



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**OBTENÇÃO DE PÓS NANOMÉTRICOS DE HIDROXIAPATITA  
SINTETIZADOS COM MAGNÉSIO UTILIZANDO  
ULTRA-SOM**

**DEIBY SANTOS GOUVEIA**

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

Orientador:  
Dr. José Carlos Bressiani

**São Paulo  
2008**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**OBTENÇÃO DE PÓS NANOMÉTRICOS DE HIDROXIAPATITA SINTETIZADOS  
COM MAGNÉSIO UTILIZANDO ULTRA-SOM**

**DEIBY SANTOS GOUVEIA**



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

Orientador:

Dr. José Carlos Bressiani

**SÃO PAULO**

2008

*Aos meus pais, Zélia e Douglas e ao Rodrigo  
pelo apoio carinhoso, paciência e compreensão.*

*Às Famílias Savério Regina e Rodrigues Brandão  
pelo apoio e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro, através da bolsa de doutoramento.

Ao prof<sup>o</sup> Dr. José Carlos Bressiani pela orientação.

A prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Helena de Almeida Bressiani por sua colaboração durante a execução deste trabalho.

Ao Dr. Luis A. Genova pelas proveitosas discussões e sugestões dadas na tese.

Ao prof<sup>o</sup> Dr. Nelson B. de Lima e Rene R. de Oliveira, pela realização das análises de difração de raios X e, a Dr<sup>a</sup> Liana pelos resultados de Rietveld analisados e discutidos.

Ao Centro de Química e Meio Ambiente – CQMA, em especial à Msc. Marycel E. B. Cotrim pelas análises de ICP.

Ao Laboratório de Microscopia do IFUS, em especial à Simone pelas análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e a Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Rumbao pelas discussões dos resultados obtidos.

Aos Técnicos do Laboratório de Caracterização Microestrutural, Celso V. de Moraes e Nildemar A. Messias, pela extrema dedicação no trabalho de microscopia eletrônica.

A prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Olga Z. Higa e a aluna Andrea Rodas do Centro de Biotecnologia CB - IPEN, pelas análises in vitro e discussões.

Ao Dr. Marcelo Yoshimoto, Tamiye e Kalan, pela grande ajuda nos experimentos in vivo, e acima de tudo pela amizade.

Ao laboratório de Análise de Imagens do Instituto de Patologia da Universidade Nacional de La Plata – Bs As /Argentina, pela colaboração na discussão das imagens histológicas.

Ao técnico do Laboratório de Cerâmica, Pedro P. de Freitas, pelo suporte e amizade em todos os momentos.

Aos amigos do IPEN, principalmente a Amanda, Ana Lucia Godoy, Antônio Carlos (A.C), Chiba, Carla, Christiane, Egberto, Erica, João Roberto, Graziela, Heveline, Kalan, Priscila, Sandra Tadokoro, Thais, Tamiye, Renata, Reinaldo e Ulisses pelo apoio carinhoso e estímulos constantemente dedicados.

Aos meus amigos Chicão e Lúcia, Sandra Portuga, Claudia Yurika, Michele Lopes, Emerson (Hiperquímica), Paulo Dantas e Valmir (Weir do Brasil) pela amizade incondicional e ajuda que de alguma forma contribuíram para minha formação.

## OBTENÇÃO DE PÓS NANOMÉTRICOS DE HIDROXIAPATITA SINTETIZADOS COM MAGNÉSIO UTILIZANDO ULTRA-SOM

Deiby Santos Gouveia

### RESUMO

A Hidroxiapatita sintetizada (HA -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) é um dos materiais mais atrativos para uso como biomaterial, devido a sua similaridade composicional e biológica com a fase inorgânica do osso humano. A estrutura da HA permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com facilidade, as quais podem alterar a cristalinidade, a morfologia, os parâmetros de rede, a estabilidade, a bioatividade e a biocompatibilidade do material obtido. Estudos recentes têm mostrado a incorporação do magnésio (máxima substituição de até 0,4% em massa de  $\text{Mg}^{2+}$ ) na HA como um fator importante na mudança de qualidade da matriz óssea. O processo de obtenção da HA pode ser feito utilizando o método de neutralização, que consiste em neutralizar uma suspensão de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , formando água como subproduto. A necessidade de obter HA nanométrica com características específicas tem levado pesquisadores a avaliar o uso da técnica do ultra-som durante a síntese dos pós. Esta técnica, associada ao método de neutralização, exerce influência na cristalinidade, na morfologia e na quantidade de fase do material obtido. O objetivo deste trabalho foi sintetizar pós nanométricos de HA com diferentes concentrações de  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{Ca}_{(10-x)}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ,  $x = 0,0; 0,1; 0,15; 0,17$  e  $0,2$  mols de magnésio) pelo método de neutralização com e sem a aplicação do ultra-som durante a síntese. A velocidade de adição do ácido fosfórico mostrou ser um fator importante na formação da HA devido a mudança no pH da suspensão. A máxima incorporação do  $\text{Mg}^{2+}$  nos pós de HA, quando sintetizados adicionando  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a uma razão de 8,0 mL/min e sem aplicação do ultra-som, foi de 0,36% em massa de  $\text{Mg}^{2+}$ . Com a aplicação do ultra-som durante a síntese foi possível incorporar até 0,49% em massa de  $\text{Mg}^{2+}$  na HA. Estes resultados sugerem que a técnica de ultra-som é efetiva para adicionar maiores quantidades de  $\text{Mg}^{2+}$  na estrutura da HA. O teste *in vitro* comprovou que os biomateriais sintetizados não apresentaram características de citotoxicidade. Os experimentos “in vivo” associados com a análise histológica mostraram uma reparação tecidual semelhante ao do grupo controle.

# OBTENTION OF HYDROXYAPATITE NANOMETRIC POWDERS SYNTHESIZED WITH MAGNESIUM USING ULTRASOUND

Deiby Santos Gouveia

## ABSTRACT

The synthesized Hydroxyapatite (HA -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) is the main attractive material used as biomaterial due to its compositional and biological similarity with inorganic phase of the human bone. The HA structure allows cationic and anionic isomorphs substitutions which, can change the crystallinity, the morphology, the lattice parameters, stability, bioactivity and biocompatibility of the obtained material. Recent studies have shown that the incorporation of magnesium (maximum of about 0.4wt% of  $\text{Mg}^{2+}$ ) in the HA is an important factor in the change of quality of bone matrix. The process of HA obtention can be made using the neutralization method, which consists to neutralize a  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  suspension with  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , and water is produced as by-product. The necessity of get nanometric HA with specific characteristics has motivated researchers to evaluate the use of ultrasound technique during the synthesis of the powders. This technique, associated with the neutralization method, influences the crystallinity, morphology and the amount of phase obtained in the material. The aim of this work was to synthesize nanometric powders, with different concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{Ca}_{(10-x-1)}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ,  $x = 0.0; 0.1; 0.15; 0.17$  and  $0.2$  mols of magnesium), by neutralization method. The ultrasound technique was also used during the synthesis. The rate of addition of the phosphoric acid showed to be an important factor in the HA formation because the variation of pH suspension. The maximum incorporation of  $\text{Mg}^{2+}$  in the HA powders, when synthesized adding  $\text{H}_3\text{PO}_4$  at  $8.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , was 0.36wt% of  $\text{Mg}^{2+}$ . With the application of ultrasound during the synthesis, it was possible to incorporate 0.494wt% of  $\text{Mg}^{2+}$ . These results suggest that the ultrasound technique is effective to add large amount of  $\text{Mg}^{2+}$  in the HA structure. The “in vitro” tests proved that the synthesized biomaterials are non cytotoxic. The “in vivo” experiments associated with the histological analysis showed that the tissue repair is similar to the control group.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Contexto Histórico.....	4
3.2 Biomateriais.....	5
3.3 Aplicação dos Biomateriais.....	8
3.4 Tecido Ósseo.....	9
3.5 Fosfato de Cálcio.....	11
3.5.1 Fosfato Tricálcico (TCP): características estruturais e cristalográficas.	15
3.5.2 Hidroxiapatita (HA): características estruturais e cristalográficas.....	17
3.5.3 Efeito de alguns substituintes catiônicos e aniônicos na HA.....	20
3.5.3.1 Efeito da substituição do $\text{CO}_3^{2-}$ na HA.....	20
3.5.3.2 Efeito da substituição do $\text{Mg}^{2+}$ na HA.....	21
3.6 Métodos de Obtenção.....	23
3.6.1 Reação no Estado Sólido.....	23
3.6.2 Método Úmido.....	23
3.6.2.1 Método Hidrotermal (conversão hidrotérmica de corais).....	24
3.6.2.2 Precursores Poliméricos.....	24
3.6.2.3 Precipitação – Método de Neutralização.....	25
3.7 Precursores utilizados durante a síntese - Influência do material de partida.....	26
3.8 Ultra-som/sonoquímica.....	29
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	36
4.1 Caracterização do pó antes e após calcinação.....	40
4.2 Estudo da densificação dos corpos cerâmicos de HA .....	42
4.3 Caracterização biológica.....	43
4.3.1 Teste “in vitro” – Ensaio de citotoxicidade.....	43
4.3.2 Teste “in vivo”.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
5.1 Caracterização do Hidróxido de Cálcio e do Hidróxido de Magnésio.....	51
5.2 Avaliação do pH e da temperatura durante a obtenção dos pós de HA.....	53
5.2.1 Efeito da velocidade de adição do ácido fosfórico durante a síntese.....	57

5.2.2	Efeito do pH durante a síntese dos pós de HA-Mg.....	60
5.3	Caracterização dos pós de HA.....	61
5.3.1	Difração de raios X.....	61
5.3.1.1	Avaliação da velocidade de adição do ácido fosfórico na formação da fase HA quando sintetizada com ou sem a aplicação do ultra-som.....	61
5.3.1.2	Estudo do limite máximo de incorporação do Mg <sup>2+</sup> nos pós de HA quando sintetizados com e sem a presença do ultra-som.....	66
5.3.2	Análise Quantitativa das fases presentes nos pós da HA calcinados a 800°C/3h .....	70
5.3.3	Análise Termogravimétrica e Análise Térmica Diferencial dos pós precipitados.....	76
5.3.4	Identificação dos grupos funcionais da HA.....	81
5.3.5	Análise química, Área de superfície específica, Distribuição do tamanho de partícula e Morfologia do pó para as diferentes composições.....	85
5.3.6	Estudo de densificação dos corpos cerâmicos de HA.....	92
5.4	Caracterização biológica.....	104
5.4.1	Estudo in vitro - Teste de citotoxicidade.....	105
5.4.2	Estudo in vivo.....	106
6.	CONCLUSÕES.....	114
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	116
8.	ANEXOS.....	117
9.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	120

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aplicação dos biomateriais em diversas partes do corpo humano [10].	8
Figura 2. Representação esquemática da arquitetura do osso [4].	10
Figura 3. Diagrama de estabilidade do sistema Ca-P-H <sub>2</sub> O da HA a 25°C [17].	12
Figura 4. Diagrama de fases do sistema CaO-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> em altas temperatura (a) na ausência de água (b) p <sub>H<sub>2</sub>O</sub> = 500mmHg. Sendo C <sub>2</sub> P = DCPD, C <sub>3</sub> P = TCP, C <sub>4</sub> P = TTCP, Ap = HA [8,20].	14
Figura 5. Equilíbrio das distâncias interatômicas (Å) do TCP (a) sem e (b) com adição de MgO [18].	16
Figura 6. Representação esquemática da célula unitária da Hidroxiapatita [7].	17
Figura 7. Arranjo tetraédrico do íon fosfato [47,68].	27
Figura 8. Composição fracionária das espécies do ácido fosfórico em função do pH [47].	29
Figura 9. Região de frequência do som [69].	30
Figura 10. Crescimento da bolha e implosão num líquido irradiado com ultra-som [69,76].	32
Figura 11. (a) Impacto da frequência do ultra-som sobre a intensidade de cavitação e quantidade de bolhas formadas; (b) representação da quantidade de bolhas formadas em função da frequência utilizada [70].	34
Figura 12. Fluxograma do processo de obtenção dos pós da HA.	39
Figura 13. Representação da diluição seriada para cada extrato.	45
Figura 14. Esquema da microplaca utilizada para cada amostra: 1º coluna – Branco; 2ª e 3ª coluna – 100% células vivas; 4ª a 8ª coluna – diluições seriadas.	45
Figura 15. Grupo de animais selecionados para o teste in vivo.	47
Figura 16. Procedimento cirúrgico: (a) tricotomia da área a ser realizada a cirurgia, (b) incisão dos tecidos, (c) afastamento dos tecidos.	48
Figura 17. Difração de raios X para o pó precursor Ca(OH) <sub>2</sub> .	51
Figura 18. Difração de raios X para o pó precursor Mg(OH) <sub>2</sub> .	52
Figura 19. Curva de distribuição do tamanho de partícula e/ou aglomerado para os pós precursores (a) Ca(OH) <sub>2</sub> e (b) Mg(OH) <sub>2</sub> .	53
Figura 20. Variação do pH em função do volume de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> adicionado durante a síntese da HA realizada (a) sem e (b) com a presença do ultra-som.	56
Figura 21. Variação do pH em função do tempo para as amostras HA2 = 2,0 mL/min HA8 = 8,0 mL/min.	57

Figura 22. Variação do pH em função do tempo para as amostras sintetizadas na presença do ultra-som. Sendo US8= 8,0 mL/min e US15 = 15,0 mL/min. ....	58
Figura 23. Variação do pH em função do tempo para as amostras Har e USr sintetizadas na ausência e presença do ultra-som. ....	59
Figura 24. Variação do pH em função do tempo para as amostras sintetizadas com diferentes concentrações de $Mg^{2+}$ quando a síntese da HA foi realizada sem ultra-som.....	60
Figura 25. Variação do pH para as amostras sintetizadas com diferentes concentrações de $Mg^{2+}$ quando a síntese da HA foi realizada com aplicação do ultra-som. ....	61
Figura 26. Difração de raios X para os pós precipitados quando a síntese foi realizada (a) sem ultra-som e (b) dentro do banho de ultra-som. (#) fase não identificada e (l) HA. ....	62
Figura 27. Difração de raios X para os pós calcinados a 800°C/3h. (*) $\beta$ -TCP e (l) HA.....	63
Figura 28. Difração de raios X para os pós calcinados a 800°C/3h quando a síntese foi realizada com ultra-som. (*) $\beta$ -TCP e (l) HA. ....	63
Figura 29. Difração de raios X para as amostras HA2 e HAR calcinadas a 1200°C/3h. (*) $\beta$ -TCP, (■) $\alpha$ -TCP e (l) HA. ....	65
Figura 30. Difração de raios X para os pós precipitados de HAMg quando sintetizados (a) sem ultra-som .....	66
Figura 31. (a) Difração de raios X dos pós de HAMg calcinados a 800°C/3h quando a síntese foi realizada sem ultra-som. (b) Detalhamento do pico principal referentes à fase Whitlockite observada nas amostras HAMg041 e HAMg049. (●) Whitlockite e (l) HA. ....	68
Figura 32. Difração de raios X para os pós com diferentes concentrações de $Mg^{2+}$ , calcinados a 800°C/3h, quando a síntese foi realizada com ultra-som. (*) $\beta$ -TCP e (l) HA. ....	70
Figura 33. Porcentagens de fase formadas em função da velocidade de adição do ácido fosfórico quando a síntese foi realizada com e sem a presença do ultra-som. ....	73
Figura 34. Porcentagens de fase formadas em função das diferentes concentrações de $Mg^{2+}$ quando a síntese foi realizada na (a) ausência e (b) presença do ultra-som. ....	74
Figura 35. Curva ATG/DTG para os pós precipitados HA8 e HAR. ....	77
Figura 36. Curva TG/DTG para os pós precipitados US8 e US15 sintetizados na presença do ultra-som.....	78
Figura 37. Curva TG/DTG para os pós precipitados HA8, HAMg036 e HAMg049.....	78

Figura 38. Curva TG/DTG para os pós precipitados US15, USMg036 e USMg049 sintetizados na presença do ultra-som. ....	79
Figura 39. Curva de DTA para os pós precipitados HAr, HA8, HAMg036 e HAMg049. .	80
Figura 40. Curva de DTA para os pós precipitados US8, US15, USMg036 e USMg049 sintetizados na presença do ultra-som. ....	80
Figura 41. Espectro de Infravermelho para os pós precipitados HAr, HA8 e US15. ....	82
Figura 42. Espectro de Infravermelho para as amostras HAr, HA8 e US15 calcinadas a 800°C/3h. ....	83
Figura 43. Espectro de Infravermelho para as amostras com Mg <sup>2+</sup> calcinadas a 800°C/3h sintetizadas na ausência do ultra-som. ....	84
Figura 44. Espectro de Infravermelho para as amostras com Mg <sup>2+</sup> calcinadas a 800°C/3h sintetizadas na presença do ultra-som. ....	84
Figura 45. Curvas de distribuição do tamanho de aglomerados e/ou partículas das amostras (a) HA8, (b) HAMg036, (c) US15 e (d) USMg036 calcinadas a 800°C/3h. ....	88
Figura 46. Microscopia eletrônica de transmissão das amostras (a) HA8 e (b) HAr calcinadas a 800°C/3h. ....	89
Figura 47. Microscopia eletrônica de varredura das amostras (a) HA8 e (b) HAr calcinadas a 800°C/3h. ....	89
Figura 48. Microscopia eletrônica de transmissão para a amostra US15 calcinada a 800°C/3h. ....	90
Figura 49. Microscopia eletrônica de transmissão para as diferentes composições calcinadas a 800°C/3h. Sendo (a) HAMg024 (b) HAMg036 (c) HAMg041 e (d) HAMg049. ....	90
Figura 50. Microscopia eletrônica de transmissão para as diferentes composições calcinadas a 800°C/3h. Sendo (a) USMg036 (c) USMg049. ....	91
Figura 51. Difração de raios X para as pastilhas a) HAr e HA8 sinterizadas a 1100°C/1h. (∅) HA, (Φ) CaO, (■) α-TCP e (*) β-TCP ....	94
Figura 52. Difração de raios X para as pastilhas sinterizadas com magnésio a 1100°C/1h. quando os pós foram sintetizados na (a) ausência e (b) presença do ultra-som. Sendo (∅) HA, (●) Whitlockite. ....	96
Figura 53. Micrografias obtidas por Microscopia eletrônica de varredura das superfícies de fraturas das amostras sinterizadas a 1100°C. Sendo (a) HA8, (b) HAr, (c) US15, (d)USr. ....	97

- Figura 54. Micrografias obtidas por Microscopia eletrônica de varredura das superfícies de fraturas das amostras com magnésio sinterizadas a 1100°C/1h. (a) HAMg024, (b) HAMg036, (c) HAMg041 e (d) HAMg049. .... 98
- Figura 55. Micrografias obtidas por Microscopia eletrônica de varredura das superfícies de fraturas das amostras com magnésio sinterizadas a 1100°C/1h. (a) USMg024, (b) USMg036, (c) USMg041 e (d) USMg049. .... 99
- Figura 56 Curva de retração linear para as diferentes composições quando sintetizadas (a) ausência e (b) presença da frequência ultra-sônica. .... 101
- Figura 57. Curva de supressão de colônias no teste de citotoxicidade para os pós de HA sintetizados em diferentes condições. .... 105
- Figura 58. Lâminas histológicas representativas do grupo controle: (a) Fotomicrografia da lâmina de HE; (b) Fotomicrografia de lâmina de HE - Imagem aproximada da região ON; (c) Fotomicrografia de lâmina de TM; (d) Fotomicrografia de lâmina de HE - Fluorescência no local da injúria. A seta indica o local onde foi feita a injúria, (ON) osso neo-formado, (C) osso cortical e (M) medula. .... 107
- Figura 59. Lâminas histológicas representativas da amostra HA8: (a) Fotomicrografia de lâmina de HE, (b) Fotomicrografia de lâmina de HE - Imagem aproximada da região ON, (c) Fotomicrografia de lâmina de TM; (d) Fotomicrografia de lâmina de HE - Fluorescência no local da injúria. A seta indica o local onde foi feita a injúria, (ON) osso neo-formado, (C) osso cortical e (M) medula. .... 108
- Figura 60. Lâminas histológicas representativas da amostra HAMg036: (a) Fotomicrografia de lâmina de HE, (b) Fotomicrografia de lâmina de HE - Imagem aproximada da região ON, (c) Fotomicrografia de lâmina de TM; (d) Fotomicrografia de lâmina de HE - Fluorescência no local da injúria. A seta indica o local onde foi feita a injúria, (ON) osso neo-formado, (C) osso cortical e (M) medula. .... 109
- Figura 61. Lâminas histológicas representativas da amostra USMg036: (a) Fotomicrografia de lâmina de HE, (b) Fotomicrografia de lâmina de HE - Imagem aproximada da região ON, (c) Fotomicrografia de lâmina de TM; (d) Fotomicrografia de lâmina de HE - Fluorescência no local da injúria. A seta indica o local onde foi feita a injúria, (ON) osso neo-formado, (C) osso cortical e (M) medula. .... 110
- Figura 62. Lâminas histológicas representativas da amostra HAc: (a) Fotomicrografia de lâmina de HE, (b) Fotomicrografia de lâmina de HE - Imagem aproximada da região ON, (c) Fotomicrografia de lâmina de TM; (d) Fotomicrografia de lâmina

de HE - Fluorescência no local da injúria. A seta indica o local onde foi feita a injúria, (ON) osso neo-formado, (C) osso cortical e (M) medula. ....	111
Figura 63. Fotomicrografia de Lâmina de HE (osso): presença de (I) osteócitos, (II) osteoblastos e (III) osteoclastos no tecido ósseo neo-formado. ....	112

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Classificação dos fosfatos de cálcio em função da razão molar Ca/P e do produto de solubilidade [4,8,15,18,19].....	12
Tabela 2. Dados Cristalográficos dos fosfatos de cálcio: $\alpha$ -TCP, $\beta$ -TCP e HA [7,19].....	15
Tabela 3. Produto de solubilidade a 25°C [47].....	27
Tabela 4. Precursores utilizados para a síntese da Hidroxiapatita.....	36
Tabela 5. Composição química e parâmetros avaliados durante a síntese da HA.....	38
Tabela 6. Dosagem e tempo de aplicação dos marcadores celulares.....	50
Tabela 7. Análise química, área de superfície específica e distribuição do tamanho de partículas e/ou aglomerados para os precursores $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e $\text{Mg}(\text{OH})_2$ .....	53
Tabela 8 Valores de pH e temperatura obtidos durante e após a síntese da HA.....	54
Tabela 9. Número de mols de Ca, P e Mg calculado e número de mols de P consumido em função do volume adicionado para as diferentes composições estudadas. ....	56
Tabela 10 Comparação do ângulo de difração ( $2\theta$ ) no plano (0210) entre as amostras sintetizadas e as fichas padrões JCPDS.....	69
Tabela 11. Porcentagem de fase formada para as diferentes composições sintetizadas sem ultra-som e calcinadas a 800°C/3h. ....	71
Tabela 12. Porcentagem de fase formada para as diferentes composições sintetizadas com ultra-som e calcinadas a 800°C/3h. ....	72
Tabela 13. Valores estruturais teóricos das fases hidroxiapatita, $\beta$ -TCP e Whitlockite,.....	74
Tabela 14. Análise química e Área de superfície específica (BET) para as diferentes composições calcinadas a 800°C/3h.....	85
Tabela 15. Diâmetro médio de partícula e/ou aglomerado para as amostras calcinadas a 800°C/3h.....	87
Tabela 16. Valores de densidade e perda de massa das diferentes composições. ....	92
Tabela 17. Temperatura de onset de início de densificação e da máxima taxa de retração linear ( $T_m$ ) para as diferentes composições de HA. ....	100
Tabela 18. Fases identificadas no DRX para as amostras de HA após tratamento térmico a 900 e 1000°C durante 15 min. ....	104

## 1. INTRODUÇÃO

---

O aumento da expectativa de vida da humanidade, como consequência dos avanços da medicina gerada pela assim denominada “vida moderna”, tem resultado no aumento da população de idosos e, conseqüentemente, das doenças relacionadas à velhice. Contudo, o problema de estrutura óssea não atinge apenas as pessoas idosas. Os jovens, em sua fase mais produtiva, são também afetados em decorrência de acidentes automobilísticos, de trabalho e de esportes. O tratamento de várias patologias, na maioria dos casos, requer o uso de implantes ou enxertos de um material para compensar a perda óssea devido a traumas e fraturas e, desta forma, promover a cura. A magnitude deste problema de saúde junto à população tem levado pesquisadores a desenvolver materiais adequados que possam reparar ou substituir de forma apropriada os ossos danificados.

O interesse pelo desenvolvimento de novos materiais utilizados em enxertos como função de restaurar, remodelar ou mesmo reforçar estruturas ósseas cresceu nos últimos anos. O uso desses materiais é bastante comum em obturações, após a curetagem de lesões cavitárias de tumores ósseos benignos e malignos. O emprego de enxerto de osso autógeno “fresco” (do mesmo indivíduo) traz alguns problemas como limitação do material, lesão ou enfraquecimento de outras estruturas ósseas e riscos inerentes a esse tipo de intervenção. Os bancos de ossos (osso homogêneo) também apresentam problemas como alterações das propriedades mecânicas, dificuldades técnicas de esterilização e estocagem, além dos custos elevados que essas técnicas acarretam. A ausência de um substituto biológico que atenda perfeitamente as necessidades de enxertia influenciou o desenvolvimento de biomateriais sintéticos para eventuais substituições ósseas.

A interação dos tecidos vivos com o biomaterial, associada com o tipo de resposta ao organismo à presença do material, é o ponto mais desafiador no desenvolvimento de biomateriais.

Por ser o principal componente mineral de ossos e dentes, a hidroxiapatita – HA, com fórmula química  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ , vem sendo largamente aplicada como um biomaterial, na forma de pó, corpos densos ou porosos. Sua estrutura permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com facilidade, as quais podem alterar a cristalinidade, a morfologia, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a estabilidade, a bioatividade e biocompatibilidade do material obtido. A substituição do íon  $Ca^{2+}$  pelo  $Mg^{2+}$  é de grande interesse uma vez que o magnésio está intimamente associado ao processo de mineralização dos tecidos calcificados. Estudos têm mostrado a incorporação do íon  $Mg^{2+}$  na estrutura da HA (máxima substituição de até 0,4% em massa de  $Mg^{2+}$ ) como um fator importante na mudança da qualidade da matriz óssea.

As recentes e potenciais aplicações tecnológicas dos materiais descritos como “cerâmicas avançadas” têm estimulado o desenvolvimento de novas técnicas para a síntese de pós cerâmicos com o intuito de melhorar as características físicas e químicas dos materiais obtidos. O processo de obtenção da HA pode ser feito utilizando o método de neutralização, que consiste em neutralizar uma suspensão de  $Ca(OH)_2$  com  $H_3PO_4$  formando água como subproduto. Para a utilização deste método, faz-se necessário um rígido controle sobre as condições de processamento, uma vez que elas afetam significativamente tanto o tipo de fosfato de cálcio quanto as características morfológicas e físico-químicas dos pós obtidos. A principal vantagem deste método é que é possível controlar alguns parâmetros como, por exemplo, natureza e composição do material de partida, controle do pH, razão de adição do ácido e temperatura da solução durante a sua síntese.

A relação entre “biomateriais” e “nano” é intrínseca tendo em vista que o desenvolvimento dos produtos passa, na maioria das vezes, pelo processo da interação do material (em escala nano) com o meio biológico, que definirá se haverá formação óssea (caso de implantes dentais) ou uma indesejável adesão plaquetária (caso das próteses endovasculares). A necessidade de obter hidroxiapatita nanométrica com características específicas tem sugerido a avaliação do uso da técnica do ultra-som durante a síntese dos pós da HA via neutralização. A aplicação de ondas ultra-sônicas durante a síntese favorece a formação de pós finos, uma vez que, envolve dissolução e precipitação dos sólidos por meio da redução do tamanho de partícula e ativação da superfície por agitação intensa. Esta técnica, associada ao método de neutralização, tende a exercer forte influência na cristalinidade, na morfologia e na quantidade de fase do material obtido.

## 2. OBJETIVO

---

Devido à necessidade de obter pós nanométricos que mimetizem a hidroxiapatita biológica, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar pós nanométricos de HA com diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$  utilizando o método de neutralização com e sem aplicação do ultra-som durante a síntese.

O efeito do pH em função da velocidade de adição do ácido fosfórico foi verificado quando a síntese foi realizada na presença ou ausência do ultra-som e com diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$ .

A avaliação biológica dos pós sintetizados foi realizada por meio de testes “*in vitro*” e “*in vivo*”.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 3.1. Contexto Histórico

Biomateriais são utilizados desde o tempo em que o homem dava os primeiros passos na medicina e na odontologia, mas somente depois da Segunda Guerra Mundial houve um avanço significativo neste ramo da engenharia dos materiais.

Uma das principais aplicações dos biomateriais como substituto ósseo tem registro na Fenícia antiga: os dentes provenientes de perda eram unidos com um arame de ouro e ligas eram utilizadas para amarrar os dentes “perdidos” aos dentes vizinhos [1].

O uso do gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ) foi relatado em 1894 como um possível substituto para ossos. Este biomaterial apresentou uma resistência mecânica muito baixa e foi completamente absorvido pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e degradação [2]. A partir desta tentativa, outros materiais foram utilizados, mas poucos obtiveram resultados satisfatórios, já que a maioria provocava, em maior ou menor grau, uma resposta imunológica do organismo receptor [3].

Em 1932, utilizou-se a alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) na forma sinterizada como material biocerâmico para a substituição de partes ósseas [1]. Este material devido a sua excelente biocompatibilidade, elevada resistência à abrasão e alta resistência mecânica, vem sendo utilizado com frequência até hoje como ponto de apoio de carga em próteses de quadril e implantes dentais (implantes intra-ósseos para fixação de dentes artificiais) [2,3]. Entre as décadas de 50 e 60 surgiram os primeiros enxertos vasculares, válvulas cardíacas e juntas de quadris artificiais [1].

Um aspecto importante a considerar é que até o início dos anos 70, os materiais utilizados para implantes eram materiais industriais os quais deveriam preencher certos pré-requisitos para aceitação biológica. Hoje em dia, os biomateriais são projetados,

produzidos e processados com o intuito de encontrar uma aplicação no campo das Ciências Clínicas [4].

Com os avanços tecnológicos outros biomateriais vêm sendo desenvolvidos e utilizados com bastante frequência. Dentre eles destacam-se a zircônia parcialmente estabilizada com ítria (Y- ZrO<sub>2</sub>) e com magnésia (Mg-ZrO<sub>2</sub>), dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), fosfatos de cálcio (hidroxiapatita e fosfato-tricálcico), biovidros e vitrocerâmicas [1].

### 3.2. Biomateriais

Devido à necessidade de se utilizar um material dentro do corpo humano na forma de implante e/ou enxerto e, ao mesmo tempo, classificá-lo na área médica, algumas definições para Biomateriais têm sido utilizadas.

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais da Sociedade Européia de Biomateriais para aplicações clínicas, ocorrida na cidade de Chester, Inglaterra, 1982, os materiais utilizados na substituição e reparação óssea se enquadram em uma classe denominada *Biomateriais* que, por definição, é *todo material empregado para substituir no todo ou em parte sistemas biológicos*. Isto significa que, no sentido mais amplo, são enquadrados nesta categoria todos os materiais empregados na Medicina, Odontologia, Medicina Veterinária e Farmacologia, além daqueles que entram na forma de implantes em contato direto com o tecido do corpo [Willians, D. F. (1987) apud Santos, L.A. [3]]. Assim, podem existir biomateriais metálicos, cerâmicos, poliméricos (sintéticos ou naturais) e compósitos. Estas classes de materiais apresentam combinações de propriedades determinadas pela composição e método de obtenção [1].

Biomaterial pode ser entendido como um material não vivo utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos [5,6]. Outra definição que pode ser dada é como uma substância, não tóxica, adequada para inclusão em sistemas os quais preenchem ou substituem a função dos órgãos ou tecidos corpóreos [1].

De um modo geral, o termo Biomaterial compreende qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada ou incorporada por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva

que deixou de ter função, podendo ou não servir como suporte ou estímulo para o crescimento do tecido hospedeiro [7].

Dada às especificidades a que apresenta, a tendência é que estes Biomateriais sejam considerados hoje uma classe especial de materiais. Desta forma, os biomateriais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos.

Com o aumento do número de materiais utilizados como biomateriais e os diversos aspectos envolvidos na interação com os tecidos vivos, têm-se procurado classificá-los em diversos grupos. De uma forma geral, os biomateriais podem ser classificados em função do comportamento fisiológico e em função da sua natureza e origem.

A classificação segundo o comportamento fisiológico é baseado na resposta do tecido hospedeiro [3,4,8]:

- Biotoleráveis - materiais tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Esta camada é induzida por meio da liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerância dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais. Os metais mais utilizados são o aço inoxidável, ligas de Vitalium (Cr-Co) e ligas de titânio.

- Bioinertes - materiais também tolerados pelo organismo, mas a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou, mais realisticamente, o faz em quantidade mínima. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia e carbono.

- Bioativos - induz uma reação biológica resultando na formação de osso entre o tecido e o implante por meio de uma ligação química (osteointegração). Em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio do recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os biovidros, as vitrocerâmicas e os fosfatos de cálcio (hidroxiapatita e fosfato tricálcico).

O conceito de uma cerâmica bioativa, capaz de ligar-se ao tecido ósseo, foi originalmente sugerido por Larry Hench no início dos anos 70. A bioatividade dos materiais foi inicialmente descrita para as chamadas biocerâmicas (hidroxiapatita, vidros bioativos, etc.) [5]. Este termo está associado à capacidade dos materiais se ligarem, ou aderirem aos tecidos vivos. Deve-se salientar que, quando um material bioativo é implantado no corpo humano, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorre na interface tecido-implante. Estas reações resultam em uma forte interação interfacial associada à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada na superfície do implante [9].

O desenvolvimento de materiais considerados bioativos e biodegradáveis é enfatizado já que, além de substituir tecidos traumatizados, estes materiais também podem propiciar a recuperação do tecido danificado através da atuação em metabolismos intra e extracelulares responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento.

Quanto ao tipo de material utilizado, os biomateriais podem ser classificados de acordo com a sua natureza e origem [4,7]:

- artificial: polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais (ex.: biopolímeros) que são manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos que entram em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos.
- animal: tecidos naturais, queratina e colágeno.

As Biocerâmicas utilizadas de uma forma única ou com materiais adicionais naturais, orgânicos ou poliméricos estão entre as mais promissoras de todos os biomateriais.

Quando um material produzido pelo homem é implantado dentro do corpo, os tecidos reagem em direção ao implante numa variedade de formas dependendo do tipo do material. O mecanismo da interação do tecido depende da resposta que terá em relação à superfície implantada [1]. Algumas características são fundamentais aos biomateriais para serem utilizados em organismos vivos [7].

- não ser tóxico nem carcinogênico;
- ter propriedade mecânica adequada;
- ter peso, densidade e forma adequados e,

- ser relativamente barato, reprodutível e de fácil fabricação

### 3.3. Aplicação dos Biomateriais

O número de pacientes nos hospitais em função principalmente da ocorrência de osteoporose e de acidentes oriundos de trabalho, transportes e esportes têm incentivado o desenvolvimento de materiais que possam ser utilizados como próteses e implantes no corpo humano. Em diversas situações, os biomateriais podem ser úteis para reconstituição ou substituição de tecidos naturais do corpo. Entretanto, nem sempre o organismo aceita os materiais implantados o que preocupa os médicos e faz com que muitos pacientes voltem à mesa de cirurgia.

Devido às distintas propriedades e formas que podem apresentar, os biomateriais podem ser aplicados em inúmeras partes do corpo humano (Figura 1):

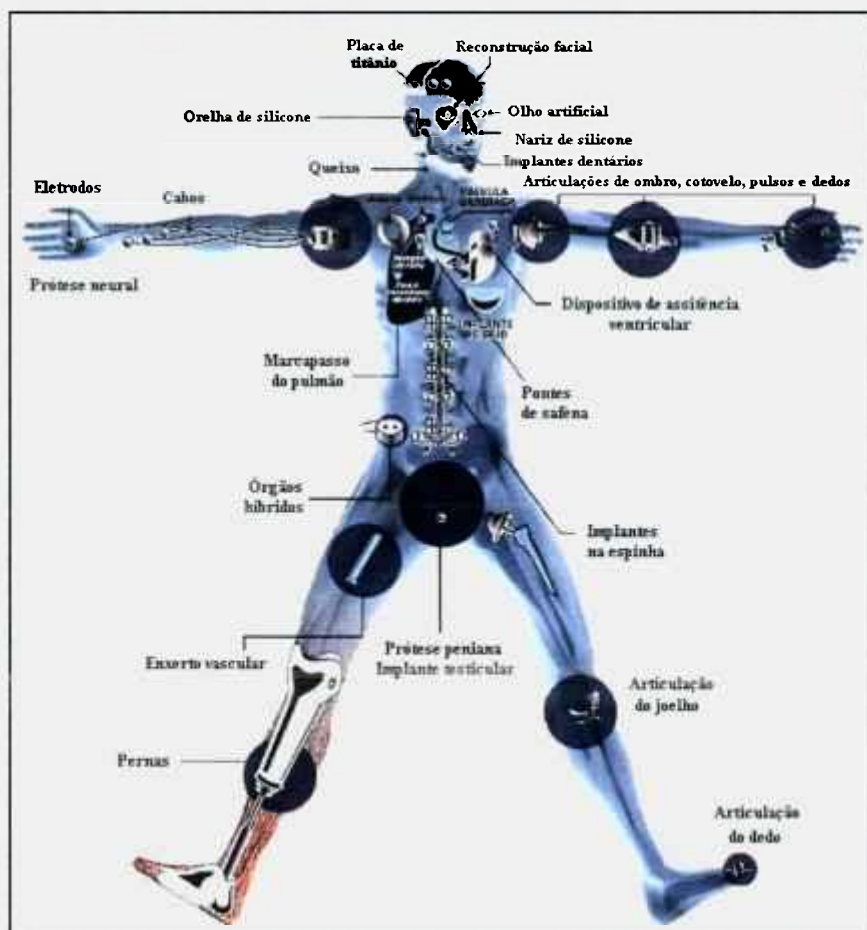


Figura 1. Aplicação dos biomateriais em diversas partes do corpo humano [10].

De um modo geral, a aplicação dos biomateriais ocorre nos mais diversos campos da medicina como por exemplo, prótese em ortopedia ou cirurgia cardiovascular (válvulas cardíacas), órgãos artificiais, materiais para reparação de tecido ósseo (implantes endósseos), dispositivos cirúrgicos, sistemas de liberação controlada de fármacos, recobrimento de materiais metálicos e nos compósitos bioativos que nada mais são que a combinação de uma biocerâmica, na forma de partículas ou fibras, com um material polimérico, potencializando suas características para torná-lo adequado a determinados tipos de implante [7,10].

### 3.4. Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo dos mais resistentes e rígidos do nosso corpo. Constituinte principal do esqueleto serve de suporte para partes moles, protege os órgãos vitais, aloja a medula óssea, além de proporcionar apoio aos músculos esqueléticos para a movimentação do organismo [11].

O osso é composto por uma fração inorgânica e outra orgânica. A fração inorgânica ou não protéica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea, sendo composta, principalmente, por íons de fosfato e cálcio caracterizados como um cristal de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Outros íons como bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato também estão presentes, porém, em pequenas quantidades [11].

A parte orgânica da matriz óssea é formada, na sua maioria, por fibras colágenas e é responsável pela capacidade plástica do osso. A parte orgânica dos ossos é composta por três tipos de células [11,12]:

- Osteoblastos - são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea.
- Osteócitos: são células em estado de “repouso” podendo diferenciar-se rumo à atividade blástica (crescimento em reparação) ou à atividade lítica (absorção).
- Osteoclastos - são células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação óssea.

A associação de hidroxiapatita (parte inorgânica) com as fibras colágenas (parte orgânica) é responsável pela dureza e resistência características do tecido ósseo.

Os compostos minerais formam a estrutura rígida responsáveis pela sustentação, enquanto que a parte orgânica preenche as lacunas na estrutura conferindo a característica de elasticidade do esqueleto. Quando o osso possui pouca substância mineral em relação à substância orgânica, deforma-se ou curva-se facilmente (raquitismo). Por outro lado, quando há diminuição da substância orgânica, o osso torna-se quebradiço e fratura-se facilmente [13].

O osso adapta sua estrutura e sua forma às cargas mecânicas que suporta. Assim, os ossos dos atletas e das pessoas que realizam trabalhos pesados são mais resistentes e pesam mais que o das pessoas que tem uma vida sedentária [13].

Quanto à sua arquitetura, a maioria dos ossos possui uma estrutura básica composta de duas camadas: osso cortical - camada mais externa e mais dura e osso trabecular - camada interna, mais esponjosa (Figura 2) [4,11]:

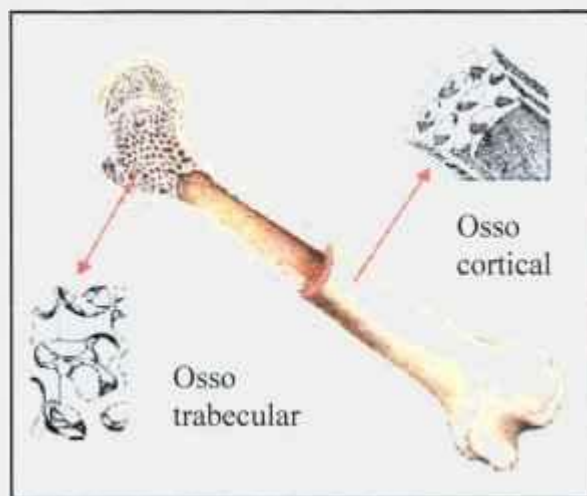


Figura 2. Representação esquemática da arquitetura do osso [4].

A resposta do osso ao trauma consiste de uma seqüência ordenada e bem diferenciada de eventos, que resulta na cicatrização do tecido lesado de forma bastante semelhante à sua estrutura inicial.

Nos últimos tempos, o uso de materiais cerâmicos como fosfatos de cálcio, tem sido empregado em pequenas lesões para preenchimento ósseo. Os fosfatos de cálcio (hidroxiapatita - HA, fosfato tricálcico - TCP ou a mistura de ambos) formam um grupo de cerâmicas reativas que apresentam excelente biocompatibilidade e se ligam diretamente ao osso, sem interposição de qualquer outro tipo de tecido. Isso é explicado pelo fato destes materiais serem compostos dos mesmos íons que formam a fase mineralizada do osso

natural, sendo, portanto, capazes de participar do equilíbrio cálcio/fosfato no organismo [14].

### 3.5. Fosfatos de Cálcio

Cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas, por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica no organismo, ausência de inflamações, e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro. Elas foram propostas em 1920 para aplicações biomédicas, uma vez que o fosfato tricálcico, quando injetado nos defeitos ósseos, demonstrou crescimento ósseo mais rápido do que nos defeitos não tratados [1].

Tais características positivas podem ser explicadas pela natureza química destes materiais que, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica [15].

Uma forma conveniente de classificar os vários fosfatos de cálcio é pela sua razão molar Ca/P que pode variar de 0,5 a 2,0 (Tabela 1).

O tipo de fase de fosfato de cálcio formado irá depender das condições do meio utilizado durante a síntese como, por exemplo, temperatura, pH, concentração de íons, razão molar Ca/P entre outros. Neste contexto, os diagramas de fases são úteis para ilustrar o mecanismo pelo qual a HA se forma por meio das reações de precipitação/dissolução e expressam também a variação da solubilidade molar do componente mais relevante em função do pH, a qual é expressa em termos do íon comum a todos os componentes, neste caso, o íon cálcio. Para os fosfatos de cálcio, é comum representar o diagrama de fase utilizando a concentração do íon cálcio (ou a atividade) em função do pH [16].

A solubilidade é uma das mais importantes propriedades dos compostos de fosfato de cálcio. A Tabela 1, já apresentada, relaciona o produto de solubilidade com os diferentes fosfatos de cálcio. À medida que a razão Ca/P aumenta, o produto de solubilidade diminui ou reduz a razão de degradação destes materiais *in vivo* [16].

A Figura 3 apresenta o diagrama de estabilidade do sistema Ca-P-H<sub>2</sub>O a 25°C [17] na forma do logaritmo da concentração total de cálcio da solução em função do pH da suspensão. Como pode ser observado, a fase Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> é obtida em meio básico.

Para valores de  $2 < \text{pH} < 6$  a HA deficiente em cálcio ( $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ;  $0 \leq x \leq 1$ ) é a fase predominante.

Tabela 1. Classificação dos fosfatos de cálcio em função da razão molar Ca/P e do produto de solubilidade [4,8,15,18,19].

Símbolo	Nome	Fórmula	Ca/P	Produto de Solubilidade
MCPM	Diidrogeno fosfato de cálcio monoidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	$1,0 \times 10^{-3}$
DCPD	Hidrogeno fosfato de cálcio diidratado (brushita)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	$1,87 \times 10^{-7}$
DCP	Hidrogeno fosfato de cálcio (monetita)	$\text{CaHPO}_4$	1,0	$1,26 \times 10^{-7}$
OCP	Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	$5,01 \times 10^{-15}$
TCP	Fosfato tricálcico ( $\beta$ , $\alpha$ )	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50	$2,83 \times 10^{-30}$
HA	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	$2,35 \times 10^{-59}$
TTCP	Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0	-

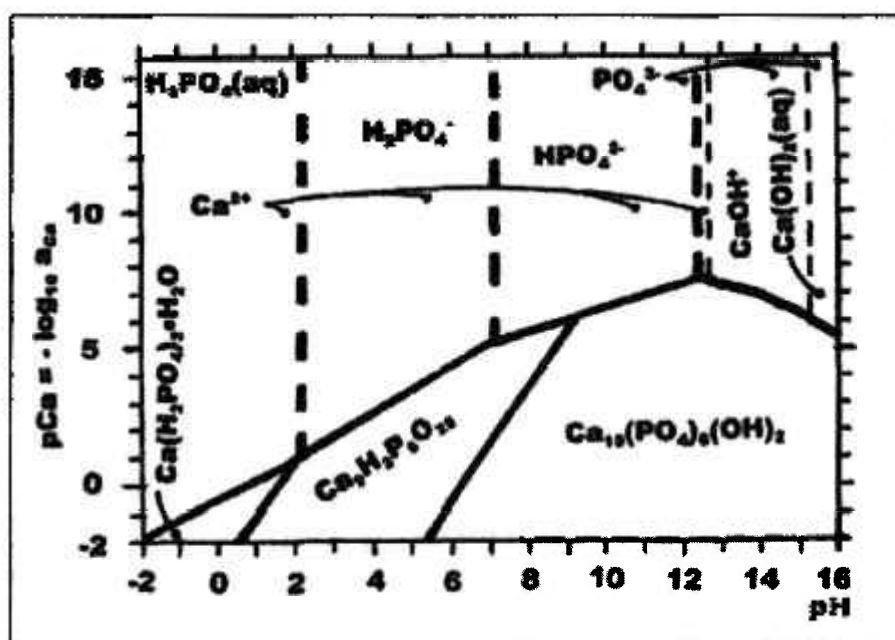


Figura 3. Diagrama de estabilidade do sistema Ca-P-H<sub>2</sub>O da HA a 25°C [17].

De um modo geral, as biocerâmicas de fosfato de cálcio degradam em diferentes níveis, segundo a ordem: DCPD>DCP>OCP>TCP>HA. A reabsorção do material que representa esta degradação é causada pela dissolução, que depende do produto de solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico, pela desintegração física em partículas menores e, ainda por fatores biológicos, como a fagocitose, a presença de leucócitos e de mediadores químicos que causam a redução do pH local [6,8].

A velocidade de reabsorção (degradação) pode aumentar com o aumento da área superficial (pó > sólido poroso > sólido denso), com o decréscimo da cristalinidade, e, no caso da hidroxiapatita, por substituições de  $\text{CO}_3^{2-}$  nos sítios do fosfato e por  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$  nos sítios do cálcio [6,15]. A velocidade de reabsorção da HA é extremamente baixa quando comparada com a do  $\beta$ -TCP. Estudos mostraram que após um período de 12 meses o  $\beta$ -TCP foi totalmente absorvido [8]. Um implante ósseo constituído de HA permanecerá mesmo depois de 3 ou 4 anos de implantação, enquanto o TCP, sendo reabsorvível, desaparecerá parcialmente, em períodos de 6 a 15 semanas, dependendo da estequiometria e porosidade [1,6].

A estabilidade dos fosfatos de cálcio à temperatura ambiente e em soluções aquosas é determinada pelo pH. À temperatura do corpo, apenas dois fosfatos de cálcio são estáveis em contato com o meio aquoso como nos fluidos corpóreos. A fase  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  é estável em  $\text{pH} < 4,2$  enquanto que a fase  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  é estável em  $\text{pH} > 4,2$  [5,18].

As fases estáveis de cerâmicas de fosfato de cálcio em função da temperatura dependem consideravelmente da ausência ou presença de água durante o processamento ou do meio onde se encontram [5,9].

Na Figura 4-a estão apresentadas as fases em equilíbrio à pressão atmosférica, na ausência da água: fosfato tetracálcio ( $\text{C}_4\text{P}$ ), alfa- fosfato tricálcico ( $\alpha\text{-C}_3\text{P}$ ), monetita ( $\text{C}_2\text{P}$ ) e misturas de óxido de cálcio ( $\text{CaO}$ ). Observa-se que a hidroxiapatita não é estável nestas condições. Se a pressão de vapor for elevada de 0 para 500mmHg, o diagrama de equilíbrio será o mostrado na Figura 4-b, onde se observa uma grande variedade de misturas contendo a fase apatita (Ap) [8,18,20].

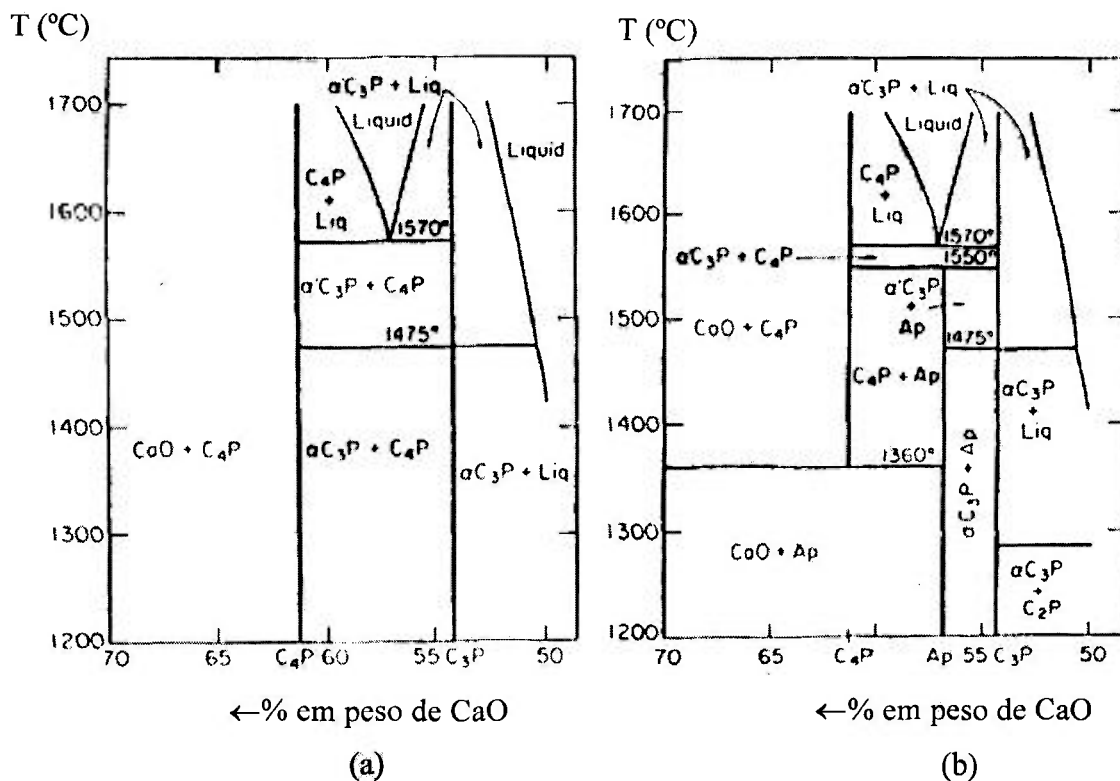


Figura 4. Diagrama de fases do sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> em altas temperatura (a) na ausência de água (b) p<sub>H<sub>2</sub>O</sub>= 500mmHg. Sendo C<sub>2</sub>P = DCPD, C<sub>3</sub>P = TCP, C<sub>4</sub>P= TTCP, Ap = HA [8,20].

Dentre todos os fosfatos de cálcio, o fosfato tricálcico e a hidroxiapatita são os que têm despertado maior interesse de estudo para aplicações biológicas [7,8,9,21]. Os dados cristalográficos destes fosfatos de cálcio estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Dados Cristalográficos dos fosfatos de cálcio:  $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP e HA [7,19].

	$\alpha$ -TCP	$\beta$ -TCP	HA
Fórmula	$\alpha$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	$\beta$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>
Razão molar (Ca/P)	1,50	1,50	1,67
Estrutura Cristalográfica	Monoclínico	Ortorrômbico	Hexagonal
Parâmetro de rede (Å)	a = 12,887	a = b = 10,439	a = b = 9,418
	b = 27,280		
	c = 15,219	c = 37,375	c = 6,884
Ângulo da célula	$\alpha = 90^\circ$	$\alpha = 90^\circ$	$\alpha = 90^\circ$
	$\beta = 126,2^\circ$	$\beta = 90^\circ$	$\beta = 90^\circ$
	$\gamma = 90^\circ$	$\gamma = 90^\circ$	$\gamma = 120^\circ$
Volume da célula (Å <sup>3</sup> )	4.317,5	3.527,2	528,80
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	2,863	3,120	3,08

### 3.5.1. Fosfato Tricálcico (TCP): características estruturais e cristalográficas

O fosfato tricálcico (TCP) apresenta fórmula química Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> com razão molar Ca/P = 1,5. Possui três fases polimorfas:  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\alpha'$ . A fase  $\beta$ -TCP é estável até 1125°C, acima desta temperatura e até 1470°C o  $\alpha$ -TCP torna-se a fase mais estável. Já a fase  $\alpha'$ -TCP torna-se estável a temperaturas acima de 1470°C [7,22,23,24].

Dentre as três fases polimorfas a fase  $\beta$ -TCP é a mais promissora para implantes biocerâmicos, pois é a que apresenta melhor estabilidade química e resistência mecânica a este tipo de aplicação [22].

No processo de sinterização da fase  $\beta$ -TCP são utilizadas temperaturas relativamente altas, o que provoca a transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$ . Esta transformação de fase está associada a uma expansão na rede cristalina o que dificulta a densificação do material e diminui, conseqüentemente, suas propriedades mecânicas [22,23]. Para retardar esta transformação de fase, tem-se estudado o uso de alguns aditivos durante a síntese do  $\beta$ -TCP [22,25,26,27,28]. A adição do MgO nesta estrutura, permite que a temperatura de transformação seja elevada para ~1500°C, possibilitando a sinterização sem transformação de fase [26,29].

O íon  $\text{Ca}^{2+}$  é substituído pelo íon  $\text{Mg}^{2+}$  na rede do  $\beta$ -TCP e pode formar os compostos de  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  ou  $\text{Ca}_{3-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_2$  (Whitlockite) os quais devem estabilizar a estrutura a altas temperaturas [26]. A estrutura da fase Whitlockite sintetizada é muito próxima à estrutura do  $\beta$ -TCP. Apresenta parâmetros de rede  $a = b = 10,330 \text{ \AA}$  e  $c = 37,103 \text{ \AA}$  [7].

Quando o átomo de cálcio é substituído por magnésio na estrutura do TCP, a ligação Mg-O torna-se mais forte, enquanto que as ligações Ca-O são enfraquecidas pelo aumento do comprimento de ligação comparado com a interação Mg-O, o que pode ser a razão para o magnésio estabilizar a estrutura do TCP [18] (Figura 5).

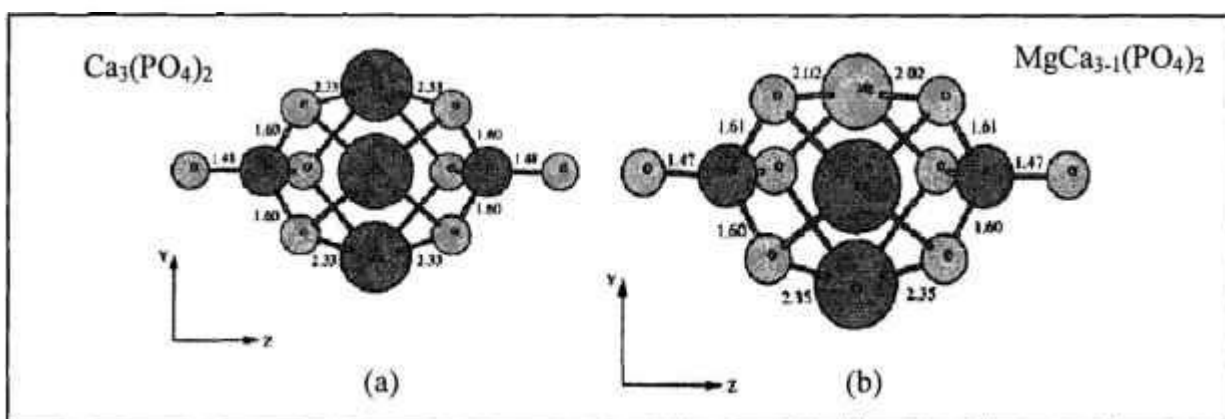


Figura 5. Equilíbrio das distâncias interatômicas (Å) do TCP (a) sem e (b) com adição de MgO [18].

Estudos prévios relatam que é possível substituir aproximadamente 15% dos íon  $\text{Ca}^{2+}$  pelo íon  $\text{Mg}^{2+}$  sem mudar essencialmente a estrutura do  $\beta$ -TCP [7]. Quando a substituição excede este valor, ocorre a diminuição do parâmetro de rede “a” de 10,436 para 10,308 Å e do parâmetro de rede “c” de 37,42 para 37,02 Å [30].

### 3.5.2. Hidroxiapatita (HA): Características estruturais e cristalográficas

As apatitas são definidas pela fórmula química  $M_{10}(Y_6)Z_2$  e formam soluções sólidas como resultado da substituição dos sítios  $M^{2+}$ ,  $Y^{3-}$  ou  $Z$ . As espécies  $M^{2+}$  são tipicamente cátions metálicos divalentes como  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  ou  $Cd^{2+}$ . As espécies  $Y^{3-}$  são os ânions trivalentes:  $PO_4^{3-}$ ,  $AsO_4^{3-}$ ,  $VO_4^{3-}$ ,  $CrO_4^{3-}$  ou  $MnO_4^{3-}$ . Os ânions monovalentes  $Z$  são geralmente  $F^-$ ,  $OH^-$ ,  $Br^-$  ou  $Cl^-$ . Os diferentes grupos das apatitas são referenciados com base nos seus ânions predominantes, ou seja, fluorapatita (F), hidroxiapatita (OH), cloroapatita (Cl) entre outros [7,9].

O nome hidroxiapatita é formado pela junção das palavras *hidroxi* e *apatita*. *Hidroxi* refere-se ao grupo hidroxila (OH) e *apatita* é um nome mineral. Apatita vem do grego e significa “decepciono”, em função de ser confundida com turmalina ou berilo [7].

A HA ( $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ), cuja razão molar Ca/P é igual a 1,67, é constituída a partir de uma rede tridimensional de óxido de cálcio e poliedros de fosfato. A sua célula unitária contém uma representação completa do cristal de apatita, consistindo em grupos de  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$  e  $OH^-$  empacotados juntos em um arranjo como visto na Figura 6 [7,31].

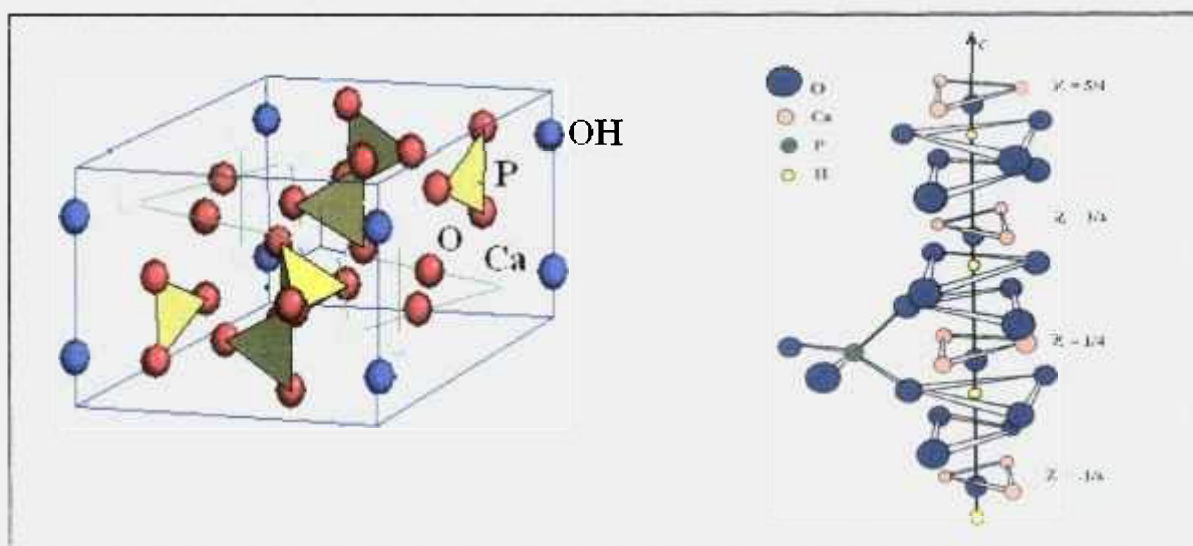


Figura 6. Representação esquemática da célula unitária da Hidroxiapatita [7].

A célula unitária hexagonal da hidroxiapatita contém 10 íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I ( $Ca_I$ ) e seis no sítio II ( $Ca_{II}$ ). Os íons cálcio no sítio I estão alinhados em colunas, enquanto os íons cálcio do sítio II estão em triângulos

equiláteros perpendiculares à direção  $c$  da estrutura. Os cátions do sítio I estão coordenados a 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de  $\text{PO}_4^{3-}$  e também a 3 outros átomos de oxigênio relativamente distantes. A existência de dois sítios de íons cálcio traz conseqüências importantes para as hidroxiapatitas que contém impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza. Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria (eixo  $c$ ). Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons oxigênio ( $\text{O}^{2-}$ ) e de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) estão ligados entre si por íons fosfato. Os átomos de oxigênio dos íons hidroxila estão situados a 0.9 Å abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio e a ligação O-H forma um ângulo de aproximadamente  $30^\circ$  com a direção  $C$ . Dos quatro átomos de oxigênio que constituem os grupos fosfatos, dois estão situados em planos perpendiculares à direção  $c$  e os outros dois são paralelos a esta direção [7,8,9].

Os dados cristalográficos da Hidroxiapatita estão descritos na Tabela 2.

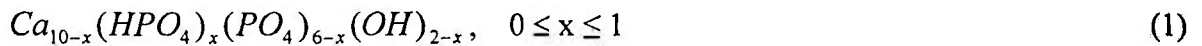
A estrutura da HA permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande facilidade: o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser substituído por metais tais como o  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , etc; os grupos  $\text{PO}_4^{2-}$  podem ser substituídos por carbonatos e vanadatos e, os grupos OH por carbonatos, flúor e cloro. Estas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a estabilidade, a bioatividade, a biocompatibilidade, a solubilidade e as propriedades de adsorção da estrutura da hidroxiapatita sem que ocorra significativa mudança na simetria hexagonal da estrutura [8,32].

Em 1926, De Jong foi o primeiro a observar a semelhança entre os padrões de Difração de raios X (DRX) da fase mineralizada dos ossos e da hidroxiapatita sintética. Ele verificou que a fase mineralizada não apresentava uma composição bem definida, além de mostrar variações durante os estágios de maturação e envelhecimento dos tecidos duros [1,2].

A HA encontrada nos ossos não é estequiométrica, sendo observada uma deficiência em cálcio em até 10%. O balanço eletrônico das cargas pode ser obtido pela ausência de grupos hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) ou, alternativamente, pela presença do ânion hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) no lugar do  $\text{PO}_4^{3-}$  [8,33,34].

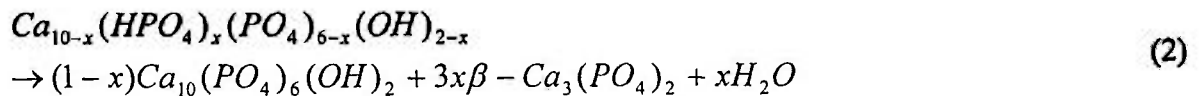
A hidroxiapatita sintetizada deficiente em cálcio (d-HA) é geralmente caracterizada pela razão Ca/P. Enquanto a razão molar Ca/P da HA estequiométrica é igual

a 1,67 a razão molar da d-HA pode variar de 1,5 a 1,67 [35,36,37]. Sua composição química pode ser expressa pela fórmula geral (Reação 1):



O grau da não estequiometria da d-HA depende do método de síntese empregado. Uma variedade de métodos tem sido proposta para sintetizar a d-HA. Um dos mais utilizados é o de precipitação ou hidrólise com temperatura variando de 25 a 100°C. De acordo com a literatura, o pH inicial da suspensão deve ser menor que 12 e, após a síntese, o pH final obtido deve ser igual a 5 [9].

Osaka et. al. [38], em seus estudos, observaram que a formação da d-HA pode ser proveniente da alta razão de adição do ácido fosfórico, diminuindo rapidamente o pH do meio, ou da baixa razão molar Ca/P. O tratamento térmico em temperaturas acima de 700°C leva a formação de misturas bifásicas HA e  $\beta$ -TCP, de acordo com a Reação 2 [9,33,34,37,39]:



Biologicamente, a HA é encontrada nos tecidos mineralizados como, por exemplo, esmalte, dentina e osso [7,8]. Devido à similaridade química da HA sintetizada com a matriz inorgânica dos tecidos ósseos, a hidroxiapatita é um dos materiais mais biocompatíveis. Esta biocompatibilidade favorece o crescimento ósseo para os locais em que a HA se encontra (osteocondutor), estabelecendo ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioativo), permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, as quais não a distinguem da superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial [3].

### 3.5.3. Efeito de alguns substituintes catiônicos e aniônicos na HA.

O efeito do substituinte aniônico ou catiônico no parâmetro de rede da HA depende do tamanho iônico e da quantidade a ser substituída. Geralmente, se o substituinte é maior que o íon substituído ( $\text{Sr}^{2+}$  por  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Cl}^-$  por  $\text{OH}^-$ ), o efeito é de expandir um ou os dois parâmetros de rede. Em alguns casos de substituição, ambos os parâmetros são afetados na mesma direção ou em direções opostas. Há também a possibilidade de apenas a dimensão do eixo “a” aumentar ou diminuir enquanto que o eixo “c” não varia ou vice-versa. Quando o substituinte é menor que o substituído ( $\text{Cd}^{2+}$  por  $\text{Ca}^{2+}$ ) os dois parâmetros tendem a diminuir [7,29,34].

#### 3.5.3.1. Efeito da substituição do $\text{CO}_3^{2-}$ na HA.

A relação entre o carbonato e a apatita é de grande importância uma vez que o carbonato aumenta a reatividade química da apatita, particularmente pelo aumento do produto de solubilidade e a taxa de dissolução nos ácidos [7].

Nas apatitas, o sítio fosfato aniônico trivalente ( $\text{PO}_4$ )<sub>6</sub><sup>3-</sup> pode ser ocupado tanto pelo íon hidrogenofosfato bivalente ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) quanto pelo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Já a substituição no sítio aniônico monovalente da hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) só é possível com o carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Estes dois tipos de substituições deram origem às chamadas apatitas carbonatadas do Tipo A e do Tipo B. Estas substituições alteram a razão Ca/P das apatitas pela mudança na sua fórmula química [40,41].

A quantidade de carbonato no osso mineralizado é de aproximadamente 4-8% em massa e tem-se mostrado variar de acordo com a idade do indivíduo. A apatita carbonatada do Tipo A é encontrada nos ossos de indivíduos mais velhos. Por outro lado, a apatita do Tipo B é a espécie mais abundante encontrada nos ossos de indivíduos mais novos [40].

Para a apatita do Tipo A, a substituição do grupo  $\text{OH}^-$  pelo  $\text{CO}_3^{2-}$ , causa uma expansão no eixo “a” e uma contração no eixo “c”, enquanto que na do Tipo B, quando o carbonato substitui o fosfato dentro da rede da apatita (Tipo B:  $\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$ ), causa uma contração no eixo “a” e expansão no eixo “c” quando comparado com a apatita sem  $\text{CO}_3^{2-}$  [8,9].

As apatitas carbonatadas do Tipo A podem ser obtidas por reações no estado sólido a 1000°C. Já as do Tipo B podem ser obtidas quando as apatitas forem preparadas juntamente por precipitação direta ou por hidrólise do ACP, DCPD, DCP ou OCP em soluções contendo carbonato. A quantidade de carbonato incorporada na apatita é dependente da concentração de  $\text{CO}_3^{2-}$  da solução. Contudo, o máximo de incorporação do  $\text{CO}_3^{2-}$  na apatita é limitado (máximo de 22% em massa ou 3 mols de  $\text{CO}_3^{2-}$ ) [9].

Diferenças significativas no espectro de infravermelho podem ser observadas para as apatitas do Tipo B: quanto maior a quantidade de  $\text{CO}_3^{2-}$  incorporada na apatita, mais definidas são as bandas de  $\text{CO}_3^{2-}$  nas regiões de absorção. A perda da resolução das bandas de absorção da ligação P-O ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) também pode ser verificada [9].

Nelson (1981) apud Kawashi [15] mostrou que a hidroxiapatita apresentando sítios de fosfatos substituídos por carbonatos são biologicamente mais reativas que os compostos estequiométricos. Isto talvez explique a razão pela qual os ossos naturais sejam constituídos por HA contendo  $\text{CO}_3^{2-}$  ao invés de serem constituídos apenas por compostos estequiométricos.

Outros autores sugerem que uma melhor resposta seria encontrada se a HA sintetizada fosse próxima ao osso mineralizado em composição, estrutura cristalina, cristalinidade, tamanho do cristal e morfologia [42]. Para isto pesquisadores como Bertoni et. al. (1998), Lin et. al. (1998), Kim et. al. (2003) e Suchanek et. al. (2004), vem estudando o efeito da adição do  $\text{Mg}^{2+}$  na estrutura da HA e do TCP associada ou não a outros íons como  $\text{CO}_3^{2-}$  por exemplo [27,32,42,43].

### 3.5.3.2. Efeito da substituição do $\text{Mg}^{2+}$ na HA

A adição do magnésio na fase apatita tem atraído pesquisadores devido ao seu significativo impacto no processo de mineralização e também sua influência na formação e crescimento de cristais da HA [37]. O  $\text{Mg}^{2+}$  é, sem dúvida, um dos mais importantes íons bivalentes associados à apatita biológica. Tem-se verificado que em tecidos calcificados, a quantidade de  $\text{Mg}^{2+}$  associada à fase apatita é maior no início do processo de remodelação óssea e diminui à medida que a calcificação aumenta [18,32,44].

Tendo em vista que a quantidade de  $\text{Mg}^{2+}$  pode variar de acordo com a aplicabilidade do material, a necessidade de controlar o nível substitucional entre o  $\text{Ca}^{2+}$  e

o  $Mg^{2+}$  durante a síntese é de significativo interesse [45]. O aumento da concentração de  $Mg^{2+}$  na HA favorece a diminuição na cristalinidade, o aumento na incorporação do  $HPO_4^{2-}$  como também um aumento no grau de dissolução [7,8,42].

O tamanho atômico, a estrutura cristalina e o estado de oxidação dos átomos são alguns pontos relevantes que devem ser considerados para que ocorra a substituição do  $Ca^{2+}$  pelo  $Mg^{2+}$  na estrutura da HA. Esta substituição é possível devido à formação de uma solução sólida. Ambos os cátions têm a mesma valência e o raio iônico efetivo do  $Mg^{2+}$  (0,69 Å) é menor que o do  $Ca^{2+}$  (0,99 Å) e, como consequência, ele fica próximo ou no limite de aceitação da rede da apatita [7,46,47].

Entretanto, a incorporação de  $Mg^{2+}$  na HA é limitada (máximo de 0,4% em massa de  $Mg^{2+}$ ) a não ser que outros íons, como carbonatos ou fluoretos, sejam simultaneamente incorporados como par de substituição, podendo apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos nas propriedades da apatita:  $Mg^{2+}$  e  $CO_3^{2-}$  tem efeito sinérgico na cristalinidade e nas propriedades de dissolução das apatitas sintetizadas. Já o  $Mg^{2+}$  e o  $F^-$  apresentam efeito antagônico [8,32,42].

De acordo com a literatura, a incorporação de até 0,3% em massa de magnésio foi verificada na estrutura da HA quando sintetizada por precipitação ou por hidrólise. O aumento desta concentração foi observado com a incorporação simultânea de até 1% em massa de  $CO_3^{2-}$  e 0,5% em massa de  $Mg^{2+}$ . Resultados similares foram obtidos por Suchanek et. al. [42] que sintetizaram pós de HA com diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$  e  $CO_3^{2-}$  pelo método hidrotermal.

Suchanek et. al. [45] também sintetizaram pós de HA variando a composição de 1,2 a 9,6% de  $Mg^{2+}$  em massa, sem a presença do  $CO_3^{2-}$ , pelo método hidrotermal. Os resultados de DRX para os pós calcinados a 900°C/1h indicaram a formação da fase HA (JCPDS 09-0432) e Whitlockite (fase  $\beta$ -TCP com  $Mg^{2+}$ ) em todas as composições. Quando a variação foi de 4,8 % em massa de  $Mg^{2+}$ , outras fases foram observadas, o que comprova a limitação de substituição do  $Mg^{2+}$  na estrutura da HA.

Segundo Elliot [7], o estudo da substituição dos íons  $Mg^{2+}$  na HA se torna difícil devido à falta de métodos espectroscópicos adequados uma vez que é difícil de encontrar um cristal simples com uma quantidade de  $Mg^{2+}$  adequada para se observar os sinais de difração de raios X (DRX). Evidências para a substituição do  $Mg^{2+}$  são geralmente baseadas em pequenas mudanças no parâmetro de rede.

### 3.6. Métodos de Obtenção

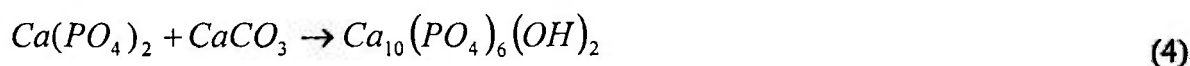
Os fosfatos de cálcio podem ser obtidos por reações no estado sólido ou por métodos via úmida (síntese hidrotérmica, processo sol-gel, precipitação e neutralização) [8,9,48,49]. Modificações nestes métodos “clássicos” (precipitação, hidrólise ou precipitação na presença de uréia, glicerina ou formaldeído) ou técnicas alternativas têm sido empregadas para preparar pós com morfologia, estequiometria, substituição iônica ou grau de cristalinidade como requerido para uma aplicação específica [4,50,51,52].

Algumas destas rotas recentemente aplicadas apresentam desvantagens relacionadas ao alto custo do material de partida (metais alcóxidos para aplicações em sol-gel), processos intermediários descartáveis (agentes criogênicos para métodos *freeze-drying*), reações de dupla decomposição capaz de liberar íons nitrato, amônio e fosfato que são bastante poluentes e outros procedimentos complicados, dificultando sua aplicação em escala industrial [48, 53].

#### 3.6.1. Reação no Estado Sólido

É um método tradicional de interdifusão de íons a partir de partículas sólidas gerando um produto, por um mecanismo baseado na difusão e nucleação [54]. Nos fosfatos de cálcio este processo envolve temperatura acima de 950°C para a mistura mecanicamente homogênea dos compostos de cálcio e fosfato [8,23]. Apesar de ser um método fácil de preparar, apresenta alguns inconvenientes como tamanho e morfologia de partícula não uniforme, falta de reprodutibilidade, caráter multifásico e perda de estequiometria, devido à volatilização de reagentes a altas temperaturas [54].

Por este método, a HA pode ser obtida por duas reações principais [8]:



### 3.6.2. Método Via Úmida

#### 3.6.2.1. Método Hidrotermal (conversão hidrotérmica de corais)

O carbonato de cálcio para a síntese de fosfato de cálcio pode ser obtido por meio de várias fontes naturais. Apenas o  $\text{CaCO}_3$  originado de algas marinhas e corais mostram porosidades características e interconectadas que as deixam próxima à porosidade do osso humano [23]. A porosidade destes corais apresenta vantagens e desvantagens para uso como implantes. Uma vantagem significativa é que certos corais apresentam uniformidade na porosidade num intervalo de 500 a 600  $\mu\text{m}$  em diâmetro o que ajuda na osseointegração. Devido à dificuldade em se obter uma quantidade de material de partida suficiente para uso comercial esta metodologia vem sendo raramente utilizada [54,55].

Este método apresenta duas reações principais [56]:



Acredita-se que o uso de materiais de partida natural para a síntese da HA confira uma maior aceitação no organismo devido às suas características físico-químicas serem semelhantes [56].

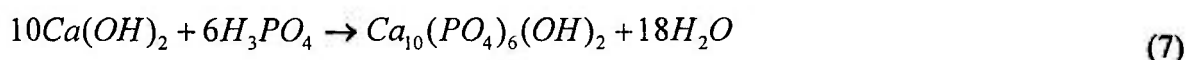
#### 3.6.2.2. Precursores Poliméricos

O método dos precursores poliméricos, desenvolvido por Pechini em 1967, tem como objetivo a imobilização dos íons metálicos em uma rede polimérica rígida a qual é obtida de uma solução de etileno glicol, ácido cítrico e dos respectivos cátions [57]. Este método vem sendo estudado para sintetizar fosfatos de cálcio [48,58].

A principal dificuldade encontrada para esta síntese é que os grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  não podem ser complexados pelo ácido cítrico, podendo levar a segregação e a formação de diferentes fases de fosfatos [48].

## 3.6.2.3. Precipitação – Método de Neutralização

Pós de HA e  $\beta$ -TCP podem ser preparados direta ou indiretamente utilizando a técnica de precipitação. A metodologia comumente utilizada na obtenção destes pós foi baseada nos métodos de Rathje e Hayek, que consiste na adição em gotas do ácido ortofosfórico numa suspensão de hidróxido de cálcio formando água como subproduto [8,51,52].



Tendo em vista que o  $Ca(OH)_2$  é pouco solúvel em água e a forma como os íons ortofosfato estão dissociados é dependente do pH, a reação de precipitação envolve a dissolução do hidróxido de cálcio (difusão de espécies iônicas tais como  $Ca^{2+}$  e íons hidróxido) e a dissociação dos íons ortofosfato [38].

Geralmente uma fase metaestável é primeiramente formada e passa por um ou mais passos intermediários de recristalização até a modificação do precipitado termodinamicamente estável. Para baixas supersaturações a seqüência a qual cada fase é formada está de acordo com a regra de estágios de Ostwald que permite prever qual composto se formará em determinadas condições do processo [59]. Segundo esta regra, a primeira fase a se formar será a de maior solubilidade. Esta fase se transforma por dissolução e recristalização nas fases menos solúveis. A consequência desta regra, prevista teoricamente e confirmada experimentalmente para os fosfatos de cálcio, é que para valores de pH superiores a 7, a primeira fase a se precipitar é o fosfato de cálcio amorfo (ACP) que se transforma lentamente em hidroxiapatita. Para valores de pH entre 5 e 7 pode ocorrer também a formação de precursores como o fosfato octacálcico e o fosfato de cálcio diidratado (brushita) [59,60,61].

Dependendo da aplicabilidade a que se destina, esta técnica permite que a temperatura da síntese e as substituições catiônicas ou aniônicas sejam alteradas. Contudo, para se obter uma HA monofásica, este método necessita do controle de alguns parâmetros como, por exemplo, natureza e composição do material de partida, controle do pH, razão de adição do ácido e temperatura da solução preparada [55,59,62]. A influência da razão

de adição do ácido fosfórico e o rígido controle do pH durante a síntese são parâmetros pouco estudados na literatura.

Trabalhos recentes vêm mostrando que este método é o mais adequado para a obtenção da HA nanométrica [25,62,63,64,65]. Campos et. al. [63] sintetizaram a HA por 3 rotas diferentes: a) precipitação do acetato de cálcio,  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  e fosfato de amônia dibásico,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; b) neutralização do hidróxido de cálcio,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , e ácido fosfórico,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e, c) rota sol-gel de acetato de cálcio,  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , e ácido fosfórico,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , em meio alcoólico. Os autores observaram que os pós obtidos por precipitação e neutralização exibiram os melhores resultados em termos de cristalinidade e estabilidade térmica.

### 3.7. Precursores utilizados durante a síntese - Influência do material de partida

O processo de precipitação para a obtenção da hidroxiapatita envolve a adição de uma solução de ácido fosfórico em uma suspensão de hidróxido de cálcio.

As propriedades químicas destes materiais têm apresentado influência na qualidade no produto final. A composição e a morfologia são parâmetros que podem ser correlacionados às características dos reagentes iniciais, uma vez que influenciam na composição química das partículas precipitadas, cristalinidade, morfologia, distribuição do tamanho de partícula e área de superfície específica [53].

O grau de solubilidade dos reagentes utilizados é outro fator importante a ser avaliado durante a síntese para a obtenção da hidroxiapatita. Os hidróxidos metálicos são pouco solúveis a moderadamente solúveis em água. Suas solubilidades aumentam consideravelmente com a dimensão do íon metálico [47]. Para o hidróxido de cálcio e de magnésio a solubilidade em água pode ser estimada a partir da reação de equilíbrio de solubilidade do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e do  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  a  $25^\circ\text{C}$  como demonstrado nas reações abaixo:



Como observado na Tabela 3, o produto de solubilidade do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  em água é maior que do  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ .

Tabela 3. Produto de solubilidade a 25°C [47].

	Raio iônico (Å)	Kps	Solubilidade (mol/L)
$\text{Mg}(\text{OH})_2$	0,69	$1,1 \times 10^{-11}$	$1,4 \times 10^{-4}$
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	0,99	$5,5 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-2}$

Vale ressaltar que a estequiometria da HA precipitada e a sua pureza depois de calcinada dependem da qualidade do material de partida [53]. Alguns pesquisadores vêm mostrando que a morfologia dos pós da HA precipitada é modificada em função da fonte de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{CaCl}_2$ ) e da temperatura da síntese utilizada [53,66].

O ácido fosfórico é a origem dos fosfatos que contém o ânion tetraédrico ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Figura 7). Trata-se de um ácido poliprótico e sua dissociação de Arrhenius dá origem a três séries de sais: os hidrogeno fosfatos,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , os monohidrogenofosfatos,  $\text{HPO}_4^{2-}$  e os fosfatos,  $\text{PO}_4^{3-}$  as quais propiciam três pontos de equivalência para o sistema químico (Reações 10,11 e 12) [67,68].

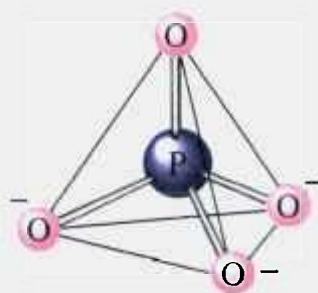


Figura 7. Arranjo tetraédrico do íon fosfato [47,68].



$$k_{a1} = \frac{[H_3O^+][H_2PO_4^-]}{[H_3PO_4]} = 7,6 \times 10^{-3}$$



$$k_{a2} = \frac{[H_3O^+][HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 6,3 \times 10^{-8}$$



$$k_{a3} = \frac{[H_3O^+][PO_4^{3-}]}{[HPO_4^{2-}]} = 4,4 \times 10^{-13}$$

A formação do  $HPO_4^{2-}$  (para um  $K_{a2} = 6,3 \times 10^{-8}$ ), a partir do  $H_2PO_4^-$ , repõe a maior parte do  $H^+$  consumido com a formação de  $H_2O$ , diminuindo a alteração do pH (Reação 13).



Os prótons são doados sucessivamente pelos ácidos polipróticos com uma constante de acidez decrescendo significativamente, obtendo-se valores distintos para cada dissociação, assim:  $K_{a1} > K_{a2} > K_{a3}$ . Uma simples explicação desta tendência pode ser atribuída em termos das forças eletrostáticas. A ionização do 2º próton do  $H_3PO_4$  envolve a remoção de um  $H^+$  de um ânion monovalente,  $H_2PO_4^-$ . A remoção do 3º próton é mais difícil porque envolve remoção de um ânion divalente,  $HPO_4^{2-}$ . Este comportamento é exemplificado na Figura 8 onde se observa que a fração das espécies desprotonadas aumenta quando o meio está alcalino ( $pH > 7$ ). Um fato relevante é que quanto mais protonada a espécie mais baixo o pH no qual ela é dominante [47,62].

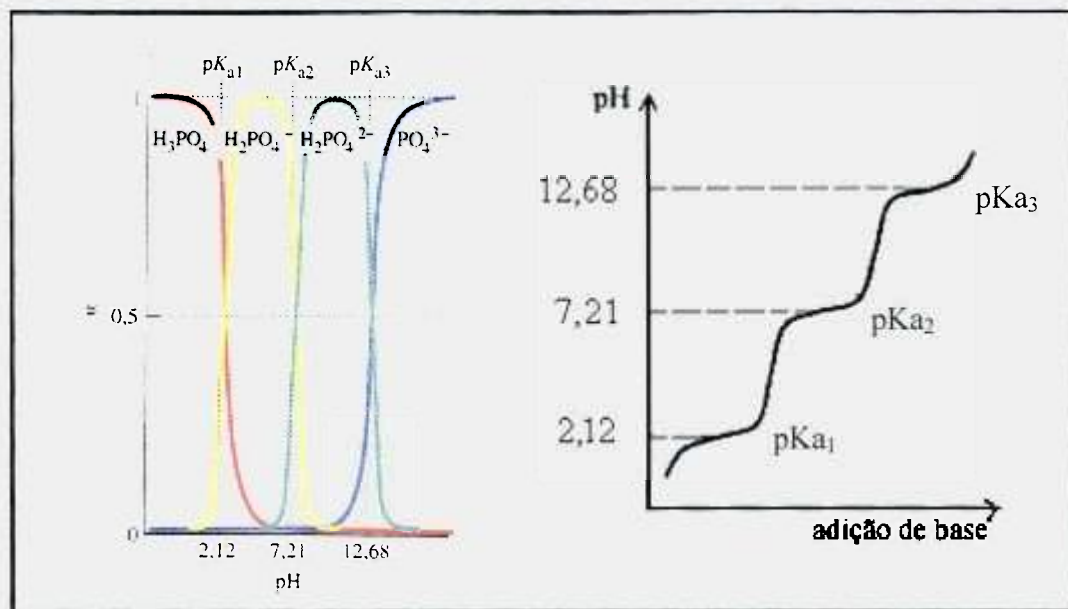


Figura 8. Composição fracionária das espécies do ácido fosfórico em função do pH [47].

### 3.8. Ultra-som / sonoquímica

A descoberta do ultra-som ocorreu em 1880 por Curie estudando o efeito piezolétrico. Thornycroft e Barnaby em 1894 observaram que na propulsão de mísseis lançados pelo destróier uma fonte de vibração era gerada causando implosão de bolhas e/ou cavidades na água. Em 1927, Richard e Alfredo Loomis foram os primeiros químicos a reconhecer o efeito anômalo de ondas sonoras intensas propagando-se pelo líquido (sonoquímica) [69]. Em investigações preliminares eles perceberam que intensas ondas ultra-sônicas introduzidas nas reações químicas alteravam a resposta dos resultados químicos normais [70]. Quando geradores confiáveis de ultra-som tornaram-se disponíveis na década de 80, surgiram então novos interesses nas técnicas ultra-sônicas. Atualmente, o número de publicações relacionadas aos estudos de reações que mudam consideravelmente as suas taxas ou direções dentro de um campo ultra-sônico aumenta a cada ano [69].

As ondas ultra-sônicas são vibrações mecânicas com frequência acima de 18 kHz, não audíveis ao ouvido humano. A sensibilidade do ouvido humano está na faixa de 16 Hz a 16 kHz, e a frequência característica do ultra-som, em geral, está no intervalo de 16 kHz a 1MHz. É importante ressaltar que frequências de 1 a 10 MHz correspondem a regiões de altas frequências (Figura 9) [69].

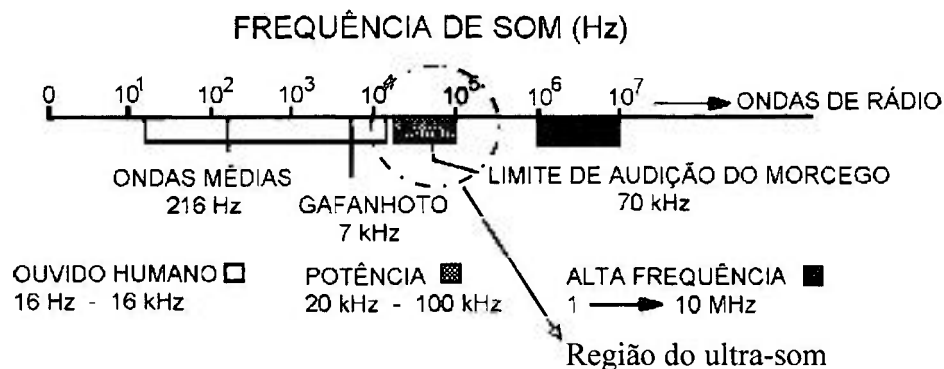


Figura 9. Região de frequência do som [69].

As ondas ultra-sônicas são produzidas a partir da transformação da corrente elétrica em corrente de alta frequência, que ao incidir sobre um cristal de quartzo ou de zirconato - titanato de chumbo (ZTP) provoca compressão e expansão alternada do cristal [71]. Nos laboratórios de análise química, os geradores de ondas ultra-sônicas são usualmente empregados para a limpeza de materiais e, mais recentemente em procedimento de preparo de amostras (preparação de suspensões, dissolução de sólidos). Para estes fins, normalmente são empregados os banhos de ultra-som. Estes banhos são caracterizados como vasos (cuba) metálicos e apresentam no fundo da cuba transdutores piezoelétricos que oscilam numa dada frequência característica do cristal. Os banhos de ultra-som encontrados no mercado, também conhecidos como banhos ultra-sônicos de limpeza, têm cerâmicas piezoelétricas que vibram com frequência menor que 100KHz, acopladas ao fundo das cubas [71].

Para alcançar o efeito ultra-sônico nos líquidos, um gerador de alta frequência converte a frequência da rede na frequência correspondente da unidade ultra-sônica. A frequência produzida é transformada em vibrações mecânicas por meio do transdutor eletrocerâmico. Ao ser aplicada a corrente alternada nos cristais (transdutores), estes passam a ter vibração característica. Essa vibração, com frequência na faixa de ultra-som (normalmente de 20 ou 35 kHz), é transferida para a cuba e, conseqüentemente, para todo o material que nele estiver contido. É importante ressaltar que os banhos somente devem entrar em operação se a cuba estiver preenchida com água até o limite estabelecido pelo fabricante [70].

Quando se deseja trabalhar com banhos de limpeza para procedimentos de preparo de amostras, alguns pontos devem ser avaliados [72,73]:

- Posicionamento preciso do bécker que contém a solução a ser irradiada, uma vez que a energia do ultra-som não é disponível uniformemente a partir de equipamentos com uma fonte fixa, como é o caso dos banhos de ultra-som.
- Tipo de frasco (plástico ou vidro) utilizado para a reação dentro do banho
- Número de frascos utilizados simultaneamente
- Temperatura da água
- Volume da água utilizado dentro do banho

A sonoquímica é uma das técnicas mais recentes utilizadas para se preparar compostos na forma nanométrica utilizando radiação ultra-sônica de alta potência (20kHz-10MHz). Em 2004, Gedanken apresentou as principais vantagens do uso da sonoquímica para a obtenção de nanomateriais bem como as possíveis morfologias dos pós obtida por meio desta técnica [74].

O fenômeno físico responsável pelo processo sonoquímico é a cavitação acústica. Este fenômeno é baseado no processo de criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases em um líquido promovendo efeitos de ativação em reações químicas [69]. As ondas ultra-sônicas se propagam através de um líquido em ciclos alternados de compressão e expansão que gera cavidade [75].

A origem da cavitação se deve ao fato que, durante a expansão, os gases adsorvidos no líquido ao redor da cavidade ou na interface, evaporam, resultando na expansão da cavidade. Durante a etapa de compressão estes gases ou vapores não retornam completamente ao líquido, resultando num aumento efetivo da cavidade (Figura 10). Ciclos periódicos de compressão e expansão causam o aumento do tamanho da cavidade. A cavidade ao atingir um tamanho crítico, implode-se, liberando grande quantidade de calor e pressão num curto período de tempo e em pontos localizados do líquido [69,76]. Toda bolha implodindo é um micro-reator em si, acelerando reações de forma nunca vista na química tradicional. Isto é devido ao extremo calor alcançado pela implosão que cria ponto de concentração de calor (hot spot). Durante o colapso de cada bolha, “hot spot” são formados com temperaturas acima de 5000°C. Essa concentração localizada de energia da onda ultra-sônica nestes “hot spots” possibilita induzir, melhorar ou acelerar as reações

químicas, criar radicais de alta energia e remover contaminantes da superfície dos metais [70,77,78].

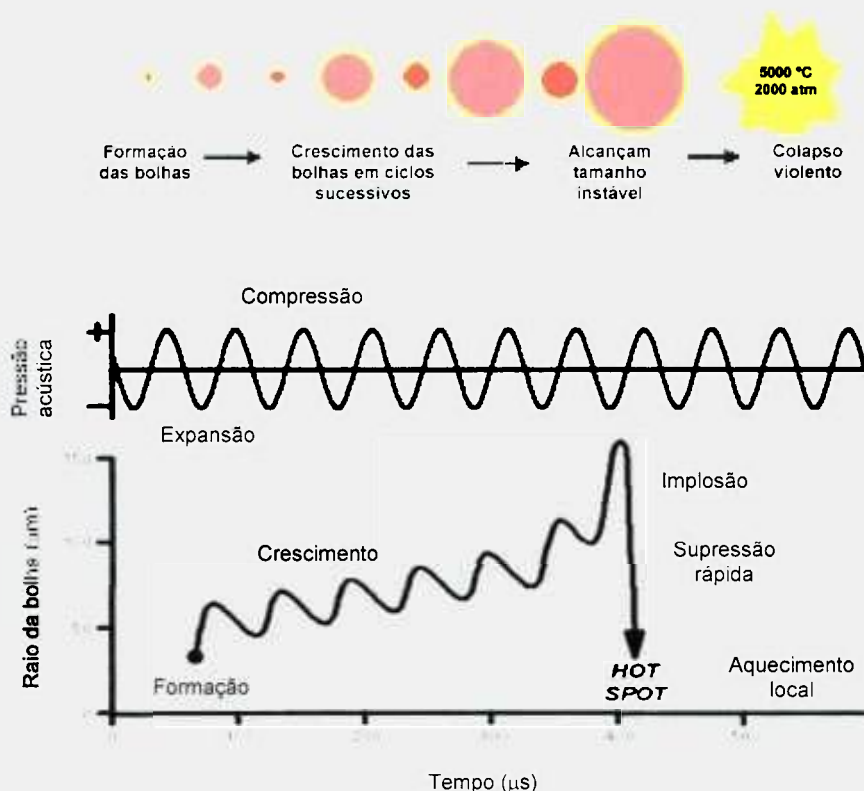
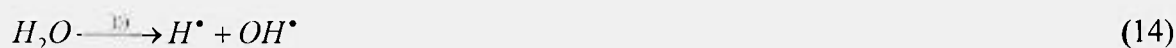


Figura 10. Crescimento da bolha e implosão num líquido irradiado com ultra-som [69,76].

O processo de cavitação e as temperaturas geradas no colapso são fortemente dependentes da pressão de vapor do solvente. Assim, moléculas de solventes com altas pressões de vapor (ex. moléculas de água) podem penetrar nas cavidades e, no momento do colapso, sofrem sonólise, resultando na formação de novos produtos (ex.  $H_2$  e  $H_2O_2$ ) [75].

Os efeitos químicos do ultra-som em meio aquoso estão intimamente associados à formação de radicais livres. Embora exista alguma incerteza na estimativa da exata temperatura e pressão no núcleo da bolha, pode-se afirmar que, em geral, extremas temperaturas e pressões são criadas dentro da bolha que colapsa. Moléculas de soluto e solvente presentes dentro da bolha são decompostas sob estas condições extremas e geram vários radicais altamente reativos. Por exemplo, se o meio sonificado, representado pelo símbolo ))) , for a água, os radicais  $H^\bullet$  e  $OH^\bullet$  serão gerados pela clivagem homolítica das ligações O-H das moléculas de água como representado pela reação 14 [70,76]:



Estas podem se combinar produzindo água ou sofrerem arranjos para a formação de  $H_2$  e  $H_2O_2$ . Contudo, outros produtos podem ser formados, caso outras espécies estejam presentes no meio sonificado [75].



A eficiência de cavitação em reações químicas também depende da frequência e amplitude das ondas acústicas, potência do sonicador, bem como da tensão superficial, força iônica e temperatura do meio [75].

A intensidade da cavitação é diretamente proporcional à potência de ultra-som e inversamente proporcional à frequência utilizada. Isto significa que, quanto maior for a potência e menor for a frequência, maior será a intensidade da cavitação [70].

Nos banhos de ultra-som, a frequência do ultra-som utilizada durante a síntese, influencia no diâmetro das bolhas que surge durante a cavitação. Em geral, em baixa frequência (25kHz) menor número de bolhas de cavitação com maior tamanho e mais energia (intensidade da cavitação) é gerado. Em frequências maiores (40kHz), uma maior densidade de bolhas é formada, porém com capacidade de gerar energia mais baixa (Figura 11) [70].

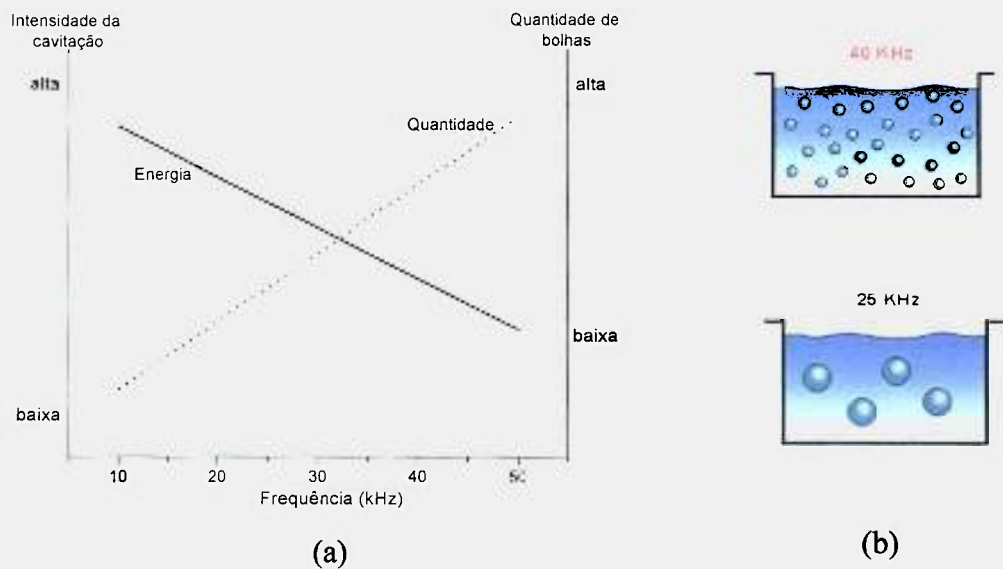


Figura 11. (a) Impacto da frequência do ultra-som sobre a intensidade de cavitação e quantidade de bolhas formadas; (b) representação da quantidade de bolhas formadas em função da frequência utilizada [70].

Com o intuito de se obter pós nanométricos, a sonificação tem-se mostrado uma ferramenta promissora para auxiliar nas reações químicas por envolver a dissolução e a precipitação dos sólidos e a ativação da superfície por agitação intensa [52,63,74,79]. Para os fosfatos de cálcio, em estudo, esta técnica é efetiva, pois ajuda a acelerar a formação dos pós de HA e TCP como também ela tem forte influência na morfologia e na cristalinidade dos pós [79].

Estudos prévios têm mostrado que a associação do método de neutralização com a aplicação do ultra-som influencia a morfologia, a cristalinidade e a quantidade de fase desejada de fosfatos de cálcio. Logo, se faz necessário controlar alguns parâmetros como a frequência, temperatura do banho do ultra-som durante a síntese e tempo de ação ultra-sônica para se obter o material desejado [52,79]. A velocidade de adição do ácido fosfórico também deve ser estabelecida uma vez que o sistema está sendo “perturbado” por frequências ultra-sônicas.

Em 2002, Kim et. al., sintetizaram pós de HA com a técnica de ação ultra-sônica e observaram que o tempo de sonificação interfere na morfologia do material obtido [79].

Campos et. al. [52,65] estudaram a influência da irradiação ultra-sônica (40 e 50 kHz) e a adição da D-glicose e glicerol na síntese do  $\beta$ -TCP e do BCP (material bifásico

HA/ $\beta$ -TCP). Os resultados indicaram que o método de neutralização associado a uma frequência de 50 kHz favoreceu a formação da fase HA. A adição da D-glicose na síntese ajudou a formar apenas as fases desejadas:  $\beta$ -TCP e/ou BCP. Este fato pode ser explicado levando-se em consideração o aumento da viscosidade da suspensão após adição do aditivo, o qual minimizou a ocorrência de microbolhas e, desta forma, preveniu a formação da HA devido à quantidade reduzida de radicais  $\bullet$ OH. A morfologia e a cristalinidade foram significativamente afetadas pela irradiação ultra-sônica e pelos aditivos utilizados [52,65].

Han et. al. [80] sintetizaram pós de HA adicionando glicosamina (GaGs) como aditivo regulador, pelo método de precipitação, utilizando um banho de ultra-som com frequência de 40 kHz e, observaram que é possível obter nanopartículas de HA estabilizadas com GaGs.

Com base nestes resultados, é possível prever que a eficiência do método de neutralização associado à aplicação do ultra-som durante a síntese é dependente de aditivos para formar nanomateriais estequiométricos.

## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os precursores utilizados para a síntese da Hidroxiapatita – HA estão descritos na Tabela 4.

Hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) e hidróxido de magnésio ( $\text{Mg(OH)}_2$ ) foram previamente caracterizado por Difração de raios X (DRX). A medida da área de superfície específica dos pós precursores foi realizada adotando o método de Adsorção Gasosa (BET – Micrometric modelo ASAP 2000). Para verificar a distribuição do tamanho de partículas e/ou aglomerados dos pós precursores utilizou-se o método de Difração à Laser (CILAS).

A análise química para o hidróxido de cálcio foi realizada com o auxílio de um Espectrômetro de Emissão Atômica com fonte de plasma induzido ICP-OES (M120 SPECTRO). Esta análise serviu para verificar e quantificar o magnésio presente no pó precursor de cálcio. Com base nessa informação foi possível calcular a quantidade exata de magnésio a ser adicionada durante a síntese dos pós de HA-Mg.

Os pós nanométricos de HA foram sintetizados utilizando o método de neutralização. As suspensões de hidróxido de cálcio e de magnésio e a solução de ácido fosfórico foram preparadas utilizando água destilada previamente fervida para evitar a presença do carbonato.

Tabela 4. Precursores utilizados para a síntese da Hidroxiapatita.

Precursor	Peso Molecular	Pureza (%)
Hidróxido de cálcio $\text{Ca(OH)}_2$	74,1	99,6
Hidróxido de magnésio $\text{Mg(OH)}_2$	58,3	97,0
Ácido fosfórico $\text{H}_3\text{PO}_4$	97,9	85,0

O procedimento experimental foi realizado com e sem a aplicação do ultra-som durante a síntese. Nas sínteses realizadas com ultra-som, teve-se o cuidado de colocar o bécker sempre na mesma posição dentro do banho. O equipamento utilizado para a síntese com ultra-som foi um banho de ultra-som USC 2850, Unique com frequência de 25kHz.

Para cada experimento, a quantidade preparada foi 10g de material. As sínteses dos pós de HA seguiram as seguintes etapas:

1ª etapa: Para avaliar o efeito da velocidade de adição do ácido fosfórico quando sintetizado com ou sem a aplicação do ultra-som, o  $H_3PO_4$  foi adicionado à suspensão de  $Ca(OH)_2$  em diferentes velocidades de adição sob agitação constante (Tabela 5).

2ª etapa: Após a escolha da velocidade de adição, as sínteses foram realizadas, com ou sem a aplicação do ultra-som, adicionando  $Mg(OH)_2$  antes da adição do ácido fosfórico. As composições estudadas, tomando-se como base a fórmula  $Ca_{(10-x)}Mg_x(PO_4)_6(OH)_2$ , tiveram valores de x variando da seguinte forma: 0,0; 0,1; 0,15; 0,17 e 0,2 mols de magnésio o que corresponde a 0,0; 0,24; 0,36; 0,41 e 0,49 % em massa de  $Mg^{2+}$ , respectivamente. Em todos os experimentos, a relação  $(Ca+Mg)/P = 1,67$  foi mantida (Tabela 5).

Após a reação, a agitação e o banho de ultra-som foram desligados. O precipitado obtido ficou em digestão por 24 horas à temperatura ambiente para que ocorresse o “envelhecimento do precipitado” e, conseqüentemente, o crescimento do cristal. Este período foi estabelecido tendo em vista que tempos de envelhecimentos prolongados geralmente favorecem razões Ca/P próximas da HA estequiométrica (1,67) e altas cristalinidades [60].

Entende-se por envelhecimento do precipitado o conjunto de transformações irreversíveis que ocorre num precipitado depois que ele se formou. Durante este processo, as partículas pequenas tendem a se dissolver e precipitar sobre a superfície dos cristais maiores. Este fenômeno é denominado de “Ostwald ripening” e ocorre porque as partículas menores são mais solúveis que as maiores, pois estas não atingiram um tamanho crítico para se tornarem estáveis energeticamente, sendo sua razão área superficial sobre volume muito elevada [59].

Tabela 5. Composição química e parâmetros avaliados durante a síntese da HA.

Amostra	Composição	Velocidade de adição do H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (mL/min)	Condição
HA2	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	2	Sem Ultra-som
HA8	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	8	Sem Ultra-som
HAr	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Rápida	Sem Ultra-som
US8	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	8	Com Ultra-som
US15	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	15	Com Ultra-som
USr	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	rápida	Com Ultra-som
HAMg024	Ca <sub>9,9</sub> Mg <sub>0,1</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	8	Sem Ultra-som
HAMg036	Ca <sub>9,85</sub> Mg <sub>0,15</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	8	Sem Ultra-som
HAMg041	Ca <sub>9,83</sub> Mg <sub>0,17</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	8	Sem Ultra-som
HAMg049	Ca <sub>9,8</sub> Mg <sub>0,2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	8	Sem Ultra-som
USMg024	Ca <sub>9,9</sub> Mg <sub>0,1</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	15	Com Ultra-som
USMg036	Ca <sub>9,85</sub> Mg <sub>0,15</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	15	Com Ultra-som
USMg041	Ca <sub>9,83</sub> Mg <sub>0,17</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	15	Com Ultra-som
USMg049	Ca <sub>9,8</sub> Mg <sub>0,2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	15	Com Ultra-som

Durante e após a reação, o pH das suspensões foi monitorado. Para isto, utilizou-se um pHmetro Dm-20 Digimed com o auxílio do programa Acquire v2.0. Este programa foi desenvolvido com o intuito de ajudar a observar a variação do pH e da temperatura em função da velocidade de adição do ácido fosfórico, da aplicação do ultra-som durante a síntese, como também as etapas de estabilização da suspensão da HA com e sem adição de magnésio.

O fluxograma do processo desenvolvido para a obtenção dos pós de hidroxiapatita é apresentado na Figura 12:

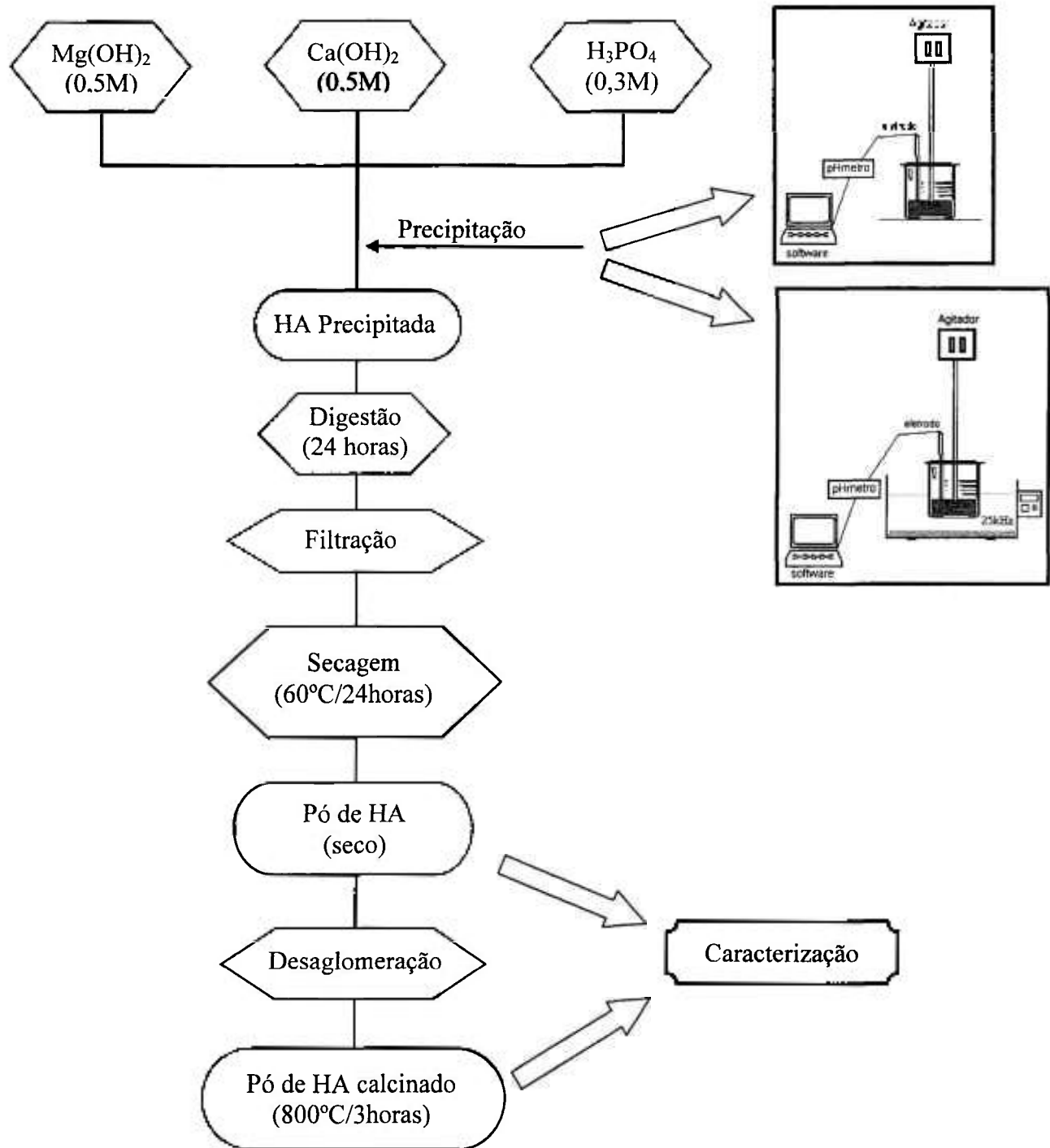


Figura 12. Fluxograma do processo de obtenção dos pós da HA.

#### 4.1. Caracterização do pó antes e após calcinação

Ao término da etapa de digestão, os precipitados foram filtrados em funil de buchner, lavados com água destilada e secos em estufa à 60°C/24h. Em seguida, o material seco foi desaglomerado em almofariz de ágata e caracterizado por Análise Termogravimétrica (ATG) e Análise Térmica Diferencial (ATD) (Setaram Modelo SETSYS 16/18) em fluxo de ar, com taxa de aquecimento de 10°C/min até 1250°C. Para esta análise, foram selecionadas, de forma aleatória, as amostras HA8, HAr, US8, US15, HAMg036, HAMg049, USMg036 e USMg049.

A análise de Difração de Raios X (DRX) foi realizada nos pós secos e após calcinação a 800°C/3h. O equipamento utilizado para esta análise foi um difratômetro Rigaku, modelo Multiflex, com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=0,1542\text{nm}$ ).

Para o pó calcinado a 800°C/3h, as fases presentes nas amostras HAr, HA8, HAMg024, HAMg036, HAMg041, HAMg049, US15, USMg024, USMg036, USMg041 e USMg049, identificadas nos DRX, foram quantificadas por meio de refinamento da estrutura cristalina pelo método de Rietveld.

A análise química para as amostras calcinadas a 800°C/3h, foi avaliada pela técnica de ICP-OES, realizada no Laboratório de Análises Químicas e Ambiental (CQMA – IPEN).

Para análise na região do infravermelho, as amostras foram misturadas em KBr, prensadas na forma de pastilhas e analisadas por meio da técnica de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (Thermo Nicolet 670 - FTIR – NEXUS). A área de superfície específica dos pós foi realizada adotando o método de Adsorção Gasosa (BET – Micrometric modelo ASAP 2000). A morfologia dos pós foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET - Philips CM 200) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV – Philips-XL 30).

#### Método de Rietveld

O método de Rietveld é uma aplicação dos princípios básicos de física da difração e de parâmetros cristalográficos fundamentais, como parâmetros de rede e posições de ocupação na célula unitária, para o cálculo das intensidades do padrão de difração. É baseado na construção de um padrão de difração calculado, de acordo com o

modelo estrutural. O padrão calculado é obtido pela introdução direta dos dados cristalográficos, tais como simetria do grupo espacial, posições atômicas, fatores de ocupação e parâmetros de rede. O padrão calculado ao se ajustar ao padrão observado fornece os parâmetros estruturais do material e parâmetros do perfil de difração [81].

O termo refinamento no método de Rietveld refere-se ao processo de ajuste do modelo de parâmetros utilizados no cálculo de um padrão de difração, que seja o mais próximo do observado.

O refinamento chega ao fim quando os parâmetros não variam mais e a função minimização atingiu o valor mínimo. Entretanto, a convergência deve ser acompanhada observando-se o valor de alguns índices, calculados ao final de cada ciclo de refinamento. Esses índices indicam ao usuário quando prosseguir, parar ou finalizar o refinamento. O índice de qualidade do refinamento,  $S^2$ , é calculado pelo quociente dos resíduos obtidos a partir das intensidades calculadas e observadas, segundo a Equação 1:

$$S^2 = (R_{WP} / R_{EXP})^2 \quad (1)$$

O resíduo  $R_{WP}$  ( $R$  ponderado) considera o erro associado a cada valor de intensidade e é função do número de contagens, enquanto que  $R_{EXP}$  é o erro esperado proveniente do erro estatístico associado às intensidades medidas. O valor ideal para  $S^2$  é a unidade, embora valores até 3 sejam aceitáveis [81].

Para o refinamento, foram usados os resultados das análises de difração de raios X dos pós calcinados a 800°C, obtidos nas seguintes condições:

- a) Coleta de dados: Difratorômetro modelo Multiflex, radiação  $CuK\alpha$  ( $\lambda=0,1542\text{nm}$ ), faixa angular ( $2\theta$ ) de 10° a 80°, tamanho do passo 0,02°, tempo por passo 8s.
- b) Padrão instrumental: Silício
- c) Programa utilizado para o refinamento: GSAS (General Structure Analysis System)

A pesquisa de dados cristalográficos para a construção dos padrões de difração teóricos da hidroxiapatita foi feita no banco de dados ICSD (26204, 4259 e 6191).

## 4.2. Estudo da densificação dos corpos cerâmicos de HA

Tendo como referência dados da literatura [8], a temperatura escolhida para o estudo de densificação dos corpos cerâmicos de HA foi de 1100°C a uma taxa aquecimento de 10°C/min e patamar por 1 hora.

Para o estudo da densificação, todos os pós calcinados foram conformados em matriz cilíndrica de 12mm de diâmetro, pré-compactados uniaxialmente, seguida de prensagem isostática à frio (200MPa).

As amostras compactadas foram pesadas em balança analítica e as dimensões das pastilhas foram determinadas com o auxílio de um micrômetro. O volume das pastilhas foi determinado utilizando-se a média destas medidas. Com base nestes dados, a densidade à verde foi calculada.

Após a etapa de sinterização, a densidade aparente das amostras foi medida pelo método de Arquimedes. Este método leva em consideração a massa seca, massa úmida e massa imersa do corpo sinterizado imerso em água (densidade da água a 25°C) (Equação 2).

$$\rho = \frac{m_s}{m_u - m_i} \cdot \rho_{H_2O} \quad (2)$$

onde:  $m_s$ : massa seca,  $m_u$ : massa úmida,  $m_i$ : massa imersa,  $\rho_{H_2O}$ : densidade da água a 25°C (1 g/cm<sup>3</sup>)

A porcentagem de perda de massa foi determinada para todas as composições pesando-se as amostras antes e após a sinterização.

Após a sinterização, as amostras foram fraturadas e analisadas por Difração de raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A análise de dilatometria foi realizada em algumas amostras com o intuito de verificar possíveis mudanças no mecanismo de sinterização da HA. A escolha das amostras foi feita levando-se em consideração os parâmetros utilizados durante a síntese dos pós de HA. Para isto, as amostras selecionadas HA8, HAMg036, HAMg049, US15, USMg036 e USMg049 foram conformadas em matriz cilíndrica, obtendo-se pastilhas de 6 mm de diâmetro por 9 mm de altura e posterior prensagem isostática à frio (200MPa).

O equipamento utilizado para esta análise foi Dilatômetro (Setaram, Modelo SETSYS 16/18), a uma temperatura de 1250°C em fluxo de ar, com taxa de aquecimento de 10°C/min, patamar de 15min e taxa de resfriamento de 10°C/min.

#### 4.3. Caracterização biológica

Após a caracterização física e química, três composições dos pós sintetizados (HA8, HAMg036 e USMg036) foram escolhidas para avaliação biológica. Esta escolha foi realizada levando-se em consideração os parâmetros utilizados durante a síntese dos pós de HA.

Como o intuito deste trabalho é obter um material próximo ou semelhante à hidroxiapatita comercial, testes “in vitro” e “in vivo” também foram realizados utilizando a HA – Stream Chemical (HAc) para posterior comparação com os pós sintetizados neste trabalho.

##### 4.3.1. Teste “in vitro” – Ensaio de citotoxicidade

A hidroxiapatita comercial (HAc) e os pós sintetizados (HA8, HAMg036 e USMg036) foram submetidos a testes de citotoxicidade. Este teste foi realizado no Centro de Biotecnologia (CB) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN.

Para avaliação de citotoxicidade das diferentes amostras de HA foi seguida a norma ISO – 10993-5 [82]. O método empregado para avaliação da viabilidade celular foi CellTiter96<sup>®</sup> AQueous Non – Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation).

O teste CellTiter96<sup>®</sup> AQueous é um método colorimétrico para determinação do número de células vivas em testes proliferativos ou quimiosensitivos, preparado com soluções de um composto tetrazólio (3-(dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, sal inerte (MTS)) e um reagente acoplador de elétrons (metassulfato de fenazida; (PMS)) [82]. O MTS (corante supravital do composto tetrazólio) é bioreduzido pelas células a produto formazan, que é solúvel no meio de cultura tecidual e, então, efetuada uma análise espectrofotométrica do corante incorporado. A absorbância do formazan a 490nm pode ser medida diretamente de placas de 96 poços sem adição de outros processos. A quantidade do produto de formazan como medida da

quantidade de absorvância a 490 nm é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura.

#### I- Manutenção das células CHO-k1 *in vitro*

As células CHO-k1 foram usadas para os testes de citotoxicidade. Estas foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com antibiótico e antimicótico (Gibco) (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina 0,025 µg/mL), 2mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino (Cultilab) em incubadora úmida a 37° C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área de cultura) na placa de cultura de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% (Sigma) em solução tampão fosfato pH 7,4. Após a tripsinização, a suspensão foi centrifugada (150° RPM/5min) e lavada com solução salina estéril (PBS), sendo o precipitado colocado em suspensão novamente em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer para estabelecer uma concentração células por mililitro na ordem de 60.000 cel/ml.

#### II- Preparação dos extratos

Extratos:

- Amostras HAc, HA8, HAMg036 e USMg036: 1g de cada amostra foi pesado, embalado e esterilizado pela exposição à radiação gama de <sup>60</sup>Co na dose de 25kGy.
- Controle negativo: 1g de alumina em pó foi embalado e esterilizado pela exposição à radiação gama de <sup>60</sup>Co na dose de 25kGy.
- Controle positivo: Solução de fenol 0,5% em meio RPMI 1640.

Os extratos foram colocados em contato com meio de cultura (RPMI) e em seguida, levados a uma incubadora a 37 °C, em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>, por 48h. Após este período, o sobrenadante foi filtrado com auxílio de uma membrana milipore (poros de 0,45µm) e realizadas diluições de 100 a 6,25% com meio RPMI 1640. As diluições seriadas dos extratos foram feitas a partir da concentração de 100%. Para cada 1ml foram adicionados 2ml de solução (RPMI) conforme a Figura 13.

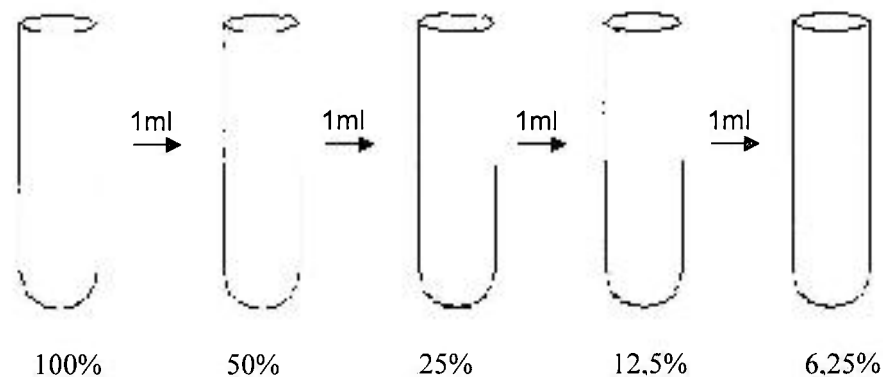


Figura 13. Representação da diluição seriada para cada extrato.

As soluções obtidas a partir das diluições seriadas foram posteriormente colocadas em contato com as células.

Procedimento: Em uma placa de cultura de 96 poços foram colocados 50µL da suspensão de células CHO, na quantidade final de 3000 células por poço, sobre 50µL do extrato em suas diluições em quadruplicata (Figura 14).

- Todos os poços continham 100µl de material para leitura final;
- A primeira coluna da placa é a Branca (sem células);
- A segunda e terceira colunas representam o meio com 100% de células vivas;
- A partir da quarta coluna foram pipetadas as diluições correspondentes à amostra (6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100%);

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 14. Esquema da microplaca utilizada para cada amostra: 1ª coluna – Branco; 2ª e 3ª coluna – 100% células vivas; 4ª à 8ª coluna – diluições seriadas.

A placa foi colocada na incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas a 37°C. A viabilidade celular foi determinada pela adição de 20 µL de solução de MTS/PMS (20:1) e incubado por mais 2 horas. A placa foi levada a uma leitora ELISA (Dynatech MR 4000) (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 495 nm. Todos os testes foram realizados com o controle positivo e negativo.

A viabilidade celular foi determinada pela relação (Equação3):

$$VC(\%) = \left( \frac{DO_{amostra}}{DO_{controle}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:  $VC$  = viabilidade celular (%);  $DO_{amostra}$  = densidade óptica da amostra;  $DO_{controle}$  = densidade óptica do controle.

O Índice de Citotoxicidade - IC<sub>50%</sub>, concentração do extrato que mata 50% da população de células, foi determinado graficamente.

#### 4.3.2. Teste “in vivo”

Este estudo foi realizado sob o consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) de acordo com o parecer do Projeto n° 16 CEPA-IPEN/SP (Anexo I).

Para o teste “in vivo”, as amostras HAC (hidroxiapatita comercial) HA8, HAMg036 e USMg036, na forma de pó, foram previamente esterilizadas com dose de 25kGy por meio de radiação gamma (Co<sup>60</sup>, Gammacell modelo 220 do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares-IPEN).

#### I- Animais, Anestesia e Medicação.

O estudo *in vivo* foi realizado em animais *Rattus norvegicus*, machos da raça Wistar com idade aproximada de 10 semanas. Estes ratos foram fornecidos pelo Centro de Biotecnologia (CB) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN e alocados no Biotério do CB.

Doze ratos com peso médio de 300g foram designados como modelo animal neste estudo, sendo atribuídos 3 animais por grupo (Figura 15). Entende-se por grupo as amostras utilizadas para estudo “*in vivo*”. Os animais foram alocados no biotério do IPEN, em sala climatizada com temperatura constante (21°C), isentos de estresse, sob iluminação em intervalos de 12 horas (claro/escuro) controlada por temporizador, em gaiolas separadas em grupos de três animais, tratados com dieta à base de ração seca e água fornecida à vontade.



Figura 15. Grupo de animais selecionados para o teste *in vivo*.

A experimentação animal seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O procedimento cirúrgico foi realizado seguindo estes princípios. Desta forma, os materiais na forma de pó, foram instalados (enxertados) no fêmur direito. No fêmur esquerdo, foi realizada a confecção do leito cirúrgico sem adição do biomaterial para acompanhar a reparação normal do tecido (grupo controle).

Antes do procedimento cirúrgico, os ratos receberam uma dose de anestesia (Quetamina (75mg/kg) + Xilazina (10mg/kg)) administradas via intraperitoneal. Nas áreas cirúrgicas o anestésico local utilizado foi o Cloridrato de Lidocaína a 2% sem vaso constritor, apresentação em tubetes de 1.8 ml. Após o procedimento cirúrgico uma dose única de Morfina (10mg/kg) foi aplicada com a finalidade de promover analgesia, diminuindo o estresse da dor pós-cirurgia e melhorando o bem-estar dos animais.

## II- Procedimento Cirúrgico

Na Figura 16 são apresentadas as etapas do procedimento cirúrgico realizado nos ratos. Previamente à realização da cirurgia, a região do fêmur dos animais foi tricotomizada e feita a assepsia com gluconato de clorhexidina a 2% e iodopovidona (Figura 16-a). Após a tricotomia, com bisturi (nº 3) munido de lâmina 15, foi realizada a excisão (incisão) da pele expondo as fáscias musculares (Figura 16-b).

A exposição do osso femural foi obtida com o rebatimento dos músculos *vastus lateralis* e *biceps femoris* até o periósteo, que foi deslocado com objetivo de proporcionar o acesso e visão à área operatória (Figura 16-c).

O leito de inserção dos materiais implantáveis (enxertados) foi preparado com o auxílio de brocas acopladas a um contra-ângulo com redução de 16:1, movido por um motor elétrico com velocidade de 1.000 rpm e 30 N/cm de torque, sob constante irrigação (solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%) (Figura 16-d). Com auxílio de uma cureta o material foi colocado no fêmur direito do rato (Figura 16-e).

Após a inserção dos materiais, a sutura de ponto simples contínuo foi realizada com fios de sutura mononylon agulhado (3/8 CR - 3,0cm). A assepsia, após o procedimento de sutura, foi feita com gluconato de clorhexidina a 0,12% e iodopovidona (Figura 16-f).

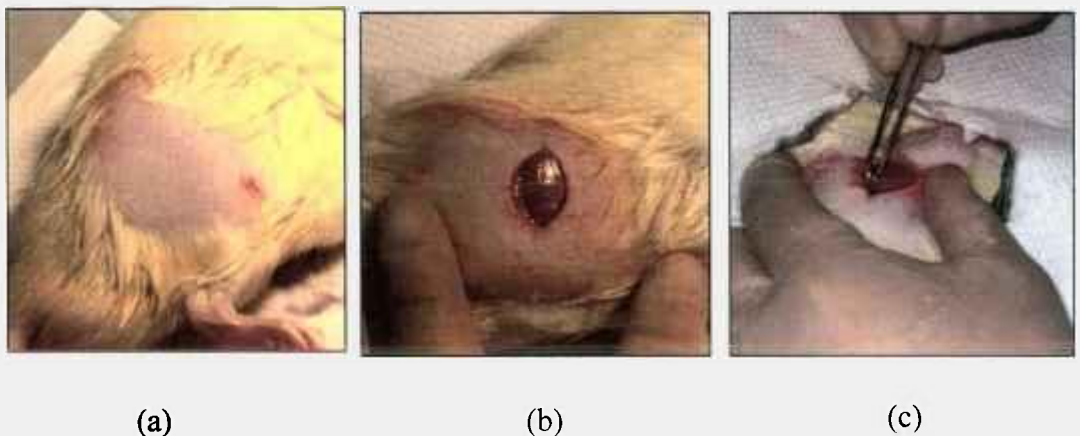


Figura 16. Procedimento cirúrgico: (a) tricotomia da área a ser realizada a cirurgia, (b) incisão dos tecidos, (c) afastamento dos tecidos.

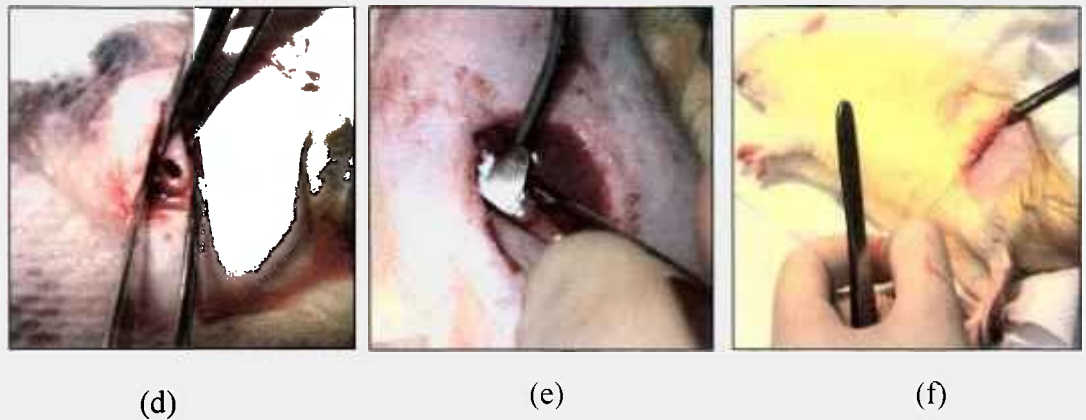


Figura 16 (cont). Procedimento cirúrgico: (d) preparo do leito cirúrgico, (e) colocação do material, (f) sutura e anti-sepsia.

### III- Aplicação dos Marcadores Celulares

No decorrer de 4 semanas (28 dias) aguardadas para a cicatrização, foram administrados, subcutaneamente, marcadores ósseos de união à apatita, com finalidade de determinar o processo de formação óssea. Para uma interpretação morfológica semi-quantitativa utilizou-se uma seqüência de três marcadores com cores diferentes, em intervalos de tempo apropriado (Tabela 6).

Os marcadores utilizados foram respectivamente a calceína (Labsynth produtos para laboratórios LTDA), a alizarina (Labsynth produtos para laboratórios LTDA) e a tetraciclina (Fosfato complexo de tetraciclina – Bristol – Meyer Squibb – Brasil).

O procedimento experimental da seqüência de marcadores está detalhado na Tabela 6. Os marcadores celulares de polifluorcromo em forma de pó foram pesados em balança de precisão (Metler – Toledo AG245) e diluídos em soro fisiológico (1mL) e solução tampão de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (2mg).

Tabela 6. Dosagem e tempo de aplicação dos marcadores celulares.

Tempo	Marcador	Dose por kg de animal
7 dias	calceína	8 mg
14 dias	alizarina	20 mg
21 dias	tetraciclina	10 mg
28 dias	sacrifício	-

#### IV-Preparação das amostras

O tempo de reparação óssea de 4 semanas em ratos foi adotado como comparativo ao tempo de reparação óssea em humanos (24 semanas). O sacrifício dos animais foi realizado em câmara de CO<sub>2</sub>. Após a inserção dos animais dentro da câmara, o gás CO<sub>2</sub> foi aberto por 30 segundos. Os animais permaneceram dentro da câmara por mais 5 min até não apresentar sinais de vitalidade.

Os tecidos moles adjacentes à área estudada foram dessecados e, uma amostra de 4 mm no longo eixo do fêmur (envolvendo centralmente a área inicial de injúria de 2 mm de diâmetro) foi removida com o auxílio de serra. Logo após a remoção das amostras, estas foram mantidas imersas em solução neutra de formalina a 10% durante 30 dias. As amostras fixadas foram colocadas no descalcificador (ácido fórmico 10%) por 7 dias para permitir a realização de cortes de 5 µm.

O procedimento de processamento de materiais após descalcificação seguiu o protocolo apresentado no Anexo II.

#### V- Análises Histológicas

As lâminas histológicas coradas foram visualizadas por microscopia de luz convencional (campo claro) e por fluorescência, onde imagens foram capturadas e processadas pelo programa Image Pro-Plus 4.1 (Media Cybernetics) feitas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.

Os métodos de coloração utilizados foram: (a) Hematoxilina e Eosina (HE) e (b) Tricrômico de Masson. Com as lâminas coradas pelo HE, além da morfologia avaliada em campo claro, foi utilizada também a avaliação por Fluorescência (Anexo III).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

---

### 5.1. Caracterização do Hidróxido de Cálcio e do Hidróxido de Magnésio

Os resultados de DRX para os pós precursores em estudo estão apresentados na Figura 17 e Figura 18. Picos característicos ao  $\text{Ca(OH)}_2$  e  $\text{Mg(OH)}_2$  foram identificados de acordo com as fichas JCPDS 441481 ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) e JCPDS 830114 ( $\text{Mg(OH)}_2$ ).

Nas duas amostras também foi possível observar a presença de picos característicos do  $\text{CaCO}_3$  (JCPDS 050586) que podem ser atribuídos a impurezas do material.

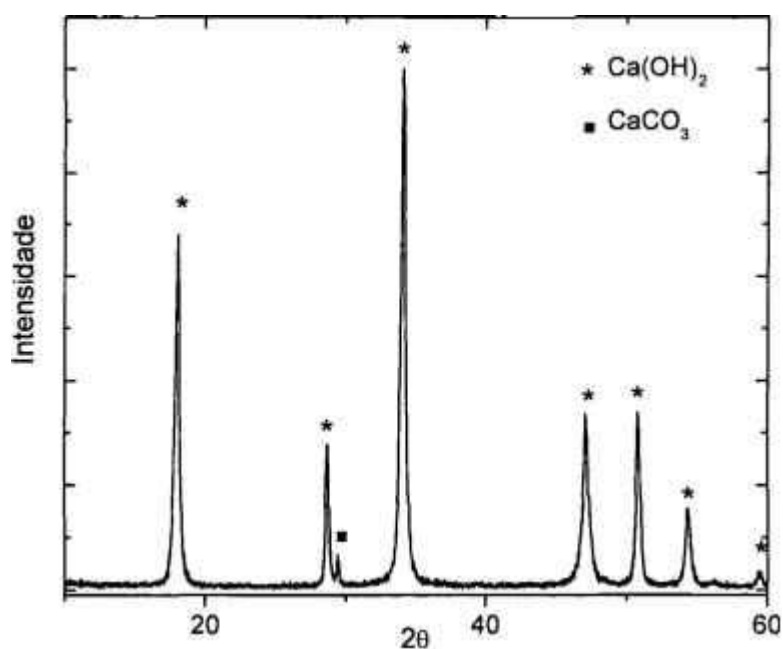


Figura 17. Difração de raios X para o pó precursor  $\text{Ca(OH)}_2$ .

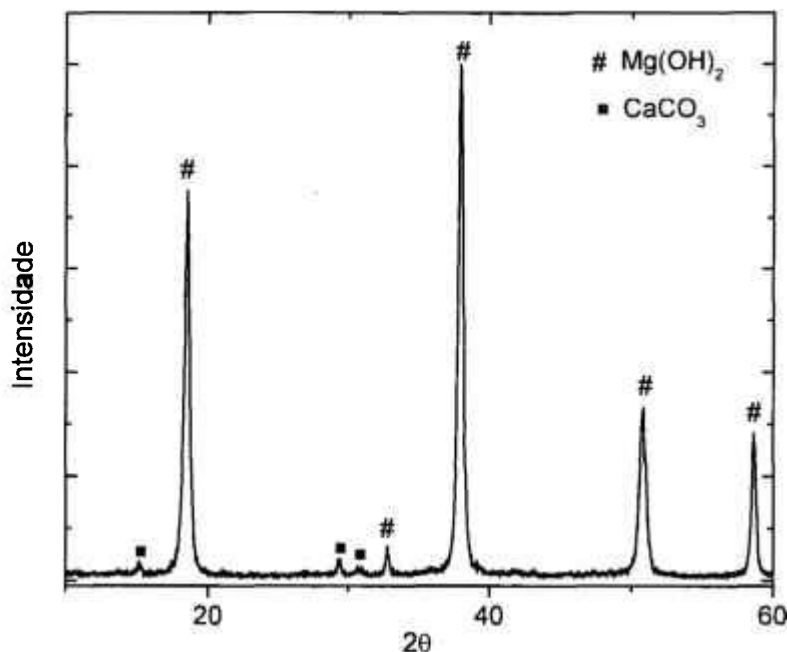


Figura 18. Difração de raios X para o pó precursor  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ .

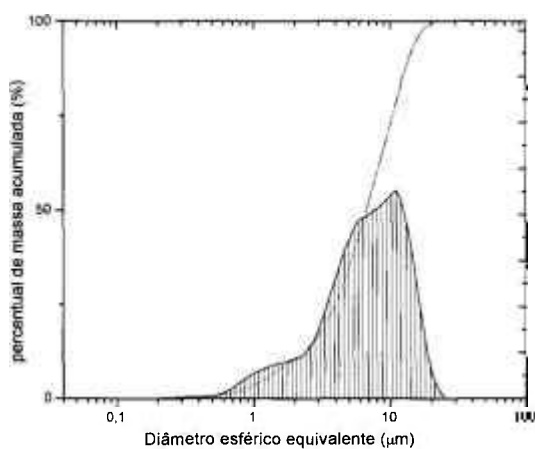
Estudos realizados por Bernard et. al. [53] com diferentes lotes de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para a síntese da HA, mostraram que, dependendo do lote utilizado, diferentes composições podem ser obtidas. A presença do magnésio no  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  influencia na estequiometria da HA produzida: o  $\text{Mg}^{2+}$  altera as condições de precipitação do fosfato de cálcio e mais precisamente a precipitação da HA.

Para o hidróxido de cálcio em estudo, a análise química realizada por ICP-OES indicou a presença de  $8,39 \times 10^{-5}$  mols de  $\text{Mg}^{2+}$  (Tabela 7). Em função deste resultado, novos cálculos estequiométricos foram realizados para as sínteses em que a adição do magnésio foi estudada.

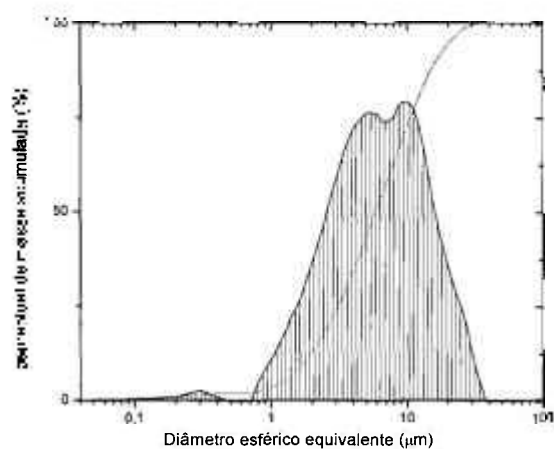
Analisando a área de superfície específica dos pós precursores, observa-se que o hidróxido de magnésio tem maior área de superfície em relação ao hidróxido de cálcio. A distribuição do tamanho de partículas e/ou aglomerados para os precursores, obtida pelo método de Difração à Laser, indicou uma larga distribuição de caráter polidisperso, com diâmetro médio variando de 7,38 a 7,73  $\mu\text{m}$  para  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , respectivamente (Figura 19 e Tabela 7).

Tabela 7. Análise química, área de superfície específica e distribuição do tamanho de partículas e/ou aglomerados para os precursores  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ .

Reagente	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	$\text{Mg}(\text{OH})_2$
Análise química: Mg (mols)	$8,39 \times 10^{-5}$	-
Área de superfície específica ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$10,40 \pm 0,08$	$53,68 \pm 0,54$
Diâmetro médio de partícula ( $\mu\text{m}$ )		
10%	1,90	1,75
50%	6,69	5,85
90%	13,58	16,45
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	7,38	7,73



(a)



(b)

Figura 19. Curva de distribuição do tamanho de partícula e/ou aglomerado para os pós precursores (a)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e (b)  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ .

## 5.2. Avaliação do pH e da temperatura durante a obtenção dos pós de HA .

Os valores de pH e temperatura obtidos durante e após a síntese dos pós da hidroxiapatita, avaliados em função da velocidade de adição do ácido fosfórico, do uso da frequência ultra-sônica e das diferentes concentrações de  $\text{Mg}^{2+}$ , estão descritos na Tabela 8

Tabela 8 Valores de pH e temperatura obtidos durante e após a síntese da HA.

Amostra	Velocidade de		pH						Temperatura (°C)					
	Adição do H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (mL/min)	Inicial	Após 70% do volume adicionado		Após adição total do ácido		Após 30 min	Após 15h	Após 24 h	Inicial	Após 70% do volume adicionado		Após 30 min	Após 15h
			12,4	12,3	5,8	7,1					7,3	7,4		
HA2	2	12,4	12,3	5,8	7,1	7,3	7,4	7,4	25,4	27,0	27,9	27,6	25,1	
HA8	8	12,4	12,2	10,0	10,5	10,7	10,6	10,6	25,4	29,0	29,8	28,9	25,6	
HAr	rápida	12,4	-	5,3	12,5	10,1	10,3	10,3	17,8	-	19,4	22,2	20,2	
US8	8	12,4	12,3	5,6	5,5	5,6	5,6	5,6	22,0	26,5	26,9	25,2	21,2	
US15	15	12,4	12,2	6,0	7,5	7,4	7,3	7,3	21,4	27,9	28,1	23,8	15,9	
USr	rápida	12,4	-	5,4	9,8	7,9	7,9	7,9	25,5	-	28,0	26,9	24,5	
HAMg024	8	12,6	12,4	8,0	9,0	9,3	9,2	9,2	20,0	23,4	23,9	23,0	20,2	
HAMg036	8	12,6	12,4	7,7	8,7	8,9	8,9	8,9	19,5	23,2	23,7	22,9	20,2	
HAMg041	8	12,6	12,3	7,1	7,8	8,1	8,1	8,1	18,0	22,0	22,5	21,8	19,9	
HAMg049	8	12,6	11,8	6,7	7,2	7,4	7,5	7,5	19,9	23,5	23,7	23,0	20,0	
USMg024	15	12,2	12,0	7,5	8,7	8,9	8,9	8,9	26,8	31,3	31,6	28,7	24,1	
USMg036	15	12,2	12,0	7,1	8,3	8,6	8,6	8,6	26,8	31,2	31,6	28,1	23,6	
USMg041	15	12,2	11,8	6,8	8,4	8,7	8,7	8,7	27,5	31,0	31,2	28,6	22,5	
USMg049	15	12,2	11,8	7,7	9,1	9,4	9,3	9,3	26,1	31,0	31,2	27,2	22,8	

O pH inicial da suspensão de hidróxido de cálcio, antes da adição do ácido fosfórico, não variou quando avaliado em função da velocidade de adição do ácido e da aplicação do ultra-som. Com a adição do magnésio, observa-se um leve aumento do pH para as amostras sintetizadas sem ultra-som. Na presença do ultra-som, uma leve redução nos valores de pH da suspensão, é observada. Esta variação pode estar relacionada à solubilidade do hidróxido de cálcio e do magnésio em água na temperatura inicial da síntese, como também aos processos cinéticos envolvidos na reação.

Para todas as composições, após a total adição do ácido fosfórico, o pH das suspensões atingiu valores que variaram de 5,3 a 10. As amostras HA2, HAr, US8, US15 e USr apresentaram valores de pH, após a total adição do ácido fosfórico, próximos a 6. De acordo com o diagrama de estabilidade do sistema Ca-P-H<sub>2</sub>O da HA a 25°C (Figura 3), estas amostras se encontram no intervalo no qual a hidroxiapatita deficiente em cálcio é formada [17]. Uma tendência na estabilização nos valores de pH é observada durante o período de 24h.

Pequenas variações no pH foram evidenciadas nas curvas até aproximadamente 70% do volume de ácido fosfórico adicionado. Acima deste valor, as curvas apresentaram uma inflexão seguida de uma queda no pH (Figura 20). Em todos os casos, as pequenas variações observadas no início de inflexão para as amostras em estudo correspondem em média a 0,12 mols de fósforo que reagiu com o hidróxido de cálcio durante a síntese. Comparando este resultado com o número de mols de fósforo calculado para a síntese da HA, observa-se que a quantidade de fósforo consumida até 80% do volume adicionado foi menor que a calculada (Tabela 9). Acima de 80%, tem-se, portanto, um excesso de ácido fosfórico no meio reacional que irá reagir com o hidróxido de cálcio remanescente na suspensão.

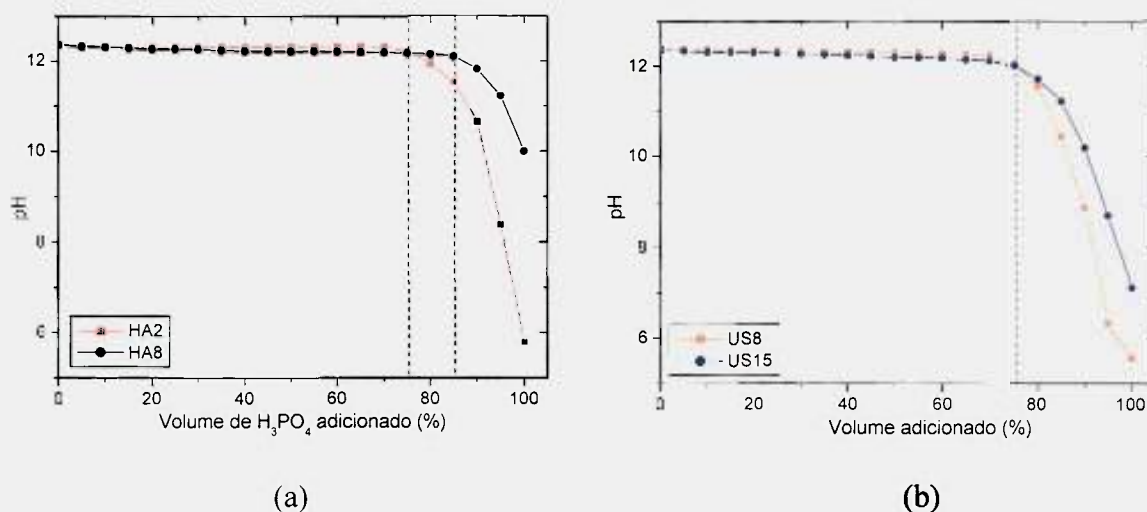


Figura 20. Variação do pH em função do volume de  $H_3PO_4$  adicionado durante a síntese da HA realizada (a) sem e (b) com a presença do ultra-som.

Tabela 9. Número de mols de Ca, P e Mg calculado e número de mols de P consumido em função do volume adicionado para as diferentes composições estudadas.

Amostra	nº de mols inicial			Nº mols de P consumido após % de volume adicionado			
	Ca	P	Mg	70%	75%	80%	85%
HA2	0,2500	0,1500	-	0,105	0,112	0,120	0,127
HA8	0,2500	0,1500	-	0,105	0,112	0,120	0,127
US8	0,2500	0,1500	-	0,105	0,112	0,120	0,127
US15	0,2500	0,1500	-	0,105	0,112	0,120	0,127

A variação da temperatura inicial, observada antes da adição do ácido fosfórico na suspensão, para as diferentes composições, foi atribuída a variações climáticas, tendo em vista que o ambiente físico utilizado para a realização da síntese não foi hermeticamente controlado.

De um modo geral, com a adição do ácido fosfórico a temperatura das suspensões aumentou e após a total adição, atingiu valores máximos variando de 19,4 a 31,6°C, o que confirma o processo exotérmico existente durante a adição do ácido

fosfórico, proveniente de sua dissociação. Este aumento de temperatura favorece, conseqüentemente, a solubilidade do hidróxido de cálcio e do hidróxido de magnésio durante a reação, uma vez que os mesmos apresentam baixa solubilidade quando dissolvido em água a temperatura ambiente [47]. Durante o período de 24h estas temperaturas caíram gradativamente atingindo valores variando entre 15,5 e 25,1°C.

### 5.2.1. Efeito da Velocidade de adição do ácido fosfórico durante a síntese

O efeito da velocidade de adição do ácido fosfórico foi avaliado para as amostras sintetizadas com e sem aplicação do ultra-som. As curvas de pH em estudo apresentaram comportamentos distintos quando o ácido fosfórico foi adicionado em diferentes velocidades.

Quando a adição foi realizada a 2,0 mL/min (HA2), o pH, após adição total do ácido, ficou próximo a 6 e, à medida que a razão de adição aumentou (HA8), o meio se tornou mais alcalino, com pH igual a 10 (Figura 21).

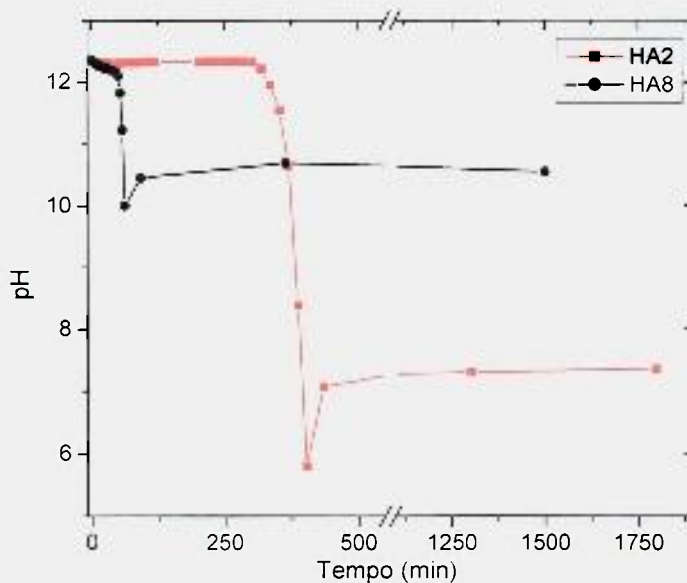


Figura 21. Variação do pH em função do tempo para as amostras HA2 = 2,0 mL/min HA8 = 8,0 mL/min.

O mesmo comportamento foi observado para as amostras US8 e US15. Após a total adição do ácido fosfórico US8 e US15 apresentaram valores de pH = 5,6 e 6,0 respectivamente (Figura 22).

O efeito químico do ultra-som em soluções aquosas (sonólise) produz radicais hidroxílicos ( $\bullet\text{OH}$ ) e átomos de hidrogênio ( $\bullet\text{H}$ ) provenientes dos choques entre as ondas do ultra-som, o que pode estimular a reatividade das espécies químicas, resultando numa aceleração efetiva de reações heterogêneas entre o líquido e o sólido reagente [52,75]. A formação destas espécies heterogêneas tende a influenciar o pH durante toda a síntese.

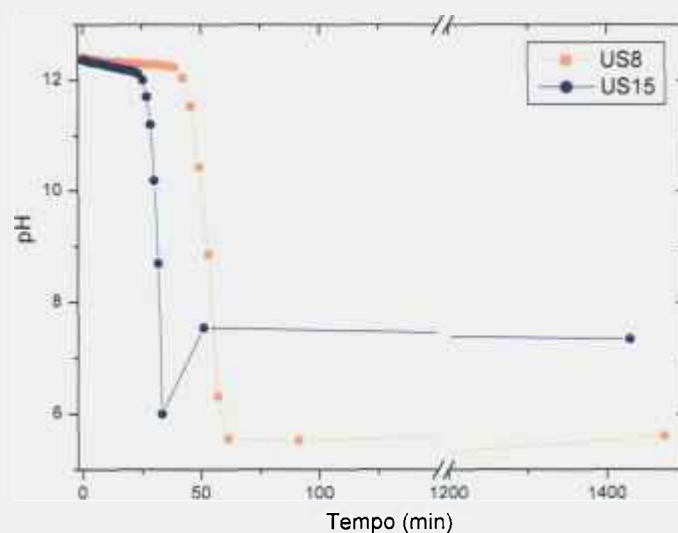


Figura 22. Variação do pH em função do tempo para as amostras sintetizadas na presença do ultra-som. Sendo US8= 8,0 mL/min e US15 = 15,0 mL/min.

O tempo necessário para a adição total do ácido fosfórico na suspensão de hidróxido de cálcio foi proporcional à velocidade de adição estabelecida, ou seja, tempos maiores para velocidades de adição mais baixas (HA2 e US8) e tempos menores para velocidades de adição mais altas (HA8 e US15). Outro ponto a ser observado é que quanto maior o tempo para a total adição do ácido, mais baixo foi o pH final após a total adição (Figura 21 e Figura 22).

Quando o ácido fosfórico foi adicionado em uma única etapa, o pH inicial da suspensão caiu rapidamente para valores próximos a 5. Esta queda abrupta do pH pode ser explicada se levar em consideração a baixa solubilidade do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , onde poucos íons  $\text{OH}^-$  estão dispersos na suspensão. Quando os íons  $\text{H}^+$ , provenientes do ácido fosfórico,

foram adicionados na suspensão de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  de uma única vez, houve o desequilíbrio reacional devido à deficiência do  $\text{OH}^-$  livre na suspensão, diminuindo, conseqüentemente, o pH do meio [38]. Após um determinado tempo, a reação entrou em equilíbrio, aumentando o pH da suspensão (Figura 23).

A dissociação do  $\text{H}_3\text{PO}_4$  à medida que é adicionado na base ocorre em etapas. Este comportamento pode ser confirmado por meio da curva de dissociação do ácido fosfórico (Figura 8) [47]. Uma vez que o ânion precipitado ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) é formado lentamente em soluções contendo o íon metálico ( $\text{Ca}^{2+}$ ), a síntese para a obtenção de HA requer que a adição da solução de fosfato seja realizada em razões mais lentas na suspensão contendo o íon cálcio [52]. É importante ressaltar que a HA estequiométrica é estável em  $\text{pH} > 8$  [39].

Com base nestas informações, analisando o diagrama de estabilidade do sistema Ca-P- $\text{H}_2\text{O}$  da HA a  $25^\circ\text{C}$  (Figura 3) e, avaliando o pH após a total adição do ácido fosfórico (Tabela 8) para as amostras em estudo, as velocidades de adição do ácido fosfórico sugeridas para a síntese da HA foram 8,0 e 15,0 mL/min quando realizadas na ausência e presença do ultra-som respectivamente.

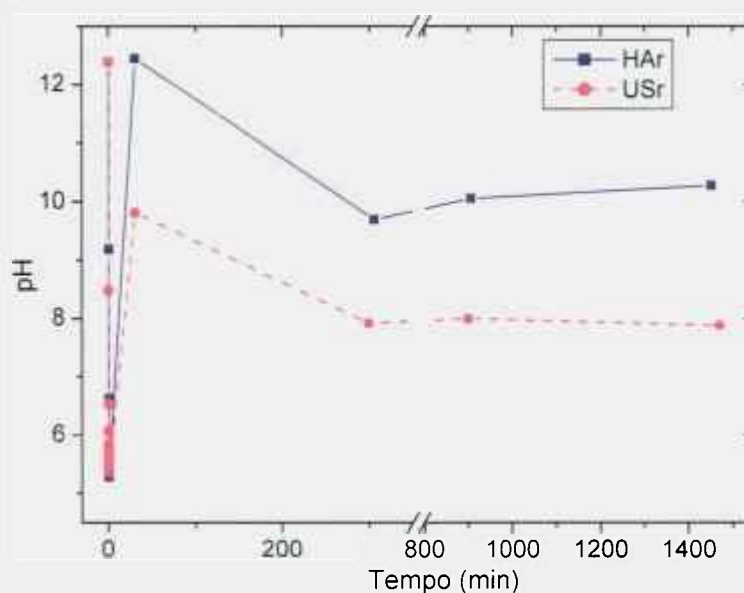


Figura 23. Variação do pH em função do tempo para as amostras Har e USr sintetizadas na ausência e presença do ultra-som.

### 5.2.2. Efeito do pH durante a síntese dos pós de HA-Mg.

O efeito do pH durante a síntese da HA-Mg foi avaliado em função das diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$ . Os valores de pH obtidos durante a síntese estão descritos na Tabela 8.

A substituição do  $Ca^{2+}$  pelo  $Mg^{2+}$  durante a síntese da hidroxiapatita favoreceu uma redução no pH em relação à amostra HA8. À medida que a concentração de  $Mg^{2+}$  aumentou, o pH, após a total adição do ácido, diminuiu gradativamente (Figura 24). O produto de solubilidade do  $Mg(OH)_2$  ( $kps = 1,1 \times 10^{-11}$ ) em água é menor que do  $Ca(OH)_2$ . A redução no pH pode estar associada a esta baixa solubilidade tendo em vista que as hidroxilas presentes no meio reacional ainda estão fortemente ligadas ao magnésio.

Contudo, o mesmo comportamento não foi observado quando a síntese foi realizada utilizando o ultra-som (Figura 25). Um aumento no pH, após a total adição do ácido, foi observado em função da concentração de  $Mg^{2+}$ . Este comportamento inverso está relacionado ao uso do ultra-som, uma vez que as ondas ultra-sônicas ajudam a solubilizar o hidróxido de magnésio liberando  $OH^-$ . A temperatura dentro do banho do ultra-som foi também outro fator que pode ter ajudado a solubilizar o hidróxido de magnésio aumentando, conseqüentemente, o pH das suspensões (Tabela 8).

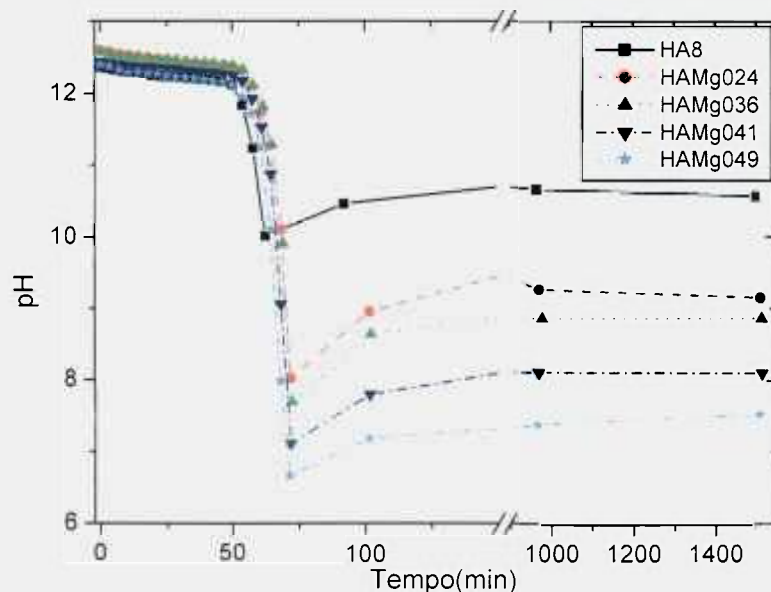


Figura 24. Variação do pH em função do tempo para as amostras sintetizadas com diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$  quando a síntese da HA foi realizada sem ultra-som.

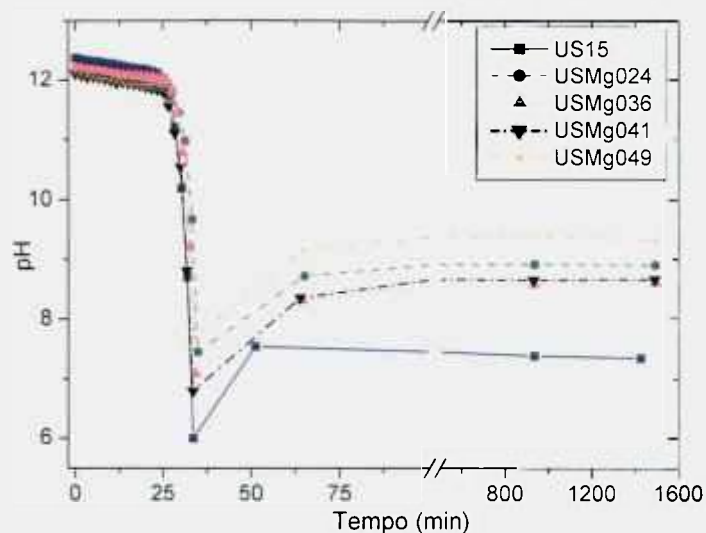


Figura 25. Variação do pH para as amostras sintetizadas com diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$  quando a síntese da HA foi realizada com aplicação do ultra-som.

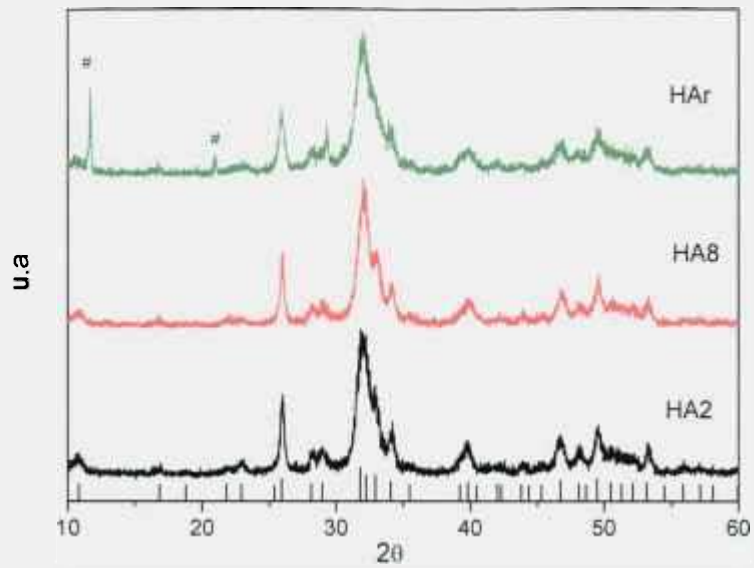
### 5.3. Caracterização dos pós de HA

#### 5.3.1. Difração de Raios X

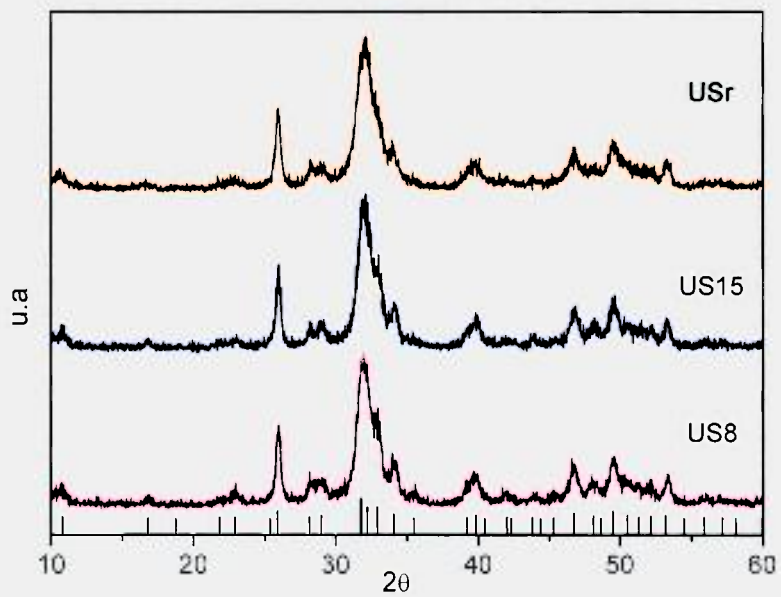
A formação das fases cristalinas dos precipitados após a síntese e dos pós calcinados a  $800^{\circ}C/3h$  foi analisada por difração de raios X. A quantificação de fase presente, para as amostras calcinadas a  $800^{\circ}C/3h$ , foi realizada pelo método de Rietveld.

5.3.1.1. Avaliação da velocidade de adição do ácido fosfórico na formação da fase HA quando sintetizada com ou sem a aplicação do ultra-som.

De um modo geral, todos os pós precipitados nas diferentes velocidades de adição quando sintetizados com ou sem a aplicação do ultra-som, apresentaram picos característicos da fase HA de acordo com os dados da ficha JCPDS 9-432 (Figura 26). A rápida velocidade de adição para amostra HAR resultou numa mistura de fases: HA e de uma fase não identificada em  $2\theta = 11,64^{\circ}$  e  $20,92^{\circ}$ .



(a)



(b)

Figura 26. Difração de raios X para os pós precipitados quando a síntese foi realizada (a) sem ultra-som e (b) dentro do banho de ultra-som. (#) fase não identificada e (l) HA.

Após calcinação a 800°C/3h, HA8 apresentou 100% da fase HA. Para as demais composições, este tratamento térmico favoreceu a formação de uma segunda fase ( $\beta$ -TCP).

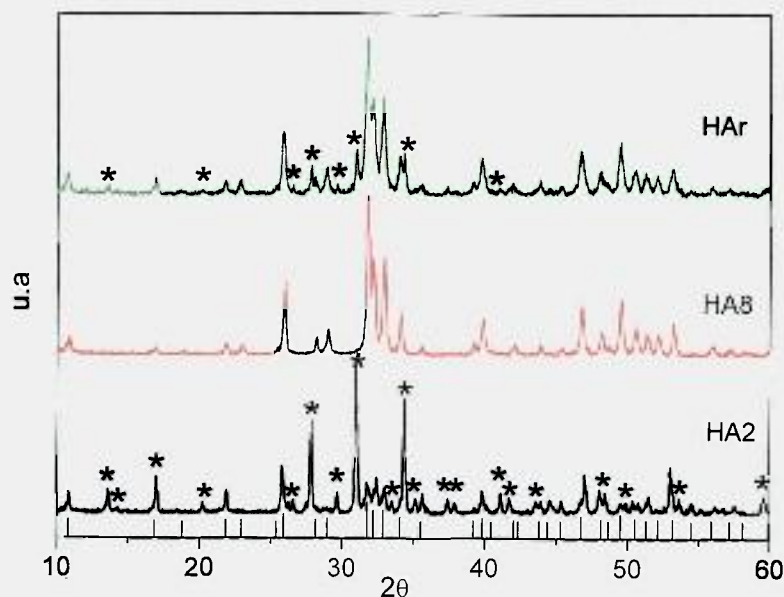


Figura 27. Difração de raios X para os pós calcinados a 800°C/3h. (\*)  $\beta$ -TCP e (|) HA.

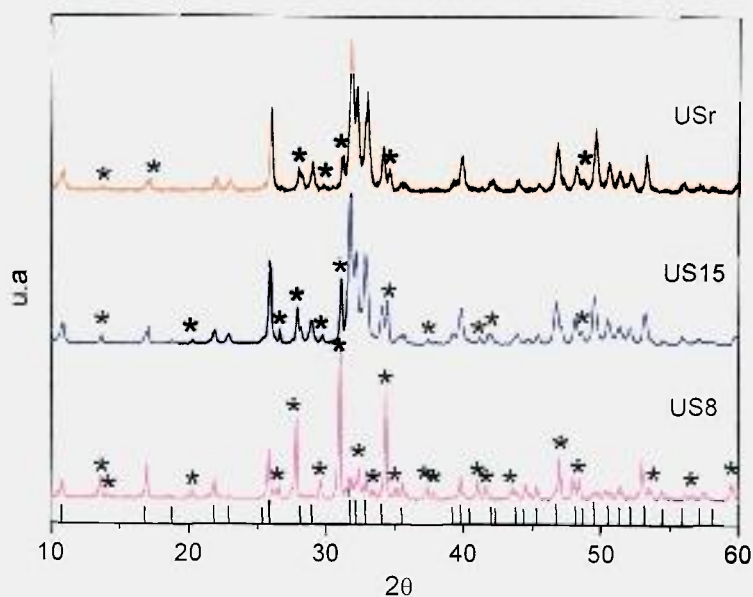
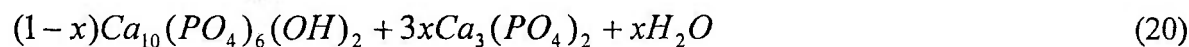
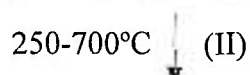
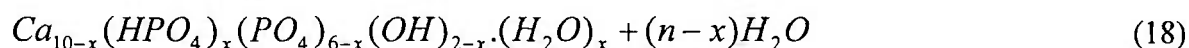
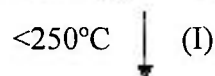
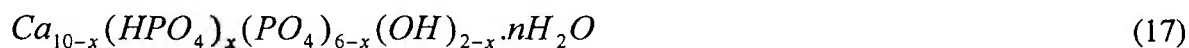


Figura 28. Difração de raios X para os pós calcinados a 800°C/3h quando a síntese foi realizada com ultra-som. (\*)  $\beta$ -TCP e (|) HA.

As apatitas deficientes em cálcio (d-HA,  $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ ,  $0 \leq x \leq 1$ ) com razão Ca/P variando entre 1,5 e 1,67, quando calcinadas à temperatura acima de 700°C, favorecem a formação de misturas bifásicas de HA e  $\beta$ -TCP [9,37,39,83,84]. De acordo com Mortier et. al. [36,84], as transformações de fase da d-HA ocorrem em diferentes temperaturas:



As amostras HA2, HAr, US8, US15 e USr, apresentaram, após a total adição do ácido fosfórico,  $\text{pH} \leq 6$  (Tabela 8), o que favoreceu a formação da fase hidroxiapatita deficiente em cálcio (d-HA), como verificado no Diagrama de estabilidade do sistema Ca-P-H<sub>2</sub>O da HA (Figura 3). Após calcinação a 800°C/3h, esta fase se transformou numa mistura das fases HA e  $\beta$ -TCP.

Na amostra HAr, após calcinação a 800°C/3h, a fase não identificada no pó precipitado se transformou em picos referentes à fase  $\beta$ -TCP (JCPDS 09-169). De acordo com Osaka et. al. [38], esta fase não identificada pode ser um precursor do TCP, e a rápida velocidade de adição do ácido fosfórico favorece a formação de fases metaestáveis. Um segundo tratamento térmico a 1200°C/3h foi realizado nas amostras HA2 e HAr onde se observou uma melhor definição dos picos referentes à fase HA (Figura 29). Com o aumento da temperatura, ocorreu a transformação da fase  $\beta$ -TCP em  $\alpha$ -TCP (JCPDS 29-0359) [22,84].

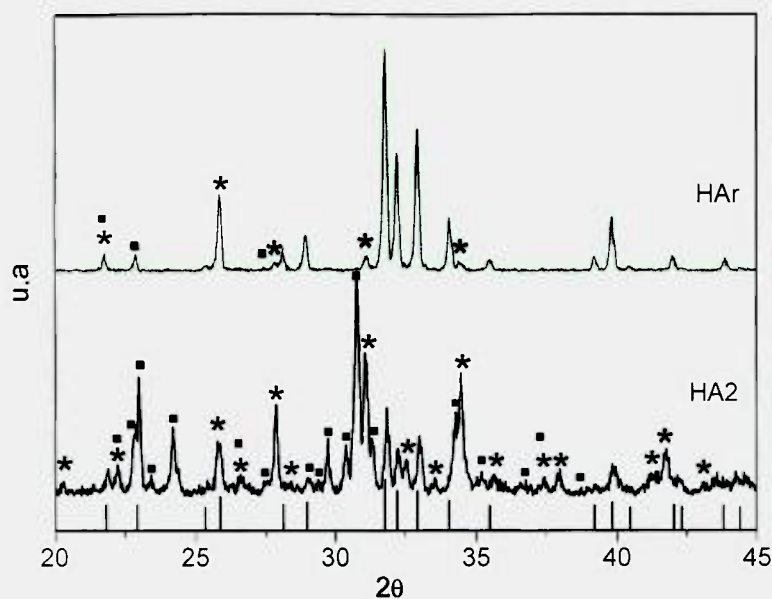


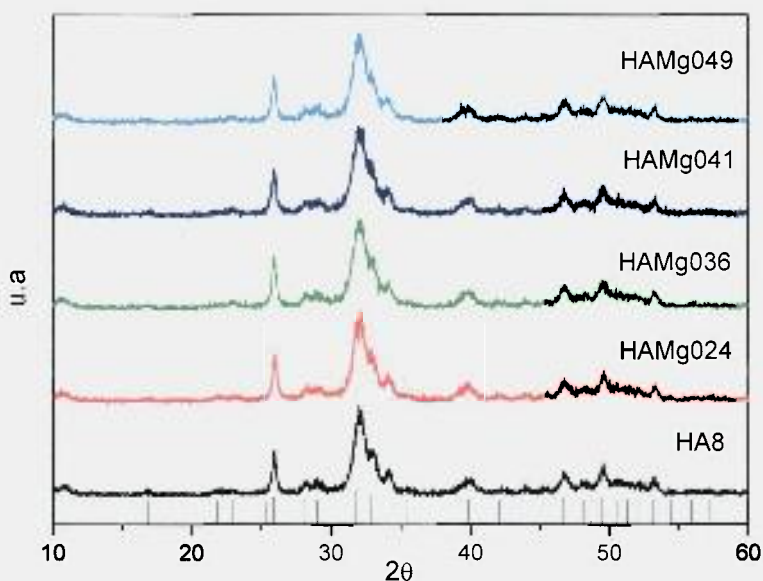
Figura 29. Difração de raios X para as amostras HA2 e HAR calcinadas a 1200°C/3h. (\*)  $\beta$ -TCP, (■)  $\alpha$ -TCP e (|) HA.

Um ponto importante a ressaltar é que, para os pós sintetizados na presença do ultra-som em diferentes velocidades de adição, após a calcinação a 800°C/3h, a fase hidroxiapatita pura não foi obtida. À medida que a velocidade de adição do ácido fosfórico aumentou o pico principal ( $2\theta = 31,02^\circ$ ) da fase  $\beta$ -TCP diminuiu, e os picos referentes à fase HA ( $2\theta = 31,77^\circ$ ) aumentaram: A uma velocidade de adição de 8,0 ml/min (US8), uma maior concentração da fase  $\beta$ -TCP foi verificada. O aumento da velocidade para 15,0 mL/min (US15) favoreceu a uma redução da fase  $\beta$ -TCP. A fase HA, nesta amostra, apresentou uma maior quantidade de picos em relação a US8. A rápida velocidade de adição (USr) favoreceu a formação da fase HA em maior quantidade com picos cristalinos mais definidos e um pouco da fase  $\beta$ -TCP (Figura 28).

A síntese da HA com diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$  (HA-Mg), quando sintetizada na presença do ultra-som, foi avaliada como um possível agente estabilizador da fase HA.

### 5.3.1.2. Estudo do limite máximo de incorporação do $Mg^{2+}$ nos pós de HA quando sintetizados com e sem a presença do ultra-som

A análise de DRX para os pós precipitados de HAMg, quando sintetizados com ou sem a aplicação do ultra-som, indicou a presença da fase HA em todas as composições. Como observado na literatura, os resultados de DRX para os precipitados com e sem magnésio podem resultar em padrões de difração análogos ao da HA de acordo com a ficha JCPDS 9-432 [37]. Para as amostras em estudo, observa-se um alargamento dos picos de difração atribuídos a uma leve diminuição na cristalinidade do pó precipitado quando comparado com as amostras sem magnésio (HA8 e US15) (Figura 30).



(a)

Figura 30. Difração de raios X para os pós precipitados de HAMg quando sintetizados (a) sem ultra-som

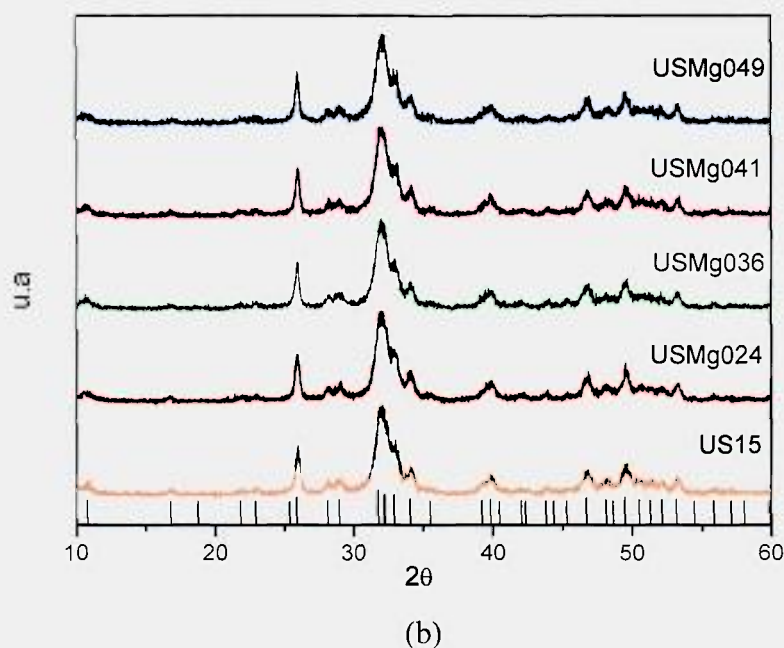


Figura 30 (cont). (b) na presença do ultra-som. (j) HA.

O tratamento térmico destes precipitados a 800°C durante 3 horas levou ao aumento dos picos referentes à fase HA. Na síntese realizada sem a presença do ultra-som, as amostras com 0,41 e 0,49% de  $Mg^{2+}$  em massa apresentaram picos atribuídos à fase  $\beta$ -TCP com  $Mg^{2+}$  (Whitlockite) (Figura 31).

Os valores de  $2\theta$  referentes a esta fase apresentaram um deslocamento considerável quando comparados com os dados da ficha JCPDS 09-169, que podem ser atribuído ao efeito da incorporação do  $Mg^{2+}$  na estrutura do  $\beta$ -TCP, formando uma solução sólida  $(Ca_{1-x}Mg_x)_3(PO_4)_2$  [18,29,37].

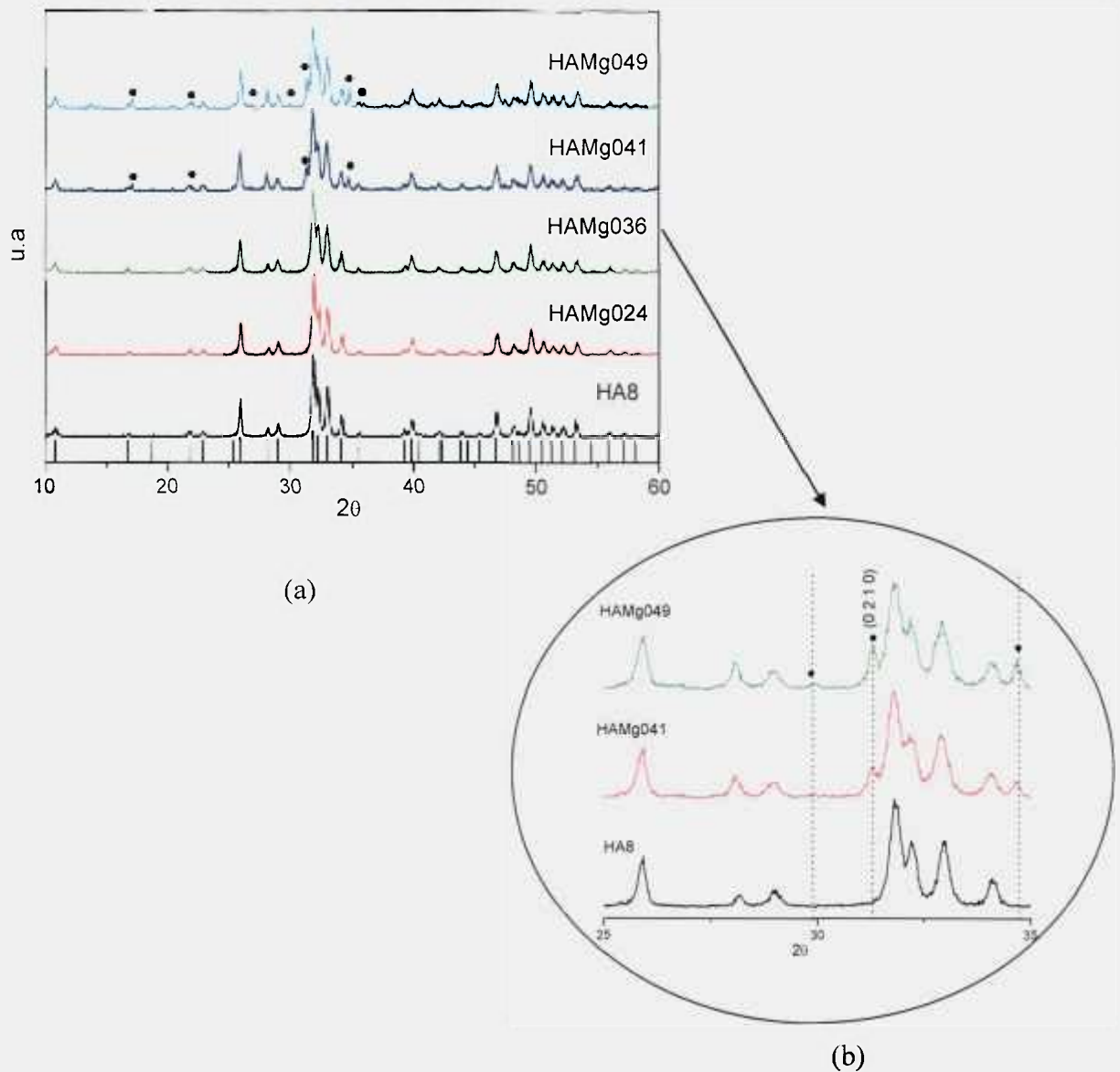


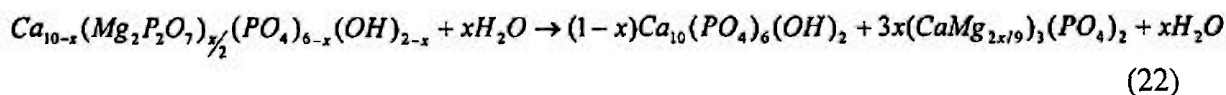
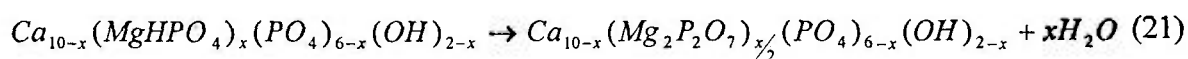
Figura 31. (a) Difração de raios X dos pós de HAMg calcinados a 800°C/3h quando a síntese foi realizada sem ultra-som. (b) Detalhamento do pico principal referentes à fase Whitlockite observada nas amostras HAMg041 e HAMg049. (●) Whitlockite e (○) HA.

Como observado na Tabela 10, os valores de  $2\theta$  no plano (0210), para as amostras HAMg041 e HAMg049 tendem a ficar mais próximos da fase  $\text{Ca}_{2.81}\text{Mg}_{0.19}(\text{PO}_4)_2$  (JCPDS 70-0682) do que da fase  $\beta$ -TCP, o que confirma a incorporação do  $\text{Mg}^{2+}$  na estrutura do  $\beta$ -TCP [29,37].

Tabela 10 Comparação do ângulo de difração ( $2\theta$ ) no plano (0210) entre as amostras sintetizadas e as fichas padrões JCPDS.

Amostra	Plano (0210)
	$2\theta$
JCPDS PDF # (09-169) ( $\beta$ -TCP)	31,026
JCPDS PDF # (70-0682) ( $\text{Ca}_{2,81}\text{Mg}_{0,19}(\text{PO}_4)_2$ )	31,306
HAMg041	32,320
HAMg049	32,320

Kanan et. al. [37] em seus estudos, utilizou as equações propostas por Mortier et al [35] para explicar a incorporação do  $\text{Mg}^{2+}$  na estrutura do  $\beta$ -TCP: a temperaturas abaixo de  $700^\circ\text{C}$ , a fase  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  é formada (reação 21) e, acima de  $720^\circ\text{C}$  as fases HA e Whitlockite ( $(\text{CaMg})_3(\text{PO}_4)_2$ ) são obtidas (reação 22). Para as amostras em estudo, esta mesma equação pode ser utilizada com o mesmo objetivo. A fase  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  não foi verificada nos pós precipitados tendo em vista que ela é obtida a  $200^\circ\text{C}$  [85].



A incorporação do  $\text{Mg}^{2+}$  na HA, quando sintetizada na condição US15 (US + velocidade de adição do ácido fosfórico a 15,0 mL /min) e calcinada a  $800^\circ\text{C}/3\text{h}$ , levou a formação de pós estequiométricos de HA, sendo observada uma melhor definição dos picos referente a esta fase e o desaparecimento da fase  $\beta$ -TCP.

Como reportado na literatura, o limite máximo de substituição do magnésio na estrutura da HA é de até 0,49% em massa. Quando a síntese foi realizada na presença do ultra-som, houve um aumento no limite de incorporação do  $\text{Mg}^{2+}$  na estrutura da HA sem que houvesse a formação de fases secundárias (Figura 32). A adição de até 0,49% em massa de  $\text{Mg}^{2+}$  não interferiu nos resultados observados por DRX o que significa que a

quantidade de  $Mg^{2+}$  adicionada foi suficiente para formar uma solução sólida substitucional.

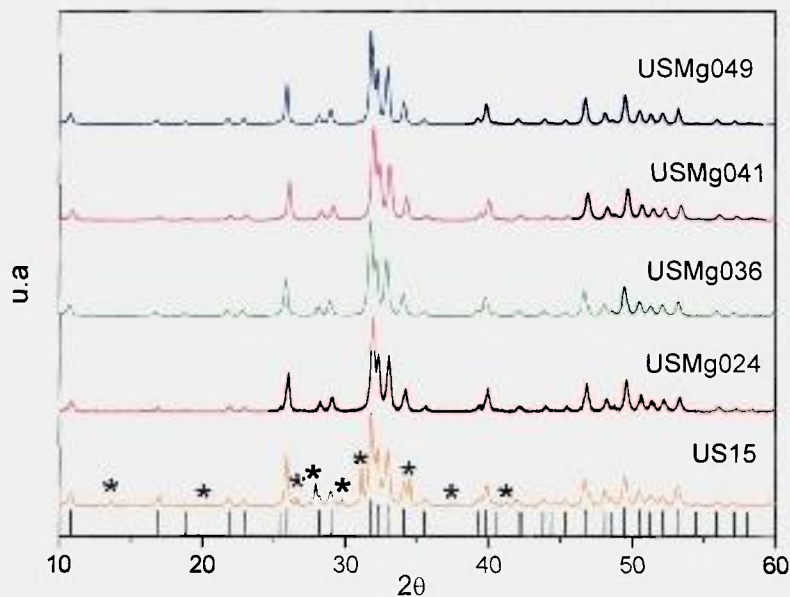


Figura 32. Difração de raios X para os pós com diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$ , calcinados a  $800^{\circ}C/3h$ , quando a síntese foi realizada com ultra-som. (\*)  $\beta$ -TCP e (|) HA.

### 5.3.2. Análise Quantitativa das fases presentes nos pós da HA calcinados a $800^{\circ}C/3h$

Os valores quantitativos das fases, obtidos após refinamento dos dados de DRX pelo método de Rietveld para as amostras HA8, HAr, HAMg024, HAMg036, HAMg041, HAMg049, US15, USMg024, USMg036, USMg041 e USMg049, calcinadas a  $800^{\circ}C/3h$ , estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Porcentagem de fase formada para as diferentes composições sintetizadas sem ultra-som e calcinadas a 800°C/3h.

Amostras	Fase	% de fase formada	Parâmetros de rede (Å)		Volume da célula unitária (Å <sup>3</sup> )	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Índice de qualidade do refinamento S <sup>2</sup>
			a = b	c			
HAr	HA	90,3±0,4	9,4281±0,0003	6,8872±0,0002	530,2±0,1	3,147	1,492
	β-TCP	9,7±0,4	a=10,4569±0,0002 b=37,4812±0,0002	-	3549,9±0,1	3,046	
HA8	HA	100,0	9,4184±0,0004	6,8872±0,0003	529,1±0,1	3,153	1,461
HAMg024	HA	100,0	9,4282±0,0002	6,8876±0,0001	530,2±0,1	3,146	1,474
HAMg036	HA	100,0	9,4216±0,0003	6,8816±0,0002	529,0±0,1	3,170	1,991
HAMg041	HA	86,0±0,5	9,4269±0,0004	6,8857±0,0002	529,9±0,1	3,149	1,297
	W	14,0±0,5	10,3497±0,0003	37,1259±0,0001	3444,0±0,1	3,065	
HAMg049	HA	82,7±0,4	9,4220±0,0002	6,8817±0,0001	529,1±0,1	3,153	1,852
	W	17,3±0,3	10,3554±0,0001	37,1486±0,0001	3449,9±0,1	3,060	

Tabela 12. Porcentagem de fase formada para as diferentes composições sintetizadas com ultra-som e calcinadas a 800°C/3h.

Amostras	Fase	% de fase formada	Parâmetros de rede (Å)			Volume da célula unitária (Å <sup>3</sup> )	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Índice de qualid refinam
			a = b	c				
US15	HA	78,6±0,4	9,4356±0,0003	6,8890±0,0004		531,2±0,1	3,141	1,5
	β-TCP	21,4±0,4	a=10,4109±0,0005 b=37,3407±0,0005	-		3505±0,1	3,085	
USMg024	HA	100	9,4179±0,0002	6,8816±0,0001		528,6±0,1	3,156	1,4
USMg036	HA	100	9,4283±0,0002	6,8869±0,0001		530,2±0,1	3,147	1,5
USMg041	HA	100	9,4399±0,0008	6,8950±0,0009		532,1±0,2	3,135	1,4
USMg049	HA	100	9,4175±0,0002	6,8811±0,0001		528,5±0,1	3,156	1,6

Como observado nas Tabelas 11 e 12, a velocidade de adição do ácido fosfórico, a frequência ultra-sônica e a presença do magnésio em diferentes concentrações influenciaram na porcentagem das fases HA,  $\beta$ -TCP e Whitlockite formadas.

Em relação à velocidade de adição do ácido fosfórico, quando a síntese foi realizada a 8,0 mL/min, a amostra HA8 apresentou 100% da fase hidroxiapatita hexagonal enquanto que a rápida velocidade de adição (HAr) favoreceu a formação de 9,7% da fase  $\beta$ -TCP e 90,3% da fase HA. Quando a síntese foi realizada na presença do ultra-som, 78,6% da fase HA e 21,4% da fase  $\beta$ -TCP foi observada na amostra US15. A ação do ultra-som durante a síntese da HA favoreceu uma maior concentração de picos referentes à fase  $\beta$ -TCP (Figura 33).

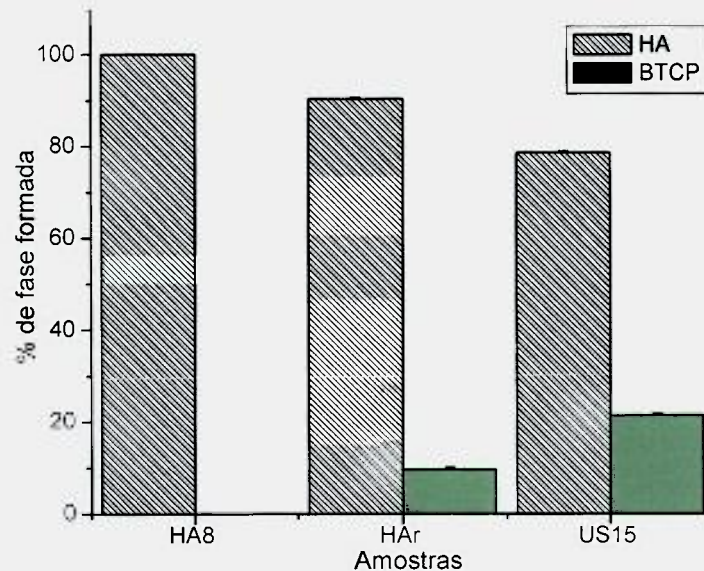


Figura 33. Porcentagens de fase formadas em função da velocidade de adição do ácido fosfórico quando a síntese foi realizada com e sem a presença do ultra-som.

A máxima substituição do cálcio pelo magnésio na estrutura da HA também foi avaliada pelo método de Rietveld. Para as amostras sintetizadas sem e com a presença do ultra-som, a completa substituição do íon  $\text{Ca}^{2+}$  pelo  $\text{Mg}^{2+}$  foi observada nas composições HAMg024, HAMg036, USMg024, USMg036, USMg041 e USMg049, o que favoreceu a formação de 100% da fase HA, levando à formação de uma solução sólida [46] (Figura 34-a e b).

Para maiores concentrações de  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\geq 0,41\%$  em massa) as amostras, quando sintetizadas sem a presença do ultra-som, apresentaram a fase Whitlockite como fase

secundária. À medida que a quantidade de magnésio foi adicionada, a porcentagem desta fase aumentou (Figura 34-a). Este aumento está relacionado ao limite máximo de substituição do  $Mg^{2+}$  dentro da rede da HA. Resultados semelhantes foram também obtidos por Suchanec et. al. [45] o que confirma que o limite máximo de substituição é de até 0,4% em massa de  $Mg^{2+}$ .

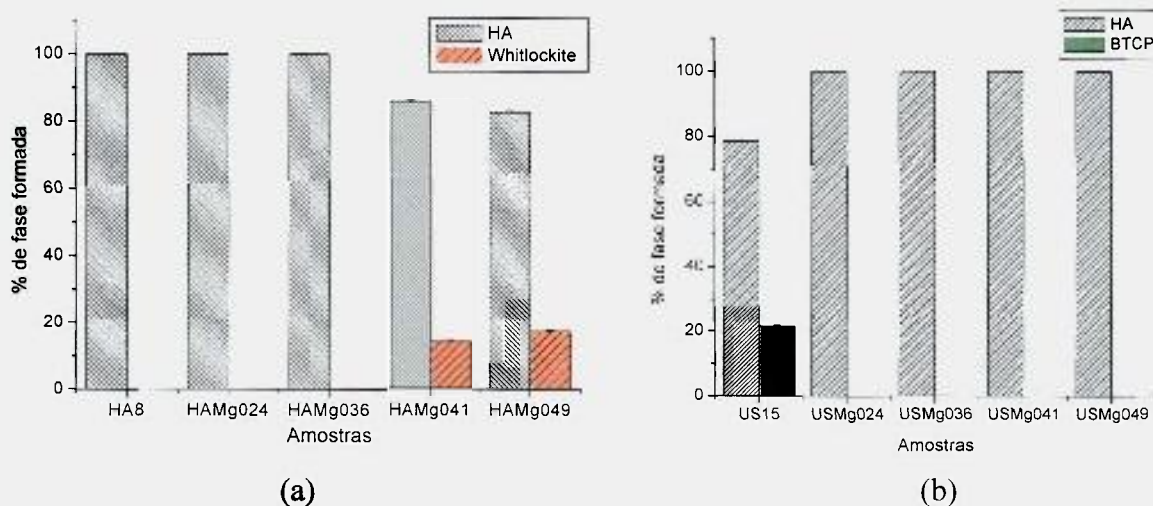


Figura 34. Porcentagens de fase formadas em função das diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$  quando a síntese foi realizada na (a) ausência e (b) presença do ultra-som.

Para todas as composições em estudo, pequenas variações no parâmetro de rede e volume da célula unitária da HA sintetizada foram observadas quando comparadas com os dados teóricos da Hidroxiapatita (Tabela 13).

Tabela 13. Valores estruturais teóricos das fases hidroxiapatita,  $\beta$ -TCP e Whitlockite,

Fases	HA	$\beta$ -TCP	Whitlockite
Tipo de rede	(Hexagonal)	(Ortorrômica)	(Trigonal-Ditrigonal Piramidal)
Parâmetros de rede (Å)	a = b = 9,424 c = 6,879	a = 10,439 b = 37,375	a = b = 10,330 c = 37,103
Volume da célula (Å <sup>3</sup> )	529,1	3527,2	3428,79
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	3,140	3,120	3,110
Referência	ICSD 26204	ICSD 4259	ICSD 6191

Em função da velocidade de adição do ácido fosfórico, observa-se um leve aumento no parâmetro de rede “a” da HA de 9,4184Å (HA8) para 9,4281Å (HAr) e nenhuma variação no parâmetro de rede “c” (Tabela 11). Quando a síntese foi realizada adicionando o ácido fosfórico a 15,0 mL/min e utilizando ultra-som (US15), os dois parâmetros “a” e “c” apresentaram valores superiores ao da HA teórica (Tabela 12 e 13).

A análise do parâmetro de rede e do volume da célula unitária, para a fase HA, quando o magnésio substitui o cálcio na estrutura da hidroxiapatita, apresenta resultados divergentes quando comparados com os dados da literatura [7,9,29,43,86,87].

Com a inserção do  $Mg^{2+}$  na rede da HA, os parâmetros de rede “a” e “c” da HA pouco variaram para as amostras sintetizadas na ausência do ultra-som. Em todas as composições, o parâmetro de rede “c” obtido foi maior que o teórico. O volume da célula unitária para estas composições teve um leve aumento com a incorporação de 0,24% em massa de magnésio seguido de uma redução à medida que a concentração de magnésio aumentou (Tabela 11).

Para as amostras sintetizadas na presença da frequência ultra-sônica, os parâmetros de rede “a” e “c” variaram de forma irregular: quando 0,24% de magnésio foi introduzido, os parâmetros de rede “a” e “c” diminuíram em relação a US15. Com a substituição de 0,36 e 0,41% em massa de  $Mg^{2+}$  os parâmetros aumentaram e após adição de 0,49% em massa de magnésio observou-se uma nova queda. Mudança irregular no volume da célula unitária também foi verificada à medida que a concentração de  $Mg^{2+}$  aumentou (Tabela 12).

De acordo com LeGeroz, a presença do magnésio na fase apatita favorece a diminuição do parâmetro de rede “a” [9]. Yasukawa et. al. [86] observaram em seus estudos que os parâmetros de rede “a” e “c” diminuem com o aumento da concentração de magnésio na estrutura da HA, reduzindo conseqüentemente o volume da célula unitária. Esta mesma observação foi feita por Elliot et. al. [7]. Bigi et. al. [87] e Bertoni et. al. [43] utilizando a mesmo procedimento químico para sintetizar HA com quantidades diferenciadas de  $Mg^{2+}$ , observaram uma leve diminuição no parâmetro de rede “c” e uma mudança irregular no parâmetro de rede “a”. Os resultados obtidos por Enderle et. al. [29] ao sintetizar HA com diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$  via reação no estado sólido, divergiram em relação aos de Bigi et. al. e Bertoni et. al.: uma leve diminuição no parâmetro de rede “a” e uma mudança irregular no parâmetro de rede “c” foram verificadas.

Com base nestas informações, torna-se difícil prever qual o comportamento ideal que o parâmetro de rede e o volume da célula devem seguir quando o magnésio for incorporado na estrutura. Como observado, o método utilizado para a obtenção da HA pode interferir nos resultados obtidos.

Outro fator que pode interferir na variação dos parâmetros de rede e volume da célula unitária é a forma como ocorre a entrada do magnésio na posição do cálcio dentro da estrutura da hidroxiapatita. A célula unitária hexagonal da hidroxiapatita contém 10 íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro na posição I ( $Ca_I$ ) e seis na posição II ( $Ca_{II}$ ). A existência destas duas posições traz conseqüências importantes para a hidroxiapatita que contém impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza [9]. Em soluções sólidas de hidroxiapatita envolvendo dois tipos de cátions, os cátions maiores ocupam preferencialmente a posição II ( $Ca_{II}$ ), enquanto que os cátions menores preferem a posição I ( $Ca_I$ ) [86]. Neste caso, seria de se esperar que o magnésio ocupasse preferencialmente a posição I. Para os resultados obtidos experimentalmente, nada se pode afirmar em relação à preferência do magnésio uma vez que durante o processo de obtenção do pó, rearranjos estruturais podem ter ocorrido devido à variação de alguns parâmetros como, por exemplo, velocidade de adição do ácido e presença do ultra-som durante a síntese.

### 5.3.3. Análise Termogravimétrica e Análise Térmica Diferencial dos pós precipitados

As curvas da Análise Termogravimétrica (ATG) e Térmica Diferencial (ATD) dos pós precipitados em diferentes velocidades de adição do ácido fosfórico, na ausência ou presença do ultra-som e com concentrações variadas de  $Mg^{2+}$  durante a síntese da HA, estão apresentadas nas Figuras 35-40.

Os resultados da Análise Termogravimétrica para os pós em estudo indicam uma variação de perda de massa total ( $m_t$ ) de 12,2% a 12,4% para as amostras HAR e HA8 respectivamente. Para a síntese realizada na presença do ultra-som, a perda de massa variou de 9,7% (US15) a 10,0% (US8). À medida que a velocidade de adição do ácido fosfórico aumentou, a perda de massa total ( $m_t$ ) para as amostras HAR e US15 foi menor.

Quando 0,36 e 0,49% em massa de  $Mg^{2+}$  foram adicionados durante a síntese da hidroxiapatita, a perda de massa total ( $m_t$ ) variou de 12,2% a 12,4% para as amostras

HAMg036 e HAMg049, respectivamente (Figura 37). Quando esta mesma síntese foi realizada na presença do ultra-som, a perda de massa total ( $m_t$ ) variou de 11,4% para USMg036 a 12,4% para USMg049 (Figura 38). Verifica-se um leve aumento da perda de massa à medida que a concentração de  $Mg^{2+}$  aumenta [37,45].

Para todas as amostras em estudo, uma expressiva perda de massa foi observada até aproximadamente 400°C, atribuída à desidratação da água adsorvida e estrutural. A água adsorvida é caracterizada por ser reversível na estrutura, ser instável termicamente entre 25 – 200°C. Nesta temperatura, a perda de massa não afeta os parâmetros de rede. Já a água estrutural, a uma temperatura de 200 a 400°C, torna-se irreversível, causando uma retração na direção do eixo “a” durante o aquecimento [88]. A gradual diminuição da perda de massa observada entre 400 e 1000°C foi atribuída à baixa eliminação dos grupos carbonatos ligados a HA e possíveis transformações estruturais [39,40].

A perda de massa observada entre 800 e 1000°C é típica da HA estequiométrica [42]. Uma queda mais acentuada por volta de 765°C observada em US8 e, ligeiramente em US15 (Figura 36) foi atribuída à perda de água devido à transformação da fase HA em  $\beta$ -TCP [39,49]. Vale ressaltar que esta transformação de fase ocorreu por se tratar de uma hidroxiapatita deficiente em cálcio. Os resultados obtidos são confirmados pela curva de DTG onde se observam picos a 765°C referentes à temperatura em que ocorreu parte da decomposição da HA em  $\beta$ -TCP (Figura 36).

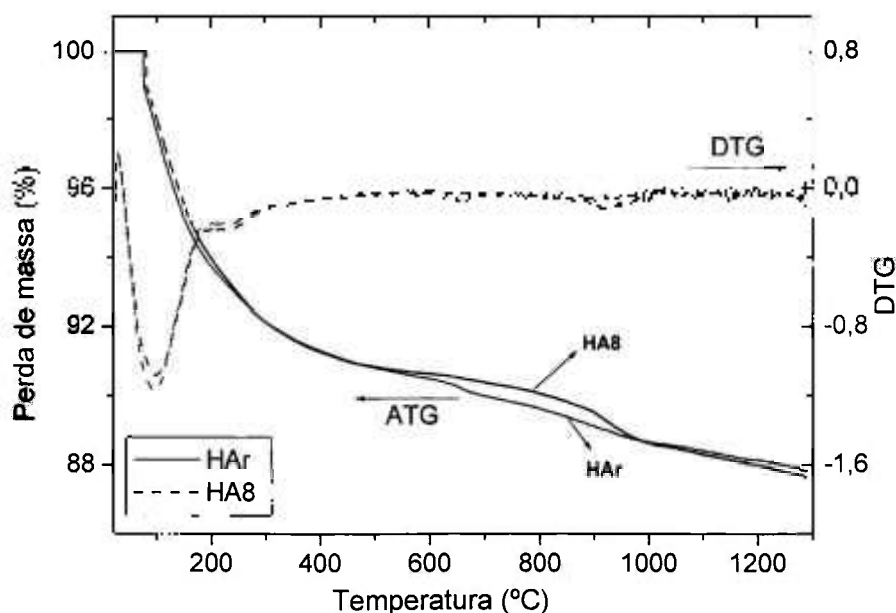


Figura 35. Curva ATG/DTG para os pós precipitados HA8 e HAR.

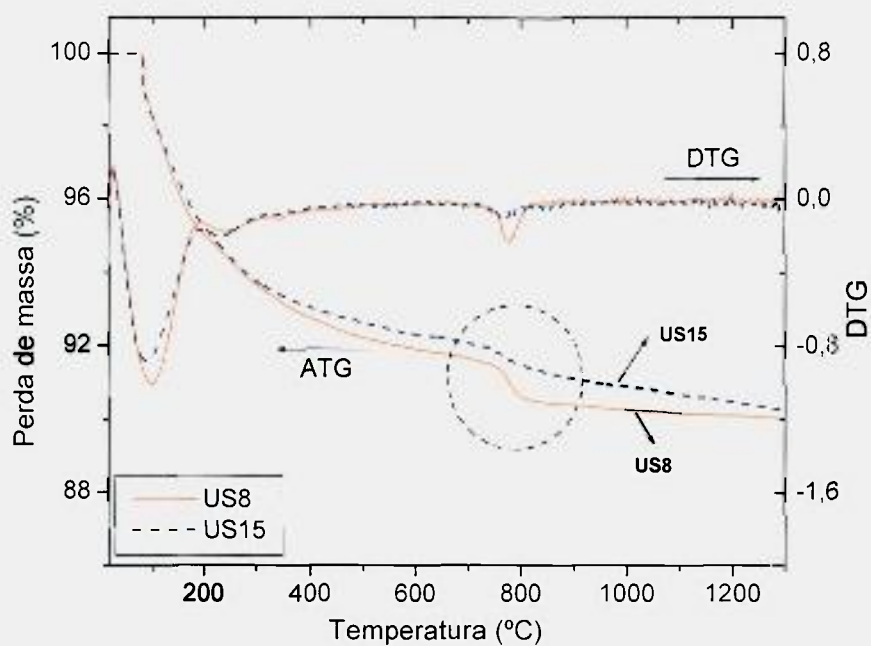


Figura 36. Curva TG/DTG para os pós precipitados US8 e US15 sintetizados na presença do ultra-som.

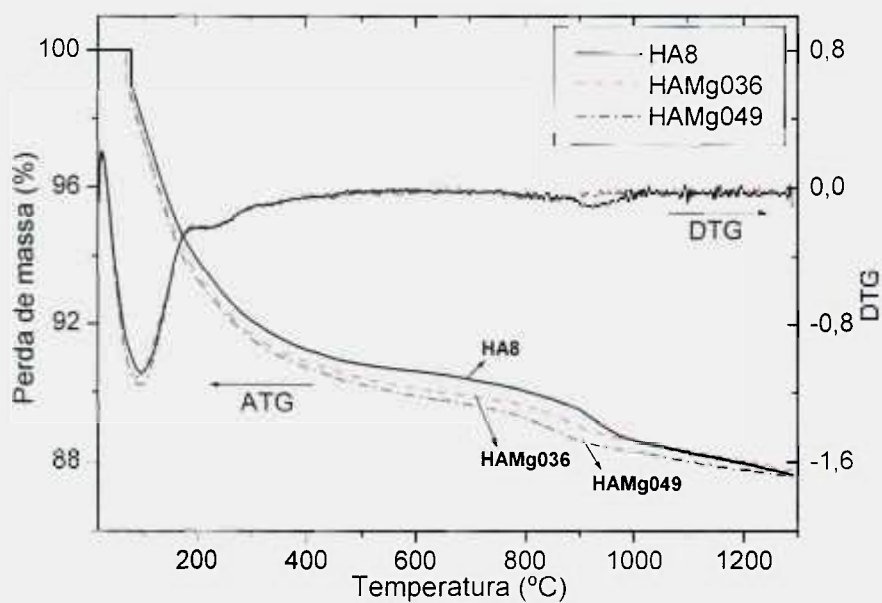


Figura 37. Curva TG/DTG para os pós precipitados HA8, HAMg036 e HAMg049.

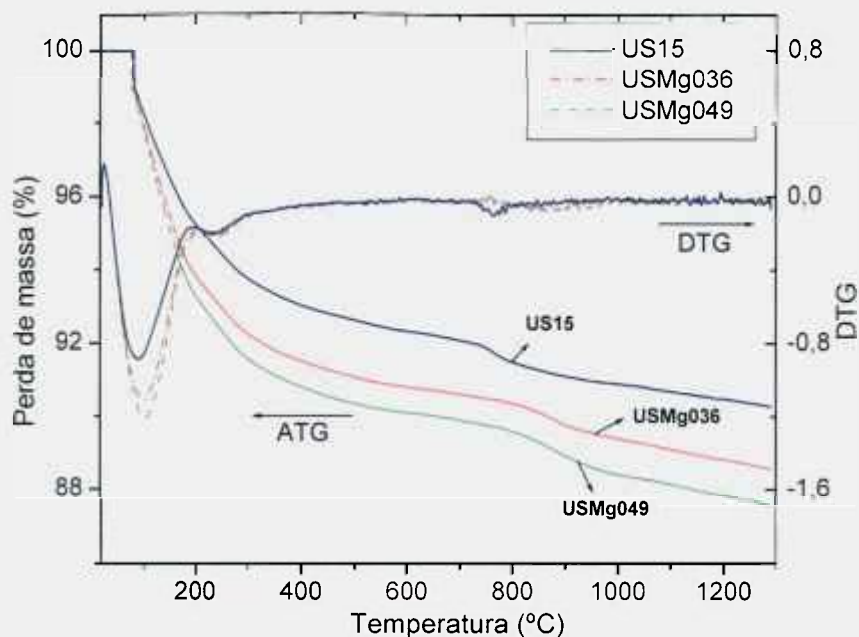


Figura 38. Curva TG/DTG para os pós precipitados US15, USMg036 e USMg049 sintetizados na presença do ultra-som.

Picos endotérmicos correspondentes à perda de água adsorvida e estrutural, eliminação de  $\text{CO}_2$  e temperatura de transformação da HA em  $\beta$ -TCP são observados nas amostras sintetizadas a diferentes velocidades de adição com e sem o uso da frequência ultra-sônica (Figura 39 e 40). Para a amostra HAR, o pico observado em aproximadamente  $900^\circ\text{C}$  foi atribuído à transformação da fase não identificada em  $\beta$ -TCP como verificado no difratograma da Figura 27.

Nas amostras US8 e US15, picos exotérmicos a  $T > 1200^\circ\text{C}$  foram observados e atribuídos à temperatura de transformação da fase  $\beta\text{TCP} \rightarrow \alpha\text{TCP}$  [37].

Para as amostras com 0,36 e 0,49 % em massa de magnésio, nenhum pico adicional foi verificado quando as amostras foram sintetizadas com e sem a presença do ultra-som.

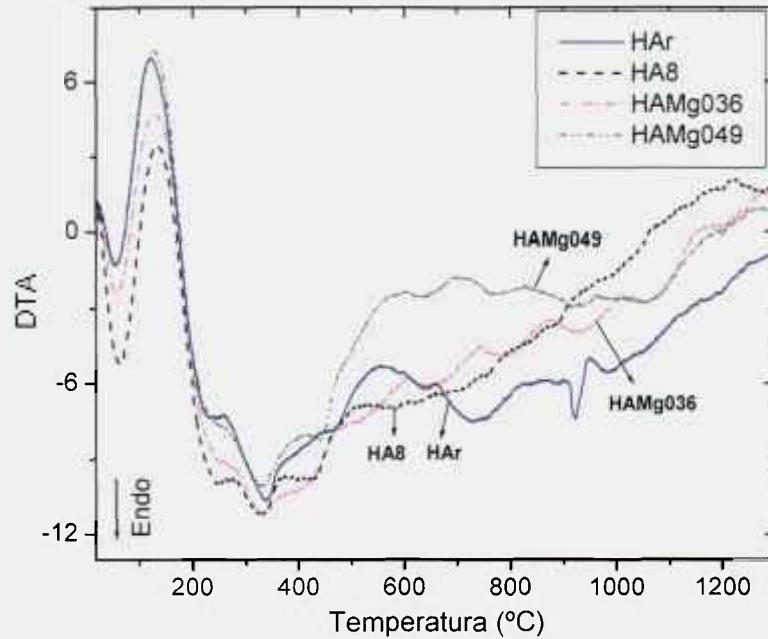


Figura 39. Curva de DTA para os pós precipitados HAr, HA8, HAMg036 e HAMg049.

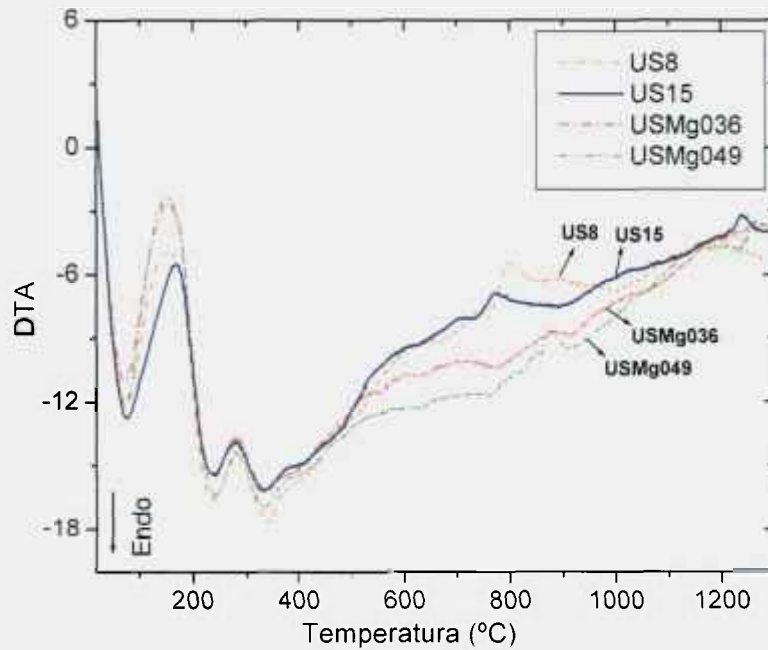


Figura 40. Curva de DTA para os pós precipitados US8, US15, USMg036 e USMg049 sintetizados na presença do ultra-som.

#### 5.3.4. Identificação dos grupos funcionais da HA.

A identificação das bandas correspondentes aos grupos funcionais foi avaliada por meio da técnica de espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-IV) adotando intervalo de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ . Antes da preparação das amostras para a análise, as mesmas ficaram durante 24 horas em uma estufa a 25°C. Este procedimento foi realizado levando-se em conta que a análise dos pós deveria ser realizada em condições iguais e na ausência do  $\text{CO}_2$ . Após este período, os pós precipitados e calcinados a 800°C/3h foram misturados com KBr e prensados na forma de pastilha.

Bandas características da HA atribuídas aos grupos funcionais dos ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) e  $\text{H}_2\text{O}$  foram observadas confirmando a obtenção da fase desejada como mostram as Figuras 41-44 [38,50,63,83,89].

O grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) tem simetria resultante de quatro modos internos ativos no infravermelho: modo de vibração de estiramento assimétrico  $\nu_3$ , caracterizado por uma banda intensa nas regiões de 1033-1038 e 1089-1094  $\text{cm}^{-1}$  e uma banda de intensidade média por volta de 962  $\text{cm}^{-1}$  atribuída às vibrações de estiramento simétrico  $\nu_1$ . A vibração angular  $\nu_4$  é caracterizada por bandas localizadas nas regiões de 565-567 e 601-603  $\text{cm}^{-1}$ . A banda fraca na região de 472-474  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a vibração angular  $\nu_2$  [50,83,84].

Em apatitas biológicas, alguns dos íons  $\text{PO}_4^{3-}$  são substituídos por íons  $\text{CO}_3^{2-}$  e o espectro de IV é bastante sensível para estas substituições dos carbonatos. As amostras em estudo apresentaram bandas nas regiões de 1411-1421 e 1453-1467  $\text{cm}^{-1}$  que foram atribuídas ao íon  $\text{CO}_3^{2-}$  e correspondem a vibrações  $\nu_3$  do C-O em regiões de alta energia. Observa-se ainda uma banda em 877  $\text{cm}^{-1}$  referente à vibração  $\nu_2$  em regiões de baixa energia [50]. Alguns autores atribuem esta banda (877  $\text{cm}^{-1}$ ) ao íon hidrogenofosfato [38,83,89] e não ao íon carbonato. Contudo, como foi observado na literatura, o aparecimento de bandas nas regiões de 1411 e 1467  $\text{cm}^{-1}$  confirma que a banda em 877  $\text{cm}^{-1}$  é característica do grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  [38,83,89]. Uma pequena fração dos íons carbonatos observados neste experimento pode estar relacionada ao processo de precipitação ou da metodologia empregada para a análise [90], porém, não foi possível quantificar o carbonato presente nas amostras. É importante ressaltar que a presença do carbonato na fase apatita favorece o aumento da razão molar Ca/P [59,91].

Após tratamento térmico a 800°C, a HA apresentou duas bandas características do grupo OH nas regiões de 3571-3576 e 630-633  $\text{cm}^{-1}$  [38,89]. Uma banda larga de baixa

intensidade na região de  $3433\text{-}3438\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída a traços de água incorporada na estrutura. Observa-se ainda outra banda na região de  $1635\text{ cm}^{-1}$  referente ao modo de ligação do grupo H-O-H [42].

Nenhuma modificação nos espectros do infravermelho foi observada para os pós precipitados HAR, HA8 e US15, sintetizados em diferentes velocidades de adição do ácido fosfórico e na presença ou ausência do ultra-som (Figura 41).

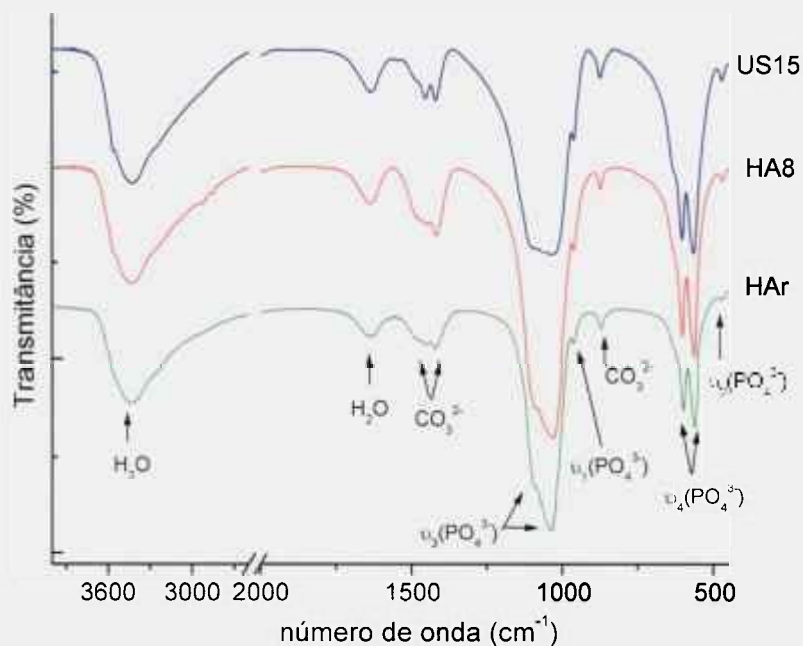


Figura 41. Espectro de Infravermelho para os pós precipitados HAR, HA8 e US15.

Após calcinação a  $800^{\circ}\text{C}$ , observa-se uma variação na intensidade das bandas do grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ . A rápida velocidade de adição promoveu a diminuição da intensidade da banda correspondente ao grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ , quando comparado com HA8. Quando o ultra-som foi utilizado (US15), estas bandas praticamente desapareceram (Figura 42).

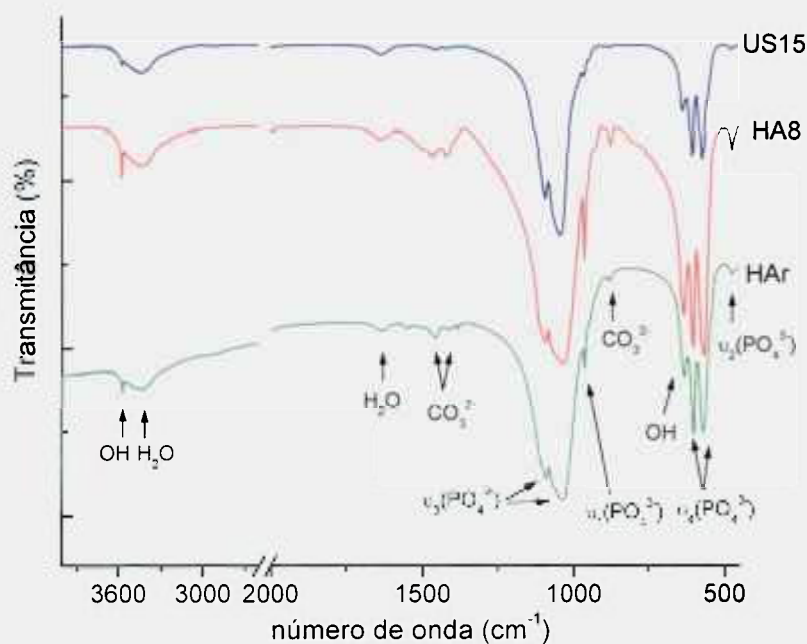


Figura 42. Espectro de Infravermelho para as amostras HAR, HA8 e US15 calcinadas a 800°C/3h.

No espectro de infravermelho para as amostras de HA contendo magnésio em diferentes concentrações e calcinadas a 800°C/3h, observa-se uma ligeira perda de resolução da banda de absorção referente ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  (Figura 43). Este resultado está coerente com dados obtidos na literatura, tendo em vista que a presença do magnésio na estrutura da apatita favorece a diminuição da cristalinidade dos pós e da intensidade das bandas de absorção do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  [9,37].

Já para as amostras sintetizadas dentro do banho de ultra-som, a intensidade destas bandas permaneceu inalterada (Figura 44). Como observado nos resultados de DRX, a ação do ultra-som durante a síntese com magnésio ajudou a estabilizar a fase HA. Devido a esta estabilização, a intensidade dos picos de DRX e das bandas de  $\text{PO}_4^{3-}$  no IV não variou.

Após a inserção do magnésio, a banda correspondente ao grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ , observada em HA8, praticamente desapareceu. Nas amostras sintetizadas na presença do ultra-som, pequenas quantidades de  $\text{CO}_3^{2-}$  foram observadas.

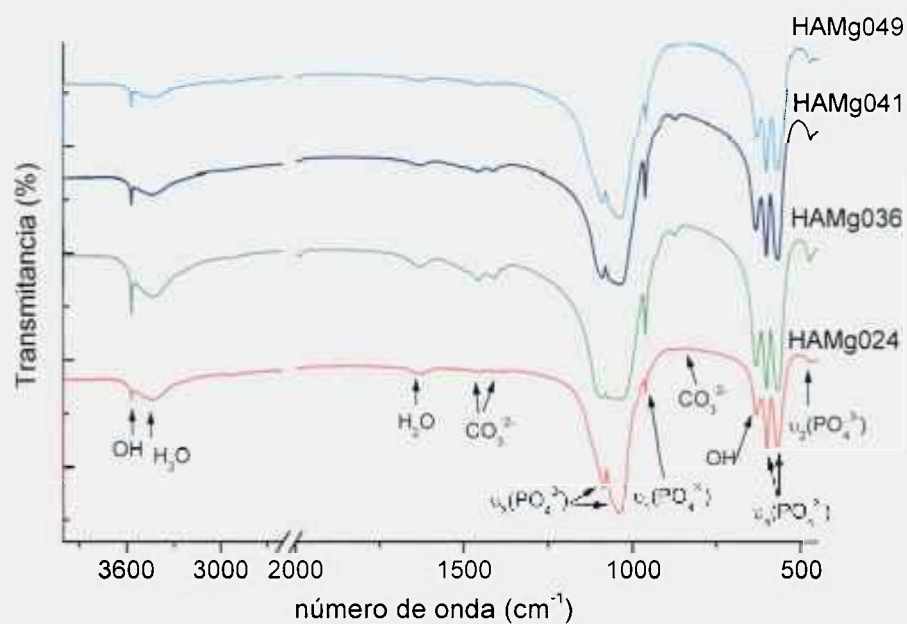


Figura 43. Espectro de Infravermelho para as amostras com  $Mg^{2+}$  calcinadas a  $800^{\circ}C/3h$  sintetizadas na ausência do ultra-som.

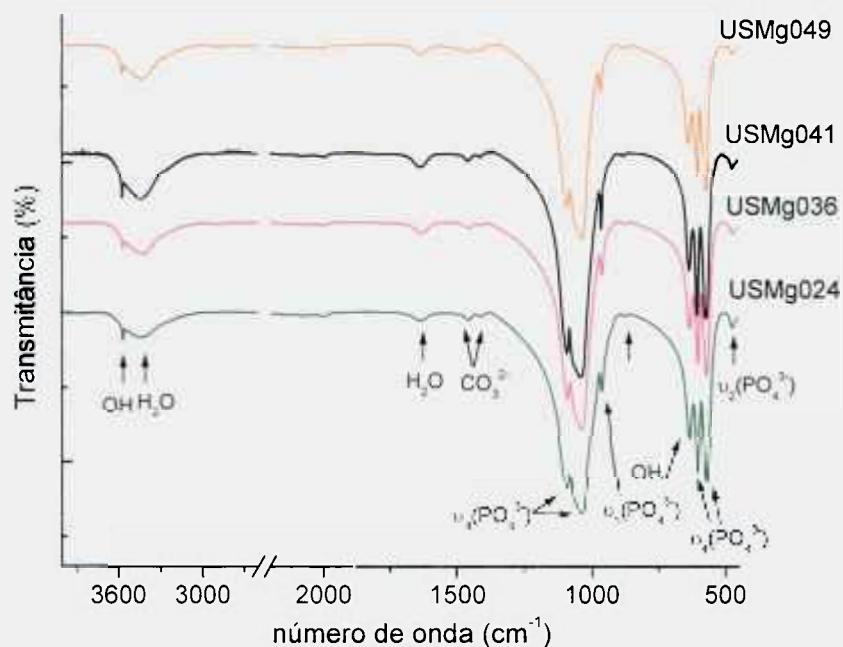


Figura 44. Espectro de Infravermelho para as amostras com  $Mg^{2+}$  calcinadas a  $800^{\circ}C/3h$  sintetizadas na presença do ultra-som.

5.3.5. Análise química, Área de superfície específica, Distribuição do tamanho de partícula e Morfologia do pó para as diferentes composições.

Os resultados da análise química e área de superfície específica para os pós calcinados a 800°C/3h estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Análise química e Área de superfície específica (BET) para as diferentes composições calcinadas a 800°C/3h.

Amostras	N° mols						Ca/P 800°C/3h	(Ca+Mg)/P 800°C/3h	BET (m <sup>2</sup> /g) 800°C/3h
	calculado			após calcinação (800°C/3h)					
	Ca	P	Mg	Ca	P	Mg			
HA2	10	6	0	8,99	5,11	0,03	1,76±0,17	1,77±0,17	13,01±0,06
HA8	10	6	0	9,54	5,48	0,05	1,74±0,09	1,75±0,09	31,64±0,14
HAr	10	6	0	9,20	4,92	0,05	1,87±0,01	1,88±0,01	14,93±0,21
US8	10	6	0	9,93	6,38	0,03	1,56±0,05	1,56±0,05	13,70±0,04
US15	10	6	0	9,70	6,13	0,04	1,58±0,00	1,59±0,00	21,43±0,14
USr	10	6	0	9,64	6,18	0,05	1,56±0,03	1,57±0,03	22,05±0,17
HAMg024	9,9	6	0,1	9,78	6,12	0,16	-	1,62±0,04	20,57±0,11
HAMg036	9,85	6	0,15	9,89	6,23	0,20	-	1,62±0,07	22,46±0,14
HAMg041	9,83	6	0,17	9,82	6,23	0,23	-	1,61±0,08	18,71±0,13
HAMg049	9,8	6	0,2	10,03	6,50	0,26	-	1,58±0,05	19,25±0,07
USMg024	9,9	6	0,1	9,22	5,79	0,13	-	1,61±0,01	-
USMg036	9,85	6	0,15	9,68	6,04	0,18	-	1,63±0,05	20,39±0,12
USMg041	9,83	6	0,17	10,21	6,11	0,20	-	1,70±0,02	22,17±0,12
USMg049	9,8	6	0,2	10,31	6,10	0,23	-	1,73±0,01	23,90±0,05

A análise química para as amostras HA2, HA8, HAr, US8, US15 e USr apresentou uma pequena quantidade de magnésio em sua composição, decorrente de impurezas presentes no hidróxido de cálcio, como por exemplo, o magnésio (Tabela 7). Para estas amostras a razão molar Ca/P variou de 1,56 a 1,87 e são consideradas consistentes com o valor da HA teórica (Ca/P=1,67) [83,84]. As amostras HA2, HA8 e HAr apresentaram razão molar Ca/P maior que 1,67. Este aumento pode estar relacionado à presença de grupos CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> observados nos espectros de infravermelho (Figura 42).

Com a adição do magnésio nos pós de HA, a razão molar (Ca+Mg)/P foi menor quando comparada com HA8, enquanto que um aumento nesta relação, em relação a US15, foi verificado nas amostras sintetizadas na presença do ultra-som.

À medida que a quantidade de  $Mg^{2+}$  foi adicionada, a razão (Ca+Mg)/P também diminuiu. Esta redução pode estar associada ao limite de incorporação do  $Mg^{2+}$  na estrutura da HA uma vez que a fase Whitlockite foi observada nas composições HAMg041 e HAMg049 (Figura 31). É importante ressaltar que a presença do magnésio induz a uma leve diminuição da razão molar Ca/P [43]. Já para a síntese realizada na presença do ultra-som, o comportamento observado foi inverso. A adição do  $Mg^{2+}$ , neste caso, favoreceu o aumento da razão molar (Ca+Mg)/P em relação a US15. Como verificado nas análises de DRX, a presença do magnésio ajudou a estabilizar a fase HA (Figura 32). À medida que a concentração de  $Mg^{2+}$  aumentou, a razão (Ca+Mg)/P também aumentou.

Os resultados da área de superfície específica dos pós, medidos pelo método de BET, para as amostras calcinadas a 800°C/3h, mostram uma redução nos seus valores à medida que a velocidade de adição do ácido fosfórico na suspensão de  $Ca(OH)_2$  tornou-se mais lenta (HA2) e mais rápida (HAr) em relação a HA8 (8,0 mL/min). Na síntese realizada na presença do ultra-som, um aumento significativo na SSA foi observado em função da velocidade de adição ou seja, à medida que a velocidade de adição do ácido tornou-se mais rápida, os pós apresentaram maior valores de SSA. A aplicação do ultra-som durante a síntese da HA, neste caso, ajudou a formar pós mais finos e, conseqüentemente, mais reativos, devido ao efeito da cavitação acústica.

A redução na área de superfície específica observada nas amostras HA2 e HAr em relação a HA8 pode estar relacionada à presença da fase  $\beta$ -TCP. A quantidade de picos referente a esta fase também deve influenciar a área de superfície específica dos pós. Como observado nos resultados de DRX, as amostras US8, US15 e USr apresentaram uma menor quantidade de picos referente a fase  $\beta$ -TCP à medida que a velocidade de adição do ácido aumentou.

Na presença do magnésio, os resultados de BET para os pós sintetizados sem ultra-som apresentaram dois comportamentos distintos, onde se observou um aumento da área de superfície específica para os pós com até 0,36% em massa de  $Mg^{2+}$  adicionado na HA, e uma redução significativa para valores acima de 0,41% em massa a qual foi atribuída à formação da fase Whitlockite (Figura 30). Já para as amostras sintetizadas com

aplicação do ultra-som, a área de superfície específica para estes pós aumentou com o aumento da concentração de  $Mg^{2+}$  na HA.

A distribuição do tamanho de partículas e/ou aglomerados, obtida pelo método de Difração à Laser, foi avaliada em função do uso ou não do ultra-som durante a síntese da HA e das diferentes concentrações de magnésio na HA, quando a síntese foi realizada na ausência ou presença do ultra-som (Tabela 15). Este método fornece resultados relacionados ao estado de aglomeração dos pós. Normalmente, partículas de dimensões pequenas quando suspensas em meio líquido tendem a se movimentar de forma muito rápida e aleatória, em decorrência do impacto das moléculas do líquido contra a superfície, o que facilita a aglomeração [92].

Para as composições em estudo, observa-se uma distribuição de caráter polidisperso com diâmetro médio variando de 18,87 a 27,23  $\mu m$ . O uso do ultra-som durante a síntese da HA resultou em um diâmetro médio de partícula inferior ao da amostra HA8. A presença do magnésio nas condições estudadas pouco interferiu nos resultados de distribuição do tamanho de partículas. Curvas representativas da distribuição granulométrica dos pós estão apresentadas na Figura 45.

Tabela 15. Diâmetro médio de partícula e/ou aglomerado para as amostras calcinadas a 800°C/3h.

Amostras	Diâmetro médio de partícula e/ou aglomerado			Diâmetro médio ( $\mu m$ )
	10%	50%	90%	
HA8	1,99	22,07	59,32	27,23
HAMg024	2,28	20,81	48,40	23,31
HAMg036	2,34	22,19	51,92	24,91
HAMg041	2,31	20,22	46,42	22,46
HAMg049	2,49	14,04	45,81	20,33
US15	2,24	14,93	39,75	18,87
USMg024	2,22	19,70	51,42	23,84
USMg036	2,38	23,76	53,63	25,92
USMg041	2,51	23,90	56,41	26,89
USMg049	2,35	21,36	51,42	24,51

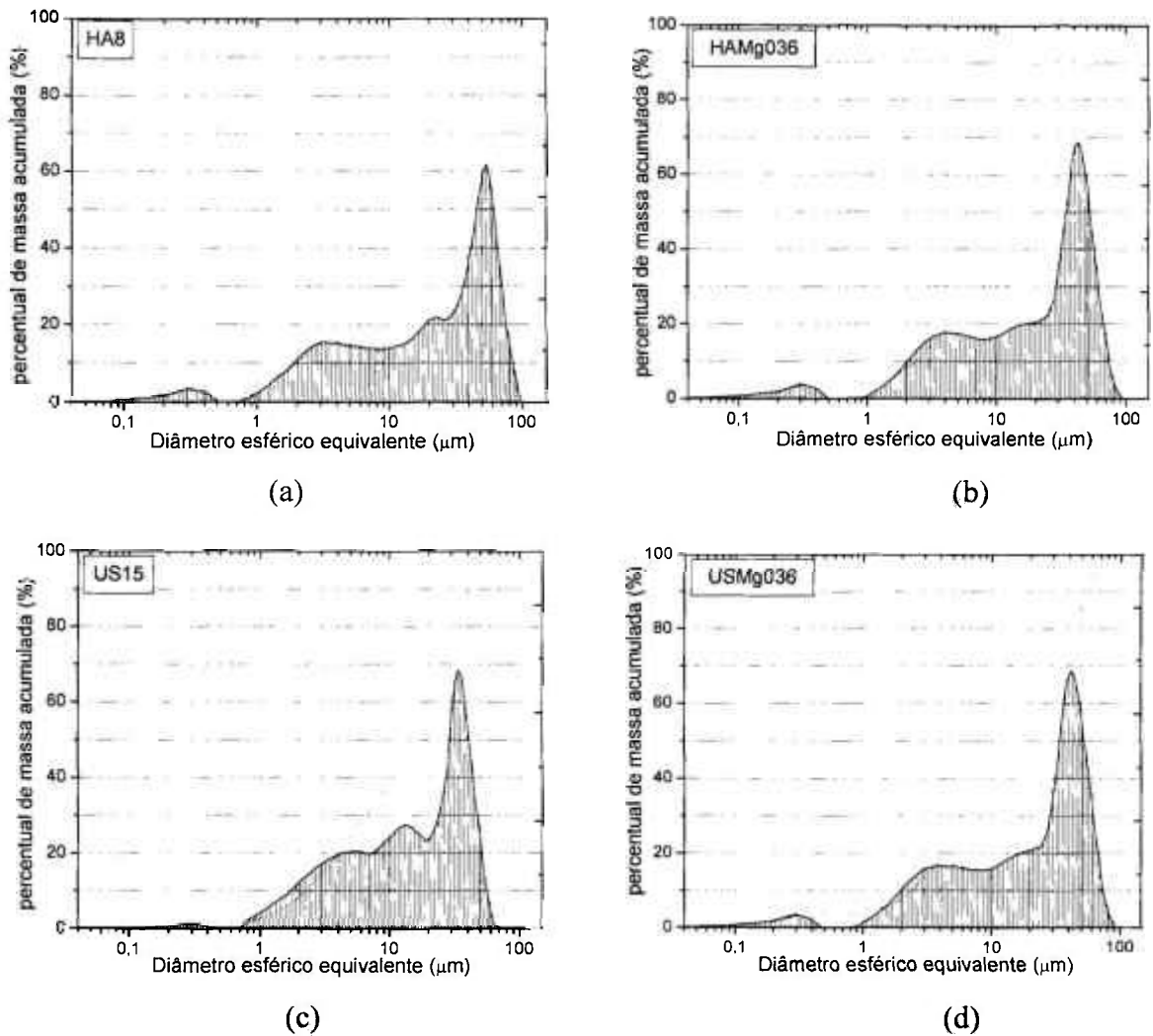


Figura 45. Curvas de distribuição do tamanho de aglomerados e/ou partículas das amostras (a) HA8, (b) HAMg036, (c) US15 e (d) USMg036 calcinadas a 800°C/3h.

Analisando as micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), pode-se confirmar a presença de aglomerados nas amostras calcinadas a 800°C/3h, o que é uma tendência comum para pós finos obtidos durante reações químicas. De modo geral, pós nanométricos foram observados em todas as composições (Figura 46- 50).

Como observado na Figura 46, a amostra HAR apresentou morfologia diferenciada em relação a HA8. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para estas composições indicam a presença de placas com contornos de grão proeminentes e aspecto rugoso para HAR, enquanto que na amostra HA8 verificou-se apenas a formação de aglomerados (Figura 47). A mudança na morfologia destes pós, observada por MEV, pode estar associada à velocidade de adição do ácido fosfórico utilizada durante a síntese como também a presença de uma material bifásico (HA e  $\beta$ -TCP) presentes em HAR.

Em relação à amostra sintetizada com ultra-som (US15), os resultados obtidos por MET mostram um grau de aglomeração semelhante à amostra HAr (Figura 48). Este comportamento semelhante pode ser atribuído à mistura de fases, como foi observado em HAr.

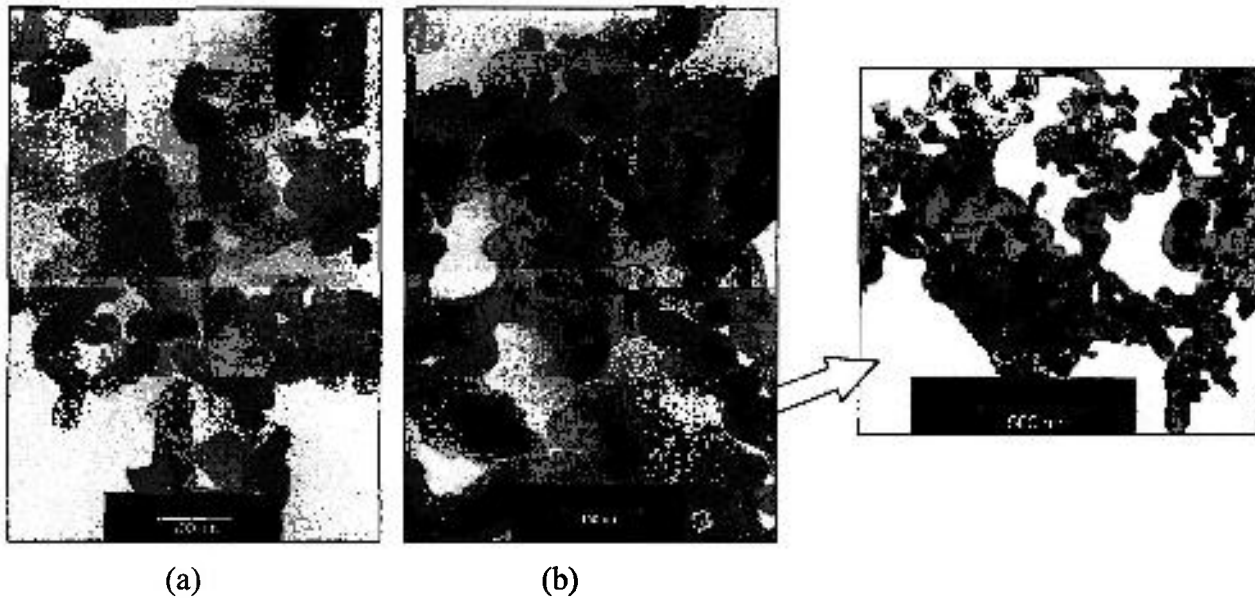


Figura 46. Microscopia eletrônica de transmissão das amostras (a) HA8 e (b) HAr calcinadas a 800°C/3h.

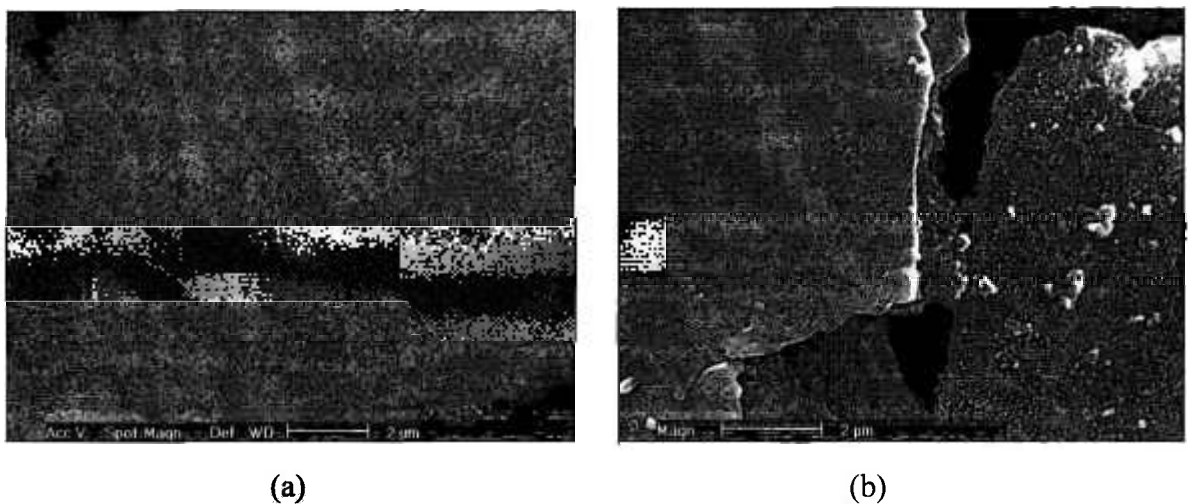


Figura 47. Microscopia eletrônica de varredura das amostras (a) HA8 e (b) HAr calcinadas a 800°C/3h.

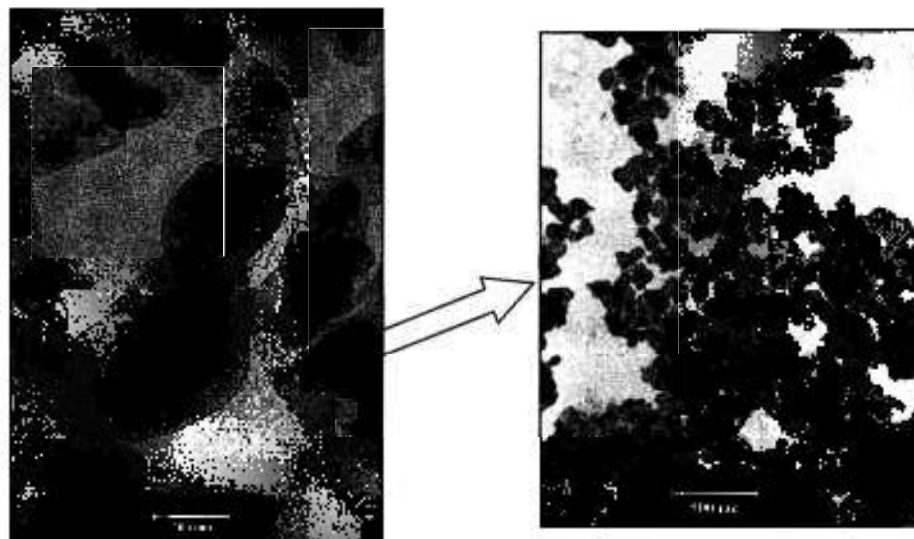


Figura 48. Microscopia eletrônica de transmissão para a amostra US15 calcinada a 800°C/3h.

As micrografias dos pós de HAMg sintetizados na ausência ou presença do ultra-som estão apresentadas nas Figuras 49 e 50. As diferentes concentrações de magnésio nas amostras não interferiram no grau de aglomeração dos pós e no tamanho das partículas.

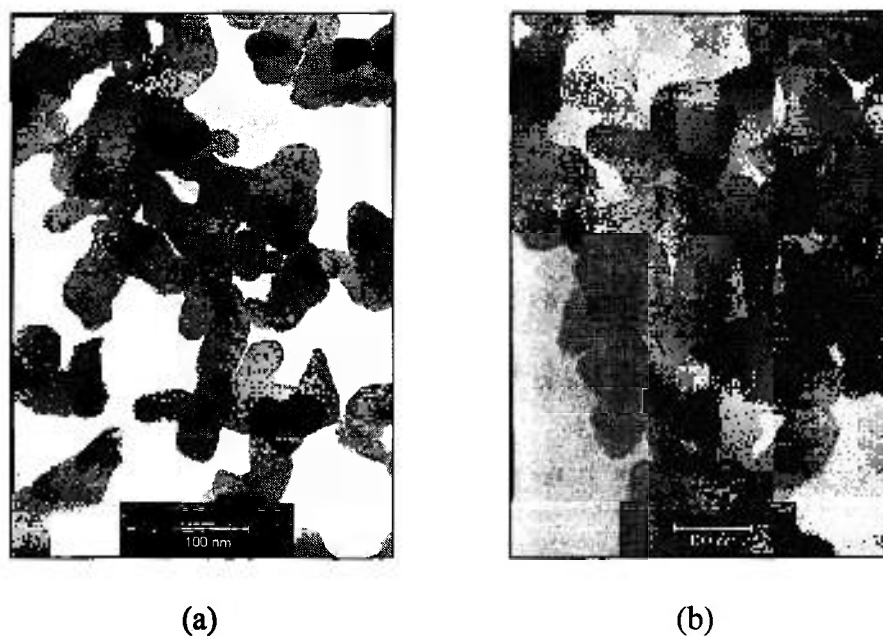


Figura 49. Microscopia eletrônica de transmissão para as diferentes composições calcinadas a 800°C/3h. Sendo (a) HAMg024 (b) HAMg036 (c) HAMg041 e (d) HAMg049.



(c)



(d)

Figura 49. (cont). Microscopia eletrônica de transmissão para as diferentes composições calcinadas a 800°C/3h. Sendo (c) HAMg041 e (d) HAMg049.



(a)



(b)

Figura 50. Microscopia eletrônica de transmissão para as diferentes composições calcinadas a 800°C/3h. Sendo (a) USMg036 (c) USMg049.

## 5.3.6. Estudo da densificação dos corpos cerâmicos de HA

Geralmente, a temperatura utilizada para a sinterização dos pós de hidroxiapatita varia de 1150 a 1350°C, dependendo da forma como o material foi processado [93]. Contudo, a temperatura comumente utilizada para estudar a densificação da HA é de 1100°C [8,94].

Com o objetivo de avaliar a densidade das composições com diferentes concentrações de magnésio quando sintetizadas na ausência ou presença do ultra-som, estabeleceu-se a temperatura de 1100°C a uma razão de 10°C/min e patamar de 1 hora.

Para cada composição foram feitas quatro amostras, e os valores tabelados correspondem às médias dos valores obtidos, com seus respectivos desvios, para as medidas de densidade e perda de massa. Os valores de densidade obtidos para cada amostra utilizando a densidade teórica da HA (3,156 g/cm<sup>3</sup>) e suas respectivas perdas de massa estão dispostos na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de densidade e perda de massa das diferentes composições.

Amostras	Densidade ( $\rho$ )		Perda de massa ( $\Delta m$ ) %
	à verde ( $\rho_v$ )%	Aparente ( $\rho_a$ )%	
HA2	55,5±0,3	97,2±0,1	1,4±0,0
HA8	54,2±0,2	99,0±0,1	3,3±0,0
HAr	53,9±0,5	75,8±0,2	1,9±0,0
US8	55,8±0,3	97,2±0,7	1,1±0,1
US15	53,9±0,1	87,9±0,2	2,3±0,1
USr	53,2±0,2	81,5±0,6	2,9±0,1
HAMg024	51,9±0,6	86,2±0,2	2,2±0,0
HAMg036	50,9±0,5	83,4±0,2	2,1±0,1
HAMg041	51,4±0,2	92,1±0,3	2,1±0,2
HAMg049	52,8±0,3	93,8±0,4	1,9±0,0
USMg024	47,7±4,9	85,4±0,0	2,1±0,0
USMg036	51,7±0,2	82,2±0,3	1,5±0,9
USMg041	50,8±0,4	82,9±0,1	2,2±0,0
USMg049	51,7±0,1	82,9±0,1	2,3±0,3

Comparando as amostras sintetizadas em diferentes velocidades de adição do ácido fosfórico, na ausência ou presença do ultra-som, observa-se uma tendência na redução da densidade à verde à medida que a velocidade de adição do ácido aumenta. Para as amostras sintetizadas com diferentes concentrações de magnésio, não foi possível fazer uma correlação dos resultados obtidos com a concentração de magnésio adicionada.

A porcentagem de perda de massa para todas as composições durante o processo de sinterização variou de 1,4 a 3,3% sendo observada uma maior perda de massa para a amostra HA8.

De todas as amostras sinterizadas a 1100°C/1h, HA8 foi a que apresentou maior densidade, ou seja, 99% da densidade teórica. De um modo geral a densidade aparente para as amostras sintetizadas em diferentes velocidades de adição e na ausência ou presença do ultra-som variou de 75,8 a 99,0%. Estes resultados estão coerentes com os valores de área de superfície específica obtida para cada pó.

A presença da fase  $\beta$ -TCP nas amostras HA2, HAR, US8, US15 levou a uma redução na densidade aparente em relação a HA8. Para as amostras HAR e US15 esta redução pode estar associada à presença da fase  $\alpha$ -TCP detectada no DRX para HAR (Figura 51-a). De acordo com a literatura, a presença da fase  $\alpha$ -TCP nos compostos de HA prejudica muito mais a densificação da HA do que a presença da fase  $\beta$ -TCP [94].

Os resultados acima apresentados estão coerentes com os observados na literatura onde uma menor sinterabilidade dos corpos cerâmicos é obtida quando misturas bifásicas estão presentes [24,94].

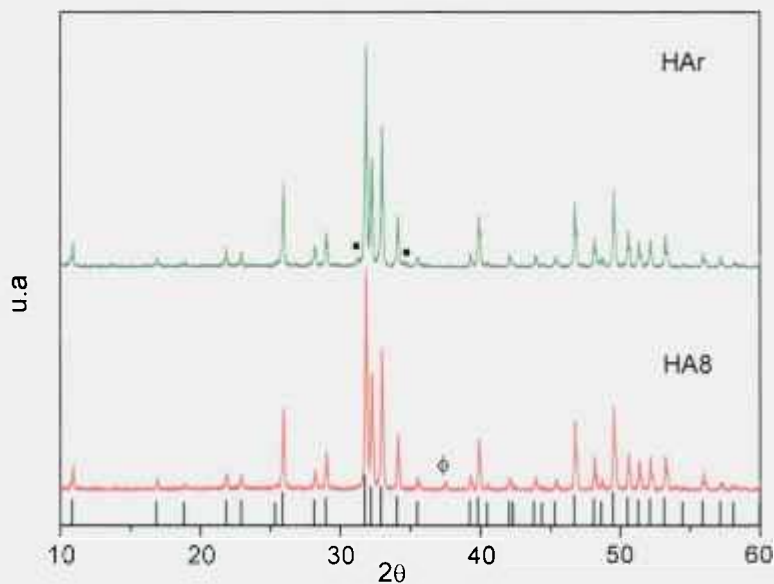
Para as amostras com até 0,36% em massa de magnésio, sintetizadas na ausência e presença do ultra-som, observa-se valores de densidade inferiores ao das amostras puras HA8 e US15. Acima de 0,36% em massa de magnésio, um novo aumento nas densidades foi observado mantendo-se praticamente constante nas composições com 0,49% em massa.

As pastilhas sinterizadas foram fraturadas e analisadas por DRX e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Os resultados de DRX das pastilhas após sinterização estão apresentados nas Figuras 51 e 52. Todas as amostras apresentaram picos característicos referentes à fase HA. Outras fases como CaO,  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP também foram verificadas nas composições estudadas.

Geralmente, as apatitas preparadas em solução altamente alcalina na presença do ar contêm  $\text{CO}_3^{2-}$  e podem formar CaO e HA após sinterização acima de  $900^\circ\text{C}$  [8]. Para a amostra HA8, sintetizada em  $\text{pH} = 10$ , uma pequena fração de CaO (JCPDS 37-1497) foi verificada. A presença do CaO além de diminuir a temperatura de sinterização da HA melhorou a sua densificação.

Para a amostra HAr, os picos observados nas posições  $2\theta = 31,21^\circ$  e  $34,65^\circ$  característicos da fase  $\alpha$ -TCP, confirmam que ocorreu a transformação da fase  $\beta$  em  $\alpha$ -TCP (Figura-a). A análise de DRX para a amostra US15 não detectou a presença da fase  $\alpha$ -TCP. Possivelmente a quantidade presente desta fase em US15 seja insuficiente, tornando-se indetectável no DRX. Para US15 e US8 picos mais estreitos referentes às fases HA e  $\beta$ -TCP foram observados.



(a)

Figura 51. Difração de raios X para as pastilhas a) HAr e HA8 sinterizadas a  $1100^\circ\text{C}/1\text{h}$ . (○) HA, (Φ) CaO, (■)  $\alpha$ -TCP e (\*)  $\beta$ -TCP

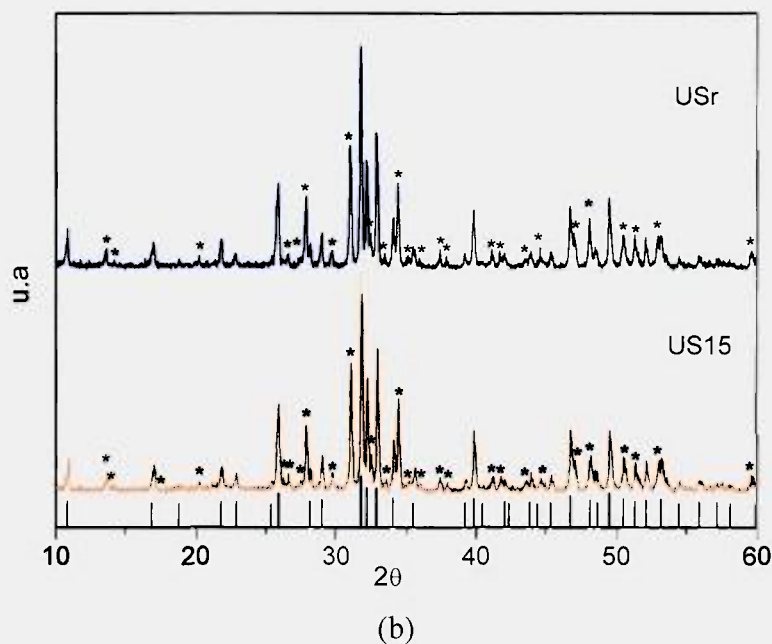


Figura 51. cont. Difração de raios X para as pastilhas b) USr e US15 sinterizadas a 1100°C/1h. (□) HA, (Φ) CaO, (■) α-TCP e (\*) β-TCP.

Para as amostras sintetizadas com magnésio, após a sinterização a 1100°C/1h, a fase Whitlockite foi observada em todas as composições.

Nas amostras sintetizadas sem ultra-som, um aumento na quantidade de picos referente à fase Whitlockite foi verificado à medida que a concentração de magnésio aumentou. Já para as amostras sintetizadas com aplicação do ultra-som, a quantidade de picos referente à fase Whitlockite não variou em função da quantidade de magnésio incorporado na estrutura da HA.

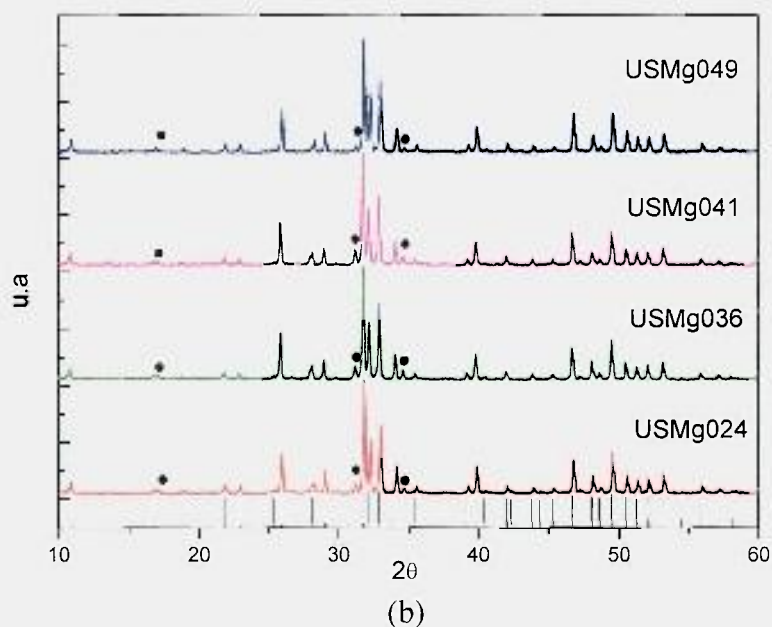
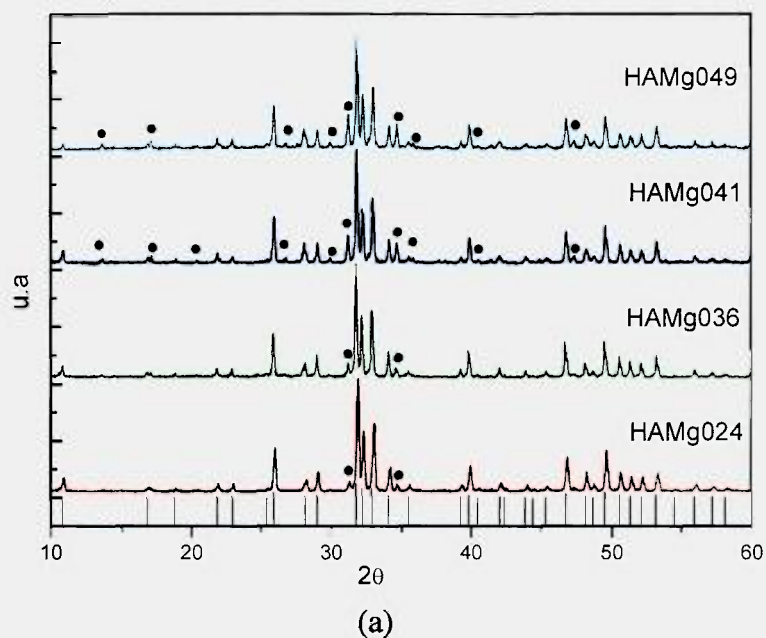


Figura 52. Difração de raios X para as pastilhas sinterizadas com magnésio a  $1100^\circ\text{C}/1\text{h}$ . quando os pós foram sintetizados na (a) ausência e (b) presença do ultra-som. Sendo (□) HA, (●) Whitlockite.

As micrografias das amostras fraturadas, após a sinterização, estão apresentadas nas Figuras 53 - 55. Em todas as micrografias, verificou-se a presença de poros.

As observações microestruturais dos materiais sintetizados em função da velocidade de adição do ácido, da ausência ou presença do ultra-som durante a síntese bem como da incorporação do magnésio, apresentaram diferenças significativas na morfologia dos corpos sinterizados. Contudo, não foi possível identificar as fases  $\beta$ -TCP,  $\alpha$ -TCP e CaO presentes.

A amostra HA8 e USr apresentaram uma melhor densificação em comparação com as amostras HAR e US15. O aumento na quantidade de poros, observado nas amostras HAR e US15, foi associada à baixa área de superfície específica destes pós (Figura 53).

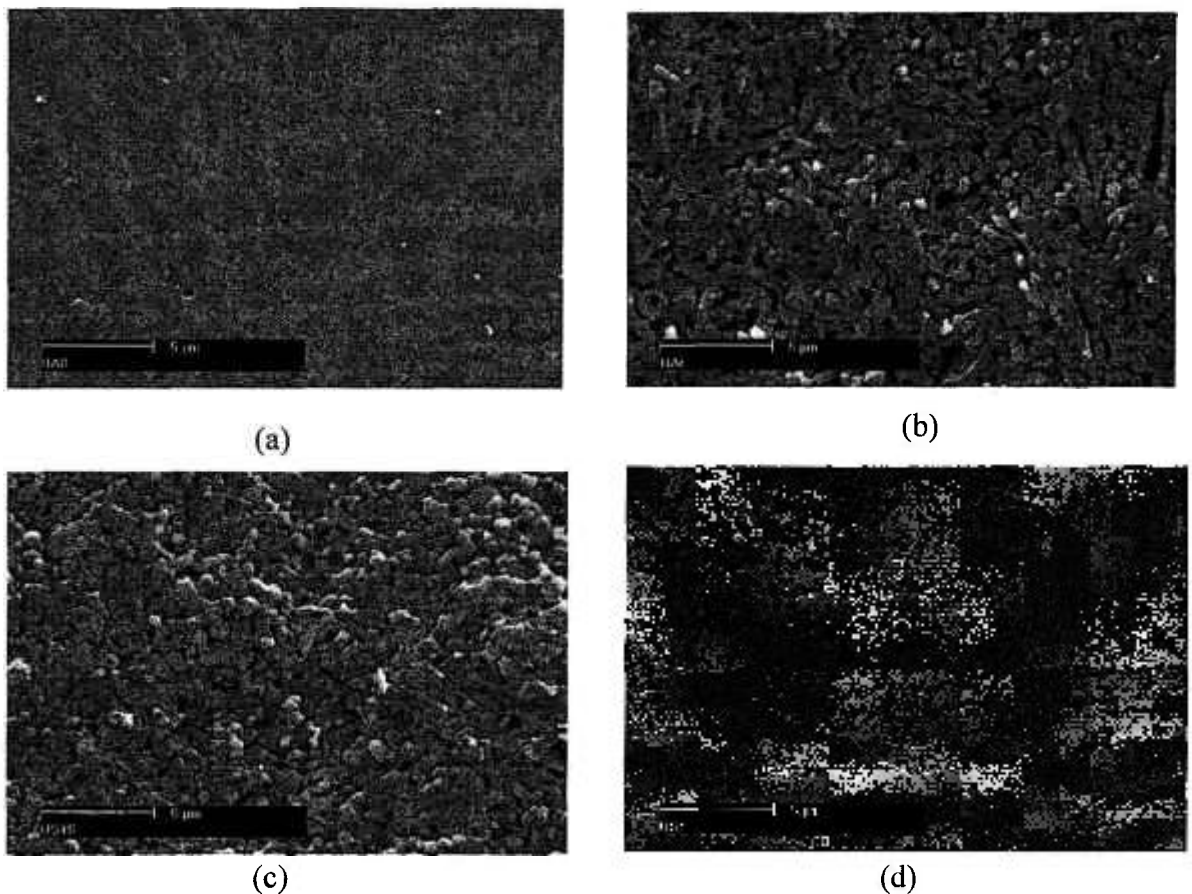


Figura 53. Micrografias obtidas por Microscopia eletrônica de varredura das superfícies de fraturas das amostras sinterizadas a 1100°C. Sendo (a) HA8, (b) HAR, (c) US15, (d)USr

As micrografias para as amostras sintetizadas com diferentes concentrações de magnésio e sinterizadas a 1100°C estão coerentes com os resultados de densidade obtidos na Tabela 16. Com a adição de 0,24 e 0,36% em massa de magnésio, as amostras apresentaram-se menos densas, evidenciada pela quantidade de poros. À medida que a

concentração de magnésio aumentou, superfícies mais densas foram observadas (Figura 54 e 55).

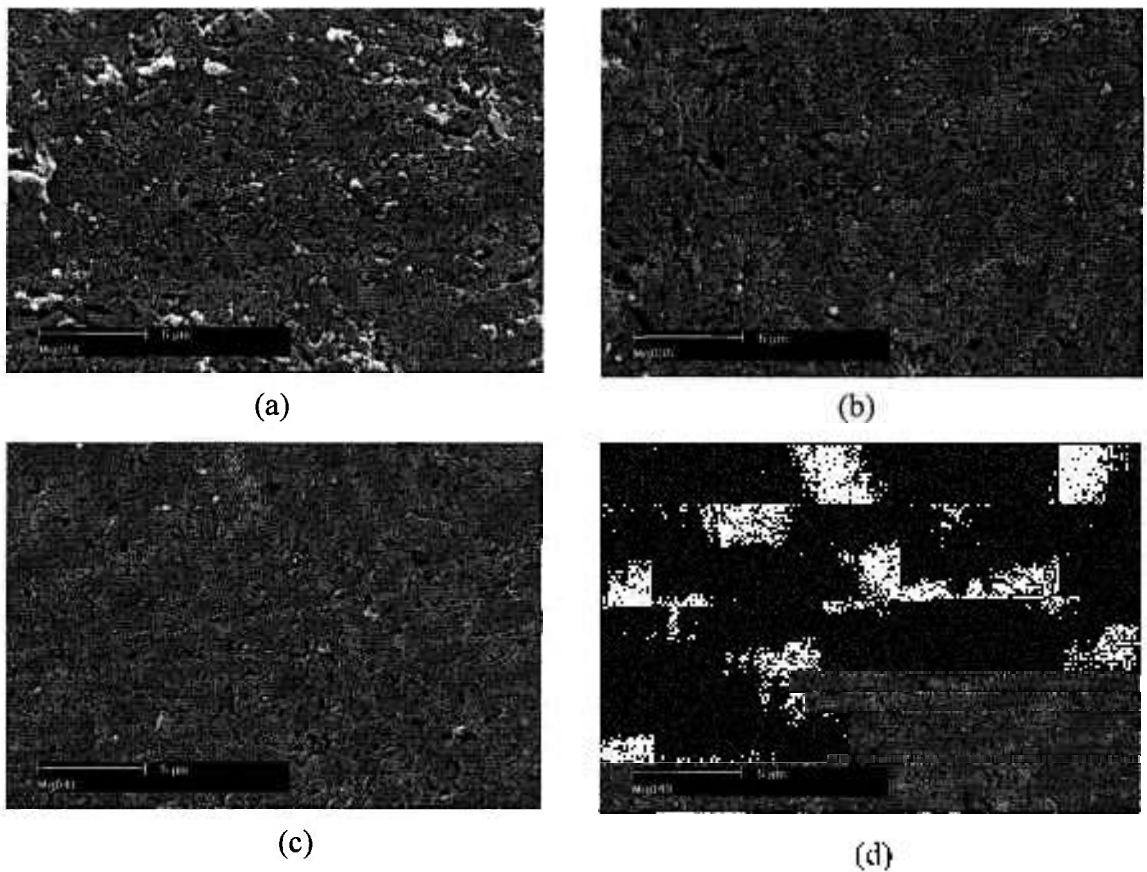


Figura 54. Micrografias obtidas por Microscopia eletrônica de varredura das superfícies de fraturas das amostras com magnésio sinterizadas a 1100°C/1h. (a) HAMg024, (b) HAMg036, (c) HAMg041 e (d) HAMg049.

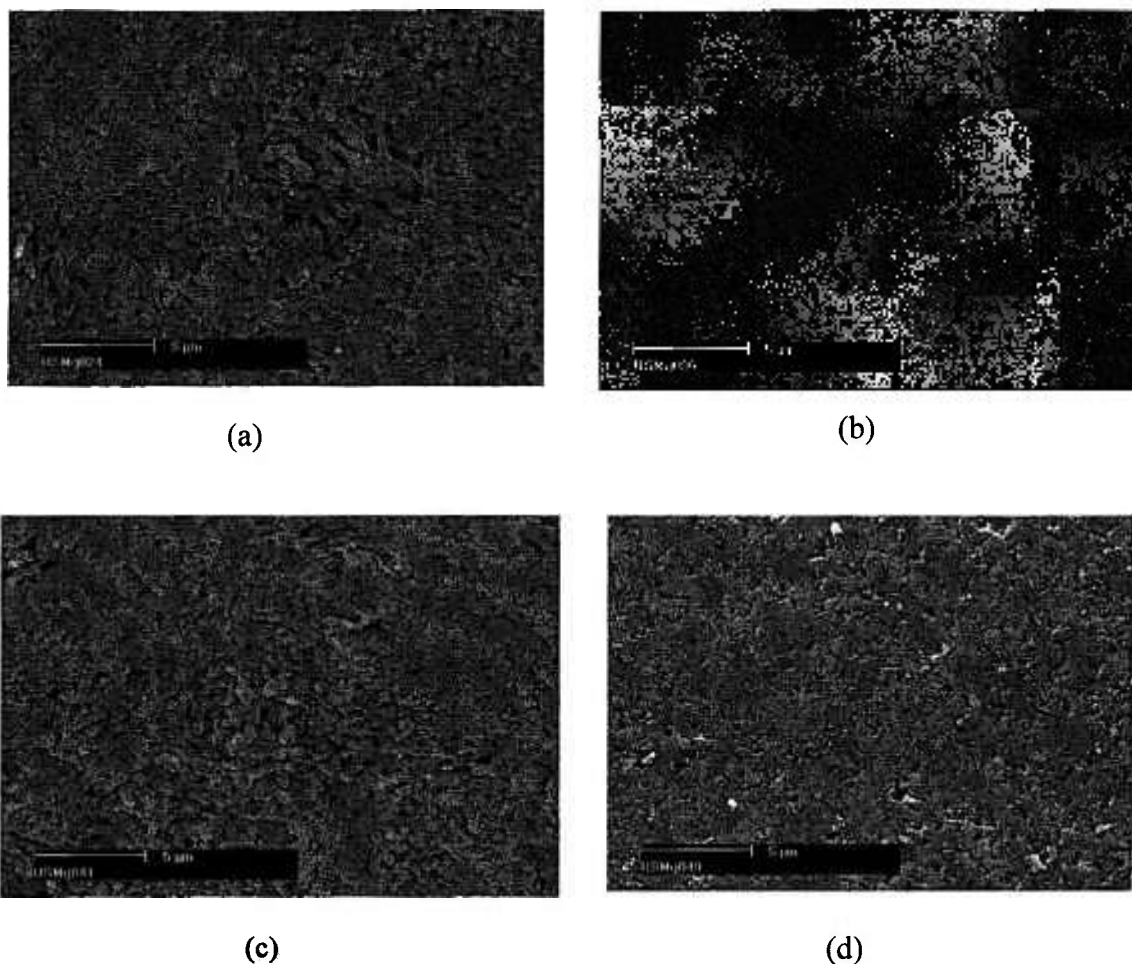


Figura 55. Micrografias obtidas por Microscopia eletrônica de varredura das superfícies de fraturas das amostras com magnésio sinterizadas a 1100°C/1h. (a) USMg024, (b) USMg036, (c) USMg041 e (d) USMg049.

Devido à variação dos valores de densidade obtidos após a sinterização a 1100°C/1h, (75 a 99% da densidade teórica da HA) algumas amostras foram selecionadas aleatoriamente para análise de dilatometria. Esta análise foi realizada com o intuito de verificar possíveis mudanças no mecanismo de sinterização da HA tendo em vista que alguns parâmetros durante a síntese da HA (velocidade de adição do ácido fosfórico, ultrassom e magnésio) foram alterados.

O estudo de densificação por meio da análise de dilatometria foi realizado nas amostras HA8, HAMg036, HAMg049, US15, USMg036 e USMg049.

A Figura 56 mostra as curvas de retração linear ( $\Delta L/L_0$ ) em função da temperatura, para as composições escolhidas com e sem magnésio e quando sintetizadas com ou sem aplicação do ultra-som durante a síntese.

Duas informações importantes podem ser verificadas quando analisadas as curvas de retração linear que apresentam comportamentos semelhantes. No primeiro caso, observa-se que a curva de retração linear para US15 foi deslocada a temperaturas mais elevadas quando comparadas com HA8. No segundo caso, a presença do magnésio fez com que as curvas de retração linear, fossem deslocadas a temperaturas mais altas (para o caso das amostras HAMg036 e HAMg049) e temperaturas mais baixas (para o caso das amostras USMg036 e HUSMg049) em relação as amostras HA8 e US15 respectivamente.

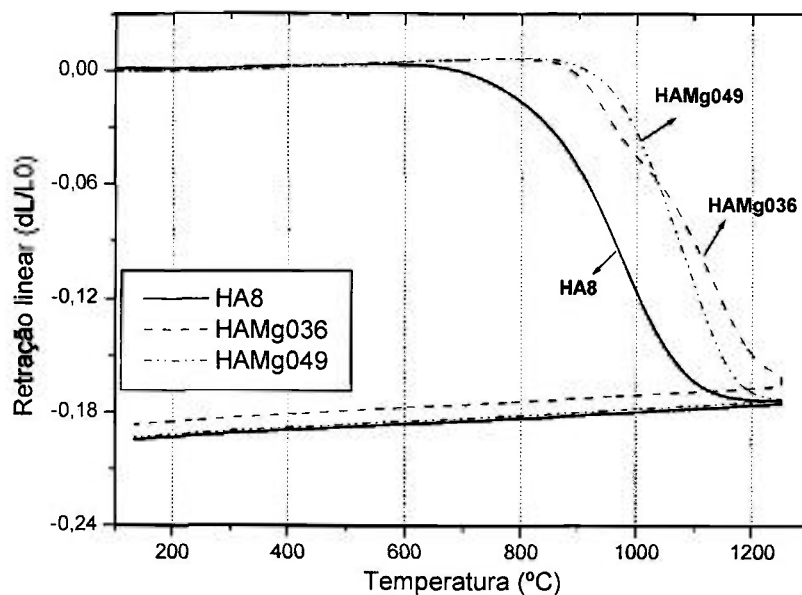
A Tabela 17 apresenta os valores de temperatura onset do início da densificação para todas as amostras. Esta temperatura é definida como a temperatura equivalente ao ponto onde ela começa a cair dando início a retração linear.

Tabela 17. Temperatura de onset de início de densificação e da máxima taxa de retração linear ( $T_m$ ) para as diferentes composições de HA.

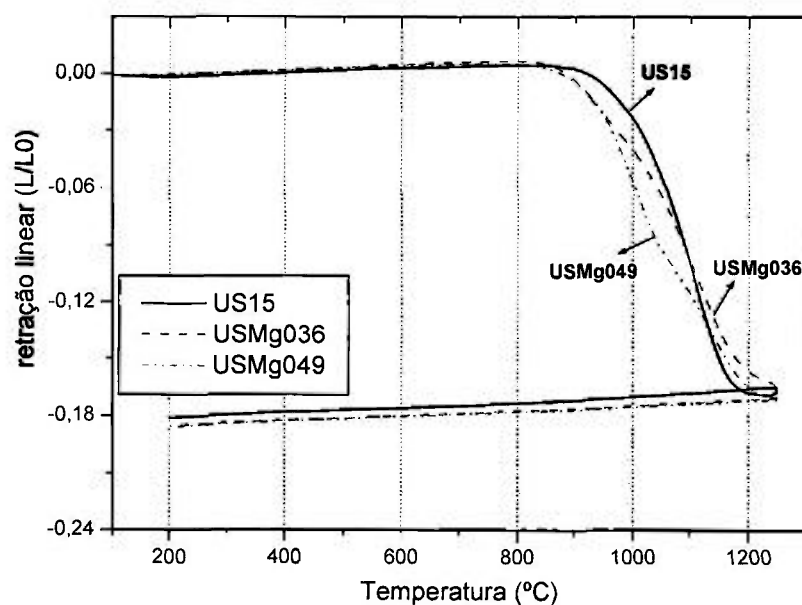
Amostras	T-Onset (°C)	$T_m$ (°C)	
		1° pico	2° pico
HA8	645	977	-
HAMg036	817	951	1130
HAMg049	860	1082	-
<b>US15</b>	<b>875</b>	<b>1104</b>	1250
USMg036	834	935	1104
USMg049	820	1003	1126

Como observado na Tabela 17 e na Figura 56-a, a amostra HA8 iniciou o processo de densificação a 645°C. A presença do magnésio aumentou esta temperatura passando de 645°C e chegando a 860°C aproximadamente. À medida que a concentração de magnésio aumentou a retração linear, entre as amostras com magnésio, foi mais pronunciada: HAMg036 teve 16,1% de retração enquanto que HAMg049 teve 16,7% de

retração linear final. Contudo, HA8 apresentou maior retração linear (17,3%) em relação às amostras com magnésio.



(a)



(b)

Figura 56 Curva de retração linear para as diferentes composições quando sintetizadas (a) ausência e (b) presença da frequência ultra-sônica.

Comportamento inverso foi observado nas amostras sintetizadas com aplicação do ultra-som: as temperaturas de início de densificação foram mais baixas para as amostras

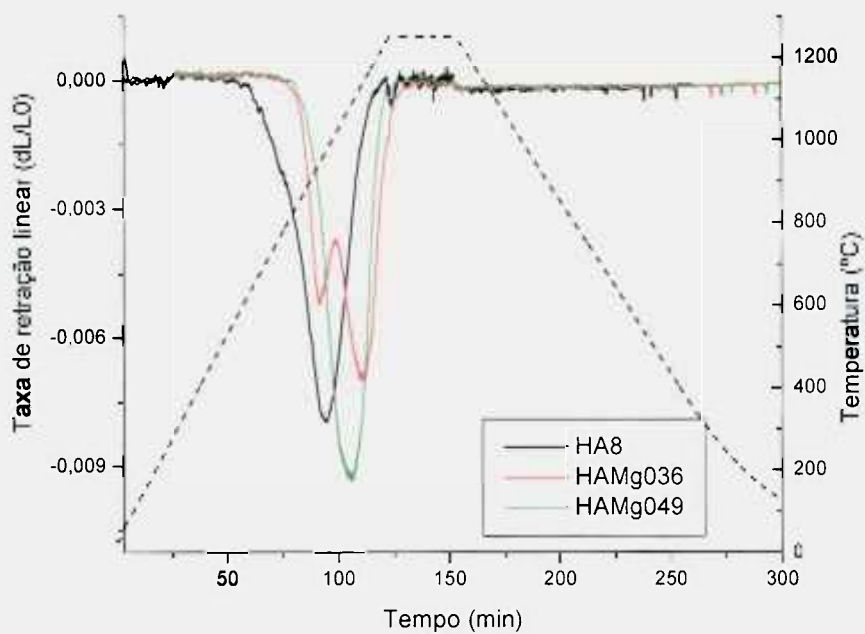
com magnésio quando comparadas com US15 (875°C). A presença do magnésio fez com que as amostras USMg024 e USMg036 retraíssem mais em comparação a US15, em que a retração foi de 16,5% (Tabela 17 e Figura 56-b).

É importante ressaltar que o uso do ultra-som durante a síntese dos pós de HA, provocou o aumento da temperatura do início de densificação das amostras US15 (875°C) quando comparada com HA8 (645°C). A retração linear na amostra HA8 foi maior em relação à US15, isto porque em compostos bifásicos (HA/TCP) a retração linear é menor do que na HA pura [24].

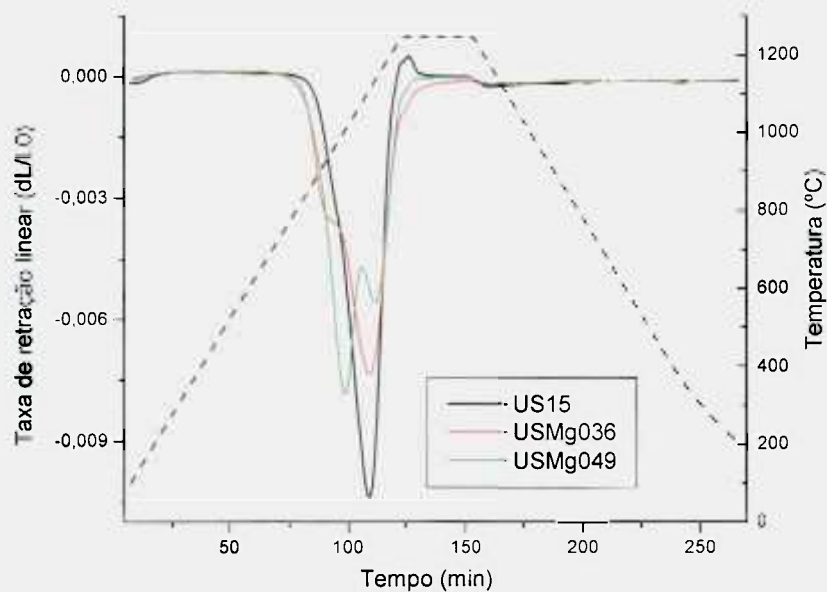
Para a amostra US15, a expansão linear, observada a 1250°C, foi relacionada à temperatura de transformação da fase  $\beta$ -TCP em  $\alpha$ -TCP [23,84,88]. De acordo com a literatura, a fase  $\beta$ -TCP é estável até 1125°C. Acima desta temperatura, esta fase se transforma em  $\alpha$ -TCP com uma expansão de 7,24% no volume da célula unitária [24,94].

Tanto na amostra HAMg036 como na USMg036 observa-se uma retração linear durante o patamar a 1250°C o que significa que a temperatura utilizada não foi suficiente para que a densificação ocorresse por completo.

A Figura 57 apresenta as curvas de taxa de retração linear em função do tempo para as amostras sintetizadas na ausência e presença do ultra-som. Através destas curvas, se obtém a temperatura na qual a máxima taxa de retração linear ( $T_m$ ) ocorre (Tabela 17). Para todas as composições, observam-se picos que podem estar relacionados a temperatura onde ocorre o mecanismo de sinterização da hidroxiapatita [93] como também possíveis transformações de fase nas regiões acima de 1000°C.



(a)



(b)

Figura 57. Curva da taxa de retração linear em função do tempo para as diferentes composições quando sintetizadas na (a) ausência do ultra-som e (b) presença do ultra-som.

## 5.4.1. Estudo in vitro - Teste de citotoxicidade

No teste de citotoxicidade, o índice de citotoxicidade ( $IC_{50(\%)}$ ) representa a concentração de extrato que inibe a capacidade de 50% da população de crescer e se multiplicar para formar colônias, como consequência da toxicidade do material.

Como esperado, a alumina utilizada como controle negativo, causou uma resposta não citotóxica, apresentando  $IC_{50(\%)} > 100$ , enquanto que o controle positivo (solução fenol 0,5%) apresentou  $IC_{50(\%)}$  de aproximadamente 50, indicando que a solução de fenol numa diluição de 50% da inicial, reduziu à metade a capacidade de sobrevivência da população celular no teste.

No gráfico da Figura 57, a curva obtida foi correlacionada entre o percentual médio de células vivas e a concentração dos extratos. Como resultado, as amostras em estudo apresentaram  $IC_{50(\%)} > 100$ , indicando, portanto, ausência de citotoxicidade.

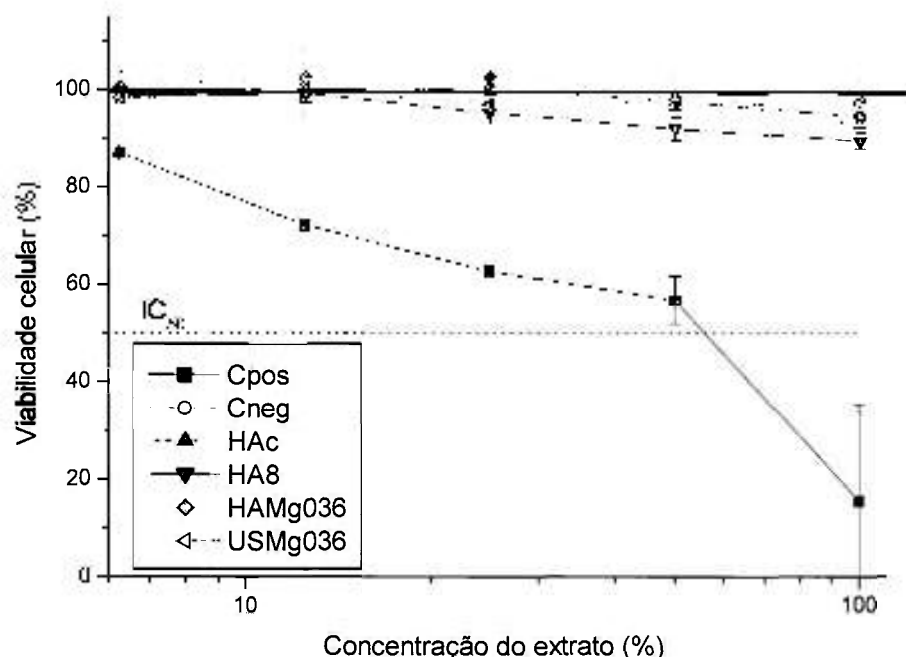


Figura 57. Curva de supressão de colônias no teste de citotoxicidade para os pós de HA sintetizados em diferentes condições.

#### 5.4.2. Estudo in vivo

Todos os animais apresentaram boa cicatrização superficial do leito cirúrgico durante o período de 4 semanas, não sendo observado, nenhum tipo de infecção ou deiscência da incisão cirúrgica na região operada.

Na avaliação macroscópica de todos os espécimes de osso retirado da pata direita e esquerda dos animais envolvidos, foi observada uma reparação óssea satisfatória o que indica primariamente que, em nenhuma das amostras testadas, houve reação adversa com o tecido vivo. De igual maneira, pode-se observar macroscopicamente que não houve diferença entre o osso proveniente da pata direita (grupo experimental, com amostra) com o osso proveniente da pata esquerda (grupo controle, sem amostra), mostrando que no período de tempo escolhido para efetuar as observações não há como diferenciar os espécimes que receberam amostras de biomateriais com o grupo controle.

Para análise morfológica e de marcadores foi realizada a avaliação microscópica, que procedeu a partir das técnicas de identificação: Hematoxilina e Eosina (HE), Tricromo de Masson (TM) e Fluorescência (F).

- A hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas (como porções do citoplasma ricas em RNA e a matriz da cartilagem hialina). A eosina, por outro lado, cora o citoplasma e o colágeno em cor de rosa [11].

- O Tricrômico de Masson, além de mostrar muito bem o núcleo e o citoplasma, ajuda a diferenciar tecido ósseo antigo (observado em cor azul escuro) de tecido ósseo neo formado (observado em cor azul claro) e tecido ósseo não mineralizado (observado em cor vermelha) [11,95].

- A fluorescência permite a observação dos marcadores ósseos utilizados durante o processo de reparação óssea. Os marcadores se depositam com grande afinidade sobre a matriz óssea recém formada, possibilitando a avaliação da velocidade de crescimento da mesma devido à diferença de coloração dos marcadores [11,96].

Lâminas histológicas representativas do grupo controle bem como dos grupos experimentais estão dispostas nas Figuras 58 a 62.

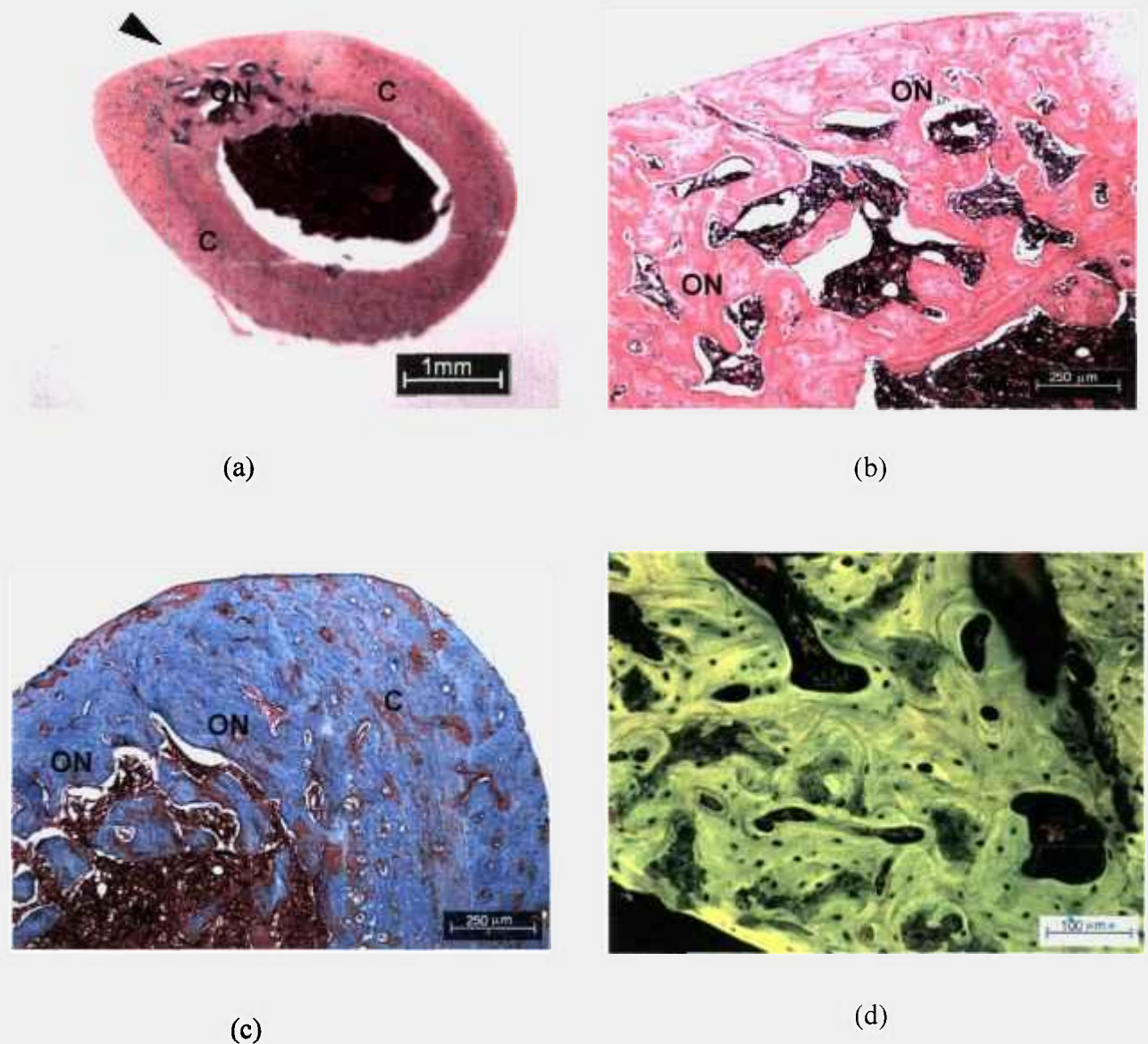


Figura 58. Lâminas histológicas representativas do grupo controle: (a) Fotomicrografia da lâmina de HE; (b) Fotomicrografia de lâmina de HE - Imagem aproximada da região ON; (c) Fotomicrografia de lâmina de TM; (d) Fotomicrografia de lâmina de HE - Fluorescência no local da injúria. A seta indica o local onde foi feita a injúria, (ON) osso neo-formado, (C) osso cortical e (M) medula.

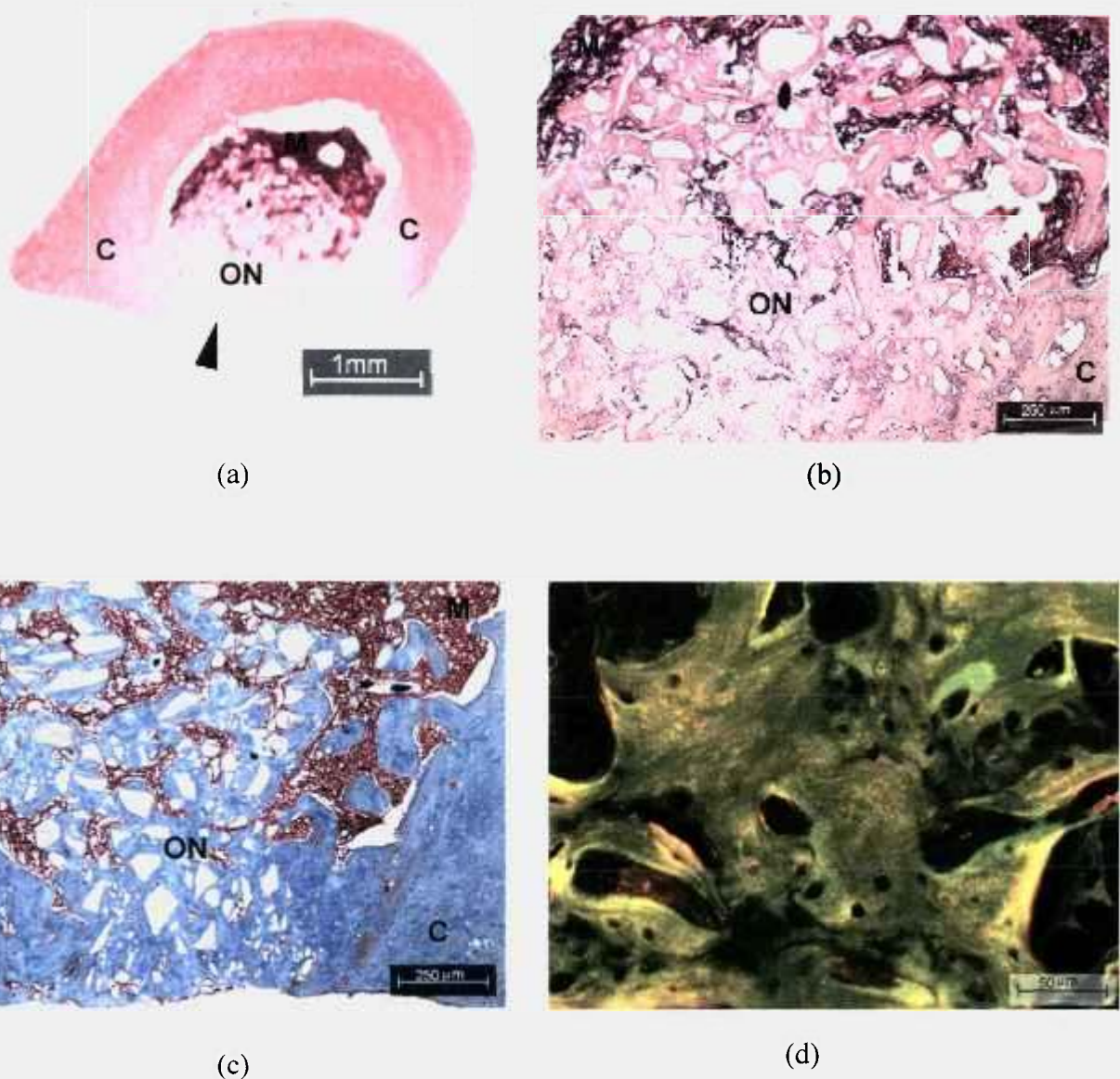
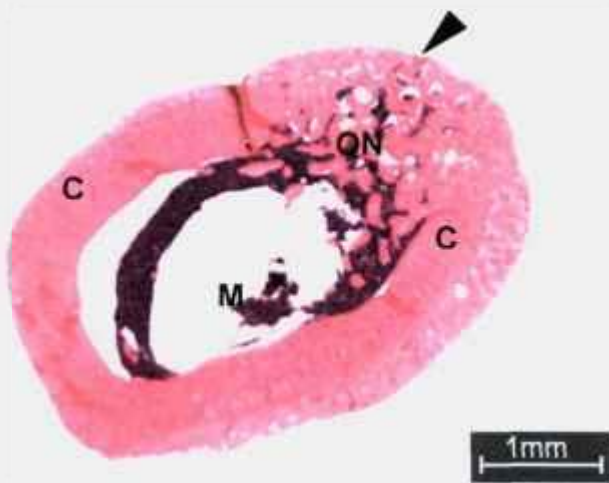
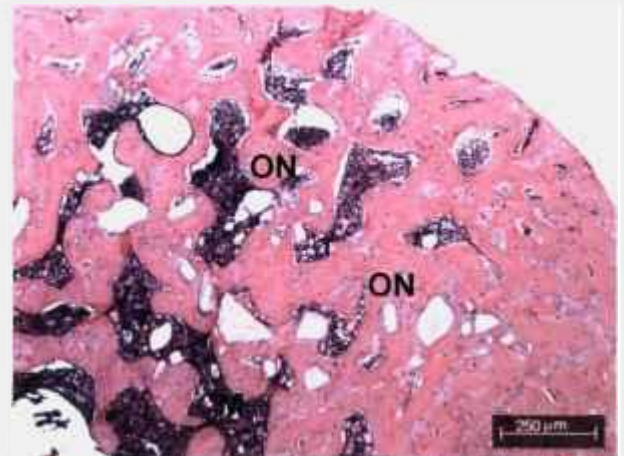


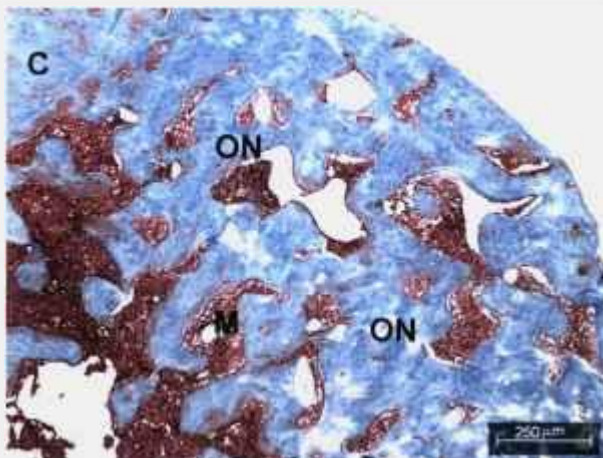
Figura 59. Lâminas histológicas representativas da amostra HA8: (a) Fotomicrografia de lâmina de HE, (b) Fotomicrografia de lâmina de HE - Imagem aproximada da região ON, (c) Fotomicrografia de lâmina de TM; (d) Fotomicrografia de lâmina de HE - Fluorescência no local da injúria. A seta indica o local onde foi feita a injúria, (ON) osso neo-formado, (C) osso cortical e (M) medula.



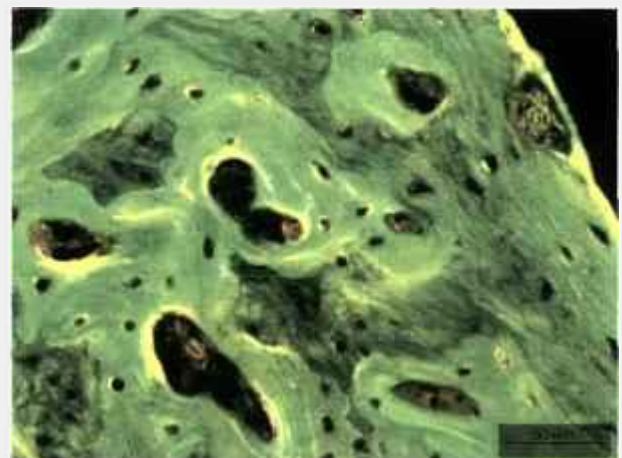
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 60. Lâminas histológicas representativas da amostra HAMg036: (a) Fotomicrografia de lâmina de HE, (b) Fotomicrografia de lâmina de HE - Imagem aproximada da região ON, (c) Fotomicrografia de lâmina de TM; (d) Fotomicrografia de lâmina de HE - Fluorescência no local da injúria. A seta indica o local onde foi feita a injúria, (ON) osso neo-formado, (C) osso cortical e (M) medula.

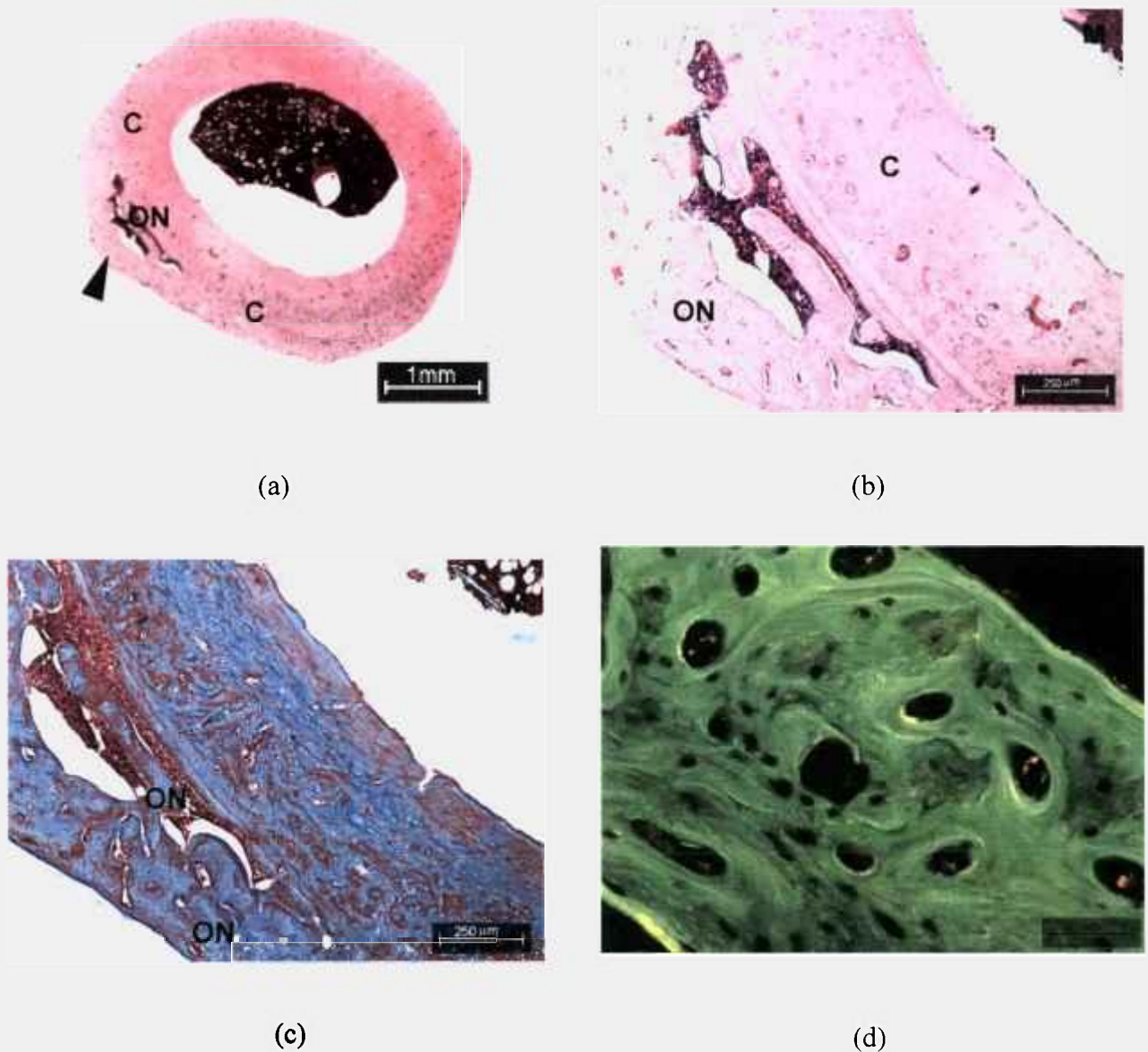


Figura 61. Lâminas histológicas representativas da amostra USMg036: (a) Fotomicrografia de lâmina de HE, (b) Fotomicrografia de lâmina de HE - Imagem aproximada da região ON, (c) Fotomicrografia de lâmina de TM; (d) Fotomicrografia de lâmina de HE - Fluorescência no local da injúria. A seta indica o local onde foi feita a injúria. (ON) osso neo-formado, (C) osso cortical e (M) medula.

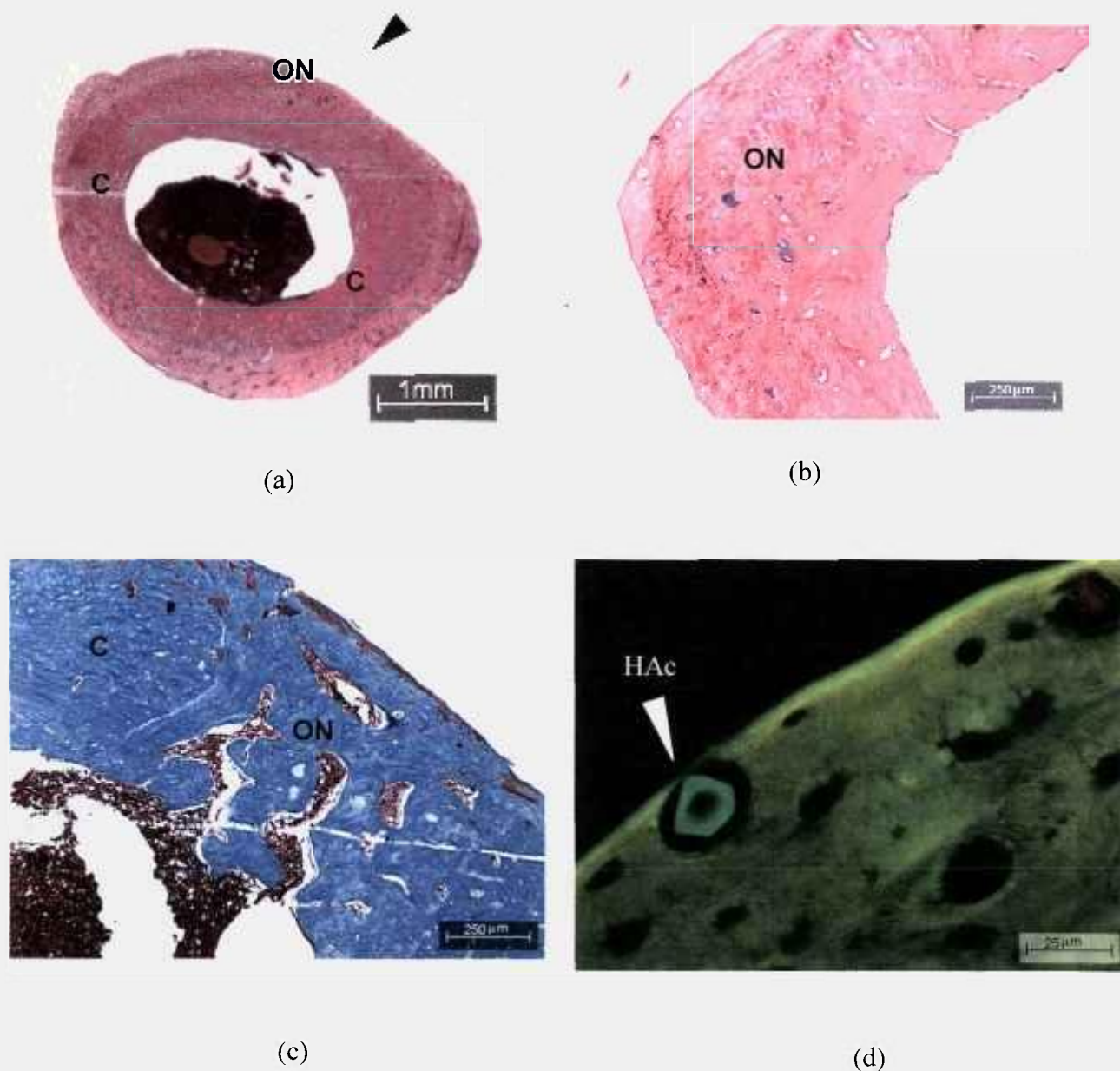


Figura 62. Lâminas histológicas representativas da amostra HAC: (a) Fotomicrografia de lâmina de HE, (b) Fotomicrografia de lâmina de HE - Imagem aproximada da região ON, (c) Fotomicrografia de lâmina de TM; (d) Fotomicrografia de lâmina de HE - Fluorescência no local da injúria. A seta indica o local onde foi feita a injúria, (ON) osso neo-formado, (C) osso cortical e (M) medula.

Nas lâminas de HE, se observou, tanto no grupo controle quanto nos grupos experimentais, a presença de osso trabecular neo-formado preenchido por tecido medular, o que confere a reestruturação da área lesionada.

O grupo controle (Figura 58) e o grupo USMg036 (Figura 61-a) apresentaram estruturação semelhante em comparação com os outros grupos sendo observado uma resposta óssea menos intensa com predomínio de áreas de osso compacto. Em contrapartida, os grupos HA8 (Figura 59-a) e HAMg036 (Figura 60-a) apresentaram reação mais intensa com predomínio de osso neo-formado ocupando até a área medular. O grupo HAc (Figura 2-a) teve uma menor formação de tecido ósseo trabecular na posição observada.

Em todas as lâminas foram observadas a presença de osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, vasos sanguíneos (forames nutritícios) e osteonas primárias. Essas estruturas presentes na área de injúria demonstram a qualidade do tecido ósseo novo (Figura 63).

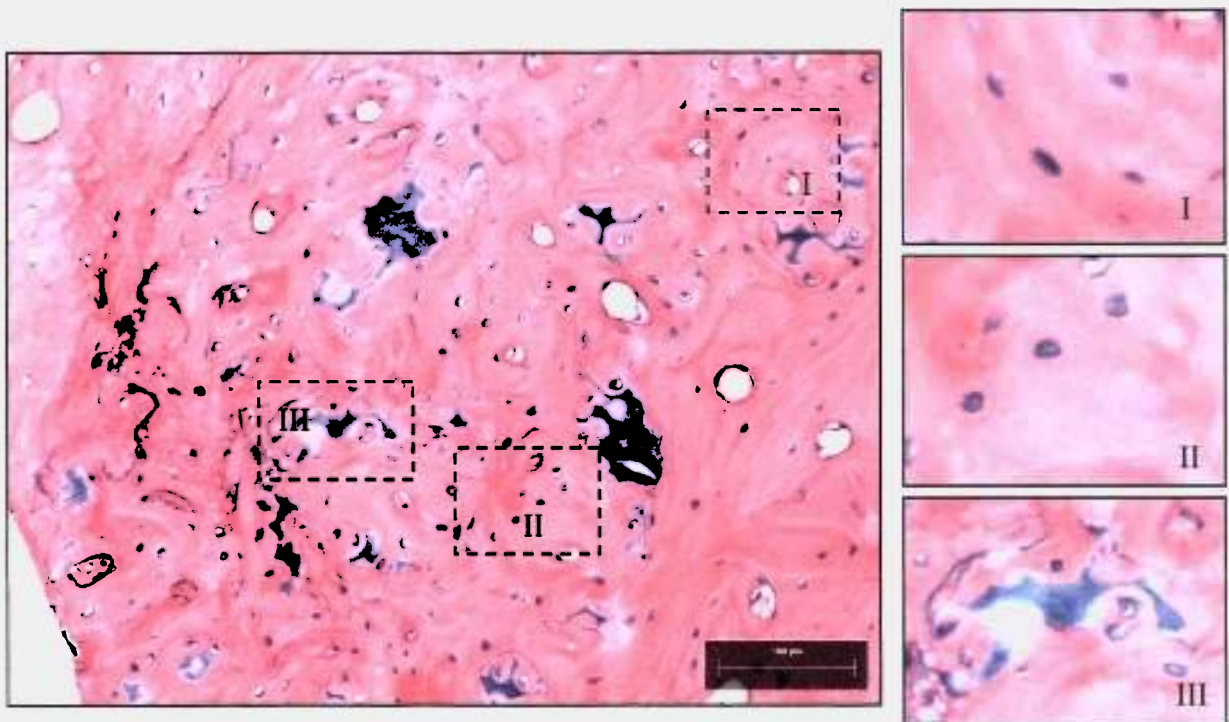


Figura 63. Fotomicrografia de Lâmina de HE (osso): presença de (I) osteócitos, (II) osteoblastos e (III) osteoclastos no tecido ósseo neo-formado.

Em todos os grupos, o tecido desorganizado marca o local que ainda sofre o processo de remodelação. Este mesmo aspecto foi observado nas lâminas de TM.

De acordo com a literatura a análise de TM se caracteriza pela intensidade de cor para diferenciar o tecido antigo do tecido neo-formado [11]. Para os grupos em estudo, a avaliação minuciosa da intensidade da cor foi limitada, sendo possível verificar apenas a coloração vermelha (tecido não-mineralizado) e tons de azul (tecido mineralizado) no tecido ósseo (Figura 58-c, 59-c, 60-c, 61-c, 62-c).

A preservação do periósteo durante o procedimento cirúrgico determina a capacidade do osso de prover uma quantidade satisfatória de células osteoblásticas e, conseqüentemente, formar osso novo [97]. Os resultados obtidos com o grupo controle mostraram que a manobra cirúrgica foi adequada no contexto devido a sua boa resposta. Os grupos experimentais se diferenciaram não somente pelas manobras cirúrgicas adequadas, mas pela presença das amostras de hidroxiapatita.

Na avaliação por fluorescência foram observados os marcadores ósseos em diferentes apresentações de cores na imagem capturada. A calceína (visualizada em verde) por ter uma maior afinidade com o tecido ósseo novo tem uma maior abrangência no campo observado. A tetraciclina (visualizada em laranja) e a alizarina (visualizada em marrom) tem tons semelhantes, dificultando a visualização separadamente [96]. Na área lesionada observou-se maiores concentrações de marcadores nas linhas de crescimento em relação aos tecidos intactos.

Para o grupo HAc, na lâmina de HE, observada por fluorescência, verificou-se a estrutura de um grão de HA isoladamente próximo à superfície da área lesionada (Figura 62-d). Este fato ocorreu de modo isolado e pode estar relacionado ao tamanho de partícula da HAc ( $45,7 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

## 6. CONCLUSÕES

---

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- O método de neutralização utilizado para a obtenção da hidroxiapatita é adequado para a síntese de pós com tamanho de partículas nanométricas.
- A velocidade de adição do ácido fosfórico e a aplicação do ultra-som durante a síntese interferem na formação da HA estequiométrica, como também na morfologia dos pós uma vez que o pH do meio reacional é alterado.
- Adicionando o ácido fosfórico a uma razão de 8,0 mL/min, é possível obter HA estequiométrica. Já as velocidades de adição estudadas, quando a síntese foi realizada na presença do ultra-som, não foram suficientes para obter HA estequiométrica.
- As amostras HA2, HAR, US8, US15 e USr apresentaram pH < 6 após a total adição do ácido fosfórico e foram caracterizadas como hidroxiapatita deficientes em cálcio (d-HA). O tratamento térmico a 800°C/3h levou a formação de uma mistura bifásica HA e β-TCP.
- As diferentes concentrações de magnésio estudadas quando a síntese foi realizada sem e com a aplicação do ultra-som permitiu as seguintes conclusões:
  - Para as amostras sintetizadas adicionando ácido fosfórico a uma razão de 8,0 mL/min (HA8), foi possível incorporar até 0,36% em massa de Mg<sup>2+</sup> na estrutura da HA sem que houvesse formação de outras fases. Com adição de 0,41% em

massa de  $Mg^{2+}$  a fase Whitlockite foi obtida, o que comprova o limite de incorporação de até 0,4 % em massa de  $Mg^{2+}$  como observado na literatura.

- Para as amostras sintetizadas na presença do ultra-som, adicionando ácido fosfórico a uma razão de 15,0 mL/min (US15), houve um aumento no limite de incorporação do  $Mg^{2+}$  de até 0,49 % em massa na estrutura da HA sem que ocorresse a formação de fases secundárias. A aplicação do ultra-som durante a síntese da HA, neste caso, ajudou a formar pós estequiométricos.

➤ Estes resultados sugerem que a técnica de ultra-som é efetiva para adicionar maiores quantidades de  $Mg^{2+}$  na estrutura da HA, sem que haja a formação de fases indesejadas.

➤ Testes “in vitro” revelaram que os pós em estudo não apresentaram características de citotoxicidade, viabilizando o próximo passo em testes in vivo.

➤ Os experimentos “in vivo” associados com a análise histológica mostraram uma reparação tecidual semelhante ao do grupo controle.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

- 1- Estudar o efeito da temperatura durante a síntese dos pós de HAMg quando sintetizados com ultra-som
- 2- Estudar o uso de diferentes frequências ultra-sônicas durante a síntese dos pós de HA e HAMg
- 3- Estudar o limite máximo de incorporação do magnésio quando a síntese for realizada com ultra-som
- 4- Desenvolver corpos cerâmicos densos de HA-Mg para estudo in vivo.

## 8. ANEXOS



Anexo I. Projeto n° 16 CEPA-IPEN/SP.**Parecer - Projeto N° 16/CEPA-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **ESTUDO DA BIOATIVIDADE E BIOCOMPATIBILIDADE DE PÓS NANOMÉTRICOS DE HA** de responsabilidade do pesquisador **JOSÉ CARLOS BRESSIANI** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEPA .

São Paulo, 16 de julho de 2007

**Prof. Dra. Nanci do Nascimento**  
Coordenadora do CEPA-IPEN

---

IPEN-CNEN/SP  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL  
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP  
Telefone: (011) 3816-9229 - Fax (011) 3816-9232  
E-mail: nnascime@ipen.br

**Anexo II. Processamento do material fixado.**

- 1° - Álcool 95° durante 1 hora e 30 minutos
- 2° - Álcool 95° durante 1 hora e 30 minutos
- 3° - Álcool 100° durante 1 hora e 30 minutos
- 4° - Álcool 100° durante 1 hora e 30 minutos
- 5° - Álcool 100° durante 1 hora e 30 minutos
- 6° - Álcool 100° durante 1 hora e 30 minutos
- 7° - Xilól durante 1 hora e 30 minutos
- 8° - Xilól durante 1 hora e 30 minutos
- 9° - Xilól durante 1 hora e 30 minutos
- 10° - Parafina durante 2 horas e 30 minutos a 57 °C
- 11° - Parafina durante 4 horas a 57 °C

**Anexo III. Preparação das lâminas para coloração**

## a) Hematoxilina e Eosina (HE)

- 1° - Xilól durante 10 minutos
- 2° - Xilól durante 10 minutos
- 3° - Álcool 100° durante 3 minutos
- 4° - Álcool 95° durante 3 minutos
- 5° - Álcool 70° durante 3 minutos
- 6° - Água corrente durante 3 minutos
- 7° - Hematoxilina durante 5 minutos
- 8° - Água corrente durante 3 minutos
- 9° - Álcool ácido uma lavagem
- 10° - Água corrente durante 10 minutos
- 11° - Eosina durante 1 minuto
- 12° - Álcool 95° durante 1 minutos
- 13° - Álcool 100° durante 2 minutos
- 14° - Álcool 100° durante 2 minutos
- 15° - Xilól durante 2 minutos
- 16° - Xilól durante 2 minutos
- 17° - Montagem da lamínula com resina.

## b) Tricromo de Masson

- 1° - Xilól durante 10 minutos
- 2° - Xilól durante 10 minutos
- 3° - Álcool 100° durante 3 minutos
- 4° - Álcool 95° durante 3 minutos
- 5° - Álcool 70° durante 3 minutos
- 6° - Água corrente durante 3 minutos
- 7° - Hematoxilina durante 5 minutos
- 8° - Água corrente durante 3 minutos
- 9° - Álcool ácido uma lavagem
- 10° - Água corrente durante 10 minutos
- 11° - Fucsina ácida durante 2 minuto
- 12° - Água corrente durante 3 minutos
- 13° - Colocar em várias trocas de água destilada
- 14° - Solução Fosfotungstca 5% e Ácido Molíbdico 5% (1/1) durante 10 minutos
- 15° - Azul de anilina-acética até corar
- 16° - Água corrente durante 3 minutos
- 17° - Álcool 95° durante 1 minutos
- 18° - Álcool 100° durante 2 minutos
- 19° - Álcool 100° durante 2 minutos
- 20° - Xilól durante 2 minutos
- 21° - Xilól durante 2 minutos
- 22° - Montagem da lamínula com resina.

## 9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1] BENS-NISSAN, B.; PEZZOTTI, G. Bioceramics: Processing Routes and Mechanical Evaluation. *Journal of the Ceramic of Japan*, v. 110, n. 7, p. 601-608, 2002.
- [2] KAWASHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p.518-522, 2000.
- [3] SANTOS, L.A. *Desenvolvimento de cimentos de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica*. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo.
- [4] VALLET-REGÍ M., GONZÁLEZ-CALBET, J.M. Calcium Phosphate as Substitution of Bone Tissues. *Progress in solid State Chemistry*, v.32, p.1-31, 2004.
- [5] HENCH, L.L. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 81, n. 7, p. 1705-1728, 1998.
- [6] RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, 1996.
- [7] ELLIOT, C. *Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates: Studies in Inorganic Chemistry 18*, Elsevier Science, 1994.
- [8] HENCH, L. L.; WILSON, J. *Introduction to Bioceramics*. 1ª ed., Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993.
- [9] LEGEROS R.Z. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Monographs in Oral Science*, v.15, Switzerland: Karger, 1991.
- [10] <<http://www.metalmat.ufrj.br/biomat/biomateriais.html>> acesso em 24/09/2004
- [11] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 8ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
- [12] MOTTA, V.T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. 4º ed., Porto Alegre: Editora Média Misau, São Paulo: Robe Editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2003.
- [13] GUYTON, ARTHUR C. *Fisiologia Humana – Cap. 36: Metabolismo do cálcio, osso, hormônio paratireodiano e a Fisiologia do osso*. [Trad] Charles Alfred Esberard. 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
- [14] PULEO, D.A.; NANCI, A. Understanding and Controlling the Bone Implant Interface. *Biomaterials*, v. 20, p. 2311-2321, 1999.

- [15] KAWASHI, E.Y. *Fosfatos de Cálcio: Porosidade, Cristalinidade, Potencial de Interface e Comportamento in Vivo*. 1997. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo.
- [16] BROWN, P.W., 1999, "Hydration behavior of calcium phosphates is analogous to hydration behavior of calcium silicates", *Cement and Concrete Research*, v. 29, n. 8, pp. 1167-1171.
- [17] Ogaswara, T., Bastos, I.N., Andrade, M.C., Silva, R.R., Soares, G.A., "Análise termodinâmica da fluoretação da Hidroxiapatita no sistema Ca-P-F-H<sub>2</sub>O a 37°C". *Educação & Tecnologia*, Belo Horizonte, v.6, n. 1/2, p.14-17, jan/dez. 2001.
- [18] BANDYOPADHYAY, A.; BERNARD, S.; XUE, W. and BOSE, S. Calcium Phosphate-based Resorbable Ceramics: Influence of MgO, ZnO and SiO<sub>2</sub> Dopants. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 89, n. 9, p. 2675-2688, 2006.
- [19] KALITA, S. J.; BHARDWAJ, A.; BHATT H. A. Nanocrystalline Calcium Phosphate Ceramics in Biomedical Engineering. *Materials Science and Engineering C*, v. 27, p. 441-449, 2007.
- [20] DE GROOT, K. Effect of Porosity and Physicochemical Properties on the Stability, Resorption, and Strength of Calcium Phosphate Ceramics. *Annals New York Academy of Sciences*. p.227-233.
- [21] RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. *Bioceramics: Materials, Properties, Applications*, Chapman & Hall; 1992.  
< <http://books.google.com/books?id=6WM021gyTnoC&printsec=frontcover&hl=pt-BR>>  
acesso em 20/01/2008.
- [22] RYU, H.S.; YOUN, H.J.; HONG, K.S.; CHANG, B.S.; LEE, C.K.; CHUNG, S.S. An Improvement in Sintering Property of  $\beta$ -tricalcium Phosphate by Addition of Calcium Pyrophosphate. *Biomaterials*, v.23, p.909-914, 2002.
- [23] PETROV, O. E.; DYULGEROVA, E.; PETROV, L.; POPOVA, R. Characterization of Calcium Phosphate Phases Obtained During the Preparation of Sintered Biphase Ca-P Ceramics. *Materials Letters*, v. 48, p. 162-167, 2001.
- [24] RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLANT, D. Calcium Phosphate Apatites with Variable Ca/P Atomic Ratio II: Calcination and Sintering. *Biomaterials*, v. 23, p. 1073-1080, 2002.
- [25] MARCHI, J.; DANTAS, A.C.S.; GREIL, P.; BRESSIANI, J.C.; BRESSIANI, A.H.A.; MULLER, F.A. Influence of Mg-substitution on the Physicochemical Properties of Calcium Phosphate Powders. *Materials Research Bulletin*, v. 42, p. 1040-1050, 2007.
- [26] ANDO, J. Tricalcium Phosphate and its Variation. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v. 31, n.2, p.196-201, 1958.

- [27] LIN, F.H.; LIAO, A.J.; CHEN, K.S.; SUN, J.S. Preparation of High-temperature Stabilized  $\beta$ -tricalcium Phosphate by Heating Deficient Hydroxyapatite with  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  Addition. *Biomaterials*, v.19, p.1101-1107, 1998.
- [28] ANDO, J. Phases Diagrams of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaNaPO}_4$  Systems. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v. 31, n. 2, p. 201-205, 1958.
- [29] ENDERLE, R.; GOTZ-NEUNHOEFFER, F.; GOBBLES, M.; MULLER, F. A.; GREIL, P. Influence of Magnesium Doping on the Phase Transformation of  $\beta$ -TCP Ceramics Examined by Rietveld Refinement. *Biomaterials*, v.26 p. 3379-3384, 2005.
- [30] RIBEIRO, C. *Processamento e Caracterização de Cerâmicas à Base de Hidroxiapatita e Fosfato Tricálcico*. 2003. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- [31] CHOW, L.C. Development of Self-Setting Calcium Phosphate Cements. *J. Ceram. Soc. Japan*, v.99, p.954-964, 1991.
- [32] KIM, S.R.; LEE, J.H.; KIM, Y.T.; RIU, D.H.; JUNG, S.J.; LEE, Y.J.; CHUNG, S.C.; KIM, Y.H. Synthesis of Si, Mg Substituted Hydroxyapatites and their Sintering Behaviors. *Biomaterials*, v.24, p.1389-1398, 2003.
- [33] MOSTAFA, N.Y. Characterization, Thermal Stability and SINTERING of Hydroxyapatite Powders Prepared by Different Routes. *Materials Chemistry and Physics*, v.94, p.333-341, 2005.
- [34] RIBEIRO, C.C.; GIBSON, I.; BARBOSA, M.A. The Uptake of Titanium Ions by Hydroxyapatite Structural Changes and Possible Mechanisms. *Biomaterials*, v.27 p. 1749-1761, 2006.
- [35] MORTIER, A.; LEMAITRE, J. and ROUXHET, P.G. Temperature-programmed Characterization of Synthetic Calcium-Deficient Phosphate Apatites. *Thermochimica Acta*, v.143, p. 265-282, 1989.
- [36] MONMA, H.; UENO, S. and KANAZAWA, T. Properties of Hydroxyapatite Prepared by the Hydrolysis of Tricalcium phosphates. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v.31, p.15-24, 1981.
- [37] KANNAN, S.; LEMOS, I.A.F.; ROCHA, J.H.G.; FERREIRA, J.M.F. Synthesis and Characterization of Magnesium Substituted Biphasic Mixtures of Controlled Hydroxyapatite/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate Ratios. *Journal of Solid State Chemistry*, v.178, p.3190-3196, 2005.
- [38] OSAKA, A.; MIURA, Y.; TAKEUCHI, K.; ASADA, M.; TAKAHASHI, K. Calcium Apatite Prepared from Calcium Hydroxide and Orthophosphoric Acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.2, p. 51-55, 1991.

- [39] KUMTA, P.N.; SFEIR, C.; LEE, D.H.; OLTON, D.; CHOI, D. Nanostructured Calcium Phosphates for Biomedical Applications: Novel Synthesis and Characterization. *Acta biomaterials*, v.1, p. 65-83, 2005.
- [40] LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; VICHI, L.; SANDRI, M. Influence of Synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite. *Biomaterials*, v.25, p.1763-1770, 2004.
- [41] BARRALET, J.; KNOWLES, J.C.; BEST, S.; BONFIELD, W. Thermal Decomposition of Synthesized Carbonate Hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.13, p.529-533, 2002.
- [42] SUCHANEK, W.L.; BYRAPPA, K.; SHUK, P.; RIMAN, R.E.; JANAS, V.F.; TENHUISEN, K.S. Mechanochemical-hydrothermal Synthesis of Calcium Phosphate Powders with Coupled Magnesium and Carbonate Substitution. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 177, p.793-799, 2004.
- [43] BERTONI, E.; BIGI, A.; COJAZZI, G.; GANDOLFI, M.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N. Nanocrystals of Magnesium and Fluoride Substituted Hydroxyapatite. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.72, p.29-35, 1998.
- [44] BERTINETTI, L.; TAMPIERI, A.; LANDI, E.; MARTRA, G.; COLUCCIA, S. Punctual Investigation of Surface Sites of HA and Magnesium-HA. *Journal of European Ceramic Society*, v.26, p.987-991, 2006.
- [45] SUCHANEK, W.L.; BYRAPPA, K.; SHUK, P.; RIMAN, R.E.; JANAS, V.F.; TenHuisen, K.S. Preparation of Magnesium-Substituted Hydroxyapatite Powders by the Mechanochemical-Hydrothermal Method. *Biomaterials*, v.25, p.4647-4657, 2004.
- [46] CALLISTER, W.D. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. 5° ed., Rio de Janeiro, Edit. LTC, 2000
- [47] ATKINS, P.; JONES, L. *Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente*. São Paulo: Bookman (Artmed Editora Ltda), 2002.
- [48] PENA, J.; VALLETI-REGÍ, M. Hydroxyapatite, Tricalcium Phosphate and Biphasic Materials Prepared by a Liquid Mix Technique. *Journal of the European Society*, v. 23, p.1687-1696, 2003.
- [49] PANG, Y.X.; BAO, X. Influence of Temperature, Ripening Time and Calcinations on the Morphology and Crystallinity of Hydroxyapatite Nanoparticles. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 23, p.1697-1704, 2003.
- [50] STOCH A.; JASTRZEBSKI W.; BROZEK A.; TRYBALSKA B.; CICHOCINSKA M.; SZARAWA E. FTIR Monitoring of the Growth of the Carbonate Containing Apatite Layers from Simulated and Natural Body Fluids. *Journal of molecular Structure*, v.511-512, p.287-294, 1999.

- [51] AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SAERI, M.R.; SORELL, C.C. Some Important Factors in the Wet Precipitation Process of Hydroxyapatite. *Materials and Design*, v.24, p.197-202, 2003.
- [52] CAMPOS, M.; MULLER, F.A.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. Comparative Study of Sonochemical Synthesized  $\beta$ -TCP and BCP- Nanoparticles. *Key Engineering Materials*, v. 254-256, p.923-926, 2004.
- [53] BERNARD, L.; FRECHE, M.; LACOUT, J.L.; BISCANS, B. Preparation of Hydroxyapatite by Neutralization at Low Temperature – Influence of Purity of the Raw Material. *Powder Technology*, v.103, p. 19-25, 1999.
- [54] KAKIHANA, M. Sol-Gel Preparation of High Temperature Superconducting Oxides. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v.6, p.7- 55, 1996.
- [55] TOTH, J.M.; LYNCH, K.L.; DEVINE, T.R. Mechanical and Biological Characterization of Calcium Phosphates for Use as Biomaterials. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering – Part A: Materials*, v. 2, p. 1465-1499, edited by Donald L. Wise et al, 1995.
- [56] FELÍCIO-FERNANDES, G.; LARANJEIRA, M. C. M. Calcium Phosphate Biomaterials from Marine Algae - Hydrothermal Synthesis and Characterization. *Química Nova*, v.23, n.4, p. 441-446, 2000.
- [57] PECHINI, M. P. *US Patent*, n. 3.330.697 (1967).
- [58] ANNE, T. K.; ASHOK, M.; PALANICHAMY, M.; KALKURA, N. S. A novel technique to Synthesize Hydroxyapatite at Low Temperature. *Materials Chemistry and Physics*, v.80, p.725-730, 2003.
- [59] SECKLER, M.M. *Calcium Phosphate Precipitation in a Fluidized Bed*. Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT, São Paulo, 1994.
- [60] ALBUQUERQUE, J.S.V.; NOGUEIRA, R.E.F.Q.; NETO, J.V.F.; JUNIOR, J.I.L.A.; LIMA, D.O.; PINHEIRO, T.D.; PRADO DA SILVA, M.H. Síntese de Apatitas Nanométricas em Diferentes Valores de pH para Aplicações Biomédicas. IN: do 47º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2003, João Pessoa-PB. Anais do 47º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2003, p.2205-2215).
- [61] SECKLER, M.M.; DENISE, M.; DERENZO, S.; VALARELLI, J.V.; GIULIETTI, M.; RODRIGUEZ-CLEMENTE, R. Influence of Process Conditions on Hydroxyapatite Crystallinity Obtained by Direct Crystallization. *Materials Research*, v.2, n.2, p.59-62, 1999.
- [62] GOUVEIA, D. S.; BRESSIANI, A. H. A.; BRESSIANI, J. C. Phosphoric Acid Rate Addition Effect in the Hydroxyapatite Synthesis by Neutralization Method. *Materials Science Forum*, v.530-531, p.593-598, 2006.

- [63] CAMPOS, M., BRESSIANI, A. H., Comparative Study of the Synthesis and Processing of Hydroxyapatite. *Key engineering Materials*, v. 218-220, p.171-174, 2002.
- [64] GOUVEIA, D. S.; COUTINHO, A.C.S.; BRESSIANI, A. H. A.; BRESSIANI, J. C. Effect of  $Mg^{2+}$  Addition during HA Nanoparticles Synthesis using Ultrasonic Irradiation. *Key Engineering Material*, v. 361-363, p.203-206, 2008.
- [65] CAMPOS, M.; MULLER, F. A.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C.; GREIL, P. Sonochemical Synthesis of Calcium Phosphate Powders. *Journal Materials Science: Mater. Med.*, v.18, p.669-675, 2007.
- [66] PRAKASH, K.H.; KUMAR, R.; OOI, C.P.; CHEANG, P. AND KHOR, K. A. Apparent Solubility of Hydroxyapatite in Aqueous Medium and its Influence on the Morphology of Nanocrystallites with Precipitation Temperature. *Langmuir*, v. 22, p.11002-11008, 2006.
- [67] RUSSEL, J. B. *Química Geral*, 1ª ed., São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981.
- [68] LEE, J. D. *Química Inorgânica não tão concisa*. 4ª ed., São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1996
- [69] MARTINES, M.A.U.; DAVOLOS, M.R.; JAFELICCI JÚNIOR, M. Divulgação: O Efeito do Ultra-som em Reações Químicas. *Química Nova*, v.23, n.2, p.251-256, 2000.
- [70] DOS SANTOS, J.G. *Obtenção de dióxido de Titânio Rutilo em Temperaturas Inferiores às Usadas Industrialmente a partir de Diferentes Precursores*. 2004. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- [71] KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S.; BORGES, S.S.; SOUZA, C.S. AND OLIVEIRA, F.S. Reagent Generation Assisted by Ultrasonic Irradiation. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.14, n.2, p.254-258, 2003.
- [72] MAJUNDAR, S.; KUMAR, P.S.; PANDIT, A.B. Effect of Liquid-Phase Properties on Ultrasound Intensity and Cavitation Activity. *Ultrasonic Sonochemistry*, v.5, p.113-118, 1998.
- [73] NASCENTES, C.C.; KORN, M.; SOUSA, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Use of Ultrasonic Baths for Analytical Applications: A New Approach for Optimization Conditions. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.12, n.1, p.57-63, 2001.
- [74] GEDAKEN, A. Using Sonochemistry for the Fabrication of Nanomaterials. *Ultrasonic Sonochemistry*, v.11, p. 47-55, 2004.
- [75] BORGES, S.S. e KORN, M. Geração Sonoquímica de Oxidantes em Solução Aquosa Saturada de Tetracloreto de Carbono. *Química Nova*, v.5, n.4, p.558-562, 2002.
- [76] SUSLICK, K.S. The Chemical Effects of Ultrasound. *Scientific American*, p.80-86, 1989.

- [77] DIDENKO, Y.T.; MCNAMARA III W.B. AND SUSLICK, K.S. Hot Spot Conditions during Cavitation in Water. *J. Amer. Chem. Soc.*, v.121, p.5817-5818, 1999.
- [78] DANTSIN, G. AND SUSLICK, K. S. Sonochemical Preparation of a Nanostructured Bifunctional Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 122, p.5214-5215, 2000.
- [79] KIM, W.; SAITO, F. Sonochemical Synthesis of Hydroxyapatite from  $H_3PO_4$  Solution with  $Ca(OH)_2$ . *Ultrasonics Sonochemistry*, v.8, p.85-88, 2001.
- [80] HAN, Y.; LI, S.; WANG, X.; BAUER, I.; YIN, M. Sonochemical Preparation Of Hydroxyapatite Nanoparticles Stabilized by Glycosaminoglycans. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.14, p.286-290, 2007.
- [81] MCCUSKER, L.B.; VON DREELE, R.B.; COX, D.E.; LOUËR, D.; SCARDI, P. Rietveld Refinement Guidelines. *Journal of Applied Crystallography*, v.32, p.36-50, 1999.
- [82] INTERNATIONAL STANDARD. *Biological Evaluation of Medical Devices- Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods*. 1<sup>a</sup> Ed., 1992, (ISO 10993-5 1992).
- [83] ISHIKAWA, K.; DUCHEYENE, P.; RADIN, S. Determination of the Ca/P Ratio in Calcium-deficient Hydroxyapatite Using X-ray Diffraction Analysis. *Journal of Material Science – Materials in Medicine*, v. 4, p. 165-168, 1993.
- [84] RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLANT, D.; Thomas, P. Calcium Phosphate Apatites with Variable Ca/P Atomic Ratio I: Synthesis, Characterization and Thermal Stability of Powders. *Biomaterials*, v.23, p.1065-1072, 2002.
- [85] KONGSHAUG K.O.; FJELLVAG, H.; LILLERUD, K.P. Synthesis and Crystal Structure of the Hydrated Magnesium Diphosphate  $Mg_2P_2O_7 \cdot 3.5H_2O$  and its High Temperature Variant  $Mg_2P_2O_7 \cdot H_2O$ . *Solid State Sciences*, v. 2, p. 205–214, 2000.
- [86] YASUKAWA A.; OUCHI, S.; KANDORI, K. and ISHIKAWA, T. Preparation and Characterization of Magnesium-Calcium Hydroxyapatites. *Journal of Materials Chemistry*, v.6, n.8, p.1401-1405, 1996.

- [87] BIGI, A.; FALINI, G.; FORESTI, E.; GAZZANO, M.; RIPAMONT, A. Magnesium Influence on Hydroxyapatite Crystallization. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.49, p.69-78, 1993.
- [88] LIAO, C.J.; LIN, F.H.; CHEN K. S.; SUN, J.S. Thermal Decomposition and Reconstitution of HAp in air atmosphere. *Biomaterials*, v.20, p.1807-1813, 1999.
- [89] SLOSARCZYK, A.; PALUSZKIEWICZ, C.; GAWLICKI, M. and PASZKIEWICZ, Z. The FTIR Spectroscopy and QXRD Studies of Calcium Phosphate Based Materials Produced from the Powder Precursors with Different Ca/P ratios. *Ceramics International*, v.23, p.297-304, 1997.
- [90] GOUVEIA, D.S.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J. C. Efeito do Carbonato Durante a Síntese da Hidroxiapatita. IN: 17º CBECIMat - CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Anais do 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais
- [91] TAMPIERI A.; CELLOTI, G.; SPRIO, S.; MINGAZZINI, C. Characteristics of Synthetic Hydroxyapatites and attempts to improve their Thermal Stability. *Materials Chemistry and Physics*, v.64, p.54-61, 2000.
- [92] OLIVEIRA, I.R.; STUDART, A.R.; PILLEGI, R.G.; PANDOLFELLI, V.C. *Dispersão e Empacotamento de partículas – princípios e Aplicações em Processamento Cerâmico*. São Paulo, Fazenda Arte Editorial, 2000.
- [93] TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; SZONTAGH, F. AND LANDI, E. Sintering and Characterization of HA and TCP Bioceramics with Control of their Strength and Phase Purity. *Journal of materials Science: Materials in Medicine*, v.8, p.29-37, 1997.
- [94] DESTAINVILLE, A.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLANT, D.; LABORDE, E. Synthesis, Characterization and Thermal Behaviour of Apatite Tricalcium Phosphate. *Materials Chemistry and Physics*, v.80, p.269-277, 2003.

---

[95] SEPULVEDA, P.; BRESSIANI, A.H.; BRESSIANI, J.C.; MESEGUER, L.O.; KONIG JR.B. In Vivo Evaluation of Hydroxyapatite Foams. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.62, n.4, p.587-592, 2002.

[96] Konig JR.B. and LOPES, C.C. Bone Remodeling Analysis After Placement of Dental implants Using Polyfluorochrome Sequential Labeling. *Annals of Anatomy*, v.184, p.241-244, 2002.

[97] RHINELANDER, F.W. Physiological Responses of Bone to Implants. IN: Williams, D.F. (editor): *Biocompatibility of Orthopedic Implants*, Boca Raton, FL., 1982, CRC Press, v.1, p.51-74.

GOUVEIA, D.S.; RIGO, E.C.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. *Estudo da Obtenção de Hidroxiapatita em Diferentes Temperaturas*. In: 48º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2004, Curitiba-PR. 46º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2004.

GOUVEIA, D.S.; RIGO, E.C.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. *Síntese de Hidroxapatita Preparada por Neutrlização Com e Sem Ação de Frequência Ultra-Sônica*. In: III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2004, Campinas. Anais do III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2004.

GOUVEIA, D.S.; RIBEIRO, C.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. *Sinterização de Pós de Hidroxapatita Comercial e Obtido Pelo Método de Neutralização*. In: CBECIMat, 2004, Porto Alegre, 2004.

GOUVEIA, D.S.; BRESSIANI, A.H.; BRESSIANI, J.C. *Phosporic acid adition effect in the hydroxypatite syntesis by neutralization method*. In: Fifth International Latin-American Conference on Powder Tecnology, 2005, Costa do Sauípe - BA. Proceeding of the Fifth International Latin-American Conference on Powder Tecnology. p. 01-11.

GOUVEIA, D.S.; GUIMARAES, L.M.F.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. *Efeito da adição do  $Mg^{2+}$  da síntese da HA*. In: IV COLAOb - Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2006, Caxambú - MG. Anais do IV COLAOb - Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2006.

GOUVEIA, D.S.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. *Efeito do Carbonato durante a síntese da hidroxiapatita*. In: 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais - CBECIMat, 2006, Foz do Iguaçu - PR. Anais do 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais - CBECIMat, 2006. v. 1. p. 133-143.

GOUVEIA, D.S.; GUIMARAES, L.M.F.; BRESSIANI, A.H.; BRESSIANI, J.C. *Efeito da velocidade de adição do  $H_3PO_4$  e da adição do  $Mg^{2+}$  na síntese da HA*. In: 51º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2007, Salvador - BA. Anais do 51º Congresso Brasileiro de Cerâmica - Ref.: 13-09. São Paulo: Associação Brasileira de Cerâmica, 2007. p. 1-10.

GOUVEIA, D.S.; COUTINHO, A.C.S.; GUIMARAES, L.M.F.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. *Utilização do Método de Rietveld na caracterização de Ha com adição do  $Mg^{2+}$* . In: 51º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2007, Salvador - BA. Anais do 51º Congresso Brasileiro de Cerâmica - Ref. 13-10. São Paulo: Associação Brasileira de Cerâmica, 2007. p. 1-10.

GOUVEIA, D.S.; COUTINHO, A.C.S.; Bressiani, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. *Effect of  $Mg^{2+}$  Addition During HA Nanoparticles Synthesis Using Ultrasonic Irradiation*. Key Engineering Materials, v. 361-63, p. 203-206, 2008.

GOUVEIA, D.S.; GOIA, T.S.; VIOLIN, K.B.; HIGA, O.Z.; BRESSIANI, A.H.A.; BRESSIANI, J.C. *In Vitro and in Vivo Evaluation of Hydroxyapatite Nanopowders*. In: 8<sup>th</sup> World Biomaterials Congress - Amsterdam - Holanda.