

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA,
MATERIAIS E DE MINAS

Dissertação de Mestrado

**Síntese e caracterização de biocerâmicas à base de
fosfato de cálcio modificada com nióbio**

Aluna: Nádia Sueli Vieira Capanema

Orientador: Prof. Herman Sander Mansur, Dr.

Coorientadora: Alexandra Ancelmo Piscitelli Mansur, Dra.

Abril/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA,
MATERIAIS E DE MINAS

Nádia Sueli Vieira Capanema

**Síntese e caracterização de biocerâmicas à base de
fosfato de cálcio modificada com nióbio**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade
Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais
Orientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur
Coorientadora: Dra. Alexandra Ancelmo Piscitelli Mansur
Belo Horizonte

C236s

Capanema, Nádia Sueli Vieira.

Síntese e caracterização de biocerâmicas à base de fosfato de cálcio modificada com nióbio [manuscrito] / Nádia Sueli Vieira Capanema. – 2014.

xix, 143 f., enc.: il.

Orientador: Herman Sander Mansur.

Coorientadora: Alexandra Ancelmo Piscitelli Mansur.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Anexos: f.142-143.

Bibliografia: f.122-134

1. Engenharia metalúrgica – Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses.
I. Mansur, Herman Sander, 1962-. II. Mansur, Alexandra Ancelmo Piscitelli. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia.
IV. Título.

CDU: 669(043)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir chegar e concluir esta etapa.

Ao meu companheiro de jornada e ao meu filho, pela paciência e compreensão durante as ausências.

Ao professor Herman Sander Mansur, por ter me dado o suporte necessário para realização desta pesquisa e participar de maneira vibrante em cada etapa do projeto.

À Alexandra Mansur, pela atenção e participação no dia a dia do trabalho no laboratório.

À Professora Alexandra Rodrigues Pereira da Silva, pela realização dos ensaios biológicos.

As laboratoristas, Andréa Bicalho, e Patrícia Azevedo que tiveram sempre a disponibilidade para atender às solicitações.

Aos meus colegas Fábio Perereira Ramanery, Marys Lene Braga Almeida, Patrícia Saliba e Vítor César Dumont, pela companhia e colaboração na execução dos ensaios.

Ao Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da UFMG, aos professores pela disponibilidade de infraestrutura dos laboratórios e materiais para realização dos ensaios, e em especial aos funcionários Maria Aparecida Pacheco, e Nelson Azevedo.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

À JHS Laboratório Químico Ltda, especialmente na pessoa da Professora Sheyla Máximo, pelo fornecimento de hidroxiapatita utilizada nos experimentos.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO 3. REVISÃO TEMÁTICA.....	6
3.1. Tecido Duro em Humanos e a Ciência.....	6
3.1.1. Tecido Dentário e a Odontologia	7
3.1.1.1. Esmalte	9
3.1.1.2. Dentina	10
3.1.1.3. Odontologia	10
3.1.2. Tecido Ósseo e Ortopedia	11
3.1.2.1. Tecido Ósseo	11
3.1.2.2. Ortopedia	13
3.2. Biomateriais.....	14
3.2.1. Histórico	14
3.2.1.1. Biomateriais na Odontologia.....	15
3.2.2. Biomateriais à Base de Fosfato de Cálcio	16
3.2.2.1. Hidroxiapatita (HAP)	17
3.2.2.2. β -Fosfato tricálcico (β TCP - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	25
3.2.2.3. Material Bifásico HAP - β TCP.....	26
3.3. Biomateriais Compósitos.....	27
3.3.1. Nióbio	29
3.3.2. Compósitos Hidroxiapatita/Nióbio.....	31
3.4. Engenharia de Tecidos	32

3.4.1.	Engenharia de Superfície.....	33
3.5.	Caracterização	34
3.5.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
3.5.2.	Espectroscopia de Raio-x por Dispersão em Energia (EDS)	36
3.5.3.	Difração de Raios-X (DRX).....	37
3.5.4.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	38
3.5.5.	Microscopia de Força Atômica (AFM)	38
3.5.6.	Análise Térmica.....	39
3.5.6.1.	Análise Termogravimétrica (TGA)	40
3.5.6.2.	Análise Térmica Diferencial (DTA).....	40
3.5.6.3.	Análise Calorimétrica Diferencial (DSC)	41
3.6.	Caracterização do Fosfato de Cálcio e do Fosfato de Cálcio modificado com Nióbio.....	41
3.6.1.	Caracterização Morfológica de Fosfato de Cálcio	41
3.6.1.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	41
3.6.2.	Análise das fases cristalinas	44
3.6.2.1.	Difração de Raios-X (DRX).....	44
3.6.2.1.1.	Análise dos parâmetros de rede do cristal de HAP	48
3.6.3.	Caracterização da Composição Estrutural.....	49
3.6.3.1.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	49
3.6.3.1.1.	Análise Química dos Grupos Funcionais	49
3.6.3.2.	Espectroscopia de Raio-x por Dispersão em Energia (EDS)	52
3.6.4.	Análise Térmica.....	55
3.6.5.	Caracterização Biológica.....	58
3.6.5.1.	Ensaio de Viabilidade Celular Via MTT (3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5- diphenyl-tetrazolium bromide).....	58

CAPÍTULO 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	60
4.1. Síntese de Cerâmicas de Fosfato de Cálcio	60
4.2. Materiais	60
4.2.1. Materiais e equipamentos utilizados na síntese das biocerâmicas	60
4.2.2. Amostra de referência (HAPc)	61
4.3. Procedimentos	61
4.3.1. Síntese do Fosfato de Cálcio	61
4.3.2. Síntese do Fosfato de Cálcio com adição de Nióbio	63
4.4. Caracterização dos Pós de Fosfato de Cálcio e do Fosfato de Cálcio/Nióbio	64
4.4.1. Análise Química e Mineralógica	64
4.4.1.1. Espectroscopia de Raio-x por Dispersão em Energia (EDS)	64
4.4.1.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	65
4.4.1.3. Difração de Raios X (DRX)	65
4.4.1.4. Cálculo do Tamanho do Cristalito.....	66
4.4.2. Análise Morfológica.....	67
4.4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	67
4.4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	67
4.4.2.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)	67
4.4.3. Análise Térmica.....	67
4.4.4. Ensaios para Avaliação da Biocompatibilidade <i>In Vitro</i>	68
CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1. Síntese do Fosfato de Cálcio e do Fosfato de Cálcio com adição de Nióbio.....	70
5.1.1. Monitoramento e Controle do pH durante a síntese	70
5.1.2. Síntese do Material	70

5.2.	Caracterização do Fosfato de Cálcio	70
5.2.1.	Análise Química e Mineralógica	70
5.2.1.1.	Espectroscopia de Raio-x por Dispersão em Energia (EDS)	70
5.2.1.2.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	73
5.2.1.3.	Difração de Raios-X (DRX).....	75
5.2.2.	Análise Morfológica.....	77
5.2.2.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	77
5.2.2.2.	Microscopia de Força Atômica (AFM)	81
5.2.2.2.1.	Análise Morfológica de Imagens 3D de AFM – Amostras de HAP_110 e HAP_900	81
5.2.2.2.2.	Avaliação de dimensões de imagens de AFM – Amostra de HAP_110	82
5.2.2.2.3.	Avaliação de dimensões de imagens de AFM – Amostra HAP_900.	84
5.2.3.	Análise Térmica.....	86
5.3.	Caracterização do Fosfato de Cálcio modificado com Nióbio (CaP/Nb).....	89
5.3.1.	Análise Química e Mineralógica	90
5.3.1.1.	Espectroscopia de Raio-x por Dispersão em Energia (EDS)	90
5.3.1.2.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	93
5.3.1.3.	Difração de Raios-X (DRX).....	96
5.3.2.	Análise Morfológica do Fosfato de cálcio com adição de Nióbio ...	104
5.3.2.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	104
5.3.2.2.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET/EDS).....	107
5.3.3.	Análise térmica	117
5.3.4.	Avaliação da Biocompatibilidade In Vitro das HAP	119
CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES.....		120

CAPÍTULO 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
BIBLIOGRAFIA	135
ANEXOS	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Representação esquemática da anatomia do dente	8
Figura 3.2	Representação esquemática da macro a nanoestrutura do osso	12
Figura 3.3	A estrutura de cristal de hidroxiapatita idealizada, vistos ao longo do eixo c	20
Figura 3.4	Representação dos sítios Ca I e Ca II da HAP com relação aos grupos fosfatos e hidroxila (Ca: verde; O: vermelho; P: roxo; H: branco) ...	21
Figura 3.5	Representação esquemática da estrutura cristalina da fase β TCP adaptado de BONADIO <i>et al.</i> (2011)	26
Figura 3.6	Estrutura cristalina do nióbio (Nb)	30
Figura 3.7	Estrutura cristalina do pentóxido de nióbio (Nb_2O_5)	31
Figura 3.8	Representação esquemática dos componentes do MEV	35
Figura 3.9	Raios-X característicos (1), Elétrons secundários (2), Elétrons retroespalhados (3) e Feixe primário (4)	36
Figura 3.10	Diagrama representativo de funcionamento do microscópio de força atômica	39
Figura 3.11	Fotomicrografia MEV da HAP	42
Figura 3.12	Micrografia de MEV da amostra HAP, antes do tratamento térmico, com aspecto mais poroso e menos denso	43
Figura 3.13	Micrografia de MEV da amostra HAP, após tratamento térmico	43
Figura 3.14	Difratograma de HAP da literatura (PETERS; SCHWARZ; EPPLE, 2000) e difratograma das amostras de HAP tratadas a 110°C, evidenciando semelhança entre os picos	44
Figura 3.15	Evidência da coincidência entre o difratograma de DRX de β TCP da literatura (CHUSSEI; GOODMAN, 1999) em preto e um dos difratograma da amostra do trabalho de OLIVEIRA, 2004	45
Figura 3.16	Evidenciação da região do difratograma de DRX que apresenta os picos e planos de material bifásico HAP / β TCP em R2 B1 900 BIF., destacando os picos de cada fase e os respectivos planos de rede do cristal ($\bullet$ HA; β TCP)	46

Figura 3.17	Difratogramas de DRX mostrando a formação de material bifásico em R1-1 900 BI e R1-5 900 BI e formação de HAP pura em R1-2 900 HAP e R1-3 900 HAP ($\bullet$ HAP; β TCP) 47
Figura 3.18	Comparação entre a largura dos picos dos difratogramas de uma mesma amostra HAP tratada a 25°C, 110°C e 900°C (amostra R1-4) 48
Figura 3.19	Espectro de FTIR com as bandas de absorção no infravermelho referentes às ligações químicas dos grupamentos funcionais da composição da amostra A2 (HAP) e A5 (HAP- β TCP) 51
Figura 3.20	Espectros de FTIR da amostra A2 de (HAP), HAPc (comercial), e HAP da literatura (OLIVEIRA, 2004) (B). 51
Figura 3.21	Espectro de EDS com picos dos principais constituintes, Ca e P, e dos traços de elementos da amostra HAP, antes do tratamento térmico .. 53
Figura 3.22	Espectro de EDS, após tratamento térmico a 900°C: (A) Pó de HAP, espectro com picos de maior intensidade de Ca e P e traços de outros elementos; (B) espectro com picos de maior intensidade de Ca e P, e presença de picos de baixa intensidade de Mg, Si, K e Zn nas amostras dopadas com HAPZn 54
Figura 3.23	Curva TG da HAP 55
Figura 3.24	Curvas de DTA, TG e DTG da HAP calcinada a 500°C 57
Figura 3.25	Viabilidade celular avaliada por MTT após 72hs de incubação: osteoblastos não mostraram nenhuma diferença significativa na proliferação, na presença de todos compósitos, quando comparados com o controle. Os resultados representam a média $\pm$ SD de três experiências separadas ($p < 0,05$) 59
Figura 4.1	Procedimentos para obtenção de Material CaP 63
Figura 5.1	Espectros de EDS representativos das amostras de HAP_110 (A) e HAP_900 (B), com picos dos principais constituintes, Ca, P 71
Figura 5.2	Espectro de EDS representativo da HAP Comercial (JHS) com picos dos principais constituintes, Ca e P 72
Figura 5.3	Espectros de FTIR obtidos para a HAP_110 (a) e HAP_900 (b) 74
Figura 5.4	Padrões de difração de raios-X obtidas para as amostras HAP_110 (a) e HAP_900 (b) e do padrão de referência da HAP (ICDD - 96-900-3549) com os principais picos 76

Figura 5.5	Imagens de MEV da HAP_110 (a) e HAP_900 (b), após tratamento térmico 110 e 900°C, com aumento de 10.000X	78
Figura 5.6	Imagens de MEV da HAP Comercial (JHS), após tratamento térmico 900°C, com aumento de 10.000X	79
Figura 5.7	Imagens de MEV da HAP_110 (a) e HAP_900 (b), após tratamento térmico 110 e 900°C, com aumento de 20.000X	81
Figura 5.8	Imagens de MEV da HAP Comercial, após tratamento térmico 900°C, com aumento de 20 000X	81
Figura 5.9	Imagens 3D AFM, com HAP_110 em (A); e HAP_ 900 em (B)	82
Figura 5.10	AFM da Amostra HAP_110 – Medida de dimensão de partícula na direção 1	83
Figura 5.11	AFM da Amostra HAP_110 – Medida de dimensão de partícula na direção 2	83
Figura 5.12	AFM da Amostra HAP_110 – Medida de dimensão de partícula na direção 1	84
Figura 5.13	AFM da Amostra HAP_110 – Medida de dimensão de partícula na direção 2	84
Figura 5.14	AFM da Amostra HAP_900 – Medida de dimensão de partícula na direção 1	85
Figura 5.15	AFM da Amostra HAP_900 – Medida de dimensão de partícula na direção 2	85
Figura 5.16	TG – (A) Perda de Massa (%) e (B) Calorimetria exploratória diferencial. Comparação entre as amostras HAP_110 (a) e HAP_900 (b)	86
Figura 5.17	Curvas de DSC (a) e TG (b) da HAP_110 (A) e HAP_900 (B)	88
Figura 5.18	Espectro de EDS da HAP-Nb_110	90
Figura 5.19	Espectro de EDS da HAP-Nb_900	91
Figura 5.20	Mapas composicionais dos elementos Ca, P, O, Nb da amostra de HAP-Nb 900	93
Figura 5.21	Espectro de FTIR das amostras HAP- Nb tratadas termicamente a 110°C (a) e 900°C (b)	94

Figura 5.22	Espectro de FTIR das amostras de HAP_110 (a) e HAP-Nb_110 (b) 95
Figura 5.23	Espectro de FTIR das amostras de HAP_900 (a) e HAP-Nb_900 (b) 96
Figura 5.24	Difratogramas da HAP (a) e HAP-Nb (b) com tratamento térmico 110°C e em (c) HAP e (d) HAP-Nb com tratamento térmico a 900°C, comparado com o padrão de referência da HAP (ICDD – 96-900-3549) com os principais picos 97
Figura 5.25	Difratogramas da HAP_110 (a) e HAP-Nb_110 (b) com tratamento térmico 110°C 98
Figura 5.26	Difratogramas da HAP_110 (a) e HAP-Nb_110 (b) com tratamento térmico 110°C 98
Figura 5.27	Difratogramas da HAP_110 (a) e HAP-Nb (b) com tratamento térmico 110°C 99
Figura 5.28	Difratogramas da HAP_110 (a) e HAP-Nb_110 (b) com tratamento térmico 110°C 99
Figura 5.29	Valores do parâmetro de rede $a=b$ calculados para as amostras em avaliação 101
Figura 5.30	Valores do parâmetro de rede c calculados para as amostras em avaliação 101
Figura 5.31	Tamanho de cristalitos das amostras de HAP_110 e HAP-Nb_110 103
Figura 5.32	Tamanho de cristalitos das amostras de HAP_900 e HAP-Nb_900 104
Figura 5.33	Imagens de MEV da HAP_110 (a) e HAP-Nb_110 (b), após tratamento térmico 110, com aumento de 20.000X 105
Figura 5.34	Imagens de MEV da HAP_900 (a), (b) Região projetada de (a) e HAP-Nb_900 (c), (d) Região projetada de (c), após tratamento térmico 900°C, com aumento de 20.000X 106
Figura 5.35	Histograma do Tamanho de Partículas das Amostras 107
Figura 5.36	Imagens de MET da HAP_900, após tratamento térmico 900°C em ampliações crescentes 108
Figura 5.37	Imagens de MET da HAP-Nb_900, após tratamento térmico 900°C em ampliações crescentes 109
Figura 5.38	Espectro de EDS da HAP_900, após tratamento térmico 900°C 111

Figura 5.39	Resultados de EDS obtidos para a amostra HAP_900 no EDS acoplado ao microscópio eletrônico de transmissão 112
Figura 5.40	Espectros de EDS da HAP-Nb_900, após tratamento térmico 900°C. Nos detalhes as transições $L\alpha$ e $K\alpha$ do Nb 113
Figura 5.41	Resultados de EDS obtidos para a amostra HAP-Nb_900 no EDS acoplado ao microscópio eletrônico de transmissão 114
Figura 5.42	Representação esquemática da estrutura de cristal de HAP idealizada, vistos ao longo do eixo c, (JONES, 2001), modificado para HAP parcialmente substituída com Nb obtida neste estudo 116
Figura 5.43	(A) Perda de Massa (%) e (B) Calorimetria exploratória diferencial. Comparação entre as amostras de HAP-Nb_110 e HAP-Nb_900 .. 118
Figura 5.44	Gráfico com absorbância dos cristais de formazan avaliados pelo ensaio de MTT 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Exemplos de fosfato de cálcio, com seu respectivo nome, fórmula química e relação Ca/P	19
Tabela 3.2	Identificação de picos de amostras de HAP e β TCP em FTIR	50
Tabela 5.1	Análise Quantitativa de Elementos Químicos	73
Tabela 5.2	Evento Térmico e Temperatura de Transição	89
Tabela 5.3	Relação Molar (Ca+Nb)/P	92
Tabela 5.4	Parâmetros de rede	100
Tabela 5.5	Volume das células unitárias	102
Tabela 5.6	Medida de tamanho de partícula HAP, HAP-Nb	106
Tabela 5.7	Relação molar Ca/P teórica e experimental	112
Tabela 5.8	Composição Química da Hidroxiapatita parcialmente substituída por Nb	117

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação Representativa da Síntese de HAP (3.1)	17
Equação de obtenção de HAP (4.1)	60
Equação de Webstar (4.2)	66
Equação de Scherrer (4.3)	66
Cálculo de Volume da Célula Unitária (5.1)	102

LISTA DE NOTAÇÕES E ABREVIATURAS

Å	Angstrom
a.C.	antes de Cristo
AFM	Microscopia de força atômica (<i>Atomic force microscopy</i>)
CaP	Fosfato de cálcio
CN	Controle Negativo
COL	Colágeno
d.C.	depois de Cristo
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DP	Desvio Padrão
DRX	Difratometria de Raios X (<i>XRD-X Ray Diffraction</i>)
DSC	Análise calorimétrica diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
EDS	Espectroscopia de Raios-X por Dispersão em Energia
EMP	Erro Médio Padrão
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier
HAP	Hidroxiapatita

HAP-110	Hidroxiapatita tratada termicamente a 110°C
HAP-900	Hidroxiapatita tratada termicamente a 900°C
HAPc	Hidroxiapatita comercial
HAP-Nb_110	Hidroxiapatita com Nióbio tratada termicamente a 110°C
HAP-Nb_900	Hidroxiapatita com Nióbio tratada termicamente a 900°C
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura (<i>SEM-Scanning Electron Microscopy</i>)
ML	Microscopia Ótica de Luz
MO	Microscópio Ótico
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)
PBS	Solução Salina de Tampão Fosfato
TGA	Análise termogravimétrica
VHN	Ensaio de Dureza Vickers
βTCP	β fosfato tricálcico

RESUMO

O principal objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da incorporação do metal de transição Nb^{5+} nas propriedades de biocerâmicas à base de Fosfato de Cálcio (CaP) produzidas. Portanto, neste trabalho foi sintetizada a biocerâmica de Fosfato de Cálcio (CaP) com a adição de 1% molar de sal de nióbio (Nb) cujas propriedades foram comparadas ao material sem modificação (CaP) para potencial aplicação como biomateriais para reposição e regeneração óssea. O Nb foi utilizado nesta pesquisa devido ao seu comportamento e propriedades similares a de outros metais de transição e por sua relativa disponibilidade uma vez que o Brasil possui a maior produção mundial desse metal.

A rota de síntese por precipitação foi escolhida por apresentar simplicidade na técnica, reagentes de baixo custo e disponibilidade comercial, utilização de equipamentos de rotina e acessíveis nos laboratórios de química, associado a um tempo de execução de aproximadamente 4 horas. Esta rota de síntese favoreceu a formação, com ou sem adição de Nb, de uma única fase predominante de fosfato de cálcio (CaP), denominada de hidroxiapatita (HAP), verificada pelas análises de difração de raios X (DRX) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As fases de HAP carbonatada ou HAP cristalinas foram obtidas em função do tratamento térmico realizado, secagem a 110°C ou sinterização a 900°C, respectivamente. A sinterização promoveu o aumento do tamanho médio do cristalito e a densificação do material produzido.

Os resultados mostraram a incorporação de Nb na HAP produzida, preferencialmente pela substituição dos sítios catiônicos de Ca^{2+} pelo Nb^{5+} , verificada pela variação nas propriedades avaliadas, como a redução no parâmetro da célula unitária, redução do tamanho médio das partículas após sinterização, maior coalescimento das partículas, entre outros aspectos. Finalmente, as biocerâmicas produzidas com a modificação parcial Nb^{5+} apresentaram citocompatibilidade e bioatividade *in vitro* similares a a HAP evidenciando potencial aplicações como biomateriais e em engenharia de tecido ósseo.

PALAVRAS CHAVE: Biomateriais, biocerâmica, fosfato de cálcio, hidroxiapatita, hidroxiapatita modificada com nióbio.

ABSTRACT

The need for obtaining new materials to replace human body parts that were destroyed or damaged led scientists from different areas of research for developing new biomaterials. Thus, the aim of this work was the synthesis and characterization of niobium-modified apatite bioceramics. Calcium phosphates (CaP) were synthesized with niobium partially replacing calcium sites using aqueous precipitation route at room temperature. The bioceramics, with and without Nb incorporation, were characterized by scanning electron microscopy (SEM) coupled with energy dispersive spectroscopy (EDS) and X- ray diffraction (XRD) as prepared and after heat treatments. The results indicated that Nb was incorporated in the apatite structure promoting morphological and structural changes in the ceramic properties.

KEYWORDS: Biomaterials, bioceramics, calcium phosphate, hydroxyapatite, hydroxyapatite modified with niobium.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

A necessidade de obtenção de novos materiais para substituição de partes do corpo humano que foram destruídas ou danificadas conduziu cientistas das mais diferentes áreas a investigação de novos materiais utilizados para implantes.

A reconstrução ou substituição de partes do organismo tem sido um desafio para a espécie humana há pelo menos 3000 anos. Achados arqueológicos demonstram que, desde essa época, as antigas civilizações já teriam realizado tentativas de reconstruir partes do crânio por meio de implantes. Mais antigo ainda são as trepanações (perfurações) em crânios, praticadas por vários motivos em inúmeras civilizações. As civilizações americanas pré-colombianas, como os Incas, também realizaram essas operações, estando expostos em museus uma série de instrumentos cirúrgicos, crânios e implantes (DUALIBI *et al.*, 2008).

As primeiras tentativas de substituição de partes do corpo humano durante a guerra foram frustrantes. Com isso, estabeleceu-se na época como objetivo a identificação de materiais que, além das propriedades estruturais e de não provocarem sérios danos à saúde do paciente, não fossem rejeitados pelo organismo.

Após esses eventos, o Comitê Americano para o Tratamento de Fraturas do Colégio Americano de Cirurgiões recomendou formalmente, em 1947, que fossem utilizados aços inoxidáveis como materiais para implante em casos de fratura. Desde então, vários materiais sintetizados em laboratório foram criados, desenvolvidos, testados e considerados adequados ou não para a utilização em implantes com as mais variadas funções (BINI, 2007; RODRIGUES, 2008).

A importância no desenvolvimento de biomateriais envolve, dentre outras coisas, o envelhecimento da população. À medida que o ser vivo envelhece, ocorrem desgastes de várias formas. Embora muitos fatores responsáveis pelo envelhecimento não sejam compreendidos, as consequências são bastante claras. Dentes causam dor, articulações se tornam artríticas, ossos ficam frágeis e quebram, os poderes de audição e visão

diminuem, dentre outras coisas. E, como se estes processos naturais não fossem o bastante, a popularização dos esportes de alto risco levaram a uma onda de doenças relacionadas ao osso (ORÉFICE, 2006). A importância de se aperfeiçoar e desenvolver materiais para próteses dentárias e ortopédicas está inserida neste contexto. Uma prova disso é que só nos Estados Unidos, cerca de 2 a 3 milhões de partes artificiais são implantadas a cada ano (ORÉFICE, 2006).

Diante desses fatos, pesquisas visando o desenvolvimento de biomateriais são de extrema importância. Existem diversos materiais que atualmente são utilizados na confecção de implantes artificiais, como por exemplo, metais, polímeros, cerâmicas e compósitos (PARK, 1992). Além disso, o emprego de materiais sintéticos em próteses ósseas e dentárias é clinicamente bem estabelecido devido à maior praticidade e segurança em relação aos transplantes de uma pessoa para outra (DOROZHUKIN, 2011).

Os metais têm um merecido destaque no emprego de substitutos ósseos devido ao fato de possuírem excelentes propriedades mecânicas, tais como: dureza, módulo de elasticidade e resistência à fadiga (PARK, 1992). Entretanto, esses materiais podem apresentar certos inconvenientes como rejeições biológicas, infecções, perda de massa óssea e deslocamento na interface osso implante devido à falta de compatibilidade estrutural e de superfície (BENTO, 2003). Logo, surgiu um novo conceito que diz respeito ao uso de cerâmicas como materiais biocompatíveis.

Atualmente, são produzidas algumas cerâmicas com propriedades mecânicas aceitáveis para substituições ósseas, com a vantagem de estimularem o crescimento ósseo, acelerando o processo de recuperação das partes do corpo danificadas (GOMIDE, 2005). As cerâmicas de um modo geral são mais adequadas, em relação aos metais, do ponto de vista estético, de biocompatibilidade e de resistência química. Algumas cerâmicas densas, como alumina e zircônia, possuem baixa porosidade e boa resistência mecânica (HENCH, 1998). Essas cerâmicas são utilizadas em reconstituição de cabeça de fêmur e em implantes dentários. Desde a primeira cerâmica relatada na década de 1980, cimentos de fosfato de cálcio têm atraído grande interesse como substitutos

ósseos para a reconstrução de tecidos duros, devido à sua excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade (LIU *et al.*, 2013).

As cerâmicas a base de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), destacam-se pela propriedade de bioatividade. Sua utilização na substituição do tecido ósseo ocorre devido ao fato de sua composição química ser similar à da matriz óssea. Tal fato favorece a melhor interação entre o tecido vivo e o material implantado com a formação de uma ligação biomaterial-tecido ósseo (ORÉFICE, 2006).

Cerâmicas porosas de hidroxiapatita, por exemplo, podem ser preparadas quando se necessita de uma rápida recuperação do tecido ósseo. É o caso, por exemplo, do preenchimento de cavidades oriundas de processos inflamatórios, osteoporose, acidentes e em alguns tipos de implantes ósseos. Os implantes porosos possuem grande área superficial o que permite uma maior área de contato melhorando, assim, a interface implante-tecido ósseo, pois os poros interconectados permitem que o tecido vivo permeie estes poros possibilitando e facilitando a osteointegração (WEINAND, 2009).

Como a grande maioria dos materiais cerâmicos, a hidroxiapatita é um material frágil. Uma das maneiras para reforçar esta cerâmica é desenvolver materiais compósitos ou parcialmente modificados, combinando as propriedades de bioatividade da hidroxiapatita com propriedades adequadas de outros materiais (WILLIANS, 1987).

A maior parte dos implantes metálicos é manufaturada de titânio devido as suas propriedades mecânicas e por ser resistente a corrosão. Outro material com propriedades semelhantes às do titânio, porém bem menos estudado, é o nióbio. O nióbio, além de ser um material biocompatível, é um dos minérios mais abundantes no Brasil, que possui cerca de 90% das reservas mundiais (NASCIMENTO, 2009).

Recentes trabalhos comprovaram que é possível desenvolver um compósito nanoestruturado utilizando o nióbio e a hidroxiapatita (NASCIMENTO *et al.*, 2011; WEINAND, 2009). Esses trabalhos apontaram para o desenvolvimento de novos e vantajosos materiais bioativos. Por outro lado, atualmente o número de publicações nacionais e internacionais, explorando a biocompatibilidade do nióbio, é muito menor

do que o do titânio (NASCIMENTO *et al.*, 2011). Assim, parece promissor desenvolver uma HAP modificada com Nb, fazer sua caracterização, e estudar suas propriedades para futura aplicação em Engenharia de Tecidos Duros.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar biocerâmicas à base de fosfato de cálcio com a adição de nióbio produzidos por rota aquosa para potencial aplicação em Engenharia de Tecidos Duros.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar as biocerâmicas de fosfato de cálcio.
- Caracterização estrutural, espectroscópica e morfológica das biocerâmicas desenvolvidas.
- Sintetizar biocerâmicas de fosfato de cálcio quimicamente modificada com nióbio (1% molar).
- Caracterização estrutural e morfológica das biocerâmicas desenvolvidas modificadas com nióbio.
- Avaliar os efeitos do tratamento térmico nas propriedades físicas e químicas das biocerâmicas.
- Avaliar a citocompatibilidade das biocerâmicas através de teste de citotoxicidade *in vitro*.

CAPÍTULO 3. REVISÃO TEMÁTICA

O aumento crescente no número de pessoas que vivem mais tempo e que estão em atividade até uma idade mais avançada, como também o aumento das injúrias nos esportes levaram a um desenvolvimento maior da ciência médica reconstrutiva. Assim a mimetização de tecidos humanos tornou-se um importante mecanismo de busca para cura de doenças. Esta busca resulta em um envolvimento amplo de profissionais e instituições formando parcerias com o objetivo comum de melhorar a qualidade de vida dos seres humanos. A ciência dos materiais, juntamente com o estudo da biologia celular e molecular, desempenha um papel importante no desenho, na estrutura e nas propriedades de um biomaterial. Assim, alguns temas de relevância neste contexto serão abordados (OLIVEIRA, 2004).

3.1. TECIDO DURO EM HUMANOS E A CIÊNCIA

Do quinto ou quarto século a.C. até o primeiro ou segundo século d.C., os achados arqueológicos exibidos em museus mostram que os materiais usados para recolocar dentes humanos perdidos eram dentes de bois, conchas, corais, marfim, madeira, dentes humanos de cadáveres e metais (ouro ou prata). Posteriormente, em relação aos ossos, foram utilizados os auto-enxertos (osso obtido em local diferente ao danificado no mesmo indivíduo), porém com as desvantagens de gasto financeiro adicional, danos ao tecido saudável, possibilidade de morbidade do local doador e disponibilidade limitada; os alo-enxertos (osso obtido de um doador da mesma espécie ou banco de ossos de cadáveres) com as desvantagens de suprimento limitado, custo financeiro alto, transmissão viral e bacteriana e imunogenicidade; os xeno-enxertos (oriundos de espécies diferentes) também apresentando problemas de transmissão viral, bacteriana e imunogenicidade. Em relação aos tecidos moles, estes mesmos riscos acontecem (KIKUCHI, 2001; KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003; LEGEROS, 2002; SCHNETTLER; ALT; DINGELDEIN, 2003).

A composição de alguns tecidos duros como o esmalte, a dentina e o osso é de fase orgânica e fase mineral. A fase mineral ou inorgânica do esmalte é basicamente uma

HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ exibindo a forma carbonatada, enquanto que a fase orgânica inclui proteínas e lipídeos. A composição da fase inorgânica da dentina é basicamente HAP carbonatada enquanto a fase orgânica é composta por colágeno. A composição da fase mineral óssea é baseada em fosfato de cálcio, enquanto a fase orgânica é formada por colágeno, mucopolissacarídeos e água. O colágeno, como principal componente orgânico da dentina e do osso, é depositado em forma de matriz que posteriormente sofre mineralização, enquanto o esmalte dentário é formado praticamente por fase mineral (JONES, 2001).

Os tecidos dentários têm composição similar ao tecido ósseo, porém se apresentam em ambiente aberto, ou seja, têm comunicação com o meio externo e seus derivados e com fluidos fisiológicos. Este meio externo contém espécies iônicas biologicamente importantes tanto quanto lipídeos, sacarídeos e proteínas. Além disto, a cavidade oral é um ambiente ideal para a proliferação e permanência de bactérias. O osso, por sua vez, está inserido em ambiente fechado mantendo interações com a matriz extracelular e mais diretamente com as células desta matriz que podem afetar a estabilidade e levar à degradação ou corrosão dos materiais com os quais entra em contato. Neste caso, o papel da ciência de superfície tem importância fundamental. Consequentemente, tecido dentário e tecido ósseo apresentam características diferenciadas em relação às propriedades o que deve ser copiado nos tecidos mimetizados (JONES, 2001).

3.1.1. Tecido Dentário e a Odontologia

Um dente é formado por duas partes distintas: a coroa e a raiz. A camada superficial da coroa é formada por um tecido forte, branco e brilhante chamado esmalte que ocupa a porção visível do dente. Sua espessura é variável podendo alcançar até 2 mm na região das pontas e superfícies cortantes e funciona como uma camada protetora aos tecidos subjacentes. A dentina, por sua vez, apresenta coloração amarelada e preenche grande parte do interior do dente no sentido longitudinal (Figura 3.1). Este tecido funciona como um suporte para o esmalte e sua flexibilidade ajuda a prevenir fraturas no esmalte por conter uma porcentagem maior de material orgânico (JONES, 2001).



Figura 3.1 - Representação esquemática da anatomia do dente. Fonte: TEN CATE (1994).

Na porção dentária radicular, a dentina é recoberta por uma camada fina de tecido também bastante mineralizado que é o cimento. Na região mais interna, também percorrendo grande parte do corpo do dente no sentido longitudinal, está a polpa dentária. Composta basicamente por tecidos vivos como terminações nervosas, fibras colágenas, vasos sanguíneos e células como os odontoblastos, este tecido responsável por manter a vitalidade do dente, sua hidratação, nutrição e sensibilidade. A união do dente ao osso é feita por um sistema de forças complexo localizado no ligamento periodontal. Este ligamento é formado basicamente por fibras colágenas que ligam o cimento ao osso alveolar, mas também contém células, líquido extracelular, vasos sanguíneos e nervos. A gengiva cobre externamente o osso alveolar e é um tecido conectivo cuja superfície apresenta tecido epitelial queratinizado (JONES, 2001; TEN CATE, 1994).

De forma geral, “O desenho do dente constitui uma maravilha da Engenharia visto que é capaz de absorver energias estáticas e dinâmicas” (ANUSAVICE, 1998). Os tecidos

dentários estão sujeitos a forças de compressão de aproximadamente 700N, a forças de cisalhamento e a forças abrasivas grandes (CALLISTER JR, 2002; JONES, 2001).

Embora o dente apresente algumas regiões diferenciadas, as mais estudadas são o esmalte e a dentina, pois são as regiões mais expostas aos agentes nocivos (JONES, 2001). Assim, é importante salientar a estrutura destes tecidos.

3.1.1.1. Esmalte

Os ameloblastos, células formadoras de esmalte, secretam uma matriz proteica (gel) de esmalte. Este gel é supersaturado em íons de cálcio e fosfato e a HAP carbonatada se precipita quase que imediatamente. Uma vez terminado o processo secretório, acontece a fase de maturação durante a qual os cristais de apatita (fosfato de cálcio) crescem e as proteínas são dissolvidas e reabsorvidas. Em seguida, os ameloblastos se retiram e deixam os cristais de apatita empilhados em prismas. Completada a formação do esmalte, os ameloblastos desaparecem e nenhum reparo biológico é possível neste tecido (JONES, 2001).

Considerado o tecido mais mineralizado do corpo humano, o esmalte é composto basicamente por HAP cristalina em estrutura $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e uma baixa proporção de água e matéria orgânica (proteínas e lipídeos). A matriz orgânica, juntamente com a água, permanece como uma película delgada envolvendo os cristalitos e estes apresentam uma determinada orientação que forma os prismas do esmalte. Estes prismas possuem uma largura média de $5\mu\text{m}$, apresentam uma forma irregular semelhante a um cilindro e uma organização estrutural justaposta (TEN CATE, 1994).

O esmalte apresenta uma translucidez que permite, em regiões onde sua espessura é mais fina, visualizar a coloração da dentina, tecido imediatamente abaixo (JONES, 2001). A dureza do esmalte está entre 3,2 e 4,4GPa ou 270 a 360VHN e em relação à resistência a fadiga é considerado friável, comumente apresentando micro fraturas por esforços além do seu limite elástico. Sua resistência à tração está próxima a 10MPa e sua resistência à compressão é de aproximadamente 262MPa. Seu módulo de

elasticidade em testes de compressão se aproxima de 33,6GPa (ANUSAVICE, 1998; NAKABAYASHI; PASHLEY, 2000; REYES-GASGA, 2002).

3.1.1.2. *Dentina*

A dentina é um composto biológico constituído de uma matriz de colágeno preenchida com cristalitos de apatita de tamanhos nanométricos. Estes cristalitos são deficientes em Ca, ricos em carbonato e possuem muitos íons F^- e Mg^{2+} . Apresentam-se dispersos entre cilindros ocos quase paralelos chamados canalículos ou túbulos dentinários (JONES, 2001). Os túbulos em seu interior contêm fluídos e prolongamentos dos odontoblastos (células que produzem a matriz de colágeno e se localizam na polpa dentária). Na região intertubular, a matriz colágena mineralizada apresenta fibras que variam de 50nm a 200nm em diâmetro e são distribuídas de forma aleatória, retardando a propagação de microfraturas durante a função. Porém, mesmo assim, apresenta trincas em sua estrutura e estas, associadas a outros estímulos do meio, permitem a movimentação de fluidos que estimulam os odontoblastos dentro da polpa a produzir mais dentina (NAKABAYASHI; PASHLEY, 2000).

A dentina é menos friável e menos dura que o esmalte e, como está localizada subjacente a este último, promove um suporte diante das tensões criadas no sistema. Em testes de compressão, a dentina possui módulo de elasticidade entre 14GPa e 19GPa e resistência de 230 a 370MPa. Sua resistência à tração é de 50MPa e dureza de 50VHN a 60VHN (NAKABAYASHI; PASHLEY, 2000; REYES-GASGA, 2002).

3.1.1.3. *Odontologia*

A Odontologia é a ciência que se ocupa com a prevenção de doenças da boca e com o tratamento e reparo dos dentes, proporcionando uma função ideal e uma estética agradável. A cárie é possivelmente a doença mais comum do mundo civilizado, porém uma condição evitável por métodos odontológicos preventivos. Ocorre como o resultado da atividade metabólica de carboidratos dos alimentos pelas bactérias, levando à produção de ácidos que promovem um ataque localizado no esmalte e na dentina. A cárie começa na região mais externa do esmalte e gradualmente, penetra no interior do

dente sendo que seu deslocamento no esmalte é relativamente lento em comparação com o deslocamento na dentina, levando a grandes perdas do tecido dentário.

3.1.2. Tecido Ósseo e Ortopedia

Em relação aos tecidos duros dentários, o funcionamento do tecido ósseo é altamente dinâmico. Ao contrário do esmalte e da dentina, o osso cresce e remodela durante toda a vida.

3.1.2.1. Tecido Ósseo

O osso é formado por uma série de eventos complexos envolvendo a mineralização de proteínas da matriz extracelular por HAP carbonatada na fórmula $(Ca,X)_{10}(PO_4,HPO_4,CO_3)_6(OH,Y)_2$. O “X” são cátions como Mg^{2+} , Na^+ e Sr^{2+} e o “Y” são ânions como Cl^- ou F^- . As funções básicas do tecido ósseo são suporte, proteção, locomoção e reserva de minerais. O osso resiste melhor à forças de compressão do que à forças de tração pela sua porosidade (LEGEROS, 2002; TEN CATE, 1994).

A fisiologia óssea se processa hipoteticamente por transdução de sinais mecânicos (processo no qual uma célula converte um sinal em resposta). As células sensoriais são os osteócitos que transmitem sinais às células efectoras (osteoblastos), às células lineares ósseas e aos osteoclastos que, em turnos, fazem a deposição óssea ou absorvem a matriz (ROACH, 2003). As células ósseas jovens são chamadas osteoblastos e são responsáveis pela formação óssea enquanto que os osteoclastos se responsabilizam pelo processo de absorção óssea. As células ósseas maduras, ou seja, os osteócitos ocupam lacunas existentes no tecido mineralizado e são conectados por canalículos.

As células ósseas depositam a matriz orgânica e a presença desta matriz influencia o processo de mineralização, determinando a orientação e organização estrutural do osso, enquanto a parte mineral dá ao osso sua resistência e rigidez. Cerca de 90% da matriz é colágeno e o restante outras proteínas. A mineralização ocorre na região dos vazios das moléculas de colágeno e os cristais de HAP são ordenados em plaquetas paralelas (ROACH, 2003).

O osso maduro existe em duas geometrias diferentes: sistema de Havers, formado por camadas concêntricas (como pele de cebola) ao redor de um vaso sanguíneo e o sistema lamelar formado por camadas que se prolongam até a superfície óssea. A camada superficial do osso é formada por osso compacto com poros de $1\mu\text{m}$ a $100\mu\text{m}$ enquanto a parte central é formada por tecido mole da medula óssea. As trabéculas ósseas emergem da cavidade da medula e formam o osso trabecular ou esponjoso com poros de $200\mu\text{m}$ a $400\mu\text{m}$, estendendo-se até o osso compacto (LEGEROS, 2002; TIRREL; KOKKOLI; BIESALSKI, 2002). Na Figura 3.2, vemos a estrutura do osso em várias escalas de tamanho, da macro a nanoestrutura. Em nano escala, temos fibrilas colágenas envolvidas em feixe pela hidroxiapatita (SADAT-SHOJAI, 2013).

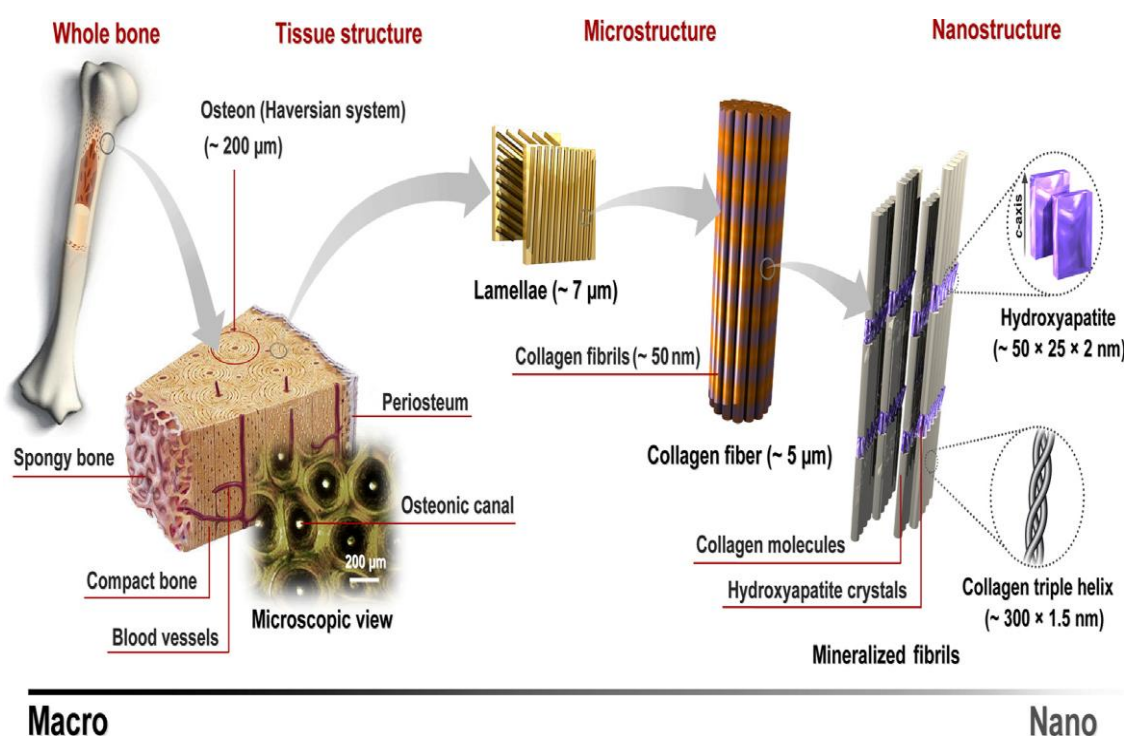


Figura 3.2 - Representação esquemática da macro a nanoestrutura do osso. Fonte: SADAT-SHOJAI (2013).

3.1.2.2. Ortopedia

A Ortopedia é a ciência que se concentra em estudar o desenvolvimento ósseo, se ocupando da preservação ou restauração anatômica e/ou funcional do esqueleto e formações associadas. Os problemas que afetam comumente o tecido ósseo são as lombalgias, traumatismos, problemas periodontais e osteoporose (MARRA; KUMTA, 2002). Das alterações acima, a osteoporose é atualmente uma das situações mais frequentes, justamente porque as pessoas estão vivendo mais. Esta se caracteriza por ser uma doença esquelética sistêmica, com diminuição da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo com um consequente aumento na fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura. As fraturas causadas por osteoporose duplicaram na última década e isto está associado ao aumento da vida média da população (ERIKSEN, 2003). Em relação à osteoporose, os fatores genéticos afetam tanto o pico de massa óssea quanto à perda óssea depois da menopausa. O depósito de cálcio afeta o acréscimo de massa óssea durante o crescimento e é também um fator determinante da massa óssea depois dos 65 anos. Os níveis de estrogênio afetam o acréscimo da massa óssea durante o crescimento e regulam a atividade dos osteoclastos e por isto, influenciam na perda óssea do início da menopausa. Os exercícios físicos mostram um grande efeito sobre a massa óssea na adolescência enquanto que na idade adulta e nos idosos é insignificante (ERIKSEN, 2003).

A deficiência de vitamina D causa hiperparatireoidismo secundário que estimula a atividade dos osteoclastos e inibe a atividade dos osteoblastos. A deficiência de estrogênio e queda da taxa do hormônio de crescimento exacerbam a insuficiência osteoblástica (ERIKSEN, 2003).

A limitada habilidade natural do corpo para reparar grandes defeitos ósseos frequentemente necessita da implantação de um material para promover cicatrização (THIBAUT; MIKOS; KASPER, 2013).

O avanço do conhecimento no campo dos tecidos ósseos e de biomateriais objetiva a reconstrução de áreas destruídas na remoção de dentes e de tumores, reconstrução de defeitos periodontais e reabilitação de fraturas, como também o desenvolvimento de

sistemas que otimizem a criação de proteínas e fatores de crescimento celulares, criação de condições para degradação de materiais condutores de regeneração óssea, entre outros.

3.2. BIOMATERIAIS

3.2.1. Histórico

A primeira utilização de um biomaterial registrada se refere a materiais de sutura há mais 4.000 anos a.C. Há 1.000 anos a.C. os registros mostravam que os egípcios usavam placas de ouro para o reparo de lesões cranianas. Do império romano até a idade média, se noticiou a existência de membros artificiais. Os romanos, chineses e astecas usavam ouro na Odontologia há mais de 2000 anos. Olhos de vidro e dentes de madeira têm sido usados durante o desenvolvimento da história. Contudo, a era dos biomateriais começou realmente no século XX com a introdução da assepsia e da esterilização (PARK, 1984; RATNER *et al.*, 1996).

O progresso significativo da restauração de função e estrutura dos tecidos nos últimos 50 anos pode ser dividido em três campos diferentes:

- no campo biônico, ou seja, o uso de invenções mecânicas ou eletrônicas para substituir ou reparar órgãos e tecidos como dentaduras, óculos, membros artificiais, articulações artificiais, válvulas cardíacas, marca-passos, máquinas de diálise e bombas de insulina, que tiveram um desenvolvimento marcante no período pós-guerra.
- no campo do transplante de órgãos, tecidos ou células, já descritos no texto Sânscrito *Sushruta* em relação à pele de nariz e orelha. No século XVIII, já se entendia a anatomia e fisiologia humanas. No século XIX, se associou o conhecimento da origem microbiana e o desenvolvimento da anestesia, o que levou a avanços nas técnicas cirúrgicas. No século XX, o desenvolvimento de aparelhos cárdio-pulmonares, poderosa tecnologia de imagens e ferramentas novas como o laser, levaram a uma alta sofisticação na ciência e engenharia cirúrgicas.

- no campo da estimulação da regeneração tecidual a partir de um tecido pré-existente (Engenharia de Tecidos). Isto é o mais desejável, pois a forma, a estrutura e a função são semelhantes ao tecido original (mimetismo), sendo assim biocompatíveis (Biocompatibilidade é a “habilidade de um material desencadear uma resposta apropriada no hospedeiro, quando utilizado para uma aplicação específica” – WILLIAMS, 1987).

Deve-se salientar que a utilização dos plásticos na Odontologia acontece desde 1937 e que durante a Segunda Guerra Mundial, estilhaços de polimetilmetacrilato (PMMA), derivados dos artifícios de artilharia, atingiam acidentalmente os olhos dos aviadores e se implantavam ali, causando leve reação de corpo estranho. Iniciou-se então a utilização dos plásticos como biomateriais. Outro acontecimento importante foi a “explosão dos eletrônicos”, o que facilitou enormemente o campo das pesquisas e o desenvolvimento de novos materiais (JONES, 2001; RATNER *et al.*, 1996). Atualmente, os engenheiros e biólogos criam inventos e materiais biomimetizados para substituir funções dos sistemas biológicos como, por exemplo, corações artificiais, prótese de quadril e implantes de mama. Muitos destes sistemas têm impacto positivo no mercado, porém os materiais usados nestas terapias estão sujeitos à fadiga, fratura e desgaste e ainda podem ser tóxicos e causarem inflamação. Além disto, não remodelam com o tempo (um implante ósseo metálico não pode crescer com o paciente e não muda sua forma apropriadamente em resposta às cargas suportadas). Assim, eles não se comportam como órgãos e tecidos verdadeiros.

3.2.1.1. Biomateriais na Odontologia

O primeiro relato sobre a utilização com sucesso de uma combinação de materiais CaP como reparo de defeitos ósseos aconteceu em 1920. O segundo relato foi publicado por outros pesquisadores 30 anos depois e sugeria que a HAP ou a fluorapatita fossem utilizadas para implantes ósseos e dentários. Entre 1976 e 1986, trabalhos foram feitos para o desenvolvimento e comercialização de CaP (principalmente HAP) como biomaterial para reparo, substituição e aumento de ossos (OLIVEIRA, 2004).

Aproximadamente em 1980, foram relatadas aplicações clínicas de materiais de CaP (HAP e TCP) em Odontologia. Partículas de CaP foram usadas para reparo de defeitos ósseos criados em cães e para aumento da crista óssea alveolar. Cilindros densos de HAP foram usados para implantes imediatos após extração dentária, como substitutos para a raiz do dente extraído. A HAP era preparada por precipitação e sinterização a 1000°C ou preparada por síntese de reagentes químicos e formava TCP.

Nas duas décadas posteriores, os biomateriais de CaP foram largamente utilizados em aplicações ortopédicas e odontológicas como reparos de defeitos ósseos, aumento e manutenção de cristas ósseas alveolares, recolocação de raiz dentária imediata, implantes auriculares, fusão espinhal e recobrimentos em implantes dentários e ortopédicos (LEGEROS, 2002).

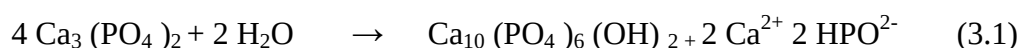
3.2.2. Biomateriais à Base de Fosfato de Cálcio

Os fosfatos de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as biocerâmicas. Sua utilização na substituição do tecido ósseo ocorre devido ao fato de sua composição ser similar à da matriz óssea. Tal similaridade favorece a melhor interação entre o tecido vivo e o material implantado com a formação de uma ligação biomaterial-tecido vivo (ORÉFICE, 2006).

Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita, por ser o principal componente presente na fase mineral dos ossos, é sem dúvida a cerâmica mais estudada e a mais utilizada para as finalidades clínicas. Estudos têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser absorvida gradualmente após quatro ou cinco anos de implante. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação. As biocerâmicas de fosfato de cálcio se degradam com uma velocidade na seguinte ordem: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 > \text{Ca}(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O} > \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A reabsorção do material, que representa esta degradação, é causada pela dissolução que depende da solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico.

Apenas dois fosfatos de cálcio são estáveis quando estão em contato com o meio aquoso como o sangue: o fosfato dicálcico dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) estável em $\text{pH} < 4,2$ e a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) estável em $\text{pH} > 4,2$. Em altas temperaturas, outras fases como o βTCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) são estáveis.

Pesquisadores importantes no estudo de biomateriais como L. L. HENCH (1994) propõem que quando amostras de TCPs (fosfatos tricálcicos) são postas em contato com fluidos corpóreos pode ocorrer a formação de HAP na superfície delas pela sua reação com H_2O (Equação 3.1) (CAO; HENCH, 1996; LIN *et al.*, 2001).



3.2.2.1. Hidroxiapatita (HAP)

O uso da HAP é intensamente difundido em aplicações ortodônticas e ortopédicas. Na área de biomateriais, a ampla aplicabilidade deste fosfato de cálcio está relacionada ao fato da sua composição química, composta basicamente por cálcio e fósforo, ser semelhante à fase mineral de ossos, dentes e alguns tecidos calcificados. Desta forma, este material tem a capacidade de induzir a formação do osso na região comprometida. Além do mais, pode favorecer a biocompatibilidade de próteses e implantes, atuando na interface implante-tecido.

O fato da superfície da HAP ter a capacidade de adsorver moléculas, como proteínas, enzimas e aminoácidos, potencializa suas aplicações, principalmente na indústria farmacêutica. Atualmente, medicamentos funcionalizados podem ser incorporados na HAP, possibilitando que este material possa ser aplicado no tratamento e na prevenção de doenças ósseas cancerígenas (SYGNATOWICZ; KEYSHAR; TIWARI, 2010).

A reabsorção é uma característica desejável para alguns tipos de biomateriais. Apesar das diversas aplicações biológicas promissoras, o uso da HAP é limitado em função da sua lenta taxa de degradação, que pode induzir a uma resposta imunológica do organismo (COSTA *et al.*, 2003; GUASTALDI; APARECIDA, 2010). A incorporação de íons metálicos, tais como o Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , à estrutura da HAP têm sido

utilizada como alternativa para aumentar a sua solubilização em processos biológicos (BOANINI; GAZZANO; BIGI, 2010). Estas substituições iônicas possibilitam que a HAP tenha propriedades físico-químicas e características biológicas específicas, que variam em função dos efeitos biológicos dos íons. Alguns autores recomendam que a utilização da HAP seja associada a diversos tipos de materiais, como elastina, colágeno, quitosana, entre outros (VENKATESAN *et al.*, 2011). Esses tipos de associações diminuem o efeito do desalojamento das partículas na região de implantação.

As aplicações da HAP não são limitadas apenas às aplicações relacionadas à materiais biomédicos, mas também em questões ambientais. Este material pode ser utilizado para minimizar problemas de poluição ambiental, principalmente em rios e mares, na absorção de produtos tóxicos e compostos metálicos (COSTA *et al.*, 2003). Pois estes materiais possuem uma notável capacidade de absorção, que está diretamente relacionada às características de porosidade do material. Quando utilizada em forma compacta, a HAP também pode ser utilizada em sistemas de purificação de água, atuando como filtros para a retenção de diversos tipos de impurezas.

Atualmente, existe uma ampla variedade de compostos de fosfato de cálcio que são estudados e aplicados para regeneração do tecido ósseo. Normalmente, esses compostos podem ser classificados de acordo com a razão molar Ca/P, que variam entre 0,5 e 2,0. Dentre os diversos fosfatos de cálcio existentes, podemos mencionar a nomenclatura de alguns deles, com o seu respectivo valor de razão Ca/P, e sua fórmula química (Tabela 3.1).

Geralmente, a degradação dos compostos de fosfato de cálcio depende da razão Ca/P (BOANINI; GAZZANO; BIGI, 2010). A HAP é um material pouco solúvel em comparação as demais biocerâmicas de fosfato de cálcio mencionadas anteriormente (Tabela 3.1). A taxa de solubilização pode depender da área superficial, cristalinidade e porosidade do material. Além do mais, há uma dependência das condições do meio de imersão, como pH, temperatura, etc.

A HAP pura não foi encontrada em sistemas biológicos naturais. No entanto, a HAP carbonatada (não estequiométrica), além de ser encontrada na natureza, também é

utilizada em diversas aplicações. Este composto, que é deficiente em cálcio pela entrada grupo carbonato (CO_3^{2-}) à estrutura, que pode ser representado pela fórmula química (LEGEROS *et al.*, 2001): $[(\text{Ca},\text{X})_{10} (\text{PO}_4,\text{HPO}_4,\text{CO}_3)_6(\text{OH},\text{Y})_2]$, onde X são representados pelos cátions (Mg^{2+} , Na^{2+} , Sr^{2+} , etc.) que podem substituir os Ca^{2+} , e Y são os ânions (Cl^- , F^- , etc.) que podem substituir o grupo hidroxila (OH^-) (Figura 3.3).

Tabela 3.1 - Exemplos de fosfato de cálcio, com seu respectivo nome, fórmula química e relação Ca/P (DOROZHKIN, 2009; GUASTALDI; APARECIDA, 2010; LEGEROS *et al.*, 2001).

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato Tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,00
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,50
Fosfato Tricálcico (α , β , γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
Fosfato Octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato cálcio di-hidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
Mono-hidrogênio fosfato cálcio (DCP)	CaHPO_4	1,00
Pirofosfato de Cálcio (CPP)	CaHPO_4	1,00
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,00
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,70
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,50

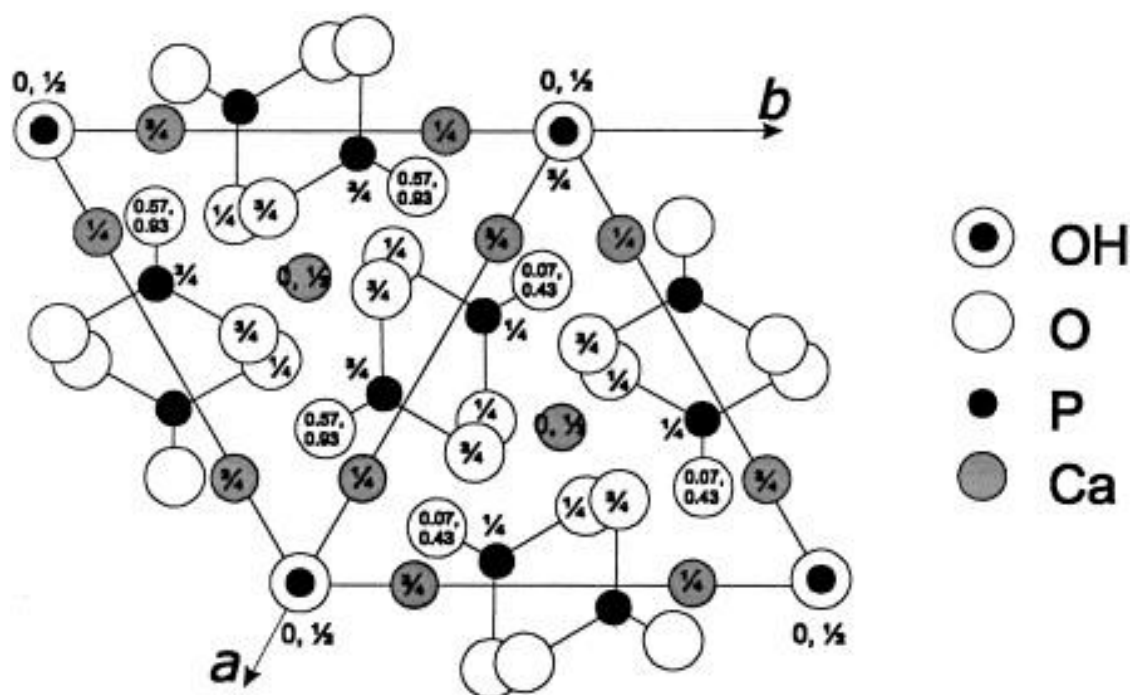


Figura 3.3 - A estrutura de cristal de hidroxiapatita idealizada, vistos ao longo do eixo c (JONES, 2001).

A HAP é um fosfato de cálcio hidroxilado estável e solúvel (BOANINI; GAZZANO; BIGI, 2010), com fórmula química dada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. O valor correspondente a razão molar Ca/P é de 1,67 (Tabela 3.1), sendo o mesmo para a fluorapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$ e cloroapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2]$, que diferentemente da HAP, possuem suas hidroxilas substituídas por F^- e Cl^- , respectivamente.

Em temperaturas inferiores a de 250°C , a HAP pode cristalizar-se sob a forma monoclínica, para temperaturas superiores, existe uma transição alotrópica da forma monoclínica para hexagonal (COSTA *et al.*, 2003). Em temperatura ambiente, algumas impurezas ou substituições parciais podem contribuir para estabilização da forma hexagonal. Nesta forma possui uma densidade de $3,16\text{g/cm}^3$, com parâmetros de rede definidos por $a = b = 9,4302$, $c = 6,8911\text{\AA}$ (DOROZHKIN, 2009).

A célula unitária hexagonal da HAP é formada por 10 íons Ca^{2+} , 6 grupos fosfatos (PO_4^{3-}) e 2 íons hidroxila (OH^-). Os íons Ca^{2+} estão distribuídos em diferentes sítios, denominados sítio Ca I e sítio Ca II (Figura 3.4).

O sítio Ca I é formado por 4 íons Ca^{2+} alinhados em colunas paralelas ao eixo c com 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros PO_4^{3-} e 3 outros átomos de oxigênio relativamente distantes. Já o sítio Ca II é constituído por 6 íons Ca^{2+} , formando uma estrutura hexagonal, perpendicular à direção c . No entanto, este sítio possui 2 coordenações a menos em relação ao sítio Ca I, sendo coordenado por 6 átomos de oxigênio e um íon OH^- , que está situado no interior do canal do cálcio (Figura 3.3). Este íon está situado a 0,9Å abaixo do plano formado pelo sítio Ca II, formando um ângulo de 30° em relação ao eixo c (DRIESSENS; VERBEECK, 1990).

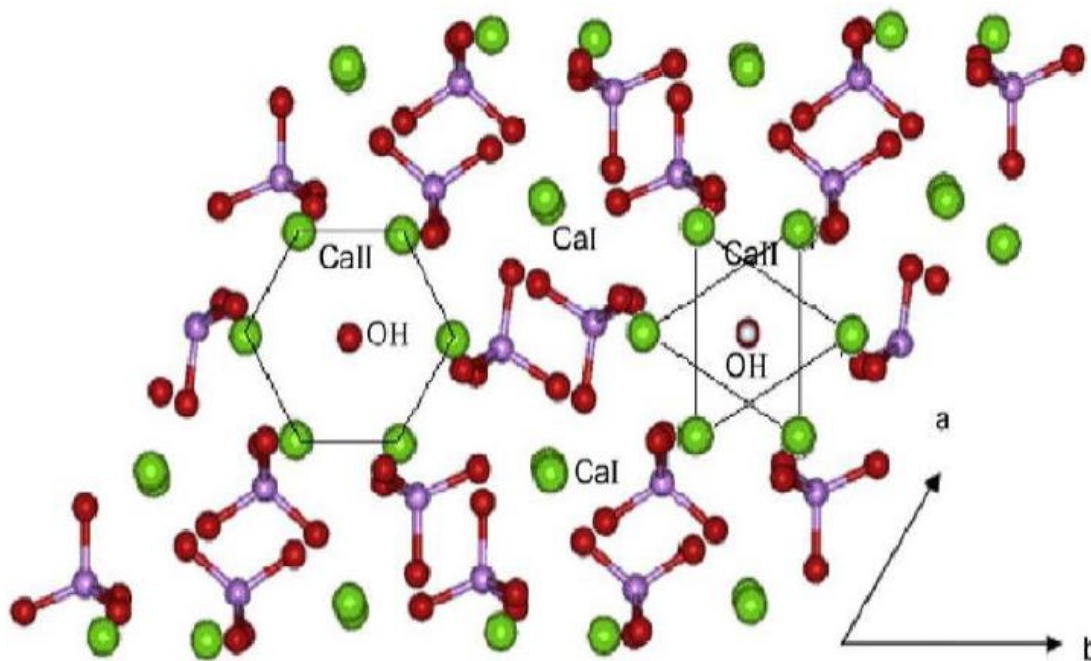


Figura 3.4 - Representação dos sítios Ca I e Ca II da HAP com relação aos grupos fosfatos e hidroxila (Ca: verde; O: vermelho; P: roxo; H: branco). Esquema modificado de LAURENCIN *et al.* (2011).

A base da célula unitária é formada por 6 átomos de fósforo que estão rodeados por 4 átomos de oxigênio [O(I), O(II), O(III)], dando origem aos 6 tetraedros do PO_4^{3-} (ELLIOTT, 1994). Os tetraedros dos PO_4^{3-} estão arranjados de tal forma que formam dois tipos de canais que são perpendiculares ao plano basal. Cada célula unitária é formada por dois canais, com cerca de 2 Å de diâmetro, que são ocupados pelos Ca^{2+} do sítio Ca I. Ambos os canais estão alinhados paralelamente aos eixos ternários, estando localizados a uma distância de $z = 0$ e $z = \frac{1}{2}$ do parâmetro de rede cristalino. Na HAP outro canal, com um diâmetro em torno de 3,0 a 3,5 Å, que é ocupado pelos Ca^{2+} pertencente ao sítio Ca II, estão localizados em $z = \frac{1}{4}$ e $z = \frac{3}{4}$. A distinção entre a forma hexagonal e monoclinica pode ser dada no interior destes canais (ELLIOTT, 1994). De forma que, distorções na rede da HAP, principalmente do íon OH^- , podem tornar a estrutura mais monoclinica, tornando o arranjo mais fechado.

A existência de dois sítios para o Ca^{2+} na estrutura da HAP implica em consequências importantes nas propriedades e características do material uma vez que prováveis substituições iônicas podem ocorrer individualmente ou simultaneamente em ambos os sítios. Geralmente, as substituições catiônicas e aniônicas ocorrem com maior facilidade no sítio Ca II em comparação com o sítio Ca I. A coordenação do íon OH^- com o Ca^{2+} , torna o sítio Ca II mais susceptível a essas substituições, pois o OH^- está ligado a apenas um íon Ca^{2+} (Figura 3.3). Já o sítio Ca I, o íon Ca^{2+} está ligado a átomos de oxigênios pertencentes aos grupos PO_4^{3-} , sendo uma estrutura mais rígida (LAURENCIN *et al.*, 2011).

Uma das metodologias mais utilizadas para a obtenção da HAP é o método de precipitação química em meio aquoso. Esta técnica é amplamente utilizada pelo baixo custo dos procedimentos empregados, principalmente em relação aos reagentes utilizados e a simplicidade do método de preparação. Para a obtenção da HAP por este método deve haver o controle do pH da solução, temperatura, taxa de adição dos reagentes utilizados, tempo de agitação, tempo de envelhecimento, e temperatura de calcinação (USKOKOVIC, V.; USKOKOVIC, D. P., 2011).

A velocidade de gotejamento dos reagentes influencia diretamente na cinética da reação química da solução e, conseqüentemente, na sua homogeneidade no final do procedimento. Para garantir que ocorra a nucleação de partículas maiores e menos aglomeradas, a velocidade de titulação deve ser lenta (USKOKOVIC, V.; USKOKOVIC, D. P., 2011). Em paralelo, o tempo de reação pode influenciar na cristalinidade, no tamanho do cristalito (BOANINI; GAZZANO; BIGI, 2010), e aumentar a relação Ca/P, diminuindo a deficiência de cálcio da apatita. Deste modo, reações de precipitação rápidas podem favorecer a formação de um composto de fosfato de cálcio amorfo (ACP).

As partículas obtidas por esta metodologia têm uma tendência a serem aglomeradas, devido à tensão superficial da água, que podem provocar defeitos estruturais no material formado. Esta tensão pode influenciar tanto na solubilidade quanto na aglomeração das partículas de HAP (USKOKOVIC, V.; USKOKOVIC, D. P., 2011).

Alguns métodos de síntese têm sido desenvolvidos para substituir a água por outro solvente menos polar (ARAÚJO, 2006), de modo a diminuir a tensão superficial e evitar a aglomeração de partículas. Outros processos incorporam agentes modificadores de partículas, como grupos orgânicos funcionais, que dificultam esta aglomeração, aumentando a homogeneidade do material formado ao final do processo de síntese (COSTA *et al.*, 2003).

Sabe-se que a temperatura na qual ocorre a precipitação influencia diretamente na fase, no tamanho e na morfologia dos cristais de HAP formados. O equilíbrio de uma reação química para a obtenção de HAP pelo método de precipitação química em meio aquoso, através do equilíbrio do sistema $\text{Ca(OH)}_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$, depende da temperatura da reação (ELLIOTT, 1994). É sabido que temperaturas de precipitação em torno de 25°C a 37°C são necessárias para obter uma HAP com fase mineral semelhante ao osso (ARAÚJO, 2006).

A energia fornecida ao material durante a calcinação atua diretamente ao nível de organização dos átomos, influenciando no tamanho e na morfologia dos cristais. Existem dois tipos de HAP que devem ser considerados: as calcinadas em altas

temperaturas, que apresentam boa cristalinidade e cristais grandes, e as que são calcinadas em baixas temperaturas, que apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos (COSTA *et al.*, 2003). Temperaturas mais altas permitem a obtenção de pós mais cristalinos, e mais resistentes, o que facilita a sua manipulação diferentemente quando a temperatura é baixa, uma vez que o material obtido possui uma fragilidade acentuada.

O método de obtenção da HAP em meio aquoso requer uma prática metodológica concisa e sistemática, com a finalidade de obter pós biocompatíveis em meio biológico. Se o controle das variáveis que envolvem o processo de síntese não forem monitorados cuidadosamente pode ocorrer à formação de compostos de fosfato de cálcio menos estáveis.

A estrutura da HAP formada por grupos fosfatos (PO_4^{3-}), hidroxilas (OH^-) e íons cálcio (Ca^{2+}), permite substituições catiônicas e aniônicas. O Ca^{2+} pode ser substituído por metais, tais como o Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} etc. Os grupos fosfatos, por carbonatos (CO_3^{2-}) e vanadatos (VO_4^{3-}), e as hidroxilas, por carbonatos, fluoretos e cloretos (COSTA *et al.*, 2003). Desta forma, cada agrupamento iônico pode ser substituído por outro de mesma valência ou similar.

As apatitas minerais e biológicas contém uma grande quantidade de defeitos estruturais provenientes das substituições iônicas (USKOKOVIC, V.; USKOKOVIC, D. P., 2011), que podem provocar modificações à estrutura do material, como alterações nos parâmetros de rede da célula unitária, na morfologia e no tamanho dos cristais. Além do mais, podem influenciar diretamente na solubilidade e estabilidade térmica do material.

A incorporação do CO_3^{2-} na HAP pode aumentar de forma significativa à instabilidade estrutural da apatita formada. Existem dois tipos de classificação para uma HAP carbonatada: a do tipo A, quando o OH^- é substituído pelo CO_3^{2-} , causando um aumento no parâmetro de rede a , seguido por uma diminuição no parâmetro c , e do tipo B: quando o PO_4^{3-} é substituído pelo CO_3^{2-} , proporcionando uma diminuição no parâmetro de rede a , e um aumento no parâmetro de rede c , (USKOKOVIC, V.; USKOKOVIC, D. P., 2011). E ainda pode ocorrer a substituição do tipo AB, em que o PO_4^{3-} e o OH^-

podem ser substituídos pelos grupos CO_3^{2-} (SLOSARCZYK; PASZKIEWICZ Z.; PALUSZKIEWICZ C., 2005).

A presença do CO_3^{2-} na estrutura da HAP pode favorecer a redução da cristalinidade e ao aumento de solubilidade (BOANINI; GAZZANO; BIGI, 2010). Convém mencionar que a cinética de solubilidade da HAP depende das características físico-químicas do meio, dos componentes químicos presentes no material, e do tipo de solução de imersão.

O principal problema na incorporação de íons metálicos à estrutura da HAP está relacionado à diminuição da estabilidade térmica. Uma vez que a inserção de íons em grandes quantidades pode provocar alterações na rede do material, comprometendo o processamento desses materiais em alta temperatura. Geralmente, por tornar os materiais mais estáveis são empregados tratamentos térmicos que podem induzir transformações de fases no material formado, tornando-o menos estável. Além do mais, subprodutos indesejados podem ser formados, como o óxido de cálcio (CaO), que é conhecido por ser citotóxico às células, e outros compostos de fosfato de cálcio menos estáveis, que podem aumentar a instabilidade térmica do material, tornando a apatita deficiente em cálcio.

3.2.2.2. β -Fosfato tricálcico ($\beta\text{TCP} - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Entre os fosfatos de cálcio que representam velocidade de reabsorção apreciável, um dos mais estudados é o β - fosfato tricálcico com razão Ca/P igual a 1,5. Este material é biodegradável e biocompatível, sendo parcialmente reabsorvido entre 6 e 15 semanas após o implante, dependendo da porosidade. A taxa de biodegradação do material é reduzida conforme a diminuição da razão $\beta\text{TCP}/\text{HAP}$ (SANTOS, 2007).

O βTCP , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, é um material fosfato de cálcio que possui cristal romboédrico com as medidas de $a = 10,43\text{\AA}$ e $c = 37,37\text{\AA}$, e apresenta imperfeições na estrutura que levam a grande instabilidade (OKAZAKI; SATO, 1990). O tamanho das partículas de βTCP e suas propriedades variam de acordo com os parâmetros de síntese. Estes materiais são absorvíveis em condições fisiológicas podendo ser substituídos por osso

gradativamente, quando usados como biomateriais em defeitos ósseos (PEÑA; VALLET-REGI, 2003; YANG; WANG, 1998). De acordo com o método de síntese e da estequiometria de β TCP, observa-se a seguinte ordem de solubilidade (LEGEROS, 2002): CaP amorfo > fosfato dicálcico > fosfato tetracálcico > α TCP > β TCP >> HAP. A dissolução β TCP na água depende da razão Ca/P, sendo que há inicialmente, liberação de íons Ca^{+2} , para depois acontecer a liberação de íons PO_4^{-3} (SANTOS, 2005). O β TCP está representado na Figura 3.5. As esferas em verde, laranja e vermelho representam os átomos de cálcio, fósforo e oxigênio, respectivamente.

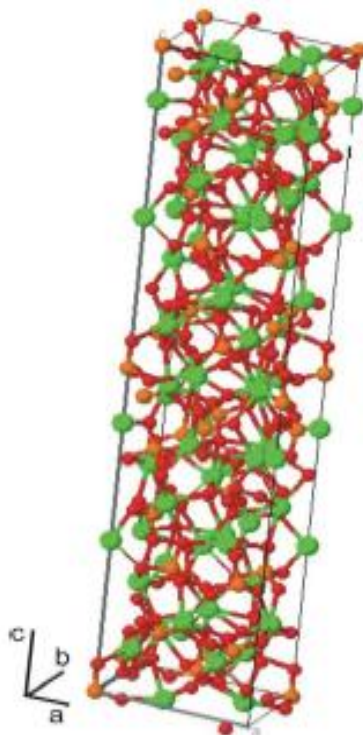


Figura 3.5 - Representação esquemática da estrutura cristalina da fase β TCP adaptado de BONADIO *et al.* (2011)

3.2.2.3. *Material Bifásico HAP - β TCP*

O β TCP está quase sempre associado às sínteses de HAP, sendo observado em tratamentos térmicos inferiores a 1100°C. Modificações nas condições de síntese deste

material levam a obtenção de materiais que variam entre HAP pura e β TCP puro, passando por composições intermediárias de HAP β TCP, e conseqüentemente levam à modificação das suas propriedades. Um material bifásico HAP β TCP com grande quantidade de HAP leva a uma maior biocompatibilidade, enquanto que com maior quantidade de β TCP leva a uma maior biodegradabilidade (ARENDS *et al.*, 1987; FUJITA *et al.*, 2003; PEÑA; VALLET-REGI, 2003; YANG; WANG, 1998).

O material bifásico HAP β TCP pode ser alterado de acordo com a proporção dos reagentes na mistura (YANG; WANG, 1998; PEÑA; VALLET-REGI, 2003). Assim, partindo-se de uma mistura estequiométrica para a obtenção de HAP pura, se conseguiria um aumento gradativo na quantidade de formação de β TCP com um aumento da quantidade de fosfato adicionado na síntese. Haveria a formação de material bifásico com aumento gradativo de β TCP até a obtenção de β TCP puro. A obtenção de HAP ou β TCP pode estar relacionada à temperatura de sinterização que, até 900°C favorece a formação de HAP, de 900°C a 1100°C favorece a formação de β TCP e de 1100°C até 1400°C favorece novamente a formação de HAP, mesmo com equação estequiométrica para obtenção de HAP. Assim, pode-se controlar a concentração bifásica (SANTOS, 2005).

3.3. BIOMATERIAIS COMPÓSITOS

O termo compósito é empregado para designar a combinação de dois ou mais materiais na escala macroscópica ou microscópica em que os materiais mantêm sua identidade física e química inicial. Essa combinação tem por objetivo combinar diferentes materiais produzindo um único material com propriedades superiores às dos seus componentes separados (SASTRE; AZA; ROMÁN, 2004).

A combinação entre cerâmicas e alguns outros materiais como metal, polímero e cerâmicas tem sido usada para produzir compósitos de alto desempenho. O objetivo é fazer uso de propriedades características de cada fase unindo-as num único material. Os materiais componentes do compósito são chamados de matriz e reforço. A matriz confere a estrutura ao compósito, enquanto os reforços realçam as propriedades físicas e químicas.

Como dito anteriormente, as cerâmicas bioativas de fosfato de cálcio, tais como a HAP e o β TCP, são de grande interesse no uso de biomateriais, entretanto, elas possuem baixas propriedades mecânicas. Uma alternativa para melhorar essas propriedades é o desenvolvimento de materiais compósitos pela adição de uma fase de reforço, referente a um material com melhores propriedades mecânicas como, por exemplo, a alumina, dióxido de titânio, zircônia, entre outras (CHIBA *et al.*, 2003; FIDANCESKA, 2007).

Nesse contexto, esforços são concentrados visando a obtenção de compósitos cerâmicos que melhorem as propriedades mecânicas das matrizes HAP e β TCP. Um implante necessita de uma estrutura superficial micromorfológica (rugosidade e porosidade) não só para assegurar a ancoragem mecânica do osso na superfície, mas também para ativar a osseointegração. Dessa maneira, muitas pesquisas buscam essa superfície estrutural sobre a superfície do metal pesquisado, tornando-a muito mais reativa. A partir daí, surge o interesse em se estudar as propriedades deste material para fins biológicos quando combinado à HAP, podendo vir a formar um material compósito com propriedades intermediárias (GOMIDE, 2005).

Assim, a união de um material com alto grau de biocompatibilidade, com materiais metálicos, devido as suas propriedades mecânicas, é promissora para o desenvolvimento de biomateriais. Nesse sentido, pesquisas vêm sendo desenvolvidas para se estudar a interação entre estes materiais (FU; KHOR; LIM, 2001; GUOA *et al.*, 2003; YOKOYAMA *et al.*, 2001) de forma a melhorar esta característica. Novas ligas têm sido testadas quanto a sua aplicabilidade como biomateriais. A biocompatibilidade e consequentemente a resistência à corrosão são as propriedades fundamentais que devem ser exigidas destas, pois dentro do corpo humano, o implante pode sofrer diversos tipos de corrosão e as propriedades físicas do material não podem ser afetadas durante sua utilização *in vivo* (WIDU *et al.*, 1999).

Desta forma, a biocompatibilidade da maioria dos biomateriais metálicos é baseada no quanto passivo é sua oxidação e nos riscos que podem causar futuramente. Dentre os metais usados para implante, o que mais resiste a todos os tipos de corrosão são o titânio e suas ligas, seguido por nióbio e tântalo e o que menos resiste é o aço inoxidável.

3.3.1. Nióbio

Um dos metais mais abundantes em solo brasileiro é o nióbio apesar de sua baixa concentração na crosta terrestre. O Brasil possui 90% do nióbio mundial em suas reservas, sendo que no ano de 2007, de toda a produção mundial de nióbio (133.928 toneladas), cerca de 96,6% foram provenientes das reservas brasileiras, com um aumento na produção de 23,3% em relação ao ano de 2006 (NASCIMENTO, 2009). O nióbio possui propriedades físicas e mecânicas muito parecidas com as do titânio como alto ponto de fusão, boa resistência mecânica e etc.

Contudo, atualmente o número de publicações nacionais e internacionais explorando a biocompatibilidade do nióbio ainda é muito menor do que o do titânio. O nióbio, assim como o titânio é um material que apresenta alta afinidade com o oxigênio podendo formar, por exemplo, o Nb_2O_5 , NbO_2 e NbO , sendo destes o Nb_2O_5 , o mais estável.

Tanto o nióbio puro quanto o óxido de nióbio são materiais que apresentam boa biocompatibilidade e resistência à corrosão. Pelo fato do nióbio metálico ser um material altamente reativo e com alto ponto de fusão, exige que as técnicas convencionais de produção sejam acompanhadas de sistemas sofisticados para altas temperaturas e controle de atmosfera, o que eleva o custo de produção. Por outro lado, o pentóxido de nióbio pode ser sinterizado em atmosfera livre e também em menores temperaturas. Daí o interesse em se estudar a viabilidade da produção de biocompósitos Nb_2O_5 – Hap com propriedades intermediárias. O pentóxido de nióbio é um material menos reativo e possui um ponto de fusão menor do que o nióbio metálico, além disso, é um material frágil o que possibilita o seu processamento por ação mecânica com outros materiais, por exemplo, a hidroxiapatita. Este processo facilita a formação de reações de estado sólido facilitando as transições de fase na formação dos compósitos (NASCIMENTO, 2009).

O pentóxido de nióbio pertence ao grupo espacial $P2/m$, cuja estrutura cristalina é monoclinica caracterizada por uma célula unitária com dois ângulos retos e uma variável ($\sim 115,7^\circ$) e parâmetros de rede $a = 2,038\text{nm}$, $b = 0,3824\text{nm}$ e $c = 1,936\text{nm}$.

Para sua utilização como um material compósito bioativo e biocompatível, o pó de nióbio deve ser misturado com o pó de hidroxiapatita. Contudo, tanto o nióbio quanto o óxido de nióbio apresenta a importante propriedade de biocompatibilidade e resistência à corrosão. Os principais óxidos formados pelo nióbio são: Nb_2O_5 (branco), NbO_2 (preto-azulado) e NbO (cinza), onde o nióbio apresenta estados de oxidação +V, +IV e +II, respectivamente. Destes, o Nb_2O_5 é o mais estável. O nióbio (Nb) possui estrutura cristalina de simetria cúbica de corpo centrado e grupo espacial $\text{Im}\bar{3}\text{m}$, conforme se pode observar na Figura 3.6. Por outro lado, o pentóxido de nióbio (Nb_2O_5), possui estrutura cristalina de simetria monoclínica e grupo espacial $\text{P2}_1/\text{M}$, conforme está representado na Figura 3.7. Nesta figura, as bolas vermelhas representam o oxigênio e as bolas azuis, o nióbio (NASCIMENTO, 2009).

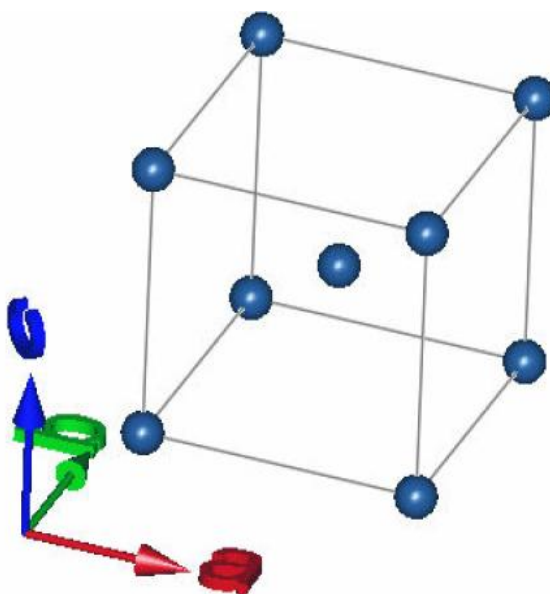


Figura 3.6 - Estrutura cristalina do nióbio (Nb). Fonte: NASCIMENTO (2009).

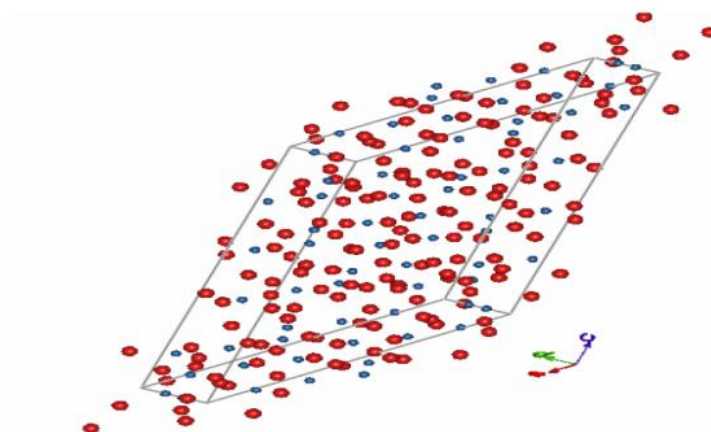


Figura 3.7 - Estrutura cristalina do pentóxido de nióbio (Nb_2O_5). Fonte: NASCIMENTO (2009).

Contudo, estudos anteriores (ZANETTA; AGOSTINHO; GOMIDE, 2002) demonstram que as reações teciduais ao implante de nióbio em ratos e coelhos gera o revestimento do material por uma fina camada de tecido fibroso, sem a presença de células inflamatórias, edema intersticial ou células multinucleadas, revelando a característica de biocompatibilidade do nióbio. Observa-se também a alta compatibilidade biológica do nióbio, representada pela aposição do osso diretamente sobre a superfície do implante, fato observado na análise radiográfica das áreas em torno do implante. Em estudos comparativos entre implantes de nióbio e titânio, os resultados demonstraram uma boa resposta do nióbio como material constituinte de implantes osseointegráveis (JOHANSSON; ALBREKTSSON, 1991; SOUZA, 2006).

3.3.2. Compósitos Hidroxiapatita/Nióbio

Os compósitos formados por óxido de nióbio-hidroxiapatita têm o intuito de obter um compósito alternativo para aplicação em implante. A união de um material com alto grau de biocompatibilidade como a HAP, com elementos metálicos como o nióbio, devido suas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e sua resistência à corrosão, será promissora para o desenvolvimento de biomateriais. Este compósito poderá ser considerado como um bom substituto ósseo em áreas com perdas ósseas parciais para futura aplicação em ortopedia (DEMIRKOL; OKTAR; KAYALI, 2013), produzindo um

único material com propriedades superiores às dos seus componentes separados (SASTRE; AZA; ROMÁN 2004).

3.4. ENGENHARIA DE TECIDOS

O termo Bioengenharia Tecidual foi inicialmente definido pelos participantes da primeira reunião da *National Science Foundation* em 1988 como “a aplicação dos princípios e métodos da engenharia e ciências da vida na compreensão da relação estrutura-função em condições normais e patológicas dos tecidos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para sua reparação e regeneração.” (SHALAK; FOX, 1988). É um campo emergente multidisciplinar, que aplica os princípios das ciências biológicas e das engenharias para o desenvolvimento de substitutos viáveis que restaurem, mantenham ou melhorem a função tecidual (LANGER; VACANTI, 1993; PAULA *et al.*, 2009). Durante os anos 90, a bioengenharia tecidual progrediu rapidamente e substitutos biológicos foram desenvolvidos para diversos tecidos do corpo.

A bioengenharia tecidual surgiu como alternativa potencial diante da falência de órgãos e de lesões teciduais, assim como em substituição ao transplante de órgãos que podem ser tratados pela implantação de substituto da engenharia biológica. Visa a substituir os tecidos que estão lesionados, a fim de recriar tecidos funcionais e órgãos saudáveis (KAIGLER; MOONEY, 2001). Tem se desenvolvido, ao longo da última década, para corrigir defeitos de tecidos duros e moles, secundários a trauma, congênitos e doenças adquiridas. As atuais abordagens clínicas para substituição de tecidos e reconstrução têm o propósito de aliviar a dor e restaurar a estabilidade mecânica e funcional de tecidos e órgãos biológicos (KAIGLER; MOONEY, 2001). As aplicações potenciais da engenharia de tecidos na medicina regenerativa variam de tecidos estruturais a órgãos complexos (MENDELSON; SCHOEN, 2006).

Quando lesões ou danos aos tecidos e órgãos ocorrem, a reconstrução tecidual, com o objetivo de restabelecer a integridade funcional e mecânica, ocorre geralmente de maneira espontânea (CANCEDDA *et al.*, 2003). Porém é válido ressaltar que a consolidação do reparo está condicionada a determinadas condições, tais como amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional

(GONDIM, 2007; SALGADO, 2002;) e tamanho do sítio lesionado, pois, em regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo torna-se limitado (KIM *et al.*, 2006). Procedimentos de enxertia e substituição tecidual por biomateriais são frequentemente necessários para o preenchimento da lesão (CANCEDDA *et al.*, 2003). Os biomateriais podem atuar como um arcabouço e, assim, estimular a migração e proliferação celular (PIATTELLI *et al.*, 2000).

Dessa forma, a bioengenharia tecidual encontra-se frente ao desafio fundamental de desenvolver biomateriais e procedimentos que levem à otimização da regeneração (MIGUEL *et al.*, 2006; STEVENS; GEORGE, 2005).

As aplicações da bioengenharia tecidual têm obtido resultados satisfatórios, porém se fazem necessárias novas pesquisas que melhor elucidem algumas lacunas existentes.

A aplicabilidade dos biomateriais tem sido amplamente estudada. Tais substitutos são potencialmente condutores, estimuladores e indutores de respostas celulares (PATEL *et al.*, 2005), bioativos, biocompatíveis, além de custos mais acessíveis (VERNA *et al.*, 2002). Devem ainda possuir alguns requisitos básicos para sua aplicação, como não causar efeitos adversos locais e sistêmicos, isto é, não devem ser citotóxicos, carcinogênicos nem radioativos. A biocompatibilidade é outro fator de suma importância para o sucesso do tratamento, por desencadear reações desejadas, controladas e toleradas fisiologicamente. Na avaliação desses requisitos, é necessário o desenvolvimento prévio de testes *in vitro* e *in vivo* para que, por fim, possam ser utilizados em humanos.

3.4.1. Engenharia de Superfície

O corpo interage com a estrutura superficial dos biomateriais com os quais entra em contato. A região superficial dos materiais é mais reativa que seu interior por conter átomos que possuem ligações não preenchidas. Assim, a superfície de um material tem, inevitavelmente, propriedades diferentes do seu interior. Por estas razões, deve-se conhecer a estrutura superficial dos biomateriais (RATNER *et al.*, 1996). Grandes

esforços atuais se dirigem a compreender e caracterizar as comunicações entre o material e o meio onde ele estará inserido. As interações tecido-biomaterial são governadas por propriedades de superfície e ocorrem geralmente à cerca de 1nm de distância e, dependendo do tipo de tecido, as interfaces biológicas são altamente dinâmicas com interações específicas (JONES, 2001).

Os materiais empregados em tecnologia biomédica são desenvolvidos para ter interações específicas e desejáveis biologicamente com os tecidos vizinhos à região onde serão utilizados. As propriedades desta interface material-meio é que determinam o tipo e a resistência desta comunicação. No caso de implantes como, por exemplo, os implantes ósseos ficam evidenciados a importância da ciência de superfície, pois as interações entre o implante e o ambiente receptor necessitam de alta especificidade (JONES, 2001).

3.5. CARACTERIZAÇÃO

Os avanços atuais em instrumentação analítica oferecem poderosas ferramentas para o estudo de biomateriais e para a caracterização de interações tecido-material. Os processos de caracterização possibilitam analisar quantitativamente e qualitativamente a composição dos materiais, bem como descrever os aspectos morfológicos dos materiais (MANSUR *et al.*, 2002). Alguns métodos de caracterização mais utilizados na avaliação de biocerâmicas são:

- Microscopia de Luz (LM)
- Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) com Espectroscopia de Raios-X por Dispersão em Energia (EDS)
- Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)
- Difração de Raios-X (XRD)
- Microscopia de Força Atômica (AFM)
- Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)
- Análises térmicas

A caracterização prévia dos tecidos naturais e das amostras se faz necessária para posterior comparação. As análises das amostras, por imagem e por espectro, devem ser

feitas numa sequência em que se visualize a macroestrutura, a microestrutura (MANSUR *et al.*, 2002), bem como a nanoestrutura.

3.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma ferramenta importante e extensivamente utilizada na análise dos materiais. O princípio fundamental de funcionamento desta técnica consiste na emissão de feixes de elétrons termi-
onicamente por um filamento de tungstênio (feixes primários) que passam por um sistema de lentes eletromagnéticas, diafragmas e bobinas, e incide sobre uma amostra (Figura 3.8).

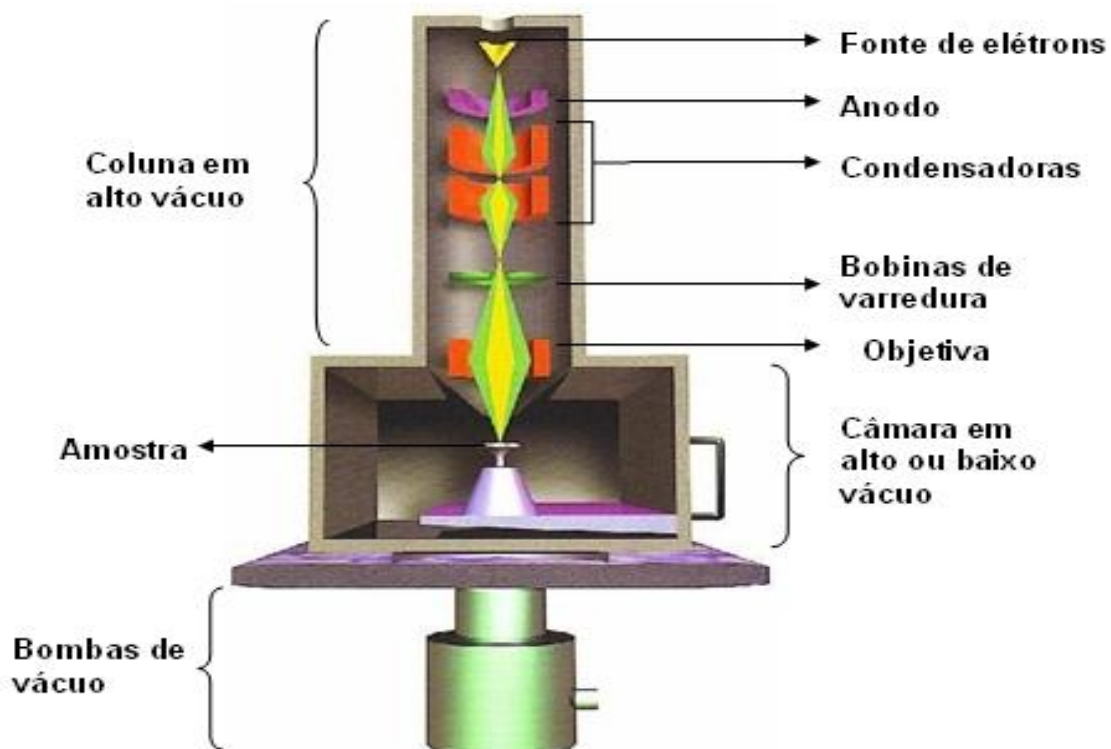


Figura 3.8 - Representação esquemática dos componentes do MEV. Fonte: OLIVEIRA (2009).

A interação entre este feixe de elétrons e a amostra resulta na emissão de elétrons secundários, elétrons retroespalhados, e raios-x característicos como ilustrado na Figura 3.9. Esta interação depende da energia dos elétrons, do número atômico dos átomos da amostra e da densidade da amostra. Na microscopia eletrônica de varredura os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição.

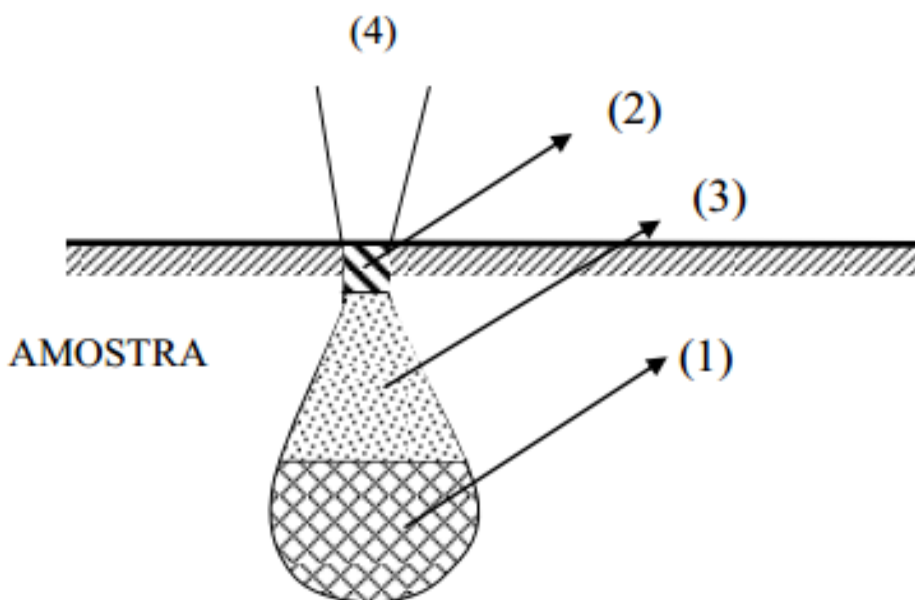


Figura 3.9 - Raios-X característicos (1), Elétrons secundários (2), Elétrons retroespalhados (3) e Feixe primário (4). Fonte: ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR (2012)

3.5.2. Espectroscopia de Raio-x por Dispersão em Energia (EDS)

Os raios-X característicos permitem a contagem eletrônica através da Espectroscopia de Raio-x por Dispersão em Energia (EDS), criando um espectro que representa a análise

química elementar da amostra. O elétron do feixe primário interage inelasticamente com a amostra removendo um elétron de uma camada interna (K, L, M, N) deixa o átomo em um estado excitado de energia permitindo que um elétron de uma camada mais energética decaia para preencher o vazio. Este decaimento ocorre com emissão de energia na forma de um fóton de raios-X (Raios-X característico) permitindo identificar o elemento que está emitindo a radiação.

3.5.3. Difração de Raios-X (DRX)

A difratometria de raios-X é uma importante ferramenta para a identificação e caracterização estrutural de materiais cristalinos. Esta técnica, além de permitir a identificação das fases cristalinas que compõem um material, fornece informações sobre a natureza e os parâmetros estruturais do cristal desta fase (BONADIO *et al.*, 2011).

Um feixe de elétrons é acelerado em direção a um alvo metálico com uma diferença de potencial de aproximadamente 100kV. Após a colisão, parte da energia do feixe de elétrons é convertida em raios X, formando um feixe. Quando o feixe de raios X passa por uma fina camada de matéria, sua intensidade é diminuída como consequência de absorção e de retroespalhamento. Quando este retroespalhamento acontece no interior de um cristal bem ordenado em que as distâncias entre os centros de retroespalhamento (distâncias interplanares) são da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da radiação X, ocorrem interferências nos planos do cristal. O resultado deste efeito é a difração de raios X (SKOOG; LEARY, 1992).

O feixe de raios X atinge a superfície do cristal e uma fração deste feixe é retroespalhada. A fração restante do feixe penetra em direção ao segundo plano do cristal, onde novamente outra fração é retroespalhada e o restante penetra em direção ao terceiro plano e também é retroespalhado, e assim sucessivamente. O efeito cumulativo deste retroespalhamento permite a análise da amostra e é visualizado em forma de espectro (MANSUR *et al.*, 2002).

3.5.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Fótons de energia são absorvidos quando a radiação infravermelha atinge uma molécula. Isto causa um estado de excitação vibracional alto nas ligações interatômicas presentes que se manifesta como flexão, dobramento ou estiramento. Assim, informações sobre a estrutura de materiais podem ser obtidas. A caracterização molecular é possível porque grupos funcionais específicos vibram na mesma frequência, independente do meio em que se encontram. Grande parte das espécies moleculares orgânicas e inorgânicas absorvem energia nos comprimentos de onda iguais aos da radiação infravermelha (BRANTLEY; ELIADES, 2001; SKOOG; LEARY, 1992).

3.5.5. Microscopia de Força Atômica (AFM)

O princípio fundamental de funcionamento do microscópio de força atômica é a medida de deflexões causadas pelas forças que agem entre a sonda (cantilever) e a superfície da amostra, as imagens referem-se à distância mantida entre a sonda (que chamaremos ponteira) e a amostra, no momento da varredura, e às formas de movimentar a ponteira sobre a superfície a ser estudada. Este movimento da ponteira promove angulação diferentes de reflexão dos lasers que são captados por um dispositivo específico, criando a imagem. A Figura 3.10 mostra o diagrama representativo de funcionamento do microscópio de força atômica.

O AFM opera medindo as forças entre a ponteira e a amostra que dependem de diversos fatores como, por exemplo, dos materiais que compõem a amostra e a ponteira, da distância entre elas, da geometria da ponteira e de qualquer tipo de contaminação que houver sobre a superfície da amostra. Ao se aproximar da amostra, a ponteira é primeiramente atraída pela superfície. Esta atração aumenta até que a ponteira aproxime-se muito da amostra, no qual os seus átomos ficarão tão próximos que seus orbitais eletrônicos começam a se repelir.

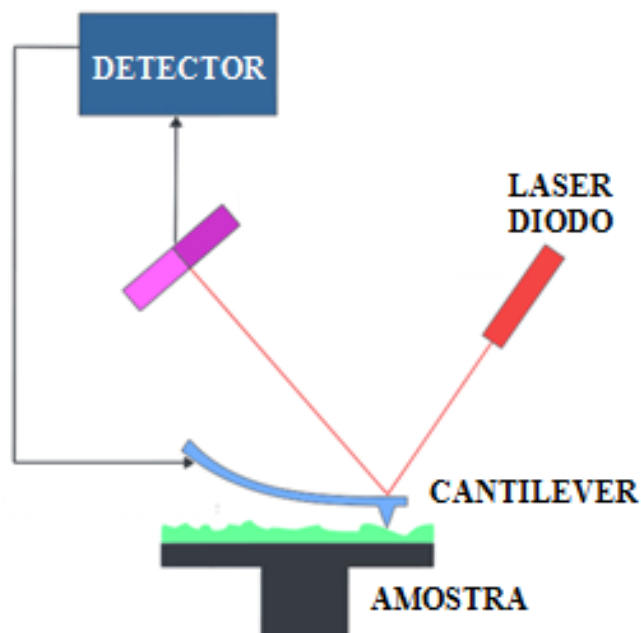


Figura 3.10 - Diagrama representativo de funcionamento do microscópio de força atômica. Fonte: ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR (2012).

A força atrativa enfraquece à medida que a distância diminui. A força anula-se quando a distância entre os átomos é da ordem de alguns ângstroms. Quando as forças se tornam positivas, podemos dizer que os átomos da ponteira e da amostra estão em contato e as forças repulsivas acabam por dominar. A medida que a distância entre os átomos é diminuída aumenta-se a força de repulsão o que exige um aumento da força para aproximação dos mesmos. À medida que se aumenta a distância entre os átomos ocorre um aumento das forças atrativas e em consequência uma diminuição na força necessária para aproximação dos átomos (MANSUR; ORÉFICE; PEREIRA, 2012).

3.5.6. Análise Térmica

As análises térmicas consistem em uma série de técnicas nas quais uma propriedade de um material ou sistema é avaliada em função da temperatura durante um programa de tratamento térmico. Diversas são as propriedades possíveis de serem avaliadas (físicas, termodinâmicas, mecânicas, óticas, magnéticas, elétricas, acústicas), mas as análises

principais são as associadas a avaliação de variação de massa, temperatura, entalpia e dimensões.

3.5.6.1. *Análise Termogravimétrica (TGA)*

A análise termogravimétrica consiste na medida da massa da amostra em função da temperatura. As análises termogravimétricas são aplicadas e fornecem valiosas informações nas avaliações de água adsorvida e de água de cristalização e nos estudos de estabilidade térmica de substâncias e de reações de decomposição e oxidação.

A aplicação da TGA é limitada na medida em que nem todos os eventos térmicos possíveis de ocorrer no material em análise ocorrem acompanhados de variações de massa como, por exemplo, transições de fase no estado sólido, fusão e polimerização. Um aumento da resolução das curvas de TGA mais complexas pode ser obtida colocando os resultados na forma diferencial ($dmassa/dtempo - dm/dt$). Esta análise é conhecida como análise termogravimétrica diferencial – DTG (“*Derivative Thermogravimetric*”). As análises DTG são capazes de mostrar pequenas variações nas curvas de TGA além de que as temperaturas do início e do fim dos picos obtidos pela DTG correspondem ao começo e ao fim das transformações.

3.5.6.2. *Análise Térmica Diferencial (DTA)*

No DTA a diferença de temperatura, ΔT , entre a amostra e um material de referência, representada enquanto ambos são submetidos a um mesmo tratamento térmico. As análises de DTA são utilizadas para determinação das propriedades térmicas da amostra tais como temperaturas de transição, ponto de fusão, temperaturas de reação. Os eventos endotérmicos usualmente verificados são perda de água capilar e de constituição, decomposição de carbonatos e sulfatos e mudanças de estado endotérmicas. Os picos exotérmicos são resultado de mudanças de estado envolvendo liberação de energia (entalpia), tais como as transformações de recristalização, neomineralizações e oxidação.

3.5.6.3. *Análise Calorimétrica Diferencial (DSC)*

No ensaio de DSC, a amostra e o material de referência são mantidos à mesma temperatura ($\Delta T = T_s - T_r = 0$) durante o programa térmico sendo a diferença de energia (dq) necessária para manter as amostras na mesma temperatura controlada. As curvas de DSC são muito utilizadas para determinação do calor específico e variações de entalpia que acompanham as transformações de fase de uma substância.

3.6. CARACTERIZAÇÃO DO FOSFATO DE CÁLCIO E DO FOSFATO DE CÁLCIO MODIFICADO COM NIÓBIO

A síntese e preparação de materiais requerem usualmente a avaliação de suas propriedades e estabelecer possíveis relações entre estrutura e o processamento. Pode-se caracterizar estes sistemas de inúmeras formas e ilimitadas técnicas, mas essencialmente considera-se informações nos aspectos morfológicos, estruturais, físico-químicos, cristalográficas, termomecânicos, biológicos, entre outras. A seguir são apresentadas algumas técnicas e metodologias reportados na literatura utilizados na investigação, análise e caracterização de materiais compósitos.

3.6.1. Caracterização Morfológica de Fosfato de Cálcio

3.6.1.1. *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A imagem de MEV das amostras dos pós-sintetizados no trabalho realizado por SANTOS; HENEINE; MANSUR (2008), antes do tratamento térmico, mostra a presença de um material aglomerado com superfície granular, tendendo para uma estrutura densa (Figura 3.11). As imagens mostram o aspecto considerado como típico de apatita (SCHUMANN, 1992).

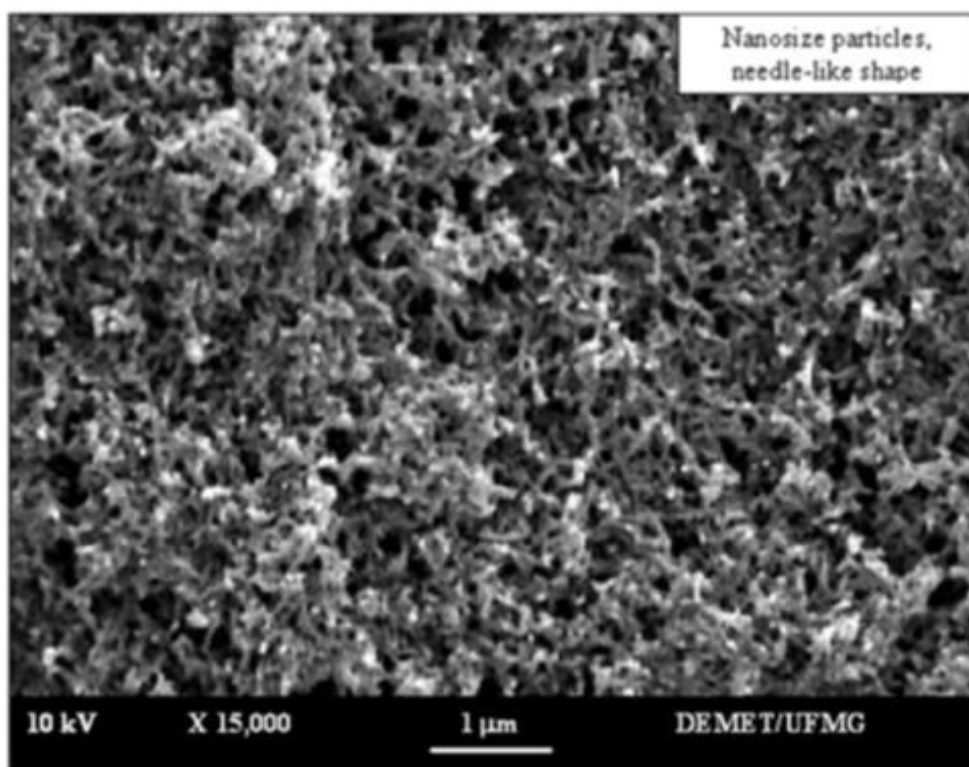


Figura 3.11 – Imagem de MEV da HAP. Fonte: SANTOS; HENEINE; MANSUR (2008).

Durante o tratamento térmico inicia-se o processo de densificação dos fosfatos de cálcio (CHENG *et al.*, 1998). A Figura 3.12 mostra o MEV da HAP, com aspecto mais poroso antes do tratamento térmico. Durante tratamento térmico há perda da água de hidratação e cristalização do material, que se transforma em uma estrutura mais densa, menos porosa e consequentemente com menor área específica. A micrografia da Figura 3.13 mostra o aspecto do material, após o tratamento térmico à temperatura de 900°C.

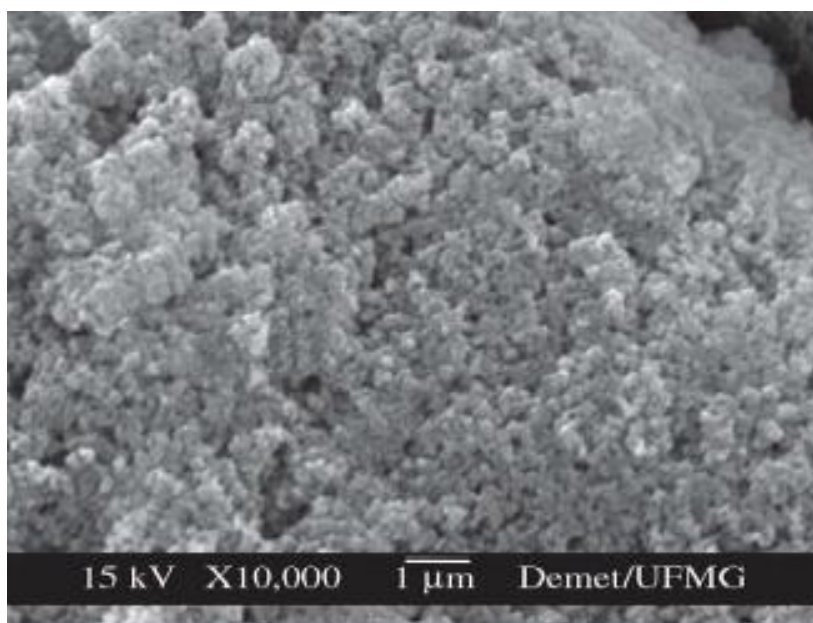


Figura 3.12 - Micrografia de MEV da amostra HAP, antes do tratamento térmico, com aspecto mais poroso e menos denso. Fonte: SANTOS *et al.* (2004).

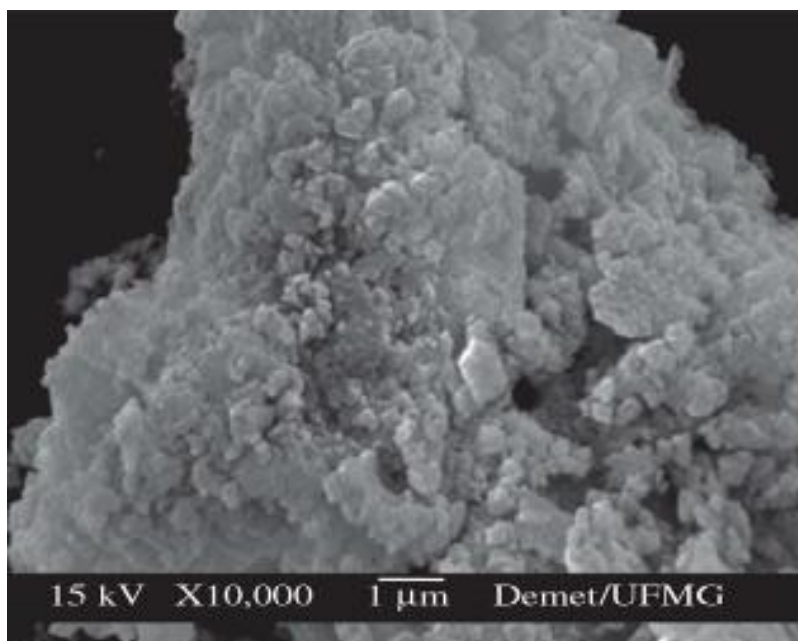


Figura 3.13 - Micrografia de MEV da amostra HAP, após tratamento térmico. Fonte: SANTOS *et al.* (2004).

3.6.2. Análise das fases cristalinas

3.6.2.1. Difração de Raios-X (DRX)

As amostras dos pós sintetizados, antes e depois do tratamento térmico, foram submetidos à difração de raios-X, que permitem identificar as fases cristalinas presentes no material e estimar a sua quantidade de fase amorfa e cristalina.

No trabalho de OLIVEIRA (2004); os difratogramas das amostras apresentam picos de HAP e grande quantidade de material amorfo, sintetizadas em temperatura ambiente e tratadas a 110°C, mostrando grande similaridade, no trabalho de OLIVEIRA (2004). Além disto, estes difratogramas mostram grande semelhança ao difratograma de HAP sintetizada e a existente na literatura. Neste material, todos os picos são de HAP. (Figura 3.14).

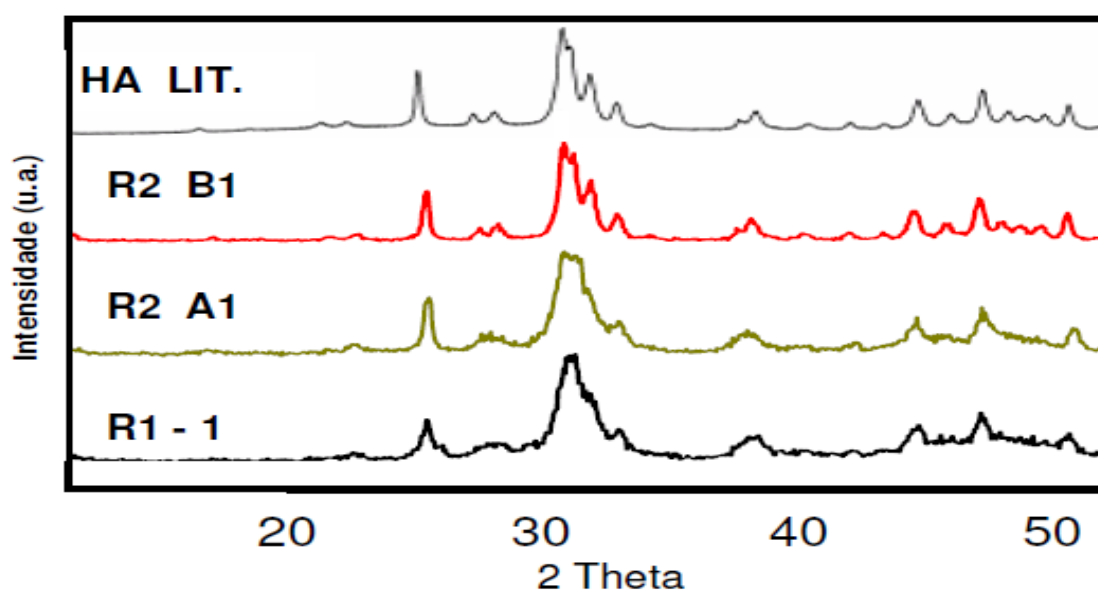


Figura 3.14 - Difratograma de HAP da literatura (PETERS; SCHWARZ; EPPLE, 2000) e difratograma das amostras de HAP tratadas a 110°C, evidenciando semelhança entre os picos. Fonte: OLIVEIRA (2004).

Os difratogramas de algumas amostras secas a 110°C (OLIVEIRA, 2004), apresentam grande quantidade de fase amorfa e alguns picos correspondentes a HAP, quando

tratadas a 900°C mostram o desaparecimento dos picos de HAP e o aparecimento de picos de β TCP puro. Ocorrem reações em que há dissociação da HAP e a formação de β TCP provavelmente por haver uma quantidade de fosfato disponível na fase amorfa que reage e favorece a formação deste último composto. Uma justificativa para a formação de β TCP puro associa este fato ao tratamento térmico próximo a 900°C (ARENDS *et al.*, 1987; FUJITA *et al.*, 2003; PEÑA; VALLET-REGI, 2003; RAYNAUD; CHAMPION; BERNACHE-ASSOLANT, 2002; YANG; WANG, 1998). Os difratogramas na Figura 3.15 abaixo, mostram coincidência entre difratogramas de β TCP puros vistos na literatura e aqueles obtidos no trabalho de OLIVEIRA (2004).

Os picos principais dos difratogramas de HAP representam os planos de rede do cristal (211), (112) e (300) e os picos principais dos difratogramas de β TCP representam os planos de rede do cristal (221) e (220) (PEÑA; VALLET-REGI, 2003 - Figura 3.16).

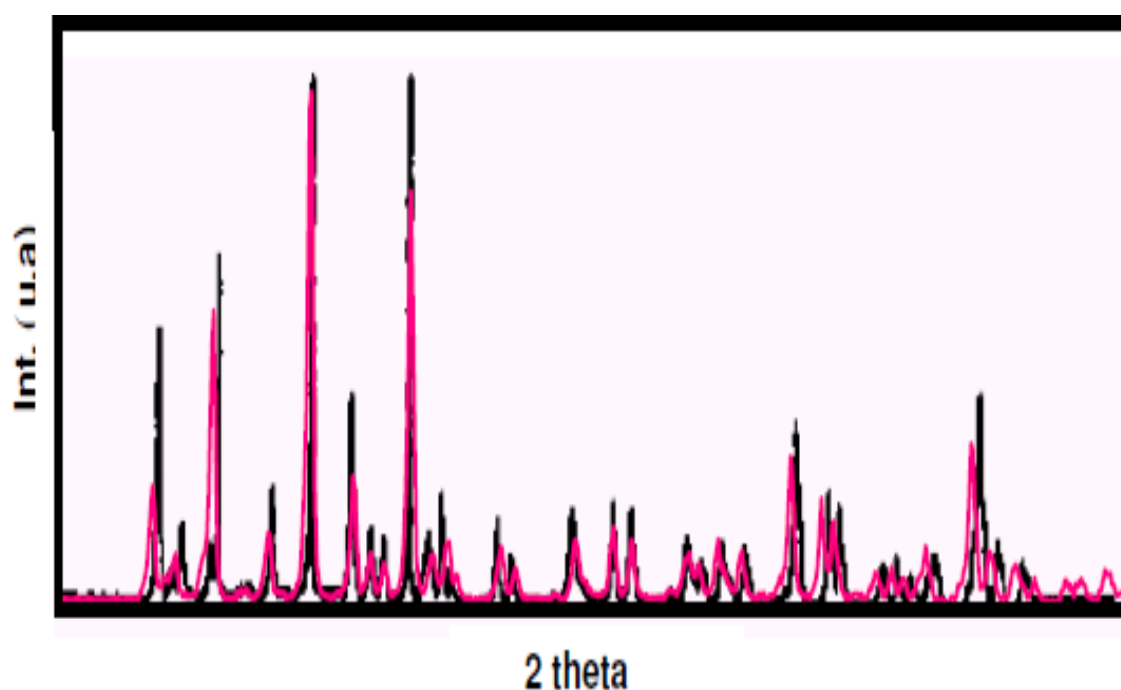


Figura 3.15 - Evidência da coincidência entre o difratograma de DRX de β TCP da literatura (CHUSSEI; GOODMAN, 1999) em preto e um dos difratograma da amostra do trabalho de OLIVEIRA, 2004. Fonte: OLIVEIRA (2004).

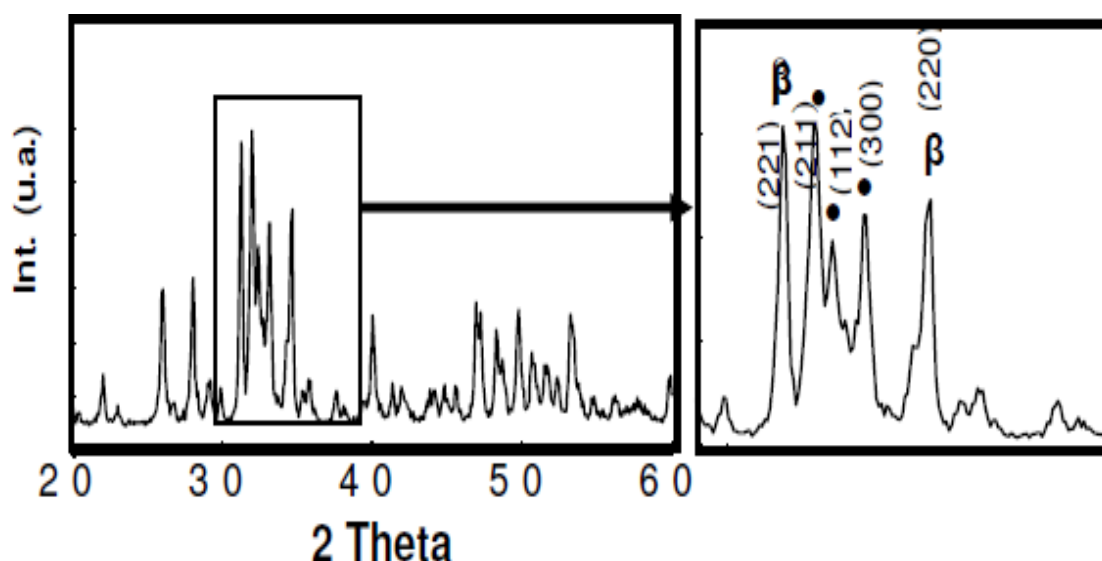


Figura 3.16 - Evidenciação da região do difratograma de DRX que apresenta os picos e planos de material bifásico HAP / β TCP em R2 B1 900 BIF., destacando os picos de cada fase e os respectivos planos de rede do cristal ($\bullet$ HA; β TCP). Fonte: OLIVEIRA (2004).

No trabalho de OLIVEIRA (2004), na Figura 3.17, onde temos R1 com tratamento térmico a 900°C, as amostras evidenciam o aparecimento de material bifásico HAP / β TCP quando foi utilizada agitação magnética lenta e quando houve inversão na ordem de adição dos reagentes. O aparecimento de HAP pura aconteceu quando se utilizou agitação magnética vigorosa. A agitação vigorosa da mistura promove a disponibilização dos dois íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} levando à formação de material puro em R1-2 e R1-3. O β TCP puro não foi obtido em R1-5, mas sim um material com grande proporção de β TCP e picos de HAP de intensidade baixa.

A cristalinidade do material é visto pela largura dos picos dos difratogramas de DRX no trabalho de OLIVEIRA, (2004). Os picos estreitos mostram um grau de cristalinidade mais alto, enquanto os picos mais largos mostram uma quantidade maior de material amorfo (KIESWETTER *et al.*, 1994; PETERS, SCHWARZ; EPPLE, 2000 - Figura 3.18).

A análise da proporção entre a área da fase amorfa e a área da fase cristalina mostrou que à medida que a temperatura do tratamento térmico aumentou o grau de

cristalinidade das amostras também aumentou. Esse aumento foi em média de 43% quando se comparou a cristalinidade das amostras com tratamento térmico de 110°C para 900°C (OLIVEIRA, 2004).

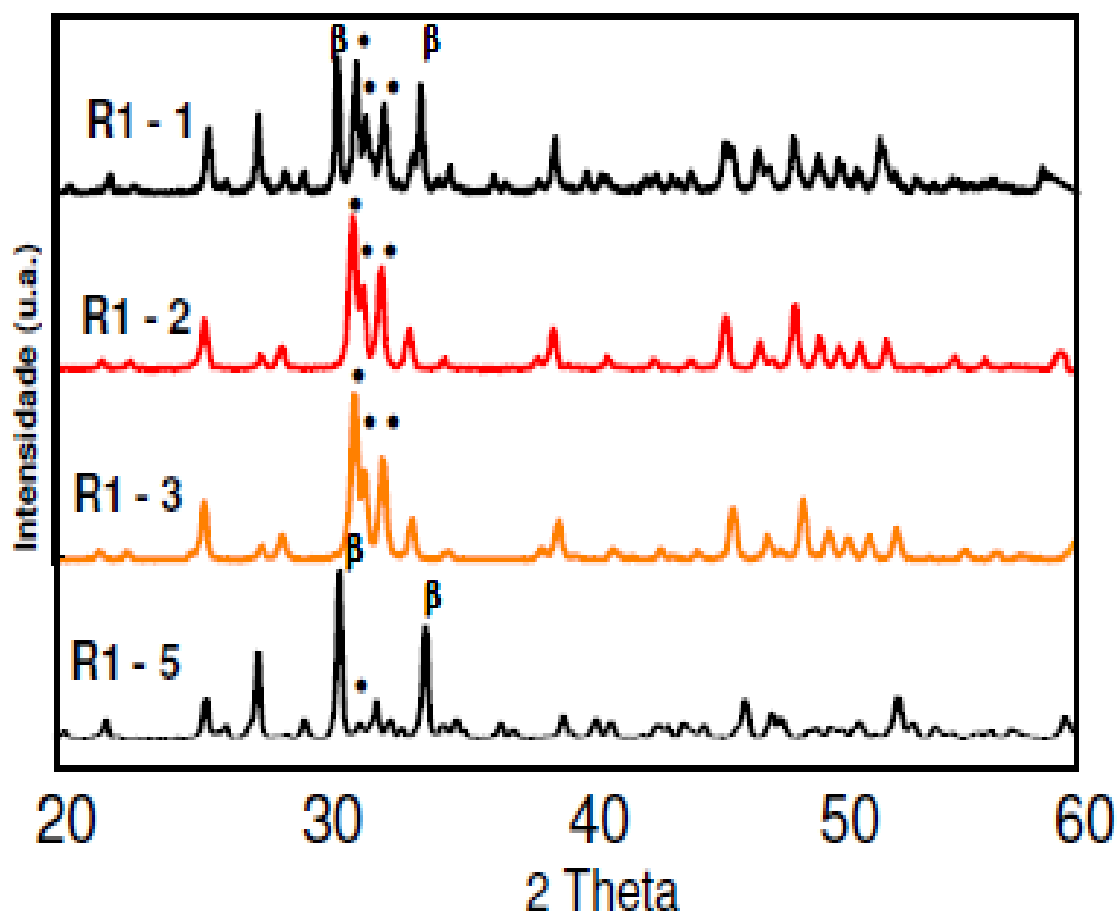


Figura 3.17 - Difrátogramas de DRX mostrando a formação de material bifásico em R1-1 900 BI e R1-5 900 BI e formação de HAP pura em R1-2 900 HAP e R1-3 900 HAP (•HAP; βTCP). Fonte: OLIVEIRA (2004).

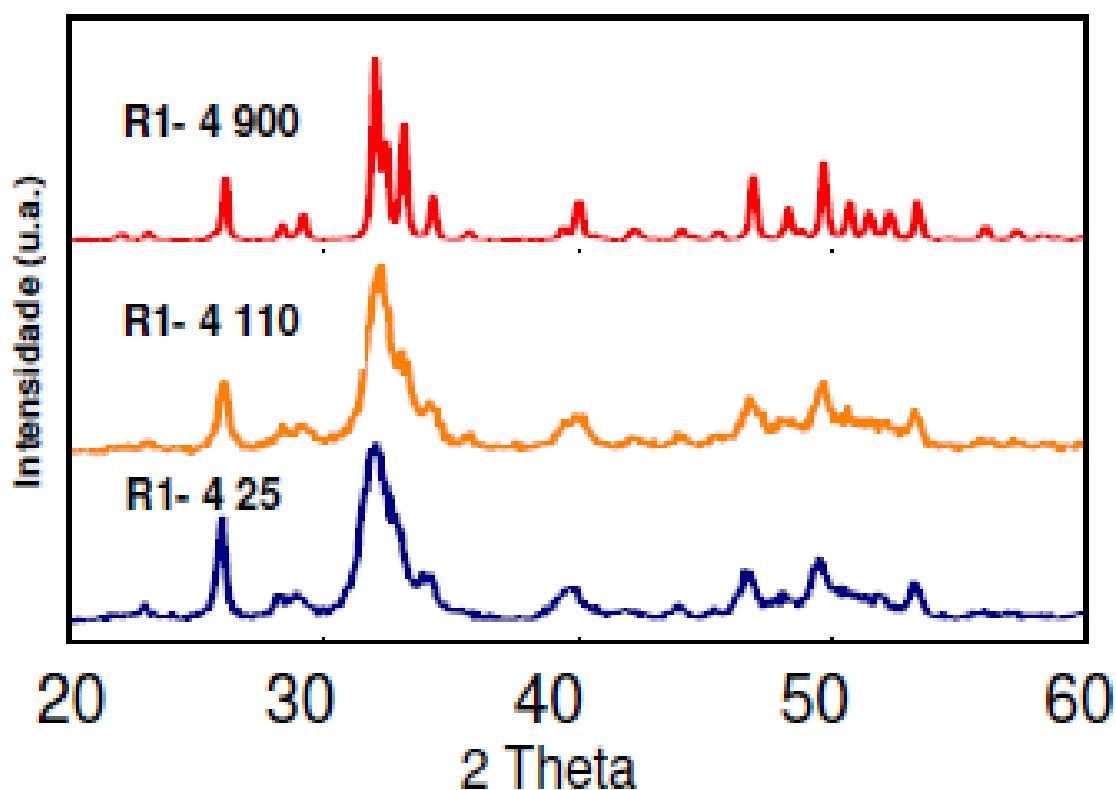


Figura 3.18 - Comparação entre a largura dos picos dos difratogramas de uma mesma amostra HAP tratada a 25°C, 110°C e 900°C (amostra R1-4). Fonte: OLIVEIRA (2004).

3.6.2.1.1. Análise dos parâmetros de rede do cristal de HAP

As medidas de a e c do parâmetro de rede do cristal de HAP (hexagonal) são descritas. Os resultados obtidos levaram a conclusão de que o material sintetizado foi HAP próxima das medidas padrão da ficha de HAP catalogada ($a = 9,42\text{\AA}$ e $c = 6,88\text{\AA}$), levando-se em consideração que HAP contendo traços de CO_3^{2-} , apresenta pequenas diferenças dimensionais em sua célula unitária (OKAZAKI; TAIRA; TAKAHASHI, 1997). MAVROPOULOS *et al.* (2003) encontrou valores de a variando de $9,413\text{\AA}$ a $9,441\text{\AA}$ e valores de c variando de $6,863\text{\AA}$ a $6,889\text{\AA}$.

3.6.3. Caracterização da Composição Estrutural

3.6.3.1. *Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)*

3.6.3.1.1. *Análise Química dos Grupos Funcionais*

A espectroscopia no Infravermelho foi feita na região do intermediário, ou seja, de 400cm^{-1} a 4000cm^{-1} evidenciando as bandas mais significativas em relação a HAP e β TCP, no trabalho de OLIVEIRA (2004). Além disto, evidenciou também bandas referentes a alguns grupos funcionais adsorvidos nas amostras. A Tabela 3.2 traz um resumo das interações químicas existentes nas moléculas das amostras.

Na Figura 3.19, pode-se observar os espectros de FTIR de amostras A2 e A5 referentes ao trabalho de SANTOS, 2005. As bandas referentes aos íons PO_4^{3-} apareceram no espectro em níveis variados de frequência, nos modos de vibrações de estiramento e de dobramento. As bandas no modo de vibração de estiramento (ν_3) foram evidenciadas em 1096cm^{-1} , 1059cm^{-1} e 1041cm^{-1} como íons PO_4^{3-} , em 964cm^{-1} como PO_4^{3-} , e em 632cm^{-1} como PO_4^{3-} lábil, ou seja, com presença de OH livre. As bandas evidenciadas em 606 e 565cm^{-1} relacionam-se aos íons PO_4^{3-} no modo de vibração de dobramento (ν_4). Na frequência 2077cm^{-1} e 1989cm^{-1} caracterizaram-se bandas secundárias de íons PO_4^{3-} e a banda referente à OH da ligação P-OH apresentou-se em 871cm^{-1} .

Na Figura 3.20, no trabalho de SANTOS (2005) a amostra A2 mostrou-se como uma hidroxiapatita carbonatada, mesma constituição do material natural de ossos e dentes (JONES, 2001; LEGEROS, 2002). Seu espectro de FTIR pode ser comparado ao de HAPc (comercial) e ao de HAP da literatura (OLIVEIRA, 2004) (B), que também caracterizaram-se como hidroxiapatita carbonada. As setas indicam os grupamentos funcionais onde foram notadas diferenças entre os materiais, o que pode indicar mudanças nas suas características.

Tabela 3.2 - Identificação de picos de amostras de HAP e β TCP em FTIR.

Frequência (cm ⁻¹) na HA	Atribuição	Frequência (cm ⁻¹) no β TCP
	P ₂ O ₇ (estiramento)	435
468	PO ₄ v2	
566 e 604	PO ₄ v4 (dobramento)	552 e 604
632	OH livre ou PO ₄ lábil	
	P ₂ O ₇ (estiramento)	729
875	P-OH ou CO ₃ v2	
963	PO ₄ v1	946 e 975
1033 - 1100	PO ₄ v3 (estiramento)	1039-1123
	HPO ₄	1212
1420	CO ₃ v3 estrutural ou PO ₄	
1450	CO ₃ v3 estrutural ou OH	
2237 e 2368	CO ₂ (atmosfera)	2336 e 2370
3570 (largo)	OH estrutural (estiramento)	3331-3480-3629

Fonte: CHENG (1998); OLIVEIRA (2004); PEÑA, VALLET-REGI (2003); RAYNAUD; CHAMPION; BERNACHE-ASSOLANT (2002); YANG; WANG (1998).

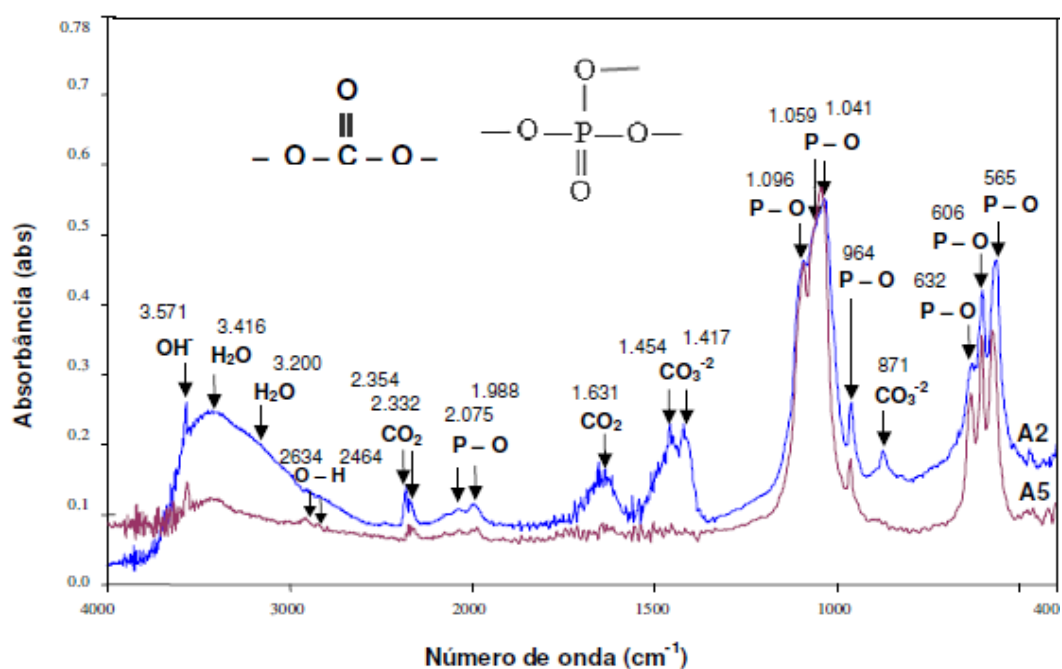


Figura 3.19 - Espectro de FTIR com as bandas de absorção no infravermelho referentes às ligações químicas dos grupamentos funcionais da composição da amostra A2 (HAP) e A5 (HAP- β TCP). Fonte: SANTOS (2005).

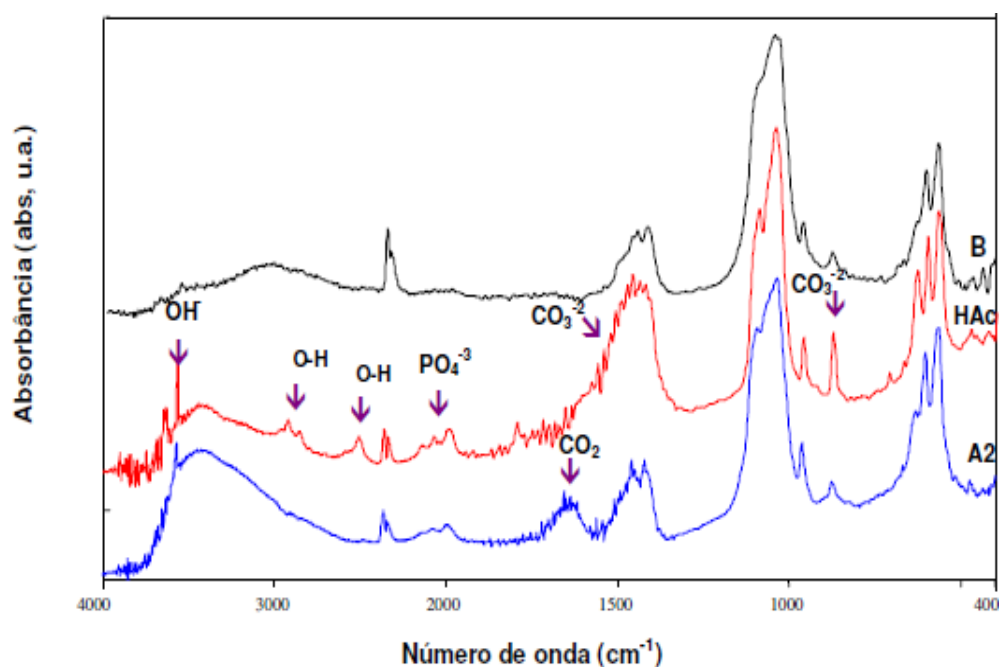


Figura 3.20 - Espectros de FTIR da amostra A2 de (HAP), HAPc (comercial), e HAP da literatura (OLIVEIRA, 2004) (B).

3.6.3.2. *Espectroscopia de Raio-x por Dispersão em Energia (EDS)*

A composição química elementar qualitativa das amostras dos pós sintetizados é avaliada através da análise por EDS. Na Figura 3.21, no trabalho de SANTOS (2005), os espectros revelam que os materiais sintetizados apresentam picos de alta intensidade referentes aos seus principais elementos constituintes, cálcio(Ca) e fósforo (P); e mostra picos de baixa intensidade referentes ao magnésio (Mg), silício (Si), sódio (Na), estrôncio (Sr), enxofre (S), potássio (K) e cloro (Cl) considerados impurezas do material advindas de seus reagentes, antes do tratamento térmico (SANTOS, 2005).

Os mesmos constituintes das amostras antes do tratamento térmico foram observados após o tratamento térmico, mostrando a mesma composição inicial do material. Os picos referentes ao Ca e ao P antes do tratamento térmico mostraram uma menor intensidade (Figura 3.22) comparados aos mesmos picos de Ca e P após o tratamento térmico (Figura 3.22). A técnica também foi utilizada para identificação e incorporação de elementos adicionados em pequenas proporções como modificadores de propriedades (Figura 3.22B - SANTOS, 2005).

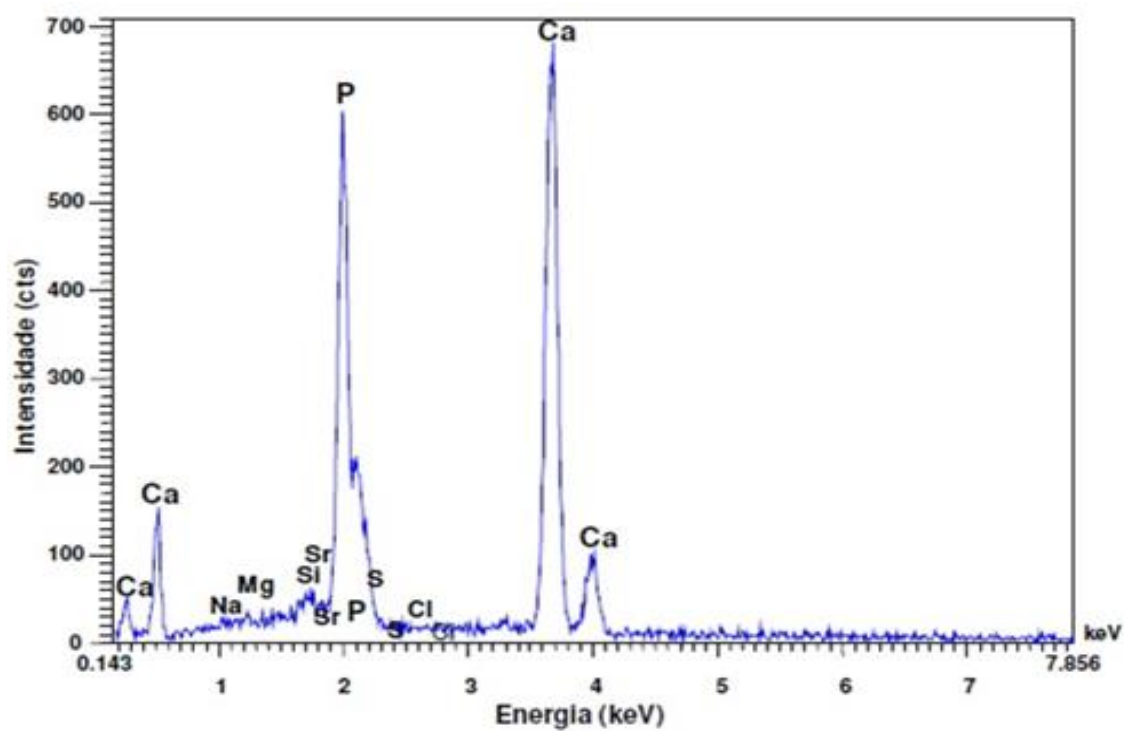


Figura 3.21 - Espectro de EDS com picos dos principais constituintes, Ca e P, e dos traços de elementos da amostra HAP, antes do tratamento térmico. Fonte: SANTOS (2005).

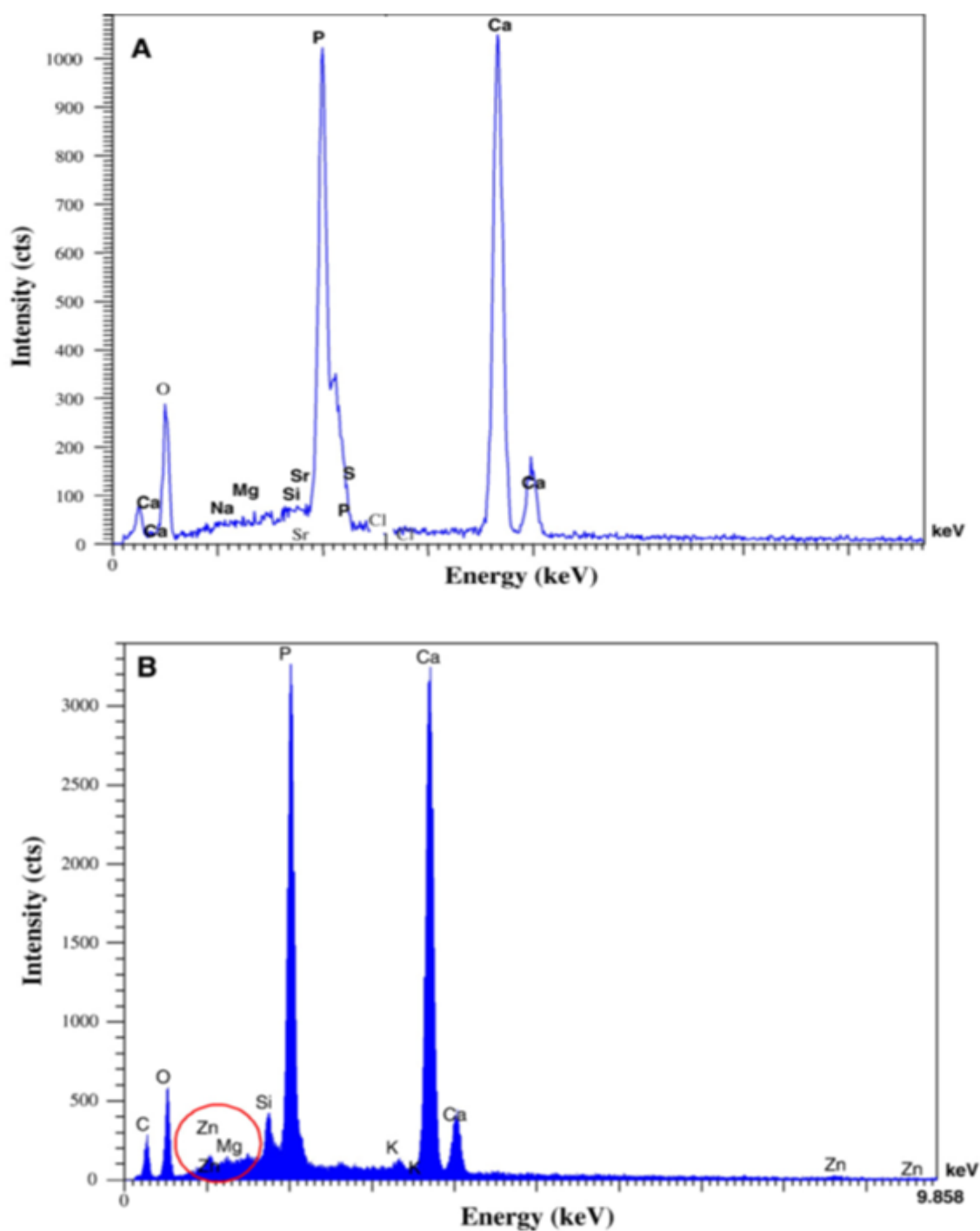


Figura 3.22 - Espectro de EDS, após tratamento térmico a 900°C: (A) Pó de HAP, espectro com picos de maior intensidade de Ca e P e traços de outros elementos; (B) espectro com picos de maior intensidade de Ca e P, e presença de picos de baixa

intensidade de Mg, Si, K e Zn nas amostras dopadas com HAPZn. Fonte: SANTOS (2005).

3.6.4. Análise Térmica

A Figura 3.23, mostra que a curva TG da HAP pode ser dividida em três estágios segundo a literatura (ZHANG *et al.*, 2006). Estágio 1 (35-145°C) corresponde a vaporização da água adsorvida na superfície da HAP, estágio 2 (145-620°C) é devido a vaporização da água de cristalização da HAP, e estágio 3 (620-800°C) é provavelmente devido a ruptura do CO_3^{2-} e HPO_4^- na HAP (LEGEROS, 1978).

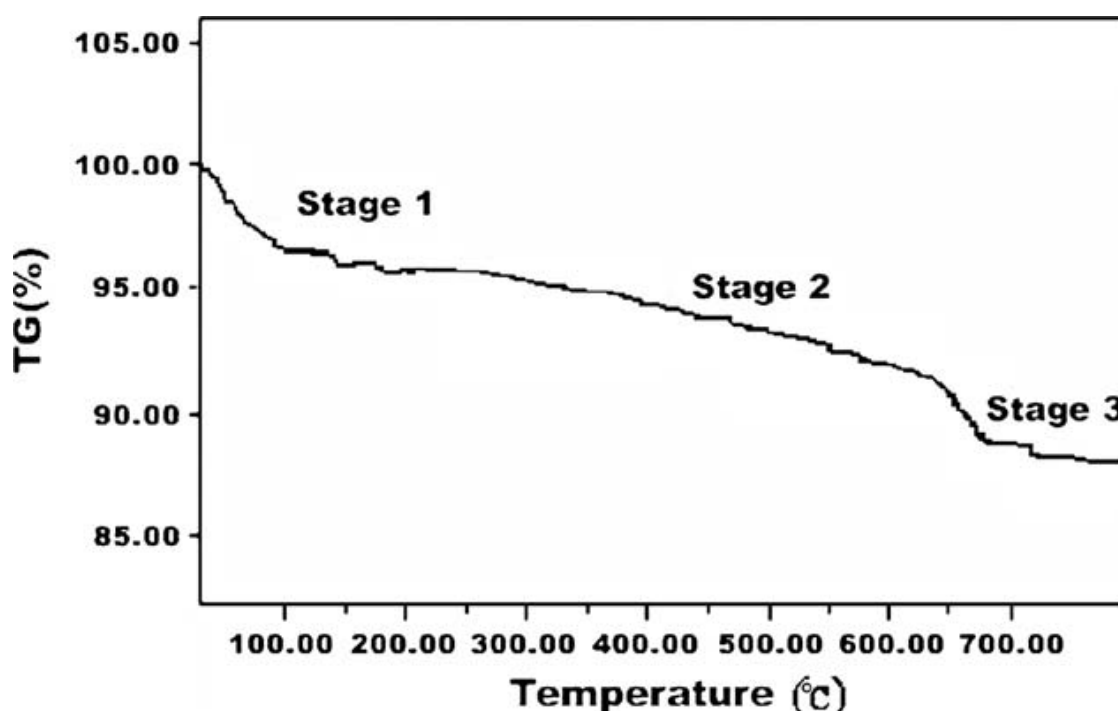


Figura 3.23 - Curva TG da HAP. Fonte: ZHANG *et al.* (2006).

A

Figura 3.24 apresenta as curvas de DTA, TG e DTG da amostra pura de HAP calcinada a 500°C. Na curva de DTA, entre 177 e 212°C pode-se ver uma pequena banda exotérmica atribuída a HAP de baixa cristalinidade. A derivada da curva termogravimétrica em função da temperatura (DTG) mostra que a partir de 100°C a taxa de perda praticamente se mantém constante o que equivale a perda de cerca de 95,5% da

massa inicial da HAP. Desta faixa de temperatura até cerca de 750°C a perda de massa ocorre devido a eliminação de água. Não se obteve picos relativos à mudança de fase do material na temperatura de 500°C. A perda de massa a partir de 770°C refere-se a decomposição da HAP, conforme literatura (ARAÚJO, 2006).

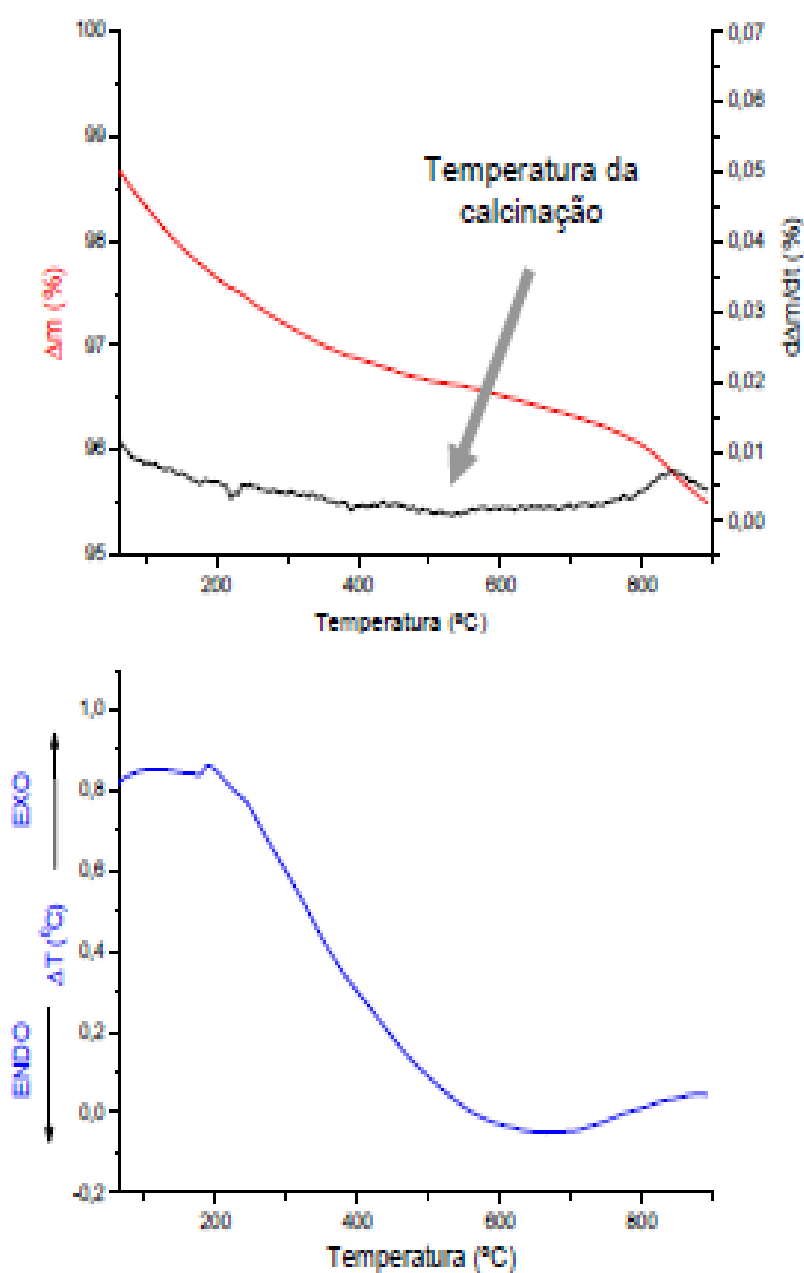


Figura 3.24 - Curvas de DTA, TG e DTG da HAP calcinada a 500°C. Fonte: ARAÚJO (2006).

Segundo LIAO *et al.* (1999), a HAP tem dois tipos de água na sua estrutura, água adsorvida e água estrutural (LEGEROS R. Z.; BONEL; LEGEROS, R., 1978). A água adsorvida é caracterizada pela reversibilidade, instabilidade térmica de 25 a 200°C, e perda de peso sem nenhum efeito sobre o parâmetro de rede. A água estrutural é irreversivelmente perdida na temperatura de 200-400°C, o que causa uma contração no parâmetro *a* de rede durante o aquecimento. Em altas temperaturas, a HAP desidrata gradualmente levando a liberação de OH⁻.

3.6.5. Caracterização Biológica

3.6.5.1. Ensaio de Viabilidade Celular Via MTT (3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)

A viabilidade celular foi avaliada via ensaios de MTT usando cultura de osteoblastos na presença de compósitos após incubação por um período estabelecido (SANTOS; HENEINE; MANSUR 2008). No presente trabalho, os resultados de citocompatibilidade de todas as amostras de biocompósitos testadas, mostraram que não houve nenhuma diferença significativa para a viabilidade celular entre CAP/COL dopados e não dopados com zinco. Assim a proliferação dos osteoblastos na presença dos biocompósitos e sem os biocompósitos foi semelhante quando comparados com o grupo controle como mostrado na

Figura 3.25.

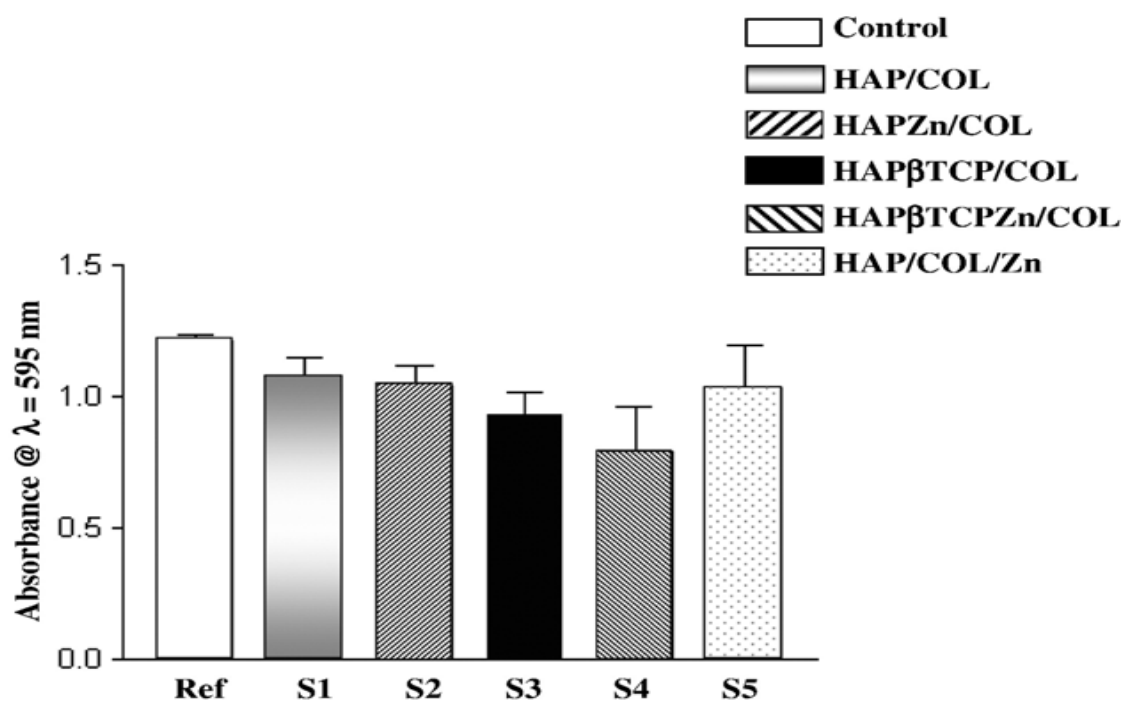
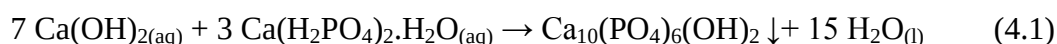


Figura 3.25 - Viabilidade celular avaliada por MTT após 72hs de incubação: osteoblastos não mostraram nenhuma diferença significativa na proliferação, na presença de todos compósitos, quando comparados com o controle. Os resultados representam a média $\pm$ SD de três experiências separadas ($p < 0,05$). Fonte: SANTOS; HENEINE; MANSUR (2008).

CAPÍTULO 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. SÍNTESE DE CERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO

O método de escolha para a obtenção de fosfato de cálcio foi o de síntese por precipitação em meio aquoso, segundo a Equação 4.1. O controle e monitoramento do pH foram feitos em intervalos de 10 minutos. O ambiente foi preparado com água deionizada na vidraria utilizada.



As sínteses foram feitas em temperatura ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) e posteriormente foram submetidas à tratamento térmico. Primeiramente foram levadas à estufa para secagem à temperatura de $110^\circ\text{C} \pm 5$ por 24 horas, sendo esta amostra identificada como HAP_110. O objetivo desta etapa é garantir a remoção de toda a água adsorvida do material. Todas as amostras do material após esta secagem foram armazenadas em recipientes plásticos com tampa. Na sequência, uma alíquota deste material seco foi tratado termicamente à temperatura de $900^\circ\text{C} \pm 5$ em forno mufla, com uma taxa de aquecimento de 20°C por minuto, sendo esta amostra identificada como HAP_900. Atingida a temperatura de 900°C , esse patamar foi mantido durante 3 horas. O resfriamento das amostras foi feito de forma lenta dentro do próprio forno até atingir a temperatura ambiente.

4.2. MATERIAIS

4.2.1. Materiais e equipamentos utilizados na síntese das biocerâmicas

- Hidróxido de cálcio: Ca(OH)_2 P.A. (Riedel de Haen - Alemanha)
- Fosfato de cálcio monobásico hidratado: $\text{Ca(H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ P.A. (Synth)
- Água deionizada – 18 MΩ.cm

- Cloreto de nióbio: Nb_2Cl_5 (Sigma)
- Balança eletrônica (MARTE, modelo AY 2200)
- Agitador magnético (FISATOM, modelo 751)
- Beckers de vidro de 600mL
- Bomba de vácuo (FISATOM)
- Kitazato de vidro de 1000mL
- Funil de Büchner
- Filtros de papel Quanty, com porosidade de $25\mu\text{m}$
- Peneira (Mesh) da Bertel: $200\mu\text{m}$
- Estufa (MEDICATE, modelo EL 1.3)
- Gral de ágata
- Forno Mufla - QUIMIS
- Termômetro

4.2.2. Amostra de referência (HAPc)

- Hidroxiapatita comercial, HAP-91[®], JHS – Laboratório Químico LTDA.

4.3. PROCEDIMENTOS

4.3.1. Síntese do Fosfato de Cálcio

A síntese do fosfato de cálcio foi realizada através da preparação da suspensão de hidróxido de cálcio (identificada como “Sus.1”) e suspensão de fosfato de cálcio

monobásico hidratado (identificada como “Sus.2”). Para a preparação da suspensão de hidróxido de cálcio (“Sus.1”), pesou-se 5,201g de hidróxido de cálcio, que foi adicionado lentamente a 250mL de água deionizada em becker sob agitação magnética por 10 minutos para homogeneizar e depois foi medido o pH da suspensão.

Para a preparação da suspensão de fosfato de cálcio monobásico hidratado (“Sus.2”), pesou-se 7,5216g de fosfato de cálcio monobásico hidratado, que foi adicionado a 250mL de água deionizada em becker, sob agitação magnética vigorosa por 10 minutos para homogeneizar e depois foi medido o pH da suspensão.

A Sus.2 foi adicionada à Sus.1, derramando lentamente e sob agitação magnética vigorosa por 10 minutos para disponibilizar os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} para a reação de síntese. A agitação magnética foi aumentada durante a síntese devido ao aumento da concentração da mistura e foi monitorado o pH da mesma.

A suspensão foi deixada sob agitação magnética vigorosa por uma hora. Esta agitação foi mantida com o mesmo propósito de disponibilizar os íons e foi monitorado o pH. A suspensão foi deixada em repouso por 24 horas para decantar. O sobrenadante foi desprezado e a suspensão final filtrada à vácuo em funil de Büchner com papel de filtro, adaptado ao kitazato e ligado à bomba de vácuo através de mangueiras.

O material retido no filtro foi lavado por três vezes com água deionizada (30mL) para remoção de íons não reagidos seguido de filtração e removido com espátulas metálicas para placa de Petri. O material foi seco em estufa à temperatura de 110°C por 24 horas (HAP_110). O material foi moído em gral de ágata até que 100% do material passasse na peneira de 200 mesh para a realização dos ensaios de caracterização.

Na sequência, amostra HAP_110 foi submetida a tratamento térmico a 900°C $\pm$ 5 em forno mufla com taxa de aquecimento de 20°C a cada 10min. As amostras após tratamento térmico foram retiradas somente após o forno atingir a temperatura ambiente e identificada como HAP_900. O material foi moído em gral de ágata até que 100% do material passassem na peneira de 200 mesh para realização dos ensaios de caracterização.

O fluxograma a seguir, Figura 4.1, resume a sequência de procedimentos para obtenção das biocerâmicas.

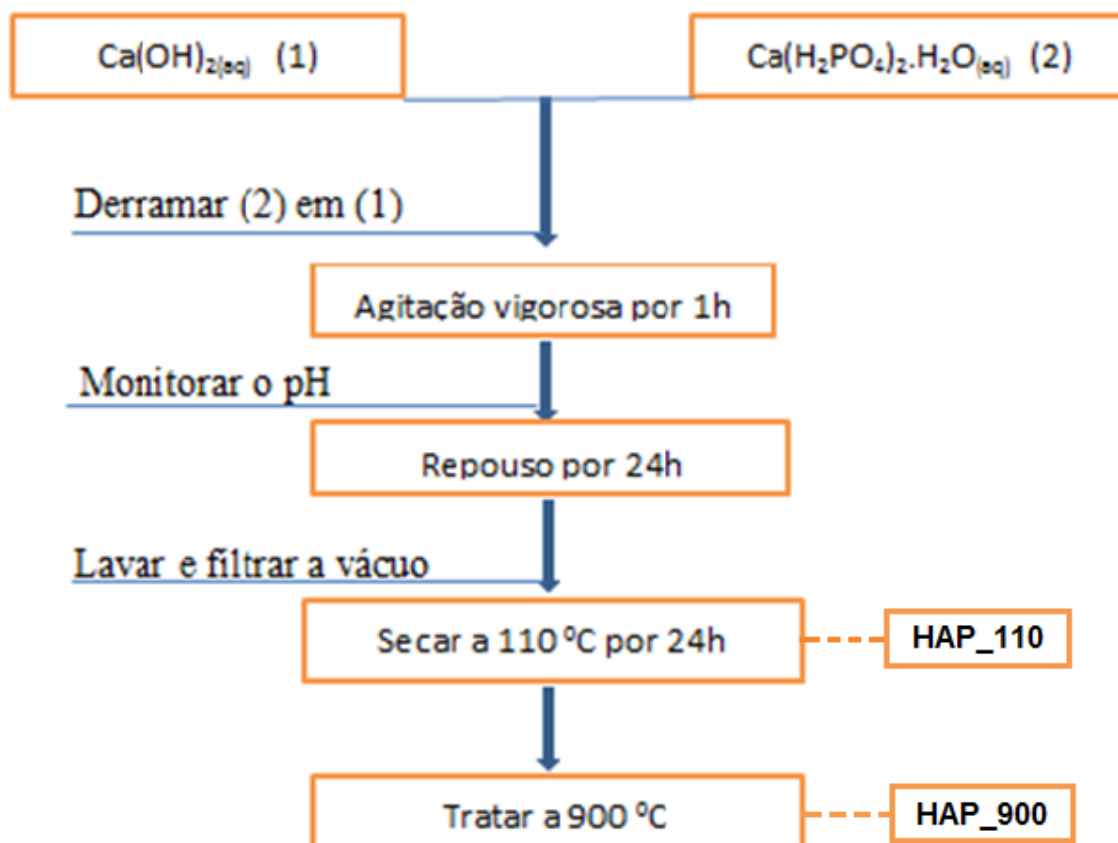


Figura 4.1 - Procedimentos para obtenção das biocerâmicas.

4.3.2. Síntese do Fosfato de Cálcio com adição de Nióbio

Foi preparada a suspensão de hidróxido de cálcio (“Sus.1”) e a suspensão de fosfato de cálcio monobásico hidratado (“Sus.2”) conforme descrito na seção 4.3.1.

Para a introdução de 1% molar de Nb em substituição ao cálcio, foi preparada a solução de cloreto de nióbio (identificada como Sol. Nb). Pesou-se 0,2701g do cloreto de nióbio que foi adicionado 10mL de etanol em becker sob agitação magnética vigorosa por 10 minutos.

A “Sol.Nb” foi adicionada à “Sus.2”, sendo derramada lentamente sob agitação magnética vigorosa por 10 minutos, formando agora a “Sus.3”. A “Sus.3” foi adicionada à “Sus.1”, e derramada lentamente, sob agitação magnética vigorosa por 10 minutos para disponibilizar os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} para a reação de síntese. A agitação magnética foi aumentada durante a síntese pelo aumento da concentração da mistura e foi monitorado o pH da mistura.

A suspensão foi deixada sob agitação magnética vigorosa por uma hora. Esta agitação foi mantida com o mesmo propósito de disponibilizar os íons e com o monitoramento do pH. A suspensão foi mantida em repouso por 24 horas para decantar. O sobrenadante foi desprezado e a suspensão final foi filtrada à vácuo em funil de Büchner com filtro de papel, adaptado ao kitazato e ligado à bomba de vácuo através de mangueiras. O material retido no filtro foi lavado por três vezes com água deionizada (30mL) para remoção de íons não reagidos e depois foi filtrada e retirada com espátulas metálicas e colocada em placa de Petri. O material foi seco em estufa à temperatura de $110^\circ\text{C} \pm 5$ por 24 horas (HAP-Nb_110).

O tratamento térmico a $900^\circ\text{C} \pm 5$ foi realizado em forno mufla por 3h, com taxa de aquecimento de 20°C a cada 10min. A amostra foi retirada somente após o forno atingir a temperatura ambiente, sendo identificada como HAP-Nb_900.

Todas as amostras foram cominuídas em gral de ágata até que 100% do material passasse na peneira de 200 mesh antes da realização dos ensaios de caracterização.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS DE FOSFATO DE CÁLCIO E DO FOSFATO DE CÁLCIO/NIÓBIO

4.4.1. Análise Química e Mineralógica

4.4.1.1. Espectroscopia de Raios-X por Dispersão em Energia (EDS)

A análise elementar semi-quantitativa das amostras foi obtida, através do detector de espectroscopia de raio-x por dispersão em energia (EDS), acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, usando feixe de elétrons de 10 e 15kV. Os resultados foram

determinados pela análise de áreas diferentes com 5 réplicas de cada amostra, com ampliação de 150X. Antes das análises, as amostras foram recobertas com fina camada de carbono para tornar a superfície condutiva.

A análise elementar semi-quantitativa das amostras também foi obtida, através do equipamento de EDS acoplado ao microscópio eletrônico de transmissão com tensão de aceleração de 200kV, permitindo a ampliação da faixa de energia dos raios-X característicos em avaliação.

4.4.1.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os pós sintetizados foram dispersos em KBr, na proporção de 0,11g de KBr para 0,0011g da amostra. Os espectros FTIR das amostras sintetizadas dispersas em KBr foram obtidos através dos métodos de refletância difusa (DRIFTS) com 32 varreduras, no intervalo entre 400 à 4000cm⁻¹ e com resolução de 4cm⁻¹ no espectrofotômetro de infravermelho NICOLET 6700 GOLD, Thermo Electron. As medidas de absorbância das amostras nas regiões do infravermelho permitiu a determinação qualitativa de suas moléculas, identificando sua estrutura química.

4.4.1.3. Difração de Raios X (DRX)

As amostras dos pós sintetizados, antes e após os tratamentos térmicos, foram submetidos à difração de raios-X, que permitem identificar as fases cristalinas presentes no material e estimar a quantidade de fases amorfas e cristalinas. As amostras foram analisadas usando difratômetro Philips- X'Pert, PANalytical modelo EMPYREAN, utilizando radiação CuK α ($\lambda = 1,5406\text{\AA}$).

O método de análise se baseou na comparação dos valores das distâncias interplanares e das intensidades dos picos nos difratogramas das amostras analisadas e uma amostra de referência, utilizando o padrão do banco de dados PDF-2 Release 2010 do ICDD (*International Centre for Diffraction Data e o software X 'Pert High Score versão 2011*).

O cálculo dos parâmetros de rede a e c foram realizados em relação aos planos (211) (112) da HAP, respectivamente, usando a relação padrão entre as distâncias interplanares para uma célula unitária de um sistema hexagonal, segundo a Equação 4.2 (WEBSTER *et al.*, 2004).

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (4.2)$$

Sendo:

- d é a distância entre planos adjacentes definidos pelos índices de Miller (h,k,l).
- Os termos a e c representam os parâmetros de rede da célula unitária.

4.4.1.4. Cálculo do Tamanho do Cristalito

O tamanho de cristalito (D_{hkl}) foi determinado pela Equação 4.3 de Scherrer, partir da medida da largura de um pico de difração no ponto onde a intensidade cai pela metade de seu valor máximo, “*full width at half maximum – FWHM*”, ou simplesmente chamada de largura a meia altura (β) (AZAROFF *et al.*, 1958).

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (4.3)$$

sendo:

k : coeficiente de forma com valores entre 0,9 e 1;

λ : comprimento de onda da radiação CuK α ;

β : largura da meia altura (FWHM);

θ : ângulo de difração de Bragg.

4.4.2. Análise Morfológica

4.4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras sintetizadas foram recobertas com carbono e suas superfícies foram observadas com alta resolução e grande profundidade para análise detalhada de sua morfologia e obtenção de imagens com aparência tridimensional, no microscópio eletrônico de varredura, usando equipamento marca FEI e modelo INSPECT™ S50 através da incidência de feixe de elétrons de 10 a 15kV acoplado com detector de raios-X característicos (EDAX GENESIS).

4.4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para o preparo das amostras analisadas, a HAP_900 e HAP-Nb_900, foram pesadas (2mg), adicionadas a 2mL de etanol (álcool etílico absoluto P.A. – Synth) e colocadas no agitador magnético por 5h. Imediatamente após essa etapa, uma gota de cada amostra foi colocada em grade de cobre recoberta com filme de carbono (*holey carbono*). Após secagem, as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (Tecnai G2 – Spirit – FEI) com tensão de aceleração de 200kV.

4.4.2.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

As amostras tratadas a 110°C (HAP_110) e 900°C (HAP_900) foram pesadas (2mg), adicionadas a 2mL de etanol (álcool etílico absoluto P.A. – Synth) e colocadas no agitador magnético por 5h. Imediatamente após essa etapa, uma gota de cada amostra foi colocada em placa de mica. Após secagem, as amostras foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM). Todas as imagens foram obtidas com o equipamento XE- 70, Parker, modo não contato, velocidade 1.0Hz e número de pixels 512 x 512.

4.4.3. Análise Térmica

As análises térmicas das amostras sintetizadas foram obtidas utilizando um analisador térmico simultâneo TGA/DTA SDT Q 600, TA *Instruments*. O material foi submetido a

um aquecimento de 20°C por minuto em uma atmosfera de N₂ ultra puro, da temperatura ambiente até 1000°C, em cadinho de alumina.

4.4.4. Ensaios para Avaliação da Biocompatibilidade *In Vitro*

Os testes de citotoxicidade usando culturas de células são aceitos como primeiro passo na identificação de compostos ativos e/ou como testes de biosegurança (VISTICA *et al.*, 1991). A citotoxicidade dos biomateriais foi mensurada pelo ensaio de MTT, baseado em um método colorimétrico que avalia a capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis em converter o sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium, solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água (MOSMANN, 1983). Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade ótica pode ser determinada pelo espectrofotômetro a 595nm. O número de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazan produzidos.

Células de cultura primária de fibroblastos humanos na quarta passagem foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 1×10^4 células/poço. As populações celulares foram normalizadas com meio DMEM durante 24 horas, após esse período o meio foi trocado e as amostras foram colocadas nos respectivos poços.

Amostras de HAP_900, HAP-Nb_900, HAPc (comercial), na concentração de 1mg/mL foram utilizadas para este experimento. Como controle positivo do experimento, células e meio DMEM suplementado e, como controle negativo (CN), células e PBS 10x. O método de esterilização das amostras foi radiação ultravioleta por 40 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=3).

As células foram incubadas à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por 24 horas. Ao término deste período de incubação, o meio de cultura foi retirado e descartado e foi adicionado 210µL/poço de meio DMEM. Em seguida, foi acrescentado 170µL/poço de solução de MTT (Invitrogen) (5mg/mL) e a placa foi incubada em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas. As células foram observadas ao microscópio ótico (MO) para visualização dos cristais de formazan e estes foram solubilizados através da adição de 210µL/poço de uma solução de SDS 10%-HCl (ácido clorídrico

0,01M - 10% de dodecil sulfato de sódio em água) seguido de incubação em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Transferiu-se 100µL de cada poço para uma placa de 96 poços (fundo reto), em triplicata, e a densidade ótica foi mensurada no espectrofotômetro a 595nm. Durante o experimento, todos os passos envolvendo reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média ± EMP (erro médio padrão).

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SÍNTESE DO FOSFATO DE CÁLCIO E DO FOSFATO DE CÁLCIO COM ADIÇÃO DE NIÓBIO

5.1.1. Monitoramento e Controle do pH durante a síntese

A síntese foi iniciada com o pH de $13,0 \pm 0,5$, pela presença inicial de Ca(OH)_2 na mistura. Não houve alteração significativa do pH durante a mistura, porém ao final de uma hora quando foi interrompida a agitação magnética, pH $11,0 \pm 0,5$. Consequentemente, todo o procedimento de síntese se fez em pH alcalino (AFSHAR, 2003; LIOU; CHEN; LIU, 2003; MAVROPOULOS *et al.*, 2003; RAYNAUD; CHAMPION; BERNACHE-ASSOLANT, 2002).

5.1.2. Síntese do Material

Para a síntese do fosfato de cálcio modificado com nióbio apresentou-se inicialmente amarelada e após agitação magnética com etanol tornou-se branca leitosa. Depois de adicionadas as outras suspensões, a mistura permaneceu com a coloração esbranquiçada.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO FOSFATO DE CÁLCIO

5.2.1. Análise Química e Mineralógica

5.2.1.1. Espectroscopia de Raios-X por Dispersão em Energia (EDS)

A Figura 5.1 apresenta os espectros de EDS obtidos a partir das amostras HAP_110 (A) e HAP_900 (B). A análise dos espectros permitiu a constatação da formação de material à base de CaP pela presença de picos intensos de Ca e P (BET, 1995; DENG *et al.*, 2004). O Oxigênio também faz parte da composição dos CaP. O Mg, Na e o Si encontrados no espectro de EDS podem ser originados de contaminantes presentes nos dois reagentes, Ca(OH)_2 e $\text{Ca(H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ utilizados na síntese. E o oxigênio e o

carbono tem sua origem no recobrimento condutor utilizado para evitar o carregamento da superfície da amostra.

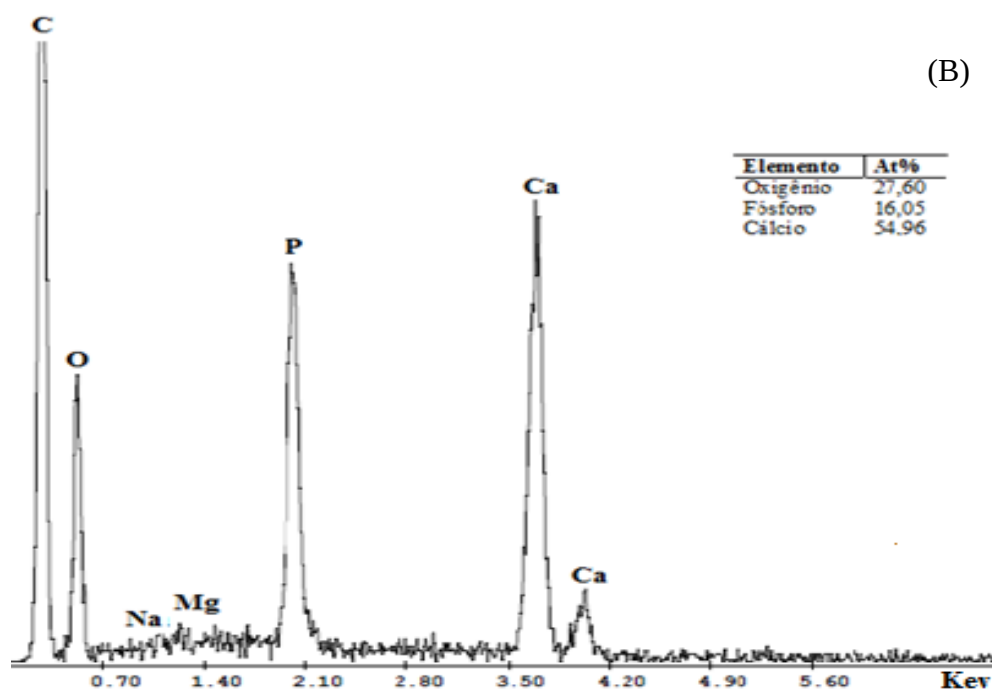
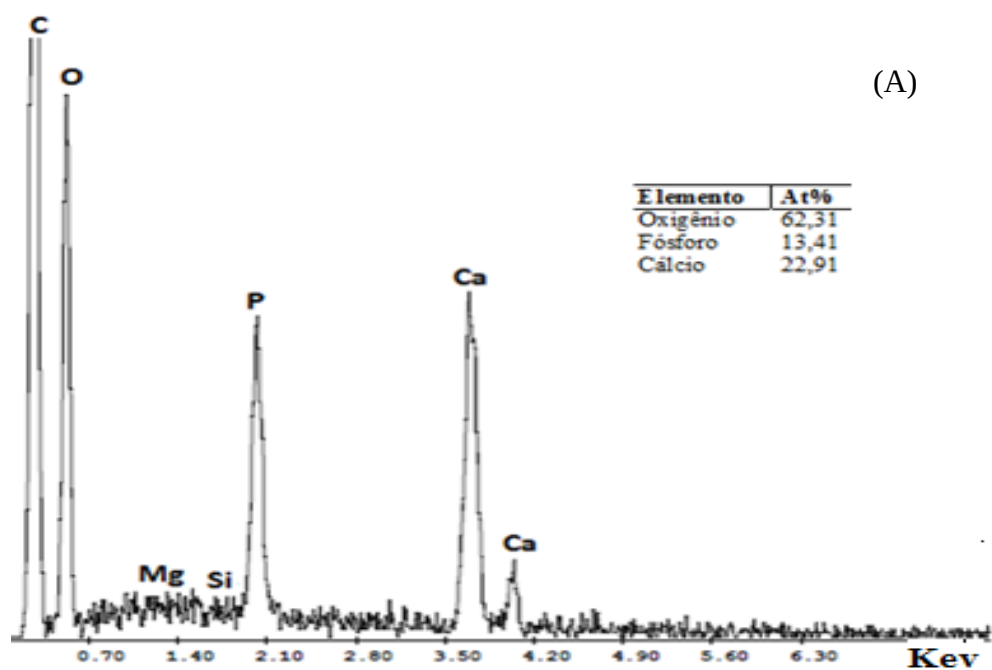


Figura 5.1 - Espectros de EDS representativos das amostras de HAP_110 (A) e HAP_900 (B), com picos dos principais constituintes, Ca, P.

Na Figura 5.2, pode ser visualizado o espectro de EDS da HAP Comercial (JHS), onde constatamos também a presença de picos mais intensos de Ca e P e de picos menos expressivos (traços) de Na, Mg e Si que está em semelhança com a HAP_110 e HAP_900 sintetizada. Novamente, o C tem origem no recobrimento condutor.

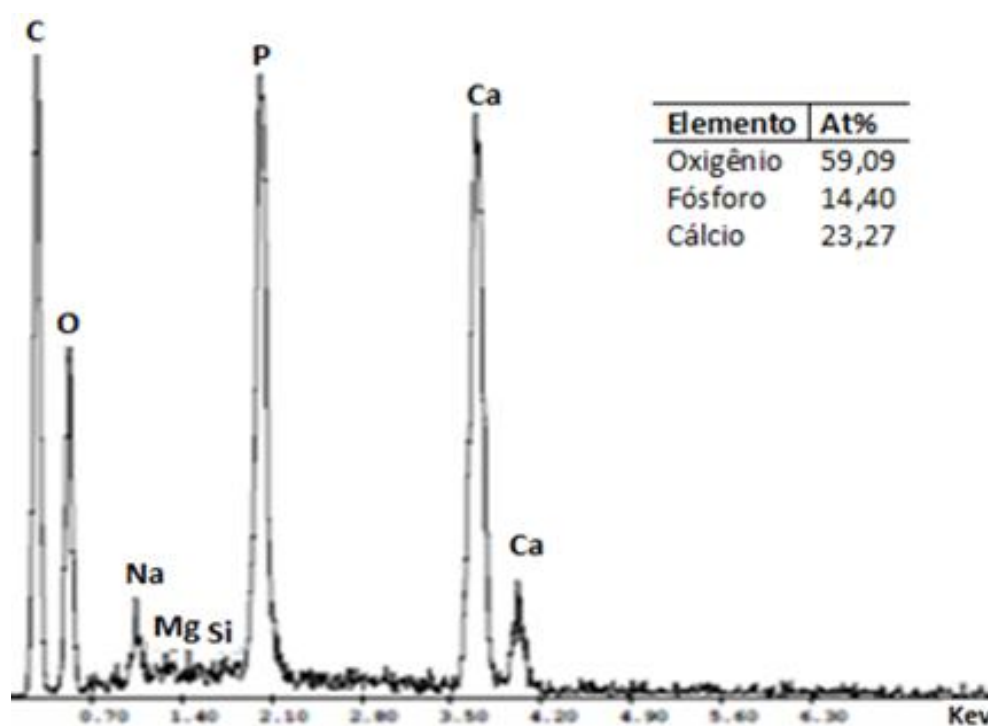


Figura 5.2 - Espectro de EDS representativo da HAP Comercial (JHS) com picos dos principais constituintes, Ca e P.

Na Tabela 5.1, são apresentadas análises de cinco áreas da amostra HAP_110 e amostra HAP_900 num aumento de 150X, onde temos a concentração em percentual atômico de cálcio e fósforo em cada região. Os resultados da análise quantitativa de elementos mostraram maior concentração em peso atômico de Ca em relação ao P. A proporção molar entre o Ca e P (Ca/P) presente nas amostras foi calculado através da razão entre os percentuais atômicos destes elementos. A média obtida calculada para a proporção molar Ca/P para ambas amostras foi 1,75. A razão Ca/P dos pós sintetizados é

compatível com a razão Ca/P da hidroxiapatita pura relatada na literatura que varia de 1,5 a 2, sendo considerada ideal a razão Ca/P 1,67 (LEGEROS, 1991).

Tabela 5.1 - Análise Quantitativa de Elementos Químicos

HAP_110		HAP_900	
150 X		150 X	
Ca	P	Ca	P
22,9	13,4	28,6	16,1
23,5	13,3	27,2	16,2
21,3	12,3	25,2	14,2
28,4	15,6	28,8	15,9
28,0	16,0	27,6	16,1
*Ca/P = 1,75±0,04		*Ca/P = 1,75±0,06	
*Média ± DP			

5.2.1.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 5.3 apresenta os espectros típicos de FTIR obtidos para as amostras de fosfato de cálcio em estudo obtidas através da técnica de refletância difusa. Observa-se a presença de bandas em 3571cm^{-1} e 638cm^{-1} correspondentes às vibrações de estiramento e ao movimento vibracional dos íons OH^- estruturais da HAP, respectivamente. A banda alargada na faixa compreendida entre 3500 a 3200cm^{-1} (estiramento, ν) e a banda centrada em 1640cm^{-1} (dobramento, δ) indicam a presença de moléculas de H_2O física e quimicamente adsorvidas no material (LIAO *et al.*, 1999; NETO, 2009), características das hidroxiapatitas produzidas através de rotas aquosas. O processo de sinterização promove a remoção desta água adsorvida resultando na redução da intensidade destas bandas, conforme verificado para a HAP_900 (Figura 5.3b), (GROSS, A. K.; GROSS, V.; BERNDT, 1998; RAMESH *et al.*, 2013).

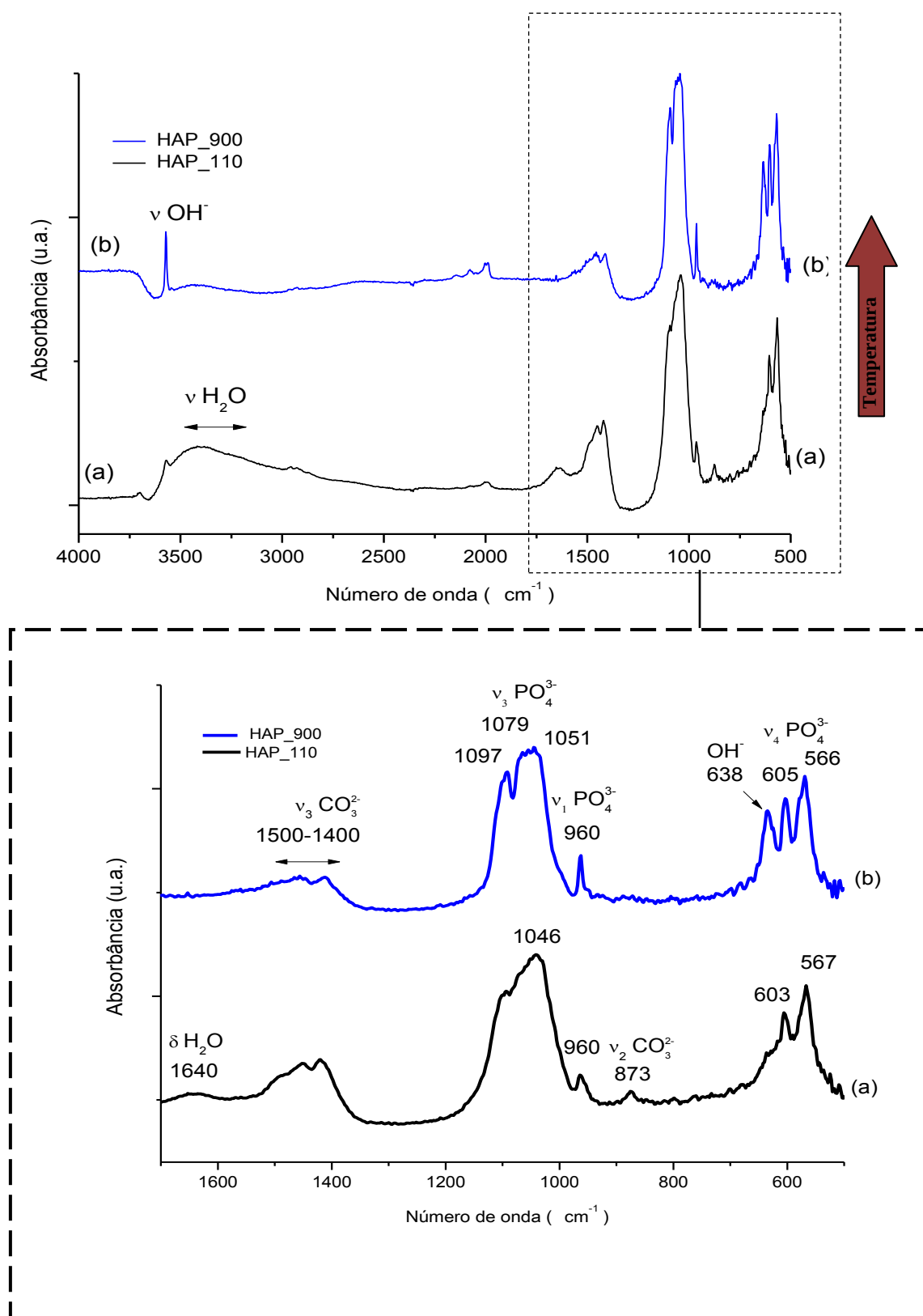


Figura 5.3 - Espectros de FTIR obtidos para a HAP_110 (a) e HAP_900 (b).

Os espectros de FTIR também revelam vibrações associadas aos grupos fosfato (PO_4^{3-}): $610\text{-}560\text{cm}^{-1}$ (ν_4), 960cm^{-1} (ν_1) e $1100\text{-}1000\text{cm}^{-1}$ (ν_3). Os números de onda identificados para os picos nestas regiões nas amostras avaliadas são característicos da forma hidroxiapatita (Figura 5.3). Verificam-se também bandas associadas aos carbonatos (CO_3^{2-}) na região compreendida na faixa de 1500 a 1400cm^{-1} (ν_3) e em 875cm^{-1} (ν_2), sendo as bandas correspondentes ao estiramento ν_3 atribuídas a íons carbonato de superfície (LEGEROS, 2002; LIAO *et al.*, 1999). Os íons carbonatos substituem parcialmente os sítios da PO_4^{3-} e OH^- resultando na hidroxiapatita carbonatada que corresponde ao material natural de ossos e dentes (LEGEROS, 2002; MOREIRA *et al.*, 2007).

Em espectros de FTIR obtidos através de transmissão direta (não apresentados), que trazem informações sobre o sólido estendido, as bandas dos carbonatos estão presentes apenas na amostra HAP_110, indicando que este material pode ser identificado como uma hidroxiapatita carbonatada, enquanto que a amostra HAP_900 apresenta carbonatação superficial, o que era indicado pela ausência da banda em 873cm^{-1} nos espectros obtidos por DRIFTS.

O perfil dos espectros de FTIR de CaP mostraram concordância com as bandas de vibração características da hidroxiapatita (conforme Tabela 3.2, descrita na seção 3.6.3) encontradas na literatura (SANTOS, 2005).

5.2.1.3. Difração de Raios-X (DRX)

Os padrões de difração da HAP_110 e HAP_900 estão apresentados nas Figura 5.4 (a) e (b) respectivamente. Nas curvas, baseados nos padrões do ICCD, identificam-se picos nas posições características da hidroxiapatita (Figura 5.4 c) sem a presença de fases secundárias, tais como α -TCP, β -TCP, CaO, dentre outras. No entanto, existe uma significativa diferença no grau de cristalinidade entre as amostras, identificada pelo alargamento dos picos na amostra tratada a 110°C (HAP_110), associada a uma menor cristalinidade deste material. Este aspecto pode ser atribuído à carbonatação da hidroxiapatita HAP_110. Nas hidroxiapatitas carbonatadas verifica-se uma razoável

concordância com os picos da fase cristalina identificada como hidroxiapatita, mas com um alargamento dos picos típico das fases amorfas devido à falta de periodicidade a longo alcance em decorrência das deformações introduzidas pela substituição de fosfato e/ou hidroxilas pelos carbonatos (MOREIRA *et al.*, 2007; RAMESH *et al.*, 2013).

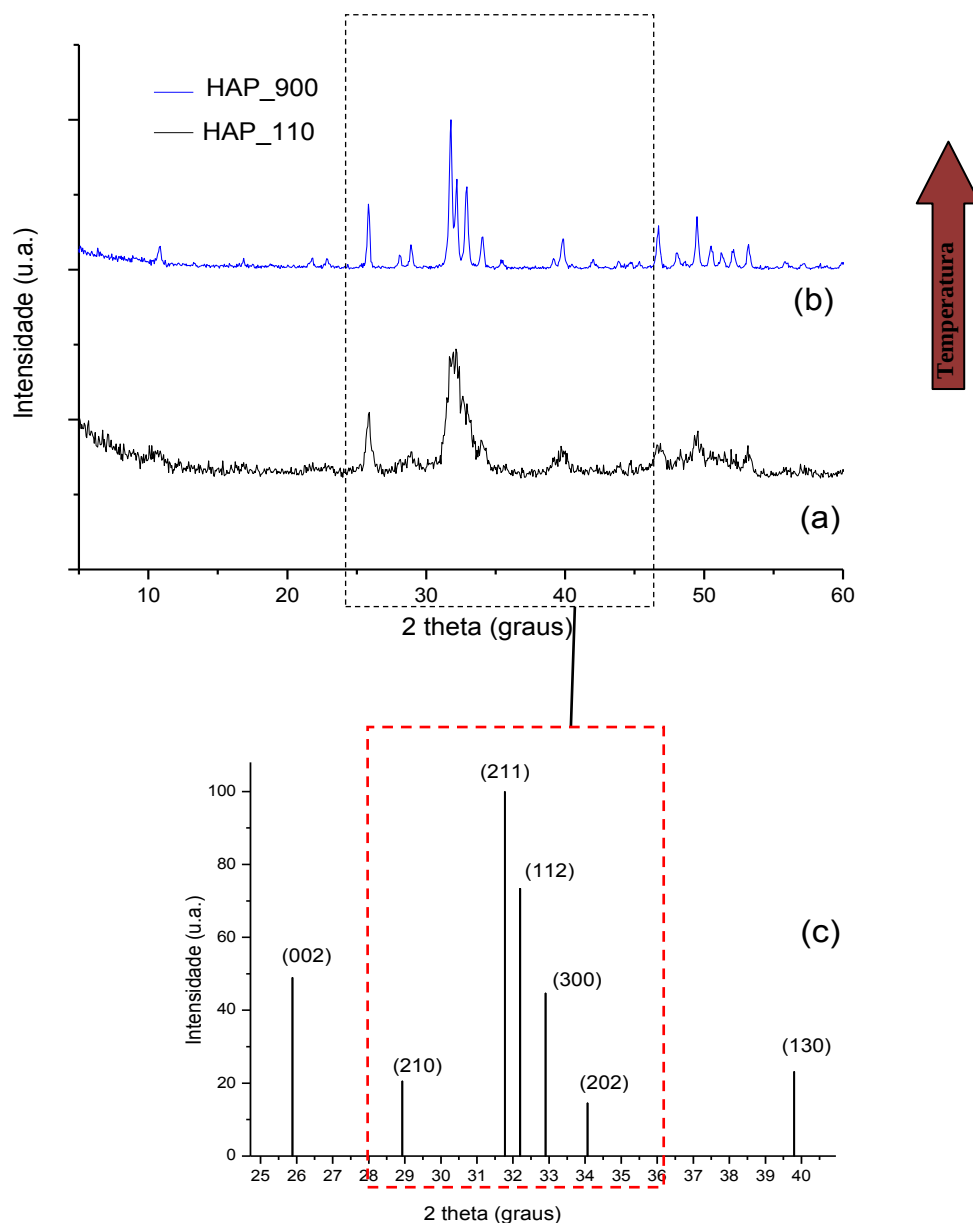


Figura 5.4 - Padrões de difração de raios-X obtidas para as amostras HAP_110 (a) e HAP_900 (b) e do padrão de referência da HAP (ICDD - 96-900-3549) com os principais picos (c).

5.2.2. Análise Morfológica

5.2.2.1. *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A Figura 5.5 apresenta imagens típicas das amostras de CaP em estudo. A morfologia observada é similar à verificada na literatura para fosfatos de cálcio com composição da hidroxiapatita (SANTOS, 2004). A Figura 5.5 (A), típica da amostra HAP_110, revela uma microestrutura porosa, com grânulos esferoidais com relativamente dimensões uniformes. Após a sinterização (HAP_900, Figura 5.5 B), observa-se um coalescimento dos grânulos com aparente densificação da estrutura.

As amostras sintetizadas foram comparadas com HAP comercial (JHS), no aumento de 10.000X (Figura 5.6), onde observa-se a semelhança da morfologia, especialmente com a amostra sinterizada a 900°C.

Em um aumento de 20.000X (Figura 5.7A e B), conseguimos identificar com melhor nitidez, as diferenças morfológicas após tratamento térmico a 110°C (Figura 5.7A) e 900°C (Figura 5.7B), onde se pode observar uma densificação das partículas esferoidais com o tratamento térmico (RANDOLPH; LARSON, 1986).

Na Figura 5.8, temos a imagem do MEV da HAP Comercial, onde observamos bastante semelhança nas imagens com as partículas aglomeradas e compactadas, no aumento de 20.000X.

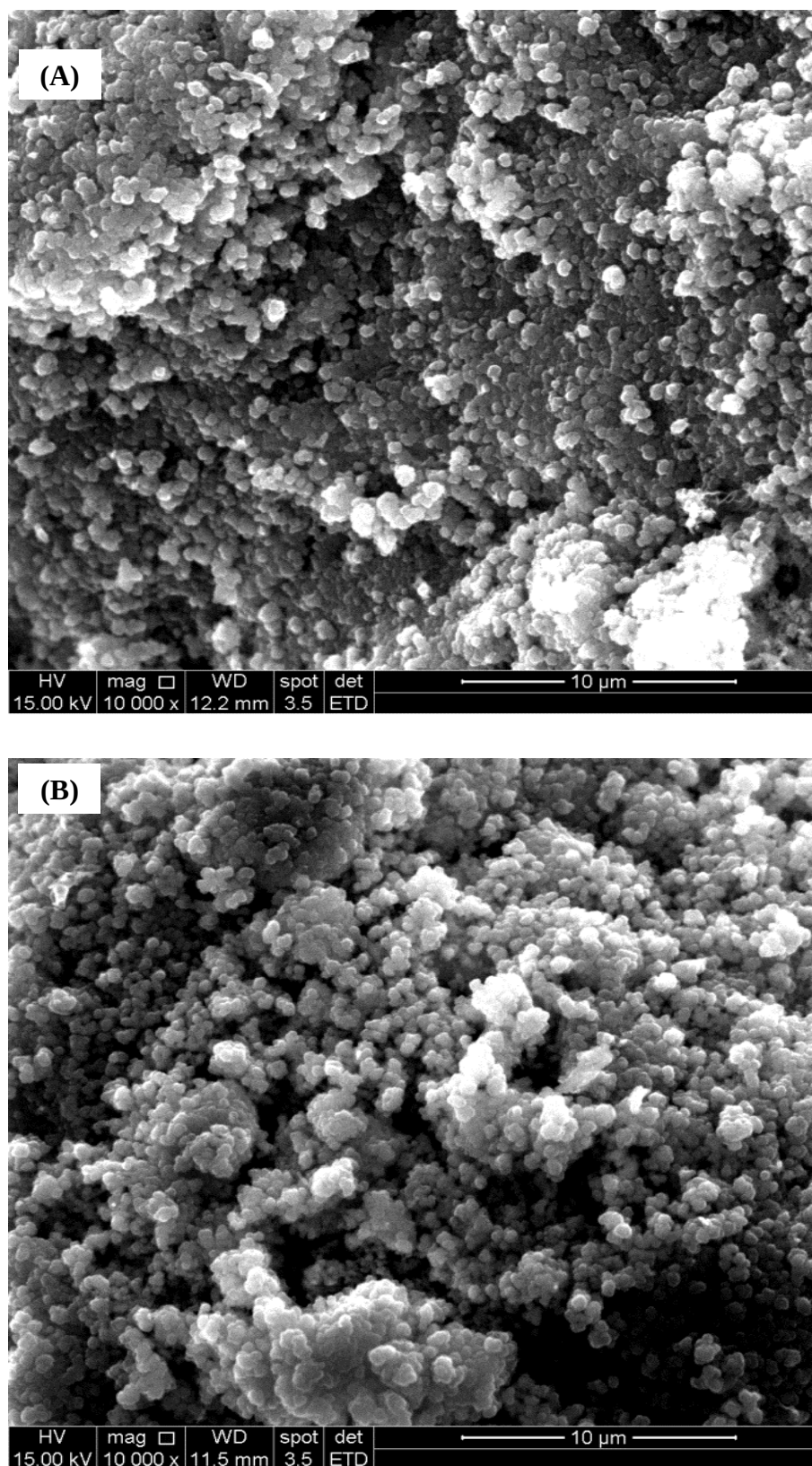


Figura 5.5 - Imagens de MEV da HAP_110 (A) e HAP_900 (B), após tratamento térmico 110 e 900°C, respectivamente, com aumento de 10.000X.

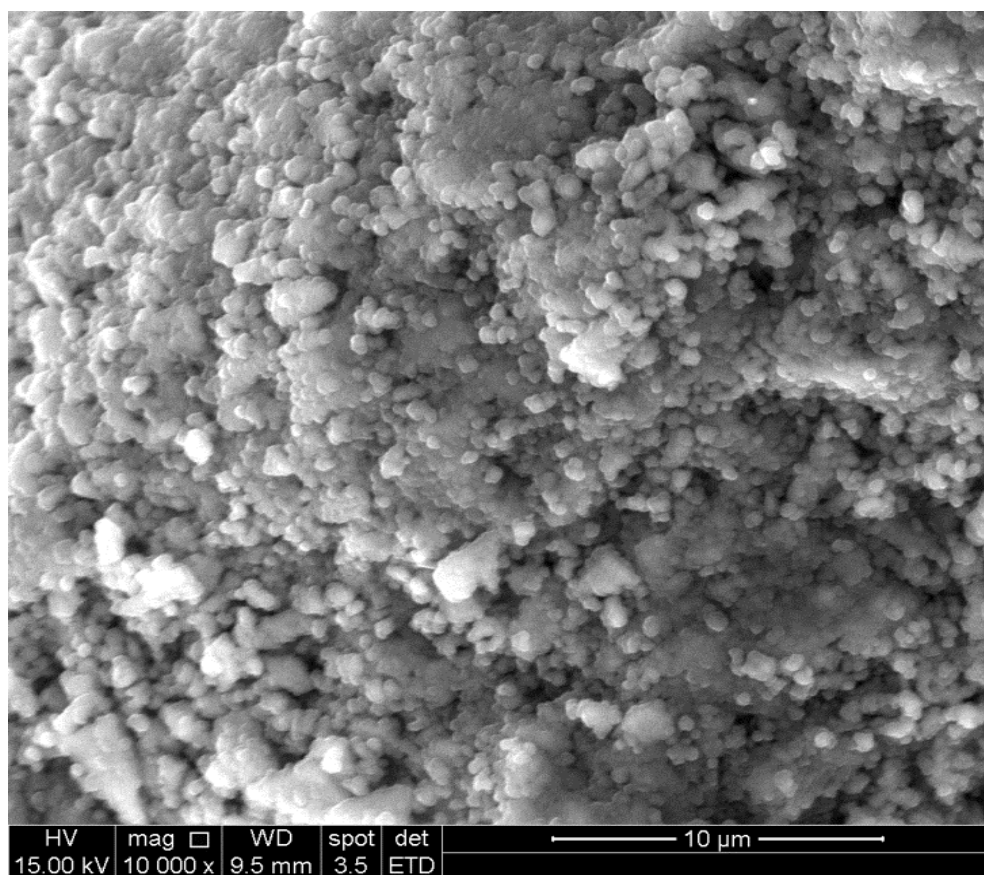


Figura 5.6 - Imagens de MEV da HAP Comercial (JHS), após tratamento térmico 900°C, com aumento de 10.000X.

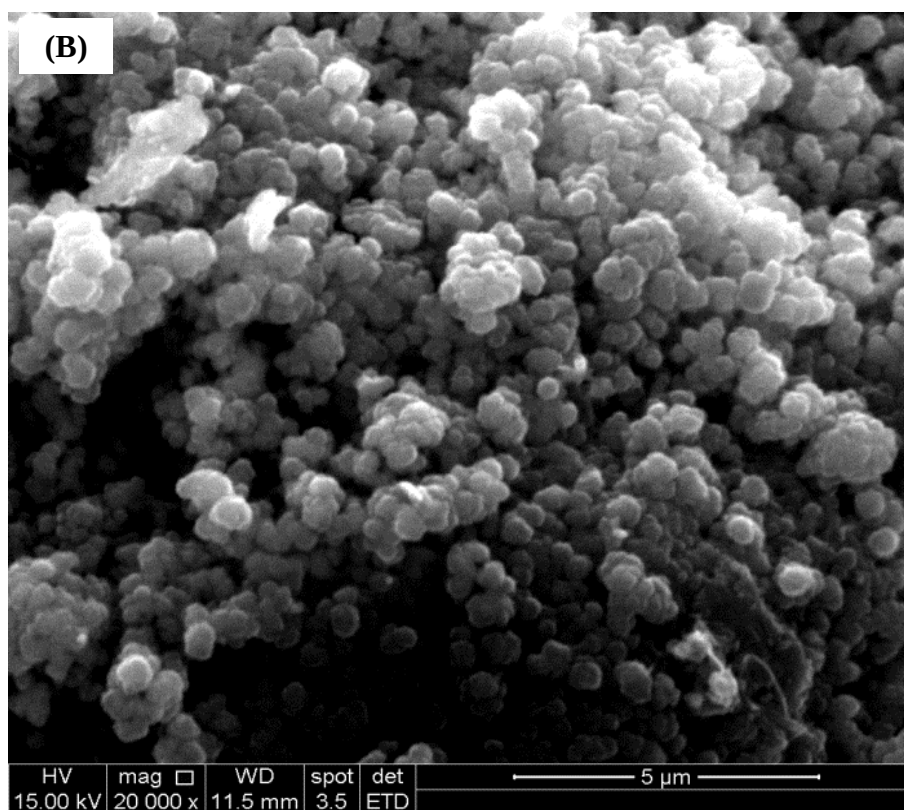
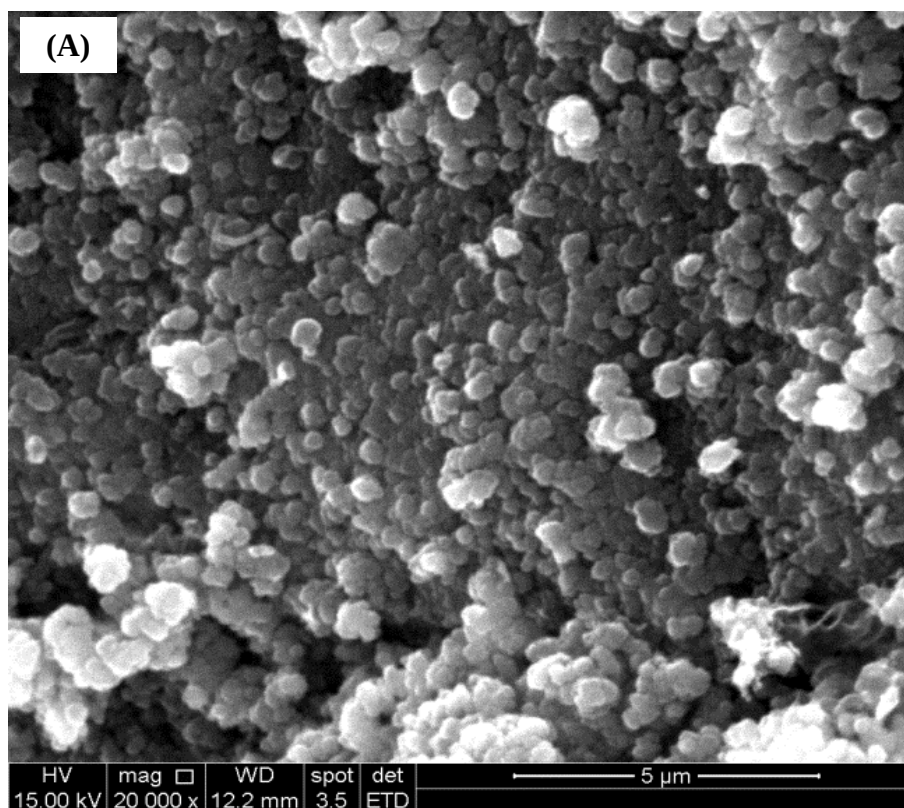


Figura 5.7 - Imagens de MEV da HAP_110 (A) e HAP_900 (B), após tratamento térmico a 110 e 900°C, respectivamente, com aumento de 20.000X.

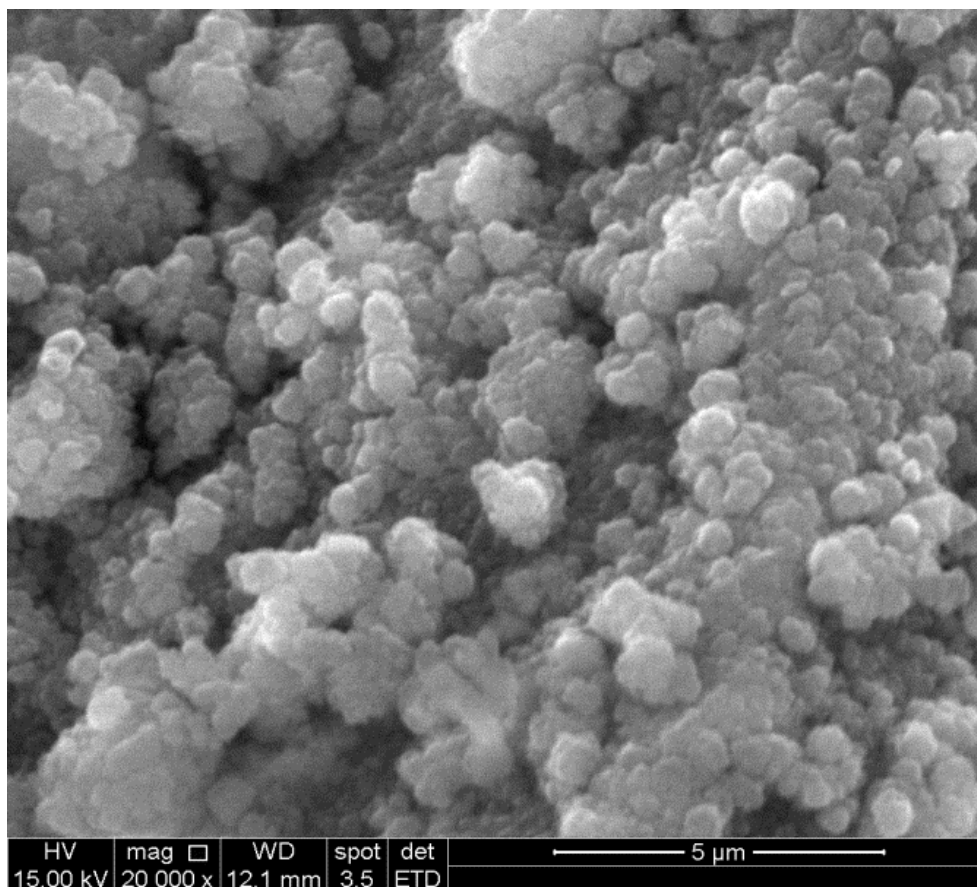


Figura 5.8 - Imagens de MEV da HAP Comercial, após tratamento térmico 900°C, com aumento de 20 000X.

5.2.2.2. *Microscopia de Força Atômica (AFM)*

5.2.2.2.1. *Análise Morfológica de Imagens 3D de AFM – Amostras de HAP_110 e HAP_900*

Na Figura 5.9A, temos imagem 3D da HAP_110, que foi tratada a 110°C. Nesta imagem conseguimos visualizar regiões bem delimitadas com aspecto de partículas menos compactadas.

Na Figura 5.9B, temos a imagem da HAP_900, sinterizada a 900°C. Nesta imagem visualizamos regiões mais compactadas, pois a sinterização promove um rearranjo das partículas e com isso um melhor e uma maior densificação da amostra, segundo literatura (BONADIO *et al.*, 2011), o que confirma a morfologia obtida pelo MEV no item anterior, após tratamento térmico.

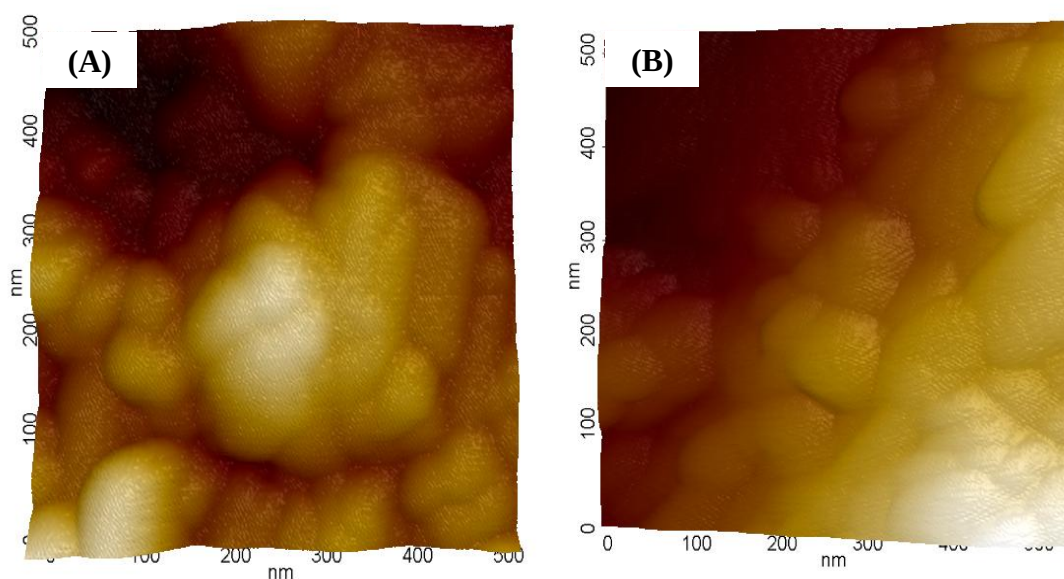


Figura 5.9 - Imagens 3D AFM, com HAP_110 em (A); e HAP_ 900 em (B).

5.2.2.2.2. Avaliação de dimensões de imagens de AFM – Amostra de HAP_110

A partir das imagens da HAP_110 foi realizada a medição do tamanho das partículas, constatando-se que houve equivalência nas medidas de comprimento e largura, como pode ser observado nas Figuras 5.10 a 5.13 a seguir.

Nas Figuras 5.10 e 5.11, são apresentadas as dimensões obtidas nos gráficos, as medições de grãos obtidas no gráfico na linha vermelha (A) e verde (B) para duas diferentes partículas em direções perpendiculares. Foram determinados tamanhos de 80 e 60nm, indicando um formato tendendo a esferoidal para as partículas que compõem a amostra.

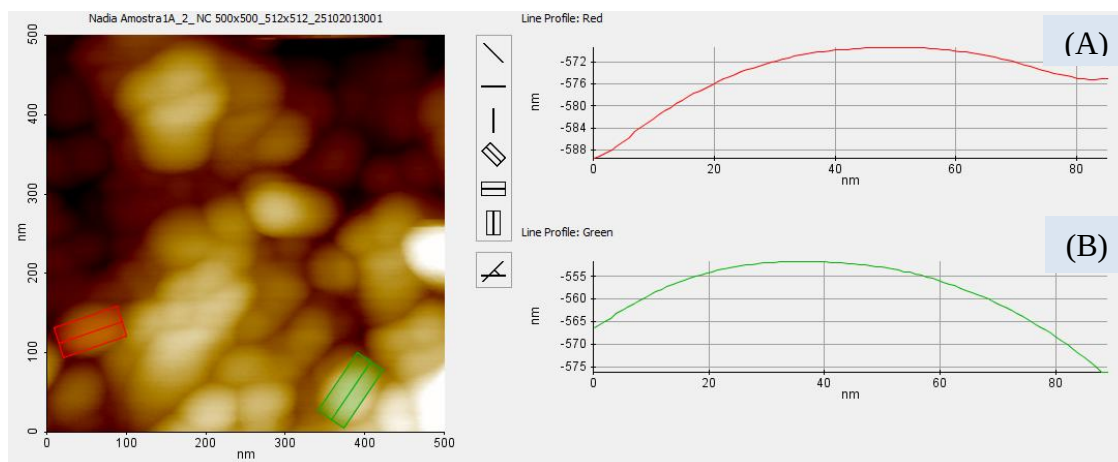


Figura 5.10 - AFM da Amostra HAP_110 – Medida de dimensão de partícula na direção 1.

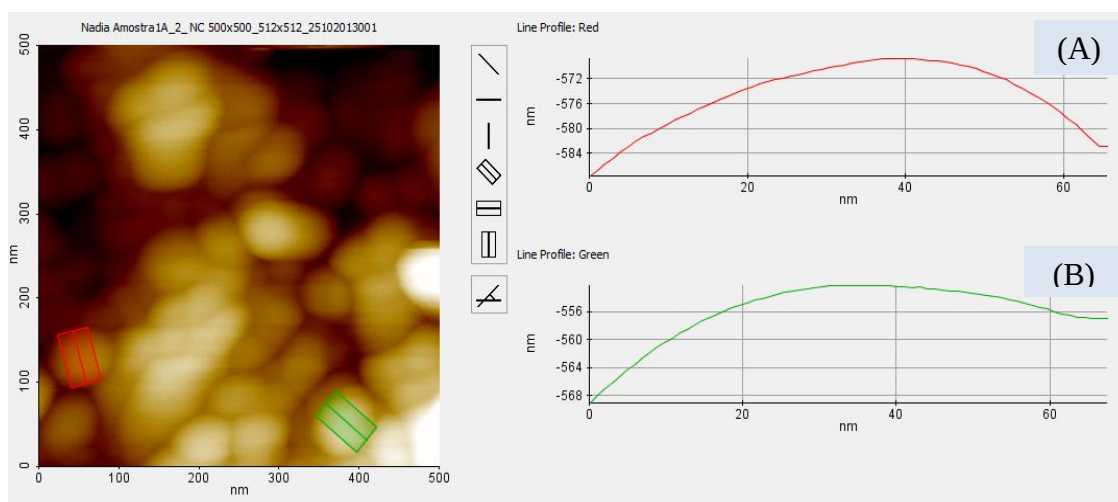


Figura 5.11 - AFM da Amostra HAP_110 – Medida de dimensão de partícula na direção 2.

De forma similar, as Figuras 5.12 e 5.13 apresentam medidas de duas outras partículas da amostra HAP_110 em direções perpendiculares. Os resultados indicam tamanhos da ordem de 60 a 50nm em ambas as direções, novamente indicando o formato esférico das partículas de HAP_110.

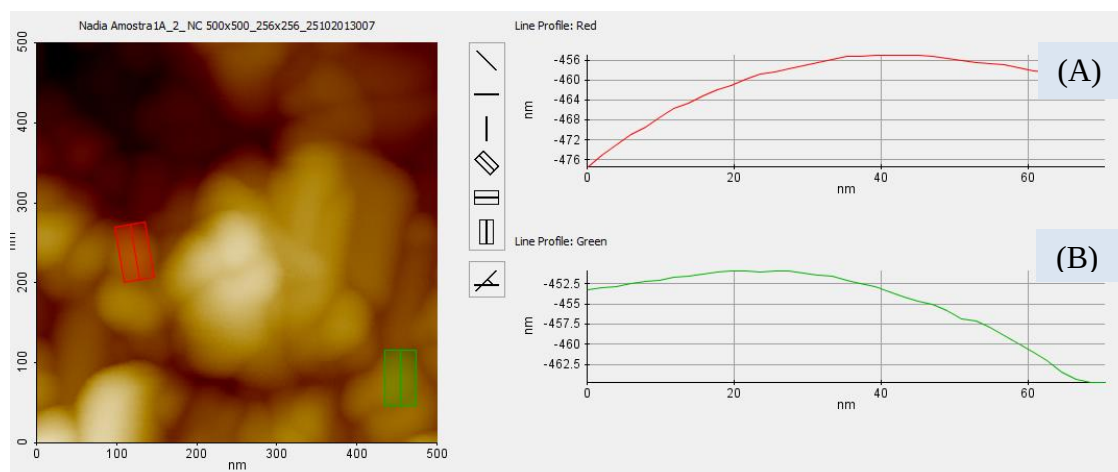


Figura 5.12 - AFM da Amostra HAP_110 – Medida de dimensão de partícula na direção 1.

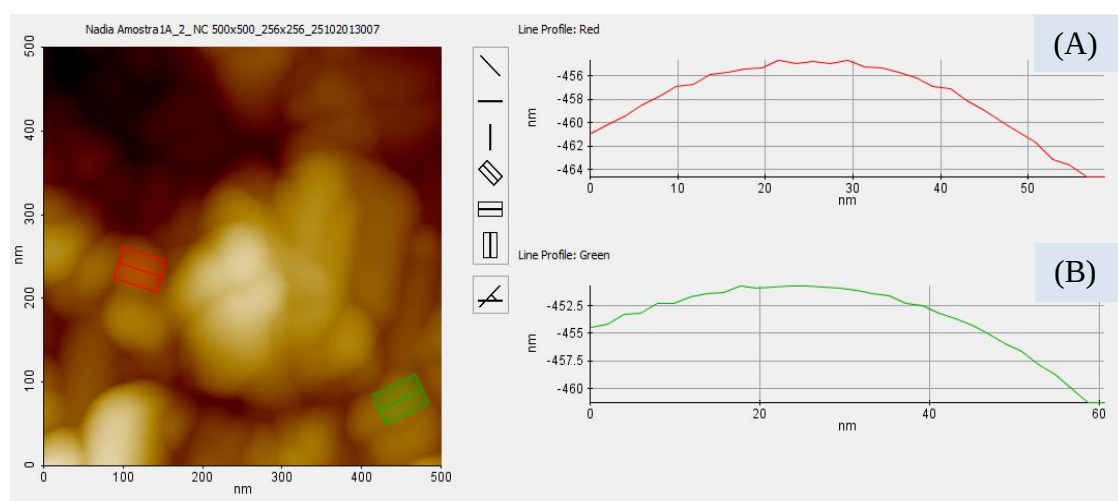


Figura 5.13 - AFM da Amostra HAP_110 – Medida de dimensão de partícula na direção 2.

5.2.2.2.3. Avaliação de dimensões de imagens de AFM – Amostra HAP_900

Foi possível observar que após a sinterização, os cristais apresentaram uma tendência a crescer preferencialmente para um formato mais alongado, apesar de detectarmos também a presença de formas esferoidais.

Presença de partículas no formato elipsóide, com tamanho de 160nm de comprimento por 80nm de largura, e também temos a presença de partículas no formato esferoidal de 80nm de diâmetro (Figuras 5.14 e 5.15).

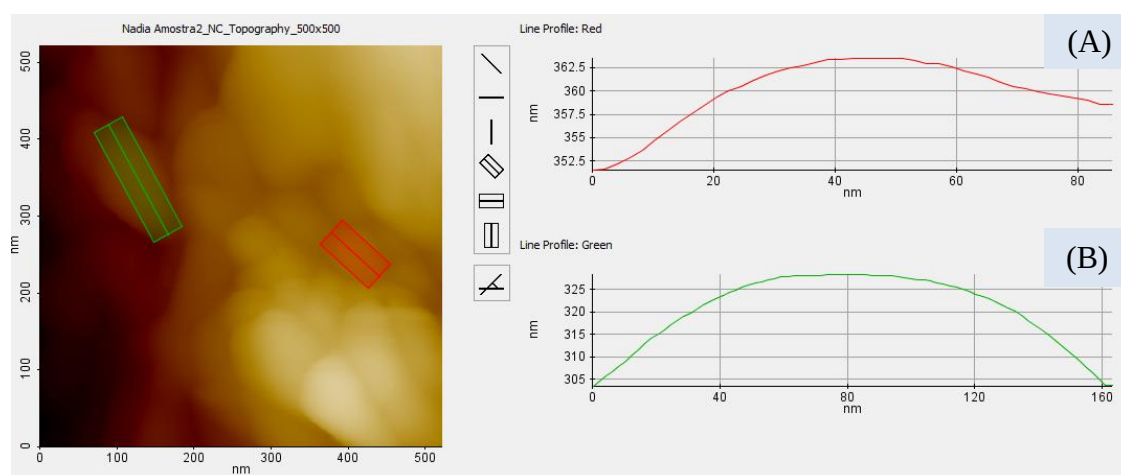


Figura 5.14 - AFM da Amostra HAP_900 – Medida de dimensão de partícula na direção 1.

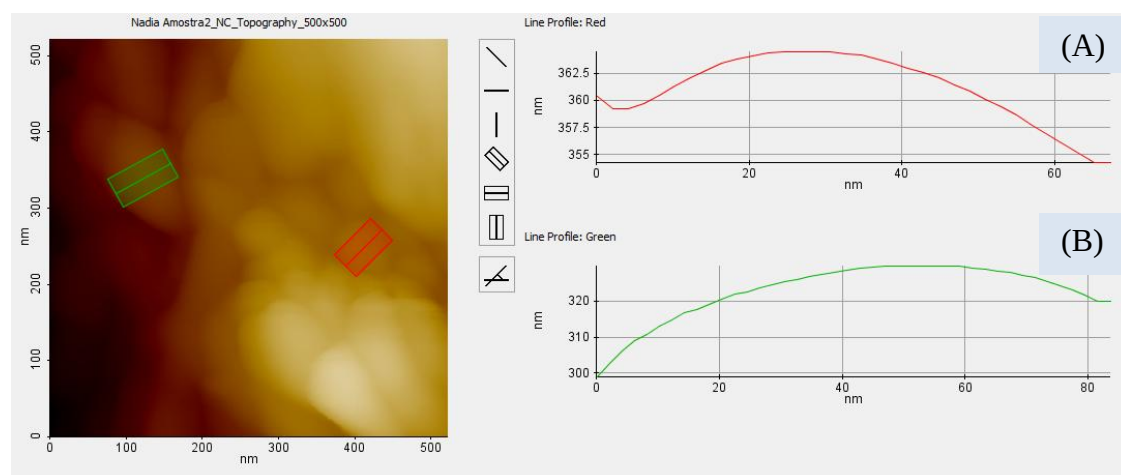


Figura 5.15 - AFM da Amostra HAP_900 – Medida de dimensão de partícula na direção 2.

5.2.3. Análise Térmica

A Figura 5.16 apresenta as curvas de TG (A) e DSC (B) obtidas a partir das amostras de HAP_110 (a) e HAP_900 (b) permitindo a comparação do comportamento térmico dos materiais.

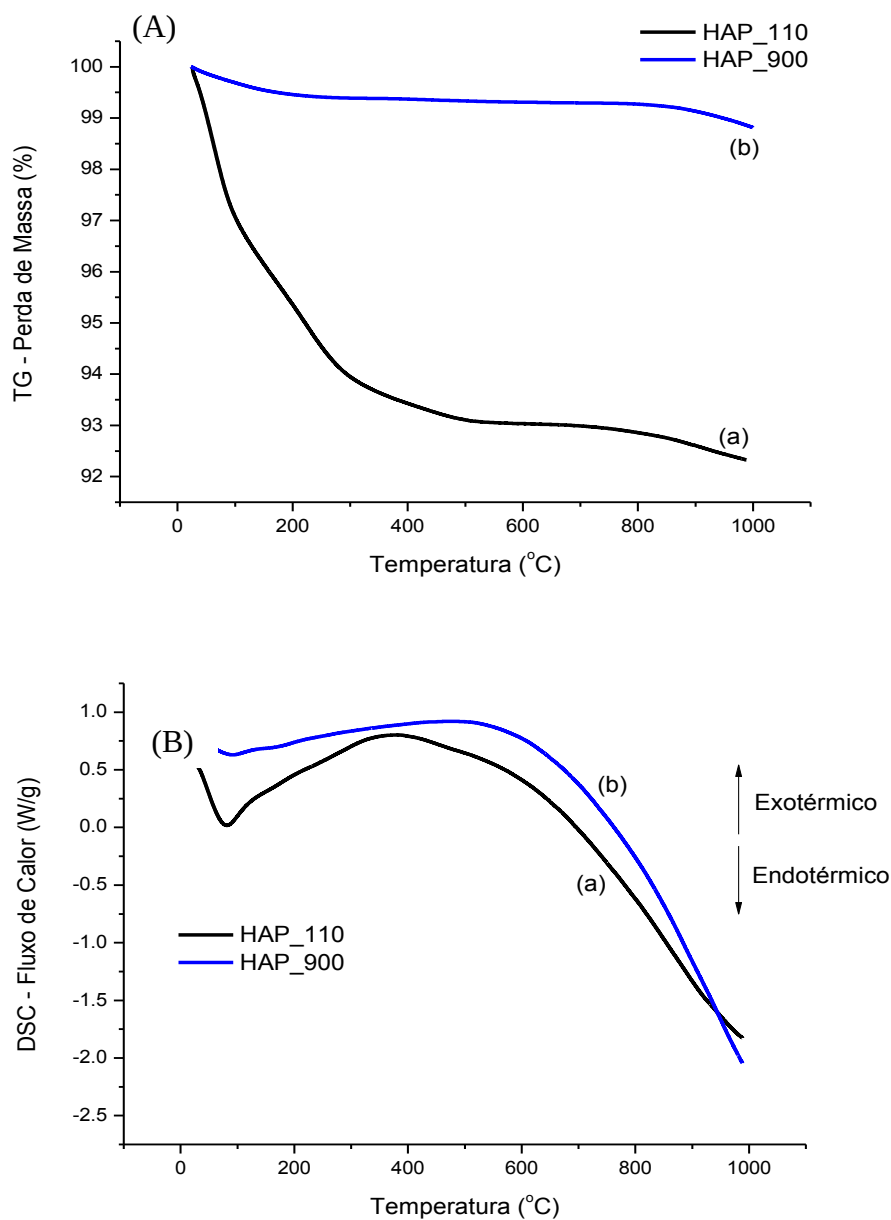


Figura 5.16 - TG – (A) Perda de Massa (%) e (B) Calorimetria exploratória diferencial. Comparação entre as amostras HAP_110 (a) e HAP_900 (b).

Analizando o gráfico da Figura 5.16 (A), observa-se uma elevada diferença na perda de massa percentual entre as amostras. O material HAP_900 se mostrou bastante estável dentro da faixa de temperatura de análise, onde a perda da massa total foi ínfima (0,7%) e concentrada em temperatura $< 200^{\circ}\text{C}$. Não se identificaram maiores alterações de massa nestas amostras em temperaturas mais elevadas, demonstrando que o material obtido é bastante estável, o que já era esperado em função da sinterização a 900°C . Fazendo uma análise na mesma Figura 5.16, a perda de massa total (até 900°C) correspondente à HAP_110 (a), foi bastante superior, da ordem de 7%.

As curvas TG e DSC estão representadas para cada amostra isoladamente na Figura 5.17. Na perda de massa para a HAP_110 curva (a), na Figura 5.17A, tem-se um grande declínio na curvatura na faixa de $20\text{-}200^{\circ}\text{C}$, indicando perda de massa da ordem de 4,6%, devido a eliminação da água fisicamente adsorvida (ANJUVAN, 2012). Em (b) na curva de DSC pode-se ver uma pequena banda endotérmica, temperatura de cerca de 150°C , associada a este evento térmico. Na faixa de temperatura entre 200 a 600°C na curva de DSC predomina o efeito exotérmico associado à cristalização da HAP provavelmente a partir das fases amorfas (ARAÚJO, 2006; GROSS; GROSS; BERNDT, 1998). Este resultado está de acordo com os resultados de DRX, que demonstram um maior grau de cristalinidade das amostras que foram tratadas termicamente a 900°C , em relação àquelas que só foram mantidas em estufa a 110°C , portanto abaixo da temperatura do pico exotérmico. É importante notar, no entanto, que nesta região também ocorre o evento endotérmico relativo à eliminação da água quimicamente adsorvida que permite esta re-estruturação da HAP, com perda de massa de 2,1%. Em temperaturas superiores continua o efeito de reorganização da HAP (exotérmico) com eliminação dos carbonatos (endotérmica) e da água estrutural (endotérmico).

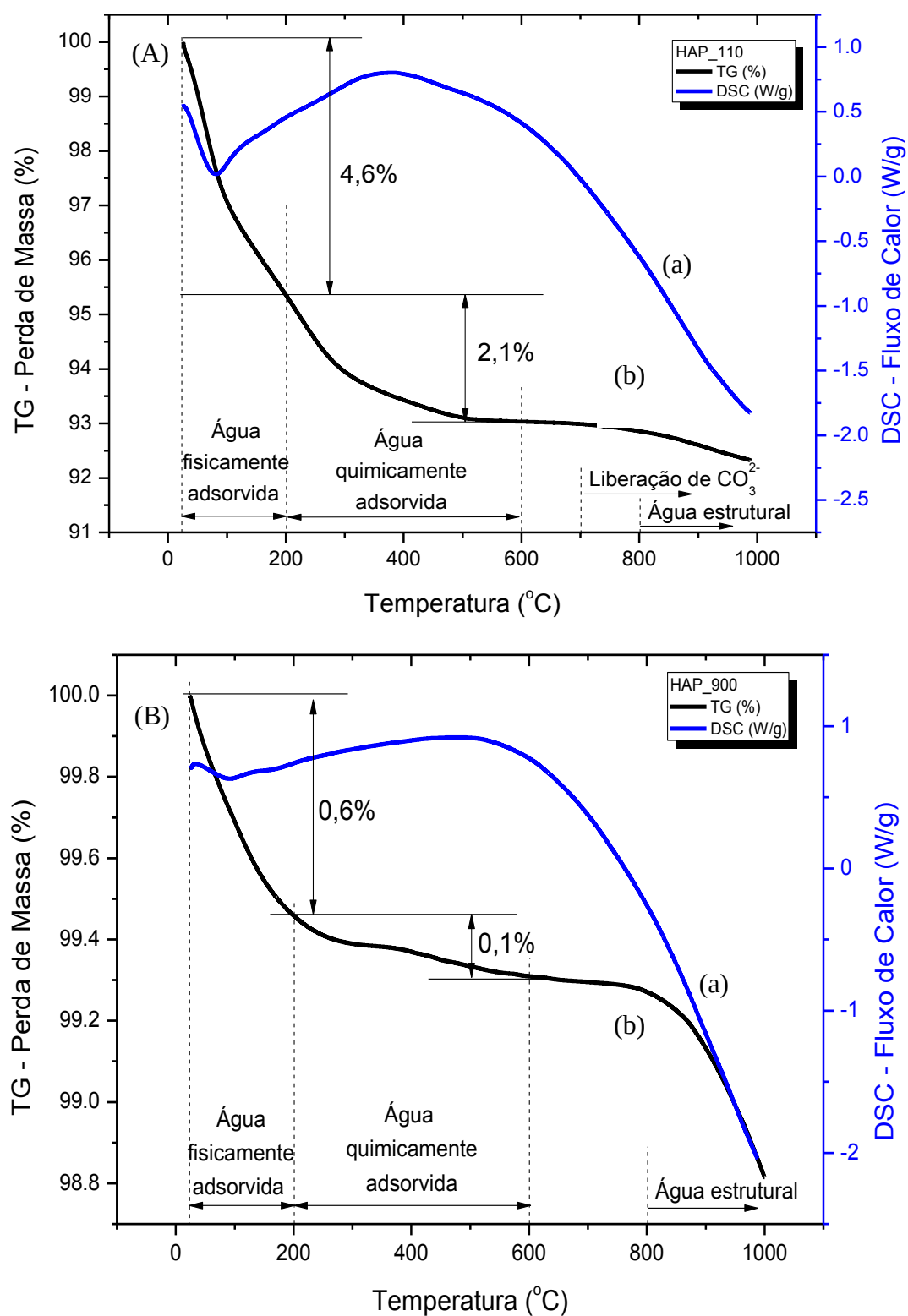


Figura 5.17 – Curvas de DSC (a) e TG (b) da HAP_110 (A) e HAP_900 (B).

Na Figura 5.17B temos a HAP_900, em (b) a curva TG, apresentando-se sem nenhuma inclinação, indicando estabilidade da HAP_900 em (b) e não houve variação de massa. Em (B), temos a curva DSC, inicialmente sem variação e a partir de 600°C, ocorrendo uma inclinação indicando processo endotérmico. No gráfico da derivada de perda de massa (Figura 5.17B), na temperatura de 150°C, houve perda de 0,6% de massa; e até 900°C houve perda total de massa de 0,7% ou seja, quase praticamente nenhuma variação de perda de massa total (VILLANI; MILLAÁN; GONZALEZ, 2012). Na Tabela 5.2, temos os eventos térmicos com suas temperaturas de transição e respectivas perdas de massa.

Tabela 5.2 - Evento Térmico e Temperatura de Transição

Material	Evento Térmico	Temperatura de Transição (°C)	Perda de Massa (%)
HAP_110	Endo: Perda de água fisicamente adsorvida	0-200	4,6
	Endo: Perda de água quimicamente adsorvida Exo: Rearranjo estrutural	200-600	2,1
	Endo: Liberação de CO_3^{2-} Exo: Rearranjo estrutural	700	
	Endo: Perda de água estrutural.	>800	
HAP_900	Endo: Perda de água fisicamente adsorvida	0-200	0,6
	Endo: Perda de água quimicamente adsorvida Exo: Rearranjo estrutural	200-600	0,1
	Endo: Perda de água estrutural	>800	

5.3. CARACTERIZAÇÃO DO FOSFATO DE CÁLCIO MODIFICADO COM NIÓBIO (CaP/Nb)

5.3.1. Análise Química e Mineralógica

5.3.1.1. Espectroscopia de Raios-X por Dispersão em Energia (EDS)

O espectro de EDS da HAP-Nb_110 (Figura 5.18) e da HAP-Nb_900 (Figura 5.19), apresentam-se conforme descrição das amostras de CaP já realizadas na seção 5.2.1.1, onde foi observada a presença de picos intensos de Ca, P e O, os principais constituintes dos fosfatos de cálcio.

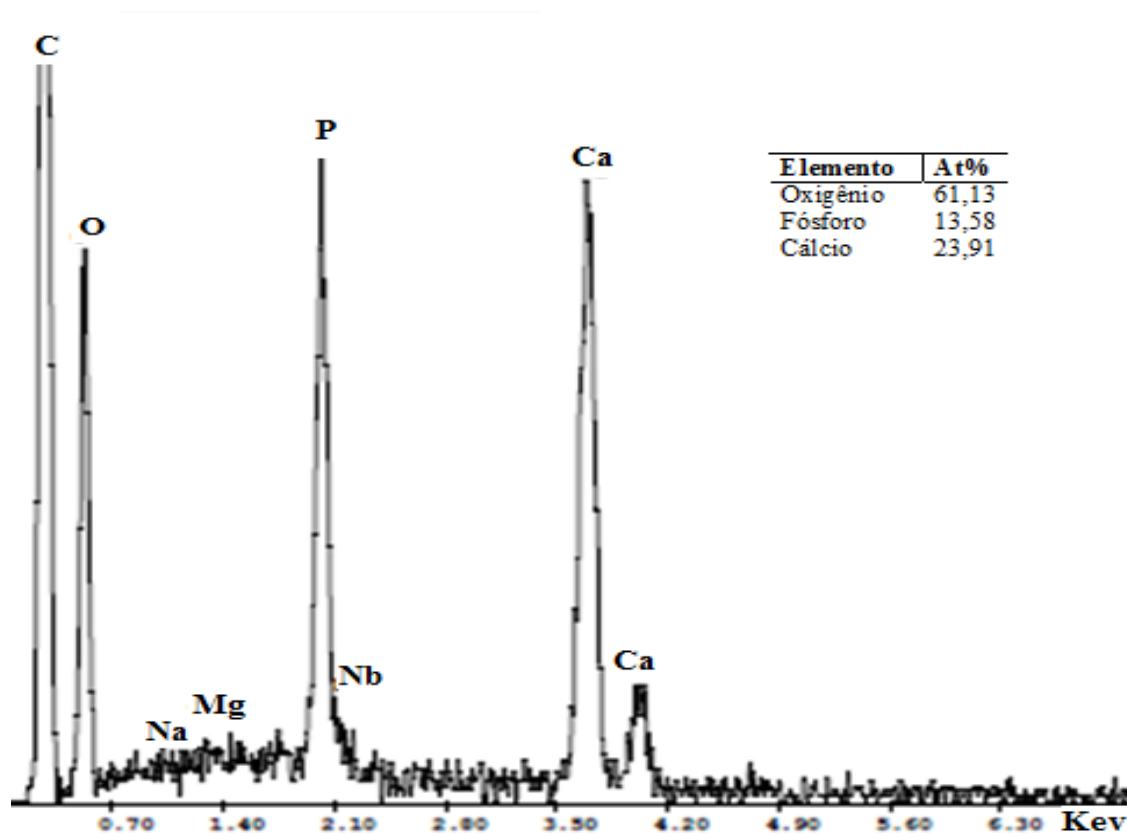


Figura 5.18 - Espectro de EDS da HAP-Nb_110.

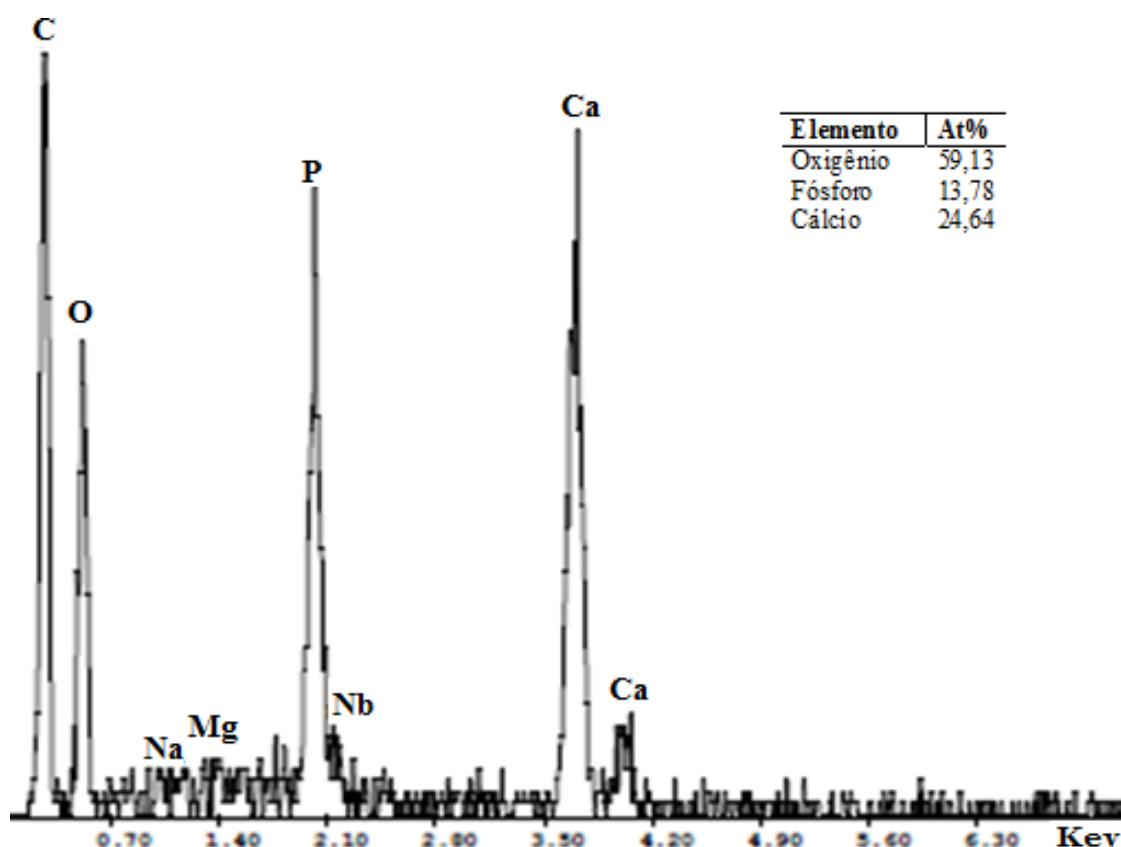


Figura 5.19 - Espectro de EDS da HAP-Nb_900.

As amostras de CaP/Nb mostraram também picos de baixa intensidade, onde foi detectado a presença do Nb, já que foi adicionado em pequena quantidade ao CaP.

Na Tabela 5.3 que apresenta a relação molar $(Ca+Nb)/P$, tem-se as análises de cinco áreas das amostras (HAP-Nb_110 e HAP-Nb_900) num aumento de 150X, onde é apresentada a concentração em percentual atômico de cálcio, nióbio e fósforo em cada região. Os resultados da análise semi-quantitativa de elementos mostraram maior concentração atômica de $(Ca + Nb)$ em relação ao P. A proporção entre o $(Ca + Nb)$ e P presente nas amostras foi calculado através da sua razão molar $(Ca + Nb)/P$. A média obtida para a proporção molar da amostra tratada a 110°C foi de 1,73 e da amostra sinterizada a 900°C foi de 1,77. A razão $Ca + Nb/P$ dos pós sintetizados podem ser comparados à razão Ca/P da hidroxiapatita pura relatada na literatura que varia de 1,5 a 2, sendo considerada ideal a razão $Ca/P = 1,67$ (LEGEROS, 1991).

Tabela 5.3 - Relação Molar (Ca+Nb)/P.

Amostra HAP-Nb (110°C)		Amostra HAP- Nb (900°C)	
150 X		150 X	
Ca + Nb	P	Ca + Nb	P
23,91 + 0,55	13,58	24,64 + 1,05	13,78
22,23 + 0,69	13,66	26,57 + 0,94	15,28
22,03 + 0,56	13,46	25,79 + 0,88	15,82
25,05 + 0,66	14,42	25,40 + 1,24	15,21
25,65 + 0,26	15,27	20,15 + 0,73	11,83
23,77 + 0,54 *	14,07 *	24,51 + 0,98 *	14,38 *
Ca+Nb/P = 1,73		Ca+Nb/P = 1,77	

*Desvio Padrão

A amostra de HAP-Nb_900 foi analisada através do mapeamento da distribuição de elementos químicos, onde se pode observar que todos os elementos químicos e o agente modificador apresentaram-se homogeneamente distribuídos na amostra e não sendo identificada a presença de aglomerados (Figura 5.20).

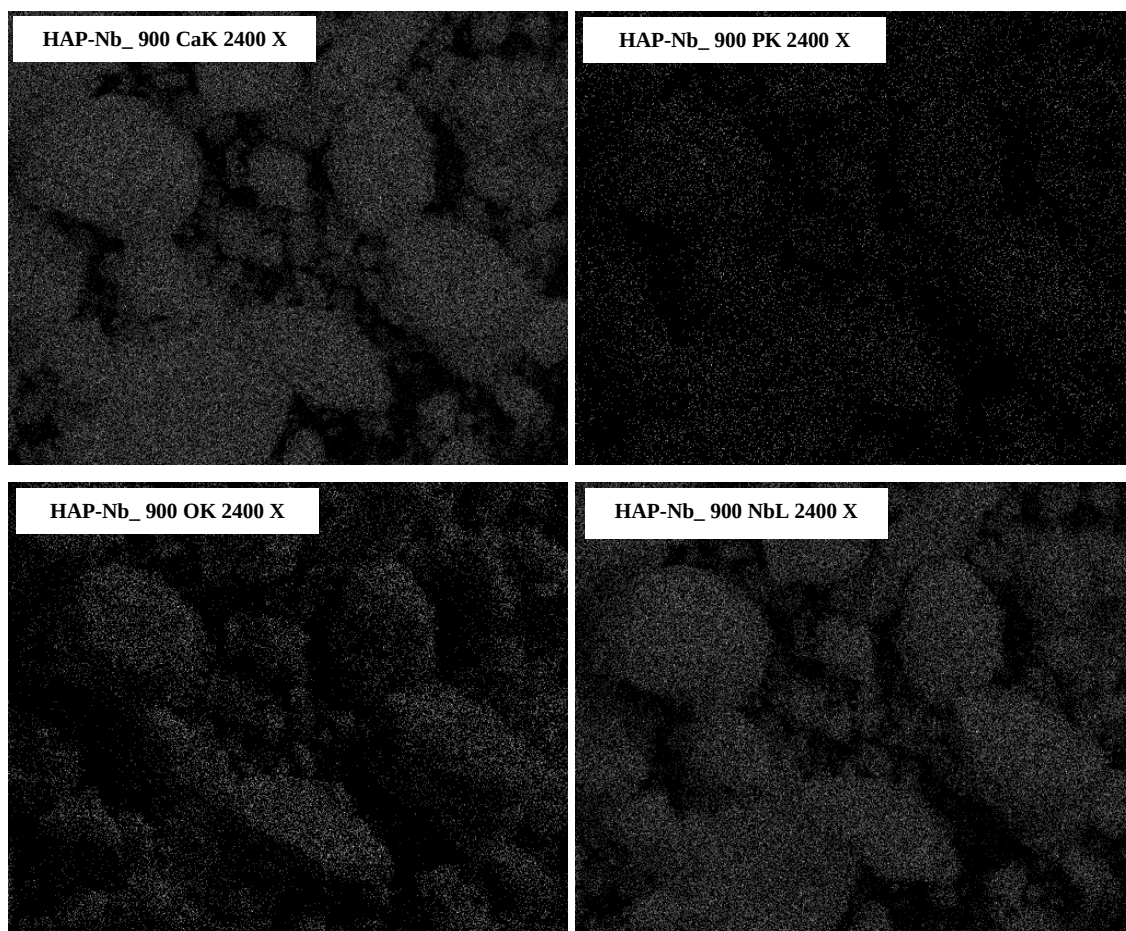


Figura 5.20 - Mapas composicionais dos elementos Ca, P, O, Nb da amostra de HAP-Nb_900.

5.3.1.2. *Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)*

Na Figura 5.21, temos os espectros das amostras tratadas termicamente a 110°C (a) , (HAP-Nb_110) e 900°C (b), (HAP-Nb_900). O espectro de FTIR das amostras apresentou as bandas características de HAP, correspondendo aos grupos funcionais fosfatos, hidroxilas e carbonatos substitutos na estrutura da HAP. Não foram identificadas bandas características associadas ao CaP/Nb. Na Figura 5.21, amostras tratadas termicamente a 110°C (HAP-Nb_110) e 900°C (HAP-Nb_900). Observa-se que na curva (b), as bandas ficaram mais intensas e melhor definidas, sugerindo aumento na ordem estrutural e da cristalinidade do material, após o tratamento térmico.

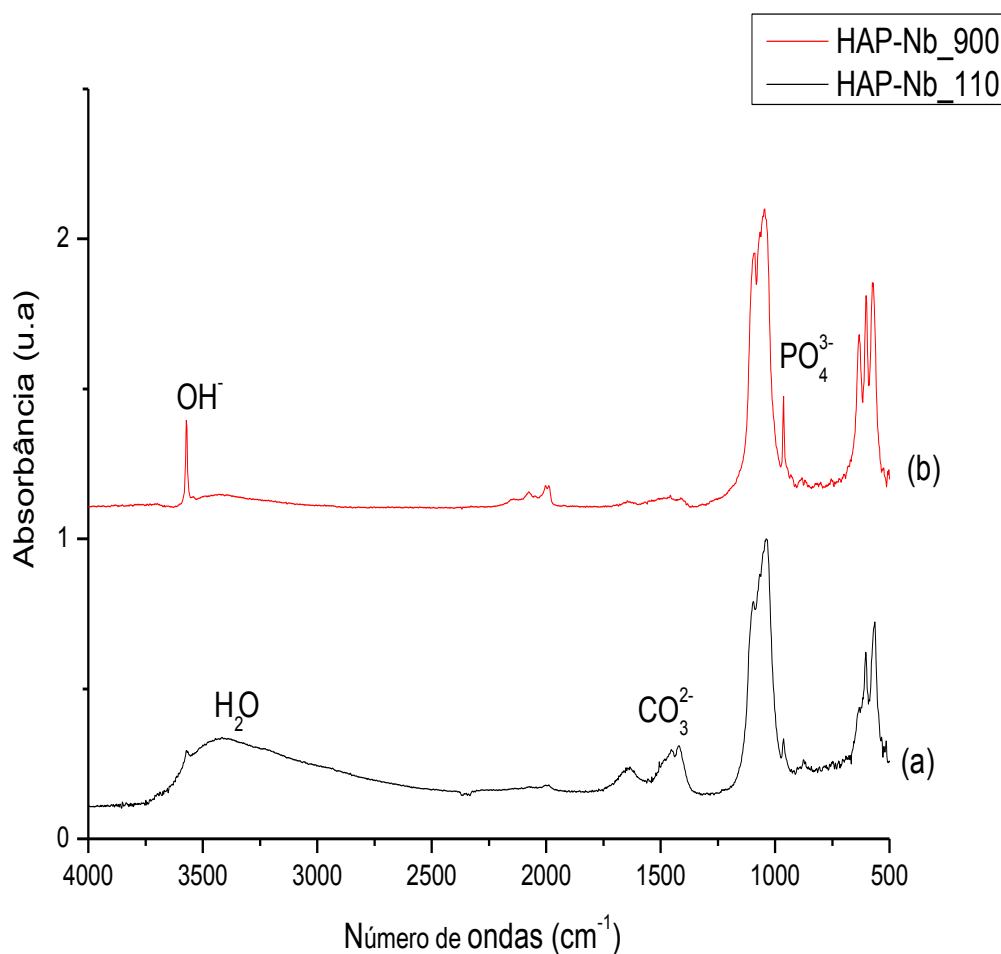


Figura 5.21 - Espectro de FTIR das amostras HAP- Nb tratadas termicamente a 110°C (a) e 900°C (b).

Na Figura 5.22, visualizamos os espectros de FTIR da HAP_110 (a), sem adição de Nb, e da HAP-Nb_110 (b) tratadas termicamente a 110°C, onde os picos relativos as regiões do carbonato e da água apresentam-se na HAP_110 sem adição de Nb bem mais pronunciados.

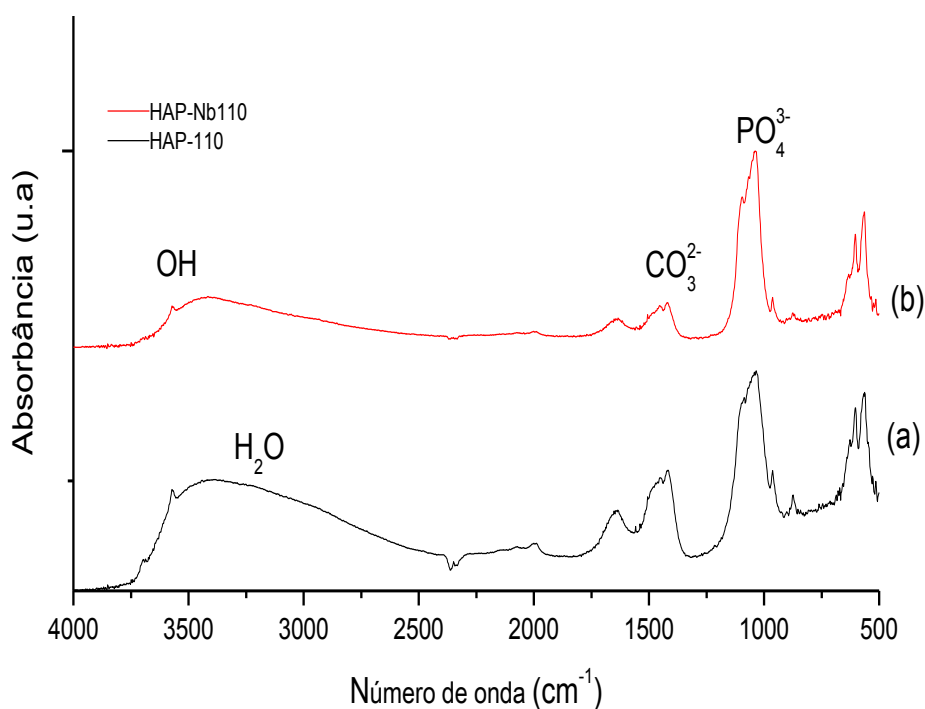


Figura 5.22 - Espectro de FTIR das amostras de HAP_110 (a) e HAP-Nb_110 (b).

Na Figura 5.23, temos os espectros de FTIR das amostras de HAP_900 (a) e HAP-Nb_900 (b), onde podemos observar picos mais pronunciados na região relativa ao carbonato e da região relativa à água correspondente a amostra de HAP_900.

Os materiais CaP adicionados com Nb podem ser analisados e comparados a materiais CaP sem a presença do Nb. As bandas em aproximadamente 840 e 680cm^{-1} , que podem ser associadas com óxido de nióbio (OLIVEIRA *et al.*, 2009) não foram detectadas. Os espectros de FTIR entre estas amostras quando comparados se mostraram bastantes similares, pois não houve presença de novas bandas adsorvidas relativas, mas apenas mais pronunciadas, o que pode indicar que a baixa concentração de Nb presente nas amostras não foi suficiente para provocar modificações significativas nos espectros.

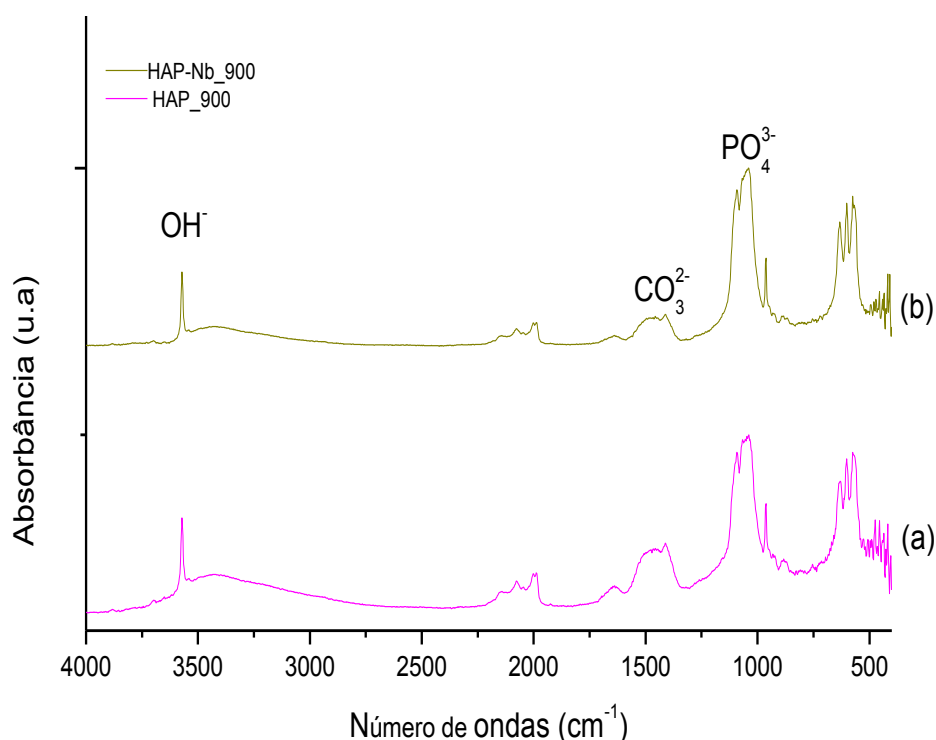


Figura 5.23 - Espectro de FTIR das amostras de HAP_900 (a) e HAP-Nb_900 (b).

5.3.1.3. Difração de Raios-X (DRX)

Através das análises de DRX foi possível identificar as fases características da hidroxiapatita em todas as amostras analisadas de HAP e HAP-Nb (Figura 5.24) independente da temperatura de tratamento térmico. Os picos correspondentes aos planos que definem a HAP (ICDD – 96-900-3549) foram mais evidentes nos difratogramas c e d das amostras de HAP tratadas a 900°C, o que era de se esperar, pois o tratamento térmico deve aumentar a cristalinidade das amostras.

Diante dos resultados, segundo TAMAI, NAKAOBA e TSUCHIYA (2007) supõe-se que o Nb deve ter sido incorporado na estrutura da HAP, já que não foi observada a formação de novos picos detectáveis pelo método de caracterização usado (Figura 5.25), mas foram observadas mudanças perceptíveis na altura e formato de alguns picos, que está representado nas Figuras 5.26, 5.27 e 5.28.

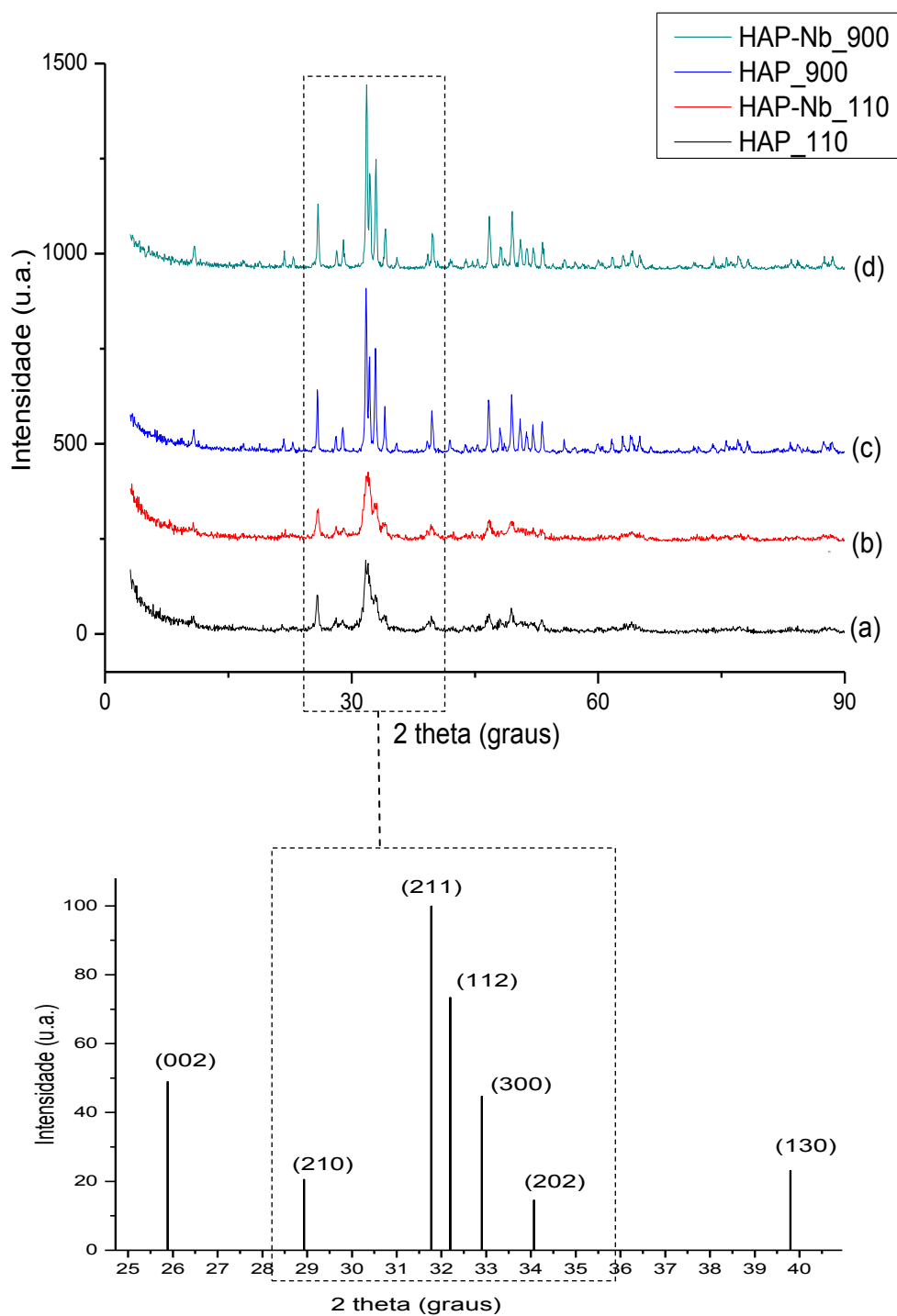


Figura 5.24 - Difratomogramas da HAP (a) e HAP-Nb (b) com tratamento térmico 110°C e em (c) HAP e (d) HAP-Nb com tratamento térmico a 900°C, comparado com o padrão de referência da HAP (ICDD – 96-900-3549) com os principais picos.

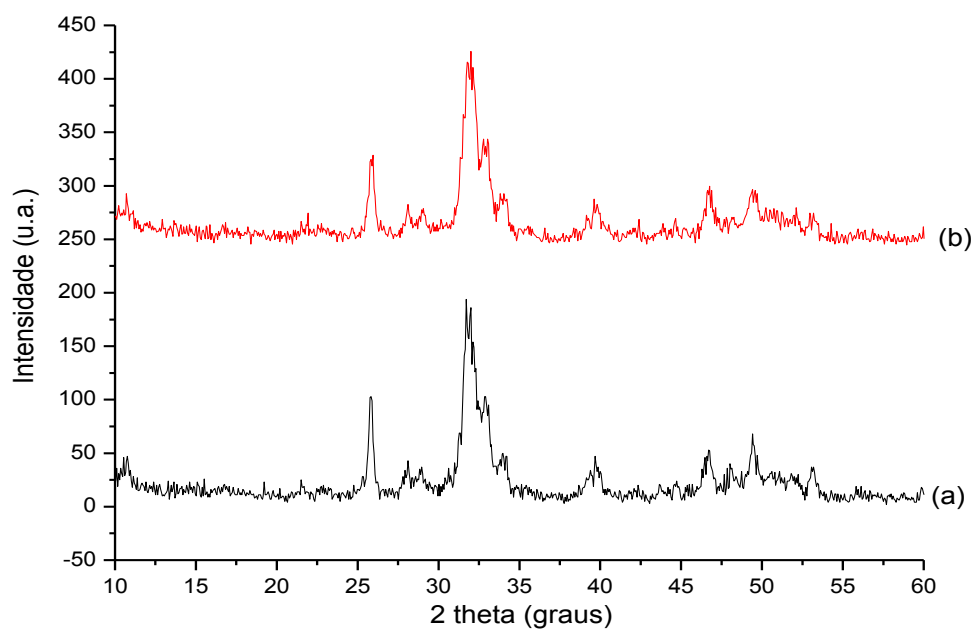


Figura 5.25 - Difrátogramas da HAP_110 (a) e HAP-Nb_110 (b) com tratamento térmico 110°C.

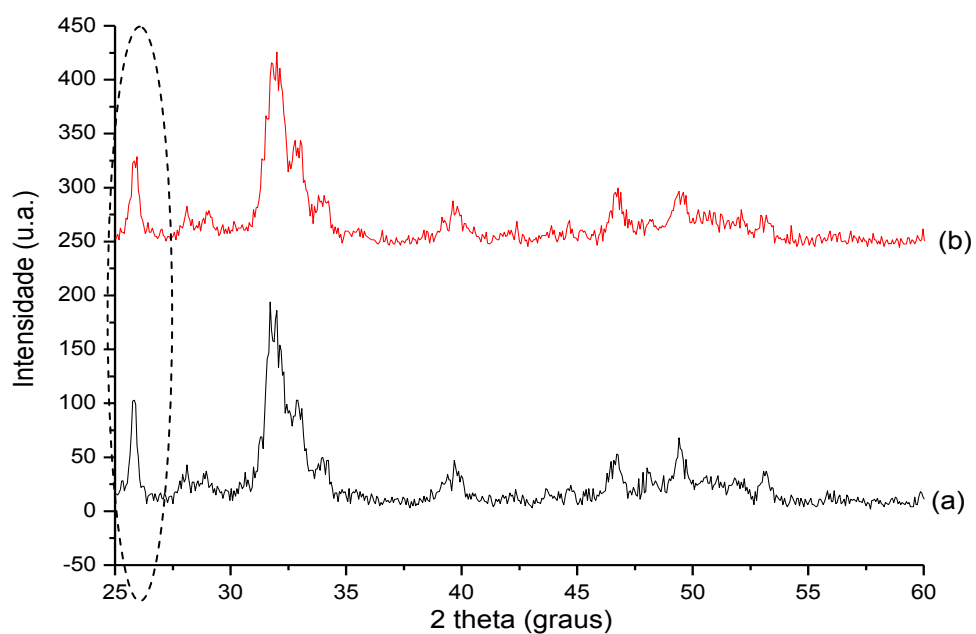


Figura 5.26 - Difrátogramas da HAP_110 (a) e HAP-Nb_110 (b) com tratamento térmico 110°C.

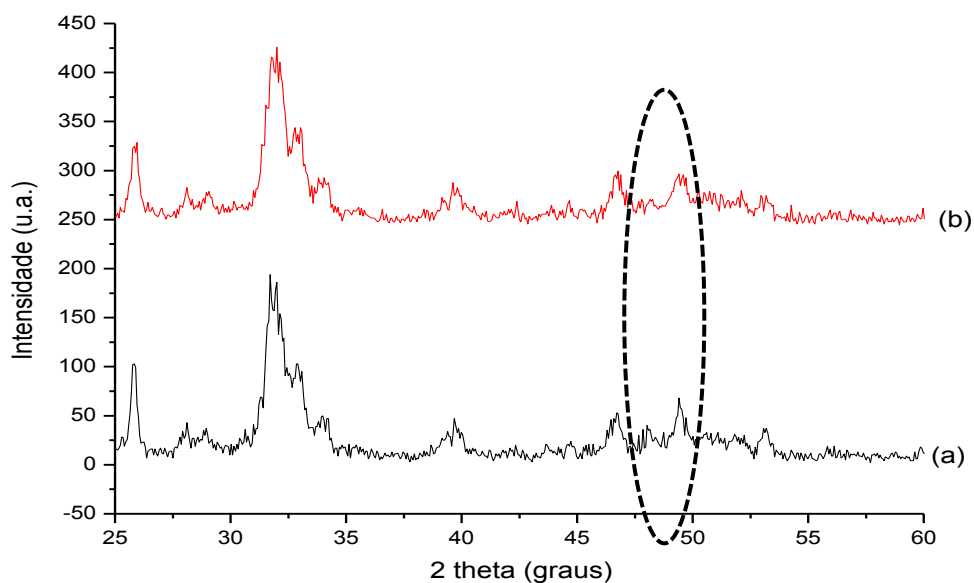


Figura 5.27 - Difrátogramas da HAP_110 (a) e HAP-Nb (b) com tratamento térmico 110°C.

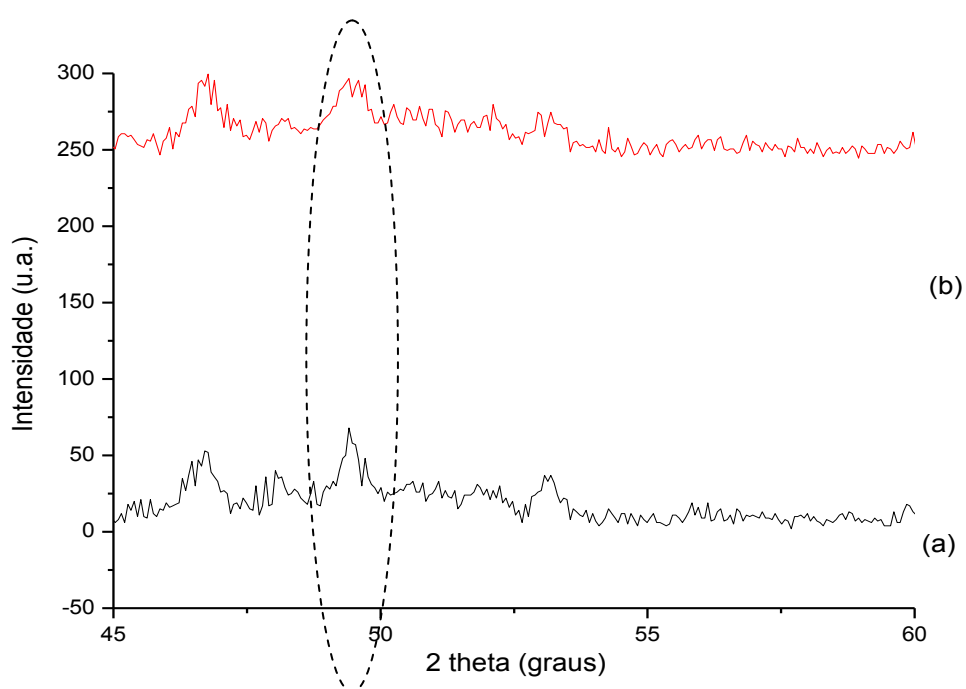


Figura 5.28 - Difrátogramas da HAP_110 (a) e HAP-Nb_110 (b) com tratamento térmico 110°C.

Na Tabela 5.4, tem-se os valores dos parâmetros de rede $a=b$ e c calculados a partir dos dados da DRX em relação aos planos (211) e (112) das amostras de HAP_110, HAP-Nb_110, HAP_900 e HAP-Nb_900 com tratamento térmico a 110 e 900°C. Os gráficos das Figuras 5.29 e 5.30 resumem estas informações.

Inicialmente os parâmetros a e c calculados permitem verificar as alterações ocorridas durante o processo de sinterização. A redução do parâmetro a verificada quando se comparam as amostras HAP_110 e HAP_900, isto é devido à sinterização, é característico da perda de água adsorvida quimicamente, identificada na análise térmica (GROSS; GROSS; BERNDT, 1998). A remoção desta água não provoca alterações no parâmetro de rede c , conforme verificado nas Figuras 5.29 e 5.30 (LIAO *et al.*, 1999). Para a amostra modificada com Nb, comportamento similar foi verificado.

Tabela 5.4 - Parâmetros de rede

Amostras	Parâmetros de rede (Å)*	
	$a = b$	c
HAP_110	9,4261±0,017	6,8977±0,003
HAP-Nb_110	9,4602±0,048	6,7916±0,156
HAP_900	9,4004±0,021	6,8799±0,008
HAP-900_Nb	9,4337±0,011	6,7405±0,264

*média±desvio padrão

Os efeitos da adição do Nb nos parâmetros de rede da célula unitária também podem ser verificados nestes resultados. A incorporação do Nb na estrutura cristalina provocou um aumento de $a (=b)$ e uma redução no parâmetro c .

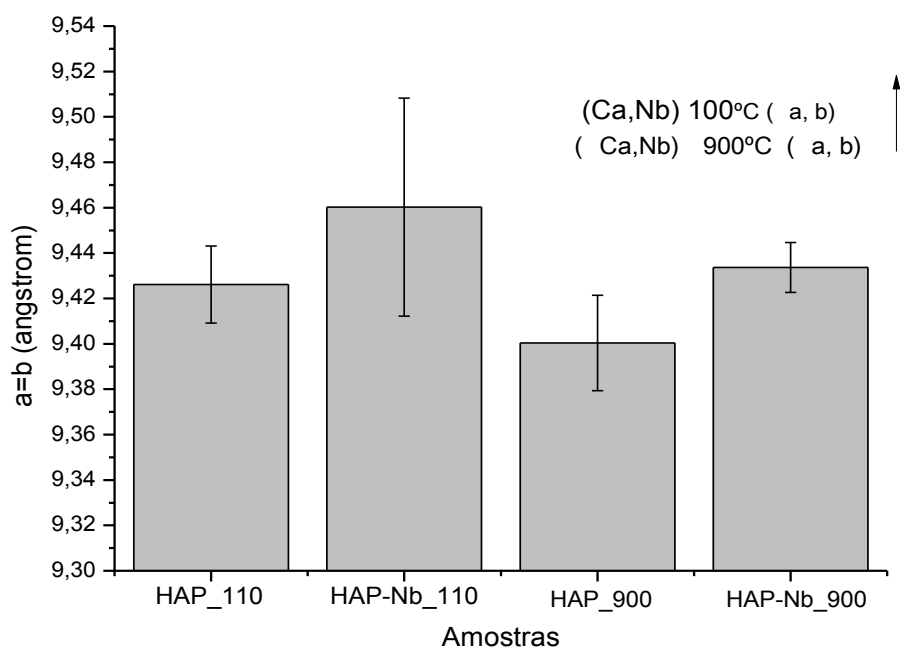


Figura 5.29 - Valores do parâmetro de rede $a=b$ calculados para as amostras em avaliação.

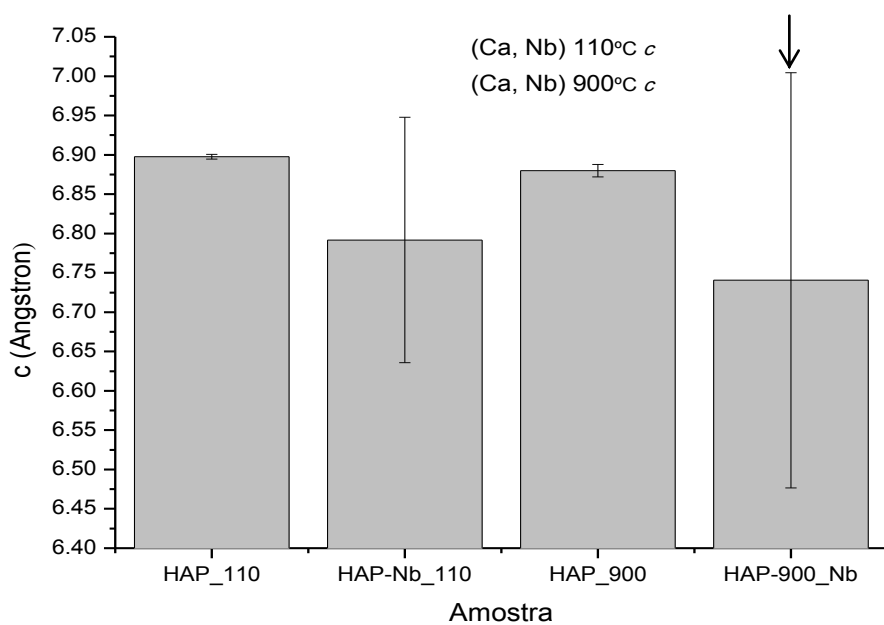


Figura 5.30 - Valores do parâmetro de rede c calculados para as amostras em avaliação.

O volume das células unitárias foi calculado para cada amostra usando a Equação 5.1, de acordo com a geometria exibida para uma estrutura hexagonal.

$$V = 0,866 a^2 \cdot c \quad (5.1)$$

Tabela 5.5 - Volume das células unitárias.

Amostra	Volume (Å ³)
HAP-110	530,7454
HAP-Nb_110	526,3694
HAP-900	526,4931
HAP-Nb_900	519,4863

Conforme LEGEROS R. Z. e LEGEROS J. P. (1984), a seletividade da HAP por cátions metálicos pode ser explicada considerando-se o raio iônico e a eletronegatividade dos íons. Assim podemos sugerir que a substituição do cálcio (raio iônico igual a 0,99Å) por um cátion menor, como neste caso o nióbio (raio iônico igual a 0,78Å), pode resultar na redução do volume na célula unitária (Tabela 5.5). A partir dos resultados da difração de raio-x também foram calculados os tamanhos dos cristalitos utilizando a Equação de Scherrer (Equação 4.3)

Conforme observado nas Figuras 5.31 e 5.32 podemos perceber que as amostras com tratamento térmico a 900°C apresentam valores do tamanho de cristalitos maiores em relação às aquelas tratadas a 110°C. Deste modo, as condições de tratamento térmico utilizados neste trabalho favoreceu o aumento do tamanho dos cristalitos, o que era esperado em função do processo de sinterização. De acordo com PRATIHAR *et al.* (2006), o aumento do tamanho do cristalito segue dois estágios distintos. O primeiro associado a baixas temperaturas (550-750°C) onde o crescimento é lento e o segundo estágio, em faixa de temperatura de 750-950°C onde o crescimento é rápido. Nestas temperaturas, o coalescimento das partículas é controlado por difusão e resulta aumento

do tamanho dos cristalitos. Observa-se ainda que a incorporação do Nb na amostra tratada a 110°C, apresentou menor tamanho de cristalito em relação à amostra sem Nb. Para a amostra sinterizada a 900°C, os resultados indicam que o efeito da sinterização foi predominante, não sendo verificada alteração no tamanho do cristalito pela incorporação do Nb.

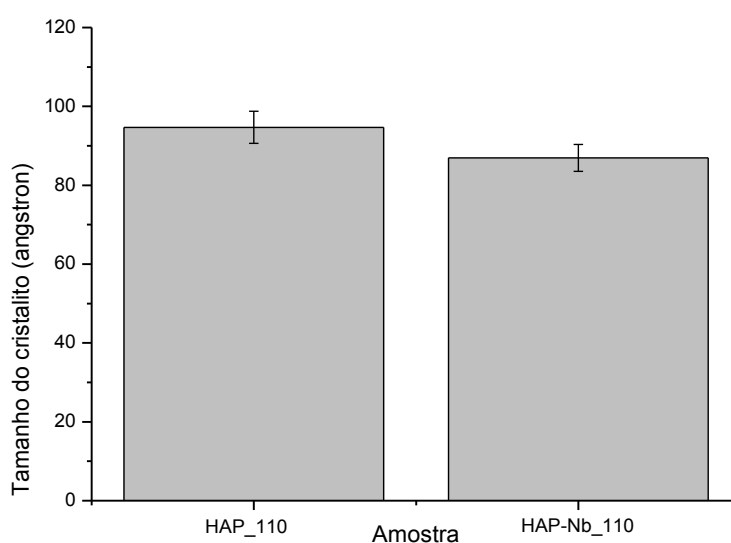


Figura 5.31 - Tamanho de cristalitos das amostras de HAP_110 e HAP-Nb_110.

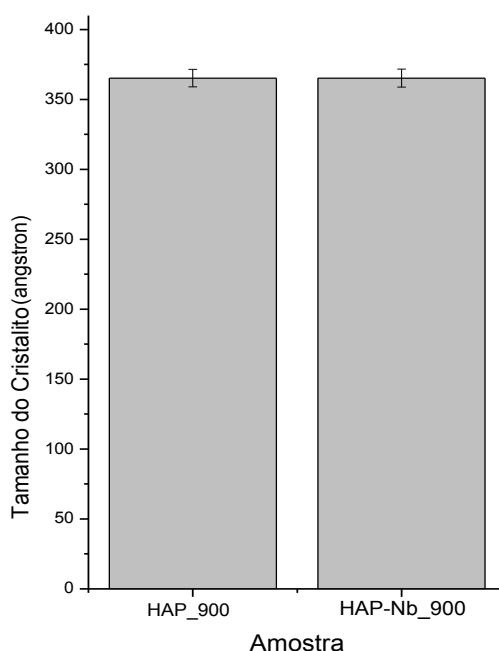


Figura 5.32 - Tamanho de cristalitos das amostras de HAP_900 e HAP-Nb_900.

5.3.2. Análise Morfológica do Fosfato de cálcio com adição de Nióbio

5.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de MEV das amostras sintetizados após tratamento térmico a 110°C (HAP_110, Figura 5.33A e HAP-Nb_110, Figura 5.33B) mostraram a presença de um material aglomerado com superfície granular, tendendo para uma estrutura densa. Após tratamento térmico a 900°C (HAP_900, Figura 5.34A e HAP-Nb_900, Figura 5.34C), as imagens mostraram a presença de aglomerados com formatos mais esferoidais (grãos), aumento de 20.000X. Nas amostras de HAP com Nb (HAP-Nb_110 e HAP-Nb_900), Figuras 5.33B e 5.34C, podemos observar que estas amostras aparentam morfologia diferenciada apresentando tamanho de partículas menores, conforme evidenciado nos detalhes da Figura 5.34 (B e C) para as amostras sinterizadas a 900°C.

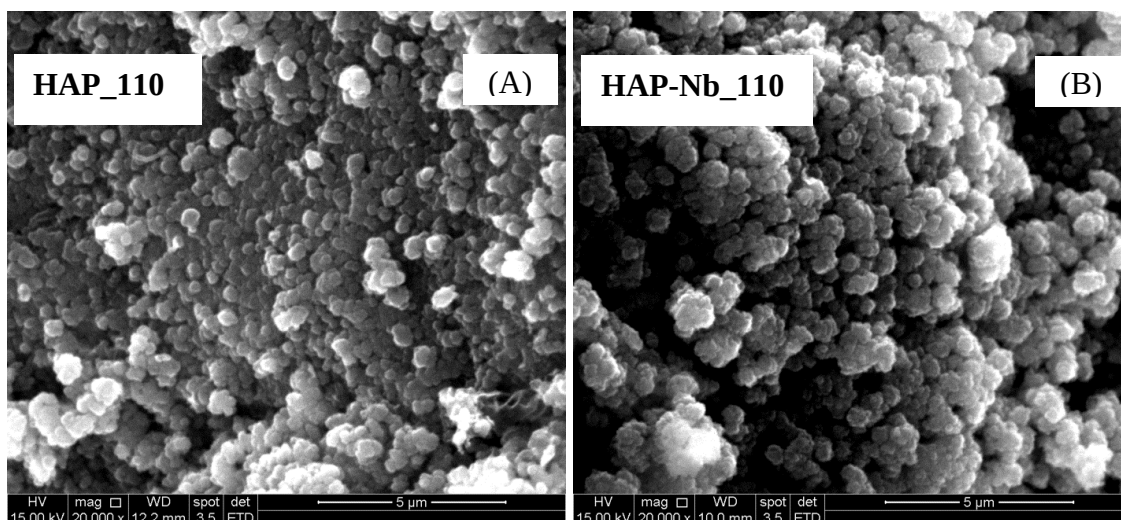


Figura 5.33 - Imagens de MEV da HAP_110 (A) e HAP-Nb_110 (B), após tratamento térmico 110, com aumento de 20.000X.

Para avaliação quantitativa desta observação, em todas as amostras sintetizadas, foram realizadas as medidas dos grãos, feitas manualmente, tomando a medida da escala apresentada em cada imagem.

A Tabela 5.6 e a Figura 5.35 relacionam os valores das medidas dos tamanhos de partículas encontrados para cada amostra sintetizada comparando os valores. A avaliação qualitativa das imagens do MEV nas amostras de HAP com Nb (HAP-Nb110, HAP-Nb_900), que se apresentam com morfologia menor em relação às amostras de HAP sem Nb (HAP_110 e HAP_900), pode ser comparada e confirmada após a medição das partículas.

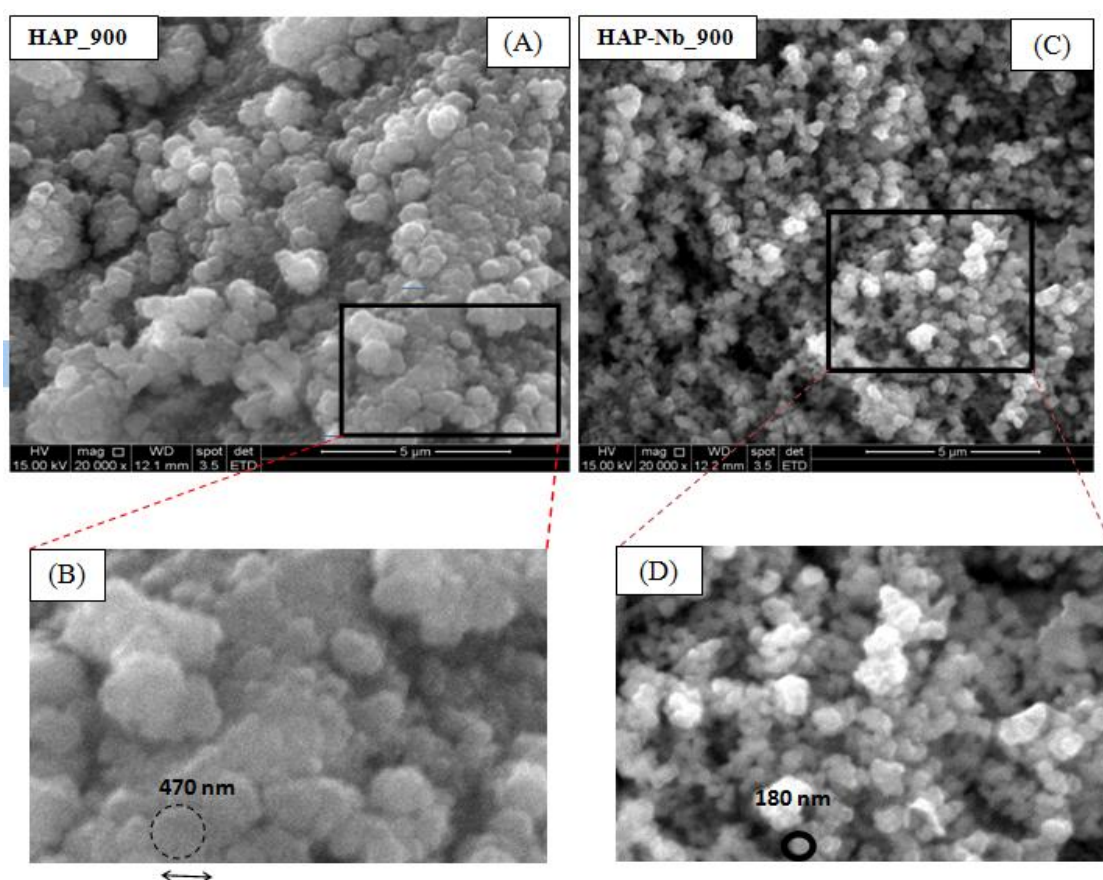


Figura 5.34 - Imagens de MEV da HAP_900 (a), (b) Região projetada de (a) e HAP-Nb_900 (c), (d) Região projetada de (c), após tratamento térmico 900°C, com aumento de 20.000X.

Tabela 5.6 - Medida de tamanho de partícula HAP e HAP-Nb

Amostras	Média ±DP* (nm)
HAP_110	610±120
HAP-Nb_110	420±50
HAP_900	470±40
HAP-Nb_900	180±70

*Desvio Padrão

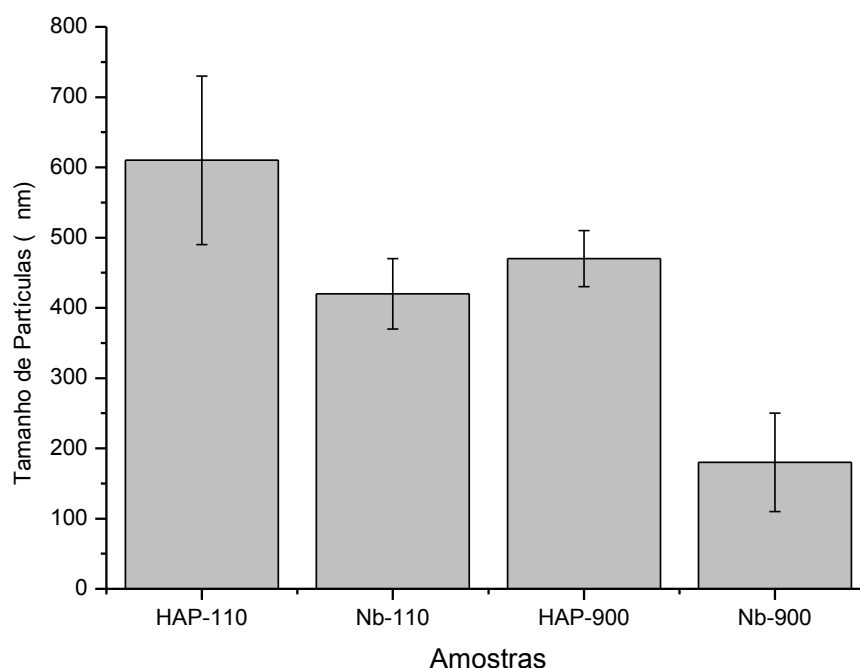


Figura 5.35 - Histograma do Tamanho de Partículas das Amostras.

5.3.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET/EDS)

A morfologia da amostra de HAP_900 é mostrada na imagem do MET na Figura 5.36. Pode-se observar a presença de partículas aglomeradas e algumas nanopartículas isoladas. As partículas apresentam tamanhos e forma variada, com dimensões da ordem de 50nm a 100nm e formatos esferoidal ou alongado.

A Figura 5.37 apresenta a imagem do MET da amostra de hidroxiapatita modificada com nióbio após o tratamento térmico a 900°C (HAP-Nb_900). Identifica-se nesta imagem uma elevada aglomeração entre as nanopartículas que apresentam tamanho homogêneo, da ordem de 60 a 70nm, e contornos esferoidais. As partículas encontram-se bastante coalescidas devido ao processo de sinterização, com maior redução de contornos entre elas quando comparada com a amostra sem nióbio.

Assim, quando comparadas as imagens do MET das Figuras 5.36 e 5.37 pode-se afirmar que houve uma modificação na estrutura nanoscópica da HAP com a adição do Nb. Esta alteração verifica o princípio que a microestrutura do material depende da composição química do material e que irá influenciar o seu desempenho e as suas propriedades finais (Figura 5.38) e confirma a incorporação do nióbio como agente modificador da hidroxiapatita.

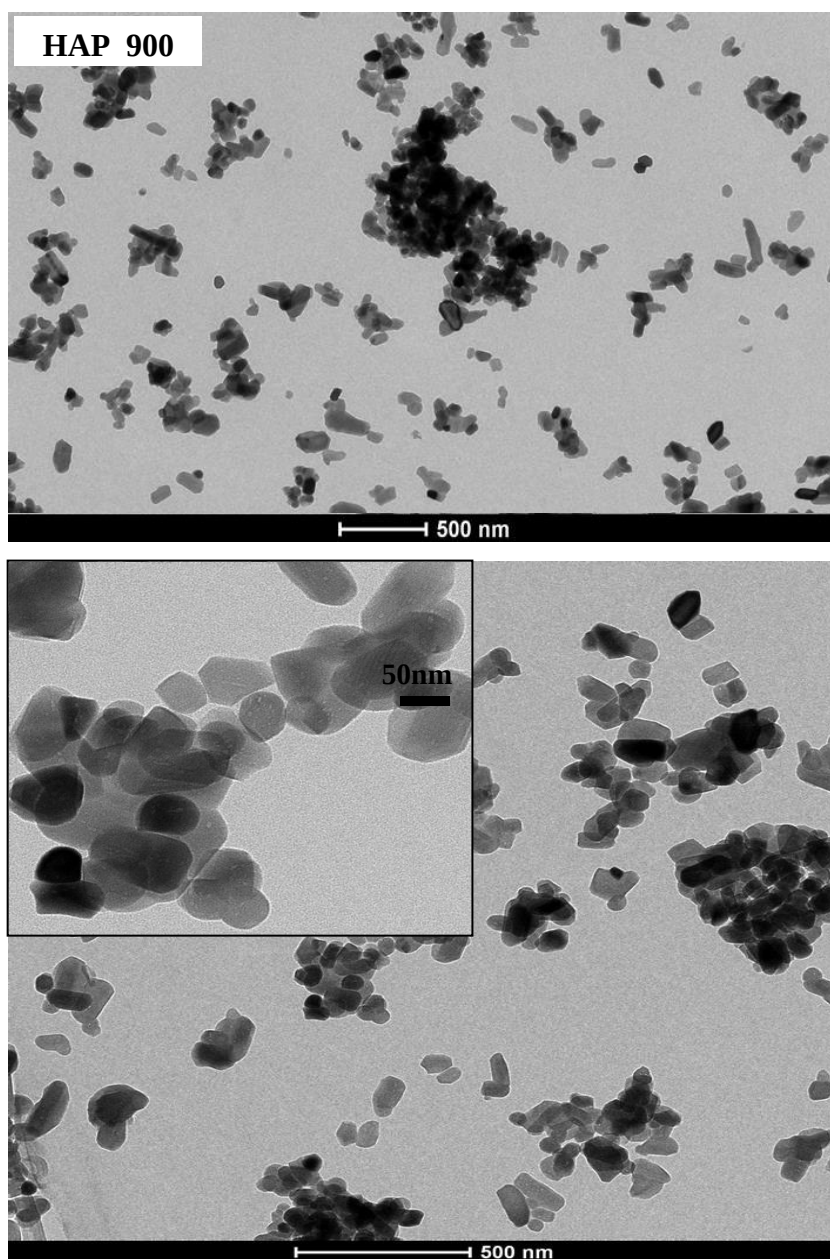


Figura 5.36 - Imagens de MET da HAP_900, após tratamento térmico 900°C em ampliações crescentes.

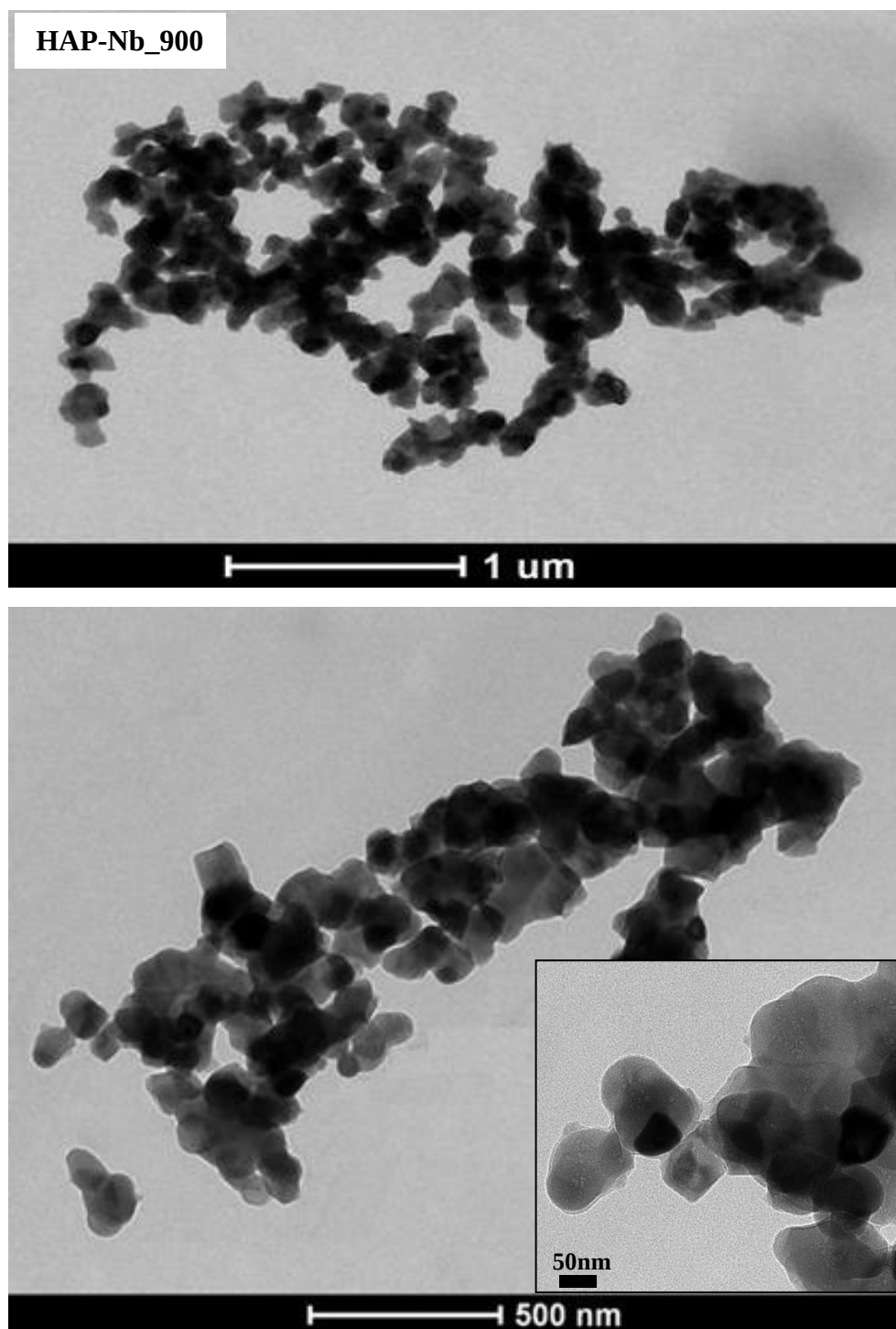


Figura 5.37 - Imagens de MET da HAP-Nb_900, após tratamento térmico 900°C em ampliações crescentes.

Foi também realizada a análise de EDS das amostras utilizando a sonda acoplada ao microscópio de transmissão. Devido à maior tensão deste equipamento, em comparação

com o microscópio eletrônico de varredura, uma maior faixa de energia de raios-X característicos pode ser avaliada. Nas emissões detectadas pelo EDS acoplado ao MEV para as amostras da HAP-Nb_900 verifica-se a superposição da banda do P com a banda da emissão $L\alpha$ do nióbio em 2,166eV. Pela maior tensão, no MET pode-se detectar e quantificar o nióbio presente na amostra utilizando-se a banda $K\alpha$ em 16,581 que não apresenta superposição com nenhum outro elemento presente no material.

O resultado da análise qualitativa elementar por EDS acoplado ao MET da HAP_900 (Figura 5.38) apresentou picos de maior intensidade referentes ao Ca e P, e também mostrou o pico de baixa intensidade do Si previamente descrito na seção 5.2.1.1. Neste caso, o Si também pode ser associado ao detector do equipamento. A presença do cobre (Cu) ocorre em função da grade utilizada para a deposição da amostra.

A Tabela 5.7 apresentada na Figura 5.39 mostram os resultados de análise química em peso e atômica para a amostra HAP_900. Baseado nestes resultados pode-se calcular a razão molar entre Ca/P obtendo-se um valor médio de $1,72 \pm 0,05$, estatisticamente similar ao valor previamente determinado através do MEV. Este valor é ligeiramente diferente da razão teórica da hidroxiapatita, igual a 1,67, resultando em uma variação entre as razões experimental e teórica da ordem de 3%.

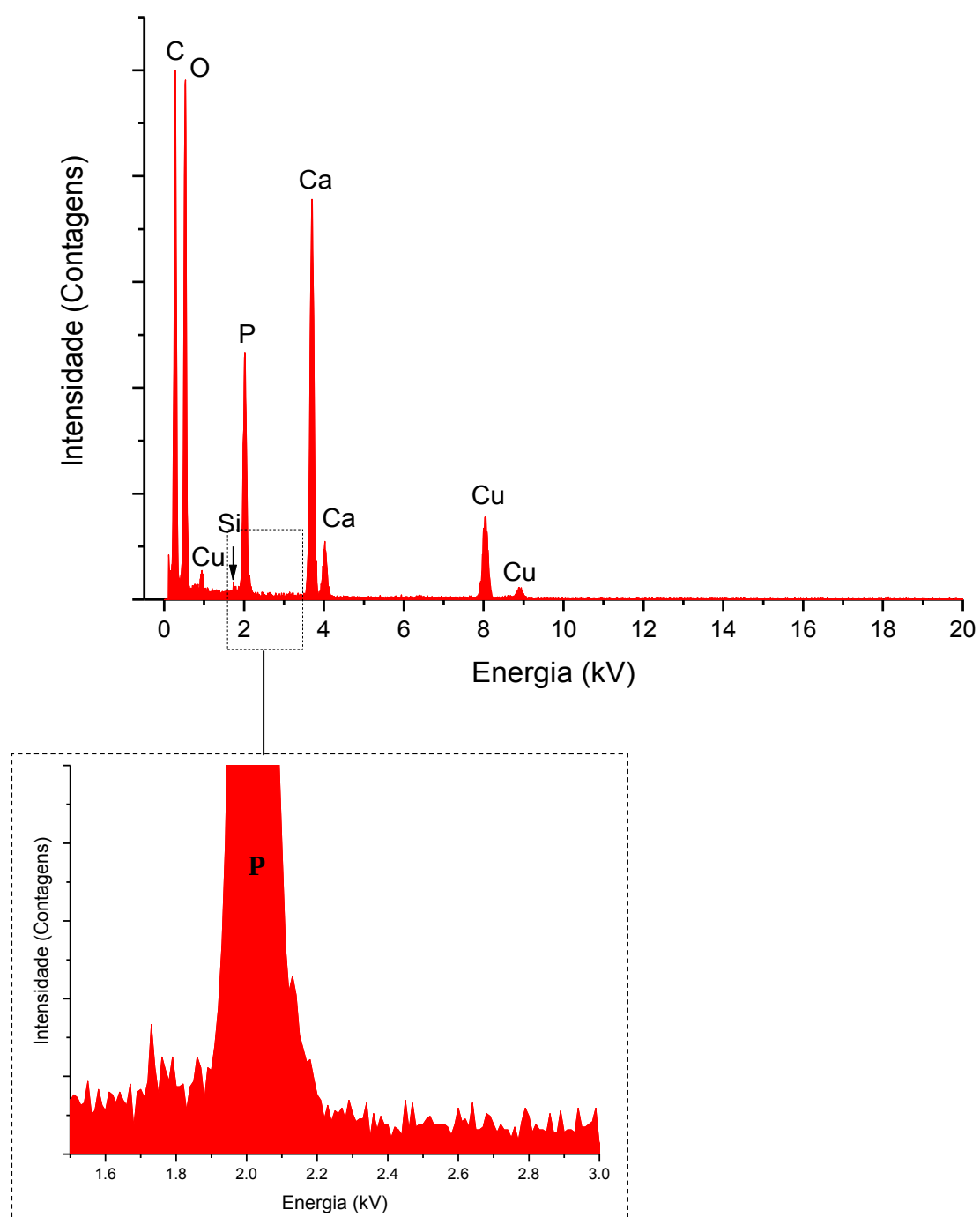


Figura 5.38 - Espectro de EDS da HAP_900, após tratamento térmico 900°C .

Tabela 5.7 - Relação molar Ca/P teórica e experimental

Fração teórica Ca/P	Fração experimental Ca/P
1.67 Mol%	1,72 ±0.05 Mol%
Diferença Experimental - Teórica Δ= 3%	

E:\Imagens\Herman\Alexandra\2014_01_30\A3_004_1.spc		
Label :		
Acquisition Time	: 11:54:40	Date:31-Jan-2014
kV	: 200.00	Azimuth:45.00
Elevation	:35.00	AmpT : 102.4
Detector Type	:SUTW, Sapphire	Resolution:132.07
Lsec	:97	
Thin Apx		
KAB Set : User, Elements		
Element	Weight %	Atomic %
O K	46.5	66.6
P K	17.0	12.6
CaK	36.5	20.8
Total	100.0	100.0

Ca/P = 1,65

E:\Imagens\Herman\Alexandra\2014_01_30\A3_004_2.spc		
Label :		
Acquisition Time	: 11:58:37	Date:31-Jan-2014
kV	: 200.00	Azimuth:45.00
Elevation	:35.00	AmpT : 102.4
Detector Type	:SUTW, Sapphire	Resolution:132.07
Lsec	:41	
Thin Apx		
KAB Set : User, Elements		
Element	Weight %	Atomic %
O K	46.0	66.2
P K	16.2	12.1
CaK	37.8	21.7
Total	100.0	100.0

Ca/P = 1,79

Figura 5.39 - Resultados de EDS obtidos para a amostra HAP_900 no EDS acoplado ao microscópio eletrônico de transmissão.

A Figura 5.40 apresenta os resultados obtidos para a análise de EDS a partir da amostra HAP-Nb_900. Nos detalhes dos espectros pode-se observar claramente a superposição das bandas do Nb e do P na região da transição do $L\alpha$ do nióbio, bem como a presença da emissão correspondente ao $K\alpha$, sem superposição com quaisquer outros elementos constituintes do material, que foi utilizada para a detecção e quantificação da presença do elemento químico modificador.

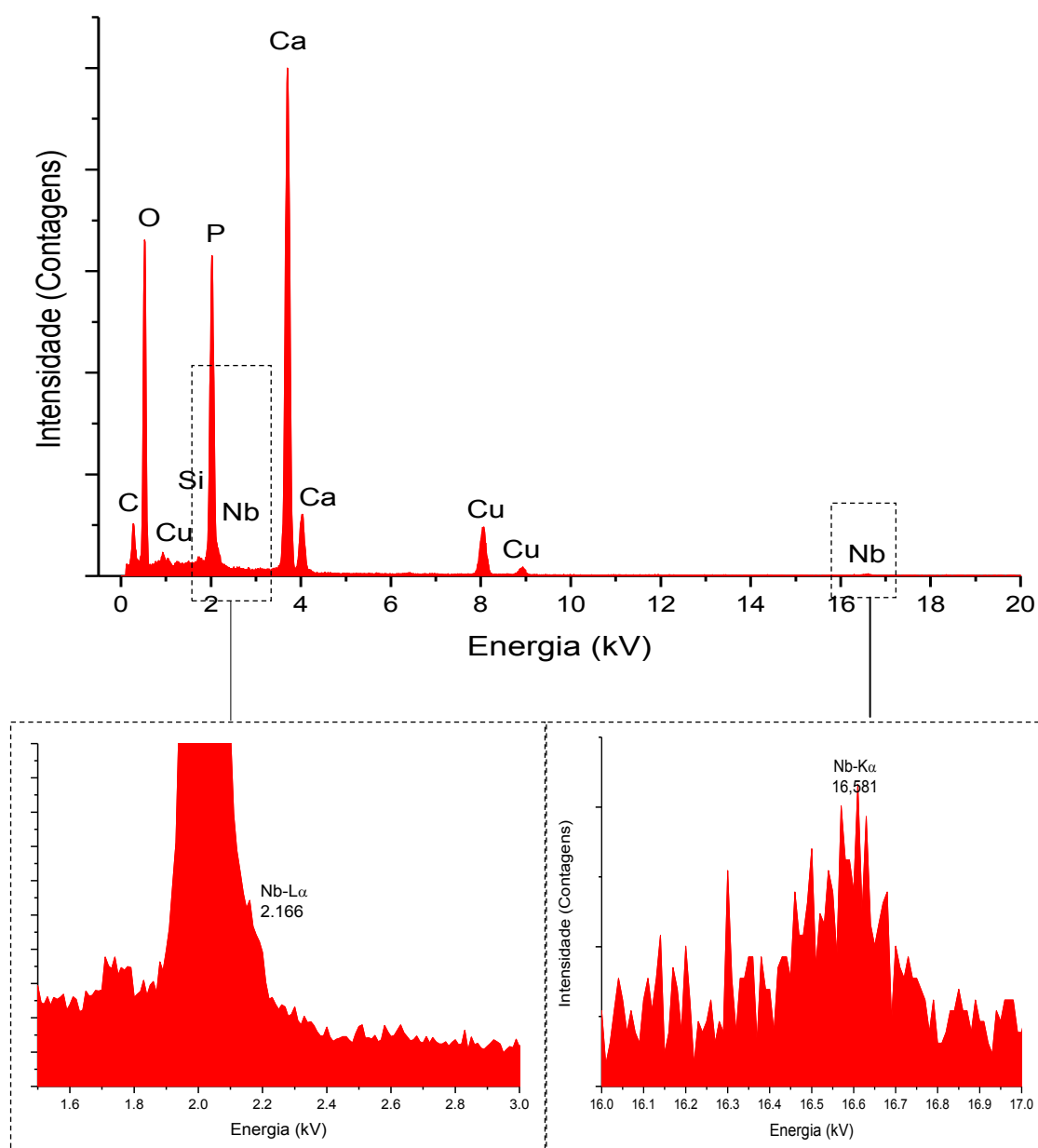


Figura 5.40 - Espectros de EDS da HAP-Nb_900, após tratamento térmico 900°C. Nos detalhes as transições $L\alpha$ e $K\alpha$ do Nb.

E:\Imagens\Herman\Alexandra\2014_01_30\A3_Nb_geral.spc		
Label :		
Acquisition Time	: 11:33:43	Date:31-Jan-2014
kV	: 200.00	Azimuth:45.00 Elevation:35.00 AmpT : 102.4
Detector Type	:SUTW, Sapphire	Resolution:132.07 Lsec:68
Thin Apx		
KAB Set : User, Elements		
Element	Weight %	Atomic %
O K	29.5	49.2
P K	21.3	18.3
CaK	48.4	32.2
NbK	0.8	0.2
Total	100.0	100.0
Ca+Nb/P=1,77		

E:\Imagens\Herman\Alexandra\2014_01_30\A3_Nb_006_2.spc		
Label :		
Acquisition Time	: 11:18:13	Date:31-Jan-2014
kV	: 200.00	Azimuth:45.00 Elevation:35.00 AmpT : 102.4
Detector Type	:SUTW, Sapphire	Resolution:132.07 Lsec:92
Thin Apx		
KAB Set : User, Elements		
Element	Weight %	Atomic %
O K	43.1	63.7
P K	17.5	13.3
CaK	38.8	22.8
NbK	0.6	0.2
Total	100.0	100.0
Ca+Nb/P=1,73		

E:\Imagens\Herman\Alexandra\2014_01_30\A3_Nb_006_3.spc		
Label :		
Acquisition Time	: 11:24:17	Date:31-Jan-2014
kV	: 200.00	Azimuth:45.00 Elevation:35.00 AmpT : 102.4
Detector Type	:SUTW, Sapphire	Resolution:132.07 Lsec:111
Thin Apx		
KAB Set : User, Elements		
Element	Weight %	Atomic %
O K	38.8	59.4
P K	18.9	15.0
CaK	41.5	25.4
NbK	0.8	0.2
Total	100.0	100.0
Ca+Nb/P=1,71		

Figura 5.41 - Resultados de EDS obtidos para a amostra HAP-Nb_900 no EDS acoplado ao microscópio eletrônico de transmissão.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5.8 de composição atômica mostrados na Figura 5.41 pode-se calcular o valor da razão molar (Ca+Nb)/P para a amostra HAP-Nb_900 utilizando-se somente a banda da transição $K\alpha$ do Nb. Obteve-se o valor de $1,74 \pm 0,03$, estatisticamente igual ao medido através do MEV, a partir da transição $L\alpha$. Os valores determinados também podem ser utilizados para a estimativa da razão molar de Nb incorporada na estrutura pela determinação da razão Nb/Ca calculando-se um valor médio para a razão molar de $0,8 \pm 0,1\%$. Este valor é bastante similar à fração teórica de nióbio incorporado que foi de 1% em substituição ao Ca. Baseado nos resultados, pode-se afirmar que a maior parte do nióbio adicionado foi incorporado na estrutura do material. A Figura 5.41 resume a análise realizada e propoe uma representação esquemática para a célula unitária do material obtido com a substituição parcial do Ca pelo Nb na estrutura cristalina da hidroxiapatita teórica.

Na Figura 5.42 temos a estrutura de cristal de HAP idealizada (JONES, 2001) modificada para que seja visualizada a HAP parcialmente substituída com Nb obtida neste estudo.

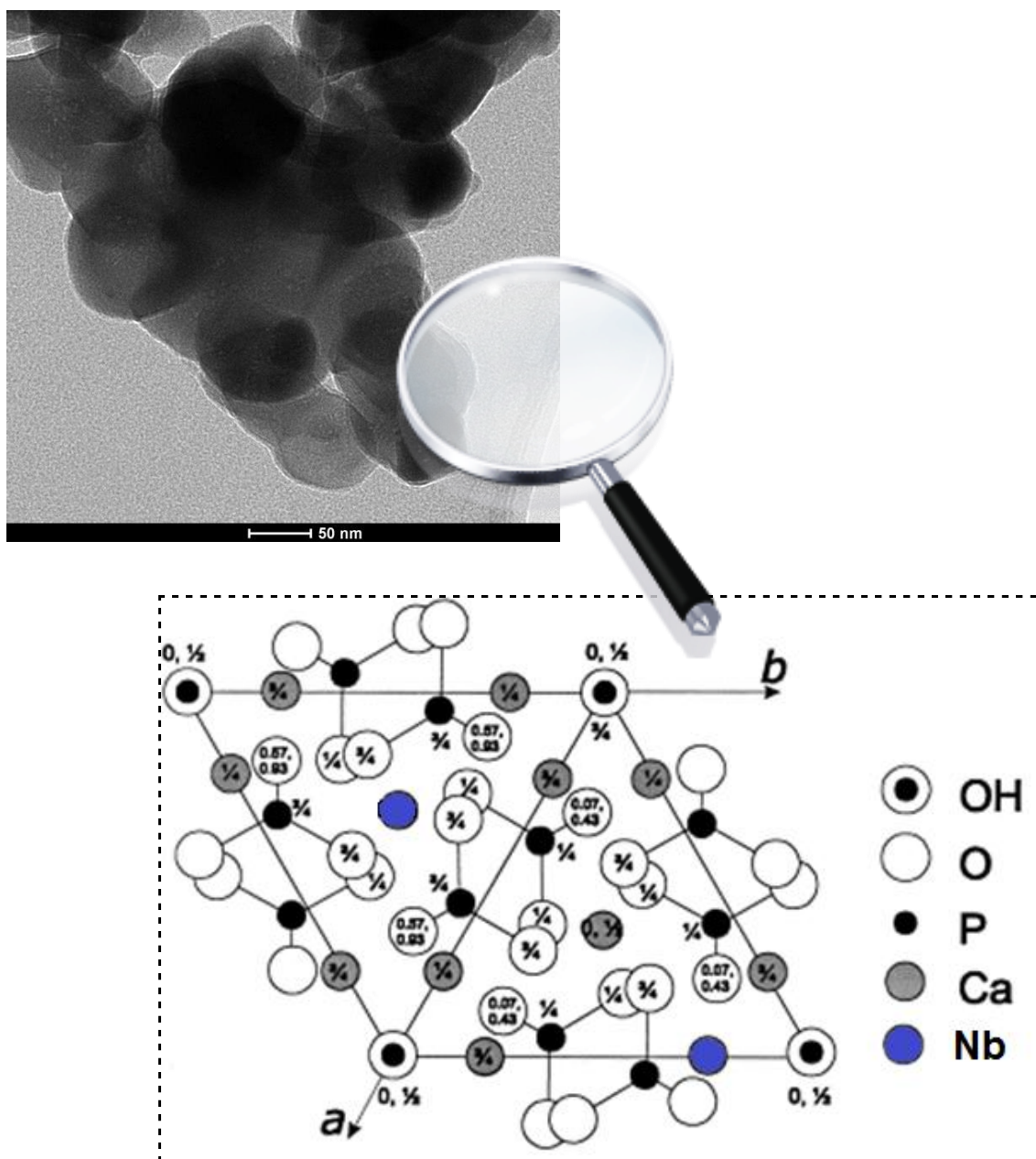


Figura 5.42 - Representação esquemática da estrutura de cristal de HAP idealizada, vistos ao longo do eixo c, (JONES, 2001), modificado para HAP parcialmente substituída com Nb obtida neste estudo.

Tabela 5.8 - Composição Química da Hidroxiapatita parcialmente substituída por Nb.

Fração teórica Nb/Ca	Fração estimada experimental EDS Nb/Ca
1.0 % Molar	$(0.2/(26.8)) = (0.8 \pm 0.1) \text{ at } \%$

*valores médios

5.3.3. Análise térmica

A Figura 5.43 (A e B) apresenta as curvas de TG e DSC obtidas a partir das amostras de HAP-Nb_110 e HAP-Nb_900. Observa-se para ambas as amostras comportamento similar ao identificado para os materiais sem Nb, indicando que a incorporação do agente modificador não promoveu alteração nas propriedades térmicas das biocerâmicas sintetizadas.

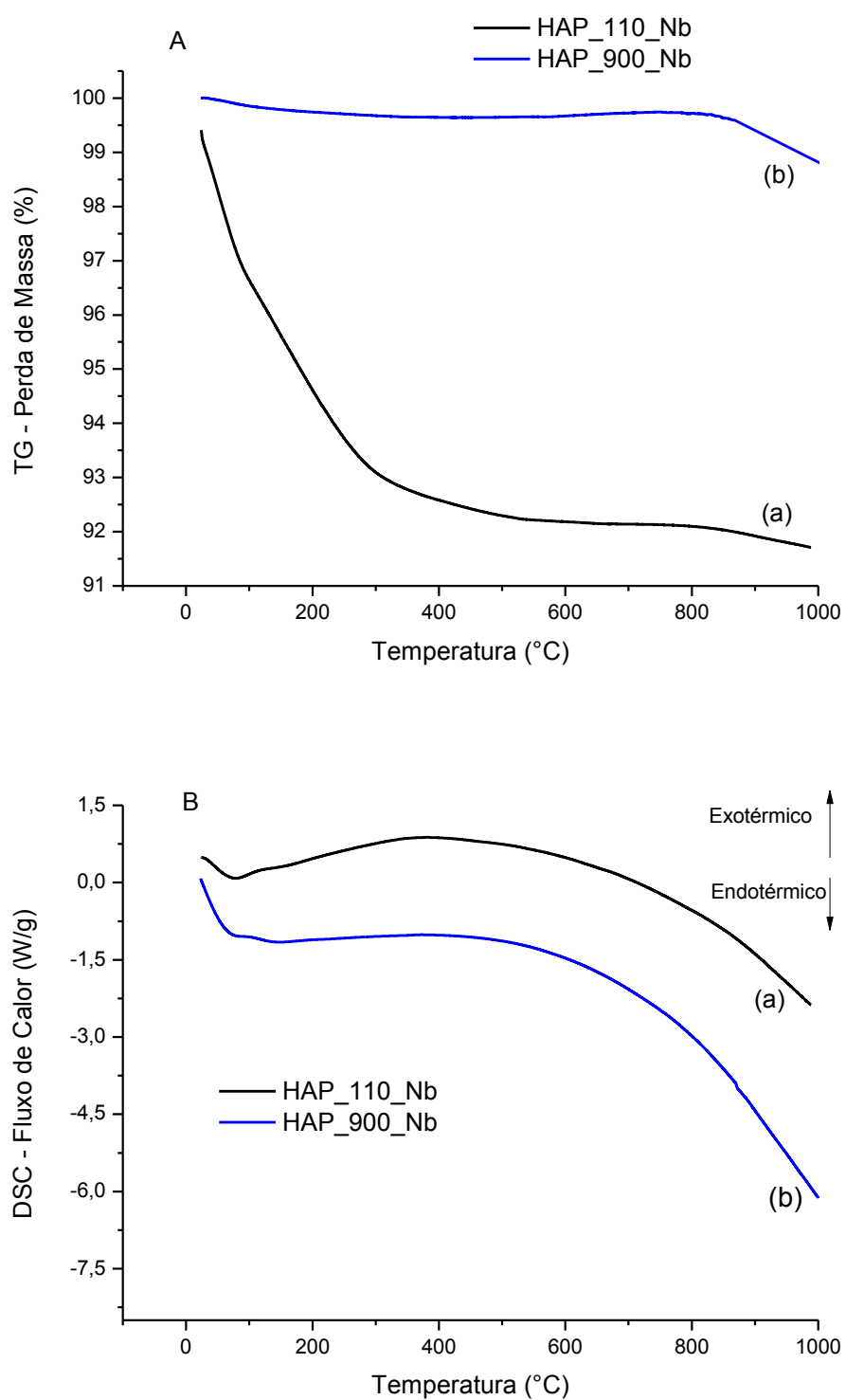


Figura 5.43 - (A) Perda de Massa (%) e (B) Calorimetria exploratória diferencial. Comparação entre as amostras de HAP-Nb₁₁₀ e HAP-Nb₉₀₀.

5.3.4. Avaliação da Biocompatibilidade In Vitro das HAP

A viabilidade e proliferação dos fibroblastos mostraram alteração significativa na presença das HAP quando comparados com o controle pela leitura da absorbância dos cristais de formazan, já que são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis (Figura 5.44). Após 24 hs de incubação, a HAP_900 mostrou maior absorbância, seguida da HAP-Nb_90, o que significa melhor proliferação celular em relação aos outros grupos e em relação ao controle por serem diretamente proporcionais, indicando assim, a presença de células viáveis adaptadas favoravelmente ao meio.

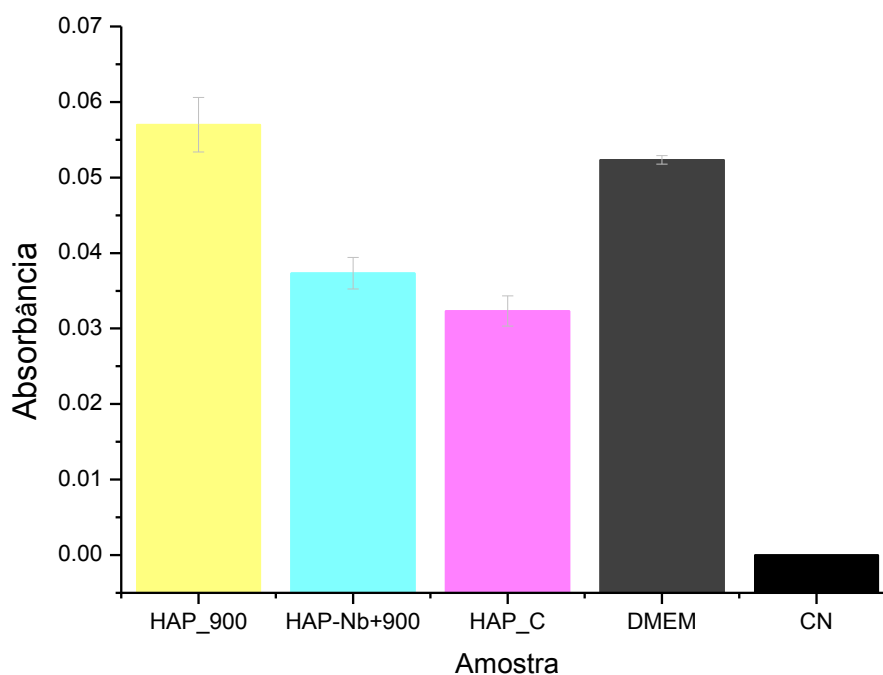


Figura 5.44 - Gráfico com absorbância dos cristais de formazan avaliados pelo ensaio de MTT.

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES

6.1. CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos, neste trabalho foi obtida biocerâmica à base de hidroxiapatita modificada com nióbio.

6.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- A rota coloidal aquosa de síntese, com ou sem adição de Nb, resultou na formação de uma única fase fosfato de cálcio: hidroxiapatita, comprovada pelas análises de difração de raios X e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.
- Foi obtida hidroxiapatita carbonatada ou hidroxiapatita cristalina em função do tratamento térmico executado, secagem a 110°C ou sinterização a 900°C, respectivamente. A sinterização também promoveu o aumento do tamanho do cristalito e a redução do parâmetro de rede a .
- . Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas de caracterização revelaram a presença de nióbio no pó identificado como hidroxiapatita parcialmente substituída com nióbio, bem como variação em algumas propriedades como redução no parâmetro da célula unitária, redução do tamanho de partícula após sinterização, maior coalescimento das partículas, etc.
- Os materiais obtidos indicam citocompatibilidade preliminar obtida por ensaio *in vitro* indicando um potencial para crescimento celular, demonstrando serem candidatos para aplicação na engenharia de tecido ósseo.

CAPÍTULO 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar alterações nos parâmetros do processo de síntese como os reagentes, pH e agentes estabilizantes nas propriedades dos fosfatos de cálcio produzidos;
- Investigar alterações nos parâmetros do processo de síntese como os reagentes, pH e agentes estabilizantes para produção de nanopartículas de fosfatos de cálcio;
- Realizar ensaios *in vivo* com as biocerâmicas produzidas utilizando modelos animais;
- Utilizar as biocerâmicas de HAP com adição de nióbio para desenvolver nossos biomateriais e biocompósitos para engenharia de tecido ósseo;
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SAERI, M. R.; SORELL, C. C. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. *Materials & design*, v.24, p.197-202, 2003.

ANJUVAN, S. Hydroxyapatite, a biomaterial: Its chemical synthesis, characterization and study of biocompatibility prepared from shell of garden snail. *Helix aspersa. Bull Material Science*, v.35, n.6, p.1031-1038, 2012.

ANUSAVICE, K. J. *Phillips: Materiais Dentários*. Tradução por Édson José Lima Moreira. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap.5, p.44-66.

ARAÚJO, T. S. *Produção de Hidroxiapatita Pura e Dopada para Aplicação em Biosensores*. São Cristovão: NPGFI/UFS, SE, Brasil. 2006. (Dissertação, Mestrado)

ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J.; CHRISTOFFERSEN, M. R. A calcium hydroxyapatite precipitated from an aqueous solution-an international multimethod analysis. *Journal of Crystal Growth*, v.84, p.515-532, 1987.

AZAROFF, L. V.; BURGUER, M.J. *The Powder method in X-Ray Crystallography*. New York: McGRAW HILL, 1958. 342p.

BENTO D. A. *Análise de resistência mecânica em implantes de osso: um enfoque numérico e experimental*. Florianópolis: Centro Tecnológico UFSC, 2003. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Mecânica).

BET, M. R. *Preparação e caracterização de biocerâmicas compostas de colágeno e sais de fosfato de cálcio*. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos-USP, 1995. 62p. (Dissertação, Mestrado).

BINI, R. A. *Recobrimentos cerâmicos bioativos pelo processo sol-gel sobre Ti c.p. modificado por laser empregados em implantes*. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2007. (Dissertação, Mestrado).

BOANINI, E.; GAZZANO, M.; BIGI, A. Ionic substitutions on calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia*, v.6, pp.1882-1894, 2010.

BONADIO, M G. T.; NASCIMENTO, W. J.; FREITAS, V. F.; WEINAND, W. R.; BAESSO, M. L.; LIMA, W. M. Nanostructured Nb₂O₅–natural hydroxyapatite formed by the mechanical alloying method: A bulk composite, *Materials Chemistry and Physics*, v.130, p.84-89, 2011.

BRANTLEY, W. A.; ELIADES, T. *Orthodontic materials - scientific and clinical aspects*. New York: Thieme New York, 2001. Cap.5, p.105-122.

CALLISTER JR, W. D. *Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução*. Tradução por Sérgio Murilo Stamile Soares. 5ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S. A, 2002. Cap. 6, p.78-107.

CANCEDDA, R, DOZIN, B.; GIANNONI, P.; QUARTO, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol*, v.22, n.1, p.81-91, 2003.

CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive materials, *Ceramics International*, v.22, p.493, 1996.

CHENG, Z. H. C.; YASUKAWA, A.; KANDORI, K.; ISHIKAWA. FTIR study on incorporation of CO₂ into calcium hydroxyapatite, *Journal of Chemistry Society, Faraday Trans.*, v.94, n.10, p.1501-1505, 1998.

CHIBA, A.; KIMURA, S.; RAGHUKANDAN, K.; MORIZONO, Y. Effect of alumina addition on hydroxyapatite biocomposites fabricated by underwater-shock compaction. *Materials Science Engineering*, v.A, n.350, p.179, 2003.

CHUSSEI, C. C.; GOODMAN, D. W. *Analytical Chemistry*, v. 71, n. 1, p. 149-153, 1999.

COSTA, E.; NOVAKI L.; TSAI H. I.; VIEIRA L. T. P.; ANDRADE A. V. C.; PAIVA-SANTOS, C. O.; BORGES, C. P. F.; MARQUES, M. B.; SANTOS, A. C. C.; SILVA, Z. Biovidros: sinterização de biovidros na forma de partículas e do tipo espuma. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.6, n.30, 2003.

DEMIRKOL, N.; OKTAR, N. F.; KAYALI, S. E. Influence of Niobium Oxide on the Mechanical Properties of Hydroxyapatite, *Key Engineering Materials*, Vols.529-530, p.29-33, 2013.

DENG, C.; CHUN L. D., TAN, Y.; BAO, C. Y.; ZHANG, Q.; HONG, S. F., CHEN, J.; ZHANG, X. In vitro simulation of calcium phosphate crystallization from dynamic revised simulated body fluid. *Key Engineering Materials*, v.254, p.7-10, 2004.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. *J. Mater Sci*, v.44, p.2343, 2009.

DOROZHKIN, S. V. Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics. 2011.

DRIESSENS, F. C. M.; VERBEECK, R. M. H. *Biominerals*. Boca Raton, An Arbor, Boston: CRC PRESS, 1990. v.1, p.61-73.

DUALIBI, S. E.; SILVA, J. V. L. A Biofabricação de Tecidos e Órgãos. *Com Ciência*, n.102, 2008.

ELLIOTT, J. C. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. The Netherlands: Elsevier Sci., 1994.

ERIKSEN, E. F. Osteoporosis Pathogenesis. *ECTS The European Calcified Tissue Society*. Disponível em: <<http://www.ectsoc.org/review.htm>>. Acesso em: 15 jan 2003.

FIDANCESKA, E; FIDANCEVSKA, E.; RUSESKA, G.; BOSSERT, J. Fabrication and characterization of porous bioceramic composites based on hydroxyapatite and titania. *Materials Chemistry and Physics*, v.103, p.95-100, 2007.

FU, L.; KHOR, K. A.; LIM, J. P. Processing, microstructure and mechanical properties of yttria stabilized zirconia reinforced hydroxyapatite coatings. *Materials Science Engineering*, v.A316, p.46-51, 2001.

FUJITA, R.; YOKOYAMAA, A.; NODASAKA, Y.; KOHGO, T.; KAWASAKI, T. Ultrastructure of ceramic-bone interface using hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics and replacement mechanism of β -tricalcium phosphate in bone. *Tissue & Cell*, v.35, p.427-40, 2003.

GOMIDE, V. S. *Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita – alumina e hidroxiapatita – titânia para fins biomédicos*. Campinas: UNICAMP, 2005.

GONDIM, A. L. M. *Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos confeccionados em calota craniana e ratos*. Porto Alegre: Faculdade de Odontologia, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2007. (Dissertação, Mestrado em Odontologia).

GROSS, A. K.; GROSS, V.; BERNDT, C. C. Thermal Analysis of Amorphous Phases in Hydroxyapatite Coatings, *Journal of the American Ceramic Society*, v.81, n.1, pp.106-12, 1998.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfato de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos, *Química Nova*, v.33, pp. 1352-1358, 2010.

GUOA, H.; KHORB, K. A., CHIANG, Y.; MIAOA, B. X. Laminated and functionally graded hydroxyapatite/yttria stabilized tetragonal zirconia composites fabricated by spark plasma sintering. *Biomaterial*, v.24, p.667-675, 2003.

HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of American Ceramics Society*, v.74, p.1487-1510, 1994.

HENCH, L. L. Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.*, v.81, n.7, p.1705-1728, 1998.

HENCH, L. L., Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v.19, 1998.

HENCH, L. L.; ETHRIDGE, E. C. *Biomaterials: Interfacial approach*. New York: Academic Press, 1982. 385p.

HENCH, L. L.; WILSON, J. *An introduction to bioceramics*. Singapore: World Scientific, 1993.

JOHANSSON, C. B.; ALBREKTSSON, M. O. A removal torque and a histomorphometric study of commercially pure niobium and titanium and implants in rabbit bone, *Clin. Oral Implants Reserch*, v.2, n.1, p.24, 1991.

JONES F. H. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related

biomaterials. *Surface Science Reports*, n.42, p.75-205, 2001.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J. Dent. Educ.*, v.65, n.5, p.456-462, 2001.

KIESWETTER, K.; BAUER, T.W.; BROWN, S.A.; VAN LENTE, F.; MERRIT, K. *Biomaterials*, v.15, n.3, p. 4609-4620, 1994.

KIKUCHI, M.; ITOH, S.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Self organization mechanism in a bonelike hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo, *Biomaterials*, v.22, n.13, p.1705-1711, 2001.

KIM, S. S.; AHN, K. M.; PARK, M. S.; LEE, J. H.; CHOI, C. Y. Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v.27, n.8, p.1399-1409, 2006.

KOKUBO, T., KIM, H-M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, v.24, p.2161-2175, 2003.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineered. *Science*, v.260, p.920-926, 1993.

LAURENCIN, D. ALMORA-BARRIOS, N.; LEEUW, N. H.; GERVAIS, C.; BONHOMME, C.; MAURI, F.; CHRZANOWSKI, W.; KNOWLES, J. C.; NEWPORT, R.; WONG, A.; GAN, Z.; SMITH, M. E. Magnesium incorporation into hydroxyapatite. *Biomaterials*, v.32, p.1826-1837, 2011.

LEGEROS R. Z; BONEL G.; LEGROS R. Types of H₂O in human enamel and in precipitated apatites. *Calcif Tiss Res*, v.26, o111-118, 1978.

LEGEROS, R. Z. CaP Materials: a Review. *Adv Dent Res*, v.3, p.164-180, 1988.

LEGEROS, R. Z. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*; Monographs in Oral Science. Basel: H.M. Myers Ed., 1991.

LEGEROS, R. Z. Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification, *Zeitschrift für Kardiologie*, 2001.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.1, n.395, p.81-98, 2002.

LEGEROS, R. Z.; LEGEROS, J. P. Phosphate minerals in human tissues. In: NIAGRU, J. O.; MOORE, P.B. Eds, *Phosphate minerals*. p.351-385, 1984.

LIAO, C. J.; LIN, F. H.; CHEN, K. S.; SUN, J. S. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials*, v.20, p.1807-1813, 1999.

LIAO, K.; SEIFTER, E.; HOFFMAN, D.; YELLIN, E. L.; FRATER, R. W. Bovine pericardium versus porcine aortic valve: comparison of tissue biological properties as prosthetic valves. *Artificial Organs*, v.16, n.4, p.361-365, 1992.

LIN, C.; LIN, F. H.; LIAO, C. J.; CHEN, K. S.; SUN, J. S.; LIN, C. P. Petal-like apatite formed on the surface of tricalcium phosphate ceramic after soaking in distilled water. *Biomaterials*, v.22, p.2981, 2001.

LIOU, S-C.; CHEN, S-Y.; LIU, D-M. Synthesis and characterization of needlelike apatitic nanocomposite with controlled aspect ratios. *Biomaterials*, v.24, p.3981-3988, 2003.

LIU, W.; ZHANG, J.; WEISS, P.; TANCRET, F.; BOULE, J. M. The influence of different cellulose ethers on both the handling and mechanical properties of calcium phosphate cements for bone substitution. *Acta Biomaterialia*, p.5740–5750, 2013.

MANSUR, H. S.; ORÉFICE, R. L.; LOBATO, Z. I. P.; VASCONCELOS, W. L. In Vitro and in Vivo Testing of Chemically Engineered Biomaterial Surfaces. *Medical & Biological Engineering & Computing*, v.3, p.148-150, 2002.

MANSUR, H. S.; ORÉFICE, R.; PEREIRA, M. *Análise e caracterização de superfícies e interfaces*; Biomateriais: Fundamentos e Aplicação. 1.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Minas. Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

MARRA, K. G.; KUMTA, P. N. Polymer/ceramic composites for bone tissue engineering. In: *PITA - Pennsylvania Infrastructure Technology Alliance*. Disponível em: <<http://www.ices.cmu.edu/pita>> Acesso em 13 dez. 2002

MAVROPOULOS, E.; ROSSI, A. M.; ROCHA, N. C. C.; SOARES, G. A.; MOREIRA, J. C.; MOURE, G. T. Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different conditions. *Materials Characterization*, v.50, p.203-7, 2003.

MENDELSON, K.; SCHOEN, F. J. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann. Biomed. Eng.*, v.34, n.12, p.1799-819, 2006.

MIGUEL, F. B.; CARDOSO, A. K.; BARBOSA, A. A. Jr.; MARCANTONIO, E. Jr.; GOISSIS, G.; ROSA, F. P. Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rat. *J Biomed Mater Res B Appl Biomaterials*, v.78, n.2, p.334-339, 2006.

MOREIRA, E. L.; ARAUJO, J. C.; MORAES, V. C. A.; MOREIRA, A. P. D. Análise por difração de raio-X de uma hidroxiapatita carbonatada usando o método de Rietveld, *Matéria*, v.12, n.3, p.494-502, 2007.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p.55-63, 1983.

NAKABAYASHI, N.; PASHLEY, D. *Hibridização dos tecidos dentais duros*. Tradução por Luis Narciso Baratieri e Sylvio Monteiro Junior. 1ed. São Paulo: Quintessence Editora Ltda, 2000. 129p.

NASCIMENTO W. J.; BONADIO, T. G. M.; FREITAS, V. F.; WEINAND, W. R; BAESSO, M. L.; LIMA, W. M. Nanostructured Nb₂O₅–natural hydroxyapatite formed by the mechanical alloying method: A bulk composite. *Materials Chemistry and Physics*, v.130, p.84, 2011.

NASCIMENTO, W. J. *Preparação e Caracterização Físico-Mecânica, Microestrutural e Térmica de Compósitos à Base de Nióbio e Hidroxiapatita*. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. (Dissertação, Mestrado).

NETO, J. S. R. *Hidroxiapatita sintética nanoestruturada e esmalte dental aquecidos e irradiados por laser de Er, Cr:YSGG*, Caracterização por FTIR e por DRX. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEM-CNEN/SP, 2009, 120p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia Nuclear – Materiais).

OKAZAKI, M.; SATO, M. Computer graphics of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. *Biomaterials*, v.11, p.573-78, 1990.

OKAZAKI, M.; TAIRA, M.; TAKAHASHI, J. Rietveld analysis and Fourier maps of hydroxyapatite, *Biomaterials*, v.18, n.11, p.795-799, 1997.

OLIVEIRA, D. M. F. *Síntese e Caracterização de Óxidos Metálicos Nanoestruturados e sua Utilização em Nanocompósitos com Poli (álcool vinílico)*. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. (Tese, Doutorado).

OLIVEIRA, M. *Síntese e Caracterização de Biomateriais à Base de Fosfato de Cálcio*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2004. (Dissertação, Mestrado).

ORÉFICE, R. L. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro, 2006.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA M. M.; MANSUR, H. S. *Biomateriais*. Fundamentos e Aplicação. 1ed. 2012. p.74-76.

PARK, J. B.; LAKES, R. S. *Biomaterials: An introduction*. 2.ed. New York: Plenum Press, 1992.

PARK, J. *Biomaterials Science and Engineering*. New York: Plenum Press, 1984.

PATEL, N. *et al.* In vivo assessment of hydroxyapatite and silicate substituted hydroxyapatite granules using an ovine defect model. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v.16, n.5, p.429-440, 2005.

PAULA, F. L.; BARRETO, I. C.; ROCHA-LEÃO, M. H.; BOROJEVIC, R.; ROSSI, A. M.; ROSA, F. P., FARINA, M. Hydroxyapatite-alginate biocomposite promotes bone mineralization in different length scales in vivo. *Front. Mater. Sci. China*, v.3, n.2, p.145-153, 2009.

PEÑA, J.; VALLET-REGI, M. Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique. *Journal of the European Ceramic Society*, v.23, p.1687-

1696, 2003.

PETERS, F.; SCHWARZ, K.; EPPLER, M. The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis. *Thermochimica acta*, v.361, p.131-138, 2000.

PIATTELLI, A.; SCARANO, A.; PIATTELLI, M.; CORAGGIO, F.; MATARASO, S. Bone Regeneration using bioglass: an experimental study in rabbit tibia. *J. Oral Implant.*, v.26, n.4, p.257-261, 2000.

PRATIHAR, S. K.; GARG, M.; MEHRA S.; BHATTACHARYYA, S. Phase evolution and sintering kinetics of hydroxyapatite synthesized by solution combustion technique. *J Mater Sci Mater Med.*, v.17, n.6, p.501-507, 2006.

RAMESH, S.; NIAKAN, A., RAMESH, S.; TAN, C. Y.; HAMDI, M.; TENG, W. D. Sintering properties of hydroxyapatite powders prepared using different methods, *Ceram. Inter.*, v. 39, p.111-119, 2013.

RANDOLPH, A. D.; LARSON, M. A. *Theory of particulate processes: Analysis and techniques of continuous crystallization*. 2.ed. New York: Academic Press, 1986.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. Biomaterials science: an interdisciplinary endeavor. In: *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego: Academic Press, 1996. p.1-8.

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLANT, D. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering, *Biomaterials*, v.23, p.1072-1088, 2002.

REYES-GASGA, J.; GARCIA, G. Chemical and structural characterization of human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. In: SBPMat - ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS, 1, 2002, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: 2002.

ROACH, H. I. Bone Anatomy and cell biology. ECTS *The European Calcified Tissue Society*. Disponível em <<http://www.ectsoc.org/review.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2003.

RODRIGUES, L. R. *Síntese e caracterização de hidroxiapatita etitânia nanoestruturadas para a fabricação de compósitos*. Campinas: UNICAMP, 2008. (Dissertação, Mestrado)

SADAT-SHOJAI, M. Synthesis methodis for nanosized hydroxyapatite with diverser structure. *Acta Biomater*, 2013.

SALGADO, J. F. M. *Avaliação da velocidade do processo de regeneração óssea primária, conjugando, a técnica de regeneração óssea guiada com membrana de colágeno aniônico e terapia laser baixa potência*. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2002. 117p. (Dissertação, Mestrado em Bioengenharia).

SANTOS, H. M. *Síntese e Caracterização de Biocompósitos Fosfato de Cálcio/Colágeno Dopados com Zinco*. Belo Horizonte: UFMG, 2005. (Tese, Doutorado).

SANTOS, M. H.; VALERIO, P.; GOES, A. M.; LEITE, M. F.; HENEINE, L. G. D.; MANSUR, H. S. Biocompatibility evaluation of hydroxyapatite/collagen nanocomposites doped with Zn^{+2} . *Biomedical Materials*, v.2, p.135-141, 2007.

SANTOS, M. H.; HENEINE, D. G. L.; MANSUR, H. S. Synthesis and characterization of calcium phosphate/collagen biocomposites doped with Zn^{2+} . *Materials Science and Engineering*, v.C28, p.563-571, 2008.

SANTOS, M. H.; MANSUR, H. S. Synthesis control and characterization of hydroxiapatite prepared by wet precipitation routes, *Mater. Res.*, v.7, n.4, p.625-630, 2004.

SASTRE, R.; AZA, S.; ROMÁN, J. S. *Biopolímeros de origen natural*, Biomateriales. Faenza, Itália, 2004. 515p.

SCHNETTLER, R.; ALT V.; DINGELDEIN, E. Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials*, v.24, p.4603-608, 2003.

SCHUMANN, W. *Minerals of the world*. New York: Sterling, 1992.

SHALAK, R.; FOX, C. Tissue engineering proceedings. In: Workshop, 1988, Granlibakken, Lake Tahoe, California. New York: Alan Liss, February 26-29.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. *Principles of instrumental analyses*. 4ª ed. [s.l.]: Saunders

College Publishing, 1992. 700p.

SŁOSARCZYK, A.; PASZKIEWICZ, Z.; PALUSZKIEWICZ, C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by methods. *Journal of Molecular Structure*, v.78. p.657-661, 2005.

SOUZA, L. R. Análise bidimensional de tensões em implantes de nióbio e titânio pelo método dos elementos finos. Uberlândia: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, 2006. (Dissertação, Mestrado).

STEVENS, M. M.; GEORGE, J. H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science*, v.310, n.18, p.1135-1138, 2005.

SYGNATOWICZ, M.; KEYSHAR, K.; TIWARI, A. Antimicrobial Properties of Silver-doped Hydroxyapatite nano-powders and Thin Films. *Biological Biomedical Materials*, v.62, p.65-70, 2010.

TAMAI, M.; NAKAOBA, R. I. K.; TSUCHIYA, T. Synthesis of a novel b-tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties, *J Artif Organs*, v.10, p.22-28, 2007.

TANG, Z. Y.; WANG, Y.; PODSIADLO, P. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials*, v.18, n.24, p.3203-3224, 2006.

TEN CATE, A. R. *Oral histology: development, structure and function*. 4.ed. Mosby, 1994.

THIBAUT, R. A.; MIKOS, A. G.; KASPER, F. K. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on demineralized and devitalized biodegradable polymer and extracellular matrix hybrid constructs. *Adv. Healthcare Mater*, v.2, p.13-24, 2013.

TIRREL, M.; KOKKOLI, E.; BIESALSKI, M. The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science*, v.500, p.61-83, 2002.

USKOKOVIC, V.; USKOKOVIC, D. P. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials*, v.96, p.152-191, 2011.

VENKATESAN, J.; QIAN, Z. J.; RYU, B.; KUMAR, N. A.; KIM, S. K. Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted chitosan – hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Carbohydrate polymers*, v.83, p.569-577, 2011.

VERNA, C.; BOSCH, C.; DALSTRA, M.; WIKESJÖ, U. M.; TROMBELLI, L. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. *J. Clin. Periodontol.*, v.29, n.9, p.865-870, 2002.

VILLANI, A.; MILLAÁN, A.; GONZALEZ, G. *Caracterización Físico-Química Y Cerámica de Hidroxiapatitas Producidas por Distintos Métodos de Síntesis (Parte I)*. *Revista de La Facultad de Ingeniería U.C.V.*, v.27, n.4, p.7-16, 2012.

VISTICA, D. T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Research*, v.51, p.2515-2520, 1991.

WEBSTER, T. J.; MASSA-SCHLUETER, E. A.; SMITH, J. L.; SLAMOVICH, E. B. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations. *Biomaterials*, v.25, p.2111-2121, 2004.

WEINAND, W. R. *Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis*. Maringá: Departamento de Física – UEM, 2009. (Tese, Doutorado)

WIDU, F.; DRESCHER, D.; JUNKER, R.; BOURAUDEL, C. Corrosion and biocompatibility of orthodontic wires. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v.10, p.275, 1999.

WILLIAMS, D. F. Definitions in Biomaterials, Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials. *Progress in Biomedical Engineering*, Chester, England: Elsevier, 4, 1987.

YANG, X.; WANG, Z. Synthesis of biphasic ceramics of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate with controlled phase content and porosity, *Journal of Materials Chemistry*, v.8, p.2233-2237, 1998.

YOKOYAMA, A.; WATARI, F.; MIYAO, R. Mechanical Properties and Biocompatibility of Titanium-Hydroxyapatite Implant Material Prepared by Spark Plasma Sintering Method. *Bioceramics 13. Key Engineering Materials*, v.192-195, p.445-448, 2001.

ZANETTA, B. D.; AGOSTINHO, L. G. D., GOMIDE, H. A. Reações teciduais ao implante de corpos de nióbio. Estudo histológico em ratos. *ABO Nacional*, v.10, n.1, p.160-164, 2002.

ZHANG, L.; XU, T.; LIN, Z. Controlled release of ionic drug through the positively charged temperature-responsive membranes. *Journal of Membrane Science*, v.281, p.491-499, 2006.

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, R. B.; RESENDE, A. M.; SANTOS, A. P. M. Avaliação da capacidade de selamento marginal do esmalte e da dentina utilizando diferentes sistemas adesivos e tratamentos superficiais, *Braz Dent Sci*, v.12, n.4, p.52-58, 2009.

ARIAS, J. L.; FERNANDEZ, M. S. Biomimetic processes through the study of mineralized shells. In: SBPMat - ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS, 1, 2002, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro, 2002.

ASHBY, M. F. Criteria for Selection the Components of Composites. *Acta Metall. Mater*, v. 41, n.5, p.1313-35, 1993.

BASURTO, S. G. *et.al.* Evaluación *in vitro* de la microdureza superficial de diferentes resinas comerciales, frente a la acción de una bebida gaseosa, *Revista Odontológica Mexicana*, v. 14, n.1, p.8-14, 2010.

BLACK, J.; HASTINGS, G. *Handbook of Biomaterial Properties*. London: Chapman & Hall, 1998.

BORGES, A. P. B. *et al.* Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeitos experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos e microscopia eletrônica de transmissão, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.52, p.616-620, 2000.

BOULER J. M; DACTULS G. In citro carbonated apatite precipitation calcium phosphate pellets presenting various HAP - β TCP ration; *Key Engineering Materials*, v.192, p.119, 2001.

BUDINSKI, K. G. *Engineering Materials; properties and selection*. New Jersey: Prentice Hall International, 1996.

CARLINI-JÚNIOR, B. Influência da profundidade dentinária na resistência à microtração de sistemas adesivos de condicionamento ácido total e autocondicionante. *Rev Odonto Ciênc*, v.23, n.2, p.150-155, 2008.

CAVALCANTE, L. M. *et al.* Efeito da ciclagem térmica na microinfiltração e microtração de restaurações de resina Composta, *Revista da Faculdade Odontologia da Universidade de Passo Fundo*, v.14, n.2, p. 132-138, 2009.

CECCHINA, D. *et al.* Influência da profundidade dentinária na resistência à microtração de sistemas adesivos de condicionamento ácido total e autocondicionante. *Rev Odonto Ciênc*,

v.23, n.2, p.150-5, 2008.

COSTA, H. S. *et al.* Synthesis, neutralization and blocking procedures of organic/inorganic hybrid scaffold for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*, v.20, p.529-535, 2009.

DE GROOT, K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials*, v.1, n.47, p.47-50, 1980.

DE SOUZA, R. M. F.; FERNANDES, L. E.; Guerra, W. Nióbio. *Revista Química Nova na Escola*, v.34, n.3, 2012.

DUMONT, V. C. *Caracterização e Avaliação da Resistência à Adesão de Sistema Adesivo Dentário Processado com Nanopartículas de HA*. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina-M.G., 2012, (Dissertação, Mestrado).

EISENBERGER, P. Biomaterials and medical implant science: present and future perspectives:a sumary report. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.32, p.143-147, 1996.

FARINA, M. Fundamentos da microscopia analítica para biólogos. In: SOUZA, W. *Técnicas básicas em Microscopia Eletrônica aplicadas às ciências biológicas*. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1998. p.161-177.

FATHI, M. H. *et al.* Novel Hydroxyapatite/ niobium surfasse coating for endodontic dental implant. *Surf. Eng.*, v.22, p.353, 2006.

FELIU, S.; ANDRADE, M. C. *Corrosion y Proteccion Metalicas*, Serie Nueva Tendencias, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas. Madrid, vol.II, 1991.

FENG, Q. L. *et al.* Influence of solution conditions on deposition of calcium phosphate on titanium by NaOH-treatment. *J. Cryst., Growth*, v.210, p.735, 2000.

FRANCO, K. L. *et al.* Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita sintética associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tibia de cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.4, 2001.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hidroxyapatite at nearphysiological temperature. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.3, p.299-305, 1992.

GARCIA, R. N. *et al.* Avaliação da resistência de união de sistemas restauradores contemporâneos em esmalte e dentina. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, v.8, p.60-67, 2011.

GAUGLITZ, R. *et al.* Immobilization of Heavy Metals by Hydroxylapatite. *Radiochimica Acta*, v.58/59, p.253-257, 1992.

HAYEK, E.; NEWESLEY, H. *Inorganic Syntheses*. 7ed. New York: McGraw Hill, p.63-65, 1963.

HELENA, M. P. G. *Avaliação do comportamento a corrosão e da citocompatibilidade de uma liga ortopédica de Co-Cr-Mo*. Lisboa: FCUL – Universidade de Lisboa, 1995. (Tese, Doutorado).

HENCH, L. L.; WILSON, J. *An introduction to bioceramics*. Singapore: World Scientific, 1993.

HONDA, T. *et al.* Post-composition control of hydroxyapatite in an aqueous medium. *J. Mater. Sci.: Mater. Med*, v.1, p.114-117, 1990.

KANZAKI, N. *et al.* Direct growth rate measurement of hydroxiapatite single crystal by moire phase shift interferometry. *Journal of Physics and Chemistry*, v.102, p.6471- 6476, 1998.

KHAN, A. S. *et al.* Structural and in vitro adhesion analysis of a novel covalently coupled bioactive composite. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*; v.100, p.239-248, 2012.

KIHARA, T. *et al.* *Biocerâmica*. São Paulo: Instituto de Geociências - Universidade de São Paulo, 2003.

LEEuw, N. H. Density functional theory calculations of local ordering of hydroxy groups and fluoride ions in hydroxyapatite. *Journal of Owner Societies*, v.4, n.108, p.3865-3871, 2002.

LEGEROS, R. Z. CaP Materials: a Review. *Adv Dent Res*, v.3, p.164-180, 1988.

LI, P.; de GROOT, K.; KOKUBO, T. P. Bioactive $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{-TiO}_2$ Composite Coating Prepared by Sol-Gel Process. *J. of Sol-Gel Science and Technology*, v.7, p.27-30, 1996.

LIU, H. S. *et al.* Hydroxyapatite synthesized by a simplified hydrothermal method. *Ceramic*

International, v.23, p.19-25, 1997.

MA, Q. Y. *et al.* Effects of NO_3^- , Cl^- , F^- , SO_4^{2-} , and CO_3^{2-} on Pb^{2+} Immobilization by Hydroxyapatite. *Env. Sci. Technol*, v.28, p.408-418, 1994.

MANSUR, H. S. UV- visible and FTIR characterization of B.S.A. protein incorporation in porous sol-gel matrices. *Journal of Medical & Biological Engineering*, v.37, supl 2, p.372; 1999.

MANSUR, H. S. *Análise e caracterização de superfícies e interfaces*, Biomateriais. Fundamentos e Aplicação. 1ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Minas. Universidade Federal de Minas Gerais, 2012. Cap.7.

MANSUR, H. S.; MANSUR, A. A. P.; BICALHO, S. M. C. M. Lignin hydroxyapatite/tricalcium phosphate biocomposites: SEM/EDX and FTIR characterization. *Key Engineering Materials*, v.284-286, p.745-748, 2005.

MARSHALL JR, G. W. *et al.* The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *Journal of Dentistry*, v.25, n.6, p.441-58, 1997.

MATOS, A. B. *et al.* Estudo de resistência à tração de três sistemas adesivos associados a resina composta em superfícies dentinárias. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, v.15, p.161-165, 2001

MOREIRA, A. S. B.; PASTORELI, M. T.; DAMASCENO, L. H. F. Influence of dimensions of hydroxyapatite granules upon bone integration: in experimental study. *Acta ortop. Bras.*, v.11, n.4, p.240-250, 2003.

MOSTAFA, N. Y. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. *Materials chemistry and physics*, 2005.

NORDSTROM, E. G.; KARLSSON, K. H. Carbonate-doped Hydroxyapatite. *J. Mater. Med*, v.1, n.3, p.182-184, 1990.

OHIO, P. *Metals Handbook*. 9ed. American Society for Metals (ASM), v.11, 1980.

OLIVEIRA, M.; MANSUR, H. S. Synthetic Tooth Enamel: SEM Characterization of a Fluoride Hydroxyapatite Coating for Dentistry Applications. *Material Research*, v.7, n.4, p.625-30, 2004.

OLIVEIRA, S. V. *et al.* Estudo das biocerâmicas em forma de pó para aplicações clínicas. In:

18º CBECiMat – CONGRESSO BRASILEIRO de ENGENHARIA e CIÊNCIAS dos MATERIAIS, *Anais...* 2008.

ONO, I.; TATESHITA, T.; NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials*, v.21, p.143-151, 2000.

PARRIS, G. E.; ARMOR. Catalytic cracking of organic amides: I. Production of N-vinylformamide. *Journal Applied Catalysis*, v.78, n.1, p.45-64, 1991.

PAULA, C. R.; PEREIRA, M. A. Estudo comparativo da eficácia de dois sistemas adesivos na microinfiltração marginal. *Rev. biociênc.*, v.9, n.2, p.53-61, 2003.

PERDIGÃO, J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dental Material*, v.26, p.24-37, 2010.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Novos biomateriais: híbridos orgânico inorgânicos bioativos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.9, p.104-109, 1999.

PHAN, M. T. *et al.* Promoted hydroxyapatite nucleation on titanium ion-implanted with sodium. *Thin Solid Films*, v.379, p.50-56, 2000.

POLLICK, S. *et al.* Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramic placed in bone and ectopic sites. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.53, p.915-922, 1995.

RAMIRES, I.; GUASTALDI, A. C. Estudo dos biomateriais Ti-6Al-4V empregando-se técnicas eletroquímicas e XPS. *Quim. Nova*, v.25, 2002.

RESENDE, A. M.; PAGANI, C.; ARAÚJO, M. A. M. Evaluation of the marginal leakage in composite resin restorations, varying the cavity form and methods for enamel marginal finishing: manual and rotatory instruments, Er:YAG and Nd:YAG lasers. *Ciência Odontológica Brasileira*, v.11, n.1, p.76-83, Jan. 2008.

RIBEIRO, C. *Processamento e caracterização de cerâmicas à base de hidroxiapatita e fosfato tricálcico*. São Paulo: IPEN, 2003. (Dissertação, Mestrado).

RODRIGUEZ-CLEMENTE, R. *et al.* Hydroxyapatite precipitation: a case of nucleation-aggregation-agglomeration-growth mechanism. *Journal of the European Ceramic Society*, v.18, p.1351-1356, 1998.

RODRIGUEZ-LORENZO, L. M.; VALLET-REGI, J. M. Fabrication of hydroxyapatite bodies by uniaxial pressing from a precipitated powder. *Biomaterials*, v.22, p.583-588, 2001.

ROSSI, A. M. *et al.* A ciência e a tecnologia das biocerâmicas. *Revista do CBPF*, p.54-56, 2000.

SADAT-SHOJAI, M. *et al.* Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: synthesis and application. *Dental Materials*, v.26, n.5, p.471-82, 2010.

SAKANO, H. *et al.* Treatment of the instable distal radius fracture with external fixation and a hydroxyapatite spacer. *J. Hand Surg.*; v.26, p.923-929, 2001.

SANTOS, M. H. *et al.* Biocompatibility Evaluation of Hydroxyapatite Collagen Nanocomposites. *Materials Research*, v.10, n.2, p.115-18, 2007.

SHEU, M. T.; HUANG; JU CHUN. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials*, v.22, p.1713-19, 2001.

SILVA, P. R. F. *et al.* Caracterização química, molecular e mecânica de um compósito odontológico nanoparticulado. *Exacta*, v.8, n.1, p.55-63, 2010.

STROZ, O.; GASTHURBER, H.; WOYDT, M. Tribological properties of thermal-sprayed

Magneli-type coatings with different stoichiometries (TiO_{2n-1}). *Surf. Coat. Technol.*, v.76, p.140, 2001.

THIBAUT, A. R.; MIKOS, G. A.; KASPER, K. F. Scaffold/Extracellular Matrix Hybrid Constructs for Bone-Tissue Engineering. *Adv. Healthcare Mater.*, v.2, p.13-24, 2013.

TOMIYAMA, M.; SUZUKI, C. K. *Síntese e Caracterização de nano vidros de sílica para pré-forma de fibra óptica*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Materiais, 2003. p.22-25 (Tese, Doutorado em Engenharia de Materiais).

VAN MEERBEEK, B. *et al.* Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dental Material*, v.26, p.100-121, 2010.

VAN VLACK, L. H. *Princípios de Ciência e Tecnologia dos Materiais*. 4ed. Rio de Janeiro: Editora Campus. 1984.

VARMA, H. K.; BABU, S. S. Synthesis of calcium phosphate bioceramics by citrate gel pyrolysis method. *Ceramics International*, v.31, p.109-114, 2005.

WEI, G.; Ma, P. X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, v.25, n.19, p.4749-4757, 2004.

YUBAO, L.; XINGDONG, Z.; Groot, K. Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, v.18, p.737, 1997.

ZENG, H.; LACEFIELD, W. R. XPS, EDX, and FTIR analysis of pulsed laser deposited calcium phosphate bioceramic coatings: the effects of various process parameters. *Biomaterials*, v.21, p.23-30, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1

Derivada de Perda de Massa

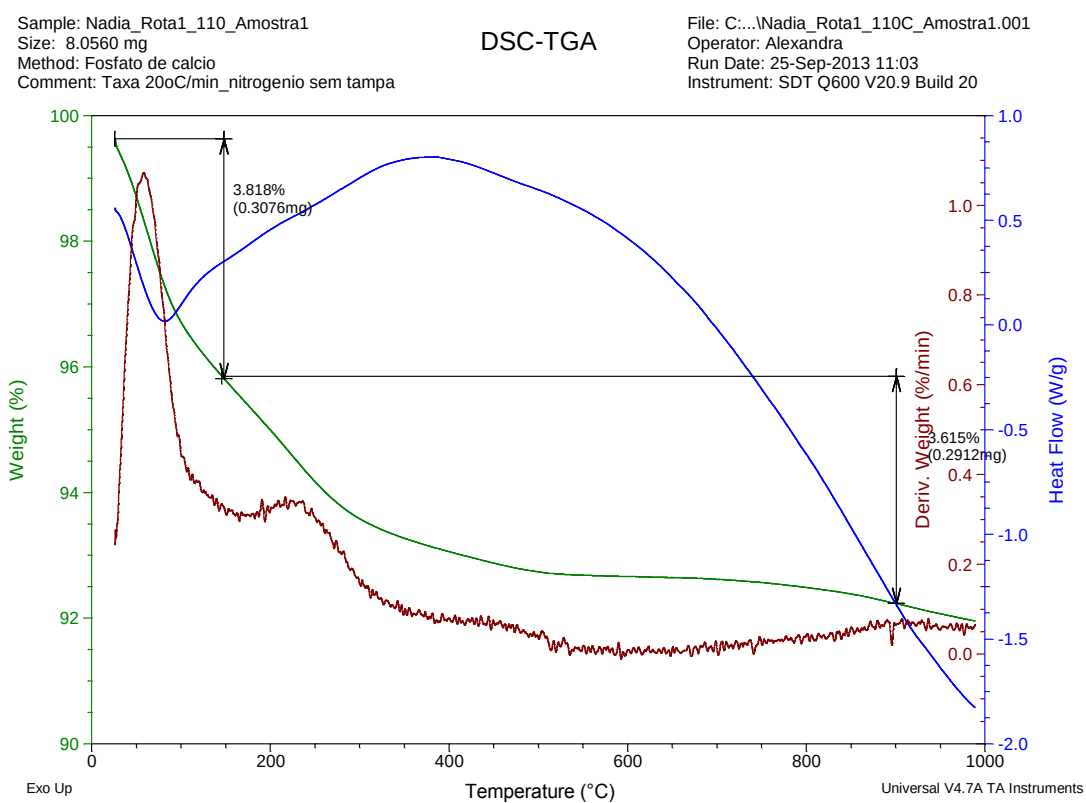


Figura 1 - Análise de Perda de Massa – HAP_110

Sample: Nadia_Rota1_900_Amostra2
 Size: 8.2240 mg
 Method: Fosfato de calcio
 Comment: Taxa 20oC/min_nitrogenio sem tampa

DSC-TGA

File: C:\...\Nadia_Rota1_900C_Amostra2.001
 Operator: Alexandra
 Run Date: 26-Sep-2013 10:44
 Instrument: SDT Q600 V20.9 Build 20

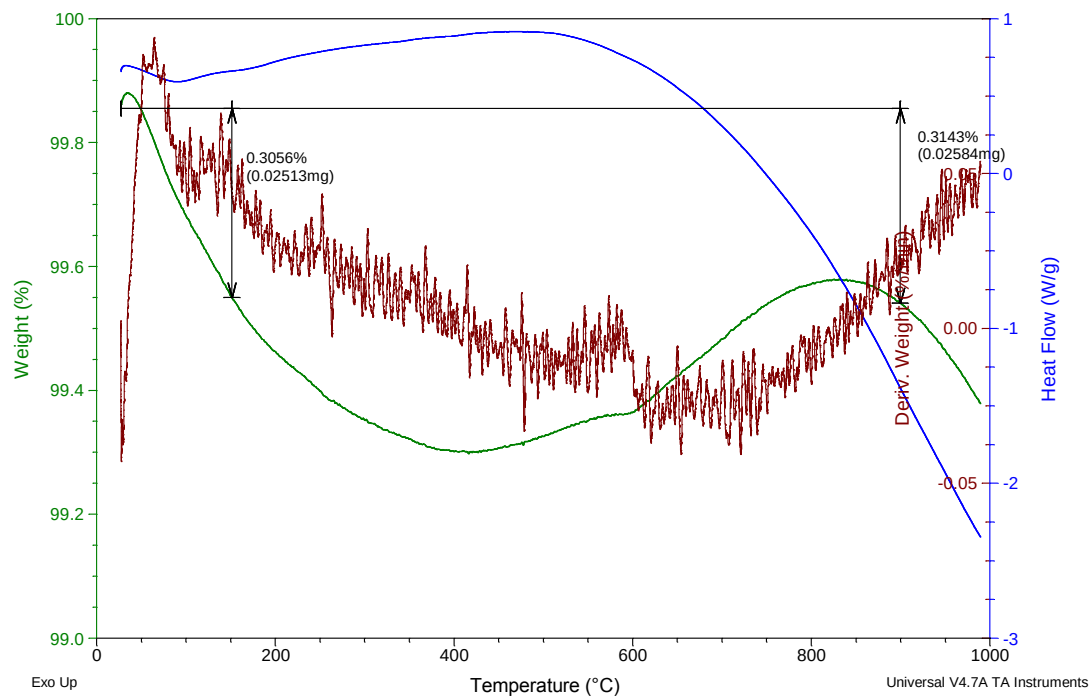


Figura 2 - Análise de Perda de Massa – HAP_900