
	5.1.1 Avaliação dos pós cerâmicos	
	5.1.2 Estudo da ovalbumina	
	5.2 Estudo reológico de suspensões de albumina.....	78
	5.3 Estudo da obtenção das suspensões.....	81
	5.4 Estudos para obtenção da espuma.....	88
	5.5 Produção e caracterização de espumas de albumina.....	94
	5.6 Avaliação <i>in vitro</i> .....	104
	5.6.1 Dissolução e Bioatividade em SBF	
	5.6.2 Citotoxicidade/Biocompatibilidade inicial	
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>7.</b>	<b>PROPOSTAS FUTURAS.....</b>	<b>124</b>
<b>8.</b>	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>125</b>
	8.1 Apêndice A – Solução SBF.....	125
	8.2 Apêndice B – Solução DMEM.....	127
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>129</b>

---

---

## INTRODUÇÃO

O ritmo acelerado de desenvolvimento multidisciplinar da área biotecnológica tem impulsionado uma das vertentes da área da engenharia, que trata da obtenção de novos biomateriais. Neste capítulo é abordado, de maneira sucinta, o desenvolvimento dos biomateriais porosos, visando a obtenção de cerâmicas biocompatíveis com o tecido ósseo. Também é enfatizada a importância do acesso aos biomateriais, dentro do contexto sócio-econômico, viabilizando a utilização desta classe especial de materiais a partir do desenvolvimento de novas tecnologias de processamento.

## 1 INTRODUÇÃO

Uma das áreas prioritárias da pesquisa vinculada à biotecnologia refere-se ao desenvolvimento de novos biomateriais. Estes materiais podem ser empregados, durante um período de tempo indeterminado, como um todo, ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais<sup>1</sup>.

As iniciativas do Ministério da Saúde em parceria com o Ministério da Ciência e Tecnologia com relação à biotecnologia voltada à nacionalização de implantes ganharam impulso a partir de 2004, quando, em consonância com a tendência mundial, aproximou-se a atividade de pesquisa à política nacional de saúde. A mudança de enfoque foi estabelecida a partir da construção da Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Saúde, permitindo que os estudos atendessem, prioritariamente, aos princípios e às necessidades do Sistema Único de Saúde (SUS). Uma das contribuições foi a criação de Redes de Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia, como a Rede Multicêntrica de Avaliação de Implantes Ortopédicos (Remato)<sup>2</sup>.

Esta iniciativa tem incentivado a busca de produtos para implantes cada vez mais variados em termos de composição, função e estrutura. O desenvolvimento de novos materiais, dentro deste contexto, é dirigido por produtos que possam não só aumentar e/ou manter a qualidade de vida, mas que também reduzam o custo do atendimento médico, seja por redução de complicações, diminuição da necessidade de revisões ou do período de estadia hospitalar, mantendo um alto desempenho<sup>3</sup>.

De acordo com o Ministério da Saúde e Ministério de Ciência e Tecnologia, só os biomateriais de natureza ortopédica responderam, entre 2006/2007, por um orçamento de R\$ 8,5 milhões provando sua real importância também no contexto econômico<sup>2</sup>

Com a geração das cerâmicas avançadas houve uma revolução no 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*, as principais são: alumina, zircônia, hidroxiapatita, fosfatos de cálcio, alguns silicatos que constituem os biovidros, e algumas cerâmicas covalentes. Atualmente, mais de 25% dos implantes realizados na área da ortopedia são produzidos utilizando material cerâmico<sup>4, 5, 6</sup>.

No caso específico dos biomateriais cerâmicos à base de fosfatos de cálcio sintéticos, existe uma sinergia entre a medicina e a engenharia de tecidos, já que fosfatos

de cálcio confeccionados sob a forma de matrizes porosas se adequam em situações para regeneração de tecido (scaffolds), além de serem utilizados como enxerto ósseo <sup>7</sup>. Estas cerâmicas também podem ser aplicadas, em sistemas de liberação controlada de fármacos em sítios doentes, potencializando sua ação local e minimizando os efeitos indesejados de intoxicação da parte sadia não comprometida <sup>8</sup>.

Vários materiais osteocondutivos, como a hidroxiapatita (HAp) e o fosfato tricálcico (TCP), têm sido pesquisados para este fim. Um material é considerado osteocondutivo e osteointegrado quando se liga quimicamente à superfície do osso sem a interposição de tecido fibroso. Neste caso, também pode ser denominado bioativo <sup>9, 10</sup>. A osteocondução refere-se à habilidade do implante em dar suporte para o crescimento de tecido ósseo sobre sua superfície. Quando um implante existe sem a presença de um tecido fibroso, a ligação com o tecido é muito resistente e há significativa rigidez do sistema osso-implante. Biomecanicamente, a interface de união tecido/ implante, é mais forte que o próprio osso situado próximo do implante e, qualquer tentativa de remoção levaria à fratura do osso ou do material (implante), mas a interface permaneceria intacta. Quando há formação de tecido fibroso, o implante possui mobilidade, podendo levar a infecção e reabsorção óssea ao seu redor <sup>11, 12</sup>.

A osteocondução também é otimizada quando são utilizados materiais que não apenas apresentam a composição química semelhante à do osso, mas também mimetizam a estrutura óssea <sup>6</sup>. Tentativas de reproduzir a estrutura porosa do tecido ósseo encontram-se ainda limitadas pelo fato da resistência mecânica dos materiais fabricados artificialmente ser muito baixa <sup>13, 14</sup>.

Existe uma necessidade real quanto ao desenvolvimento de materiais cada vez mais sofisticados e especializados dentro da área médica, a um custo acessível. Neste sentido, as expectativas quanto ao uso de técnicas alternativas como a utilizada nesta pesquisa são sempre promissoras. Tópicos como a utilização de menores quantidades de energia durante a manufatura, o impacto quanto ao descarte de subprodutos ou componentes secundários durante o processo demandam de novos estudos e recursos.

Tem-se buscado explorar novos mecanismos de consolidação, visando a obtenção de materiais com diferentes porosidades devido a existência de uma demanda especial por cerâmicas porosas para que atendam requisitos específicos, inclusive como implantes <sup>15</sup>. A manufatura de biomateriais com tecnologias economicamente eficientes e ecologicamente seguras coloca maior ênfase na contínua pesquisa voltada à melhora da qualidade de vida e obriga a considerar interconexões e tecnologias afins, juntamente com

## INTRODUÇÃO

desempenho e projetos integrados. Exemplo disso, é o sofisticado “casamento” entre as áreas da Biologia e da Engenharia que deu origem à Engenharia de Tecidos que atualmente faz uso também de cerâmicas porosas.

As variadas técnicas de conformação têm contribuído também para o avanço nas pesquisas de biomateriais porosos <sup>16</sup>. Cerâmicas porosas obtidas a partir da consolidação de espumas apresentam características para a utilização em implantes ósseos <sup>17</sup>. Estas estruturas, em particular, são bastante interessantes devido ao conjunto de propriedades, como por exemplo, a configuração dos poros (tamanho, forma e distribuição) capaz de resultar em uma osteointegração adequada quando estão atuando como substitutos ósseos. O processamento via úmida, com base em uma suspensão cerâmica preparada pela técnica do *gelcasting* de espuma oferece um alto grau de liberdade de formatos, obtendo-se as mais variadas e complexas geometrias, devido às facilidades de moldagem <sup>18</sup>. A introdução de técnicas de processamento como esta tem apresentado bons resultados no desenvolvimento de cerâmicas para implantes e representa uma tendência emergente neste campo de aplicação <sup>17, 19</sup>.

---

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A grande variedade de biomateriais disponíveis é um reflexo da atual diversidade que está relacionada tanto a diferentes composições, quanto a variadas técnicas de síntese ou metodologias de processamento. Esta condição permite obter materiais com microestruturas variadas, podendo acarretar em propriedades diferenciadas mesmo para materiais de mesma composição. Apesar da crescente produção de trabalhos envolvendo reparação óssea, ainda não existe um consenso que define a “melhor técnica” de síntese ou processamento que remete ao “melhor material”, considerando que nenhum deles conseguiu reproduzir as propriedades do tecido ósseo como um todo. Por isso, o conhecimento de como o tecido ósseo se comporta perante um novo material e durante a reparação é de extrema importância na avaliação de novos implantes. Neste capítulo são enfatizados conceitos que servem de sustentação para este estudo, como o detalhamento das questões que envolvem o tecido ósseo; os derivados inorgânicos à base de fosfatos de cálcio sintéticos, universalmente aceitos como biocerâmicas; a ciência das espumas e as técnicas de processamento coloidal, assim como aspectos de reologia que vem sendo introduzidos como uma ferramenta importante na otimização de suspensões na obtenção de cerâmicas porosas de boa qualidade, podendo se tornar uma das metodologias mais relevantes, também para obtenção de biomateriais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 TECIDO ÓSSEO

#### 2.1.1 Histologia

A classificação baseada no critério histológico admite apenas duas variantes do tecido ósseo: o tecido ósseo cortical ou compacto (denso) e o tecido ósseo trabecular ou reticulado (esponjoso). Cerca de 75% do tecido ósseo é formado pela matriz compacta, e a esponjosa está compreendida em 25%<sup>20</sup>. O pico de tecido ósseo mineralizado é alcançado entre 30 e 40 anos de idade, sendo maior em homens que em mulheres. Alguns anos após esse pico, começa a ocorrer perda progressiva de tecido mineralizado, aproximadamente 3,3% ao ano em homens e 1% ao ano em mulheres, tanto de massa cortical como trabecular<sup>21</sup>.

A partir do corte transversal de um osso longo típico, é possível observar a olho nu, próximo a superfície externa, a presença do osso cortical e, na superfície interna, o osso trabecular, Figura 2.1. Essas variantes apresentam o mesmo tipo de célula e de substância intercelular, diferindo entre si apenas na disposição de seus elementos e na quantidade de espaços medulares. O tecido ósseo trabecular apresenta espaços medulares mais amplos, sendo formado por várias trabéculas, dando aspecto poroso ao tecido. O tecido ósseo cortical, praticamente compacto, não apresenta espaços medulares, existindo, no entanto, além dos canalículos, um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos: canais de Volkmann e canais de Havers<sup>22</sup>.

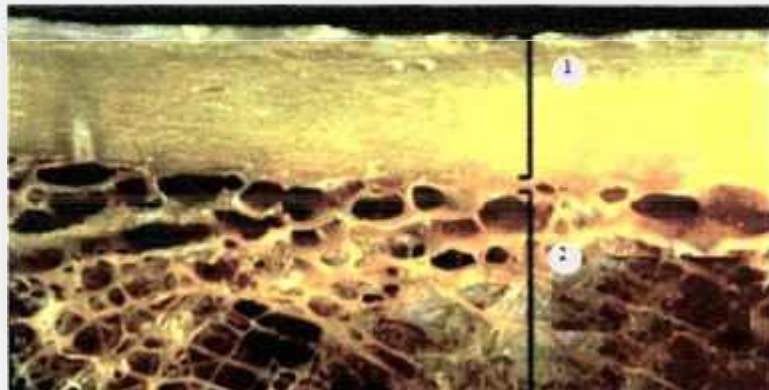


Figura 2.1– As duas variantes da macroestrutura óssea: 1 (osso cortical) e 2 (osso trabecular)<sup>23</sup>.

Os canais de Volkmann partem da superfície do osso (interna ou externa), possuindo uma trajetória perpendicular em relação ao eixo maior do osso. Esses canais comunicam-se com os canais de Havers, que percorrem o osso longitudinalmente, podendo comunicar-se por projeções laterais. Ao redor de cada canal de Havers, é possível observar várias lamelas concêntricas de substância intercelular e de células ósseas, como mostra a Fig. 2.2. Cada conjunto formado pelo canal central de Havers e por lamelas concêntricas é denominado sistema de Havers ou sistema haversiano.

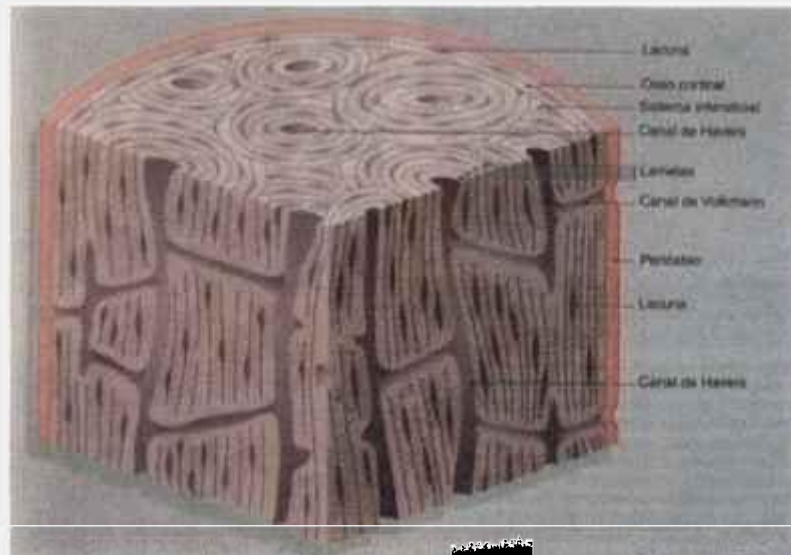


Figura 2.2 – Estruturas que constituem o osso compacto <sup>22</sup>.



Figura 2.3 – Osso esponjoso (aumento de 50X). Rede de trabéculas ósseas separadas por espaços intercomunicantes contendo medula <sup>23</sup>.

Além da matriz extracelular, o tecido ósseo é composto por células que se diferenciam em osteócitos, osteoblastos e osteoclastos.

**Osteócitos:** são as células mais abundantes do tecido ósseo, representando cerca de 95% do componente celular deste tecido. Originam-se a partir de osteoblastos, uma transformação que leva aproximadamente 3 dias, no qual a célula sintetiza um volume de matriz extracelular 3 vezes maior que o volume da própria célula<sup>24</sup>. O tempo de vida de um osteócito está estimado em 25 anos, sendo que a porcentagem de osteócitos mortos aumenta com a idade do indivíduo, sendo, em média 1% ao nascer e 75% quando o indivíduo atinge oitenta anos<sup>25</sup>. Os osteócitos estão localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea. Destas lacunas formam-se canalículos que se dirigem para outras lacunas, tornando assim a difusão de nutrientes possível graças à comunicação entre os osteócitos. Os osteócitos têm papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea<sup>26, 27, 28</sup>.



Figura 2.4 – Osteócito visualizado em uma lacuna óssea<sup>22</sup>.

**Osteoblastos:** sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, composta por colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas. Também concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Durante a alta atividade sintética, os osteoblastos destacam-se por apresentar muita basofilia (afinidade por corantes básicos). Possuem sistema de comunicação intercelular semelhante ao existente entre os osteócitos. Os osteócitos inclusive originam-se de osteoblastos, quando estes são envolvidos completamente por matriz óssea<sup>28</sup>. Neste caso, sua síntese protéica diminui e o seu citoplasma torna-se menos basófilo. Os canais de cálcio de osteoblastos podem ser estimulados sob estiramento, possibilitando aumento de cálcio intracelular, que permite uma liberação mais acentuada da reserva de cálcio destinada à matriz óssea<sup>29</sup>.



Figura 2.5- Disposição (lado a lado) típica de osteoblastos em tecido ósseo <sup>23</sup>.

**Osteoclastos:** participam dos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo. São células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos. A atividade destas células é comandada pela calcitonina e paratormônio. Nos osteoclastos jovens, o citoplasma apresenta uma leve basofilia que vai progressivamente diminuindo com o amadurecimento da célula, até que o citoplasma finalmente se torna acidófilo (com afinidade por corantes ácidos). Dilatações dos osteoclastos, através da sua ação enzimática, escavam a matriz óssea, formando depressões conhecidas como lacunas de Howship. Os osteoclastos se encontram frequentemente nestas cavidades (lacunas de Howship) produzidas pela sua própria ação, todas elas polarizadas, com os núcleos na parte distal que não estão em contato com a trabécula óssea e os prolongamentos celulares em forma de folha, na zona de contato com a superfície óssea, aumentando a área de contato <sup>22, 30</sup>.

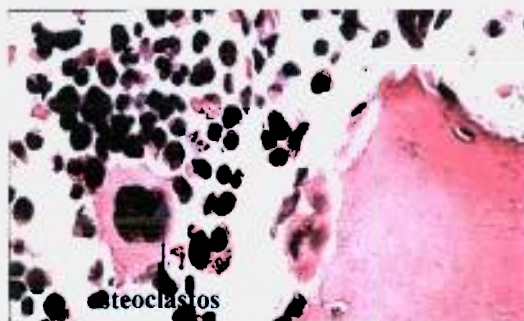


Figura 2.6- Osteoclastos em atividade de reabsorção em lacunas de Howship <sup>23</sup>

**Matriz óssea:** 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 (hidroxiapatita e fosfato de cálcio amorfo), 30-40% de colágeno e o restante (aproximadamente 5%) são proteínas e carboidratos, principalmente conjugados com glicoproteínas (osteonectina, osteocalcina, etc). As proporções dos diversos componentes variam com a idade, localização e condição metabólica. Os sais presentes no tecido ósseo são responsáveis pela dureza e rigidez do osso. Os íons principais que compõem a parte mineral do osso são: cálcio, fosfato, hidroxila e carbonato; os íons menos numerosos são relativos ao citrato, responsável pela captura de íons cálcio, formando um complexo que serve de base à formação da HAp do osso, magnésio, sódio, potássio, fluoreto, cloreto, ferro, zinco, cobre, alumínio, chumbo, estrôncio, silício e boro, muitos destes estando presentes apenas em quantidades muito pequenas <sup>31, 32</sup>.

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 <sup>33, 34</sup>.

A maioria dos ossos está envolta por uma dura camada de tecido conjuntivo, o perióstio, formado por duas camadas: uma interna, caracterizada como osteogênica (fornecedora de células para a formação de tecido ósseo) e a externa, fibrosa, composta de fibras colágenas e vasos sanguíneos. Já o endóstio é uma variedade de tecido conjuntivo presente na porção interna do osso que envolve ou reveste a cavidade medular, também possuindo potencial osteogênico <sup>22</sup>.

### **2.1.2 Reparação tecidual**

O tecido ósseo se encontra entre os mais especializados tecidos do corpo humano, pela presença de características únicas, aliando resistência estrutural à capacidade de regeneração. Por ser uma estrutura inervada e irrigada, os ossos apresentam altas sensibilidade e capacidade de regeneração. O osso revela uma capacidade de reparação de fraturas sem que seja observada qualquer cicatriz. O mecanismo deste padrão de reparação é considerado uma recapitulação da osteogênese que ocorre no embrião e durante o período de crescimento <sup>35</sup>.

O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo e essencialmente uma repetição de eventos de desenvolvimento. Este processo tem muito em comum com o reparo dos tecidos moles. Ambos mostram fases similares no processo de reposição celular: fases de inflamação, proliferação e remodelagem. As células que participam deste processo incluem os leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e da matriz óssea. Também existe a participação de diferentes tipos de proteínas e uma expressão genética ativa que restaura a integridade natural dos ossos <sup>22</sup>. Quando o osso é lesionado, os vasos sanguíneos produzem uma hemorragia local que acarreta na formação de coágulo. Durante a reparação, as células e a matriz óssea, agredidas e o coágulo formado são removidos por fagocitose. Concomitantemente, o perióstio e o endóstio se encarregam da proliferação de fibroblastos e células osteoprogenitoras, formando um novo tecido celular <sup>40</sup>. Após uma semana, o tecido formado ao redor da lesão ou de um implante, é transformado em tecido ósseo imaturo pela mudança das células de tecido conjuntivo em osteoblastos que iniciam a produção de matriz óssea <sup>36</sup>.

A ação dos osteoclastos no reparo ósseo tem várias explicações e etapas simultâneas. Uma delas refere-se à ocorrência de variação na zona de pressão, onde os níveis de oxigênio e gás carbônico estão diferentes do usual, devido a compressão dos vasos sanguíneos. Isto faz com que osteoclastos venham de outras áreas adjacentes ou estimulem os inativos. Outra possibilidade seria a formação de novos osteoclastos e também a transformação de monócitos em osteoclastos <sup>25,26</sup>.

As células encontradas nas fases iniciais dos processos de reparação contêm uma variedade de mediadores químicos e agentes quimiotácteis, que são armazenados no interior das células e liberados durante este processo. A liberação destes agentes provoca alterações nas membranas celulares e o envolvimento no transporte de íons para o interior da célula <sup>37</sup>. A liberação de agentes químicos estimula a presença de fibroblastos e células endoteliais no sítio lesado. As células endoteliais são essenciais para a formação de novos capilares, que transportam os metabólitos para o tecido em reparação <sup>22</sup>.

Modelamento e remodelamento ósseos são eventos atuantes na etapa de reparação do osso. Esses eventos podem ser incitados por microlesões, estímulos mecânicos, estímulos combinados ou por mecanismos desconhecidos <sup>38</sup>. Denomina-se “modelamento” o processo de construção do osso, havendo deposição óssea sem reabsorção prévia, o que provoca mudanças em sua forma e tamanho, e “remodelamento” o processo de reconstrução, no qual a reabsorção óssea é seguida por formação frente à

sobrecarga mecânica<sup>39</sup>. Assim, quando a reabsorção óssea ocorre a nível do periósteo ou endósteo, o processo é denominado modelamento, porém se a atividade dos osteoclastos resulta na formação de cavidades de reabsorção no osso, sendo preenchidas por osso novo pelos osteoblastos, o processo é chamado remodelamento<sup>40</sup>

A reparação óssea para implantes odontológicos, por exemplo, depende de vários fatores, como profundidade e ângulo da lesão, vascularização e imobilização dos implantes<sup>41, 42</sup>.

Uma alternativa para melhorar a reparação óssea e tecidual nas diversas especialidades odontológicas ou médicas é a utilização de fatores de crescimento, como BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas), PRP (plasma rico em plaquetas), que individualmente ou em associações influenciam positivamente na reparação<sup>43</sup>. Os fatores de crescimento formam um grupo de mediadores biológicos que regulam os eventos celulares importantes no reparo dos tecidos e proliferação de células incluindo, diferenciação, quimiotaxia e formação de matriz. As proteínas TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 destacam-se entre os fatores de crescimento e transformação (TGF) envolvidos com a reparação do tecido conjuntivo, em geral, e regeneração óssea, tendo como função mais importante, a quimiotaxia e a mitogênese dos precursores de osteoblastos e sua habilidade para estimular deposição da matriz de colágeno na reparação da ferida e do osso<sup>44</sup>.

O osso tem uma arquitetura estrutural própria para suportar forças compressivas. Os vasos intra-ósseos estão protegidos pela estrutura rígida do osso. Uma pressão contínua, quando aplicada sobre um tecido vivo pode induzir a formação de necrose. Necrose por compressão é observada freqüentemente na prática médica, sobretudo em tecidos moles. Estudos demonstraram que o osso suporta sem necrose as forças de compressão obtidas pelo novo osso que está sendo formado. Esta força de compressão obtida por uma formação óssea compressiva sofre uma queda gradual no decorrer de vários meses. Este fenômeno não se dá por necrose e reabsorção óssea, mas sim por alteração viscoelástica do próprio material ósseo e pela gradual remodelação<sup>45, 46</sup>.

A tensão sobre o tecido de reparação parece ser um importante fator para a proliferação e evolução do tecido a ser reparado. Considerando a reação do tecido ósseo ao movimento, pode-se afirmar que o movimento relativo causa uma tensão, gerando uma deformação até os níveis de tolerância suportados pelo tecido de reparação. Quando o movimento aumenta e a tensão supera os limites do tecido, uma condição de instabilidade pode ser gerada<sup>47</sup>. Se a tensão existente for baixa, existe insuficiente indução mecânica

para a diferenciação tecidual, esta situação, muitas vezes pode acarretar em reabsorção do material enxertado <sup>46,47</sup>.

Normalmente, os limites de tolerância de tensão são diferentes para cada variedade de tecido de reparação, sendo o tecido de granulação que melhor tolera a tensão, seguido, em ordem decrescente pelo tecido fibroso denso, tecido cartilaginoso, osso esponjoso e o osso lamelar <sup>48</sup>.

### 2.1.3 Fenômenos atuantes na regeneração óssea

Os fenômenos elétricos acompanham os processos biológicos em todos os tecidos, incluindo o osso <sup>49</sup>. O osso apresenta-se como um material biológico rico em colágeno, que é responsável pela propriedade da piezoelectricidade dos ossos e tendões <sup>50</sup>. A piezoelectricidade é um fenômeno observado em cristais anisotrópicos nos quais deformações mecânicas provocam polarizações elétricas, seguindo determinadas direções <sup>51, 52</sup>. Estudos desta natureza tiveram início em 1892 com Jacques Arsène d'Arsonval, contribuindo para o desenvolvimento da tecnologia elétrica para caracterização dos tecidos biológicos e estímulo da osteogênese <sup>50, 53, 54</sup>. A piezoelectricidade é responsável pela adaptação desses tecidos às solicitações mecânicas que o meio externo impõe, por isso o biomaterial deve ser apto a induzir a formação de cargas elétricas superficiais compatíveis com o osso, quando em contato com os fluidos fisiológicos <sup>55</sup>.

Já é postulado, desde muito tempo, que o predomínio de cargas negativas estimula o crescimento ósseo. Um dos pioneiros deste estudo foi Wolff em 1870, desde então, cargas elétricas e reparo ósseo têm sido associados <sup>53, 56</sup>.

A literatura relata que a propriedade piezoelétrica do osso determina que as áreas eletronegativas atraiam os osteoblastos e áreas eletropositivas ou neutras, os osteoclastos <sup>57</sup>.

Diferentes estudos têm relatado que o estímulo elétrico altera a incorporação de íons  $\text{Ca}^{+2}$  nas células. O transporte de cálcio acoplado a atividade da ATPase é essencial para o crescimento e reparo ósseo. O mecanismo pelo qual as cargas elétricas promovem osteogênese ainda é assunto de especulação científica. Há relatos de que a presença destas cargas eleva o potencial da membrana celular, afetando a função das proteínas e lipídeos na membrana, mostrando efeitos positivos na promoção e estímulo da osteogênese <sup>58</sup>.

As fontes de energia elétrica residem intrinsecamente no interior do osso, resultantes do esforço aplicado sobre o tecido ósseo, desse modo os componentes extracelulares do osso, principalmente o colágeno, agem como transdutores para converter energia mecânica, em elétrica <sup>56</sup>. O osso mecanicamente comprimido gera um potencial elétrico. As áreas de compressão tornam-se eletronegativas e as de tração, eletropositivas <sup>53, 59</sup>.

Em um osso longo, por exemplo, quando se coloca um eletrodo de registro na epífise e outro na metáfise, o da metáfise é negativo, em relação ao da epífise. Quando um eletrodo metafisário é progressivamente afastado da epífise, a negatividade vai decrescendo, tendendo a eletropositividade no meio da diáfise <sup>59</sup>.

Na área negativa observa-se um fluxo sangüíneo lento, uma pressão de O<sub>2</sub> baixa, pH alto e osteogênese <sup>59, 60</sup>. Quando uma determinada área do osso é fraturada, ela se torna negativa e a eletronegatividade de metáfise torna-se mais acentuada. À medida que a fratura cicatriza, as diferenças de potencial voltam ao normal <sup>53, 59</sup>.

Sabendo-se que a deformação ocorrida no osso é da ordem de poucos angstroms, a literatura menciona que a possibilidade do melhor mecanismo de interação esteja associada à geração de fluxo de fluido, o qual permite aumento de nutrientes e de transporte metabólico dentro dos canálculos dos ossos <sup>61</sup>.

Os ossos e tecidos conjuntivos quando deformados geram potenciais elétricos locais, denominados "potenciais gerados por deformação" (SGPs). Esta deformação mecânica gera gradientes de pressão dentro dos canálculos do tecido ósseo, que são captados pela membrana celular do osteócito e conseqüente deslocamento do fluxo de fluido intersticial existente <sup>29, 62</sup>. Este fenômeno contribui para o aumento do transporte de nutrientes e metabólitos. Desta forma, sugere-se que o osteócito seja a célula responsável pela transdução do estímulo mecânico em biológico <sup>62</sup>.

Estudos relatam que a movimentação deste fluido seja importante para que o osso perceba e responda aos estímulos mecânicos <sup>29, 63</sup>. O fluxo cria força de cisalhamento sobre a membrana celular de osteócitos, que agem como sensores de tensão óssea local. O aumento da deformação óssea provoca aumento do fluxo de fluido intersticial <sup>64</sup>.

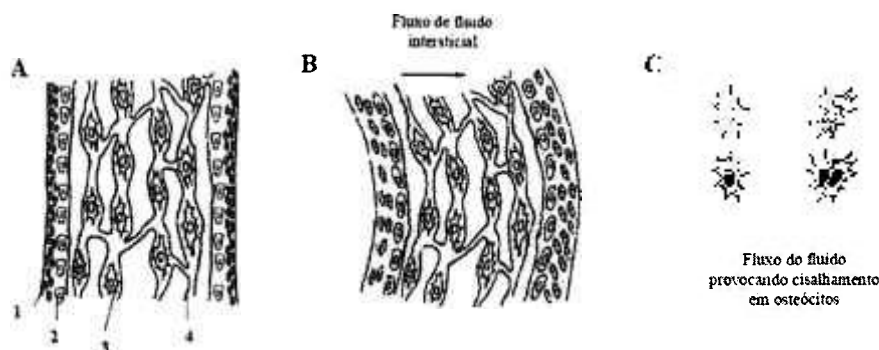


Figura 2.7 – Representação esquemática do processo de remodelamento. (A): 1-periosteio, 2-osteoblastos, 3-osteócito, 4-lacunas ósseas; (B): deformação do osso quando submetido à ação de uma força, promovendo deslocamento do fluido intersticial; (C): fluxo do fluido intersticial que promove cisalhamento entre osteócitos, fator estimulante para o remodelamento ósseo <sup>64</sup>.

Nas últimas décadas, estudos experimentais de cultura celular têm tentado definir qual molécula ou sistema é responsável pela tradução da linguagem do estímulo físico em linguagem biológica <sup>28, 64</sup>. É importante salientar que, embora estes estudos esclareçam fenômenos isolados não podem ser extrapolados para o que acontece com o tecido no organismo como um todo.

Contudo, observa-se que todos estes mecanismos e fenômenos que atuam no processo de reparação devem ser considerados para uma avaliação mais precisa da interação implante/tecido. O comportamento de novos sistemas de implantes com diferentes características estruturais e de superfície só pode ser avaliado seguramente, quando a resposta celular e todos os fenômenos concomitantes são compreendidos.

## 2.2 CERÂMICAS DE FOSFATOS DE CÁLCIO COMO BIOMATERIAIS

Tem-se conhecimento do uso de cerâmicas para implantes desde 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 <sup>5</sup>. 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) <sup>1</sup>. 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 <sup>6</sup>.

Dentre muitos dos materiais sintéticos atuantes nesta área, destacam-se as cerâmicas à base de fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (HAp),  $\beta$ -fosfato tricálcico (TCP) e a composição bifásica dos dois. Os fosfatos de cálcio são totalmente aceitos pelo meio fisiológico, são osteocondutores, têm provado excelência na substituição óssea, permitindo taxas de reabsorção/substituição muito favoráveis <sup>65, 66</sup>.

Cristalograficamente, a HAp é mais similar ao osso natural do que o  $\beta$ -TCP, porém, a razão de reabsorção da HAp é extremamente baixa comparada com a do  $\beta$ -TCP. A velocidade de dissolução do  $\beta$ -TCP é de 3 a 12 vezes maior do que para HAp estequiométrica <sup>6</sup>. 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 <sup>67</sup>. 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  $\lll$   $\beta$ -TCP  $<$   $\alpha$ -TCP, embora esta tendência também seja influenciada pela densidade, distribuição de tamanho de poros, área de superfície específica e pH do meio <sup>68, 69, 70</sup>.

Estudos de sinterização têm demonstrado que a HAp é capaz de atingir altas densidades, mantendo sua estequiometria a temperaturas de sinterização próximas de 1100°C, mais baixas que a necessária para se obter TCP denso. Esta fase apresenta uma temperatura de início de retração mais alta <sup>71</sup>. A presença do TCP na cerâmica de HAp provoca mudanças de comportamento, sobretudo na degradação *in vitro* e *in vivo* <sup>68, 71</sup>.

A biodegradação dos fosfatos de cálcio pode representar a combinação dos seguintes processos <sup>72</sup>:

- 1- *físico*: abrasão, fratura, desintegração.
- 2- *químico*: dissolução, aumento local de Ca e P na superfície.
- 3- *biológico*: redução do pH causado pela atividade celular e fagocítica, resultando no aumento da taxa de biodegradação devido a dissolução.

Os fatores físicos incluem: forma (bloco ou particulado), porosidade, área superficial, cristalinidade e tamanho de grão. Os fatores químicos dependem da composição e substituição iônica no material. Os biológicos incluem queda de pH devido à fatores envolvendo participação celular, infecção osteolítica ou doenças, grau de contato ósseo, tipo de osso, espécie animal, sexo, idade, nível hormonal e predisposição genética <sup>72</sup>.

Estudos sugerem que o mecanismo de degradação de cerâmicas densas de fosfatos de cálcio que exibem alta cristalinidade, é principalmente uma dissolução via líquidos extracelulares, diferente dos cimentos (normalmente baixa cristalinidade e porosidade considerável), que envolvem a participação celular, devido à presença de partículas do cimento que se desprendem do material <sup>65, 72, 73</sup>.

A literatura <sup>72, 74</sup> tem demonstrado que a regeneração óssea pode ser diferente em cada porção (cortical, trabecular ou medular) do osso, pois são diferentes em circulação sanguínea e quantidade de líquidos. A regeneração óssea é maior em sítios corticais, seguida por sítios trabeculares e por último os medulares. Já a biodegradação do material apresenta o comportamento inverso (medular > trabecular > cortical). Consta na literatura que estudos *in vivo* de regeneração e biodegradação, envolvendo HAp e  $\beta$ -TCP foram mais intensos nas cerâmicas de  $\beta$ -TCP que nas de HAp. Foi demonstrado também que a interface osso/implante apresenta boa qualidade óssea, sendo classificada como trabecular para as duas cerâmicas, porém a interface de contato era melhor em cerâmicas de  $\beta$ -TCP do que de HAp, especialmente em sítios corticais <sup>74</sup>. Nos últimos anos, uma série de pesquisadores <sup>75, 76, 77</sup> têm proposto o uso destas cerâmicas (HAp e  $\beta$ -TCP) para implantes ósseos e recobrimento de próteses, porém os parâmetros que afetam processos concorrentes de biodegradação/formação óssea ainda merecem investigações à parte, com objetivo de estabelecer uma relação estrutura/função sob a atuação dos mecanismos biológicos <sup>78</sup>.

### 2.3 CERÂMICAS BIFÁSICAS DE HAp/TCP

As cerâmicas bifásicas passaram a ocupar um destaque especial quando foi demonstrada que a combinação de suas propriedades possibilita o crescimento do osso e facilita a integração do implante <sup>79, 80</sup>. No entanto, a integração entre osso e implante não é

meramente uma simples conexão, mas sim uma série de processos bioquímicos e fisiológicos <sup>81</sup>.

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. Quando porosas, estas cerâmicas podem proporcionar uma fixação biológica, característica de materiais com grande quantidade de poros interconectados, permitindo uma incorporação bem sucedida do material no leito ósseo <sup>82, 83</sup>.

Além da osteogênese há também o comportamento osteocondutivo da cerâmica bifásica <sup>81</sup>. O potencial osteogênico intrínseco das cerâmicas bifásicas é ainda questionado e por isso alguns autores consideram as cerâmicas bifásicas inadequadas para preenchimentos ósseos de grandes proporções, principalmente aqueles que mantêm pouco contato com o osso <sup>84, 85</sup>. Ao contrário, Manjubala et.al. <sup>81</sup> afirma que cerâmicas bifásicas possuem características de osteocondução, podendo ser desenvolvido um potencial osteoindutor em meios biológicos apropriados, e que a formação óssea pode ser analisada em termos de osteoindutividade. A formação de células ósseas e osso trabecular em coelhos, durante 4 semanas, por exemplo, é um indicativo do aumento da osteoindutividade do material. Pode ser deduzido que os novos fibroblastos e osteoblastos que se proliferam e se diferenciam para células ósseas são um reflexo da osteoindutividade que se dá sem a formação de condrócitos. Assim, há uma ossificação induzida, sendo o novo tecido ósseo induzido pelo material bifásico (HAp/ $\beta$ -TCP) e não por uma calcificação patológica. Este comportamento foi provado em experimentos com cães, considerado como uma propriedade intrínseca do material quando são implantados em sítios com lesões ósseas. Além disso, nesse estudo foi observado um aumento na concentração inicial da enzima fosfatase alcalina (ALP) que pode ser usada como um marcador de diferenciação celular em osteoblastos, estando associada à proliferação de células osteogênicas, maturação e atividade de osteoblastos <sup>81</sup>.

Nas cerâmicas bifásicas HAp/TCP, a principal expectativa refere-se à velocidade de reabsorção do implante, que deve ser compatível com a velocidade de formação óssea, para que a redução da resistência do implante seja compensada pelo aumento da resistência do osso formado. Estes dois fenômenos antagônicos abrangem uma questão difícil de ser controlada, principalmente em cerâmicas exclusivamente à base de TCP, podendo, na maioria das vezes, comprometer o desempenho do implante. Com este

intuito, cerâmicas com diferentes razões de HAp e TCP têm sido alvo de estudo na tentativa de um melhor controle da reabsortividade do material.<sup>83, 86, 87</sup>

Estudos de processamento envolvendo cerâmicas bifásicas de microestrutura densa (~95%) já tem demonstrado bons resultados quanto a sua obtenção. A presença da fase TCP torna a sinterização mais difícil, sendo necessária a utilização de temperaturas mais elevadas para promover a mesma densificação que na cerâmica de HAp. Essas cerâmicas são capazes de fornecer uma microporosidade *in situ*, após contato com soluções específicas devido à propriedade de degradação<sup>88, 89, 90</sup>. As cerâmicas bifásicas apresentam comportamento intermediário de degradação e à medida que a reabsorção ocorre, a substituição pelo tecido ósseo é adaptada para o seu crescimento. Este fenômeno representa o elemento diferencial do desempenho biológico das bifásicas<sup>72</sup>.

Em estudos comparativos de reatividade *in vitro* entre cerâmicas bifásicas e cada um de seus componentes, em SBF (Solution Body Fluid), mostram uma reatividade claramente maior das bifásicas<sup>80, 91</sup>. As cerâmicas de TCP apresentam condições cineticamente mais favoráveis à nucleação, no entanto, após período de 3 semanas, a camada fosfática nas cerâmicas de TCP não se apresenta uniforme, com disposição desordenada de glóbulos e mais hidratada que as cerâmicas HAp/TCP<sup>88</sup>. A camada precipitada sobre as cerâmicas de TCP não é de natureza bioativa, sugerindo a presença de espécies diferentes de fosfatos de cálcio, ou seja, não há indícios de espécies de carbonato da provável HCA (hidroxicarbonatoapatita) que é característica de materiais com superfície ativa<sup>88</sup>. A literatura também mostra que a reatividade das bifásicas é influenciada pela razão de TCP/HAp. Desta forma, quanto maior a razão TCP/HAp, maior a quantidade de micro-cristais de HCA<sup>91, 92</sup>.

A propriedade de dissolução do TCP interfere no processo de ossificação na região de contato com o implante. Portanto, a dissolução parcial do TCP em cerâmicas bifásicas produz um aumento na concentração local de Ca e P e conseqüentemente uma precipitação de cristais de apatita que promovem uma mineralização mais rápida do colágeno. Concentrações muito altas de cálcio podem inibir a atividade dos osteoclastos<sup>81</sup>.

Cerâmicas bifásicas constituídas de HAp/  $\beta$ -TCP ou HAp/ $\alpha$ -TCP têm sido avaliadas na presença do tecido ósseo e em tecidos moles. Os resultados apresentados por Li Yubao et al.<sup>87</sup> demonstram que as cerâmicas bifásicas são biologicamente mais ativas que HAp pura, além disso o comportamento biológico da cerâmica bifásica 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. A presença de vacâncias de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{OH}^-$ , na estrutura da apatita-TCP permite que moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  ocupem estes sítios, a incorporação de  $\text{H}_2\text{O}$ , neste caso, pode aumentar 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 <sup>87, 91</sup>.

Alguns trabalhos tem incorporado também a macroporosidade em estruturas cerâmicas de HAp e TCP, visando melhores resultados na osseointegração. Estas cerâmicas também podem incorporar biomoléculas ou fármacos que são liberados à medida que o material é reabsorvido <sup>93</sup>. 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 <sup>8</sup>. A distribuição de poros na microestrutura, neste caso, é o principal requisito para a eficiência de sistemas de liberação de fármacos <sup>94</sup>. As cerâmicas bifásicas podem ser testadas para a mesma finalidade.

A forma macroporosa das cerâmicas bifásicas pode incitar a formação óssea pela osteocondução e promover uma taxa de degradação compatível com a cinética de crescimento ósseo que permite a vascularização e o seu remodelamento <sup>84, 95</sup>. O número de trabalhos na área de fosfatos de cálcio macroporosos é grande, demonstrando a sua importância como material de regeneração óssea <sup>96, 97, 98, 99</sup>. Além de serem materiais ótimos para regeneração de tecido ósseo *in situ*, as cerâmicas de fosfatos de cálcio porosas oferecem outros potenciais de aplicação na área de engenharia de tecidos, como por exemplo, substratos (*scaffolds*) <sup>100, 101</sup>.

## 2.4 IMPLANTES POROSOS

A necessidade de novos materiais para o tratamento de doenças apresenta várias oportunidades de pesquisa. O campo de biomateriais e engenharia de tecido vem experimentando uma série de desafios à medida que são desvendados os mecanismos biológicos de muitas doenças. Estes avanços têm motivado a exploração de materiais mais elaborados para o desenvolvimento de novos implantes e órgãos híbridos.

Fosfatos de cálcio macroporosos, em particular hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcico têm atingido aplicação considerável como materiais para substituição óssea. Suas aplicações incluem, por exemplo, próteses para reposição ou para suporte em partes do

fêmur, joelho, dentes, tendões, ligamentos, materiais para reparos decorrentes de problemas de periodontia, reconstrução maxilofacial, neurocirurgia do crânio, aumento e estabilização do maxilar, ou para o preenchimento de cavidades ósseas após cirurgia de tumores<sup>6, 102</sup>.

Nos últimos anos, a utilização destas cerâmicas como “scaffolds” emergiu como uma ferramenta revolucionária na engenharia de tecido devido sua capacidade de simular a matriz extracelular e promover o crescimento de células. Atualmente, o uso destes suportes representa um passo primordial para Engenharia de tecido conceituada na cultura prévia de células para o desenvolvimento de tecido maduro e órgãos híbridos<sup>103, 104</sup>.

Estes substratos ou suportes, conhecidos como “scaffolds” (Fig.2.8), podem fornecer dois mecanismos para melhorar a regeneração: 1 – fornecem um suporte permissivo para migração e adesão celular e crescimento fora do hospedeiro; 2 - servem como veículos para liberação controlada de fármacos capazes de promover o crescimento e a sobrevivência durante a regeneração e, veículos para terapia genética (ferramenta poderosa na engenharia de tecido, que pode ser usada para regular a expressão de proteínas intracelulares, sendo vital para a regeneração do tecido)<sup>105, 106</sup>.

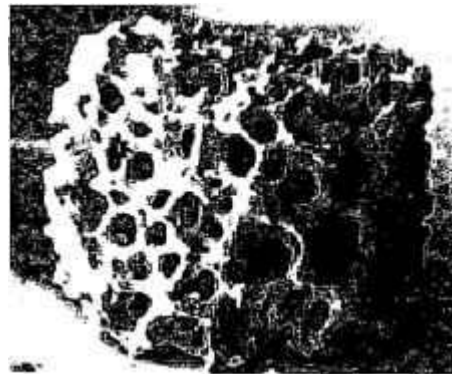


Figura 2.8 – “Scaffold” obtido a partir do fosfato tricálcico (aumento de 20 vezes)<sup>105</sup>.

Estes substratos, quando modificados pela adição de células ou biomoléculas, são capazes de estimular a regeneração em um período de tempo menor, podendo funcionar como materiais híbridos de alto valor terapêutico melhorando ainda mais a formação de tecido *in vivo*<sup>106</sup>.

Dentre os inúmeros fatores que devem ser satisfeitos para que os materiais sejam aplicados como matrizes para regeneração do tecido ósseo têm-se as seguintes características <sup>100, 104</sup>:

- Alta porosidade, boa distribuição espacial e uniformidade da estrutura para promover ancoramento homogêneo de células e rápida regeneração do tecido.
- Composições biodegradáveis ou bioativas, isto é, possuem alta reatividade com o tecido ósseo.
- Boas propriedades mecânicas sob condições fisiológicas a fim de aumentar a durabilidade do material e maximizar o uso pelas células do doador. Deve-se enfatizar que a maior limitação das biocerâmicas produzidas artificialmente se encontra em sua baixa tenacidade e baixa capacidade de suportar as variações de carga multiaxiais e cíclicas impostas pelo meio fisiológico.
- Mecanismos de indução celular, que no caso, dos implantes ósseos é governado por fatores de biomecânica (forças físicas) e microambiente/matriz extracelular. Materiais como colágenos, hidroxiapatita, fosfatos de cálcio, vidros bioativos podem auxiliar a adesão de células.

A invasão de tecido ósseo em implantes porosos é afetada pela geometria e osteocondutividade do substrato. Sabe-se da literatura que um implante poroso deve ter tamanho de poro suficientemente grande para o desenvolvimento de osso mineralizado <sup>107</sup>. Este valor tem sido variado, mas em geral acredita-se que tamanhos de poros de 100-400  $\mu\text{m}$  sejam ótimos, com poros interconectando o substrato, permitindo que seja aberta para acesso por circulação sanguínea e formação de tecido vascularizado. Quanto maiores os canais que conectam os poros melhor é o acesso pelos fluidos corpóreos, favorecendo atividade de osteoblastos, nova formação óssea e posterior reabsorção cerâmica <sup>107, 108</sup>

Em geral, o tamanho dos canais é o fator limitante para osteocondução ser efetiva e atingir o centro do implante. Muitos materiais porosos disponíveis comercialmente e estudados apresentam porosidade elevada, no entanto, sem comunicação dos poros, o que inviabiliza o crescimento de tecido no interior do implante <sup>109</sup>. Também, materiais com canais pequenos não permitem a migração de células e vascularização que é essencial para a formação do tecido novo. Em geral, o núcleo de células dos mamíferos é maior que 10  $\mu\text{m}$ , portanto, poros menores que 10  $\mu\text{m}$  dificilmente serão permissivos a osteocondução <sup>106</sup>.

Existe uma preocupação quanto ao tamanho exagerado dos poros, que pode dificultar a atividade celular, como consequência da coagulação das hemáceas no núcleo do poro, devido ao acúmulo destas células. O tamanho das hemáceas é estimado em 3  $\mu\text{m}$  e acredita-se que uma quantidade de 10 hemáceas já seja suficiente para incitar uma resposta compatível para regeneração óssea, no entanto encontra-se na literatura que o diâmetro de poro ótimo é no mínimo de 100  $\mu\text{m}$  <sup>110</sup>.

É importante salientar que o conceito de material poroso, sob o ponto de vista da biocompatibilidade, está fundamentado em dimensões de poros completamente diferentes do que é usual para a Química. Segundo o Sub-comitê para a caracterização de sólidos porosos da IUPAC <sup>111</sup>, materiais macroporos apresentam poros com dimensões maiores que 50 nm. Contudo, para que um biomaterial seja considerado macroporoso é necessário que ele apresente poros da ordem do diâmetro Harvesiano (50 a 250  $\mu\text{m}$ ) <sup>112</sup>.

Tem-se sugerido que a porosidade em materiais osteocondutores possui uma função ainda mais específica que somente o de dar suporte a invasão por tecido <sup>110</sup>. Tem sido proposto que materiais osteocondutivos podem ser transformados em osteoindutivos através de uma otimização da geometria, composição química e estrutura porosa quando são utilizados aditivos especiais <sup>84, 113, 114</sup>.

Na presença de poros em superfícies planas verifica-se a deposição de tecido ósseo nas concavidades <sup>84</sup>. Ainda não se entende quais as condições específicas que promovem a indução óssea. Nesses casos, é sugerido que a combinação do potencial osteocondutor do material com a diminuição do fluxo sanguíneo na região do poro estimule a diferenciação de células mesenquimais para osteoblastos <sup>84, 107, 113</sup>.

## 2.5 PROCESSAMENTO COLOIDAL

Materiais cerâmicos podem ser conformados por diferentes rotas de processamento, uma delas consiste no processamento coloidal. O termo colóide descreve partículas dimensionalmente pequenas, da ordem de  $10^{-3}$  a 1  $\mu\text{m}$ ; por isso sistemas coloidais são caracterizados por apresentarem uma grande área de contato entre suas partículas e o meio dispersante e pela forte atuação de forças superficiais <sup>115</sup>. Os avanços tecnológicos da ciência coloidal têm colaborado para melhoria de técnicas de processamento cerâmico como: moldagem por injeção, extrusão, slipcasting, tapecasting, gelcasting, coagulação direta, entre outras <sup>115, 116</sup>.

O processamento coloidal é uma técnica vantajosa, já que permite a manipulação e controle das forças interpartículas, minimizando a ocorrência de heterogeneidades microestruturais, além do acompanhamento durante todo processo de fabricação, sendo introduzido como um novo mecanismo para obtenção de materiais cerâmicos com geometrias complexas e de boa qualidade <sup>115</sup>.

Em processo de consolidação a seco, a aglomeração espontânea do pó gerada por forças de van der Waals, induze a obtenção de uma microestrutura não homogênea, resultando em propriedades mecânicas deficientes <sup>117</sup>. O processamento coloidal é capaz de evitar estas aglomerações espontâneas, devido a atuação das forças de repulsão (eletrostáticas, estéricas ou eletroestéricas), tornando-se uma das metodologias mais relevantes para obtenção de biocerâmicas. Atualmente, as técnicas por slipcasting e gelcasting são as mais exploradas para produção de materiais cerâmicos voltados para área médica <sup>118, 119</sup>.

A maioria das técnicas existentes para conformação cerâmica, caracterizadas como “near net shape” são empregadas na presença de aditivos orgânicos que fornecem uma conformabilidade adequada para pastas ou suspensões. Estes aditivos conhecidos como ligantes, são adicionados para facilitar o manuseio dos corpos <sup>115, 120</sup>.

A combinação de diferentes componentes adicionados ao pó cerâmico pode afetar diretamente o comportamento da dispersão e o empacotamento das partículas na suspensão. Quando a combinação destes aditivos não permite atingir uma condição de homogeneidade, pode ocorrer uma variação de densidade no corpo à verde, gerando gradientes de tensões na peça durante a sinterização, facilitando a deformação e a propagação de defeitos <sup>117, 120</sup>.

O aparecimento de defeitos pode estar relacionado ao estado de aglomeração do sistema. A qualidade de empacotamento das partículas depende da capacidade de permanecerem separadas umas das outras na suspensão coloidal. No entanto, existe uma grande tendência de partículas coloidais se unirem, resultando em um sistema coagulado. Este fenômeno só ocorre no momento em que a distância entre elas se torna muito pequena, da ordem de raios moleculares <sup>121</sup>.

A estabilidade coloidal depende da energia potencial total das partículas ( $V_{total}$ ), podendo ser expressa como <sup>115</sup>:

$$V_{total} = V_{vdW} + V_{el.} + V_{ester.} + V_{estrut.}$$

Sendo:  $V_{vdW}$ , a energia potencial de atração devido o longo alcance das interações de van der Waals entre as partículas;  $V_{el.}$ , a energia potencial de repulsão como resultado das interações eletrostáticas das superfícies das partículas carregadas;  $V_{ester.}$ , energia potencial de repulsão, causada pelas interações estéricas entre as superfícies das partículas recobertas por espécies poliméricas adsorvidas e  $V_{estrut.}$ , a energia potencial resultante da presença de espécies não adsorvidas na solução, podendo aumentar ou diminuir a estabilidade da suspensão<sup>115</sup>.

O sistema mais comum de estabilidade é causado pela geração de cargas de intensidade suficiente sobre a superfície de partículas suspensas em meio aquoso. A estabilidade, neste caso, deve-se ao efeito repulsivo *eletrostático*, que depende da distância, cuja força de repulsão está relacionada ao potencial de superfície induzido na interação de partículas coloidais e às propriedades dielétricas decorrente do meio<sup>117</sup>.

A teoria DLVO (Derjafuin, Landau, Verwey e Overbeek), que trata da estabilidade de partículas coloidais suspensas em líquidos polares, tem sido submetida a testes exaustivos há décadas, e mostra-se muito adequada, se não houverem outros fatores importantes de interação entre partículas, além da atração de van der Waals e a repulsão Coulombiana. A teoria DLVO e o modelo da dupla camada elétrica foram desenvolvidos inicialmente para partículas de dimensões coloidais. Como a dupla camada elétrica aparece em superfícies de quaisquer dimensões (cristalinas e vítreas) quando imersas em eletrólitos, essas teorias são também aplicáveis a partículas de quaisquer tamanhos<sup>117, 121</sup>.

A observação de vários tipos de desvio de comportamento previstos pela teoria DLVO levou ao reconhecimento de outros fatores importantes de estabilidade coloidal, ou seja, repulsão estérica, hidratação da superfície, depleção e interações hidrodinâmicas, que introduzem um fator de retardamento para a aproximação de partículas<sup>117, 121</sup>.

A depleção (Figura 2.9) consiste em um mecanismo de estabilidade, ou instabilidade, de partículas coloidais, causada por: polieletrólitos, outras partículas coloidais, ou em geral, por materiais orgânicos não adsorventes às partículas. A desestabilização ocorre quando estas espécies são excluídas da região interparticular, resultando em uma pressão osmótica diferente, promovendo a floculação<sup>115</sup>.

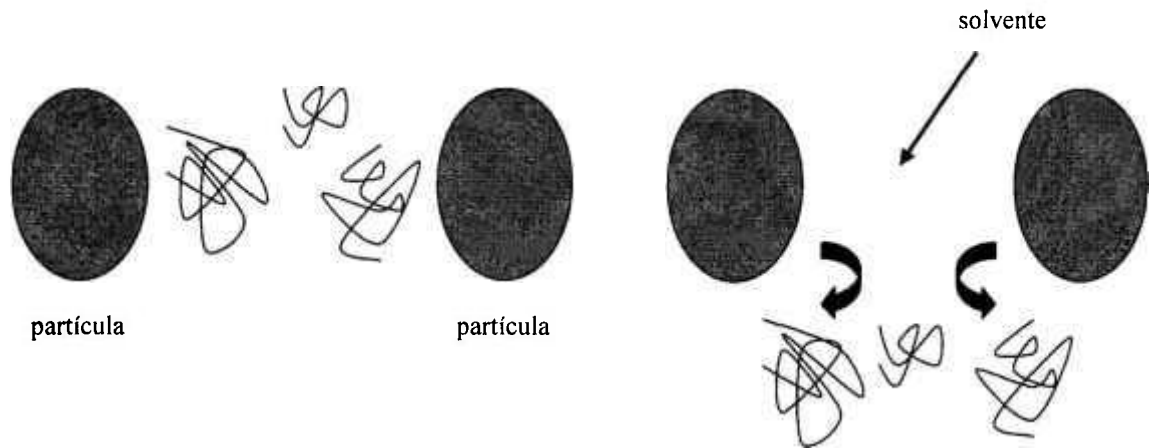


Figura 2.9 – Esquema representativo do fenômeno de estabilidade causado por depleção <sup>115</sup>

A concentração de espécies rígidas, próxima à superfície das partículas, diminui a superfície descoberta e aumenta o volume da solução, ocupando uma distância além das superfícies das partículas. Estas distâncias são conhecidas como espessura da camada de depleção e dependem do diâmetro da espécie depletante <sup>115</sup>.

A intensidade das forças de atração e repulsão entre as partículas pode ser modificada pela adição de dispersantes orgânicos ou inorgânicos que são adsorvidos na interface sólido/líquido, podendo gerar uma repulsão entre as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, entre as partículas <sup>117</sup>. Este fenômeno é o fator que determina, por exemplo, a ação dos colóides protetores. Repulsões desta natureza tendem a estabilizar um sistema, por efeito *estérico*. Quando os polímeros são polieletrólitos, a repulsão se torna extremamente efetiva, e neste caso é chamada *eletroestérica* <sup>117</sup>.

Na Figura 2.10 está exemplificada a atuação de diferentes mecanismos capazes de promover a estabilização para diferentes suspensões <sup>117</sup>.

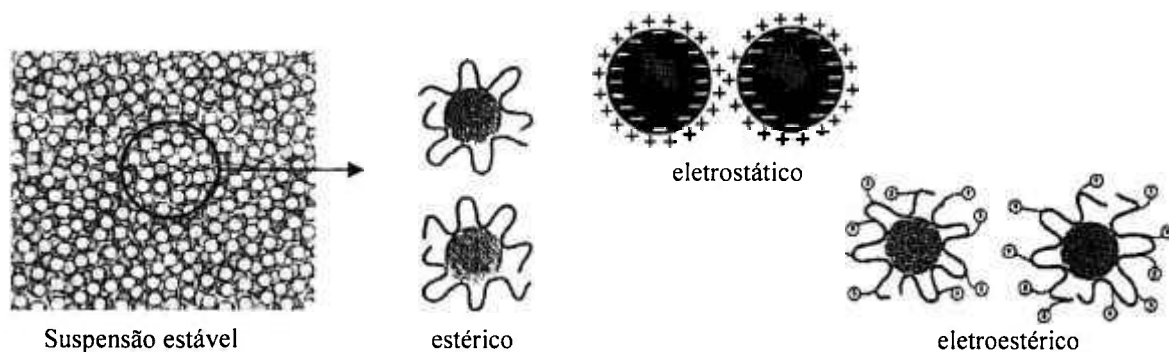


Figura 2.10 – Mecanismos de estabilização para suspensões <sup>117</sup>.

Polímeros ácidos à base de acrilatos, que são dissociados para formar polieletrólitos carregados negativamente, promovem a estabilidade via forças eletrostáticas para muitos sistemas contendo hidroxiapatita e outras cerâmicas <sup>122, 123</sup>.

A Tabela 2.1 apresenta os principais dispersantes empregados na obtenção de suspensões cerâmicas à base de fosfatos de cálcio. Observa-se que todos os dispersantes apresentam caráter aniônico, muito utilizado para estabilização de suspensões de hidroxiapatita em diferentes sistemas <sup>124</sup>.

Tabela 2.1– Nome comercial e composição dos dispersantes testados para suspensões à base de HAp <sup>124</sup>.

Dispersante	Composição
Darvan C	Polimetacrilato de amônio
Darvan 7	Polimetacrilato de sódio
Darvan 811	Poliacrilato de sódio
Darvan 821A	Poliacrilato de amônio
APMA	Polimetacrilato de amônio
Dispex A40	Solução aquosa de um copolímero acrílico (sal de amônio)
DispexG40	Solução aquosa de um copolímero acrílico (sal de sódio)
Dispex GA40	Solução aquosa de um copolímero acrílico (sal de sódio)
Dispex N40	Solução aquosa de um copolímero acrílico (sal de sódio)
Glascol K11	Solução aquosa de um copolímero acrílico
Calgon	Hexametáfosfato de sódio
SPP	Pirofosfato tetrasódico

A característica de adsorção destes polieletrólitos depende da carga superficial das partículas cerâmicas, do eletrólito e de seu tamanho na solução <sup>125</sup>. Em alguns casos,

os polímeros adsorvidos não atuam como estabilizantes, podendo desestabilizar uma dispersão coloidal da seguinte maneira <sup>115, 117</sup>:

- As partículas e o polímero apresentam cargas opostas; neste caso, a adsorção pode resultar na neutralização das cargas da partícula, anulando a repulsão coulombiana. Nesta situação, uma pequena adição de polímero à dispersão pode provocar a sua coagulação, e a adição em excesso, provoca a redispersão.
- Polímero de grande peso molecular e grau de cobertura das partículas pequeno. Neste caso, uma mesma cadeia polimérica pode unir-se a duas ou mais partículas simultaneamente, formando flocos e desestabilizando a dispersão.

## 2.6 REOLOGIA

Reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais, tratando das respostas das substâncias, provocadas pela ação de forças de deformação ou escoamento, de origens mecânicas, térmicas, elétricas ou magnéticas. A reologia é um dos fatores mais importantes na descrição do comportamento de fluxo de escoamento durante a preparação, moldagem e também na determinação das características estruturais do material em estudo <sup>116, 120</sup>.

Fatores reológicos são extremamente importantes na estabilidade de suspensões, auxiliando em muitas das questões que normalmente surgem quando não se atinge uma condição de estabilidade ou sistemas homogêneos e dispersos de boa qualidade.

Suspensões cerâmicas caracterizadas por um comportamento de fluxo instável são típicas de sistemas cerâmicos constituídos de partículas finas com mais de 30% em volume de sólidos. Características reológicas de dispersões instáveis estão relacionadas ao volume da fração de partículas; alcance e magnitude das forças de interação e pela estrutura dos agregados ou flocos <sup>116</sup>.

A literatura <sup>117</sup> tem relatado a influência do tamanho e área de superfície específica ( $A_s$ ) das partículas na reologia da suspensão. Pós cerâmicos de área superficial elevada tendem a formar aglomerados indesejáveis; porém, deve ser considerado que ao reduzir a superfície específica, a sinterização torna-se mais difícil <sup>124</sup>. Cerâmicas de HAP com  $A_s$  próximas de  $10\text{m}^2/\text{g}$ , por exemplo, são apropriadas para sinterização (1100 –

1300°C) e tornam possível a preparação de suspensões com 50% (vol.) de teor de sólido, na ausência de aglomerados <sup>118</sup>.

Técnicas de caracterização reológica de materiais cerâmicos podem ser baseadas em medidas de viscosidade para estudar o comportamento de fluxo dos materiais em longos intervalos de taxas e tensões de cisalhamento <sup>117</sup>. Estas medidas têm sido usadas empiricamente para muitas propostas, prevendo a processabilidade e a qualidade do produto final, como densidade a verde e permeabilidade do material <sup>116, 120, 126</sup>.

Os tipos de comportamento reológico de suspensões concentradas são usualmente classificados entre aqueles que dependem da taxa (ou tensão de cisalhamento) e aqueles que dependem do tempo de cisalhamento ou de repouso <sup>117</sup>. As propriedades de fluxo das suspensões são normalmente representadas por curvas de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) em função da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ), Figura 2.11.

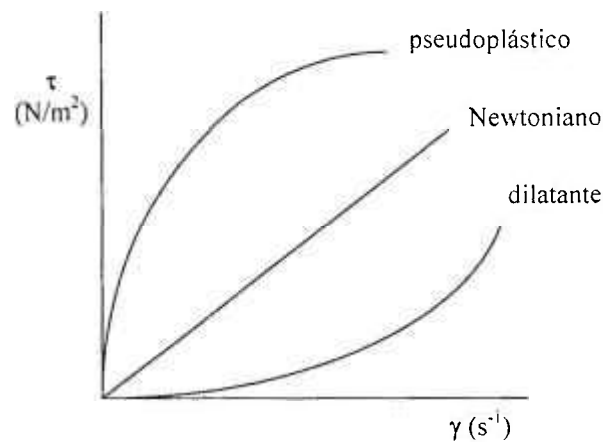


Figura 2.11 - Tipos de comportamentos apresentados pelos fluidos, independente do tempo.<sup>117</sup>

- *Newtoniano*: apresenta uma relação linear entre a tensão e a taxa de cisalhamento. É o caso de suspensões ideais, diluídas, e de grande parte dos líquidos puros, nos quais a viscosidade é uma característica intrínseca que depende apenas da temperatura e, de forma menos significativa, da pressão.

- *Pseudoplasticidade*: a viscosidade aparente ( $\tau/\dot{\gamma}$ ) do fluido diminui com o aumento da taxa e/ou da tensão de cisalhamento. Comportamento comumente observado em dispersões cerâmicas.
- *Dilatância*: comportamento caracterizado pelo aumento da viscosidade aparente do fluido à medida que se eleva a taxa e/ou tensão de cisalhamento, típico de suspensões altamente concentradas.

A viscosidade de muitos sistemas pode estar associada à existência de estruturas, como cadeias entrelaçadas, partículas ordenadas por repulsão eletrostática, cadeias adsorvidas em partículas ou micelas de dimensões avantajadas. Estas estruturas são sensíveis ao cisalhamento, de maneira que podem ser destruídas sob tensão ou escoamento <sup>115, 121</sup>. Por outro lado, a recomposição destas estruturas é dependente do tempo, podendo ocorrer de maneira mais rápida ou lenta <sup>117</sup>.

Um sistema cujas estruturas se recompõem espontaneamente é chamado de tixotrópico. Nestes sistemas, a viscosidade é modificada pelo cisalhamento, de uma forma dependente do tempo. De fato, há certa ambigüidade no uso desta palavra, mas de maneira geral, *tixotropia* pode ser definida como a redução da viscosidade aparente em função do tempo em suspensões submetidas a uma taxa ou tensão de cisalhamento constante, sendo uma propriedade essencial no uso de muitas substâncias, como por exemplo, tintas <sup>121</sup>.

O fenômeno análogo com efeito de espessamento sob cisalhamento, dependente do tempo, é chamado de *reopexia*. Normalmente, observado em suspensões contendo aglomerados fracos ou partículas assimétricas, nestes sistemas as forças de atração entre as partículas se acentuam com o tempo, aumentando a probabilidade de formação de aglomerados <sup>117, 121</sup>.

A reatividade dos fosfatos de cálcio pode ser fortemente influenciada pelas propriedades de superfície, por exemplo, o *potencial zeta*, definido como sendo o potencial no plano de cisalhamento. Esta grandeza é extremamente importante porque está diretamente relacionada com a mobilidade das partículas, com a repulsão eletrostática entre elas e a estabilidade da suspensão, podendo ser determinada indiretamente por medidas de mobilidade eletroforética, a partir da velocidade em um campo elétrico, ou utilizando a técnica ESA (*Electrokinetics Sonic Amplitude*) <sup>115, 117, 121, 127</sup>.

Em uma dispersão coloidal as partículas apresentam normalmente um potencial zeta diferente de zero, tendo um excesso de cargas positivas ou negativas. Em suspensões de fosfatos de cálcio, normalmente as partículas estão carregadas negativamente, mantendo-se dispersas pela atuação de um dispersante <sup>17, 128</sup>.

Variações do potencial zeta em cerâmicas de fosfatos de cálcio podem fornecer informações importantes sobre as trocas iônicas entre a camada hidratada ao redor das partículas cerâmicas e o meio, ou de sua própria superfície durante a etapa de formação da ligação bioativa, momento que ocorre a precipitação de uma nova fase, a hidroxiapatita carbonatada (HCA). O potencial zeta também é utilizado na análise de adsorção de proteínas sobre HAp sintética, sendo uma ferramenta importante na caracterização da interação destes materiais com diferentes fármacos, especialmente quando atuam como sistemas de liberação controlada <sup>124, 125, 129</sup>.

Além de estudos de sedimentação e viscosidade, os resultados obtidos a partir de medidas eletroforéticas de partículas são os mais recomendados para seleção do melhor dispersante para um sistema de suspensão <sup>125</sup>. Dessa maneira, as melhores condições de estabilidade para suspensões de fosfatos de cálcio, também podem ser determinadas por medidas eletroforéticas.

## 2.7 IMPORTÂNCIA DOS SURFACTANTES NO PREPARO DE SUSPENSÕES

Os surfactantes ou tensoativos constituem uma ampla classe de compostos químicos de importância para diferentes setores industriais, inclusive no preparo de suspensões cerâmicas. A ação de surfactantes se baseia em sua natureza anfipática decorrente de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica que conferem um comportamento dualístico em água <sup>130, 131</sup>. O balanço entre as partes hidrofílica e hidrofóbica da molécula é chamado de HLB, um indicativo do comportamento do surfactante <sup>132</sup>. Genericamente, Figura 2.12 <sup>133</sup>, as cadeias hidrocarbônicas longas constituem a porção apolar e na outra extremidade pode ser encontrado um grupo iônico (catiônico, aniônico ou anfotérico), ou não iônico. Em função da presença destes grupos, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas <sup>130</sup>.

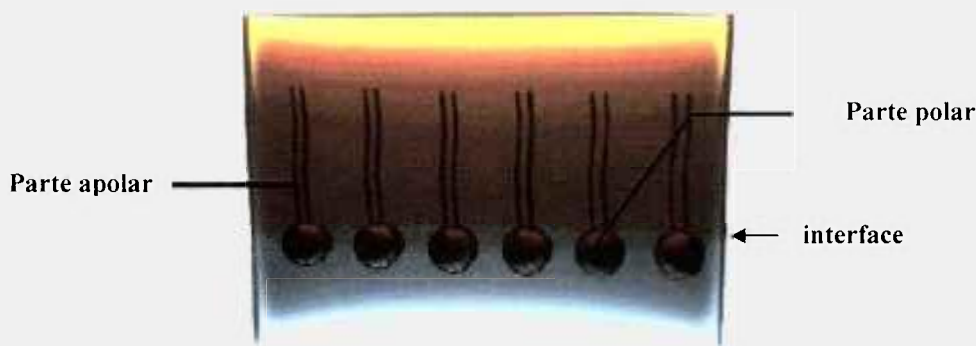


Figura 2.12 – Representação do posicionamento de moléculas de surfactante em um sistema, baseado no seu comportamento dualístico <sup>133</sup>.

Quando o surfactante é dissolvido, a presença do grupo hidrofóbico causa uma distorção da estrutura do solvente, aumentando a energia livre do sistema. Desta forma, o trabalho necessário para trazer uma molécula do surfactante para a superfície é menor do que aquele relativo a uma molécula de água, ou seja, a presença do surfactante reduz o trabalho necessário para criar uma unidade de área de superfície (superfície de energia livre ou tensão superficial) <sup>134</sup>.

A formação de um filme molecular nas interfaces reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes <sup>130</sup>. A atividade do surfactante é devida à adsorção, concentração e orientação de suas moléculas nas interfaces e à aglomeração e orientação destas no interior da solução, formando as micelas. Quando tem início a formação das micelas, tem-se a concentração micelar crítica (CMC) <sup>135</sup>. A intensidade destes efeitos depende do balanço de solubilidade entre as partes filica e fóbica das suas moléculas ou íons, trazendo como consequência as propriedades funcionais em solução aquosa, tais como: redução de tensão superficial e interfacial, emulsificação, dispersão, umectação, detergência, ação antiespumante, solubilizante, dentre outras. Na Figura 2.13, são apresentadas variações de algumas destas propriedades e a mudança de comportamento que as mesmas experimentam ao alcançar a concentração micelar crítica <sup>136</sup>.

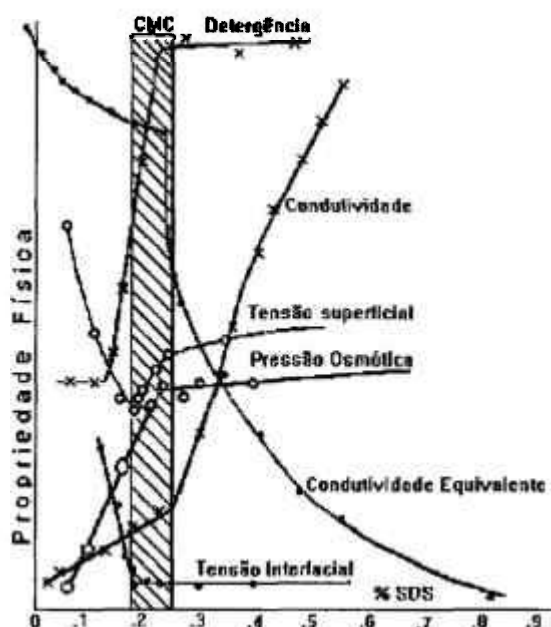


Figura 2.13 – Variação de diversas propriedades da solução em função da concentração do surfactante (% dodecil sulfato de sódio, SDS) <sup>136</sup>.

Quando ocorre a adsorção, estas moléculas tensoativas produzem uma notável redução da tensão superficial que pode passar de 72 mN/m, por superfície ar-água, a 30 mN/m, para uma solução diluída de surfactante, e muitas vezes é reduzida a números extremos, como é o caso dos surfactantes perfluorados <sup>135, 136</sup>. Quanto mais se reduz a tensão superficial, mais fácil a formação de uma nova área superficial ou interfacial <sup>137</sup>.

A aplicabilidade destes agentes de superfície ativa está relacionada à sua capacidade em modificar algumas propriedades com conseqüente melhoria na sensibilidade e/ou seletividade de diferentes sistemas <sup>130</sup>. Considerando os efeitos já descritos neste tópico que provam sua versatilidade de aplicação, o uso de surfactantes pode se estender no desenvolvimento de ambientes mais organizados para obtenção de suspensões.

## 2.8 ESPUMAS

A obtenção de um reticulado cerâmico poroso pode ser idealizada a partir da estrutura particular que uma espuma apresenta. Acredita-se que estruturas deste tipo podem acentuar propriedades que são interessantes para o desenvolvimento de implantes. Por se tratarem de sistemas termodinamicamente instáveis, o controle de estabilidade da espuma e

a definição de um perfil ideal para sua obtenção são decisivos para aplicações em sistemas de longa duração. Assim, a seguir, são apresentados tópicos de interesse no processamento das espumas, visando uma melhor compreensão dos diferentes fenômenos que podem ocorrer durante sua obtenção.

### 2.8.1 Formação de espuma

As espumas são definidas como sistemas termodinamicamente instáveis que apresentam uma estrutura tridimensional constituída de células gasosas envolvidas por um filme líquido contínuo. Essa estrutura é originada pelo agrupamento de bolhas geradas ao se dispersar um gás em um líquido que contenha agentes espumantes, como surfactantes solúveis ou impurezas <sup>138</sup>.

Moléculas de surfactante difundem-se na solução em direção à interface gás-líquido, formando uma monocamada adsorvida que estabiliza a bolha de gás e retarda sua coalescência. A destruição das bolhas é termodinamicamente favorável, pois provoca redução da elevada área superficial da espuma e expansão do gás contido nas células e, conseqüentemente, redução da energia livre da espuma <sup>139</sup>.

O processo de dispersão do gás pode ser desencadeado por agitação, batimento ou borbulhamento do gás e, influi diretamente nas características da espuma. Espumas são formadas também quando há redução de pressão ou aumento de temperatura em soluções supersaturadas de gás. Pelo borbulhamento, é possível estimar o tamanho das células geradas a partir da dimensão do borbulhador. A uniformidade na distribuição e no tamanho de suas bolhas, e o grau de dispersão, estão sujeitos às irregularidades do dispositivo através do qual o gás é introduzido. O tamanho da bolha, o volume de espuma formado em relação ao volume de solução utilizado para gerá-la, ou coeficiente de expansão da espuma, é delimitado pela natureza química do sistema e pelas condições em que é produzido. Entretanto, fatores como velocidade do gás e concentração de surfactante nas células e, sobretudo, a natureza química dos agentes estabilizantes são significativos na estruturação da espuma <sup>138</sup>.

Na geração de uma espuma estão envolvidos diferentes estágios: *formação*, *maturação* e *ruptura*. Estas etapas envolvem mecanismos e fenômenos físico-químicos bastante distintos, que tendem a diferenciar uma etapa de outra. A etapa inicial de formação da espuma prevalece apenas por alguns minutos, a etapa de maturação acontece

nos minutos seguintes ou até por algumas horas, e a persistência da espuma depende da estabilidade da película associada às interações coloidais <sup>140</sup>.

A formação de espuma pelo processo de agitação vigorosa, capaz de introduzir uma fase gasosa em um meio líquido, gera uma nova superfície (bolhas que representam um aumento da área superficial gás-sólido) disponível para a adsorção de um surfactante presente no líquido que tende a adsorver nas superfícies ou interfaces <sup>138</sup>.

Após formação das bolhas, há uma separação entre elas em função da diferença de densidade com a fase líquida. Estas bolhas se amontoam umas sobre as outras, causando a formação de películas entre elas. Estas películas são submetidas a esforços de estiramento, sendo indispensável que não se rompam, já que a espuma se forma pelo acúmulo de bolhas <sup>130, 140</sup>.

### 2.8.2 Efeito Gibbs-Marangoni

Quando uma película espessa se forma entre duas bolhas que se aproximam, é provável que durante um afastamento, a película fique exposta a um esforço de estiramento complexo, no qual a área superficial gás-líquido aumenta rapidamente. A concentração de surfactante adsorvido (denominado adsorção  $\Gamma$ , em moléculas por unidade de superfície) tende a diminuir na zona estirada onde a película é mais delgada que nas zonas adjacentes. Em conseqüência, a tensão superficial aumenta segundo a relação que permite calcular a elasticidade de Gibbs,  $\varepsilon$  <sup>140</sup>.

$$\varepsilon = 2.(d\gamma / d \ln A) = - 2. (d\gamma / d \ln \Gamma)$$

Sendo  $\gamma$  : tensão;  $A$ : área superficial e  $\Gamma$ : adsorção. O coeficiente 2 indica que a película está compreendida por duas superfícies gás-líquido.

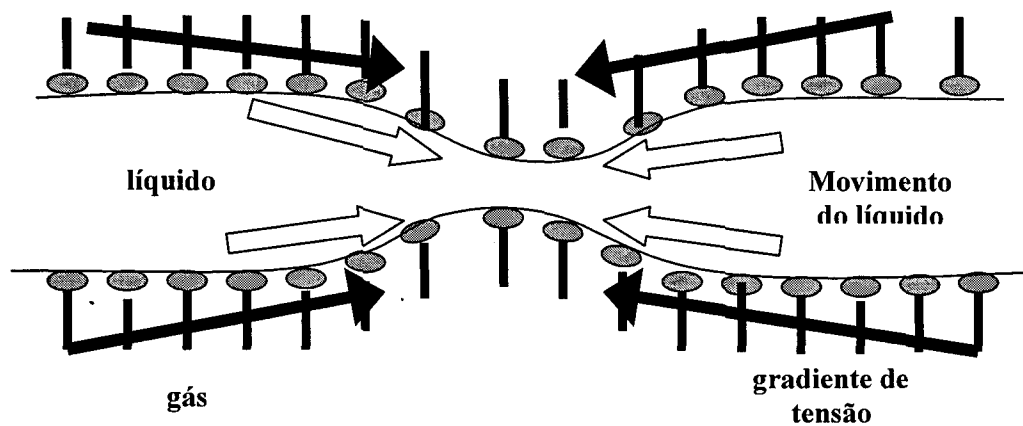


Figura 2.14 – Efeito Gibbs-Marangoni <sup>140</sup>.

Como representado na Figura 2.14, há uma diferença de tensão superficial entre a zona estirada da película (tensão mais elevada, menor espessura) e as zonas adjacentes (não estiradas, tensão mais baixa), que provoca um fenômeno conhecido como *instabilidade de Marangoni*, descrita como a movimentação de líquidos por gradientes de tensão superficial <sup>140, 141</sup>.

O gradiente de adsorção entre a zona delgada e a zona vizinha se deve ao gradiente de tensão que corresponde ao equilíbrio entre a superfície e a fase líquida <sup>140</sup>.

Em baixa concentração de surfactante, a tensão superficial se aproxima à da água pura, não havendo um gradiente de tensão significativo por estiramento da película. Esta informação está de acordo com observações experimentais, que indicam alta espumabilidade à medida que a concentração de surfactante aumenta, até atingir a concentração micelar crítica (CMC), Figura 2.15 <sup>140</sup>, uma das principais características dos tensoativos.

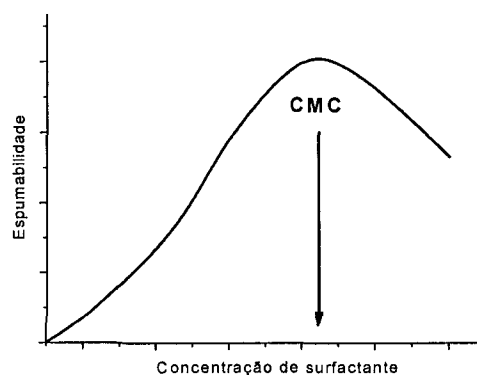


Figura 2.15 – Variação típica da espumabilidade em função da concentração do tensoativo em fase líquida <sup>140</sup>.

A concentração micelar crítica ou micelização (CMC), Figura 2.15, é uma propriedade intrínseca do surfactante, definida como a concentração de surfactante onde se inicia o processo de formação de micelas. As micelas são definidas como agregados moleculares de dimensões coloidais, que geralmente contem 60 a 100 moléculas do surfactante, possuidoras de regiões estruturais hidrofílica e hidrofóbica, que dinamicamente e espontaneamente se associam em meio aquoso, a partir desta concentração crítica, (CMC) <sup>134</sup>. Esta propriedade pode ser determinada pela variação de diferentes propriedades físicas, sendo as mais comuns: tensão superficial e condutividade elétrica ou pela técnica de espectroscopia de absorção UV-VIS em função da concentração do surfactante <sup>142</sup>. A CMC é identificada graficamente pelo ponto que representa uma descontinuidade na curva obtida, Figura 2.16.

É possível analisar a distribuição do surfactante em solução aquosa e o efeito na tensão superficial, pela Figura 2.16. A adição do surfactante à água tende a saturar todas as interfaces (situação B e C) de modo que, a partir da CMC, a saturação tendo sido atingida, inicia-se a formação de micelas (situação D). Qualquer quantidade de surfactante adicionada acima da CMC será utilizada na formação de micelas, não havendo mais redução na tensão superficial <sup>132, 134</sup>.

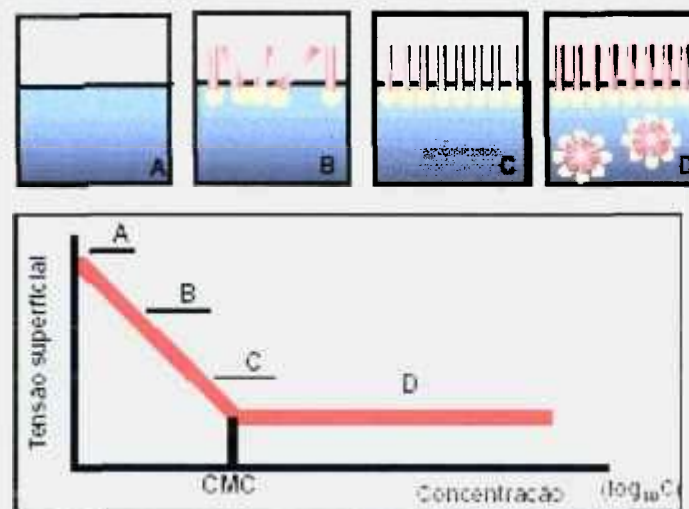


Figura 2.16 - Esquema representativo do processo de micelização e comportamento da tensão superficial em função da concentração do surfactante em diferentes estágios <sup>132</sup>.

Os valores de concentração micelar crítica são característicos de cada tensoativo e dependentes da temperatura. Em geral, este valor é mais baixo quanto mais hidrófobo for o tensoativo, ou seja, quanto maior for a cadeia hidrocarbônica <sup>134, 135</sup>.

A característica de eficácia, ou eficiência de um espumante é conhecida como a concentração na qual o máximo de espumabilidade é atingido; o que na maioria dos casos, corresponde à concentração micelar crítica (CMC). A eficiência do surfactante é medida pela concentração de surfactante requerida para produzir uma significativa redução na tensão superficial da água. A efetividade do surfactante é medida pelo efeito produzido. Frequentemente estes dois parâmetros são contrários um ao outro, por exemplo, a eficiência aumenta com crescimento da porção hidrofóbica do surfactante, favorecendo a formação da micela, enquanto que a efetividade diminui, pois depende da quantidade de surfactante molecularmente disperso<sup>139, 140</sup>.

### 2.8.3 Maturação e Estabilidade da Espuma

Após a formação da espuma, ela fica sujeita à ruptura, podendo perdurar de alguns minutos até algumas horas. Durante este percurso há participação de diferentes mecanismos<sup>140</sup>:

- Segregação e drenagem gravitacional
- Sucção capilar
- Difusão gasosa entre bolhas

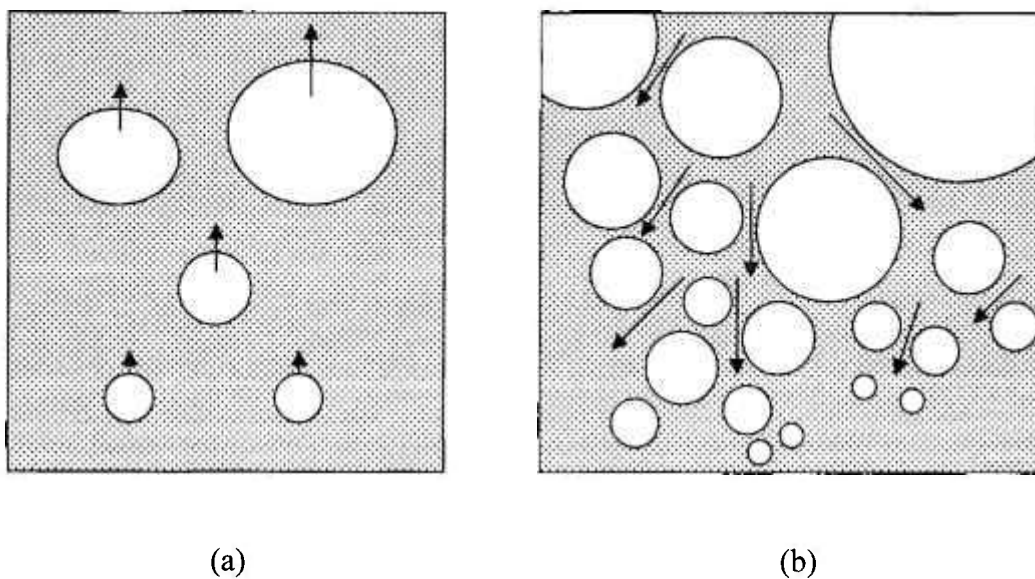


Figura 2.17 – (a) Segregação de bolhas e (b) drenagem do líquido na espuma líquida<sup>140</sup>.

Durante os primeiros instantes, é produzida uma *segregação gravitacional* das bolhas, movidas pelo empuxo de Arquimedes, sendo mais intenso sobre as bolhas maiores, Figura 2.17 -a. A *drenagem gravitacional do líquido* ocorre durante toda a permanência da espuma, apresentando um sentido direcional para baixo e adjacente às paredes das bolhas, Figura 2.17 -b.

A proporção de líquido presente na espuma diminui rapidamente devido ao efeito de drenagem, pela simples ação da gravidade sobre o líquido presente na espuma. Em seguida, ocorrem fenômenos mais complexos que tendem a deformar a esfericidade das bolhas e produzir formas poliédricas <sup>138</sup>. Neste estágio, o conteúdo de líquido não ultrapassa 10% e continua sendo consumido, já que a diferença da curvatura entre as bordas de Plateau ( Figura 2.18) e a parte plana das películas, segundo a lei de Laplace produz um gradiente de pressão. Esta é a força motriz que espalha o líquido pelo centro das películas até as bordas de Plateau, por meio de um mecanismo chamado *sucção capilar*. Este líquido é continuamente drenado pela gravidade até a parte inferior da espuma nas bordas de Plateau <sup>143</sup>.

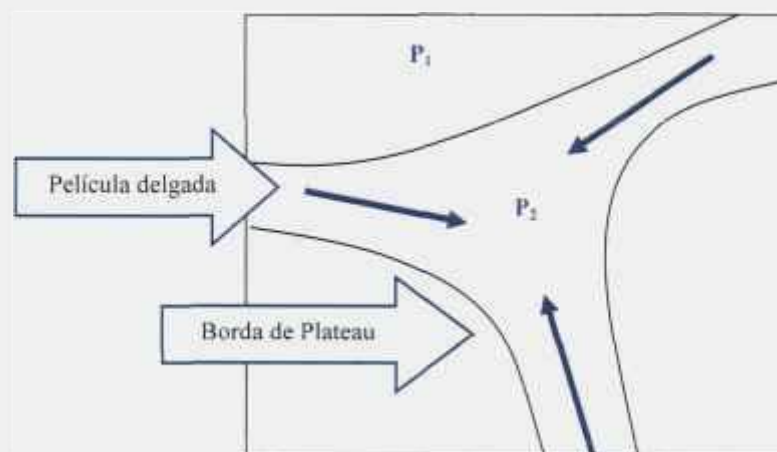
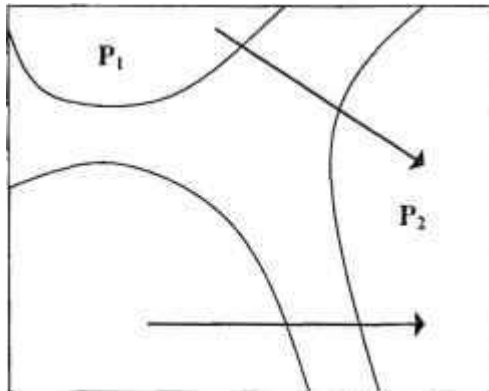


Figura 2.18– Sucção capilar do líquido do centro da película até as bordas de Plateau <sup>140</sup>.

A deformação e a degradação da espuma ocorrem pela ruptura das películas relativamente finas (espessura de alguns  $\mu\text{m}$  ou menos) se as condições favoráveis ao efeito Giggs-Marangoni não são satisfeitas, ou pela inexistência de mecanismos de estabilização das perturbações da película entre as bolhas. De modo geral, a ruptura das películas não se produz necessariamente, durante esta etapa de deformação, podendo a espuma ainda persistir por mais tempo <sup>140</sup>.

Quando as bolhas se tornam poliédricas, as películas entre elas se comportam como películas planas de baixa espessura, por causa da lei de Laplace, resultando em uma

pressão maior nas bolhas pequenas em relação às maiores. Como consequência, é gerado um gradiente de pressão entre diferentes películas, induzindo uma *difusão gasosa* através delas, Figura 2.19 <sup>140</sup>.



### Lei de Laplace

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r}$$

Figura 2.19 – Difusão gasosa entre bolhas <sup>140</sup>.

Este fenômeno, conhecido como maturação de Ostwald, é responsável pelo inchamento das bolhas maiores, em função da coalescência das menores, predominando durante a evolução da espuma em escalas de tempo intermediárias (alguns minutos a algumas horas) <sup>140</sup>. Este mecanismo é muito importante na prática, podendo ser inibido pela presença de uma camada insolúvel adsorvida, como no caso da proteína da clara de ovo, batida a ponto de neve. Neste caso, a diminuição do diâmetro de uma bolha, produz o aumento da adsorção, já que as moléculas adsorvidas são praticamente insolúveis e o valor de elasticidade ( $\epsilon$ ) é muito elevado. Conseqüentemente, é gerada uma redução de tensão suficiente para compensar a diferença de pressão devido à lei de Laplace. O recobrimento da superfície da bolha por partículas sólidas minúsculas também pode impedir a difusão entre bolhas <sup>140</sup>.

À medida que a película afina, ocorre uma rápida diminuição da drenagem de maneira inversamente proporcional à viscosidade do líquido e à área da película. A drenagem pode ser lenta, se o líquido contiver agentes viscosos ou se as bolhas poliédricas forem de grandes dimensões.

Se a espessura da película entre bolhas atinge o intervalo de um décimo de  $\mu\text{m}$ , ou cerca de 0,02 de  $\mu\text{m}$ , são observadas novas deformações que correspondem a interações coloidais entre as superfícies. Durante estas interações, estão presentes dois efeitos antagônicos <sup>140, 143</sup>:

- Forças intermoleculares de van der Waals que tendem a atrair bolhas vizinhas, produzindo uma drenagem pelicular. Estas forças atuam a distâncias mínimas, praticamente no contato.
- Forças repulsivas que se opõem à aproximação entre bolhas, impedindo a drenagem das películas, decorrente da presença de uma camada adsorvida de tensoativo sobre toda a superfície da película delgada.

## 2.9 SISTEMAS DE CONSOLIDAÇÃO CERÂMICA

Métodos inovadores de conformação vêm sendo continuamente desenvolvidos em busca de processamentos versáteis e eficientes para componentes cerâmicos <sup>144</sup>.

Um dos métodos mais recentemente estudado se refere a “*técnica de consolidação direta*” que abrange <sup>19</sup>:

- reações de polimerização para atingir a consolidação (“gelcasting”);
- reações de policondensação (solidificação assistida por hidrólise);
- desestabilização (consolidação por coagulação direta);
- congelamento (“quick set”);
- uso de agentes especiais como de consolidação e ligantes.

Nestes sistemas de consolidação direta, a conformação da massa cerâmica é contida sem compactação do pó ou remoção do líquido, ou seja, acontece uma transformação de um estado “ótimo” da suspensão para um estado rígido sem afetar sua homogeneidade <sup>19</sup>.

No presente trabalho são abordadas duas das técnicas citadas anteriormente, o gelcasting de espuma e o emprego de agente especial de consolidação a partir de uma proteína globular, ambas exploradas com o intuito de obter uma espuma cerâmica.

### 2.9.1 Gelcasting

O processo *gelcasting* consiste na dispersão de um pó cerâmico em uma solução aquosa contendo monômeros, obtendo-se uma suspensão fluida que é gelificada, no próprio molde, por uma reação de polimerização *in situ*. A polimerização é promovida pela adição de catalisador e iniciador adequados em sistema com atmosfera livre de

oxigênio <sup>145, 146</sup>, Na Figura 2.20 é apresentado o fluxograma representativo da metodologia do *gelcasting* <sup>146</sup>.

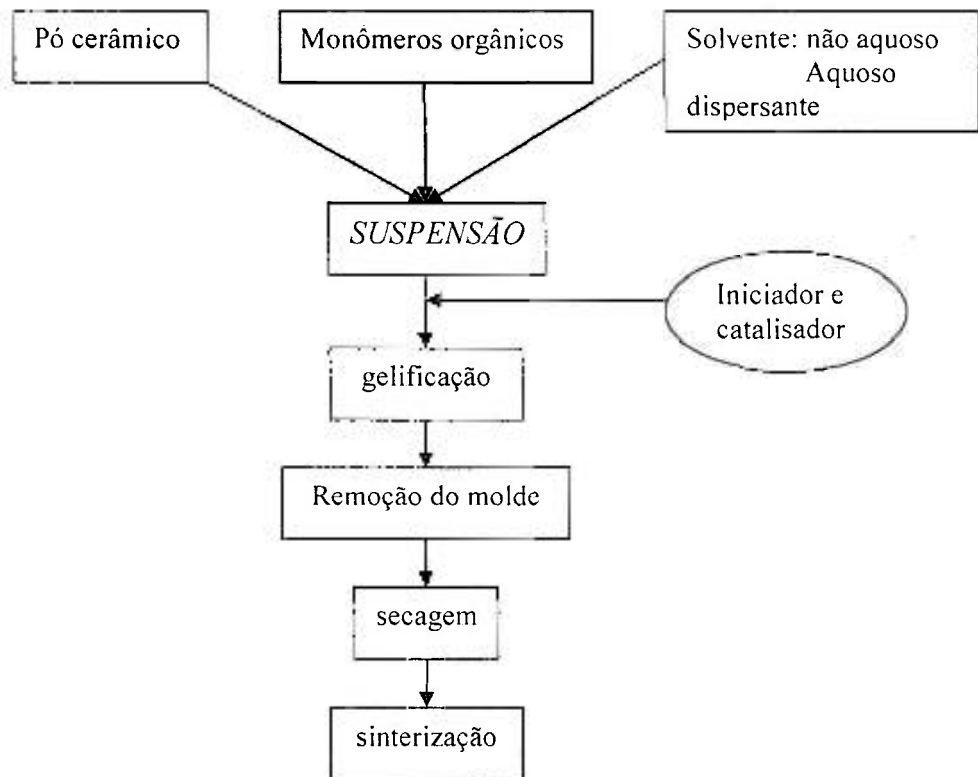


Figura 2.20– Fluxograma simplificado da metodologia *gelcasting*.

A tecnologia do *gelcasting* necessita de suspensões com boas propriedades de fluxo e alta concentração de sólidos (mínimo 50% em volume) <sup>145</sup>. Por causa do alto teor de sólidos e a presença de pouca quantidade de orgânicos (~5% vol.), os corpos não sinterizados apresentam pequena quantidade de ligante volátil, minimizando os riscos de trincas e retrações exageradas durante o processo de secagem e sinterização <sup>145, 147</sup>.

Este processo assemelha-se às técnicas de *slipcasting* e de moldagem por injeção, mas com algumas vantagens. Comparado ao *slipcasting*, ele fornece um material mais homogêneo, livre de diferenças de densidades ao longo da peça; comparado com a moldagem por injeção, o método *gelcasting* se torna mais atrativo por não necessitar de moldes especiais, normalmente de alto custo, ou de grande quantidade de ligantes orgânicos, não tornando crítica a etapa de sua remoção, e usa água como veículo de dispersão. Dessa maneira, as principais vantagens desta técnica podem ser resumidas da seguinte forma <sup>146</sup>:

- ✓ capacidade de gerar peças complexas, como na moldagem por injeção;

- ✓ alta resistência mecânica, ainda nas peças à verde;
- ✓ material homogêneo;
- ✓ baixa quantidade de orgânicos, resultando na fácil remoção do ligante;
- ✓ baixo custo dos equipamentos;
- ✓ pode empregar moldes mais baratos e acessíveis;

O principal componente responsável pelo mecanismo de gelificação do sistema *gelcasting* é a acrilamida, considerada uma neurotoxina e, por isso tem sido o principal motivo da relutância da indústria ao emprego desta técnica e sua maior limitação. Em busca de minimizar o risco à saúde, diferentes monômeros de baixa toxicidade têm sido pesquisados <sup>15, 148</sup>. O HEMA (hidroxietil metacrilato) tem sido apontado como uma das alternativas <sup>149</sup>, este monômero é utilizado com frequência na confecção de lentes de contato e no desenvolvimento de biomateriais poliméricos em tendões e ligamentos <sup>6</sup>.

A versatilidade da técnica de *gelcasting* torna possível obter cerâmicas de alta densidade ou altamente porosas, neste caso é utilizado um tensoativo adequado para geração de uma espuma que posteriormente é consolidada pela polimerização *in situ*, fornecendo rigidez aos corpos a verde <sup>119</sup>.

Na Figura 2.21 são apresentadas algumas das diferentes geometrias para amostras densas e porosas obtidas pela técnica do *gelcasting*.

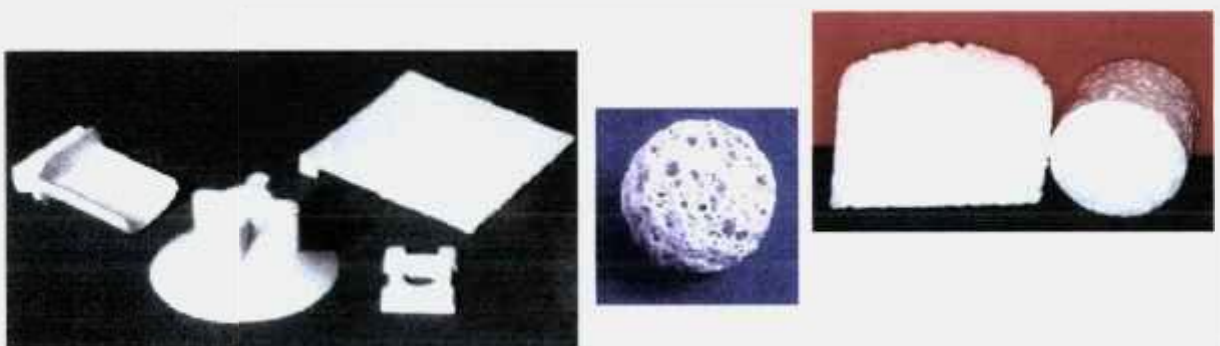


Figura 2.21 – Amostras com diferentes formatos e microestruturas obtidas pela técnica do *gelcasting* <sup>150</sup>.

## 2.9.2 Cerâmicas Porosas e *Gelcasting* de Espumas

Existem várias rotas para obtenção de cerâmicas porosas nas mais diferentes configurações e dimensões de poros, com custo relativamente baixo, as principais são: incorporação de substâncias voláteis, eliminadas durante a queima; método sol-gel, que desenvolve uma porosidade durante a transformação de fase ou ocorrência de reações químicas; replicação de estrutura polimérica porosa; espumas a partir de suspensões cerâmicas (*gelcasting*)<sup>119, 151</sup>. Com estas técnicas, é possível desenvolver materiais com porosidades, propriedades mecânicas e aplicações diferenciadas<sup>119, 152</sup>.

A porosidade do material além de influenciar o comportamento mecânico pode também interferir nas propriedades elétricas e óticas do material. O nível de porosidade aberta influencia, por exemplo, a permeabilidade de gases ou líquidos. Em geral, as condutividades térmica e elétrica diminuem com a porosidade, já que o ar apresenta baixa condução de calor e alta resistividade elétrica. Já a taxa de corrosão aumenta com a porosidade, como resultado da elevação na área superficial<sup>151</sup>.

Inicialmente desenvolvido para produzir corpos densos, o *gelcasting* foi adaptado para a produção de cerâmicas porosas a partir da geração de espumas de suspensões cerâmicas em atmosfera livre de oxigênio. No processo, monômeros orgânicos são incorporados a uma suspensão aquosa de pó cerâmico e polimerizados *in situ*, criando ligações cruzadas e uma estrutura gelificada, que fornece rigidez aos corpos a verde. O uso de agentes gelificantes ou plastificantes para polimerização *in situ* de monômeros em espumas, tem resultado em uma resistência a verde, suficiente para manter estruturas contendo porosidade superior a 90% em volume. Este fator, representa a principal vantagem desta rota, com relação aos demais métodos previamente relatados. O gel retém a estrutura da espuma, de tal maneira, que ambas, micro e macroestrutura, são preservadas. Finalmente, já na forma do molde, o corpo é seco para remoção dos polímeros e a matriz cerâmica pode ser densificada<sup>152, 153</sup>.

O *gelcasting* de espumas tem sido usado na produção de cerâmicas macroporosas com níveis de porosidade de até 95%, e propriedades mecânicas significativamente melhores quando comparado com outras técnicas, sendo uma das rotas mais versáteis para produção de corpos com alto nível de complexidade em sua forma<sup>15</sup>.

Este método, como é característico de um processamento coloidal, permite a obtenção de microestruturas finas, homogêneas e livres de macrodefeitos, resultando em materiais com boas propriedades mecânicas, e de geometrias complexas, já que a suspensão pode preencher com facilidade pequenas regiões do molde, inclusive as de difícil acesso <sup>15, 154</sup>. Sepulveda et.al <sup>119</sup>, demonstrou que este processo pode ser aplicado para vários pós cerâmicos, como: zircônia, alumina e hidroxiapatita <sup>17, 155</sup>.

Cerâmicas macroporosas têm demonstrado ótimos resultados, como implantes porosos para o reparo ósseo, podendo ser empregados também como substratos para regeneração de tecido e sistemas para liberação de fármacos <sup>156, 157</sup>. O uso de cerâmicas porosas na área médica ou odontológica pode se tornar mais acessível pela utilização de técnicas mais versáteis na obtenção de cerâmicas com diferentes porosidades. Por isso, alternativas que propiciem resultados semelhantes ao *gelcasting* convencional têm sido adotadas para minimizar ou isentar totalmente o impacto da toxicidade causado pelo uso de monômeros <sup>148</sup>.

## 2.10 MECANISMO DE CONSOLIDAÇÃO A PARTIR DE PROTEÍNA

A formação de espuma a partir de uma proteína tem despertado interesse na produção de sólidos porosos, que atualmente ocupam uma posição privilegiada em inúmeras aplicações tecnológicas. No entanto, como representa uma nova técnica, ainda existem muitas variáveis a serem estudadas e, a seguir são apresentados alguns tópicos importantes para compreensão do mecanismo envolvido.

No âmbito dos estudos realizados observa-se que a utilização desta alternativa na obtenção de cerâmicas porosas para fins médicos é inédita.

### 2.10.1 Estrutura das Proteínas

As proteínas são biomoléculas constituídas basicamente de: carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, podendo também apresentar outros elementos como: enxofre, fósforo, magnésio e ferro, entre outros, como é caso de alguns tipos específicos de proteínas. Genericamente, são formadas por uma série de aminoácidos interligados por ligações peptídicas (ligação covalente estabelecida entre um grupo carboxílico COO<sup>-</sup> e um grupo amino NH<sub>3</sub> de outro aminoácido), <sup>158</sup> Figura 2.22 <sup>159</sup>.

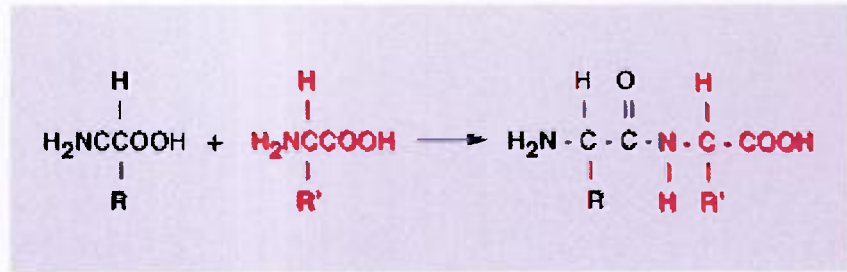


Figura 2.22 - Esquema representativo de uma ligação peptídica <sup>159</sup>,

A união de um pequeno número de aminoácidos dá origem a um peptídeo; se o número de aminoácidos que formam a molécula é inferior a 10, é denominado oligopeptídeo e se é superior a 10 é chamado polipeptídeo. Um polipeptídeo é chamado de proteína quando a cadeia de aminoácidos é superior a 50 <sup>158</sup>.

Uma proteína pode ser definida em função de quatro níveis estruturais: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. Cada uma destas estruturas informa sua disposição espacial, Figura 2.23 <sup>159</sup>,

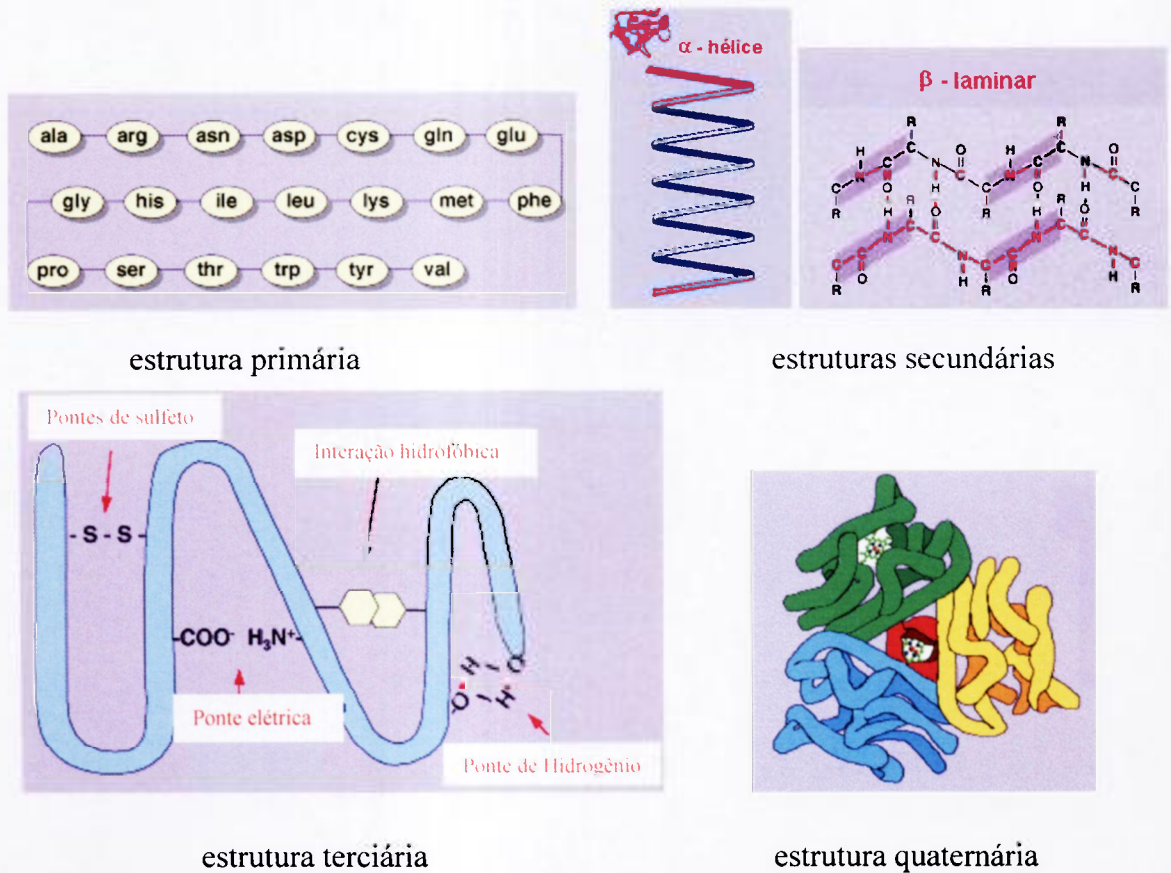


Figura 2.23 – Diferentes níveis estruturais das proteínas <sup>159</sup>,

A estrutura da proteína é flexível e dinâmica e, altamente dependente do meio em que se encontra, podendo assumir diferentes conformações <sup>158</sup>. A força de ligação hidrofóbica é muito sensível a mudanças de temperatura e de constante dielétrica, alterações nestes parâmetros podem ter grandes influências sobre a estrutura das proteínas. Outros fatores, que podem comprometer sua estrutura, incluem: pH, resistência iônica e a presença de outras moléculas como desnaturantes, ar, gordura, etc <sup>160</sup>.

### 2.10.2 Atuação das Proteínas

A ação de uma proteína se manifesta pela interação com outros componentes dentro de um sistema. Estas interações podem envolver moléculas de solvente, soluto, outras proteínas ou substâncias que se encontram dispersas no meio <sup>158</sup>.

Além do papel biológico fundamental desempenhado no organismo de todos os seres vivos, as proteínas apresentam diferentes funções, atuando, sobretudo na área alimentícia há muitas décadas, sendo responsáveis por inúmeras características, como: sabor, viscosidade, capacidade de gelificação, aumento de massa, ação de ligante, emulsificação, prolongamento de fibras e formação de espuma <sup>161</sup>.

O processo de formação de espuma resulta da rápida diminuição da tensão superficial enquanto sua estabilidade está relacionada à estrutura globular da proteína, sendo a desnaturação, a principal responsável pela ação espumante da proteína, expondo seus grupos hidrofóbicos na superfície do ar, enquanto aminoácidos hidrofílicos permanecem em água <sup>162</sup>.

Alguns fatores, como: drenagem gravitacional, pressão capilar e intensa agitação mecânica, podem contribuir para uma diminuição da estabilidade da espuma obtida a partir da proteína, porém a viscosidade da superfície, efeito Gibbs-Marangoni e dupla camada elétrica podem aumentar a sua estabilidade <sup>140, 143</sup>.

### 2.10.3 Albumina procedente do ovo

A albumina é classificada como uma homoproteína do tipo globular, apresenta um peso molecular de 43000 u e dimensão molecular de 40-70 Å <sup>163</sup>. Atua como reservatório de nutrientes e sistema de defesa contra microorganismos, devido ao seu pH alcalino (>9), baixa concentração de nitrogênio, e especificamente a ação anti-bactericida

da ovatransferrina e da lisozima, que impedem a migração de microorganismos para o núcleo <sup>164</sup>.

O alto pH da albumina é decorrente da produção de sulfeto de ferro, sendo o ferro proveniente da gema e o enxofre da albumina da clara. Com o aquecimento, o enxofre é liberado da proteína sob forma de gás de hidrogênio sulfurado, resultando no seu odor característico <sup>164</sup>.

A albumina é encontrada em abundância na clara do ovo (85% de água, 10% de proteína e alguns lipídios, carboidratos e minerais), sendo reconhecida como a mais rica proteína animal, fundamental para o crescimento e regeneração muscular <sup>162, 164</sup>.

A albumina do ovo apresenta um conjunto de proteínas: ovalbumina (54%), responsável por manter a espuma; conalbumina (12%) e ovomucina (11%), glicoproteína que se apresenta na forma de fibras, contribuindo para a alta viscosidade da albumina e também auxilia na estabilização da espuma; lisozima (3-4%), avidina, ovoglobulina, ovinibitores e flavoproteínas em menores quantidades. Proteínas solúveis em água, em particular do grupo do albúmem são coaguladas por processo de aquecimento que neste caso ocorre próximo de 60° C. Todas as proteínas deste grupo são solúveis em água ou solução salina exceto a ovomucina que representa 1,5-3,5 % (massa) da proteína total <sup>162, 165</sup>. Outros componentes da clara do ovo incluem também metais alcalinos como: Na (0,19% massa) e K (0,15% massa), e 0,03% de P. No preparo de uma espuma cerâmica, uma quantidade significativa destes elementos pode ser eliminada durante o processo de sinterização, mas a presença indesejada de metais alcalinos pode ser um problema típico do emprego de materiais naturais, podendo dificultar a sinterização devido à contaminação do contorno de grão <sup>162</sup>.

A viscosidade da albumina da clara permite a retenção de ar (clara em neve), resultando em uma massa leve e porosa. A adição de um sal ou ácido em pequena quantidade pode aumentar sua estabilidade. Normalmente, experimentos com clara em neve, após aquecimento, aumentam de volume pela expansão do ar retido. A bolha de ar é rodeada por uma película de proteína que se coagula, podendo se romper e o ar retido escapar, diminuindo o volume da preparação <sup>162</sup>.

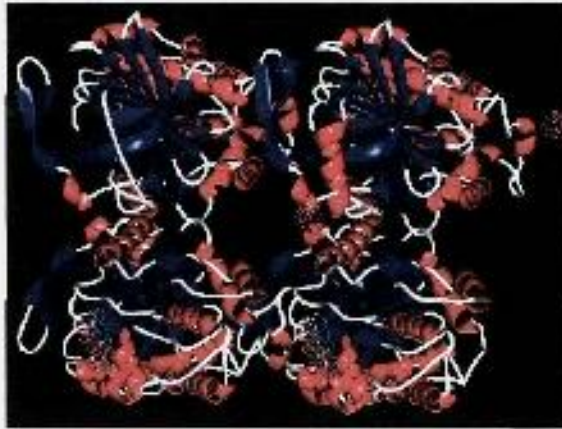


Figura 2.24 – Arranjo espacial da ovalbumina <sup>166</sup>.

#### 2.10.4 Suspensões solidificadas pela ação da Albumina

Uma nova técnica de consolidação direta, a partir da ação de proteínas, tem sido desenvolvida. Nesta técnica proteínas globulares, como albumina presente na clara do ovo, são utilizadas aproveitando a capacidade de formar gel na presença de água (coagulação), ao sofrerem processo de desnaturação, quando aquecidas a 70-80°C. Este processo torna possível solidificar suspensões cerâmicas à base de água, obtendo corpos rígidos <sup>19, 167</sup>.

O emprego da albumina como agente de consolidação e porogênico apresenta algumas vantagens comparado ao sistema gelcasting <sup>168</sup>. O sistema à base de albumina não necessita de qualquer aditivo para iniciar ou completar a reação de gelificação, não é tóxico, é biodegradável, barato e facilmente disponível <sup>169</sup>.

O processo de desnaturação de proteínas globulares pode ocorrer por irradiação UV ou raios-X, aquecimento, alterações de pH, aumento da área interfacial, ou adição de solventes orgânicos, sais, uréia, detergentes, e outros. Quando uma proteína sofre desnaturação, significa que ela perde sua estrutura nativa, como consequência da quebra de ligação, como pontes de hidrogênio, ou formações meta-estáveis em sua estrutura <sup>19</sup>.

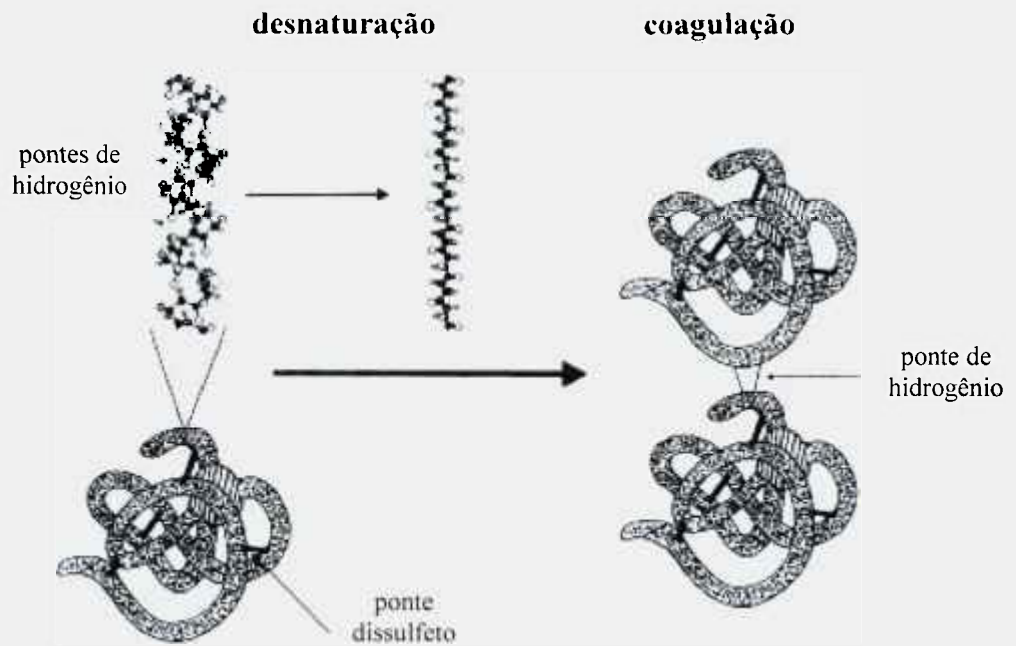


Figura 2.25 – Esquema de desnaturação de uma proteína globular <sup>19</sup>.

A desnaturação é normalmente reversível se a cadeia peptídica é estabilizada com uma conformação estendida, inibindo qualquer reação intermolecular que permita restabelecer seu estado nativo, quando já foi removido o agente causador. Quando a cadeia peptídica estendida é estabilizada pela interação com outras cadeias, como é o caso da albumina, a desnaturação é irreversível. Durante a desnaturação, as cadeias polipeptídicas tornam-se emaranhadas para formar uma rede (gel) tridimensional e termo-irreversível (coagulação) a partir da formação de novas pontes de hidrogênio entre as cadeias, causando a imobilização da água dentro de uma estrutura gelificada <sup>141</sup>.

A coagulação ou gelação de proteínas, em particular é irreversível, coagulação induzida pelo calor ou gelação de proteínas à base de ovo determinam o sucesso de muitos produtos alimentícios e agora tem despertado o interesse em outras áreas da engenharia. Uma melhor compreensão do processo de gelação permite a manipulação de diferentes variáveis para obter um gel com textura desejada e características funcionais. Fatores que afetam parâmetros cinéticos de gelação e propriedades reológicas do gel ainda não são bem discutidas, assim como os métodos para medir este fenômeno. Para melhor compreensão é necessário definir alguns termos usados comumente e que estão associados a este fenômeno <sup>165</sup>:

- **Desnaturação:** é o processo no qual uma proteína ou polipeptídeo sofre uma transformação de um estado ordenado para um desordenado sem ruptura de

ligações covalentes, causando uma modificação na estrutura tridimensional da forma “nativa” de uma proteína. A desnaturação, em geral, envolve interações proteína-solvente que caracterizam alterações de propriedades físicas, como perda de solubilidade.

- *Agregação*: interação proteína-proteína com a formação de um complexo de alto peso molecular. Este fenômeno é normalmente governado pelo balanço entre forças atrativas e repulsivas. Forças atrativas podem envolver pontes de hidrogênio, ligações covalentes, pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas, enquanto as repulsivas envolvem forças coulombicas que são afetadas pela carga da molécula de proteína ou força iônica do meio.
- *Coagulação*: agregação aleatória de moléculas de proteínas desnaturadas, no qual as interações polímero-polímero são favorecidas perante as reações polímero-solvente. O coágulo é normalmente turvo e sua formação é termicamente irreversível.
- *Gelação*: agregação ordenada de proteínas, que podem, ou não, estar desnaturadas, formando uma rede tridimensional. Interações polímero-polímero e polímero-solvente, assim como forças atrativas e repulsivas em estado de equilíbrio, permitindo que uma matriz bem ordenada seja formada. O gel pode ser turvo ou translúcido, neste caso, o gel pode ser termo-reversível. O termo gelação é também usado em outro contexto, que se refere às proteínas da gema do ovo. O fenômeno de gelação, neste caso, se refere a formação de um produto irreversivelmente gelificado.

Para suspensões cerâmicas, uma quantidade suficiente de proteína globular é capaz de gelificar em fase aquosa, quando aquecida, resultando em um corpo rígido, Figura 2.26.



Figura 2.26 – Esquema de formação de gel com uma proteína globular em suspensões cerâmicas<sup>19</sup>.

Quando é feita adição de uma proteína globular em uma suspensão cerâmica, seguida de uma operação de mistura, bolhas de ar podem ser introduzidas na suspensão e as moléculas de proteína são adsorvidas na interface ar/água, via local hidrofóbico, gerando um estiramento parcial, chamado de superfície de desnaturação. A diminuição na tensão superficial causada pela adsorção de proteínas tende a facilitar a formação de uma nova interface e também a geração de mais bolhas<sup>138, 140</sup>.

A habilidade de moléculas de proteínas para formação e estabilização da espuma depende da velocidade de difusão e propensão à desnaturação<sup>135</sup>. Alguns fatores, como: drenagem gravitacional, pressão capilar e intensa agitação mecânica podem contribuir para a diminuição da estabilidade da espuma, porém a viscosidade da superfície, efeito Gibbs-Marangoni e dupla camada elétrica podem aumentar sua estabilidade<sup>140</sup>. Por isso neste trabalho foi dada atenção a estes fenômenos em busca da melhor condição para obtenção da espuma.

O uso de novos aditivos em cerâmicas de impacto tecnológico, normalmente requer estudos aprofundados, visando diminuir o custo do processo, sem acarretar prejuízo nas propriedades do material. Em virtude da grande relevância das questões ligadas à melhoria de qualidade de vida e à necessidade de soluções rápidas para a crescente demanda de implantes, os esforços em busca de novas técnicas para manufatura de implantes são de total interesse no contexto da saúde pública nacional. O uso de técnicas alternativas em busca de soluções sustentáveis sem impactos ao meio ambiente e ao ser humano pode repercutir no fácil acesso destes materiais à classe médica e às necessidades do paciente.

---

## OBJETIVOS

Neste tópico é apresentada a proposição da tese, que configura seu objetivo principal e a justificativa da proposta.

### 3 OBJETIVOS

Em decorrência das propriedades que a técnica de consolidação utilizando albumina provêm, combinada às características intrínsecas de reatividade e biocompatibilidade diferenciada das cerâmicas bifásicas (HAp/ $\beta$ -TCP), este trabalho tem como objetivo principal, desenvolver e avaliar a obtenção de cerâmicas macroporosas à base de hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcico com potencial para regeneração de tecido ósseo.

O desenvolvimento deste trabalho foi feito através de dois enfoques distintos. O primeiro com o objetivo de avaliar o comportamento dos materiais de partida, procedeu-se com a obtenção de cerâmicas porosas a partir da técnica do *gelcasting* de espumas. Os resultados obtidos serviram para seleção de alguns parâmetros importantes, e como base comparativa, para a metodologia proposta, na qual está inserida o caráter inovador do trabalho. Apesar da técnica do *gelcasting* já ter sido utilizada para diferentes cerâmicas, ela foi pouco explorada no processamento das bifásicas (CaP), assim os resultados obtidos da mistura trouxeram novos desafios para pesquisa. Sendo assim, este estudo representou um método inédito na otimização para as suspensões cerâmicas a base de HAp,  $\beta$ -TCP e para as diferentes misturas.

No segundo enfoque, foram adaptadas as melhores condições para obtenção das cerâmicas porosas pela metodologia da consolidação direta a partir de dados correlacionados a técnica do *gelcasting* de espumas, seguida da caracterização física e *in vitro* das amostras obtidas. O processamento alternativo utilizando albumina é muito recente, tornando evidente a originalidade do trabalho e a necessidade destes estudos para uma análise comparativa frente às outras técnicas disponíveis para obtenção de implantes macroporosos e *scaffolds*.

---

## MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo está descrita a metodologia adotada para o desenvolvimento desta pesquisa, constando de técnicas de caracterização para avaliar os materiais de partida, metodologia de processamento, estudos de análises reológicas que complementam o desenvolvimento da técnica proposta e as caracterizações físicas e *in vitro* das cerâmicas obtidas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi iniciado pela caracterização das matérias-primas (hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcico) para prever o efeito de suas propriedades na obtenção das suspensões cerâmicas.

Sabe-se que o desempenho da cerâmica é bastante influenciado pelas características do pó adotado como precursor; neste trabalho, as características dos materiais de partida foram adequadas às melhores condições para a técnica de processamento coloidal por gelcasting de espumas e consolidação a partir do albúmem (extrato de proteínas procedentes da clara do ovo) fornecido pela empresa Schettert Nutracêutica.

### 4.1 Materiais

Os materiais utilizados são: Hidroxiapatita (cód.20-2039, Strem Chemicals) e  $\beta$ - fosfato tricálcico (cód. 21218, Fluka).

### 4.2 Caracterização física das matérias-primas

- *Difração de raios X*

Os pós foram caracterizados por difração de raios-X (difratômetro Bruker-AXS modelo D8 Advance) para confirmar a presença das fases cristalinas: hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcico, e possível presença de fases secundárias.

- *Distribuição de tamanho de partículas*

Foram realizados ensaios para determinação da distribuição de tamanho de partículas/aglomerados, pela técnica de difração a laser em equipamento Cilas 1064. Neste ensaio, cada amostragem (~ 0,5g ) de pó (HAp ou TCP), foi dispersa em meio aquoso com adição do dispersante comercial Dispex A-40 (poliacrilato de amônio) (0,05% em massa), permanecendo por 1 minuto em ultrassom (Vibracell Sonics & Materials).

- ***Área Superficial Específica***

A área superficial específica foi determinada, adotando-se o método de adsorção gasosa (BET – Micromeritics modelo ASAP 2010), utilizando gás N<sub>2</sub> como adsorvedor.

- ***Microscopia eletrônica de varredura***

A morfologia dos pós foi observada por microscopia eletrônica de varredura, equipamento Philips–XL 30, com espectroscopia de dispersão de energia (EDS), marca EDAX. Uma pequena quantidade de pó foi dispersa em etanol e depositado, com auxílio de um estalagnômetro, sobre o porta-amostra, seguido de recobrimento com Au.

- ***Espectroscopia de Infravermelho***

A técnica de caracterização por espectroscopia de infravermelho foi empregada 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, cuja presença pode ter grande influência nas propriedades do material. Os pós foram incorporados em matriz de KBr e analisados por técnica de transmitância em equipamento Thermo Nicolet 870-FTIR-NEXUS.

### **4.3 Caracterização da albumina**

O extrato de ovalbumina (Schettert-Nutracêutica), denominado de albúmem foi caracterizado quanto à composição química elementar pela técnica de Fluorescência de Raios-X por dispersão de comprimento de onda (FRX), por espectroscopia de infravermelho (FTIR), para identificação dos grupos característicos das proteínas. Foi utilizada a técnica de análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimétrica (TG), em equipamento Shimadzu 50H, para avaliar o comportamento térmico deste material, prevendo alguns eventos como: desnaturação protéica e a cinética de decomposição a fim de estabelecer um processo adequado de queima para eliminação dos orgânicos sem comprometer a posterior sinterização.

#### 4.4 Análise dos surfactantes

A seleção dos surfactantes, para avaliar a compatibilidade química com os demais aditivos e rendimento de espuma, foi realizada pela verificação do efeito produzido de cada surfactante e também por medidas de tensão superficial em diferentes concentrações, para estabelecer a concentração micelar crítica de cada surfactante. Neste ensaio utilizou-se um tensiômetro, KRÜSS modelo K-6. Com base nesta análise e avaliação da efetividade foi selecionado um ou mais surfactantes para etapa de preparo das suspensões.

As propriedades espumantes podem ser melhor avaliadas pela expansão e estabilidade da espuma. O volume e a sinérese (expulsão da fase líquida, decorrente da aproximação das moléculas após formação da espuma com redução de seu volume) da espuma foram usados como índices de estabilidade, sendo que a sinérese é o inverso da estabilidade. Como o aumento da sinérese nem sempre é acompanhado pela correspondente diminuição no volume de espuma devido a sua aderência na superfície do recipiente usado na sua determinação, a sinérese é uma medida mais precisa do que a determinação do volume para verificar sua estabilidade.

A expansão e sinérese foram determinadas pelas seguintes equações <sup>170</sup>:

$$\% \text{ expansão} = \frac{\text{vol. após agitação} - \text{vol. antes da agitação}}{\text{vol. antes da agitação}} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

$$\% \text{ sinérese} = \frac{\text{vol. liq. liberado da espuma após certo tempo}}{\text{vol. liq. inicial} - \text{vol. liq. após agitação}} \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

#### 4.5 Preparo e Caracterização das suspensões

##### 4.5.1 Mobilidade eletroforética (potencial zeta)

A mistura do material particulado em água, para obter um sistema fluido, é o primeiro passo de um processamento coloidal. Esta etapa de dispersão é muito importante para descrever o comportamento do pó em suspensão e prever a intensidade das forças de atração entre suas partículas. A medida de mobilidade eletroforética de partículas é a técnica mais recomendada para caracterização da suspensão nesta etapa inicial e

estabelecer as melhores condições de dispersão e estabilidade, a partir de valores de potencial zeta.

Para determinação da mobilidade eletroforética foram preparadas suspensões cerâmicas com 0,04 % (volume) de HAp e  $\beta$ -TCP em solução aquosa de KCl  $1.10^{-3}$  M. O pH das suspensões foi ajustado com HCl ou KOH, obtendo diferentes pHs para leitura. As medidas foram realizadas em Zetâmetro, ZETA PALS - Brookhaven Instruments Corporation.

Para analisar a influência do dispersante (dispex A40), um poliacrilato de amônio com peso molecular de 10.000 Daltons, foi preparada uma suspensão nas mesmas condições adotadas anteriormente para o estudo de potencial zeta, variando-se, neste caso, a concentração de dispersante. A cada adição do dispersante foram medidos valores de mobilidade eletroforética, determinando o potencial zeta correspondente a diferentes pHs, mantendo intervalo alcalino.

Após a caracterização dos pós, quanto aos valores de potencial zeta, em diferentes pHs, foi realizada uma avaliação reológica das suspensões.

#### 4.5.2 Estudos reológicos

A partir dos resultados de potencial zeta foram preparadas suspensões cerâmicas nas mesmas concentrações de dispersante analisadas no ensaio de potencial zeta.

É importante considerar que a obtenção da suspensão inicial foi baseada nas concentrações dos reagentes definidas pela teoria do gelcasting de espumas <sup>145, 153</sup>, contendo em média teores acima de 55% (massa) de sólidos em solução aquosa com 7% (massa) de monômero, garantindo uma condição adequada de estabilidade pela adição de um dispersante específico, sendo mantidas em ultrassom para assegurar boa homogeneidade de dispersão.

O fluxograma representativo da primeira etapa da metodologia gelcasting para o preparo da suspensão, etapa que antecede a obtenção da espuma, é apresentado na Figura 4.1.

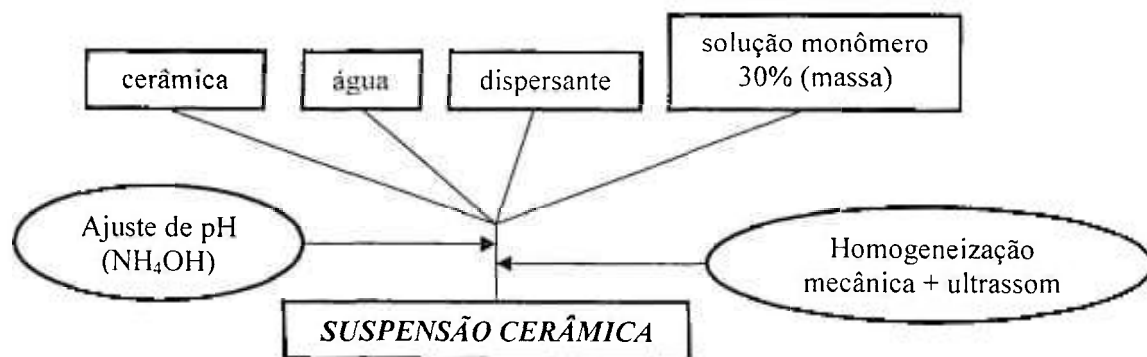


Figura 4.1 –Fluxograma da metodologia utilizada na obtenção das suspensões.

Neste estudo foi observado o comportamento típico das suspensões, utilizando equipamento Reômetro – Brookfield LV, modelo DV-III, com porta-amostra para pequeno volume de material e spindle SC4-18. As suspensões foram submetidas a ciclos de cisalhamento crescentes e em seguida decrescentes, com taxa de cisalhamento variando entre 2 e 30  $s^{-1}$ .

Para o estudo de gelificação, a reologia foi analisada a partir de ensaios oscilatórios no modo de operação, com frequência e tensão constantes de 1 Hz e 1 Pa, respectivamente, e um tempo de ajuste de 30s para as medidas. Neste ensaio foram analisadas suspensões aquosas contendo diferentes concentrações (5, 6 e 7 % em massa) de albumina. Utilizou-se o sistema de medidas de placas paralelas na obtenção das variáveis:  $G'$  (módulo de armazenamento ou elástico) e  $G''$  (módulo de perda ou viscoso), em função da temperatura, no intervalo de 35-80°C. Como a temperatura é a principal responsável pela consolidação da suspensão na metodologia da albumina, contribuindo diretamente para formação do gel e na desnaturação da proteína, as leituras foram realizadas em função desta grandeza –  $T(^{\circ}C)$ .

As leituras foram iniciadas a 35°C, já que foi necessário um brando aquecimento da suspensão para assegurar uma melhor condição de homogeneidade da amostra durante seu preparo. Suspensões heterogêneas com presença de glóbulos de albumina são características de sistemas obtidos a temperatura ambiente e podem comprometer as análises reológicas, por isso foi utilizado um aquecimento (30- 35°C) seguido de dispersão em ultra-som (30s). As leituras limitaram-se a temperaturas de até 80°C, já que em temperaturas superiores, a albumina já sofreu processo de desnaturação, e pode ocorrer ruptura de sua estrutura devido ao início do processo secagem da suspensão,

podendo comprometer as propriedades reológicas estudadas. Nesta situação é difícil garantir que a amostra ainda esteja em regime elástico, prejudicando a leitura de um sinal claro e intenso desta propriedade (gelificação).

#### 4.6 Obtenção e caracterização da espuma

Diferentes proporções entre as fases de HAp e  $\beta$ -TCP foram obtidas. As composições (% em massa) das misturas foram nomeadas da seguinte maneira: 5H (50% de HAp e  $\beta$ -TCP), 2H/7T (25% HAp e 75%  $\beta$ -TCP) e 7H/2T (75% HAp e 25%  $\beta$ -TCP). A etapa de obtenção da espuma está descrita no fluxograma apresentado na Figura 4.2.

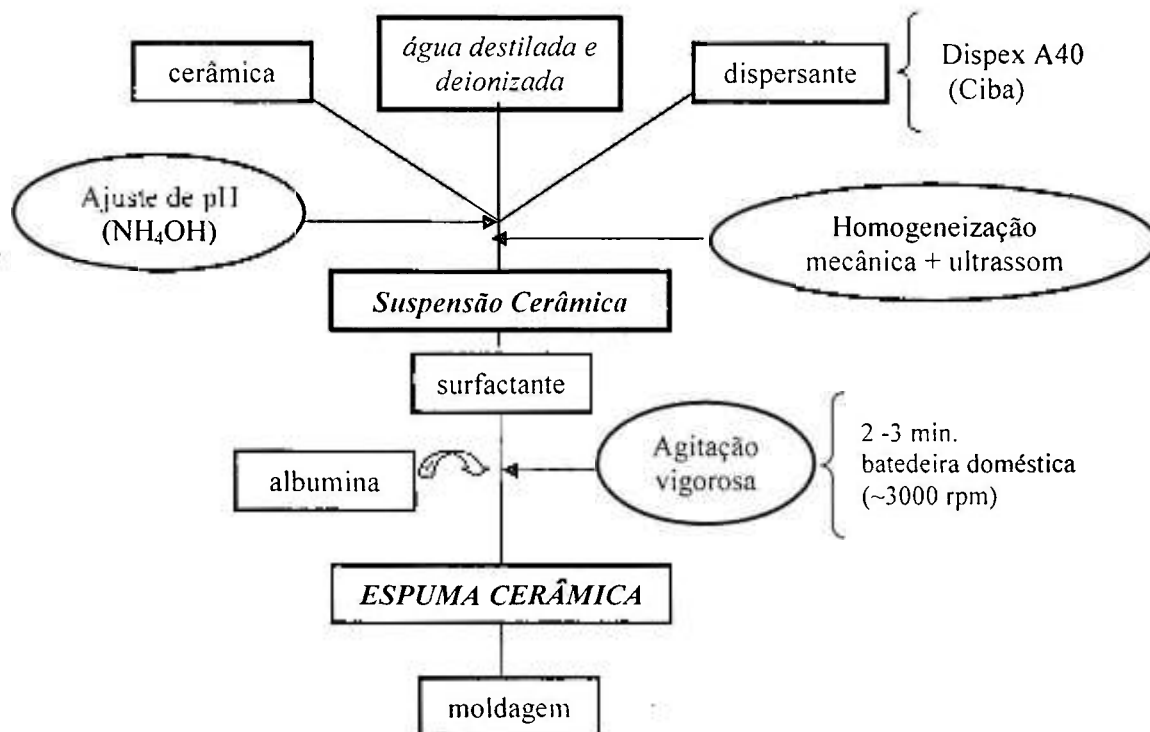


Figura 4.2 – Fluxograma da metodologia utilizada na obtenção das espumas cerâmicas.

A inovação desta técnica refere-se a ausência da adição de monômero, iniciador e catalisador, necessários para produção de um corpo poroso, rígido e gelificado. Esta metodologia torna-se bastante versátil pelo fato de não exigir atmosfera controlada e pelo aproveitamento das propriedades surfactantes (emulsão, cozimento, espumante, estabilizante) e reológicas (agregação, gelação, viscosidade) da albumina<sup>171</sup>. Neste processamento, suspensões cerâmicas foram preparadas em condições que se aproximavam

o máximo possível da metodologia do *gelcasting*, em termos de quantidade de cada componente. Adotou-se uma quantidade de albumina entre 5-7%. É importante salientar que a albumina participa como teor de sólido nesta metodologia, competindo com a cerâmica na etapa de dispersão e gerando suspensões mais viscosas que as suspensões obtidas pelo *gelcasting* de espumas.

Após obtenção, as espumas cerâmicas foram vertidas rapidamente em diferentes moldes e levadas a estufa a 60°C para gelificação. As paredes do molde foram previamente lubrificadas com vaselina para facilitar a remoção da espuma consolidada. A temperatura ideal foi definida após a interpretação do estudo reológico, na determinação do ponto de gel e o tempo foi variado de acordo com o volume de espuma, ou seja, o tamanho do molde utilizado. Após reação de gelificação, a espuma é removida do molde e mantida em estufa (60°C) por meia hora para prévia secagem e depois mantida ao ar para perda gradativa de água, evitando o aparecimento de trincas. Posteriormente, as amostras foram tratadas termicamente a 600 °C/2h com taxa de aquecimento de 3 °C/min para degradação completa dos orgânicos. As amostras foram sinterizadas em atmosfera oxidante, usando taxa de aquecimento e resfriamento de 5°C/min e 10°C/min, respectivamente. As taxas de aquecimento e resfriamento foram mantidas para as diferentes misturas e para as composições monofásicas, variando somente a temperatura e tempo de sinterização.

As condições adotadas foram: 1100°C/1h, para HAp; 1200°C/30min, para a mistura 7H/2T; e 1250°C/30min para o TCP e as misturas 5H e 2H/7T; temperaturas estabelecidas a partir de dados de densificação para as diferentes composições <sup>172</sup>.

Após sinterização, as amostras foram caracterizadas quanto às fases cristalinas, por difração de raios-X, adotando os mesmos parâmetros dos pós de partida; morfologia e análise da microestrutura, por microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.6.1 Avaliação da Porosidade

Os valores de porosidade foram calculados de acordo com a norma ASTM C20-00, pela equação <sup>173</sup>:

$$\text{Porosidade aparente: } P_{AP} = (\mu - m_s) / (\mu - m_i) \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

Sendo:

$\mu$  = massa úmida

$m_s$  = massa seca

$m_i$  = massa imersa

Para determinação destes dados foi utilizado querosene ( $\rho=0,76\text{g/cm}^3$  a  $25^\circ\text{C}$ ) como líquido penetrante, e não água. Esta substituição está relacionada ao fato do querosene apresentar, a temperatura ambiente, menor tensão superficial (23 dina/cm) em relação à água (72 dina/cm), esta característica permite maior habilidade de penetração nos poros e descontinuidades, conferindo melhor molhabilidade e capilaridade, forças que estão associadas também a tensão superficial, induzindo uma penetração espontânea na região dos poros. Durante este ensaio as amostras foram imersas em querosene e mantidas num sistema de vácuo por 30 minutos, para eliminação completa de gases aprisionados, antes de mensurar os valores de massa (imersa e úmida) necessários para determinação da porosidade.

A distribuição do tamanho de poros foi obtida pela técnica de intrusão de mercúrio, equipamento Micromeritics-Autopore III e os valores comparados com os dados de porosidade aparente obtidos anteriormente.

## **4.7 Ensaio *in vitro***

### **4.7.1 Dissolução e Bioatividade em SBF**

Foi analisado o comportamento das cerâmicas porosas por um período de 21 dias na presença de solução simulada do plasma sanguíneo humano (SBF), com pH de 7,24. A preparação do SBF está descrita no Apêndice A.

Para este ensaio foram cortadas amostras cilíndricas com 10 mm de diâmetro e 5 mm de altura; e adotada uma razão de área geométrica das cerâmicas em relação ao volume de solução,  $S/V= 0,1\text{ cm}^{-1}$ . 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  $40^\circ\text{C}$  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 equipamento Shaker (TE-420, Tecnal) com sistema de agitação ajustado a 40 rpm e temperatura fixa de  $37,0^\circ\text{C}$ . As soluções de SBF foram renovadas a cada 3 dias. Após este período as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

Durante este estudo foi realizado um acompanhamento quanto ao ganho de massa das amostras e variação de pH das soluções, sendo monitorados os elementos Ca e P por medidas de espectrometria de emissão por plasma induzido (ICP-OES). Estes resultados foram comparados com os dados obtidos pelos ensaios envolvendo o meio simulado (DMEM) de cultura de células.

#### 4.7.2 Ensaios de cultura com osteoblastos

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material com potencial para aplicações médicas. Estes testes se destacam pela facilidade de padronização das amostras e controle de fatores como: pH, temperatura, pressão osmótica, concentração de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Porém é exigido um ambiente totalmente estéril e asséptico para a prática deste ensaio, sendo o alto custo do experimento sua maior desvantagem, comparada ao custo relativamente baixo dos experimentos em animais.

Foi realizado teste preliminar de biocompatibilidade e citotoxicidade de acordo com o protocolo da ISO 10993-5<sup>174</sup>. Nesta norma constam três categorias para testes de citotoxicidade de biomateriais. Neste trabalho optou-se pelo teste de contato direto, análise de rotina utilizada pelo Laboratório de Pesquisa Básica em cultivo celular do Departamento de Dentística da FOUSP.

Como as linhagens derivadas de osteossarcoma nem sempre apresentam diferenciação completa *in vitro* e linhagens imortalizadas podem adquirir expressão fenotípica diferente das células das quais foram originadas, as células utilizadas nesse trabalho foram extraídas de cultura primária de osteoblastos porque representam fielmente as células com as quais os implantes vão interagir quando implantados *in vivo*. Células da linhagem OSTEO 1 de osteoblastos de ossos de camundongos recém-nascidos foram utilizadas neste estudo. Essas células foram cultivadas em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), cuja composição é detalhada no Apêndice B, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de antibiótico-antimicótico, mantido a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos para manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura. Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços, com osteoblastos na densidade de

$4 \times 10^4$  células/poço incubadas em DMEM na presença de amostras bifásicas da mistura (HAp/ $\beta$ -TCP) 1:1, com dimensões de 10 mm de diâmetro e altura entre 5-8 mm, Figura 4.3. As amostras foram previamente esterilizadas a uma dose de 25kGy por meio de radiação gamma (Co60, Gammacell modelo 220, Centro de Tecnologia das Radiações-IPEN).



Figura 4.3 – Amostra típica para o ensaio *in vitro*, processada via albumina, sinterizada e cortada em serra-copo de 10 mm.

Foram estabelecidos 4 grupos de acordo com os tempos experimentais de 12 horas, 1, 2 e 3 dias, sendo cada grupo formado por 3 amostras, Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Planejamento dos ensaios *in vitro* com cultura de células. Separação em 4 grupos de estudo em função do tempo.

<b>grupo 1</b>	<b>grupo 2</b>	<b>grupo 3</b>	<b>grupo 4</b>
12 horas	1 dia	2 dias	3 dias

Este ensaio normalmente é utilizado para uma resposta imediata ou de curto prazo, sendo avaliadas: ancoragem celular, alterações no crescimento celular, na membrana citoplasmática, ou perturbação metabólica. Deve-se considerar que o objetivo principal destes testes é demonstrar a natureza citotóxica, ou não, do material, e não a reação tecidual que ele provoca.

O aspecto morfológico das células foi analisado a cada tempo experimental em microscópio eletrônico de varredura e comparado com dados obtidos da literatura.

Paralelamente, foi realizado estudo do meio de cultura, sem a presença das células, para avaliar o comportamento do meio de simulação DMEM na presença das cerâmicas bifásicas de mesma composição destinada aos estudos em SBF. Este estudo foi

concretizado avaliando alterações de massa, variações de pH e monitorando concentrações de Ca e P nas soluções por espectrometria de emissão por plasma induzido, durante os diferentes períodos.

---

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta o teor de maior importância da tese. Nele estão apresentados os resultados de maior pertinência, obtidos no decorrer da pesquisa. Resultados quanto aos materiais de partida, quanto à metodologia do *gelcasting* e da consolidação via albumina são relatados na sua íntegra e comparados com dados já prescritos na literatura. A essência da argumentação teve forte embasamento da Revisão Bibliográfica apresentada.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização dos materiais de partida

#### 5.1.1 Avaliação dos pós cerâmicos

Foram obtidos difratogramas dos pós de partida (não sinterizados) de hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato-tricálcico para confirmar a presença das fases características destes materiais e observar a coexistência de fases secundárias, como o fosfato tricálcico, que pode estar presente em HAp comerciais, ou CaO e  $\text{Ca(OH)}_2$  empregados para atingir a razão estequiométrica ideal de Ca/P no material <sup>65, 175</sup>.

Os difratogramas obtidos são apresentados na Figura 5.1– (a) e (b), onde é possível observar apenas os picos característicos do  $\beta$ -fosfato tricálcico e da hidroxiapatita, respectivamente.

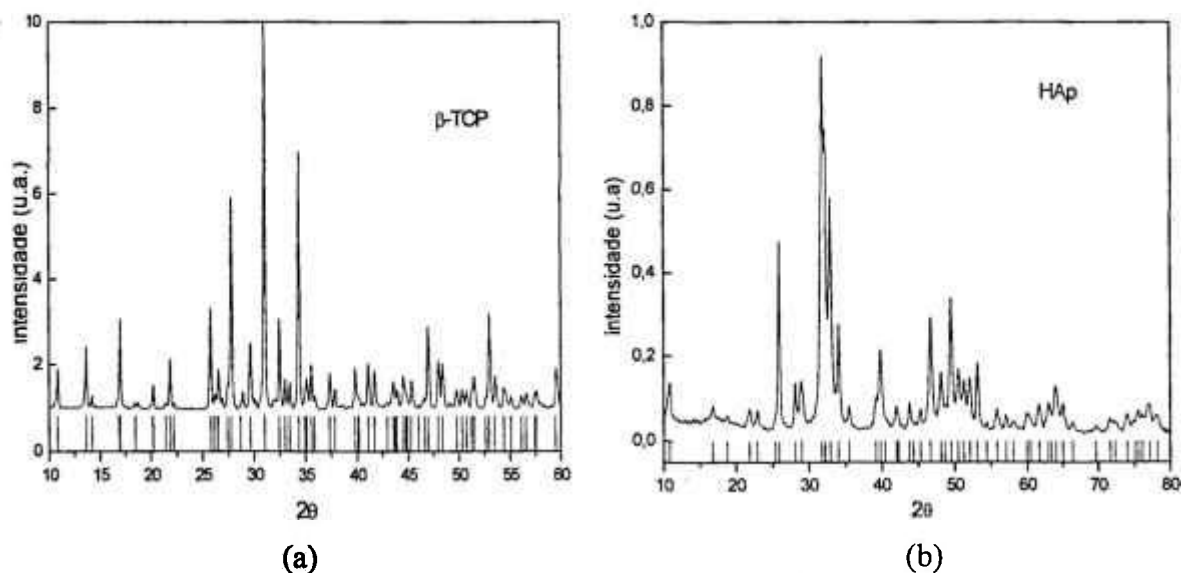


Figura 5.1– Difratograma dos pós não sinterizados (a):  $\beta$ -fosfato-tricálcico e (b): hidroxiapatita, respectivamente.

Os pós, Figura 5.2, apresentam morfologias diferentes, sendo observada a presença de aglomerados com formato mais esférico e superfície de característica rugosa, para a HAp, enquanto o TCP é constituído de partículas maiores com geometria facetada e superfícies mais lisas.

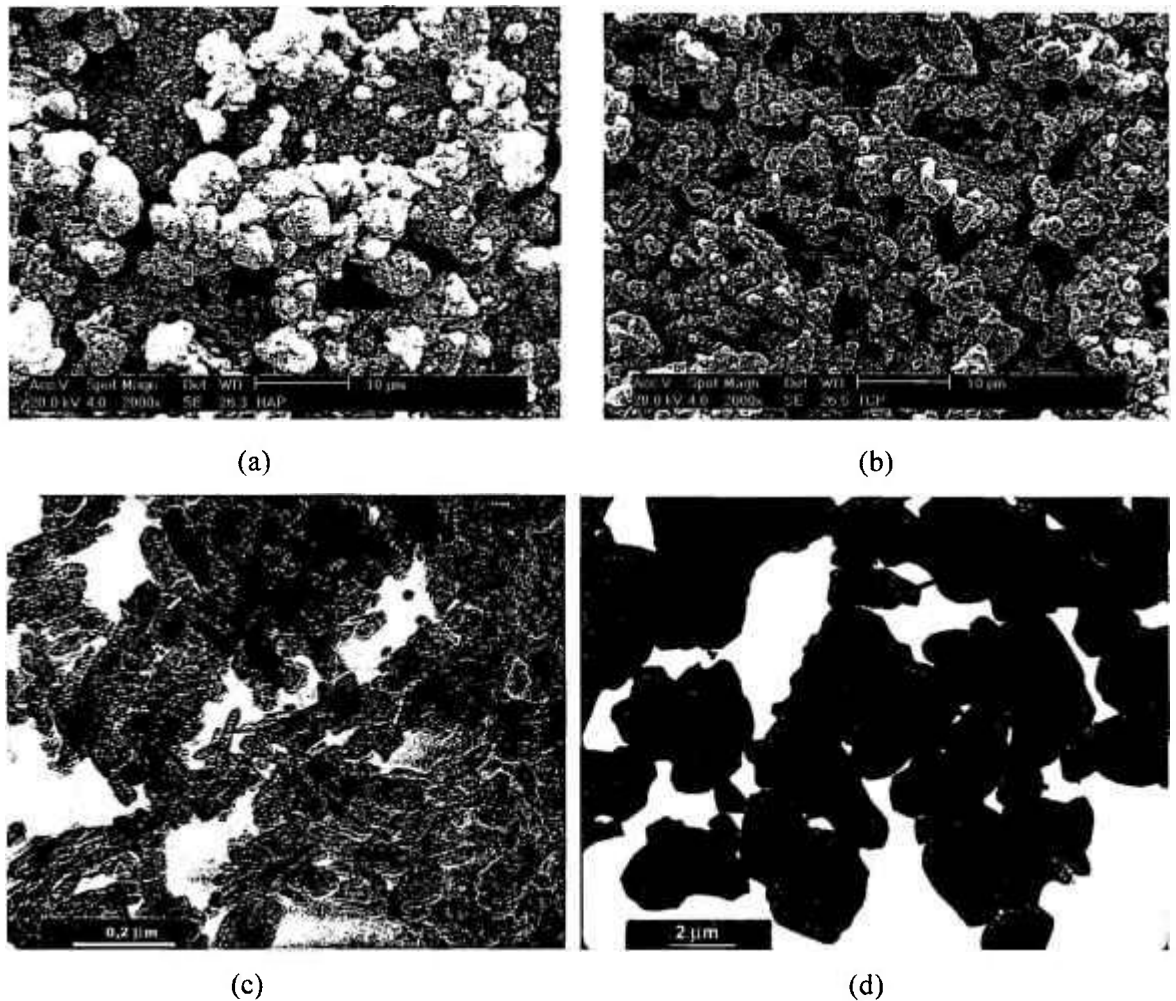


Figura 5.2 - Micrografias dos pós de partida, (a) HAp e (b) TCP, obtidos por MEV e (c)HAp e (d) TCP, obtidos por MET.

Normalmente, pós finos garantem melhores características para a sinterização, assegurando microestruturas finas, homogêneas e livres de macrodefeitos, porém o processo de dispersão pode ser dificultado, considerando que pós finos absorvem maior quantidade de água para reduzir sua energia livre e suprir a deficiência de ligação <sup>117</sup>.

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, 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<sub>2</sub>) utilizado no ensaio que do gás/sólido e nem posições preferenciais de adsorção, o que torna o resultado confiável. Os resultados desta análise e de distribuição de tamanho de partículas, obtida pelo método de

difração a laser, dos pós de hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato-tricálcico, são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1- Resultados obtidos das análises por BET e Cilas.

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

Estas técnicas forneceram resultados que estão associados ao estado de aglomeração dos pós, principalmente na HAp, indicando a presença de agregados densos, já que não foram rompidos depois de mantidos em ultra-som. 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 rápido e aleatoriamente, decorrente do impacto entre as próprias partículas, ou com as moléculas do meio, ou contra a superfície do recipiente, facilitando a aglomeração. Este fenômeno apresenta uma influência marcante sobre o comportamento reológico de suspensões, visto que áreas de superfície específica elevada são favoráveis a formação de aglomerados<sup>117</sup>.

Foram obtidos espectros de infravermelho por transmitância para os pós de HAp e TCP. As Figuras 5.3-5.4 apresentam os espectros obtidos e os picos de transmitância característicos.

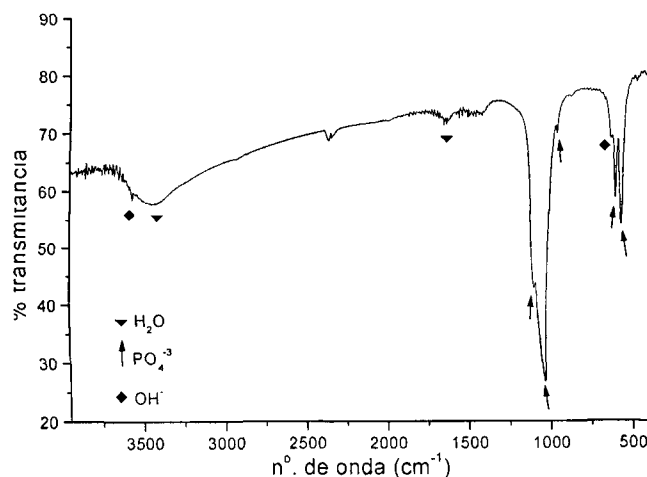


Figura 5.3 – Espectro de transmitância obtido por FTIR da HAp (material de partida).

Os principais picos de energia de vibração identificados nas duas amostras: HAp e TCP são atribuídos aos grupos funcionais de ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{-3}$ ), hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ), hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{-2}$ ) e provavelmente pirofosfato ( $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ ), estes dois últimos em quantidade traço, já que seus picos não são expressivos e nem observados nas outras posições do espectro, características destas espécies. A presença de carbonato não foi observada nas matérias-primas.

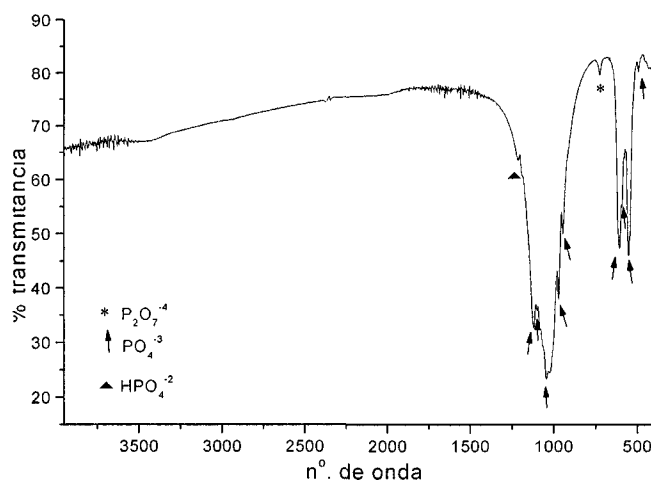


Figura 5.4 – Espectro de transmitância obtido por FTIR do  $\beta$ -TCP.

No espectro da amostra de HAp, Figura 5.3, são observadas suas bandas características em: 561, 603 e 631 ( $\text{cm}^{-1}$ ) que correspondem aos modos de deformação tripla degenerada de ligações O-P-O de grupos fosfatos do tipo  $\nu_{4c}$  e  $\nu_{4a}$ , associados ao nível de energia e tipo de vizinhança que estão ligados e, ao modo  $\nu_L$ , do tipo rotacional da ligação O-H, respectivamente. Em 3572  $\text{cm}^{-1}$  é observada a banda decorrente também do grupo  $\text{OH}^-$ , referente a seu modo de estiramento,  $\nu_s$ . A banda observada em 962  $\text{cm}^{-1}$ , de baixa intensidade em amostras de HAp, é decorrente do modo,  $\nu_1$ , correspondente ao estiramento simétrico não degenerado de ligações P-O de grupos fosfatos. As bandas em 1033 e 1089 ( $\text{cm}^{-1}$ ) representam os modos de estiramento assimétrico triplo degenerado,  $\nu_{3c}$  e  $\nu_{3a}$ , respectivamente, das ligações P-O de grupos fosfatos<sup>176</sup>.

Foi observada a presença de água nos materiais de partida pela existência de bandas associadas a ruídos nas regiões de 1590 - 1630 ( $\text{cm}^{-1}$ ), modo de deformação  $\nu_2$  e banda larga por volta de 3400  $\text{cm}^{-1}$ , 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 ( $\text{cm}^{-1}$ ) descarta a possibilidade de uma HAp deficiente em cálcio<sup>65, 176</sup> e a ausência de bandas nas posições: 680, 715, 745 ( $\text{cm}^{-1}$ ) e também de uma banda de forte intensidade em 3544 ( $\text{cm}^{-1}$ ), elimina a possibilidade de tratar-se de uma HAp rica em cálcio<sup>65, 176</sup>.

Na amostra de TCP, a ausência de bandas em 460 e 740 ( $\text{cm}^{-1}$ ) e de uma banda isolada,  $\sim 600 \text{ cm}^{-1}$ , características do  $\alpha$ -TCP, indica que o material de partida é composto apenas de  $\beta$ -TCP. Este fosfato de cálcio é facilmente identificado por apresentar uma banda larga em 900-1200  $\text{cm}^{-1}$ <sup>65</sup>. Observa-se a presença do pico em 724  $\text{cm}^{-1}$ , 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  $\text{PO}_4^{-3}$  em dímeros de  $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ <sup>177, 178</sup>. Já o pico em 1214  $\text{cm}^{-1}$  é característico do modo não degenerado de deformação plana de hidrogênio em grupos:  $-\text{OPO-H} \cdots \text{O-PO}_3$ , comum em íons  $\text{HPO}_4^{-2}$ <sup>176</sup>. 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 5.4, apresenta diferentemente da outra amostra, uma banda pouco significativa de água adsorvida na superfície, podendo ser incorporada à rede, associando-se às espécies vizinhas. Apesar de estes dois picos serem detectados no espectro, seus grupos  $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$  e  $\text{HPO}_4^{-2}$  não foram confirmados em outras posições do espectro.

Foi determinado o potencial zeta característico de cada cerâmica, HAp,  $\beta$ -TCP. Informações desta natureza permitem manipular a estabilidade das suspensões em busca de um perfil ideal de dispersão.

A teoria DLVO pode ser interpretada em termos da dependência entre valores de potencial zeta com o pH da suspensão, sendo que alterações no pH podem promover a formação de suspensões dispersas ou não. A Figura 5.5 apresenta a evolução do potencial zeta para os pós comerciais de HAp e  $\beta$ -TCP em função do pH.

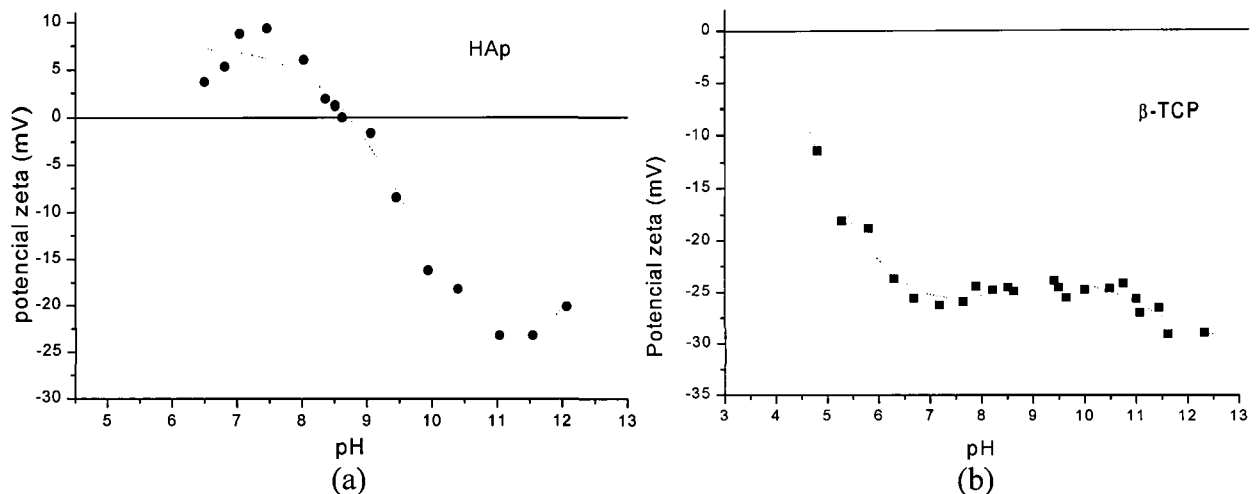


Figura 5.5 - Curvas de potencial zeta obtidas a partir da mobilidade eletroforética para as amostras: (a) HAp e (b)  $\beta$ -TCP.

Foi observado que a hidroxiapatita em intervalos de pH próximos a neutralidade e de mínima acidez ou alcalinidade (pH entre 6-8, respectivamente) desenvolve uma carga superficial positiva, sendo o ponto isoelétrico detectado em pH 8,6; neste ponto o potencial é nulo e a suspensão encontra-se aglomerada. Os valores de pH acima de 10,5 referentes ao intervalo máximo de potencial entre  $-22$  e  $-24$  mV definem suspensões de HAp completamente dispersas.

A presença dos eletrólitos (HCl e KOH) utilizados durante as medidas, principalmente, para pHs inferiores a 7 e próximos de 12 pode ter provocado alterações na curva de potencial zeta da HAp, observa-se que nestes intervalos a curva apresenta uma tendência diferente do seu percurso normal. Este comportamento pode estar relacionado ao fenômeno de saturação decorrente do aumento da força iônica (excesso do eletrólito), causando uma compressão na dupla camada elétrica que pode modificar a estabilidade da suspensão <sup>115</sup>.

Para o sistema contendo  $\beta$ -TCP houve uma predominância de carga superficial negativa sobre as partículas nos diferentes pHs analisados. A maior solubilidade desta cerâmica com relação a HAp tornou difícil o alcance de seu ponto isoelétrico, já que abaixo de pH 6 o material apresenta significativa solubilidade. As partículas de  $\beta$ -TCP indicaram alta mobilidade em pH acima de 7 (intervalo de máximo potencial), mas com mínima variação na sensibilidade para estes valores de pH ( $> 7$ ).

A evolução da curva de potencial zeta para o  $\beta$ -TCP sofreu uma sutil oscilação em regiões alcalinas devido a presença de contra-íons e co-íons capazes de alterar a

mobilidade eletroforética, mas os resultados obtidos indicam que a suspensão deste material apresenta-se dispersa na região com pH acima de 7.

Os valores de pH associados ao potencial zeta, correspondentes a uma condição de dispersão, foram empregados no preparo das suspensões para avaliar seu comportamento reológico.

### 5.1.2 Estudo da ovalbumina

Com a finalidade de investigar a qualidade da albumina, considerando que não se trata de um reagente analítico de alta pureza, a mesma foi analisada quali e semi-quantitativamente por espectrometria de fluorescência de Raios-X (FRX). Os elementos identificados e os teores encontrados na amostra estão apresentados na Tabela 5.2. Os elementos típicos de proteínas, que representam a cadeia de aminoácidos, como C, O, N e H presentes na amostra de albumina não puderam ser identificados pela limitação da técnica de FRX em relação a elementos leves. Esta limitação é decorrente da performance do cristal de LiF para determinadas regiões do espectro.

Tabela 5.2 - Identificação elementar da amostra de albumina obtida por FRX.

Elemento	Quantidade %
S	2,4
Cl	2,1
K	2,0
Na	1,2
P	0,18
Mg	0,16
Ca	0,12
Fe	0,0041
Ni	0,0028
Br	0,0012

O enxofre foi o elemento predominante encontrado na amostra de albumina. Sua combinação com o ferro dá origem ao sulfeto de ferro, responsável pelo alto valor de pH da albumina. Com o aquecimento, o enxofre é liberado da proteína sob a forma de gás hidrogênio sulfurado, resultando no seu odor característico <sup>179</sup>. Os elementos identificados podem ser volatilizados durante o tratamento térmico, mas a possibilidade de elementos

remanescentes, principalmente aqueles que apresentam compatibilidade com fosfatos de cálcio (Na, K, Mg, Cl) e os próprios elementos Ca e P, não pode ser descartada.

Para analisar a presença de seus grupos característicos, que não puderam ser identificados por FRX, foi obtido o espectro de transmissão por espectroscopia de infravermelho (FTIR), da amostra de albumina, Figura 5.6.

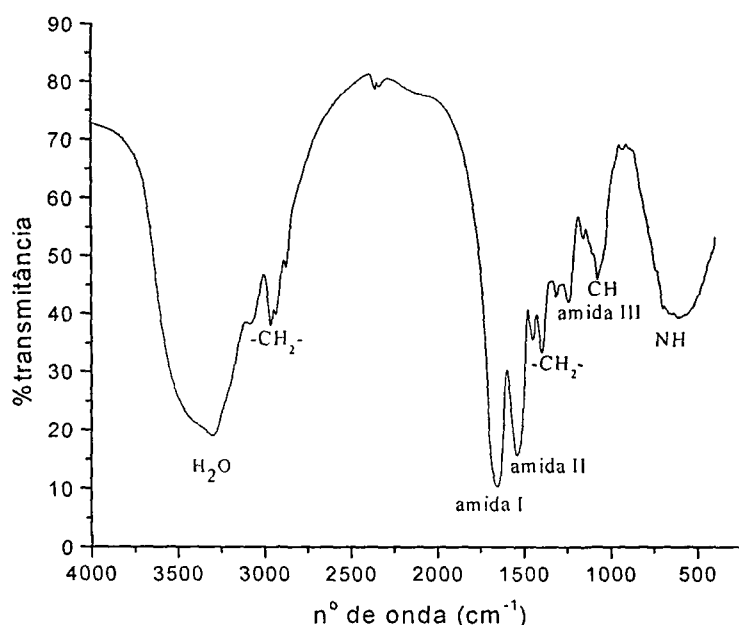


Figura 5.6- Espectro de transmissão obtido por FTIR da amostra de albumina.

No espectro apresentado é possível identificar a presença de diferentes grupos funcionais <sup>180, 181</sup>: 600-800  $\text{cm}^{-1}$ , banda característica da deformação angular fora do plano de ligação N-H, que é tipicamente encontrada em proteínas; 1072 e 1155  $\text{cm}^{-1}$  atribuída a deformação angular no plano de ligação C-H; 1235 e 1450  $\text{cm}^{-1}$ , vibrações no plano tipo amida III, resultantes do estiramento C-N e da vibração N-H; 1360  $\text{cm}^{-1}$  referente a deformação no plano simétrico  $\text{CH}_2$ ; 1552  $\text{cm}^{-1}$ , vibrações no plano tipo amida II, da ligação N-H e estiramento C-N; 1654  $\text{cm}^{-1}$ , amida I, estiramento da carbonila (C=O) da ligação peptídica; 2700 – 3100  $\text{cm}^{-1}$  resultantes da deformação axial assimétrica e simétrica do grupo  $-\text{CH}_2-$  da cadeia hidrocarbônica e na região de 3500  $\text{cm}^{-1}$ , banda larga atribuída a presença de água.

A curva de análise termogravimétrica (TG) e a respectiva derivada (DTG) da amostra de albumina é apresentada na Figura 5.7. O gráfico desta Figura apresenta dois estágios de perda de massa, o primeiro com perda de aproximadamente 9%, intervalo onde

ocorre a desidratação e desnaturação da proteína, e o segundo estágio caracterizado pelo intervalo de maior perda de massa, aproximadamente 70%, é relativo ao processo de degradação. Após tratamento térmico a 1000°C a albumina apresenta uma quantidade de resíduo inferior a 9%, provavelmente de substâncias que seriam eliminadas em tratamentos térmicos mais longos. Baseando-se nesta análise foi utilizada taxa de aquecimento de 3°C/min durante tratamento térmico das espumas de albumina, para facilitar a volatilização dos materiais, sem comprometer a sinterização.

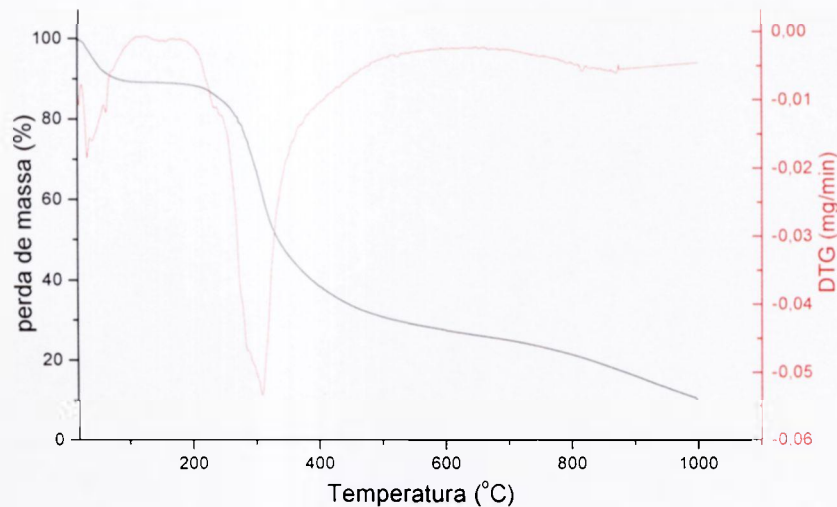


Figura 5.7 - Curva de análise termogravimétrica e sua respectiva derivada da amostra de albumina, com taxa de aquecimento de 5°C/min, em atmosfera de ar sintético.

Na curva de DSC para amostra de albumina, observam-se apenas eventos endotérmicos, Figura 5.8.

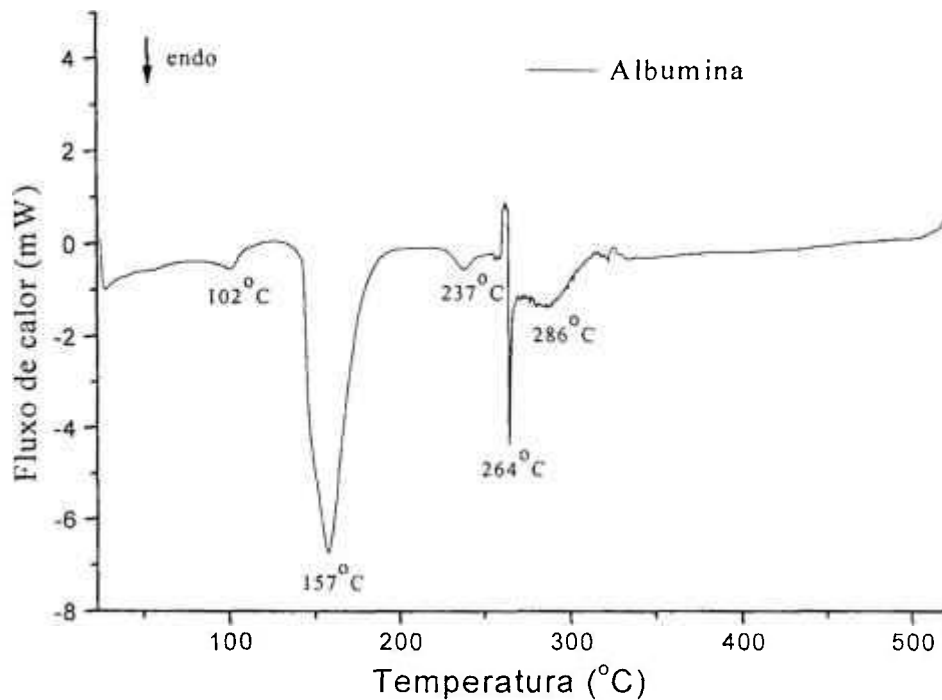


Figura 5.8 - Curva de análise térmica exploratória diferencial da amostra de albumina (taxa de 5°C/min).

A literatura mostra que o processo de gelatinização de proteínas pode ocorrer numa faixa de temperatura de 65 a 110°C, e processo de desnaturação ocorre no intervalo de 55-90°C <sup>19, 182</sup>. Estes processos não puderam ser comprovados na análise por DSC, nesse intervalo de temperatura pode-se observar apenas uma linha levemente ascendente.

O primeiro evento observado, a 102°C, pode ser originado pelo processo de desidratação da proteína, de acordo com a perda de massa na curva TG (Figura 5.7), o que impossibilita a ocorrência de um processo de gelatinização na mesma faixa de temperatura. O evento endotérmico a temperatura de 157°C pode ser atribuído a uma modificação estrutural da proteína, causando desdobramento da molécula, expondo à superfície espécies que diferem de sua estrutura nativa, fenômeno que envolve uma significativa variação de energia <sup>180</sup> e, em geral, se processa sem perda de massa. Com o objetivo de qualificar o evento próximo de 237°C foi realizado um tratamento térmico até 240°C para avaliar o aspecto da albumina e verificar a provável ocorrência de um processo de fusão nesta temperatura. Neste estudo foi observada uma alteração física da albumina, tanto no aspecto da cor (escurecimento) quanto no aspecto físico, passando de um estado de pó disperso para porções de grumos de tamanhos variados, comportamento que pode ser atribuído a um processo de fusão. Os eventos em 264°C e 286°C correspondem ao processo de degradação

da albumina responsáveis pela maior perda de massa. Este processo pode ocorrer em etapas diferentes devido a natureza heterogênea da fase amorfa da albumina <sup>182</sup>.

## 5.2 Estudo reológico de suspensões de albumina

Antes do processo de obtenção da espuma é muito importante a avaliação do comportamento do agente de consolidação, neste caso a albumina, para uma melhor definição do processo de gelificação. A etapa de consolidação pode ser melhor interpretada, avaliando-se as características reológicas, que assumem um papel primordial durante a modificação da suspensão fluida, para um estado rígido.

A transição da suspensão, ainda na forma de sol, para gel pode ser monitorada medindo-se os módulos de armazenamento ou elástico ( $G'$ ) e de perda ou viscoso ( $G''$ ), a certa frequência em função do tempo e/ou temperatura <sup>183</sup>. A componente elástica ( $G'$ ) indica quanto da tensão aplicada pode ser temporariamente armazenada e instantaneamente recuperada; a componente viscosa ( $G''$ ) está associada à energia utilizada para iniciar o fluxo viscoso, irreversivelmente transformada em calor. Neste trabalho, como a temperatura é a principal responsável pela solidificação da suspensão, sendo uma variável que contribui diretamente para formação do gel de albumina, considerando também a sensibilidade das proteínas com o aumento da temperatura, as leituras foram realizadas em função desta grandeza –  $T(^{\circ}\text{C})$ .

Os reogramas das Figuras a seguir (Fig. 5.9 – 5.11) apresentam o comportamento das respostas viscosa e elástica das suspensões de albumina em diferentes concentrações (5, 6 e 7% massa), em função da temperatura. Nos gráficos podem ser observados os pontos de gelificação para as diferentes amostras (pontos de interseção entre as curvas  $G'$  e  $G''$ ).

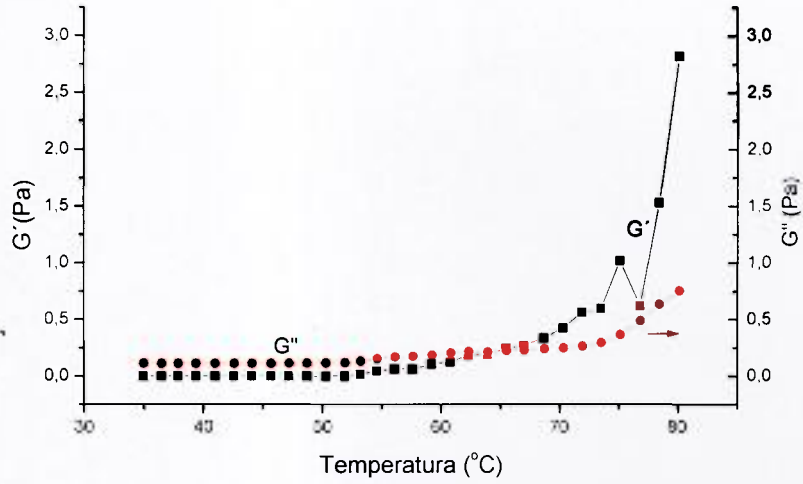


Figura 5.9 – Reograma representativo da variação das componentes: elástica ( $G'$ ) e viscosa ( $G''$ ) em função da temperatura, para suspensão de albumina (5% massa).

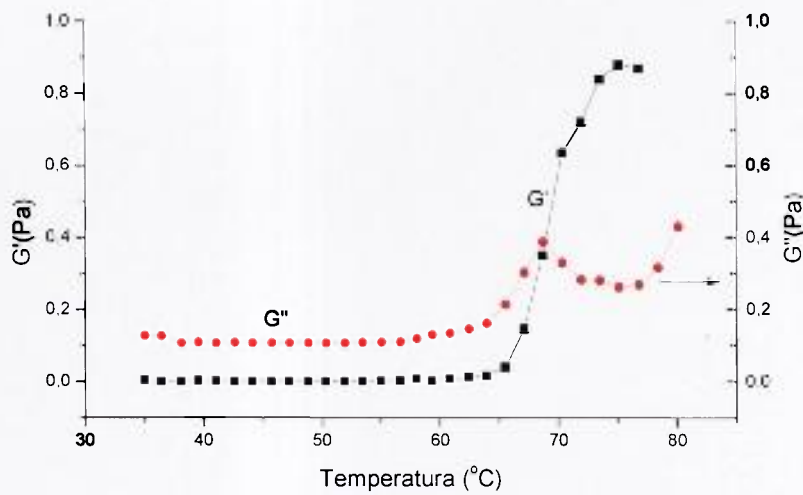


Figura 5.10 – Reograma representativo da variação das componentes: elástica ( $G'$ ) e viscosa ( $G''$ ) em função da temperatura, para suspensão de albumina (6% massa).

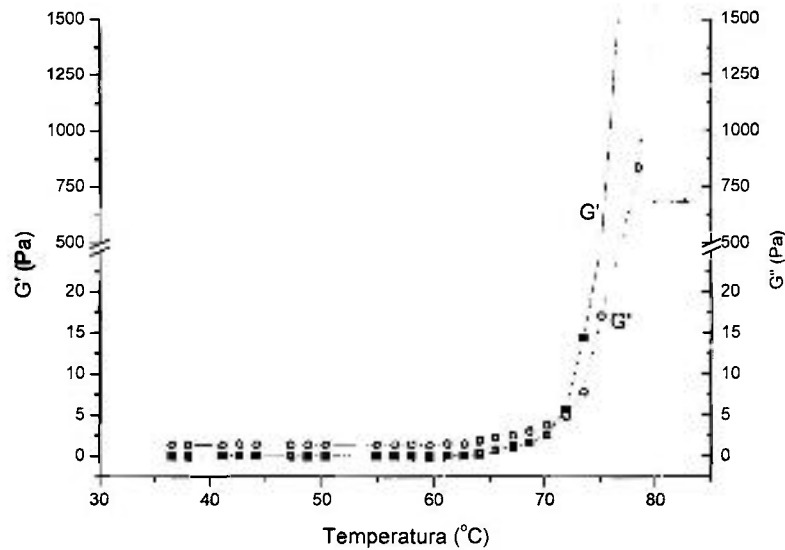


Figura 5.11 – Reograma representativo da variação das componentes: elástica ( $G'$ ) e viscosa ( $G''$ ) em função da temperatura, para suspensão de albumina (7% massa).

Inicialmente, o comportamento reológico das suspensões é caracterizado por um módulo de perda ( $G''$ ) maior que o módulo de armazenamento ( $G'$ ), definindo um comportamento viscoso para estes sistemas,  $G'' > G'$ . Fisicamente, a suspensão se torna mais elástica ao mesmo tempo em que aumenta sua capacidade de dissipar energia quando deformada. Com o aumento da temperatura, a componente elástica predomina sobre a componente viscosa, comportamento característico de gel ( $G' > G''$ ). O aumento mais acentuado de  $G'$  após a interseção entre os dois ( $G'$  e  $G''$ ) pode ser resultante da formação rápida de zonas de junção entre cadeias que formam a rede do gel <sup>184</sup>

Um dos critérios adotados na literatura para determinar a reação de gelificação, prevê que o ponto de gel é alcançado quando as curvas de  $G'$  e  $G''$  se interceptam, ou seja, o tempo necessário para que  $G'$  e  $G''$  se igualem <sup>185</sup>. Na verdade, a igualdade destas variáveis não deve ser considerada como propriedade universal do ponto de gel, pois, o tempo necessário para que a interseção de  $G'$  com  $G''$  ocorra, pode ser muito próximo, mas não é idêntico ao tempo necessário para a transição sol-gel. Porém, esse critério vem sendo utilizado por diversos autores <sup>184, 186</sup>.

As suspensões contendo: 5, 6 e 7% de albumina apresentaram ponto de gel a uma temperatura equivalente a 65, 69 e 75 °C, respectivamente. Observa-se que com o aumento da concentração de albumina uma temperatura mais alta é necessária para a reação de gelificação. Este comportamento foi mais expressivo para suspensões com maior quantidade de albumina.

As interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio contribuem para formação e estabilização da rede do gel e podem ser afetadas pela temperatura. A temperatura ótima de gelificação corresponde a um máximo da cooperação das interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Ligações secundárias sofrem diferentemente o efeito da temperatura; enquanto pontes de hidrogênio são estabilizadas pela diminuição da temperatura, as ligações hidrofóbicas são formadas a temperaturas mais elevadas <sup>186</sup>. Em temperaturas mais elevadas, normalmente o ponto de gel é caracterizado por uma rede tridimensional mais fraca, em função da menor contribuição das pontes de hidrogênio. Neste caso, a formação do gel ocorre mais rapidamente devido à contribuição predominante de ligações hidrofóbicas <sup>184</sup>. Para assegurar uma secagem lenta, na garantia de estruturas mais fortes obtidas preferencialmente pela cooperação entre pontes de hidrogênio e poucas interações hidrofóbicas, a etapa de consolidação da espuma, neste trabalho, é realizada a temperatura de 60°C, tendo como conseqüência um sólido mais resistente.

Para a suspensão 6% de albumina é observado valores constantes de  $G'$  (em torno de  $G'=0,86$  Pa), indicando provavelmente, o fim da reação de gelificação. Em temperatura próxima a 80°C foi observado um aumento para os valores de  $G''$ , estas oscilações de comportamento podem ser atribuídas a desestruturação do material, que provavelmente nesta temperatura estava sendo solicitado fora de seu regime elástico ou devido a existência de uma estrutura resultante de alguma pré-agregação das partículas protéicas.

Durante os ensaios oscilatórios, notou-se que houve um aumento da elasticidade das suspensões estudadas, apresentando uma rigidez suficiente para desmoldagem, verificado empiricamente utilizando-se uma espátula. O aumento da rigidez foi proporcional ao aumento da concentração de albumina nas suspensões.

### 5.3 Estudo da obtenção das suspensões

Inicialmente o preparo das suspensões foi baseado em concentrações do gelcasting definidas na literatura <sup>145</sup>, que recomenda um teor de sólido superior a 55% (massa) e cerca de 7% (massa) de monômero. Para esta concentração de sólido, a suspensão de  $\beta$ -TCP apresentava elevada fluidez, característica que proporcionou um aumento da concentração de sólidos para valores próximos a 70%, mantendo ainda uma fluidez adequada. O caráter disperso desta suspensão pode estar relacionado ao seu pH

final de 7,5 , que corresponde a um potencial zeta (Figura 5.5), com boa condição de dispersão para as partículas em suspensão.

Durante o preparo das suspensões foi observada uma fácil dispersão e uma tendência à sedimentação em tempos prolongados para as amostras contendo  $\beta$ -TCP. Este comportamento pode ser resultante da menor solvatação e de seu maior tamanho de partícula, que pode promover uma acelerada sedimentação e, a menor área superficial deste material, tendendo a uma dispersão mais fácil, comparada a HAp. É importante esclarecer que o tempo para obtenção da espuma consolidada não foi afetado pelo efeito da sedimentação do  $\beta$ -TCP, que acontece em tempos mais longos. A suspensão de HAp, obtida inicialmente apresentou o aspecto de uma pasta totalmente aglomerada, por isso suas suspensões foram feitas com uma concentração de 58% de sólidos. Esta concentração de sólidos para suspensão de HAp, apesar de menor em relação às suspensões que contêm a fase TCP, supera a maioria dos dados encontrados na literatura <sup>118, 124</sup>.

As suspensões obtidas foram submetidas a um estudo reológico preliminar. Neste estudo, não foi variado o teor de sólidos, nem a concentração de dispersante, com o objetivo de observar o perfil inicial de viscosidade das suspensões. As Figuras 5.12 e 5.13 (a) apresentam as curvas de tensão em função da taxa de cisalhamento, que descreve as propriedades de fluxo, e o comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento (curvas b) das suspensões de HAp e  $\beta$ -TCP, respectivamente.

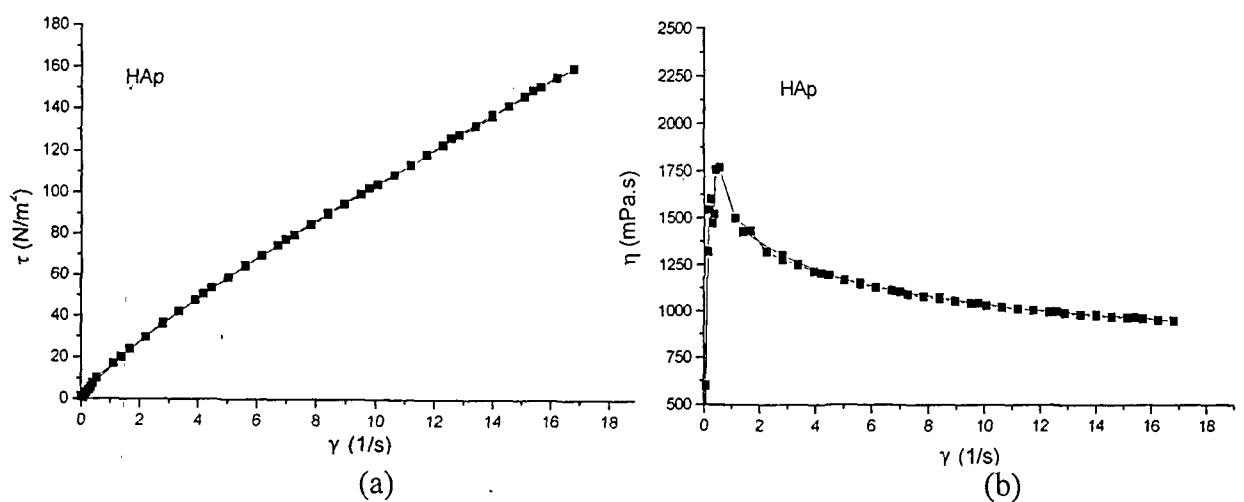


Figura 5.12 - Curvas da tensão de cisalhamento (a) e da viscosidade (b) em função da taxa de cisalhamento para suspensões de HAp.

Observando a curva (a) de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) em função da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) é possível afirmar que o comportamento reológico da suspensão de HAp é típico de suspensões concentradas, ou seja, pseudoplástico, mas tendendo a um comportamento newtoniano em taxas mais altas. A suspensão de  $\beta$ -TCP, Figura 5.13-a, apresenta comportamento newtoniano; sua tensão máxima de cisalhamento corresponde a valores mínimos de tensão alcançados pela HAp para promover um decréscimo na viscosidade, podendo indicar uma melhor dispersão do  $\beta$ -TCP ou a presença de aglomerados mais fracos. A curva (a) da Figura 5.13, suspensão de  $\beta$ -TCP, apresenta pequena oscilação na tensão de cisalhamento, o que pode estar relacionada a sedimentação mais rápida de suas partículas.

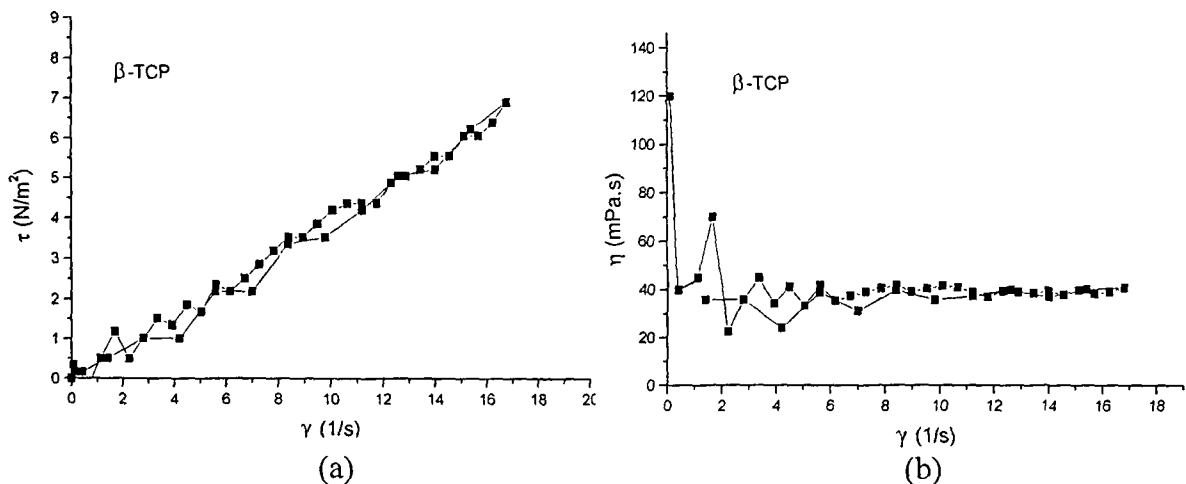


Figura 5.13 - Curvas da tensão de cisalhamento (a) e da viscosidade (b) em função da taxa de cisalhamento para suspensões de  $\beta$ -TCP.

A curva (b), amostra de  $\beta$ -TCP, Figura 5.13, indica a existência de uma viscosidade inicialmente alta na suspensão, que pode estar relacionada a uma eventual aglomeração de partículas presentes a baixas taxas ( $\dot{\gamma} < 0,5 \text{ s}^{-1}$ ); para taxas de cisalhamento mais altas há a destruição destes aglomerados, com liberação da água retida no seu interior, o que justifica a queda brusca na viscosidade. Este comportamento foi mais pronunciado para suspensões de HAp (Figura 5.12 – b), estas apresentam uma tendência de redução na viscosidade (comportamento pseudoplástico) a taxas intermediárias. Em contrapartida, a suspensão de  $\beta$ -TCP, no mesmo intervalo intermediário de taxa de cisalhamento, apresenta um comportamento estável de viscosidade, independente da taxa.

As curvas obtidas, relativas a amostra de TCP apresentam perfil semelhante ao descrito como “ideal” para geração de espuma a partir do *gelcasting*, devido a baixa viscosidade da suspensão. Este comportamento pode estar relacionado a menor área de superfície específica do pó, reduzindo a quantidade de líquido aprisionado, restando um volume maior para suspensão, o que acaba contribuindo para a redução da viscosidade. Para a HAp, que apresenta alta área de superfície específica, a solvatação é maior, restando pequeno volume de líquido livre na suspensão, gerando uma viscosidade mais alta.

A baixa fluidez da HAp também pode estar relacionada, ao pH 8, atingido pela suspensão final. Neste pH a suspensão encontra-se muito próxima de seu ponto isoelétrico, 8,6 (Figura 5.5-a), tornando-se mais sujeita a formação de aglomerados e capaz de atingir viscosidades mais altas. Para verificar a ocorrência deste fenômeno e evitar este tipo de comportamento (baixa mobilidade), o pH da suspensão foi deslocado para um intervalo mais alcalino, com maior valor de potencial zeta. A literatura <sup>127</sup> tem demonstrado que valores de  $\pm 20$  mV de potencial zeta são suficientes para promover uma dispersão adequada. Neste estudo, o pH da suspensão de HAp foi ajustado para 10, observando-se uma redução na viscosidade, Figura 5.14.

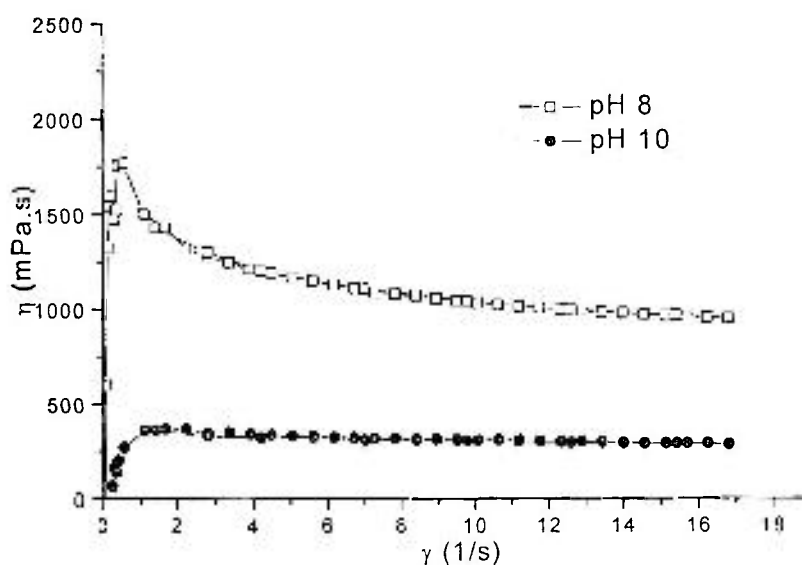
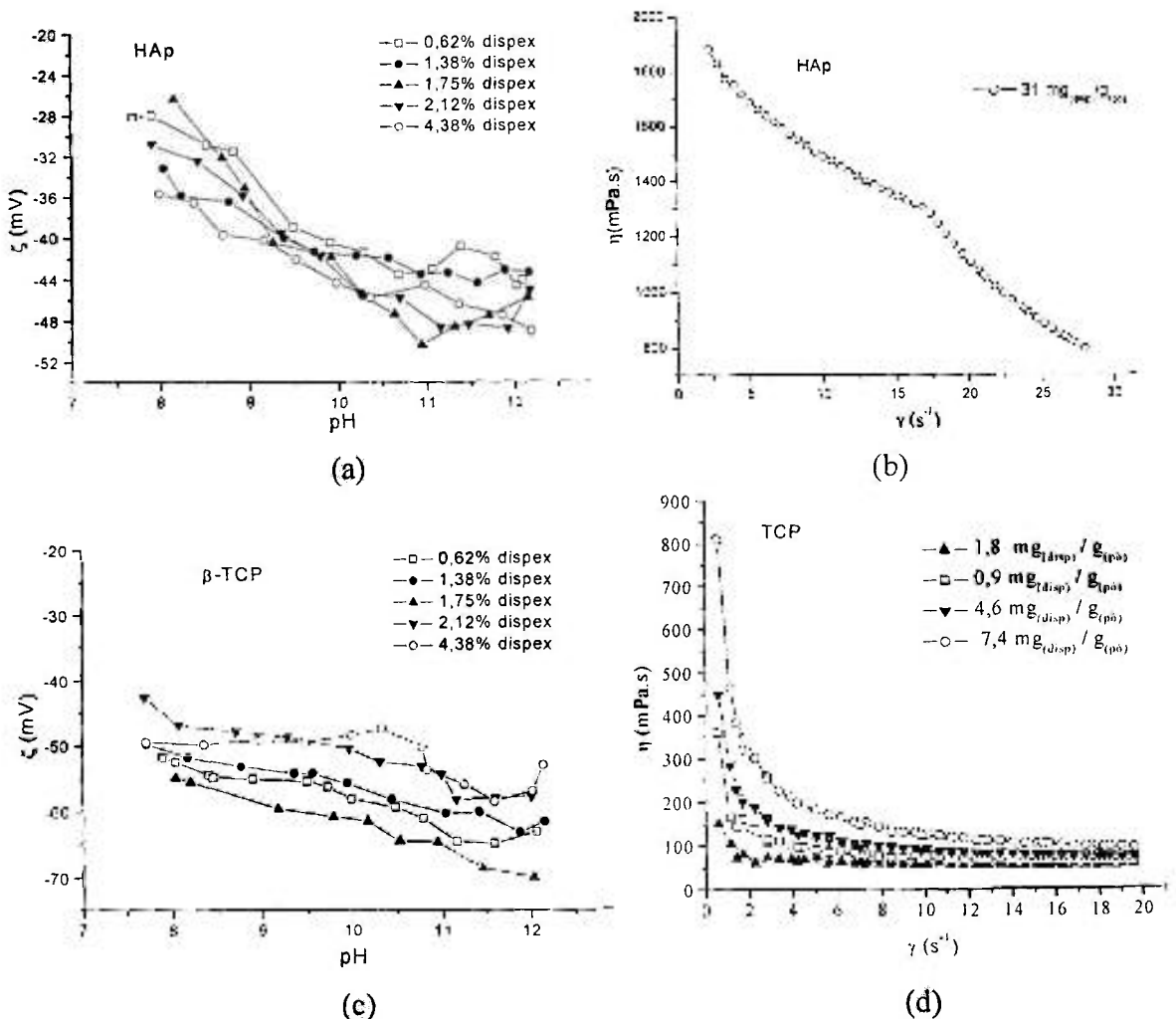


Figura 5.14 – Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de HAp em diferentes pHs.

Observa-se que a suspensão em pH 10 apresentou o mesmo comportamento inicial, tendendo a ficar constante a taxas superiores a  $2 \text{ s}^{-1}$ , enquanto que para a suspensão em pH 8, o efeito de pseudoplasticidade predomina em taxas intermediárias.

Foi realizado outro estudo de potencial zeta, agora na presença do dispersante aniônico (dispex A-40), um poliacrilato de amônio, em diferentes pHs para amostras de HAp,  $\beta$ -TCP e da mistura 5H, obtida com 50% (massa) das fases, hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcico (HAp :  $\beta$ -TCP). Esta análise tem a finalidade de verificar possíveis modificações de cargas superficiais em função da interação com íons  $H^+$  e  $OH^-$ , determinantes de potencial e a variação da viscosidade. Foram utilizadas cinco diferentes concentrações (%vol.<sub>(disp)</sub> / % vol.<sub>(pó)</sub>) do dispersante, no intervalo de pH alcalino, considerado o mais eficiente pelos resultados anteriores.

Os gráficos (Figura 5.15), apresentam as variações de potencial zeta em intervalo alcalino de pH, com diferentes concentrações de dispersante e, da viscosidade das suspensões de *gelcasting*, em função da taxa de cisalhamento, preparadas com a quantidade de dispersante definida por este estudo.



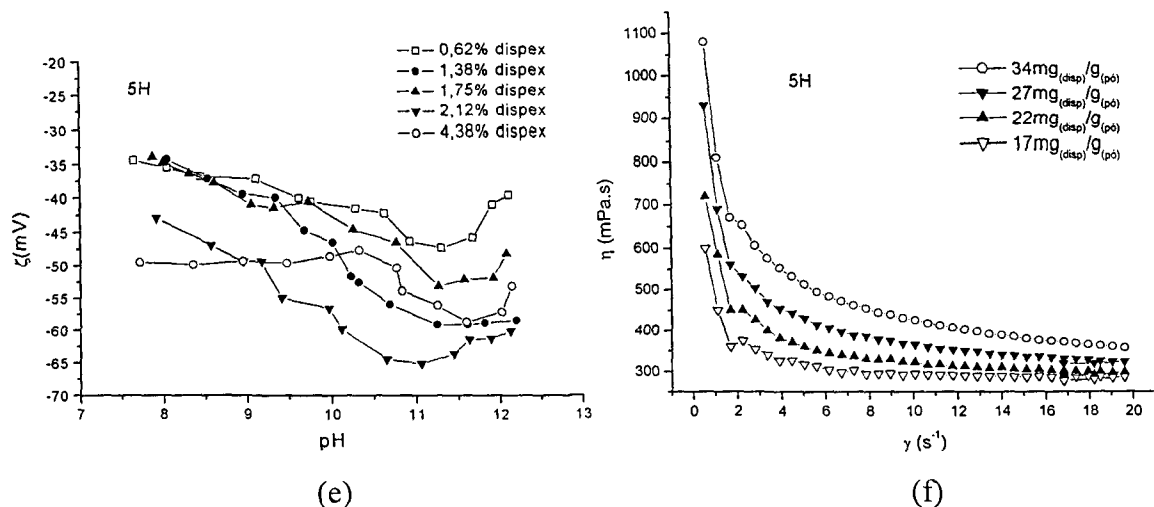


Figura 5.15 - Avaliação do comportamento das suspensões de HAp, TCP e 5H, respectivamente. Variação do potencial zeta (a), (c), (e) e da viscosidade da suspensões de *gelcasting* (b), (d) e (f), em função da concentração do dispex A-40 (40% massa).

Os dispersantes parecem adsorver à superfície das partículas e modificar a dupla camada elétrica, elevando sua carga superficial negativa (Figura 5.15 – a, c, e), que possibilita uma melhor estabilização para as suspensões com valores de pH entre 10 e 11. Observa-se para todas as suspensões um valor de potencial zeta muito superior a 20 mV, apontado pela literatura como base para assegurar boa estabilidade para suspensões concentradas <sup>127</sup>.

Os valores de potencial zeta, em pH 10,5, foram mais efetivos para concentrações de dispersante correspondente a 1,75% para suspensões de HAp e TCP (gráficos a, c) e, 2,12% para a mistura 5H (gráfico e). Os valores de concentração (% em volume) de dispersante, em relação a massa do pó, foram convertidos para concentração em massa (massa de dispersante em relação a massa de pó: mg/g) para uma melhor visualização dos resultados.

Nas curvas da Figura 5.15 (b, d, f) é observado que a presença do monômero, hidroximetilacrilamida (HMAM), que compõem o *gelcasting*, ocasiona alterações na superfície do pó, o que pode justificar as diferenças observadas na correlação entre a melhor concentração de dispersante na suspensão que contém apenas o pó disperso (curvas a, c, e) e a obtida no processamento por *gelcasting* (curvas b, d, f). Para as amostras de HAp e da mistura 5H, as concentrações de dispersante (1,75% e 2,12%, respectivamente), responsáveis pelo melhor comportamento de potencial zeta não correspondem a menor

viscosidade para as suspensões do *gelcasting*, diferente da suspensão de TCP, onde o melhor resultado de potencial zeta e viscosidade estavam de acordo com a concentração de dispersante. Este comportamento confirma que o pH inicialmente apresentado pela suspensão de TCP, distante de seu ponto isoelétrico, fornece uma melhor condição de dispersão que para a HAp.

Obteve-se uma suspensão otimizada de TCP com 71,4% de sólidos e 0,3% de dispersante em relação a massa total da suspensão (Tabela 5.3), este valor de dispersante corresponde a  $0,6 \text{ mg/m}^2$  (considerando sua área de superfície específica) que está de acordo com o valor de  $1,8 \text{ mg/g}$ , observado em uma das curvas da Figura 5.15-d.

É muito provável que exista uma competição entre a adsorção de íons  $\text{OH}^-$  e adsorção da cadeia hidrocarbônica presente no dispersante e/ou no monômero (HMAM). Como a hidroxila é um íon determinante de potencial, sua adsorção por ponte de hidrogênio deve ocorrer preferencialmente à da cadeia monomérica. A geração da carga superficial negativa pode, por repulsão eletrostática, impedir a adsorção do dispersante que se encontra ionizado (forma aniônica) neste intervalo de pH, conduzindo a um aumento da viscosidade observada em algumas das curvas (b, d, f), Figura 5.15, com o aumento da concentração do dispersante.

A suspensão de HAp apresentou um teor máximo de sólidos de 59,5% (massa) com a adição de 1,9% (massa) de dispersante (Tabela 5.2), mantendo ainda uma viscosidade alta, Figura 5.15 (b), que pode dificultar a formação da espuma. Por esse motivo e também pelo fato do reômetro estar operando no limite de seu torque para esta suspensão, não foi possível a realização de mais medidas, considerando que suspensões anteriores não apresentaram diminuição considerável na viscosidade, contendo 58% de sólidos. A necessidade de uma quantidade maior de dispersante para suspensão de HAp pode estar relacionada a alta área de superfície específica do pó, apresentando um teor de dispersante de  $0,7 \text{ mg/m}^2$ , quantidade que se aproxima dos dados encontrados na literatura. Concentrações superiores de dispersante não causaram redução da viscosidade e tendem a reduzir a quantidade de sólido na suspensão.

A presença da HAp na mistura 5H causou o mesmo efeito, ou seja, foi necessária uma quantidade maior de dispersante que a apresentada pela melhor curva (2,12% do gráfico-e) de potencial zeta. A suspensão apresentou 65,2% (massa) sólidos e 1,1% (massa) dispersante (Tabela 5.2), na melhor condição de viscosidade (curva  $17 \text{ mg/g}$ , gráfico-f), concentração que corresponde a  $0,7 \text{ mg/m}^2$ .

O dispersante exerce para as diferentes suspensões, um efeito significativo no módulo de potencial zeta, conseguido pelo aumento do potencial de repulsão entre as partículas. A partir deste estudo, confirmou-se a necessidade de trabalhar em intervalo alcalino, próximo de 10,5 para assegurar maior estabilidade às suspensões concentradas.

As concentrações de cada componente da suspensão (*gelcasting*) foram feitas, inicialmente, a partir de dados disponíveis na literatura correspondentes a esta metodologia. A partir das informações de potencial zeta, obtidas anteriormente (Figura 5.5), que sugeriram melhor intervalo de pH e agora com a viscosidade em função da concentração do dispersante (Figura 5.15), as suspensões puderam ser otimizadas e utilizadas na elaboração das suspensões com albumina. A Tabela 5.3. apresenta as quantidades de cada componente para técnica do *gelcasting*.

Tabela-5.3 Quantidade de reagentes utilizados no preparo das suspensões por *gelcasting*, baseado nos estudos realizados.

<b>Componentes (% em massa)</b>	<b><math>\beta</math>-TCP</b>	<b>HAp</b>	<b>5H</b>
<i>sólidos</i>	71,4	60	65,2
<i>Água</i>	21,8	32	26,2
<i>Dispersante : Dispex A40</i>	0,3	1,8	1,1
<i>Monômero</i>	6,5	6,2	7,5

Estes estudos realizados para o *gelcasting* serviram de base para elaboração das suspensões de albumina. É importante salientar que estas suspensões apresentam um comportamento pseudoplástico que independe da presença do monômero, que caracteriza a principal diferença entre uma técnica e outra. Observa-se que o comportamento das suspensões é definido pela característica intrínseca de cada pó de partida, por isso a validação destes estudos é pertinente para a obtenção das suspensões com o uso da albumina.

#### 5.4 Estudos para obtenção da espuma

As suspensões estudadas neste trabalho são constituídas predominantemente de um sal de cálcio, e também há a presença deste elemento na constituição da albumina, assim, precisa ser considerado que alguns espumantes disponíveis no mercado podem sofrer efeitos consideráveis na presença de cálcio, ou água dura, levando a uma inibição

durante a etapa de formação e maturação da espuma. Quanto à efetividade desses espumantes, sua composição química exerce uma forte influência da solubilidade em água, por isso espumantes à base de potássio ou outros íons alcalinos são considerados mais efetivos <sup>135</sup>. Espumantes desta natureza não puderam ser utilizados devido a alta afinidade com fosfatos de cálcio, o que poderia comprometer a sinterização destes materiais. Neste estudo foram considerados todos estes aspectos para não comprometer a estabilidade da suspensão e selecionar os melhores espumantes para o teste de efetividade. Na Tabela 5.4 são apresentados os surfactantes selecionados.

Tabela 5.4 - Agentes espumantes selecionados para análise preliminar.

<i>Nome comercial</i>	<i>Composição química</i>	<i>Propriedade</i>
Genapol LESA	Lauril éter sulfato de amônio	Aniônico
Genapol LSA	Lauril sulfato de amônio	Aniônico
Genapol X	Álcool sintético etoxilado	Não iônico
Sandopan	Ácido poliéter carboxílico	Aniônico
Genaminox KC180	Óxido amino dimetil alquil	Não iônico
Alkolan CP30	Cocoamido propil betaína	Anfótero

Não foram selecionados surfactantes catiônicos, Tabela 5.4, pois são considerados de menor detergência <sup>139</sup> e na presença de espécies aniônicas, como é o caso do dispersante utilizado na suspensão, pode induzir a precipitação com formação de complexos que tendem a flocular <sup>140</sup>. Foi testado o comportamento de um surfactante anfótero, considerando que no intervalo de trabalho (meio alcalino), sua espécie aniônica prevalece.

Foi analisada a efetividade dos espumantes na ausência, e na presença, da albumina. Na avaliação do comportamento isolado dos espumantes foram mantidos: mesma concentração (1% massa) de espumante em água destilada e tempo de agitação de 3 minutos em bateadeira com alta velocidade (~ 3000 rpm). Os espumantes: Genapol LESA, Genaminox e Alkolan promoveram espumas de boa estabilidade, tendo uma baixa sinérese nos primeiros 3 minutos e alcançando uma expansão da espuma superior a 130%. O Genaminox apresentou maior habilidade para formação de espuma, atingindo valor de 157%. A ação dos 3 espumantes (Genapol LSA, Genapol X e Sandopan), que produziram expansão de 115%, pode ter sido prejudicada em função de suas características físico-

químicas; no caso do Genapol LSA, por ser muito viscoso prejudica a produção de espuma por agitação, o Genapol X apresenta pouca miscibilidade em água, o que torna mais difícil a redução da tensão superficial e com isso a obtenção da espuma, e o Sandopan apresenta uma acidez incompatível com o material e um tempo de permanência da espuma inferior às demais amostras.

O interesse por sistemas formados pela mistura de surfactantes (albumina e espumante) está relacionado ao melhor rendimento de espuma, já que diferentes sinergias podem afetar o volume e tempo de permanência da espuma <sup>135</sup>. A literatura <sup>19, 143</sup> tem relatado que a participação de um aditivo, como a albumina, na presença de um surfactante com propriedade de detergência pode potencializar a ação espumante devido a adsorção da albumina na superfície das películas das bolhas, tornando a espuma mais estável.

Para estudar a interação albumina/agente espumante foram selecionados os materiais de melhor comportamento efetivo. Foi preparada uma suspensão contendo 6% (massa) de albumina e 0,5% de agente espumante, sendo analisada alteração de pH, que pode comprometer a desnaturação da proteína, e viscosidade ( $\eta$ ) da suspensão. O comportamento das suspensões está resumido na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Parâmetros analisados no estudo da interação espumante/albumina na suspensão.

Agente espumante	pH	$\eta$ (mPas) sem albumina	$\eta$ (mPas) com albumina	% expansão
Genapol LESA	9,36	1,50	3,11	176
Genaminox KC 180	9,65	1,74	2,51	236
Alkolan	9,62	1,37	3,18	266

Foi observada uma constituição de células maiores para espuma obtida a partir do Genaminox que para as demais espumas. Este comportamento pode ser atribuído a sua maior resistência à presença de íons existentes na albumina devido ao seu caráter molecular, e ao caráter iônico dos espumantes (Genapol e Alkolan) que geraram espumas com células menores, indicando maior interação com o solvente (água). Todos os espumantes promoveram uma ótima expansão, sendo a maior delas atingida pelo Alkolan, comportamento que pode estar associado a sua viscosidade mais alta na presença da albumina.

A albumina causa um aumento da viscosidade, conferindo propriedades não-newtonianas a suspensão, inibindo os mecanismos hidrodinâmicos de drenagem das películas, durante etapa de maturação da espuma <sup>140</sup>. Os valores de pH medidos na presença do tensoativo não comprometeram a ação da albumina, que se encontra ativa no intervalo alcalino de pH observado. A adsorção da albumina também produz um acréscimo na elasticidade, sendo observada uma sinérese muito mais lenta do que a verificada na ausência da albumina e um aumento na expansão de 157% (sem albumina) para 236%, comprovando o efeito sinérgico.

Durante etapa de consolidação a partir da albumina observa-se que o papel da temperatura é fundamental. Neste sistema, a formação de uma estrutura gelificada ocorre naturalmente, comandada pela absorção de calor de uma fonte externa. Diferentemente, da metodologia do *gelcasting* de espumas, onde há necessidade da adição de espécies catalíticas e atmosfera controlada para evitar a inibição da reação de polimerização *in situ* pela presença de oxigênio <sup>17</sup>.

O aumento da temperatura pode levar ao rompimento prematuro das bolhas, porém este efeito pode ser compensado pelo aumento da viscosidade da suspensão, gerado pela presença da albumina. A albumina promove um mecanismo de estabilização das perturbações da película entre bolhas. A difusão gasosa entre bolhas, movidas pelo gradiente de pressão de Laplace, que determina o espalhamento do líquido pelo centro das películas até as bordas, é inibida pela presença de uma camada insolúvel de albumina adsorvida. Conseqüentemente, ocorre um aumento na elasticidade das bolhas que acaba tornando a película mais estável, retardando o colapso das bolhas, efeito conhecido como maturação de Ostwald <sup>140</sup>. Foi observado que houve uma persistência da espuma, mesmo na superfície de contato da suspensão com as paredes do molde, quando a mesma era mantida em estufa durante etapa de consolidação.

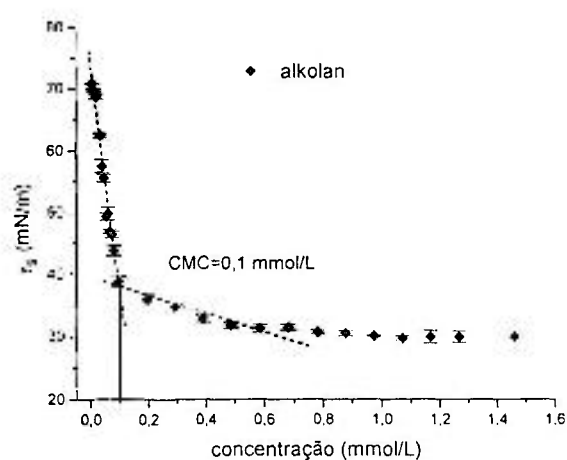
A Tabela 5.6 apresenta a evolução da sinérese para os três espumantes analisados na presença da albumina. Os espumantes apresentaram nos primeiros 4 minutos uma estabilidade proporcional à expansão da espuma, ou seja, o espumante que promove menor expansão é aquele que apresenta maior sinérese. Após um período de 9 minutos, os espumantes iônicos apresentam maior sinérese; e em período mais longo a diferença de sinérese entre os diferentes espumantes não é relevante.

Tabela 5.6– Avaliação da sinérese em diferentes intervalos de tempo após obtenção da espuma.

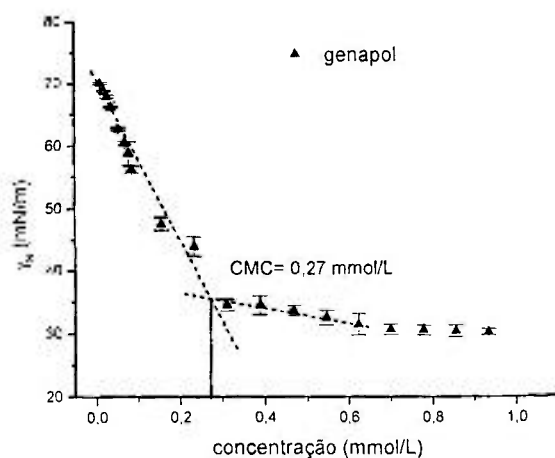
Agente espumante	sinérese após 4 min	sinérese após 9 min	sinérese após 25 min
Genapol LESA	13%	29%	44%
Genaminox KC180	10%	26%	45%
Alkolan	9%	28%	44%

O caráter efetivo dos surfactantes não pode ser confirmado com base apenas nestes ensaios, por isso, foram selecionados os de melhor desempenho e compatibilidade para uma análise mais detalhada, determinando sua eficiência a partir da CMC de cada um deles. Esta propriedade é tão importante para geração da espuma, quanto os pontos de fusão e ebulição, ou o índice de refração, de substâncias puras<sup>134</sup>. No ponto de CMC, a diminuição da solubilidade do surfactante pode provocar um ponto de turbidez e atuar como um anti-espumante<sup>140</sup>. Deve-se salientar que os valores de concentração (CMC) determinados por esta técnica servem apenas para uma análise comparativa, não implicando que estas serão as concentrações reais adotadas para a suspensão, já que para suspensão cerâmica devem ser considerados outros parâmetros, como: concentração de sólidos e presença do monômero ou da albumina.

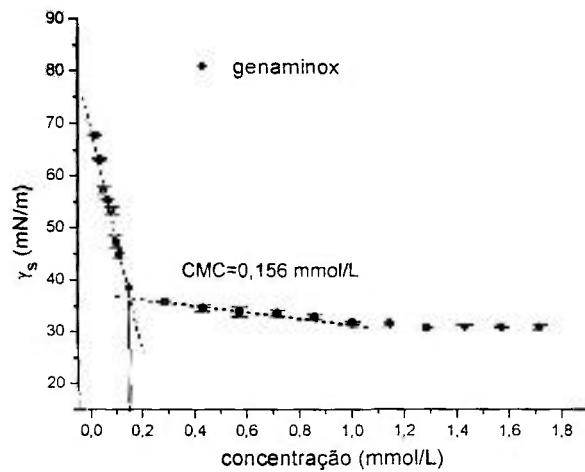
As curvas de tensão superficial em função da concentração de cada surfactante são apresentadas a seguir, sendo possível observar os valores de CMC.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.16 - Comportamento da tensão superficial ( $\gamma_s$ ) em diferentes concentrações de surfactante: (a) alkolan, (b) genapol e (c) genaminox, respectivamente.

Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma monomérica<sup>134</sup>. Quando a concentração está abaixo, porém próxima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômero e micela e, acima da CMC toda quantidade de surfactante adicional tende a colaborar para a formação de mais micelas, sem causar redução considerável na tensão superficial ( $\gamma_s$ ), podendo ocasionar redução no volume de espuma e aumento da viscosidade. As micelas, nesta condição, são facilmente redissolvidas, podendo ser destruídas pela diluição com água.<sup>187</sup>

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.16, observa-se a seguinte ordem de eficiência entre os surfactantes selecionados: alkolan > genaminox > genapol, já que a concentração de alkolan necessária para que ocorra uma redução significativa da  $\gamma_s$ , e alcançar o valor crítico foi menor. Os resultados demonstram que o alkolan favorece a formação de micelas, comportamento que pode ser explicado pela menor solubilidade decorrente de seu caráter parcial não iônico, seguida do genaminox e por último do genapol que apresenta um limite de solubilidade maior e por isso seu processo de miscelização é mais lento.

Normalmente, espécies iônicas são mais solúveis em água que compostos moleculares, porém outras características destes compostos devem ser consideradas. A repulsão eletrostática, por exemplo, entre os grupos hidrofílicos ionizados dos surfactantes, genapol e alkolan, pode afetar o rendimento da espuma. A presença destas espécies iônicas e ramificações na molécula diminuem a coesão, aumentam a entropia e reduzem o número

de moléculas na superfície<sup>140</sup>. Isto explica porque o genapol, apesar de seu caráter polar apresentou eficiência mais baixa que o genaminox.

Apesar da variação entre os valores de CMC entre os espumantes, não foram observadas diferenças significativas na expansão da espuma durante os ensaios de efetividade com as suspensões produzidas por gelcasting. Os três surfactantes selecionados são adequados para produção de espuma, habilidade que foi testada, avaliando as diferentes propriedades espumantes.

Para continuidade do trabalho, foi adotado o surfactante genaminox para o processo de obtenção das espumas cerâmicas. Esta seleção foi baseada no conjunto de resultados obtidos até esta etapa. Alguns dos fatores considerados foram, a baixa viscosidade na presença da albumina, compatível com a expansão da espuma; a formação de células de maior tamanho; a baixa sinérese para períodos intermediários e, valor reduzido de CMC, muito próximo do alkolan. Além disso, o caráter químico do genaminox quanto a sua não ionização em solução, podendo ser mais resistente na presença de diferentes íons, também foi considerado.

### 5.5 Produção e caracterização de espumas de albumina

Foi observado que a técnica de consolidação direta permite a obtenção de cerâmicas com diferentes porosidades, podendo ser definida a partir do estado reológico das suspensões. A Figura 5.17 retrata este comportamento, que representa uma das versatilidades da técnica proposta, permitindo uma maior amplitude de aplicação para estes materiais, em função das porosidades variadas.



(a)

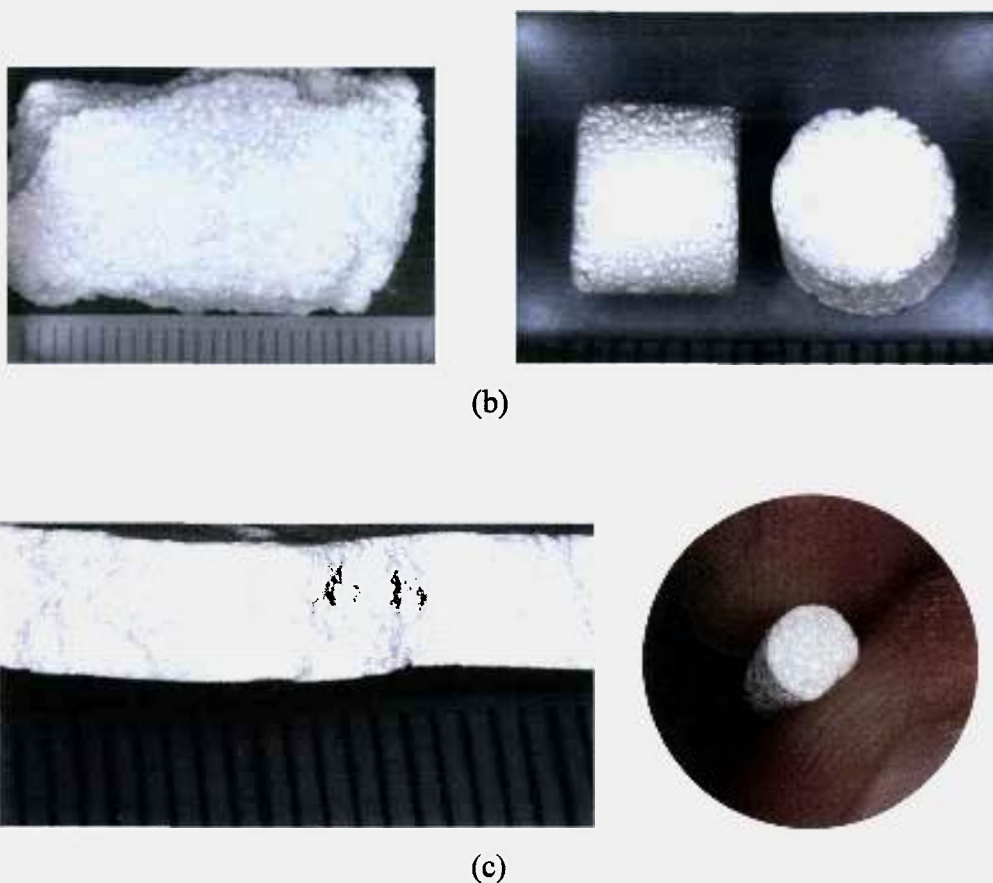


Figura 5.17- Imagens de diferentes amostras, (a):  $\beta$ -TCP; (b) e (c): 5H, obtidas pelo processamento utilizando albumina, com diferentes porosidades (escala milimétrica).

A presença de intervalos limitados de porosidade permite estabelecer um destino mais adequado para aplicação destes biomateriais, em específico, podendo por exemplo, atuar como *scaffold* quando detêm uma porosidade mais alta<sup>188</sup>, Fig. 5.17-(a) ou como enxerto ósseo quando a porosidade é mais baixa, Fig. 5.17-(b) e (c) .

Com base nos resultados obtidos foi possível a definição da concentração de cada componente da suspensão cerâmica para metodologia de consolidação direta, utilizando albumina. A composição final para as diferentes suspensões de HAp e/ou  $\beta$ -TCP contendo 6% (massa) de albumina é apresentada na Tabela 5.7. A concentração de albumina foi definida após estudo da obtenção de espumas de  $\beta$ -TCP nas concentrações de 5, 6 e 7% e análise da distribuição de tamanhos de poros, Figura 5.18.

A concentração do genaminox foi determinada após análise do efeito sinérgico da albumina 6% (massa) com o surfactante na suspensão cerâmica, variando sua concentração entre 0,02% e 0,5%, em relação à massa de suspensão. Estes valores de concentração do surfactante foram estimados com base na literatura<sup>150</sup>, onde se recomenda

um intervalo de 0,02-0,8% para o *gelcasting* tradicional, ou seja, sem agentes especiais de consolidação e de efeito espumante simultâneo, como a albumina. Por isso, neste estudo, o intervalo de variação da concentração ficou restrito até 0,5%(massa) de genaminox. Foi constatado, com base no volume de espuma formado, que a concentração de 0,08% (massa) proporcionou maior volume de espuma, após 3 minutos em bateadeira (~3000 rpm), em relação as outras quantidades ( 0,02, 0,05, 0,08, 0,1, 0,3, 0,5 %) de espumante. Concentrações acima de 0,08% apresentaram uma diminuição do volume de espuma produzido, comportamento relacionado ao alcance da concentração micelar crítica, onde não se observa aumento significativo no volume de espuma <sup>136</sup>.

Tabela 5.7 – Composições das suspensões cerâmicas estabelecidas para técnica de consolidação direta utilizando 6% (massa) de albumina e 0,08% (massa) de surfactante.

<b>Composição (%)</b>	<b>TCP</b>	<b>HAp</b>	<b>5H</b>	<b>2H/7T</b>	<b>7H/2T</b>
<i>Sólidos</i>	71,5	62,0	68,2	69,0	68,0
<i>Água</i>	28,2	37,2	31,4	30,7	31,5
<i>Dispersante : Dispex A40</i>	0,3	0,8	0,4	0,3	0,5

Os resultados da análise de porosimetria, Tabela 5.8, para as cerâmicas de  $\beta$ -TCP produzidas com diferentes teores de albumina e determinados pelo método de intrusão de mercúrio, foram expressos em volume de mercúrio intrudido em função do tamanho de poro, Figura 5. 18.

Tabela 5.8 - Valores de porosidade total das espumas contendo 5, 6 e 7% de albumina obtidos pela técnica de intrusão de mercúrio.

<b>Amostras</b>	<b>Porosidade total (volume)</b>
TCP 5% alb.	57,9 %
TCP 6 % alb.	61,8 %
TCP 7 % alb.	50,8 %

O aumento na concentração de albumina na suspensão resulta em uma frequência maior de poros de menor tamanho, como verificado para amostra com 7% (massa) de albumina, Figura 5.18. Este efeito está relacionado ao aumento exponencial da viscosidade na presença da albumina, devido sua tendência em absorver água, comportamento típico de proteínas globulares relacionado à propriedade de

coagulação<sup>164, 165</sup>. Esta característica confere à suspensão uma maior resistência à formação da espuma, resultando em menor porosidade, Tabela 5.8. As amostras com 5 e 6% de albumina resultaram em espumas com maior nível de interconectividades, propriedade relacionada à habilidade para formação da espuma em níveis baixos de viscosidade.

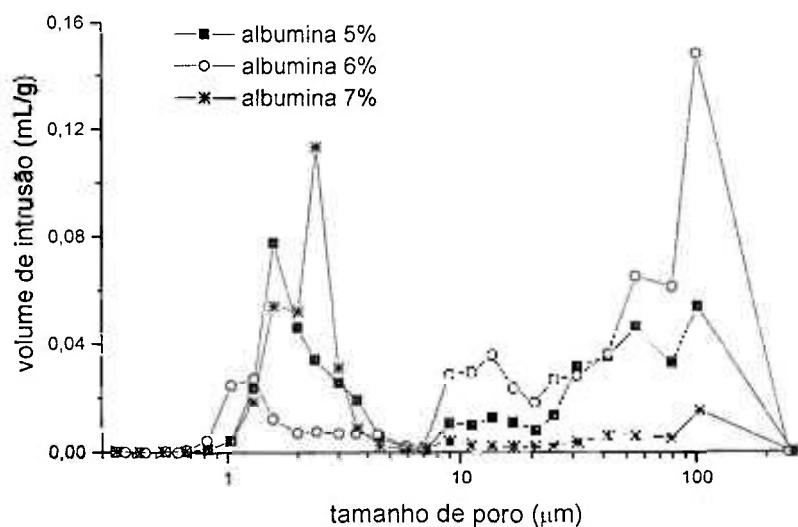


Figura 5.18 – Curvas da frequência de distribuição de tamanho de poros em função do volume de mercúrio intrudido.

As amostras obtidas apresentaram duas faixas de distribuição de tamanho de poros mais significativas; uma estreita distribuição para intervalos de menor tamanho de poros, e uma distribuição mais larga para tamanho de poros maiores, destacando-se a concentração de 6% que apresenta também uma fração de poros mais expressiva no intervalo de 10-20 ( $\mu\text{m}$ ). Somente as concentrações de 5 e 6 % de albumina propiciaram a obtenção de espumas com tamanho de poros maiores. Mesmo variando-se a concentração da albumina foi mantida a mesma tendência de distribuição para as amostras.

A fração de poros pequenos detectada nas amostras contribui diretamente para formação de interconectividade entre os poros. Esta é a característica principal da porosidade que tem se confirmado em vários estudos, como sendo responsável pela manutenção e crescimento do tecido ósseo pelo transporte de nutrientes e drenagem de líquidos<sup>189, 190</sup>. Poros com dimensões próximas a 1  $\mu\text{m}$ , podem ainda contribuir para difusão iônica, que ocorre inicialmente entre a superfície do implante e o plasma sanguíneo.

Em função deste estudo aliado às análises reológicas que determinaram o ponto de gel, adotou-se a concentração de 6% para produção das demais cerâmicas macroporosas.

Após produção e secagem das espumas cerâmicas de diferentes composições foram determinadas suas densidades a verde ( $\rho_v$ ). Os resultados de perda de massa, porosidade aparente ( $P_{ap}$ ) e porosidade total ( $P_t$ ), fornecida pela técnica de intrusão de mercúrio, depois do processo de sinterização estão apresentadas na Tabela 5.9. E as distribuições de poros para as diferentes amostras estão apresentadas na Figura 5.10.

Tabela 5.9 – Valores de densidade, perda de massa e porosidade para as diferentes amostras, após sinterização\*.

	HAp	7H/2T	5H	2H/7T	TCP
$\rho$ teórica (g/cm <sup>3</sup> )	3,156	3,134	3,113	3,091	3,07
$\rho_v$ (%)	23,4 ± 1,3	28,4 ± 1,9	31,2 ± 3,2	27,4 ± 1,4	26,0 ± 2,1
Perda massa (%)	13,1 ± 0,9	12,5 ± 1,1	11,3 ± 1,3	9,6 ± 0,4	10,1 ± 1,2
$P_{ap}$ (%)	61,9 ± 2,3	60,1 ± 3,3	69,2 ± 3,9	67,1 ± 3,4	68,4 ± 5,3
$P_t$ (%)	67,1	56,8	73,5	67,2	61,8

\*HAp (1100°C/1h), 7H/2T (1200°C/30min) e 5H, 2H/7T e TCP (1250°C/30min).

A densidade a verde das cerâmicas obtidas geometricamente, variou entre 23 e 31%. Os baixos valores de densidade são atribuídos a macroestrutura porosa das amostras. A grande perda de massa deve estar relacionada a alta concentração de orgânicos e água presente na constituição das espumas cerâmicas.

Observa-se uma boa aproximação entre os valores de  $P_{ap}$  e  $P_t$  das amostras, com variação dentro do erro verificado para a  $P_{ap}$ . As medidas que não se encontram na faixa de erro podem estar relacionadas a existência de poros de grande tamanho, comprovados por MEV (Fig. 5.21), mas não detectados pelo porosímetro, por ultrapassar o limite de pressão mínima que opera o equipamento.

A ocorrência de valores de porosidade aparente inferiores aos valores de porosidade total pode estar relacionada ao fato de que quando a amostra está em contato com um fluido, durante a determinação da densidade aparente, o mecanismo de penetração por capilaridade prevalece apenas nas camadas superficiais que apresentam poros abertos e conectados. Mesmo estes poros estando interligados até as camadas mais internas, o transporte não ocorre indefinidamente por capilaridade, pois os poros opõem uma

resistência ao escoamento de fluidos, determinada pelas suas dimensões, sendo que poros menores apresentam maiores resistências hidráulicas que os maiores. Além disso, à medida que a interface líquido/ar se movimenta através do poro, pode ter seu movimento interrompido ao atingir uma situação de menisco estável, resultante de um aumento no diâmetro e conseqüente redução da força capilar <sup>111</sup>.

A curva de distribuição de poros, Fig. 5.19, revela que as amostras com maior quantidade da fase HAp apresentam uma concentração mais expressiva de poros com tamanho inferior a 1  $\mu\text{m}$ . Este comportamento está de acordo com estudos efetuados anteriormente quanto as propriedade de dispersão e reológicas dos pós de HAp, que revelam viscosidades mais altas comparada às suspensões na qual a fase de  $\beta$ -TCP é predominante. A distribuição de tamanhos de poros entre 10- 200  $\mu\text{m}$  é mais significativa para as amostras com maior concentração de  $\beta$ -TCP.

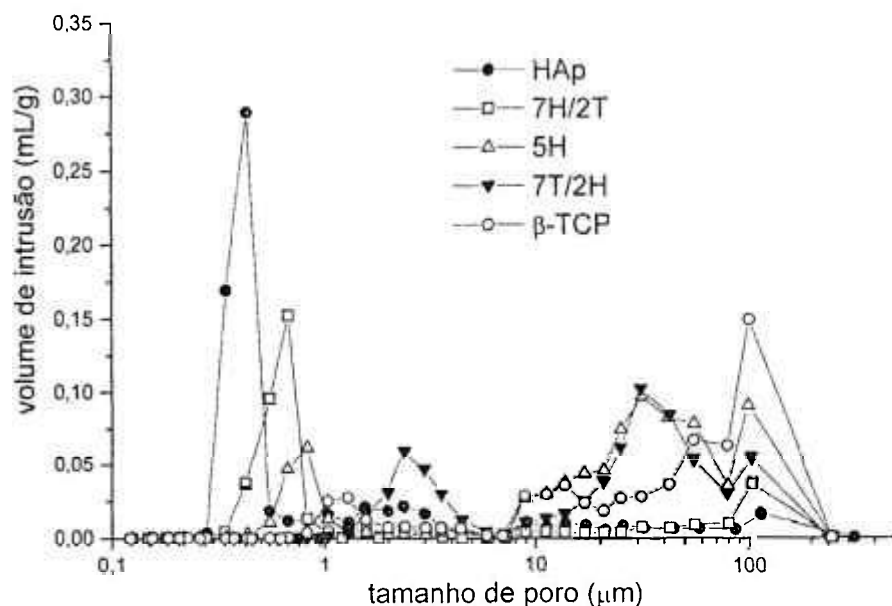


Figura 5. 19– Curva de distribuição de tamanho de poros para as diferentes amostras obtidas.

Na Figura 5.20 são apresentados os perfis de difração de raios-X das espumas de  $\beta$ -TCP, HAp e da mistura 5H em diferentes condições: do material de partida e das amostras sinterizadas, ou seja, somente da cerâmica sem albumina e posteriormente, das amostras obtidas com albumina. Foi feita a sinterização da cerâmica processada convencionalmente e depois da cerâmica processada via albumina para avaliar se há formação de outras fases. Os difratogramas foram analisados com base nas fichas JCPDS 09-0169 (TCP) e JCPDS 09-0432 (HAp).

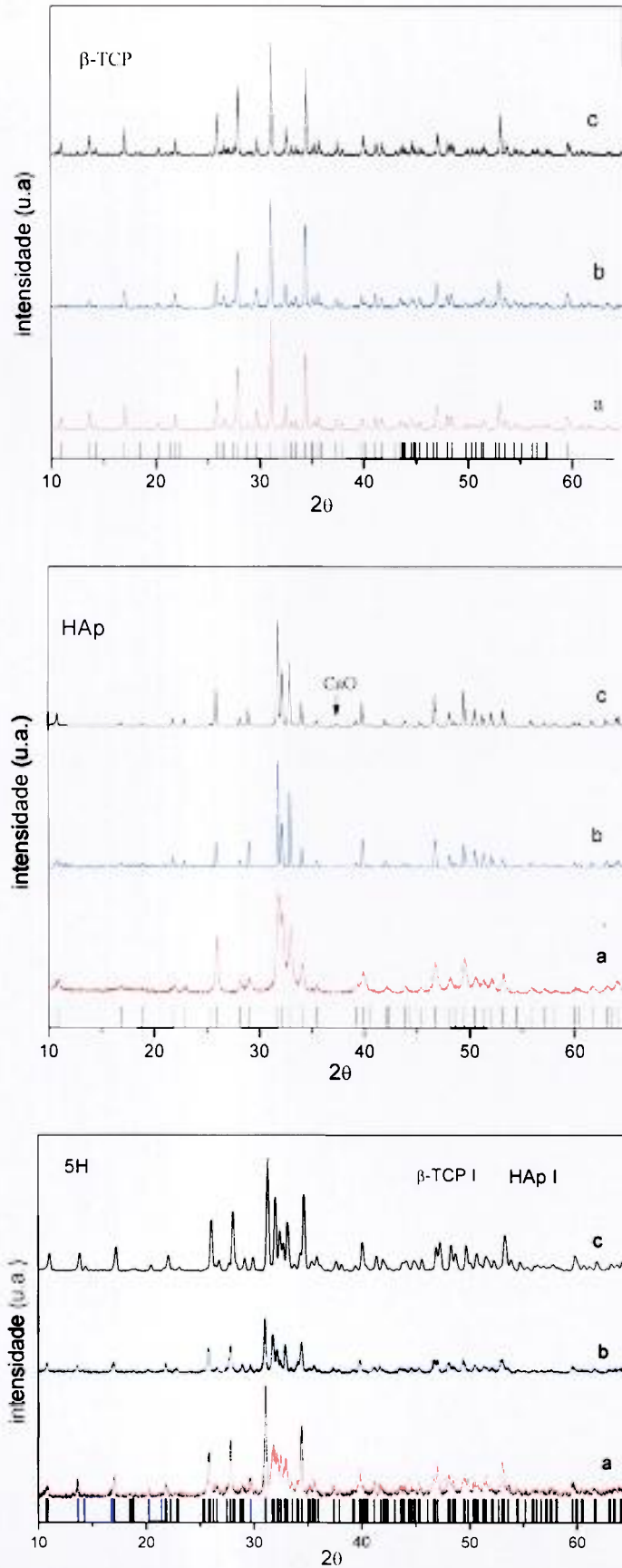


Figura 5.20 – Difratoogramas de raios- X das diferentes amostras: (a) pó de partida não sinterizado, (b) cerâmica após sinterização, (c) espuma cerâmica após sinterização.

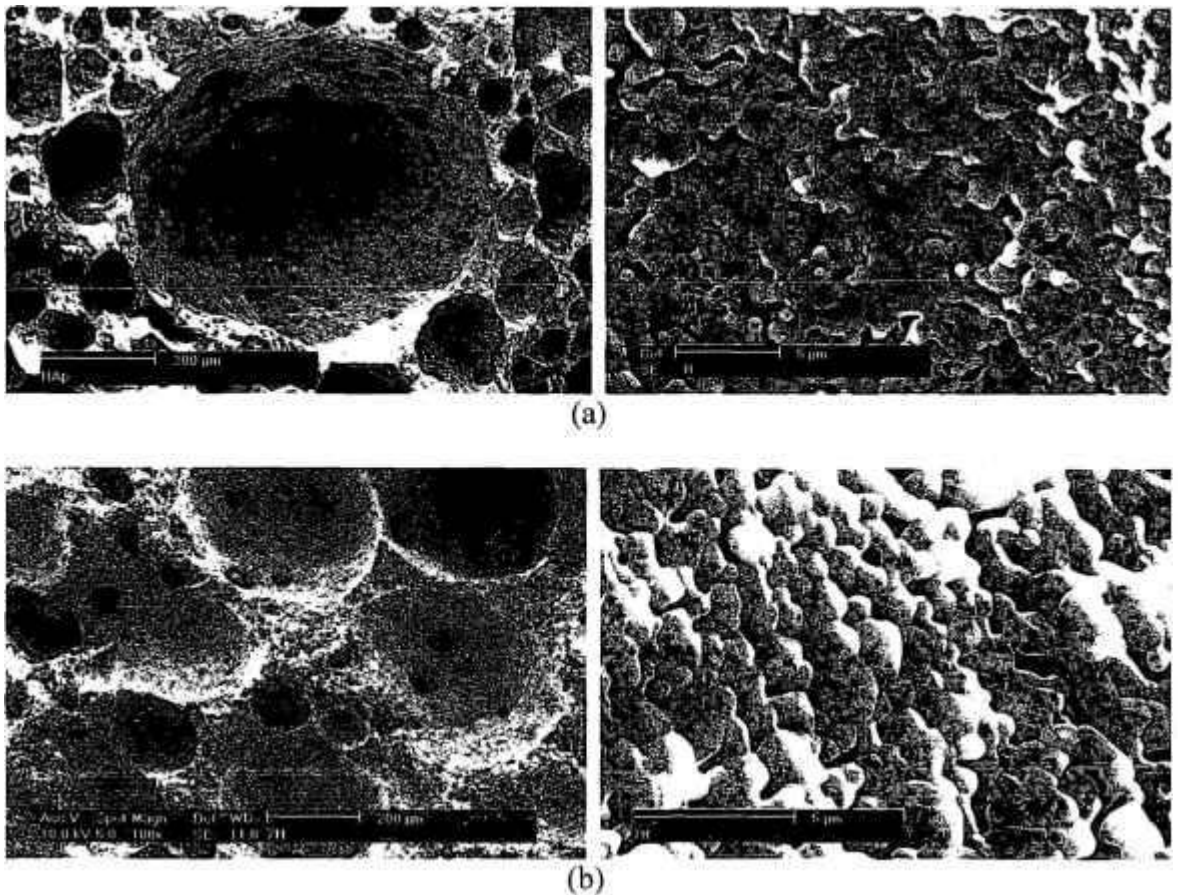
Não foram observadas fases secundárias nos materiais de partida (não sinterizados), nem formação de novas fases durante o processamento convencional (prensagem uniaxial de 20MPa, seguida de isostática a frio: 200MPa e sinterização). Este comportamento demonstra a boa estabilidade térmica das cerâmicas nas condições de sinterização utilizadas, fato já relatado em estudos anteriores <sup>172</sup>. A presença da albumina no processamento da espuma não provocou o aparecimento de novas fases para as amostras de  $\beta$ -TCP e da mistura 5H, apresentando difratogramas idênticos aos das amostras sinterizadas sem albumina, porém foi detectado um pequeno pico correspondente à fase CaO para espuma de HAp após sinterização. O aparecimento desta fase pode estar relacionado a quantidade de cálcio na amostra proveniente da albumina, conforme observado por FRX. Como a HAp apresenta uma razão estequiométrica de Ca/P maior que as demais cerâmicas de fosfatos de cálcio, esta característica pode ter favorecido a formação desta nova fase nas espumas de HAp em específico, e não para as demais amostras. Porém não se pode afirmar com certeza a inexistência de CaO nas diferentes misturas em decorrência da sobreposição de picos nesta mesma região de  $2\theta$  ( $\sim 37^\circ$ ).

A técnica utilizada é reprodutível na característica interconectada dos poros, Figura 5.21. As diferenças entre as espumas nas composições obtidas são notadas em termos de volume de porosidade total e aparente, Tabela 5.9. Não foram observadas diferenças topográficas significativas entre as superfícies das amostras, Fig. 5.21.

Em aumentos maiores é possível observar a microestrutura das paredes que constituem os poros. É observada porosidade inter e intra-granular nas amostras, característica comum em materiais que atingiram último estágio de sinterização. Constatou-se que a sinterização da HAp a  $1100^\circ\text{C}$ , por período de uma hora, resulta na formação de grãos e poros de tamanho menor comparativamente ao TCP sinterizado a  $1250^\circ\text{C}$ . O aumento do tamanho de grão para as amostras de TCP puro e para a amostra 7T pode comprometer a resistência mecânica destas cerâmicas, um efeito menos significativo para as demais amostras. Os tamanhos de microporos observados estão de acordo com os dados obtidos por porosimetria de mercúrio, Fig.5.19, onde é observada uma concentração de poros de tamanho menor para as amostras que contém maior quantidade da fase HAp.

É importante reiterar que mesmo estas cerâmicas apresentando uma limitação quanto à solitação mecânica, sua superação quanto a resposta biológica coloca as cerâmicas de fosfatos de cálcio como um dos materiais mais requisitados na área biomédica pelo conjunto de propriedades que são capazes de agregar.

De acordo com a macroestrutura das espumas pode-se concluir que as mesmas foram consolidadas no seu estágio de maturação, pois a forma esférica das células foi mantida, não sendo observada geometria poliédrica em nenhuma região das diferentes amostras. Esta característica revela a condição adequada de dispersão e reologia da suspensão que resulta na boa estabilidade da espuma, capaz de perdurar durante a etapa de consolidação. A esfericidade dos poros observada representa uma geometria que não compromete o metabolismo ósseo, nem a resistência mecânica, já que os defeitos críticos presentes se restringem aos poros de formato esférico, minimizando a concentração de tensões mecânicas <sup>191</sup>. A presença de microporos, que tendem a facilitar a drenagem de líquidos e a natureza interconectada dos poros foi detectada em todas as amostras. Este tipo de porosidade facilita a vascularização e manutenção do tecido, uma característica promissora para osteointegração quando o material é utilizado como implante <sup>189, 190</sup>.



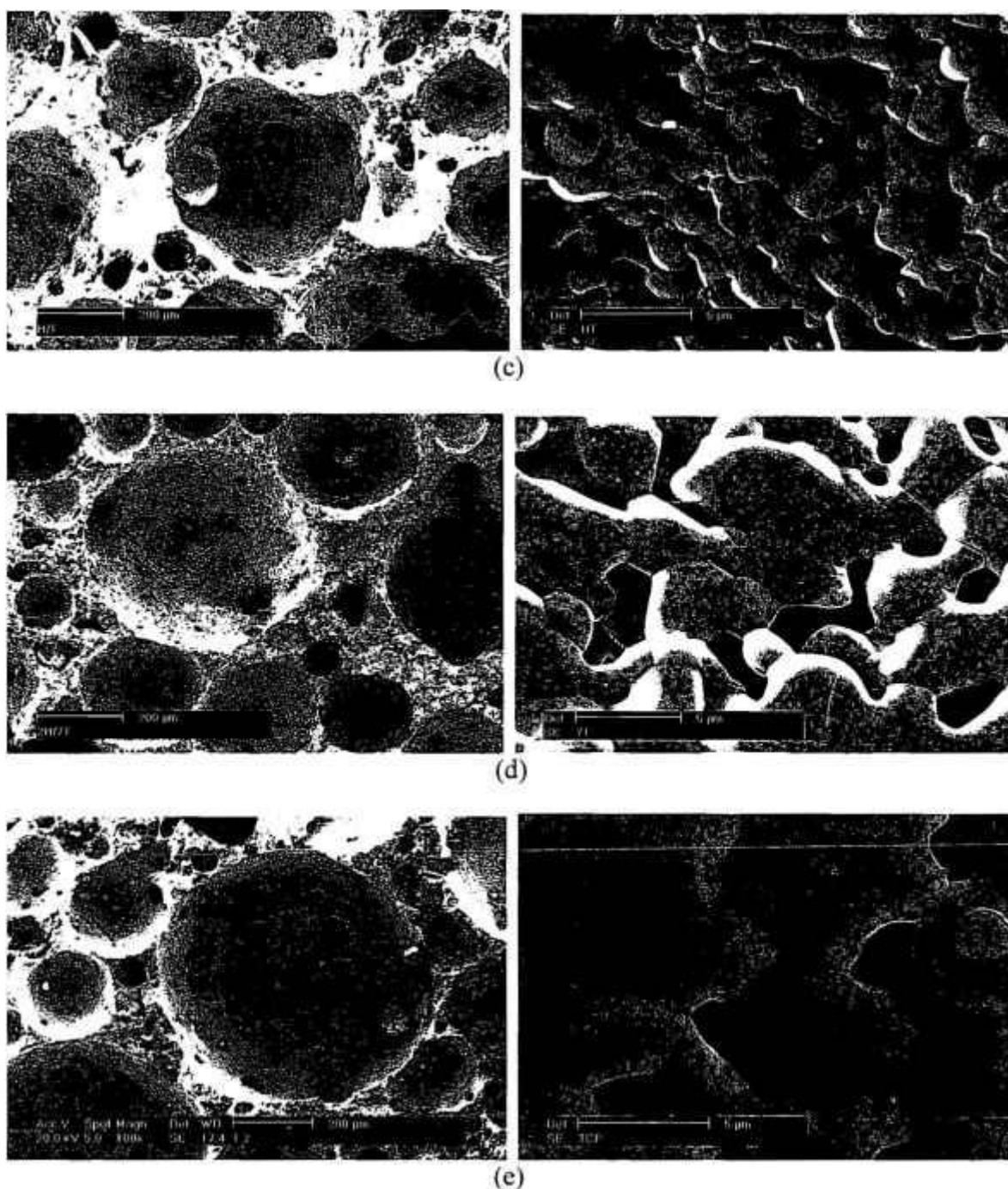


Figura 5.21- Micrografias das superfícies de fraturas das espumas cerâmicas de diferentes composições após sinterização: (a) HAp (1100°C/1h); (b) 7H/2T (1200°C/30min); (c) 5H (1250 °C /30min); (d) 2H/7T (1250 °C /30min) e (e) TCP(1250 °C /30min).

A estrutura celular tem grande influência nas propriedades do material. As propriedades mecânicas, por exemplo, dependem do tamanho das células e especialmente do formato. As células esféricas exibem as mesmas propriedades em todas as direções e a espuma é dita isotrópica, já as células alongadas ou elípticas formam espumas

anisotrópicas<sup>191</sup>. As células dos materiais processados apresentam formato esférico, porém de tamanhos diferenciados. Dimensão, espaçamento, geometria e número de células são fatores essenciais que podem governar a resistência do material<sup>192, 191</sup>.

A macroporosidade presente nas amostras pode promover caminhos de acesso para o crescimento do tecido ósseo, que facilmente penetra pelos poros, estabelecendo o processo de osteocondução. O preenchimento dos poros pelo novo tecido ósseo pode promover um forte entrelaçamento osso-implante, conferindo um aumento da resistência mecânica do implante<sup>190, 193</sup>.

A fração de poros pequenos detectada na amostra e observada nas micrografias, pode contribuir para o efeito de rugosidade superficial que influencia de maneira positiva na dinâmica de adsorção celular e resposta celular osteogênica<sup>194, 195</sup>. Poros com dimensões próximas de 5  $\mu\text{m}$ , ainda podem facilitar a difusão iônica que ocorre inicialmente entre a superfície do implante e o plasma sanguíneo, estabelecendo a formação de cargas que definirão o tipo de interface formada<sup>196</sup>.

## 5.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

### 5.6.1 Dissolução e Bioatividade em SBF

O estudo de dissolução das cerâmicas porosas de fosfatos de cálcio na presença de solução simulada do plasma sanguíneo humano (SBF) permitiu uma previsão da reatividade das amostras e revelou um comportamento favorável à formação de uma camada globular de fosfato de cálcio (hidroxiapatita carbonatada,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$ ) sobre a superfície das amostras, característica típica para este tipo de ensaio, Figura 5.22. A formação desta espécie está associada à saturação de íons cálcio e fósforo, em solução, que tendem a se combinar com o grupo  $\text{CO}_2$ , devido, principalmente a sua elevada constante de difusão, que se deve a alta solubilidade desta espécie, seja em SBF ou qualquer outro fluido corporal.

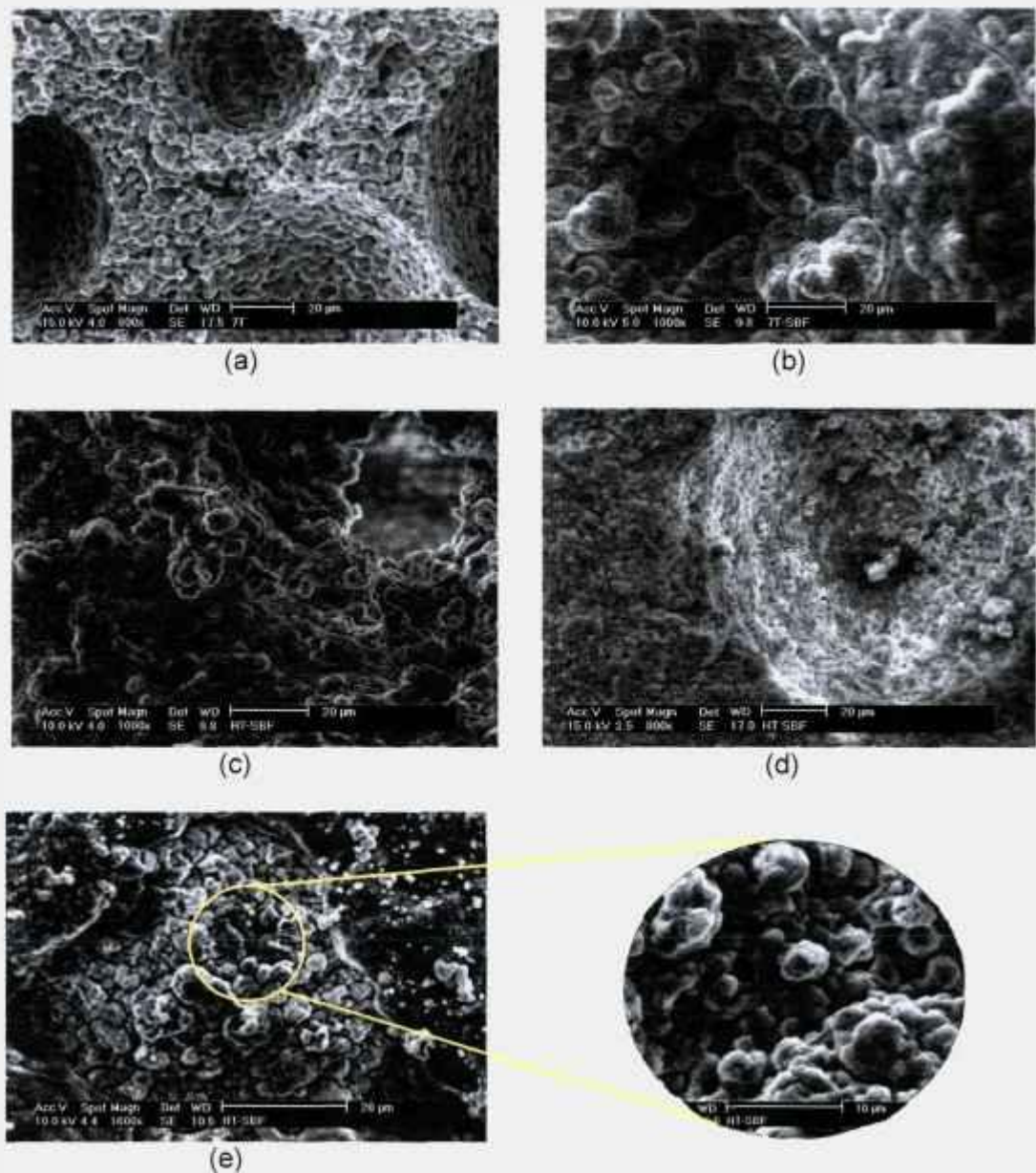


Figura 5.22- MEV da superfície das amostras após 21 dias de ensaio com SBF; (a) superfície da amostra 7T/2H antes do ensaio; e superfície das amostras após ensaio: (b) 7T/2H, (c), (d), (e) diferentes regiões da amostra 5H.

O espectro de EDS apresentado na Figura 5.23 revela a natureza da camada depositada, constituída basicamente de cálcio e fósforo. Outros espectros foram obtidos durante a análise e todos apresentaram a mesma proporcionalidade destes elementos, sem variação significativa entre as diferentes amostras, reforçando que os glóbulos observados na superfície representam um forte indicativo da reatividade das amostras.

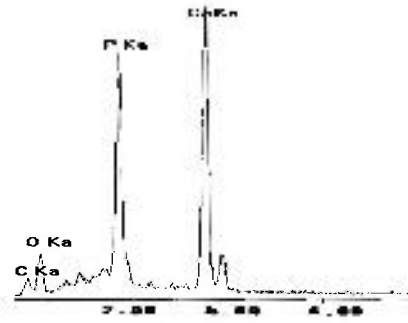


Figura 5.23- Espectro obtido por EDS, da superfície da amostra 5H, após ensaio em SBF.

Não foram observadas diferenças morfológicas significativas entre as superfícies das diferentes amostras, porém foi verificado que as composições com maior concentração da fase  $\beta$ -TCP, tendem a acelerar a saturação da solução (rica em Ca e P). Este comportamento deve-se a solubilização acelerada desta fase, permitindo a difusão mais acentuada de íons Ca e P para solução de SBF <sup>65, 197</sup>. Este comportamento tende a favorecer a formação de núcleos, sendo observados em grande quantidade em um período inferior a 3 dias.

Outro fator que pode acelerar a deposição da camada de fosfato de cálcio, como consequência da saturação do meio, é a porosidade presente na microestrutura. Este comportamento pode estar relacionado a uma taxa de dissolução mais alta quando a amostra apresenta maior área de superfície. A presença de poros nas amostras proporciona um aumento da área de superfície específica, portanto maior área de contato para permeação do líquido. Esta propriedade pode facilitar a difusão de íons da amostra para a solução e posterior processo de nucleação da fase de fosfato de cálcio, inclusive no interior dos poros, Fig.5.22 (c) e (e). A concavidade dos poros proporciona locais de abrigo menos afetados pelas forças do fluido e também tende a facilitar a retenção de células no caso de ensaios de cultura ou em experimentos *in vivo* <sup>96, 190</sup>.

Não foram observadas diferenças morfológicas dos precipitados depositados ou na formação da camada globular, comparadas aos dados existentes na literatura, apesar da microestrutura particular apresentada pelas amostras <sup>88</sup>.

A literatura relata que porosidades micrométricas e nanométricas, como observadas nestas amostras, conferem um aspecto irregular e rugoso à superfície, podendo atuar como sítios para nucleação e crescimento de cristais, tornando mais evidente a habilidade para formação da camada bioativa <sup>65</sup>.

A rugosidade pode fornecer informações complementares quando interpretada a partir de outras variáveis, como molhabilidade. Sabe-se que quanto maior a rugosidade, menor o ângulo de contato e mais molhável se torna a superfície <sup>198</sup>. O efeito da redução do ângulo de contato acontece em função do aumento da área superficial da superfície mais rugosa. Possivelmente, isso facilita a permanência de líquido nos poros, podendo contribuir para uma hidratação mais eficiente, proporcionando um filme de líquido mais estável, gerando um aumento da hidrofiliabilidade das superfícies, propriedade interessante no uso clínico <sup>198</sup>.

Outra implicação imediata à influência da natureza hidrofílica das superfícies das amostras durante ensaio em SBF, diz respeito à presença dos sais que constituem este meio simulado. A presença de eletrólitos tem a capacidade de blindar as cargas da dupla camada elétrica <sup>121</sup>. Considerando o sistema em estudo, se a superfície da amostra e os núcleos sólidos, oriundos do processo de saturação do meio, estiverem carregados eletricamente com mesma carga, a força elétrica de repulsão entre as duplas camadas seria atenuada. A presença de sais em solução pode atuar na redução do ângulo de contato, alterando a hidrofiliabilidade das superfícies, favorecendo a deposição da fase de fosfato de cálcio adsorvida na superfície das amostras <sup>121, 199</sup>.

Os eletrólitos podendo atuar na modificação da carga superficial, fazem com que os íons de sinais opostos ao da superfície sejam adsorvidos sobre ela, a ponto de inverter a carga superficial. Isso é possível, especialmente, para contra-íons polivalentes ou polieletrólitos e outras espécies que tenham grande afinidade pela superfície <sup>121</sup>, este fenômeno pode ocorrer durante o ensaio em SBF, pois é sabido que a apatita tem afinidade para diferentes íons, como,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{CO}_3^{-2}$  e outras espécies também presentes neste meio <sup>65</sup>.

Foi verificada uma alteração na carga superficial das cerâmicas de HAp e  $\beta$ -TCP, após sinterização, Figura 5.24. Diferentemente da condição inicial, as amostras de HAp, após processamento e tratamento térmico, não desenvolvem cargas positivas em suas superfícies, para valores de pH inferiores a 8,5, como mostrado na Figura. 5.5 (referente aos materiais de partida). As amostras obtidas apresentaram apenas carga superficial negativa no amplo intervalo de pH analisado, sendo observada uma alta densidade de carga (alta mobilidade) para valores de pH próximos de 7,5 para o  $\beta$ -TCP e no intervalo de 9 a 11 para a HAp. As amostras de  $\beta$ -TCP apresentaram valores de potencial zeta mais altos que as amostras de HAp, comportamento similar às análises anteriores (Figura 5.5).

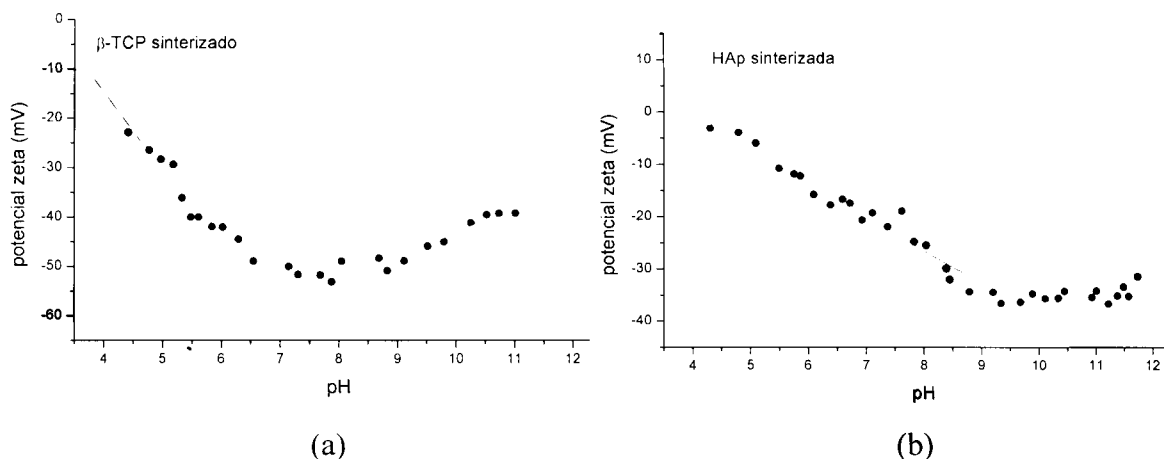


Figura 5.24– Potencial zeta dos materiais processados após sinterização; (a)  $\beta$ -fosfato tricálcico e (b) hidroxiapatita.

A literatura relata que a presença de carga negativa na superfície de biomateriais pode proporcionar melhores resultados frente aos eventos celulares da reparação, quando comparados a materiais com superfície positiva<sup>200</sup>. Além disso, a presença de cargas negativas na superfície é favorável à nucleação de HAp em solução SBF<sup>201</sup>. A carga superficial tem influência direta na interação material/célula e pode definir a adesão, capacidade de proliferação e diferenciação, determinando a falha ou sucesso de um implante<sup>200</sup>.

Além do estudo com SBF, foi realizada uma investigação das soluções que constituem o meio de cultura DMEM e seus resultados foram comparados aos obtidos a partir do SBF. Este estudo paralelo foi realizado com o intuito de verificar o efeito de saturação para os íons cálcio e fósforo no meio de cultura acelular DMEM (Dulbecco's MEM), após contato com as amostras de composição 5H submetidas ao ensaio *in vitro* com osteoblastos. Neste ensaio, foram analisadas variações de massa e alterações de pH, sendo monitoradas concentrações dos íons cálcio e fósforo, por espectrometria de emissão por plasma induzido (ICP-OES). Foram avaliados exclusivamente, os elementos, cálcio e o fósforo, porque são os principais elementos presentes no plasma humano, em materiais bioativos, cuja participação é bastante efetiva no processo de dissolução/precipitação e, são essenciais para manutenção das células<sup>58, 202</sup>. A liberação destes íons a partir de materiais cerâmicos é um dos principais fatores responsáveis pela formação da camada biologicamente ativa e estímulo para o crescimento ósseo<sup>91</sup>.

Os testes de cultura foram realizados no Laboratório de Pesquisa Básica em cultivo celular do Departamento de Dentística da FOUSP, em um período máximo de três

dias, sem renovações do meio (DMEM), conforme protocolo do laboratório. É importante considerar que este período de tempo (3 dias), corresponde ao mesmo período adotado para renovação das soluções para o estudo com SBF, por isso as concentrações dos elementos predominantes (Ca e P) puderam ser comparadas nas diferentes situações. A variação, expressa em porcentagem, das concentrações de cálcio e fósforo determinada por ICP, em cada um dos meios, comparada aos respectivos controles (solução na ausência das amostras), estão apresentadas na Figura 5.25.

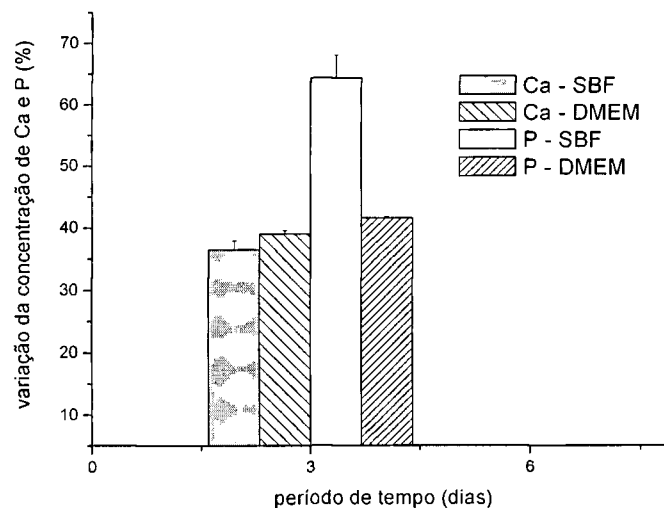


Figura 5.25 – Variação percentual das concentrações de Ca e P, em solução, obtida por ICP-OES, comparada ao controle das soluções SBF e DMEM acelular no período de 3 dias.

Nas duas situações (SBF e DMEM), houve uma redução na concentração dos íons analisados em solução, após 3 dias de imersão das amostras nos respectivos meios, comparada aos controles. Este comportamento é um indicativo da formação de compostos à base de fosfatos de cálcio para o SBF e, possivelmente também para o DMEM, depositados sobre as superfícies das amostras, confirmados pelo ganho de massa e observação das superfícies, por MEV.

Na Figura 5.26, estão apresentadas as concentrações dos íons analisados por ICP, mediante a variação de pH neste intervalo de tempo.

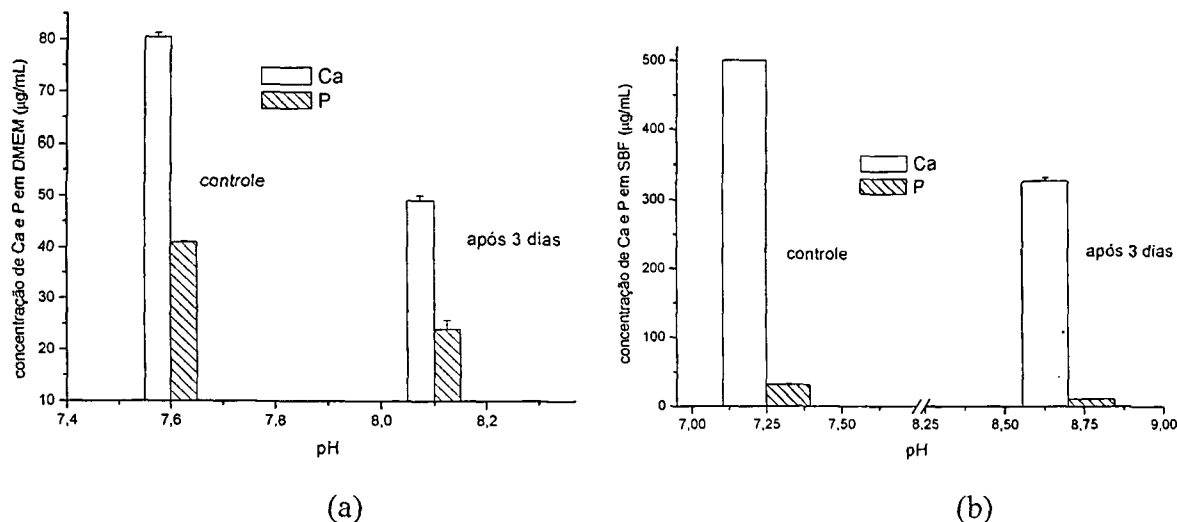


Figura 5.26 – Concentração de Ca e P em solução DMEM (a) e SBF (b), em função do pH das soluções controle e após 3 dias na presença das amostras 5H (HAp/TCP na proporção 1:1), determinadas por ICP-OES.

A variação da concentração de cálcio entre as duas soluções foi pouco expressiva (Figura 5.25), sendo mais elevada para a solução DMEM. É importante esclarecer que a concentração de cálcio determinada por ICP para as duas soluções foi superior a concentração de fósforo (Figura 5.26), havendo uma condição de equilíbrio mais favorável entre Ca e P para solução DMEM, que apresenta uma razão Ca:P de 2:1. Este equilíbrio iônico entre Ca e P existente na solução controle pode ser responsável pela variação proporcional da concentração destes íons observada na Figura 5.25, após três dias de permanência das amostras na solução DMEM.

A razão entre estes elementos é muito mais elevada em SBF, Figura 5.26 –(b), sendo a quantidade de cálcio nesta solução, superior a concentração deste mesmo íon presente no meio de cultura DMEM acelular, Figura 5.26 –(a). Por outro lado, sua concentração inicial (controle) de fósforo foi menor que a concentração deste elemento no meio DMEM e após três dias de ensaio. A presença do fósforo no meio de cultura é extremamente importante, considerando que este elemento é um dos componentes base das glicoproteínas e também é responsável pelo tamponamento do meio<sup>207</sup>, justificando a variação mais acentuada deste elemento no gráfico da Figura 5.25 para os dois meios simulados. Isto acontece no intuito de recuperar a condição inicial de equilíbrio, verificada antes da presença da amostra. O controle DMEM apresentou uma quantidade de fósforo estimada em 28,4% superior e, 83,9 % de cálcio inferior, à solução controle de SBF. Além da ação de tamponamento do meio promovida pela participação do fósforo, este elemento

atua na homeostase do cálcio, ou seja, ele mantém uma condição estável de cálcio para o meio onde se encontra<sup>207</sup>. Este comportamento pode ser confirmado pelo gráfico (a) da Figura 5.26, onde pode ser sugerido que a variação entre estes elementos se deve ao fato do fósforo estar atuando na homeostase de cálcio que só pode ser regulada se o fósforo variar proporcionalmente, reforçando o comportamento observado na Figura 5.25.

No período de 3 dias foi verificado, para o meio celular DMEM, uma variação de 6,5 % ( $\sigma \pm 0,4$ ) de pH para intervalos mais alcalinos e as amostras tiveram um ganho de massa de 2,26 % ( $\sigma \pm 0,09$ ) neste mesmo período. Comparados aos ensaios com SBF, cujas amostras apresentaram um ganho de massa de 3,7 % ( $\sigma \pm 0,2$ ) e variação de pH de 19,3% ( $\sigma \pm 0,5$ ), observou-se que estas variáveis, em DMEM foram menos expressivas, sugerindo uma condição de equilíbrio mais favorável deste meio.

O deslocamento do meio para intervalos de maior alcalinidade (Figura 5.26) pode estar associado à concentração mais elevada de cálcio em solução SBF que em DMEM. O ganho de massa pouco significativo para amostras após os ensaios com DMEM podem comprovar a maior estabilidade deste meio de cultura, comparado ao SBF, mantendo praticamente a mesma razão de proporção Ca/P após os 3 dias de análise, como observado na Figura 5.25.

Após 3 dias em SBF, as amostras analisadas apresentaram maior saturação de íons que as amostras de mesma composição, mantidas em DMEM celular, comportamento que faz referência a maior reatividade das cerâmicas no meio simulado do plasma sanguíneo humano (SBF)<sup>203</sup>.

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), por exemplo, é convertida em OCP, fosfato octacálcico (precursor da HAP), com redução do pH do meio, por hidrólise<sup>177,204</sup>.

Num período de 3 dias as soluções apresentaram variações de pH que não seguiram uma relação direta com os valores das concentrações obtidas pelos resultados de ICP, sendo notada uma redução na concentração do cálcio, que implicaria em uma redução também no pH. Este comportamento pode estar relacionado à presença de outros íons de natureza alcalina que não foram quantificados por ICP, também presentes na solução DMEM, sendo mais abundantes em SBF. Sabe-se que estas soluções apresentam um

dinamismo diferente entre si, para o tempo de resistência de seus compostos e moléculas, de líquidos puros ou soluções verdadeiras. Na solução DMEM, por exemplo, pode ocorrer a participação de moléculas orgânicas, além de íons, entre a solução e a superfície da amostra, assim, um soluto ou molécula orgânica desta solução que tende a diminuir a tensão superficial pode se concentrar na superfície. A presença de novas espécies pode ter modificado a carga de superfície das amostras, que é muito sensível a variação de pH, gerando um efeito contrário, agora de aumento da tensão superficial, resultando na exclusão de íons da superfície para suprir a condição anterior de equilíbrio e, conseqüentemente, causando o aumento de pH, como observado na Figura 5.26.

Não foi detectada situação crítica, como a redução do pH durante os ensaios. Este fator é de extrema importância, já que valores de pH, se abruptamente reduzidos a níveis ácidos, podem favorecer a dissolução da fase HAp, presente na cerâmica bifásica, a partir da protonação dos grupos carbonato e fosfatos, dando origem aos seus respectivos ácidos<sup>177, 204</sup>.

### 5.6.2 Citotoxicidade/Biocompatibilidade inicial

O parâmetro mais utilizado para testar a citotoxicidade de um material é a avaliação da viabilidade celular em meio de cultura. Este estudo pode se tornar ainda mais preciso quando se avalia também a sua biocompatibilidade inicial. Uma questão importante a ser considerada durante um ensaio de biocompatibilidade *in vitro* é que, além da condição do meio, existe uma forte dependência quanto às propriedades do material e do contexto em que é utilizado<sup>205</sup>. Como o material processado é indicado para reparação óssea, os osteoblastos são os mais efetivos para uma avaliação precisa e representativa quanto a sua aplicação, por isso foi selecionada esta linhagem celular.

Variações morfológicas apresentadas pelos osteoblastos em diferentes períodos podem ser observadas na Figura 5.27.

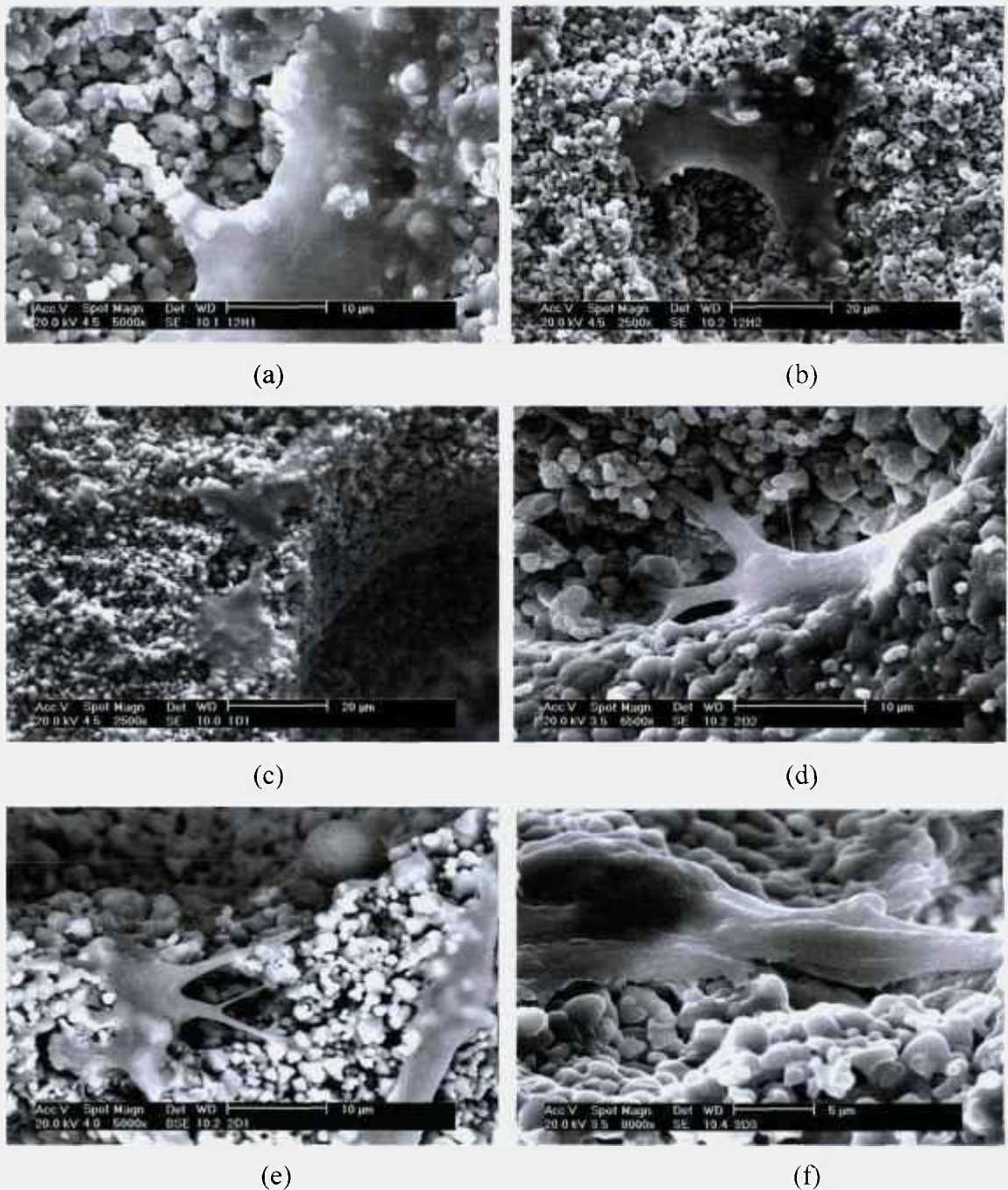


Figura 5.27- Micrografias obtidas por MEV da superfície de diferentes amostras (5H), mostrando as diferentes morfologias dos osteoblastos e ancoramento sobre a superfície, após período de 12 horas: (a) e (b); 1 dia de cultura: (c); 2 dias de cultura: (d) e (e); e 3 dias de cultura: (f); variação morfológica: (e) e (f): adensamento da membrana do osteoblasto.

Os osteoblastos ancorados na superfície das amostras apresentam fenótipo alongado de forma poligonal e longos prolongamentos citoplasmáticos, configurando um aspecto estrelado e presença de filipódias, estruturas desejadas na garantia de uma adesão adequada, sendo típicas de osteoblastos <sup>206</sup> (Fig. 5.27). Estes prolongamentos

citoplasmáticos, posteriormente serão efetivos na formação de lacunas e canalículos osteocitários que estabelecem a formação de uma rede tridimensional interconectada, conhecida como sistema lacuno-canicular (SLC), responsável pelo trânsito de nutrientes e líquido intersticial <sup>24</sup>.

Durante as primeiras horas, as células mostram indícios de baixa atividade, característica associada ao aspecto achatado e fino da membrana das células <sup>207</sup>, já com ancoragem adequada na superfície das amostras, assim como uma tendência de ancoragem sobre a curvatura dos poros, estabelecendo pontes entre as paredes adjacentes do mesmo, Fig. 5.27-b. A ancoragem está relacionada à presença de uma glicoproteína adesiva, a osteopontina, envolvida nos processos de adesão, migração e proliferação celular e que tem alta afinidade pela HAp, fase presente nas amostras <sup>208, 209</sup>.

Não foram notadas variações quanto à presença de filipódias ou prolongamentos citoplasmáticos entre os diferentes grupos de amostras analisados. Normalmente, em materiais porosos e superfícies irregulares, os prolongamentos citoplasmáticos são mais evidentes que a presença de filipódias <sup>210</sup>.

Em períodos mais longos (maiores que 12 horas), as células apresentavam uma membrana mais densa e morfologia mais definida, provavelmente com uma atividade maior, reforçada pela aparência mais arredondada das células, Fig 5.27-(c) e (e). A literatura relata que osteoblastos mais esféricos indicam sinal de alta atividade metabólica <sup>211, 212</sup>.

Na fase de crescimento, que se estabelece a partir do primeiro dia, as células passam a apresentar um metabolismo mais acelerado, sendo muito susceptível a variações de pH, pressão de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, temperatura e substâncias ativas, como biomoléculas ou compostos diferenciados presentes no meio <sup>207</sup>. O aumento do tamanho para algumas células foi a alteração morfológica mais evidente para as amostras analisadas nos últimos períodos (2 e 3 dias). Estudos sobre a interação de osteoblastos em diferentes superfícies de implantes de hidroxiapatita e outros fosfatos de cálcio demonstraram que os osteoblastos apresentam um comportamento diferente, de acordo com o tipo de superfície em que são cultivados <sup>213, 214</sup>. Cerâmicas porosas, com superfícies irregulares, desenvolvem osteoblastos com características morfológicas diferentes dos osteoblastos em contato com superfícies lisas <sup>215</sup>. Como as amostras analisadas apresentam topografia variada, com áreas menos irregulares e com depressões (porosidades), esta variação pode ser responsável pela diferença morfológica dos osteoblastos.

Para as amostras dos grupos 3 e 4 (2 e 3 dias, respectivamente) foi observado um maior número de contatos célula-célula, estabelecendo interconexões e evidência do processo habitual de divisão celular (mitose) em algumas das amostras, como ilustra a Figura 5.28, sendo detectada a presença de vesículas na membrana das células sobre as amostras analisadas em diferentes períodos. Neste processo a célula cresce, se diferencia e realiza reparos<sup>216</sup>.

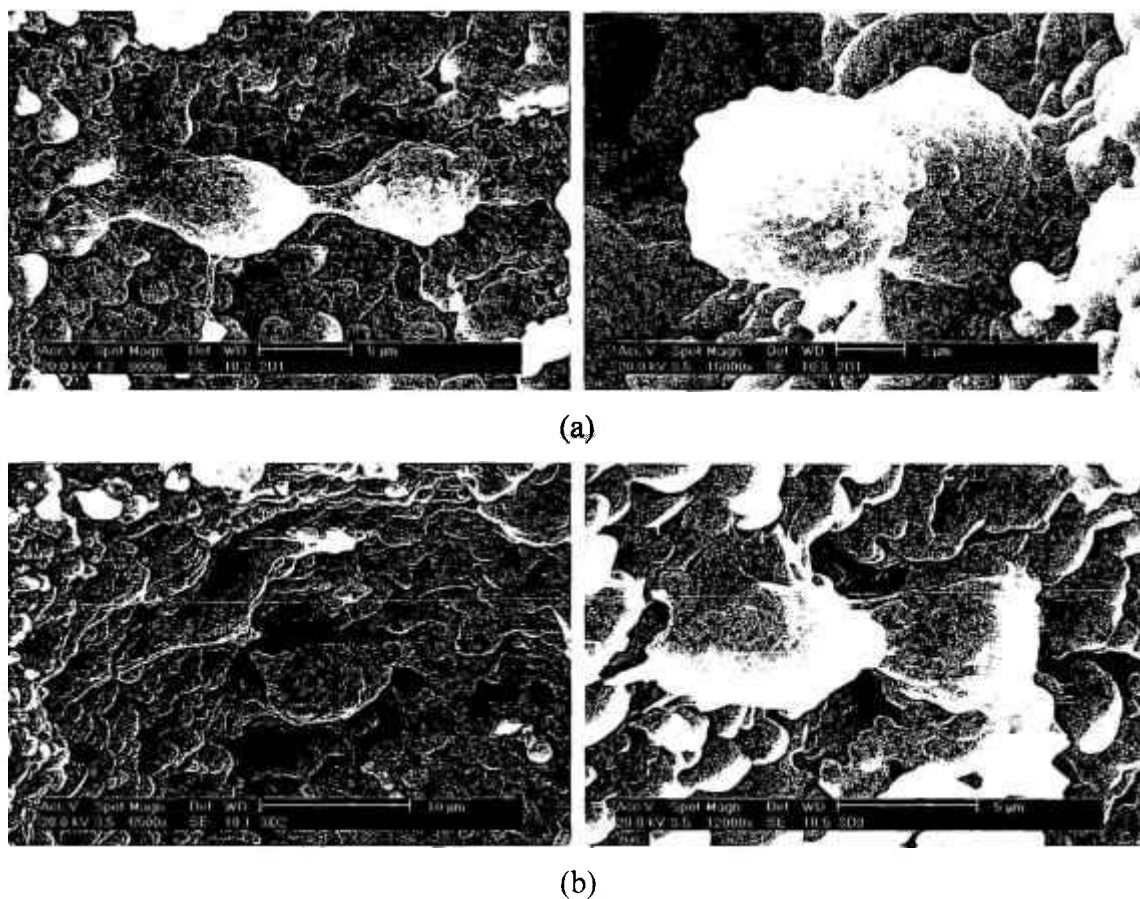


Figura 5.28 – Micrografias de osteoblastos em fase de divisão celular (mitose), obtidas por MEV em diferentes amostras; (a) 2 dias de cultura e (b) 3 dias de cultura.

As amostras dos dois últimos grupos (2 e 3 dias) apresentaram células de morfologia arredondada. Uma tendência normal, considerando que as células que crescem em monocamadas tornam-se arredondadas, uma condição termodinâmica e energeticamente favorável ao entrar em processo de divisão celular<sup>217</sup>, ficando menos aderidas ao substrato e podendo ser facilmente descoladas, o que justifica a presença de células viáveis em suspensão no meio de cultura das amostras, observadas em microscópio ótico.

Além da composição do material, a rugosidade presente nas amostras, é um fator determinante em ensaios de cultura celular<sup>205</sup>. Osteoblastos se orientam ao longo de sulcos do substrato, demonstrando o reconhecimento celular da topografia superficial<sup>215, 218</sup>. O tipo de topografia apresentada pela superfície das amostras promoveu o aumento da superfície de contato experimentada por cada célula. Estudos permitiram concluir que a rugosidade e porosidade do suporte condicionam a adesão celular, podendo aumentar a retenção de células, quando comparada a superfícies lisas<sup>213, 207, 215, 219</sup>.

Suportes sólidos com poros de dimensões equivalentes a cerca de 4 a 5 vezes o comprimento das células constituíam as melhores superfícies de adesão<sup>219</sup>. Nos experimentos desta tese pode-se observar que poros com dimensões maiores a esta citada na literatura<sup>219</sup> também são favoráveis ao ancoramento dos osteoblastos (Fig. 5.29); é possível que este comportamento tenha sido favorecido pela concavidade dos poros associada a rugosidade superficial. O efeito da rugosidade da superfície é importante quando ocorre a adesão da primeira camada de células, tendo menos influência quando uma superfície de adesão já tem um biofilme formado (fase de confluência)<sup>219, 213, 214</sup>.

É importante salientar que um material utilizado como implante está sempre condicionado pelos componentes do fluido onde está inserido, seja soro, saliva, sangue, ou ambientes simulados, como nos ensaios *in vitro*<sup>220</sup>. Além da natureza reabsorvível da cerâmica capaz de promover um processo de dissolução das amostras, também a existência de íons afins, Ca e P, na constituição do meio de cultura (DMEM) pode gerar gradientes de concentração iônica que condicionam um processo de difusão passiva no meio. Estes fenômenos podem desencadear um processo de saturação do meio que leva a formação de precipitados sobre a superfície, característica típica da reatividade de fosfatos de cálcio, mais evidente em ensaios com SBF<sup>88, 91, 203</sup>.

A presença de precipitados, como observada claramente, na micrografia (d) da Figura 5.29, pode tornar diferente a acessibilidade das células ao contato com substâncias ativas presentes no meio, retardando a fase de confluência<sup>221</sup>, momento onde há preenchimento completo da superfície de cultura. Nesta fase as células apresentam um índice mitótico muito baixo, devido a inibição do crescimento por contato celular e exibem, com maior intensidade, as características fenotípicas<sup>221, 222</sup>.

Na Figura 5.29 é possível observar o estágio de proliferação celular dos osteoblastos sobre a superfície das amostras. Em baixos aumentos, as células podem ser observadas como manchas ou sombras (indicadas nas setas, micrografia-a) sobre a superfície das amostras. Em aumentos maiores elas são visualizadas com mais facilidade,

possibilitando a detecção de precipitados (setas, micrografia-d) sobre a superfície da amostra e também sobre as células já aderidas. Esta última observação sugere que a formação de núcleos e conseqüente deposição indicam a participação de um processo dinâmico de dissolução das amostras e saturação/ precipitação do meio no qual as amostras estão submetidas.

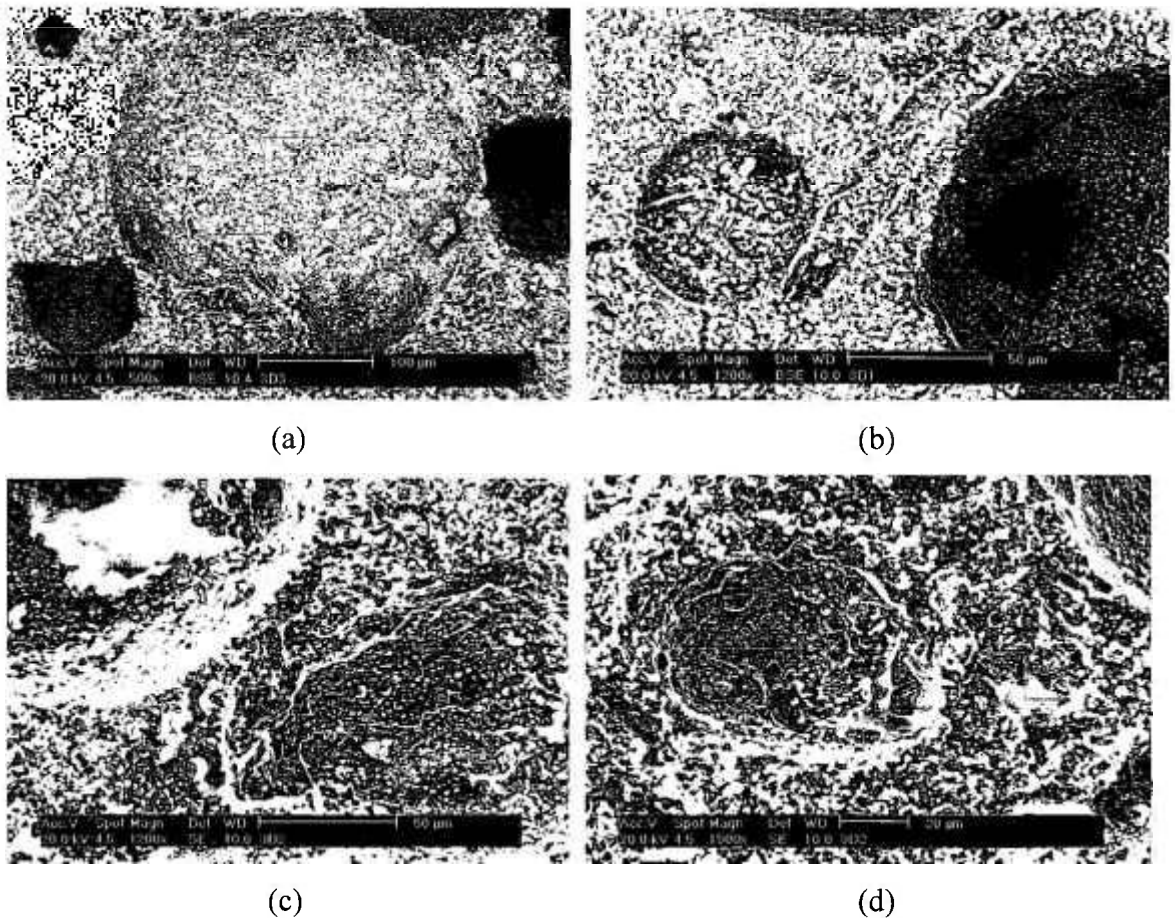


Figura 5.29- Fase de proliferação/diferenciação celular dos osteoblastos, após período de 3 dias de cultura, observada por MEV em superfícies de amostras variadas.

Durante o período do estudo *in vitro* de cultura celular (3 dias) não pode ser constatada a fase de confluência, porém foi observado um crescimento celular não uniforme, notando-se zonas de maior densidade celular, como as regiões de angulação dos poros. Este comportamento está de acordo com dados da literatura, que mencionam um crescimento disperso e irregular de osteoblastos sobre superfícies de fosfatos de cálcio rugosas e com porosidades, mesmo após uma semana de incubação <sup>210</sup>.

Sabe-se que o aumento da concentração de cálcio no meio pode ocasionar diferenças na viabilidade celular, diferenciação e adesão <sup>223</sup>. Este efeito pode ter sido

responsável pela alteração morfológica, caracterizada pelo aumento mais pronunciado do corpo celular de alguns osteoblastos. Este comportamento não prejudica o metabolismo das células, sendo o efeito contrário, de retração celular, uma alteração morfológica, na maioria das vezes, desfavorável ao seu desenvolvimento <sup>23</sup>.

Este aumento de volume celular pode ser explicado pelo fato de que diferentes moléculas ou íons, principalmente o cálcio, que apresenta natureza alcalina, após difusão para a célula, têm tendência a acumularem-se nos lisossomas, organelas com um meio relativamente ácido e que atuam como depósitos de substâncias exógenas, sendo responsáveis pela digestão e degradação de substâncias desnecessárias ou inoperantes, como forma de defesa <sup>207</sup>. A elevação da concentração de cálcio no interior dos lisossomas é acompanhada por um aumento da entrada de líquido nestas estruturas, aumentando o tamanho destas organelas, ocasionando um aumento no volume celular <sup>221, 224</sup>. Este comportamento é uma reação provocada por muitas substâncias de origem alcalina a que as células podem ser expostas <sup>221</sup>.

Outro fator a ser considerado, diz respeito a ocorrência de depressões nas superfícies das amostras, ocasionada pela presença de diferentes porosidades, podendo remeter a variações de pressão, onde os níveis de oxigênio e CO<sub>2</sub> estão diferentes do topo da superfície <sup>225</sup>. Este fenômeno pode fazer com que as células sejam estimuladas de maneiras diferentes, justificando as alterações morfológicas, como observadas na Figura 5.27-e, podendo em casos extremos, resultar em alterações metabólicas profundas <sup>207</sup>.

Os desequilíbrios de pressão, que ocorrem nas interfaces ou perto delas, são os responsáveis pelo bombeamento capilar que promove a distribuição de líquido por toda a amostra, acentuando a propriedade hidrofílica do material, podendo ocasionar uma melhora apreciável no comportamento biológico pela proliferação de células na matriz porosa <sup>225</sup>.

Outra característica observada é o estiramento do citoplasma das células. A literatura menciona que sob condição de estiramento, os canais de cálcio dos osteoblastos podem ser estimulados, possibilitando aumento de cálcio intracelular, que permite uma liberação mais acentuada da reserva de cálcio destinada à síntese de matriz extracelular <sup>29</sup>. A presença de matriz extracelular representa um grande avanço no metabolismo dos osteoblastos, podendo induzir, mais precocemente, sua transformação em osteócito <sup>24</sup>.

A presença de núcleos, resultantes da saturação do meio, pode mascarar a presença de células que estejam aderidas na mesma região, dificultando uma análise

quantitativa precisa. Esta característica teve efeito na contagem real do número de osteoblastos sobre as superfícies, permitindo apenas uma avaliação semi-quantitativa.

A Figura 5.30 ilustra a viabilidade celular, a partir do gráfico representativo do crescimento dos osteoblastos, em um período máximo de 3 dias, sobre as cerâmicas porosas de composição 5H.

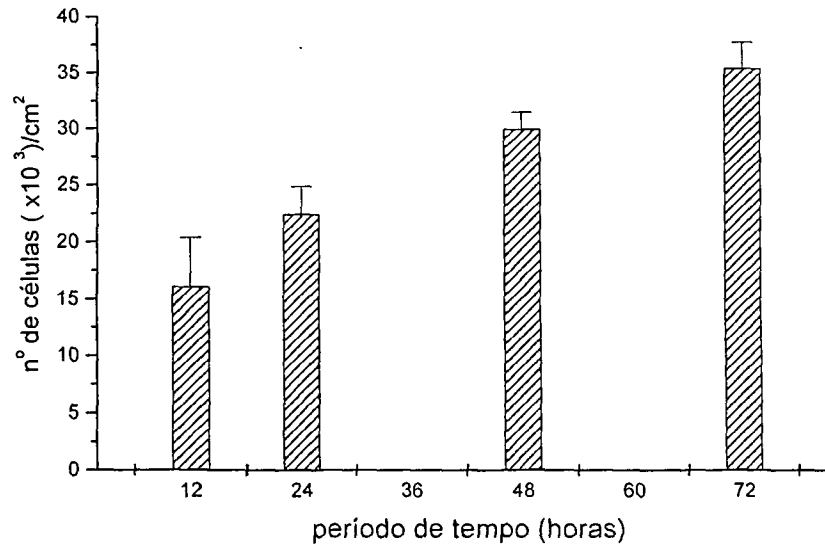


Figura 5.30- Avaliação do crescimento/proliferação celular de osteoblastos em superfícies das amostras macroporosas de fosfatos de cálcio (5H) para diferentes períodos.

Observa-se na Figura 5.30, que há um aumento gradativo do número de células na superfície das amostras, não sendo observado período de supressão entre as culturas que indique reações adversas ou sinal de citotoxicidade do material. No estágio inicial (12 horas), o metabolismo celular está voltado para o processo de ancoragem, na garantia de uma adesão adequada. A ancoragem das células requer a presença de proteínas de ligação específicas, enquanto a proliferação e diferenciação necessitam de fatores de crescimento e citocinas, glicoproteínas de baixo peso molecular, inferior a 80KDa, que atuam na intercomunicação celular<sup>220</sup>.

Após a etapa de adesão, as células iniciam processo de proliferação/diferenciação. Se o processo de adesão não tiver sido efetivo, dificilmente as células atingem as próximas fases de desenvolvimento, que acontecem em períodos mais prolongados<sup>213</sup>. Nos últimos estágios, as funções metabólicas estão voltadas para o processo de diferenciação celular, por isso não acontece um aumento expressivo do número de células, como observado para as amostras de 2 e 3 dias, na Figura 5.30, enquanto um reforço das características fenotípicas é notado, como, por exemplo, nas

amostras da Figura 5.27 (d), (e) e (f). Durante este processo ocorre a reorganização do citoesqueleto, estrutura que é determinante na organização do citoplasma, posição das organelas, movimento da célula e de componentes subcelulares, modelação da forma e diferenciação celular<sup>207</sup>.

Relativamente à composição do fluido, há vários parâmetros que influenciam no metabolismo celular, um deles é o pH. Este afeta as propriedades elétricas das células, dos microorganismos e da superfície dos sólidos, podendo alterar a repulsão eletrostática entre eles e conseqüentemente o processo de adesão celular às superfícies<sup>217, 225</sup>. Materiais bioativos, sob determinadas condições, propiciam a deposição de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA)<sup>203</sup>, uma espécie rica em  $\text{CO}_3^{2-}$ , esta condição também pode ter sido induzida, na presença da solução DMEM. A presença de HCA mesmo que na forma de precipitados ainda isolados, pode alterar o pH do meio, tornando a superfície da amostra menos alcalina, sensibilizando o metabolismo das células. A maioria dos biofilmes de células se forma em valores de pH próximos à neutralidade, sendo 7,2 o pH da membrana celular<sup>207, 219</sup>. Alterações do pH para valores superiores ou inferiores ao pH da membrana podem afetar o desenvolvimento e atividade do biofilme, pois já é relatado que o pH exerce um efeito significativo no metabolismo de qualquer linhagem celular<sup>226</sup>.

De modo geral, os ensaios *in vitro* demonstraram que os materiais processados são biocompatíveis e não exercem efeito citotóxico para as células que crescem sobre eles, não liberando substâncias tóxicas para o meio ou sinais de alterações morfológicas prejudiciais nas membranas celulares. Os resultados obtidos indicam que este tipo de material incitou um metabolismo considerado normal de acordo com dados da literatura para materiais semelhantes e dentro do padrão exigido para a continuidade da pesquisa, agora com ensaios *in vivo*.

---

---

## CONCLUSÕES

Neste capítulo, estão apresentadas as principais conclusões do estudo realizado.

## 6. CONCLUSÕES

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

A metodologia desenvolvida permite a obtenção de cerâmicas com diferentes porosidades na ausência de monômeros e outros aditivos, sem a necessidade de atmosfera controlada. A ação espumante da albumina aliada ao efeito de consolidação e à versatilidade oferecida pela metodologia tornou-se o grande diferencial, impactando na melhoria do processamento de cerâmicas porosas frente às outras técnicas.

O dispersante, Dispex A-40 alterou a superfície dos pós, melhorando a estabilidade das suspensões, fenômeno comprovado pelo aumento em módulo do potencial zeta na presença do dispersante. Suspensões de HAp,  $\beta$ -TCP e da mistura 5H foram otimizadas empregando quantidades de dispersante de: 1,9, 1,1 e 0,3 (%massa), respectivamente, resultando em propriedades reológicas adequadas para produção de espumas.

Suspensões de HAp,  $\beta$ -TCP e das diferentes misturas, preparadas em pH próximo de 10,5 são eficientes para obtenção de uma ótima condição de dispersão, proporcionando baixos valores de viscosidade e alta mobilidade. O  $\beta$ -TCP apresenta características como, área de superfície e mobilidade, que permite obter suspensão com maior teor de sólidos (71%) comparado a HAp (62%).

As espumas produzidas apresentaram uma sinérese adequada para consolidação da espuma. A lenta drenagem e a alta viscosidade superficial proporcionaram uma maior elasticidade para as células, melhorando sua estabilidade.

O surfactante, genaminox, selecionado não alterou a estabilidade da suspensão, sendo efetivo na produção da espuma. A atuação conjunta albumina/surfactante proporcionou a geração de micro e macroporosidade com características: tamanho, esfericidade e interconectividade dos poros, interessantes para aplicação como biomateriais.

As amostras de  $\beta$ -TCP, 7T/2H e 5H, apresentaram maior concentração de poros em intervalos de maior tamanho, enquanto as amostras, HAp e 7H/2T apresentaram uma distribuição mais significativa no intervalo de menor tamanho de poro.

Os ensaios de reatividade mostraram aspectos favoráveis da macroestrutura à formação de uma camada globular (típica da apatita biológica), como rugosidade, porosidades além da composição. As composições ricas em  $\beta$ -TCP são mais favoráveis à dissolução devido à solubilidade desta fase.

As cerâmicas apresentaram modificação da carga superficial após processo de sinterização, sendo observados valores mais altos de potencial zeta com relação aos materiais de partida.

A presença de carga superficial negativa nas amostras confeccionadas é um dos fatores favoráveis à reatividade das cerâmicas em SBF e para os ensaios com osteoblastos.

A topografia e a rugosidade da superfície das cerâmicas processadas permitiram a boa adesão dos osteoblastos.

A contagem das células pode ter sido comprometida pela presença de núcleos de fosfato de cálcio que foram detectados nas amostras durante o ensaio.

As análises *in vitro* indicam que os materiais processados apresentam biocompatibilidade inicial, não revelando morte celular, ou alterações drásticas do metabolismo das células, podendo ser testados em experimentos *in vivo*.

## 7. PROPOSTAS FUTURAS

Os estudos desenvolvidos durante a tese permitem a sugestão de novas propostas, contando com a parceria de outros grupos de pesquisa na área de biomateriais. Algumas propostas estão apresentadas a seguir:

- Análise *in vivo* das cerâmicas desenvolvidas, implantando em tíbias de coelhos, para avaliação da osteocondução e intra-muscular para verificação de comportamento osteoindutivo.
- Estudo das características de superfície dos materiais (molhabilidade, hidroflicidade, carga de superfície em diferentes meios) e de permeabilidade.
- Estudo da incorporação de um polímero biocompatível, após obtenção do corpo poroso, avaliando alterações de comportamento mecânico e biológico.

## 8. APÊNDICE

## APÊNDICE A

## Solução SBF

Para a avaliação de reatividade *in vitro*, foi preparada a solução específica para o teste, SBF –“Simulated Body Fluid”, de acordo com o método proposto por Kokubo e colaboradores <sup>203</sup>. Foi utilizada a solução SBF designada com o n.º.9, de acordo com Kokubo, sendo esta, a que mais se aproxima da composição do plasma sanguíneo humano. A Tabela a seguir 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.

Tabela 8.1-Reagentes analíticos e suas respectivas massas para a obtenção do SBF.

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

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-hidroximetil-aminometano, até atingir um pH de 7,25 ajustado para 37°C, em volume de 1 litro.

Após a obtenção do SBF, o mesmo pode ser guardado em frasco de polietileno e mantido em geladeira. Normalmente, esta solução apresenta uma vida útil de 30 dias.

## APÊNDICE B

## Solução DMEM

DMEM é um meio de cultura celular levemente alcalino, com pH aproximado de  $7,6 \pm 0,2$ . Na sua constituição estão presentes vitaminas, aminoácidos, fatores de crescimento celular, citocinas e soro. São utilizados ingredientes de alta qualidade e livres de origem animal na garantia de um ótimo desempenho, sua composição está apresentada na Tabela 8.2.

Tabela 8.2 – Composição da solução DMEM

Componentes DMEM 130-091-438	Concentrações g/L
<i>Sais inorgânicos</i>	
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,264
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	0,001
KCl	0,4
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	6,4
NaHCO <sub>3</sub>	3,7
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,125
<i>Outros componentes</i>	
Glucose	4,5
Fenol red Na	0,0159
Piruvato de sódio	0,11
<i>Aminoácidos</i>	
L-Arginina.HCl	0,084
L-Cistina	0,048
L-Alanil-L-Glutamina	0,868
Glicina	0,03
L-Histidina HCl.H <sub>2</sub> O	0,042
L-Isoleucina	0,105
L-Leucina	0,105
L-Lisina.HCl	0,146
L-Metilanina	0,030
L-Fenilalanina	0,066
L-Serina	0,042

L-Treonina	0,095
L-Triptofan	0,016
L-Tirosina	0,072
L-Valina	0,094
<i>Vitaminas</i>	
D-Ca Pantothenato	0,004
Cloreto Colina	0,004
ácido Fólico	0,004
mio-Inositol	0,0072
Nicotinamida	0,004
Piridoxina.HCl	0,004
Riboflavina	0,0004
Tiamina.HCl	0,004

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 RATNER, B.D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. *Biomaterials Science, An introduction to Materials in Medicine*; San Diego, editora Academic Press; 1996.
- 2 DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Ministério da Saúde. Rev. *Estratégia Nacional de Biotecnologia: interfaces com a saúde humana*. Saúde Pública, v.40, no.5 São Paulo Oct. 2006.
- 3 KLEIN, A. N.; FREDEL, M. C.; WENDHAUSEN, P. A. P. *Novos materiais: realidade e tendências de desenvolvimento*. Disponível no site: [www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011219\\_03.pdf](http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011219_03.pdf) (data de acesso: 25/10/07)
- 4 OHRING, M. *Engineering Materials Science*, San Diego, Academic Press, 1ª edição, 1995.
- 5 CERÂMICA BRASIL – *Cerâmica Interessante/ Tecnologia*; disponível no endereço: [www.ceramicabrasil.com/revista/index.php?edição=2](http://www.ceramicabrasil.com/revista/index.php?edição=2), data de acesso: 18/03/2003.
- 6 VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBERT, J.M. Calcium phosphate as substitution of bone tissues. *Progress in Solid state Chemistry*, 32, p. 1-31, 2004.
- 7 ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z.. Cerâmicas Bioativas – Estado da Arte. *Quim. Nova*, v. 29, n. 1, p. 100-104, 2006.
- 8 UCHUDA, A.; SHENTO, Y.; ARAKI, N.; ONO, K. Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. *Journal of orthopedic research*. v.10, p.440-445, 1992.
- 9 AYERS, R. A.; WOLFORD, L.M.; BATEMAN, T.A. FERGUSON, V.L.; SIMSKE, S.J.J. Quantification of bone ingrowth Into porous block hydroxyapatite in humans. *Biomed. Mater. Res.* 47, p. 54-57, 1999.
- 10 ALBREKTSSON, T. ; ALBREKTSSON, B. Osseointegration of bone implants. *Acta Orthopedic Scand.*, v. 58, p. 567-577, 1987.
- 11 RAVAGLIOLI A., KRAJEWSKI A. *Bioceramics: from concept to clinic*, New York, Chapman & Half, 1992.
- 12 WRITER, S. *Biointegrated materials project*. Techno Japan, 30, p. 10-20, 1997.

- 13 TANCRED, D.C.; MC COMARCK, B. A. O.; CARR, A. J. A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone. *Biomaterials*, 19, p. 2303-2311, 1998.
- 14 YUAN, H.; KENJI KURASHINA, JOOST D. de BRUIJN, YUBAO LI, K. de GROT, XINGDOG ZHANG. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, v.20, p. 1799-1806, 1999.
- 15 CARLOS, M.O.; OLIVEIRA, I.R.; GARCIA, J.R.; PANDOLFELLI, V.C. Otimização da suspensão para obtenção de cerâmicas porosas via "gelcasting". *Anais do 49º Congresso Brasileiro de Cerâmica*, 6-9 de junho, São Pedro, 2005.
- 16 A. WOESZ, M. RUMPLER, J. STAMPFL, F. VARGA, N. FRATZL-ZELMAN, P. ROSCHGER, K. KLAUSHOFER AND P. FRATZL Towards bone replacement materials from calcium phosphates via rapid prototyping and ceramic gelcasting. *Materials Science and Engineering: C*, v. 25, Issue 2, 28, p. 181-186; 2005.
- 17 SEPULVEDA, P.; ORTEGA, F. S.; INNOCENTINI, M. D. M.; PANDOLFELLI, V. C. Properties of Highly Porous Hydroxyapatite Obtained by the Gelcasting of Foams. *J. Am. Ceram. Soc.*, v.83; n.12; p. 3021-24; 2000.
- 18 DHARA, S.; BHARGAVA, P. Egg white as an Environmentally friendly low-cost binder for gelcasting of ceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* v.84, n.12, p. 3048-3050, 2001.
- 19 LYCKFELDT, O.; BRANDT, J.; LESCA, S. Protein forming – a novel shaping technique for ceramics. *Journal of the European ceramic Society*, v.20, p.2551-2559, 2000.
- 20 MONOLAGAS SC, JILKA RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging Insights into the Pathology of Osteoporosis. Review. *N Engl J Med.*; v.5, n.332, p.305-11, 1995.
- 21 LOPES, M. H. Envelhecimento ósseo. In: Papaléo Neto M, Carvalho Filho ET. *Geriatría: Fundamentos, Clínica e Terapêutica*. 2a ed. São Paulo: Atheneu; p.553-62, 2002
- 22 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, 8.ed: Guanabara Koogan. 433p, 1995.
- 23 YOUNG B, HEATH JW. *Wheater Histologia Funcional* – Texto e atlas em cores. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 415 p. 2001
- 24 BOZAL, C. B. Biologia del osteocito. *Actualiz Osteologia*. v. 2, n. 1 , p. 19-21, 2006.

- 
- 25 KNOTHE, T. M.L. Whither flows the fluid in bone? An osteocyte's perspective. *J. Biomech.* v.53, p. 1409-1424, 2003.
- 26 AARDEN, E.M.; BURGER, E.H.; NIJWEIDE, P.J. Function of osteocytes in bone. *J. Cell Biochem.* v.55, p. 287-299, 1994.
- 27 BOZAL, C. B.; FIOL, J.A.; UBIOS, A.M. Osteocytic lacunae enlarge immediately in response to stimulus. *J.Dent. Res.* v.81, B-9, 2002.
- 28 TURNER, C.H.; FORWOOD, M.R. What role does the osteocyte network play in bone adaption? *Bone*, 16:283-5, 1995.
- 29 DUNCAN, R.L.; TURNER C.H.: Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcified Tissue International* v.57, p. 344-358, 1995.
- 30 ROSS, M., ROWRELL, L.J. *Histologia: texto e atlas*. São Paulo, Panamericana, 1993.
- 31 PARK, E.; CONDRATE, S. R.; 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.
- 32 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.
- 33 WILLIAMS D, F. "*Definições em Biomateriais*". Conference of the European Society for Biomaterials, mar. 3-5, Chester, England, Elsevier, Amsterdam, n.6, p. 49-59, 1987.
- 34 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.
- 35 BUSER, D. *Guided bone regeneration in implant dentistry*. Chicago: Quintessence Books, 265p. 1994.
- 36 BOTTINO, M. C. M. *Estudo da osteointegração da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por metalurgia do pó com diferentes graus de porosidade*. 2005. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 37 DYSON, M. ; BROOKES, M. Estimulation of Bone Repair by Pulsed. *Wave ultrasound IEEE Transaction on Sonics and Ultrasonics*, v.17, p. 133-140, 1970.

- 38 HILL, P.A. Bone remodeling. *J. Orthod.* v.25, p.101-107, 1998.
- 39 RUSSEL, R.G.G. *et al.* Bone biology and the pathogenesis of osteoporosis. *Cur Opin Rheumatol*; v.18, n. 1, p. 3 – 10, 2006.
- 40 ROBERTS, E. W., POON, L. C., SMITH, R. K. Interface histology of rigid endosseous implants. *J. Oral Implantol*, v. 12, n.3, p. 406-416, 1986.
- 41 TONETTI, M.; GIOVANPAOLO, P.; CORTELLINI, P. Periodontal regeneration of human intrabony defects. IV. Determinants of healing response. *J Periodontol*;v.64, p.934-940,1993
- 42 CARRANZA FA JR, KENNEY EB, LEKOVIC V, TALAMANTE E, VALENCIA J, DIMITRIJEVIC B: Histologic study of healing of human periodontal defects after placement of porous hydroxylapatite implants. *J Periodontol.* v.58, n.10, p.682-688,1987.
- 43 ROSS, R. ; RAINES, E.W.; BOWEN, D.F. - The biology of Platelet derived growth factor. *Cell* v.46, p.155-169, 1986.
- 44 MARX RE.- Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin Plast Surg* v.21, p.377- 392, 1994.
- 45 CHRISTIAN,R.W.; REIS, F. B.; KÖBERLE,G..Traumatologia – Membro Superior. *Rev. Unifesp- Esc.Paulista de Medicina.* p.23-7,1997
- 46 MÜLLER, M. E.; ALLGÖWER, M.; SCHNEIDER, R.; WLENEGER, H.- *Manual de Osteossíntese.* São Paulo: 1 ed., Manole, 1993.
- 47 PASCHOAL, F. M.- *Haste Bloqueada "Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto"- experiência clínica no tratamento das fraturas femorais.* 1999. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Ribeirão Preto- São Paulo.
- 48 FERNANDES, H. J. A.; REIS, F.B.; KÖBERLE,G. FALLOPA, F.;CRISTIAN,R..Tratamento de Fraturas diafisária do fêmur com haste intramedular bloqueada. *Rev. Bras. Ortop.*,v.32, p: 418- 23, 1997.
- 49 FUENTES, A.E.R. *Efeitos da estimulação elétrica em pseudoartrose provocada experimentalmente em cães.* 1978. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.Ribeirão Preto/SP.

- 50 LIRANI, A. P. R., LAZARETTI-CASTRO, M. Evidências da Ação de Agentes Físicos sobre o metabolismo do Tecido Ósseo e seus potenciais usos clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab* v. 49, n. 6, p. 891-896, 2005
- 51 PROFFIT, W.R. *As bases biológicas da terapia ortodôntica*. Biomecânica e Mecânica. Ortodontia Contemporânea. 2ª. ed. R J, cap. 9 e 10. Guanabara Koogan, 1995,
- 52 GJEELSVIK, A. Bone remodeling and piezoelectricity – II. *J Biomechanics*, v.6, p.187-193, 1973..
- 53 WOLFF, J.: The Internal Architecture of normal bone and its mathematical significance. In: Julius Wolff. *The Law of Bone Remodelling*. Tradução P. Maquet and R. Furlong Springer-Verlag, EUA, New York, p. 3-21, 1986.
- 54 MARINO, A.A.; GROSS, B.D. Piezoelectricity in cementum, dentine and bone. *Archives of Oral Biology*, v.34, n.7, p. 507-9, 1989.
- 55 JIANQING, F.; HUIPIN, Y.; XINGDONG, Z. Promotion of osteogenesis by a piezoelectric biological ceramic. *Biomaterials*, v.18, p. 1531-34, 1997.
- 56 TURNER, C.H.; BURR, D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14,: 595-608, 1993
- 57 MOSTAFA, Y.A.; WEAKS-DYBVIK, M.; OSDOBY, P. Orchestration of tooth movement. *Am. J. Orthod*. Saint Louis, v.83, p. 245-250, 1983.
- 58 EINHORN, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Rel Res*. v.355, p. 7-21, 1998.
- 59 DANTAS, FÁBIO. *FISIOTERAPIA NA PREVENÇÃO DA OSTEOPOROSE* data de publicação: 25/06/2007. Seção: Artigos [www.2apoliclinica.cbmerj.rj.gov.br](http://www.2apoliclinica.cbmerj.rj.gov.br)
- 60 MAC DONALD, A.G.; FRASER, P.J.: The transduction of very small hydrostatic pressures. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* v.122, n.1, p. 13-36, 1999.
- 61 JOHNSON, M.W et al. Comparison of the Electromechanical Effects in Wet and Dry bone. *J. Biomech*, v.13, p. 437-442, 1980.
- 62 SIKAVITSAS, V.I.; TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, v.22, p. 2581-2593, 2001.

- 63 BURGER, E.H.; KLEIN-NULEND, J.: Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Bone* 22, n. 5, suplemento 1: 127S-130S, 1998.
- 64 CARVALHO, DANIELA C. L.; CARVALHO, MARIÂNGELA M; CLIQUET, ALBERTO JR. Osteoporose por desuso: aplicação na reabilitação do lesado medular. *Acta Ortop. Bras.* v.9, n.3, p. 34-43, 2001.
- 65 LEGEROS R. Z, *Calcium phosphate in oral biology and medicine*. Monographs in Oral, 15, 1991.
- 66 GAUTHIER, O.; GOYENVALLE, E.; BOULER, J. M.; GUICHEUS, J.; PILET, P.; WEISS, P.; DACULSI, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute: a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone *J. Mat. Sci.: Materials in medicine*. v.12, p. 385-90, 2001.
- 67 LAVERNIA, C.; SCHOENUNG, J. M. Calcium Phosphate Ceramics as Bone Substitute. *Ceramic Bulletin*, v. 70 ,n 1, 1991.
- 68 DE GROOT. K. *Clinical usefulness of calcium phosphate ceramics*. Zahnarztl Mitteil; 75, p. 1938-40, 1985.
- 69 TENHUISEN, K.; BROWN, P. W. Formation of calcium-deficient hydroxyapatite from tricalcium phosphate. *Biomaterials*. v.19, p. 2209-17, 1998.
- 70 RENOO, J.W.; HOOGENDOORN, H. A.; VISSER, W. J.; LENTFERINK, R. H.; WITTEBOL, F. Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants in dog femoral. *P. Clin. Orthopedic Relat Res*. 197, p. 272-285; 1985.
- 71 RIBEIRO, C.; SEPULVEDA, P.; BRESSIANI, J. C.; BRESSIANI, A H.A. Processamento de cerâmicas bifásicas de fosfatos de cálcio. In: 46 CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA, 2002, São Paulo. *Anais do 46º Congresso Brasileiro de Cerâmica*, p. 842-853; 2002.
- 72 LU, J.; DESCAMPS, M.; DEJOU, J.; KOUBI, G.; HARDOUIN, P.; LEMAITRE, J.; PROUST, JEAN-PIERRE. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J. Biomed Mater Res.*, 63, 408-412, 2002.
- 73 DOROZHUKIN, S.V. A review on the dissolution models of calcium apatites. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. P. 45-61, 2002.
- 74 LU, J. X.; GALLUR, A.; FLAUTRE, B.; ANSELME, K.; DESCAMPS, M.; THIERRY, B.; HARDOUIN, P. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *J. Biomed Mater Res*, 42, 357-367, 1998.

- 
- 75 FERNANDEZ, E. ; GIL, F. G. ; GINEBRA, M. P. ; DRIESSENS, F. C. M. ; PLANELL, J. A. Calcium phosphate bone cement for clinical application. Part I: solution chemistry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 10, p. 169 – 176, 1999.
- 76 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.
- 77 BLEACH, N. C.; NAZHAT, S.N.; TANNER, K.E.; KELLOMAKI, M.; TORMALA, P. Effect of filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate-poly lactide composites *Biomaterials*. v. 23, n.7, p. 1579-1585, 2002.
- 78 JACK E. LEMONS. Ceramics: past, present and future. *Bone* Vol. 19, no.1 Suppl. July, 121S-128S, 1996.
- 79 KWON, S.; JUN, Y.; HONG, S.; KIM, H. Synthesis and dissolution behavior of  $\beta$ -TCP and HA/ $\beta$ -TCP composite powders *Journal of the European Ceramic Society* 23, p. 1039-1045, 2003.
- 80 SOUS, M.; BAREILLE, R.; ROAIS, F.; CLÉMENT, O.; AMÉDEE, J.; DUPUY, B.; BAQUEY, C.H. Cellular biocompatibility and resistance to compression of macroporous  $\beta$ - tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, v. 19, p. 2147-2153; 1998.
- 81 MANJUBALA, I.; SIVAKUMAR, M.; SURESHKUMAR, V. R.; SASTRY, P. T. Bioactivity and Osseointegration Study of Calcium Phosphate Ceramic of Different Chemical Composition *J. Biomed Mater Res.*, v. 63, n.2, p. 200-208, 2002.
- 82 DACULSI, G.; LE GEROS, R. Z.; NERY, E.; LYNCH, K.; KEREDEL, B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J. Biomed. Mater. Res.* 23, p. 883-94; 1989.
- 83 BOULER, JEAN-MICHEL; DACULSI, GUY. In vitro carbonated apatite precipitation calcium phosphate pellets presenting various HAp- $\beta$ -TCP ratios. *Key Engineering Materials* 192-195; p. 119-22, 2001.
- 84 RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models *Biomaterials* v.17, n.1, p. 31-35 ; 1996.
- 85 TOQUET, J.; ROHANIZADEH, R.; GUICHEX, J.; COUILLAUD, S.; PASSUTI, N. DACULSI, G.; HEYMANN, D. *J. Biomed Mater Res.*, 44, p. 98-108; 1999.

- 86 NERY, E. B.; LE GEROS, R. Z.; LYNCH, K. L. tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HAp-TCP in periodontal osseous defects. *J. Periodontal* , 62; p. 729-35; 1992.
- 87 YUBAO, L.; XINGDONG, Z.; DE GROOT, K. Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, v 18, 10, p. 737-741, 1997.
- 88 RIBEIRO, C.; RIGO, E. C. S.; SEPULVEDA, P.; BRESSIANI, J. C.; BRESSIANI, A. H. A. Formation of calcium phosphate layer on ceramics with different reactivities. *Materials science and Engineering C*, v.24, p. 631-636, 2004.
- 89 ROHANIZADEH, R.; PADRINES, M.; BOULER, M. J.; COUCHOUREL, D.; FORTUN, Y.; DACULSI, G., Apatite precipitation after incubation of biphasic calcium-phosphate ceramic in various solutions: Influence of seed species and proteins. *J. Biomed Mater Res.*, 42, 530-539, 1998.
- 90 MONTEIRO, M. M.; CAMPOS DA ROCHA, N. C.; ROSSI, M. A.; SOARES, A. G., Dissolution properties of calcium phosphate granules with different compositions in simulated body fluid. *J. Biomed Mater Res.*, 65, 299-305, 2003.
- 91 HENCH, L.L. Bioceramics: from concept to clinical. *J. Am. Ceram. Soc.*, v.74, n.7, p.1487- 1510, 1991.
- 92 XIN, R.; LENG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Q. A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 2005.
- 93 DACULSI, G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials*, v.19, p. 1473-1478; 1998.
- 94 LENZA, R. F. S.; JONES, J. R.; VASCONCELOS, W. L.; HENCH, L. L. In vitro release kinetics of proteins from bioactive foams. *J. Biomed Mater Res.* v. 67, p. 121-129, 2003.
- 95 HING, K. A.; BEST, S.M.; BONFIELD, W. Characterization of porous hydroxyapatite *J. Mater. Sci.: Materials in Medicine*, v.10, p. 135-145, 1999.
- 96 GAUTHIER, O.; GOYENVALLE, E.; BOULER, J-M.; GUICHEUS, J.; PILET, P.; WEISS, P.; DACULSI, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute: a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone *J. Mat. Sci. :Materials in Medicine* 12, p. 385-390, 2001.
- 97 TANCREDO, D.C.; MC COMARCK, B. A. O.; CARR, A. J. A synthetic bone macroscopically identical to cancellous bone. *Biomaterials*, 19, p. 2303-2311, 1998.

- 98 MENDONÇA, F.; LOURO, L.H.L.; CAMPOS, J.B.; PRADO DA SILVA, M.H. Porous biphasic and triphasic bioceramics scaffolds produced by gelcasting. *Key Eng. Mat.* v. 361-363, p.27-30, 2008.
- 99 ROBINSON, J.H.; BEST, S.M.; AHMAD, Z.; EDIRISINGLE, M.J. The effect of reaction conditions on hydroxyapatite particle morphology and applications to the reticulated foam method of scaffold production. *Key Eng. Mat.* v. 361-363, p.3-6, 2008.
- 100 LI, S. H.; WIJN, DE R. J.; LAYROLLE, P.; GROOT, DE K. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed Mater Res.* v. 61, p.109-120, 2002.
- 101 MONTUFAR, E.B.; TRAYKOVA, T. GINEBRA, M.P.; PLANELL, J. Foamed beta-tricalcium phosphate scaffolds *Key Eng. Mat.* v. 361-363, p.323-326, 2008.
- 102 PASSUTI, N., DACULSI, G., ROGEZ, J. M., MARTIN, S., BAINVEL, J. V. Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 243; p. 169-76; 1989.
- 103 WOODARD, J. R.; HILLDORE, A. J. LAN, S. K. PARK, C.J., JOHNSON, A. J. W. ABBY W. MORGAN, JO ANN C. EURELL, SHERRIE G. CLARK, WHEELER, M. B., RUSSELL, D. J. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* v.28, p. 45-54, 2007.
- 104 HENCH, L.L.; JONES, J. R.; SEPULVEDA, P. cap.1, p. 3-22, 2001; disponível no end.: [www.icpress.co.uk/books/engineering/etxtbook/p252](http://www.icpress.co.uk/books/engineering/etxtbook/p252); data de acesso: 14/04/03.
- 105 [www.biomed.wustl.Edu/faculty/sakiyama/research.htm](http://www.biomed.wustl.Edu/faculty/sakiyama/research.htm); data de acesso: 02/09/2003.
- 106 TAMAI, N.; MYOUI, A.; TOMITA, T.; NAKASE, T.; TANAKA, J.; OCHI, T. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.* V.59, p. 110-117; 2002.
- 107 AYERS, R. A.; WOLFORD, L.M.; BATEMAN, T.A. FERGUSON, V.L.; SIMSKE, S.J. Quantification of bone ingrowth into porous block hydroxyapatite in humans *J. Biomed. Mater. Res.* 47, p. 54-57, 1999.
- 108 P. HORCAJADA, A. RÁMILA, K. BOULAHYA, J. GONZÁLEZ-CALBET AND M. VALLET-REGÍ. Bioactivity in Ordered Mesoporous Materials. *Solid State Sci.* v.6, p.1295-1300, 2004.
- 109 TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T.

- Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials*.v. 26, p. 6014-6023, 2005.
- 110 ALMEIDA JUNIOR, A.; FERREIRA, A. *Elementos de anatomia e Fisiologia humanas*. São Paulo, S.P.: Edição Nacional, p. 41-66, 1983.
- 111 J. ROUQUEROL; D. AVNIR; C. W. FAIRBRIDGE D. H. EVERETT ; J. H. HAYNES ; N. PERNICONE; J. D. F. RAMSAY ; K. S. W. SING and K. K. UNGER COMMISSION ON COLLOID AND SURFACE CHEMISTRY *Subcommittee on Characterization of Porous Solids*. Recommendations for the Characterization of Porous Solids *Pure & Appl. Chem.*, v. 66, n. 8, p. 1739-1758, 1994.
- 112 KAWACHI, ELIZABETE Y., BERTRAN, CELSO A., REIS, RALPHO R., ALVES, OSWALDO. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quím. Nova*. v.23, n.4, p. 518-522, 2000.
- 113 YUAN, H.; DE BRUIJN, J.D.; ZHANG, X.; BLITTERSWIJK,C. A. V.; DE GROOT, K. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass® (45S5). *J. Biomed. Mater. Res.* v. 58, n. 3, p. 270-276; 2001.
- 114 FELLAH, B. H.; JOSSELIN, N.; CHAPPARD,D.; WEISS, P.; LAYROLLE, P. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 18, p.287-294, 2007
- 115 LEWIS, J.A. Colloidal Processing of Ceramics *J. Am. Ceram. Soc.* 83, v10, p. 2341-2359, 2000.
- 116 KELLER, M., ULBRICH, R., HABER, Rheological characterization of slips. *The Am. Ceram. Soc. Bull.* 3, v. 76, p. 87-91, 1997.
- 117 OLIVEIRA, I. R., STUDART, A. R., PILEGGI, R. G., PANDOLFELLI, V. C. *Dispersão e empacotamento de partículas*. Fazenda Arte Editorial, 2000.
- 118 LORENZO, R. L.M., VALLET-REGÍ, M., FERREIRA, J.M.F. Colloidal processing of hydroxyapatite. *Biomaterials* v.22, p. 1847-1852, 2001.
- 119 SEPULVEDA, P. A. Porous Ceramics and the Gelcasting of Foams. *The Am. Ceram. Soc. Bull.* v. 76, no. 10, p. 61- 65, 1997.
- 120 YATES, J.D., LOMBARDO, S. The effect of plaster composition and binder concentration on strain mismatch and deformation of slip-cast green bodies. *J. Mat. Science and Engineering*, A 337, p. 297-305, 2002.

- 
- 121 SHAW, D. J. *Introdução à Química dos colóides e de superfícies*. Edgard Blücher Ltda, SP, 975.
- 122 TAN, Q., ZHANG, Z., TANG, Z., LUO, S., FANG, K.. *Mat. Chem. and Phy.* 80, p. 615-619, 2003.
- 123 CYSTER, L.A.; GRANT, D.M.; HOWDLE, S.M.; IRVINE, D.J.; FREEMAN, D. SCOTCHFORD SHAKESHEFF, K.M. The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 26,p. 697-702, 2005.
- 124 PADILLA, S., GARCÍA-CARRODEGAS, R., VALLET-REGÍ, M. Hydroxyapatite suspensions as precursors of pieces obtained by gelcasting method. *J. of the Eur. Cer. Soc.*,2004.
- 125 BAO, Y., SENOS, A. M.R., ALMEIDA, M. GAUCKLER, L. J. Rheological behavior of aqueous suspensions of hydroxyapatite (HAp). *J. of Mat. Sc.: Mat. in Med.*, v. 13, n. 7, p. 639-643, 2002.
- 126 GUO, J. and LEWIS, J.A. "Salt Concentration Effects on the Rheological Properties and Sedimentation Behavior of Colloidal Silica Suspensions, *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 83, n.2, p.266-72, 2000.
- 127 GOUVÊA, D.; MURAD, B.B.S. Influência das características ácido-básicas da superfície dos óxidos na estabilidade de suspensões cerâmicas de  $Al_2O_3$  ou  $SnO_2$  com dispersantes comerciais. *Cerâmica*, v.47, 301, p. 51-56, 2001.
- 128 RAVAGLIOLI A., KRAJEWSKI A. A physico-chemical study of crystal growth of hydroxyapatite bioceramic. *Biomaterial*, v.2, n. 2, p. 105-11; 1981.
- 129 GBURECK, U., PROBST, J., THULL, R. Surface properties of calcium phosphate particles for self setting bone cements. *Biomolecular Engineering*. v.19, p. 51-55, 2002.
- 130 NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Quim. Nova*. v. 25, 5, p. 772-776, 2002.
- 131 OSÓRIO, V.K.L E OLIVEIRA, W. Polifosfatos em detergentes em pó comerciais. *Química Nova*, v. 24, 5, p. 700-708, 2001.
- 132 CONDE, A. L. *Tensoativos e suas aplicações*. Artigo técnico - OXITENO. p.1-10, agosto, 2003.

- 133 CUNHA, C.P.; LOBATO, N.; DIAS, S. *Problemática dos tensioativos na indústria de produção de detergentes em Portugal*, 2002.  
site:meteo.ist.utl.pt/~jjdd/LEAMB/LEAmb%20TFC%20site%20v1, acesso: 05/2005.
- 134 MANIASSO, NELSON. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, vol.24,1, p. 87-93, 2001.
- 135 SALANGER, JEAN-LOUIS. *Surfactants types and uses*,. FIRP Booklet , E 300-A, Venezuela, 2002.
- 136 ELWORTHY, P.H., FLORENCE, A.T., MACFARLANE, C.B. *Solubilization by surface active agents*. Chapman Hall, London, 1968.
- 137 ASNACIOUS, A .; KLITZING, R.; D. LANGEVIN. Mixed monolayers of polyelectrolytes and surfactants at the air-water interface. *Colloids and surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*.167, p. 189-197, 2000.
- 138 FIGUEREDO, R. C. R., RIBEIRO, F. A. L., SABADINI E .Ciência de espumas - aplicação na extinção de incêndios. *Quím. Nova* v.22 n.1 São Paulo feb. 1999
- 139 BENEVENTI, D.; CARRE, B.; GANDINI, A. Role of surfactant structure on surface and foaming properties. *Colloids and surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 189,p.65-73, 2001.
- 140 SALANGER, J.L., ANDEREZ, J. M. FORGIARINI, A. *Influencia de la formulation sobre las espumas*, 263-A.Venezuela, 2003
- 141 ANGARSKA, J.K.; DIMITROVA, D.S.; DANOV K.D.; KRALCHEVSKI, P.A.; LIPS, A. Detection of the hydrofobic surface force in foam films by measurements of the critical thickness of films rupture *Langmuir*, 20, p. 1799-1806, 2004.
- 142 MORAES, S.L.; REZENDE, M.O.O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. *Química Nova*, v. 27, 5, p. 701-705, 2004.
- 143 HÉDREUL, C. FRENS, G. Foam stability. *Colloids and surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*.186, p. 75-82, 2001.
- 144 CARLOS, M.O.; GARCIA, J.R.; OLIVEIRA, I.R.; SALOMÃO, R.; PANDOLFELLI,V.C. Heterocoagulação como técnica para obtenção de cerâmicas porosas. *Anais do 49º Congresso Brasileiro de Cerâmica*, 6-9 de junho , São Pedro, SP, 2005.

- 
- 145 GILISSEN, R., ERAUW, J.P., SMOLDERS, A., LUYTEN, Gelcasting, a near net shape technique *J. Materials & Design*. 21, p. 251-257, 2000.
- 146 OMATETE, O. O., JANNEY, M. A., STREHLOW, R.A. Gelcasting: from laboratory development toward industrial production. *Journal of the European Ceramic society*. v. 17, p. 407-413, 1997.
- 147 YASUDA, H. Y., MAHARA, S., UMAKOSHI, Y., IMAZATO, S., EBISU, S. Microstructure and mechanical property of synthesized hydroxyapatite prepared by colloidal process. *Biomaterials*, v. 21, p. 2045-2049, 2000.
- 148 POTOCZEK, M.; ZAWADZAK, E. Initiator effect on the gelcasting properties of alumina in system involving low-toxic monomers. *Ceramics International*. 30, p. 793-799, 2004.
- 149 KAI CAI, YONG HUANG AND JINLONG YANG . Alumina gelcasting by using HEMA system. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 25, n. 7, p. 1089-1093, 2005
- 150 ORTEGA, FERNANDO DOS SANTOS. *Produção e caracterização de espumas cerâmicas obtidas pelo processo "gelcasting"*. 2002. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- 151 ISHIZAKI, SHEPPARD, OKADA, HAMASAKI, HUYBRECHTS. Ceramics Transactions - Porous Ceramics, v. 31, *The Am. Ceram. Soc.*, 1993.
- 152 VANDEPERRE, L.J.; WILDE, A.M. D.; LUYTEN, J. Gelatin gelcasting of ceramic components. *J. Mater. Process. Tech* 135 p. 312-316; 2003.
- 153 ORTEGA, F.S.; VALENZUELA, F.A.O.; PANDOLFELLI, V.C. Alternative gelling agents for the gelcasting of ceramics foams. *Mater. Sci. Forum*, 416, p. 512-518; 2003.
- 154 SEPULVEDA, P.; BINNER, J. G. P. Processing of cellular ceramics by foaming and in situ polymerisation of organic monomers. *J Eur Ceram Soc* 19, p. 2059-66; 1999.
- 155 SEPULVEDA, P.; BINNER, J. G. P. Monomer system for the gelcasting of foams. *Chem. Mater*. 13, p. 4065-4070; 2001.
- 156 UCHUDA, A.; SHENTO, Y.; ARAKI, N.; ONO, K. Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. *Journal of orthopedic research*. V-10, 440-445, 1992.

- 157 LENZA, R. F. S.; JONES, J. R.; VASCONCELOS, W. L.; HENCH, L. L. In vitro release kinetics of proteins from bioactive foams. *J. Biomed Mater Res.*, 67, p. 121-129, 2003.
- 158 MARZZOCO, A.; Torres, B.B. *Bioquímica básica*. Editora Guanabara, RJ, 1990.
- 159 Estructura de las proteínas. [www.arrakis.es/~lluengo/pproteinas.html#GlossE](http://www.arrakis.es/~lluengo/pproteinas.html#GlossE). data de acesso: 31/03/2005.
- 160 ANTON, M.; GANDEMER, G. Effect of pH on interface composition and on quality of oil-in-water emulsions made with hen egg yolk. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, p. 351-358, 1999.
- 161 XU, W.; NIKOLOV, A.; GONSALVES, A. ; BORWANKAR, R. P. Foam films rheology and thickness stability of foam-based food product. *Colloids and surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 214, p. 13-21, 2003.
- 162 C. TUCK, J.R.G. EVANS. Porous ceramics prepared from aqueous foams. *Journal of Materials Science Letters* 18, p. 1003-1005, 1999.
- 163 YIU, H. H. P.; BOTTING, C. H.; BOTTING, N.P.; Wright, P.A. Size selective protein adsorption on thiol functionalised SBA-15 mesoporous molecular sieve. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3, p.2983-2985, 2001.
- 164 ALLEONI, A.C.C.; ANTUNES, A.J. Perfil de textura e umidade expremível de gá do albume de ovos recobertos com soro de leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.v. 25, 1, jan/mar, 2005.
- 165 GOSSETT, P.W.; RIZVI, S.S.H.; BAKER, R.C. Quantitative analysis of gelation in egg protein systems. *Food Technology*. V. 38, 5, p. 67-96, 1984.
- 166 Ovalbumina. [www.imb-ena.de/image\\_library/PROTEINS/proteins/lova/lova\\_midasl\\_s.gif](http://www.imb-ena.de/image_library/PROTEINS/proteins/lova/lova_midasl_s.gif). data de acesso: 10/08/2004
- 167 ENGELA, L.; ASIN, J.A.; DELGADO, A.C.; PLANELL, J.A. Cell behaviour of calcium phosphate bone cement modified with a protein-based foaming agent. *Key Engineering Material*. v. 284-286, p.117-120, 2005.
- 168 GARRN, I., REETZ, C., BRANDES, N., KROH, L. W., SCHUBERT, H. Clot-forming: the use of protein as binders for producing ceramic foams. *Journal European Ceramics Society* . v.24, p. 579-587, 2004.

- 169 LEMOS, A.F.; FERREIRA, J.M.F. The valences of egg white for designing smart porous bioceramics: as foaming and consolidation agent. *Key Engineering Material*. v. 254-256, p.1045-1050, 2004.
- 170 WANG, S.H.; FERNANDES, S. M.; CABRAL, L.C.; ARAÚJO, F.B. Absorção de gordura, solubilidade, e propriedades espumantes dos extratos hidrossolúveis desidratados de arroz e soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 20, 2, may/aug. 2000.
- 171 CHANG, Y.I.; CHEN, T.C. Functional and gel characteristics of liquid whole egg as affected by pH alteration. *Journal of Food Engineering*, 45, p. 237-241, 2000.
- 172 RIBEIRO, C. *Processamento e Caracterização de cerâmicas à base de fosfatos de cálcio como biomaterial*. 2003. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 173 ASTM C20-00. Standard test methods for apparent porosity, water absorption, apparent specific gravity, and bulk density of burned refractory brick and shapes by boiling water.
- 174 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5. 1993. Biological evaluation of medical devices. Part. 5: *Tests for cytotoxicity: in vitro methods*.
- 175 ELLIOT, J. C. *Structure and Chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Elsevier Science B.V. 1994.
- 176 DAYANAND, C.; BHIKSHAMAIAH, G.; TYAGARAJU, V. J.; SALAGRAM, M.; MURTHY A.S.R. 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.
- 177 HANKERMEYER, C.R; OHASHI, L. K; DELANEY, C. D; ROSS, J; CONSTANTZ, R. B. Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid. *Biomaterials* v. 23, p. 743-750; 2002.
- 178 KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite crystal: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.62, p. 600-612, 2002.
- 179 ALLEONI, A.C.C.; ANTUNES, A.J. Perfil de textura e umidade expremível de gá do albume de ovos recobertos com soro de leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.v. 25, n.1, 2005.

- 
180. TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e Caracterização de Blendas Colágeno-Quitosana. *Quím. Nova*, v.25, n.6, Nov./ dec. 2002.
- 181 VALCINIR ALOISIO S. VULCANI. *Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona*. 2004. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- 182 MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. *Análise Térmica de Materiais*. São Paulo, Editora, 2002.
- 183 ANJOS, R.D., SALOMÃO, R., PANDOLFELLI, V.C. Novas técnicas de reometria aplicadas a suspensões cerâmicas. *Cerâmica*, v.51, p. 173-179, 2005.
- 184 WEIJERS, M., SAGIS, L.M.C., VEERMAN, C., SPERBER, B., VAN DER LINDEN, E. Rheology and structure of ovalbumin gels at low ph and low ionic strength. *Food Hydrocolloids*, v.16, p. 269-276, 2002
- 185 J. M. LAZA, C. A. JULIAN, E. LARRAURI, M. RODRIGUEZ, L. M. LEON. Thermal scanning rheometer analysis of curing kinetic of an epoxy resin: an amine curing agent, *Polymer* . v.40 , 35, 1998.
- 186 WEIJERS, M., VAN DE VELDE, FRED., STIJNMAN, A., VISSCHERS, R. W. Structure and rheological properties of acid-induced egg white protein gels. *Food Hydrocolloids*, v.20, p. 146-159, 2006.
- 187 NASCENTES C.C.; ARRUDA, M.; MANIASSO, N. Experimentos Didáticos em Química Analítica Envolvendo Separação de Fases e Pré-Concentração. *Quím. Nova – Educação*. v. 25, n.3, p. 483-489, 2002
- 188 GAO, Y.; CAO, WEN-LING; WANG, XIAO-YAN; GONG, YAN-DAO; TIAN, JIE-MO; ZHAO, NAN-MING; ZHANG, XIU-FANG. Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone *J Mater Sci: Mater Med* v.17, p.815–823, 2006
- 189 DEL VALLE, S., MIÑO, N., MUÑOZ, F., GONZÁLEZ, A. PLANELL, J. A., GINEBRA, MARIA-PAU. In vivo evaluation of an injectable. Macroporous Calcium Phosphate Cement *J Mater Sci: Mater Med*, v.18, p. 353– 361, 2007.
- 190 J. P. FISHER AND A. H. REDDI Functional Tissue Engineering of Bone: Signals and Scaffolds, II Bone, Chapter 5, *Topics in Tissue Engineering* 2003. Eds. N. Ashammakhi & P. Ferretti.

- 
- 191 F. S. ORTEGA, A. E. M. PAIVA, J. A. RODRIGUES, V. C. PANDOLFELLI. Propriedades mecânicas de espumas cerâmicas produzidas via .gelcasting. *Cerâmica* 49, p.1-5, 2003
- 192 GONG, S. J.; WANG, H.; SUN,Q.; XUE,SONG-TAO; WANG, JIN-YE. Mechanical properties and in vitro biocompatibility of porous zein scaffolds. *Biomaterials* v.27, n 20, p. 3793-3799, 2006.
- 193 YONG ZHANG, MIQIN ZHANG. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *J. Biomed Mater Res* 61, p.1–8, 2002.
- 194 RAFFAINI, GIUSEPPINA; GANAZZOL, FABIO. Sequential adsorption of proteins and the surface modification of biomaterials: A molecular dynamics study. *J Mater Sci: Mater Med*, 18, p.309–316, 2007.
- 195 DAMIEN LE NIHOUANEN · AFCHINE SAFFARZADEH · ERIC AGUADO · ERIC GOYENVALLE · OLIVIER GAUTHIER · FRAN,COISE MOREAU · PAUL PILET · REINER SPAETHE · GUY DACULSI PIERRE LAYROLLE. Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites *J Mater Sci: Mater Med*, 18, p. 225–235, 2007.
- 196 D. O. MEREDITH, M. O. RIEHLE, A. S. G. CURTIS, R. G. RICHARDS. Is surface chemical composition important for orthopaedic implant materials? *J Mater Sci: Mater Med*, 18, p.405–413, 2007.
- 197 SOON-HO KWON, YOUN-KI JUN, SEONG-HYEON HONG, HYOUN-EE KIM. Synthesis and dissolution behavior of b-TCP and HA/b-TCP composite powders. *Journal of the European Ceramic Society* 23, p.1039–1045, 2003.
- 198 NAKAE, H., INUI, R., HIRATA, Y., SAITO, H. Effects of surface roughness on wettability. *Acta mater.*, v.46, n.7, p.2313-2318, 1998.
- 199 HIRASAKI, G. J. *Wettability: Fundamentals and surface forces*. SPE Formation Evaluation, p.217-226, 1991.
- 200 AMARAL, M.; LOPES, M.A.; SANTOS, J.D.; SILVA, R.S. Wettability and surface charge of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> bioglass composites in contact with simulated physiological liquids. *Biomaterials*, n. 23, p. 4123-4129, 2002.
- 201 ZHU, PEIXIN; MASUDA, Y.; KOUNOTOS, K. The effect of surface charge on hydroxyapatite nucleation. *Biomaterials*, n.25,p. 3915-3921, 2004.

- 
- 202 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.
- 203 KOKUBO, T.; KUSHITAMI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T. and YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biom. Mater. Res.*v. 24, p.721-734, 1990.
- 204 HORVATH, L. et al. Effect of cationic surfactant on the transformation of octacalcium phosphate. *Journal of Crystal Growth.* v. 219, p. 91-97; 2000.
- 205 INOUE, M.; LEGEROS, R.Z.; INOUS, M.; TSUJIGIWA, H.; NAGATSUKA, H.; YAMAMOTO, T. In vitro response of osteoblast-like and odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites, *J Biomed Mater Res* 70A, p. 585–593, 2004.
- 206 BAXTER, L. C., TEXTOR, V. FRAUCHIGER, GWYNN, M. I.; RICHARDS, R. G. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *European Cells and Materials.* v. 4, p. 1-7, 2002.
- 207 GUYTON, A. C. *Fisiologia humana*, 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 564 p., 1988.
- 208 VILLARREAL, D. R.; SOGAL, A.; ONG, J. L. Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces. *Journal of Oral Implantology.* v. XXIV, n.2, p.67-73, 1998.
- 209 OSHIMA, A.; TADOKORO, M.; HIROSE, M. TAKAKURA, Y.; OHGUSHI, H. Stability of cultured osteoblasts on calcium phosphate ceramics. *Key. Eng. Mat.* V. 309-311, p. 93-96, 2006.
- 210 SILVA, R.V. *Uso do laser em falhas ósseas tratadas com enxerto ósseo autógeno ou cerâmica de fosfato de cálcio.* Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- 211 CHESMEL, K.D.; CLARCK, C.C.; BRIGHTON, C.T.; BLACK, J. Cellular response to chemical and morphological aspects of biomaterials surfaces II. The biosynthetic and migratory response of bone cell population. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29, p. 1101-1110, 1995.
- 212 HARMAM, M.D. Humam cell culture and characterization of cell-biomaterial interface. *Clin Mater.* 11, p. 145-150, 1992.

- 213 DELIGIANNI, D.D.; KATSALA, N.D.; KOUTSOUKOS, P.G.; MISSIRLIS, Y.F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 22, p. 87-96, 2001.
- 214 BOWERS, K.T.; KELLER, J.C.; RANDOLPH, B.A.; WICK, D.G.; MICHAELS, C.M. Optimisation of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int. J Oral Maxillofac Implants*. v.7, p. 302-310, 1992.
- 215 MURRAY, D.W.; ERA, T.; RUSHTON, N. The influence of the surface energy and roughness of implants on bone resorption. *J Bone Joint Surg*. 71-B, n.4, p. 632-637, 1989.
- 216 BRUNETTE, D.M. The effects of implants surface topography on the behavior of cells. *Int. J Oral Maxillofac Implants*. v.3, p. 231-246, 1988.
- 217 GWYNN I. Cell biology at interfaces. *J Mater Sci: Mater Med*. v. 5, p. 357-360, 1994.
- 218 ANSELME K, BIGENELLE M, NOEL B, DUFRESNE E, JUDAS D, IOST A, HARDOUIN P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res*. v. 49, p. 155- 166, 2000.
- 219 VIEIRA, M. J.; OLIVEIRA, R.; MELO, L.; PINHEIRO, M.; MARTINS, V. Effects of metallic ions on the adhesion of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens*. *Colloids and Surfaces B. Interfaces*. v.1, p.119-124. 1993.
- 220 BOYAN B.D.; HUMMERT, T.W.; DEAN, D.D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, 17, p. 137-146, 1996.
- 221 PEREIRA, M.L.L.; COSTA, M.A.; CARVALHO, J.F.C.; FERNANDES, M.H.R. Efeito da nicotina na morfologia e proliferação de células de osso alveolar humano em diferentes fases de diferenciação. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*. v. 46, no. 2, p. 81-91, 2005.
- 222 ANSELME K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, v. 21, p. 667-681, 2000.
- 223 OHASHI, N.; NAKAMURA, M.; NAGAI, A.; TANAKA, Y.; SEKILIMA, Y.; YAMASHITA, K. Comparison of hydroxyapatite with carbonate apatite in osteoclastic cell resorptive activity. *Key. Eng. Mater*. v. 361-363, p. 1039-1042, 2008.

- 
- 224 STEIN, G.S. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian J.P., Rodan G.A., eds. *Principles of bone biology*. San Diego. p. 69-86, 1996.
- 225 DEE, K. C., PULEO, DAVID A., BIZIOS, RENA. *An Introduction to tissue Biomaterial Interactions*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, EUA, 2002.
- 226 BERNE, R.M.; LEVY, MN, KOEPPEN BM, STANTON BA. *Fisiologia*, 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.