UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Físico-Química

Tese de Doutorado

Síntese de nanopartículas de fosfatos de cálcio em ambientes confinados no sistema Renex-100®/cicloexano/"brine"

Doutoranda: ***Elizabete Yoshie Kawachi***

Orientador: ***Celso Aparecido Bertran***

Julho /2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE IQ
Nº CHAMADA T/UNICAMP
K179s
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 51498
PROC 16.837/02
C ____ D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 12/11/02
Nº CPD ____

CM00176564-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

BC/ID 267672

K179s

Kawachi, Elizabete Yoshie
Síntese de nanopartículas de fosfatos de cálcio em ambientes confinados no sistema Renex- 100 ®/ cicloexano / brine / Elizabete Yoshie Kawachi. -- Campinas, SP: [s.n], 2002.

Orientador: Celso Aparecido Bertran.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fosfatos de cálcio. 2. Nanomateriais. 3. Biomateriais. 4. Sistemas pseudo-ternários. I. Bertran, Celso Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Titulo.

Dedico

À Verônica...

Ao Guilherme...

Ao Zé Guilherme...

Com amor

Agradecimentos

A todos aqueles que tornaram este trabalho possível, quer diretamente através do apoio técnico e intelectual, quer indiretamente pelo carinho e amizade. Àqueles cujos nomes não estão impressos neste agradecimento, mas que merecem minha estima e gratidão, por menos que tenham feito...

Agradeço, primeiramente, ao Professor Bertran pelos inumeráveis fatores que sempre me fizeram admirá-lo. Mais que um excelente professor e orientador, foi um mestre na arte de viver de bem com vida sem se alienar, um amigo e paizão, sempre preocupado com seus alunos e capaz de enxergar uma luz no final de qualquer túnel...

À minha família, pelo apoio incondicional e por terem acreditado em mim, sempre, mesmo que isso representasse o sacrifício individual e os vários momentos de mau humor a serem aturados...

Aos amigos que sempre estiveram presentes, mesmo distantes, fazendo-me sorrir a cada encontro, a cada reencontro, a cada e-mail, a cada telefonema recebido...

Aos amigos do grupo que trabalharam sob orientação do prof. Bertran e que dividiram vários bons (e, às vezes, maus também) momentos comigo. À Nidi, Carlinha, Cassiana, Bárbara, Carla e aos "escravinhos" mais que queridos Sérgio, Lauter, Virgu, Ney e Túlio, com quem aprendi muito mais do que pude ensinar.

Aos professores e todos os colegas do laboratório I-130 e adjacente, com quem dividi muitas de minhas dúvidas e descobertas, com quem aprendi não só a química envolvida no trabalho de cada um, mas também a química da amizade, do respeito e do companheirismo. Em especial, ao Professor Lauro Tatsuo Kubota pelo apoio e incentivo.

Aos Professores. Watson Loh e Fred Y. Fujiwara por me auxiliarem no entendimento dos sistemas ternários.

À Professora Maria do Carmo Gonçalves pelas sessões no microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Professor José Ângelo Camilli e sua orientada Rosane Vieira da Silva, do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp, pela amizade, colaboração e pelos estudos *in vivo*.

Aos Professores César e Maria Helena Santana e às Doutorandas Maria Helena Ambrósio Zanin e Elaine do Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, pela gentil atenção, recepção e utilização do equipamento de espalhamento de luz dinâmico.

Ao Raúl Barrea e Flávio Vicentin, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela colaboração e auxílio na realização das medidas de XANES.

À Oxiteno do Brasil, pela cordial e primordial doação de Renex-100®, em especial, à Mônica, da representação de vendas da Oxiteno em Campinas.

Ao corpo técnico e administrativo do Instituto de Química da Unicamp, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Por fim, isto que pode ser considerado o início de uma série de agradecimentos, agradeço a meus novos colegas do Departamento de Química da Divisão de Ensino Fundamental do Instituto Tecnológico de Aeronáutica, por me receberam de braços abertos, me oferecerem suas amizades e me incentivarem a crescer.

Resumo

Síntese de nanopartículas de fosfatos de cálcio em ambientes confinados no sistema Renex-100®/cicloexano/*brine*

Elizabete Yoshie Kawachi e Celso Aparecido Bertran

Instituto de Química - UNICAMP

Palavras-chave: fosfatos de cálcio; nanomateriais; biomateriais; sistemas pseudo-ternários.

Ossos são formados por fosfatos de cálcio nanométricos, organizados sobre uma matriz de colágeno. A obtenção de fosfatos de cálcio sintéticos que mimetizem as propriedades dos fosfatos ósseos, apresentando baixa cristalinidade e elevada área superficial (A_s), pode levar ao entendimento dos processos envolvidos na formação óssea e à otimização de implantes.

Fosfatos de cálcio nanométricos foram sintetizados em sistemas organizados do tipo surfactante/óleo/água, compostos por Renex-100®, hexanol (co-surfactante), cicloexano e soluções aquosas de cálcio e fosfato. Os sistemas de síntese apresentavam composições típicas de microemulsão reversa, cristal líquido e emulsão normal e reversa.

Os materiais sintetizados apresentaram partículas de: i) diferentes morfologias (forma esférica, de agulha e de filme); ii) dimensões entre 5 e 200 nm; iii) razão molar Ca/P de 1,23 a 1,77 e iv) A_s maior (45 a 147 m^2/g) que fosfatos de cálcio cristalinos. Estes fatores variaram com o tipo de sistema organizado utilizado.

Estudo do potencial desenvolvido na interface de eletrodos construídos com estes materiais e soluções aquosas de fosfato a diferentes concentrações revelou duas tendências: uma dependência do potencial com a A_s do material, em pH 6 e outra com a razão molar Ca/P, em pH 7. Estes resultados podem indicar uma maior troca iônica entre materiais que apresentam A_s elevada e soluções aquosas em pH baixo, o que pode levar a um aprimoramento da resposta destes quando *in vivo*, visto que os processos de regeneração ocorrem após a diminuição do pH no meio local.

Abstract

Synthesis of calcium phosphate nanoparticles in confined environments inside Renex-100®/ciclohexane/*brine* system

Elizabete Yoshie Kawachi and Celso Aparecido Bertran

Instituto de Química - UNICAMP

Key-words: calcium phosphates; nanomaterials; biomaterials; pseudo-ternary systems.

Bone is formed by nanometric calcium phosphate particles, organized through a collagen matrix. Synthetic calcium phosphates with low crystallinity and high surface area (S_A) may lead to the understanding of bone formation process and to the improvement of implants, through the mimesis of the natural bone behaviour.

Nanometric calcium phosphate particles were synthesized in surfactant/oil/water organized systems composed by Renex-100®, hexanol as a cosurfactant, cyclohexane and calcium and phosphate aqueous solutions as brine. The compositions of the systems prepared were typically of reverse microemulsion, liquid crystal, reverse and normal emulsions.

The materials synthesized showed particles of: i) different morphologies (spherical, film and needle-like form); ii) dimensions ranging from 5 to 200 nm; iii) Ca/P molar ratio from 1.23 to 1.77; and iv) S_A (45 to 147 m^2/g) larger than crystalline calcium phosphate solids. These factors varied with the type of organized system used.

The potential developed in the interface of electrodes constructed with these materials and phosphate solutions of different concentrations revealed two tendencies: a dependence of the potential with the materials' S_A, at pH 6, and with the Ca/P molar ratio, at pH 7.These results may indicate a more effective ionic exchange between materials of large S_A and aqueous solutions at low pH, which may lead to an improvement of implants' response *in vivo*, as far as regeneration processes occur after the reduction of the local environment pH.

Súmula Curricular

Elizabete Yoshie Kawachi

1. Atuação Profissional

   Professor Assistente

   Departamento de Química – Divisão de Ensino Fundamental (IEFQ)

   Instituto Tecnológico de Aeronáutica - Centro Técnico Aeroespacial (ITA/CTA)

   São José dos Campos, SP

2. Formação:

   2.1. Doutor em Ciências

   Área de Concentração: Físico-Química

   Instituição: Instituto de Química/Unicamp

   Data de conclusão: Julho de 2002.

   2.2. Mestre em Química

   Área de Concentração: Físico-Química

   Instituição: Instituto de Química/Unicamp

   Data de conclusão: Maio de 1997.

   2.3. Bacharel em Química

   Instituição: Instituto de Química/Unicamp

   Data de conclusão: Dezembro de 1994.

3. Atividades extracurriculares

   3.1. PED – Grupo I

   Disciplinas ministradas: QG-102, turmas E e F

   Instituição: Instituto de Química/Unicamp

   Período: 2º Semestre de 2000

   3.2. Curso sobre caracterização microestrutural de materiais.

   I Simpósio sobre Ciência e Engenharia de Materiais e Mercosul (MatMerco), São Carlos/SP, 1998.

3.3. Curso sobre Biomateriais
Prof. Dr. Paul Vincent Hatton, da Universidade de Sheffield
DEMA, Faculdade de Engenharia Mecânica/Unicamp, 1998.

4. Trabalhos apresentados em Encontros Científicos

4.1. Nanopartículas de fosfato de cálcio.
14º CBECiMat, São Pedro/SP, 2000.

4.2. Biocerâmicas de fosfato de cálcio nanoestruturadas
I MatMerco, São Carlos/SP, 1998.

4.3. Potencial Elétrico na interface de fosfatos de cálcio/fluido biológico.
20ª SBQ, Caxambu/MG, 1997.

4.4. Obtenção de corpos porosos de hidroxiapatita.
17ª SBQ, Caxambu/MG, 1994.

5. Artigos publicados

5.1. Barrea, R.A.; Vincentin, F.C.; Kawachi, E.Y. e Bertran, C.A. Identificação de fases minerais em cálculos dentários por espectroscopia de absorção. *X-ray Spectrometry* (submetido).

5.2. Andrade, J.C.T.; Camilli, J.A.; Kawachi, E.Y. e Bertran, C.A. Integration of dense and porous hydroxyapatite cylinders implanted in rat femora defects. *J. Biomed. Mater. Res.* (no prelo).

5.3. Kawachi, E.Y.; Bertran, C.A.; dos Reis, R.R. e Alves, O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova* 23, 518-523, **2000.**

5.4. Kawachi, E.Y.; Bertran, C.A. e Kubota, L.T. Interface potential of calcium phosphate in simulated body fluid. *Biomaterials* 19, 2329-2333, **1998.**

5.5. Petrucelli, G.; Kubota, L.T.; Kawachi, E.Y. e Bertran, C.A. Hydroxyapatite-based electrode: a new sensor for phosphate. *Anal. Comm.* 33, 227-229, **1996.**

Índice

1. Introdução 1
1.1. Biomineralização e Osteogênese 3
1.2.. Composição óssea 4
1.3. Biomateriais 7
1.4. Mimetização da biomineralização 9
1.5. Moléculas anfifílicas 10
1.5.1. Microemulsões 13
1.5.2. Emulsões 13
1.5.3. Cristais líquidos 14
1.6. Síntese em sistemas água/óleo/surfactante 15
1.7. Interação material-fluido biológico 18
2. Objetivos 23
3. Parte Experimental 25
3.1. Materiais utilizados 26
3.1.1. Reagentes 26
3.1.2. Equipamentos de pequeno porte e materiais de laboratório 27
3.2. Síntese em sistemas Renex-100®/cicloexano/brine 28
3.3. Caracterização dos sistemas de síntese 31
3.3.1. Microscopia óptica 31
3.3.2. Espalhamento de luz dinâmico (ELD) 32
3.4. Caracterização química das amostras 32
3.4.1. Determinação de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) 32
3.4.2. Razão molar Ca/P 33
3.5. Caracterização física das amostras 33
3.5.1. Espectroscopia de refletância difusa na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR) 33
3.5.2. Difração de raios X (DRX) 34

3.5.3. Área superficial por adsorção de gás (BET) 34
3.5.4. Espalhamento de luz dinâmico (ELD) 34
3.5.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e eletrônica de varredura (MEV) 35
3.5.6. Análises térmicas (TGA e DTA) 36
3.5.7. Espectroscopia de absorção de raios X na borda K do P (XANES) 36
3.6. Potencial de interface 40
3.7. Estudo *in vivo* 41
4. Resultados e discussões 43
4.1. Sistemas organizados 45
4.1.1. Síntese em região de microemulsão 50
4.1.2. Síntese em região rica em surfactante/co-surfactante 53
4.1.3. Síntese em região de cristal líquido 54
4.1.4. Síntese em região de emulsão 56
4.2. Caracterização dos materiais 58
4.2.1. Caracterização química 58
4.2.2. Caracterização física 61
4.2.2.1. FTIR e DRX 61
4.2.2.2. XANES de P 68
4.2.2.3. Análises Térmicas 72
4.2.3. Caracterização do tamanho das partículas e área superficial 76
4.2.4. Caracterização morfológica 79
4.2.5. Potencial de interface 90
4.2.6. Estudo *in vivo* 92
5. Conclusões e Perspectivas 97
6. Referências Bibliográficas 101
7. Anexos 109
7.1. Anexo 1: DRX de DCPD 111
7.2. Anexo 2: DRX de DCP 113
7.3. Anexo 3: DRX de HA 115

Índice de Figuras

Figura 1: Diagrama de fases ternário genérico para sistemas do tipo água/óleo/surfactante não-iônico 12
Figura 2: Diagrama esquemático das etapas de crescimento de partículas em microemulsões 16
Figura 3: Fórmulas estruturais de (a) Triton X-100 e (b) Renex-100® 26
Figura 4: Diagrama de fases genérico, incluindo as composições dos sistemas de síntese dos fosfatos de cálcio 28
Figura 5: Fluxograma de síntese dos fosfatos de cálcio em sistemas organizados 30
Figura 6: Espectro típico de absorção de raios X 37
Figura 7: Esquema do processo de espalhamento múltiplo 38
Figura 8: Esquema de construção dos eletrodos de fosfato de cálcio 40
Figura 9: RMN ^{1}H do Renex-100®, lote 990213-1M1, solvente DOH 47
Figura10: Curva de distribuição de tamanho de partículas do sistema S1 da síntese de ME-1, avaliado por espalhamento de luz dinâmico 51
Figura 11: Sistema de síntese da amostra ME-1, resfriado a 2 °C 52
Figura12: Micrografia óptica com luz polarizada da textura do sistema de cristal líquido 55
Figura13: Sistema de síntese da amostra CL-1, a temperatura ambiente 56
Figura14: Micrografia óptica da emulsão O/A 57
Figura 15: Sistema de síntese da amostra EA, resfriado a 2 °C 58
Figura16: Sistema de síntese da amostra EO, resfriado a 2 °C 58
Figura17: Espectros de refletância difusa na região do infravermelho médio 62
Figura18: Difratogramas de raios X das amostras de fosfato de cálcio 65
Figura19: Espectros de XANES na borda K do P dos padrões e das amostras sintetizadas em sistemas organizados. 69

Figura 20: Curvas termogravimétricas das amostras de fosfato de cálcio 73
Figura 21: Curvas de análise térmica diferencial das amostras de fosfato de cálcio 75
Figura 22: Histogramas de distribuição de tamanhos de partículas avaliados por ELD para os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados 78, 79
Figura 23: MEV da amostra ME-1 80
Figura 24: MEV da amostra RS 80
Figura 25: MEV da amostra CL-2 80
Figura 26: MEV da amostra EA 80
Figura 27: MEV da amostra EO 80
Figura 28: MEV da amostra DCPD 82
Figura 29: MEV da amostra DCP 82
Figura 30: MEV da amostra HA 82
Figura 31: MET da amostra ME-1. 83
Figura 32: MET da amostra ME-2 84
Figura 33: MET da amostra ME-3. 84
Figura 34: MET da amostra RS 86
Figura 35: MET da amostra CL-1 87
Figura 36: MET da amostra CL-2 87
Figura 37: MET da amostra EA 88
Figura 38: MET da amostra EO 88
Figura 39: Potenciais de interface médios para os eletrodos de fosfatos de cálcio, em soluções aquosas de fosfato 91
Figura 40: Região de implante de ME-1, 16 semanas após cirurgia 93
Figura 41: Região de implante de RS, 16 semanas após cirurgia 94

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição dos sistemas utilizados para sintetizar as amostras de fosfato de cálcio, em porcentagem de massa..... 29

Tabela 2: Relação dos picos observados no espectro de RMN ^{1}H do Renex-100®, utilizado nos sistemas de síntese. 48

Tabela 3: Resultados das análises químicas por CHN e por ICP/AES..... 59

Tabela 4: Relação das bandas observadas nos espectros de FTIR e suas atribuições 63

Tabela 5: Posições em energia, E, dos máximos das estruturas de absorção de raios X nos espectros XANES na borda K do P 70

Tabela 6: Valores de área superficial por BET, diâmetro médio de aglomerado de partículas por ELD e tamanho de partículas por MET 77

Lista de Abreviaturas

A/O: Água em óleo . Mistura ternária cuja fase dispersa é a água e a fase contínua é o óleo.

A_S (ou, em inglês, S_A): Área superficial.

BET: (iniciais dos nomes Brunauer, Emmett e Teller) Equação para determinação de área superficial.

Brine: (do inglês) solução aquosa de sais inorgânicos.

Ca/P: Razão molar entre cálcio e fósforo.

CHA-A: Hidroxiapatita carbonatada do tipo A (CO_3^{2-} substituindo OH^-).

CHA-B: Hidroxiapatita carbonatada do tipo B (CO_3^{2-} substituindo PO_4^{-3-}).

CHN: Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio.

CL: Cristal líquido ou amostra sintetizada neste sistema.

cmc: concentração micelar crítica.

CPP: (do inglês) Pirofosfato de cálcio, $Ca_2P_2O_7$.

D: Diâmetro de aglomerados de partículas.

DCP: (do inglês) Monohidrogeno fosfato de cálcio, $CaHPO_4$.

DCPD: (do inglês) Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado, $CaHPO_4.2H_2O$.

DRX: Difração de raios X.

DTA: (do inglês) Análise térmica diferencial.

E: Energia de fóton.

EA: Emulsão água-em-óleo ou amostra sintetizada neste sistema.

ELD: Espalhamento de luz dinâmico.

EO: Emulsão óleo-em-água ou amostra sintetizada neste sistema.

EXAFS: Extended X-ray absorption fine structure.

FBS: Fluido biológico simulado.

FTIR: (do inglês) Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier.

HA: Hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

I: Intensidade do feixe transmitido.

I_0: Intensidade do feixe incidente.

ICP/AES: (do inglês) Espectroscopia de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado.

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

μ: Coeficiente de absorção linear de raios X do elemento analisado.

ME: Sistema de microemulsão ou amostra sintetizada neste sistema.

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MEV: Microscopia eletrônica de varredura.

MO: Microscopia óptica.

ν: Vibração de estiramento de uma molécula ou grupo.

O/A: Óleo em água . Mistura ternária cuja fase dispersa é o óleo e a fase contínua é a água.

OCP: (do inglês) Fosfato octacálcico, $Ca_8H_2(PO_4)_6.5H_2O$.

RMN ^1H: Ressonância magnética nuclear de ^1H.

rpm: Rotações por minuto.

RS: Região rica em surfactante ou amostra sintetizada neste sistema.

S1: Sistema de síntese constituída por fase aquosa contendo solução de cálcio e fosfato em meio ácido.

S2: Sistema de síntese constituída por fase aquosa contendo solução de amônia.

TCP: (do inglês) Fosfato tricálcico, $Ca_3(PO_4)_2$.

TGA: Análise termogravimétrica.

TEY: (do inglês) Rendimento total de elétrons.

x: Espessura do material analisado por absorção de raios X.

XANES: X Ray absorption near edge structure.

XAS: (do inglês) Espectroscopia de absorção de raios X.

$Z_{average}$: Diâmetro médio de partículas.

1. Introdução

Os vertebrados são caracterizados pela presença de um endoesqueleto que lhes confere a forma característica e lhes possibilita manter-se eretos. Os ossos do esqueleto apresentam características duais de rigidez e flexibilidade, determinadas por sua natureza compósita, isto é, por serem constituídos por uma fase inorgânica e uma fase orgânica. Os ossos são comumente chamados de tecidos calcificados ou mineralizados, pois a sua parte inorgânica é formada por uma substância análoga a um mineral que ocorre na natureza, a hidroxiapatita[1].

Os ossos possuem duas funções principais no organismo. A primeira está relacionada à estruturação do corpo, como já foi mencionado, possibilitando que este se mantenha de pé, além de proteger órgãos vitais, como o cérebro e o coração e possibilitar a locomoção. A segunda função está relacionada à armazenagem de íons

que são trocados com o fluido biológico[2]. A esta última função está relacionada a capacidade de regeneração de ossos fraturados, já que os íons presentes no fluido biológico são incorporados ao osso, viabilizando sua reestruturação.

Problemas ósseos, como fraturas e doenças, sempre foram motivos de preocupação para os homens, na medida em que costumam acarretar deficiência de locomoção e de realização de tarefas, além de, em muitos casos, levar à exclusão dos indivíduos da sociedade.

O estilo de vida moderna tem contribuído para o aumento dos problemas relacionados aos ossos, quer seja por fatores externos, como acidentes de trabalho e automobilísticos, quer por fatores internos, como a osteoporose. Em ambos os casos, a alimentação diária inadequada, associada ao stress e ao sedentarismo da vida cotidiana, retardam a recuperação e a readaptação destes indivíduos.

A utilização de materiais biocompatíveis surgiu como uma esperança para o alívio do desconforto gerado por problemas ósseos. No entanto, o simples uso de um material que seja compatível com o organismo não garante o seu sucesso. Vários fatores estão envolvidos nos processos de formação e regeneração óssea e devem ser levados em consideração. Aspectos químicos, físicos, mecânicos, biológicos e imunológicos são fatores ponderantes na recuperação do tecido lesado. Frente a esta diversidade de fatores, profissionais das áreas médica, odontológica, biológica, química, física e de engenharia de materiais vêm trabalhando intensamente de maneira integrada para tentar entender e até mesmo imitar a natureza, a qual trabalha com os conceitos de todas as áreas citadas de forma singular.

O primeiro passo para que se obtenha sucesso na área de Biomateriais é o conhecimento básico dos aspectos que ocorrem durante a osteogênese, isto é, na formação do tecido ósseo.

1.1. Biomineralização e Osteogênese

O processo pelo qual os organismos vivos sintetizam compostos inorgânicos é denominado biomineralização. Como em todo processo de formação de um sólido inorgânico a partir de soluções aquosas, a biomineralização ocorre pela combinação de três etapas físico-químicas: supersaturação da solução aquosa com relação ao composto a ser formado, nucleação e crescimento do cristal. Nos diversos organismos que desempenham a biomineralização, este processo pode ocorrer das seguintes formas[3]:

i) Mineralização biologicamente induzida: os compostos iônicos são retirados das células;

ii) Mineralização biologicamente controlada: ocorre em espaços confinados, como membranas;

iii) Mineralização mediada por matriz orgânica: ocorre sobre um molde orgânico, que tem a função de controlar a nucleação, o crescimento, a forma e as propriedades mecânicas da fase mineral em formação.

A formação dos ossos ou osteogênese ocorre através de um processo complexo de biomineralização, que envolve a diferenciação celular, a produção da

matriz orgânica por estas células diferenciadas, a deposição ordenada de fosfato de cálcio sobre esta matriz e a remodelação da matriz mineralizada inicial para, finalmente, ser formado o osso maduro[4]. Esta complexidade de processos que ocorrem durante a biomineralização óssea dificulta o entendimento dos mecanismos da osteogênese. Por exemplo, partindo-se do início do processo, acredita-se que o local onde a mineralização principia não esteja associado à matriz orgânica, mas que ocorra dentro de vesículas limitadas por membranas. A função que estas vesículas desempenhariam no processo também é questão de controvérsias. Não se sabe se elas serviriam como depósitos de íons necessários à mineralização da matriz orgânica ou se serviriam como ambiente confinado para a nucleação e crescimento dos cristais que, de alguma forma, seriam posteriormente transportados para fora das membranas e depositadas sobre a matriz orgânica[3].

Uma vez formado, o osso apresenta algumas características pertinentes a qualquer formação biomineral, como o elevado grau de organização e regularidade de sua estrutura[5-7]. Além disso, as partículas inorgânicas formadas nos ossos encontram-se entre as menores sintetizadas por organismos vivos, apresentando dimensões aproximadas de 25 x 50 x 2 nm [3].

1.2. Composição óssea

A matriz orgânica, formada pelas células osteoblásticas, é constituída basicamente por fibras protéicas de colágeno do tipo I. Já a fase mineral é formada

por uma substância análoga à hidroxiapatita mineral, diferenciando-se por sua deficiência em íons Ca^{2+}, por apresentar a incorporação de carbonato e por ser pouco cristalina frente à técnica de difração de raios X. A principal característica desta fase, portanto, é seu baixo grau de cristalinidade a média e longa distâncias, ditado pelas pequenas dimensões de seus cristais e pelas substituições iônicas que ocorrem na sua rede cristalina, o que torna os fosfatos de cálcio da fase mineral dos ossos mais reativos e solúveis que o composto geológico equivalente. O tamanho reduzido das partículas da fase mineral resulta em uma área superficial elevada, o que faz com que grande parte destas partículas esteja disponível para troca e reação com os componentes presentes no fluido biológico. Assim, íons do fluido que apresentam tamanho e carga semelhantes aos íons Ca^{2+}, PO_4^{3-} e OH^-, podem prontamente substituir estes íons na superfície e no interior do cristal de hidroxiapatita em crescimento na fase mineral. Além disso, a área superficial elevada favorece os processos de adsorção de proteínas e enzimas[4].

A composição do osso difere de espécie para espécie e, dentro de uma mesma espécie, também varia com a região, com a idade e com o sistema imunológico individual. No caso da fase mineral, observa-se que durante a maturação óssea o processo de calcificação leva ao aumento da razão Ca/P, pela incorporação de íons cálcio na matriz mineralizada, fazendo com que a estrutura cristalina da fase mineral sofra um contínuo rearranjo, sendo possível encontrar intermediários que apresentam valores de razão molar Ca/P crescentes e de solubilidade progressivamente decrescente. Alguns destes intermediários apresentam estruturas cristalinas que se assemelham às de compostos geológicos,

como a brushita ou monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado [DCPD, $CaHPO_4.2H_2O$, Ca/P=1,00], o fosfato octacálcico [OCP, $Ca_8H_2(PO_4)_6.5H_2O$, Ca/P=1,33] e a whitelockita ou fosfato tricálcico [TCP, $Ca_3(PO_4)_2$, Ca/P=1,50]. No final do processo de maturação, a fase inorgânica é formada por um fosfato de cálcio que apresenta um arranjo cristalino semelhante ao da hidroxiapatita [HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, Ca/P=1,67], com várias substituições iônicas em sua rede cristalina, como íons Mg^{2+}, CO_3^{2-}, HPO_4^{2-}, F^- e Cl^- ou vacâncias[2,8,9]. Genericamente, pode-se dizer que a fase mineral do osso maduro sempre apresenta vacâncias de íons Ca^{2+} (sendo denominada deficiente em cálcio) e a presença de íons HPO_4^{2-} e CO_3^{2-}. Várias fórmulas moleculares têm sido sugeridas[10], como por exemplo a que leva em consideração apenas a presença de carbonato e fosfato divalente:

$$Ca_{8,3}(PO_4)_{4,3}(CO_3)_x(HPO_4)_y(OH)_{0,3}$$

Com o avanço da idade do indivíduo, acredita-se que o valor de x aumenta e o valor de y diminui, isto é, íons HPO_4^{2-} vão sendo substituídos por íons CO_3^{2-} com o passar dos anos[3].

Vários tipos de materiais compatíveis com o organismo têm sido empregados na substituição de ossos, cada qual apresentando qualidades e defeitos que devem ser ponderados antes de sua utilização. Além disso, a região onde o material será implantado também deve ser considerada, já que a estrutura e a composição dos ossos varia de acordo com as necessidades locais, relacionadas principalmente à aplicação de esforço mecânico.

1.3. Biomateriais

Desde o século XIX, uma das técnicas mais utilizadas em procedimentos ortopédicos para a substituição óssea tem sido o autoenxerto. Nesta técnica, osso proveniente do corpo do próprio paciente, denominado osso autólogo, é utilizado para reparar a região afetada. Este método promove a regeneração óssea, além de poder oferecer propriedades químicas, físicas e mecânicas características dos ossos naturais. Por outro lado, além da dificuldade em se obter a quantidade necessária de osso autólogo e do resultado de baixa qualidade estética, as estatísticas revelam que a maior incidência de complicações pós-operatórias que podem levar o paciente ao óbito ocorre não na região do implante, mas sim na região doadora do osso[11].

Para contornar a necessidade de uma cirurgia secundária para a obtenção de osso autólogo e conservar as características do autoenxerto, sugeriu-se o uso de ossos provenientes de outros indivíduos ou animais, denominados enxertos homólogos e heterólogos, respectivamente. No entanto, sua utilização não é recomendada devido a sua performance inferior, causada pela potencialidade de transmissão de doenças e/ou de reação imunológica adversa[12].

No início do século XX, os metais começaram a ser usados na substituição de ossos, tendo adquirido grande aceitação devido a sua resistência mecânica. Apesar dos metais utilizados serem biocompatíveis, eles apresentam propriedades químicas e físicas muito diferentes dos ossos e não são totalmente integrados ao organismo, sendo por isso denominados de bioinertes.

A partir da metade do século XX, ocorreu um acentuado desenvolvimento no campo de implantes médicos e odontológicos, que resultou nos denominados biomateriais. Estes são materiais especialmente elaborados para o uso na restauração ou reconstrução de partes ou funções do corpo, de modo que eles atuem de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável[13].

Vários biomateriais a base de fosfatos de cálcio têm sido obtidos nas últimas três décadas e têm-se mostrado promissores, pois apresentam boa bicompatibilidade com o tecido ósseo, devido à semelhança de composição com a sua fase mineral, além de se ligarem diretamente ao osso hospedeiro, sem a formação de uma camada intermediária de tecido conectivo. Biocerâmicas[14,15], biovidros[16], vitrocerâmicas[17], cimentos[18] e compósitos[19] são formas comumente encontradas destes materiais. Além disso, é possível obter materiais física e mecanicamente adequados para que o implante não sofra qualquer tipo de deformação[20].

Nos últimos anos, o interesse na obtenção de materiais cada vez mais semelhantes aos sintetizados *in vivo* resultou no estudo dos processos de mimetização da biomineralização, através do controle químico do crescimento dos cristais inorgânicos em matrizes orgânicas[7,21]. Materiais assim obtidos podem otimizar o tempo de regeneração óssea e o tempo de vida útil do implante, além de aumentar a compreensão do processo de mineralização.

1.4. Mimetização da biomineralização

Várias estratégias de mimetização da biomineralização têm sido traçadas nas últimas décadas[5-7,21-27]. A diversificação de estratégias elaboradas até hoje se deve ao fato de que, apesar do processo genérico de mineralização ocorrer a partir da nucleação e do crescimento de compostos inorgânicos sobre uma matriz orgânica, cada ser vivo utiliza uma matriz diferente, que leva à formação de fases minerais com diferentes composições e morfologias.

O ambiente onde a cristalização ocorre é a chave para o controle da nucleação e do crescimento do cristal. A fase mineral geralmente se forma em espaços pré-definidos, delimitados pelas matrizes extracelulares e membranas celulares ou dentro de vesículas. Dentro destes espaços confinados, os cristais crescem com forma, tamanho, concentração e composição impostas direta ou indiretamente pelas células diferenciadas que estão ao redor. Estas células comunicam-se com outras células, de modo que o trabalho conjunto destas células "inteligentes" é responsável pelos processos complexos de formação do tecido[4]. Torna-se, portanto, improvável a possibilidade de mimetizar sinteticamente estes processos. No entanto, podemos tentar elucidar os princípios do modelo biológico de mineralização e usá-los para obter materiais sintéticos que respondam de maneira mais eficiente no organismo[5].

Entre os ambientes confinados que são normalmente utilizados em processos de biomineralização estão as membranas biológicas, como as vesículas, formações supostamente utilizadas no início do processo de formação óssea. Estas membranas

impõem limites de tamanho e forma para o crescimento das partículas e, por isso, a investigação por materiais que apresentem partículas de tamanho controlado têm sido realizadas em sistemas confinados que simulam o ambiente das membranas[5,27].

Um sistema organizado que pode ser utilizado para mimetizar o ambiente das membranas é o composto por moléculas anfifílicas que se agregam de modo a separar uma fase aquosa de uma fase orgânica, resultando em regiões aquosas segregadas, nas quais a síntese dos compostos inorgânicos pode ser realizada. Partículas obtidas nestas regiões apresentam dimensões controladas pelo tamanho do agregado de moléculas anfifílicas.

A seguir, discutiremos algumas formas de agregados de macromoléculas anfifílicas que podem ser utilizadas na mimetização dos ambientes confinados da biomineralização.

1.5. Moléculas anfifílicas

Substâncias anfifílicas são compostos que apresentam uma porção hidrofílica ou polar (cabeça) e uma porção hidrofóbica ou apolar (cauda). Como resultado de sua estrutura dual, os compostos anfifílicos são capazes de alterar as propriedades de uma interface líquido-líquido, reduzindo a tensão superficial e aumentando a área de contato, sendo por isso conhecidos como detergentes, tensoativos ou surfactantes (do inglês *surface active*). Dependendo da carga existente na cabeça

polar, os surfactantes podem ser classificados em catiônicos, aniônicos, anfóteros (ou zwiteriônicos) e não-iônicos[28].

Soluções aquosas de surfactante, acima de determinada concentração, podem formar agregados organizados de dimensões coloidais denominados micelas. As micelas apresentam tamanhos que variam de 1 a 10 nm[29] e a concentração na qual elas começam a ser formadas é denominada concentração micelar crítica (cmc), sendo específica para cada surfactante[30].

Se adicionarmos um solvente orgânico à solução aquosa de surfactante e aumentarmos a concentração de água, mais água será encapsulada por mais moléculas de surfactante. Desta forma, o tamanho do compartimento interno das micelas cresce, formando agregados maiores e dando origem às microemulsões, que apresentam dimensões entre 10 e 100 nm. Aumentando-se ainda mais a quantidade de água encapsulada, formam-se as emulsões, que apresentam dimensões entre 0,1 e 10 μm[31]. Na presença de grande quantidade de surfactante, podem ser formados os cristais líquidos[32].

A introdução de um líquido apolar à solução aquosa de surfactante dá origem aos sistemas ternários do tipo água/óleo/surfactante, que são comumente representados por diagramas de fase nos quais são representadas as fases características de cada região de composição do sistema. A Figura 1 apresenta um diagrama de fases ternário água/óleo/surfactante que representa as regiões de composição nas quais as fases são comumente encontradas, em grande parte dos sistemas que empregam surfactantes não iônicos e que já foram estudados[29].

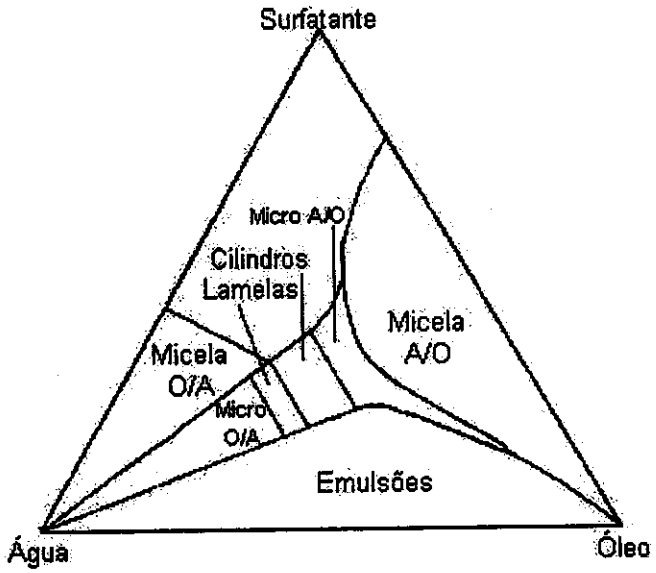


Figura 1 Diagrama de fases ternário genérico para sistemas do tipo água/óleo/surfactante não iônico[29].

Soluções não aquosas de surfactantes também podem formar micelas. Nestes casos, as micelas são formadas pelo encapsulamento de solvente orgânico pelas moléculas de surfactante, sendo denominadas micelas normais. Por definição, então, as micelas formadas por soluções aquosas são chamadas micelas reversas. Assim como as micelas, as microemulsões e emulsões também podem ser chamadas de normais ou reversas, dependendo da origem da substância encapsulada pelas moléculas de surfactante. Desta forma, pode-se formar sistemas nos quais a fase orgânica encontra-se encapsulada ou dispersa na fase aquosa em abundância, sendo chamados de sistemas normais, ou óleo-em-água, ou simplesmente O/A. Por outro lado, sistemas reversos são formados pelo encapsulamento da fase aquosa que se encontra dispersa na fase orgânica em abundância, sendo chamados de sistemas reversos, ou água-em-óleo, ou A/O.

1.5.1. Microemulsões

O termo microemulsão foi introduzido por Schulmann em 1943 e é definido como sendo uma dispersão transparente, fluida, opticamente isotrópica e termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis, contendo quantidades apropriadas de surfactante ou de surfactante e co-surfactante. A fase dispersa consiste de pequenas gotas com diâmetro na faixa de 10 a 100 nm[31]. As microemulsões podem ser do tipo água-em-óleo ou óleo-em-água e o sistema pode inverter de um tipo para outro, passando por uma estrutura bicontínua, na qual regiões de óleo e água se intercalam.

A formação de microemulsões é favorecida pela adição de um co-solubilizante ou um co-surfactante, como um álcool de cadeia longa, possivelmente devido às interações destas substâncias com a cauda apolar do surfactante, o que possibilita a formação de uma curvatura apropriada da interface que separa a fase orgânica da fase aquosa, diminuindo ainda mais a tensão interfacial, segundo parâmetros termodinâmicos[29].

1.5.2. Emulsões

Uma das definições mais usuais de emulsões é a que descreve estes sistemas como sendo dispersões de gotas de um líquido em outro, no qual o primeiro é imiscível[33]. No entanto, para se preparar uma mistura de dois líquidos imiscíveis de modo a obter uma emulsão e não apenas uma solução de duas fases, torna-se necessária a adição de um emulsificante para favorecer a dispersão e estabilizar a emulsão[32]. A utilização dos surfactantes como agentes emulsificantes torna possível

a formação de emulsões, gerando um sistema composto por gotas dispersas em uma fase contínua e que apresenta moléculas de surfactante na interface destas duas fases, tal qual as microemulsões. No entanto, o que diferencia as emulsões das microemulsões é o tamanho das gotas da fase dispersa, que apresenta diâmetros entre 0,1 e 10 μm, o que torna as emulsões turvas. Estas gotas crescem continuamente devido à agitação térmica e conseqüente coalescência, indicando a instabilidade termodinâmica destes sistemas[31].

1.5.3. Cristais líquidos

O termo cristal líquido indica um estado de agregação intermediário entre o sólido cristalino e o líquido amorfo sendo, por isso, chamado também de mesomórfico. De modo geral, uma substância neste estado é anisotrópica em algumas de suas propriedades, mas ainda exibe um certo grau de fluidez que, em muitos casos, pode ser comparável à dos líquidos comuns. Um fator essencial para que o mesomorfismo ocorra é a anisotropia geométrica da molécula de surfactante, que normalmente é longa e relativamente estreita. Dependendo da geometria desta molécula, o sistema pode passar por uma ou mais mesofases antes de se transformar no cristal líquido[34].

Os cristais líquidos são classificados de acordo com o modo como são formados, podendo ser termotrópicos ou liotrópicos. Os cristais líquidos termotrópicos são formados pelo aquecimento de um sólido cristalino ou pelo resfriamento de um líquido isotrópico, passando pela mesofase antes de se fundir ou solidificar. Já os cristais líquidos liotrópicos são formados na presença de solventes e

podem apresentar uma estrutura de micelas cilíndricas compactadas na forma cúbica ou hexagonal, ou ainda de micelas distribuídas em bicamadas com arranjo lamelar. As duas últimas formas de organização são anisotrópicas e apresentam birrefringência óptica, enquanto a fase cúbica apresenta-se como isotrópica[35].

1.6. Síntese em sistemas água/óleo/surfactante

Os sistemas apresentados na sessão anterior são normalmente empregados nas indústrias e fazem parte do nosso dia-a-dia, estando presente nos alimentos (leite, maionese), nos cosméticos (cremes), nas cores dos objetos a nossa volta (tintas), nas televisões e computadores (monitores), nos remédios (sistemas de liberação controlada de drogas). Além destas aplicações, sistemas contendo anfifílicos também estão presentes no nosso organismo, como nas membranas, organelas celulares, lipoproteínas do soro e até mesmo em ocorrências patológicas[35]. Desta forma, a utilização de sistemas contendo anfifílicos para sintetizar materiais inorgânicos pode resultar em materiais com organização e morfologia semelhantes a de materiais obtidos em sistemas biológicos.

O crescimento de partículas em sistemas contendo anfifílicos acontece através do contato entre reagentes precursores do material de interesse, o que pode ocorrer através da solubilização destes na fase aquosa de dois sistemas em separado e posterior coalescência dos domínios aquosos por agitação do sistema, ou por solubilização de apenas um dos reagentes em um sistema contendo o

anfifílico e, posterior adição do segundo reagente diretamente sobre este sistema, de modo que o reagente adicionado entra em contato com o primeiro pela sua difusão através da interface formada pelas moléculas de surfactante. A Figura 2 apresenta um diagrama esquemático dos vários estágios de crescimento de partículas por solubilização dos reagentes em sistemas separados e posterior coalescência dos domínios aquosos (Figura 2a) e por solubilização de um dos reagentes e posterior adição de outro reagente por difusão (Figura 2b).

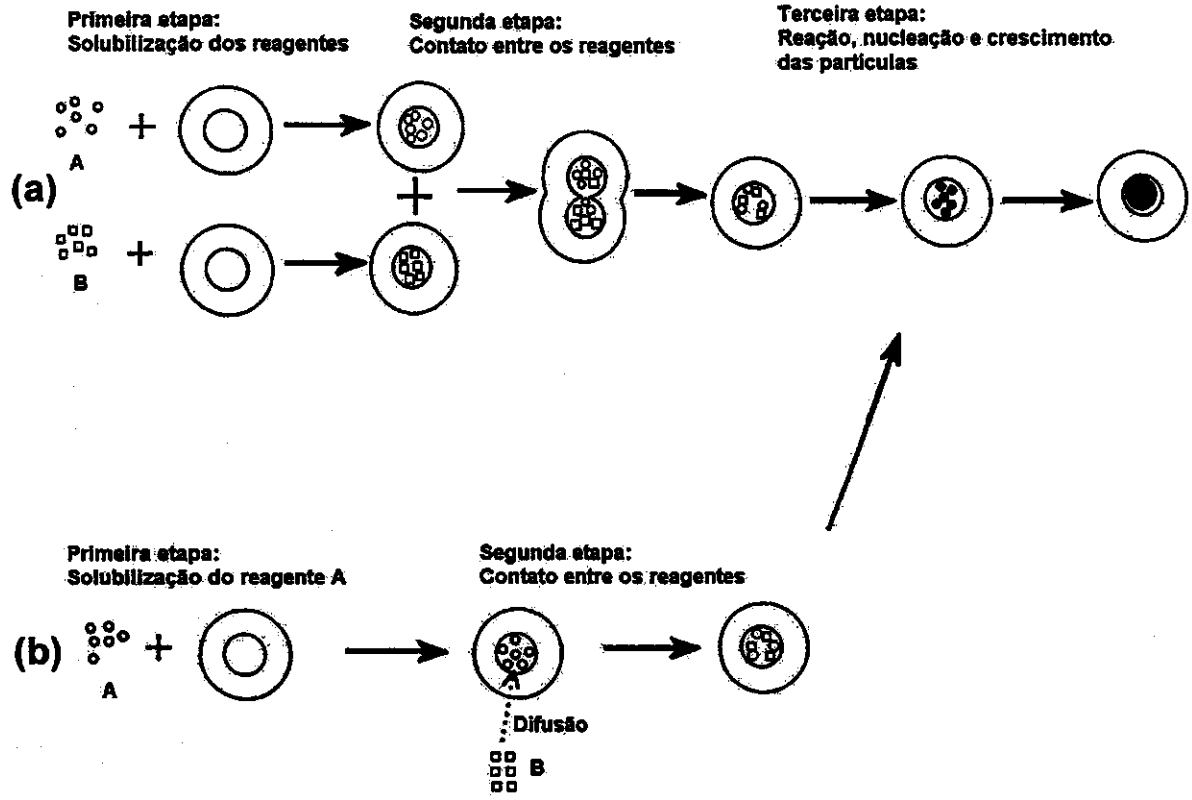


Figura 2: Diagrama esquemático das etapas de crescimento de partículas em microemulsões[36].

Este esquema refere-se à síntese em um sistema de microemulsão[36], mas ele pode ser estendido para todos os outros sistema que empregam surfactantes, respeitando-se a morfologia de cada um.

A utilização de microemulsões para a obtenção de compostos inorgânicos apresenta como grande vantagem a possibilidade de obtenção de partículas nanométricas e monodispersas, sendo estas características dificilmente obtidas por métodos clássicos, já que as partículas tendem a se aglomerar durante o processo de síntese[35].

No caso dos fosfatos de cálcio, estes apresentam grande tendência à aglomeração. No entanto, como já foi descrito em sessões anteriores, o fosfato de cálcio da fase mineral dos ossos apresenta partículas de tamanhos reduzidos, o que lhe confere baixa cristalinidade e elevada área superficial. Na tentativa de obter materiais sintéticos com estas características, nanossitemas têm sido utilizados para obter materiais em ambientes confinados de dimensões nanométricas[37,38]. As partículas provenientes de sínteses realizadas neste tipo de sistema apresentam dimensões abaixo de 100 nm.

Recentemente, fosfatos de cálcio têm sido sintetizados em sistemas de microemulsão [39-41], através do uso de macromoléculas, de modo a compor um sistema do tipo água-em-óleo, no qual a fase aquosa forma domínios de dimensões nanométricos, chamados de microrreatores ou microdomínios e que conferem ao sistema transparência, homogeneidade e estabilidade.

Com base nos resultados relatados em literatura, este projeto de Doutorado buscou a utilização de sistemas organizados do tipo água-óleo-surfactante para obter

fosfatos de cálcio com diferentes tamanhos e morfologias, mas sempre em busca de nanopartículas, para obtermos materiais de área superficial elevada. Para tanto, escolheu-se um sistema composto por Renex-100® como surfactante, hexanol como co-surfactante, cicloexano como a fase orgânica e soluções aquosas de cálcio e fosfato como *brine* (termo inglês que se refere a soluções aquosas de eletrólitos). Foram estudadas sínteses em sistemas com composições correspondentes às regiões de microemulsão reversa, emulsão normal e reversa e cristal líquido liotrópico, procurando determinar a influência dos diferentes ambientes de confinamento sobre as características químicas e morfológicas das partículas ali sintetizadas.

1.7. Interação material-fluido biológico

Partículas sintetizadas em sistemas organizados do tipo água/óleo/surfactante podem apresentar dimensões reduzidas e homogêneas, que se assemelhem às de cristalitos provenientes da fase mineral dos ossos. Esta característica pode resultar em uma superfície de contato ampla, que torna a interação material/fluido biológico mais efetiva, possibilitando uma maior adesão de enzimas, proteínas e células osteoblásticas à superfície do material, que se apresenta na forma de aglomerados de partículas. Trabalhos publicados nos últimos anos têm mostrado a importância da microestrutura de corpos cerâmicos e da dimensão nanométrica de suas partículas para a obtenção de materiais osteoindutores (materiais capazes de induzir o

crescimento ósseo), em detrimento aos materiais osteocondutores (materiais que servem apenas como suporte para o osso em formação) comumente utilizados [42,43].

Quando um material é implantado no organismo, ele pode interagir com o meio. No caso de materiais a base de fosfato de cálcio, eles podem sofrer um processo de remodelação, no qual o material implantado pode ser parcialmente dissolvido no fluido biológico. Processos de remodelação ocorrem constantemente em todos os ossos durante a vida, liberando íons dos ossos para o fluido biológico ou incorporando íons presentes no fluido[44]. Em verdade, o próprio organismo é capaz de regenerar fraturas, sintetizando HA *in vivo*, através de consecutivos processos de formação e solubilização, utilizando os íons presentes no fluido corpóreo. Desta forma, os processos de troca iônica desempenham um papel importante, mas de difícil compreensão nos processos de regeneração óssea.

Gramain e colaboradores[45,46], estudando o processo de dissolução de HA e esmalte dentário, sugeriram que ocorre a formação de uma camada rica em cálcio entre a camada de Nernst e a superfície de HA, impedindo o avanço da troca iônica, logo após o início do processo de dissolução. Segundo os autores, as concentrações dos íons cálcio e fosfato em equilíbrio com a solução contendo fosfato de cálcio sólido, após a formação da camada rica em cálcio na interface sólido/solução, dependem do pH e da força iônica da solução e de características do sólido, como composição, cristalinidade, tamanho de partículas, entre outras. Em se tratando de troca iônica, através da movimentação destas espécies em solução, imagina-se que seria possível verificar o potencial desenvolvido na interface destes materiais com soluções aquosas.

Neste sentido, estudos realizados anteriormente mostraram que eletrodos construídos com HA não respondem à presença de íons cálcio em solução, mas respondem a íons fosfato, podendo até ser empregados como sensores para esta espécie[47].

Em outro trabalho, o comportamento do potencial de interface de eletrodos de HA, β-TCP e β-CPP (pirofosfato de cálcio) cristalinos, imersos em uma solução que simula o fluido biológico (FBS) foi avaliado[48,49]. Apesar do FBS conter apenas os íons principais, como Na^+, K^+, Cl^-, HCO_3^- e HPO_4^{2-}, não incluindo a presença de íons existentes em baixas concentrações e as moléculas orgânicas que, muitas vezes, possibilitam o tamponamento do fluido, são os íons presentes em maiores quantidades que irão responder na presença dos eletrodos. O estudo foi realizado em diferentes valores de pH e temperatura, de modo a simular o ambiente biológico e quando da ocorrência de uma lesão ou de um processo inflamatório, como por exemplo, uma cirurgia para implante ósseo. Nestes processos, o pH na região do trauma pode cair de 7,2 para 5,2, devido à fagocitose, à necrose e à presença de mediadores e enzimas[13]. As temperaturas avaliadas foram de 25 ° e 37 °C. Os autores observaram que os eletrodos constituídos com materiais mais solúveis têm seu potencial de interface estabilizado mais rapidamente em valores de pH menores e a 37 °C, isto é, os processos de troca iônica para o estabelecimento da dupla camada de Nernst, ou de uma camada rica em cálcio, são rapidamente atingidos, quanto maior for a solubilidade do material.

No caso do trabalho acima, os fosfatos de cálcio utilizados apresentavam elevada cristalinidade e partículas de grandes dimensões, sendo possível relacionar

a demora na estabilização da resposta do potencial de interface com a solubilidade de cada material. Espera-se, no presente trabalho, que eletrodos construídos com fosfatos de cálcio, sintetizados em diferentes sistemas organizados e que apresentem elevada área superficial, respondam rapidamente ao serem imersos em soluções aquosas, de modo que seus potenciais de interface sejam estabilizados em curto espaço de tempo.

Nas próximas sessões serão reportados os procedimentos experimentais e serão discutidos os objetivos, as observações e resultados obtidos neste trabalho.

2. Objetivos

Com o objetivo de aprimorar o entendimento dos processos de formação e de regeneração óssea e de otimizar a função de implantes e enxertos, conferindo maior estabilidade na manutenção do implante, este trabalho de Doutorado buscou a obtenção de fosfatos de cálcio em sistemas organizados, que mimetizem os ambientes confinados nos quais a biomineralização ocorre. A caracterização química destes fosfatos também foi enfocada, sem, no entanto, preocupar-se com a obtenção de materiais com estequiometria definida, mas com especial interesse nas propriedades da superfície destes materiais.

Em suma, os seguintes objetivos do trabalho podem ser listados:

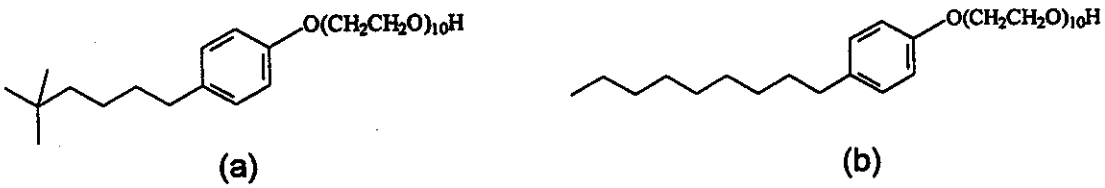
- Utilização de sistemas organizados, compostos por Renex-100®, hexanol, cicloexano e soluções aquosas dos sais de cálcio e fosfato;

- Preparo destes sistemas organizados com composições características de microemulsão água-em-óleo, emulsões água-em-óleo e óleo-em-água e cristal líquido;
- Obtenção de fosfatos de cálcio nestes sistemas organizados;
- Caracterização química e morfológica dos fosfatos de cálcio obtidos, relacionando-os aos sistemas de síntese utilizados;
- Estudo do comportamento destes materiais em solução aquosa, avaliando os processos de troca iônica.

3. Parte Experimental

Para a síntese dos fosfatos de cálcio em sistemas organizados, o trabalho de Qi e colaboradores[39] foi utilizado como referência. Neste trabalho, os autores utilizaram uma mistura composta pelo surfactante não iônico Triton X-100 (polioxietileno-octil-fenol éter, Figura 3a), hexanol como co-surfactante, cicloexano como fase lipofílica e soluções aquosas contendo íons cálcio e fosfato como *brines*.

No presente trabalho, usou-se Renex-100® como surfactante, um produto comercial fornecido pela Oxiteno do Brasil, portanto de fácil aquisição e de baixo custo, cuja molécula assemelha-se a do Triton X-100, diferindo apenas na sua parte hidrofóbica, que apresenta nove átomos de carbono em cadeia linear (Figura 3b).



(a) (b)

Figura 3: Fórmulas estruturais de (a) Triton X-100 e (b) Renex-100®, que apresentam, em média, dez grupos oxietilenos na cadeia hidrofóbica da molécula.

Soluções de $Ca(NO_3)_2$ 1,0 mol/L + H_3PO_4 0,6 mol/L e de NH_4OH 2,0 mol/L foram empregadas como fases aquosas.

A composição dos sistemas organizados foi determinada tomando por base diagramas de fase ternários genéricos e simplificados, que indicam as regiões nas quais diferentes fases normalmente são formadas[29].

3.1. Materiais utilizados

3.1.1. Reagentes

- Renex-100®, lote 990213-1M1 (Oxiteno do Brasil)
- Cicloexano, P.A. (Vetec)
- Hexanol, P.A. (Aldrich)
- $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, P.A. (Merck)
- H_3PO_4, P.A. (Merck)
- NH_4OH, P.A. (Synth)
- Álcool etílico, P.A. (Synth)

- Acetona, P.A. (Vetec)
- HCl, P.A. (Nuclear)
- $CaCO_3$, P.A. (J. T. Baker)
- KH_2PO_4, P.A. (Cinética Química)
- KBr de grau espectroscópico (Merck)
- Álcool isopropílico, P.A. (Vetec)
- Grafite em pó, 1-2 μm (Aldrich)
- Parafina (Reagen)
- Mercúrio

3.1.2. Equipamentos de pequeno porte e materiais de laboratório

- Banho de água (General Signal, Blue M)
- Centrífuga (Tomy Seiko, modelo IC-15SN, velocidade máxima 3500 rpm)
- Balança semi-analítica (Ohaus, modelo TP2KS, precisão ± 0,01 g)
- Balança analítica (Sartorius, modelo BP211D, precisão ± 0,01 mg)
- Agitador magnético (Nova Técnica, modelo NT-103)
- Agitador Mecânico (Fisatom, modelo 713T)
- Ultra-som (Thornton, modelo T14)
- Potenciômetro (Corning, modelo 450)
- Eletrodo de vidro (Analion)
- Eletrodo de calomelano saturado (Analion)
- Bomba de vácuo (Welch, modelo 1400)
- Sohxlet

- Almofariz e pistilo de ágata
- Ponteiras de micropipeta
- Fio de cobre
- Vidraria comum em laboratório

3.2. Síntese em sistemas Renex-100®/cicloexano/brine

Utilizou-se Renex-100® de um único lote em todos os sistemas de síntese. Para verificar o tamanho das cadeias hidrofílica e hidrofóbica deste composto uma alíquota (aproximadamente 40 mg) foi analisada por RMN ^{1}H, em um equipamento Varian, modelo Gemini 300, utilizando DOH como solvente.

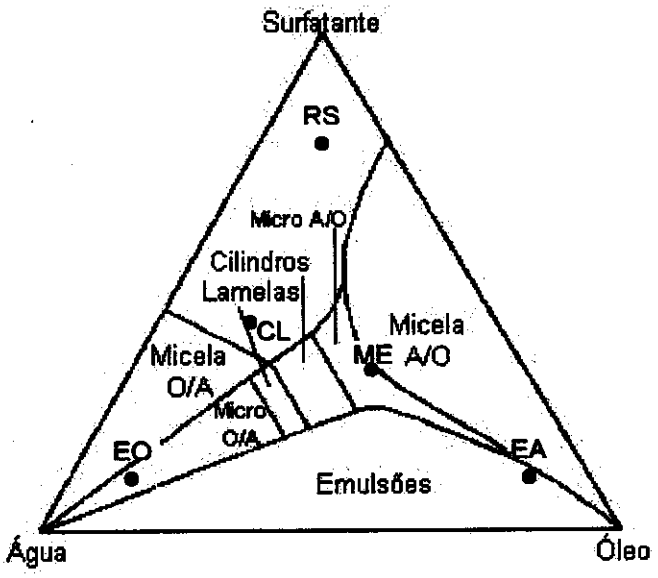


Figura 4: Diagrama de fase genérico, incluindo as composições dos sistemas organizados empregados na síntese dos fosfatos de cálcio.

Cinco composições foram utilizadas para a síntese dos fosfatos de cálcio, todos diferindo na porcentagem em massa de cada componente, de acordo com os dados listados na Tabela 1. Estas composições foram escolhidas tomando por base o diagrama de fases genérico reproduzido na Figura 4, no qual os pontos em destaque correspondem às regiões de microemulsão A/O (ME), cristal líquido (CL), emulsão O/A (EO), emulsão A/O (EA) e região rica em surfactante (RS).

Tabela 1: Composição dos sistemas utilizados para sintetizar as amostras de fosfato de cálcio, em porcentagem de massa.

Amostra	Sistema	Renex-100	Hexanol	Cicloexano	Solução de Ca^{2+} e PO_4^{3-}	NH_4OH
ME-1	S1	20,4	15,6	49,6	14,3	0
	S2	17,2	13,8	42,3	0	28,7
ME-2	S1	28,5	22,0	69,5	30,0[(a)]	0
ME-3	S1	35,2	0	48,4	16,4	0
	S2	32,2	0	44,2	0	23,6
RS	S1	46,4	35,3	8,8	9,4	0
	S2	46,4	35,3	8,8	0	9,4
CL-1	S1	45,5	0	9,0	45,5	0
	S2	45,5	0	9,0	0	45,5
CL-2	S1	45,5	0	9,0	45,5	Vapor
EA	S1	10,0	0	80,0	10,0	0
	S2	10,0	0	80,0	0	10,0
EO	S1	10,0	0	10,0	80,0	0
	S2	10,0	0	10,0	0	80,0

[(a)] Foram adicionados 15,0 % em massa de solução de $Ca(NO_3)_2$ 0,1 mol/L e, depois, 15,0 % em massa de solução contendo $(NH_4)_2HPO_4$ 0,6 mol/L e NH_4OH 1,0 mol/L.

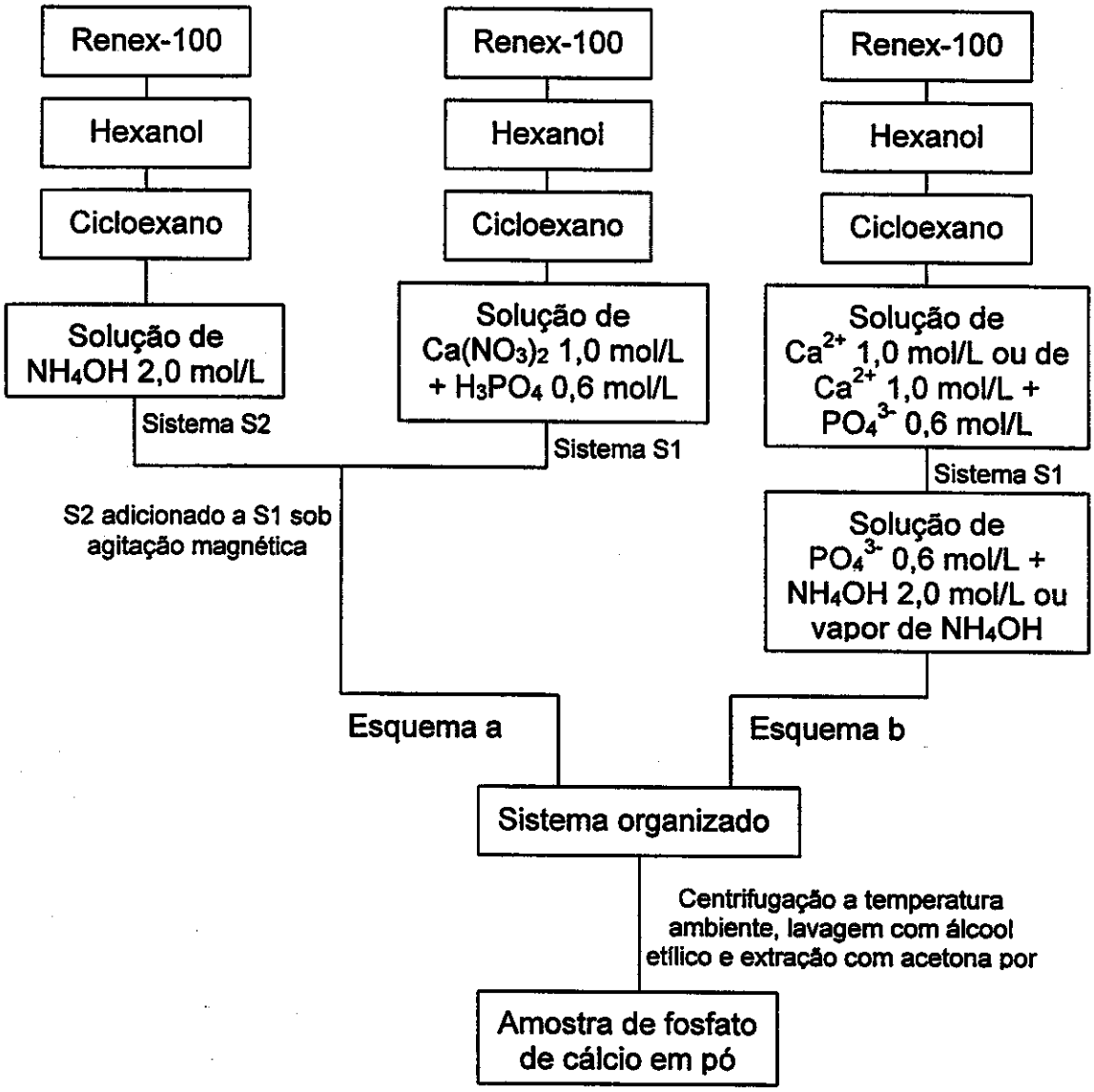


Figura 5: Fluxograma de síntese dos fosfatos de cálcio em sistemas organizados.

A Figura 5 apresenta o fluxograma de preparo dos sistemas de síntese dos fosfatos de cálcio. No processo padronizado mostrado na Figura 5 (esquema a), utilizou-se dois sistemas, cada um contendo uma solução precursora aquosa para possibilitar que a síntese ocorresse por coalescência dos microrreatores, como esquematizado na Figura 2a. Em outros processos estudados, utilizou-se um único

sistema, sobre o qual adicionaram-se as soluções aquosas precursoras ou colocou-se o sistema em presença de vapor de amônia (Figura 5, esquema b).

Todos os sistemas foram estocados por 10 dias, sendo que as misturas fluidas (ME, RS, EO e EA) foram mantidas a 2 °C. Após este período, os sistemas foram deixados atingir a temperatura ambiente para serem centrifugados a 2500 rpm. Os sistemas mais viscosos (CL) foram diluídos com álcool etílico para possibilitar a centrifugação dos sólidos aglomerados. Todos os materiais foram lavados com álcool etílico, resultando em materiais sólidos aglomerados, que foram desagregados e submetidos à extração dos resíduos orgânicos com acetona quente em extrator sohxlet. Por fim, os materiais na forma de pó fino foram secos ao ar.

Os materiais foram analisados por várias técnicas, as quais serão brevemente descritas a seguir.

3.3. Caracterização dos sistemas de síntese

3.3.1. Microscopia óptica (MO)

Os sistemas de síntese CL e RS foram observados em microscópio óptico Nikon Eclipse E800, para avaliação da anisotropia mediante polarizadores de luz e do tamanho das gotículas dos sistemas recém preparados, respectivamente. Micrografias foram obtidas a partir de uma máquina fotográfica Nikon FDX-35.

3.3.2. *Espalhamento de luz dinâmico (ELD)*

A determinação do tamanho dos domínios das microemulsões recém preparadas e analisadas sem tratamento prévio foi realizada no Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, utilizando um equipamento Malvern PCS 4700 com laser de He-Ne (λ = 633 nm). A radiação espalhada foi coletada a 90° do ângulo de incidência da radiação e os seguintes valores foram considerados nas análises: o índice de refração do meio dispersante foi calculado como sendo a média geométrica dos índices de refração dos componentes do sistema; a viscosidade elevada do sistema foi considerada 2,950 cP e o método matemático empregado na análise foi o monomodal.

3.4. *Caracterização química das amostras*

3.4.1. *Determinação de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN)*

A eficiência da extração dos resíduos orgânicos provenientes da síntese, com acetona quente, foi verificada através da determinação do teor de C, H e N, em um Analisador CHNS/O Perkin-Elmer PE-2400. Neste equipamento, a amostra é aquecida até 925 °C e a presença dos elementos C, H e N é quantificada através da coleta destes, na forma dos gases CO_2, H_2O e N_2.

3.4.2. Razão molar Ca/P

A razão molar Ca/P foi calculada a partir da determinação do teor de Ca e P por espectroscopia de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP/AES), realizado em espectrofotômetro Perkin-Elmer 3000 DV.

Soluções aquosas das amostras foram preparadas suspendendo-se aproximadamente 5 mg de amostra em um pouco de água, dissolvendo-se com aproximadamente 0,5 ml de HCl concentrado e diluindo a 25 ml.

Curvas de calibração foram construídas a partir de soluções padrão de Ca e de P a 20, 40, 60, 80 e 100 ppm, preparadas a partir de $CaCO_3$ e de KH_2PO_4. As quantidades de cálcio e fósforo nas amostras foram determinadas com base na curva de calibração e o valor da razão Ca/P foi obtido matematicamente.

3.5. Caracterização física das amostras

3.5.1. Espectroscopia de refletância difusa na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Bomen MB-series, na região de 4000 a 400 cm^{-1}, com resolução de 4 cm^{-1} e realizando 128 varreduras, utilizando o método de refletância difusa. Para este método, a amostra foi triturada e homogeneizada com KBr de grau espectroscópico

em uma concentração de cerca de 2 % em massa e esta mistura na forma de pó foi analisada em acessório próprio para refletância difusa.

3.5.2. *Difração de raios X (DRX)*

As amostras de fosfato de cálcio foram desagregadas em almofariz, compactadas sobre porta amostra de vidro e analisadas em um difratômetro Shimadzu DRX-6000, utilizando fonte de radiação CuK_α (λ = 1,5418 Å) e filtro de níquel. Como condições para a obtenção dos difratogramas foi utilizada voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA e varredura de 2 °/min.

3.5.3. *Área superficial por adsorção de gás (BET)*

A área superficial das amostras de fosfato de cálcio secas a vácuo foi avaliada utilizando um equipamento Micromeritics Flowsorb 2300. Aproximadamente 200 mg de amostra foram utilizados neste método, sem que fosse realizado aquecimento durante o processo de degaseificação.

3.5.4. *Espalhamento de luz dinâmico (ELD)*

O tamanho médio dos aglomerados de partículas foi determinado por espalhamento de luz dinâmico, utilizando um medidor Malvern PCS 4700 e uma fonte de radiação laser de He-Ne, operando em comprimento de onda de 633 nm. As amostras na forma de pó foram suspensas em álcool isopropílico (aproximadamente 0,5 g de material em 4 ml de álcool isopropílico) e submetidas ao ultra-som para

efetivar a desagregação das partículas. As análises foram realizadas a 26 °C, coletando-se a intensidade da radiação espalhada a um ângulo de 90° com relação ao raio de incidência e considerando o índice de refração do meio dispersante igual a 1,39, o índice de refração da amostra igual a 1,60 e a viscosidade do álcool isopropílico igual a 2,32 cP [50]. O método de análise utilizado foi o Contin.

3.5.5. *Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e eletrônica de varredura (MEV)*

O microscópio eletrônico de transmissão Zeiss CEM-902 foi utilizado para análise morfológica das partículas sintetizadas em sistemas confinados. As amostras foram suspensas em álcool isopropílico (0,02 % m/m) e levadas ao banho de ultra-som para desagregar as partículas. Uma gota de cada suspensão foi depositada sobre telas de cobre, cobertas com filme polimérico de parlódio e com uma camada de carbono. A condição de operação do equipamento foi de 80 kV.

O microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-T300 foi utilizado para analisar a superfície dos aglomerados de partículas obtidas tanto por sínteses convencionais (materiais cristalinos) como por sínteses em sistemas confinados. Para tanto, as amostras na forma de pó foram separadas granulometricamente em membranas de nylon de malha de 20 μm (materiais de síntese convencional) ou de 5 μm (materiais de síntese em sistemas confinados) e diretamente depositadas sobre fita adesiva de carbono de dupla face, fixada sobre porta amostras de latão ou carbono. As amostras preparadas sobre porta-amostra de latão foram metalizadas

com ouro e as amostras preparadas sobre porta-amostra de carbono foram metalizadas com carbono. O equipamento operou com aceleração de feixe de 20 kV.

3.5.6. *Análises térmicas (TGA e DTA)*

As análises térmicas foram realizadas em um equipamento TA Instruments 5100, utilizando o módulo TGA-2050 para a análise termogravimétrica e o módulo DTA-1600 para a análise térmica diferencial. Em ambos os casos, a massa da amostra variou de 10 a 15 mg e as medidas foram realizadas em atmosfera de argônio, com velocidade de aquecimento de 10 °C/min em uma faixa de temperatura de 25 a 1000 °C.

3.5.7. *Espectroscopia de absorção de raios X na borda K do fósforo (XANES)*

A espectroscopia de absorção de raios X (XAS) permite que a vizinhança de um determinado átomo imerso em uma matriz seja investigada, segundo o número de vizinhos e a distância até eles. A grande vantagem desta técnica é que ela pode fornecer informações estruturais de amostras que apresentem ordem local - já que ela é elemento seletiva - diferentemente de outras técnicas, como DRX e FTIR, as quais fornecem informações de curta a longas distâncias[51,52].

O princípio básico desta técnica envolve a aplicação de um feixe de fótons de intensidade I_0 e energia incidente variável E sobre uma amostra. A intensidade I do feixe transmitido apresenta saltos abruptos que ocorrem em energias específicas,

dependendo da natureza dos átomos presentes no material. Estes saltos, chamados de bordas, aparecem como o resultado da absorção de um fóton por um elétron de um nível mais interno de um átomo, com a conseqüente emissão de um fotoelétron para os primeiros níveis desocupados acima do nível de Fermi. A interação entre fóton e matéria resulta em uma perda de intensidade do feixe, proporcionalmente à intensidade do feixe incidente e à espessura do material (x), de acordo com a equação:

$$I = I_0 e^{(-\mu x)}$$

onde μ é o coeficiente de absorção linear de raios X do elemento, sendo uma função da energia[53]. O espectro de absorção de raios X pode ser dividido em três partes, de acordo com a Figura 6:

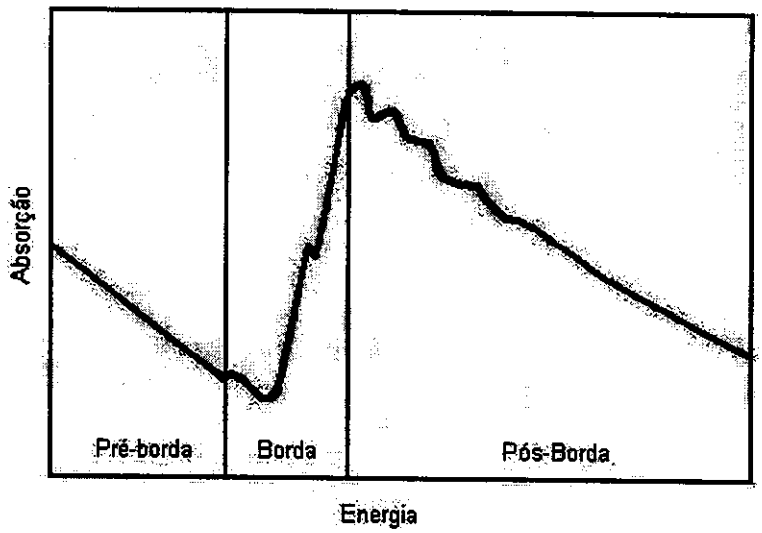


Figura 6: Espectro típico de absorção de raios X[54].

i. Região de pré-borda, formada principalmente pela excitação de elétrons que ocupam os níveis mais externos do átomo absorvedor;

ii. Região da borda, que ocorre quando um fóton incide com energia suficiente para excitar um elétron de um nível mais interno de um átomo (nível K ou L) para um estado eletrônico desocupado. Esta região de energia é chamada de XANES (X-ray Absorption Near-Edge Structure) e é tomada até cerca de 50 eV acima da borda de absorção;

iii. Região pós-borda, que representa a faixa de energia que vai de 50 a 1000 ev acima da borda de absorção e é chamada de EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure).

O espectro XANES compreende a região onde o comprimento de onda do fotoelétron é muito maior que a distância interatômica e, portanto, o seu caminho livre médio é longo o suficiente para que possam ocorrer espalhamentos múltiplos, antes que ele retorne ao átomo central (Figura 7). Deste modo, na espectroscopia XANES, tanto as transições dos elétrons ejetados a níveis eletrônicos desocupados quanto os efeitos de espalhamento múltiplo devem ser considerados. Comparando espectros de várias amostras que apresentem vizinhança conhecida em torno do átomo absorvedor, às vezes é possível interpretar os padrões observados e deduzir a ordem local ao redor do átomo analisado[55].

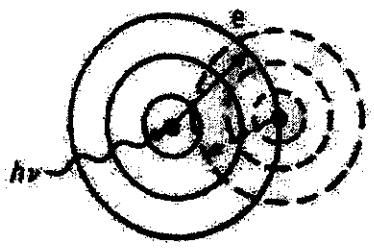


Figura 7: Esquema do processo de espalhamento múltiplo[54].

As medidas foram realizadas na linha de raios X moles do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Foram utilizadas amostras de DCP, DCPD e HA como padrões. Estes padrões foram sintetizados por métodos convencionais e avaliados cristalograficamente através de difração de raios X (vide anexos). Os padrões e as amostras na forma de pó foram depositados sobre fita adesiva de carbono. Foi utilizado um monocromador de cristal duplo de Si(111) para varrer a região da borda K do fósforo (2130-2200 eV), obtendo-se uma resolução em energia da ordem de 0,4 eV. Utilizou-se como modo de detecção o rendimento total de elétrons (TEY), no qual a corrente gerada por todos os elétrons que deixam a amostra é medida através da normalização da mesma pela corrente que atravessa um filme de alumínio localizado imediatamente antes da amostra. Os espectros apresentados neste trabalho correspondem à média de pelo menos quatro varreduras, as quais apresentaram apenas variações de intensidade. Para contornar este problema e para possibilitar a comparação quantitativa da intensidade dos padrões de absorção, o método de normalização proposto por Franke e Hormes[55] para o tratamento dos dados foi adotado. Desta forma, a região de pré-borda dos dados foi ajustada linearmente e a linha base determinada foi subtraída do espectro completo. O salto de absorção foi definido como sendo de uma unidade a uma energia de fóton de 2180 eV, região na qual a absorção pareceu não apresentar estruturas pronunciadas.

3.6. Potencial de interface

O comportamento dos fosfatos de cálcio em solução aquosa de fosfato também foi avaliado construindo mini-eletrodos com os materiais na forma de pó, de modo semelhante ao já reportado[48]. Para tanto, uma mistura de grafite e parafina (60% em massa de grafite) foi aquecida e colocada em ponteiras de micropipeta. Com a mistura levemente aquecida, foram colocados os fosfatos de cálcio na ponta das ponteiras, sob compactação. Sobre a mistura de grafite foi colocada uma gota de mercúrio líquido e imerso um fio de cobre. A Figura 8 apresenta um esquema da construção dos eletrodos.

Foram confeccionados três eletrodos para cada amostra, para eliminar eventuais desvios de construção. Os eletrodos foram mantidos em água destilada antes das medições para mantê-los hidratados, aumentando a velocidade da resposta de potencial da amostra sólida compactada na ponta do eletrodo.

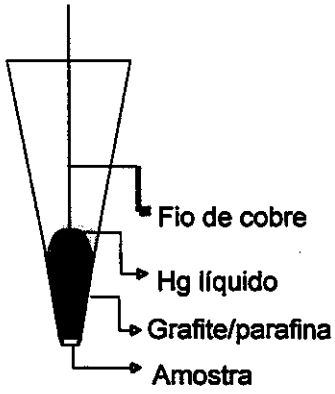


Figura 8: Esquema de construção dos eletrodos de fosfato de cálcio.

Preparou-se uma solução tampão de K_2HPO_4/KH_2PO_4 0,1 mol/L. Soluções de fosfato a 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} mol/L contendo 0,1 mol/L de KNO_3 (incluído para manter a força iônica constante no meio) foram preparadas por diluição a partir da solução 0,1 mol/L. O pH das soluções foi ajustado para 6 ou 7, com auxílio de soluções de HNO_3 ou KOH, ambas a 0,5 mol/L.

Os eletrodos tiveram seus potenciais medidos contra um eletrodo de calomelano saturado, em soluções aquosas de fosfato a diferentes concentrações. Para cada eletrodo, foram realizadas medições durante um intervalo de aproximadamente duas horas, verificando a estabilidade do potencial medido. Os gráficos de potencial de interface para os eletrodos de fosfato de cálcio apresentados neste trabalho representam valores de potencial médios, determinados para dois eletrodos de cada amostra, utilizando o potencial estabilizado médio de cada eletrodo.

3.7. Estudo in vivo

Estudo piloto foi realizado *in vivo* para avaliar a biocompatibilidade dos fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados e verificar se eles poderiam apresentar um comportamento osteoindutor.

As amostras ME-1 e RS, não submetidas à extração com acetona por sohxlet, foram implantadas em músculos de ratos Wistar, na forma de pó, umedecido com soro fisiológico e levemente compactado. As amostras foram implantadas no mesmo

animal, em diferentes músculos, utilizando um total de 4 animais como amostragem. Após 16 semanas, os animais foram sacrificados e as regiões de implante foram avaliadas histologicamente.

Esta etapa do trabalho foi realizada no Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp, com a colaboração do Professor Doutor José Ângelo Camilli.

4. Resultados e discussões

Por ocasião do início deste trabalho, levantamento bibliográfico revelou um crescente interesse dos profissionais da área de Materiais por um novo ramo da ciência moderna, a Nanotecnologia. Este ramo estuda o preparo, as propriedades e as aplicações de materiais, dispositivos e sistemas que sejam formados por pelo menos um componente que apresente uma ou mais dimensões em escala nanométrica, isto é, que tenha diâmetro ou largura, altura e/ou comprimento entre 1 e 100 nm. Os componentes básicos da nanotecnologia são os nanomateriais, os quais são formados por partículas de dimensões nanométricas[56].

O corpo humano representa o mais perfeito sistema de síntese de nanomateriais, a começar pela formação dos ossos e dentes. Estas estruturas são

formadas por colágeno e nanopartículas de hidroxiapatita que compõem um compósito, que apresenta elevada resistência à compressão, associada a uma certa elasticidade e baixa densidade, propriedades estas desejáveis para muitos materiais tecnológicos. Desta forma, o entendimento de como estas estruturas se formam e se mantêm pode nos levar à obtenção de materiais que apresentem propriedades mecânicas avantajadas[57].

Estes argumentos podem atrair o interesse de cientistas da área de materiais para as bioestruturas, no entanto, o desenvolvimento de nanomateriais pode favorecer também a área de Biomateriais, melhorando a resposta destes, quando implantados no organismo vivo.

Várias técnicas para a síntese de nanopartículas são descritas em literatura, entre elas temos os processos hidrotérmicos, sol-gel, aerosol, eletrodeposição, em fase gasosa, *ball milling*, microemulsão[7, 58-61]. Entre elas, a utilização de sistemas de microemulsão vem ganhando grande impulso por sua simplicidade de execução e a possibilidade de obtenção de partículas de tamanho uniforme[37,38,62-65]. Dentre os poucos trabalhos que se utilizam deste método para a síntese de fosfatos de cálcio[39-41], destaca-se o sistema proposto por Qi e colaboradores, os quais se utilizaram de em um procedimento simples e rápido, empregando reagentes de baixo custo, podendo-se proceder à síntese em grande escala e resultando em materiais muito finos. Pelo exposto acima, o trabalho de Qi e colaboradores[39] foi utilizado como base para a síntese de fosfatos de cálcio nanométricos e de diferentes morfologias.

4.1. Sistemas organizados

Em trabalho publicado em 1997, Qi e colaboradores descreveram a síntese de hidroxiapatita em microemulsão, utilizando o sistema Triton X-100/hexanol/cicloexano/solução aquosa de cálcio, sobre o qual foi adicionada uma solução aquosa de fosfato em meio básico, o que tornava a mistura final translúcida[39]. Em seu trabalho, os autores atribuíram a translucidez do sistema à formação de partículas nanométricas de hidroxiapatita.

O presente trabalho iniciou com a tentativa de se obter hidroxiapatita em região de microemulsão, utilizando um sistema semelhante ao reportado por Qi e colaboradores, substituindo-se apenas o surfactante Triton X-100 pelo Renex-100®, cujas moléculas se assemelham. Uma mistura com a mesma composição do sistema reportado pelos autores foi preparada, observando-se que a microemulsão contendo solução de cálcio era transparente e que a adição de solução básica de fosfato também tornava o sistema translúcido.

Sistemas de microemulsão apresentam como característica determinante a transparência da mistura, ditada pelas dimensões nanométricas de seus domínios e pela estabilidade termodinâmica. As misturas utilizadas tanto no trabalho de Qi e colaboradores quanto no presente trabalho apresentaram-se translúcidas, o que poderia indicar não apenas formação de partículas de fosfato de cálcio nanométricas, como também a desestabilização do sistema de microemulsão.

Para verificar se a microemulsão preparada neste trabalho mantinha-se estável, mesmo após a adição da solução de fosfato básica realizou-se, como teste, um procedimento contrário ao reportado por Qi e colaboradores, preparando uma microemulsão contendo solução de fosfato em meio básico, para depois adicionar a solução de cálcio. As quantidades utilizadas de cada componente foram iguais àquelas da mistura original. Observou-se que a adição da solução básica de fosfato à mistura contendo apenas Renex-100®, hexanol e cicloexano, sem a presença de cálcio, tornava a microemulsão translúcida, indicando a formação de domínios macroscópicos que desestabilizavam o sistema. Esta desestabilização pode ser resultado da interação competitiva dos íons fosfato com os oxigênios da cadeia hidrofílica do Renex-100®, competição esta que não ocorre na presença da solução de cálcio, pois apenas as moléculas de água devem interagir com o surfactante, através de pontes de hidrogênio.

O resultado deste teste pode indicar que os autores do trabalho citado não obtiveram hidroxiapatita em região de microemulsão. No entanto, deve-se ressaltar ainda, que a utilização de surfactante diferente pode levar à obtenção de sistema mais ou menos estável com relação à solubilidade da fase aquosa, ou seja, a utilização de Renex-100® no lugar de Triton X-100 pode fazer com que o sistema formado não permita que a mesma quantidade de solução aquosa seja solubilizada, causando a desestabilização da microemulsão.

Além da utilização de um surfactante de cadeia hidrofílica diferente, deve-se considerar também a variação do tamanho da cadeia hidrofóbica. Os compostos

etoxilados apresentam uma distribuição de tamanhos que, em média, aproximam-se do valor indicado pelo fabricante. Este valor também pode variar de lote para lote. Por isso, utilizou-se surfactante de um único lote para preparar os sistemas de síntese sendo, assim, possível a comparação dos resultados. A determinação do número de óxidos de eteno presentes no lote de Renex-100® utilizado neste trabalho foi conduzida por RMN ^1H e o espectro resultante, assim como a integração dos picos, é mostrada na Figura 9.

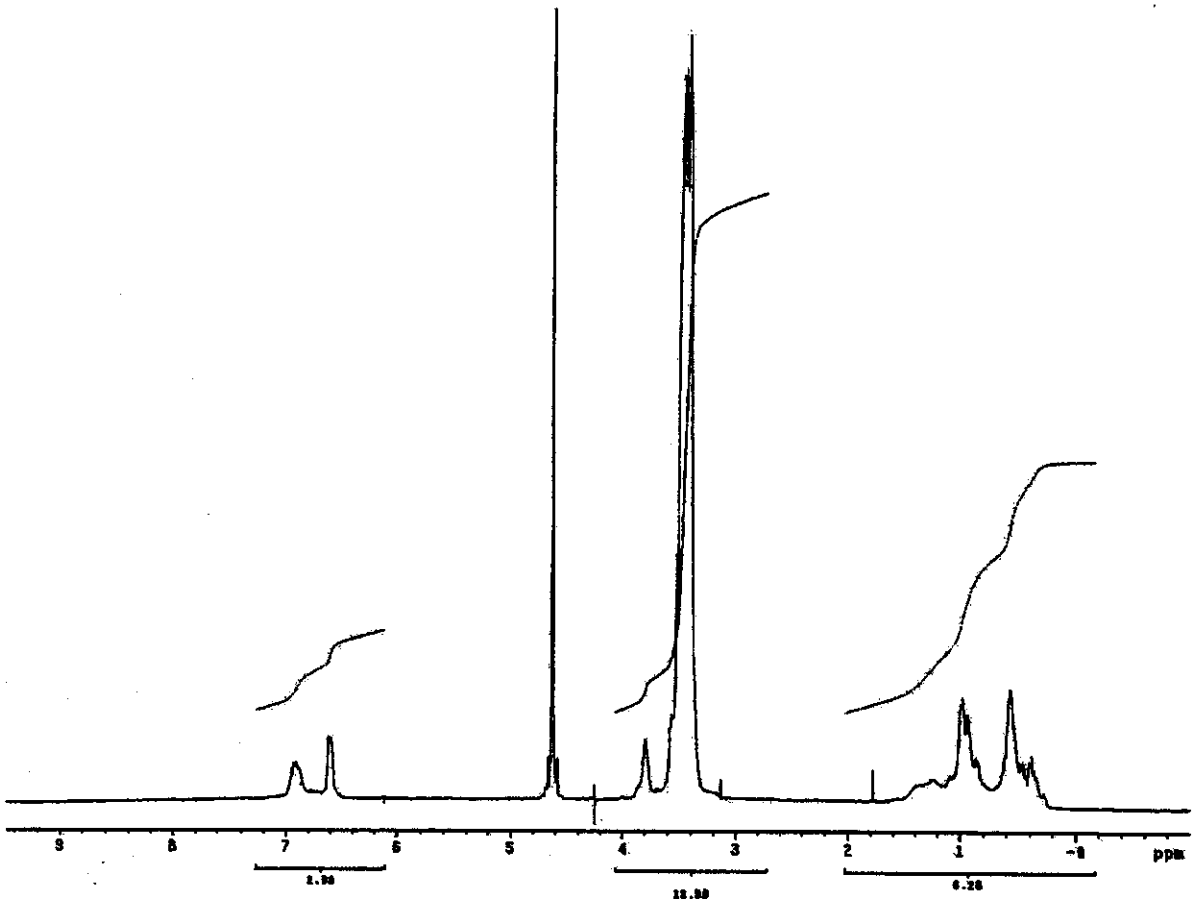


Figura 9: RMN ^1H do Renex-100®, lote 990213-1M1, solvente DOH.

A Tabela 2 apresenta a atribuição dos picos do espectro da Figura 9 e suas integrações.

O tamanho absoluto das cadeias hidrofílica e hidrofóbica pode ser determinado pela razão do sinal dos respectivos picos pelo sinal dos quatro prótons do anel aromático[66]. Desta forma, determinamos que o Renex-100® utilizado apresenta uma cadeia alquila contendo 8 metilenos e cadeia hidrofóbica formada por 8 óxidos de eteno. Com isto, trabalhos que possam ser realizados tomando o presente como referência, podem apresentar algumas discrepâncias nos resultados, caso o surfactante utilizado apresente tamanho de cadeias diferentes.

Tabela 2: Relação dos picos observados no espectro de RMN ^1H do Renex-100®, utilizado nos sistemas de síntese.

δ / ppm	Atribuição dos prótons	Integração
0,3 a 1,6	Grupos metilenos da cadeia hidrofílica	17
3,3 a 3,6	Óxidos de eteno da cadeia hidrofóbica	32
3,6 a 3.9	H_2O	2
4,62	DOH e hidroxila da cadeia hidrofóbica	—
6,5 e 7,0	Anel aromático	4

Além da utilização de surfactante diferente, outro fator que pode modificar o equilíbrio de um sistema é a utilização de diferentes sais na fase aquosa (soluções denominadas *brine*). Além disso, a quantidade de solução aquosa passível de

solubilização por um determinado sistema também varia de acordo com o *brine* utilizado[67,68].

Na tentativa de obter sistemas estáveis e transparentes que pudessem apresentar o maior rendimento possível de fosfato de cálcio nanoparticulado, alguns *brines* foram testados. A utilização de uma solução aquosa única contendo cálcio e fosfato em meio ácido (meio desfavorável à nucleação de fosfato de cálcio, visto que o valor de pK de nenhum composto é alcançado) e de uma solução de amônia (para propiciar um meio básico, no qual a formação de fosfato de cálcio é favorecida) possibilitaram a solubilização de grande quantidade destas soluções, mantendo-se a transparência do sistema. Por isso, com exceção de uma amostra, chamada de ME-2, todas as outras amostras foram obtidas utilizando sistemas contendo soluções ácidas de cálcio e fosfato. As concentrações das soluções aquosas utilizadas foram determinadas a partir da reação de obtenção de hidroxiapatita, de acordo com a equação química abaixo:

$$10\ Ca(NO_3)_2 + 6\ H_3PO_4 + 2\ NH_4OH \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 20\ NO_3^- + 18\ H^+ + 2\ NH_4^+$$

Além da região de microemulsão, comumente empregada para a obtenção de partículas de dimensões nanométricas, outras regiões do sistema Renex-100®/ciclohexano/*brine* foram utilizadas para sintetizar os fosfatos de cálcio. Os sistemas de síntese preparados corresponderam às regiões de cristal líquido, de emulsão normal, de emulsão reversa e a uma região rica em surfactante.

4.1.1. Síntese em região de microemulsão

A composição dos sistemas de síntese obtidos em microemulsão foi diferente da composição utilizada por Qi e colaboradores, com o intuito de obter um maior rendimento na síntese. Portanto, trabalhou-se com sistemas próximos ao limite da região de microemulsão, isto é, utilizou-se a maior quantidade de *brine* que poderia ser solubilizada pelo sistema, antes deste tornar-se translúcido.

A amostra ME-1 foi obtida a partir de dois sistemas, como exemplificado no Esquema a, da Figura 2, um contendo a solução de cálcio e fosfato em meio ácido (S1) e o outro contendo a solução de amônia (S2), ambos próximos ao limite da região de microemulsão. A amostra ME-2 foi preparada com a composição média dos sistemas S1 e S2 da síntese da amostra ME-1, mas empregando o mesmo procedimento proposto por Qi e colaboradores e seguindo o Esquema b da Figura 2. Já a amostra ME-3 foi obtida a partir de dois sistemas, próximos ao limite da região de microemulsão, como a amostra ME-1, no entanto sem a utilização de co-surfactante.

Para determinar o tamanho médio dos microrreatores da microemulsão, uma mistura com a composição do sistema S1 da amostra ME-1 foi preparada e analisada por espalhamento de luz dinâmico (ELD). A Figura 10 apresenta a curva de distribuição de tamanho de partículas deste sistema, no qual podemos observar a presença de uma população monodispersa com média de pico em 5,7 nm de diâmetro e apresentando um diâmetro médio ($z_{average}$) de 7,7 nm, o que indica que a maior parte dos microdomínios aquosos apresenta dimensão abaixo de 10 nm. O

tratamento matemático utilizado na determinação do tamanho de partículas através de medidas de ELD considera partículas com formato equivalente ao esférico.

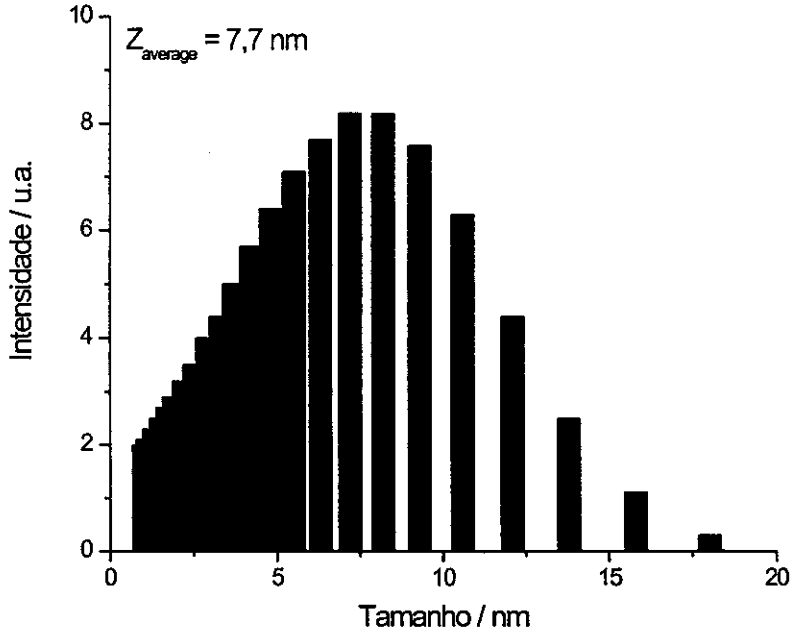


Figura 10: Curva de distribuição de tamanho de partículas do sistema S1 da síntese de ME-1, avaliado por espalhamento de luz dinâmico.

Os sistemas de síntese das amostras ME-1, ME-2 e ME-3 apresentaram-se visualmente semelhantes entre si. Antes da mistura dos precursores, os sistemas permaneceram transparentes e, após a mistura dos precursores, os sistemas apresentaram-se translúcidos devido à formação de partículas de fosfato de cálcio submicrométricas. A Figura 11 mostra a consistência gelatinosa do sistema de síntese da amostra ME-1, resfriado a 2 °C, sendo idêntica à dos sistemas de síntese de ME-2 e ME-3.

O resfriamento dos sistemas de microemulsão a 2 °C foi praticado no intuito de elevar a viscosidade das misturas e impedir o crescimento dos microrreatores, pela colisão e coalescência destes ambientes. Nesta temperatura, o cicloexano da fase contínua congela (ponto de fusão: 6,5 °C), o Renex-100® e o hexanol tornam-se mais viscosos e as soluções aquosas da fase dispersa, mantêm-se líquidas. Desta forma, o fosfato de cálcio encontra um ambiente propício para sua formação, sendo que o crescimento de suas partículas será limitado pelo tamanho dos microrreatores.

Figura 11: Sistema de síntese da amostra ME-1, resfriado a 2 °C.

O processo de centrifugação destas amostras foi dificultado pelo tamanho das partículas, tendo-se formado géis durante a centrifugação. Para separar os sólidos, fez-se necessário diluir os géis com álcool etílico, levando à agregação das partículas neles presentes. Cabe lembrar que a centrifugação de compostos como os fosfatos de cálcio, especialmente os que apresentam partículas de tamanho nanométrico, só é possível devido à tendência destes materiais em se aglomerar. Portanto, o sólido na forma de pó fino resultante da centrifugação representa

aglomerados de partículas e parte das técnicas de caracterização apresentadas aqui representarão as propriedades destes aglomerados e não das partículas isoladas.

4.1.2. *Síntese em região rica em surfactante/co-surfactante*

Tendo realizado a síntese em microemulsão, o passo seguinte foi tentar a síntese em região de cristal líquido lamelar. Como não havia na literatura uma indicação a respeito da composição de cada reagente utilizado neste trabalho, que nos forneceria uma fase de cristal líquido, tentou-se uma composição contendo 50 % de água em termos de fração molar. No entanto, tentativa de caracterizar o sistema preparado por microscopia óptica com luz polarizada, revelou que a composição utilizada não representava a fase desejada, já que não havia formação de textura birrefringente.

A amostra RS foi obtida nesta região, a qual foi denominada de região rica em surfactante/co-surfactante. O sistema S1 apresentou-se translúcido, enquanto S2 apresentou-se transparente. A mistura de ambos resultou em um sistema com aspecto translúcido, que também foi estocado a 2 °C por 10 dias e apresentou a mesma consistência dos sistemas de síntese em microemulsão (Figura 11). A centrifugação do fosfato de cálcio obtido neste sistema também formou um gel, indicando partículas muito pequenas.

A fase correspondente ao sistema de síntese do RS não foi identificada, no entanto o sistema não representava um cristal líquido, como caracterizado anteriormente e, devido ao aspecto transparente da mistura S2 desta síntese,

podemos supor que o sistema apresente uma fase próxima à região de microemulsão. No entanto, tentativa de se medir o tamanho médio dos domínios aquosos deste sistema por ELD, como foi feito com o sistema S1 da amostra ME-1, falhou. Durante a análise de ELD, o instrumento apresentou grandes oscilações de intensidade de luz, como se os domínios tivessem dimensões muito diferentes. Este fato pode ser um indicativo de um arranjo bicontínuo, que apresentaria uma dimensão muito superior à outra e impossibilitaria a determinação do tamanho dos domínios aquosos através do movimento Browniano utilizado na técnica de ELD.

4.1.3. Síntese em região de cristal líquido

De acordo com o trabalho de Heusch[69], uma composição ótima para se obter cristais líquidos lamelares, a partir de um sistema binário formado por água e surfactante contendo cadeia de óxidos de eteno, considera os oxigênios da cadeia hidrofílica solvatados por quatro moléculas de água cada um, formando o que o autor chamou de tetrahidratados. No caso do Renex-100®, ainda considerando a fórmula molecular teórica contendo dez grupos de óxidos de eteno, teríamos 10 átomos de oxigênio formando a cadeia hidrofóbica da molécula e, portanto, 40 moléculas de água solvatando-os. Procedendo-se aos cálculos, determina-se que aproximadamente 50 % em massa de surfactante seria necessária para formar o cristal líquido. A composição do sistema escolhida com base nestas informações foi de 45,5 % (m/m) de Renex-100®, 9 % (m/m) de cicloexano e 45,5 % (m/m) de *brine*.

As amostras CL-1 e CL-2 foram obtidas em sistemas com a composição

acima. A observação do sistema S1 por microscopia óptica com luz polarizada revelou uma textura birrefringente, apresentada na Figura 12. A formação de textura é uma característica dos cristais líquidos, que apresentam as moléculas organizadas anisotropicamente. Em alguns casos, é possível identificar o tipo de estrutura, através da análise da textura do sistema birrefringente, visto que esta propriedade é inerente à fase formada. Neste trabalho, entretanto, o tipo de cristal líquido utilizado não pôde ser identificado pela textura complexa observada.

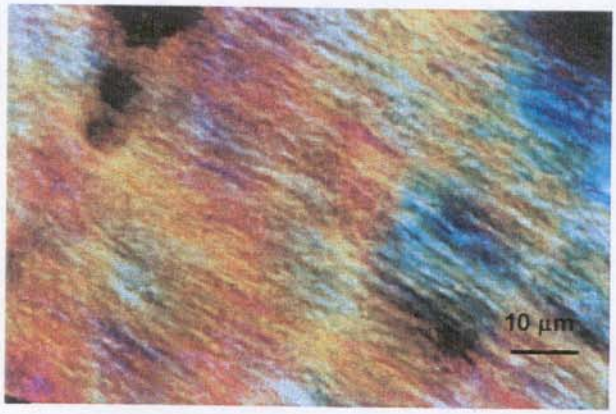


Figura 12: Micrografia óptica com luz polarizada da textura do sistema de cristal líquido, sem utilização de lamínula sobre a amostra.

Os sistemas S1 e S2 apresentavam consistência pastosa, transparência e bolhas de ar presas em seu interior. Ao submeter os sistemas S1 ao vapor de amônia ou à mistura de S2 com auxílio de uma espátula, os sistemas lentamente adquiriram tonalidade esbranquiçada, devido à formação de fosfato de cálcio. Como estes sistemas já apresentavam elevada viscosidade, como pode ser observado na Figura 13, que reduz o movimento Browniano da fase dispersa, eles não foram

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

submetidos ao resfriamento como os outros sistemas. Para possibilitar a centrifugação do sólido, adicionou-se álcool etílico para diminuir a viscosidade deste sistema pastoso. Assim, o fosfato de cálcio foi facilmente centrifugado, sem a formação de gel, indicando a separação de aglomerados de dimensão maior que das amostras anteriores.

Figura 13: Sistema de síntese da amostra CL-1, a temperatura ambiente.

4.1.4. Síntese em região de emulsão

As amostras EA e EO foram obtidas em regiões típicas de emulsão água-em-óleo (A/O) e óleo-em-água (O/A), respectivamente. O sistema S1 da emulsão O/A apresentou-se inicialmente translúcida, adquirindo aspecto leitoso em poucos minutos. Observação desta mistura em microscópio óptico revelou domínios esféricos (representando as gotículas de óleo), cujas dimensões foram ditadas pelo número de colisões e coalescências de gotículas menores.

Observa-se na Figura 14 a tendência destas gotículas em se aderirem umas às outras, causando o rompimento da parede e diminuindo a tensão interfacial destes domínios.

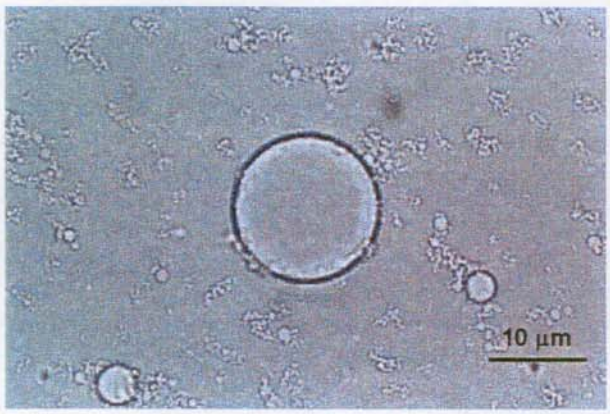


Figura 14: Micrografia óptica da emulsão O/A.

A emulsão A/O apresentou aspecto translúcido com fase segregada (formaram-se grumos translúcidos). Devido à segregação de fases, esta mistura não foi observada em microscópio óptico.

Os sistemas A/O e O/A também foram estocados a baixa temperatura. A Figura 15 mostra o sistema de síntese da amostra EA resfriado a 2 °C, o qual se apresenta completamente congelado, devido à grande quantidade de cicloexano e a Figura 16 apresenta o sistema de síntese da amostra EO resfriado a 2 °C, ainda líquido, devido à maior quantidade de solução aquosa utilizada. Na etapa de centrifugação, ambos os materiais foram facilmente separados, indicando a formação de grandes aglomerados. No caso da amostra EA, a fase segregada foi diluída com álcool etílico e centrifugada.

Figura 15: Sistema de síntese da amostra EA, resfriada a 2 °C.

Figura 16: Sistema de síntese da amostra EO, resfriada a 2 °C.

4.2. Caracterização dos materiais

4.2.1. *Caracterização química*

Os materiais obtidos na forma de sólidos aglomerados foram lavados inicialmente com álcool etílico e depois extraídos com acetona (ponto de ebulição: 56 °C) em extrator sohxlet. Este procedimento foi adotado para eliminar os compostos orgânicos remanescentes dos sistemas de síntese empregados, como o Renex-100®, o hexanol e o cicloexano, levando-se em consideração que eles apresentam solubilidade em ambos os solventes[50,70].

Após a extração dos compostos orgânicos, os materiais foram submetidos à análise elementar (CHN) para verificar a quantidade de carbono que ainda havia restado, aderido aos materiais e a razão Ca/P foi determinada a partir dos resultados de ICP/AES. Os dados obtidos nestas análises são apresentados na Tabela 3.

Os resultados da análise elementar revelaram que, apesar da extração ter sido eficiente, as amostras apresentavam entre 0,2 e 3,7% em massa de carbono e 0,2 e 1,3% em massa de nitrogênio (como resíduo do $Ca(NO_3)_2$ usado na solução aquosa de cálcio).

Tabela 3: Resultados das análises químicas por CHN e por ICP/AES.

Amostra	% C (massa)	% N (massa)	Ca/P
ME-1	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,0	1,54 ± 0,03
ME-2	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,54 ± 0,01
ME-3	3,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,77 ± 0,03
RS	3,3 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,38 ± 0,01
CL-1	0,5 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,49 ± 0,04
CL-2	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,1	1,23 ± 0,01
EA	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,38 ± 0,01
EO	0,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,52 ± 0,02

Observa-se que os materiais que apresentaram maior teor de carbono são as amostras ME-3 e RS. Ambas foram sintetizadas em região próxima ao limite de microemulsão, empregando mais de 30 % em massa de surfactante (e mais de 75 % em massa de compostos orgânicos) para compor o sistema. Podemos inferir, portanto, que as partículas que compõem estas amostras apresentam dimensões pequenas, ditadas pelo tamanho dos microdomínios do sistema de síntese e que podem apresentar uma área superficial adequada para a adsorção de macromoléculas. Desta forma, o teor de carbono determinado por CHN está

diretamente associado à quantidade de Renex-100® que permanece adsorvido sobre a superfície dos sólidos, quando da presença de uma grande quantidade de material orgânico utilizado no sistema de síntese.

No caso das amostras ME-1 e ME-2, o teor de carbono na forma de resíduo de surfactante é menor devido à menor quantidade de Renex-100® utilizada no sistema de síntese (menos de 20 % em massa), apesar da grande proporção de compostos orgânicos utilizado no sistema (90 % em massa, no total). Por outro lado, as amostras CL-1 e CL-2, sintetizadas em sistemas contendo 45,5 % em massa de surfactante, apresentaram baixo teor de carbono devido à menor adsorção de Renex-100® sobre suas superfícies, já que estes materiais foram sintetizados em região de cristal líquido, devendo apresentar partículas de tamanho elevado, se comparados com os materiais obtidos por microemulsão. Além disso, o sistema de síntese utilizava quase 50 % em massa de *brine*, o que facilitou a lavagem do material.

Já a amostra EA, sintetizada em sistema contendo 90 % em massa de compostos orgânicos, apresentou aproximadamente o mesmo teor de carbono identificado nas amostras ME-1 e ME-2, as quais também apresentavam 90 % em massa de compostos orgânicos em seus sistemas de síntese. A amostra EO, sintetizada em sistema rico em *brine* (80 % em massa), apresentou o menor teor de carbono entre todas as amostras sintetizadas.

A presença de nitrogênio pode ser justificada pela ausência de lavagem dos materiais com água, solvente no qual os nitratos utilizados como reagentes nas sínteses são totalmente solubilizados.

A razão Ca/P determinada para as amostras variou de 1,23 a 1,77. Dentro desta faixa de valores, podemos ter as seguintes fases: HA (Ca/P = 1,67), TCP (Ca/P = 1,50), ou misturas de fases contendo um dos compostos anteriores e $CaHPO_4$ (Ca/P = 1,00), $CaHPO_4.2H_2O$ (Ca/P = 1,00) ou $CaCO_3$ (que eleva o valor da razão Ca/P) ou, ainda, HA contendo vacâncias de cálcio ou substituições de grupos fosfato por carbonato. A determinação das fases presentes em cada amostra deve ser, portanto, conduzida por outros métodos.

4.2.2. *Caracterização física*

4.2.2.1. FTIR e DRX

A análise por espectroscopia na região do infravermelho possibilita a caracterização dos grupos funcionais presentes nos materiais. Normalmente, amostras de material inorgânico são preparadas na forma de pastilhas de KBr para a análise. No entanto, corre-se o risco de que haja interação entre o KBr e a amostra durante o processo de prensagem. O método de refletância difusa evita este problema, já que a amostra não é submetida à alta pressão, fato este que também poderia induzir a indesejável cristalização dos materiais. A Figura 17 mostra os espectros na região do infravermelho médio obtidos pelo método de refletância difusa, para cada uma das amostras sintetizadas.

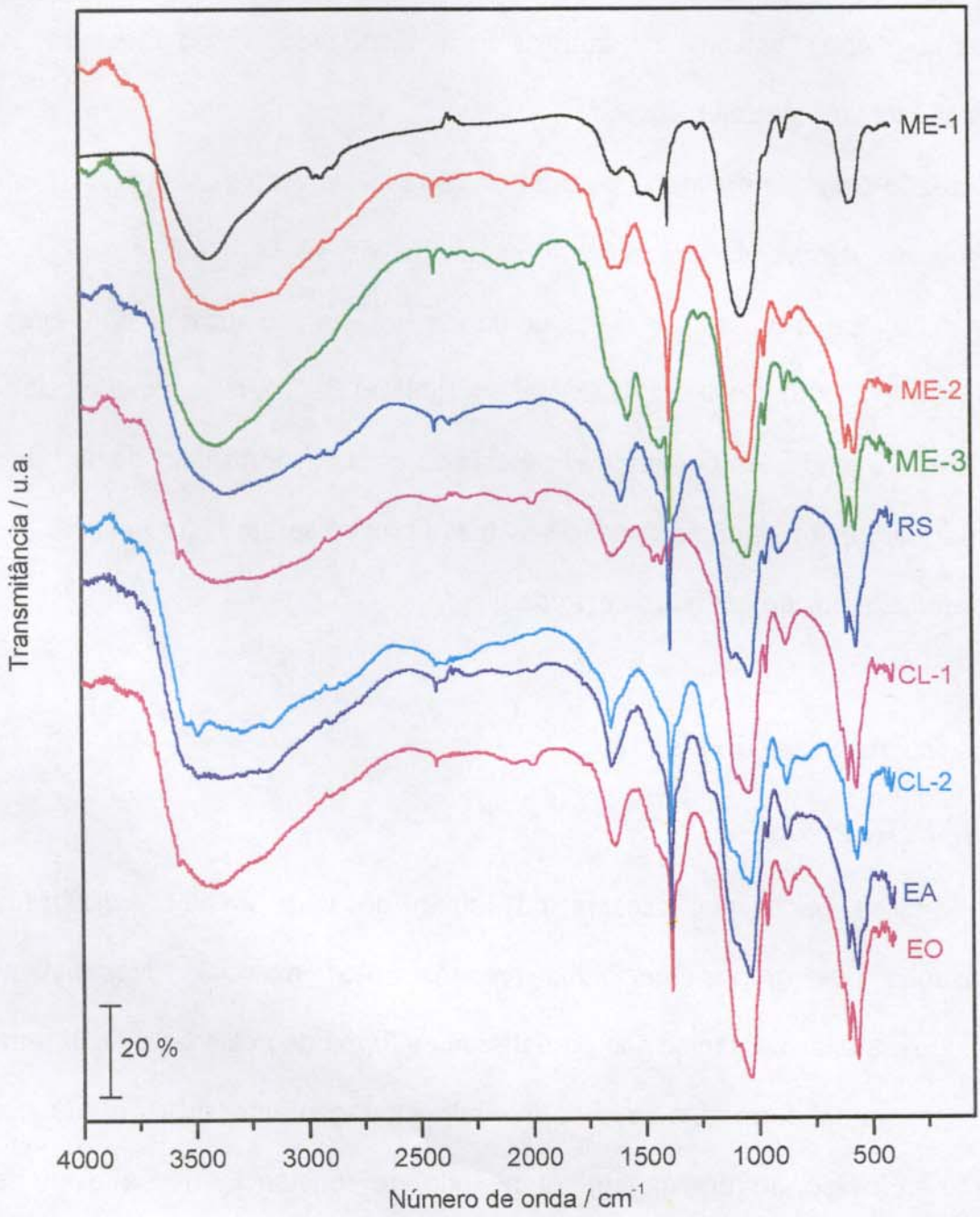


Figura 17: Espectros de refletância difusa na região do infravermelho médio dos fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados.

Os espectros da Figura 17 apresentam perfis espectroscópicos similares, com bandas características de grupos cujas atribuições dos modos vibracionais estão relacionadas na Tabela 4.

Tabela 4: Relação das bandas observadas nos espectros de FTIR da Figura 17 e suas atribuições[71-73].

Banda / cm^{-1}	Atribuição
3580	ν_s estiramento OH de hidroxila
3400	ν_s estiramento OH de H_2O
1645	deformação H-O-H de H_2O
1435	ν_1 estiramento simétrico de CO_3^{2-}
1384	estiramento NO_3^-
1128	ν_6 estiramento PO_3^- em HPO_4^{2-}
1100, 1093, 1047	ν_3 estiramento antissimétrico de PO_4^{3-} ou ν_6 estiramento PO_3 em HPO_4^{2-}
965	ν_1 estiramento simétrico PO_4^{3-}
918	ν_3 estiramento P-OH em HPO_4^{2-}
884	ν_2 estiramento antissimétrico de CO_3^{2-}
650	vibrações OH de hidroxila
616, 581	ν_4 deformação O-P-O em PO_4^{3-} ou ν_4 deformação O-P-O em HPO_4^{2-}
535	ν_7 estiramento P-OH em HPO_4^{2-}

Podemos observar nestes espectros a presença de cinco bandas não atribuídas aos modos vibracionais dos fosfatos, mas que aparecem em todos os espectros: em torno de 3400, 1645, 1435, 1384 e 884 cm^{-1}. Estas bandas estão

relacionadas com a H_2O adsorvida na superfície dos materiais, com os resíduos do NO_3^- utilizado como reagente de partida e com CO_3^{2-}, incorporado na rede cristalina dos materiais durante a síntese, através do CO_2 atmosférico. Estes grupos não representam impurezas para os fosfatos de cálcio e, em especial, o CO_3^{2-} é um grupo comumente encontrado nos fosfatos de cálcio da fase mineral óssea, sendo um dos responsáveis pela diferença estrutural com relação à hidroxiapatita mineral.

O CO_3^{2-} pode ser incorporado na rede cristalina da HA em substituição a um grupo OH^- ou a um PO_4^{3-} (ou HPO_4^{2-}), formando as chamadas hidroxiapatitas carbonatadas do tipo A (CHA-A) ou B (CHA-B), respectivamente[74,75]. As CHA-B apresentam valores de razão Ca/P maiores que da HA estequiométrica, podendo-se supor que a amostra ME-3 apresenta este tipo de HA, já que seu valor de Ca/P está acima do esperado e o teor de carbono avaliado por CHN é elevado. As bandas largas na região de 1250 a 1750 cm^{-1} estão relacionadas com os compostos orgânicos provenientes do sistema de síntese e que não foram totalmente eliminados, como mostraram os resultados de CHN, listados na Tabela 3.

Todos os espectros apresentam banda intensa na região de 1090 cm^{-1} e outra menos intensa na região de 600 cm^{-1}, relacionadas aos modos de vibração de PO_4^{3-} ou de HPO_4^{2-} (Figura 17). A amostra ME-1 apresenta bandas largas e pouco resolvidas nestas regiões, ao contrário das outras amostras que apresentam bandas resolvidas e desdobradas. Este fator é um indicativo de que amostra ME-1 é pouco cristalina a curta e a média distâncias, fato que pode ser confirmado pelo seu difratograma de raios X, mostrado na Figura 18, no qual não é possível identificar

nenhuma fase cristalina característica. A ausência de bandas vibracionais na região do infravermelho que possam ser relacionadas ao grupamento HPO_4^{2-} nos fazem crer que esta amostra seja constituída por HA, já que o meio reacional básico foi favorável a sua formação, podendo ainda apresentar vacâncias de cálcio que justificam o menor valor encontrado para a razão Ca/P = 1,54, se comparado ao valor da HA estequiométrica (Ca/P = 1,67). Além disso, esta amostra pode apresentar substituições de CO_3^{2-} nos sítios de OH^-, impedindo a observação de bandas características deste grupo.

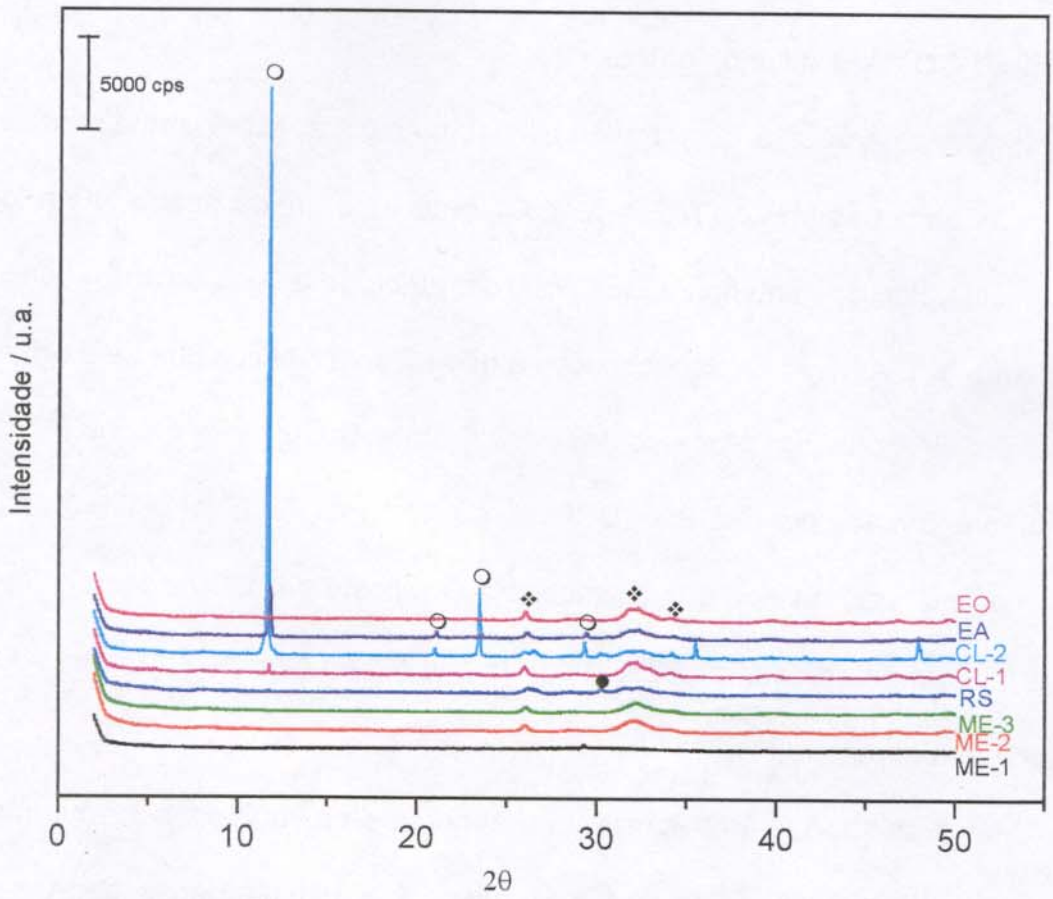


Figura 18: Difratogramas de raios X dos fosfatos de cálcio.

(❖) HA; (●) DCP; (○) DCPD.

As amostras ME-2 e ME-3 apresentam espectros semelhantes na região do infravermelho, com exceção da região atribuída aos compostos orgânicos. As amostras apresentam-se mais cristalinas frente a esta técnica, com o desdobramento das bandas de PO_4^{3-}, não apresentando bandas de HPO_4^{2-} ou de OH^- (Figura 17). Os difratogramas destes materiais mostram que ambos são compostos por HA pouco cristalina, visto que os picos são largos e mal resolvidos (Figura 18). Como o valor da razão Ca/P destes materiais está próximo do estequiométrico e não ocorre banda na região do infravermelho que seja característica de OH^-, podemos supor que estas amostras sejam formadas por CHA-A, com grupos CO_3^{2-} substituindo grupos OH^-.

O espectro na região do infravermelho da amostra RS é semelhante aos espectros das amostras ME-2 e ME-3, tendo apenas uma banda pequena em torno de 920 cm^{-1} diferindo das anteriores, que pode ser atribuída ao estiramento P-OH em HPO_4^{2-} (Figura 17). Através da espectroscopia não foi possível concluir se a amostra é formada por HA contendo grupamentos HPO_4^{2-} em substituição a grupos PO_4^{3-} ou se a amostra é formada por $CaHPO_4$ (DCP) ou por $CaHPO_4.2H_2O$ (DCPD). A análise por DRX, por sua vez, revelou que a amostra é composta por DCP pouco cristalino (Figura 18), podendo apresentar fases amorfas que façam com que sua razão Ca/P seja maior que a esperada.

As amostras CL-1 e EO apresentam espectros na região do infravermelho semelhantes entre si, nos quais podemos observar duas pequenas bandas nas regiões de 3580 e 650 cm^{-1}, que são atribuídas às vibrações do grupo OH^- e indicam

que estas amostras são constituídas de HA (Figuras 17). A confirmação vem da análise por DRX (Figura 18), cujos difratogramas apresentam picos largos, mas melhor resolvidos com relação aos difratogramas das amostras ME-2 e ME-3.

As amostras CL-2 e EA também apresentam espectros similares entre si, nos quais podemos observar uma pequena banda ou um ombro na região de 535 cm^{-1}, atribuída à vibração de deformação O-P-O em HPO_4^{2-} (Figura 17). O difratograma destas amostras revela a presença de um pico muito intenso, característico de DCPD, para as duas amostras, mas para a amostra EA também aparecem picos pequenos característicos de HA (Figura 18). No caso da amostra CL-2, a permeação do vapor de amônia através do sistema pastoso durante a síntese deve ter ocorrido de forma muito lenta, não tendo elevado o valor do pH do meio reacional o suficiente para que o pK de formação de HA fosse alcançado, mas favorecendo a formação de DCPD, em pH próximo ao neutro. No caso da amostra EA, o sistema continha grande quantidade de cicloexano, o que solidificou a mistura quando esta foi resfriada a 2 °C. Isto impossibilitou a coalescência dos domínios aquosos contendo amônia e os domínios contendo cálcio e fosfato. Desta forma, acredita-se que a formação do fosfato de cálcio tenha ocorrido pela permeação do vapor de amônia, como no caso da amostra CL-2, favorecendo a formação de DCPD. A presença de outra fase na amostra EA pode estar relacionada à fase segregada observada durante a preparação do sistema.

4.2.2.2. XANES de P

As amostras de fosfato de cálcio, sintetizadas em sistemas organizados, foram submetidas à espectroscopia XANES, por algumas delas apresentarem baixa cristalinidade frente às técnicas de DRX e FTIR. Os espectros referentes às amostras sintetizadas em sistemas organizados e das amostras utilizadas como padrões de fosfato de cálcio são apresentados na Figura 19.

As amostras DCP, DCPD e HA foram sintetizadas pelo método da precipitação direta e elas foram utilizadas como padrões para a análise por apresentarem cristalinidade elevada frente à técnica de DRX. A utilização de padrões de fosfato de cálcio nesta análise deve-se ao fato de que não existem, em literatura, padrões espectroscópicos estabelecidos.

Pode-se observar na Figura 19 que os espectros de XANES dos padrões, assim como das amostras, não apresentam nenhuma estrutura antes da borda de absorção; o máximo da borda ocorre na região de 2150, existe um ombro pós-borda entre 2152 e 2156 e estruturas de ressonância fracas acima de 2156 eV.

A borda de absorção é atribuída à transição do elétron 1s do P para um estado eletrônico de valência, formado pelo overlap dos orbitais sp^3 do P e 2p do O (t_2*). A intensidade, a posição em energia e a forma da borda de absorção estão relacionadas com o número de vizinhos e com o tamanho e simetria do poliedro de coordenação em torno do átomo absorvedor. Já as estruturas pós-borda representam ressonâncias que se originam na interferência construtiva da função de onda dos fotoelétrons que deixam o átomo absorvedor com as funções de onda

geradas pela dispersão múltipla com os átomos vizinhos. A posição em energia destas estruturas é muito sensível às distâncias internucleares[55].

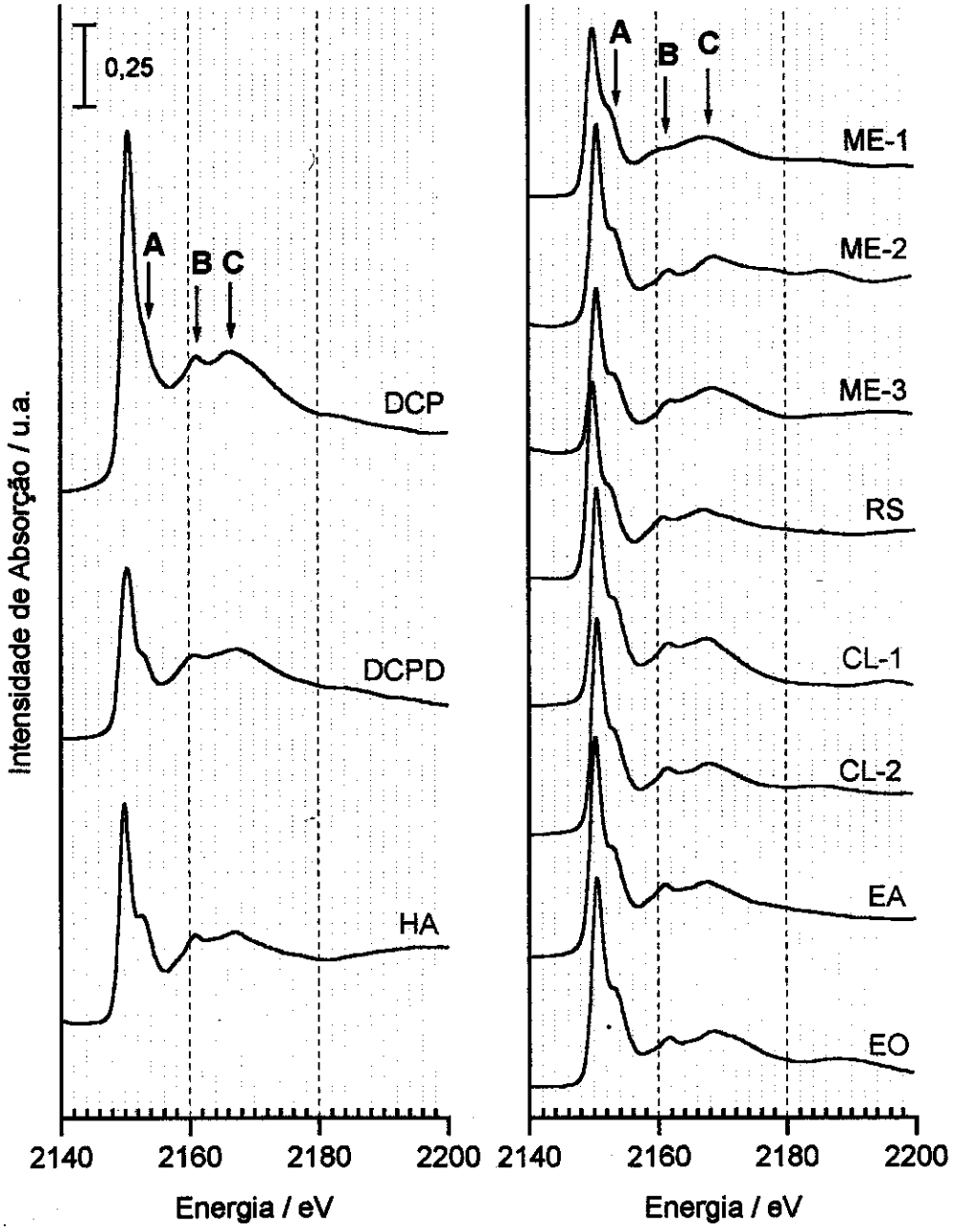


Figura 19: Espectros de XANES na borda K do P para os padrões e para as amostras de fosfato de cálcio sintetizadas em sistemas organizados.

Nos espectros dos padrões e amostras sintetizadas neste trabalho, pode-se observar que as estruturas relatadas acima apresentam um deslocamento em energia de seus máximos e também apresentam formas diferentes, visto se tratarem de fosfatos de cálcio que apresentam diferentes ambientes químicos em torno do átomo de fósforo. Na Tabela 5 são listados os valores de energia nos quais ocorrem os máximos das estruturas presentes nos espectros de XANES na borda K do P, apresentados na Figura 19.

Tabela 5: Posições em energia, E, dos máximos das estruturas de absorção de raios X nos espectros XANES na borda K do P. Os termos entre parênteses referem-se às estruturas indicadas nos espectros da Figura 19.

Material	E(Borda) / eV	E(A) / eV	E(B) / eV	E(C) / eV
DCP	2150,6	2153,1	2161,2	2166,4
DCPD	2150,4	2152,3	2160,9	2167,4
HA	2150,0	2152,6	2161,0	2167,1
ME-1	2150,0	2152,3	---	2167,4
ME-2	2150,6	2153,1	2161,8	2168,8
ME-3	2150,6	2153,2	2162,2	2168,5
RS	2150,0	2152,5	2161,0	2167,2
CL-1	2150,6	2152,8	2161,7	2167,6
CL-2	2150,6	2152,9	2161,6	2168,0
EA	2150,2	2152,6	2161,2	2167,6
EO	2150,4	2153,0	2161,8	2168,6

O espectro da amostra ME-1 apresenta estruturas menos resolvidas que os demais fosfatos de cálcio. Isto pode ser uma evidência de sua baixa cristalinidade, mesmo frente a esta técnica, o que significa que poucos átomos de P que compõem a amostra apresentam seus vizinhos periodicamente distanciados. Como a borda de absorção ocorre em 2150,0 eV, assim como o padrão de HA utilizado, pode-se dizer que a amostra ME-1 é composta por HA pouco cristalina e, pela posição das estruturas pós-borda, podemos supor que esta amostra apresenta DCPD como fase secundária.

Já as amostras ME-2, CL-1 e EO apresentam estruturas semelhantes, tanto com relação à localização em energia quanto na forma das estruturas de ressonância. A borda de absorção destas amostras ocorre em 2150,5 eV e as estruturas pós-borda se apresentam como uma mistura dos espectros dos padrões de DCPD e HA. Esta semelhança entre os espectros também se reflete no valor da razão Ca/P determinada por ICP/AES: 1,54, 1,49 e 1,52 respectivamente, que são valores maiores que de DCPD (Ca/P = 1,00), mas menores que de HA (Ca/P = 1,67). No entanto, os difratogramas de raios X destas amostras apresentam picos característicos de apenas uma das fases, podendo indicar que a fase secundária se apresenta em sua forma amorfa, não sendo detectado por esta técnica.

A amostra ME-3 apresenta um espectro XANES semelhante ao das amostras anteriores, diferindo apenas na forma e posição da estrutura da segunda ressonância. Isto pode estar refletindo no elevado valor de Ca/P (1,77) encontrado

para esta amostra, que pode estar relacionado a outro composto, cujo padrão não foi avaliado.

A amostra RS apresenta um espectro XANES no qual a borda de absorção aparece intensa, na mesma região da borda de HA, no entanto as estruturas pós-borda aparecem menos resolvidas, com forma semelhante às estruturas do padrão de DCP. Estes dados conferem com o difratograma de raios X desta amostra, que apresenta picos característicos de HA e DCP e com o valor da razão Ca/P determinado para a amostra (Ca/P = 1,38).

A amostra EA apresenta borda de absorção e estruturas de ressonância que se ajustam aos padrões de HA e DCPD, resultando, desta forma, em um valor de Ca/P intermediário, como o determinado por ICP/AES (1,38).

Por fim, a amostra CL-2 apresenta uma mistura de fases que podem ser ajustadas aos espectros de DCPD e DCP.

Em quase todos os casos, as estruturas B e C não se apresentaram nas mesmas posições de energia que nenhum dos padrões utilizados. Isto pode indicar uma mistura de fases que apresentem distâncias entre os átomos de P e O diferentes, não sendo possível identificar uma única fase, ou mesmo a presença de fases diferentes daquelas assumidas como padrões.

4.2.2.3. Análises Térmicas

A presença de compostos orgânicos nas amostras também foi verificada submetendo as amostras à análise termogravimétrica e à análise térmica diferencial.

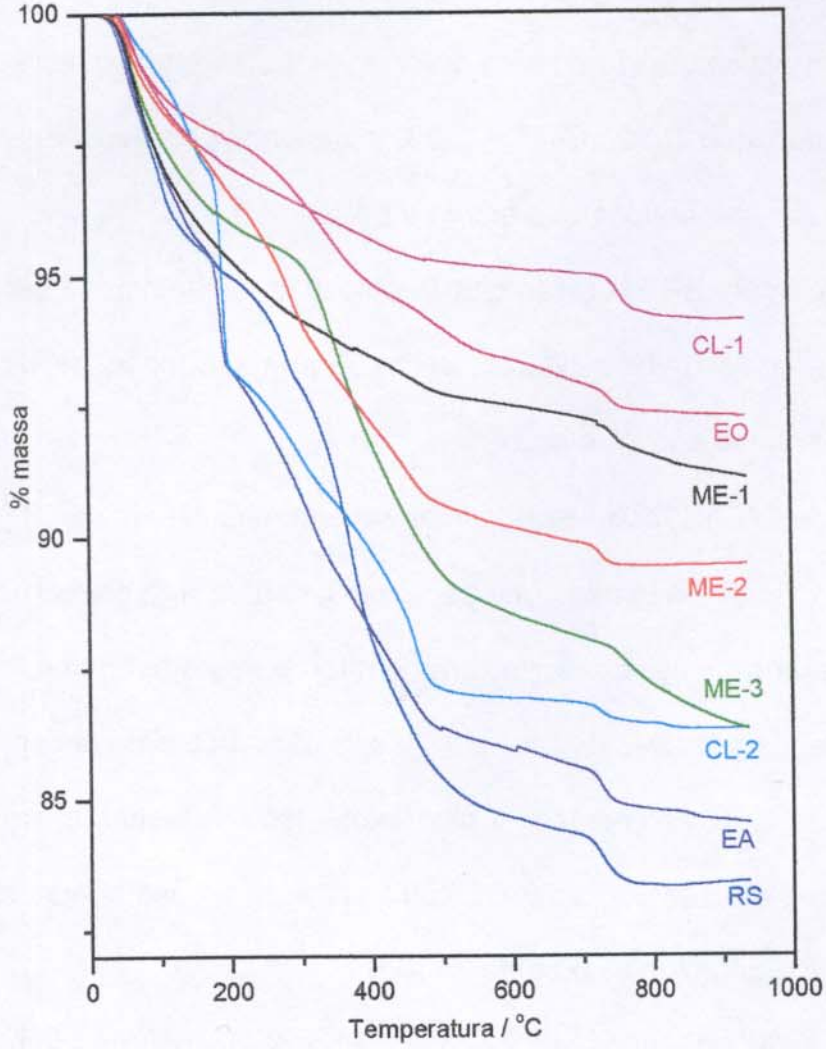


Figura 20: Curvas termogravimétricas das amostras de fosfato de cálcio.

Podemos observar em todas as curvas termogravimétricas da Figura 20, a perda de massa relativa à água adsorvida, até aproximadamente 120 °C. Para as amostras CL-2 e EA, suas curvas indicam uma perda significativa de massa a uma temperatura próxima de 200 °C, equivalente à perda das águas de hidratação da fase $CaHPO_4.2H_2O$. Pode-se observar que a amostra CL-2 apresenta uma perda de

massa maior nesta etapa, ou seja, há maior quantidade de DCPD na amostra CL-2, o que estaria em concordância com os valores de Ca/P determinados para estas amostras, indicando que CL-2 (Ca/P = 1,23) apresenta uma fase menos rica em cálcio proporcionalmente maior que a amostra EA (Ca/P = 1,38).

A perda de água de hidratação destas amostras também pode ser observada nas curvas de análise térmica diferencial da Figura 21, onde estes processos aparecem como eventos endotérmicos.

Em torno de 270 °C, pode-se observar em algumas curvas de DTA da Figura 21, um pequeno evento exotérmico que pode ser atribuído à decomposição de sais de NO_3^- [39]. A perda de massa das amostras em torno desta temperatura ocorre de forma discreta, sendo possível verificar que as amostras que apresentam maior teor de N avaliado por CHN apresentam o pico exotérmico nas suas curvas de DTA, assim como perdas de massa discretas, mas visíveis, em suas curvas térmicas de TGA, as quais são proporcionais à perda de NO_2

Entre 300 e 500 °C, pode-se observar perda de massa em todas as curvas termogravimétricas da Figura 20, sendo que a quantidade de matéria perdida varia de amostra para amostra. Este evento está relacionado à decomposição dos compostos orgânicos utilizados nos sistemas de síntese e que ficaram aderidos aos materiais. No entanto, análise elementar de carbono das amostras indicou teores que, considerando-se apenas a presença de Renex-100® (composto orgânico utilizado que apresenta maior peso molecular), ficaram muito abaixo da quantidade de matéria perdida nesta faixa de aquecimento, durante a análise térmica. Com isso

e levando-se em consideração que a caracterização dos materiais revelou a presença de uma fase composta por DCPD em todas as amostras, acredita-se que esta fase sofra perdas sucessivas de água, levando à formação de pirofosfato de cálcio, $Ca_2P_2O_7$, nesta faixa de temperatura.

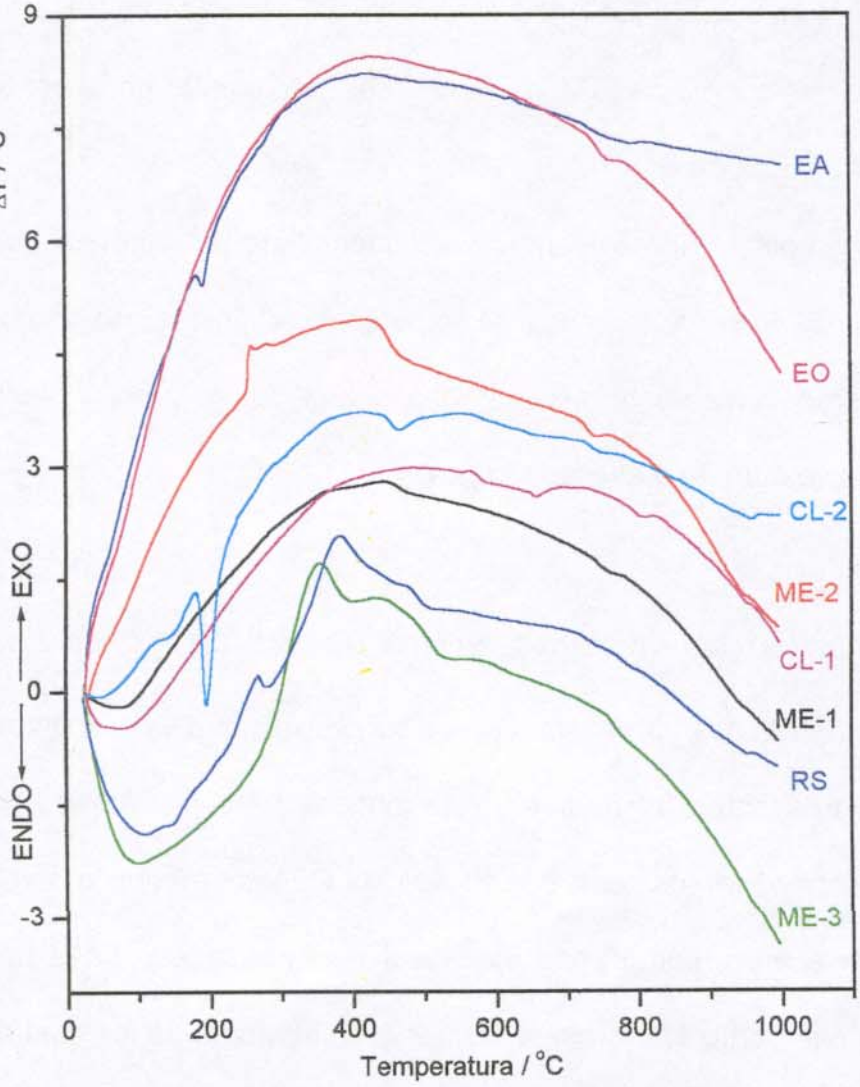


Figura 21: Curvas de análise térmica diferencial das amostras de fosfato de cálcio.

Pode-se verificar que as amostras que apresentam menor teor de C e de N avaliados por CHN (CL-1, EO e ME) sofrem menor perda de massa na região de 200 a 500 °C, indicando, portanto, a eliminação destas espécies quando as amostras são aquecidas a estas temperaturas.

Em todos os casos, também é possível observar um pequeno evento endotérmico em torno de 750 °C nas curvas de DTA da Figura 21, associado à perda de massa nas curvas de TGA da Figura 20. Este evento pode ser atribuído à perda de CO_3^{2-} na forma de CO_2[72].

Como as amostras apresentam grande quantidade de variáveis que definem suas composições, como a presença de impurezas orgânicas, de carbonatos, de nitratos e de diferentes fases, torna-se improvável a atribuição precisa das perdas de massa que ocorrem durante a análise térmica.

4.2.3. *Caracterização do tamanho das partículas e área superficial*

Os materiais obtidos apresentam áreas superficiais que variam entre 46 a 150 m^2/g. Estes valores estão intimamente relacionados com o diâmetro médio das partículas que compõem os fosfatos de cálcio. Quanto menor o tamanho das partículas, maior a área, como pode ser observado na Tabela 6. As medidas de diâmetro médio das partículas foram feitas por espalhamento de luz dinâmico (ELD) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET), preparando as amostras por suspensão em álcool isopropílico e submetendo-as ao ultra-som por 20 min para desagregar as partículas.

Tabela 6: Valores de área superficial por BET, diâmetro médio de aglomerado de partículas por ELD e tamanho de partículas por MET.

Amostra	A_s / $m^2.g^{-1}$ (por BET)	$D^{(a)}$ / nm (por ELD)	$D^{(b)}$ / nm (por MET)
ME-1	136	94	5-30
ME-2	118	128	25
ME-3	147	153	35
RS	87	260	30-50
CL-1	46	457	175
CL-2	75	871	120
EA	96	210	20
EO	92	140	60
HA	55	75	—

(a) Diâmetro médio da menor população determinada por ELD, considerando partículas esféricas.

(b) Tamanho médio da dimensão de maior valor de uma partícula avaliada, por MET.

Pode-se observar a concordância entre os valores de área superficial e de diâmetro médio das partículas. No entanto, todas as amostras apresentaram diâmetro médio de partículas por ELD superiores ao tamanho das partículas avaliado por MET. Isto se deve ao fato de que os fosfatos de cálcio têm grande tendência à aglomeração, fazendo com que as medidas de ELD e também de área superficial sejam obtidas em relação a aglomerados de partículas e não em relação às partículas isoladas. Além disso, compostos orgânicos foram detectados na maioria das amostras, como verificado por CHN, indicando que, mesmo após a extração em

soxhlet, Renex-100®, hexanol e cicloexano permaneciam aderidos aos materiais, fazendo com que a área superficial avaliada para eles fosse menor que a real.

A Figura 22 mostra a distribuição de tamanho de aglomerados obtidos por ELD.

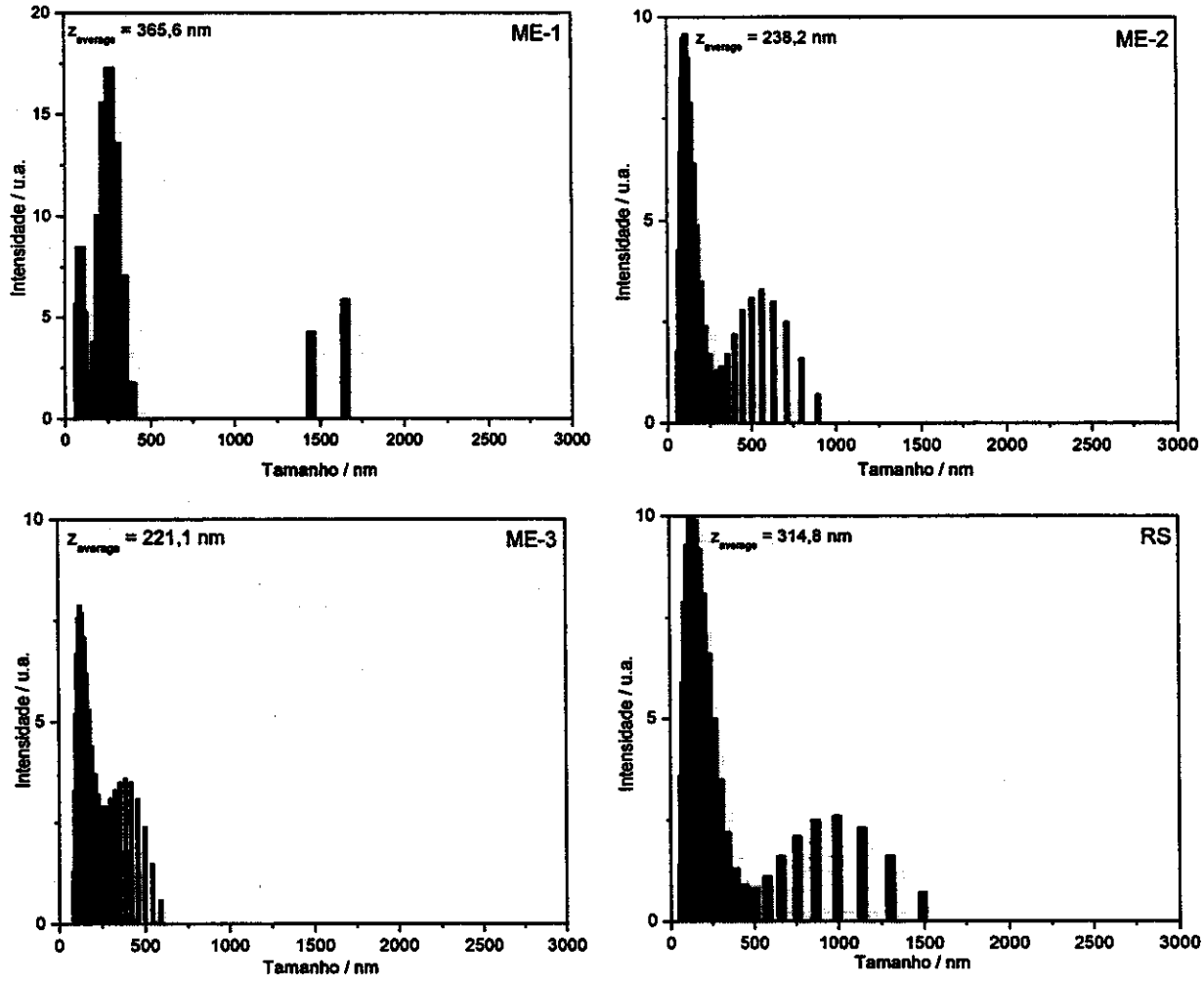


Figura 22: Histograma de distribuição de tamanho de partículas, determinado por ELD, para as amostras de fosfato de cálcio sintetizadas (Continua).

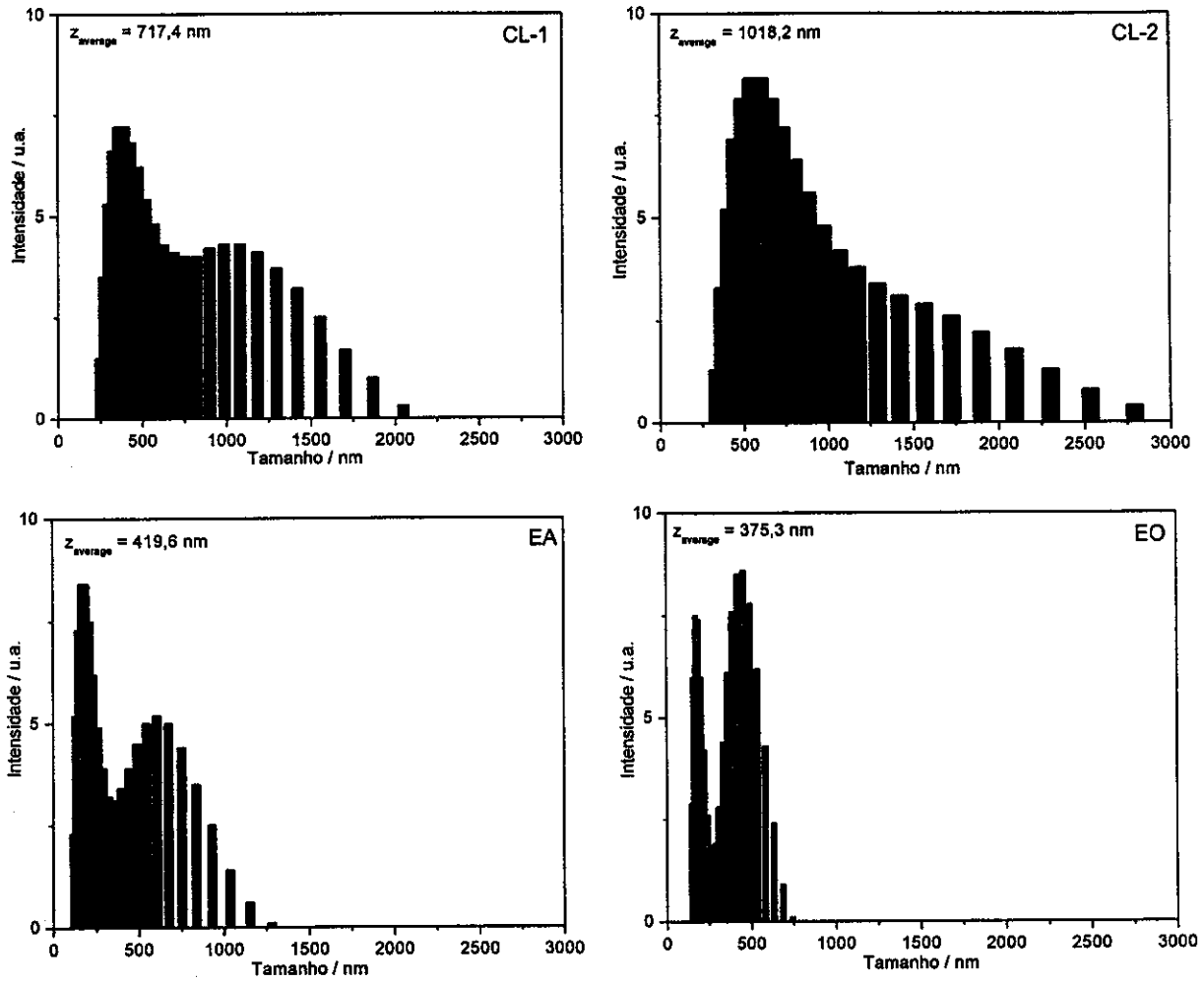


Figura 22: Histograma de distribuição de tamanho de partículas, determinado por ELD, para as amostras de fosfato de cálcio sintetizadas.

4.2.4. Caracterização morfológica

Para a análise por microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram preparadas fazendo-as passar através de peneiras de 5 ou 20 μm de malha, para que se pudesse observar apenas pequenos aglomerados. As Figuras 23 a 27 apresentam as micrografias eletrônicas de varredura para as amostras ME-1, RS, CL-2, EA e EO.

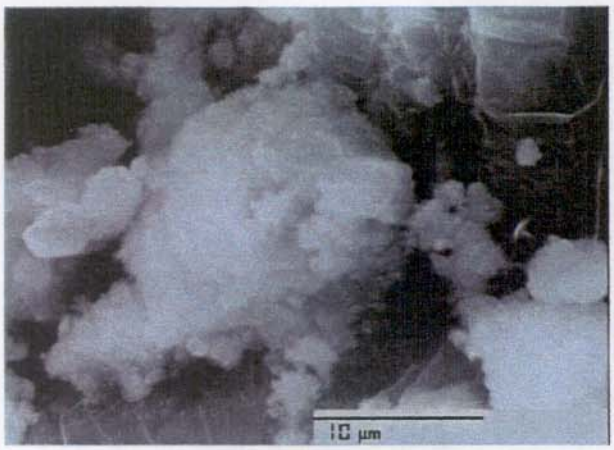


Figura 23: MEV da amostra ME-1.

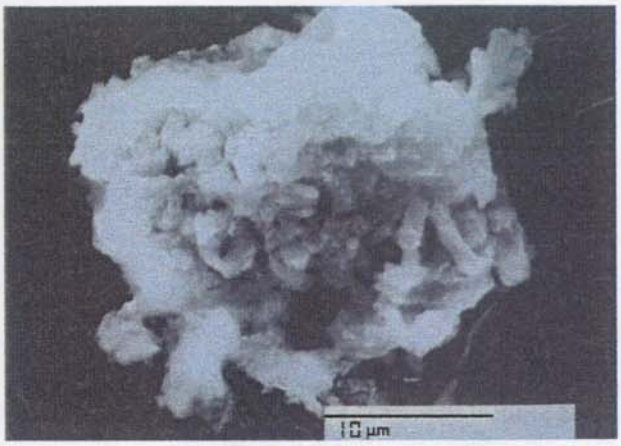


Figura 24: MEV da amostra RS.

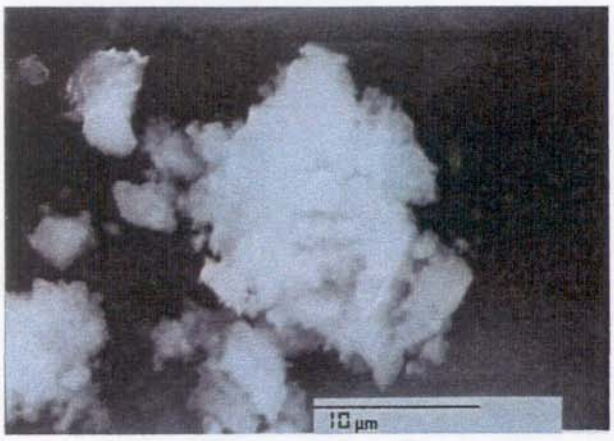


Figura 25: MEV da amostra CL-2.

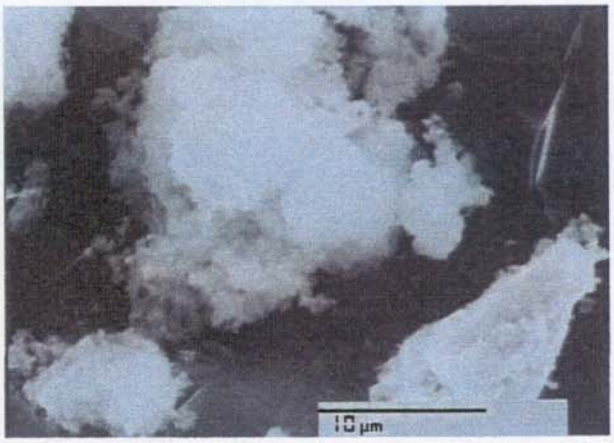


Figura 26: MEV da amostra EA.

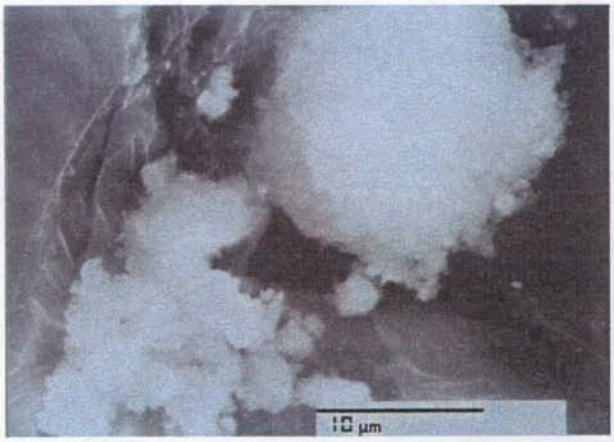


Figura 27: MEV da amostra EO.

Nestas Figuras, observa-se aglomerados de partículas, as quais apresentam morfologias de baixa resolução, não sendo possível identificar diferenças significativas entre elas. As amostras ME-1 e EO apresentam a superfície dos aglomerados como se fossem formados por várias partículas arredondadas. A amostra RS apresenta a superfície do aglomerado mais lisa, porém, pode-se observar nas bordas do aglomerado, a presença de estruturas pouco densas e sem forma definida.

A amostra CL-2 apresenta aglomerado de partículas com padrão filamentar, como algodão doce. Por fim, a amostra EA apresenta uma estrutura densa sob um aglomerado de partículas arredondadas.

A análise por MEV permite apenas a observação de aglomerados de partículas, sem a possibilidade de resolução destas últimas, devido à grande aglomeração das partículas, mas pode-se inferir que as partículas que compõem os materiais apresentam tamanho reduzido, tais que não permitam a resolução de suas morfologias.

Apenas como ilustração e comparação, MEV dos fosfatos de cálcio utilizados como padrões na análise de XANES foi realizada e as micrografias relativas a elas são apresentadas nas Figuras 28 a 30. Pode-se observar que, mesmo a amostra de HA padrão, cuja micrografia é mostrada na Figura 30 mostra um aglomerado de partículas de pequenas dimensões, apresenta uma maior resolução, indicando partículas mais cristalinas que as amostras obtidas em sistemas organizados. Pode-

se observar que cada amostra padrão apresenta partículas de diferentes morfologias.

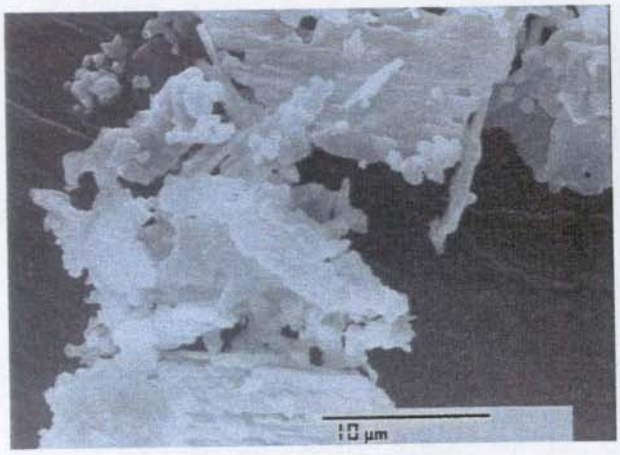


Figura 28: MEV da amostra DCPD.

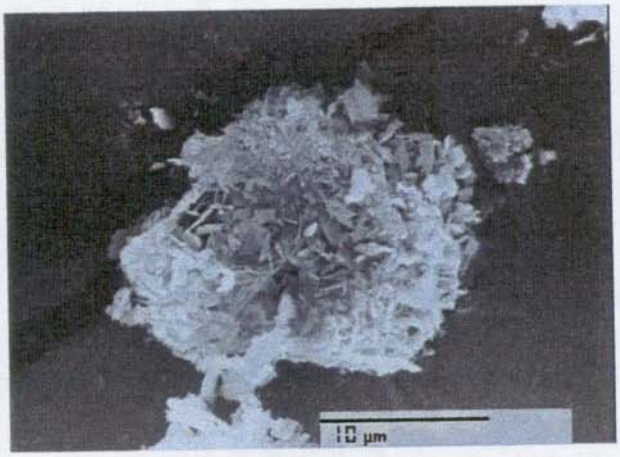


Figura 29: MEV da amostra DCP.

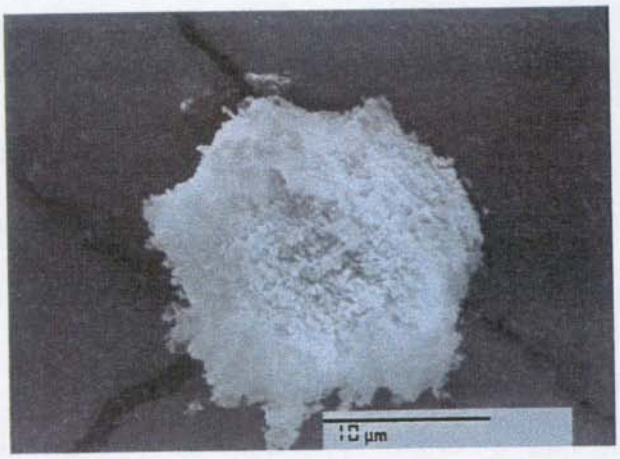


Figura 30: MEV da amostra HA.

Para a análise por microscopia eletrônica de transmissão, as amostras também foram suspensas em álcool isopropílico e submetidas ao ultra-som para garantir que as partículas fossem desagregadas. Ao contrário das micrografias obtidas por MEV, análise por MET revela a morfologia das partículas que compõem as amostras, mesmo quando temos aglomerados de partículas. Podemos observar

comparando as micrografias das Figuras 31-38 com os dados da Tabela 6, que as amostras que apresentam maior aglomeração de partículas também apresentam menor área superficial e maior diâmetro médio de partículas por ELD.

As micrografias das amostras sintetizadas em sistemas organizados mostram a variedade de formas e tamanhos das partículas, mesmo quando trabalhando na mesma região de composição do sistema. As amostras obtidas em microemulsão apresentam partículas com dimensões abaixo de 100 nm e diferentes morfologias. A amostra ME-1 apresenta partículas esféricas de 5 a 30 nm de diâmetro, levemente aglomeradas, mas ainda sendo possível visualizar algumas partículas isoladas (no canto superior direito da Figura 31), que apresentam uma casca mais densa que seu interior. Devido a estas características, o aglomerado de partículas que foi analisado por MEV apresenta-se com bordas arredondadas e pouco resolvidas.

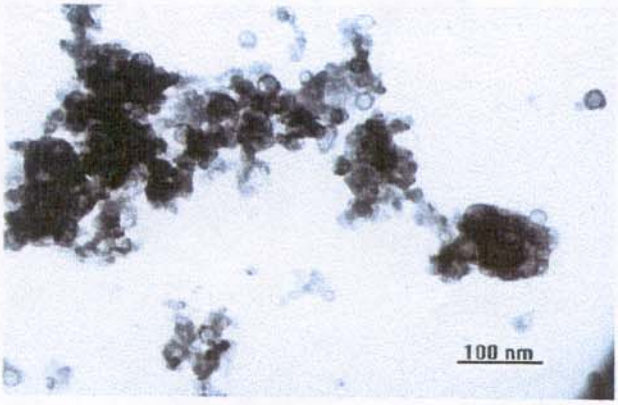


Figura 31: MET da amostra ME-1.

A amostra ME-2 apresenta partículas alongadas, com extremidades arredondadas, de 10 a 90 nm de comprimento por 10 nm de largura. A amostra ME-3

apresenta-se como pequenas agulhas de 30 a 200 nm de comprimento. Estas indicações podem ser visualizadas nas Figuras 31-33, nas quais podemos observar que existem partículas dispersas e também aglomeradas. Com exceção da amostra ME-3 que apresenta agulhas de diferentes comprimentos, as amostras ME-1 e ME-2 apresentam tamanho de partículas dentro de uma faixa estreita, principalmente a amostra ME-1, sendo esta uma das propriedades interessantes do sistema de microemulsão: a possibilidade de obter partículas de dimensões homogêneas. Tomando-se este parâmetro por base, podemos dizer que o método de síntese da amostra ME-1 foi o mais eficiente entre todos os métodos empregados nas sínteses de fosfatos de cálcio.

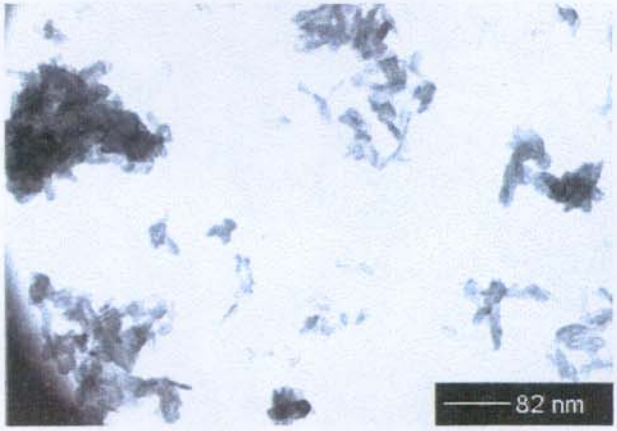


Figura 32: MET da amostra ME-2.

Figura 33: MET da amostra ME-3.

A importância do uso do co-surfactante nesta microemulsão pode ser inferida de acordo com a morfologia das partículas. No caso das amostras ME-1 e ME-2, foi utilizado o hexanol para auxiliar a surfactação, isto é, para diminuir a tensão interfacial do sistema. Isto deve fazer com que as moléculas de hexanol se

acomodem entre as moléculas de Renex-100® na interface do microrreator, repelindo suas caudas hidrofóbicas e fazendo com que os microrreatores apresentem uma forma mais arredondada. A ação do co-surfactante resultou em partículas arredondadas, cujo crescimento deve ter sido controlado pelo tamanho e pela forma dos microrreatores.

No caso da amostra ME-1, os sistemas S1 e S2 de síntese constituíam-se de microemulsões, podendo-se garantir a forma e o tamanho dos microrreatores. Para a amostra ME-2 esta garantia não pode ser dada, pois os precursores aquosos foram adicionados ao mesmo sistema, recaindo na questão inicial deste trabalho, na qual não se sabia se a translucidez verificada após a adição do segundo precursor referia-se apenas à formação de fosfato de cálcio nanométrico ou à desestabilização do sistema de microemulsão. No caso da amostra ME-3, que foi sintetizada empregando dois sistemas de microemulsão, como a amostra ME-1, porém sem a utilização de co-surfactante, a interface dos microrreatores, composta apenas pelas moléculas de Renex-100®, não deve ter sido suficiente para dar forma arredondada aos microdomínios, resultando nas partículas alongadas e finas.

A Figura 34 mostra a micrografia da amostra RS, na qual podemos observar que a amostra aparenta ser formada por filmes finos enrolados, o que vem confirmar a hipótese do sistema de síntese representar uma microemulsão bicontínua. A amostra apresenta-se com regiões muito densas, como se vários filmes estivessem sobrepostos. Neste caso, o tamanho médio de partículas, apresentado na Tabela 6 indica o tamanho médio destes aglomerados de filmes.

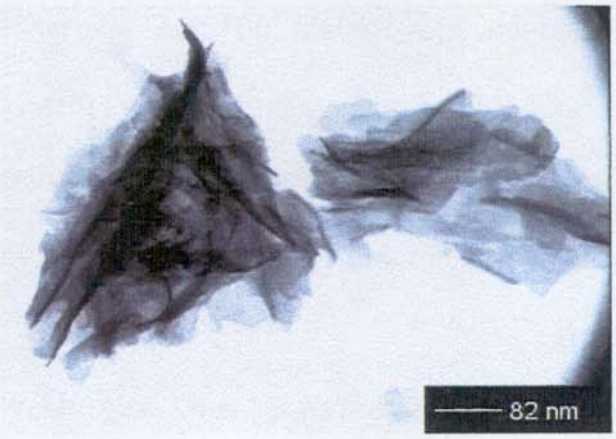


Figura 34: MET da amostra RS.

Com base nas micrografias acima, podemos dizer que o sistema utilizado para sintetizar a amostra ME-1 era composta por microdomínios esféricos, o que torna o tratamento matemático das medidas de espalhamento de luz para este sistema adequado. Já o sistema da amostra RS era composto por microdomínios lamelares, o que justifica a forma de filme fino e a impossibilidade de medida dos domínios aquosos por espalhamento de luz.

As amostras obtidas em sistema de cristal líquido apresentam forma alongada, semelhante à amostra ME-3, no entanto as partículas apresentam maior comprimento e aglomeração, como pode ser observado nas Figuras 35 e 36, diferentemente da amostra obtida em microemulsão que apresentava partículas dispersas. A maior aglomeração das partículas das amostras CL-1 e CL-2 resultou em valores de diâmetro médio de partículas, obtido por ELD, elevados e área superficial menor.

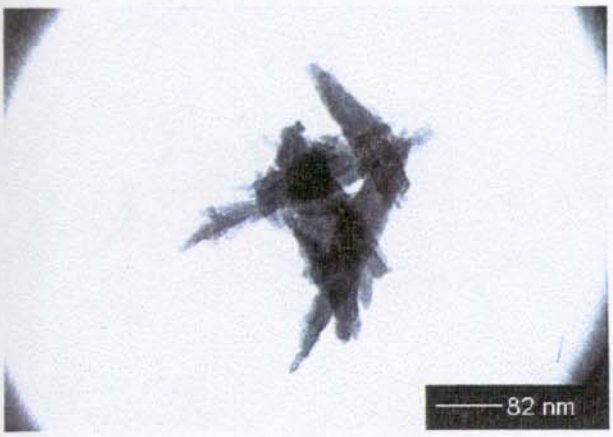


Figura 35: MET da amostra CL-1.

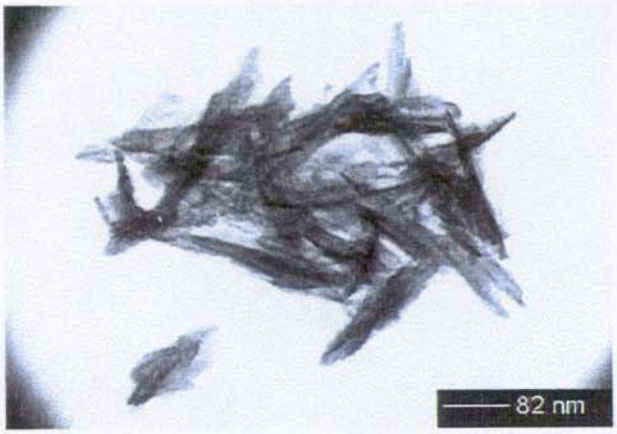


Figura 36: MET da amostra CL-2.

A amostra obtida em emulsão água-em-óleo apresentou-se disforme. Em algumas regiões de amostragem, as partículas aparentavam ser alongadas com extremidade arredondada, em outras regiões aparentava ser um filme fino e em outras regiões aparentava ser agulhas, como mostra a Figura 37. Esta variedade de formas pode estar associada à fase segregada, formada durante o preparo do sistema de síntese e que também puderam ser observadas por MEV. As partículas desta amostra apresentam-se aglomeradas, o que justifica o elevado valor de diâmetro médio de partículas determinado por ELD. A elevada área superficial (próxima de 100 m^2/g) pode ser justificada pelo fato de, em algumas regiões de amostragem, os aglomerados de partículas aparentarem certa porosidade, o que pode elevar a área superficial, mesmo em se tratando de grandes aglomerados de partículas.

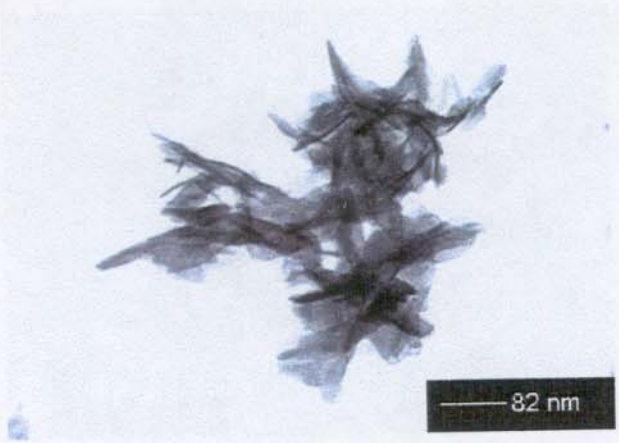


Figura 37: MET da amostra EA.

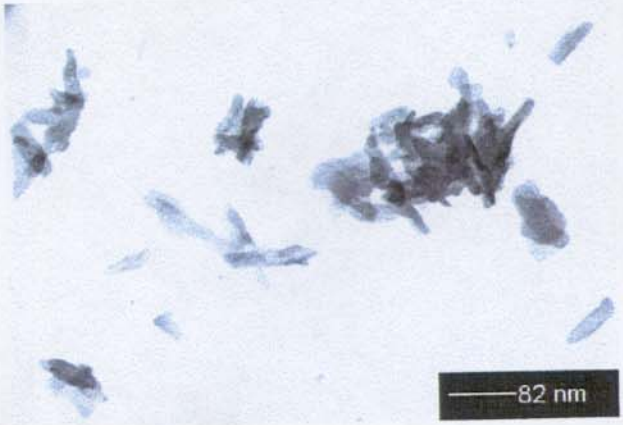


Figura 38: MET da amostra EO.

A amostra EO apresenta partículas alongadas e microporosas, que aparecem dispersas e em pequenos aglomerados, como pode ser observado na Figura 38. Estas características fazem com que a área superficial seja razoavelmente elevada devido à dispersão e microporosidade e o diâmetro médio de partículas obtido por ELD tenha a mesma ordem de grandeza que das amostras ME-2 e ME-3, além de apresentar aglomerados de partículas caracterizados por MEV com baixa resolução de forma, mas com contornos arredondados.

Portanto, comparando-se as micrografias com os valores de diâmetro médio de partículas obtido por ELD, podemos dizer que as medidas de ELD representam o tamanho médio de aglomerados de partículas e não de partículas isoladas, o que indica uma grande concordância entre as duas técnicas. Além disso, as discordâncias entre os valores de área superficial e diâmetro médio de partículas também foram justificadas com base nas observações feitas por MET.

Com base nos resultados avaliados até este ponto, podemos dizer que a região de microemulsão confere um ambiente mais adequado para a mimetização da

osteogênese, se levarmos em consideração o fato de que a etapa inicial deste processo ocorre dentro de membranas que limitam o crescimento e a forma das partículas da fase inorgânica dos ossos, que passarão por um processo de remodelamento contínuo. A região de microemulsão permite a obtenção de partículas de dimensões homogêneas e nanométricas que podem mimetizar os fosfatos de cálcio na sua fase inicial da osteogênese, induzindo a formação de osso jovem e o seu remodelamento.

No entanto, as amostras obtidas em região de microemulsão apresentaram tamanhos e formas diferentes, sendo a amostra ME-1 aquela que melhor se prestaria à mimetização da fase inorgânica dos ossos em sua fase inicial de formação, por apresentar partículas esféricas e dentro de uma faixa estreita de diâmetro (entre 5 a 30 nm). As amostras ME-2 e ME-3, por sua vez, apresentaram partículas mais alongadas, de dimensões maiores e dentro de uma faixa mais dispersa de tamanhos. Portanto, não apenas a região de síntese deve ser considerada para a obtenção de partículas que se assemelham àquelas da fase inicial do processo de formação óssea, como também a forma como o sistema de síntese é preparado. Deve-se utilizar dois sistemas diferentes, cada qual contendo um dos precursores da síntese, garantindo que os sistemas iniciais se compõem de microemusões (como indicado na Figura 5, esquema a), além da necessidade de utilização de co-surfactante.

Com relação à morfologia, acredita-se que partículas com forma de agulha, como as amostras ME-3, CL-1, CL-2 e EA, podem induzir uma resposta inflamatória

no organismo, visto que muitos processos biológicos, como calcificações patológicas, apresentam formações deste tipo[76].

4.2.5. *Potencial de interface*

No presente trabalho, eletrodos construídos com fosfatos de cálcio de diferentes composições e, portanto, de diferentes solubilidades, porém apresentando elevada área superficial devido ao tamanho reduzido de suas partículas, foram avaliados com relação ao potencial desenvolvido na interface de soluções aquosas de diferentes concentrações de fosfato, mantendo fixas a temperatura e a força iônica. Observou-se que todos eles respondem rapidamente quando se introduz o eletrodo nas soluções, tendo seu potencial estabilizado em curto espaço de tempo. Eletrodos confeccionados com material obtido por precipitação direta, também sem tratamento térmico, não responderam rapidamente, levando mais tempo para ter seu potencial estabilizado. Esta diferença de comportamento pode ser atribuída à área superficial das amostras. Os materiais obtidos por precipitação direta apresentam A_s menor que 50 m^2/g, enquanto os materiais obtidos em sistemas organizados apresentam A_s maior que 50 m^2/g, o pode indicar um maior contato do fluido com as partículas.

Este estudo do comportamento dos eletrodos de fosfatos de cálcio nos sugere que, em pH 6, o fator que governa o potencial de interface é a área superficial dos materiais. Pode-se observar na Figura 39 que ME-1 e EO apresentam menor potencial de interface, sendo suas áreas superficiais iguais a 136 e 92 m^2/g,

respectivamente. Já as amostras CL-2, RS e EA apresentam áreas superficiais equivalentes a 75, 87 e 96 m^2/g, respectivamente. Além disso, as amostras aparentemente se agruparam com relação à razão molar Ca/P, podendo-se observar que amostras que apresentam valores próximos de Ca/P apresentaram comportamento semelhante, tanto em pH 6 quanto em pH 7, com exceção da amostra RS que, em soluções de fosfato em pH 7 apresentou os maiores valores de potencial de interface. Neste valor de pH, aparentemente predominou a razão Ca/P para as amostras, isto é, quanto menor o valor Ca/P da amostra, menor seu potencial de interface.

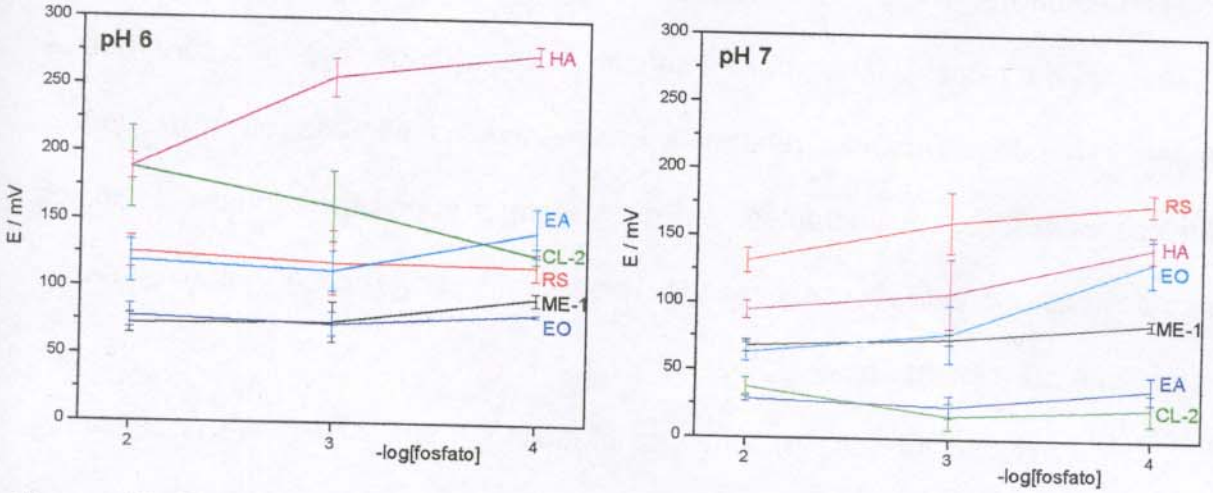


Figura 39: Potenciais de interface médios para os eletrodos de fosfatos de cálcio, em soluções aquosas de fosfato.

Se considerarmos que os potenciais determinados para os eletrodos de fosfato de cálcio estão relacionados à solubilização dos materiais, podemos inferir que em pH 7, independentemente da concentração de fosfato na solução testada,

materiais que apresentam menor fração de cálcio com relação a fosfato são mais solúveis, enquanto que em pH 6, os materiais que apresentam maior solubilidade são aqueles que apresentam maior área superficial.

Disto conclui-se que, quando em processo de regeneração, o pH local do meio diminui, tendo a solubilidade dos materiais afetada principalmente pela disponibilidade superficial dos fosfatos de cálcio, o que indica uma maior troca iônica com o meio.

4.2.6. Estudo in vivo

Um estudo preliminar foi realizado *in vivo*, implantando alguns dos materiais em músculo de ratos Wistar, para verificar a capacidade osteoindutora destes materiais. Trabalhos recentes relatam a importância da microestrutura de corpos cerâmicos utilizados em implantes, em detrimento à importância quase exclusiva dada à macroporosidade necessária para a vascularização sangüínea e conseqüente crescimento ósseo[42,43].

Para avaliar se os materiais sintetizados em sistemas organizados apresentavam biocompatibilidade ou até mesmo se poderiam induzir a formação óssea, amostras de ME-1 e RS foram implantadas na forma de pó levemente compactado e não submetidas à extração por acetona quente, em músculos de ratos Wistar. Apesar deste procedimento não ser padronizado, esperava-se apenas avaliar uma possível resposta positiva destes materiais. Como a região de implante escolhida não possui células de crescimento ósseo, visto ser o músculo um tecido

mole, a capacidade osteoindutora, isto é, a capacidade de induzir a formação de osso poderia ser avaliada. O mesmo animal foi utilizado para avaliar os diferentes materiais, utilizando diferentes locais para a implantação.

Até 16 semanas após o implante, não foi observada a presença de células ósseas em nenhum dos casos, o que indica que estes materiais não foram capazes de induzir o crescimento de osso. Este fato pode estar relacionado à presença dos compostos orgânicos utilizados nos sistemas de síntese e que não foram previamente eliminados, pois eles poderiam estar obstruindo os poros e os vãos entre as partículas. Por outro lado, nenhum deles provocou um processo inflamatório representativo, o que também indica que estes materiais são biocompatíveis.

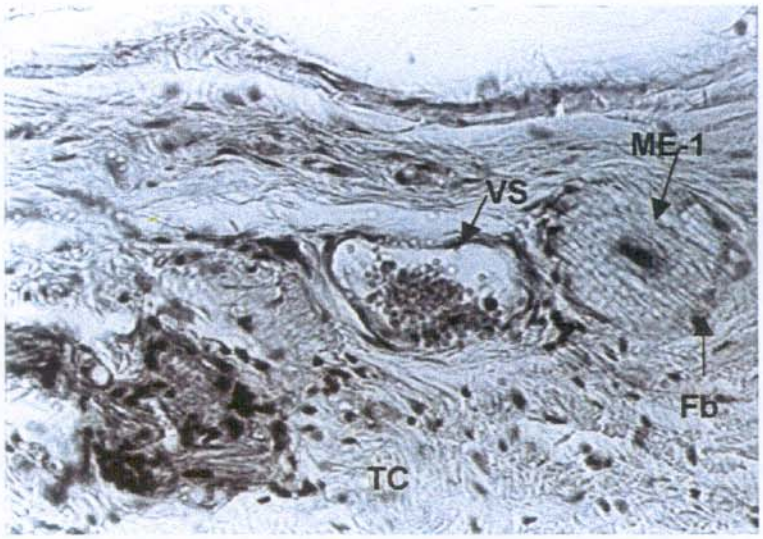


Figura 40: Região de implante de ME-1, 16 semanas após cirurgia. Grânulos de ME-1 cercados por células semelhantes a fibroblastos (Fb), presença de vaso sangüíneo (VS) e de tecido conectivo (TC) entre os músculos.

Como os materiais foram implantados na forma de pó compactado, muitas partículas foram carregadas ou dissolvidas no fluido biológico. Após 16 semanas de implante, pode-se observar a presença de alguns aglomerados de partículas nos locais dos implantes, cercadas por camadas de células semelhantes a fibroblastos, que tendem a isolar o corpo estranho, como pode ser observado nas Figuras 40 e 41. A presença destas células semelhantes a fibroblastos pode estar relacionada não apenas à presença dos fosfatos de cálcio na região do músculo, mas também à presença dos compostos orgânicos utilizados na síntese dos materiais e que não foram submetidos à extração antes do implante. Estes, sem dúvida alguma, representam compostos estranhos ao organismo.

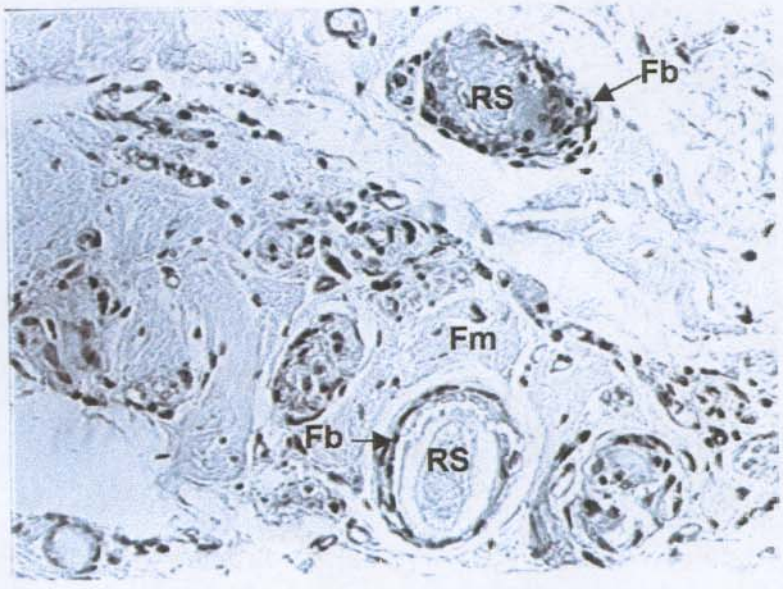


Figura 41: Região de implante de RS, 16 semanas após cirurgia. Grânulos de RS cercados por células semelhantes a fibroblastos (Fb) e por fibra muscular (Fm).

De acordo com estes resultados, pode-se garantir apenas que os materiais implantados em músculos de ratos não oferecem nenhum tipo de rejeição (mesmo impreganados de surfactante), podendo ser considerados materiais inertes ao organismo, isto é, materiais que não induzem nenhuma resposta biológica (osteoindução ou rejeição). Para uma avaliação mais rigorosa do comportamento dos fosfatos de cálcio sintetizados em ambientes confinados, torna-se necessário extrair os compostos orgânicos antes da implantação para, então, podermos verificar se as propriedades caracterizadas para estes materiais podem ou não levar ao aprimoramento da resposta destes implantes no organismo e até à possível osteoindução.

5. Conclusões e Perspectivas

Fosfatos de cálcio foram sintetizados em sistemas confinados formados por Renex-100®/hexanol/cicloexano/*brine*. Utilizando sistemas do tipo microemulsão reversa, cristal líquido e emulsões normais e reversas, obteve-se partículas de dimensões nanométricas, com elevada área superficial e com diferentes morfologias.

Considerando-se que a fase inicial da osteogênese ocorre dentro de membranas que limitam a forma e o tamanho das partículas ali formadas, a amostra ME-1 foi a que mais se assemelhou ao fosfato de cálcio da fase inorgânica dos ossos. Esta amostra foi obtida em região de microemulsão reversa, utilizando dois sistemas de microemulsão, cada um contendo um dos precursores de fosfato de cálcio em solução aquosa. A mistura destes sistemas resultou em regiões aquosas segregadas, cujos formatos se aproximaram do esférico e cujas dimensões se

apresentaram dentro de uma faixa estreita de tamanhos na escala nanométrica, mimetizando o ambiente confinado proporcionado pelas membranas biológicas. Como resultado, a amostra ME-1 apresentou partículas esféricas de 5 a 30 nm, área superficial de 136 m^2/g e baixa cristalinidade.

Após serem formadas dentro das membranas, os fosfatos de cálcio biológicos são eliminados e passam a sofrer contínuo processo de remodelamento, isto é, de dissolução e formação do osso, utilizando o fluido biológico como meio. Espera-se, desta forma, que a amostra ME-1, se implantada no organismo, possa sofrer o mesmo mecanismo de remodelamento e mimetizar o comportamento dos fosfatos de cálcio sintetizados dentro das membranas biológicas.

Além dos aspectos miméticos apontados para a amostra ME-1 e seu sistema de síntese, o tamanho reduzido das partículas de todas as amostras sintetizadas também resultou em áreas superficiais elevadas, sendo que esta característica deve apresentar importante função durante um processo de recuperação óssea, visto que a interação com os compostos presentes no fluido biológico será acentuada. Esta interação pôde ser averiguada através do estudo do comportamento do potencial de interface dos eletrodos construídos com os materiais sintetizados, indicando uma grande área de contato e de troca iônica entre os fosfatos de cálcio e soluções de diferentes concentrações de fosfato, que apresentaram resposta mais rápida que os eletrodos de HA sintetizado por precipitação direta. Além disso, verificou-se uma relação entre pH da solução e composição ou área superficial do fosfato de cálcio, indicando que em pH 7, tanto menor o potencial de interface quanto menor for a composição do material em termos de razão molar Ca/P, enquanto em pH 6, menor

o potencial de interface para os materiais que apresentam maior área superficial. Como os processos inflamatórios, como a regeneração de uma fratura, ocorrem após a redução do pH do meio local, podemos concluir que a maior área superficial das partículas pode melhorar a resposta deste tipo de material quando implantado no organismo.

Por fim, algumas sugestões de trabalhos futuros podem ser propostas:

1. Estudo dos mecanismos e da cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio em soluções aquosas, incluindo soluções que simulem o fluido biológico;
2. Estudo do potencial de interface em soluções aquosas e soluções que simulem o fluido biológico, relacionando com o processo de dissolução dos fosfatos de cálcio;
3. Estudo do comportamento *in vivo*, incluindo uma possível resposta osteoindutora. Este estudo deve ser realizado com critério e rigor, devendo-se eliminar os compostos orgânicos remanescentes dos sistemas de síntese em ambientes confinados;
4. Estudo da influência da morfologia das partículas sobre o comportamento *in vivo* dos materiais, visto que muitas calcificações apresentam formações de partículas na forma de agulhas.

6. Referências

1. Katz, J.L. e Harper, R.A. *In* Concise Encyclopedia of medical and dental materials. Williams, D. (Ed.). Oxford: Pergamon, 1990 (Advances in Materials Science and Engeneering).
2. Posner, A.S. The mineral of bone. *Clin. Orthop. Related Res.*, 200, 87-99, **1985.**
3. Perry, C.C. Biomaterials. *In* Chemistry of advanced materials: an overview. Interrante, L.V. e Hampden-Smith, M.J. (Eds). New York: Wiley – VCH, 1998.
4. Boskey, A.L. e Posner, A.S. The structure of bone. *Orthop. Clin. North Am.*, 15 (4), 597-612, **1984.**
5. Bianconi, P.A. *In* Materials Chemistry: An emerging discipline. Interrante, L.V.; Caspar, L.A. e Ellis, A.B. (Eds). Washington: American Chemical Society, 1995 (Advances in Chemistry Series, Vol. 245).
6. Mann, S; Burkett, S.L.; Davis, S.A.; Fowler, C.E.; Mendelson, N.H.; Sims, S.D.; Walsh, D. e Whilton, N.T. Sol-gel synthesis of organized matter. *Chem. Mater.*, 9 (11), 2300-2310, **1997.**
7. Weiner, S. e Addadi, L. Design strategies in mineralized biological materials. *J. Mater. Chem.* 7 (5), 689-702, **1997.**
8. Le Geros, R.Z.; Bleiwas, C.B.; Retino, M.; Rohanizadeh, R. e Le Geros, J.D. Zinc effect on the in vitro formation of calcium phosphates: Relevance to clinical inhibition of calculus formation. *Am. J. Dent.* 12 (2), 65-71, **1999.**
9. Rey, C. Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structure and properties. *Biomaterials*, 11 (BIOMAT89), 13-15, **1990.**

10. De Groot, K.; Klein, C.P.A.T.; Wolke, J.G.C. e de Blieck-Hogervorst, J.M.A. Chemistry of calcium phosphate bioceramics. *In* Handbook of bioactive ceramics. Yamamuro, T.; Hench, L.L. e Wilson, J. (Eds). Boca Raton: CRC, 1990, Vol. II.
11. Block, J.E. e Thorn, M.R. Clinical indications of calcium-phosphate biomaterials and related composites for orthopedic procedures. *Calcif. Tissue Int.* 66 (3), 234-238, **2000**.
12. Santos, R.G. *In* Materiales bioactivos para implantes oseos: características y aplicaciones. Havana, Cuba: Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 1992.
13. Hench, L.L. e Ethridge, E.C. *In* Biomaterials: an interfacial approach. New York: Academic Press, 1982.
14. Yamamuro, T.; Hench, L.L. e Wilson, J. (Eds). *In* Handbook of bioactive ceramics. Boca Raton: CRC, 1990, Vol. II.
15. Malard, O.; Bouler, J.M.; Guicheux, J.; Heymann, D.; Pilet, P.; Coquard, C. e Daculsi, G. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: Preliminary in vitro and in vivo study. *J. Biomed. Mater. Res.*, 46 (1), 103-111, **1999**.
16. Hench, L.L. Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.*, 81 (7), 1705-1728, **1998**.
17. Chin, T.S.; Wu, D.C.; Hung, M.P. e Wang, C.P. Porous Ca-P-O bio-glassceramics by loose-powder-sintering. *J. Mater. Res.*, 11 (4), 962-969, **1996**.
18. Knabe, C.; Driessens, F.C.M.; Planell, J.A.; Gildenhaar, R.; Berger, G. Reif, D.; Fitzner, R.; Radlanski, R.J. e Gross, U. Evaluation of clacium phosphate and experimental calcium phosphate cements using osteogenic cultures. *J. Biomed. Mater. Res.*, 52 (3), 498-508, **2000**.
19. Yamaguchi, I.; Tokuchi, K.; Fukuzaki, H.; Koyama, Y.; Takakuda, K.; Monma, H. e Tanaka, J. Preparation and microstructure analyses of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites. *J. Biomed. Mater. Res.*, 55(1), 20-27, **2001**.
20. Tancred, D.C.; McCormack, B.A.O. e Carr, A.J. A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone. *Biomaterials*, 19 (24), 2303-2311, **1998**.

21. Murphy, W.L. e Messersmith, P.B. Compartmental control of mineral formation: adaptation of a biomineralization strategy for biomedical use. *Polyhedron*, 19 (3), 357-363, **2000**.

22. Anderson, H.C. Vesicles associated with calcification in matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.*, 41 (1), 59, **1969**.

23. Bhandarkar, S. e Bose, A. Synthesis of nanocomposite particles by intravesicular coprecipitation. *J. Colloid Interface Sci.*, 139 (2), 541-550, **1990**.

24. Heuer, A.H.; Fink, D.J.; Laraia, V.J.; Arias, J.L.; Calvert, P.D.; Kendall, K.; Messing, G.L.; Blackwell, J.; Rieke, P.C.; Thompson, D.H.; Wheeler, A.P.; Veis, A. e Caplan, A.I. Innovative materials processing strategies – a biomimetic approach. *Science*, 255 (5048), 1098-1105, **1992**.

25. Huo, Q.S.; Margolese, D.I.; Ciesla, U.; Demuth, D.G.; Feng, P.Y.; Gier, T.E.; Sieger, P.; Firouzi, A.; Chmelka, B.F.; Schuth, F. e Stucky, G.D. Organization of organic-molecules with inorganic molecular-species into nanocomposite biphase arrays. *Chem. Mater.*, 6 (8), 1176-1191, **1994**.

26. Kniep, R. e Busch, S. Biomimetic growth and self-assembly of fluorapatite aggregates by diffusion into denatured collagen matrices. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35 (22), 2624-2626, **1996**.

27. Fendler, J.H. Atomic and molecular clusters in membrane mimetic chemistry. *Chem. Rev.* 87 (5), 877-899, **1987**.

28. Balasubramanian, D. Water inside reverse micelles. *J. Indian Chem. Soc.* 58 (7), 633-639, **1981**.

29. Attwood, D. e Florence, A.T. *In* Surfactant systems: their chemistry, pharmacy and biology. London: Chapman and Hall, 1983.

30. Adamson, A.W. e Gast, A.P. *In* Physical chemistry of surfaces. New York: John Wiley & Sons, 1997.

31. Sharma, M.K. e Shah, D.O. *In* Macro- and microemulsions: theory and applications. Shah, D.O. (Ed.). Washington, D.C.: American Chemical Society, 1985 (ACS Symposium Series, Vol. 272).

32. Davis, H.T. Factors determining emulsion type: hydrophile-lipophile balance and beyond. *Colloids and Surfaces A*, 91, 9-24, **1994**.

33. Israelachvili, J. The science and applications of emulsions - an overview. *Colloids and Surfaces A*, 91, 1-8, **1994.**

34. Chandrasekhar, S. *In* Liquid Crystals. Cambridge: Cambridge University, 1977 (Cambridge Monographs on Physics).

35. Small, D.M. Liquid crystals in living and dying systems. *J. Colloid Interface Science*, 58 (3), 581-602, **1977.**

36. Leung, R.; Hou, M.J. e Shah, D.O. *In* Surfactants in chemical/process engeneering. Wasan, D.T.; Ginn, M.E. e Shah, D.O. (Eds). New York: Marcel Dekker, 1988 (Surfactant Science Series, Vol. 28).

37. Chhabra, V.; Pillai, V.; Mishra, B.K.; Morrone, A. e Shah, D.O. Synthesis, characterization, and properties of microemulsion-mediated nanophase TiO_2 particles. *Langmuir*, 11 (9), 3307-3311, **1995.**

38. Beck, Ch.; Härtl, W. e Hempelmann, R. Size-controlled synthesis of nanocrystalline $BaTiO_3$ by sol-gel type hydrolysis in microemulsion-provided nanoreactors. *J. Mater. Res.*, 13 (11), 3174-3170, **1998.**

39. Qi, L.; Ma, J.; Cheng, H. e Zhao, Z. Microemulsion-mediated synthesis of calcium hydroxyapatite fine powders. *J. Mater. Sci. Letters*, 16 (1), 1779-1781, **1997.**

40. Walsh, D. e Mann, S. Chemical synthesis of microskeletal calcium phosphate in bicontinuous microemulsion. *Chem. Mater.*, 8 (8), 1944-1953, **1996.**

41. Lim, G.K.; Wang, J.; Ng, S.C. e Gan, L.M. Nanosized hydroxyapatite powders from microemulsions and emulsions stabilized by a biodegradable surfactant. *J. Mater. Chem.*, 9 (7), 1635-1639, **1999.**

42. Yuan, H.P.; Kurashina, K.; de Bruijn, J; Li, Y.; de Groot, K. e Zhang, X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 20 (19), 1799-1806, **1999.**

43. Webster, T.J.; Ergun, C.; Doremus, R.H.; Siegel, R.W. e Bizios, R. Specific protein mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.*, 51 (3), 475-483, **2000.**

44. Adams, J.C. *In* Manual de fraturas e lesões articulares. São Paulo: Artes Médicas, 1976, p. 8-15, 6 ed.

45. Gramain, Ph.; Voegel, J.C.; Gumpper, M. e Thomann, J.M. Surface properties and equilibrium kinetics of hydroxyapatite powder near the solubility equilibrium. *J. Colloid Interface Sci.*, 118 (1), 148-157, **1987.**

46. Mafé, S.; Manzanares, J.A.; Reiss, H.; Thomann, J.M. e Gramain, P. Model for the dissolution of calcium hydroxyapatite powder. *J. Phys. Chem.*, 96 (2), 861-866, **1992.**

47. Petrucelli, G.; Kubota, L.T.; Kawachi, E.Y. e Bertran, C.A. Hydroxyapatite-based electrode: a new sensor for phosphate. *Annal. Comm.* 33, 227-229, **1996.**

48. Kawachi, E.Y., Bertran, C.A. e Kubota, L.T. Interface potential of calcium phosphate electrodes. *Biomaterials*, 19 (24), 2329-2333, **1998.**

49. Kawachi, E.Y. Fosfatos de cálcio: porosidade, cristalinidade, potencial de interface e comportamento *in vivo*. Tese de Mestrado. Campinas: Unicamp, 1997.

50. Budavari, S. (Ed.). *In* The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse station: Merck, 1996, 12 ed.

51. Traverse, A. Some aspects of X-ray absorption spectroscopy: the interplay between models and experiments. *J. Braz. Chem. Soc.* 7 (3), 199-208, **1996.**

52. Koningsberger, D.C. e Prins, R. *In* X-ray absorption: principles, applications, techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES. John Wiley & Sons, 1988.

53. Rehr, J.J. e Albers, R.C. Theoretical approaches to X-ray absorption fine structure. *Rev. Modern Phys.* 72 (3), 621-654, **2000.**

54. Mosset, A. e Galy, J. X-ray synchrotron radiation and inorganic structural chemistry. *Top. Curr. Chem.* 145, 1-28, **1988.**

55. Franke, R. e Hormes, J. The P K-near edge absorption spectra of phosphates. *Physica B*, 216, 85-95, **1995.**

56. Lowndes, D.H. Nanotechnology overview. *Adv. Mater. & Process.* 157 (5), 48-51, **2000.**

57. (a) Dagani, R. Nasa goes nano – NanoSpace conference highlights agency's high hopes that nanotechnology will make new types of space missions possible. *Chem. Eng. News*, 78 (9), 36-38, **2000.**

(b) Idem. NanoSpace 2000: melding two worlds. *Ibid*, 78 (9), 39-42, **2000.**

(c) *Idem.* Putting the "nano" into composites. *Ibid*, 77 (23), **1999.**

58. Schoonman, J. Nanostructured materials in solid state ionics. *Solid State Ionics*, 135, 5-19, **2000**.

59. Gleiter, H. Nanocrystalline materials. *Prog. Mater. Sci.* 33 (4), 223-315, **1989**.

60. Lam, C; Zhang, Y.F.; Tang, Y.H.; Lee, C.S.; Bello, I. E Lee, S.T. Large-scale synthesis of ultrafine Si nanoparticles by ball-milling. *J. Crystal Growth* 220 (4), 466-470, **2000**.

61. Huczko, A. Template-based synthesis of nanomaterials.*Appl. Phys. A.* 70, 365-376, **2000**.

62. Zheng, N.; Wu, Q.; Ding, Y. e Li, Y. Synthesis of $BaCO_3$ nanowires and nanorods in the presence of different nonionic W/O microemulsions. *Chem. Lett.* 6, 638-639, **2000**.

63. Wang, J.; Fang, J.; Ng, S.C., Gan, L.M.; Chew, C.H.; Wang, X.B. e Shen, Z.X. Ultrafine barium titanate powders via microemulsion processing routes. *J. Am. Ceram. Soc.* 82 (4), 873-881, **1999**.

64. Wang, C.Y.; Zhou, Y.; Chen, Z.Y.; Cheng, B.; Liu, H.J. e Mo, X. Preparation of shell-core CuO_2-Cu nanocomposite particles and Cu nanoparticles in a new microemulsion system. *J. Colloid Interface Sci.* 220 (2), 469-470, **1999**.

65. Fang, X. e Yang, C. An experimental study on the relationship between the physical properties of CTAB/hexanol/water reverse micelles and ZrO_2-Y_2O_3 nanoparticles prepared. *J. Colloid Interface Sci.* 212, 242-251, **1999**.

66. Schmitt, T.M. *In* Analysis of surfactants. New York: Marcel Dekker, 1992 (Surfactant Science Series, Vol. 40), p. 312.

67. Buzier, M. e Ravey, J.C. Solubilization properties of nonionic surfactants. *J. Colloid and Interface Sci.*, 91 (1), 20-33, **1983**.

68. Iwanaga, T.; Suzuki, M. e Kunieda, H. Effect of added salts or polyols on the liquid crystalline structures of polyoxyethylene-type nonionic surfactants. *Langmuir*, 14 (20), 5775-5781, **1998**.

69. Heush, R. Composition, properties, and applications of mesomorphous tenside phase. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 95 (5), 625-637, **1991**.

70. Boletim Técnico da Oxiteno, 1998.

71. Nordström, E.G. e Karlsson, K.H. Carbonate-doped hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1 (3), 182-184, **1990.**

72. Kandori, K.; Yasukawa, A. e Ishikawa, T. Preparation and characterization of spherical calcium hydroxyapatite. *Chem. Mater.*, 7 (1), 26-32, **1995.**

73. Gadaleta, S.J.; Paschalis, E.P.; Betts, F.; Mendelsohn, R. e Boskey, A.L. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: new correlations between X-ray diffraction and infrared data. *Calcif. Tissue Int.*, 58 (1), 9-16, **1996.**

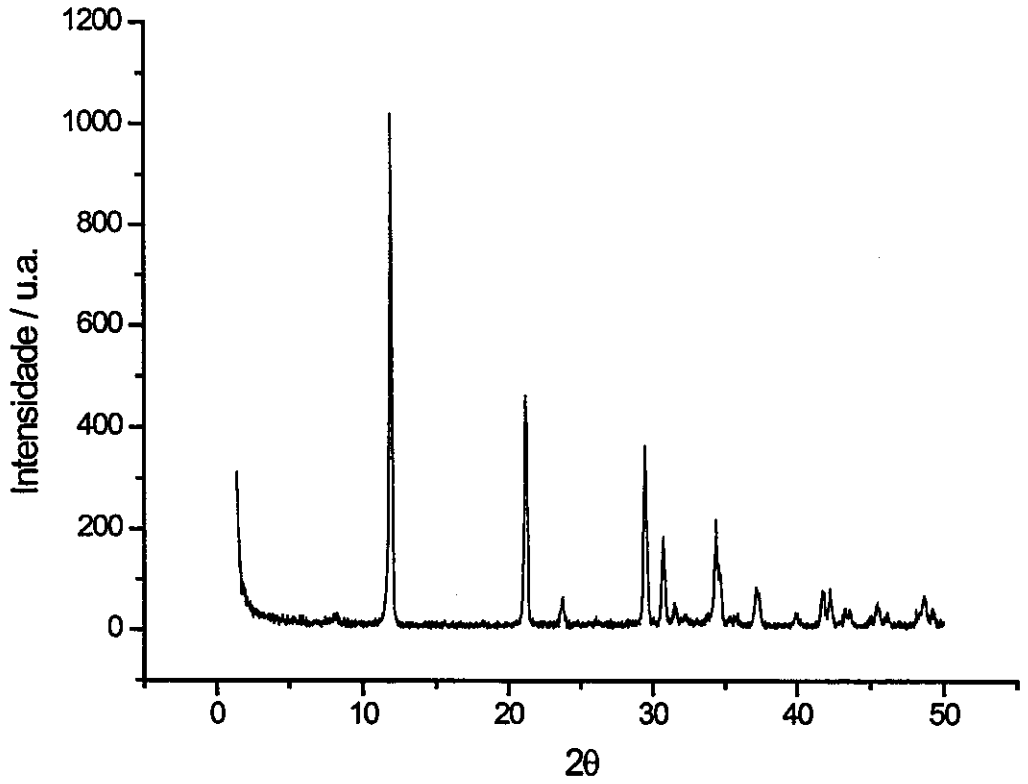
74. Walters, M.A.; Leung, Y.C.; Blumenthal, N.C.; LeGeros, R.Z. e Konsker, K.A. *J. Inorg. Biochem.* 39 (3), 193-200, **1990.**

75. Peters, F.; Schwarz, K. e Epple, M. The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis. *Themochimica Acta* 361, 131-138, **2000.**

76. Ohira, T. e Ishikawa, K. Hydroxyapatite deposition in osteoarthritic articular cartilage of the proximal femoral head. *Arthritis and Rheumatism* 30 (6), 651-660, **1987.**

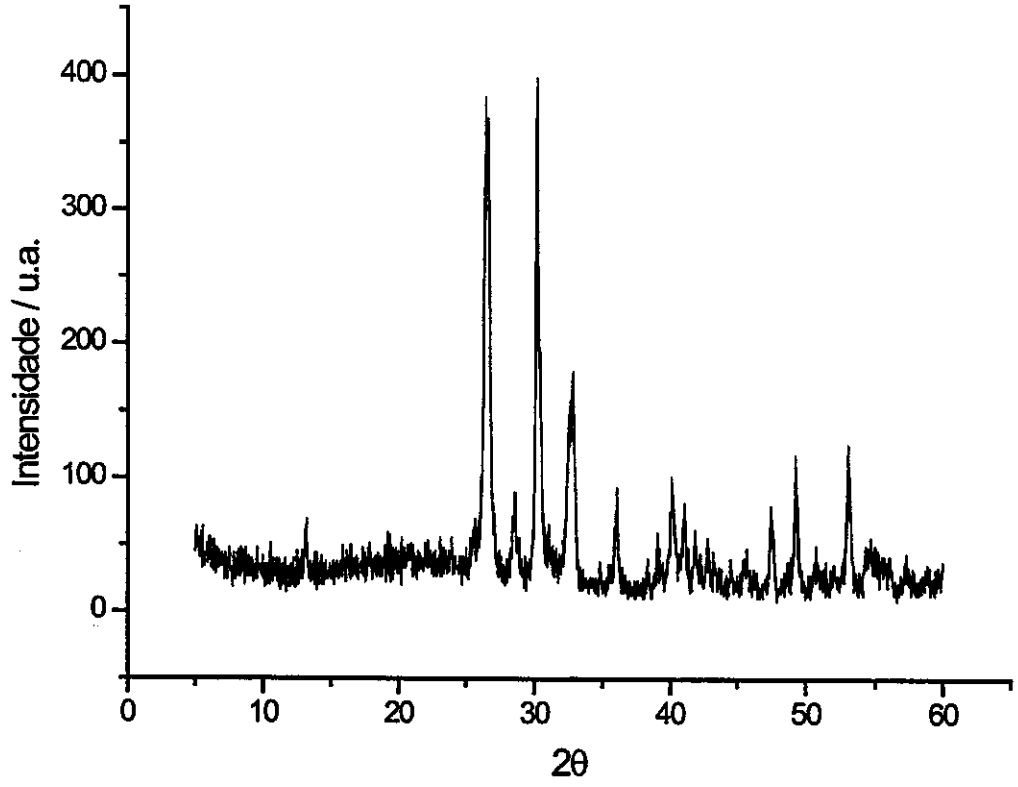
7. Anexos

Anexo 1



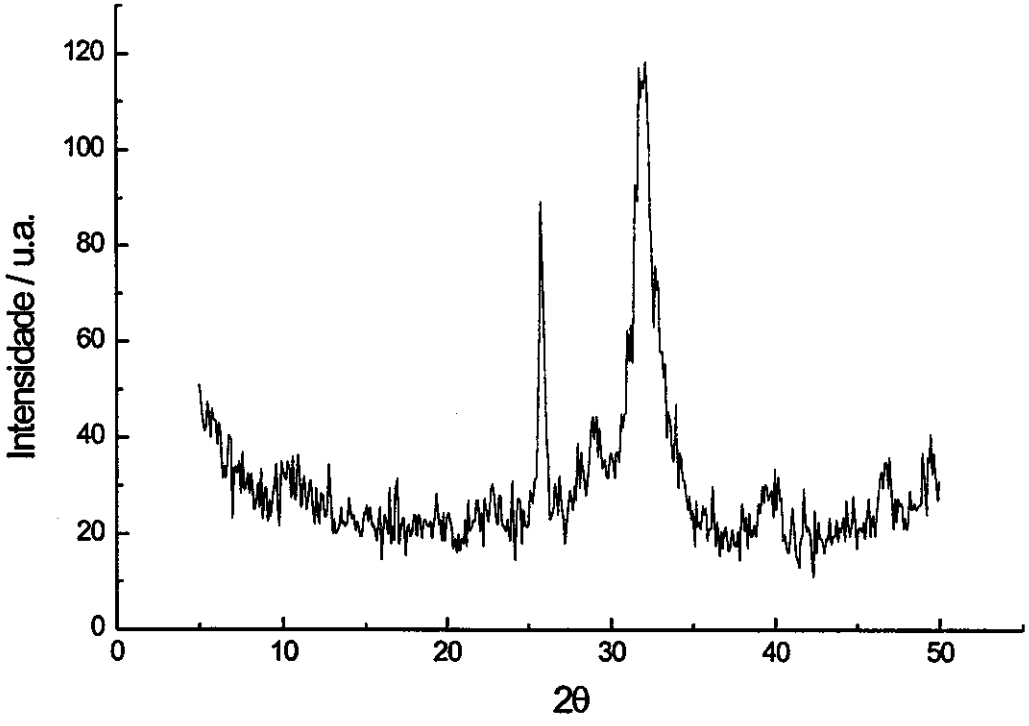
Difratograma de raios X de DCPD utilizado como padrão nas medidas de XANES.

Anexo 2



Difratograma de raios X de DCP utilizado como padrão nas medidas de XANES.

Anexo 3



Difratograma de raios X de HA utilizado como padrão nas medidas de XANES.