



REDEMAT

REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

UFOP – CETEC – UEMG



Dissertação de Mestrado

Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética



Autor: Gerson José de Oliveira Vaz
Orientador: Prof. Dr. Antonio Valadão Cardoso
Co-orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva



Novembro de 2007



REDEMAT

REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

UFOP – CETEC – UEMG

Gerson José de Oliveira Vaz

“Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética”

Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais da REDEMAT.

Área de concentração: Processo de Fabricação.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Valadão Cardoso

Co-orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

Belo Horizonte, 14 de novembro de 2007

V393p

Vaz, Gerson José de Oliveira.

Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética [manuscrito] / Gerson José de Oliveira Vaz. – 2007.

xiii, 92 f. : il. color., graf., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Valadão Cardoso.

Co-orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Rede Temática em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Processo de fabricação.

1. Fosfato de cálcio - Teses. 2. Hidroxiapatita - Teses. 3. Porosidade - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 661.632

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

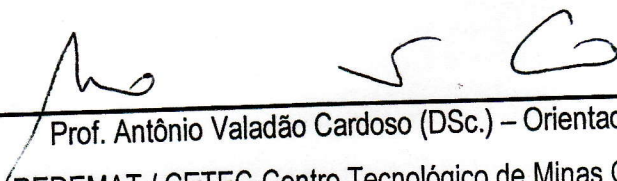


“Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética”

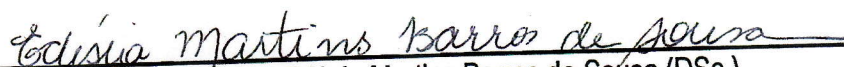
Autor(a): Gerson José de Oliveira Vaz




Dissertação defendida e aprovada, em 14 de novembro de 2007, pela banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Antônio Valadão Cardoso (DSc.) – Orientador
REDEMAT / CETEC-Centro Tecnológico de Minas Gerais



Prof. Edésia Martins Barros de Sousa (DSc.)
CDTN -Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear



Prof. Fernando Gabriel da Silva Araújo (DSc.)
REDEMAT / Universidade Federal de Ouro Preto / DEFIS

O sucesso não está no futuro ou passado,
mas a cada atitude positiva tomada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e em particular:

- aos meus queridos pais, Wilma e Diamantino, e à Tania Regina, pelo afeto, apoio e motivação,
- ao meu prezado orientador, Dr. Antônio Valadão Cardoso, que me incentivou nesse aprendizado, ao amigo co-orientador Dr. Sidney Nicodemos da Silva, aos professores do programa de engenharia de materiais - REDEMAT, e Ana Maria de S. A. e Silva secretária do curso de pós graduação da REDEMAT - UFOP.
- ao amigo cientista Dr. Creig Shevlin, pelas vibrantes discussões científicas e aos amigos pesquisadores Antônio C. V. Alves, Antônio Mendes, José Miguel Delgado Q. e Vitor J. P. Gouveia, pelas sugestões e colaborações científicas.
- aos amigos funcionários e bolsistas dos laboratórios do CETEC, pela ótima convivência.
- à Fundação Centro de Tecnologia de Minas Gerais (CETEC) e à Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), onde foram realizadas atividades laboratoriais e de ensino, à FUNED pelos testes de citotoxicidade e à INSIDE Matérias Avançadas Ltda., que cedeu os pós de hidroxiapatita sintética.
- à CAPES e FAPEMIG pelo suporte financeiro.
- à DEUS.

Sumário

Lista de Figuras	III
Lista de Tabelas	VI
Abreviaturas	VII
Resumo	IX
Capítulo 1: Introdução	1
Capítulo 2: Objetivos	3
2.1 - Objetivo Geral	3
2.2 - Objetivos Específicos	3
Capítulo 3: Revisão Bibliográfica	4
3.1 - Biomaterial	4
3.2 - Implantes com biocerâmicas	7
3.3 - Biocerâmicas da família das apatitas (fosfatos de cálcio)	8
3.3.1 - Fases presentes em uma biocerâmicas de fosfato de cálcio	14
3.3.2 - Aplicação das biocerâmicas como revestimento de substratos metálicos	15
3.4 - Porosidade dos sólidos:	16
3.5 - Os ossos	18
3.6 - Estudo dos enxertos ósseos, precursores dos implantes cerâmicos.	20
3.6.1 - Outros agentes promotores da mineralização óssea	21
3.6.3 - Fatores reguladores do tecido ósseo	23
3.7 - Andaime ou Scaffold – Matriz extracelular temporária para o crescimento ósseo ..	23
3.7.2 - Interface entre os scaffolds cerâmicos e as células.	24
3.7.3 - Recuperação do tecido ósseo.	25
3.7.4 - Breve revisão dos materiais empregados na obtenção de cerâmicas porosas de fosfatos de cálcio neste trabalho.	28
3.7.5 – Citotoxicidade - Testes de Difusão em Ágar (ASTM-F895)	29
Capítulo 4: Materiais e Métodos	30
4.1 - Seleção e preparação das matérias-primas empregadas na elaboração das cerâmicas porosas	31
4.2.1 – Tratamento térmico do osso bovino para obtenção de fosfatos de cálcio	32
4.2 – Produção de pastilhas.	32
4.3 - Sinterização	34
4.4 - Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM)	34
4.4.1 - Medida do ângulo de contato (AC)	35
4.5 - Microscopia:	37
4.6 - Difração de Raios X	37
4.6.1 - Método Rietveld (MR)	38
Capítulo 5: Resultados e Discussão	42
5.1 - Produção dos pós com hidroxiapatita	42
5.2 - Características das amostras cerâmicas sinterizadas	45
5.3 - Teste de citotoxicidade in vitro, estudo preliminar	49
5.4 - Micrografias da pastilha P11	51
5.5 - Medidas do ângulo de contato (AC) por fotometria e AutoCad® para uso na determinação do tamanho do poro pelo ensaio de Porosimetria de Intrusão de Mercúrio (PIM).	52

5.5.1 - Medida do Ângulo de Contato (AC) por análise de imagem fotográfica.	52
5.6 - Porosimetria por Intrusão de Mercúrio	55
5.6.1 – Porosidade da materia prima. Medidas da distribuição de porosidade de ossos da parte cortical da tíbia de bovinos, por meio da porosimetria de intrusão de mercúrio... ..	55
5.6.1 - Porosimetria por PIM: Influência dos aditivos na porosidade.	59
5.7 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	63
5.8 - Fluorescência de Raios-X_ Análise semi-quantitativa	66
5.9 - Difratoograma de Raios - X	68
Capítulo 6: Conclusões.....	72
Trabalhos Futuros:.....	74
Anexos.....	84
Anexo I - Diagramas de fase para o sistema binário CaO-P ₂ O ₅ e sistemas com introdução de álcalis.....	85
Anexo II - Fabricação de cadelhos de alumina pelo processo de colagem.....	92

Lista de Figuras

FIGURA 3. 1- APLICAÇÕES DAS HIDROXIAPATITAS, ADAPTADO (HENCH E WILSON, 1993) E (HUMAN BODY, 2007)	6
FIGURA 3. 2- ESTRUTURA DA HIDROXIAPATITA, O ÍON OH (VERMELHO), EM UM DADO PLANO, ESTÁ NORMALMENTE CENTRADO E EQUIDISTANTE DO TRIÂNGULO DE CÁLCIO (AZUL) MAIS PRÓXIMO, ADAPTADO. (SATO, KOGURE <i>ET AL.</i> , 2002)E(ANDRADE, BORGES <i>ET AL.</i> , 2001).....	11
FIGURA 3. 3 - O EFEITO DE DIFERENTES ÍONS NA FORMA DO CRISTAL DE HIDROXIAPATITA (PUTLYAEV E SAFRONOVA, 2006).....	12
FIGURA 3. 4- DIAGRAMA DE EQUILÍBRIO DE FASE, SOB PRESSÃO PARCIAL DE ÁGUA DE 500 TORR (66 KPA) GROOT, 1990 <i>IN</i> (HENCH, 1991). OBS. (HA = HIDROXIAPATITA, C = CAO E P = P ₂ O ₅).....	13
FIGURA 3. 5 - DIAGRAMA DE FASE CAO-P ₂ O ₅ . EM DESTAQUE O QUADRO MOSTRA A LINHA LIQUIDUS DE 3CAO.P ₂ O ₅ (EISENHUTTEBLEUTE, 1981).....	13
FIGURA 3. 6 - SEÇÃO DE UM OSTEON MOSTRANDO A VASCULARIZAÇÃO PELA POROSIDADE ÓSSEA (COWIN, STEPHEN C., 1999).....	17
FIGURA 3. 7 - MINERALIZAÇÃO DO COLÁGENO, ADAPTADO. (BOSKEY E PASCHALIS, 2000)..	17
FIGURA 3. 8 - ESQUEMA TRIDIMENSIONAL MOSTRANDO O ASPECTO EM CORTE LONGITUDINAL E TRANSVERSAL DA DIÁFISE DE UM OSSO LONGO ADULTO. ESTE ESQUEMA MOSTRA AS RELAÇÕES ENTRE OS VASOS SANGÜÍNEOS DO PERÍÓSTEO, OS CANAIS DE VOLKMANN, OS SISTEMAS HAVERSIANOS E A CAVIDADE DA MEDULA ÓSSEA (HAM, 1965), ADAPTADO.....	19
FIGURA 3. 9 - ESQUEMA COM AS FASES DE EVOLUÇÃO DE UM ENXERTO NA FORMA DE UM BLOCO DE CÔRTEX CORTADO, LIVRE DE SEU SUPRIMENTO SANGÜÍNEO E COLOCADO NOVAMENTE NO PONTO LESADO (HAM, 1977), ADAPTADO.....	20
FIGURA 3. 10 - (A) IMAGEM EM 3-D POR TOMOGRAFIA MICRO-COMPUTORIZADA (MCT) DE UM SCAFFOLD DE HAP POROSO FABRICADO POR <i>SLIP-CASTING</i> (SC), (B) MICROGRAFIA POR MEV DEMONSTRANDO UMA INTERCONETIVIDADE ALEATÓRIA DOS POROS EM UM SCAFFOLD DE HAP, (C) IMAGEM DE UM SCAFFOLD DE PDLLA FABRICADO USANDO O PROCESSO DE SC COM CO ₂ E (D) DE UM SCAFFOLD DE PDLLA (M.M.C.G. SILVA, L.A. CYSTER <i>ET AL.</i> , 2006).....	24
FIGURA 3. 11 - A ARQUITETURA DO SCAFFOLD AFETA A LIGAÇÃO E O ESPALHAMENTO CELULARES (STEVENS E GEORGE, 2005).....	25
FIGURA 3. 12 - ESQUEMA ILUSTRA UM ESPAÇO PROTEGIDO PARA GARANTIR A REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO (RALPH E. HOLMES, LEMPERLE <i>ET AL.</i> , 2001).....	26
FIGURA 3. 13 - A SEQUÊNCIA DE IMAGENS REPRESENTA OS PASSOS DE PROCESSAMENTO REQUERIDOS PARA OTIMIZAR O SCAFFOLD DE HIDROXIAPATITA (HAP) QUE FOI AJUSTADO NA PARTE DANIFICADA DA MANDÍBULA DO PACIENTE: A IMAGEM OBTIDA DA MANDÍBULA DANIFICADA POR TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (ESQUERDA) POSSIBILITA O PROJETO DA PARTE A SER RESTAURADA (CENTRO) E UMA ESTRUTURA PERIÓDICA POROSA DE HAP É REPRODUZIDA (DIREITA) (LEWIS, SMAY <i>ET AL.</i> , 2006)....	27
FIGURA 3. 14 - SCAFFOLD 3D DO POLÍMERO PLG SEMEADO COM CÉLULAS CANCERÍGENAS (ESQUERDA). CORTE TRANSVERSAL DO TUMOR CÉLULA – POLÍMERO CRESCIDO <i>IN VITRO</i> (CENTRO) E <i>IN VIVO</i> (DIREITA). (*) INDICA FRAGMENTOS DO SCAFFOLD POLIMÉRICO. (FISCHBACH, CHEN <i>ET AL.</i> , 2007).....	28
FIGURA 4. 1 - MATRIZ PARA CONFECÇÃO DE PASTILHAS CERÂMICAS COM DIÂMETRO DE 25 MM.	33
FIGURA 4. 2 - FIGURA ÂNGULO DE CONTATO OBTIDO PELA FOTOGRAFIA DA GOTA SOBRE O SUBSTRATO. À ESQUERDA, TEM-SE UMA GOTA DE ÁGUA SOBRE UMA PEÇA EM AÇO INOX (PASSIVADO), ÂNGULO DE CONTATO IGUAL A 90°. À DIREITA, É MOSTRADO O	

CÁLCULO GEOMÉTRICO DO ÂNGULO DE CONTATO FORMADO PELA DA TANGENTE DO PONTO DA INTERFACE ENTRE A GOTA DE MERCÚRIO DEPOSITADA SOBRE O MESMO SUBSTRATO DE AÇO RESULTANDO EM $AC= 134^\circ$	36
FIGURA 4. 3 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRAS PARA ANÁLISE NO MEV. PÓ DA AMOSTRA X EM FITA (A) E PASTILHA DA AMOSTRA PX (B), TRATADAS COM VAPORIZAÇÃO DE CARBONO. SUPORTE 1X1	40
FIGURA 5. 1 - OSSO BOVINO, CALCINADO À 750 °C	42
FIGURA 5. 2 - VALORES DE PH DAS AMOSTRAS DOS PÓS DE OSSO BOVINO TRATADO A 750 °C, DO PÓ COMERCIAL E DE UMA CERÂMICA PX EM MEIO AQUOSO OBTIDOS EM FUNÇÃO DO TEMPO. TEMPERATURA DO ENSAIO: 37°C	44
FIGURA 5. 3 - DRX DO PÓ DA AMOSTRA X2 CALCINADA À 750 °C, 1H. A FICHA ICCD DE FASE DE HIDROXIAPATITA #9-0432, (ICDD, 2000) APRESENTA CORRELAÇÃO AOS PICOS DA AMOSTRA	46
FIGURA 5. 4 – PASTILHA COMPOSIÇÃO 8 (ESQUERDA) E 9 (DIREITA) PENSADAS COM CARGA DE 4 TONELADAS EM MATRIZ DE 25MM (80 MPA) E SINTERIZADA À 1350 °C EM FORNO ELÉTRICO AO AR	47
FIGURA 5. 5 - AMOSTRAS NO FORMATO DE PASTILHAS, PENSADAS COM 4 TONELADAS EM MATRIZ DE 10 MM E SINTERIZADAS ATÉ 1350 °C POR 4H AO AR. NA LINHA SUPERIOR, CERÂMICAS DO PÓ Y E NA LINHA INFERIOR, CERÂMICAS DE PÓ DE OSSO BOVINO CALCINADO (PX-B)	48
FIGURA 5. 6 - (A) AMOSTRAS DO PÓ Y ESTERILIZADO EM AUTOCLAVE FORAM DEPOSITADAS SOBRE A CULTURA DE CÉLULAS L929 E (B) RESPOSTA NEGATIVA DAS AMOSTRAS APÓS 24 HORAS SEM MANIFESTAÇÃO DO INDICADOR VERMELHO	49
FIGURA 5. 7 - (A) AMOSTRAS DO FX, P10-750, P11-A, P12-B E P11-B NÃO ESTERILIZADAS FORAM DEPOSITADAS SOBRE A CULTURA DE CÉLULAS L929 E (B) MORTE DAS CÉLULAS L929	50
FIGURA 5. 8 - (A) AS AMOSTRAS FORAM FERVIDAS EM ÁGUA DEIONIZADA (B) RESPOSTA POSITIVA DAS AMOSTRAS LOGO APÓS 24 HORAS COM MANIFESTAÇÃO DO INDICADOR VERMELHO INDICANDO A MORTE DAS CÉLULAS L929	51
FIGURA 5. 9 - MICROGRAFIA DE AMOSTRA P11 POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ TRANSMITIDA, 10X ONDE AS ÁREAS CLARAS SÃO POROS (B) MICROGRAFIA DA AMOSTRA P11 POR ESTERIOSCOPIA: LUPA COM AUMENTO DE 10X ONDE A FOTOGRAFIA MOSTRA O PORO E O BRILHO DA FASE VÍTREA	51
FIGURA 5. 10 - MEDIDA DO ÂNGULO DE CONTATO. TÉCNICA DE LEITURA DO AC COM USO DO AJUSTE DE ELIPSE. MEDIDA POR MEIO DA OBTENÇÃO DA TANGENTE NO PONTO DE INTERFACE GOTA/SUBSTRATO. GOTA DE HG / PASTILHA P11: $AC=143^\circ$. APLICATIVO AUTOCAD 6.0®	53
FIGURA 5. 11 - A FIGURA MOSTRA A PONTA DO MICRÔMETRO USADO DURANTE A MEDIDA DA ALTURA DA GOTA DE HG SOBRE A PASTILHA P11, UTILIZADO NO APARELHO DE ANGULÔMETRO	53
FIGURA 5. 12 – POROSIDADE EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA DE TRATAMENTO. AS AMOSTRAS DA TÍBIA BOVINA FORAM TRATADAS TERMICAMENTE A 500 °C, 750 °C, 1050 °C E 1350 °C	56
FIGURA 5. 13 - FRAGMENTO DE OSSO BOVINO CORTICAL TRATADO TERMICAMENTE: (A) 120 °C (B) 500 °C (C) 750 °C (D)1050 °C (E) 1350 °C	57
FIGURA 5. 14 – PIM: VOLUME CUMULATIVO EM FUNÇÃO DO DIÂMETRO DOS POROS , AMOSTRAS PROVENIENTES DO OSSO BOVINO TRATADO TERMICAMENTE A (A) 500 °C, (B) 750 °C, (C) 1050 °C E (D) 1350 °C	58
FIGURA 5. 15 – PIM, VOL. INCREMENTAL EM FUNÇÃO DO DIÂMETRO DOS POROS. OSSO CALCINADO TRATADO TERMICAMENTE (A) 500 °C (B) 750 °C (C) 1050 °C (D) 1350 °C	59
FIGURA 5. 16 - POROSIMETRIA POR INTRUSÃO DE MERCÚRIO (PIM): <i>VOLUME CUMULATIVO X DIÂMETRO DO PORO</i> DE DUAS CERÂMICAS COM FOSFATO DE CÁLCIO. A CERÂMICA P11-500 (ACIMA) PODE SER CONSIDERADA UM <i>SCAFFOLD</i> . JÁ A CERÂMICA PX-500 SE MOSTROU MUITO COMPACTA	61

FIGURA 5. 17 – PIM, A CURVA TRACEJADA CORRESPONDE À AMOSTRA P11-500, E A CURVA CONTÍNUA COM 100 % DE PÓ CALCINADO DE ORIGEM BOBINA PX-500. O GRANDE VOLUME DE POROS NA FAIXA ACIMA DOS 100 μ M ATENDE EM PRINCÍPIO, AS EXPECTATIVAS DE APLICAÇÃO DESSA CERÂMICA, POIS O TAMANHO DAS CÉLULAS É ATÉ 10 VEZES MENOR. A CURVA DA AMOSTRA PX-500 APRESENTA UMA REGIÃO DE POROSIDADE INTERGRANULAR FAIXA DE 1 μ M.	62
FIGURA 5. 18 - MEV (A) PÓ DE OSSO CALCINADO X, MACERADO, 40X. (B) PÓ DE OSSO CALCINADO X, MACERADO, 1000X (C) PASTILHA P11, 100X (D) PASTILHA DE P11, 1000X.	63
FIGURA 5. 19 - OS GRÁFICOS ACIMA APRESENTAM OS ELEMENTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS PELO EDS, (A) AMOSTRA X PURA E EM (B) PASTILHA P11.	64
FIGURA 5. 20 - GRÁFICO DA RELAÇÃO CA/P OBTIDA EDXA DO PÓ DA AMOSTRA X (A) E DA PASTILHA P11 (B).	65
FIGURA 5. 21 - FLUORESCÊNCIA – TRECHO ONDE ESTÃO IDENTIFICADOS OS PICOS DE P E CA NA AMOSTRA X (A) E NA PASTILHA P11 (B).	67
FIGURA 5. 22 - RELAÇÃO CA/P OBTIDO POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X DA AMOSTRA X (A) E DE PÓ DE OSSO CALCINADO E DA PASTILHA P11 (B).	67
FIGURA 5. 23 - DRX DO PÓ DA AMOSTRA X (A) E DA PASTILHA P11 (B) SINTERIZADA À 1350 °C, 4H. AS FASES SÃO IDENTIFICADAS NA AMOSTRA PELOS SÍMBOLOS INDICADOS NA LEGENDA E CORRESPONDEM AS FICHAS DE IDENTIFICAÇÃO DE FASE #9-0432, #09-0169, #37-1497,# 11-0236 (ICDD, 2000).	69
FIGURA 5. 24 - DRX DO PÓ MATÉRIA PRIMA Y (A) E DA PASTILHA P13 (B) SINTERIZADA À 1350°C, 4H. AS FASES SÃO IDENTIFICADAS NA AMOSTRA PELOS ÍCONES INDICADOS NA LEGENDA E CORRESPONDEM AS FICHAS DE IDENTIFICAÇÃO DE FASE #9-0432, #09-0169, #37-1497,# 11-0236 (ICDD, 2000).	70
FIGURA 5. 25 – O GRÁFICO APRESENTA OS DIFRATOGRAMAS SOBREPOSTOS DOS PÓS DA AMOSTRA X E DE Y. MÉTODO DE RIETVELD COM AUXÍLIO DO PROGRAMA FULLPROF-SUITE (FULLPROF, 2007). O TEMPO DE ENSAIO FEITO PELO DRX FOI DE APROXIMADAMENTE 16 HORAS, COM PASSO DE 0,02 A CADA 15 SEGUNDOS, PARA 2 θ ENTRE 4° A 80 °.	71

Lista de Tabelas

TABELA III. 1 – DEFINIÇÕES DE BIOMATERIAL	4
TABELA III. 2 – CLASSE DE MATERIAIS PARA USO NO CORPO	5
TABELA III. 3 - CLASSIFICAÇÃO DA INTER-RELAÇÕES TECIDO COM OS MATERIAIS QUANTO AO TIPO DE RESPOSTA NO MEIO FISIOLÓGICO (HENCH L.L., 1971; HENCH, 1986).	7
TABELA III. 4 - FOSFATOS DE CÁLCIO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS, ADAPTADO. (LEGEROS, 1991).....	10
TABELA III. 5 –PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS FOSFATOS (O'BRIEN, 1996; PARK E BRONZINO, 2002)	15
TABELA III. 6 - CLASSIFICAÇÃO DAS DIMENSÕES DO PORO.....	16
TABELA III. 7 - ANISOTROPIA DO OSSO NAS REGIÕES DA DIÁFISE E METÁFISE DA PARTE CORTICAL DE UM OSSO LONGO (FUNG, 1993).	22
TABELA IV. 1 – MATÉRIAS PRIMAS	31
TABELA IV. 2- COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS PARA FABRICAÇÃO DAS PASTILHAS	33
TABELA IV. 3 PARÂMETROS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE POROSIMETRIA	35
TABELA IV. 4 - PARÂMETROS DE MICROSCOPIA.....	37
TABELA IV. 5 – AMOSTRAS UTILIZADAS PARA O ENSAIO DE DRX	38
TABELA IV. 6 – PARÂMETROS DO ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS –X	39
TABELA V. 1– LEGENDA DOS PÓS E PASTILHAS PARA TESTES DE PH.....	43
TABELA V. 2 - VALORES DE PH DO PÓ EM MEIO AQUOSO (N=5)	44
TABELA V. 3 – PASTILHAS PRODUZIDAS POR SINTERIZAÇÃO ATÉ 1350 °C, 4 HORAS.....	46
TABELA V. 4 - LEGENDA DOS SÍMBOLOS USADOS EQUAÇÕES 5.3, 5.4 E 5.5 E OS VALORES RELACIONADOS PARA O CÁLCULO DO AC DA PASTILHA P11	54
TABELA V. 5 – ÂNGULO DE CONTATO (AC) DAS AMOSTRAS DE FRAGMENTO DE OSSO TRATADO TERMICAMENTE PARA APLICAÇÃO NO ENSAIO DE POROSIMETRIA DE MERCÚRIO.	54
TABELA V. 6 - RESUMO DOS DADOS DE PIM COMPARANDO 2 AMOSTRAS CERÂMICAS.....	60
TABELA V. 7 - RESUMO DE EDXA DAS AMOSTRAS DE PÓ PCO E PASTILHA P11	64

Abreviaturas

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
ASTM	American Society for Testing and Materials
ANSI:	American National Standards Institute
BCP	Fosfato de cálcio bifásico (HA + β -TCP)
DRX	Difração de raio-X
ECM	Matriz Extra Celular
FA	Fluorapatita
EDXA	Análise por energia dispersiva de raios-X
FDA:	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
IL	Índice de lise
IR	Índice de resposta
IZ	Índice de zona
HAp:	Essa abreviação para a palavra hidroxiapatita, vem da abreviação utilizada no conceito de hidroxiapatita na forma de pó usada na tecnologia de spray térmico. Nesse trabalho essa abreviação possui atribuição genérica, referindo apenas à composição da hidroxiapatita.
ISO:	International Standardization for Organization
L-929:	Células de camundongos para uso em teste de citotoxicidade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
pH	Potencial de hidrogênio
PLC	Porosidade Lacunar-Canicular
PLG	Polímero sintético poli(lactídeo-co-glicosídeo)
PTH	Hormônio produzido na glândula da tireóide. - Paratormônio
PV	Porosidade Vascular
RPMI	Meio de cultura celular (Roswell Park Memorial Institute)
SBF	Solução que simula o meio fisiológico (tampão)
SFB	Soro fetal bovino

VN:	Vermelho Neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina)
β -TCP	Beta-fosfato tricálcio ou whitlockita, $(Ca,Mg)_9(P0_4)_6$ ou $(Ca,Mg)_3(P0_4)_2$
μ	Potencial químico
θ	Angulo de contato
ΔH_{25}	Entalpia de reação à 25 °C
°C	unidade de temperatura dada na escala Célcus.

Resumo

Cerâmicas de fosfatos de cálcio para reparo de tecido ósseo ~~é~~ são uma opção ~~de~~ para a recuperação funcional do osso. Neste trabalho, as sinterizações de misturas prensadas de fosfato de cálcio, carbonatos alcalinos e outros materiais possibilitaram a produção de pastilhas cerâmicas com tamanho adequado de poros interconectados que, quando utilizados como suportes (scaffolds) para cultura de célula, permitam a vascularização e facilitem o crescimento e reprodução de células do tecido ósseo. Os fosfatos de cálcio utilizados como composto químico principal das cerâmicas foram obtidos pela calcinação de osso bovino ou são de origem comercial. Porosimetria de mercúrio, fluorescência de raios - X, difração de raios - X, microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), medidas de pH e a avaliação da resposta celular *in vitro* através de testes de citotoxicidade foram as técnicas de caracterização aplicadas nesta investigação. A técnica de sinterização para se produzir cerâmicas pelo processo de sinterização por fase líquida teve como resultado amostras com poros interconectados com tamanho médio aproximado de 120 μm . Os carbonatos (especialmente o Li_2CO_3) utilizados como matérias-primas auxiliam na formação de fase líquida durante a sinterização e na produção de gases que facilitam a formação da estrutura porosa da cerâmica.

Abstract

Calcium phosphate ceramics applied to bone tissue repair is an option for functional bone wound healing. Calcium phosphate utilized in this work has been originated from calcined bovine bone samples or a commercial brand of biphasic calcium phosphate (BCP). In this work, calcium phosphate added with alkaline carbonates and other raw-materials have been mixed, pressured and sintered to produce ceramic samples with interconnected pores with mean pore size around 120 um which can be helpful for cell tissue growth and blood vascularization. Mercury intrusion porosimetry, X-ray fluorescence and diffraction, optical microscopy, scanning electronic microscopy (SEM), pH measurements, and cell response evaluation by *in vitro* cytotoxicity experiments were the characterization techniques used during this investigation. The sinterization process with a liquid phase seem to be useful in producing porous and mild strength ceramic samples. Carbonates specially Li_2CO_3 act as fluxing agent during liquid-phase sintering of the ceramic samples.

Capítulo 1: Introdução

A ciência dos biomateriais é o estudo de física e química dos materiais e suas interações com o ambiente biológico. Ela se preocupa fundamentalmente com o comportamento desses materiais (em uma aplicação específica) e uma apropriada resposta do hospedeiro, que, como exemplo, pode incluir resistência à colonização bacteriana e, normalmente, uma fácil recuperação e cura. Um material biologicamente aplicável ao osso deve suportar a atividade das células osteoblásticas no desenvolvimento de novo osso enquanto, simultaneamente, é reabsorvido pelas células osteoclásticas, (Hench, 1991; Davies, 2000; Ratner, Hoffman *et al.*, 2004).

Já a engenharia de tecidos investiga a retirada de células de um paciente, por biópsia, para multiplicá-las “in-vitro”, semeá-las e cultivá-las num suporte poroso, biodegradável, com o auxílio de um conjunto de fatores de crescimento. Essa estrutura híbrida é, então, implantada na zona afetada, esperando-se que a regeneração do novo tecido acompanhe o desaparecimento do suporte (*scaffold*).

O osso está sujeito ao remodelamento através da ação combinada dos osteoclastos, que erodem a matriz, e dos osteoblastos, que depositam camadas de osso sobre a matriz. Alguns osteoblastos ficam prisioneiros na matriz como osteócitos e atuam como parte da renovação da matriz óssea (Alberts, 2002). Já os defeitos onde o tamanho permita que ocorra uma regeneração de um tecido que não o ósseo devem ser preenchidos com um biomaterial (Joschek, Nies *et al.*, 2000).

Há uma considerável demanda na cirurgia oral e na medicina ortopédica por estruturas tridimensionais porosas (Cowin, S. C., 1999), denominados *scaffolds* de materiais inorgânicos, possuindo tolerância imunológica com objetivo de reparar ou aumentar o tecido ósseo humano. A hidroxiapatita é o principal material inorgânico usado como substituto para ossos e dentes, não é encapsulada pelo tecido fibroso e pode ficar em contato com o osso quando implantado dentro do corpo humano (Marcacci, Kon *et al.*, 1999; Sato, Kogure *et al.*, 2002). Ela é biologicamente compatível e pode ser transformada em matrizes com poros interconectados, permitindo o crescimento do tecido ósseo (Legeros, Trautz *et al.*, 1967).

Os íons existentes nos sais ósseos são principalmente Ca^{2+} , PO_4^{2-} , OH^- e CO_3^{2-} . Neles estão presentes também quantidades pequenas de íons de sódio (Na), magnésio (Mg) e ferro (Fe), e ainda, íons citrato.

Este trabalho se concentra na obtenção de cerâmicos à base de pós de fosfatos de cálcio contendo hidroxiapatita, adicionado aos aditivos (carbonatos alcalinos e fosfatos de amônia) com objetivo de formar uma mistura para a construção de estruturas tridimensionais porosas capazes de induzirem a regeneração dos tecidos ósseos, chamadas de *scaffolds*. A modificação química tem, aí, um papel importante, pois aumenta o leque de propriedades dos materiais, incluindo melhoras no comportamento mecânico, perfil de biodegradabilidade, capacidade de absorção de água, etc. Algumas substâncias foram adicionadas na forma de carbonatos de lítio (Li), cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e sódio (Na), para promoverem a sinterabilidade da cerâmica.

Um dos fatores considerados importantes em uma biocerâmica para permitir a osteogênese são a porosidade, o tamanho de poros e em especial o grau de intercomunicação desses poros. Estas propriedades foram investigadas por meio de ensaios de porosimetria de mercúrio, na faixa de 3 nm a 360 μm .

A aplicação de substâncias na forma de carbonatos para formação de novas composições biocerâmicas teve sua inspiração na idéia de criar poros abertos e conectados devido à liberação de gases, principalmente do CO_2 , durante o processo de sinterização.

Capítulo 2: Objetivos

2.1 - Objetivo Geral.

Produzir cerâmicas porosas de fosfatos de cálcio para aplicação reparadora do tecido ósseo.

2.2 - Objetivos Específicos

- I Elaborar um processo de sinterização de misturas contendo fosfatos de cálcio para obtenção de pastilhas cerâmicas porosas, com tamanho de poros capaz de garantir o alojamento, reprodução e sobrevivência das células osteogênicas.
- II Produzir cerâmicas porosas na forma de pastilhas.
- III Caracterizar físico-quimicamente os pós de fosfato de cálcio e as cerâmicas provenientes destes:
 - ◆ Investigar a porosidade e o tamanho de poro das pastilhas pela técnica de porosimetria de mercúrio
 - ◆ Investigar as fases presentes no fosfato de cálcio do osso calcinado e do fosfato de cálcio de origem comercial
 - ◆ Investigar a relação Ca/P da pastilha produzida com fosfato de cálcio calcinado
 - ◆ Investigar o pH de matérias primas e das pastilhas cerâmicas
- IV Investigar a citotoxicidade *in vitro* dessas cerâmicas para definir a composição das matérias primas na produção de pastilhas.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

3.1 - Biomaterial

Um biomaterial é um material que quando aplicado clinicamente no meio biológico, coexiste com o organismo de forma temporária ou permanente e contribui na melhora da qualidade de vida do hospedeiro. A discussão sobre a definição de um biomaterial levou alguns autores a se expressarem como mostra a tabela abaixo:

Tabela III. 1 – Definições de biomaterial

<i>Autor</i>	<i>Definição de biomaterial</i>
Conferência de Chester (Reino Unido), 1986	Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como parte integrante de um sistema de tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais (Williams, 1987).
Park, 2002	Biomateriais são todos os materiais que, de modo contínuo ou intermitente, entram em contato com fluidos corpóreos, mesmo que estejam localizados fora do corpo (Park e Bronzino, 2002).

Um biomaterial deve apresentar duas propriedades: a biocompatibilidade e a biofuncionalidade. A biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar prejuízo ao organismo a curto e longo prazo. Paralelamente à biocompatibilidade, é importante que o implante permita o desempenho imediato e com êxito da função específica (estática e dinâmica) da parte do corpo que está sendo substituída. Esta habilidade está embutida no conceito de biofuncionalidade. Neste conceito estão incorporados também, os problemas associados à degradação química dos materiais, visto que o meio fisiológico pode ser bastante

agressivo - mesmo aos materiais considerados inertes quimicamente, levando à redução da eficiência do implante (Oréfice, Pereira *et al.*, 2006). Os materiais propostos para serem aplicados como biomateriais podem ser provenientes de materiais biológicos, cerâmicos, compósitos, metálicos e poliméricos.

Tabela III. 2 – Classe de materiais para uso no corpo

<i>Materiais</i>	<i>Uso Típico</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Características especiais</i>	<i>Desvantagens</i>
Cerâmicas	Implantes estruturais e recobrimentos	Resistente a esforços na compressão	Coopera com a reposição / adesão óssea.	Quebradiço a tração/impácto
Compósitos	Componentes dentários e ortopédicos	Resistência a esforços e baixo peso	Propriedades mecânicas	Processos elaborados de fabricação.
Materiais Biológicos	Complemento de tecidos moles. Reposição de membranas.	Permite recuperação funcional de tecidos e órgãos.	Relação simbiótica com o local do implante incluindo autoreconstituição	Disponibilidade limitada.
Metais e Ligas	Articulações, parafusos, pinos	Ductilidade, Resistência a esforços	Condutividade elétrica	Elevada densidade, corrosão.
Polímeros	Cateteres, suturas, válvulas cardíacas, implantes oculares.	Resilientes; Fáceis de fabricar	Biodegradável Bioabsorvível	Deformação com o uso.

Assim, na elaboração de um biomaterial, independentemente da classe do material escolhido, deve-se observar dentre outros, os seguintes critérios:

1. A presença do biomaterial não deve causar efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico bem como os tecidos não devem causar a degradação não desejada do material, como por exemplo, corrosão em metais.

2. Deve possuir as características mecânicas adequadas para cumprir a função desejada, pelo tempo desejado.
3. O material deve ser esterilizável.
4. Para materiais particulados, o tamanho mínimo deve ser observado para não ativar processos como a de fagocitose.

A figura 3.1 mostra algumas das possibilidades do uso clínico da hidroxiapatita no corpo humano.

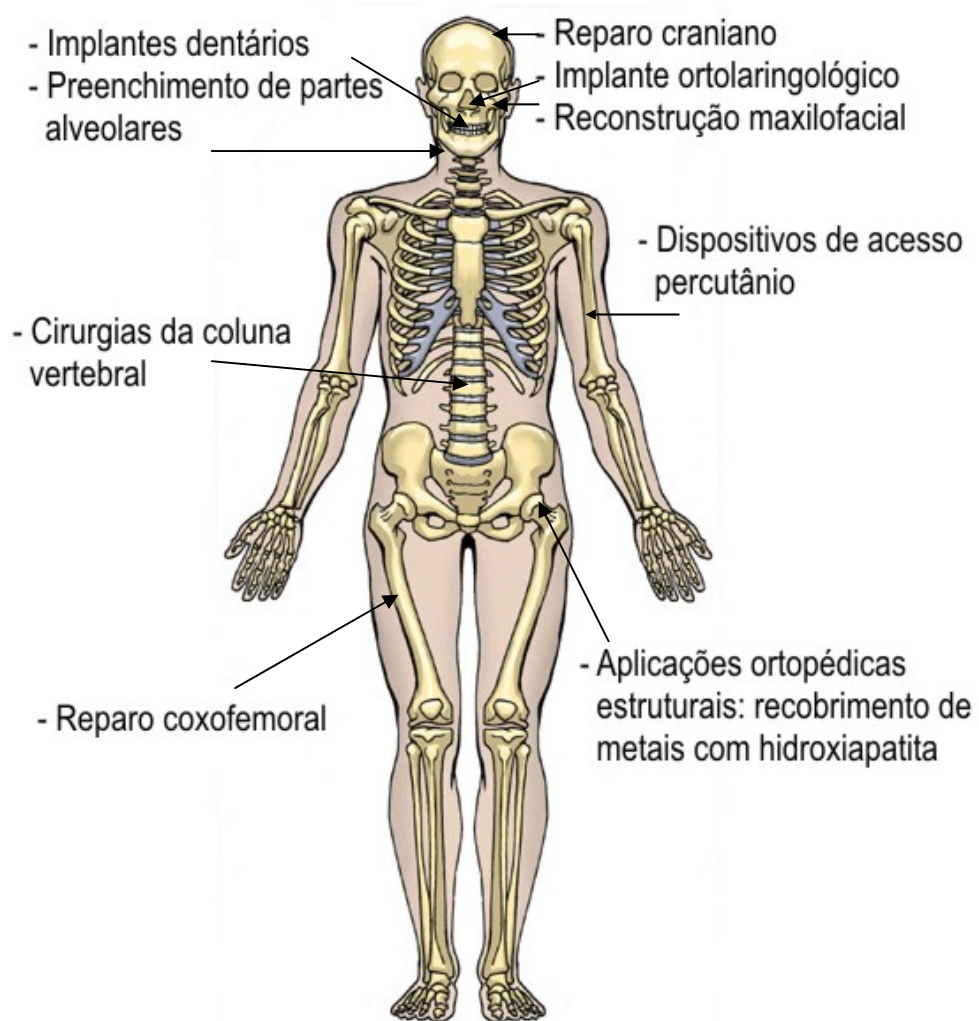


Figura 3. 1- Aplicações das hidroxiapatitas, adaptado (Hench e Wilson, 1993) e (Human Body, 2007)

O foco desse trabalho está direcionado ao estudo das cerâmicas bioaplicáveis. Dentre os principais tipos de biocerâmicas se destacam: a alumina (Al_2O_3), a zircônia (ZrO_2), algumas apatitas como a hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) e os biovidros que foram desenvolvidos a partir de 1971 por Larry Hench na Universidade da Flórida - Gainesville, e denomina uma série de composições de vidros baseados no sistema $SiO_2 - Na_2O - CaO - P_2O_5$.

3.2 - Implantes com biocerâmicas

O implante com uma biocerâmica é empregado buscando evitar os problemas inerentes aos implantes tradicionais (metálicos, poliméricos), como a liberação de íons e/ou fratura do osso (gradiente dos módulos de elasticidade), ou ainda com a sensibilidade do organismo com a maioria dos materiais estranhos, podendo resultar na formação de uma cobertura não aderente de substância fibrosa entorno do implante (Hench, 1986). Assim a cerâmica aplicada clinicamente procura ser compatível física, química e funcionalmente com o osso hospedeiro. A resposta à toxicidade do material em contato com o tecido pode ser classificado como mostrado na tabela III.3.

Tabela III. 3 - Classificação da inter-relações tecido com os materiais quanto ao tipo de resposta no meio fisiológico (Hench L.L., 1971; Hench, 1986).

<i>Resposta</i>	<i>Descrição</i>
Tóxica	morte da vizinhança do tecido.
Não-tóxica e inativa (bioinerte)	não apresenta mudanças químicas acentuadas no meio fisiológico, mas formação de uma cápsula fina fibrosa não aderente.
Não-tóxica e reabsorvíveis (biodegradável)	apresentam decomposição gradual por atividade biológica específica.
Não-tóxica e bioativa	ligação na interface com a vizinhança do tecido.

Uma das caracterizações *in vitro* mais usuais é testar a biocompatibilidade do implante com osteoblastos humanos frescos, macrófagos ou qualquer outro teste de linhagens celulares (Trentz, Hoerstrup *et al.*, 2003), avaliando-se também mutações e/ou alterações sensíveis no

metabolismo celular. Sabe-se que as células têm a capacidade de interagir com o ambiente ao seu redor de diferentes modos: através dos receptores de membrana que absorvem os sinais externos (químicos ou físicos) do meio extracelular, e por mecanismos que podem ocorrer estimulados no interior da célula. Por sua vez, as células respondem a esta ação alterando o modo como os genes se expressam e adaptando-se às novas configurações ao seu redor. Portanto, quando estas células ficam em contato com uma superfície quimicamente ativa (Ca^{2+} , Ti^{3+} , Fe^{2+}) como num meio de cultura, podem revelar mudanças significativas no sinergismo celular.

Para os materiais cerâmicos bioativos, ocorre a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada na superfície do implante (Legeros, Trautz *et al.*, 1967; Legeros, 1988; Hench, 1991). Essa fase é equivalente, em composição e estrutura, à fase mineral do osso, e é responsável pela importante ligação interfacial entre implante e tecido.

3.3 - Biocerâmicas da família das apatitas (fosfatos de cálcio)

Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos com razões molares Ca/P variadas. Para a hidroxiapatita, a fluorapatita e a hidroxifluorapatita essa razão molar é de 1,67 (Johnsson e Nancollas, 1992). O termo apatita descreve uma família de compostos parecidos. No entanto, eles não possuem necessariamente composições idênticas. Devido à estrutura complexa, a apatita é um material altamente capaz de acolher outros elementos químicos, permitindo substituições de Ca e P por vários outros íons. Como exemplo, o cálcio (Ca) pode ser substituído por estrôncio (Sr), magnésio (Mg), bário (Ba), chumbo (Pb); o fosfato por vanadatos, boratos e manganatos, e assim por diante (Legeros, 1993). Em virtude da sua característica de incorporar outros íons na sua rede cristalina, a apatita, muitas vezes, se confunde com outras estruturas minerais do grupo dos fosfatos de cálcio. Por isso, esses compostos químicos receberam o nome de apatita, palavra que em grego significa *enganar, iludir ou lograr*.

A célula unitária dos cristais de HAp podem apresentar tanto uma estrutura cristalográfica monoclinica, com quatro unidades da fórmula por célula unitária (Kay, Young *et al.*, 1964); (Johnsson e Nancollas, 1992); (Elliott, Mackie *et al.*, 1973), como hexagonal, onde a transição de fase monoclinica para a estrutura hexagonal ocorre a 370 °C, (Elliott, 1994; Calderín, Stott

et al., 2003). A hidroxiapatita com estrutura hexagonal apresenta os seguintes parâmetros de rede: $a = 0,943 \text{ nm}$ e $c = 0,688 \text{ nm}$ (Paul W. Brown, 1994; Kalita, Bose *et al.*, 2004).

A apatita descreve uma grande família de compostos com estrutura muito similar (Paul W. Brown, 1994): o nome hidroxiapatita define a composição de um destes compostos de cálcio e fósforo, sendo descrito quimicamente como: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Várias apatitas de diferentes composições podem ser preparadas pela substituição dos elementos iônicos (Tao e Irvine, 2000) segundo a fórmula, $(\text{M}_{10}(\text{ZO}_4)_6\text{X}_2)$, onde M , Z e X são os grupos de elementos ou compostos iônicos, como mostrado a seguir (Somasundaran, 1998):

$M = \text{Ca}, \text{Sr}, \text{Ba}, \text{Cd}, \text{Pb}, \text{Mg}, \text{Na}, \text{K}, \text{H}, \text{D}, \text{etc...}$

$Z = \text{P}, \text{CO}_3, \text{V}, \text{As}, \text{S}, \text{Si}, \text{Ge}, \text{Cr}, \text{B}, \text{etc...}$

$X = \text{OH}, \text{CO}_3, \text{O}, \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{vazio}, \text{etc...}$

As apatitas minerais são encontradas em quase todas as rochas ígneas, sedimentares e metamórficas. As apatitas mais comuns são a fluorapatita- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, cloroapatita- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ e a hidroxiapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e essas diferenças podem ser observadas ao longo do eixo c (Orlovskii, Komlev *et al.*, 2002). No corpo humano, a hidroxiapatita é o principal componente inorgânico do tecido ósseo e dos dentes. As diferenças nos parâmetros de rede entre as hidroxiapatita substituídas e não substituídas refletem o tamanho e a quantidade dos íons de substituição. Normalmente, a hidroxiapatita biológica constituinte dos ossos, é deficiente em cálcio em cerca de 10% e possui sempre carbonatos como substitutos, sendo conhecida como hidroxiapatita carbonatada (HAC). Devido a essa deficiência, fatores como a influência do colágeno e outras moléculas orgânicas, o mineral presente no tecido ósseo não é uma estrutura perfeitamente estequiométrica da hidroxiapatita de cálcio, mas uma estrutura complexa, dopada com outros íons e com uma fórmula genérica: $\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_{1,7}(\text{OH}, \text{CO}_3)_{0,3}$ (Hench, 1991; Legeros, 1993; Tas, 2003). A hidroxiapatita biológica é ainda composta por íons em concentrações diversas, tais como: Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} , etc., permitindo o controle desses importantes íons nos líquidos corporais através da sua liberação ou armazenamento (Rigo, 1989) *in* (Saleh J., Willke L. W. *et al.*, 2004). A tabela III.4 mostra algumas fases cristalinas da família dos fosfatos de cálcio e sua ocorrência biológica.

Tabela III. 4 - Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos, adaptado. (Legeros, 1991)

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Razão Ca/P Molar	Ocorrência
hidroxiapatita, fluorapatita, cloroapatita	$Ca_{10}(PO_4)_6X_2$ Onde X= OH, F, Cl	1,67	Esmalte, dentina, osso, cálculo dental, rochas, cálculo renal, calcificações em tecido mole
Fosfato octacálcio, OCP	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	1,33	Cálculo dental (tártaro) e renal
Brushitas, a) fosfato dicálcio di-hidratado, DCPD. b) fosfato dicálcio anidro, DCPA (monetita)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ $CaHPO_4$	1,00	Tártaro, ossos decompostos
Whitlockita, a) fosfato tricálcio, β -TCP b) fosfato tricálcio modificado Mg, Mg-TCP	$(Ca, Mg)_9(PO_4)_6$	1,50	Cálculo renal e tartaro, pedras salivárias, cáries em dentina, cartilagem artrítica, calcificações em tecido mole
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	1,00	Pseudo depósitos no <u>fluido sinovial</u> (fluido lubrificante que reduz o atrito e facilita o movimento das articulações.)

A razão para se utilizar a hidroxiapatita como um material substituto deveria ser evidente por si mesmo: o osso natural possui aproximadamente 70% hidroxiapatita em peso e 50 % em volume (Shors e Holmes, 1993).

O potencial clínico da biocerâmica de hidroxiapatita é devido à sua compatibilidade com o meio fisiológico. Além de possuir a estrutura cristalográfica e composição química semelhante à apatita óssea, a hidroxiapatita apresenta algumas propriedades peculiares como bioatividade e osteocondução, que dão capacidade de promoção do crescimento ósseo ao redor do implante em curto período de tempo.

Dependendo do modo de substituição do carbonato, pode-se classificar a hidroxiapatita como tipo A ou tipo B. Quando o carbonato (CO_3) substitui o grupo OH, ela é do tipo A, representada como: $Ca_{10}(PO_4)_6(CO_3, (OH)_2)$. Esta substituição aumenta as dimensões segundo as direções dos eixos a_1 , a_2 , a_3 e produz contração do eixo c. Quando temos substituições de

CO_3^{2-} no lugar do grupo PO_4 e o sódio (Na) no lugar do cálcio (Ca), ocorrendo aos pares, tem-se a hidroxiapatita carbonatada do tipo B, representada como: $(\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x)(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$. Esta substituição apresenta um efeito contrário ao anterior no parâmetro de rede, conduzindo a uma redução das dimensões dos eixos a_1 , a_2 , a_3 e aumento do eixo c . As substituições na hidroxiapatita resultam em variações de suas propriedades como, parâmetros de rede, morfologia e solubilidade, normalmente sem alterar a simetria hexagonal. Átomos substitucionais na rede cristalina das apatitas incrementam a concentração de deslocamentos e contribuem para o aumento da desordem no tamanho dos cristais dessa rede (Young, 1974), podendo contribuir para a alteração da cristalinidade dessas apatitas. Um exemplo é a formação do β -TCP pela presença de magnésio (Takagi, 2001). A figura 3.2 representa a estrutura cristalina hexagonal da hidroxiapatita.

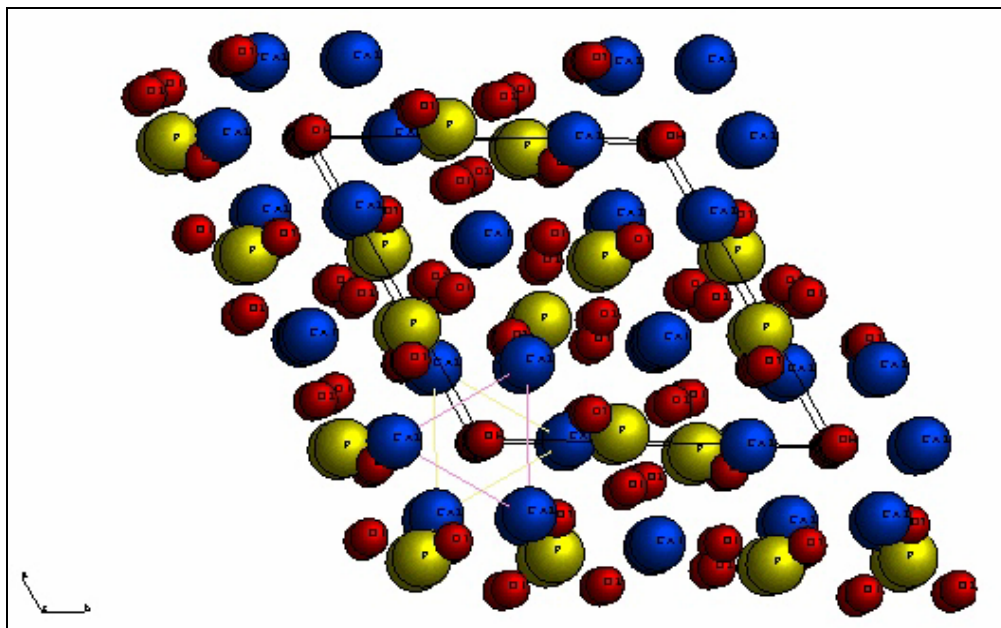


Figura 3. 2- Estrutura da hidroxiapatita, O íon OH (vermelho), em um dado plano, está normalmente centrado e equidistante do triângulo de cálcio (azul) mais próximo, adaptado. (Sato, Kogure *et al.*, 2002)e(Andrade, Borges *et al.*, 2001).

Grupos de pesquisadores como o do Safronova na Rússia e de Raynaud na França vem investigando o efeito de íons e compostos iônicos em solução além dos íons CO_3^{2-} e Na^+ , como o Mg^{2+} , K^+ , Li^+ , F^- , Cl^- , SiO_4^{4-} (Raynaud, Champion *et al.*, 2002; Putlyaev e

Safronova, 2006). A presença de cátions como o Mg^{2+} não modificaria a estrutura da hidroxiapatita, desde que as duas cargas desses íons tomassem o lugar do íon Ca^{2+} e os anions como o F^- , ocupem o lugar do grupo OH^- . A presença de grupos CO_3^{2-} e SiO_4^{4-} em solução, produzem certa modificação na estrutura, desde que esses íons presumivelmente ocupem o lugar do íon $(PO_4)^{3-}$ (Putlyaeve e Safronova, 2006).

O papel dos íons listados acima, na formação de monocristais em solução e sinterização é diferente. O efeito de íons externos na forma e tamanho dos cristais da apatita sintetizada por solução está mostrado abaixo. O efeito desses aditivos nas propriedades do material policristalino no sistema $CaO-P_2O_5$ também difere. A presença de CO_3^{2-} diminui a relação Ca/P , aumentando a deficiência de cálcio, diminuindo os defeitos da rede cristalina e facilitando a sinterização (Raynaud, Champion *et al.*, 2002) *in* (Putlyaeve e Safronova, 2006).

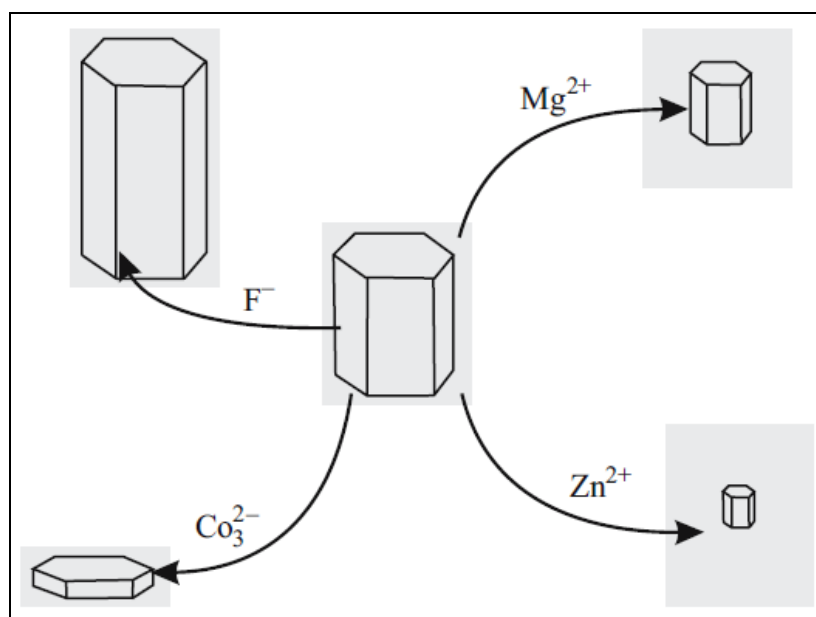


Figura 3.3 - O efeito de diferentes íons na forma do cristal de hidroxiapatita (Putlyaeve e Safronova, 2006).

No processo de sinterização, o estudo do diagrama de fases do Sistema $CaO-P_2O_5$ auxilia na determinação da temperatura de trabalho para a produção de peças sinterizadas.

O diagrama de fases do Sistema $CaO-P_2O_5$ (Fig. 3.4, Fig3.5) mostra a solução sólida obtida pela interação do cálcio (Ca) com fósforo (P).

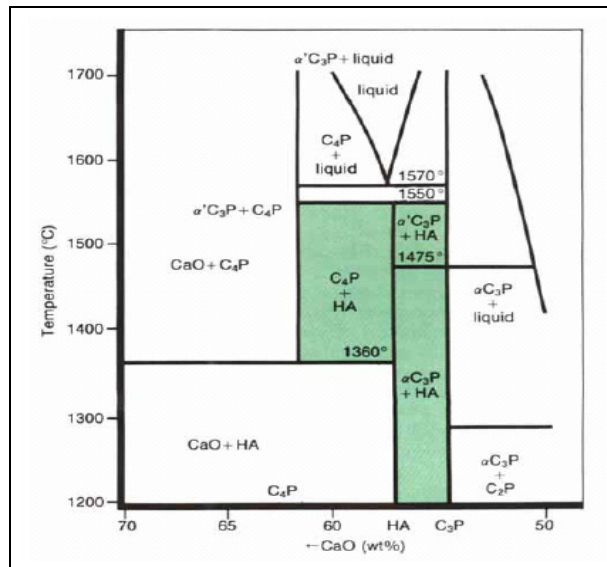


Figura 3. 4- Diagrama de equilíbrio de fase, sob pressão parcial de água de 500 Torr (66 kPa) Groot, 1990 *in* (Hench, 1991). obs. (HA = Hidroxiapatita, C = CaO e P = P₂O₅).

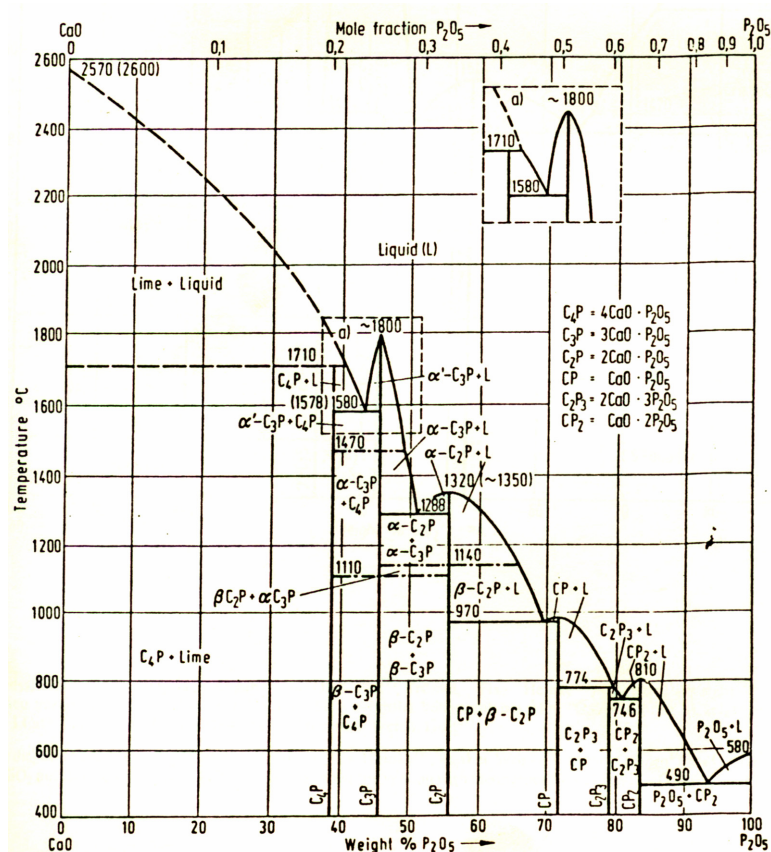


Figura 3. 5 - Diagrama de fase CaO-P₂O₅. Em destaque o quadro mostra a linha liquidus de 3CaO.P₂O₅ (Eisenhutteleute, 1981).

3.3.1 - Fases presentes em uma biocerâmicas de fosfato de cálcio

No início do século XX, a humanidade já tinha conhecimento da susceptibilidade biológica das apatitas (Albee, 1920). A síntese de uma apatita de flúor foi inicialmente realizada nos anos 70 (Legeros, 1988) e até esse período, vários outros materiais cerâmicos (Al_2O_3 , zircônia, mulita, etc) já haviam sido utilizados. Em 1969 alguns pesquisadores na Flórida haviam também proposto um vidro bioativo inspirado na liberação de Ca e P e que promoveria a ligação do vidro com o osso (Hench L.L., 1971) (Ratner, Hoffman *et al.*, 2004). Uma nova rota de síntese foi proposta desta vez com uma escala de produção um pouco maior com vistas a atender a demanda da época por materiais reconstituintes. Posteriormente, a síntese de uma mistura de beta fosfato tricálcio, ou β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e hidroxiapatita (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ foi mais tarde chamada de *fosfato de cálcio bifásico* (ou simplesmente de BCP). O BCP foi desenvolvido por alguns grupos de pesquisa, que estudavam formas de viabilizar comercialmente produtos contendo HAp, para procedimentos médicos reparadores ou para substituição óssea (Legeros, 1988; Daculsi, Laboux *et al.*, 2003).

Hidroxiapatita pura e/ou compostos não estequiométricos de fosfatos de cálcio podem ser obtidos em reações do estado-sólido ou reações de via úmida. Contudo, quando preparada em sistemas aquosos pelos métodos de precipitação ou hidrólise, a apatita obtida é geralmente deficiente em cálcio (a relação Ca/P é mais baixa do que o valor estequiométrico de 1,67 para hidroxiapatita) ou contém carbonato que faz a relação Ca/P mais alta que os valores estequiométricos (Wojciech Suchanek, 1998).

A solubilidade dos compostos de fosfato de cálcio varia consideravelmente. A HAp é bem menos solúvel do que β -TCP (Guéhenec, Layrolle *et al.*, 2004). Também em função da estrutura cristalina, os fosfatos de cálcio liberam os íons de cálcio e de fósforo diferenciadamente, por exemplo, superfícies amorfas liberam esses íons até 5 vezes mais do que superfícies cristalinas, fato que pode influenciar a biofixação do implante (dissolução: $\text{HAp} < \beta\text{-TCP} < \alpha\text{-TCP} < \text{ACP}$ (fosfato de cálcio amorfo) (Johnsson e Nancollas, 1992)).

O BCP (a mistura de hidroxiapatita e β -TCP), como já foi observado, é um material bioativo (ou mesmo biodegradável, devido ao percentual de β -TCP na mistura e à maior solubilidade dessa fase) e também biocompatível com vários tipos e formas de tecidos (ósseo, cartilaginoso e muscular). O mecanismo de bioatividade do fosfato de cálcio bifásico (BCP) envolve a

dissolução, seguida da reprecipitação de uma hidroxiapatita carbonatada (Daculsi, Laboux *et al.*, 2003). Observa-se, além disso, outra propriedade do BCP, a osteocondutividade, ou seja, a propriedade de promover o crescimento do osso ao redor do implante, num curto espaço de tempo, o que é apontado como uma das principais propriedades dos implantes que contêm o BCP (Silva, 2003).

3.3.2 - Aplicação das biocerâmicas como revestimento de substratos metálicos.

Algumas das dificuldades no uso de peças de cerâmicas (sinterizadas) bioativas em aplicações de alta solicitação mecânica são o alto módulo de elasticidade e a baixa tenacidade à fratura ($1 \text{ MPa.m}^{1/2}$) desses materiais, quando comparados ao osso natural com tenacidade à fratura entre 2 a $12 \text{ MPa.m}^{1/2}$, que também depende não só da composição estrutural, mas também de sua geometria. Uma forma de contornar esse problema é promover a combinação de outros materiais com essas biocerâmicas, de forma a melhorar o comportamento mecânico do conjugado, mantendo as características bioativas da superfície. Os revestimentos com materiais bioativos sobre substratos metálicos têm sido apontados como uma solução para esse problema. Nesse caso, a capacidade de ligação com o osso, apresentada pela superfície bioativa, está associada às propriedades mecânicas apresentadas pelo substrato (Silva, 1998). A tabela III.5 apresenta algumas propriedades físicas dos fosfatos de cálcio na estrutura do mineral de hidroxiapatita policristalino e para o osso compacto.

Tabela III. 5 –Propriedades mecânicas dos fosfatos (O'brien, 1996; Park e Bronzino, 2002)

<i>Propriedade</i>	<i>Mineral de hidroxiapatita policristalino</i>	<i>Ossso compacto*</i>
Módulo de elasticidade (GPa)	40 – 117	12 a 18
Compressão (MPa)	294	167
Taxa de Poisson	0,27	0,3
Tração (Mpa)	147	121
Dureza (Vickers, GPa)	3,43	-
Densidade g/cm^3	3,16 (teórica)	1,3 (varia)

3.4 - Porosidade dos sólidos:

Segundo Hajnos, o poro é a cavidade de superfície que tem a profundidade maior do que a metade de seu tamanho médio (Hajnos, 2004). As formas dos poros naturais são geralmente não uniformes. Para facilitar a construção de modelos utiliza-se modelos geométricos conhecidos. Entre muitos modelos propostos, tais como o cônico e o globular, o modelo de poro cilíndrico é o modelo mais usado (Hajnos, 2004) (Hollister, 2005). A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) recomenda os termos Microporos, Mesoporos e Macroporos, para classificar as dimensões dos poros (em nanômetros) IUPAC, 1972 *in* (Rouquerol, Avnir et al., 1994). A tabela III.6 compara o padrão IUPAC com a porosidade encontrada nos ossos.

Tabela III. 6 - Classificação das dimensões do poro.

Classificação IUPAC	Dimensões	Porosidade ossea (Cowin, Stephen C., 1999)	<i>Dimensões</i>
Microporos:	larguras < 2 nm		
Mesoporos:	larguras 2 a 50 nm	Porosidade Colágeno - Apatita	Raio \approx 10 nm
Macroporos:	larguras > 50 nm	Porosidade Lacunar-Canicular (PLC)	Raio \approx 0,1 μ m
		Porosidade Vascular (PV)	Canal osteonal e de Volkmann - Raio \approx 20 μ m
		Porosidade Inter trabecular	Dimensão linear característica \approx 1 mm. Associado com parte esponjosa do osso.

Osteons são estruturas cilíndricas de 100 a 150 μ m de raio que se encontram muito próximos ao longo de um osso e contêm em seu centro um canal osteonal, como mostra a figura 3.4.

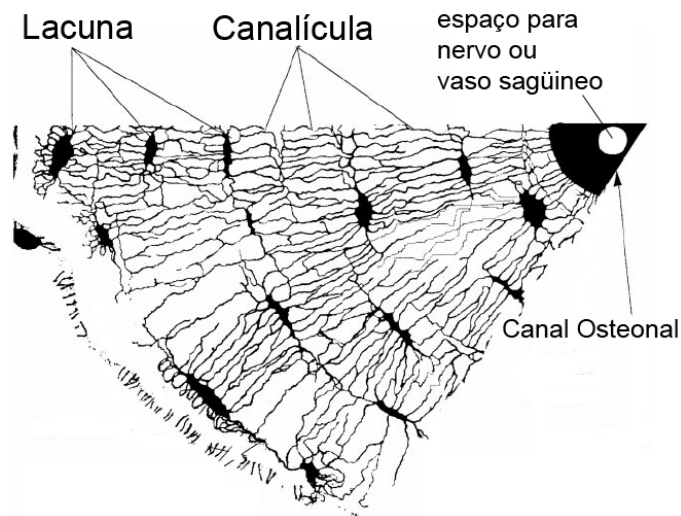


Figura 3. 6 - Seção de um osteon mostrando a vascularização pela porosidade óssea (Cowin, Stephen C., 1999).

A porosidade vascular é formada por canais de Havers e Volkmann. Nos sistemas de Havers nenhum osteócito está afastado dos vasos sanguíneos mais do que 0,1 mm. (Ham, 1965). A porosidade canicular-lacunar formada por lacunas e canalículos é da ordem de 20 μm . A porosidade colágeno-apatita é formada pelos espaços entre o colágeno e os cristais de apatita e possui raio médio de poros de aproximadamente 10 nm (figura 3.5). Além disto, existe a porosidade intertrabecular, que são os espaços existentes na trabécula, com dimensões maiores que 1 mm.

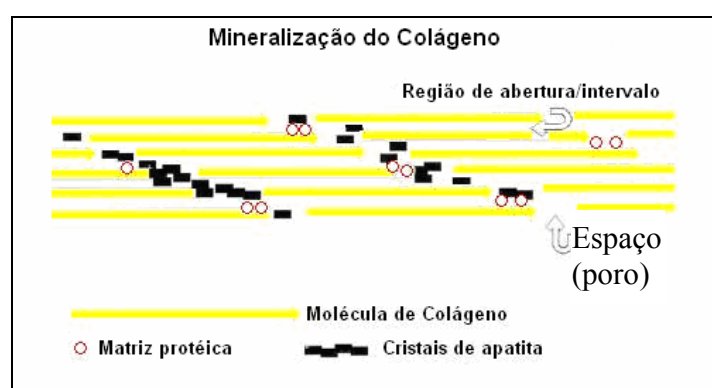


Figura 3. 7 - Mineralização do colágeno, adaptado. (Boskey e Paschalis, 2000)

Assim, em observação ao tamanho das células animais, que são tipicamente entre 10 e 100 μm de diâmetro, e a vascularização óssea (Samuel H. Barbanti e Duek, 2005) em torno de 20 μm ,

sugere que a escala em micrometros reflete melhor a ordem de grandeza dos poros e caminhos que devam ser mimetizados pelos scaffolds sintéticos, mesmo que os espaços presentes no colágeno para o alojamento dos cristais de hidroxiapatita seja na ordem de 20 nm.

3.5 - Os ossos.

Os ossos desempenham diversas funções na manutenção dos sistemas do corpo. Ele protege os órgãos vitais, providencia o suporte e localização para a fixação de músculos para a locomoção. Também, ele gera células brancas para proteção imunológica e células vermelhas do sangue para oxigenação de outros tecidos. E ainda, ele detém um reservatório de cálcio, fosfatos e outros importantes íons (Temenoff, Lu *et al.*, 2000).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo bem rígido, encontrado nos ossos do esqueleto dos vertebrados, que consiste em uma quantidade decrescente de mineral, colágeno, proteínas que não são colágeno, água e lipídeos. Diferente de outros tecidos, onde preponderantemente o tecido é celular, a maioria desses componentes está localizada na matriz extracelular (Boskey e Paschalis, 2000). Em virtude de sua substância intercelular tornar-se calcificada quase que logo após sua formação e não possuir suficiente plasticidade para crescer a partir de seu próprio interior é necessária a existência, nas superfícies ósseas, de uma linhagem de células capazes de fornecer células que possam diferenciar-se em osteoblastos e, mais tarde, em osteócitos. Após a diferenciação os osteócitos perdem a capacidade de se reproduzir. Portanto, praticamente, *qualquer porção óssea só pode crescer pela aposição de novo osso às suas superfícies*. As células que normalmente cobrem e revestem as superfícies ósseas normais e servem como células-fonte para o osso são denominadas *células osteogênicas*.

A formação de osso em qualquer superfície é provocada pela divisão e conseqüente aumento de número dessas células. As células mais internas, formadas em conseqüência das mitoses, podem diferenciar-se em osteoblastos, os quais secretam substâncias intercelulares em torno delas, transformando-se em osteócitos. Por esse meio, uma nova camada de osso é adicionada à superfície, sem que o número de células que recobrem tal superfície seja reduzido. A linha de diferenciação das células osteogênicas depende de influências ambientais. Quando o suprimento de oxigênio é baixo, elas se diferenciam em condroblastos e formam cartilagens. Sob condições ainda diferentes, as células precursoras do osso podem fundir-se, tornando-se

células multinucleadas, denominadas osteoclastos, relacionadas, não com a formação de osso, mas sim com sua reabsorção.

A figura 3.6 representa um esboço da histologia do osso cortical.

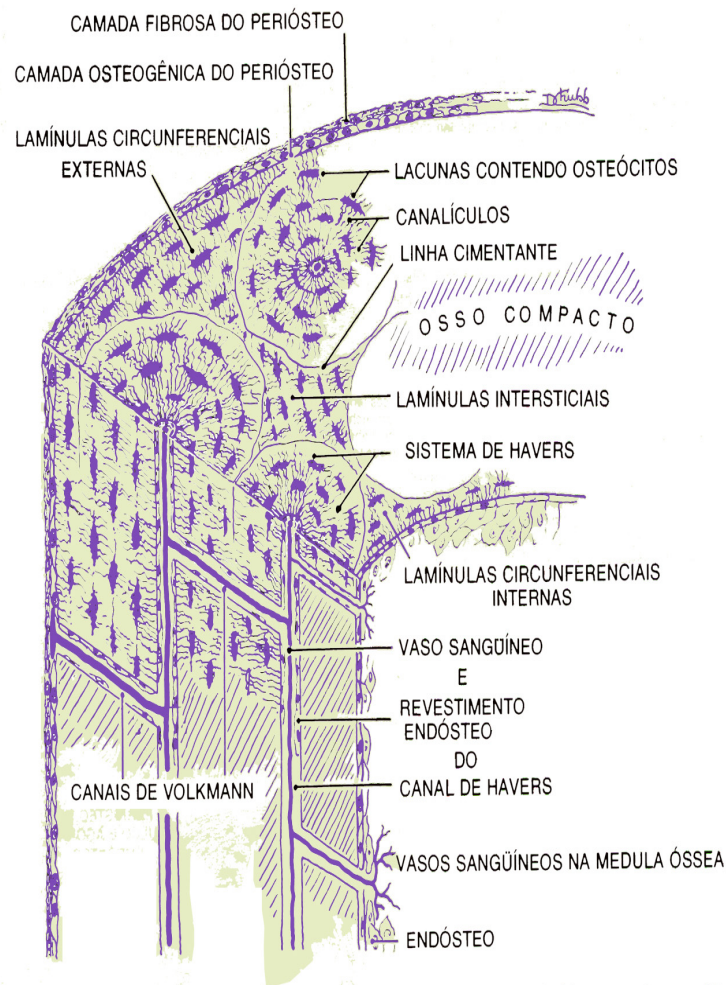


Figura 3. 8 - Esquema tridimensional mostrando o aspecto em corte longitudinal e transversal da diáfise de um osso longo adulto. Este esquema mostra as relações entre os vasos sanguíneos do perióstio, os canais de Volkmann, os sistemas haversianos e a cavidade da medula óssea (Ham, 1965), adaptado.

3.6 - Estudo dos enxertos ósseos, precursores dos implantes cerâmicos.

O interesse nos implantes ósseos, principalmente de material autólogo (Ex. o receptor é o próprio doador) é justificado pelo sucesso em termos clínicos que essa metodologia alcança e para entendimento no desenvolvimento de biomateriais devido ao problema de disponibilidade desse material, desconforto causado ao paciente, e custos.

Os enxertos ósseos são colocados de modo a que cada um de seus extremos se adapte bem ao tecido ósseo vivo dos fragmentos que deve unir. A ilustração 3.7 mostra que as células osteogênicas e osteoblastos percorrem uma pequena distância até a extremidade morta do leito do enxerto.

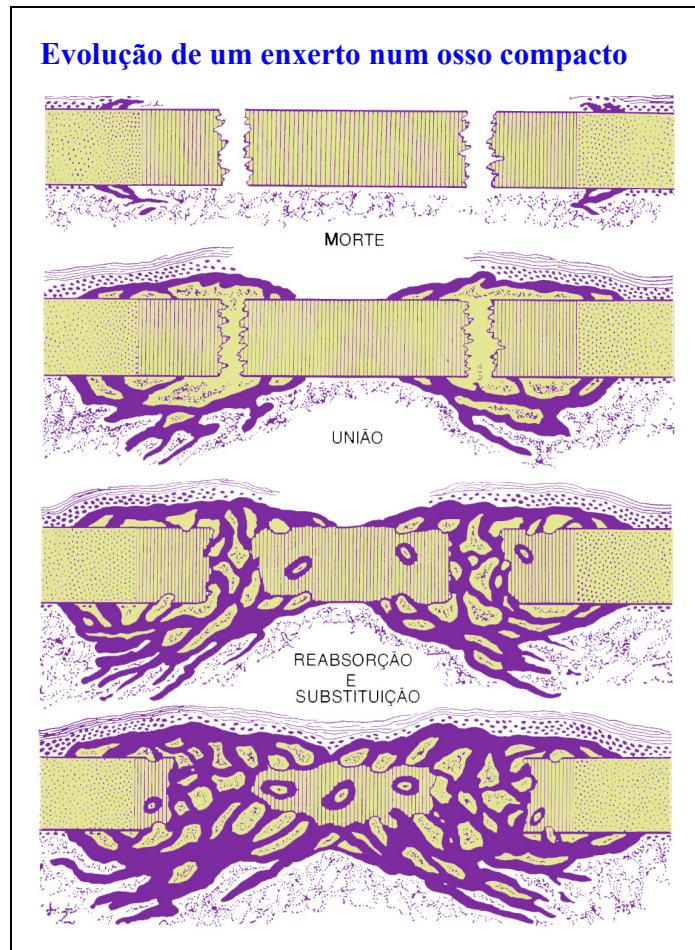


Figura 3. 9 - Esquema com as fases de evolução de um enxerto na forma de um bloco de córtex cortado, livre de seu suprimento sanguíneo e colocado novamente no ponto lesado (Ham, 1977), adaptado.

Depois que o enxerto uniu-se ao seu osso hospedeiro, ele é lentamente reabsorvido e substituído por osso novo. A reabsorção ocorre em dois pontos gerais: 1) na superfície, externa do transplante, entre as áreas nas quais as trabéculas de osso novo se fixaram; 2) na superfície interna dos canais haversianos. Os vasos sanguíneos funcionais são tão necessários para a reabsorção como para a deposição e manutenção do osso. Assim, pequena é a reabsorção que pode ocorrer nas superfícies internas dos canais haversianos de um transplante, até que existam vasos funcionais nesses canais. O crescimento dos novos vasos sanguíneos nos canais haversianos do transplante está associado com a reabsorção do osso morto desses canais e também com a deposição de novo osso nos pontos onde eles vão atravessá-la. Esses dois processos agem simultaneamente no exterior do transplante e nas extremidades mortas do leito do enxerto; assim, em pouco tempo o transplante e a extremidade do leito se tornam um aglomerado de osso vivo e morto. À medida que a porção morta de um osso compacto vai sofrendo irregularmente a erosão em diferentes pontos de sua superfície externa, e seus canais haversianos se tornam abertos pelo processo de reabsorção, começa a assemelhar-se tanto a um osso compacto como a um osso esponjoso. Pode-se imaginar que os osteócitos num osso esponjoso transplantado tenham mais probabilidade de sobrevivência do que os de um osso compacto.

O tecido ósseo esponjoso e o compacto aparecem juntos na grande maioria dos ossos dos vertebrados (Cohen, 2000) (Rhineland, 1972). As células mesenquimatosas indiferenciadas além da capacidade de se mover através dos tecidos, têm o potencial de se dividir rapidamente e se diferenciar em células especializadas do tecido músculo esquelético; como exemplo, em células de cartilagem, osso, tecidos fibrosos densos e músculos (Ralph E. Holmes, Lemperle *et al.*, 2001). Sendo o tecido ósseo altamente vascularizado, todo o esqueleto recebe a cada minuto 10% de todo o débito cardíaco, o que revela a importância de uma eficaz irrigação sanguínea óssea, para oferecer nutrientes básicos essenciais para a adequada síntese de colágeno.

3.6.1 - Outros agentes promotores da mineralização óssea

Alem do colágeno (Junqueira, 2004), outras proteínas participam do processo de iniciação da mineralização óssea, que corresponde à ligação do componente mineral à matriz protéica. Na fase inicial ocorre um contato íntimo, estreito, da hidroxiapatita com as fibrilas do colágeno,

situando-se em locais específicos que são denominados “buracos”, isto é, espaços que existem entre as fibrilas que compõem a tri-hélice do colágeno. Essa disposição arquitetural sobre a matriz protéica básica resulta em um produto bilamelar, que é responsável pelas propriedades mecânicas do osso, sendo, portanto, capaz de resistir a todo tipo de estresse mecânico. (Lakes, 1993)

Há um número de matrizes protéicas que se encontram com alguns ou todos os critérios para a regulação inicial de deposição do mineral constituinte do osso e a proliferação desses cristais minerais. A importância dessas proteínas no processo de mineralização pode ser caracterizada por: (i) Distribuição: A proteína deve estar presente na linha de frente da mineralização, ou como nucleadora ou como reguladora do crescimento dos cristais. (ii) Modificação: A proteína deve ser modificada, sintetizada, ou removida com o início da mineralização (Boskey e Paschalis, 2000).

3.6.2 - Vascularização e resposta óssea as tensões mecânicas.

A circulação sanguínea tem uma importância singular dentro e em torno do osso, e está diretamente envolvida nas mudanças ocorridas nele devido à dependência das tensões por ele sofridas. O osso trabalha dentro de uma estreita faixa de tensão; ainda sua biologia é muito sensível para os níveis de tensão, que promove alterações na quantidade de osso com objetivo de atender aos esforços sofridos em diferentes regiões ao longo do osso promovendo dessa forma uma adaptação funcional. Com isso sua equação constitutiva é linear com respeito à tensão, e a relação tensão-deslocamento é também linear, mas é anisotrópica. Portanto, o osso é um órgão que pode ser mudado, cresce, e sofre remoção e reabsorção em sua estrutura pelo estímulo mecânico, envolvendo células osteoclásticas e osteoblásticas e depende da capacidade nutritiva auxiliada pela vascularização. (Fung, 1993).

Tabela III. 7 - Anisotropia do osso nas regiões da diáfise e metáfise da parte cortical de um osso longo (Fung, 1993).

	ρ (g/cm ³)	Módulo de Young Longitudinal (MPa)	Módulo de Young Transversal (MPa)
Diáfise	1,95	17.000	11.500
Metáfise	1,62	9.650	5.470

3.6.3 - Fatores reguladores do tecido ósseo.

Considerados como estoque de cálcio, os ossos são estimulados por diversos tipos de proteínas morfogenéticas que influenciam o seu desenvolvimento e regeneração (Silva, 2003). A enorme influência do cálcio sobre as células excitáveis, especialmente as células cardíacas, obriga o organismo a manter a concentração do íon dentro de limites bastante estreitos, já que variações relativamente modestas dessa concentração podem causar arritmias cardíacas graves. A concentração de cálcio no espaço extracelular é normalmente mantida entre 2,2 e 2,6 mmol/l (0,88 a 1,05 g/l), graças à ação integrada de três agentes reguladores (Miyashiro e Hauache, 2002), que são:

- 1 - o Paratormônio (PTH) (principal regulador da $[Ca^{2+}]$ extracelular);
- 2 - a vitamina D;
- 3 - e, em menor grau, a calcitonina (CT).

O PTH é utilizado para impedir variações bruscas da concentração extracelular de cálcio e atua de modo adequado para limitar a perda (ou o ganho) de cálcio do organismo como um todo (Miyashiro e Hauache, 2002; Widmaier, Raff *et al.*, 2005).

3.7 - Andaime ou *Scaffold* – Matriz extracelular temporária para o crescimento ósseo.

Qualquer tecido do organismo vivo consiste de uma matriz com um ou mais tipos de células. A matriz é, *in vivo*, um alojamento para as células, e providencia para elas uma arquitetura específica e ambiente tecidual apropriado. Mais detalhadamente, ela serve como um reservatório de água, nutrientes, citosinas, fatores de crescimento. Nesse sentido, para restaurar funções ou regenerar tecidos, surge a necessidade de um *scaffold* (andaime) que atue temporariamente como matriz para auxiliar na proliferação celular e deposição da matriz extracelular, com conseqüente progressiva troca por uma estrutura regenerada e reconstituída. Os *scaffolds* funcionais são essenciais para algumas soluções da bioengenharia. Em muitos casos o *scaffold* ideal deve ser biodegradável numa velocidade que valorize o rápido crescimento do tecido do anfitrião. Especificamente, os *scaffolds* da engenharia tissular óssea

devem também possuir a osteocondutividade de modo que eles se degradem, e a integridade estrutural do composto seja mantida (Ratner, Hoffman *et al.*, 2004; Stevens e George, 2005).

A figura 3.10 mostra uma matriz sintetizada artificialmente para tecido ósseo (*scaffold*)

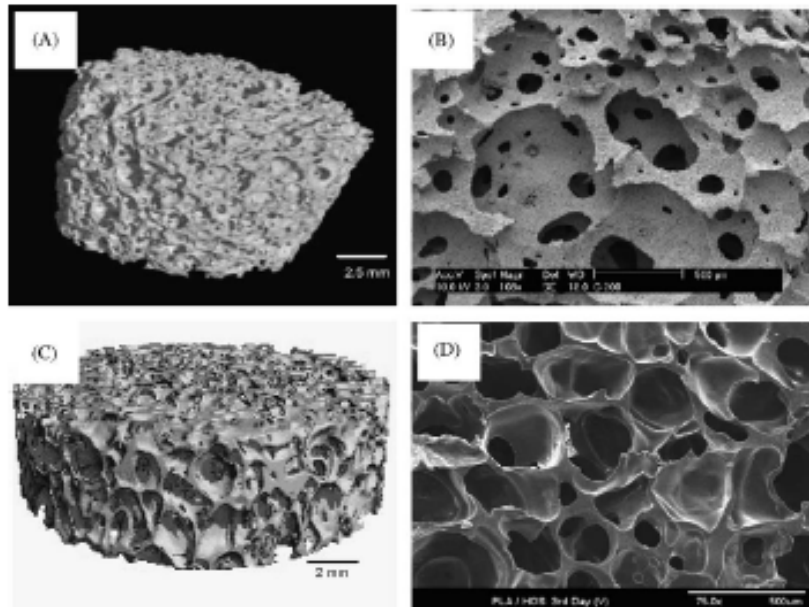


Figura 3. 10 - (A) Imagem em 3-D por Tomografia Micro-Computorizada (MCT) de um *scaffold* de HAP poroso fabricado por *slip-casting* (*sc*), (B) Micrografia por MEV demonstrando uma interconetividade aleatória dos poros em um *scaffold* de HAP, (C) imagem de um *scaffold* de PDLLA fabricado usando o processo de *sc* com CO₂ e (D) de um *scaffold* de PDLLA (M.M.C.G. Silva, L.A. Cyster *et al.*, 2006).

3.7.2 - Interface entre os scaffolds cerâmicos e as células.

O *scaffold* cerâmico foi idealizado para contribuir no controle do comportamento da célula. Os muitos e diferentes tipos de informações codificadas dentro de um ambiente extracelular combinam entre si e configuram as atividades celulares, mantendo a diferenciação de seus respectivos tecidos. As mudanças no gradiente de sinalização por essa codificação promovem sinais específicos, e os receptores celulares distribuídos pela membrana celular percebem esse sinal e responde com um comportamento direcionado. A figura 3.11 mostra como as células podem ser sensibilizadas pelas características físicas tridimensionais do *scaffold*. Pode-se observar que os receptores celulares serão ativados de modo diferente nas estruturas A, B e C. A resposta dessa célula será também diferente. Células diferentes também podem ser

sensibilizadas pelo mesmo conjunto codificado do scaffold, mas de maneiras diferentes, dependendo do complemento dos seus receptores (Hench e Polak, 2002).

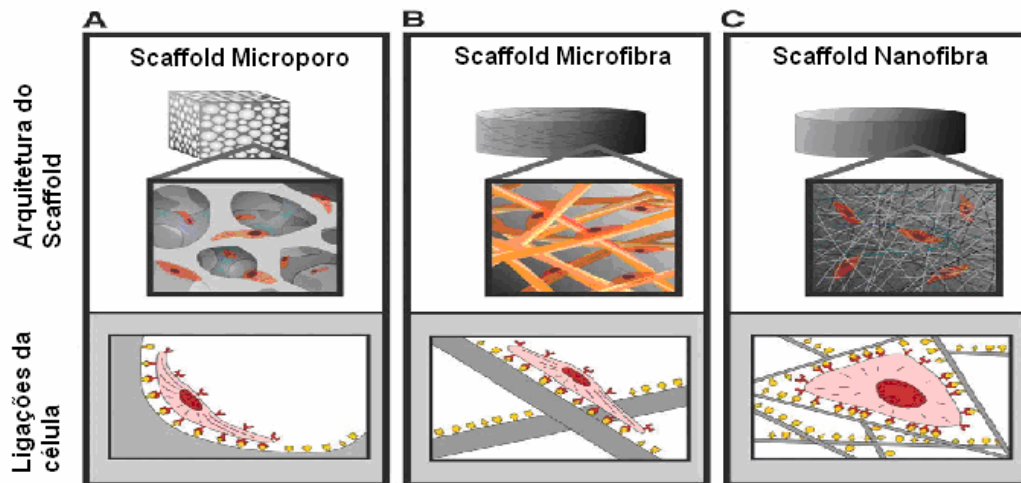


Figura 3. 11 - A arquitetura do *scaffold* afeta a ligação e o espalhamento celulares (Stevens e George, 2005).

3.7.3 - Recuperação do tecido ósseo.

Como vimos, as células podem ser afetadas pelo tipo de matriz em que elas se relacionam. A manutenção da vascularização da região é um outro fator importante para a regeneração do tecido no espaço crítico do defeito (ausência de tecido ósseo). O uso de material cerâmico de fosfato de cálcio (hidroxiapatita, β -TCP, etc) e morfologia desse biomaterial, grânulos, fibras, *scaffolds* são hoje bem pesquisados para a recuperação do tecido ósseo (Daculsi, Laboux *et al.*, 2003). Assim, o conceito de regeneração pela técnica de proteção da parte ferida especifica três condições para o sucesso da cura: adequada vascularização com suprimento de sangue, a presença de células formadoras de tecido ósseo, e a proteção do espaço a ser regenerado para que a cura ocorra. A figura 3.12 exemplifica esse conceito e mostra uma membrana rígida e porosa, que preserva o espaço para a regeneração do tecido ósseo, bem como não permite a formação de células ósseas a partir do tecido mole da vizinhança, mas permite que o fluxo de células formadoras de osso entre pela vizinhança do tecido mole. (Ralph E. Holmes, Lemperle *et al.*, 2001).

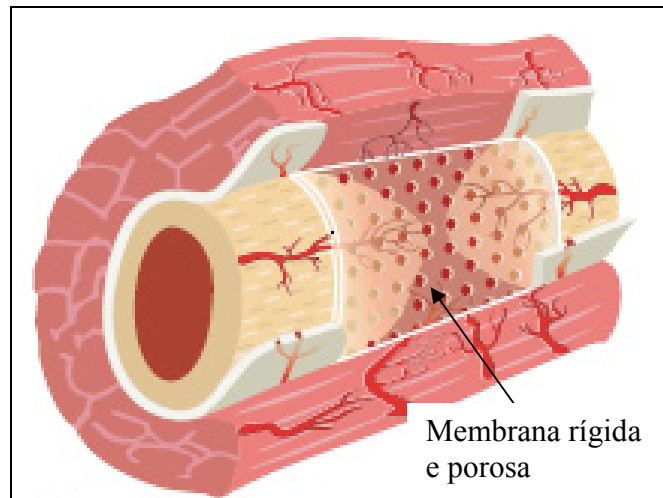


Figura 3. 12 - Esquema ilustra um espaço protegido para garantir a regeneração do tecido ósseo (Ralph E. Holmes, Lemperle *et al.*, 2001).

Para o reparo de defeitos ósseos, a engenharia de tecidos busca a combinação de células osteogênicas (ex. formadoras de osso), ativadas por uma apropriada matéria para estimular a regeneração e o reparo ósseo. Células tronco mesequimais humanas quando combinadas com fosfato de cálcio bifásico na proporção de 60% de hidroxiapatita e 40 % de TCP (em peso), tem mostrado induzir a formação de osso em grandes defeitos de ossos longos. Entretanto a baixa remodelagem desse material levou a Arinzeh (Arinzeh, Tran *et al.*, 2005) a alterar essa relação de composição para 20% de HAp e 80% de TCP. Esse estudo demonstrou que essa nova relação estimula a diferenciação osteogênica das células tronco como determinado pela expressão do osteocalcônio. Cimentos de fosfato de cálcio (CPC) são considerados altamente promissores para uso clínico devido a habilidade de configuração *in situ*, excelente osteocondutividade e capacidade de reposição óssea. Entretanto, o baixo limite de resistência desse material faz com que ele seja empregado em locais onde não seja exigida resposta de esforço mecânico. A combinação do CPC em camadas espessas com camadas macroporosas ($\approx 180 \mu\text{m}$) permitiu um desempenho satisfatório de flexibilidade sob esforços mecânicos e permite a infiltração celular, crescimento do tecido e reabsorção do implante (Xu, Burguera *et al.*, 2007). Materiais de HAp implantados apenas com estrutura macroporosa (250mm a 350mm) se mostram similares aos do osso esponjoso. O comportamento mecânico dos *scaffolds* está ligado ao tamanho do poro e a porosidade desse material, mas microporosidade

possui um papel importante no crescimento e resposta mecânica do osso (Woodard, Hildore *et al.*, 2007).

A aplicação de compósitos constituídos de hidroxiapatita/fosfato tricalcio (HAp/TCP) como partículas em suspensão por um hidrogel endurecedor – Si-hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) misturado a células osteogênicas possui resposta como um reparador ósseo osteoindutor (Trojani, Boukhechba *et al.*, 2006).

A criação de *scaffolds* com arquitetura precisa é um recente avanço com uso de projeto em três dimensões (3D) por computador (figura 3.13) e de ferramentas automatizadas para escultura de formas livres. Essas ferramentas juntas possibilitam a elaboração de um scaffold projetado com todos os detalhes das propriedades mecânicas e de regeneração do tecido ósseo. O objetivo é permitir a impressão (colocação pontual) de células e biofatores para alcançar o *scaffold* ideal (Hollister, 2005). A habilidade de diagramar materiais cerâmicos em três dimensões (3D) é crítico no aspecto estrutural, funcional e biomédico. Essa habilidade é suportada por métodos de fabricação que usam esses controladores de movimento transversal computadorizados para se reproduzir a forma geométrica projetada, oferecendo também a possibilidade de criar cerâmicas em 3D com variações locais de estrutura, composição e propriedades que não seriam possíveis de serem obtidas de outro modo (Lewis, Smay *et al.*, 2006).

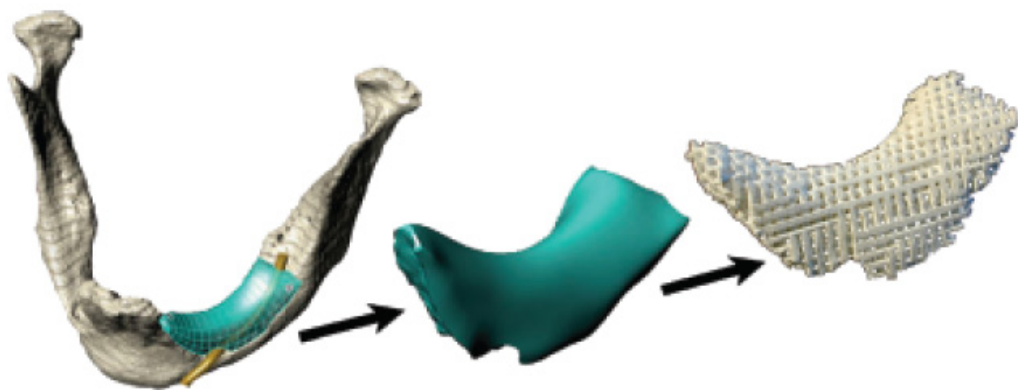


Figura 3. 13 - A seqüência de imagens representa os passos de processamento requeridos para otimizar o *scaffold* de hidroxiapatita (HAp) que foi ajustado na parte danificada da mandíbula do paciente: A imagem obtida da mandíbula danificada por tomografia computadorizada (esquerda) possibilita o projeto da parte a ser restaurada (centro) e uma estrutura periódica porosa de HAp é reproduzida (direita) (Lewis, Smay *et al.*, 2006).

Estudos dos processos tumorais nos tecidos podem ser realizados pela investigação com materiais porosos tridimensionais (3D) impregnados com células carcinogênicas e em conjunto (figura 3.14), pela investigação do comportamento de drogas utilizadas no tratamento cancerígeno. *Scaffolds* altamente porosos produzidos a partir do polímero sintético poli(lactídeo-co-glicosídeo) (PLG) propiciam um sistema de cultura celular em 3D para serem aplicados em ensaios *in vitro* bem como *in vivo*. Esses *scaffolds* são facilmente produzidos, manuseados e atendem ao uso em grande escala. Esse polímero foi utilizado para a investigação do potencial maligno das células cancerígenas nas relações entre essas células tumorais em um ambiente microestrutural 3 D controlado (Fischbach, Chen *et al.*, 2007). A figura abaixo mostra a aplicação do scaffold PLC nos estudos *in vitro* e *in vivo*.

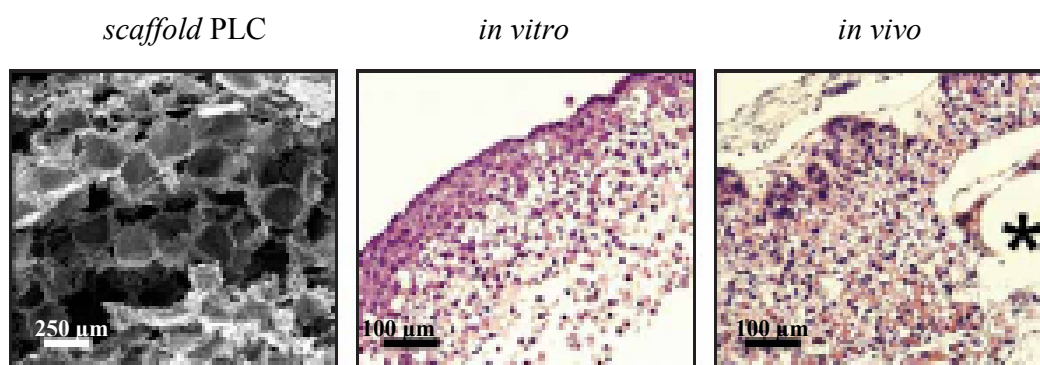


Figura 3. 14 - Scaffold 3D do polímero PLG semeado com células cancerígenas (esquerda). Corte transversal do tumor célula – polímero crescido *in vitro* (centro) e *in vivo* (direita). (*) indica fragmentos do scaffold polimérico. (Fischbach, Chen *et al.*, 2007)

3.7.4 - Breve revisão dos materiais empregados na obtenção de cerâmicas porosas de fosfatos de cálcio neste trabalho.

A estratégia promover a sinterização para obtenção de cerâmicas a base de fosfato de cálcio pode ser alcançada com aplicação de aditivos. Carbonatos dos elementos químicos das colunas IA e IIA da tabela periódica, como o sódio (Na), potássio (K) e, Lítio (Li) são comuns como matérias primas para vidros e cerâmicas. Carbonatos de álcalis são comparativamente estáveis e se fundem sem sofrerem decomposição, com a exceção do Li_2CO_3 que é termicamente estável somente até 600 °C e funde a 726 °C, enquanto já está sendo

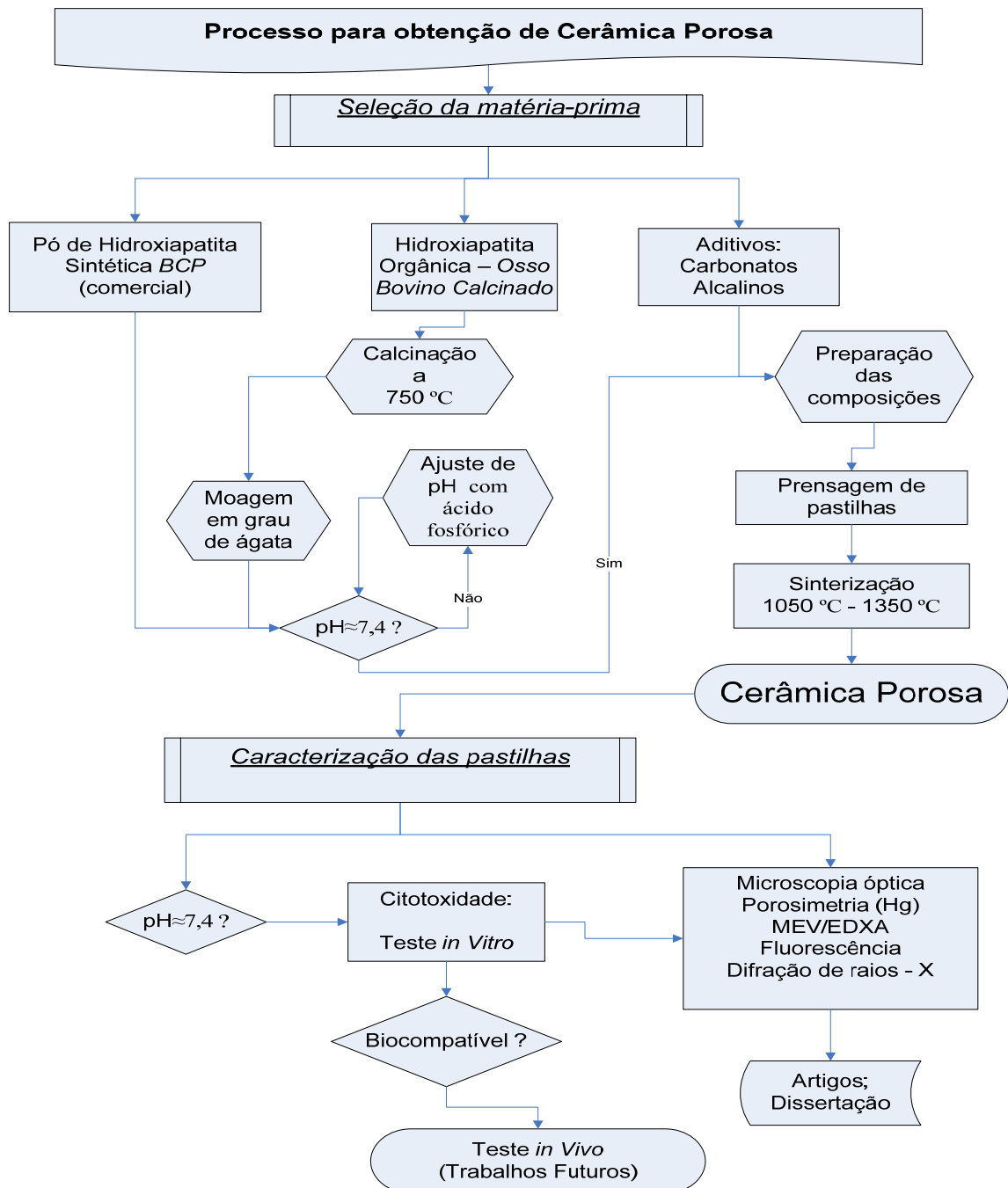
parcialmente decomposto. Diferentemente, o CaCO_3 se decompõem em CO_2 e CaO , com reação de entalpia $\Delta H_{25^\circ\text{C}} = 178,4 \text{ kJ}$ (42,6 kcal) por mol. A decomposição do MgCO_3 ocorre substancialmente em baixas temperaturas e sua pressão de dissociação atinge a pressão atmosférica entre 400 a 480 °C e entalpia de: $\Delta H_{25^\circ\text{C}} = 121 \text{ kJ}$ (28,9 kcal) por mol. A decomposição térmica do Na_2CO_3 se torna distinta, acima do ponto de fusão (851 °C), onde o Na_2CO_3 líquido se decompõe em o Na_2O líquido e CO_2 gasoso. O óxido de sódio permanece em solução e, quando a concentração desse óxido aumenta, ele é vaporizado na forma de sódio gasoso e oxigênio. Comparado com o Na_2O e K_2O , que são decompostos para seus elementos químicos durante a vaporização, o óxido de lítio, Li_2O é mais estável e suas moléculas predominam na fase de vapor. O K_2CO_3 funde a 891 °C e é fornecido sob a forma de potássio hidratado (Hlavác, 1983).

3.7.5 – Citotoxicidade - Testes de Difusão em Ágar (ASTM-F895)

Monocamadas celulares da linhagem L929 de tecido conjuntivo de camundongo são cultivadas em placas de Petri de 35 mm na presença de RPMI 1640 e 5% de soro fetal bovino (SFB) e incubado por aproximadamente 48 horas, a 37°C e 5% de CO_2 . Após a obtenção da confluência adequada, o meio de cultura líquido é substituído pelo meio de cobertura sólido composto de partes iguais de meio concentrado (2x) e ágar Noble (3%). Amostras dos controles negativos (polietileno de alta densidade e/ou disco de filtro atóxico) e positivos (látex e/ou filtro atóxico embebido com solução de fenol) e do material-teste são colocados sobre a superfície do meio de cobertura sólido e incubados por um período de 24 horas para avaliação de suas propriedades citotóxicas. Componentes tóxicos porventura presentes no material-teste podem difundir-se pelo meio de cultura, formando um gradiente de concentração e afetando as células localizadas a diferentes distâncias da amostra. Após a delimitação da área de contato das amostras na superfície externa das placas, essas são removidas e as células expostas a uma solução do corante vermelho neutro (VN) que ira corar as intactas. O índice de zona (IZ), que corresponde a área ou zona clara onde as células não foram coradas pelo vermelho neutro, e o índice de lise (IL), que indica a porcentagem de células degeneradas ou afetadas dentro da zona de toxicidade, são relacionados para fornecer o índice de resposta (IR) através da expressão $\text{IR} = \text{IZ}/\text{IL}$. As amostras são avaliadas em triplicatas em cada um dos experimentos realizados (Goes, Lopes *et al.*, 2006)

Capítulo 4: Materiais e Métodos

Neste capítulo estão descritas as técnicas de caracterização e protocolo para experimentos *in vitro* utilizados neste trabalho, representados resumidamente pelo fluxograma abaixo:



4.1 - Seleção e preparação das matérias-primas empregadas na elaboração das cerâmicas porosas.

A obtenção de uma matéria-prima composta com hidroxiapatita deve atender as normas ASTM F1088-04a e ASTM F1185-03, que são as respectivas especificações para o beta-fosfato tricálcio e hidroxiapatita aplicados como implante cirúrgico. Foram escolhidos para o caminho na obtenção de *scaffolds* os fosfatos de cálcio de origem bovina e os compostos de origem sintéticos genericamente denominados fosfatos de cálcio bifásico (BCP).

Foram coletados ossos da tíbia e do fêmur de bovinos, provenientes de animais adultos, no comércio varejista de carnes. A hidroxiapatita de origem comercial foi utilizada nas fases onde o desenvolvimento dos *scaffold*, para este trabalho, estava mais consolidado. A tabela IV.1 reúne as principais matérias primas empregadas neste trabalho Os aditivos foram empregados com objetivo de facilitar a sinterização pela formação de fase líquida e contribuir no aumento da porosidade e do tamanho dos poros.

Tabela IV. 1 – Matérias Primas

Matéria Prima	Descrição		Fabricante
Y	Pó de fosfato de cálcio bifásico sintetizado	BCP = hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) + β -TCP ($Ca_3(PO_4)_2$)	INSIDE Cerâmicas Avançadas Ltda
X	Pó de osso bovino	Calcinado (750 °C)	Osso bovino obtido no varejo.
Li ₂ CO ₃	Carbonatos alcalinos (P.A.)	Lítio	Vetec
K ₂ CO ₃		Potássio	Merck
Na ₂ CO ₃		Sódio	Merck
CaCO ₃		Cálcio	Merck
Mg CO ₃		Magnésio	LabSynth
(NH ₄) ₃ PO ₄ 3H ₂ O	Fosfato (P.A.)	Amônio Hidratado	Riedel-de Haën

A hidroxiapatita, com composição química estequiométrica de $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ associada aos aditivos que formam o sistema CaO-K₂O-MgO-Li₂O ($CaCO_3 - K_2CO_3 - MgCO_3 - Li_2CO_3$), são levados ao forno para que esta mistura seja sinterizada pela formação de fase líquida que permite a união dos grãos do pó do fosfato e cálcio e também, a liberação dos

gases que contribuem no aumento da porosidade. O fosfato pensado para ser introduzido como aditivo no sistema é proveniente do fosfato de amônio tri-hidratado $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

4.2.1 – Tratamento térmico do osso bovino para obtenção de fosfatos de cálcio.

Os pedaços de osso bovino, adquiridos no varejo de carnes (frigorífico), foram calcinados em mufla, a 750 °C por um período de 1 hora para serem utilizados como fonte de fosfato de cálcio na produção de pastilhas cerâmicas. Para isso foi empregado uma mufla com resistência elétrica, da marca Lavosier, modelo 402 D, a 750 °C. Os ossos utilizados foram cortados em pedaços com lâmina de serra elétrica e em seguida as partes moles internas e externas foram removidas. A preparação do pó do osso calcinado foi realizada por maceração manual dos pedaços do osso durante 10 minutos em grau de ágata até se obter um pó fino com granometria irregular.

O valor do pH obtido do pó em água deionizada tipo mili-Q foi medido pelo leitor de pH da OAKTON, modelo pH 100 series.

Foi realizada uma investigação do comportamento da porosidade do osso bovino por porosimetria de mercúrio, quando estes foram tratados termicamente entre 500 °C e 1350 °C sendo que em mufla até 1050 °C e para a temperatura de 1350 °C, por forno da marca Oga que opera com resistência elétrica de carbeto de silício (SiC).

4.2 –Produção de pastilhas.

Para produção das pastilhas foram projetadas três matrizes em aço-carbono temperado e revenido, com os diâmetros internos de cinco, dez, vinte e cinco milímetros. Apenas as matrizes de dez e vinte e cinco milímetros foram utilizadas. A figura 4.1 mostra uma matriz para confecção de pastilhas com 25 mm de diâmetro.



Figura 4. 1 - Matriz para confecção de pastilhas cerâmicas com diâmetro de 25 mm.

Foram usados dois lotes de pó de osso calcinado X e X2 produzidos no laboratório e o pó comercial para a elaboração das composições, apresentados na tabela IV.2. As composições foram prensadas, num primeiro estágio, com carga aplicada de duas toneladas. As prensagens das pastilhas nos estágios seguintes foram com carga de uma e quatro toneladas. Essa variação da carga nas matrizes foi para investigar a contribuição da pressão na sinterização, apesar desta se comportar com a formação de fase líquida, do pó com tamanho grão obtido por maceração. Para obter pastilhas com espessura de aproximadamente 2 mm, as misturas dos pós foram pesadas em balança digital, marca TEPRON modelo Mark 500 (classe II), sendo 2g (dois gramas) para a matriz de 10 mm de diâmetro e 3g (três gramas) para a matriz com 25 mm de diâmetro.

Tabela IV. 2- Composição das misturas para fabricação das pastilhas.

Composi- ção.	X	X2	Y	Na ₂ O	K ₂ O	MgO	P ₂ O ₅	Li ₂ O
	% Peso	% Peso	% Peso	% Peso	% Peso	% Peso	% Peso	% Peso
1		90		10	0	0	0	0
2		85		10	0	0	0	5
3		50		0	0	0	0	50
4		80		10	5	0	0	5
5		80		10	2,5	0	5	2,5
6		80		10	2,5	2,5	2,5	2,5
7		70,5		25	1,8	0,2	0	2,5
8	70,5			25	1,8	0,2	0	2,5
9			70,5	25	1,8	0,2	0	2,5
10	80			10	5	0	0	5
11	87			10	1,8	0,2	0	3
12	88			10	1,8	0,2	0	0
13			87	10	1,8	0,2	0	3

Os carbonatos alcalinos estão representados pelas proporções dos seus respectivos óxidos.

4.3 - Sinterização

As pastilhas foram sinterizadas em fornos elétricos do laboratório de cerâmica do STQ-CETEC. Uma mufla de resistência de elétrica (Cr-Ni) foi utilizada para o experimento de sinterização nas temperaturas de 750 °C e 1050 °C, com taxa de aquecimento de 5 °C/min. Um forno Oga, com resistências de carbetto de silício (SiC), do mesmo laboratório, foi utilizado para o experimento de sinterização a 1350 °C, também com taxa de aquecimento de 5 °C/min. Os fornos foram desligados 1 h e 4 h (uma hora e quatro horas) após atingirem a temperatura escolhida. As amostras foram retiradas quando os fornos estavam à temperatura ambiente.

A sinterização por fase líquida ocorre quando em uma determinada temperatura surge uma fase líquida que molha todas as partículas do pó. Essa fase normalmente é obtida com adição de materiais fundentes. Isso minimiza os problemas de compactação causados pela irregularidade no tamanho das partículas do pó. Já na sinterização comum, essa irregularidade pode afetar a compactação e posteriormente na sinterização de pós sem agentes fundentes. Neste trabalho, o pó foi produzido por duas técnicas; maceração com produção de um pó com uma variação maior no tamanho da partícula e pelo moinho Shater-Box.

4.4 - Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM)

A tabela IV.3 mostra os parâmetros do ensaio de PIM que foram realizados no laboratório de porosimetria do STQ-CETEC. O porosímetro utilizado foi o Autopore IV, Modelo 9220 marca Micromeritics Instrument. Os penetrômetros escolhidos para o ensaios de PIM foram o de 3 ml para pastilhas sinterizadas e de 5 ml para fragmentos de osso bovino da parte cortical da tíbia. Foram realizados ensaios de PIM para os fragmentos de ossos tratados termicamente nas temperaturas de cru, 100 °C, 120 °C, 500 °C, 750 °C, 1050 °C e 1350 °C, sendo que para análise neste trabalho, somente foram consideradas as amostras tratadas termicamente com temperatura igual ou superior a 500 °C, por essas terem sido consideradas osso calcinado. Todas as composições que formaram pastilhas sinterizadas foram investigadas na técnica de porosimetria de mercúrio. Sendo que, foram considerados apenas os resultados validados pela técnica. Foram selecionadas 6 amostras sinterizadas de cada composição para os ensaios.

Tabela IV. 3 Parâmetros utilizados nos ensaios de porosimetria

Porosímetro Autopore IV–Modelo 9220 V3.05 - Micromeritics Instrument		
	Pressão de vácuo	0 - 345 Pa
Baixa pressão:	Tempo de vácuo	5 min
Diâmetro do poro: 360 a 3,6 μm	Pressão de mercúrio (Hg)	3,447 kPa
	Tempo de equilíbrio	10 s
Alta pressão:	Tempo de equilíbrio	10 s
Diâmetro do poro: 6 a 0,003 μm		
Pressão máxima		413,685 MPa
Ângulos de contato (valores foram aferidos por amostra)		130° até 154° (ver resultados)
Tensão superficial do mercúrio		48,5 N/m ²
Evacuação mecânica		6,6 Pa
Densidade do mercúrio		13,5355 kg/l (25°C)

4.4.1 - Medida do ângulo de contato (AC)

O ângulo de contato é uma variável solicitada pelo ensaio de porosimetria de mercúrio. Ele interfere no cálculo do tamanho do poro. Para medir o valor do ângulo de contato pelo método da gota estática, foram realizados ensaios onde as amostras eram fotografadas, como mostra a figura 4.2, com uso da câmera digital Panasonic modelo com 9200M Pixels e zoom óptico de 10x. As imagens foram analisadas como auxílio do aplicativo Autocad 2006 da AutoDesk. O ângulo de contato foi obtido pela medida do ângulo formado pela tangente no ponto onde uma elipse desenhada ao redor da gota intercepta a reta que define a interface líquido – sólido do sistema. O ajuste da elipse é função da forma elipsoidal que a gota adquire em contato com o substrato.

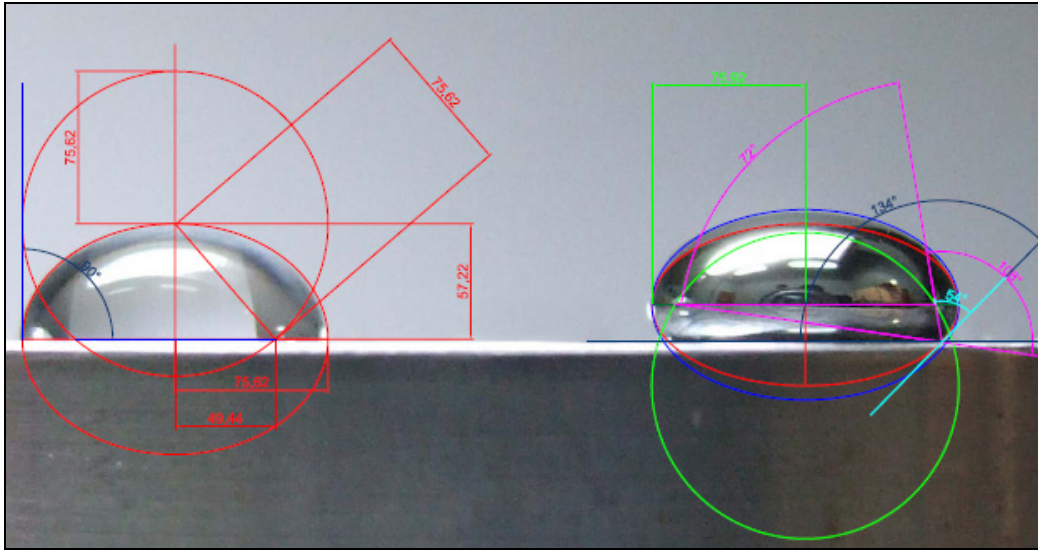


Figura 4. 2 - Figura Ângulo de Contato obtido pela fotografia da gota sobre o substrato. À esquerda, tem-se uma gota de água sobre uma peça em aço inox (passivado), ângulo de contato igual a 90°. À direita, é mostrado o cálculo geométrico do ângulo de contato formado pela da tangente do ponto da interface entre a gota de mercúrio depositada sobre o mesmo substrato de aço resultando em AC= 134°. Temperatura de ensaio T = 16°C.

Etapas adotadas para se medir o valor do ângulo de contato por registro fotográfico:

- a. Preparar a superfície da amostra de forma plana, inclusive nas bordas
- b. Limpar a superfície sem alterar as propriedades do substrato.
- c. Secar em estufa a amostra.
- d. Escolher o líquido da gota desde que esse líquido não reaja quimicamente com a superfície da amostra.
- e. Devido a sua volatilidade (Webb e Orr, 1997) e toxicidade (Azevedo,2003) medidas de AC utilizando o mercúrio metálico, devem ser realizados em capela e ambiente resfriado.
- f. Ferramentas: Máquina fotográfica digital com zoom, aplicativo de CAD e pipeta descartável.

Nota: Método de medida AC da gota estática com uso de aplicativo de CAD e fotografia digitalizada (Vaz e Cardoso, 2006).

A aferição desse método foi através do angulômetro da Micromeritics modelo 1501:

O cálculo de AC com esse aparelho foi realizado com o uso do micrômetro do angulômetro. O valor da maior medida da altura foi aplicado na equação proposta nos trabalhos de Shulbert, 1968 in (manual of angrometer 1501 – Micromeritics) e Heertjes, PM and Kossen, NWF, Powder technol. 1, 33 (1967), in (Weeb and Orr, 1997).

4.5 - Microscopia:

A investigação óptica das características dos poros das pastilhas obtidas no processo de sinterização foi realizada pelo uso de microscópio óptico de luz transmitida e uma visualização espacial desses poros, feita por estereoscópio (lupa). A tabela IV.3 mostra os parâmetros de microscopia aplicados para caracterizar as pastilhas constituídas somente com o as matérias primas de fosfato de cálcio puro e com as sinterizadas com misturas de aditivos para possibilitar a formação de fase líquida e aumento da porosidade interconectada.

Tabela IV. 4 - Parâmetros de microscopia

Instrumento	Fabricante	Acessório:	Ensaio
Lupa	Micronal	Câmera Fotográfica Digital Sony	Aumento 100X
Microscópio Óptico	Leica	Câmera Digital Colorida JVC	Luz Transmitida Aumento 100X

4.6 - Difração de Raios X

O ensaio das amostras (tabela IV.5) foi realizado pelo equipamento DRX6000 da SHIMATZU foi executado com o difratômetro equipado com anodo de cobre. A varredura 2θ foi efetuada nas seguintes condições: contínuo; velocidade de $2,00^\circ/\text{min}$; passo de 0.02° ; limites compreendidos entre 4° a 80° .

Condições de operação: Voltagem do gerador de raios -X, 20kV; intensidade de corrente do gerador de raios-X, 2mA; potência de 1,8kW. A identificação de fases cristalinas foi feita com base no banco de dados de raios_X, PDF (Powder Diffraction File) da ICDD (Icdd, 2000).

Tabela IV. 5 – Amostras utilizadas para o ensaio de DRX

Amostra	Descrição	Ensaio1	Ensaio 2 (Método Rietveld)
X	Amostra de osso bovino calcinado (macerado)	30 min.	16 horas
X2	Amostra de osso bovino calcinado (shater box)	30 min	Não realizado
Y	Amostra comercial (BCP)	30min	16 horas
P11	Pastilha de composição 11 (X + aditivos)	30 min	16 horas
P13	Pastilha de composição 13 (Y + aditivos)	30 min	16 horas

4.6.1 - Método Rietveld (MR)

O Método Rietveld (Young, 1996) permite o refino na análise da estrutura cristalina de forma a fazer com que o difratograma calculado com base em estruturas cristalinas definidas, se aproxime da estrutura real. O difratograma observado deve ser obtido num processo de varredura passo-a-passo com incremento do valor do ângulo 2θ . O ensaio de DRX para aplicação do MR foi realizado com passo de 0,02 graus e velocidade de 15 segundos por passo com uso de monocromadores e filtros. O dados do ensaio foram processados com o auxílio do aplicativo FullProf Suite (Fullprof, 2007). A tabela IV.4 apresenta as amostras escolhidas para que foram analisadas por este método.

4.7 – Fluorescência de raios-X:

O espectrômetro de fluorescência de raios-X é um instrumento que determina quantitativa ou semi-quantitativa os elementos presentes numa determinada amostra. Isto é possível através da aplicação de raios-X na superfície da amostra e a posterior análise dos fluorescentes raios-X emitidos. Foi utilizado o espectrômetro por energia dispersiva EDX-800 da SHIMATZU com capacidade de determinação do carbono C ao urânio U ($z=6 - 92$), para a análise das amostras com os parâmetros conforme indicado na tabela IV.6. As matérias primas de fosfato de cálcio X, X2 e Y bem como as pastilhas PX e PY , P11 foram analisadas. Além destas,

fragmentos do osso calcinado precursores dos pós de origem orgânica, também foram analisados para identificar a origem da presença de metais bivalente na amostra X2, detectada no ensaio de fluorescência de raios-X.

Tabela IV. 6 – Parâmetros do ensaio de fluorescência de raios –X

Tipo de análise:	semi-quantitativa
Tubo de raios-X utilizado:	ródio (Rh)
Uso de filtro:	Nenhum
Ambiente do ensaio:	Vácuo
Diâmetro do porta-amostra:	10 mm

4.8 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e EDS

A imagem eletrônica de varredura é formada pela incidência de um feixe de elétrons na amostra, sob condições de vácuo. A incidência do feixe de elétrons na amostra promove a emissão de elétrons secundários, retroespalhados, assim como de raios X característicos. A imagem eletrônica de varredura representa em tons de cinza o mapeamento e a contagem de elétrons secundários e retro- espalhados emitidos pelo material analisado. Ao MEV pode ser acoplado o sistema de energia dispersiva (EDS) e também conhecida como técnica de análise dispersiva de energia de raios-X, que possibilita a determinação da composição qualitativa ou semiquantitativa das amostras, a partir da emissão dos raios X característicos. Os equipamentos utilizados foram o JEOL – JCXA 733 para o MEV e o Micro analisador EXL-link para o EDS. A tensão utilizada no ensaio foi de 25 kV. A figura 4.3 mostra as amostras tratadas com vaporização de carbono para permitir a condução elétrica das amostras cerâmicas.

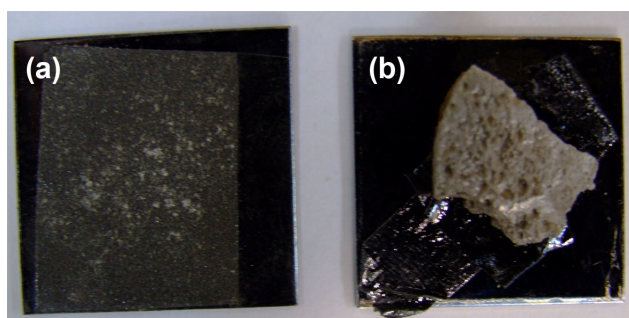


Figura 4. 3 - Preparação da amostras para análise no MEV. Pó da amostra X em fita (a) e Pastilha da amostra PX (b), tratadas com vaporização de carbono. Suporte 1x1

4.9 - Testes de citotoxicidade *in vitro*, Difusão em Ágar (ASTM-F895).

A citotoxicidade é o efeito prejudicial ou nocivo não desejado induzido pelo biomaterial no sistema da cultura de células *in vitro* (Marica, Soňa Jantová et al., 2005). O teste de citotoxicidade "in vitro" está classificado na ISO 10993-1, como um teste de avaliação inicial que utiliza técnicas de cultura de células (Daguano, Santos *et al.*, 2007) e a toxicidade celular está descrita pela ISO 10993-5.

O teste de citotoxicidade foi realizado no laboratório de Biologia Molecular, da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em Belo Horizonte. A cultura de células, esterilização (autoclave), bem como a escolha do protocolo utilizado, foram os utilizados na rotina do laboratório. Para o teste de citotoxicidade, foi realizado o método de difusão de Ágar com o uso do indicador Vermelho Neutro (VN) que foi colocado no topo de uma monocamada de células L929 e incubado por 24 horas a 37 °C.

Os passos para esse ensaio de citotoxicidade são:

1. Semear 10^5 células L929 por poço, em uma placa de 6 poços;
2. Lavar as placas com solução salina, (soro fisiológico tampão, *PBS*);
3. Adicionar 3 ml de solução Ágar, juntamente com vermelho neutro (VN);
4. Aplicar sobre o gel as amostras investigadas e o controle (mangueira de silicone cortada transversalmente).

5. Esterilizar as amostras: Autoclacagem ou Irradiação (as amostras podem perder as características físico-químicas nesta etapa. Portanto, deve-se averiguar qual processo de esterilização é o mais adequado.)
6. Incubar por 24 horas à 37 °C;
7. Observar ao redor das amostras os efeitos tóxicos;
8. Graduar os efeitos tóxicos.

Capítulo 5: Resultados e Discussão

5.1 - Produção dos pós com hidroxiapatita.

A obtenção de fosfatos de cálcio de matriz óssea é estimulada pelo alto custo da hidroxiapatita comercial. O grama da hidroxiapatita sintetizada custa entre de seis a quinze reais (Sigma-Aldrich, 2002). Optou-se pela produção de fosfatos de cálcio facilmente obtido pela calcinação de ossos de bovinos. O ponto de partida desse estudo foi investigar diferentes misturas, buscando uma relação onde os aditivos e os pós de fosfatos de cálcio promovessem a sinterização das amostras para suportar as exigências mecânicas, físico-químicas e de compatibilidade biológica da pastilha porosa, detentora de poros interconectados onde o tamanho desses poros seja capaz de acolher as células formadoras do tecido ósseo.

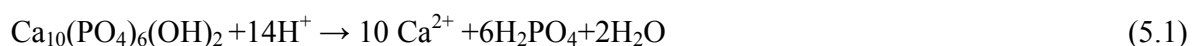
O osso bovino teve a sua parte orgânica eliminada diretamente por calcinação, como mostra a figura 1, em forno resistivo com tratamento térmico a 750 °C, em atmosfera oxidante (ar). Os pedaços calcinados foram macerados em placa de ágata. Observou-se após a calcinação um comportamento higroscópico do material, sendo necessária sua armazenagem em ambiente seco.



Figura 5. 1 - Osso Bovino, calcinado à 750 °C.

O estudo do potencial de hidrogênio (pH) em solução aquosa das amostras de pós de osso calcinado à 750 °C (amostras X), do pó do material comercial contendo a hidroxiapatita (Y) e

da pastilha (PX) constituída somente com pó de osso calcinado (pó da amostra X) prensado com cargas de quatro toneladas em matrizes de 10 e 25 mm tratadas termicamente a 1350 °C para promover a sinterização foi realizado a fim de verificar o comportamento da pastilha ao manuseio e da dissolução da mesma em água. Neste trabalho não foram realizados estudos de propriedades mecânicas. Para a hidroxiapatita é esperado o consumo de prótons durante a reação de dissolução dos fosfatos e o conseqüente aumento do pH, como mostra a equação química 5.1 abaixo (Mavropoulos, 1999).



Medidas do pH mostradas na figura 5.2 indicaram que após 48 horas as amostras detinham os respectivos valores de pH estabilizados. O pó Y ficou estabilizado com pH=7,1 bem próximo da faixa de pH do sangue humano (pH≈7,25). Os pós da amostra X apresentaram valores na faixa de pH = 9 e a pastilha PX, produzida com esse pó, apresentou um valor de pH≈8. A queda do pH da pastilha PX em relação ao do pó da amostra X indica que a sinterização diminui a protonagem em solução aquosa, devido principalmente a diminuição da área efetiva da interface soluto/solvente. É conhecido pela fisiologia humana que o regime de estabilidade do pH fisiológico do fluido intersticial é controlado pelo próprio organismo e é executado por mecanismo tampão, onde as variações de pH são corrigidas por um par ácido – base que atua como um estabilizador de pH (Paulev, 1999 - 2000). A tabela a V.1 mostra a legenda das amostras cujo pH foi investigado:

Tabela V. 1– Legenda dos pós e pastilhas para testes de pH

Legenda	Descrição das amostras
Y	Pó de fosfato de cálcio bifásico sintetizado - Comercial (fornecedor externo)
X	Pó de osso bovino calcinado (750 °C) macerado em grau de ágata
X1	Pó de osso bovino calcinado (750 °C) macerado em grau de ágata e lavado água destilada (Temperatura ≈ 100 °C)
X2	Pó de osso bovino calcinado (750 °C) moído no Shatter Box (com traços de metais)
PX	Pastilha Cerâmica do pó X sinterizado a 1350 °C

A condição de sinterização da pastilha para fabricação de cerâmicas biologicamente aplicáveis com patamar de pH fisiológico (pH≈7,4) deve ser alcançada para que o implante não supere a capacidade de manutenção local do pH fisiológico pelos processos homeostáticos.

Os valores de pH dessas amostras são apresentados na tabela V.2. Foram realizados 5 leituras para cada amostra.

Tabela V. 2 - Valores de pH do pó em meio aquoso (n=5)

Horas	H ₂ O	Y	X	X1	X2	PX
(h)	pH	pH	pH	pH	pH	pH
0	6,3 (±0,2)	7,6 (±0,3)	9,8 (±0,3)	8,7 (±0,3)	10,4 ±0,2	8,1 (±0,3)
4	6,6 (±0,2)	7,5 (±0,2)	9,2 (±0,2)	8,7(±0,3)	9,5 (±0,2)	8,2(±0,2)
24	6,5 (±0,2)	7,4 (±0,2)	9,5 (±0,2)	8,9 (±0,2)	9,2 (±0,2)	7,8 (±0,2)
48	6,5 (±0,2)	7,1 (±0,2)	8,9 (±0,2)	8,9 (±0,2)	8,9 (±0,3)	7,7(±0,3)

Os valores de pH dos pós de osso calcinado X, X1 X2 e da pastilha desse pó de osso calcinado PX estão muito longe dos valores pH fisiológico e mostram a necessidade de uma correção do pH após a calcinação desses pós como matéria prima na produção de pastilhas com pH fisiológico. Assim, pode-se constatar que o elevado pH em solução aquosa desses pós orgânicos tratados termicamente indicaram que o processo de calcinação do osso bovino nessa temperatura produziu uma composição de caráter fortemente alcalino.

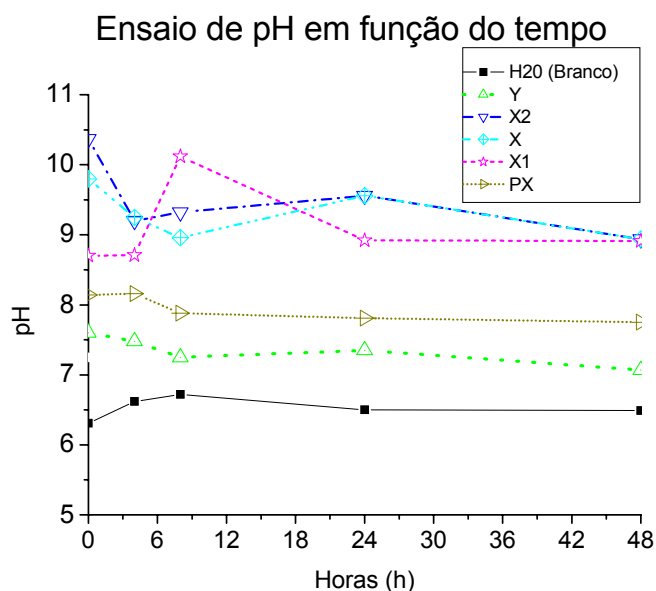


Figura 5. 2 - Valores de pH das amostras dos pós de osso bovino tratado a 750 °C, do pó comercial e de uma cerâmica PX em meio aquoso obtidos em função do tempo. Temperatura do ensaio: 37°C

Ainda sobre este estudo qualitativo, deve-se ressaltar que o pó comercial possui um pH muito similar ao da média do sangue humano, que está na faixa de pH=7,25.

Depois desse estudo, motivado pelos ensaios de citotoxicidade, fez-se a correção com solução de H_3PO_4 , sempre mantendo o pH aproximadamente neutro. Essa correção passou pelo processo de lavagem do pó calcinado, com a remoção de cinzas e fases solúveis, em água deionizada aquecida e filtrado em papel de filtro quantitativo com 8 μm de diâmetro. O pó obtido é um concentrado preferencial de hidroxiapatita. Segundo autores como Putlyaev e Safronova, Hench, Legeros e outros, a hidroxiapatita é estável em meio aquoso com $pH > 5$ *in* (Legeros, Trautz *et al.*, 1967; Hench, 1991; Putlyaev e Safronova, 2006). Como principal resultado dessas análises, temos uma rota para obtenção de hidroxiapatita de origem orgânica para uso biológico.

5.2 - Características das amostras cerâmicas sinterizadas.

A sinterização promove a ligação entre as partículas devido à movimentação dos átomos estimulados pela alta temperatura. Durante o estágio inicial as partículas formam ligações com as partículas vizinhas que estão em contato. Com o progresso de densificação (diminuição dos centros de curvatura) novos contatos são formados, processo de sinterização característico para os pós de fosfato de cálcio puro compactados. Já os aditivos são usados para aumentar a taxa de difusão durante a sinterização (criação de ligação primária), podendo auxiliar na formação de fase líquida. Tipicamente, a formação da fase líquida durante a sinterização contribui para a ligação entre as partículas, promovendo o aumento da resistência mecânica (a resistência mecânica não foi abordado neste trabalho), fenômeno predominante nas misturas investigadas neste trabalho. Nesta parte do estudo, foi realizado o tratamento térmico das pastilhas prensadas com cargas apresentadas na tabela V.3 e se avaliou a sinterabilidade das amostras. A tabela V.3 apresenta também a composição química de pastilhas sinterizadas a 1350 °C durante 4 (quatro) horas. Para as amostra 10, 11 e 12, além da temperatura de 1350 °C também foram tratadas termicamente em 750 °C e 1050 °C, nas mesmas condições de compactação. Estas composições tiveram como ponto de partida as amostras de números 4 e 7 da tabela. Os difratogramas de raios-X, que são apresentados no item 5.9 deste capítulo,

indicam que o fosfato de cálcio de osso calcinado X à 750 °C pode ser considerados como tendo apenas a fase da hidroxiapatita e o fosfato comercial como sendo uma composição de duas fases, hidroxiapatita e β -TCP. A figura 5.3 mostra a presença da fase de hidroxiapatita no pó de osso calcinado X2 à 750 °C que foi moído em moinho Shater-Box.

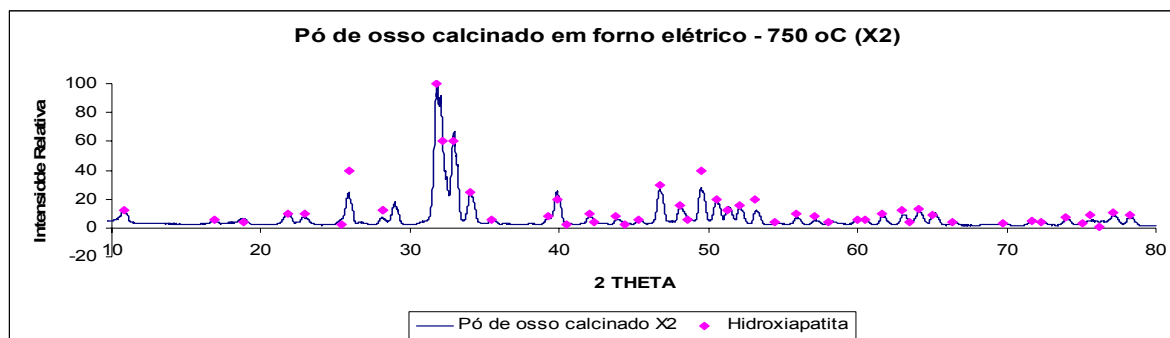


Figura 5. 3 - DRX do pó da amostra X2 calcinada à 750 °C, 1h. A ficha ICCD de fase de hidroxiapatita #9-0432, (Icdd, 2000) apresenta correlação aos picos da amostra.

Tabela V. 3 – Pastilhas produzidas por Sinterização até 1350 °C, 4 horas.

Pastilha de composição	Fosfato de Cálcio	Na ₂ O % (g)	K ₂ O % (g)	MgO % (g)	P ₂ O ₅ % (g)	Li ₂ O % (g)	Carga (MPa)	Sinterabilidade	Solúvel em água?
X	100	0	0	0	0	0	80	Boa	Não
							500		
X2	100	0	0	0	0	0	80	Boa	Não
							250		
							500		
Y	100	0	0	0	0	0	80	Boa	Não
							250		
							500		
1	90	10	0	0	0	0	250	Ruim	Sim
2	85	10	0	0	0	5	250	Ruim	Sim
3	50	0	0	0	0	50	250	Boa	Sim
4	80	10	5	0	0	5	250	Boa	Pouco
5	80	10	2,5	0	5	2,5	250	Boa	Pouco
6	80	10	2,5	2,5	2,5	2,5	250	Boa	Pouco
7	70,5	25	1,8	0,2	0	2,5	250	Boa	Pouco
8	70,5	25	1,8	0,2	0	2,5	80	Boa	Pouco
9	70,5	25	1,8	0,2	0	2,5	80	Boa	Pouco
10	80	10	5	0	0	5	80	Boa	Pouco
11	87	10	1,8	0,2	0	3	80	Boa	Pouco
							500		
12	88	10	1,8	0,2	0	0	80	Ruim	Sim
							500		
13	87	10	1,8	0,2	0	3	80	Boa	Pouco
							20	Ruim	

Os carbonatos alcalinos e o fosfato de amônio hidratado estão representados nesta tabela pelas proporções dos seus respectivos óxidos. A origem dos fosfatos de cálcio das misturas são apresentados na tabela IV.2.

Quando expostas ao ar por alguns dias, as pastilhas das composições 4, 5, 6, tratadas termicamente a 1350 °C e prensadas a 250 MPa também se tornaram instáveis ao manuseio, se desmanchando facilmente. As pastilhas número 7, 8 e 9 da tabela V.3 foram levadas para corte, onde suportaram o corte mecânico feito com disco de diamante. Em contato com a água as paredes destas amostras geraram uma pasta com aspecto argiloso e quando levada em estufa para secagem, estas se decompuseram e perderam as características básicas para construção de um *scaffold*. Nesta etapa, a principal preocupação foi focada na busca de pastilhas sinterizadas. Com a intenção de observar o comportamento da sinterização, as composições foram prensadas com cargas diferentes. Para reduzir a solubilidade em água, reduziu-se a quantidade de carbonato de sódio presente na amostra 7 para a da amostra número 4 da tabela V.3. A figura 5.4 mostra pastilhas de composição 8 e 9 prensadas em matriz de 25mm de diâmetro.



Figura 5. 4 – Pastilha composição 8 (esquerda) e 9 (direita) prensadas com carga de 4 toneladas em matriz de 25mm (80 MPa) e sinterizada à 1350 °C em forno elétrico ao ar.

Assim, as novas composições foram propositalmente elaboradas e com a quantidade dos ions Mg^{2+} , K^{+} para as composições de número 11, 12 e 13 similares às proporções dos seus íons presentes no sangue humano.

Para verificar se era possível obter pastilhas sinterizadas em temperatura diferentes de 1350°C, foram realizados experimentos com as amostras de pastilhas de composição 10, 11 e 12 nas temperaturas de 750 °C, 1050 °C. Como resultado, observou-se que estas amostras não apresentaram boa resistência mecânica após o processamento em temperatura de 750 °C. Na temperatura de 1050 °C, estas amostras sinterizaram. A temperatura de 1350 °C da tabela V.3 continuou a ser a temperatura aplicada na produção das pastilhas. As amostras de composição de número 12 da tabela V.3, sem adição do carbonato de lítio (Li_2CO_3), foram deixadas ao ar com umidade média de 30% e degradaram-se. As amostras da composição de número 10,11 e 13 que receberam o carbonato de lítio formaram fase líquida durante o tratamento térmico como resultado do processo de sinterização. A literatura apresenta algumas aplicações do lítio (Li) para uso clínico em pessoas com distúrbios psicológicos, em pequenas, pois o excesso desse elemento químico pode causar morte (Goto, Wakamatsu *et al.*, 1991; Harwood, 2005; Qing, Wenhai *et al.*, 2006).

As pastilhas prensadas com 500 MPa (matriz de 10 mm com carga de quatro toneladas) foram selecionadas para a continuidade das investigações de porosimetria por intrusão de mercúrio. Amostras das pastilhas prensadas com carga de 20 MPa, como a P13-20, não foram submetidas aos ensaios de porosimetria PIM por que não sinterizaram bem. A figura 5.5 abaixo, mostra pastilhas PY (500 MPa) e PX (500 MPa) prensadas em matriz de 10 mm de diâmetro com carga de 4 toneladas.



Figura 5. 5 - Amostras no formato de pastilhas, prensadas com 4 toneladas em matriz de 10 mm e sinterizadas até 1350 °C por 4h ao ar. Na linha superior, cerâmicas do pó Y e na linha inferior, cerâmicas de pó de osso bovino calcinado (PX-b).

5.3 - Teste de citotoxicidade *in vitro*, estudo preliminar

A toxicidade dos fosfatos de cálcio usados como matérias primas e algumas misturas de composições tratadas termicamente para formarem pastilhas sinterizadas foram investigadas preliminarmente. Estas amostras dos pós e pastilhas não receberam tratamento com o ajuste do pH para a faixa de pH fisiológico. A esterilização realizada pelo processo de autoclavagem das pastilhas de composição 10, 11, 12 e 13 a 1350 °C (tabela IV.2), prensadas em matriz de 25 mm (80 MPa) não resistiram e degradaram. Isso mostrou que o processo de esterilização, para futuros ensaios de citotoxicidade deverá seguir outro método, como o de irradiação. Neste estudo, o ensaio de citotoxicidade foi realizado com as amostras que não foram autoclavadas. Apenas a amostra Y foi esterilizada por esse método. O ambiente da autoclavagem, como umidade e temperatura, bem como a presença nas amostras de sódio (Na) e principalmente da fase CaO, higroscópica, colaboraram para a decomposição das pastilhas, apesar das mesmas estarem previamente sinterizadas. Foram investigadas as amostras dos pós Y e X (pó de osso bovino calcinado a 750 °C), os fragmentos de osso bovino calcinado nas temperaturas de 750 °C, a pastilha PX tratadas termicamente à 1350 °C, com 100% de pó de osso bovino calcinado, prensada com 80MPa. Nesse teste, as células cultivadas não foram tratadas com antibióticos para receberem as amostras. A figura 5.6 apresenta fotos do teste de citotoxicidade com resposta negativa (sem reação), mostrando a boa biocompatibilidade do pó comercial Y de pH=7.25.

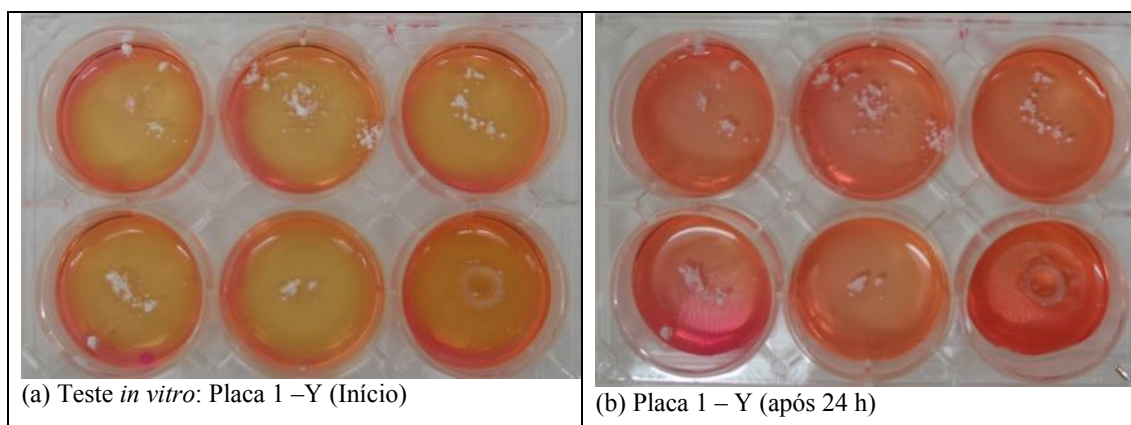


Figura 5. 6 - (a) Amostras do pó Y esterilizado em autoclave foram depositadas sobre a cultura de células L929 e (b) Resposta negativa das amostras após 24 horas sem manifestação do indicador vermelho.

As figuras 5.7 e 5.8 mostram fotos do teste de citotoxicidade de amostras que não foram perdidas no processo de esterilização por autoclavagem. As amostras foram depositadas sobre os poços contendo a cultura de células L929. A figura 5.7 apresenta o início (a) e fim (b) do ensaio de citotoxicidade de amostras de fragmentos de osso bovino calcinado a 750 °C, bem como as amostras das pastilhas tratadas a 750 °C, com composição 10, 11 e 12, com a seguinte identificação: P (pastilha) (número da composição da tabela IV.2) – (temperatura de tratamento térmico), ex: P10-750 °C. O teste destas amostras mostra que ocorreu imediata e violenta reação positiva, com intensa mudança de coloração. Estas amostras causaram a morte das células L929 presentes sem formação de anel após 24 horas. O pH medido dentro dos poços com uso de fita, revelou a forte característica alcalina do meio, com $\text{pH} > 8$.

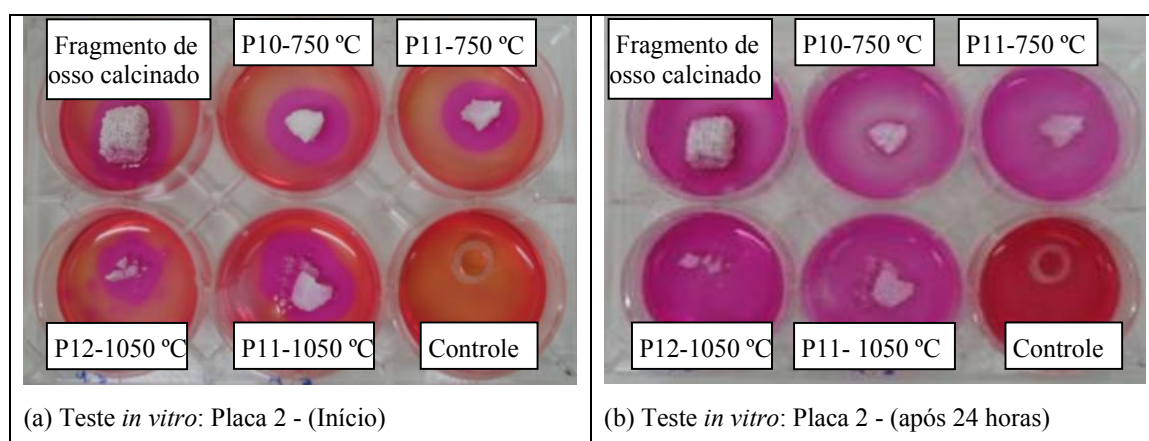


Figura 5. 7 - (a) Amostras do FX, P10-750, P11-A, P12-B e P11-B não esterilizadas foram depositadas sobre a cultura de células L929 e (b) Morte das células L929.

As amostras da figura 5.8 foram lavadas e fervidas em água deionizada a 100 °C. A sensibilização do indicador vermelho neutro foi mais lenta, como está mostrado na foto da figura 5.8 (a), mas ainda assim ocorreu a morte completa das células L929 presentes após 24 horas, como está apresentado na foto da figura 5.8 (b). A pastilha de composição X da tabela V.3, 80MPa e tratada a 1350 °C (PX) apresentou uma cor mais suave do que o fragmento do osso calcinado tratado a 750 °C. Apenas o pó Y obteve 100 % de resposta satisfatória para o ensaio. Não foi calculado o Índice de Zona (IZ) porque após 24 horas não havia a formação do anel para as amostras restantes. A verificação do pH das amostras antes do ensaio de citotoxicidade mostrou, neste caso, a importância do controle do pH dos pós de fosfato de cálcio utilizados como matéria prima na faixa do pH fisiológico.

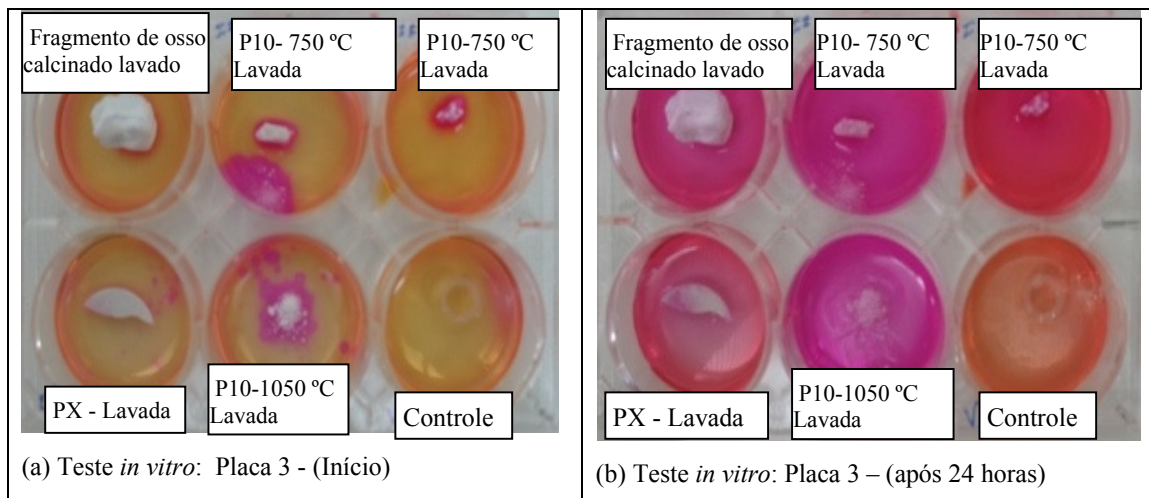


Figura 5. 8 - (a) As amostras foram fervidas em água deionizada (b) Resposta positiva das amostras logo após 24 horas com manifestação do indicador vermelho indicando a morte das células L929.

5.4 - Micrografias da pastilha P11

Amostras da pastilha de composição 11 (P11) com 2 mm de espessura foram estudadas por microscopia óptica de luz transmitida (figura 5.9-a) e por estereoscopia (lupa). A micrografia da figura 5.9-a mostra a luz transpassando em algumas áreas da pastilha de 2 mm de espessura, indicando a presença de poros interconectados. Na figura 5.9-b a presença de fase vítrea pode ser observada pela morfologia e brilho nesta amostra observada pela lupa.

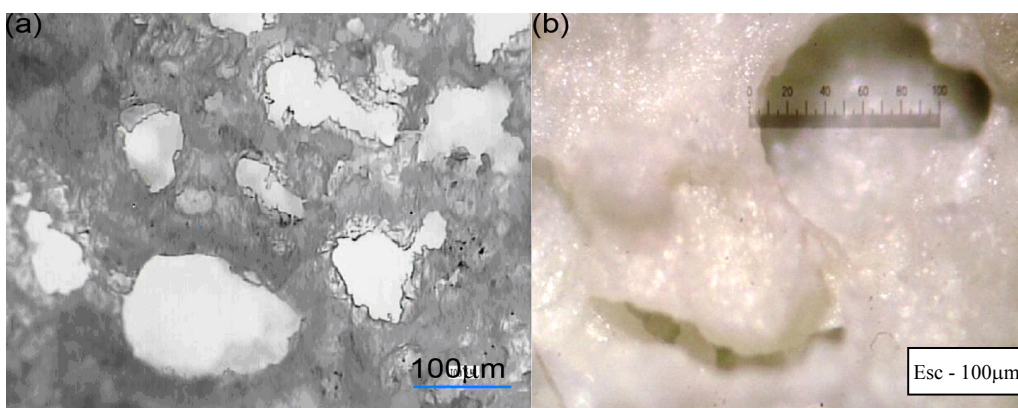


Figura 5. 9 - Micrografia de amostra P11 por microscopia óptica de luz transmitida, 10X onde as áreas claras são poros (b) Micrografia da amostra P11 por estereoscopia: lupa com aumento de 10X onde a fotografia mostra o poro e o brilho da fase vítrea.

5.5 - Medidas do ângulo de contato (AC) por fotometria e AutoCad® para uso na determinação do tamanho do poro pelo ensaio de Porosimetria de Intrusão de Mercúrio (PIM).

O ângulo de contato influencia diretamente no resultado do valor do tamanho do poro pela técnica de PIM, onde os cálculos do tamanho de poro são obtidos segundo a equação 5.2, de Washburn (Washburn, 1921):

$$D = \frac{-4\gamma \cos \theta}{P} \quad (5.2)$$

Onde, D é o diâmetro do poro, γ é a tensão superficial, θ é o ângulo de contato e P é a pressão hidráulica aplicada.

5.5.1 - Medida do Ângulo de Contato (AC) por análise de imagem fotográfica.

Com o auxílio do aplicativo de cad da Autodesk, Inc, AutoCad® 6.0, foi investigado o ângulo de contato das amostras estudadas no ensaio de porosimetria. O uso do ajuste por elipse tornou a tomada de decisão na escolha do ponto de intercessão entre gota e substrato - processo subjetivo. A reta que determina o ângulo de contato, é tomado como a tangente do ponto de intercessão pertencente à elipse, determinada pela bissetriz formada pelas retas que ligam aos pontos focais dessa elipse (ver figura 5.10). Nessa medida a amostra P11 o ângulo de contato foi determinado como sendo 143°.

1) Imagem óptica de AC da cerâmica P11:

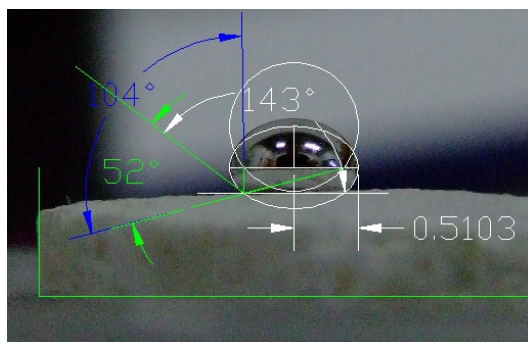


Figura 5. 10 - Medida do Ângulo de Contato. Técnica de leitura do AC com uso do ajuste de elipse. Medida por meio da obtenção da tangente no ponto de interface gota/substrato. Gota de Hg / Pastilha P11: AC=143°. Aplicativo AutoCad 6.0®

Para comparar o resultado desse método, utilizou-se o angulômetro Micromeritics 1501. A figura 5.11 mostra uma obtenção da medida de altura da gota de mercúrio pelo micrômetro utilizado no aparelho de angulômetro.



Figura 5. 11 - A figura mostra a ponta do micrômetro usado durante a medida da altura da gota de Hg sobre a pastilha P11, utilizado no aparelho de angulômetro.

A equação 5.3 é utilizada para cálculo do co-seno θ , onde $\theta > 90^\circ$ leva em consideração os efeitos da gravidade e capilaridade em função da porosidade. As equações 5.4 e 5.5 são complementares à equação 5.3 e a tabela 5.4 mostra a legenda dos símbolos empregados nestas equações:

$$\cos \theta = -1 + \left[\frac{4 - 2Bh^2}{3(1 - \varepsilon)Bh^2} \right]^{1/2} \quad (5.3)$$

$$B = \frac{\rho g}{2\gamma} \text{ (o termo considera a gravidade)} \quad (5.4)$$

$$\varepsilon = 1 - \left[\frac{\left(\frac{W}{\rho_s} \right)}{\frac{\pi d^2 t}{4}} \right] \text{ (o termo considera a porosidade)} \quad (5.5)$$

Tabela V. 4 - Legenda dos símbolos usados equações 5.3, 5.4 e 5.5 e os valores relacionados para o cálculo do AC da pastilha P11

Densidade do Mercúrio	ρ_{Hg}	13,5512 (18°C)
Densidade absoluta do sólido	ρ_s	3,16 g/cm ³
Aceleração da gravidade	g	980 cm ² /s ou 9,8 m ² /s
Tensão Superficial do Mercúrio	γ	485 g/cm ³
Peso da amostra	W	2,154 g
Espessura da amostra	t	0,23 cm
Diâmetro da amostra	d	2,5 cm
Altura máxima	h max	0,375 cm (foram tomadas 5 medidas)

Pelos cálculos: $\varepsilon = 39,7\%$

Assim:

$$\cos(\theta) = -0,793 \rightarrow \theta = 142,4^\circ$$

A medida feita pela fotometria (143°) ficou muito próxima da que foi estimada (142,4°) para a pastilha P11-500. A tabela abaixo apresentada a investigação do ângulo de contato do mercúrio pelo método de fotometria com fragmentos de osso bovino cortical obtido pelo ciclo de calcinação e tratamento térmico, para aplicação no ensaio de porosimetria de mercúrio.

Tabela V. 5 – Ângulo de contato (AC) das amostras de fragmento de osso tratado termicamente para aplicação no ensaio de porosimetria de mercúrio.

Osso Bovino	Tratamento Térmico (°C), 4 h	Fotometria AC (°)
Amostra 1	500	143
Amostra 2	750	143
Amostra 3	1050	150
Amostra 4	1350	151

O ângulo de contato para um material depende também das características de porosidade e capilaridade na superfície desse material. Com o aumento da temperatura, a densidade aparente também foi aumentada e o efeito da capilaridade diminuiu. Isso foi traduzido no aumento do ângulo de contato do osso tratado em temperaturas acima de 750 °C.

5.6 - Porosimetria por Intrusão de Mercúrio

A adsorção de gás (ex. BET) e a porosimetria por intrusão de mercúrio podem ser técnicas complementares. A técnica de adsorção de gás não será empregada nesse estudo, pois os tamanhos dos poros de interesse estão na região atendida pelo instrumento de porosimetria de mercúrio utilizado neste trabalho. A técnica de adsorção de água, método descrito por Hedge et al, 1995 *in* (Nielsen-Marsh e Hedges, 1999), não foi empregada neste trabalho, devido as característica higroscópicas dos materiais analisados.

A técnica de porosimetria de intrusão de mercúrio (equipamento de porosimetria Autopore II 9220 V3.05), fornece a distribuição de poros no intervalo 3 nm - 360 µm de diâmetro. Os resultados dos testes devem atender a faixa de confiabilidade dos ensaios, que corresponde ao intervalo de 25 a 90% da haste do penetrômetro.

A composição das cerâmicas foi planejada a fim de gerar amostras com maior concentração do tamanho de poros na faixa de 100 micrômetros, conforme as necessidades do meio biológico (Hench, 1991).

5.6.1 – Porosidade da materia prima. Medidas da distribuição de porosidade de ossos da parte cortical da tíbia de bovinos, por meio da porosimetria de intrusão de mercúrio.

O interesse no comportamento da porosidade do osso bovino quando os fragmentos desse material são tratados termicamente está em identificar a sinterabilidade dos mesmos e o uso desses fragmentos como *scaffold*. Nessa parte do trabalho, procurou-se avaliar a porosidade de amostras de osso bovino calcinado em diferentes temperaturas com conseqüente eliminação da parte orgânica (colágeno, etc.) A figura 5.12 mostra a porosidade obtida por PIM de fragmento de osso bovino da parte cortical da tíbia tratado termicamente nas temperaturas de 500 °C, 750 °C, 1050 °C e 1350 °C.

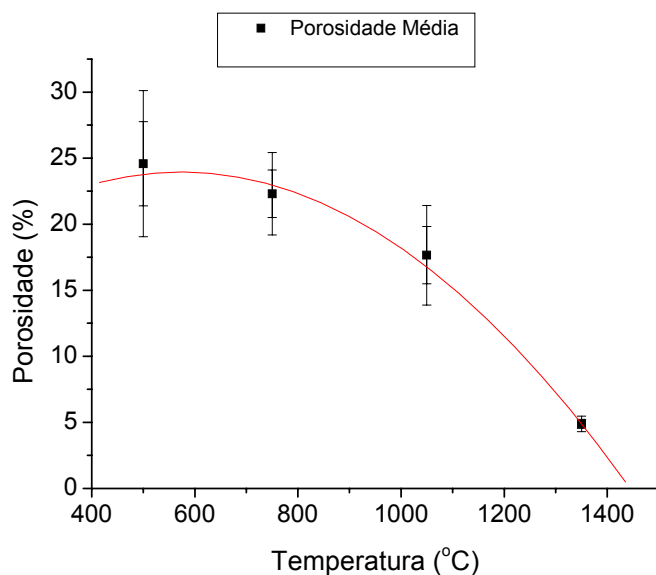


Figura 5. 12 – Porosidade em função de temperatura de tratamento. As amostras da tibia bovina foram tratadas termicamente a 500 °C, 750 °C, 1050 °C e 1350 °C.

Essa investigação auxiliou na escolha da temperatura de tratamento térmico do osso calcinado para produção de fosfatos de cálcio, de forma a não alterar as fases e, ao mesmo tempo obter material sem contaminação orgânica. Temperaturas próximas de 750 °C mostram um patamar que pode ser escolhido para extração do fosfato que será utilizado na obtenção da hidroxiapatita. A 1050 °C verifica-se uma redução da porosidade, que pode ou não estar associados à mudança de fase do material. Por fim, acima de 1200 °C percebe-se a diminuição drástica de porosidade devido à densificação do fragmento de osso.

A variação na cor dos fragmentos mostrada na figura 5.13 sugere a possibilidade de transformações ocorridas no processo de tratamento térmico em presença do ar (sem atmosfera inerte). A amostra de osso tratada a 500 °C apresenta uma coloração acinzentada que indica a pirólise incompleta dos constituintes orgânicos. Em torno da temperatura de 750 °C o material se tornou branco azulado, como indício da eliminação das biomacromoléculas presentes na amostra. Em temperaturas mais elevadas, o material tratado começa apresentar tons esverdeados e rosas bem suaves.

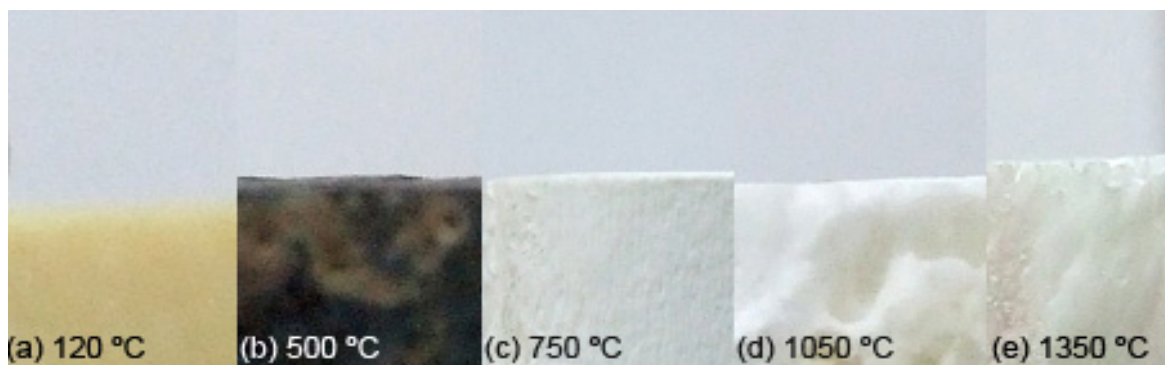


Figura 5. 13 - Fragmento de osso bovino cortical tratado termicamente: (a) 120 °C (b) 500 °C (c) 750 °C (d)1050 °C (e) 1350 °C.

Na figura 5.14, estão apresentados resultados de ensaio de porosimetria dessas amostras tratadas termicamente, com as curvas de volume cumulativo e volume incremental em função do diâmetro de poro. Foi coletado um conjunto de 94 pontos durante a intrusão de mercúrio. Valores negativos foram substituídos por zeros, pois esses representam o um efeito térmico de aumento de temperatura com aumento da pressão. (Webb e Orr, 1997). O aumento de pressão nesses pontos pode também destruir estruturas mais delicadas.

A curva da figura 5.14 mostra que a 500 °C ocorre mudança de inclinação em 12 μm , 0,1 μm e 0,01 μm durante a intrusão de mercúrio, indicando a provável presença de material orgânico, ainda retido no material. A intrusão de mercúrio (Hg) identifica mudanças de inclinação na faixa de poros 0,3 μm para as amostras tratadas a 750 °C e 1050 °C. É importante observar que as amostra tratadas a 500 °C e 700 °C acumularam 10 vezes mais $\mu\text{m Hg}$ em uma do que as amostras densificadas a 1050 °C e 1350 °C.

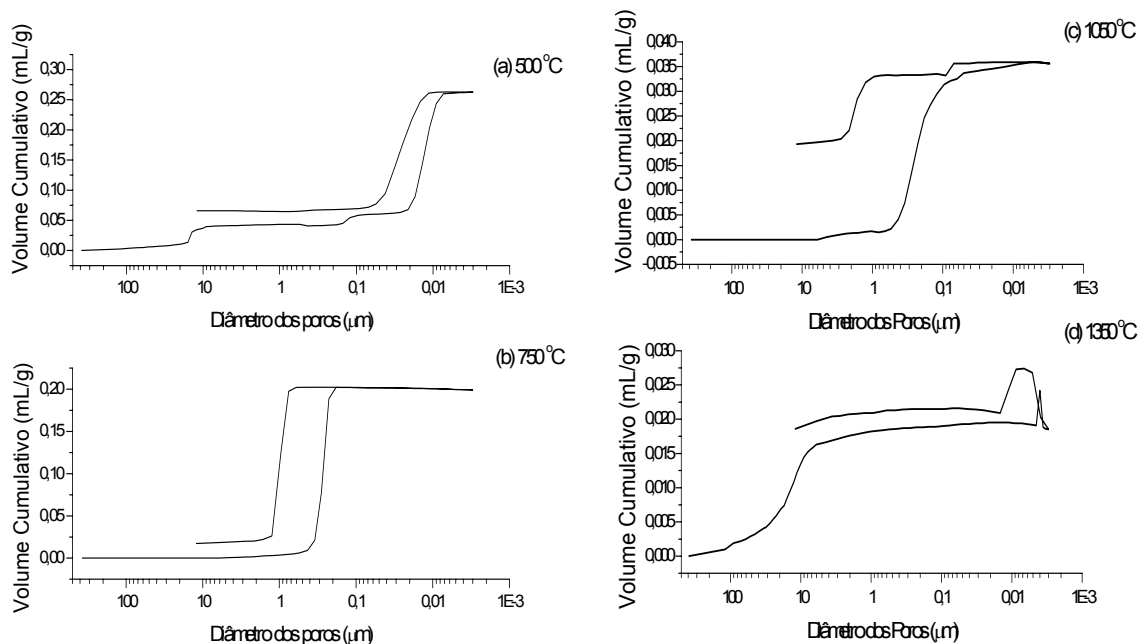


Figura 5. 14 – PIM: Volume cumulativo em função do diâmetro dos poros , amostras provenientes do osso bovino tratado termicamente a (a) 500 °C, (b) 750 °C, (c) 1050 °C e (d) 1350 °C.

A curva de PIM de volume incremental dos fragmentos de osso cortical da tíbia de bovino tratada termicamente mostra a redução da porosidade com o aumento da temperatura. Os fragmentos de osso bovino tratados termicamente a 1350 °C apresentaram trincas devido à contração do fragmento em camadas côncavas na direção da parte externa para a interna do fragmento. Assim, o mercúrio penetrou nas frestas que se formaram e foram entendidas pelo ensaio como poros na faixa de 10 μ m. Com a grande densificação do fragmento a 1350 °C, a ocorrência predominante de poros abertos foi observada na faixa abaixo de 0,01 μ m de diâmetro. Ainda para os fragmentos de osso tratados nas temperaturas de 500 °C, 750 °C e 1050 °C, figuras 5.15-a e 5.15-b e 5.15-c, suspeita-se de destruição de estruturas internas durante a intrusão de mercúrio devido à fragilidade das paredes do poro e a alta pressão para introduzir o mercúrio. As figuras 5.15-c e 5.15-d mostram que pouquíssimo mercúrio foi introduzido .

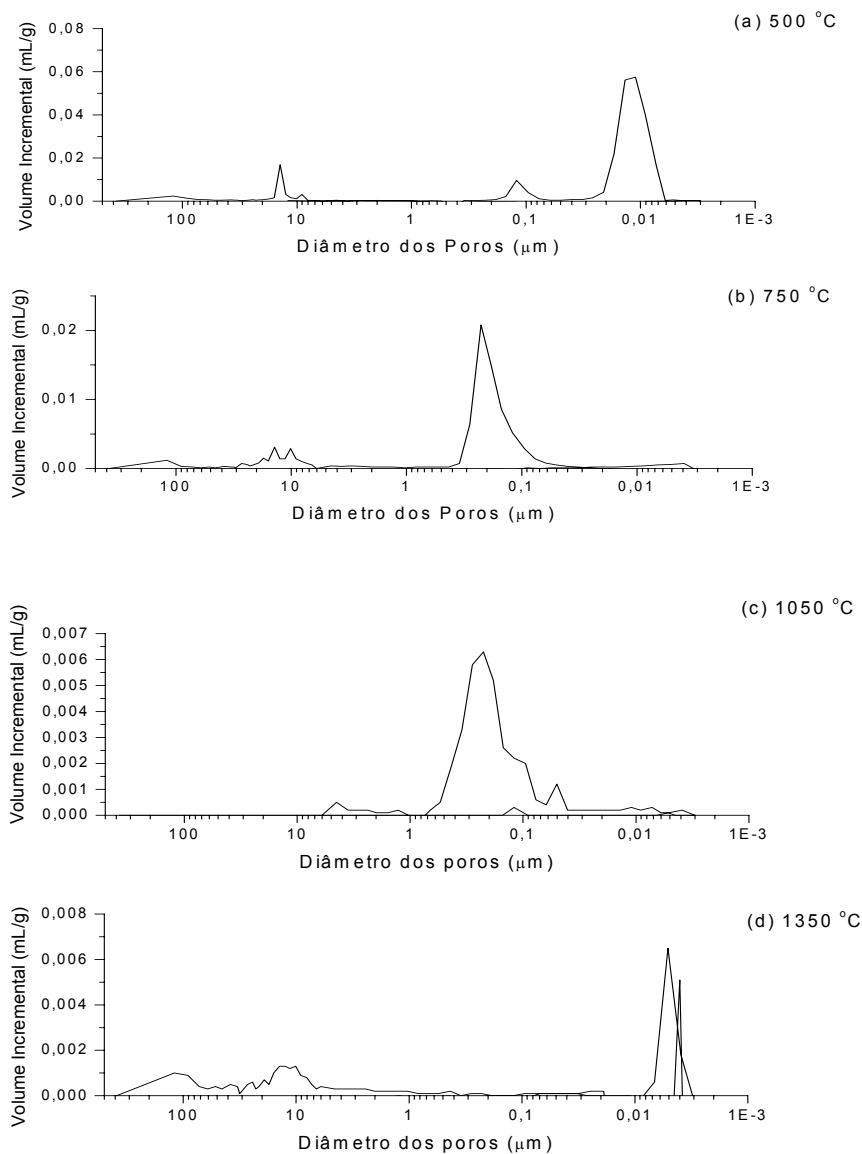


Figura 5. 15 – PIM, Vol. incremental em função do diâmetro dos poros. Osso calcinado tratado termicamente (a) 500 °C (b) 750 °C (c) 1050 °C (d) 1350 °C

5.6.1 - Porosimetria por PIM: Influência dos aditivos na porosidade.

Nessa fase de estudo, foi investigada a porosidade de amostra de pastilhas P11-500 de composição 11 da tabela IV.2 em 500 MPa e pastilhas de pó de osso bovino calcinado PX-500

pura conforme a tabela V.3. Quando foram prensadas com 500 MPa as amostras fosfato de cálcio puro apresentaram uma porosidade interconectada de 16% como as PX-500, enquanto as cerâmicas P11-500 com a presença de carbonatos alcalinos obtiveram resposta superior, entorno de 39 % conforme apresentado pela tabela V.8. O ensaio de PIM está representado pela curva da figura 5.16 pelo volume acumulado em função do diâmetro de poros dessas duas amostras. Essa investigação buscou avaliar como a ação dos gases provenientes dos carbonatos adicionados ao fosfato de cálcio interfere nas características de porosidade dessas cerâmicas sinterizadas. A confiabilidade dos resultados do ensaio de porosimetria dessas amostras foi verificada pelo ensaio com material padrão fornecido pelo fabricante. A tabela V.8 mostra o efeito dos gases produzidos no processo de sinterização das pastilhas P11-500 onde o aumento eficiente na produção de poros interconectados e com tamanho médio de 120 μm devido à presença de carbonatos de sódio, lítio e potássio e magnésio foi bem superior ao encontrado nas cerâmicas do tipo PX-500, com diâmetro médio de poro de 1,5 μm .

Tabela V. 6 - Resumo dos dados de PIM comparando 2 amostras cerâmicas.

Tipo de Amostra	PX-500 (1350 °C)	P11-500 (1350 °C)
Área superficial total dos poros	2, 4 m ² /g	3, 6 m ² /g
Diâmetro médio do poro (volume)	1, 5 μm	122, 4 μm
Densidade Aparente	1,7 g/mL	2,0 g/mL
Densidade real	2,09 g/mL	3,28 g/mL
Porosidade Aparente	16,0 %	38,9 %

A literatura discute a possibilidade de se interpretar as mudanças de direção e o aspecto da inclinação das curvas pressão em função do diâmetro do poro para determinar a morfologia dos poros. Neste trabalho, essa abordagem não será investigada. Os gráficos mostrados na figura 5.16 representam o ensaio de PIM do volume cumulativo em função do diâmetro do poro e mostra que a quantidade de mercúrio que penetrou na amostra PX-500 foi praticamente a metade em relação à cerâmica P11-500.

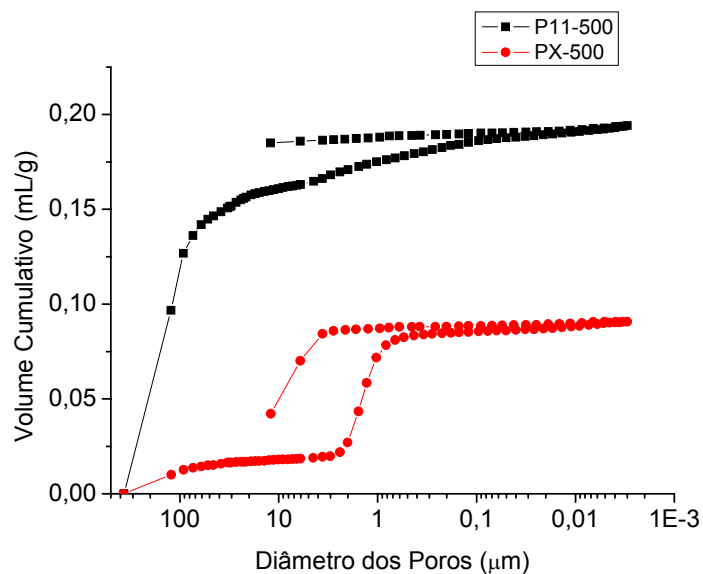


Figura 5. 16 - Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM): *Volume cumulativo x diâmetro do poro* de duas cerâmicas com fosfato de cálcio. A cerâmica P11-500 (acima) pode ser considerada um *scaffold*. Já a cerâmica PX-500 se mostrou muito compacta.

Pode-se observar nas curvas da figura 5.16 o aparecimento de histerese, isto é, o caminho seguido pela extrusão não é o mesmo para a intrusão. Após o ciclo completo de intrusão e extrusão, algum mercúrio sempre fica retido (adsorvido) pela amostra, assim a extrusão não acompanha uma parte da região de tamanho de poros identificada pela intrusão. Nos ensaios de PIM, as curvas de extrusão dessas amostras indicam que o mercúrio ficou retido na região abaixo de 10 μm . Pode até mesmo ocorrer destruição de poros com estruturas mais delicadas no interior da amostra devido a uma pressão elevada. Essa retenção se deve ao pescoço formado na conexão entre os poros, o que dificulta a continuação da extração do mercúrio no ciclo de extrusão de mercúrio. Observa-se na curva da figura 5.16 de volume cumulativo, que a amostra P11-500 possui uma concentração de diâmetro de poros na ordem de 120 μm , onde o processo de sinterização apresentou a formação de fase líquida.

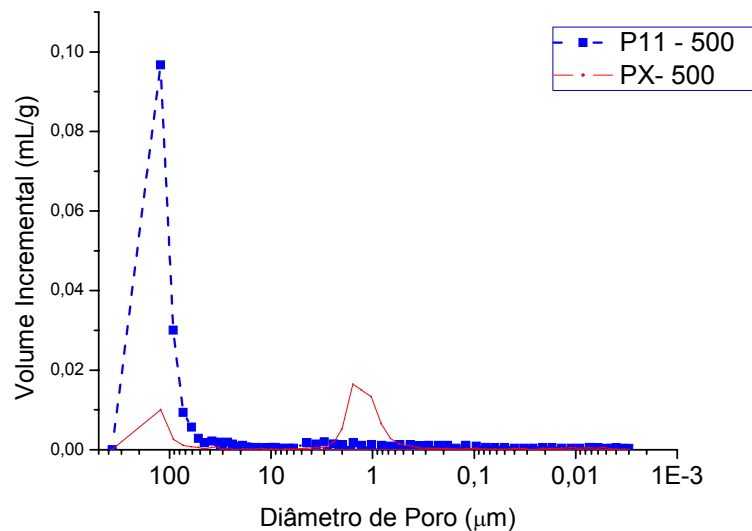


Figura 5. 17 – PIM, A curva tracejada corresponde à amostra P11-500, e a curva contínua com 100 % de pó calcinado de origem bobina PX-500. O grande volume de poros na faixa acima dos 100 μm atende em princípio, as expectativas de aplicação dessa cerâmica, pois o tamanho das células é até 10 vezes menor. A curva da amostra PX-500 apresenta uma região de porosidade intergranular faixa de 1 μm.

A curva da figura 5.17 mostra que a amostra PX-500, possui duas regiões distintas, com ênfase na faixa entre 0,6 μm e 2,0 μm que segue a uma provável presença de poros intergranulares. A segunda faixa de tamanho de poros para esta amostra, entorno de 100 μm, não está significativamente representada como cumulativa e, portanto não possui uma quantidade significativa de poros nessa faixa. Esta distribuição bimodal está associada a uma provável presença de duas faixas de tamanho de partículas com grande diferença de tamanho presente no pó utilizado, mas com apenas representatividade volumétrica somente em uma faixa com tamanho de pós abaixo de 50 μm. Nesta amostra não ocorreu formação de gases, como as reações de decomposição dos carbonatos alcalinos sofrida na amostra P11-500 e o processo de sinterização se deve principalmente a formação de ligações primárias entre as partículas do pó prensado.

5.7 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra de pó de osso calcinado X apresentados nas figuras 5.18(a) e 5.18(b), mostram que os grânulos (acima de 1 μm e abaixo de 50 μm) estão constituídos por aglomerados irregulares de partículas pequenas ou mesmo colóides (abaixo de 1 μm). Nas figuras 5.18(c) e 5.18(d) a pastilha sinterizada de composição 11 da tabela V.3, denominada P11 (80 MPa), mostra a presença de poros com formas relativamente arredondadas. A figura 5.18(d) mostra que ocorreu a formação da fase líquida no processo de sinterização, com aspecto de uma superfície suavizada.

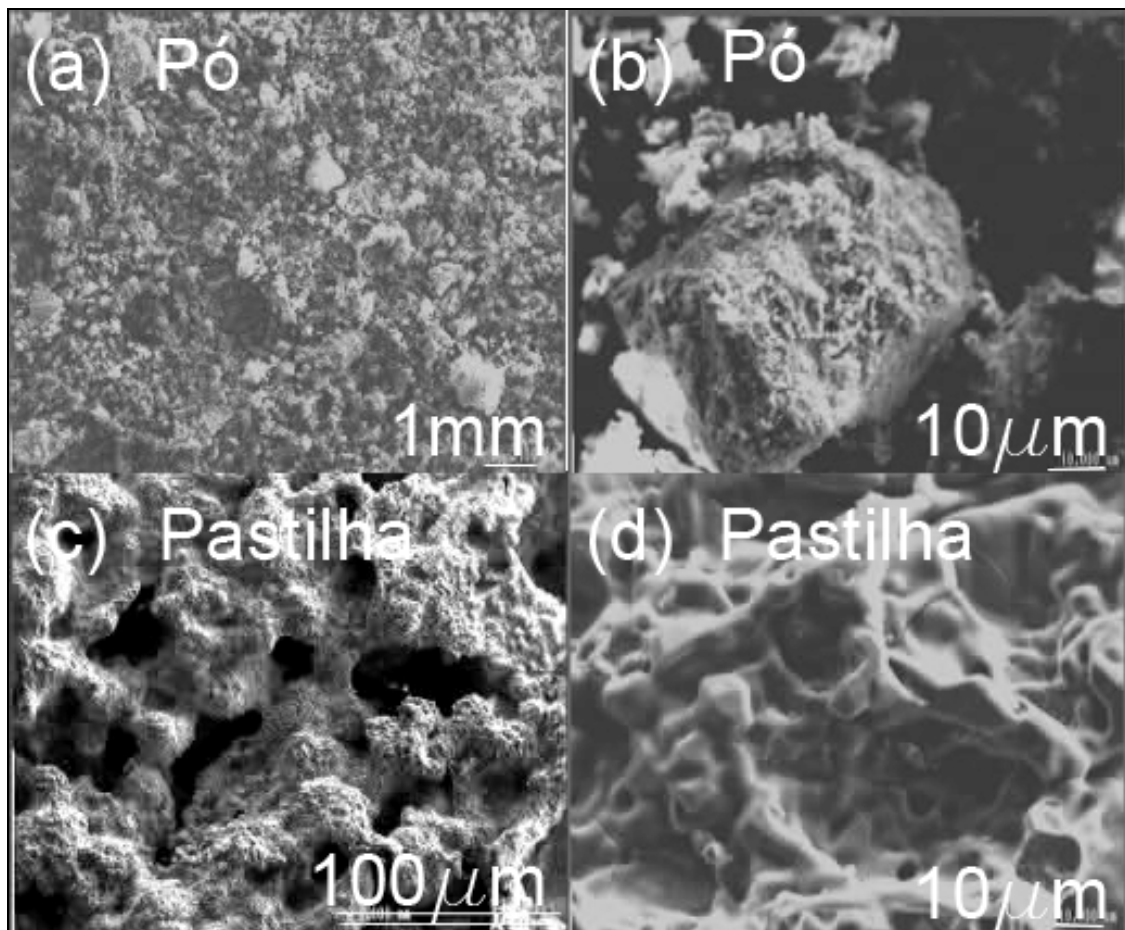


Figura 5. 18 - MEV (a) Pó de osso calcinado X, macerado, 40X. (b) Pó de osso calcinado X, macerado, 1000X (c) Pastilha P11, 100X (d) Pastilha de P11, 1000X.

Foi realizada análise de EDXA (Análise de Energia Dispersiva de Raios X) como mostra a figura 5.19, também conhecida como EDS, nas amostras onde foram lidos cinco pontos distintos que apresentaram a mesma relação de elementos químicos, indicando a presença de uma mesma fase nesses pontos, tanto para a amostra X do pó de osso bovino calcinado como a pastilha cerâmica P11 proveniente da mistura da amostra X com carbonatos alcalinos de composição apresentada na tabela V.9.

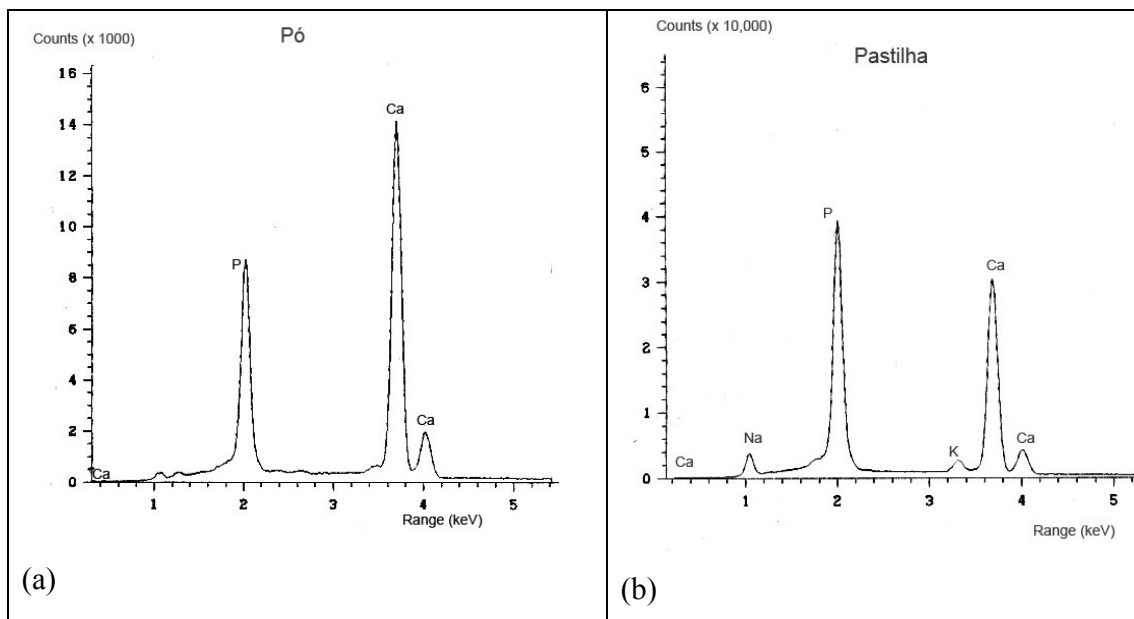


Figura 5. 19 - Os gráficos acima apresentam os elementos químicos identificados pelo EDS, (a) amostra X pura e em (b) pastilha P11.

A relação de Ca/P das amostras investigadas pela análise dispersiva de raios -X mostra a influencia dos íons dos carbonatos sobre o pó de osso bovino calcinado

Tabela V. 7 - Resumo de EDXA das amostras de Pó PCO e Pastilha P11

EDS, normalizada	Pó de X		Pastilha P11			
	P	Ca	P	Ca	Na	K
% Elemento						
Média =	34,3	65,7	39,9	45,6	11,8	2,7
Relação Ca/P	1,92		1,14			

A seguir, a figura 5.20 apresenta em forma gráfica a proporção obtida por EDS dos elementos presentes na superfície das duas amostras X e P11, bem como a relação Ca/P obtida pela análise de fluorescência na amostra P11 que será analisada no próximo tópico, item 5.8.

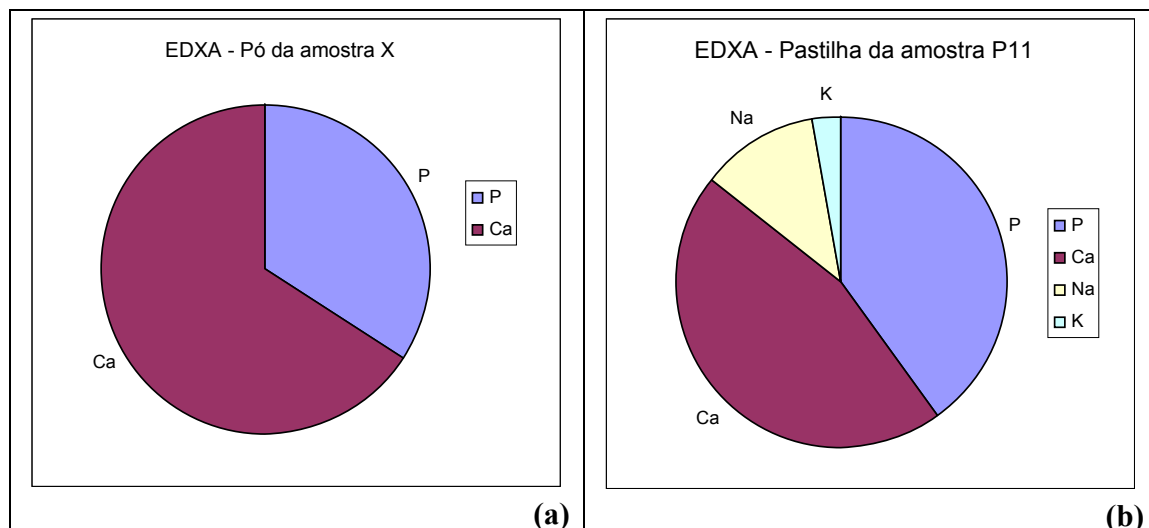


Figura 5. 20 - Gráfico da relação Ca/P obtida EDXA do pó da amostra X (a) e da pastilha P11 (b).

Essa relação estimada de Ca/P foi de aproximadamente 1,92 no ensaio semi-quantitativo de EDS para a amostra X. A relação de Ca/P obtida pelo EDS na pastilha P11 foi de 1,14 na superfície da mesma. Com a adição de carbonatos de metais alcalinos, depois do tratamento térmico, os elementos metálicos poderiam se incorporar ou substituir o íon Ca^{2+} na rede cristalográfica da HAp. Apesar do lítio ter sido introduzido na composição da pastilha na forma de carbonato de lítio, a técnica de EDS não detecta elementos leves abaixo do peso molecular do carbono. Como a análise de EDS apresenta somente a composição dos pontos observados na superfície da pastilha, o resultado dessa análise indica que as cinco diferentes regiões observadas representam a mesma fase.

Os componentes químicos usados neste estudo são basicamente aqueles contidos no osso natural. Segundo L. Vaz et al.(Vaz, Lopes *et al.*, 1999a), a adição lítio na forma de fosfato (Li_3PO_4) usado como aditivo de sinterização e aplicado no controle de porosidade de implantes cerâmicos de hidroxiapatita proporcionou um aumento de resistência mecânica do implante (Vaz, Lopes *et al.*, 1999b). O lítio na forma de carbonato (Li_2CO_3) usado como fundente das pastilhas P11 e P13, também auxiliou substancialmente na sinterização. Isso ficou evidenciado quando se compara a pastilha de número P13 com a pastilha preparada com

a composição de número 12 (veja tabela V.5), que foi desenvolvida sem a adição do carbonato de lítio e nas mesmas condições de processamento. Segundo Suchanek, o K_2CO_3 e o Na_2CO_3 aumentam a densificação da hidroxiapatita pela sinterização com fase líquida e /ou um aumento do coeficiente de difusão de íons na hidroxiapatita devido à incorporação de íons monovalentes (Na^+ e K^+) dentro das posições do cálcio na estrutura da hidroxiapatita, com subsequente formação de lacunas de OH^- (Suchanek, Yashima *et al.*, 1997). A análise semiquantitativa do ensaio EXDA da pastilha P11 estima uma diminuição da relação Ca/P na superfície da amostra. A captação de íons do metal ou do halogênio durante a síntese do HAp é possível, por exemplo, dos fosfatos de Sódio ou do Potássio. A introdução de íons de Mg^{2+} e compostos iônicos como o SiO_4^{4-} podem afetar o crescimento dos cristais não somente por solução líquida mas também por sinterização (Putlyaev e Safronova, 2006). Assim, observando, os resultados do EXDA da pastilha P11 que apresentam também os íons K^+ , Na^+ e, como é conhecido a adição de carbonatos citados na tabela V.5, a presença de íons CO_3^{2-} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Li^+ , também podem modificar a estrutura da hidroxiapatita do pó da amostra X e Y na composição da pastilha P11 sinterizada. Observa-se o decréscimo na relação Ca/P do material da superfície analisada da pastilha P11 sinterizada com relação ao encontrado na amostra X.

5.8 - Fluorescência de Raios-X _ Analise semi-quantitativa

Uma análise semi-quantitativa de fluorescência de raios X mostrou que a relação (molar) Ca/P foi igual a aproximadamente 2,23 para o pó de da amostra X e 1,74 para a pastilha P11 sinterizada, mostrando a tendência de diminuição da relação Ca/P. Essa diminuição havia sido observada na análise de EDS, mas a diferença do valor encontrada na relação Ca/P se deve a pequena amostragem pontual realizada na técnica de EDS, onde foram observados apenas 5 pontos aleatórios. A análise pela fluorescência de raios-X assume área mais abrangente. A figura 5.18 mostra a região de energia dada em KeV, onde os elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) estão presentes. A figura 5.21 (a) não apresenta potássio, já a pastilha P11, gráfico da figura 5.21 (b), possui um pico de potássio em aproximadamente 3,34 keV.

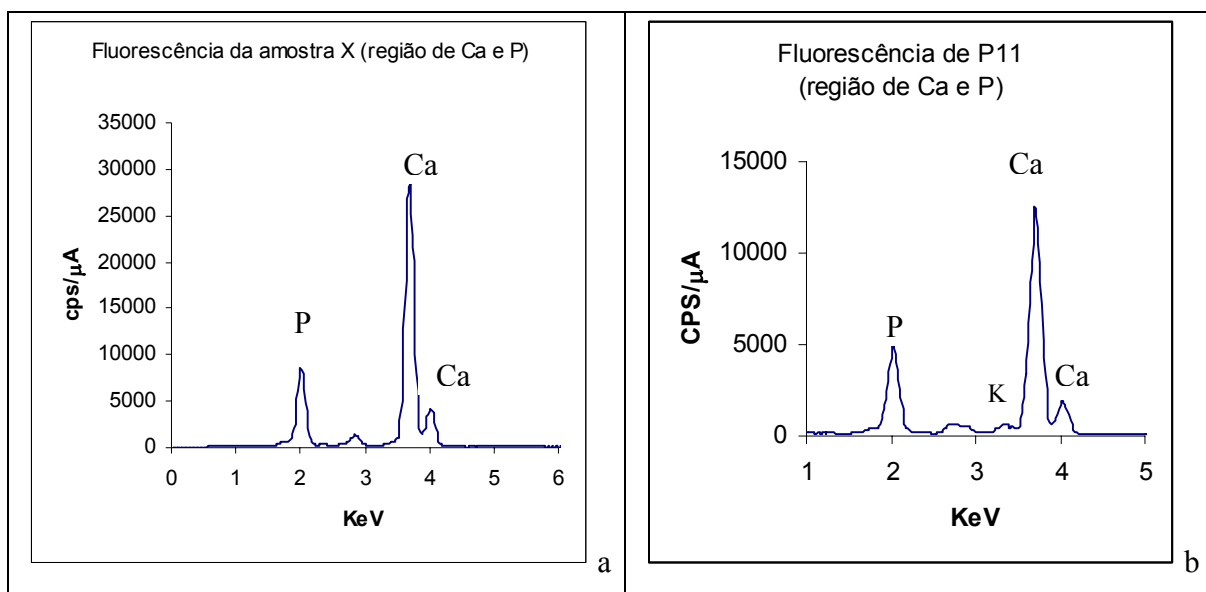


Figura 5. 21 - Fluorescência – Trecho onde estão identificados os picos de P e Ca na amostra X (a) e na pastilha P11 (b)

Traços de elementos como Silício (Si), Estrôncio (Sr), Zinco (Zn), e Zircônio (Zr) foram identificados nas amostras X e Y nos ensaios de Fluorescência (figura 5.22).

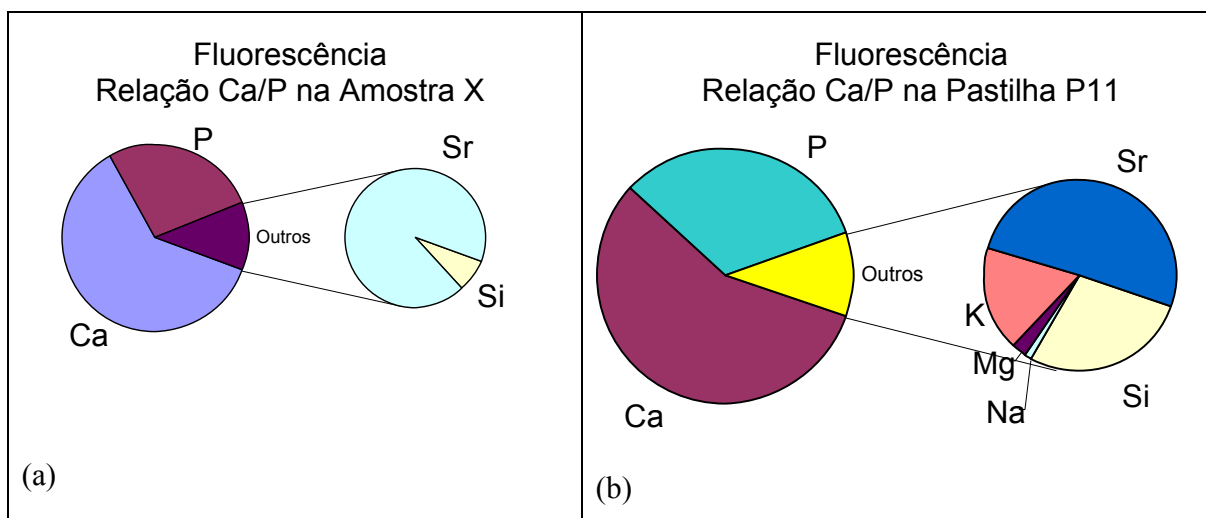


Figura 5. 22 - Relação Ca/P obtido por Fluorescência de Raios X da amostra X (a) e de pó de osso calcinado e da pastilha P11 (b).

O primeiro lote X1 analisado registrou a presença acidental de Chumbo (Pb) e Estanho (Sn), elementos que não estão presentes no material antes da moagem. Esse pó foi produzido em moinho tipo *shatter box*. O lote foi desconsiderado. Problemas de contaminação na preparação de amostras para a difração ou fluorescência de raios-X, inclusive por moagem no

moinho tipo *Shatter Box*, são abordados na ref. (Buhrke, Ron Jenkins *et al.*, 1997). Novo lote de pó de osso bovino calcinado foi produzido por moagem em grau de Ágata.

A hidroxiapatita possui alta capacidade para remover alumínio e íons divalentes de metais pesados e tem sido usada para tratamento de efluentes de rejeito (Ma, J. *et al.*, 1994).

Em seu trabalho de tese de doutorado, Elena Mavropoulos (Mavropoulos, 1999) demonstra que 2,5 gramas de hidroxiapatita foi capaz de capturar 1700 mg de chumbo por litro de solução.

Assim, a aplicação do osso bovino calcinado pode ser usado como material que atua como absorvedor de metais pesados para limpeza de moinhos, ou no tratamento de águas contaminadas por esses metais, como no caso mencionado do chumbo e poderá contribuir com outros processos no controle da contaminação por uma serie de elementos metálicos como Al, Zn, Fe(II), Cd, Cu e Ni. Portanto, para preparação de pó de osso bovino calcinado e pastilhas para uso como biomaterial, o ambiente deve estar livre desses íons.

5.9 - Difratoograma de Raios - X

Os pós da amostra X, da amostra Y e as pastilhas P11 e P13 foram investigados por DRX e apresentaram-se com um alto grau de complexidade devido à natureza das apatitas de cálcio. Os primeiros difratogramas das pastilhas foram feitos com parâmetros comerciais, isto é, a velocidade de varredura feita pelo goniômetro foi igual a 2 graus por minuto e passo de varredura igual a 0,02, numa faixa 2θ entre 10 ° a 80 °. Com isso os difratogramas apresentaram mais ruído, intensidade menor dos picos e impossibilidades de trabalhar pelo método de Rietveld (Young, 1996). Mesmo assim, a análise se mostrou útil para comparar os pós e identificar as fases cristalinas presentes.

Os difratogramas de raios-X da figura 5.23 mostram que a matéria prima da amostra X, com composição majoritária de hidroxiapatita identificada pela ficha do banco de dados da ICDD, #9-0432 (Icdd, 2000) e o pó da pastilha P11, revelam formação de novas fases além da hidroxiapatita. Para os fosfatos de cálcio de origem bovina, encontram-se uma família de apatitas como a presença das hidroxiapatitas (carbonatadas), fluorapatitas, β -TCP e fosfato de cálcio amorfo.

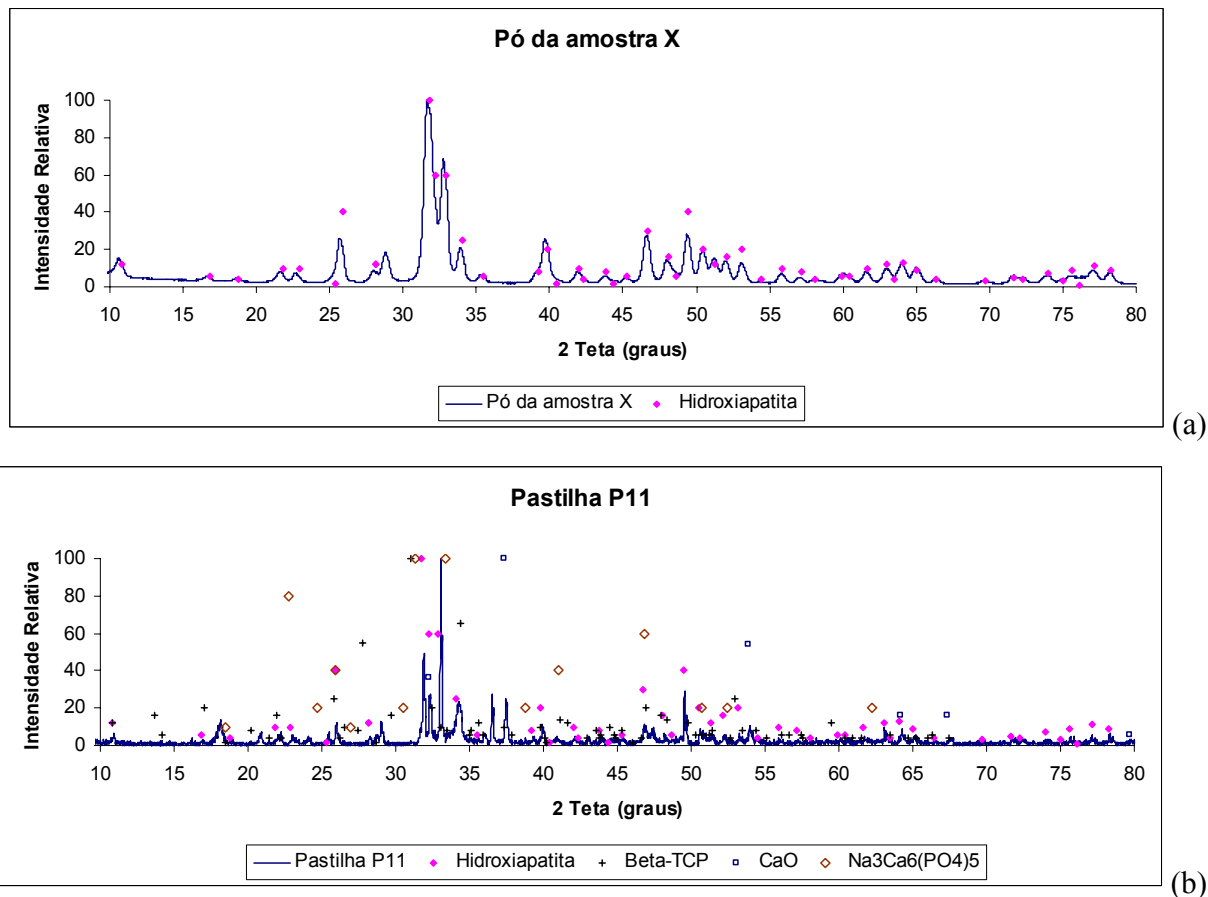
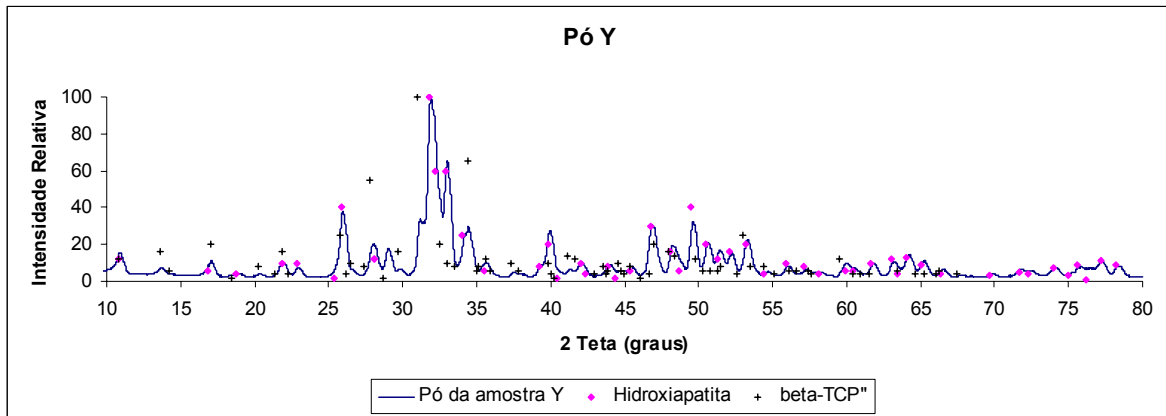


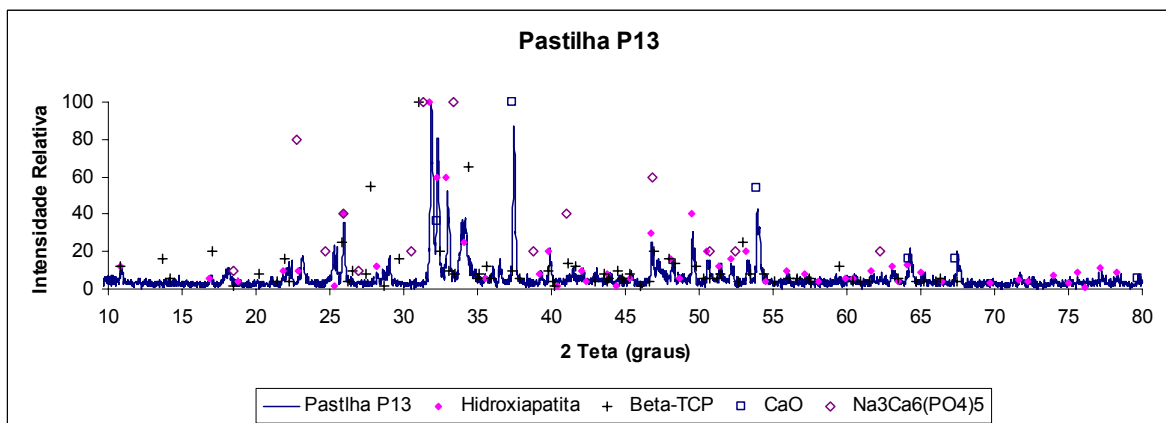
Figura 5. 23 - DRX do pó da amostra X (a) e da pastilha P11 (b) sinterizada à 1350 °C, 4h. As fases são identificadas na amostra pelos símbolos indicados na legenda e correspondem as fichas de identificação de fase #9-0432, #09-0169, #37-1497, # 11-0236 (Icdd, 2000).

As fases de hidroxiapatita, β -TCP, CaO e $\text{Na}_3\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_5$ foram identificadas como presentes na pastilha P11 tratada a 1350 °C e apresentadas na figura 5.23-b. Outras fases como α - NaCaPO_4 , MgO, Na_2O , não foram representadas, mas também são possíveis de coexistirem na pastilha P11. A fase de óxido de cálcio, CaO, identificada pela ficha ICDD #37-1497, pode causar perda da coesão do material sinterizado devido ao stress com a formação de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e mudança de volume. A presença de CaO na pastilha pode também alterar a taxa e extensão da biodegradação (Suchanek, Yashima *et al.*, 1997). O aparecimento das fases β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, denominada β -TCP, ficha ICDD #09-0169 (mineral Whitlockita), indica uma tendência de biodegradação da pastilha. O fosfato de cálcio e sódio, $\text{Na}_3\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_5$, ficha ICDD # 11-0236, pode figurar em pequenas quantidades na pastilha, sendo considerado bioativo e não é visto

como agente de interferência na taxa de biodegradação. A figura 5. 24 mostram dois difratogramas onde a figura 5.24-a apresenta as fases da matéria prima Y está constituída principalmente das fases de hidroxiapatita e β -TCP e pode ser denominado fosfato de cálcio bifásico (BCP).



(a)



(b)

Figura 5. 24 - DRX do pó matéria prima Y (a) e da pastilha P13 (b) sinterizada à 1350°C, 4h. As fases são identificadas na amostra pelos ícones indicados na legenda e correspondem as fichas de identificação de fase #9-0432, #09-0169, #37-1497, # 11-0236 (Icdd, 2000).

As pastilhas de composição P13 (figura 5.24-b) apresentou formação intensa da fase CaO, sugerindo uma menor estabilidade térmica da fase β -TCP, já presente no pó Y. Como foi mencionado, o CaO é uma fase indesejada na produção de pastilhas cerâmicas de aplicação biológica. Para os fosfatos de cálcio de origem comercial, encontram-se uma presença

significativa da fase de hidroxiapatita e em menor quantidade as fases β -TCP e fosfato de cálcio amorfo.

O ensaio de DRX apresentado na figura 5.25 mostra os difratogramas sobrepostos das matérias primas orgânica e sintética. A aplicação do método de Rietveld com auxílio do programa FullProf-Suite (Fullprof, 2007) indica a presença de duas fases para a matéria sintética (hidroxiapatita e Whitlockita) e uma fase para o material orgânico (hidroxiapatita). A figura 5.25 mostra similaridade dos picos do material orgânico (amostra X), com o sintético (Y). No estudo de materiais de apatita, entende-se que o ensaio de DRX deve ser executado com tempos longos para possibilitar a identificação de fases muito parecidas, como no caso de fluoroapatita, cloroapatita, e hidroxiapatita. Um pequeno desvio no posicionamento das amostras no DRX pode produzir um deslocamento dos picos em relação ao padrão de difração. Quando se tem precisa a posição das distintas amostras, uma mudança em relação aos padrões deve-se exclusivamente à natureza da amostra (seus parâmetros naturais de rede) e não se deve a alguma mudança na posição de uma amostra em relação à outra no DRX. Isto é particularmente importante quando se estuda sistemas que têm composições químicas similares como as hidro(fluoro)apatitas.

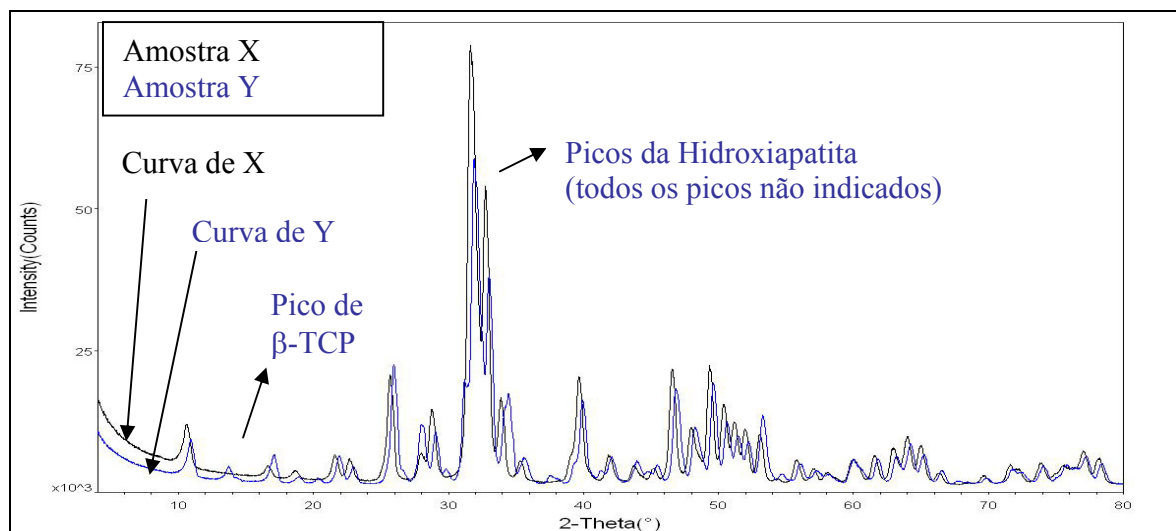


Figura 5. 25 – O gráfico apresenta os difratogramas sobrepostos dos pós da amostra X e de Y. Método de Rietveld com auxílio do programa FullProf-Suite (Fullprof, 2007). O tempo de ensaio feito pelo DRX foi de aproximadamente 16 horas, com passo de 0,02 a cada 15 segundos, para 2 θ entre 4° a 80 °.

Capítulo 6: Conclusões

O processo de sinterização de pastilhas a 1350 °C com composição da mistura de aproximadamente 20% de carbonatos alcalinos e 80 % de pó de osso bovino calcinado ou pó de fosfato de cálcio bifásico foi capaz de produzir amostras com aproximadamente 40% de porosidade interconectada e poros com tamanho médio de aproximadamente 120 μm , o que corresponde à possibilidade de vascularização e fixação das células do tecido ósseo. O carbonato de lítio (Li) agiu como formador da fase líquida nesse processo de sinterização.

A formação da fase CaO é indesejada, pois a elevada higroscopicidade da fase CaO permite o surgimento da fase $\text{Ca}(\text{OH})_2$, promovendo a degradação da pastilha sinterizada. A formação da fase β -TCP deve ser controlada porque esta aumenta a velocidade de degradação da cerâmica.

Materiais com baixo ponto de volatilização e que não interferem na estrutura cristalina da hidroxiapatita, são promissores na elaboração de cerâmicas sinterizadas com alta porosidade e tamanho de poros adequado para acomodar células.

As pastilhas prensadas com carga de quatro toneladas na matriz de 5 mm e tratadas termicamente a 1350 °C resultaram em pastilhas bem sinterizadas. Portanto, a pressão 5,1 ton/cm^2 (500 MPa) foi satisfatória no processamento dessas pastilhas.

O pó da amostra Y sintetizado é uma composição de uma fase de hidroxiapatita e β -TCP denominada fosfato de cálcio bifásico e em meio aquoso apresenta $\text{pH} \approx 7,25$. Esse pó é biocompatível, como mostrou o resultado dos testes de citotoxicidade. A composição de fosfato de cálcio de origem orgânica (osso bovino) tratado termicamente a 750 °C, apresentou $\text{pH} \approx 9$ em meio aquoso. A comparação dos difratogramas de DRX dessas amostras revela grande similaridade dos picos entre as matérias-primas de origem orgânica e sintetizada. Uma etapa importante é o controle do pH dos pós de hidroxiapatita para produção das pastilhas, que

devem ter o pH neutro, de modo a contribuir para a produção de pastilhas com pH fisiológico para aplicação como biomaterial. Esse material pode ser tratado com adição de H_3PO_4 diluído, corrigindo-se o pH e mantendo sempre essa correção na região entre $5 < \text{pH} < 8$.

Antes de se realizar o teste de citotoxicidade para essas pastilhas sinterizadas, recomenda-se medir o valor de pH em água deionizada, para verificar se esse material se encontra na região do pH fisiológico.

Para garantir a qualidade das amostras no teste de citotoxicidade, o tipo de esterilização também deve ser uma etapa investigada. Os ensaios mostraram que ocorrem alterações nas amostras, dependendo do método de esterilização escolhido. Nesse trabalho, as pastilhas degradaram quando foram submetidas ao processo de esterilização por autoclavagem.

Trabalhos Futuros:

1- Elaboração de *scaffolds* sinterizados com hidroxiapatita e substâncias orgânicas como o carboximetilcelulose (CMC) ou quitosanas.

Nesse trabalho poderia-se obter cerâmicas porosas com tamanho de poros maiores que 100 µm sem comprometer a estrutura cristalina da fase da hidroxiapatita.

2- Elaboração de lâminas tenazes e porosas a base de hidroxiapatita capazes de permitir o fluxo de células do tecido ósseo e impedir a ocupação de espaço durante a osteogênese, por tecido mole em reparo da parte cortical de ossos longos.

A importância de manter o tecido mole afastado do espaço necessário ao crescimento do tecido ósseo é uma das condições necessárias para o sucesso da regeneração óssea. Poderia-se desenvolver o implante de lâminas de cerâmicas porosas de hidroxiapatita que atuem nas situações onde os *scaffolds* não podem ser usados.

3- Elaboração de procedimentos para garantir o sucesso do uso de materiais à base de hidroxiapatita em clínicas odontológicas.

Apesar do uso da hidroxiapatita como material de enxerto em procedimentos odontológico, o sucesso do emprego desse material é comprometido pelos métodos de manipulação e preparação empregados pelo cirurgião. A elaboração de uma metodologia na manipulação dos compostos de hidroxiapatita deverá ser aperfeiçoada para garantir a diminuição de rejeição desses materiais.

4- Investigação da relação porosidade e tamanho de poros com uso da parte mineralizada do osso bovino, ácido hialorônico e células HeLa.

A investigação *in vitro* com uso de células tumorais / scaffold cerâmico propicia a obtenção da eficaz relação de porosidade e tamanho de poros no desenvolvimento de estruturas regenerativas do tecido ósseo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBEE, F. H. Studies in bone growth Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. **Ann. Surg**, v. 71, n. 1, p. 32-39, 1920.

ALBERTS, B. **Molecular Biology of The Cell**, 4. ed. New York: Garland Science, 2002.

ANDRADE, A. L. et al. **HAP-91 Síntese, caracterização e aplicações, 2ª edição**. Belo Horizonte, p.140. 2001

ARINZEH, T. L. et al. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. **Biomaterials**, v. 26, n. 17, p. 3631-3638, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-4DTKXT6-1/2/4320b0b51891b957814141ffdeed2232> >.

BOSKEY, A. L.; PASCHALIS, E. Matrix Protein and Biomineralization In: DAVIES, J. E. (Ed.). **Bone Engineering**. Toronto: EM Squared Inc, 2000.

BUHRKE, V. E.; RON JENKINS; SMITH, D. K. **A Practical Guide for the Preparation of Specimens for X-Ray Fluorescence and X-Ray Diffraction Analysis**. Wiley-VCH, 1997. 360 ISBN 978-0-471-19458-3. Disponível em: < http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471194581_descCd-tableOfContents.html >.

CALDERÍN, L.; STOTT, M. J.; RUBIO, A. Electronic and crystallographic structure of apatites. **Physical Review B**, v. 67, n. 13, p. 134106, 2003. Disponível em: < <http://link.aps.org/abstract/PRB/v67/e134106> >.

COHEN, B., WOOD,DL. **Memmler's Structure and Function of the Human Body**. . 9th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 519 ISBN 0781721105 Disponível em: < <http://connection.lww.com/Products/braun/documents/PDFs/Ch04-Part2.pdf> >.

COWIN, S. C. **Bone Poroelasticity**. Journal of Biomechanics. New York: Elsevier Science Ltd. 32: 217-238 p. 1999.

_____. Bone poroelasticity. **Journal of Biomechanics**, v. 32, n. 3, p. 217-238, 1999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T82-3WCYVX4-1/2/ba8f0fda15e1043d032b0b85f76f0515> >.

D'ALCANTARA, W. X. **Cadinhos de Alumina para Fusão de Vidros**. Belo Horizonte: Junho, p.10. 2003. (Documentação Técnica - CETEC/MG)

DACULSI, G. et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 3, p. 195-200, 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022842404495> >.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 12, p. 134-139, 2007. ISSN 1517-7076. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-70762007000100017&nrm=iso >.

DAVIES, J. E. **Bone Engineer**. December 2000 Toronto: Em Squared Inc, 2000. 656 ISBN 096869800X

EISENHUTTEBLEUTE, V. D., Ed. **SCHLACKENATLAS**. Dusseldorf: Verlag Stahleisen M.B.H., p.282ed. 1981.

ELLIOTT, J. C. **Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates** Elsevier 1994. 404 ISBN 0444815821. Disponível em: < http://www.elsevier.com/wps/find/bookdescription.cws_home/524506/description?navopenmenu=-2 >.

ELLIOTT, J. C.; MACKIE, P. E.; YOUNG, R. A. Monoclinic Hydroxyapatite. **Science**, v. 180, n. 4090, p. 1055-1057, June 8, 1973 1973. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/180/4090/1055> >.

FISCHBACH, C. et al. Engineering tumors with 3D scaffolds. **Nat Meth**, v. 4, n. 10, p. 855-860, 2007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth1085> http://www.nature.com/nmeth/journal/v4/n10/suppinfo/nmeth1085_S1.html >.

FULLPROF, S. **Cristallographic tool for Rietveld, profile matching & intensity refinements of X-Ray and/or neutron data:** <http://www.ill.fr/dif/Soft/fp/php/downloads.html> p. 2007.

FUNG, Y. C. **Biomechanics Bone and Cartilage 2nd**. New York: Springer, 1993.

GOES, A. M. D. et al. Testes *in vitro* com biomateriais e citotecnia. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. D. M., *et al* (Ed.). **Biomateriais Fundamentos & Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. cap. 11, p.285-297.

GOTO, T. et al. Sintering mechanism of hydroxyapatite by addition of lithium phosphate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 2, n. 3, p. 149-152, 1991. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00692973> >.

GUÉHENNEC, L. L.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G. A Review of Bioceramics and Fibrin Sealant. **Europe cells & materials journal**, v. 8, p. 1-11, 13th 2004 2004. Disponível em: < <http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol008/vol008a01.php> >.

HAJNOS, M., ŚWIEBODA, R. **Porous structure of natural bodies** Physics, Chemistry and Biogeochemistry in Soil and Plant Studies. Puschchino, Russia: Grzegorz Józefaciuk - Institute of Agrophysics PAS, Lublin: 52-56 p. 2004.

HAM, A. W. **Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1965. 965

_____. **Histologia**. 7. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1977. 872

HARWOOD, R. S. B. W. A. A. J. **Lithium Melallotherapeutics**. TIEKINK, G. A.: John Wiley & Sons, Ltd. 1: 17 p. 2005.

HENCH L.L., S. R. J. M., ALLEN W. C., GREENLEE T. K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **J Biomed Mater Res**, p. 117-141, 1971.

HENCH, L. L. Ceramic Implants for Humans. **Advanced Ceramic Materials**, v. 1, n. 4, p. 306-324, 1986.

_____. Bioceramics: From Concept to Clinic
J. Am. Ceram. Soc., v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014-1017, February 8, 2002 2002. Disponível em: <
<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/295/5557/1014>>.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993. 385

HLAVÁČ, J. **The technology of glass and ceramics: An Introduction, Glass Science and Technology 4**. New York: Elsevier Scientific Publishing Company Inc, 1983. 432
ISBN 0-444-41577-7.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature Materials**, v. 4, n. Na, p. 518-524, 7 2005. ISSN 1476-1122. Disponível em: <
<http://www.nature.com/nmat/journal/v4/n7/abs/nmat1421.html>>.

Human Body. **Learning and Teaching Scotland**, Glasgow, 2007. Disponível em: <
<http://www.ltscotland.org.uk/5to14/resources/illustrations/humanbody/illustrationofhumanskeleton.asp>>. Acesso em: 05 December 2007.

ICDD. **Powder Diffraction File**. 09-0432;09-0169, *et al.* Swarthmore, Pensilvania: PCPDFWIN v2.1 2000.

JOHANSSON, M. S.; NANCOLLAS, G. H. The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 3, n. 1, p. 61-82, January 2, 1992 1992. Disponível em: <
<http://crobm.iadrjournals.org/cgi/content/abstract/3/1/61>>.

JOSCHEK, S. et al. Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. **Biomaterials**, v. 21, n. 16, p. 1645-1658, 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-40GJ1RD-3/2/f5ccaf7868e46ed170dab73e4e4cc6cf> >.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. **Histologia Básica - 10ª edição**. 10ª. Guanabara Koogan, 2004. 540 ISBN 8527709066

KALITA, S. J. et al. CaO-P2O5-Na2O-based sintering additives for hydroxyapatite (HAp) ceramics. **Biomaterials**, v. 25, n. 12, p. 2331-2339, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-4B0X5K8-6/2/e0ef1d44c62db4cfc08dff1758bd433f> >.

KAY, M. I.; YOUNG, R. A.; POSNER, A. S. Crystal Structure of Hydroxyapatite. **Nature**, v. 204, n. 4963, p. 1050-1052, 1964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/2041050a0> >.

LAKES, R. Materials with structural hierarchy. **Nature**, v. 361, n. 6412, p. 511-515, 1993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/361511a0> >.

LEGEROS, R. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**. Switzerland: S Karger Pub., 1991. 201 ISBN 380555236X

LEGEROS, R. Z. Calcium Phosphate Materials in Restorative Dentistry: a Review. **Adv Dent Res**, v. 2, n. 1, p. 164-180, August 1, 1988 1988. Disponível em: < <http://adr.iadrjournals.org/cgi/content/abstract/2/1/164> >.

LEGEROS, R. Z. et al. Apatite Crystallites: Effects of Carbonate on Morphology. **Science**, v. 155, n. 3768, p. 1409-1411, March 17, 1967 1967. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/155/3768/1409> >.

LEGEROS, R. Z. L. A. J. P. Dense Hydroxyapatite. In: WILSON, L. L. H. J. (Ed.). **An Introduction to Bioceramics**. Gainesville, Florida: World Scientific Publishing Co. Pet. Ltd, v.1, 1993. cap. 9, p.139-179. ISBN 0810214006.

LEWIS, J. A. et al. Direct Ink Writing of Three-Dimensional Ceramic Structures. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 89, n. 12, p. 3599-3609, 2006. Disponível em: < <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1551-2916.2006.01382.x> >.

M.M.C.G. SILVA et al. The effect of anisotropic architecture on cell and tissue infiltration into tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, v. 27, p. 9, 5909–5917 2006.

MA, Q. Y. et al. Effects of aqueous Al, Cd, Cu, Fe(II), Ni, and Zn on Pb immobilization by hydroxyapatite. **Environmental science & technology** v. 28, n. 7, p. 1219-1228, 1994. ISSN 0013-936X

MARCACCI, M. et al. Reconstruction of Extensive Long-Bone Defects in Sheep Using Porous Hydroxyapatite Sponges. **Calcified Tissue International**, v. V64, n. 1, p. 83-90, 1999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s002239900583> >.

MARICA, T. et al. Comparison the cytotoxicity of hydroxyapatite measured by direct cell counting and mtt test in murine. fibroblast NIH-3T3 cells **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. (J)**. v. 149, n. 2, p. 393-6, September 25 2005.

MAVROPOULOS, E. **A Hidroxiapatita como removedora de Chumbo**. 1999. 126 (Master). Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MIYASHIRO, K.; HAUACHE, O. M. **Mutações do Gene do Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular e Suas Doenças Associadas**. 2002. Laboratório de Endocrinologia Molecular, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), São Paulo.

NIELSEN-MARSH, C. M.; HEDGES, R. E. M. Bone porosity and the use of mercury intrusion porosimetry in bone diagenesis studies. **Archaeometry**, v. 41, p. 165-174, 1999. ISSN 0003-813X

O'BRIEN, W. J. Biomaterials Properties Database. University of Michigan http://www.lib.umich.edu/dentlib/Dental_tables/toc.html 1996. Acesso em: dezembro , 2007.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. D. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais Fundamentos & Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538

ORLOVSKII, V. P.; KOMLEV, V. S.; BARINOV, S. M. Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. **Inorganic Materials**, v. V38, n. 10, p. 973-984, 2002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020585800572> >.

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. **Biomaterials: Principles and Applications**. CRC Press 2002. 264 ISBN 9780849314919.

PAUL W. BROWN, B. C. **Hydroxyapatite and Related Materials**. CRT, 1994. 368 ISBN 0849347505

PAULEV, P.-E. Textbook in Medical Physiology And Pathophysiology Essentials and clinical problems. 1999 - 2000. ISSN 87-984078-0-5. Acesso em: March.

PUTLYAEV, V.; SAFRONOVA, T. A new generation of calcium phosphate biomaterials: The role of phase and chemical compositions. **Glass and Ceramics**, v. 63, n. 3, p. 99-102, 2006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10717-006-0049-1> >.

QING, W. et al. Preparation of hollow hydroxyapatite microspheres. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. V17, n. 7, p. 641-646, 2006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-006-9227-5> >.

RALPH E. HOLMES; LEMPERLE, S. M.; CALHOUN, C. J. **Protected Bone Regeneration. SCIENTIFIC DATA SERIES IN RESORBABLE FIXATION**: Medtronic Sofamor Danek: 11 p. 2001.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science, Second Edition: An Introduction to Materials in Medicine 2**. China: Academic Press, 2004. 864

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering. **Biomaterials**, v. 23, n. 4, p. 1073-1080, 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-44HSM83-D/2/de46dba323c4f7051378cb99e9a56bd8> >.

RHINELANDER, F. Circulation in bone. In: G, B. (Ed.). **The Biochemistry and Physiology of Bone**. 2nd. New York: Academic Press, v.2, 1972. cap. 1, p.2-77.

RIGO, E. C. S. **Efeito das Condições de Precipitação sobre as Características de Hidroxiapatita Precipitada**. 1989. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, Sao Carlos -SP.

ROUQUEROL, J. et al. **Recommendations for the Characterization of Porous Solids**. IUPAC - Pure & Appl. Chem. Great Britain, p.1739-1758. 1994

SALEH J. et al. **Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo**. XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Engenharia de Materiais. Centro de Eventos da PUCRS - Porto Alegre - RS - Brasil: CBECIMAT 2004.

SAMUEL H. BARBANTI, C. A. C. Z.; DUEK, E. A. R. **Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos**. Polímeros: Ciência e Tecnologia. 15: 13-21 p. 2005.

SATO, K. et al. Atomic-Scale 1010 Interfacial Structure in Hydroxyapatite Determined by High-Resolution Transmission Electron Microscopy. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 85, p. 3054-3058, 2002. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/amcs/acsj/2002/00000085/00000012/art00028> >.

SHORS, E. C.; HOLMES, R. E. Porous hydroxyapatite In: WILSON, L. L. H. J. (Ed.). **An Introduction to Bioceramics**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., v.1, 1993 cap. 10, p.181-198. (Adv. Ser. Ceram). ISBN 981-02-1400-6.

SIGMA-ALDRICH, B. L. Reagentes Bioquímicos e Kits - Hydroxyapatite. **BRASIL**, St Louis, MO, 2002. Disponível em: < <http://www.sigma-aldrich.com.br/> >.

SILVA, S. N. D. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* de um fosfato de calcio bifasico e seu uso para aplicação em recobrimentos sobre substratos de aço inox (AISI 316L) e da liga Ti6Al4V**. 2003. Doutorado (Doutor). CPGEM, UFMG, Belo Horizonte.

SOMASUNDARAN, P., MARKONOVIC, B. . Interfacial properties of calcium phosphates. In: AMJAD, Z. (Ed.). **Calcium Phosphates In Biological And Industrial Systems**. New York: Amjad, Zahid 1998. cap. 5, p.85-102. ISBN 978-0-7923-8046-7.

STEVENS, M. M.; GEORGE, J. H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. **Science**, v. 310, n. 5751, p. 1135-1138, November 18, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/310/5751/1135> >.

SUCHANEK, W. et al. Hydroxyapatite ceramics with selected sintering additives. **Biomaterials**, v. 18, n. 13, p. 923-933, 1997. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-3SPKVD3-F/2/e0bfbea7e163c3470ec6586d4aa45a7b> >.

TAKAGI, S. **Structures of biological minerals in dental research** Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology HighBea Research, Inc. 2001.

TAO, S. W.; IRVINE, J. T. S. Synthesis and ionic conduction of apatite-type materials. **Ionics**, v. V6, n. 5, p. 389-396, 2000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02374158> >.

TAS, A. C. A review of bone substitutes in bone remodeling : Influence of materials chemistry and porosity. **Ceramic transactions (Ceram. trans.)** ISSN 1042-1122 v. 147, p. 10, 2003. ISSN 1042-1122.

TEMENOFF, J. S.; LU, L.; MIKOS, A. G. Bone-Tissue Engineering Using Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds. In: DAVIES, J. E. (Ed.). **Bone Engineering**. Toronto, Canada: emc square, 2000. cap. 42, p.656. ISBN 0-9686980-0-X.

TRENTZ, O. A. et al. Osteoblasts response to allogenic and xenogenic solvent dehydrated cancellous bone in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 20, p. 3417-3426, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-48KMGS9-2/2/8c5a1b8b0f95a94c2423c14005da98f1> >.

TROJANI, C. et al. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 17, p. 3256-3264, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-4JCCJTT-1/2/a83cbaae0230e1bd11bc5a51b839b72d> >.

VAZ, G. J. D. O.; CARDOSO, A. V. **Porosidade da tibia boviana após tratamento térmico**. 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciencia dos Materiais. Foz do Iguaçu: CBECIMAT 2006.

VAZ, L.; LOPES, A. B.; ALMEIDA, M. Porosity control of hydroxyapatite implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. V10, n. 4, p. 239-242, 1999a. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008910213166> >.

_____. Porosity control of hydroxyapatite implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, n. 4, p. 239-242, 1999b. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008910213166> >.

WASHBURN, E. W. The Dynamics of Capillary Flow. **Physical Review**, v. 17, n. 3, p. 273, 1921. Disponível em: < <http://link.aps.org/abstract/PR/v17/p273> >.

WEBB, P. A.; ORR, C. **Analytical Methods in Fine particle Technology**. Norcross: Micromeritics Instrument Corp, 1997. 155-191

WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; T, K. **Strang Vander's Human Physiology: The Mechanics of Body Function**. McGraw Hill Higher Education, 2005.

WILLIAMS, D. **Definitions in Biomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 1987. 72

WOJCIECH SUCHANEK, M. Y. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. **Materials Research Society**, v. 13, n. 1, p. 94-117 January 1998 1998. Disponível em: < http://www.mrs.org/s_mrs/sec_subscribe.asp?CID=2306&DID=79156&action=detail >.

WOODARD, J. R. et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. **Biomaterials**, v. 28, n. 1, p. 45-54, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-4KVXHP7-1/2/8ecb0d5bda09ce263c0cf2b4a7a5aecd> >.

XU, H. H. K.; BURGUERA, E. F.; CAREY, L. E. Strong, macroporous, and in situ-setting calcium phosphate cement-layered structures. **Biomaterials**, v. 28, n. 26, p. 3786-3796, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-4NTRT4N-1/2/3fb0892e27c605b17db7584dec544505> >.

YOUNG, R. A. Implications of Atomic Substitutions and Other Structural Details in Apatites. **J Dent Res**, v. 53, n. 2, p. 193-203, 1974.

_____, Ed. **The Rietveld Method** Oxford University Press, p.312, Reprinted ed. 1996.

Anexos

Anexo I - Diagramas de fase para o sistema binário CaO-P₂O₅ e sistemas com introdução de álcalis.

CaO-P₂O₅

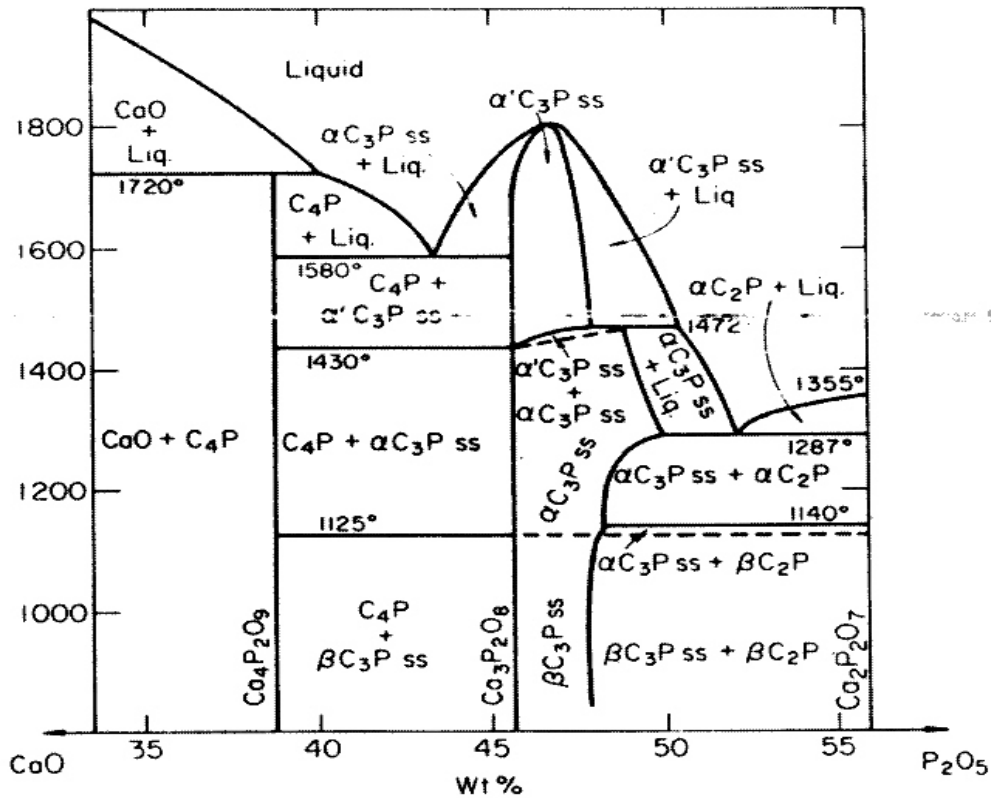


Figura A: Sistema CaO-P₂O₅. C₂P = Ca₂P₂O₇, C₃P = Ca₃P₂O₈, C₄P = Ca₄P₂O₉. H. Margor-Marette and P.V.Riboud, 1966, in LEVIN, E. M; ROBBINS, C. R; MCMURDIE, H. F. Phase diagrams for **ceramists**: Supplement. Columbus: American Ceramic Society, c1969. 625p.

CaO-P₂O₅

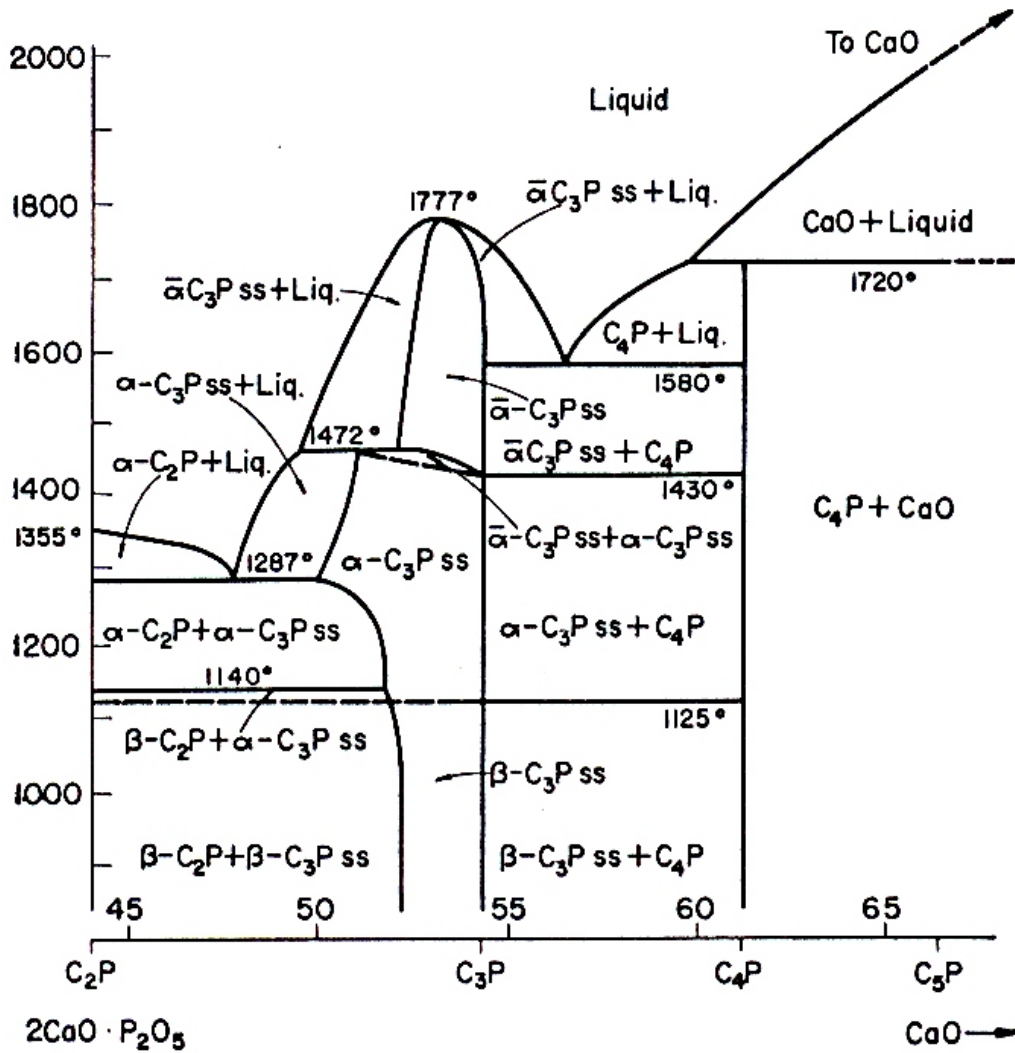


Figura B -, C = CaO, P = P₂O₅. J.H. Welch e W. Gult, 1961 in Leving, E. M., C. R. Robbins, *et al.*, Eds. Phase Diagrams for Ceramists: The American Ceramic Society. INC, v.1ed. 1964

CaO-P₂O₅ (cont.)

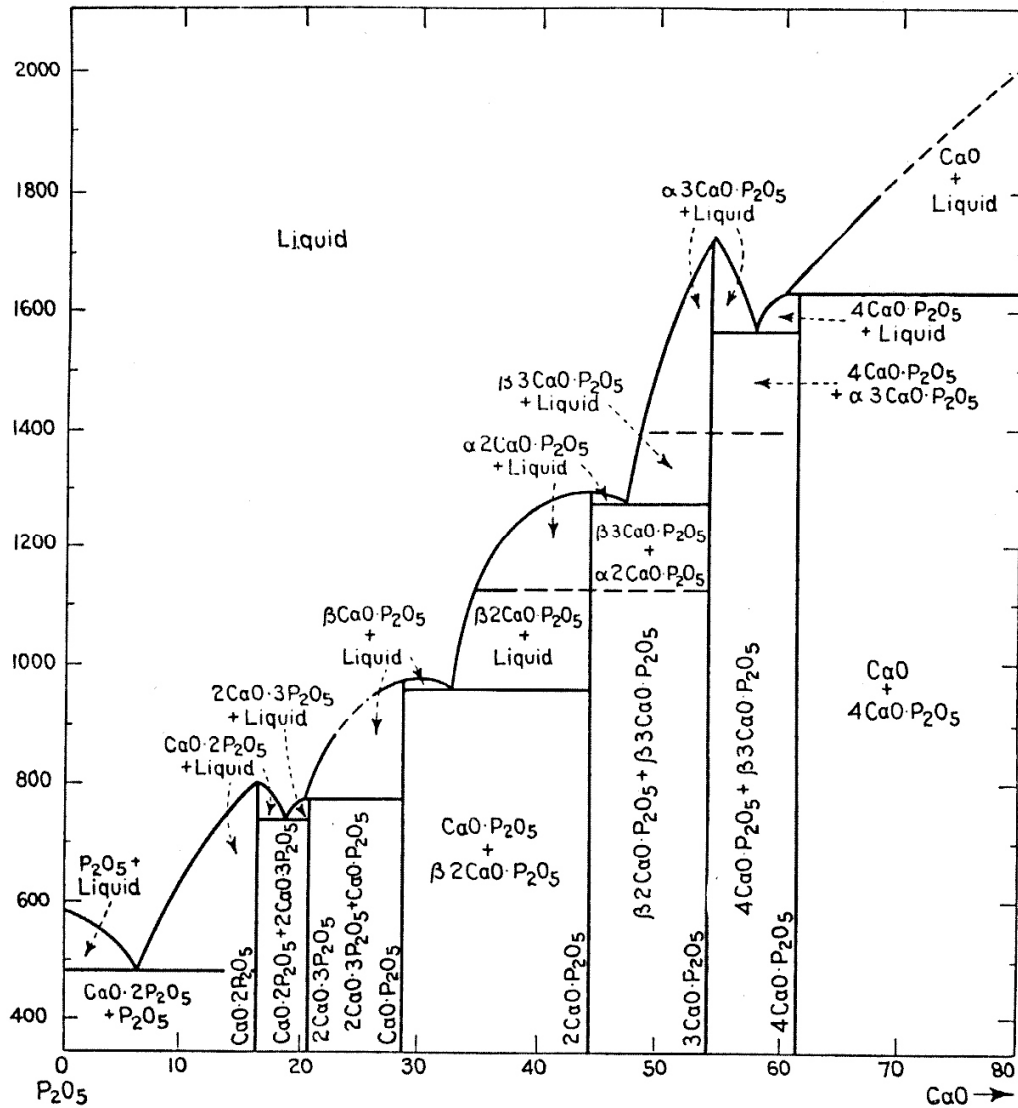


Figura C – Sistema CaO – P₂O₅. TROMEL, G., (1943) e HILL, W.L., FAULST, G.T. e REYNOLDS, D.S., (1944) in LEVING, E. M., ROBBINS, C. R., et al., Eds. Phase Diagrams for Ceramists: The American Ceramic Society, Inc, v.1ed., 1964

$K_2O-CaO-P_2O_5$

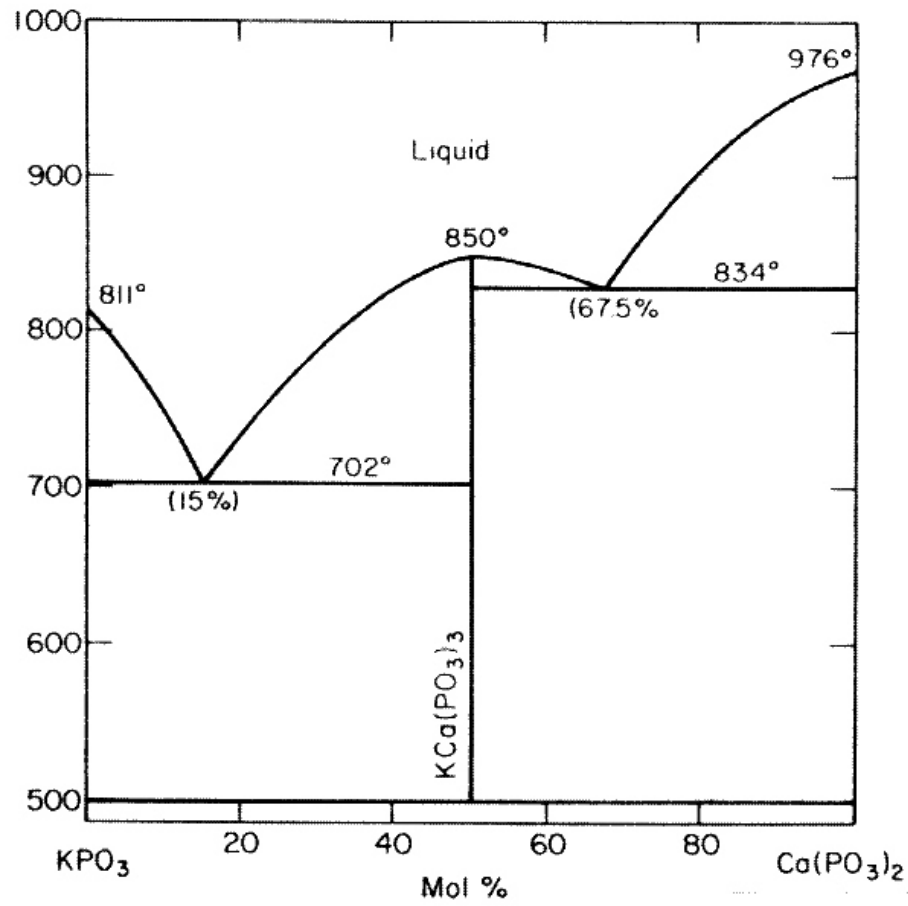


Figura C – Sistema $KPO_3-Ca(PO_3)_2$. R. Andrieu e R. Diament, (1964) in LEVIN, E. M; MCMURDIE, H. F. Phase diagrams for ceramists, v 3, 1975.

CaO-MgO-P₂O₅

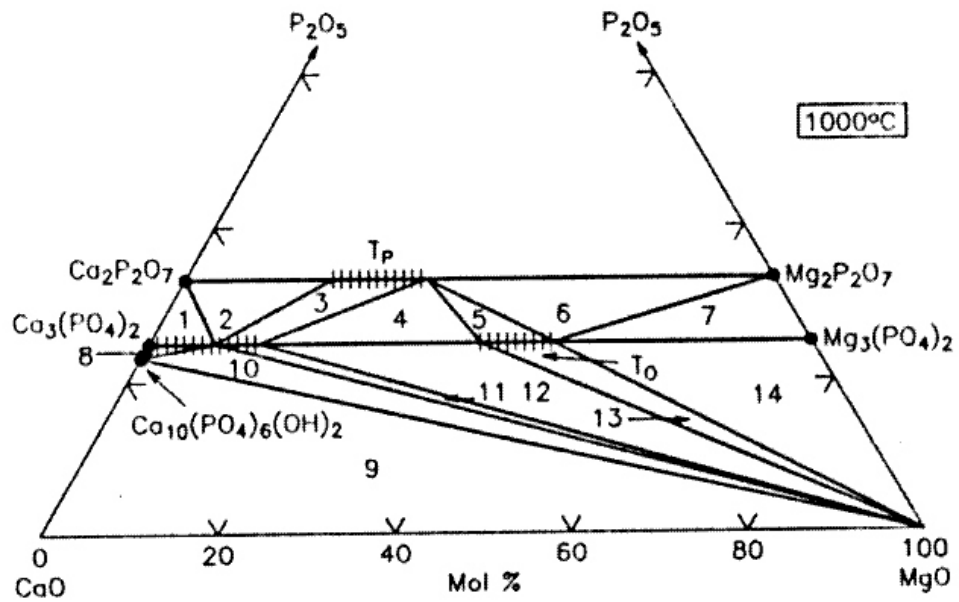


Figura D – Sistema CaO-MgO-P₂O₅ a 1000 °C. ROTH, R. S; NEGAS, T., COOK, L. P. Phase diagrams for ceramists, v.4, Ohio: c1981.

Na₂O-CaO-P₂O₅

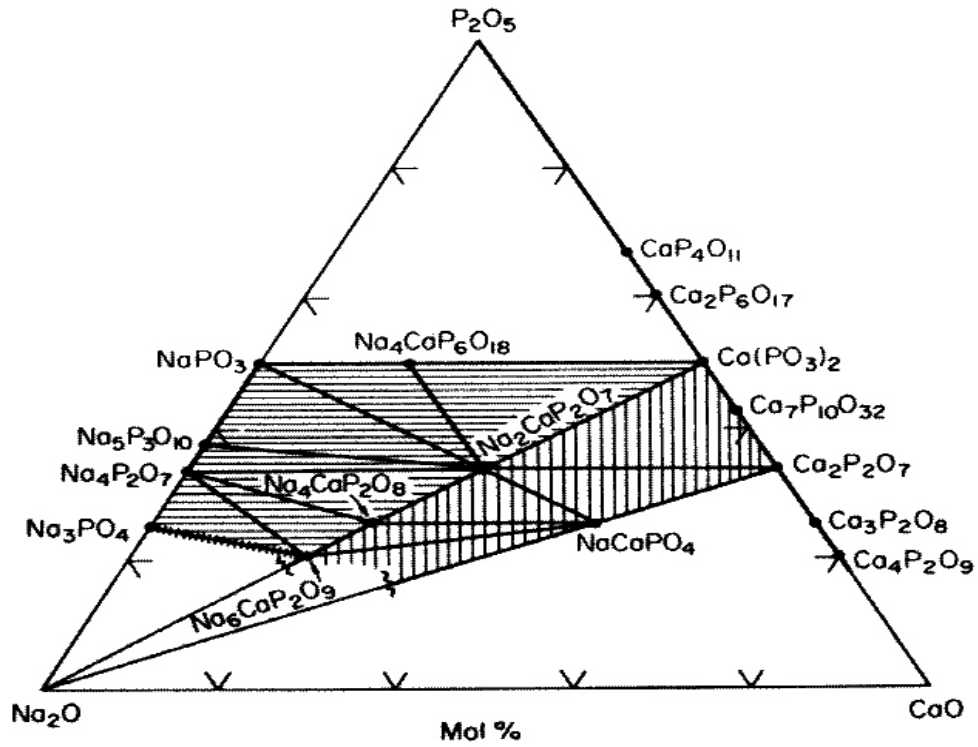


Figura F - Diagrama indexado do sistema Na₂O-CaO-P₂O₅, Berak, J., Znamierowska, T., (Ed), Pol. J. Chem. P 46, 1972 in LEVIN, E. M.; MCMURDIE, H. F. Phase diagrams for ceramists, v3, 1975.

Li₂O-Na₂O-P₂O₅

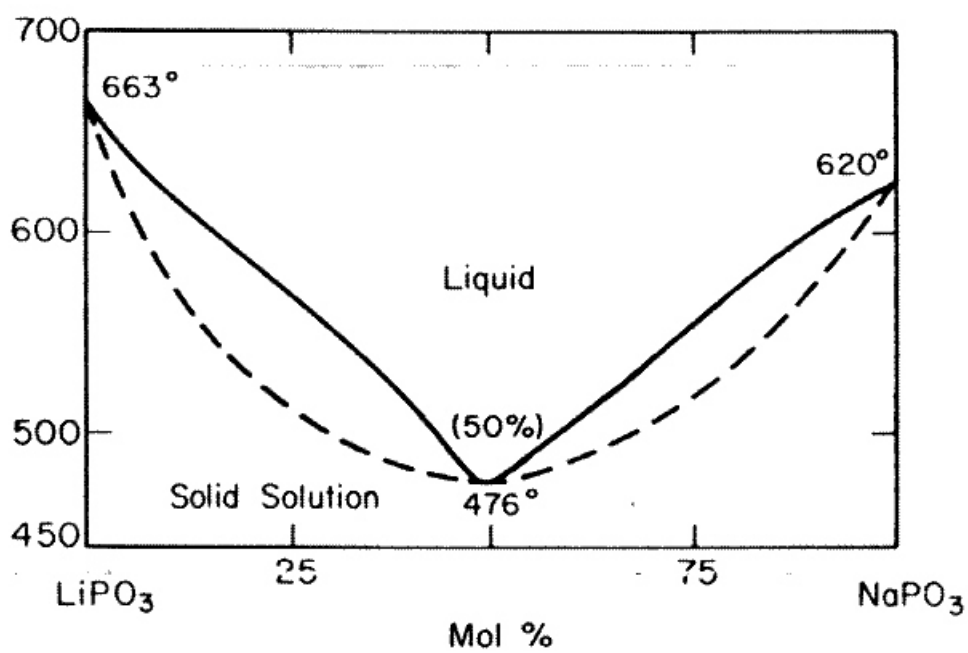


Figura G – Mardirosova, I.V e Bukhalova, G.A., Russ. J. Inorg. Chem., v11, 1966 in LEVIN, Ernest M; MCMURDIE, Howard F. Phase diagrams for ceramists, v 3, 1975

Anexo II - Fabricação de cadinhos de alumina pelo processo de colagem.

Os moldes dos cadinhos foram fabricados em gesso com uso de fôrmas plásticas e deixados em estufa da FANEM, modelo 315 SE, a 50 °C por 24 horas. Os cadinhos foram fabricados pelo processo de Colagem, descrito em “Cadinhos de alumina para fusão de vidro” (D'alcantara, 2003), e sinterizados à temperatura de 1500 °C e com taxa de aquecimento de 5 °C./min, em forno da marca Analógica AN-1600, com elementos de aquecimento a base de molibdênio (MoSi_2), fornecidos pela Zircar.

Tabela – Quantidade dos materiais usados para formar a suspensão de 300ml - método de colagem.

Materiais	Fornecedor	Para suspensão de 300 ml
Dispex A40 –(dispersante eletroestérico)	CIBA	5,4 ml
H ₂ O destilada	Lab. Cetec	174,6 ml
ZrO ₂	Z-Tech Corpotation	23,76 g
Al ₂ O ₃ – A300FL (TM=2,8 µm)	Alcoa	451,44 g