



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Físico-Química

Matriz Óssea Inorgânica e Propriedades da Interface
Fosfatos de Cálcio/Soluções Aquosas.

Tese de Doutorado

Aluno: Sérgio Bertazzo

Orientador: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

B459m	Bertazzo, Sérgio. Matriz óssea inorgânica e propriedades da interface fosfatos de cálcio/soluções aquosas / Sérgio Bertazzo. -- Campinas, SP: [s.n], 2007. Orientador: Celso Aparecido Bertran. Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Fosfato de cálcio. 2. Superfície. 3. Biomaterial. 4. Matriz óssea inorgânica. I. Bertran, Celso Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	---

Titulo em inglês: Bone mineral and interface properties of system calcium phosphate/aqueous solution

Palavras-chaves em inglês: Calcium phosphate, Surface, Biomaterials, Bone mineral

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Celso Aparecido Bertran (orientador), Gloria de Almeida Soares (COPPE-UFRJ), Marisa Masumi Beppu (FEQ-UNICAMP), Edvaldo Sabadini (IQ-UNICAMP), Ítalo Odone Mazalo (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 20/08/2007

Dedicatória

Dedico este trabalho a Ju, química honorária.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Juliana Bertazzo, pelas traduções e revisão da Tese. A Luana Faria pela ajuda no trabalho e ao Prof. Bertran pela orientação, no sentido mais amplo da palavra.

Agradeço também ao Prof. Ângelo pelo auxílio e disponibilidade de seu laboratório, sem o qual essa tese não teria acontecido.

Agradeço também a FAPESP pelo apoio financeiro, ao INPE pelo fornecimento da hidrazina.

Currículo

Formação Acadêmica

Mestrado em Físico-Química – Bolsa FAPESP (2002-2004)

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – IQ

Bacharelado em Química (1998-2001)

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Prêmios e Distinções Acadêmicas

European Society For Biomaterials 2006 Travel Award, European Society for Biomaterials – Nantes – França, 2006

Prêmio de melhor apresentação de painel de Físico-Química no *XXVI Congresso Latinoamericano de Química e 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Salvador - BA, Maio de 2004.

Publicações

Bertazzo S, Bertran CA, Journal of Inorganic Biochemistry – in press

Bertazzo S, Bertran CA, Allegretti LJM, Macromolecular Symposia 253: 2007 - in press

Bertazzo S, Bertran CA, Lilian LA, Key Engineering Materials 330:753-756 2007.

Bertazzo S, Bertran CA, Luana LP, Key Engineering Materials 330: 713-716 2007.

Bertazzo S, Bertran CA, Key Engineering Materials 309-311: 3-6 Part 1-2 2006

Bertazzo S, Bertran CA, Key Engineering Materials 309-311: 7-10 Part 1-2 2006

Bertazzo S, Bertran CA, Camilli JA Key Engineering Materials 309-311: 11-14 Part 1-2 2006

Bertazzo S, Bertran CA, Kawachi EY, Key Engineering Materials 309-311: 507-510 Part 1-2 2006

Bertazzo S, Bertran CA, Key Engineering Materials 309-311: 527-530 Part 1-2 2006

Patentes

Prot. 018070039124

Bertran CA, Bertazzo S, Silva HA, Almeida LL

Material Biocompatível, Processo de Obtenção de Material Biocompatível e Uso de Material Biocompatível em Implantes e Próteses.

Trabalhos em eventos

S. Bertazzo, C. A. Bertran, *ESB 2006* - Nantes – França, 2006. – *Apresentação oral*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, *ESB 2006* - Nantes – França, 2006. – *Apresentação na forma de poster*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, Lilian L. Almeida, *Biomaterials in Regenerative Medicine*, Viena – Austria, 2006. – *Apresentação na forma de poster*.

C. A. Bertran, S. Bertazzo, L. J. M. Allegretti. *Biomaterials in Regenerative Medicine*, Viena – Austria, 2006. – *Apresentação na forma de poster*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, *COLAOB 2006* - Caxambu – Brasil, 2006. – *Apresentação na forma de poster*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, Sérgio T. Camargo Jr, *COLAOB 2006* - Caxambu – Brasil, 2006. – *Apresentação na forma de poster*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, *Bioceramics 18* - Kyoto - Japan, December 2005 – *Apresentação oral*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, E. Y. Kawachi, *Bioceramics 18* - Kyoto - Japan, December 2005 – *Apresentação oral*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, *Bioceramics 18* - Kyoto - Japan, 2005. – *Apresentação na forma de poster*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, J. A. Camilli, *Bioceramics 18* - Kyoto - Japan, 2005. – *Apresentação na forma de poster*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, *Bioceramics 18* - Kyoto - Japan, 2005. – *Apresentação na forma de poster*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, *XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, Porto Alegre – Brasil, Dezembro de 2004 – *Apresentação oral*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, *XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, Porto Alegre – Brasil, 2004. – *Apresentação na forma de poster*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, *III COLAOB - Congresso Latino Americano de Biomateriais*, Campinas – SP, Julho de 2004 – *Apresentação oral*.

S. Bertazzo, C. A. Bertran, *XXVI Congreso Latinoamericano de Química e 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Salvador - Brasil, 2004. – *Apresentação na forma de poster*.

Resumo

Os fosfatos de cálcio possuem propriedades biocompatíveis e apresentam composição semelhante à da matriz óssea inorgânica dos vertebrados. Devido a estas propriedades, os fosfatos de cálcio têm sido largamente estudados, mas ainda hoje não há um completo consenso sobre as características destes materiais.

Neste trabalho procuramos estudar alguns dos fenômenos que ocorrem na superfície dos fosfatos de cálcio quando imersos em soluções aquosas, com pH entre 6,0 e 7,4, e caracterizar de forma completa a matriz óssea inorgânica.

Os resultados mostraram que a matriz óssea inorgânica modifica sua composição e cristalinidade apenas até o sexto mês de vida dos animais estudados. Quanto à nanoestrutura dos ossos, os resultados mostraram que estes são formados por fibras de colágeno recobertas pela matriz óssea inorgânica.

Os estudos das propriedades da superfície dos fosfatos de cálcio demonstraram que ao serem imersos em soluções aquosas, sua superfície é transformada em CaHPO_4 . A modificação da superfície dos fosfatos de cálcio e a formação de um novo equilíbrio entre esta nova superfície formada e as soluções aquosas, explicam a características peculiares apresentadas pelos fosfatos de cálcio em soluções aquosas.

O entendimento dos processos pelas quais a superfície dos fosfatos de cálcio passa ao serem imersos em soluções aquosas é de suma importância para o entendimento dos processos biocompatíveis característicos destes materiais.

Abstract

Bone Mineral And Properties of the Interface Calcium Phosphates/Aqueous Solutions.

Calcium phosphates have good biocompatible properties and are similar in composition to the bone mineral of vertebrates. Owing to these properties, calcium phosphates have been extensively studied, yet a complete consensus on the characteristics of these materials is hitherto absent.

In this work we have studied some of the surface phenomena that take place when calcium phosphates are immersed in aqueous solutions, and sought to offer a comprehensive characterization of the bone mineral.

Results show that the bone mineral modifies its composition and crystallinity only up to the sixth month of age for the animals studied. As for bone nanostructure, results show that these are formed from collagen fibers coated with bone mineral.

Our studies on the surface properties of calcium phosphates have demonstrated that their surface transforms into CaHPO_4 when immersed in aqueous solutions. Calcium phosphate surface modification and the formation of a new equilibrium between this new surface and aqueous solutions account for the distinctive characteristics presented by calcium phosphates in aqueous solutions with pH between 6.0 and 7.4.

Knowledge of the processes that happen to calcium phosphates immersed in aqueous solutions is of utmost importance for an complete understanding of biocompatible processes characteristic of these materials.

Índice

Índice de tabelas	xviii
Índice de Figuras	xxiv
1 – Introdução	1
1.1 – Ossos	2
1.1.1- Matriz Óssea Inorgânica.	2
1.1.1.1 – Composição da Matriz Óssea Inorgânica.	3
1.1.1.2 – Composição e Cristalinidade da Matriz Óssea Inorgânica.	4
1.1.2- Nanoestrutura dos Ossos	4
1.1.3– Dificuldades na Caracterização da Matriz Óssea Inorgânica.....	6
1.1.4– Desproteínação dos Ossos.....	6
1.2 – Fosfatos de Cálcio.....	8
1.2.1 – Estudo de Propriedades de Superfície dos Fosfatos de Cálcio	8
1.2.2 – Modelos de Dissolução e Solubilidade dos Fosfatos de Cálcio.	9
1.2.2.1 – Adsorção de Íons Cálcio na Superfície dos Fosfatos de Cálcio.	11
1.3 – Propriedade de Superfície e Biocompatibilidade.	15
2 – Objetivos	17
3 – Materiais	18
3.1 – Materiais e Equipamentos Utilizados.	18
3.2 - Materiais Estudados.	20
3.2.1 - Fosfatos de cálcio.....	20
3.2.1.1 - Fosfato Sintetizado por Precipitação.	20
3.2.1.2 - Fosfatos Sintetizados em Sistemas Organizados.	21
3.2.2 - Matriz Óssea Inorgânica.	22
3.2.3 - Fluido Corpóreo Simulado Modificado (SBF) e Soluções de NaCl.	22
4 – Procedimentos	25
4.1- Obtenção da Matriz Óssea Inorgânica.....	25
4.2 – Caracterização dos Materiais Estudados	26
4.2.1 – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	26
4.2.2– Difratometria de Raios X (XRD)	26

4.2.3- Microscopia Eletrônica.....	27
4.2.4- Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido (ICP/OES).....	28
4.2.5- Análise Termogravimétrica	28
4.2.6 - Determinação dos tamanhos dos cristalitos da fase mineral pelo método de Debye-Scherrer	29
4.2.7 – Método de Rietveld.....	29
4.3 – Equilíbrio de Solubilidade / Isotermas de Adsorção	30
4.4 – Tratamentos Estatísticos.	30
5- Resultados e Discussão	32
5.1- Efeitos do Processo de Desproteínação.....	32
5.1.1- Espectroscopia de Infravermelho.....	32
5.1.2- Difratometria de Raios X.....	34
5.1.3- Análise Termogravimétrica (TGA).....	36
5.1.4- ICP-OES	39
5.1.5- Microscopia Eletrônica de Varredura	41
5.1.6- Considerações sobre os Resultados do Processo de Desproteínação.....	43
5.2 – Caracterização da Matriz Óssea Inorgânica.....	47
5.2.1- Composição	47
5.2.1.1 – Espectroscopia de FTIR.....	47
5.2.1.2 – Composição Elementar	51
5.2.2 – Difratometria de Raios X e Cristalinidade da Matriz Óssea Inorgânica	57
5.2.2.1 – Cristalinidade da Matriz Óssea Inorgânica.	60
5.2.3- Relação entre Composição e Cristalinidade	65
5.2.3.1- Considerações sobre a Relação entre a Composição e Cristalinidade.....	68
5.2.4 – Microscopia Eletrônica de Varredura.....	70
5.2.5- Organização da Matriz Óssea Inorgânica nos Ossos.....	80
5.3- Estudo da Superfície dos Fosfatos de Cálcio	88
5.3.1 - Tempo de Equilíbrio	88
5.3.2 – Isotermas	89
5.3.2- Adsorção de Íons Ca^{2+} na Superfície de Fosfatos de Cálcio.....	95
5.3.3 – Equilíbrio de Solubilização dos Fosfatos de Cálcio.....	104
5.4- Caracterização dos Fosfatos de Cálcio Após a Suspensão dos Sólidos em Soluções de NaCl ou SBF.....	122

5.5- <i>Considerações Sobre os Modelos de Dissolução e Equilíbrio de Fosfatos de Cálcio em Soluções Aquosas</i>	127
6 – Conclusões	131
6.1- <i>Caracterização da Matriz Óssea Inorgânica</i>	131
6.2- <i>Estudo da Superfície dos Fosfatos de Cálcio</i>	132
Apêndice 1	134
<i>Cálculo da constante de atividade dos íons presentes nas soluções estudadas</i>	134
Apêndice 2	142
Referências	166

Índice de tabelas

Tabela 1: Siglas que representam os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados e seu respectivo significado.....	22
Tabela 2: Composição inorgânica do Fluido Corpóreo Simulado Modificado (SBF-M) e fluido biológico real (BF). Concentração dos íons em mmol/l.....	24
Tabela 3: Concentração de Ca e P e razão molar Ca/P para os materiais estudados antes e após o processo de desproteínação (Hi). Os resultados são médias de três medidas independentes realizadas com três amostras distintas.....	40
Tabela 4: Atribuição das bandas dos espectros de FTIR. ''	50
Tabela 5: Fórmulas elementares determinadas para a matriz óssea inorgânica proveniente de crânio (C) e fêmur (F) de ratos Wistar com idades de 15 dias (D), 1 mês (M) 1 ano (AN) e 1 ano e meio (A6).....	56
Tabela 6: Parâmetros determinados utilizando-se o Método de Rietveld para a Hidroxiapatita.....	62
Tabela 7: Parâmetros determinados utilizando-se o Método de Rietveld para matriz óssea inorgânica proveniente de fêmur de um ano de idade.	63
Tabela 8: Resultado da análise de correlação entre a concentração de íons CO_3^{2-} , razão Ca/P e parâmetros cristalográficos.....	67
Tabela 9: Coeficiente de atividade dos íons presentes nas soluções estudadas. ...	108
Tabela 10. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 24 para o sistema hidroxiapatita/solução.	109
Tabela 11. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 24 para o sistema matriz óssea inorgânica/solução.	110
Tabela 12. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 24 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de micro-emulsão/solução.....	110

Tabela 13. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 24 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de emulsão de água em óleo/solução.	110
Tabela 14. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 24 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de cristal líquido /solução.	111
Tabela 15: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de NaCl a pH 6.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 16: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de SBF a pH 6,6.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 17: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de NaCl a pH 6.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 18: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de SBF a pH 6,6.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 19: Valores das constantes de solubilidade obtidos a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita /solução.	116
Tabela 20: Valores das constantes de solubilidade obtidos a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução.	118
Tabela 21. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 25 para o sistema hidroxiapatita/solução.	119
Tabela 22. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 25 para o sistema matriz óssea inorgânica /solução.	120

Tabela 23. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 25 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de micro-emulsão /solução.	120
Tabela 24. Valor médio da constante de equilíbrio obtido a partir da Equação 25 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de emulsão água em óleo /solução.	120
Tabela 25. Valor médio da constante de equilíbrio obtido a partir da Equação 25 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de micro-emulsão /solução.	121
Tabela 26: Constante de equilíbrio de CaHPO_4 em soluções de NaCl e SBF.....	121
Tabela 27: Concentração dos íons no SBF.	135
Tabela 28: Parâmetro a	140
Tabela 29: Coeficiente de atividade dos íons presentes nas soluções estudadas. .	140
Tabela 30: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de NaCl a pH 6,0.	143
Tabela 31: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de NaCl a pH 7,0.	144
Tabela 32: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de NaCl a pH 7,4.	145
Tabela 33: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de SBF a pH 6,6.	146
Tabela 34: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de SBF a pH 7,0.	147

Tabela 35: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de SBF a pH 7,4.	148
Tabela 36: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de NaCl a pH 6,0.	149
Tabela 37: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de NaCl a pH 7,0.	150
Tabela 38: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de NaCl a pH 7,4.	151
Tabela 39: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de SBF a pH 6,6.	152
Tabela 40: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de SBF a pH 7,0.	153
Tabela 41: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de SBF a pH 7,4.	154
Tabela 42: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido por Microemulsão /solução de NaCl a pH 6,0.	155

Tabela 43: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido por Microemulsão /solução de NaCl a pH 7,0.	156
Tabela 44: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido por Microemulsão /solução de SBF a pH 6,6.	157
Tabela 45: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido por Microemulsão /solução de SBF a pH 7,4.	158
Tabela 46: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em emulsão água em óleo /solução de NaCl a pH 6,0.....	159
Tabela 47: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em emulsão água em óleo /solução de NaCl a pH 7,4.....	160
Tabela 48: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em emulsão água em óleo /solução de SBF a pH 6,6.....	161
Tabela 49: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em emulsão água em óleo /solução de SBF a pH 7,4.....	162
Tabela 50: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em cristal líquido /solução de NaCl a pH 6,0.	163

Tabela 51: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em cristal líquido /solução de NaCl a pH 7,4.	164
Tabela 52: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em cristal líquido /solução de SBF a pH 6,6.....	165
Tabela 53: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em cristal líquido /solução de SBF a pH 7,4.....	165

Índice de Figuras

Figura 1: Diagrama representativo do modelo de nanoestruturação dos ossos mais aceito até o momento.	5
Figura 2: Modelo proposto por Gramain para a dissolução de hidroxiapatita, onde temos uma camada de adsorção, seguida de uma camada de troca iônica. A linha inclinada representa a variação da concentração de íons cálcio ao longo da camada de Nernst.	12
Figura 3: Fluxograma do procedimento de desproteinação de ossos com hidrazina.	26
Figura 4: Espectros de Infravermelho de osso (a), hidroxiapatita (b), CaHPO_4 (c) e CaCO_3 antes e após o processo com hidrazina.	33
Figura 5: Difrátogramas de raios x de osso (a), hidroxiapatita (b), CaHPO_4 (c) e CaCO_3 (d), antes e após a desproteinação.	35
Figura 6: Termogramas de osso (a, b) e hidroxiapatita (c, d) antes (a, c) e após a desproteinação (b, d).	37
Figura 7: Termogramas de CaHPO_4 (a, b) e CaCO_3 (c, d) antes (a, c) e após a desproteinação (b, d).	38
Figura 8: Micrografias de osso (a, b), hidroxiapatita (c, d), CaHPO_4 (e, f) e CaCO_3 (g, h) antes (a, c, e, g) e após a desproteinação (b, d, f, h).	42
Figura 9: Espectros de FTIR obtidos das matrizes ósseas inorgânicas obtidas de crânio (a, c) e fêmures (b, h) de ratos Wistar com: 15 dias (a, b) e 1 mês (c, d).	48
Figura 10: Espectros de FTIR obtidos das matrizes ósseas inorgânicas obtidas de crânio (a, c) e fêmures (b, d) de ratos Wistar com: 1 ano (a, b) e 1 ano e meio (c, d).	49

Figura 11: Concentração de Ca (a) ($p=0.0162$), P (b) ($p=0.0015$), Mg (c) ($p=0.0226$), Na (d) ($p=0.0003$) e razão Ca/P ($p<0.0001$) (e) da matriz óssea inorgânica proveniente de crânio (■) ou de fêmur (■) ao longo da vida dos animais.	52
Figura 12: Termogramas de matriz óssea inorgânica obtida de crânio (a, c) e fêmur (b, d) com 15 dias (a, b), 1 mês (c, d) de idade. Cada termograma foi obtido a partir de uma amostra formada pela mistura de matriz óssea inorgânica proveniente de diferentes animais da mesma idade.....	53
Figura 13: Termogramas de matriz óssea inorgânica obtida de crânio (a, c) e fêmur (b, d) com 1 ano (a, b) e 1 ano e meio (c, d) de idade. Cada termograma foi obtido a partir de uma amostra formada pela mistura de matriz óssea inorgânica proveniente de diferentes animais da mesma idade.....	54
Figura 14: Número de mols de CO_3^{2-} na fase óssea obtida de crânio (■) e fêmur (■) ao longo da vida dos animais. Concentração obtida por análise termogravimétrica.	55
Figura 15: Variação do tamanho dos cristais das matriz óssea inorgânica perpendicular ao plano 002 (a) ($p<0.0001$) e perpendicular ao plano 310 (b) ($p<0.0001$) obtidas de crânio (●) e fêmur (▲) ao longo da vida dos animais.	57
Figura 16: Variação da distância interplanar dos planos 002 (a) ($p=0.0012$) e 310 (b) ($p<0.0001$) das matriz óssea inorgânica obtidas de crânio (●) e fêmur (▲) ao longo da vida dos animais.....	58
Figura 17: Variação da razão da intensidade dos picos de difração referentes aos planos 002 e 310 (a) ($p=0.0012$) e da razão da intensidade das linhas de base (b) ($p=0.2045$) referentes a estes mesmos dois picos obtidos dos difratogramas da matriz óssea inorgânica proveniente de crânio (●) e fêmur (▲) ao longo da vida dos animais.	58

Figura 18: Representação da célula unitária de hidroxiapatita com a indicação dos planos 310 e 002 indicados obtida pelo programa Diamond 3.1.....	59
Figura 19: Difrátogramas de hidroxiapatita cristalina, matriz óssea inorgânica, apresentando a diferença de intensidade na linha base.....	60
Figura 20: Gráfico de Rietveld para hidroxiapatita sintética.....	61
Figura 21: Gráfico de Rietveld para matriz óssea inorgânica proveniente de fêmur de um ano de idade.....	63
Figura 22: Correlações entre a concentração de íons CO_3^{2-} (□) e razão Ca/P (●) com os parâmetros cristalográficos ao longo da vida dos animais.....	66
Figura 23: Micrografias de matriz óssea inorgânica de crânios (a, c) e fêmures (b, d) com 15 dias (a, b), 1 mês (c, d) de idade, aumento de 1.000x.	71
Figura 24: Micrografias de matriz óssea inorgânica de crânios (a, c) e fêmures (b, d) com 1 ano (a, b) e 1 ano e meio (c, d) de idade, aumento de 1.000x.	72
Figura 25: Micrografias de matriz óssea inorgânica de crânios (a, c) e fêmures (b, d) com 15 dias (a, b), 1 mês (c, d) de idade, aumento de 10.000x.	73
Figura 26: Micrografias de matriz óssea inorgânica de crânios (a, c) e fêmures (b, d) com 1 ano (a, b) e 1 ano e meio (c, d) de idade, aumento de 10.000x.	74
Figura 27: Micrografias de fratura de matriz óssea inorgânica proveniente de crânio: 1 ano (a), superfície de crânio 1 ano (b, c), fratura de fêmur 15 dias (d), 1 mês (e) e 1 ano (f).	76
Figura 28: Microscopias da matriz óssea inorgânica proveniente de crânio de 1 ano de idade com aumento de 100.000x (a,b, c, d, e) e 150.000x (f).....	78
Figura 29: Microscopias da matriz óssea inorgânica proveniente de crânio de animais com idade de um ano e meio. Aumentos de 100.000x.....	79
Figura 30: Distribuição dos diâmetros das fibras observadas nas micrografias de ossos descalcificados e ossos frescos.....	83

Figura 31: Estruturas recriadas de acordo com o modelo proposto. Sobreposição destas estruturas em micrografias de matriz óssea.	86
Figura 32: Variação da concentração de Ca^{+2} em solução de NaCl em contato com hidroxiapatita ao longo do tempo a $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$	88
Figura 33: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de NaCl a pH 6, 7 e 7,4 para hidroxiapatita.	90
Figura 34: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de NaCl a pH 6, 7 e 7,4 para matriz óssea inorgânica proveniente de animais de 1 ano.	90
Figura 35: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de NaCl a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em micro emulsão.	91
Figura 36: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de NaCl a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em emulsão água/óleo.	91
Figura 37: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de NaCl a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em cristal liquido.	92
Figura 38: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em SBF a pH 6, 7 e 7,4 para hidroxiapatita.	92
Figura 39: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em SBF a pH 6, 7 e 7,4 para matriz óssea inorgânica proveniente de animais de 1 ano.	93

Figura 40: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em SBF a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em micro emulsão.	93
Figura 41: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em SBF a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em emulsão água/óleo.	94
Figura 42: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de SBF a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em cristal líquido.	94
Figura 43: Isotermas de adsorção para hidroxiapatita a diferentes pH em solução de NaCl e SBF construídas segundo uma isoterma de Langmuir.	96
Figura 44: Isotermas de adsorção para matriz óssea inorgânica proveniente de animais de um ano de idade a diferentes pH em solução de NaCl e SBF construídas segundo uma isoterma de Langmuir.	97
Figura 45: Isotermas de adsorção para fosfato de cálcio obtido em sistema de microemulsão a diferentes pH em solução de NaCl e SBF construídas segundo uma isoterma de Langmuir.	98
Figura 46: Isotermas de adsorção para fosfato de cálcio obtido em sistema de água em óleo a diferentes pH em solução de NaCl e SBF construídas segundo uma isoterma de Langmuir.	99
Figura 47: Isotermas de adsorção para fosfato de cálcio obtido em sistema de cristal líquido a diferentes pH em solução de NaCl e SBF construídas segundo uma isoterma de Langmuir.	100
Figura 48: Isotermas de adsorção de íons Ca^{2+} seguindo o modelo de Freundlich para hidroxiapatita a diferentes pH em solução de NaCl e SBF.	102

Figura 49: Isotermas de adsorção de íons Ca^{2+} seguindo o modelo de Freundlich para matriz óssea inorgânica a diferentes pH em solução de NaCl e SBF.....	103
Figura 50: Espectros de FTIR da matriz óssea inorgânica imersos por diferentes períodos em SBF.....	123
Figura 51: Espectros de FTIR de hidroxiapatita imersos por diferentes períodos em SBF.....	124
Figura 52: Difractogramas de raios x de hidroxiapatita imersos por diferentes períodos em SBF.....	125
Figura 53: Difractogramas de raios x de hidroxiapatita imersos por diferentes períodos em SBF.....	126

1 – Introdução

Fosfatos de cálcio têm sido estudados nos últimos 50 anos de forma intensa e abrangente. O grande interesse nestes materiais se justifica primeiramente pelo fato de que a matéria inorgânica dos ossos é formada por fosfatos de cálcio. Assim estes materiais apresentam propriedades biocompatíveis surpreendentes.

Estas propriedades são demonstradas em estudos “*in vivo*” onde próteses ou corpos de prova formados por estes materiais, ao serem implantados, apresentam osteointegração e osteocondutividade.

Apesar da importância e da grande quantidade de estudos sobre os fosfatos de cálcio, ainda hoje, não há um completo consenso sobre as características físico-químicas, mecânicas e morfológicas destes materiais. As principais questões ainda insatisfatoriamente respondidas sobre os fosfatos de cálcio são:

- Qual é a composição, cristalinidade e morfologia da matriz óssea inorgânica?
- Como os parâmetros: composição, cristalinidade e morfologia da matriz óssea inorgânica, variam ao longo da vida dos animais?
- Quais as reações e fenômenos que controlam a dissolução e o equilíbrio de solubilidade dos fosfatos de cálcio em soluções aquosas?
- Quais são as características dos fosfatos de cálcio que determinam as suas propriedades biocompatíveis?

Este trabalho foi concebido com o objetivo de avançar no conhecimento sobre os fosfatos de cálcio procurando contribuir para o esclarecimento de algumas das questões apresentadas acima.

Foi dada especial atenção à caracterização da matriz óssea inorgânica, sendo caracterizadas matrizes ósseas inorgânicas provenientes de ratos Wistar com

diferentes idades compreendendo todo o período de vida dos mesmos.

Neste trabalho também foram estudados os fenômenos e características físico-químicas dos fosfatos de cálcio quando imersos em soluções aquosas com força iônica controlada ou em Fluido Corpóreo Simulado (SBF). A partir do estudo do equilíbrio nestes sistemas foram avaliados modelos existentes que procuram explicar a dissolução e a solubilidade dos fosfatos de cálcio. A partir destes estudos foi possível formular uma nova hipótese para explicar os fenômenos que ocorrem com os fosfatos de cálcio em solução. Esta hipótese, coerente com os dados experimentais obtidos neste trabalho e com os trabalhos publicados na literatura, sugere que a superfície dos fosfatos de cálcio é modificada quando eles são imersos em soluções aquosas.

1.1 – Ossos

1.1.1- Matriz Óssea Inorgânica.

A matriz óssea inorgânica é formada por fosfatos de cálcio com reduzida cristalinidade,¹⁻⁵ concentração variada de CO_3^{2-} e uma razão molar Ca/P que varia com a idade dos animais (se aproximando do valor 1,67^{6, 7} a medida que os animais envelhecem). Além dos íons Ca^{2+} , fosfatos e carbonatos a matriz óssea inorgânica apresenta em sua composição, outros íons como Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- e F^- .

Apesar da cristalinidade e composição da matriz óssea inorgânica terem sido largamente estudadas, até o momento não foi possível estabelecer claramente a relação entre estas duas propriedades. Outro fato ainda sem consenso diz respeito à

composição da matriz óssea inorgânica, principalmente quanto à presença ou não, de hidroxilas em sua composição^{8,9}.

Quanto à morfologia da matriz óssea inorgânica, é aceito que os ossos são formados por partículas nanométricas de fosfatos de cálcio dispersos em uma matriz amorfa de colágeno. Apesar de existir um grande número de estudos sobre a matriz óssea inorgânica a nanoarquitetura dos ossos é frequentemente negligenciada nos trabalhos e modelos ósseos¹⁰⁻¹². Dessa forma, ainda hoje, apesar dos estudos, um modelo definitivo da organização e nanoestrutura dos ossos não existe.

1.1.1.1 – Composição da Matriz Óssea Inorgânica.

A da composição da matriz óssea inorgânica tem sido relatada em vários trabalhos na literatura. De forma geral, a composição da matriz óssea inorgânica é determinada por métodos indiretos de análise (através de considerações estequiométricas) ou diretamente, pela determinação dos elementos nas cinzas de ossos calcinados¹³⁻¹⁶. Entretanto, as determinações diretas apresentam o inconveniente de que os íons CO_3^{2-} e HPO_4^{2-} são decompostos na calcinação.

Neste trabalho, a concentração de Ca, $\text{P}_{(\text{total})}$, Na, Mg foi determinada por ICP-OES diretamente da matriz óssea inorgânica obtidas por desproteínação com hidrazina. As concentrações de CO_3^{2-} e HPO_4^{2-} foram determinadas diretamente na matriz óssea inorgânica por Análise Termogravimétrica (TGA). Já a concentração de OH^- foi obtida a partir do balanço de cargas realizada a partir dos resultados da análise dos outros íons presentes na matriz óssea inorgânica.

1.1.1.2 – Composição e Cristalinidade da Matriz Óssea Inorgânica.

Na literatura são encontrados trabalhos que mostram que a cristalinidade da hidroxiapatita (modelo da matriz óssea inorgânica) decresce à medida que aumenta a concentração de íons carbonato em seu retículo cristalino aumenta.¹⁷ Por outro lado, estudos sobre a matriz óssea inorgânica mostraram que a medida que os animais envelhecem, a concentração de íons carbonato aumenta^{6, 18} simultaneamente com a cristalinidade.^{19, 20} Essa diferença de comportamento entre a matriz óssea inorgânica e a hidroxiapatita não foi esclarecida até o momento.¹⁸

Estudos espectroscópicos²¹ sobre o aumento da concentração de íons carbonato demonstraram que a incorporação destes íons ocorre preferencialmente pela substituição dos íons PO_4^{3-} no retículo cristalino da matriz óssea inorgânica.^{22, 23}

Nos trabalhos realizados por Burnell¹⁸, foi demonstrado que existe de fato uma correlação entre o tamanho dos cristais perpendicular ao eixo cristalográfico *ab* e a razão molar $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ da matriz óssea inorgânica. Apesar de ter demonstrado essa correlação, Burnell não demonstrou completamente quais parâmetros cristalográficos da matriz óssea inorgânica são alterados pela incorporação dos íons carbonatos ao longo da vida dos animais.

1.1.2- Nanoestrutura dos Ossos

Os modelos mais aceitos que descrevem a nanoestrutura dos ossos assumem que a formação da matriz óssea inorgânica ocorre preferencialmente dentro das fibrilas de colágeno, entre as moléculas de tropocolágeno²⁴⁻³¹.

Estes modelos são baseados principalmente em micrografias de transmissão eletrônica (TEM)^{26, 27, 30, 32-34} e mais recentemente em micrografias de força atômica (AFM)^{29, 35-38}.

O diagrama apresentado na Figura 1 representa o modelo da nanoestrutura dos ossos mais aceito até o momento.

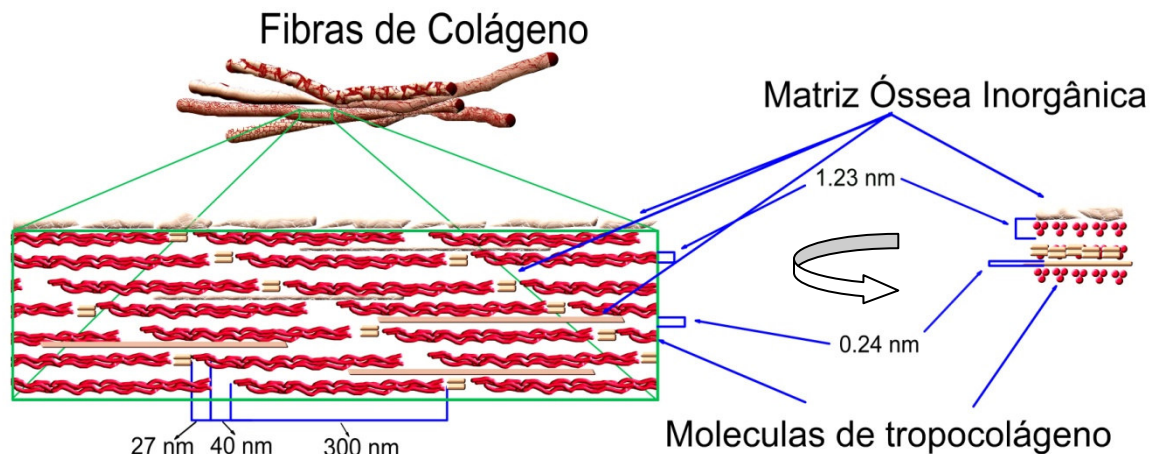


Figura 1: Diagrama representativo do modelo de nanoestruturação dos ossos mais aceito até o momento.

De acordo com o modelo apresentado na Figura 1, é esperado que micrografias de transmissão eletrônica de cortes longitudinais dos ossos mostrem filas de cristais de fosfatos de cálcio, com dimensões de 40 nm de largura, 1,71 nm de espessura e comprimentos variáveis. As fileiras de cristais devem apresentar (segundo o modelo) um espaçamento de aproximadamente 5 nm entre os cristais o que corresponde à espessura de 4 moléculas de tropocolágeno.

Apesar destes modelo ser o mais aceito para a nanoarquitetura dos ossos as estruturas previstas pelos modelos, até o momento não foram observadas de forma incontestável nas diversas micrografias obtidas por diferentes técnicas de diversos ossos provenientes de diferentes animais.

Uma vez que o modelo existente não é capaz de descrever as micrografias observadas dos ossos, neste trabalho apresentamos um novo modelo de nanoestruturação dos ossos, consistente com todos os fatos experimentais de caracterização da matriz óssea. Esse modelo é baseado e confirmado pela dimensão das fibrilas de colágeno e pelas dimensões dos cristais observados em diferentes micrografias.

1.1.3– Dificuldades na Caracterização da Matriz Óssea Inorgânica.

Como afirmado anteriormente, apesar da grande quantidade de trabalhos existentes na literatura sobre a caracterização da matriz óssea inorgânica não existe consenso total sobre a composição, cristalinidade e morfologia destes materiais.

Uma das razões pela qual não há consenso sobre as características da matriz óssea inorgânica é o fato de que os trabalhos existentes na literatura utilizam diferentes animais (desde peixes até mamíferos passando por todo o reino animal), o que dificulta uma comparação mais refinada dos resultados experimentais.

Contudo a principal dificuldade na caracterização da matriz óssea inorgânica é a obtenção da matriz óssea inorgânica livre dos interferentes orgânicos presentes nos ossos. Até o momento várias técnicas foram desenvolvidas com esse objetivo^{21, 13, 39-46}.

1.1.4– Desproteinação dos Ossos.

O grande desafio para os procedimentos de desproteinação sempre foi a eficiência na desproteinação associada à manutenção das características da matriz óssea inorgânica. A maioria dos procedimentos existentes de desproteinação altera a matriz óssea inorgânica devido ou a reações químicas entre os reagentes e a matriz óssea inorgânica ou a transformações neste material, causadas pela utilização de temperaturas elevadas.

A eliminação da matriz orgânica é um fator crucial para um estudo seguro da matriz óssea inorgânica devido ao fato de que a matriz orgânica interfere principalmente em medidas onde se utilizam técnicas como difratometria de raios x, espectroscopia de infravermelho e outras técnicas que utilizam a radiação para a análise das amostras. Essa interferência ocorre principalmente devido à absorção e ao espalhamento da radiação pela matriz óssea orgânica^{47,48}. Além da interferência nos estudos que utilizam radiação, a matriz orgânica pode, também, interferir significativamente no estudo da morfologia da matriz óssea inorgânica, uma vez que a presença desta matriz pode alterar as dimensões observadas pelas técnicas de microscopia.

Em 1973 Termine propôs um método de desproteinação dos ossos utilizando hidrazina⁴⁶. Este processo se tornou um dos processos de desproteinação mais utilizados para o estudo da matriz óssea inorgânica.

Desde a criação do processo de desproteinação com hidrazina este tem sido largamente discutido na literatura (nos últimos 30 anos⁴⁹⁻⁵³) principalmente devido às possíveis alterações que o processo possa causar na matriz óssea inorgânica.

Apesar da existência das críticas ao procedimento de desproteinação existe um número significativo de pesquisadores que, ao utilizar o procedimento, concluíram que ele não causa alteração na matriz óssea inorgânica^{5, 18, 54, 55}, ou na pior das hipóteses, causa apenas alterações insignificantes.⁵⁶

Como afirmado anteriormente, apesar da falta de consenso, acerca do processo proposto por Termine, este continua sendo largamente utilizado por vários pesquisadores que estudam a matriz óssea inorgânica⁵⁷⁻⁶¹ e a questão: “A desproteínação com hidrazina pelo método de Termine altera de fato, a fase óssea mineral?” permanece sem resposta.

Como a resposta a esta questão é fundamental para a validade dos resultados e conclusões deste trabalho, os efeitos do processo de desproteínação por hidrazina foram avaliados de forma ampla tanto na matriz óssea inorgânica quanto em materiais que têm importância biológica como hidroxiapatita, CaHPO_4 ⁶² e CaCO_3 ²².

1.2 – Fosfatos de Cálcio

1.2.1 – Estudo de Propriedades de Superfície dos Fosfatos de Cálcio

Embora os estudos realizados sobre os fosfatos de cálcio, até o momento, tenham resultado em um grande volume de informações sobre biocerâmicas por eles constituídas, ainda não foi possível explicar quais são os fenômenos e características que determinam a biocompatibilidade destes materiais. Tem sido reportado com frequência que as propriedades ligadas à biocompatibilidade destas biocerâmicas, devem-se mais a propriedades de sua superfície e de como ela se modifica ao longo do tempo após ser implantada, do que as características do “bulk”⁶³⁻⁶⁷.

A interação dos fosfatos de cálcio com os fluidos biológicos, nos organismos vivos, ocorre de forma particular na superfície destes materiais, em processos que resultam na sua degradação ou na sua formação. A degradação da matriz óssea inorgânica contida nos ossos ocorre através dos osteoclastos que liberam ácido de forma localizada em um determinado ponto do osso causando a sua dissolução. A formação dos fosfatos de cálcio, nos organismos vivos, ocorre pela ação das células conhecidas como osteoblastos^{68,69,70}.

A ação conjunta destes mecanismos (dissolução e cristalização) dentro é responsável pelo “turnover” de cálcio no organismo, ligado a todo processo de modelagem óssea, assim como ocorrência de diversas enfermidades, dentre estas a osteoporose.

Os processos de dissolução e formação de diversos fosfatos de cálcio tão importantes para as propriedades biocompatíveis destes materiais têm sido estudados através de medidas de cinética de dissolução e também através de estudos que envolvem o equilíbrio entre o fosfato sólido e uma solução aquosa.⁷¹⁻

78

1.2.2 – Modelos de Dissolução e Solubilidade dos Fosfatos de Cálcio.

Hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) e apatitas ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$,...) não apresentam uma constante de solubilidade (K_{ps}) definida. A literatura tem reportado que o valor da constante de solubilidade para a hidroxiapatita, calculada a partir da Equação 1, apresenta valores entre 10^{-50} a 10^{-60} .⁷⁹

$$K_{HA} = (\text{Ca}^{+2})^5 (\text{PO}_4^{-3})^3 (\text{OH}^-)$$

Equação 1

Além da variação da constante de solubilidade, a cinética de dissolução da hidroxiapatita não ocorre de forma usual. Ao se acompanhar a concentração de íons Ca^{2+} e fosfatos em uma solução onde esteja ocorrendo a dissolução de hidroxiapatita é observado que esta não se dissolve seguindo a estequiometria do composto.

Para se tentar explicar estes fenômenos de solubilidade e dissolução atípicos tem-se criado vários modelos que tentam descrever os fenômenos que ocorrem com as apatitas quando elas são imersos em soluções. Alguns destes modelos têm atribuído à solubilidade atípica a adsorção de íons na superfície destes materiais quando imersos em soluções aquosas.^{16-24, 13,14}

Os modelos existentes podem ser divididos em modelos que tratam do equilíbrio de solubilidade dos fosfatos de cálcio e em modelos que tratam da dissolução não estequiométrica dos mesmos. Dentre os modelos que tratam do equilíbrio de solubilidade dos fosfatos de cálcio podemos citar os modelos de Equilíbrio Meta Estável (MES)^{79, 80} e o modelo Polinuclear⁸¹. Dentre os modelos que tratam da dissolução não estequiométrica dos fosfatos de cálcio podemos citar o modelo da camada de adsorção de íons cálcio proposto por Gramain.⁷²⁻⁷⁶

O modelo do equilíbrio meta-estável considera que a solubilidade das apatitas é controlada pela competição entre a velocidade de dissolução e a velocidade de cristalização do material na superfície, até que esses dois fenômenos ocorram com velocidades iguais. No caso das apatitas, essa igualdade ocorre antes que seja atingido o K_p teórico.^{13, 14, 24}

No modelo polinuclear assume-se que a superfície das apatitas é composta por vários sítios onde ocorre a dissolução. Neste modelo a dissolução se encerra à medida que os sítios de dissolução são consumidos ao longo do processo de solubilização.

O modelo da camada de adsorção afirma que à medida que o fosfato de cálcio se dissolve há um aumento da concentração de Ca^{+2} na solução e na vizinhança do sólido e simultaneamente ocorre à adsorção destes íons na superfície formando uma camada de Ca^{+2} adsorvida no material.

O estudo do modelo de adsorção de íons cálcio na superfície dos fosfatos de cálcio proposto por Gramain foi tema de dissertação de mestrado realizado recentemente neste grupo de pesquisa⁸². Os resultados dessa dissertação levantaram novas questões sobre a adsorção de íons Ca^{2+} , portanto um dos objetivos deste trabalho foi avaliar se existe de fato a adsorção de íons cálcio na superfície dos fosfatos de cálcio quando estes são imersos em soluções aquosas.

1.2.2.1 – Adsorção de Íons Cálcio na Superfície dos Fosfatos de Cálcio.

Durante vários anos foi sugerido na literatura que a explicação para o comportamento observado na dissolução de hidroxiapatita, matriz óssea inorgânica e esmalte dentário passaria pela determinação da adsorção de íons cálcio na superfície destes materiais^{83, 84, 85}. Apesar das varias indicações na literatura da ocorrência da adsorção dos íons cálcio é interessante notar que estes trabalhos sempre indicaram a necessidade da realização de um estudo completo do processo de adsorção.

Gramain utilizou em seu modelo de dissolução a hipótese de adsorção de íons cálcio na superfície dos fosfatos de cálcio para explicar a dissolução dos fosfatos de cálcio. O modelo é representado de forma sucinta na Figura 2 onde é demonstrado que à medida que a apatita se dissolve há um aumento da concentração de Ca^{+2} na solução e na vizinhança do sólido e simultaneamente

ocorre à adsorção destes íons na superfície formando uma camada de Ca^{+2} adsorvida no material.

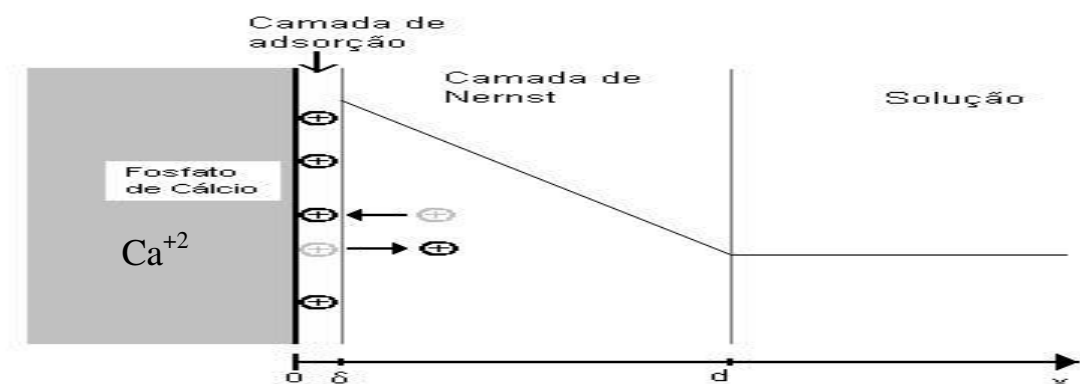


Figura 2: Modelo proposto por Gramain para a dissolução de hidroxiapatita, onde temos uma camada de adsorção, seguida de uma camada de troca iônica. A linha inclinada representa a variação da concentração de íons cálcio ao longo da camada de Nernst.

Neste trabalho com o objetivo de confirmar se de fato ocorre à adsorção de íons cálcio na superfície dos fosfatos de cálcio, o que por consequência validaria em parte o modelo de Gramain, foram feitas isotermas para a adsorção de íons cálcio na superfície de diferentes fosfatos de cálcio.

A avaliação do modelo de Gramain consistiu em a partir dos dados fornecidos pelas isotermas de adsorção avaliar se de fato ocorre uma adsorção de íons cálcio na superfície dos fosfatos de cálcio e se essa adsorção pode ser tratada de acordo com o modelo de adsorção proposto por Langmuir ou Freundlich.⁸⁶

O modelo de isoterma de adsorção de Langmuir, inicialmente incorporado ao modelo de dissolução dos fosfatos de cálcio por Gramain, assume que a adsorção ocorre na forma de uma monocamada de íons adsorvidos na superfície. Assume também que todos os sítios de adsorção na superfície são equivalentes e que a adsorção de uma espécie em um sítio de adsorção é independente da ocupação dos sítios vizinhos.

A isoterma de Langmuir pode ser representada pela equação seguinte:

$$k = \frac{N_2^s a_l}{N_l^s a_2} \quad \text{Equação 2}$$

Onde k é a constante de equilíbrio para o equilíbrio de adsorção, a_2 e a_l são os coeficientes de atividade do solvente e do soluto, respectivamente, e N_l^s e N_2^s são as frações molares do solvente e do soluto. Para soluções onde a força iônica não varia, podemos escrever $b = k/a_l$ (a_l = atividade do soluto) e $N_2^s + N_l^s = 1$. Assim, a Equação 2 torna-se:

$$N_2^s = \frac{n_2^s}{n^s} = \theta = \frac{ba_2}{1 + ba_2} \quad \text{Equação 3}$$

Onde θ é a fração da superfície ocupada pelo soluto e n^s é o número de sítios de adsorção por grama e n_2^s é o número de sítios ocupados. A constante b pode ser relacionada com o calor de adsorção (Q) através da Equação 4.

$$b = b' e^{\frac{Q}{RT}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde b' é uma constante.

Utilizando o modelo de Langmuir, podemos relacionar as variáveis anteriores através da Equação 5.

$$\frac{C_2}{n_2^s} = \frac{1}{n^s b} + \frac{C_2}{n^s}$$

Equação 5

Dessa forma, se uma isoterma de adsorção segue o modelo de Langmuir o gráfico de C_2/n_2^s em função de C_2 é uma reta com coeficiente angular igual a $1/n^s$ e coeficiente linear igual a $1/n^s b$.

Já a adsorção descrita pelo modelo de Freundlich não ocorre como uma monocamada de espécies adsorvidas e não impõem um limite de saturação da superfície.

O tratamento matemático de uma isoterma de Freundlich inicia-se com a Equação 6, que representa uma isoterma de adsorção experimental. [Erro! Indicador não definido.](#)

$$\Theta(C_2, T) = \int_0^\infty f(b) \theta(C_2, b, T) db$$

Equação 6

Onde $f(b)$ é a função de distribuição para b , e $\theta(C_2, b, T)$ é a função da isoterma de adsorção. Essa abordagem é um método alternativo onde não é necessário obter os coeficientes de atividade das espécies na superfície.

Assumindo-se que as variações de b e θ são atribuídas apenas à variação do calor de adsorção Q , temos:

$$f(Q) = \alpha e^{-\frac{Q}{nRT}}$$

Equação 7

Utilizando a Equação 7 e resolvendo a Equação 6 temos:

$$\Theta = \frac{n_2^s}{n^s} = \alpha RTnb' C_2^{\frac{1}{n}} = a C_2^{\frac{1}{n}}$$

Equação 8

Onde a e n são constantes para uma determinada solução.

As constantes a , n^s e n podem ser obtidas a partir dos gráficos de $\log n_2^s$ em função de $\log C_2$, determinando assim a adsorção das espécies.

Além de avaliar o modelo de Gramain procuramos também relacionar os estudos de adsorção com as condições fisiológicas pelas quais os implantes de fosfatos de cálcio passam ao serem implantados, os estudos foram realizados em sistemas que simulam algumas características encontradas nos organismos vivos. Para simular as condições dos organismos vivos os estudos foram realizados em sistemas compostos por fluido corpóreo simulado (SBF), com pH controlado pelo tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ a 37° C.

1.3 – Propriedade de Superfície e Biocompatibilidade.

As modificações que ocorrem na superfície dos fosfatos de cálcio quando estes são imersos em soluções aquosas, ou mesmo implantado, têm sido consideradas como um dos fatores determinantes na interação dos sistemas vivos com estes materiais.^{40, 41, 5}

Estas modificações são decorrentes das reações de dissolução, reprecipitação e troca de íons, principalmente na superfície dos fosfatos de cálcio que se encontram em contato com as soluções ou fluidos biológicos presentes no organismo. Ao final destes processos a superfície do fosfato de cálcio encontra-se alterada, sendo formada uma superfície conhecida como “apatita biológica”.⁸⁷

O resultado mais interessante destes estudos sobre a modificação de superfície é que as superfícies formadas são semelhantes para os diversos tipos de implantes ósseos, desde biovidros a todos os tipos de fosfatos de cálcio.⁸⁷

O fato de que todas as superfícies serem modificadas para uma apatita biológica comum indica que o estudo das modificações na superfície dos fosfatos de cálcio, e principalmente a descoberta de como essa superfície é formada e a sua composição, pode permitir avançar consideravelmente no entendimento dos fatores que determinam o sucesso ou não de implantes ósseos.

2 – Objetivos.

- 1- Caracterizar a matriz óssea inorgânica quanto à composição, cristalinidade e morfologia
- 2- Caracterizar as modificações que ocorrem na matriz óssea inorgânica ao longo da vida dos animais estudados.
- 3- Estudar modificações que ocorrem com a matriz óssea inorgânica, hidroxiapatita, monetita (CaHPO_4) e fosfatos de cálcio sintéticos quando imersos em soluções aquosas tais como fluido biológico simulado.
- 4- Avaliar a validade do modelo de adsorção de íons cálcio na superfície de fosfatos de cálcio quando imersos em soluções aquosas de acordo com o modelo proposto por Gramain.
- 5- Propor novos modelos para os fenômenos que ocorrem com os fosfatos de cálcio em equilíbrio com soluções aquosas.

3 – Materiais

3.1 – Materiais e Equipamentos Utilizados.

- pHmetro Digital PG2000 – Gehaka
- Eletrodo de Vidro Digimed
- Microeletrodo de Vidro Digimed
- Termo-compensador
- Banho Dubnoff - Quimis
- Banho Ultratermostático – Cientec
- Difratorômetro Shimadzu XDR- 7000
- Espectrofotômetro FT-IR Bomem da série MB-100
- EDS - JSM6360 – LV – Noran System Six.
- Microscópio Eletrônico de Varredura – Jeol/EO - JSM-6360
- Metalizador Bal-Tec Med 020
- TGA - Universal V2.3C TA instruments
- Espectrômetro de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido Optima 3000 DV
- Microfiltro de 0,2 µm Milipore
- Microfiltro de 3 µm Milipore

- Almofariz e pistilo
- Agitador magnético
- Vidraria

Reagentes

- Matriz óssea inorgânica proveniente de fêmur e crânio de ratos Wistar
- Fosfato de cálcio (Hidroxiapatita) – Sintetizada em nosso grupo de pesquisa

- KH_2PO_4 – Synth
- HCl – Nuclear
- Hidrazina – 90%
- Hidrazina – Aldrich 64%
- Hidrazina – Aldrich 25%
- Etanol – Synth
- NaHCO_3 – Nuclear
- KCl – Carlo Erba
- CO_2 – White Martins
- N_2 – White Martins
- NaOH – Merck
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Synth
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Mallinckrodt
- CaHPO_4 - Synth
- $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - ECIBRA
- NH_4OH – Merck

- $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ – Cinética Química
- NaCl – Mallinckrodt
- H_3PO_4 – Synth

3.2 - *Materiais Estudados.*

3.2.1 - *Fosfatos de cálcio.*

3.2.1.1 - Fosfato Sintetizado por Precipitação.

Hidroxiapatita (HA) foi sintetizada por precipitação direta de acordo com o procedimento desenvolvido por Macipe *et al.*⁸⁸, partindo das soluções aquosas de Ca^{2+} e PO_4^{3-} .

Resumidamente o procedimento consiste: em um balão de fundo redondo foram adicionados 250 mL da solução de K_2HPO_4 (2,295 mol/L) a velocidade de 0,1 mL/min em 1500 mL de solução de CaCl_2 (0,510 mol/L). O sistema foi mantido a temperatura de 85° C, sob atmosfera de nitrogênio, agitação de 1960 RPM e o pH da solução foi controlado adicionando-se quando necessário soluções de KOH (3 mol/L) e HCl (1 mol/L).

Ao final da adição de 250 mL da solução de K_2HPO_4 o sistema foi deixado em agitação sob atmosfera de nitrogênio por cinco dias. Após este período o material resultante foi filtrado.

Após seco, o material foi tratado a 300°C por 2 horas.

3.2.1.2 - Fosfatos Sintetizados em Sistemas Organizados.

A metodologia para a síntese dos fosfatos de cálcio nanoparticulados foi desenvolvida como parte de projeto de Doutorado conduzido em nosso laboratório.⁸⁹

Estes fosfatos de cálcio foram sintetizados em sistemas formados por microemulsões reversas, cristal líquido e emulsão de água em óleo. Os sistemas eram compostos por um sistema trifásico: Renex 100[®], ciclohexano e solução aquosa contendo íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} ou solução de amônia.

Para a síntese dos fosfatos de cálcio as misturas dos sistemas trifásicos foram estocadas por 10 dias em geladeira a temperatura de 2°C. Após este período, a mistura foi retirada da geladeira, e centrifugada a 2500 rpm. O material foi então lavado com etanol, seco ao ar e triturado. Por fim o material foi lavado em acetona quente em extrator sohxlet.

Os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados apresentam partículas com tamanho da ordem de nanômetros, cristalinidade reduzida, apresentando morfologia acicular, globular ou na forma de filme, e com razão Ca/P entre 1,3 e 1,8.

As siglas utilizadas para identificar os fosfatos, a partir do tipo de sistema utilizado para as sínteses são indicadas na Tabela 1.

Tabela 1: Siglas que representam os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados e seu respectivo significado.

Siglas utilizadas	Significado das Siglas.
ME	Fosfato de cálcio sintetizado em microemulsão de água em óleo.
CL	Fosfato de cálcio sintetizado em cristal líquido.
EW	Fosfato de cálcio sintetizado em emulsão de água em óleo.

3.2.2 - Matriz Óssea Inorgânica.

A matriz óssea inorgânica foi obtida de 30 ratos Wistar provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram divididos em grupos (formados por 5 indivíduos) de 15 dias, um mês, seis meses, um ano, um ano e meio e dois anos. A dieta e os estímulos físicos ao longo da vida de todos os animais foram rigorosamente iguais.

3.2.3 - Fluido Corpóreo Simulado Modificado (SBF) e Soluções de NaCl.

A solução denominada de fluido corpóreo simulado (SBF), com composição iônica semelhante ao do plasma sanguíneo, é utilizada para simular as condições existentes nos organismos vivos. A utilização do SBF *in vitro* possibilita o estudo das modificações e fenômenos que ocorrem na interface fosfato de cálcio/fluido biológico quando este material é implantado, e também dos fenômenos que ocorrem na superfície da matriz óssea inorgânica ao longo da vida dos animais.

O SBF mais utilizado na literatura apresenta uma concentração de íons semelhante à composição do fluido biológico, diferindo apenas na concentração de Cl^- e CO_3^{2-} , e utiliza os tampões Tris ou HEPES. Essa pequena diferença de composição, principalmente no que se refere ao carbonato, possivelmente altera a composição e morfologia dos fosfatos de cálcio formados em diversas superfícies quando estas estão em contato com este fluido.

Dessa forma, ao longo dos anos, foram criados diferentes fluidos biológicos simulados com o objetivo de se aproximar ao máximo da composição iônica presente no fluido biológico humano. Apesar destas alterações na composição iônica, estes fluidos modificados sempre contêm os tampões Tris ou HEPES e a concentração de carbonato ou não é idêntica à do fluido biológico ou varia com o tempo.

Neste trabalho, desenvolvemos uma nova metodologia de preparação e controle do pH no SBF, onde o controle do pH é realizado com o tampão $\text{HCO}_3^{3-} / \text{CO}_3^{2-}$ obtido pelo borbulhamento dos sistemas com CO_2 gasoso. Desta forma o SBF apresenta a mesma composição iônica do fluido biológico humano, e paralelamente, mantém as concentrações de HCO_3^- constante ao longo do tempo.

Além da manutenção do pH pela saturação com CO_2 , a metodologia empregada permite a variação do pH de maneira semelhante ao que ocorre nos organismos vivos.

A estabilidade do pH nos sistemas tamponados com $\text{HCO}_3^{3-} / \text{CO}_3^{2-}$ foi avaliada em função do tempo e os resultados mostraram que soluções com pH em torno de 7,4 a 37°C apresentam uma variação de $\pm 0,2$ por períodos superiores a uma semana. Em soluções com pH por volta de 6,6 a 37° C o pH da solução se mantém constante por períodos superiores a meses.

A Tabela 2 mostra a composição inorgânica do fluido corpóreo simulado modificado (SBF-M) e do fluido corpóreo real (BF).

Tabela 2: Composição inorgânica do Fluido Corpóreo Simulado Modificado (SBF-M) e fluido biológico real (BF). Concentração dos íons em mmol/l.

Íons	BF	SBF-M
Na⁺	142,0	142,0
K⁺	5,0	5,0
Mg²⁺	1,5	1,5
Ca²⁺	2,5	2,5
Cl⁻	103,0	103,0
HCO³⁻	27,0	27,0
HPO₄²⁻	1,0	1,0
SO₄²⁻	0,5	0,5

Ao longo deste trabalho o fluido biológico modificado será denominado SBF, a menos que seja informado o contrário.

4 – Procedimentos

4.1- Obtenção da Matriz Óssea Inorgânica

Para a obtenção da matriz óssea inorgânica, os ossos dos animais foram extraídos e os tecidos moles foram eliminados na medida do possível com bisturi. Após a lavagem dos ossos com solução fisiológica, estes foram fragmentados e foi iniciado o processo de desproteinação com hidrazina.

De forma resumida, o procedimento de desproteinação com hidrazina⁴⁶ consiste em: imergir os fragmentos dos ossos em hidrazina 25% por 1 hora. Após este período, a hidrazina é trocada por uma hidrazina a 95% por 1 hora. Após este período, a hidrazina é trocada e a temperatura do sistema é ajustada para 55° C. A hidrazina é trocada novamente após 1, 15 e 24 horas, mantendo-se a temperatura a 55° C. Após a última troca de hidrazina, o material restante é lavado um vez com etanol 80% e cinco vezes com etanol absoluto. Por fim, a matriz óssea inorgânica é seca a temperatura ambiente e de acordo com a necessidade triturada em almofariz manual.

A Figura 3 apresenta um diagrama detalhando o procedimento de desproteinação.

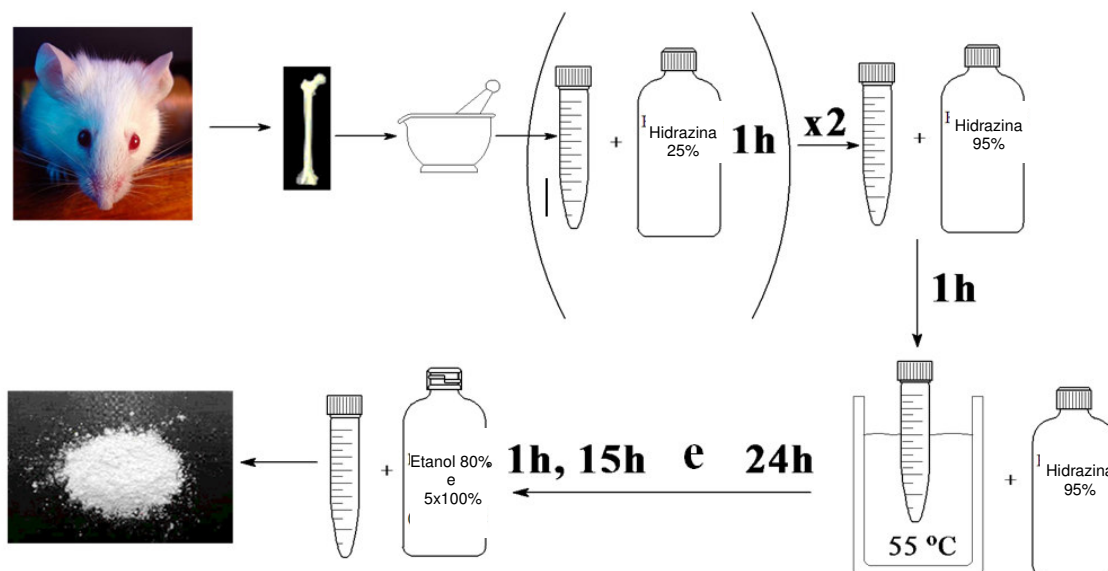


Figura 3: Fluxograma do procedimento de desproteínação de ossos com hidrazina.

4.2 – Caracterização dos Materiais Estudados

4.2.1 – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos a partir de pastilhas de KBr, contendo o material disperso na proporção de 100 partes de KBr para uma de material. Os espectros foram obtidos no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} após 32 acumulações e com resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.2 – Difractometria de Raios X (XRD)

Os difratogramas de raios x foram obtidos em um difratômetro Shimadzu 7000, operado a 40 kV e 30 mA, usando filtro de níquel para a radiação α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) de CuK.

Os difratogramas para a caracterização dos fosfatos de cálcio sintético utilizaram velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$ e os difratogramas da matriz óssea inorgânica foram obtidos com velocidade de varredura de $0,2^\circ/\text{min}$.

O desvio padrão associado às medidas obtidas a partir dos difratogramas foram determinados a partir de seis difratogramas obtidos de uma mesma amostra e respeitando o mesmo intervalo de tempo utilizado para a obtenção dos difratogramas de todas as amostras estudadas. O desvio padrão dos parâmetros determinados a partir dos difratogramas de raios x para o intervalo dos difratogramas de $24^\circ - 27.5^\circ$ (2θ) foram: largura a meia altura (FWHM) ± 0.02 (2θ); posição dos picos ± 0.01 (2θ); intensidade dos picos ± 27 ; intensidade da linha de base ± 34 . Para o pico compreendido entre o intervalo de $37^\circ - 43^\circ$ 2θ o desvio padrão dos parâmetros analisados foram: largura a meia altura ± 0.04 (2θ); posição dos picos: ± 0.04 (2θ); intensidade dos picos ± 10 ; intensidade da linha de base: ± 7 .

O tamanho médio dos cristalitos de alguns fosfatos de cálcio foi determinado pela equação de Debye-Scherrer^{7, 19, 18, 90, 91} diretamente dos picos 25.8° (2θ) (plano 002) e do pico 39.9° (2θ) (plano 310). Foi considerado que o pico 39.9° (2θ) corresponde apenas ao plano de difração 310. Também foram determinadas as distâncias interplanares entre planos de difração pela equação de Bragg⁹².

4.2.3- Microscopia Eletrônica

As micrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura com voltagem de aceleração do feixe de elétrons entre

20kV e 30 kV. As amostras foram metalizadas com carbono e ouro utilizando-se um metalizador Bal-Tec Med 020. Após a metalização as amostras foram presas ao porta-amostra empregando-se fita de carbono, pasta de carbono e pasta de prata. As micrografias apresentadas correspondem a regiões de superfície de fratura da matriz óssea inorgânica ou do pó dos fosfatos de cálcio sintéticos.

Foram obtidas, também, micrografias de ossos completos após serem fixados em tampão fosfato com 1% de ácido tânico.

4.2.4- Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido (ICP/OES)

A razão molar Ca/P para os fosfatos de cálcio foram obtidas, pela análise com Espectrômetro de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido.

Para a obtenção da razão molar Ca/P os fosfatos foram secos e dissolvidos em aproximadamente 100 ml de água com a adição de HCl (36% m/m) até a dissolução completa.

As curvas de calibração necessárias para a determinação da razão molar Ca/P foram obtidas a partir de soluções que continham simultaneamente os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} .

4.2.5- Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas foram feitas em um Universal V2.3C TA Instruments TGA na faixa de temperatura entre 25° e 1000° C, com taxa de aquecimento de 10° C/minuto em atmosfera oxidante (ar sintético).

4.2.6 - Determinação dos tamanhos dos cristalitos da fase mineral pelo método de Debye-Scherrer

A equação de Debye-Scherrer pode ser escrita da forma:

$$D_{khl} = \frac{57,3.K.\lambda}{\beta_{1/2} \cdot \cos \theta}$$

Equação 9

Onde:

D_{khl} é o tamanho do cristal determinado em um plano cristalográfico, 57,3 é o fator de conversão de graus para radianos, K é uma constante dependente do cristal com valor de 0,9, λ é o comprimento de onda da radiação raios x com o valor de 1,5418 Å no equipamento utilizado, $\beta_{1/2}$ é a diferença entre a largura a meia altura do pico da amostra e do pico de um padrão (hidroxiapatita cristalina foi utilizada como padrão) e $\cos \theta$ é o cosseno do ângulo do pico do difratograma da amostra correspondente ao plano cristalino que determina o tamanho do cristal.

4.2.7 – Método de Rietveld

O método de Rietveld é aceito como sendo um dos métodos de estudo cristalográfico com melhor embasamento teórico⁹³. Este método permite a partir de difratogramas de pó, obter parâmetros dos materiais estudados como tamanho de cela cristalina, posição dos átomos no retículo cristalino, concentração de fases presentes no material, entre outros. O método apresenta grande sensibilidade na

determinação da composição dos materiais, além de apresentar a vantagem de não ser necessário a utilização de um padrão interno ou mesmo uma calibração para se obter as concentrações.

Para o estudo utilizando-se o método de Rietveld foi utilizado o programa GSAS⁹⁴.

4.3 – Equilíbrio de Solubilidade / Isotermas de Adsorção

Para o estudo do equilíbrio de solubilidade e/ou a determinação de isotermas de adsorção de Ca^{2+} dos diversos fosfatos de cálcio o seguinte procedimento foi adotado:

Cerca de 0,03g de fosfato de cálcio sintético ou 0,015g de matriz óssea inorgânica pesada em balança analítica, foram adicionados a 5 mL de solução de NaCl $1,42 \times 10^{-1}$ mol/L ou SBF com concentrações variáveis de Ca^{2+} .

Após a adição do fosfato sólido sobre a solução, o pH foi ajustado com o auxílio de um micro eletrodo de pH e pelo borbulhamento de CO_2 gasoso. Após o ajuste do pH o frasco foi hermeticamente fechado e colocado em banho termostatizado tipo Dubnoff com agitação pendular a 37° C. O pH das soluções foi monitorado e corrigido, quando necessário, de oito em oito horas.

4.4 – Tratamentos Estatísticos.

Os resultados das medidas realizadas para a caracterização da matriz óssea inorgânica foram submetidos a tratamento estatístico quando necessário. Este tratamento foi realizado utilizando-se o método de análise de variância (ANOVA) realizado pelo programa GraphPad Prism. A partir desta análise foi possível obter a significância dos resultados (p) que foi apresentada nas figuras e texto, quando necessário. Foram considerados significativos resultados abaixo de 0,05.

Em determinados casos foi necessário avaliar a correlação entre as propriedades estudadas. Para isso foi utilizado o mesmo programa usando-se o teste Kruskal-Wallis. O teste Kruskal-Wallis é um teste não paramétrico que compara a media de três ou mais grupos não pareados. Nos experimentos com a matriz óssea inorgânica a heterogeneidade das amostras é tão acentuada (devido a própria complexidade dos organismos vivos) que o teste Kruskal-Wallis é o mais recomendado, como o próprio programa GraphPad Prism sugere.

5- Resultados e Discussão

5.1– Efeitos do Processo de Desproteinação

Um dos objetivos deste trabalho foi caracterizar as modificações que ocorrem na matriz óssea inorgânica ao longo da vida dos animais. Para isso, os ossos e fosfatos de cálcio sintéticos passaram pelo processo de desproteinação de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.

A avaliação do efeito do tratamento da hidrazina nas propriedades dos materiais foi realizada pela caracterização dos materiais antes e após a desproteinação utilizando-se espectroscopia de infravermelho, difratometria de raios x, análise termogravimétrica, análise elementar e microscopia. Os materiais sintéticos submetidos ao tratamento com hidrazina foram escolhidos devido a sua composição, uma vez que, apresentam a composição da hidroxiapatita ou contém íons que também são encontrados na matriz óssea inorgânica (HPO_4^- e CO_3^{2-}). Além dos materiais nos quais haviam a presença de íons em comum com a matriz óssea inorgânica foram analisados os compostos CaHPO_4 e CaCO_3 devido ao fato de que uma das críticas mais recorrentes a este procedimento afirma que a desproteinação com hidrazina solubiliza os íons HPO_4^- e CO_3^{2-} presentes na matriz óssea inorgânica.

5.1.1- Espectroscopia de Infravermelho

A determinação das espécies HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} é particularmente importante

para o estudo dos efeitos do processo de desproteínação.

A Figura 4 apresenta os espectros de infravermelho de ossos, hidroxiapatita, monetita e carbonato de cálcio antes e após o tratamento com hidrazina.

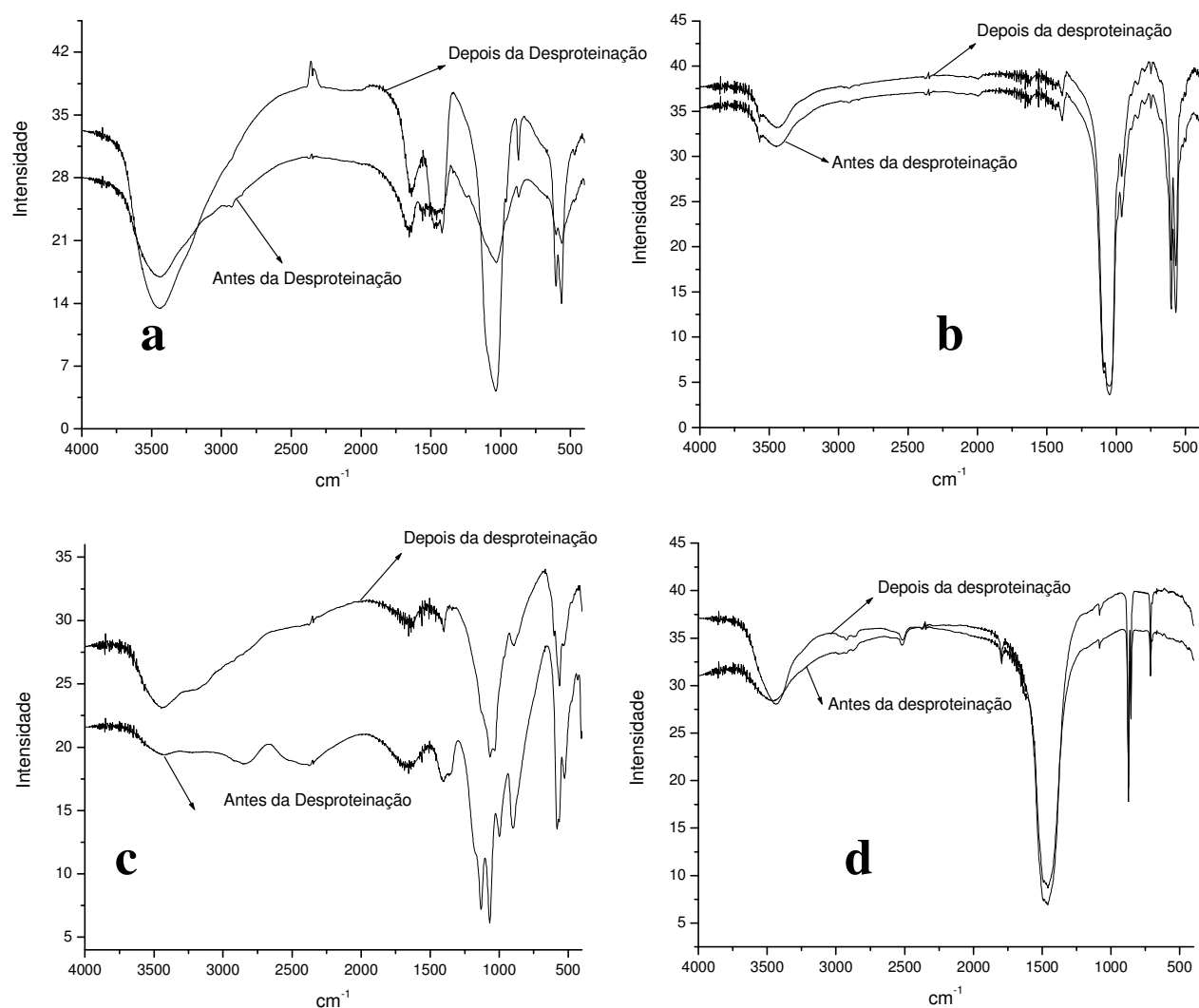


Figura 4: Espectros de Infravermelho de osso (a), hidroxiapatita (b), CaHPO_4 (c) e CaCO_3 antes e após o tratamento com hidrazina.

Os espectros de FTIR de hidroxiapatita e carbonato de cálcio não mostram nenhuma alteração após o tratamento com hidrazina. Já o espectro de

infravermelho de CaHPO_4 , após o procedimento sofre uma significativa alteração.

Os espectros de FTIR dos ossos antes e após a desproteinação mostram um estreitamento de todas as bandas, o desaparecimento das bandas 2920, 2860 e 1250 cm^{-1} e o aumento da intensidade dos picos 870 e 961 cm^{-1} . O estreitamento das bandas pode ser relacionado com a eliminação da matriz óssea orgânica, que espalha a radiação infravermelha e provoca o alargamento das bandas. A confirmação da eliminação da matriz óssea orgânica é demonstrada pela diminuição da intensidade das bandas 2920, 2860 e 1250 cm^{-1} , que corresponde a compostos presentes nesta matriz orgânica⁹⁵.

A banda a 961 cm^{-1} (presente nos espectros apresentados nas Figuras 4b e 4c) é atribuído ao grupo HPO_4^{2-} e a banda 870 cm^{-1} (presente nas Figuras 4b e 4d) ao grupo CO_3^{2-} existente em hidroxiapatitas carbonatadas⁹⁵.

A observação destas bandas nos espectros dos ossos tanto antes quanto após a desproteinação mostra que o processo de desproteinação não elimina significativamente os íons HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} dos materiais estudados.

5.1.2- Difratometria de Raios X

A técnica de difratometria de raios x permite observar se o processo de desproteinação forma novos compostos e também se modifica a cristalinidade da matriz óssea inorgânica. A Figura 5 apresenta os difratogramas obtidos antes e após o processo de desproteinação para os diferentes materiais.

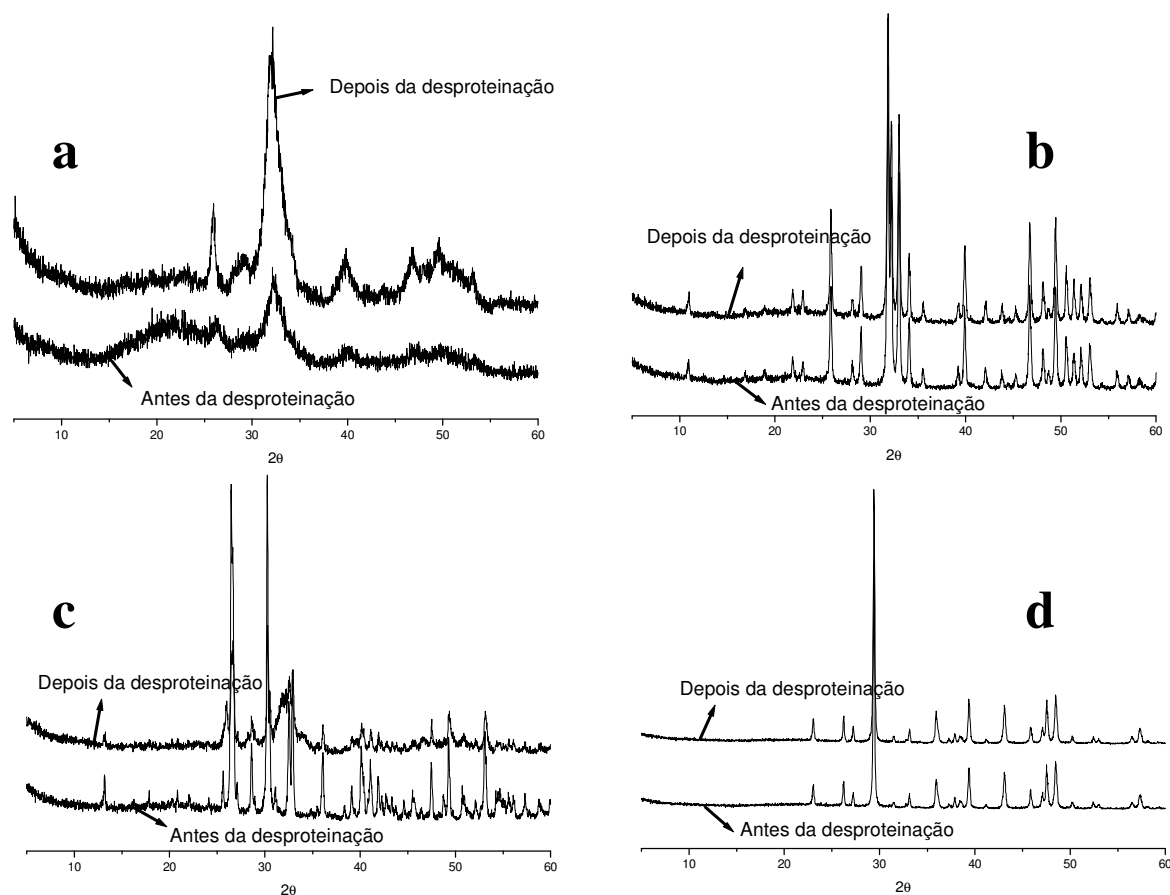


Figura 5: Difratomogramas de raios x de osso (a), hidroxiapatita (b), CaHPO_4 (c) e CaCO_3 (d), antes e após a desproteínação.

Os difratogramas 5b e 5d mostram que o tratamento com hidrazina não causa modificações nos compostos hidroxiapatita e carbonato de cálcio. Porém para composto CaHPO_4 observa-se no difratograma (Figura 5c) o aparecimento de vários picos novos na região de 31° (2θ). Estes novos picos indicam possivelmente que ao longo do tratamento com hidrazina é formado hidroxiapatita neste sistema ou que ocorre uma diminuição da cristalinidade do material causando um alargamento dos picos.

O difratograma obtido para o osso antes da desproteínação, de forma geral,

apresenta uma intensidade reduzida e um ruído maior quando comparado com o difratograma do osso desproteinado. O difratograma do osso antes da desproteinação também apresenta um halo (localizado aproximadamente entre 15° e 30°) que não é observado no difratograma do osso após a desproteinação. Esse halo é referente a matéria orgânica que ao espalhar o feixe de raios x aparece no difratograma como uma fase amorfa.

Apesar das diferenças de intensidade entre os picos dos difratogramas do osso e da matriz óssea inorgânica, não se observa, após a desproteinação, novos picos no difratograma da matriz óssea inorgânica.

A largura da meia altura (FWHM) do pico principal dos difratogramas ($\sim 31^\circ 2\theta$) do osso e da matriz óssea inorgânica foi avaliada com o objetivo de se verificar se ocorreram transformações na estrutura cristalina da matriz óssea inorgânica causadas pelo tratamento com hidrazina. Os resultados mostram que ocorreu uma leve diminuição do FWHM do pico principal após a desproteinação. O valor do FWHM foi alterado de $1,95^\circ$ (antes de desproteinação) para $1,85^\circ$ (após a desproteinação). Contudo deve-se considerar que devido intensidade reduzida e o ruído associado ao pico $31^\circ 2\theta$ nos difratogramas dos ossos, causados pela interferência da matriz orgânica, a determinação dos valores de FWHM dos difratogramas dos ossos antes da desproteinação é pouco precisa e a pequena variação observada no valor de FWHM pode ser consequência desta imprecisão. Assim, esta variação de FWHM não permite afirmar, de forma definitiva, que ocorre uma modificação significativa da cristalinidade da matriz óssea inorgânica causada pelo processo de desproteinação.

5.1.3- Análise Termogravimétrica (TGA)

Os resultados de TGA, assim como a quantidade de material orgânico eliminado dos ossos com o processo de desproteínação, permitiram avaliar a presença de matéria orgânica residual após o processo de desproteínação dos ossos. Os resultados de TGA permitiram também averiguar as possíveis transformações químicas que possam ter ocorrido ao longo do processo. As Figuras 6 e 7 apresentam os termogramas obtidos a partir dos materiais antes e após o tratamento com hidrazina, juntamente com as suas derivadas.

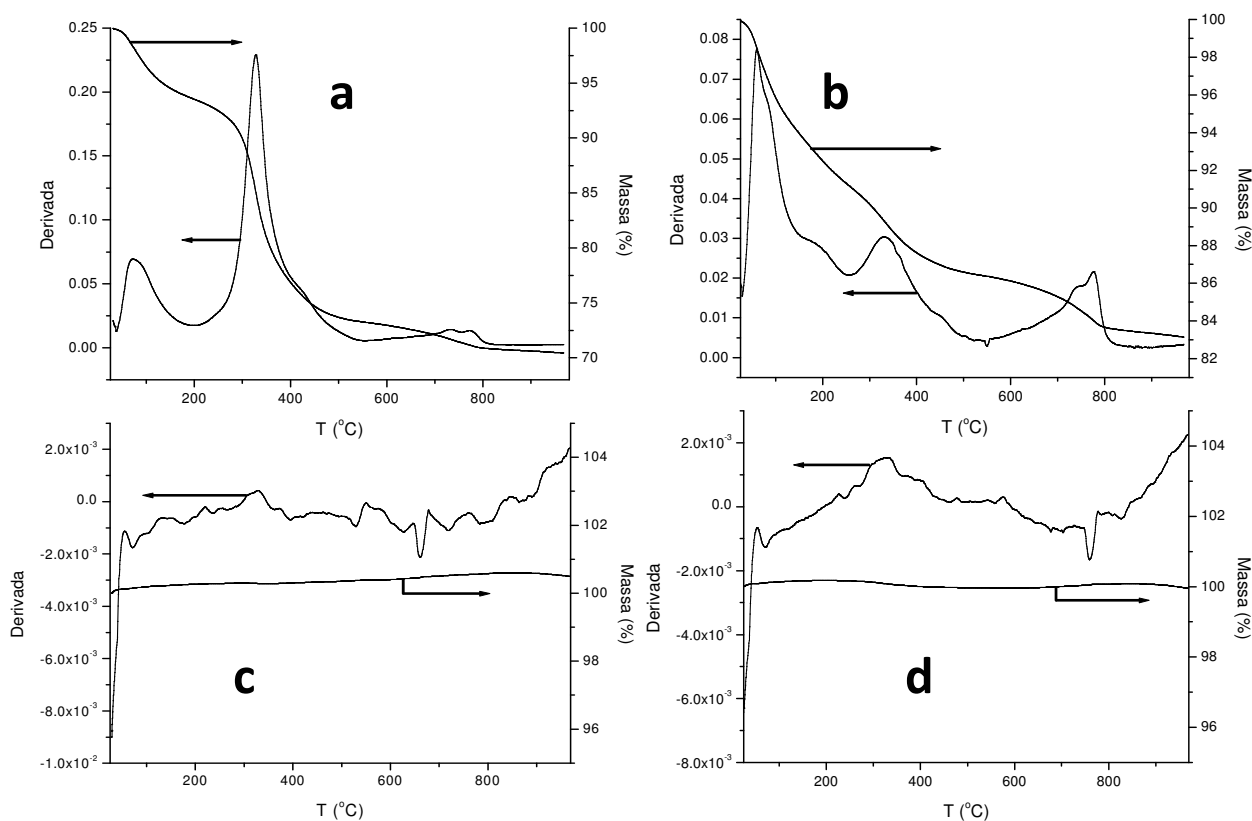


Figura 6: Termogramas de osso (a, b) e hidroxiapatita (c, d) antes (a, c) e após a desproteínação (b, d).

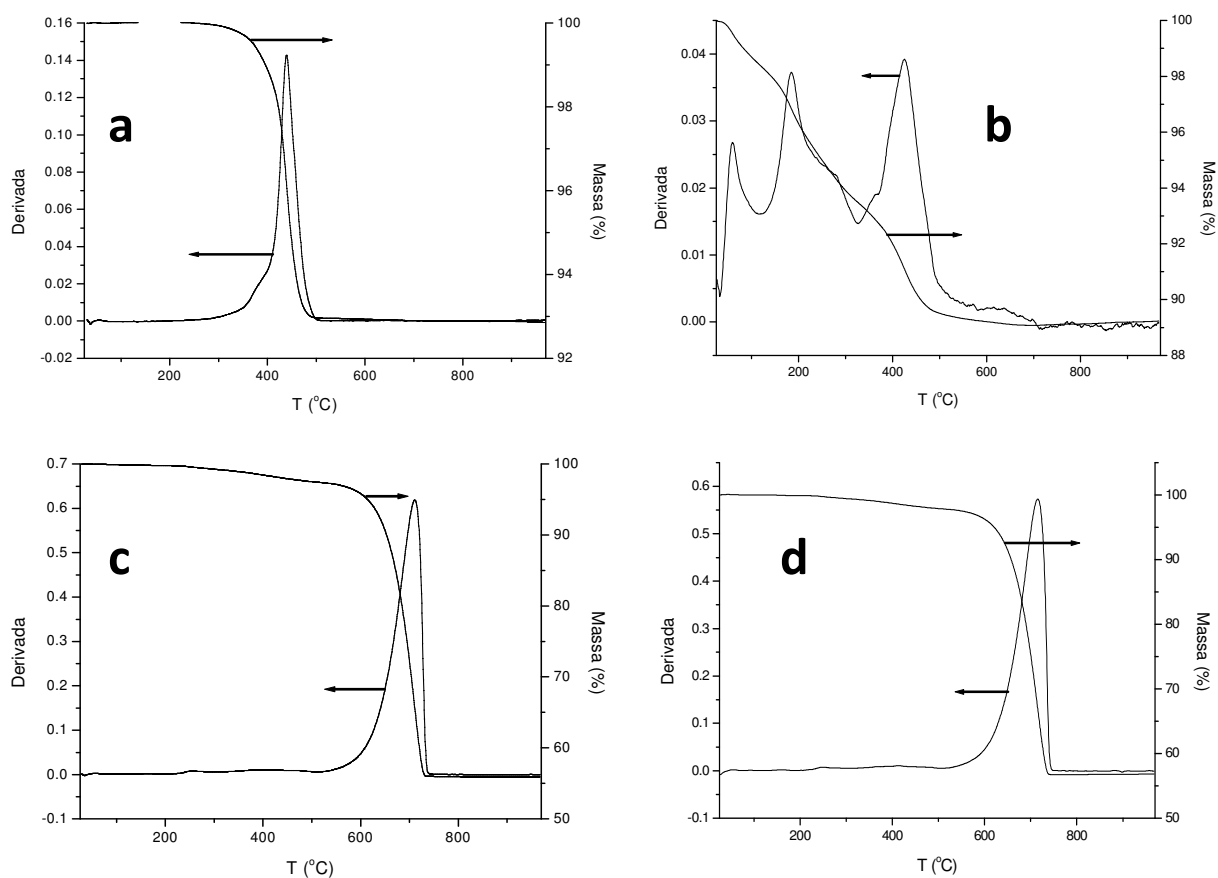


Figura 7: Termogramas de CaHPO_4 (a, b) e CaCO_3 (c, d) antes (a, c) e após a desproteínação (b, d).

Considerando como perda de massa referente a alguma espécie o intervalo compreendido entre o início e fim do pico da derivada da perda de massa. A perda considerável de massa (~20%) entre 200° e 440° C apresentada pelo termograma dos ossos (Figura 6a) antes da desproteínação, foi causada pela decomposição da

matriz orgânica. Além da perda de massa de matéria orgânica, é possível observar também uma perda de massa referente à decomposição dos íons HPO_4^{-2} (300° - 500° C) e uma perda de massa referente à decomposição do íon CO_3^{-2} (700° - 800° C).

O termograma dos ossos após a desproteínação, Figura 6b, mostra também uma perda de massa de 4%, entre as temperaturas de 200° e 440° C, que novamente pode ser atribuída à decomposição do íon HPO_4^{-2} . Apesar da expressiva diminuição de perda de massa devida à eliminação da matriz orgânica pelo processo de desproteínação, a perda de massa devida à decomposição dos íons HPO_4^{-2} e CO_3^{-2} ainda está presente nos termogramas, confirmando os resultados obtidos por espectroscopia de infravermelho.

A comparação dos termogramas dos compostos hidroxiapatita e CaCO_3 obtidos antes e depois do tratamento com hidrazina (Figuras 6c, 6d, 7c, 7d) mostram que eles não apresentam alterações. A comparação entre os termogramas de CaHPO_4 (Figuras 7a e 7b) antes e depois do tratamento com hidrazina mostrou que, apesar do caráter básico da hidrazina, a reação com CaHPO_4 sob as condições experimentais deste trabalho é pouco eficiente. Observa-se que a perda de massa correspondente à decomposição do íon HPO_4^{-2} entre 300 e 500 °C é um pouco menor no termograma realizado após o tratamento com hidrazina, indicando que apenas uma pequena fração do composto CaHPO_4 foi convertido em hidroxiapatita. Não foi possível determinar precisamente a origem da perda de massa apresentada no termograma de CaHPO_4 depois do tratamento com hidrazina, entre 100 e 330 °C é provavelmente devida à água adsorvida pelo composto.

5.1.4- ICP-OES

A Tabela 3 apresenta a concentração de Ca e P e a razão molar Ca/P para os materiais estudados antes e após a desproteinação.

Tabela 3: Concentração de Ca e P e razão molar Ca/P para os materiais estudados antes e após o processo de desproteinação. Os resultados são medias de três medidas independentes realizadas com três amostras distintas.

Amostra	Ca (mol. g ⁻¹) /10 ⁻³	P (mol. g ⁻¹) /10 ⁻³	Ca/P
Osso antes da desproteinação	6,6 ± 0,1	3,8 ± 0,1	1,75± 0,01
Osso após a desproteinação	7,8 ± 0,1	4,5± 0,1	1,73± 0,01
Ha	9,1 ± 0,4	4,8 ± 0,2	1,82 ± 0,01
Ha-Hi*	9,4 ± 0,3	4,9 ± 0,1	1,81 ± 0,01
CaHPO ₄	6,4 ± 0,7	6,1 ± 0,7	1,05 ± 0,01
CaHPO ₄ -Hi*	6,2 ± 0,2	5,6 ± 0,1	1,10 ± 0,01
CaCO ₃	9,2 ± 0,3	-	-
CaCO ₃ -Hi*	9,3 ± 0,3	-	-

* materiais após o tratamento com hidrazina

De maneira consistente com os resultados anteriores, a Tabela 3 mostra que apenas o composto CaHPO₄ apresentou alguma alteração significativa em sua razão molar Ca/P, após o tratamento com hidrazina. Neste caso, é possível notar que ocorre uma pequena diminuição da concentração de P, o que resulta em um ligeiro aumento da razão Ca/P.

5.1.5- Microscopia Eletrônica de Varredura

Para analisar as possíveis modificações morfológicas causadas pelo processo de desproteinação com hidrazina, foram obtidas micrografias dos materiais estudados antes e após o processo de desproteinação. A Figura 8 apresenta as micrografias obtidas.

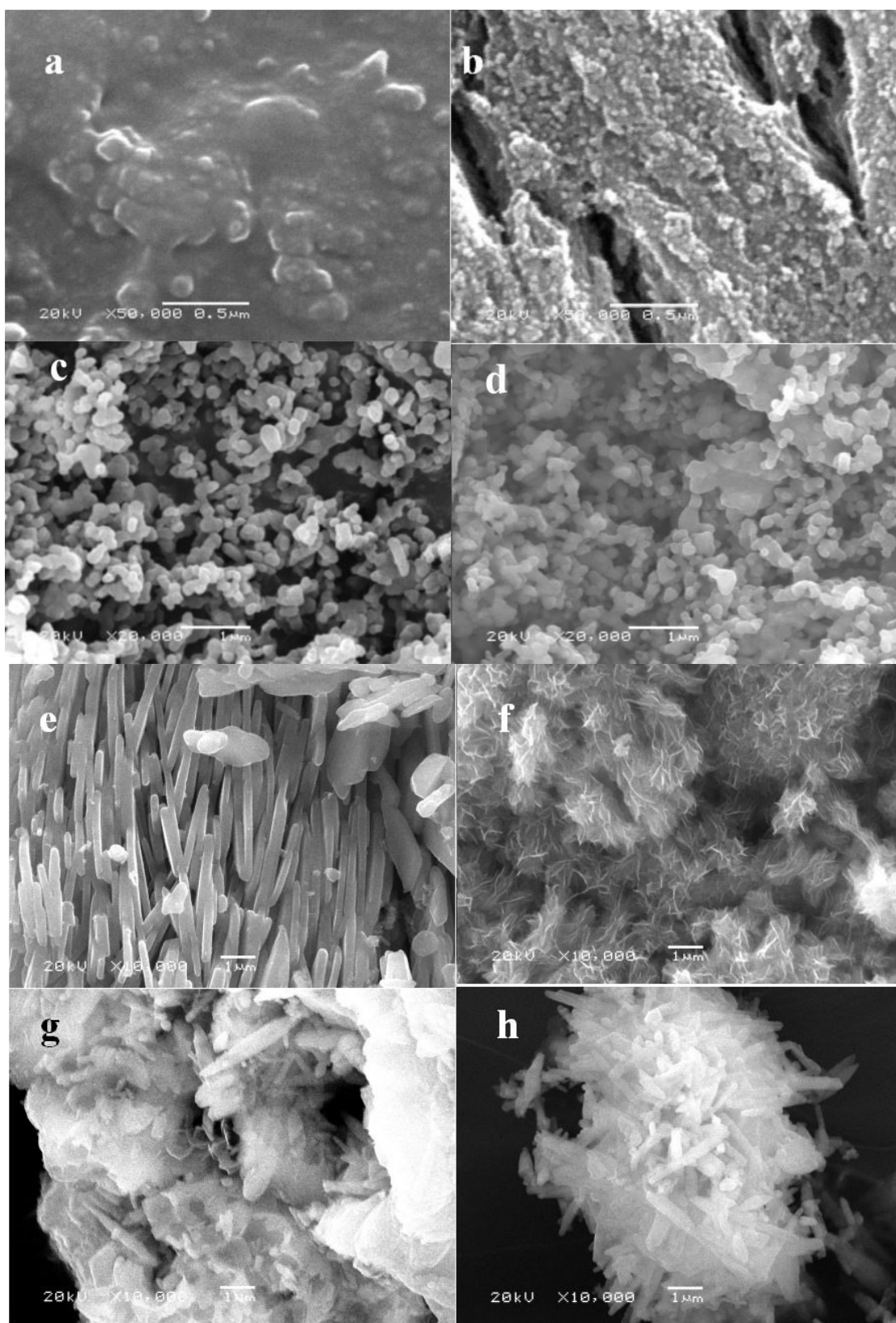


Figura 8: Micrografias de osso (a, b), hidroxiapatita (c, d), CaHPO_4 (e, f) e CaCO_3 (g, h) antes (a, c, e, g) e após a desproteínação (b, d, f, h).

As micrografias dos ossos mostram que o processo de desproteinação elimina o material amorfo, expondo de forma clara os glóbulos da matriz óssea inorgânica. Tais estruturas são também observadas em micrografias de ossos obtidos após a desproteinação por outros métodos, diferentes do usado neste trabalho^{96, 35,38}. As micrografias mostram também que as estruturas observadas no osso, que são recobertas pelo material amorfo, continuam presentes após a desproteinação, sem alteração de morfologia. Desta forma, pode-se concluir que o processo de desproteinação apenas remove a matriz orgânica (material amorfo) sem alterar a morfologia da matriz inorgânica (glóbulos observados).

A comparação entre as micrografias obtidas antes e após o tratamento com hidrazina para os demais materiais mostra que apenas as microscopias correspondentes ao CaHPO_4 apresentam uma modificação significativa na morfologia do composto. Essa modificação de morfologia deve-se à formação de pequenos cristais em sua superfície.

5.1.6- Considerações sobre os Resultados do Processo de Desproteinação.

De forma geral, as críticas ao processo de desproteinação com hidrazina são baseadas em três argumentos: primeiro, a possibilidade de que o processo de desproteinação com hidrazina possa de alguma forma alterar a composição química e a morfologia da matriz óssea inorgânica. Segundo, a possível ineficiência do processo de desproteinação na eliminação da matriz orgânica dos ossos. E terceiro, a possível modificação da cristalinidade da matriz óssea inorgânica, causada pelo tratamento a 55° C.

De acordo com o primeiro argumento, as alterações químicas na matriz óssea inorgânica seriam causadas pelo processo de desproteinação com hidrazina, devido a reações químicas ou mesmo à dissolução de constituintes do matriz óssea inorgânica ao longo do procedimento de desproteinação. Tal argumento se baseia principalmente no fato de que existem fosfatos de cálcio com elevada solubilidade ou reatividade, tais como CaHPO_4 , ou mesmo fosfatos de cálcio amorfos²². Caso estes compostos estivessem presentes na matriz óssea inorgânica, poderiam se dissolver ou serem convertidos em fosfatos de cálcio mais estáveis, tais como hidroxiapatita, ao longo do processo de desproteinação.

O trabalho original de Termine mostra que ocorre uma perda de aproximadamente 20% do total de HPO_4^{2-} e de 12% de CO_3^{2-} em relação à composição original da matriz óssea inorgânica. Estes resultados foram obtidos por Termine pela análise dos espectros de FTIR dos ossos, obtidos antes e após a desproteinação. Na literatura há trabalhos que mostram tais alterações para desproteinações conduzidas à temperaturas menores ($\sim 25^\circ \text{C}$) do que a proposta no trabalho de Termine. O próprio Termine aponta que a perda dos íons HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} que estejam na superfície é provavelmente decorrente da excessiva lavagem com H_2O ao final do processo de desproteinação.

Em nosso trabalho, utilizamos hidrazina 95% e a lavagem foi feita predominantemente com etanol 100%, dessa forma não foi observada uma diminuição na quantidade de CO_3^{2-} após o processo. Para o íon HPO_4^{2-} , foi observada uma pequena perda de massa, apenas nos resultados da análise termogravimétrica. Este resultado é reforçado pelos espectros de infravermelho do composto puro onde os picos referentes ao HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} continuam presentes após o tratamento. Tais resultados mostram que não ocorre uma solubilização significativa destes íons ao longo do processo de desproteinação e a reação da

hidrazina com o íon HPO_4^{2-} é pouco eficiente sob as condições experimentais propostas. Quanto aos resultados de ICP-OES, estes também mostram que o tratamento com hidrazina altera apenas a razão molar Ca/P do composto CaHPO_4 indicando que apenas neste composto ocorre uma alteração significativa de sua composição.

Da mesma forma, os resultados de XDR do osso e da matriz óssea inorgânica também não indicaram que o processo de desproteínação forma uma nova fase na matriz óssea inorgânica.

Apesar dos difratogramas não indicarem a formação de uma nova fase na matriz óssea inorgânica pelo processo de desproteínação, é possível observar uma ligeira diminuição do FWHM para o pico em 31° (2θ) após a desproteínação, o que poderia ser consequência de um possível aumento da cristalinidade da matriz óssea inorgânica. Este aumento do FWHM é uma das críticas mais recorrentes relacionadas à modificação da matriz óssea inorgânica pelo processo de desproteínação com hidrazina⁴⁹. Essa alteração, como citada anteriormente, seria causada pela temperatura na qual o procedimento é realizado. Esta hipótese de variação da cristalinidade em função da temperatura é derivada inicialmente da comparação entre a matriz óssea inorgânica e os fosfatos de cálcio sintetizados por Posner *et. al*^{97, 98}. Nos trabalhos de Posner, foi observado que fosfatos de cálcio recém sintetizados e amorfos são extremamente instáveis, se transformado espontaneamente em hidroxiapatita, mesmo à temperatura ambiente. Alguns autores⁵⁰ afirmam que parte da matriz óssea inorgânica apresentaria as mesmas características de instabilidade apresentada pelos fosfatos de cálcio sintéticos estudados por Posner, uma vez que a matriz óssea inorgânica também é composta por fosfatos de cálcio amorfos.

Apesar da semelhança da cristalinidade apresentada entre a matriz óssea inorgânica e os fosfatos de cálcio sintéticos de Posner, não existe comprovação experimental alguma e nem mesmo uma base teórica que sustente a afirmação de que a matriz óssea inorgânica se comportaria da mesma forma que fosfatos de cálcio amorfos recém sintetizados. A falta de sustentação para esta hipótese deve-se principalmente pelo fato de que, até o momento, não há um consenso sobre a composição da matriz óssea inorgânica, não sendo possível afirmar que ela seja formada pelos mesmos fosfatos de cálcio amorfos sintetizados por Posner. Além disso, cada vez mais trabalhos na literatura⁹ chegam à conclusão de que a matriz óssea inorgânica é composta por fosfatos de cálcio de natureza única, que ainda não foram completamente reproduzidos em sistemas sintéticos.

Um dos fatos experimentais que sustentam a hipótese de que temperaturas da ordem de 55° C não alteram a cristalinidade da matriz óssea inorgânica foi apresentado pelo próprio Termine. Em seu trabalho, são discutidos diferentes métodos de desproteinação a diferentes temperaturas. Analisando seus resultados é possível observar que nem a composição e tampouco a cristalinidade do material se alteram quando um mesmo método de desproteinação é realizado a diferentes temperaturas.

Por fim, a crítica à eficiência da desproteinação nos ossos é claramente improcedente, quando observados os resultados de TGA apresentados neste trabalho. Estes resultados mostram que a desproteinação foi muito eficiente uma vez que menos de 3% da fase orgânica permaneceu no osso, o que pode ser confirmado pelas micrografias obtidas após a desproteinação.

A crítica à eficiência do processo de desproteinação com hidrazina foi originada de estudos onde a proporção entre a massa de hidrazina para a massa de osso tratado é relativamente pequena. Nestes, estudos a desproteinação de ossos foi

realizada mantendo-se a quantidade de hidrazina constante, mas variando-se a idade dos ossos, o que resulta na variação da concentração de matéria orgânica. Os resultados destes trabalhos mostraram que a desproteinação mais eficiente ocorre em ossos velhos, ossos que contêm uma menor concentração de matéria orgânica. Embora ossos velhos apresentem uma menor concentração de matéria orgânica, a compactação da matriz óssea inorgânica nestes ossos é maior do que em ossos mais novos, o que dificulta o acesso da hidrazina à matriz orgânica. Por conseqüência, dessa dificuldade de acesso da hidrazina a matéria orgânica nos ossos mais velhos, era de se esperar uma desproteinação mais eficaz para os ossos mais jovens. Porém a não observação deste resultado pode ser explicado pela manutenção da mesma quantidade de hidrazina para o processo de desproteinação dos ossos de diferentes idades.

A eficiência da desproteinação foi aumentada neste trabalho pela utilização de uma proporção de aproximadamente dez vezes maior de hidrazina que a massa de osso a ser desproteinado (10 ml de hidrazina por g de osso).

5.2 – Caracterização da Matriz Óssea Inorgânica

5.2.1- Composição

5.2.1.1 – Espectroscopia de FTIR

As Figuras 9 e 10 apresentam espectros de FTIR obtidos das matrizes ósseas inorgânicas estudadas. Os cinco espectros apresentados em cores diferentes,

agrupados para cada tipo de osso e idade, correspondem aos cinco animais dos quais as matrizes ósseas foram obtidas.

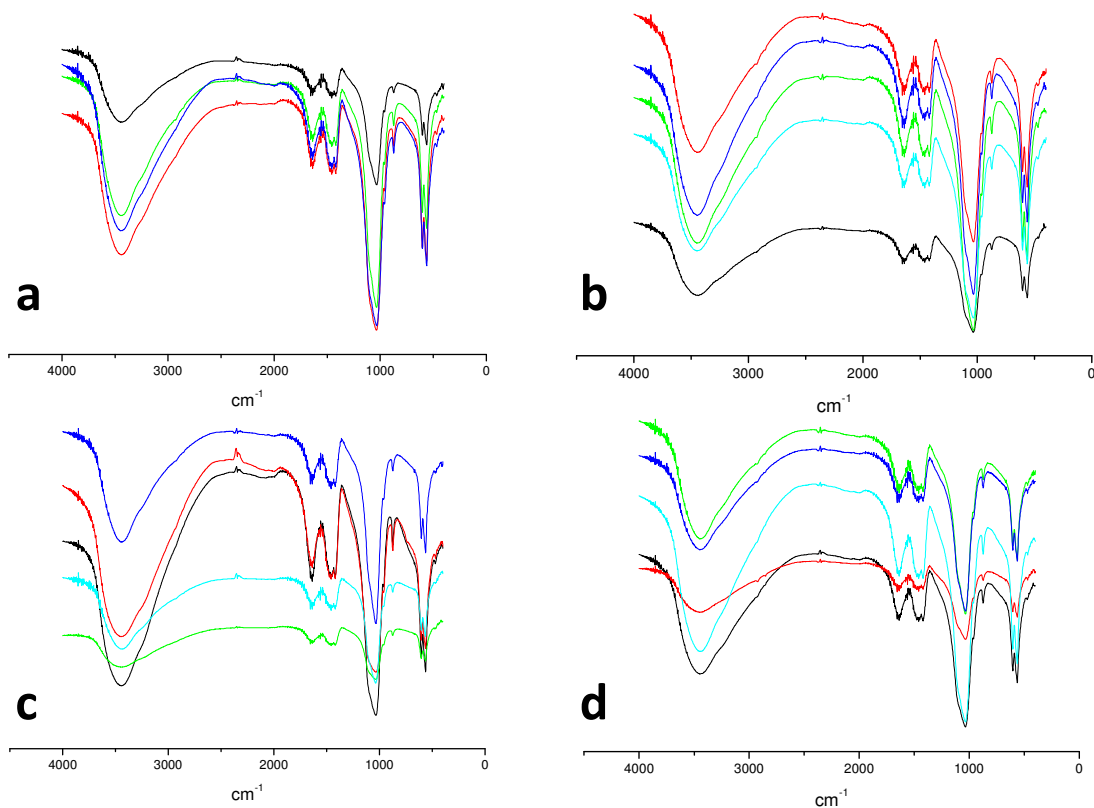


Figura 9: Espectros de FTIR obtidos das matrizes ósseas inorgânicas obtidas de crânio (a, c) e fêmures (b, h) de ratos Wistar com: 15 dias (a, b) e 1 mês (c, d).

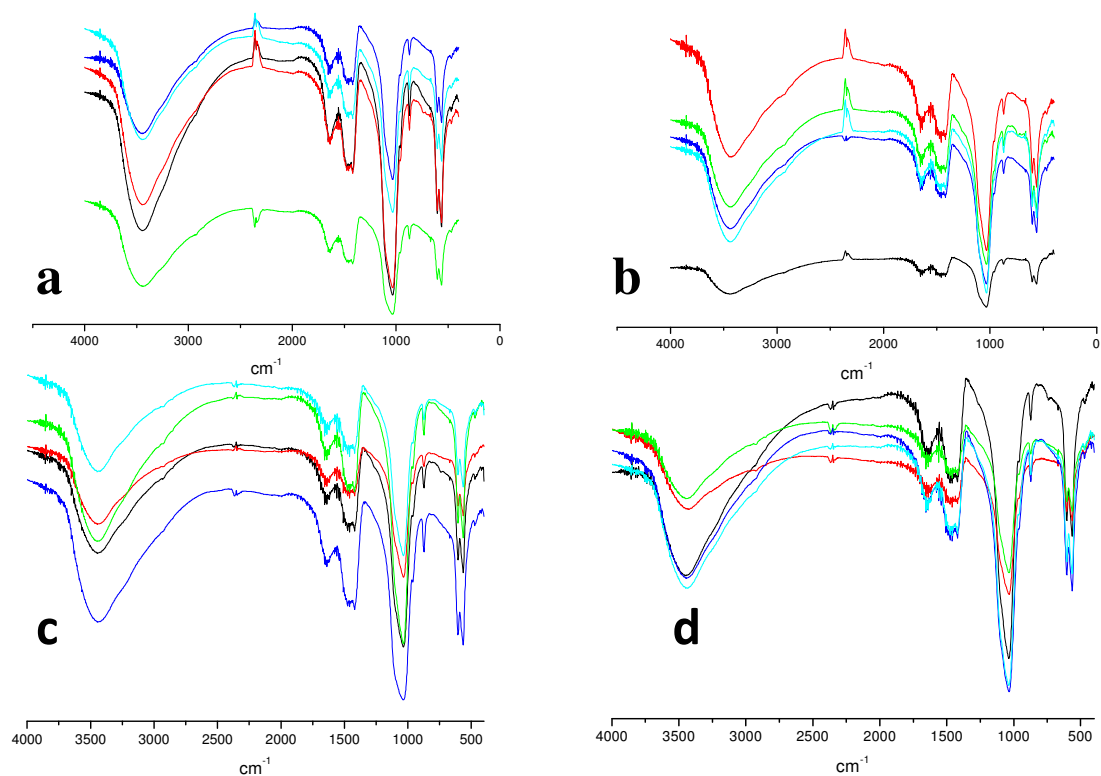


Figura 10: Espectros de FTIR obtidos das matrizes ósseas inorgânicas obtidas de crânio (a, c) e fêmures (b, d) de ratos Wistar com: 1 ano (a, b) e 1 ano e meio (c, d).

A Tabela 4 mostra as principais atribuições das bandas apresentadas nos espectros de FTIR.

Tabela 4: Atribuição das bandas dos espectros de FTIR. ^{99, 100, 101}

Banda / cm⁻¹	Atribuição
3580	estiramento OH de hidroxila
3400	estiramento OH de H ₂ O
1645	deformação H-O-H de H ₂ O
1470-1420	estiramento simétrico de CO ₃ ²⁻
1384	estiramento NO ₃ ⁻
1128	estiramento PO ₃ ⁻ em HPO ₄ ²⁻
1100, 1093, 1047	estiramento assimétrico de PO ₄ ³⁻ ou estiramento PO ₃ em HPO ₄ ²⁻
965	estiramento simétrico PO ₄ ³⁻
918	estiramento P-OH em HPO ₄ ²⁻
884	estiramento antissimétrico de CO ₃ ²⁻
650	vibrações OH de hidroxila
616, 581	deformação O-P-O em PO ₄ ³⁻ ou deformação O-P-O em HPO ₄ ²⁻
535	estiramento P-OH em HPO ₄ ²⁻

Os espectros de FTIR das matrizes óssea inorgânicas apresentam as mesmas bandas, independentemente da idade e tipo de osso do animal. Essa semelhança mostra que todas as matrizes ósseas inorgânicas são formadas pelas mesmas espécies, independentemente do osso e idade dos animais de origem.

5.2.1.2 – Composição Elementar

A concentração dos elementos Ca, P, Na e Mg e a razão Ca/P nas matrizes ósseas inorgânicas estudadas foram determinadas por ICP-OES. A Figura 11 apresenta os resultados da determinação da concentração de cada um dos elementos por grama de matriz óssea inorgânica e razão molar Ca/P, ao longo da vida dos animais.

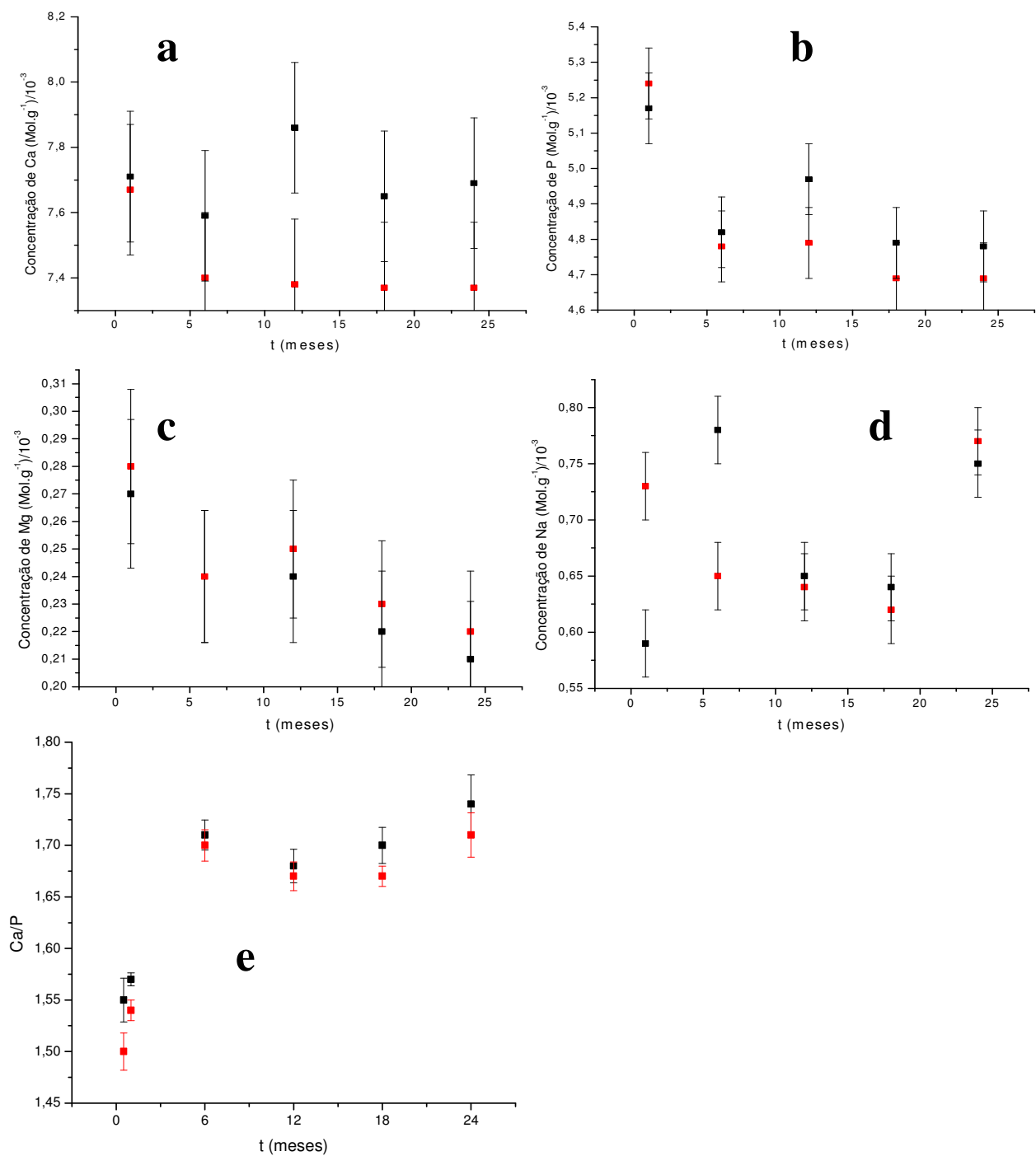


Figura 11: Concentração de Ca (a) ($p=0.0162$), P (b) ($p=0.0015$), Mg (c) ($p=0.0226$), Na (d) ($p=0.0003$) e razão Ca/P ($p<0.0001$) (e) da matriz óssea inorgânica proveniente de crânio (■) ou de fêmur (■) ao longo da vida dos animais.

A quantidade de CO_3^{2-} por grama de matriz óssea inorgânica foi determinada por análise termogravimétrica. As Figuras 12 e 13 apresentam os termogramas e as respectivas derivadas.

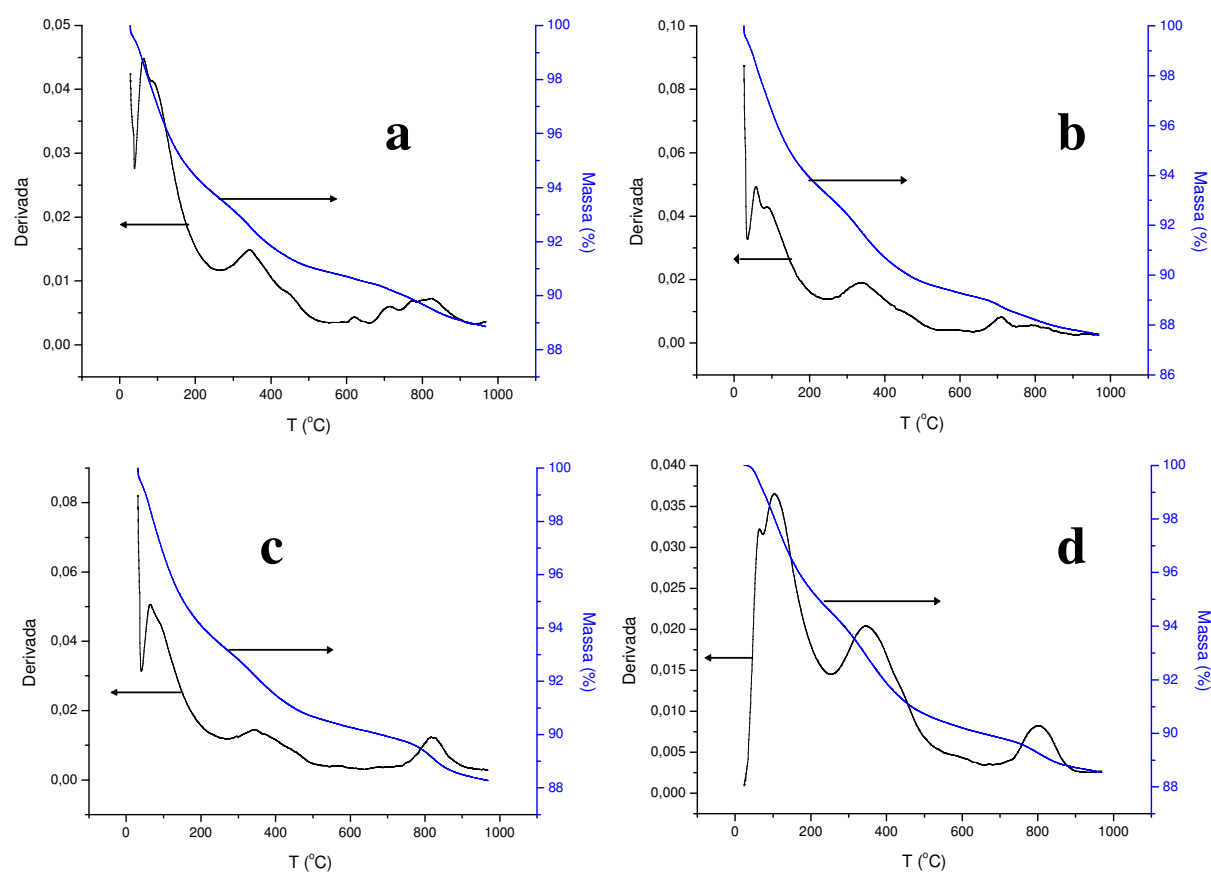


Figura 12: Termogramas de matriz óssea inorgânica obtida de crânio (a, c) e fêmur (b, d) com 15 dias (a, b), 1 mês (c, d) de idade. Cada termograma foi obtido a partir de uma amostra formada pela mistura de matriz óssea inorgânica proveniente de diferentes animais da mesma idade.

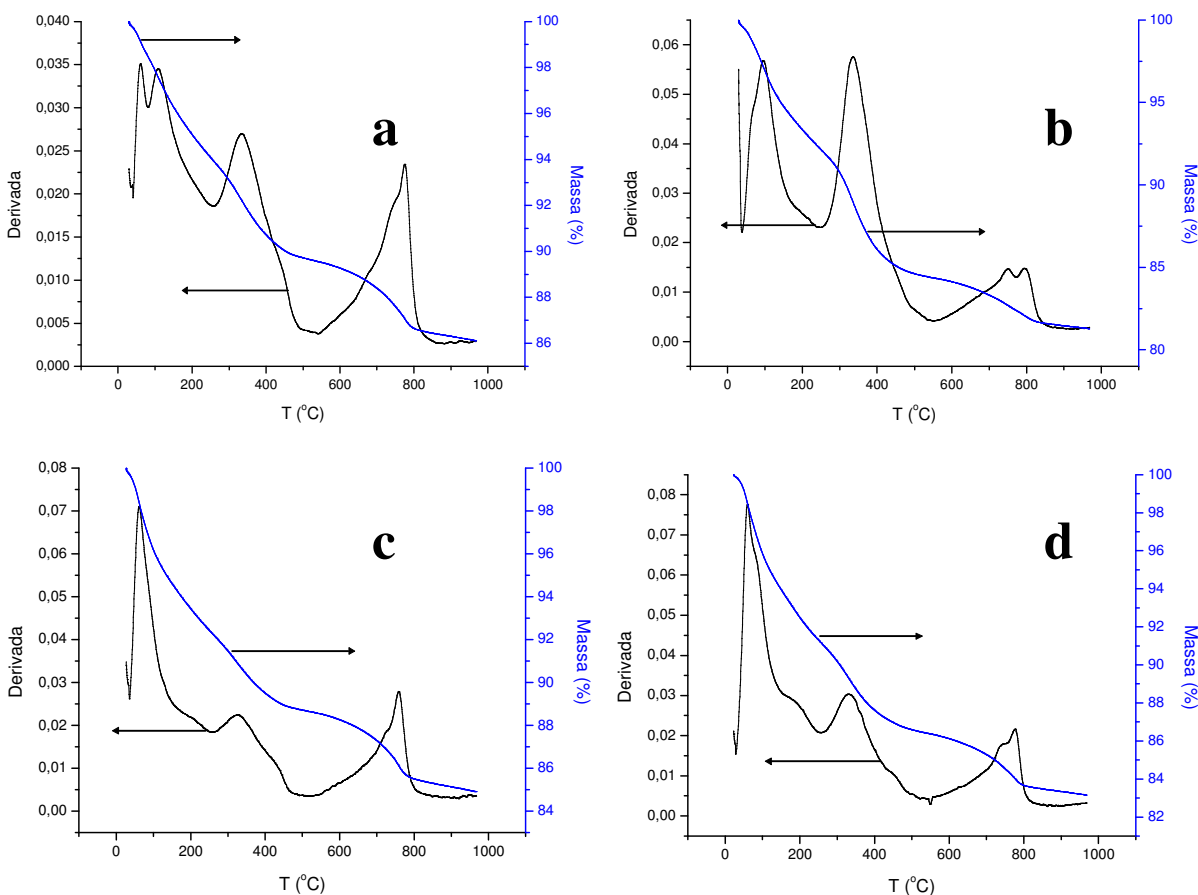


Figura 13: Termogramas de matriz óssea inorgânica obtida de crânio (a, c) e fêmur (b, d) com 1 ano (a, b) e 1 ano e meio (c, d) de idade. Cada termograma foi obtido a partir de uma amostra formada pela mistura de matriz óssea inorgânica proveniente de diferentes animais da mesma idade.

Considerando que os carbonatos presentes na matriz óssea inorgânica se decompõem por volta de 800 °C, a quantidade de CO_3^{2-} por grama de matriz óssea inorgânica foi determinada a partir da perda de massa a esta temperatura. A Figura 14 apresenta a variação da concentração de CO_3^{2-} ao longo da vida dos animais.

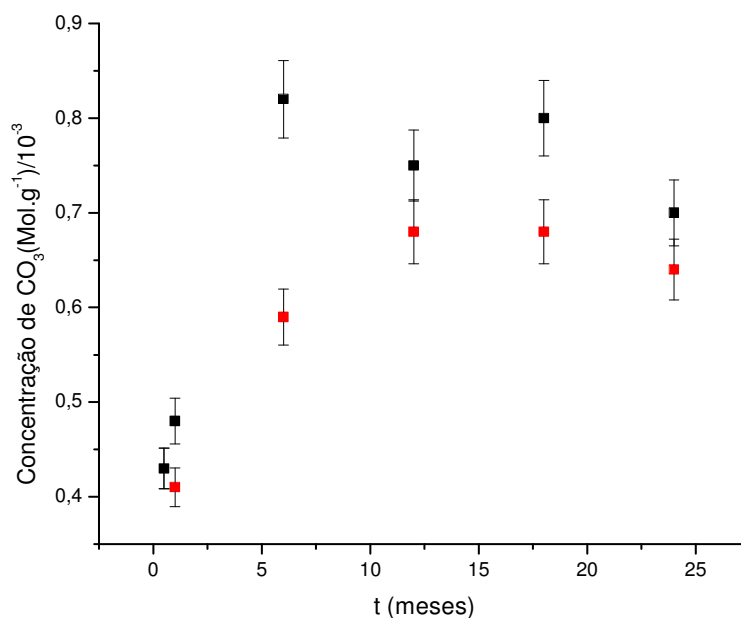


Figura 14: Número de mols de CO_3^{2-} na fase óssea obtida de crânio (■) e fêmur (■) ao longo da vida dos animais. Concentração obtida por análise termogravimétrica.

A quantidade de HPO_4^{2-} foi estimada também por análise termogravimétrica. Os termogramas da matriz óssea inorgânica indicam uma decomposição por volta de 440°C . Essa perda de massa pode ser atribuída à decomposição do HPO_4^{2-} conforme observado nos termogramas de CaHPO_4 . A partir destes resultados é possível estimar uma perda de massa de aproximadamente 2% referente à decomposição do HPO_4^{2-} , nos termogramas.

A Tabela 5 apresenta a fórmula elementar da matriz óssea inorgânica dos diferentes ossos, obtida por ICP-OES e termogravimétrica.

Para a determinação da quantidade de OH^- na fase óssea inorgânica, considerou-se que os cátions Mg^{2+} , Na^+ e Ca^{2+} são responsáveis pelo número total de cargas positivas, uma vez que estes íons estão presentes em todas as amostras.

Considerou-se, analogamente, que as cargas negativas são provenientes dos íons OH^- , CO_3^{2-} , PO_4^{3-} e HPO_4^{2-} .

Tabela 5: Fórmulas elementares determinadas para a matriz óssea inorgânica proveniente de crânio (C) e fêmur (F) de ratos Wistar com idades de 15 dias (D), 1 mês (M) 1 ano (AN) e 1 ano e meio (A6).

Osso	Fórmula Elementar						
CD	$\text{Ca}_{8,1}$	$\text{Mg}_{0,29}$	$\text{Na}_{0,2}$	$(\text{HPO}_4)_{2,2}^*$	$(\text{CO}_3)_{0,4}$	$(\text{PO}_4)_3$	$(\text{OH}^-)_{2,8}$
FD	$\text{Ca}_{7,9}$	$\text{Mg}_{0,30}$	$\text{Na}_{0,6}$	$(\text{HPO}_4)_{2,2}^*$	$(\text{CO}_3)_{0,4}$	$(\text{PO}_4)_{2,9}$	$(\text{OH}^-)_{3,3}$
CM	$\text{Ca}_{8,3}$	$\text{Mg}_{0,30}$	$\text{Na}_{0,2}$	$(\text{HPO}_4)_{2,2}^*$	$(\text{CO}_3)_{0,4}$	$(\text{PO}_4)_{2,9}$	$(\text{OH}^-)_{3,5}$
FM	$\text{Ca}_{8,1}$	$\text{Mg}_{0,30}$	$\text{Na}_{0,6}$	$(\text{HPO}_4)_{2,2}^*$	$(\text{CO}_3)_{0,3}$	$(\text{PO}_4)_{2,9}$	$(\text{OH}^-)_{3,8}$
CAN	$\text{Ca}_{7,9}$	$\text{Mg}_{0,25}$	$\text{Na}_{0,5}$	$(\text{HPO}_4)_{2,2}^*$	$(\text{CO}_3)_{0,8}$	$(\text{PO}_4)_{2,3}$	$(\text{OH}^-)_{4,1}$
FAN	$\text{Ca}_{7,4}$	$\text{Mg}_{0,25}$	$\text{Na}_{0,5}$	$(\text{HPO}_4)_{2,2}^*$	$(\text{CO}_3)_{0,7}$	$(\text{PO}_4)_{2,1}$	$(\text{OH}^-)_{3,6}$
CA6	$\text{Ca}_{8,2}$	$\text{Mg}_{0,24}$	$\text{Na}_{0,4}$	$(\text{HPO}_4)_{2,2}^*$	$(\text{CO}_3)_{0,8}$	$(\text{PO}_4)_{2,5}$	$(\text{OH}^-)_{3,9}$
FA6	$\text{Ca}_{7,6}$	$\text{Mg}_{0,25}$	$\text{Na}_{0,1}$	$(\text{HPO}_4)_{2,2}^*$	$(\text{CO}_3)_{0,7}$	$(\text{PO}_4)_{2,3}$	$(\text{OH}^-)_{3,1}$

* concentração máxima de HPO_4^{2-} estimada por análise termogravimétrica.

A quantidade de OH^- na fórmula elementar determinada neste trabalho é maior que a reportada nos resultados apresentados na literatura. Essa diferença ocorre em consequência de uma sub-estimativa pelos trabalhos da literatura da quantidade do HPO_4^{2-} presente na matriz óssea inorgânica, em função dos métodos analíticos utilizados. Essa sub-estimativa da concentração de HPO_4^{2-} resulta em uma concentração maior de PO_4^{3-} contribuindo para a soma total de cargas negativas, o que por consequência, resulta em uma menor quantidade de OH^- .

Os valores da quantidade de OH⁻ são também freqüentemente subestimados em função da não inclusão dos íons Mg²⁺ e Na⁺ na determinação da fórmula elementar da fase óssea inorgânica.

5.2.2 – Difratometria de Raios X e Cristalinidade da Matriz Óssea Inorgânica

As Figuras 15, 16 e 17 apresentam as variações de tamanho dos cristais, distância interplanar, razão da intensidade dos picos e razão da intensidade da linha de base dos picos 25,8° (2θ) e 39,9° (2θ) referentes aos planos de difração 002 e 310, da matriz óssea inorgânica.

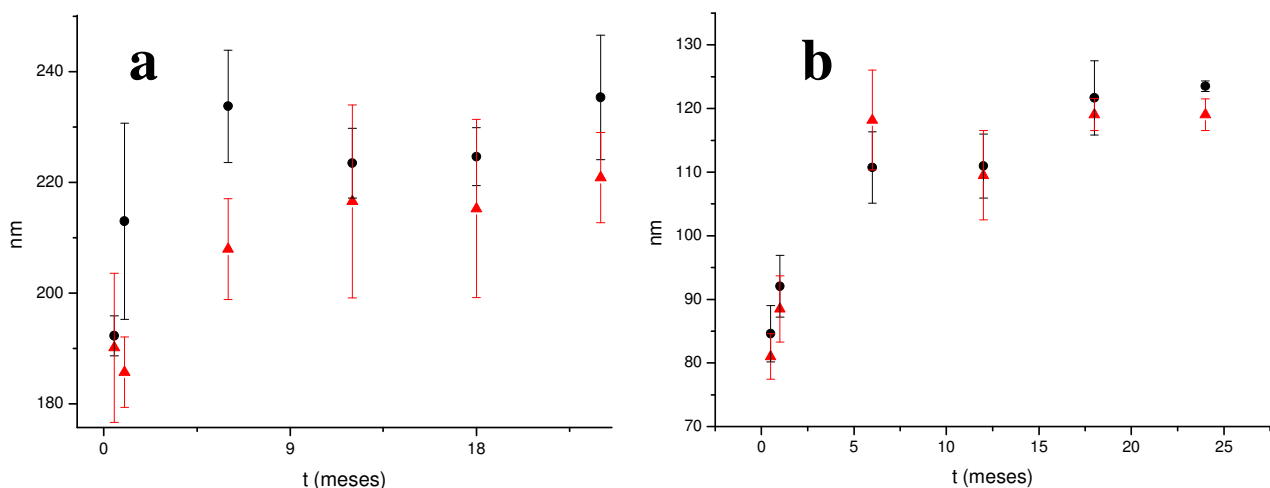


Figura 15: Variação do tamanho dos cristais da matriz óssea inorgânica perpendicular ao plano 002 (a) ($p < 0.0001$) e perpendicular ao plano 310 (b) ($p < 0.0001$) obtidas de crânio (●) e fêmur (▲) ao longo da vida dos animais.

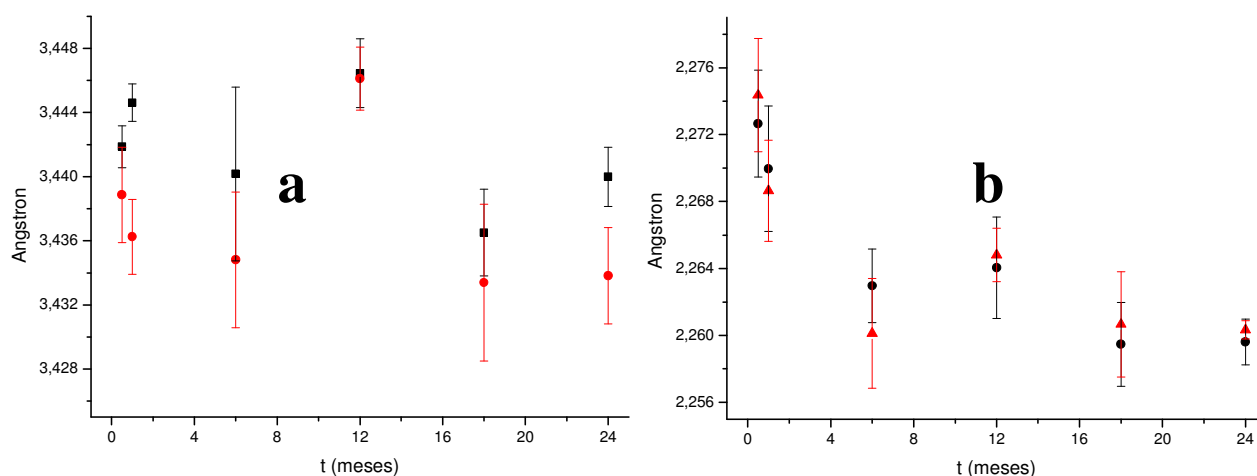


Figura 16: Variação da distância interplanar dos planos 002 (a) ($p=0.0012$) e 310 (b) ($p<0.0001$) das matriz óssea inorgânica obtidas de crânio (●) e fêmur (▲) ao longo da vida dos animais.

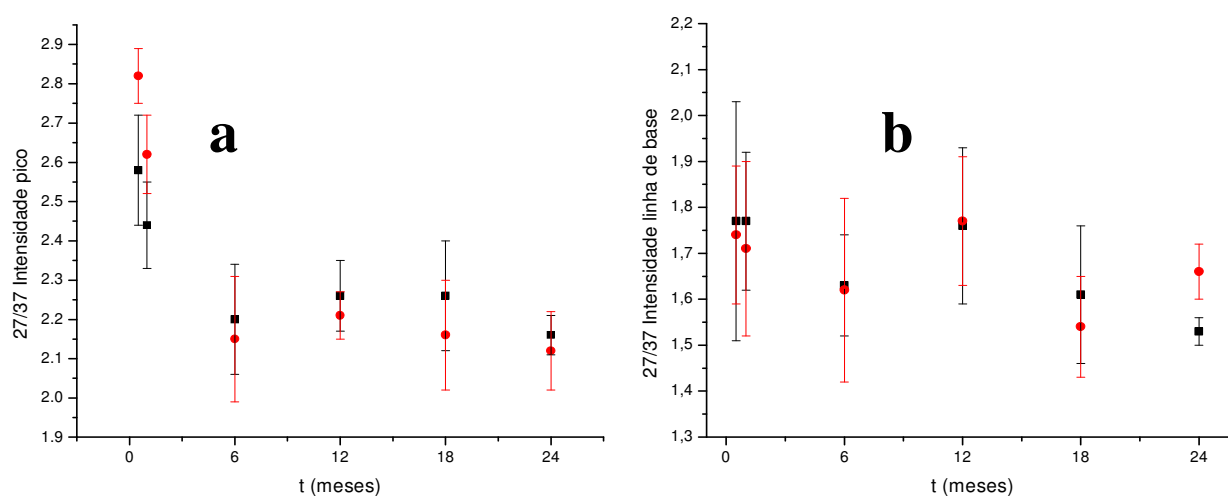


Figura 17: Variação da razão da intensidade dos picos de difração referentes aos planos 002 e 310 (a) ($p=0.0012$) e da razão da intensidade das linhas de base (b) ($p=0.2045$) referentes a estes mesmos dois picos obtidos dos difratogramas da matriz óssea inorgânica proveniente de crânio (●) e fêmur (▲) ao longo da vida dos animais.

Os difratogramas foram analisados pico a pico, uma vez que um estudo onde todos os picos dos difratogramas são avaliados de forma conjunta perde

informações importantes sobre o material, tal como tem sido demonstrado em trabalhos na literatura¹⁷. Uma avaliação dos picos de forma individualizada é particularmente interessante quando tratamos dos picos referentes ao plano 002 ($24^\circ - 27.5^\circ 2\theta$) e 310 (37° e $43^\circ 2\theta$) pois tais picos apresentam uma particularidade: os planos referentes a estes picos (planos 002 e 310) não compartilham átomo algum, como demonstrado na Figura 18.

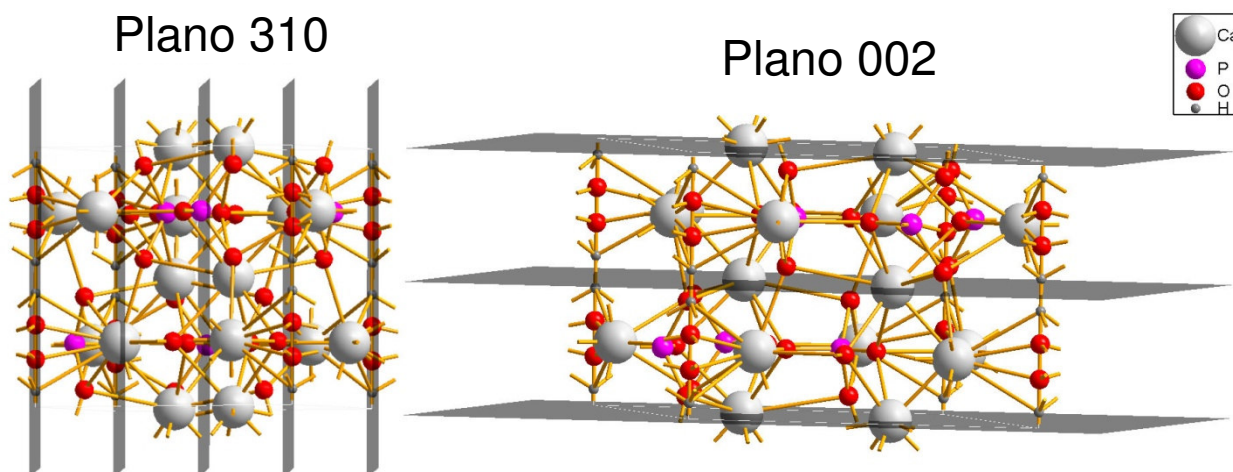


Figura 18: Representação da célula unitária de hidroxiapatita com a indicação dos planos 310 e 002 indicados obtida pelo programa Diamond 3.1.

O fato dos planos 310 e 002 não compartilharem átomos faz com que as variações observadas nos picos referentes a estes planos sejam relativamente independentes entre si. Assim, como estes dois planos respondem de forma diferente à variação da composição do retículo cristalino da matriz óssea inorgânica, seu estudo pode ser relacionado à variação da concentração de íons CO_3^{2-} .

Além do estudo dos picos de forma independente, também é interessante que a variação da intensidade dos picos seja estudada de forma independente da

correspondente intensidade da linha base e largura a meia altura a eles associadas.

O estudo destes parâmetros de forma independente deve-se primeiro, ao fato de que a intensidade de um pico de um difratograma pode ser relacionada ao número de planos cristalinos que difratam naquele determinado pico. Segundo, a intensidade da linha base pode ser relacionada à concentração de uma fase amorfa que espalha a radiação, não difratando em nenhum plano em particular. Por fim, a largura a meia altura pode ser relacionada não só com a distribuição de tamanho dos cristais, mas também com a desordem dos planos cristalinos presentes no cristal.

5.2.2.1 – Cristalinidade da Matriz Óssea Inorgânica.

A existência de um fosfato de cálcio amorfo presente na matriz óssea inorgânica tem sido cogitada a partir da observação de que a linha de base dos difratogramas de matrizes ósseas inorgânicas apresentam uma intensidade maior que as observadas nos difratogramas de HA cristalina (sintética), como apresentado na Figura 19.

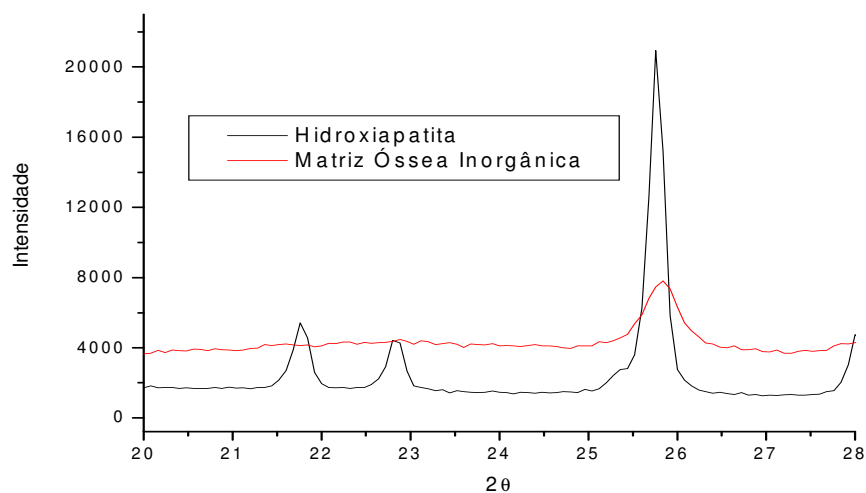


Figura 19: Difratogramas de hidroxiapatita cristalina, matriz óssea inorgânica, apresentando a diferença de intensidade na linha base.

A possibilidade da existência de uma fase amorfa na matriz óssea inorgânica pode ser verificada utilizando-se o método de Rietveld.

Inicialmente o método de Rietveld foi utilizado para a obtenção dos parâmetros cristalinos da hidroxiapatita sintética. A Figura 20 apresenta o gráfico de Rietveld obtido para este material.

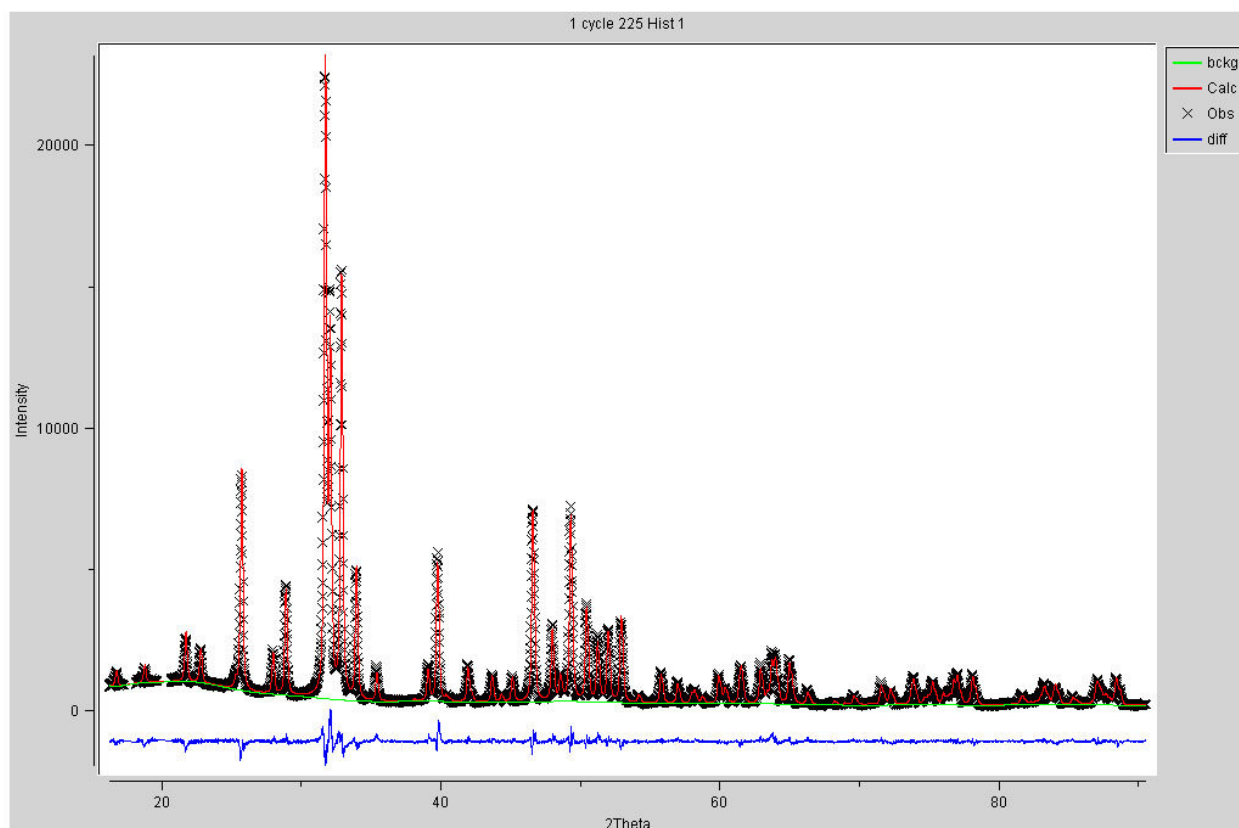


Figura 20: Gráfico de Rietveld para hidroxiapatita sintética.

Nos gráficos de Rietveld os x são os pontos obtidos experimentalmente, a linha verde é a linha de base obtida pelo método, a linha vermelha é o ajuste realizado pelo programa GSAS⁹⁴ que utiliza o método de Rietveld para o ajuste do difratograma experimental e a linha azul representa a diferença obtida entre o ajuste e os dados experimentais.

A Tabela 6 mostra os parâmetros obtidos pelo método de Rietveld para a hidroxiapatita.

Tabela 6: Parâmetros determinados utilizando-se o Método de Rietveld para a Hidroxiapatita

Volume da cela unitária	531,530 Å ³
Densidade	3,135g/cm ³
Cela unitária	9,422-a Å
	9,422-b Å
	6,912-c Å

Os resultados apresentados na Tabela 6 concordam razoavelmente com a literatura¹⁰². A pequena variação dos resultados em relação à literatura mostra que a hidroxiapatita sintética, não é completamente cristalina.

O método de Rietveld também foi aplicado à matriz óssea inorgânica de fêmur com um ano de idade. A Figura 21 apresenta o gráfico de Rietveld resultante.

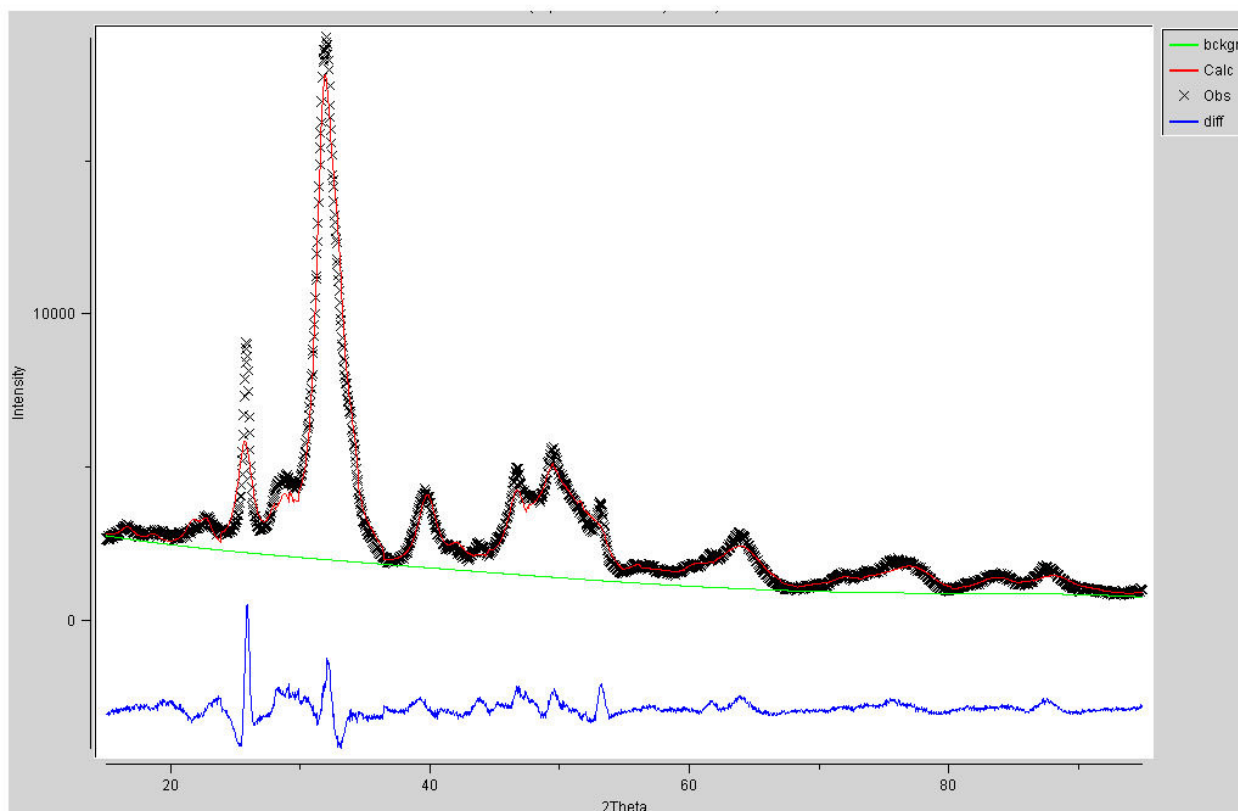


Figura 21: Gráfico de Rietveld para matriz óssea inorgânica proveniente de fêmur de um ano de idade.

Os parâmetros cristalinos da matriz óssea inorgânica são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros determinados utilizando-se o Método de Rietveld para matriz óssea inorgânica proveniente de fêmur de um ano de idade.

Volume da cela unitária	533,221 Å ³
Densidade	3,121g/cm ³
Cela unitária	9,453-a Å
	9,453-b Å
	6,889-c Å

Para a aplicação do método de Rietveld para a matriz óssea inorgânica, foi considerado que ela contém apenas hidroxiapatita como fase de fosfato de cálcio.

Tanto os resultados da literatura¹⁰³, quanto os resultados obtidos neste trabalho, indicam que é possível reproduzir o difratograma da matriz óssea inorgânica sem a necessidade de se considerar a presença de uma fase amorfa nestes materiais.

Como os resultados de ICP-OES e TGA indicaram a presença de íons carbonato e fosfato na matriz óssea inorgânica, foi feita uma tentativa de ajuste dos difratogramas da fase óssea inorgânica pelo método de Rietveld, considerando a presença de CaCO_3 , CaHPO_4 e hidroxiapatita.

Em todas as simulações do difratograma da matriz óssea inorgânica, considerando as várias composições possíveis para este material foi observado uma boa concordância entre a simulação e os resultados experimentais. A boa concordância da simulação dos difratogramas da matriz óssea inorgânica, independente da composição imposta na simulação indica que o método de Rietveld não consegue distinguir as possíveis fases cristalinas presentes na matriz óssea inorgânica.

Com o objetivo de se melhorar a qualidade dos difratogramas e assim possibilitar que o programa GSAS executasse a simulação de forma mais correta, foram realizados difratogramas em um grande número condições distintas (tais como fendas com aberturas reduzidas e tempos de acumulação maiores, entre outras).

Em todos os procedimentos experimentais, o método de Rietveld continuou apontando que a matriz óssea inorgânica é formada por apenas uma fase. Portanto, as variações observadas na matriz óssea inorgânica ao longo da vida dos animais é consequência de modificações que ocorrem nesta fase única e não pela variação da

quantidade de fases diferentes que podem estar presentes na matriz óssea inorgânica.

5.2.3- Relação entre Composição e Cristalinidade

Os resultados das análises de composição mostram que a variação de composição da matriz óssea inorgânica ocorre até o 6º mês de vida dos animais. Os resultados de difratometria de raios x também indicam que a matriz óssea inorgânica modifica suas propriedades cristalográficas até o 6º mês de vida dos animais. Uma vez que as modificações de composição e cristalinidade ocorrem no mesmo intervalo de idade é possível que exista uma relação entre estas duas propriedades.

A existência de uma relação entre a variação da cristalinidade e a composição da matriz óssea inorgânica pode ser avaliada a partir de gráficos da concentração das espécies estudadas em função dos parâmetros cristalográficos determinados a partir dos difratogramas de raios-x. A Figura 22 mostra os gráficos resultantes.

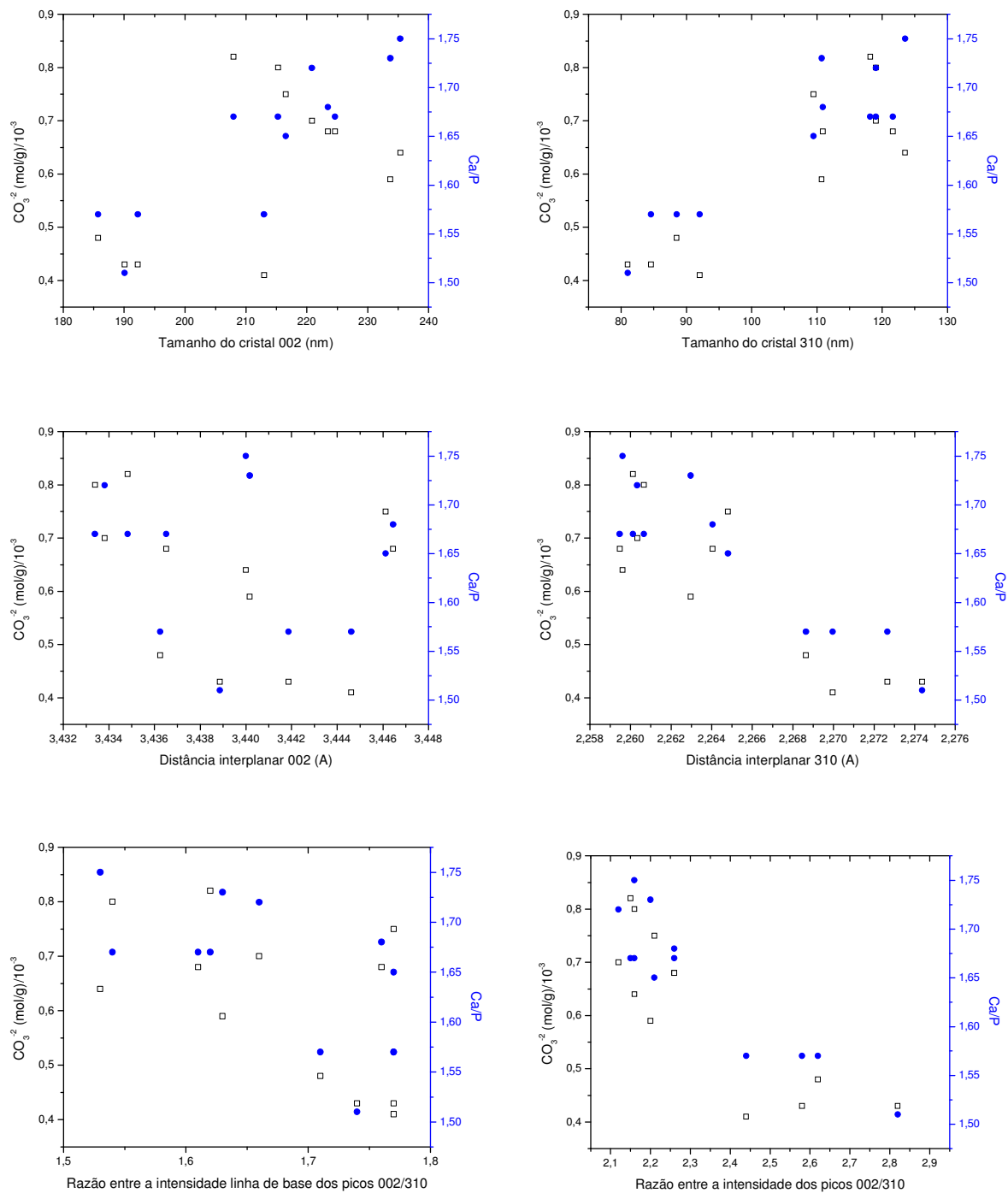


Figura 22: Correlações entre a concentração de íons CO_3^{2-} ($\square$) e razão Ca/P ($\bullet$) com os parâmetros cristalográficos ao longo da vida dos animais.

A análise da possível correlação entre as medidas mostradas nos gráficos da

Figura 22 foi realizada pelo programa GraphPad Prism. Os resultados desta análise são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Resultado da análise de correlação entre a concentração de íons CO_3^{2-} , razão Ca/P e parâmetros cristalográficos.

<i>Propriedade</i>	<i>Existe correlação?</i>	
	CO_3^{2-} (p)	Ca/P (p)
Tamanho de cristalito 002	Não (0,0866)	Sim (0,0001)
Tamanho de cristalito 310	Sim (0,0003)	Sim ($p < 0.0001$)
Distância interplanar 002	Não (0,3225)	Não (0,6182)
Distância interplanar 310	Sim (0,0004)	Sim ($p < 0.0001$)
Razão entre a intensidade dos picos 002/310	Sim (0,0007)	Sim ($p < 0.0001$)
Razão entre a intensidade da linha de base 002/310	Não (0,0657)	Sim (0,0200)

A partir da Tabela 8, é possível observar que existe uma clara correlação entre os parâmetros cristalográficos correspondentes ao plano 310 (distância interplanar e tamanho de cristal) e a concentração de íons carbonato na matriz óssea inorgânica. Esta mesma correlação entre a concentração de íons CO_3^{2-} e parâmetros cristalográficos não é observada para o plano 002.

Com relação à razão Ca/P existe correlação entre todos os parâmetros cristalográficos estudados para os dois planos cristalográficos.

Outro fato interessante mostrado pela análise dos dados da Tabela 8 é que a

variação da razão entre as intensidades da linha de base dos picos correspondentes aos planos 002 e 310 não pode ser correlacionada com a concentração de carbonato e apresenta apenas uma leve indicação, de que pode ser relacionada à variação da razão Ca/P. Esses resultados indicam que apesar da presença de íons carbonato em hidroxiapatita ser geralmente relacionada a diminuição da cristalinidade na matriz óssea inorgânica essa relação não pode ser estabelecida.

5.2.3.1- Considerações sobre a Relação entre a Composição e Cristalinidade

Os resultados de composição e parâmetros cristalográficos da matriz óssea inorgânica mostram que estes parâmetros variam de forma significativa ao longo da vida dos animais.

Aplicando o teste estatístico t de student (utilizando o programa Graphpad Prism) aos resultados das caracterizações de matriz óssea inorgânica proveniente de crânios e fêmures de animais de mesma idade, não é encontrada nenhuma variação significativa. Os resultados deste teste estatístico mostram que as características estudadas da matriz óssea inorgânica não diferem entre os ossos estudados.

A análise dos gráficos (Figuras 15 a 17) onde são apresentados os parâmetros cristalográficos para matriz óssea inorgânica demonstra os seguintes resultados: A variação do tamanho dos cristais e da distância interplanar no eixo ab (plano 310) é maior ao longo da vida dos animais do que a variação no eixo c (plano 002). É possível observar também na Figura 17 que a razão da intensidade dos picos varia significativamente, o que não ocorre com a razão da intensidade da linha base destes picos.

A distância entre os planos cristalinos é determinada, entre outros fatores, pelo tamanho dos átomos ou íons que formam aquele determinado plano. Como mencionado anteriormente, os planos 310 e 002 não compartilham átomo algum e, à distância inter-planar varia de forma independente. Os resultados apresentados na Figura 22 e na Tabela 8 mostram que a distância inter-planar entre os planos 310 pode ser correlacionada com o aumento da concentração de íons CO_3^{2-} e com a variação da razão Ca/P na matriz óssea inorgânica. À distância inter-planar entre os planos 002, por outro lado, pode ser relacionada apenas com a variação da razão Ca/P. Apesar destes resultados serem esperados, eles não tinham sido demonstrados para a matriz óssea inorgânica até o momento.

Uma vez que a técnica de difratometria de raios-x é uma técnica pouco sensível e analisa a amostra como um todo (e não apenas a superfície) a existência de correlação entre a variação dos parâmetros cristalográficos do plano 310 demonstra que a incorporação dos íons CO_3^{2-} ocorre pela substituição dos íons PO_4^{3-} ou OH^- na rede cristalina da matriz óssea inorgânica (como demonstrado em outros trabalhos na literatura) e não ocorre apenas na superfície dos materiais.

Em relação à intensidade dos picos dos difratogramas, é esperado que esta varie de acordo com a quantidade de fases que difratam naquele ângulo. É esperado também que na medida em que os cristais crescem, a intensidade dos picos cresça, uma vez que o número de planos que difratam naquele determinado ângulo aumenta.

Os resultados de FWHM mostraram que o tamanho dos cristais cresce simultaneamente para os dois planos de difração, e os resultados apresentados na Figura 17 mostram que a razão 002/310 da intensidade dos picos diminui na medida em que os animais envelhecem. Dessa forma, é possível afirmar que existe

uma maior variação do tamanho dos cristais no eixo ab (310) do que no eixo c (002).

Os resultados não mostram variação alguma na razão da intensidade das linhas de base dos picos estudados, ao longo da vida dos animais. A ausência desta variação, combinada com a variação significativa da concentração de íons CO_3^{2-} nas amostras, permite afirmar que a presença, ou a variação da quantidade de uma possível fase amorfa na matriz óssea inorgânica responsável pela linha base não pode ser relacionada à presença do íon CO_3^{2-} . Este resultado em particular vai de encontro aos resultados da literatura gerados a partir de estudos em fosfatos de cálcio sintéticos e extrapolados para a matriz óssea inorgânica, uma vez que nestes trabalhos a concentração de íons carbonato é frequentemente relacionada com a presença de um fosfato de cálcio amorfo. Uma vez mais estes resultados demonstram que a incorporação dos íons carbonato ocorre na rede cristalina da matriz óssea inorgânica e não na superfície ou mesmo em uma nova fase presente na matriz óssea inorgânica.

5.2.4 – Microscopia Eletrônica de Varredura.

Foram obtidas micrografias por Microscopia Eletrônica de Varredura da matriz óssea inorgânica com o objetivo de se estudar a morfologia deste material tanto no nível de microestrutura quanto no nível de nanoestrutura. Com estes resultados foi possível avançar no conhecimento da nanoarquitetura dos ossos. As micrografias apresentadas neste trabalho são micrografias representativas de mais de 700 micrografias obtidas de diferentes amostras de matriz óssea inorgânica.

As Figuras 23 a 26 apresentam micrografias com aumentos de 1.000x e 10.000x da matriz óssea inorgânica.

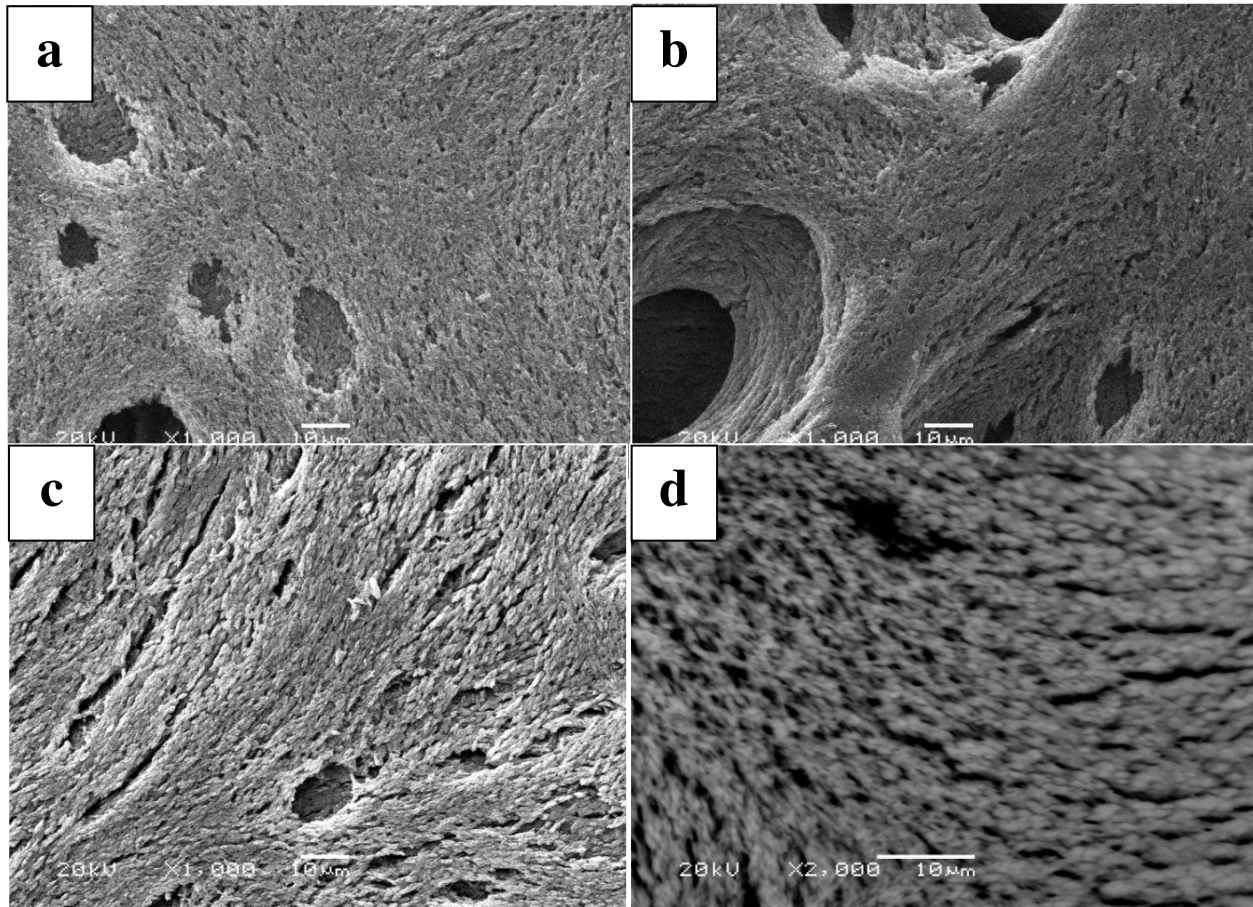


Figura 23: Micrografias de matriz óssea inorgânica de crânios (a, c) e fêmures (b, d) com 15 dias (a, b), 1 mês (c, d) de idade, aumento de 1.000x.

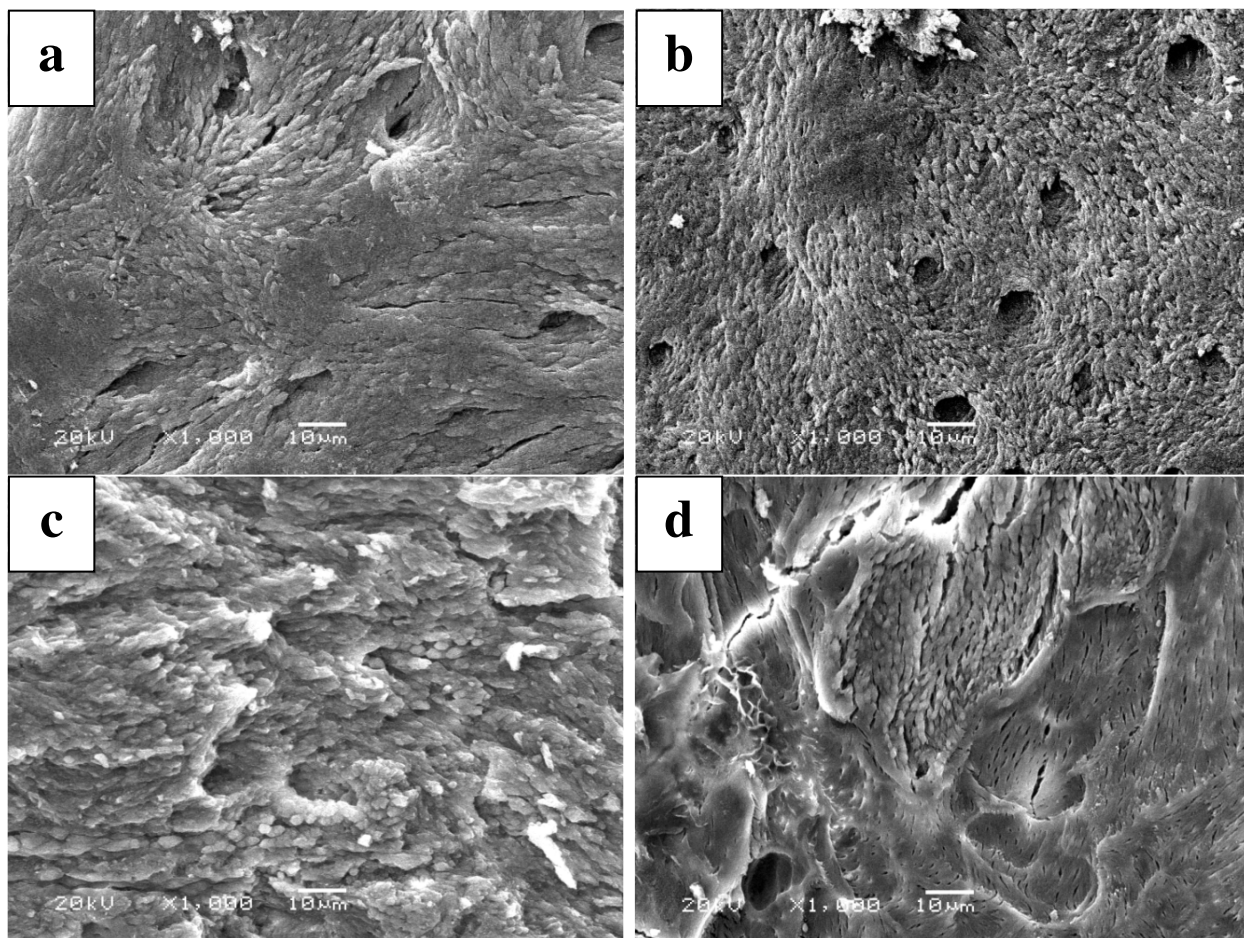


Figura 24: Micrografias de matriz óssea inorgânica de crânios (a, c) e fêmures (b, d) com 1 ano (a, b) e 1 ano e meio (c, d) de idade, aumento de 1.000x.

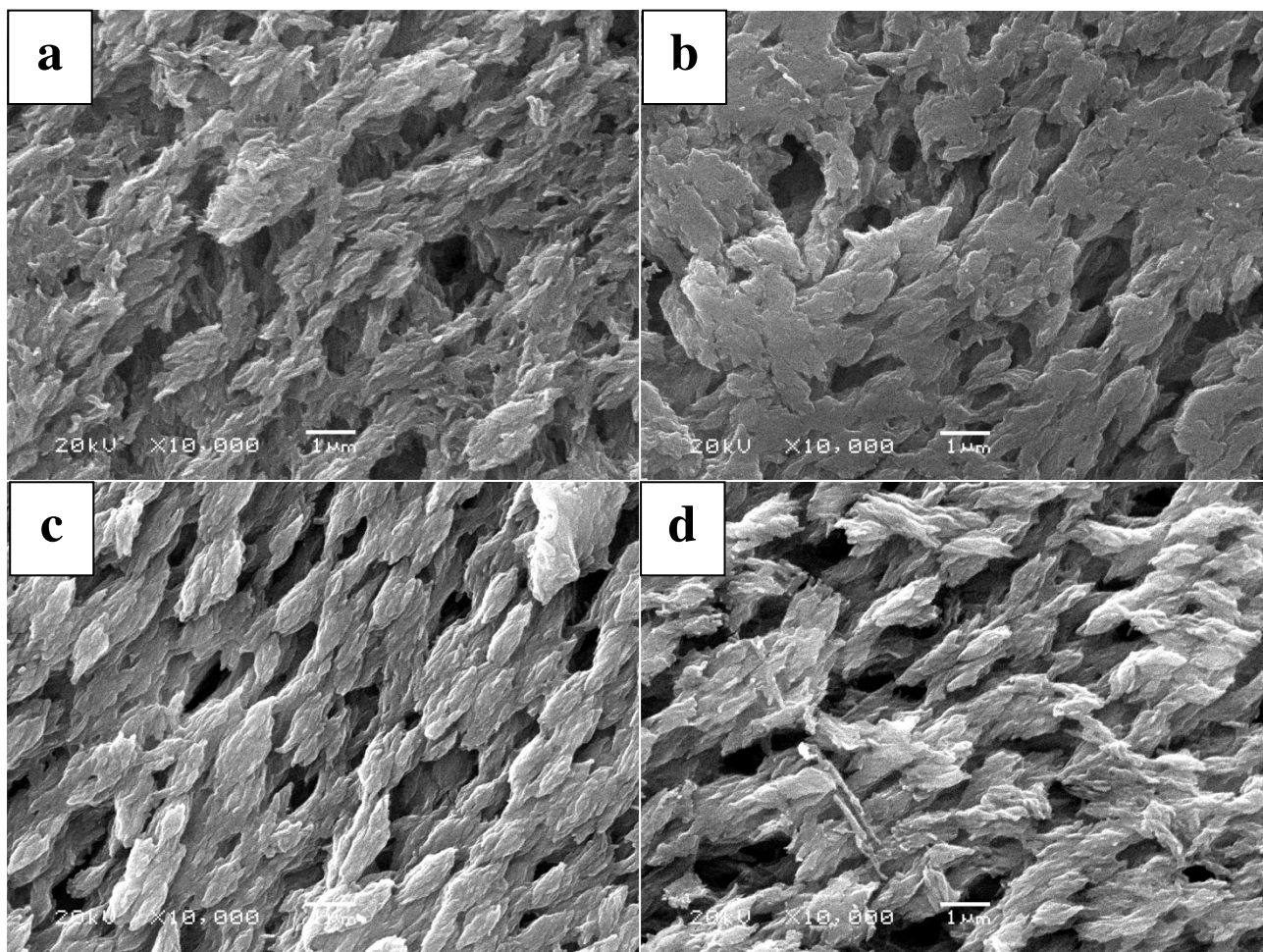


Figura 25: Micrografias de matriz óssea inorgânica de crânios (a, c) e fêmures (b, d) com 15 dias (a, b), 1 mês (c, d) de idade, aumento de 10.000x.

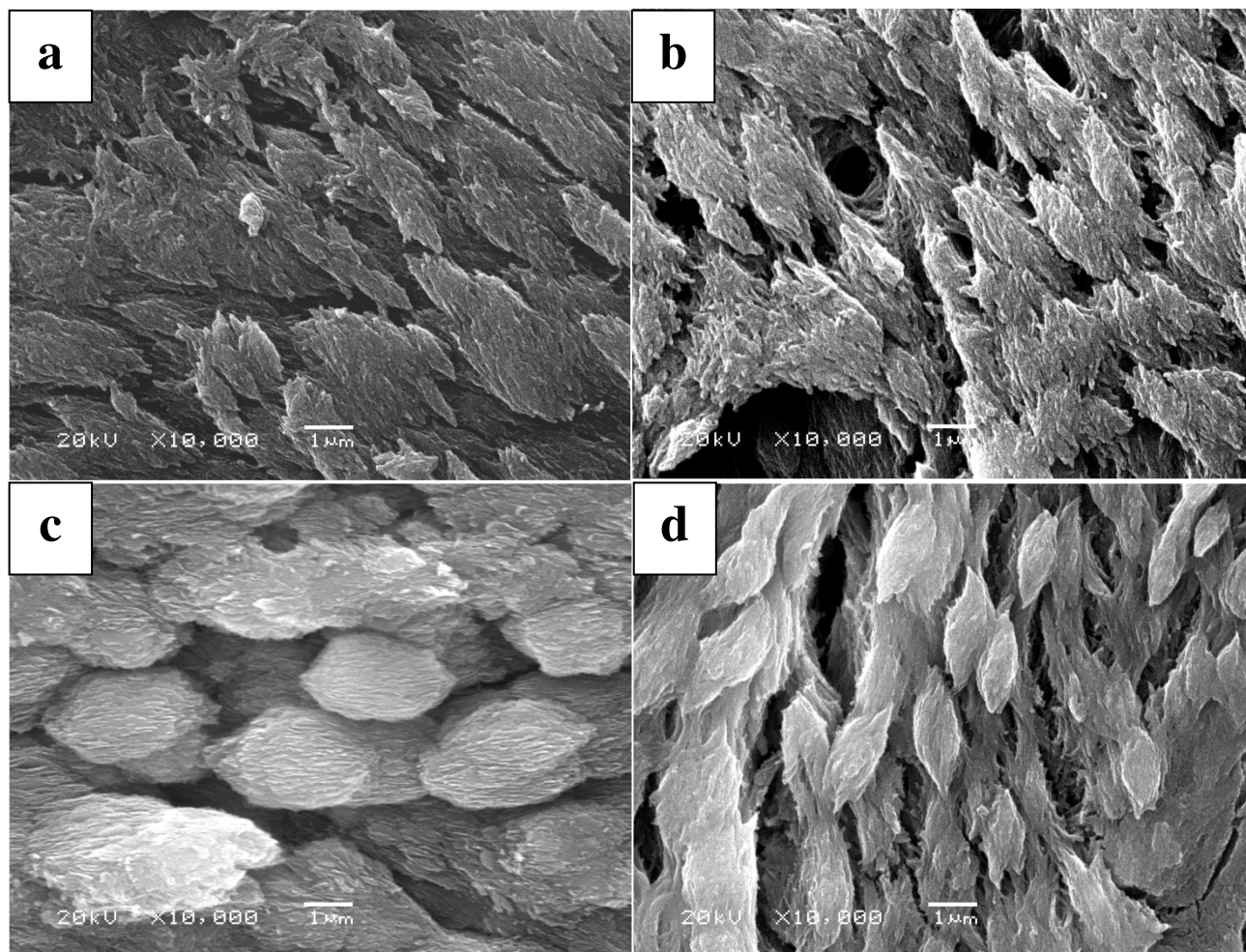


Figura 26: Micrografias de matriz óssea inorgânica de crânios (a, c) e fêmures (b, d) com 1 ano (a, b) e 1 ano e meio (c, d) de idade, aumento de 10.000x.

Observando-se as micrografias (Figuras 23 a 26) é possível notar que a morfologia da matriz óssea inorgânica proveniente do fêmur e do crânio são muito semelhantes no nível microscópico. É possível observar, também, que esta morfologia varia com a idade mas que essa variação é praticamente a mesma para os dois tipos de ossos.

A matriz óssea inorgânica tanto de fêmur como crânio com 15 dias de idade se apresenta na forma de uma sobreposição de pequenas placas de fosfato de

cálcio. Entre os aglomerados dessas placas há sulcos, que eram ocupados pela matriz orgânica. Com um mês as placas são claramente visíveis e os espaços deixados pela matriz orgânica são menores. Com idade de um ano fica evidente a maior agregação das placas com a formação de pequenos espaços, o que confere um aspecto compacto a essa fase óssea mineral.

Estes resultados demonstraram que apesar das diferenças quanto à origem embriológica, microarquitetura e estímulos mecânicos recebidos durante a vida, as características microestruturais da matriz óssea inorgânica de fêmur e de crânio são semelhantes. Por fim, podemos dizer que existe um processo de modificação da morfologia da matriz óssea inorgânica com o aumento da idade dos animais, e que tal processo leva à formação de estruturas mais compactas, o que vai ao encontro dos dados de densitometria óssea encontrados na literatura.

Com o objetivo de estudar a morfologia da matriz óssea inorgânica no nível nanoscópico foram obtidas microscopias com aumento de 50.000x. Estas microscopias são apresentadas na Figura 27.

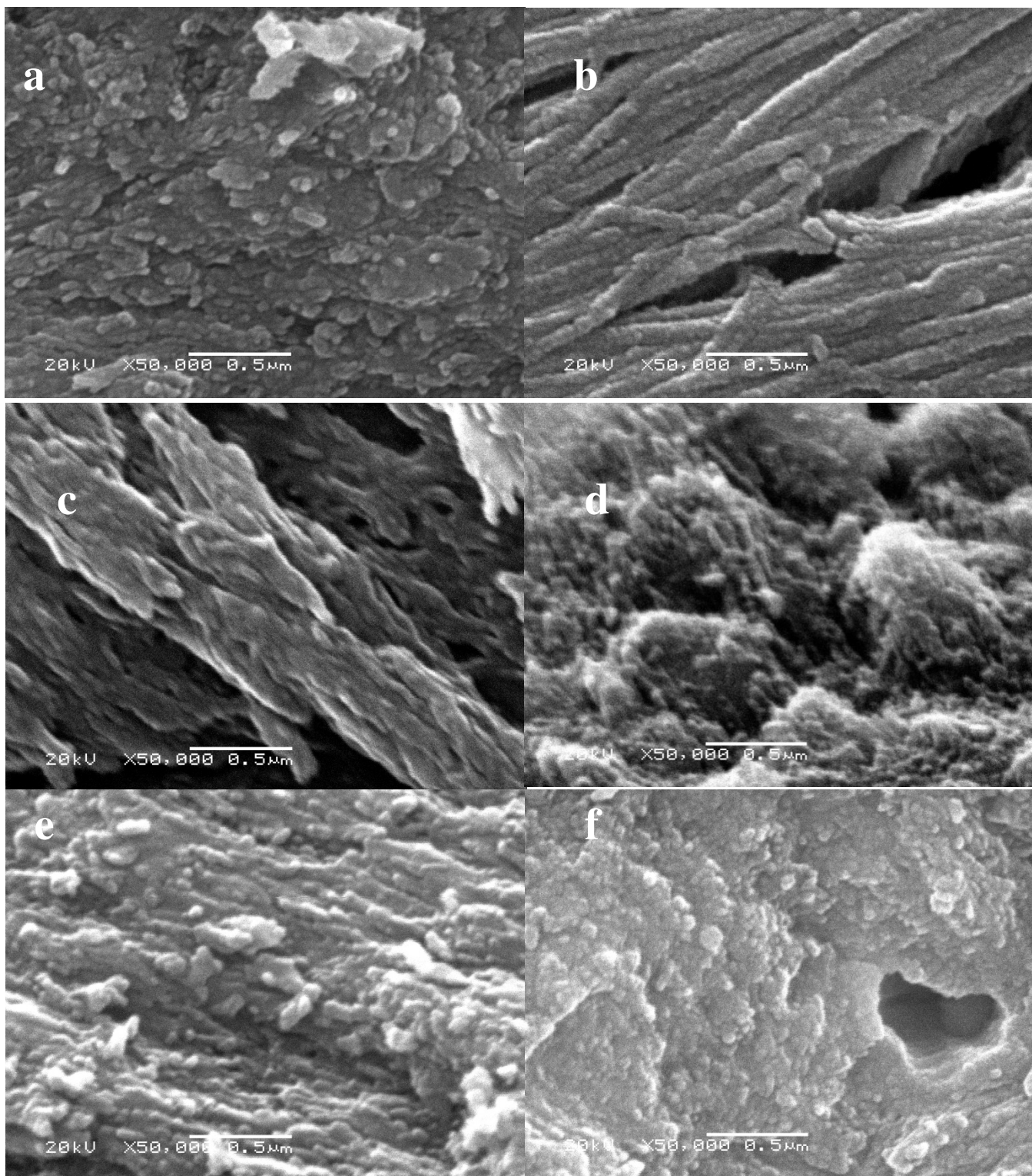


Figura 27: Micrografias de fratura de matriz óssea inorgânica proveniente de crânio: 1 ano (a), superfície de crânio 1 ano (b, c), fratura de fêmur 15 dias (d), 1 mês (e) e 1 ano (f).

Com aumento de 50.000x é possível observar que a matriz óssea inorgânica é formada por partículas globulares da ordem de 70 nm, e que estas partículas são, por sua vez, formadas por partículas menores da ordem de 20 nm. Foram também obtidas micrografias com aumento de 100.000x e 150.000x, que podem ser observadas nas Figuras 28 e 29.

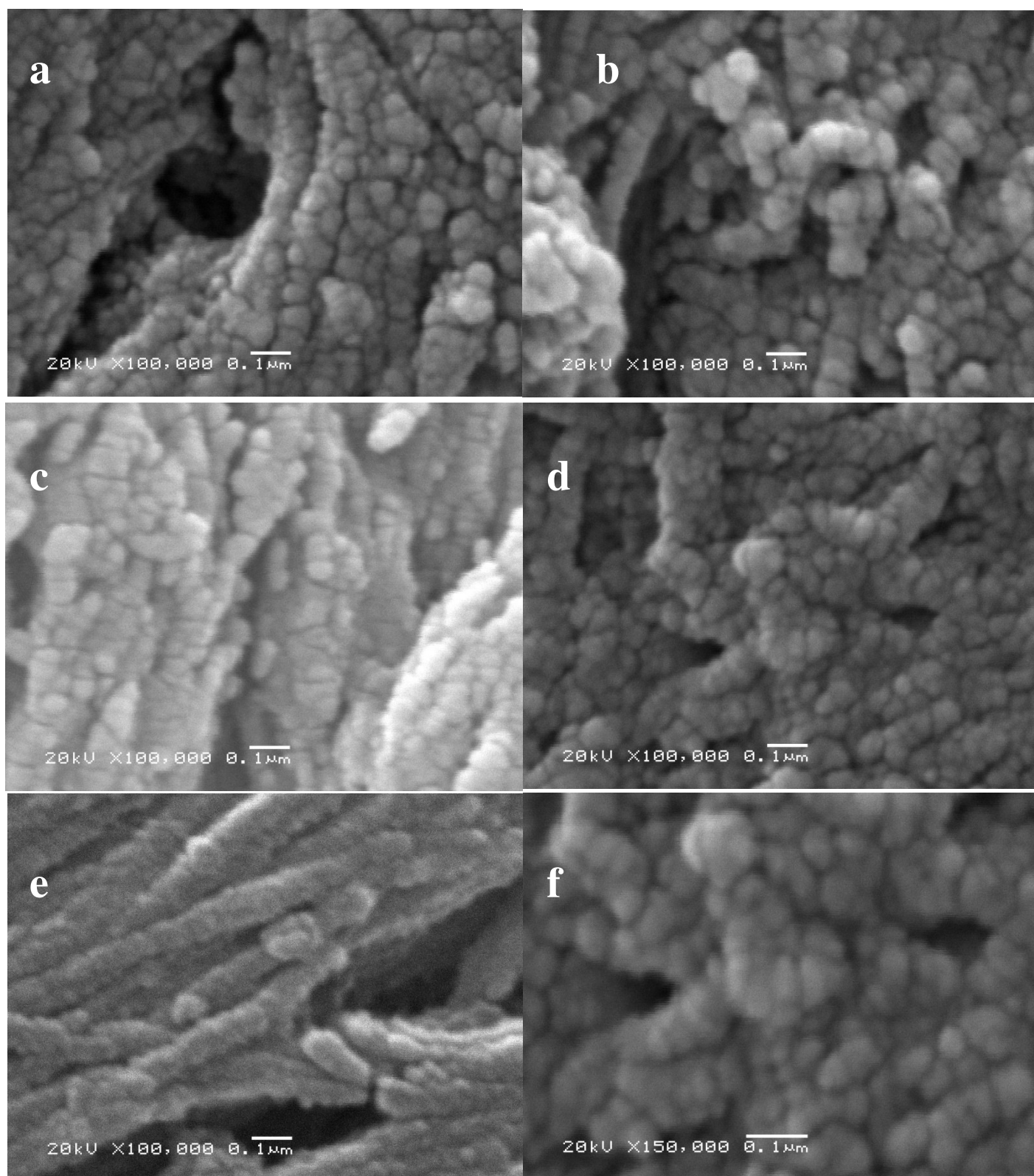


Figura 28: Microscopias da matriz óssea inorgânica proveniente de crânio de 1 ano de idade com aumento de 100.000x (a,b, c, d, e) e 150.000x (f).

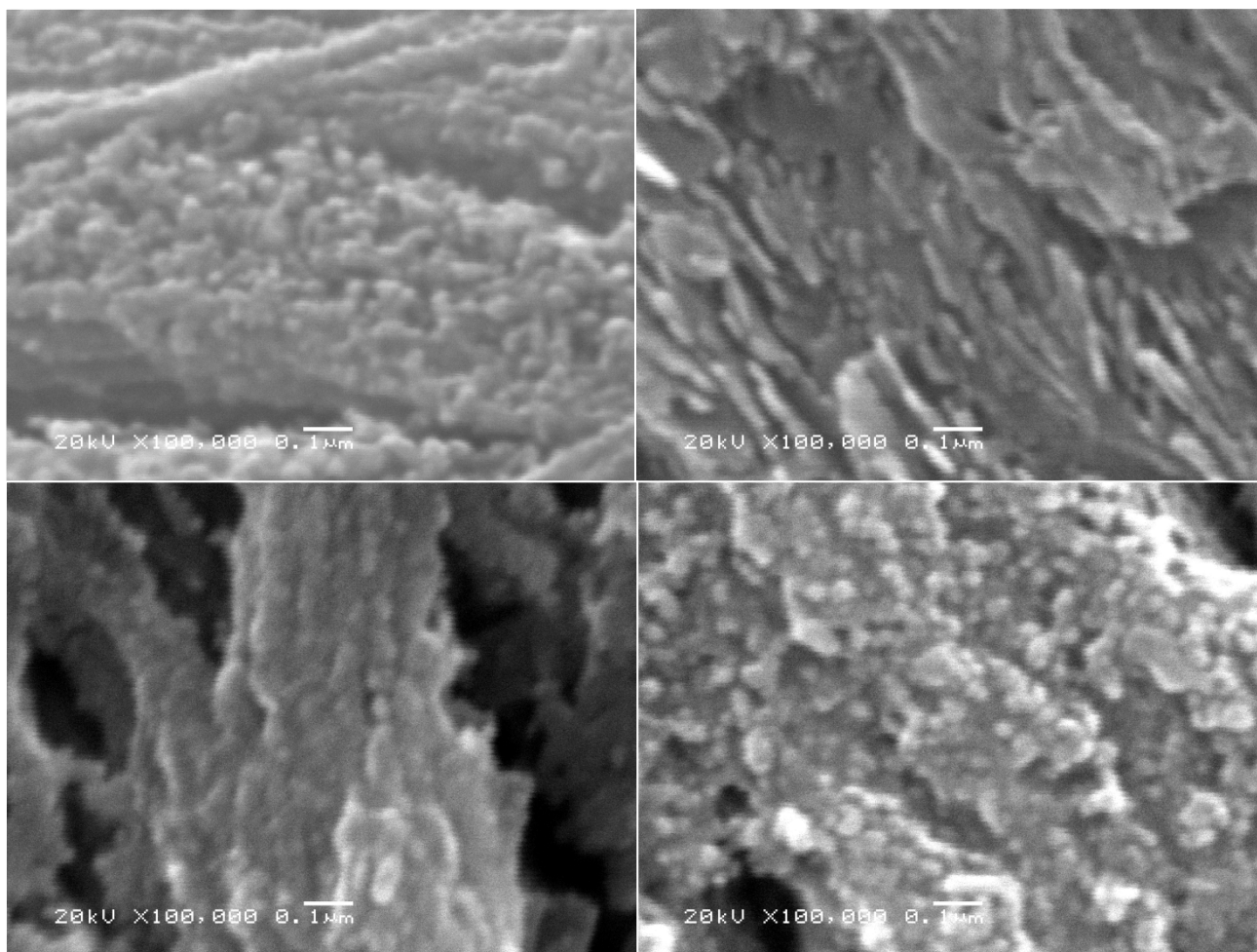


Figura 29: Microscopias da matriz óssea inorgânica proveniente de crânio de animais com idade de um ano e meio. Aumentos de 100.000x.

É possível observar nas micrografias, com aumento de 100.000x, que a matriz óssea inorgânica é formada por partículas globulares da ordem de 70 nm, e que estas partículas são, por sua vez, formadas por partículas menores da ordem de 20 nm. As dimensões das partículas que formam a matriz óssea inorgânica, observadas nas micrografias são concordantes com as dimensões determinadas a partir dos difratogramas de raios x usando a equação de Debye-Scherer.

5.2.5- Organização da Matriz Óssea Inorgânica nos Ossos

Neste trabalho procuramos estudar e propor um modelo para a nanoestrutura da matriz óssea. Esse modelo será apresentado adiante.

A Figura 1 mostra esquematicamente o modelo mais aceito para a nanoestrutura dos ossos. Segundo este modelo espera-se que micrografias obtidas de cortes longitudinais de ossos, com dimensões de 40 nm de largura, 1,71 nm de espessura e comprimentos variáveis.

Como afirmado anteriormente, estas estruturas não foram observadas de forma incontestável até o momento em micrografias de matriz óssea inorgânica. Deve-se acrescentar que alguns autores afirmam que o tamanho dos cristais de matriz óssea inorgânica de 67nm é uma prova de que os cristais se encontram entre as moléculas de colágeno.

A afirmação de que o tamanho de cristais da matriz óssea inorgânica de 67 nm é consequência de sua formação entre as moléculas de colágeno contradiz o fato experimental estabelecido de que o espaçamento entre as fibrilas de colágeno é de 40 nm. A distância de 67 nm observada nestas micrografias é, na verdade, referente a soma do espaço entre o final de uma molécula e o começo de outra (40nm) e a sobreposição de partes das moléculas adjacentes (27nm), como é possível observar no diagrama apresentado na Figura 1.

De forma geral é possível afirmar que os ossos apresentam apenas algumas estruturas básicas. Estas estruturas aparecem em todos os trabalhos, sobre a nanoestrutura dos ossos, independente da técnica utilizada ou origem dos ossos^{25, 28, 34, 36, 37, 38, 57, 96}. As estruturas apresentadas em todos estes trabalhos são semelhantes às estruturas apresentadas nas Figuras 23 a 29 deste trabalho.

As micrografias da matriz óssea inorgânica mostram fibras recobertas por estruturas globulares com aproximadamente 70 nm de diâmetro e em alguns casos também se observa estruturas formadas por glóbulos com diâmetros menores que 5 nm. Observa-se também, em algumas micrografias, estruturas formadas por placas com aproximadamente 10 nm de espessura e comprimentos variáveis.

As placas existentes na matriz óssea inorgânica são em sua maioria ligadas às estruturas globulares, mas em alguns casos é possível notar placas independentes das estruturas globulares.

Uma vez que as estruturas apresentadas nas micrografias apresentadas neste trabalho e as micrografias existentes na literatura não apresentam rigorosamente as dimensões preditas pelo modelo aceito da nanoestrutura dos ossos, é razoável considerar que o modelo existente deve sofrer profundos aprimoramentos. Este novo modelo deve necessariamente ser capaz de descrever rigorosamente as estruturas observadas nas micrografias e, ao mesmo tempo, deve ser capaz de reproduzir as proporções de volume e massa observadas entre a matriz orgânica e inorgânica presente nos ossos. Apesar da necessidade de que o modelo represente de forma rigorosa a proporção entre as matrizes formadoras dos ossos, essa proporção é raramente considerada nos trabalhos da literatura, sendo geralmente negligenciada nos modelos existente.

Analisando as micrografias apresentadas da matriz óssea inorgânica neste trabalho assim como as micrografias existentes na literatura, é possível afirmar que a matriz orgânica é formada por fibras recobertas por estruturas globulares ou por placas, as quais são formadas a partir destas estruturas globulares. Estas fibras recobertas apresentam aproximadamente 100nm de diâmetro e as placas apresentam aproximadamente 10 nm de espessura.

É bem estabelecido que os ossos são formados por fibras de colágeno (como demonstrado nas inúmeras microscopias de transmissão presentes na literatura) e fosfatos de cálcio. Desta forma, acreditamos que seja possível afirmar que as fibras observadas nas micrografias são fibras de colágeno recobertas por matriz inorgânica, e que as placas observadas são também parte da matriz inorgânica, que se forma entre as fibras de colágeno.

Esta hipótese permite realizar previsões sobre as características e propriedades dos ossos. A primeira, é que micrografias de ossos descalcificados devem apresentar fibras com diâmetros menores do que os observados nas micrografias de ossos completos ou mesmo desproteínados (uma vez que pela nossa hipótese, a superfície das fibras de colágeno é recoberta com a matriz inorgânica).

Essa hipótese pode ser testada determinando-se o diâmetro das fibras observadas em ossos frescos e descalcificados. Desta forma, utilizando o programa Image Pro Plus, determinamos o diâmetro de fibras de ossos intactos e ossos descalcificados a partir de micrografias apresentadas na literatura obtidas por TEM, SEM e AFM. Foram analisadas mais de 25 micrografias de ossos, provenientes de trabalhos publicados nos últimos 20 anos^{25, 28, 33, 35-37, 57, 95} o que totalizou mais de 550 medidas de diâmetros de fibras. Um histograma com a distribuição dos diâmetros de fibras é apresentado na Figura 30.

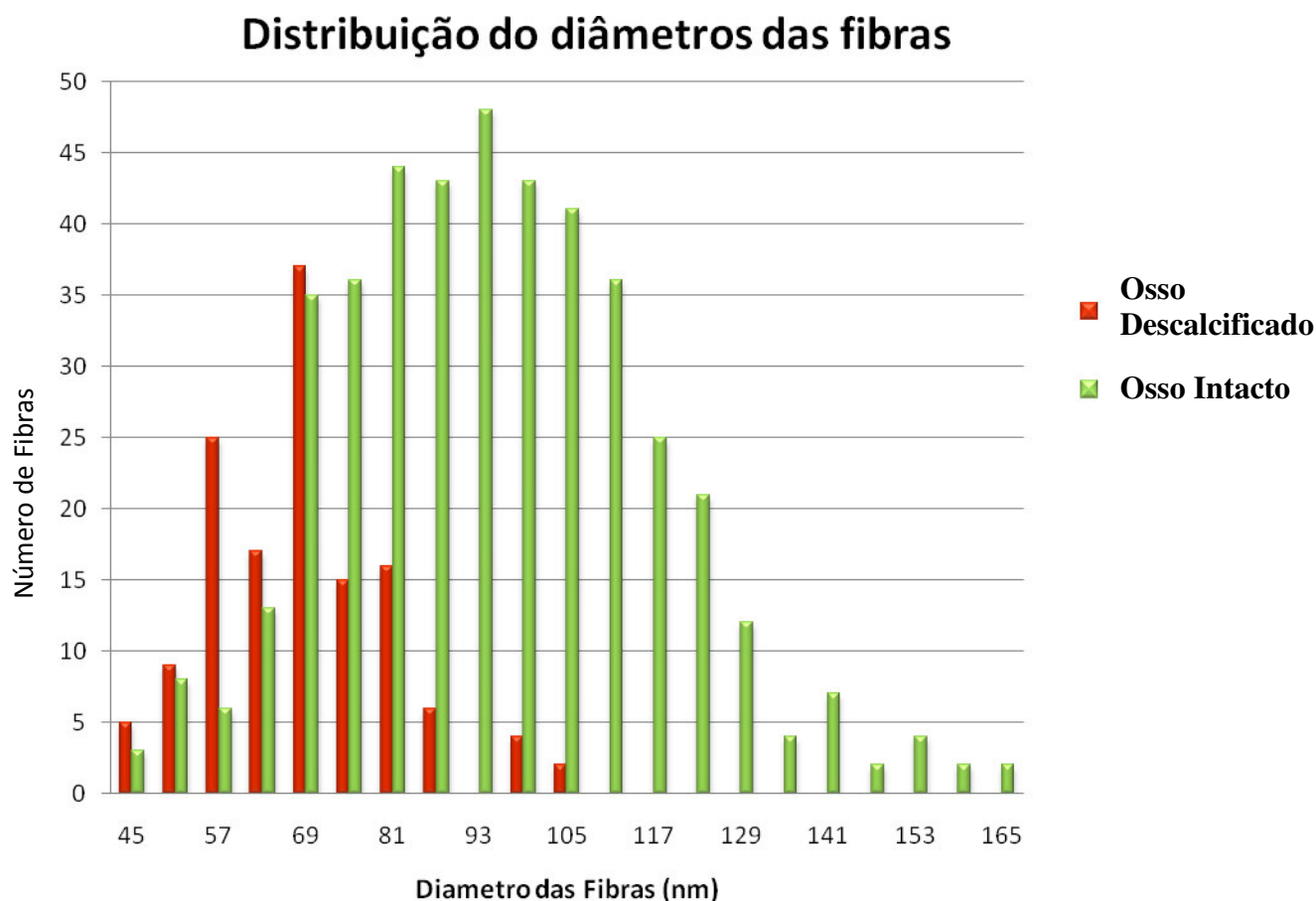


Figura 30: Distribuição dos diâmetros das fibras observadas nas micrografias de ossos descalcificados e ossos frescos.

Analisando o histograma apresentado na Figura 30, é possível observar que o grupo com diâmetros menores foi formado pelos diâmetros determinados nas micrografias de ossos descalcificados e que o grupo com maiores diâmetros é formado pelos diâmetros obtidos das micrografias de ossos intactos. O valor médio para as fibras descalcificadas é de 68 ± 22 nm e para as fibras calcificadas é de 95 ± 13 nm.

É possível também notar na Figura 30 que o histograma dos diâmetros das fibras descalcificadas se sobrepõe ao histograma das fibras calcificadas. Esse fato

condiz com a hipótese de que a calcificação das fibras de colágeno ocorre na superfície. Uma vez que as micrografias foram obtidas a partir de amostras de ossos de animais com diferentes idades, era esperada a existência de fibras em diferentes estágios de calcificação, o que explica o fato de que a variação no diâmetro das fibras calcificadas compreende os valores no intervalo do diâmetro das fibras totalmente descalcificadas até totalmente calcificadas.

Os resultados das análises de diâmetro de fibras reportados na literatura confirmam desta forma, a primeira hipótese do novo modelo proposto.

A média do diâmetro das fibras calcificadas permite realizar outra previsão. Baseado no fato bem estabelecido de que a proporção entre massa da matriz inorgânica e massa da matriz orgânica presente nos ossos é de aproximadamente 70/30%, a densidade do colágeno ($1,35 \text{ g/cm}^3$) e da hidroxiapatita ($3,1 \text{ g/cm}^3$)²⁰ e que o arranjo destas matrizes seja na forma de dois cilindros concêntricos é possível prever que o diâmetro das fibras de colágeno seja de aproximadamente 67 nm. Este valor está em perfeita concordância com os resultados experimentais obtidos para o diâmetro das fibras descalcificadas, e mostra que mais de 95% da matriz inorgânica óssea se encontra na superfície das fibras de colágeno.

Por fim, para que o modelo da calcificação externa das fibras de colágeno seja confirmado, é essencial que as micrografias existentes sejam reproduzidas considerando-se as premissas do modelo. De acordo com o modelo proposto é possível reconstruir a morfologia observada nas micrografias recobrimo fibras com estruturas globulares e os espaços entre as fibras com placas. Tais estruturas globulares devem ser arranjadas regularmente na superfície das fibras os quais devem apresentar diâmetros de aproximadamente 67 nm.

Para a reconstrução das estruturas observadas nas micrografias é necessário que as estruturas globulares sejam distribuídas uniformemente na superfície das

fibras de colágeno, de forma a reproduzir a organização das moléculas de tropocolágeno existentes na superfície. Essa organização pode representar pontos de nucleação para o crescimento dos glóbulos de fosfato de cálcio.

Apesar do padrão de organização das moléculas de tropocolágeno ser utilizado para se reconstruir as estruturas observadas nas micrografias, essa reconstrução não requer em momento algum que seja assumido a existência de alguma calcificação no interior das fibras, entre as moléculas de tropocolágeno.

A Figura 31 apresenta a reconstrução das estruturas observadas segundo as premissas delineadas acima, assim como, a sobreposição do modelo de reconstrução com as micrografias da matriz óssea.

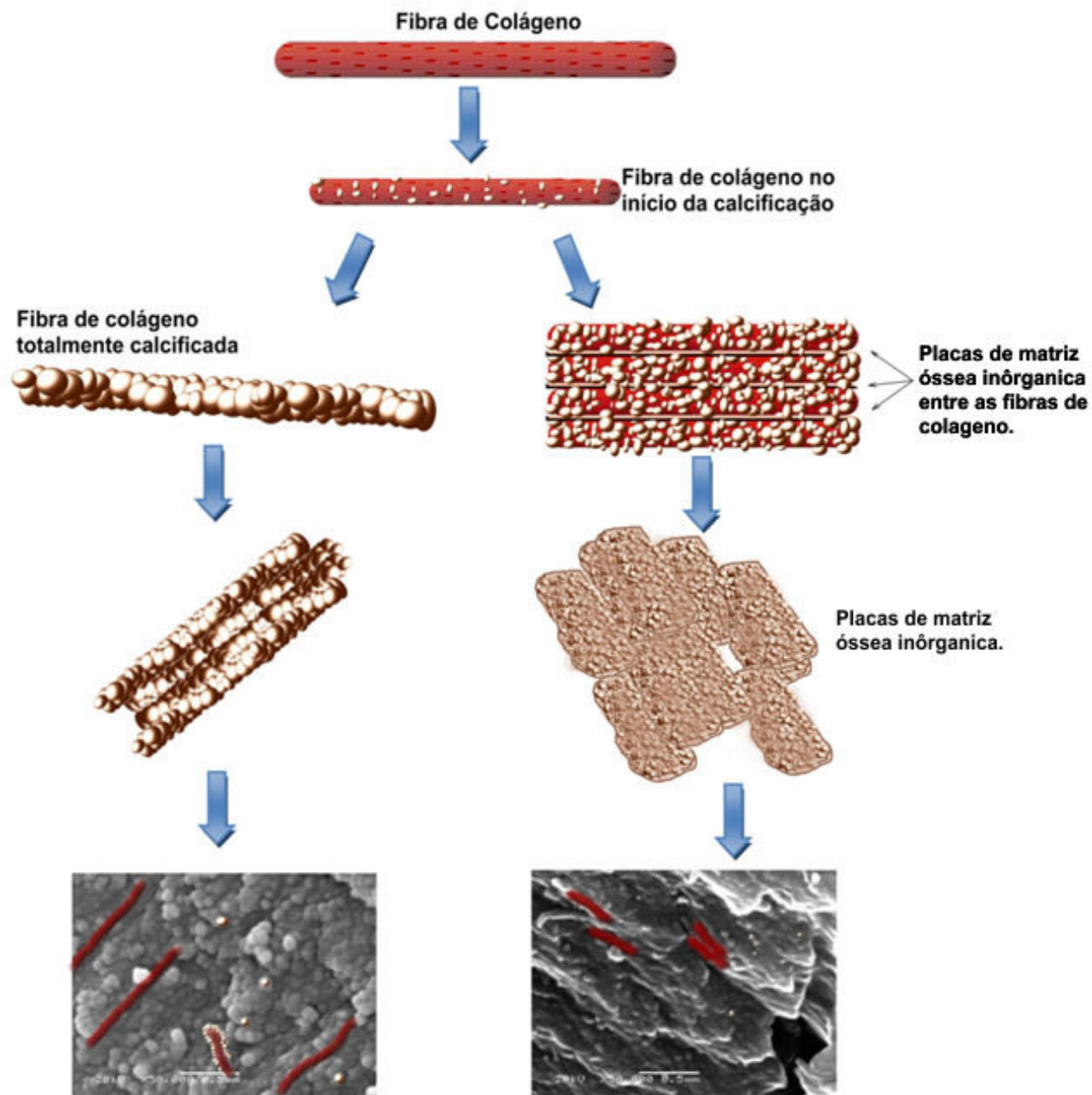


Figura 31: Estruturas recriadas de acordo com o modelo proposto. Sobreposição destas estruturas em micrografias de matriz óssea.

As estruturas apresentadas na Figura 31, construídas de acordo com o modelo proposto, reproduzem perfeitamente as estruturas observadas nas micrografias. Quando as estruturas criadas segundo as premissas do modelo

proposto são sobrepostas, é possível notar a localização das fibras entre as placas de matriz óssea inorgânica. As fibras desenhadas sobre as micrografias, representando as fibras originais da matriz óssea, têm aproximadamente 68 nm, diâmetros estes concordantes com os diâmetros apresentados nos histogramas.

Uma vez que todas as previsões derivadas deste novo modelo da nanoestrutura dos ossos apresentado por nós são concordantes com os dados experimentais, podemos com relativa segurança, propor que o modelo descreve adequadamente a nanoestrutura da matriz óssea. Podemos também considerar este modelo bastante abrangente, uma vez que ele é capaz de descrever a morfologia apresentada em todas as micrografias de ossos apresentadas na literatura, independentemente do tipo de osso, idade e animal de origem.

5.3- Estudo da Superfície dos Fosfatos de Cálcio

5.3.1 - Tempo de Equilíbrio

Para a realização do estudo de isotermas de adsorção foi necessário primeiramente se determinar o tempo para que o equilíbrio entre fosfato de cálcio e solução aquosa seja atingido. A partir do gráfico apresentado na Figura 32 que mostra a variação da concentração de Ca^{2+} em solução de NaCl a $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ na qual foi suspensa a hidroxiapatita é possível determinar que é necessário aproximadamente 10 dias para que o equilíbrio entre hidroxiapatita e a solução seja atingido.

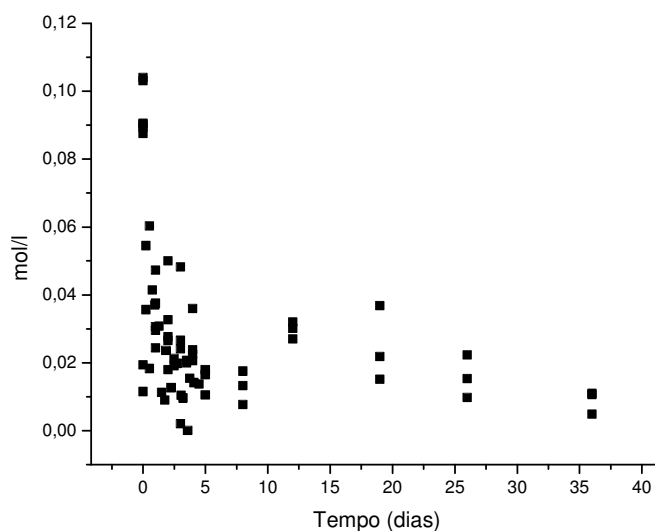


Figura 32: Variação da concentração de Ca^{+2} em solução de NaCl em contato com hidroxiapatita ao longo do tempo a $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$.

Uma vez que o equilíbrio é atingido após 10 dias, os estudos de equilíbrio foram realizados por medida de segurança utilizando-se em período de 14 dias

após a suspensão dos fosfatos de cálcio nas soluções.

5.3.2 – Isotermas

Para o estudo das propriedades de equilíbrio entre fosfato de cálcio/soluções aquosas foram analisados sistemas contendo diferentes fosfatos de cálcio suspensos em soluções de NaCl e SBF, tal como descrito no procedimento deste trabalho. Nestes sistemas, após o equilíbrio, foram determinadas a concentração de Ca^{2+} e a concentração total de P (P_T) na solução.

As Figuras 33 a 42 apresentam as concentrações de Ca^{2+} e P_T nos sistemas após o equilíbrio, em função da concentração de cálcio presentes inicialmente na solução antes da suspensão dos fosfato de cálcio.

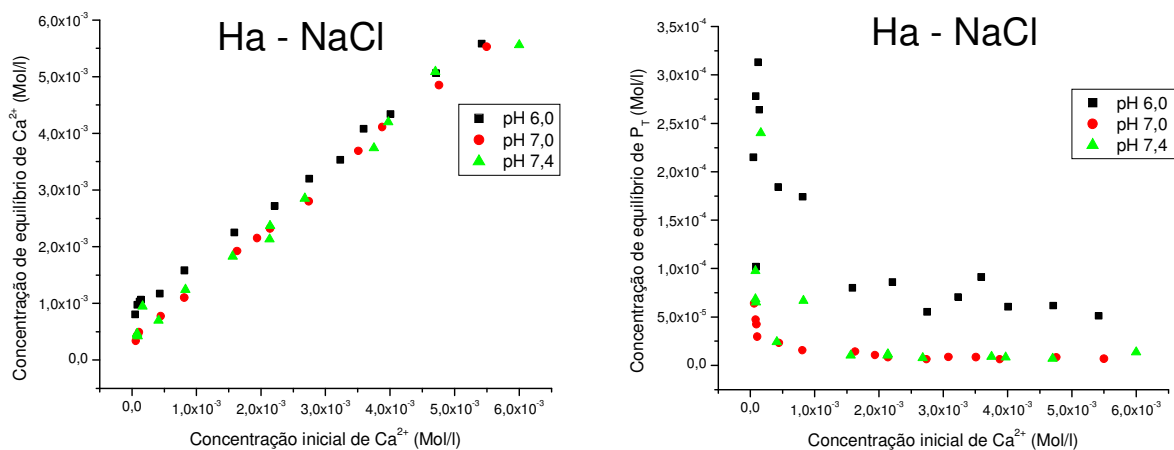


Figura 33: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de NaCl a pH 6, 7 e 7,4 para hidroxiapatita.

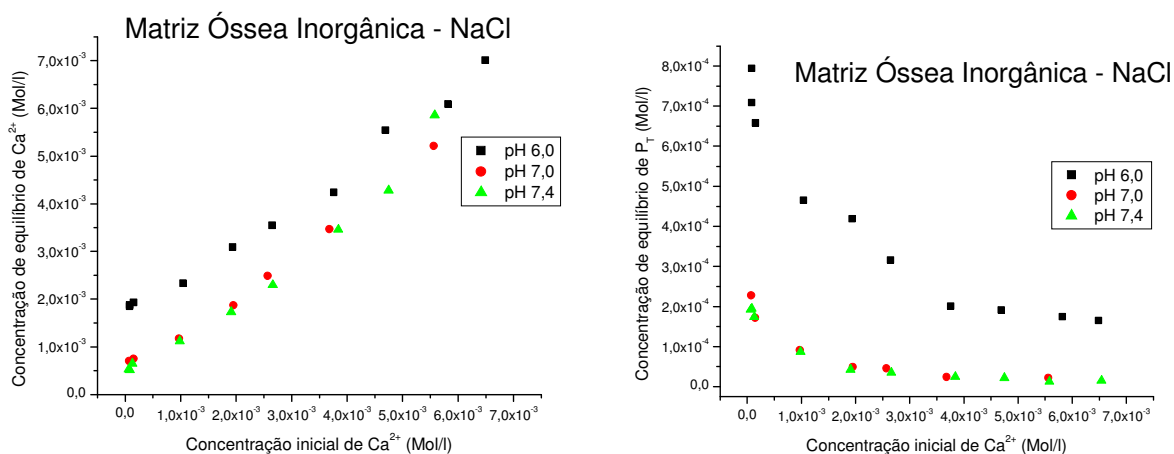


Figura 34: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de NaCl a pH 6, 7 e 7,4 para matriz óssea inorgânica proveniente de animais de 1 ano.

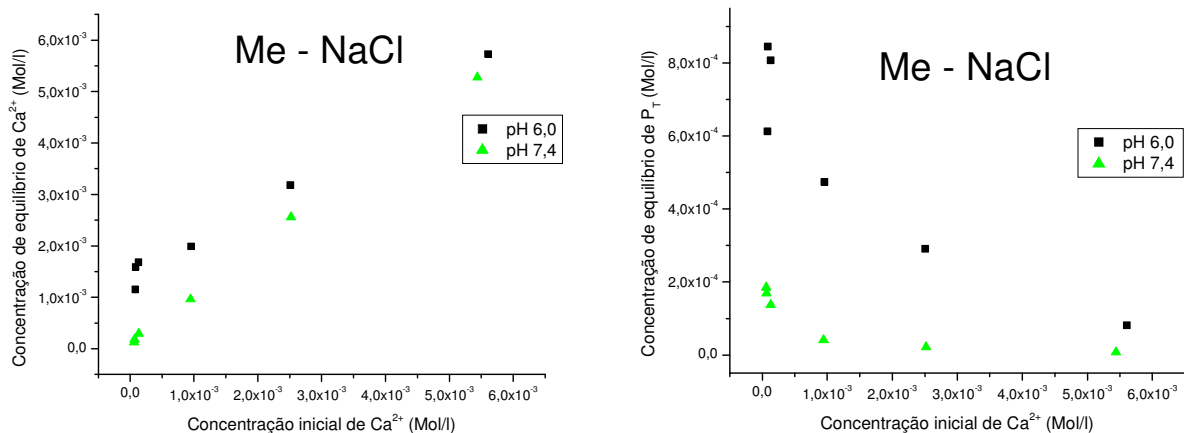


Figura 35: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de NaCl a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em micro emulsão.

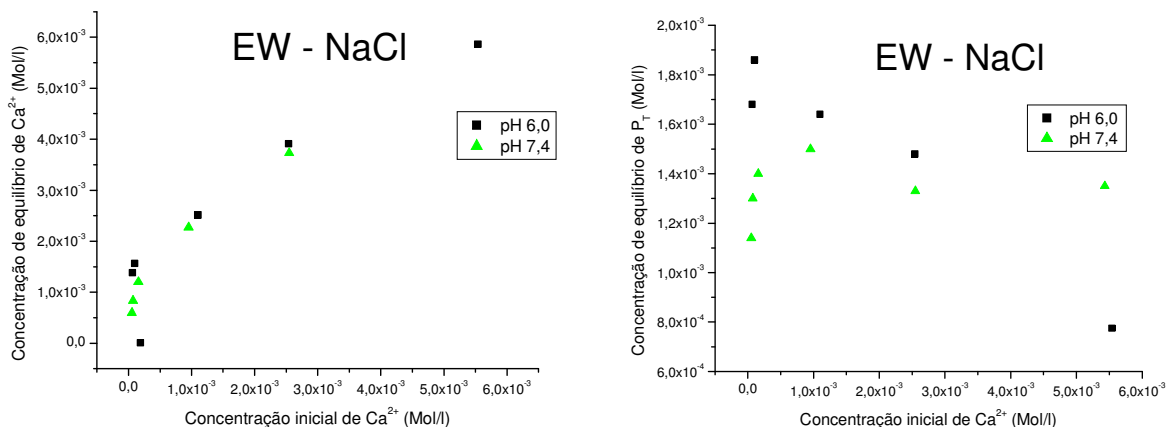


Figura 36: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de NaCl a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em emulsão água/óleo.

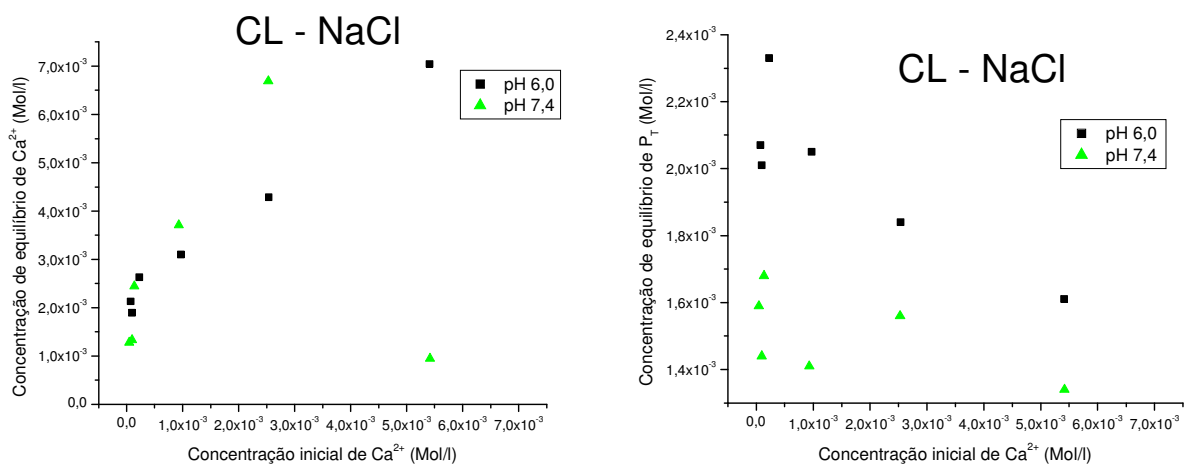


Figura 37: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de NaCl a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em cristal líquido.

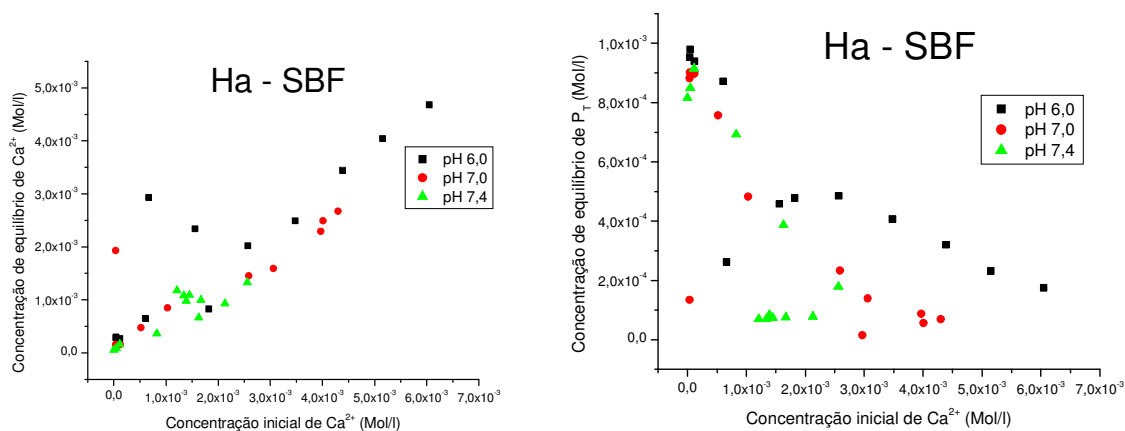


Figura 38: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em SBF a pH 6, 7 e 7,4 para hidroxiapatita.

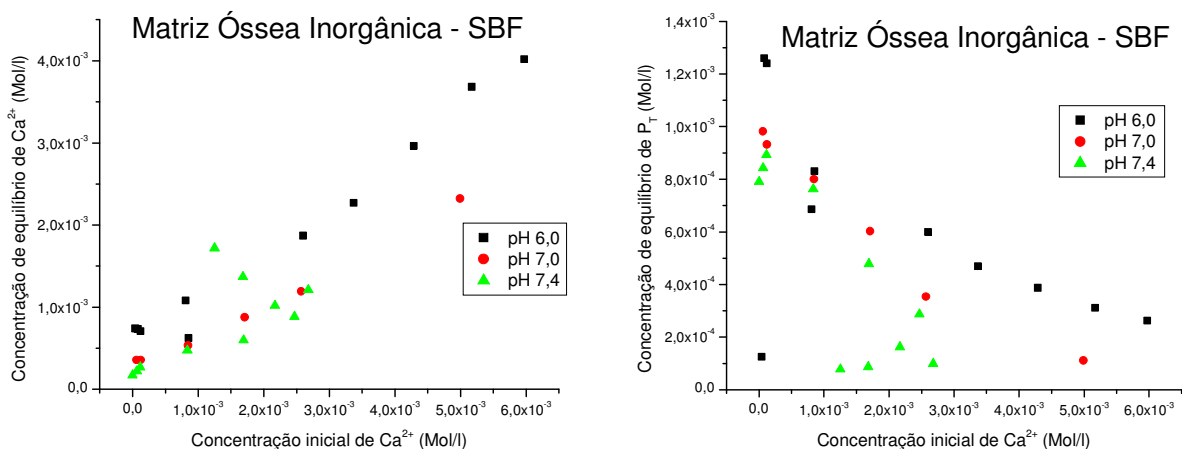


Figura 39: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em SBF a pH 6, 7 e 7,4 para matriz óssea inorgânica proveniente de animais de 1 ano.

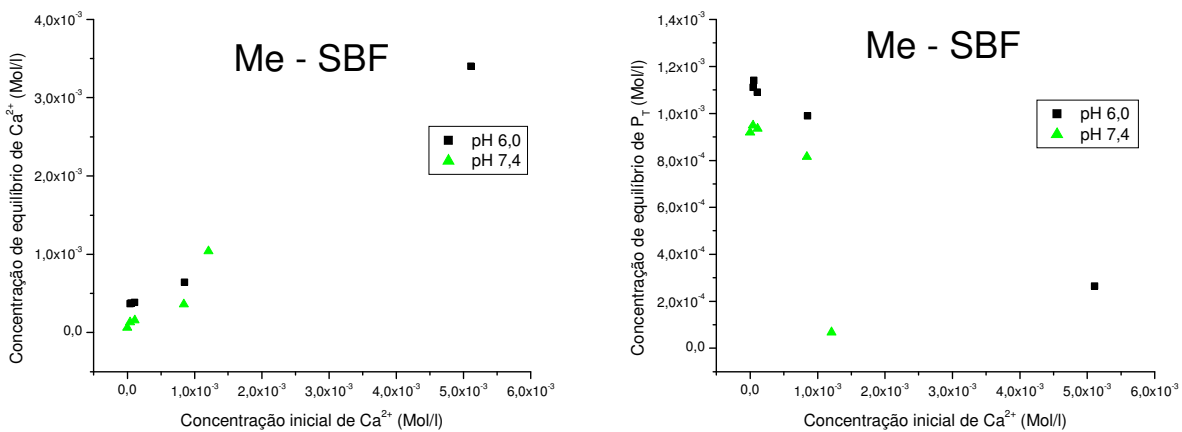


Figura 40: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em SBF a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em micro emulsão.

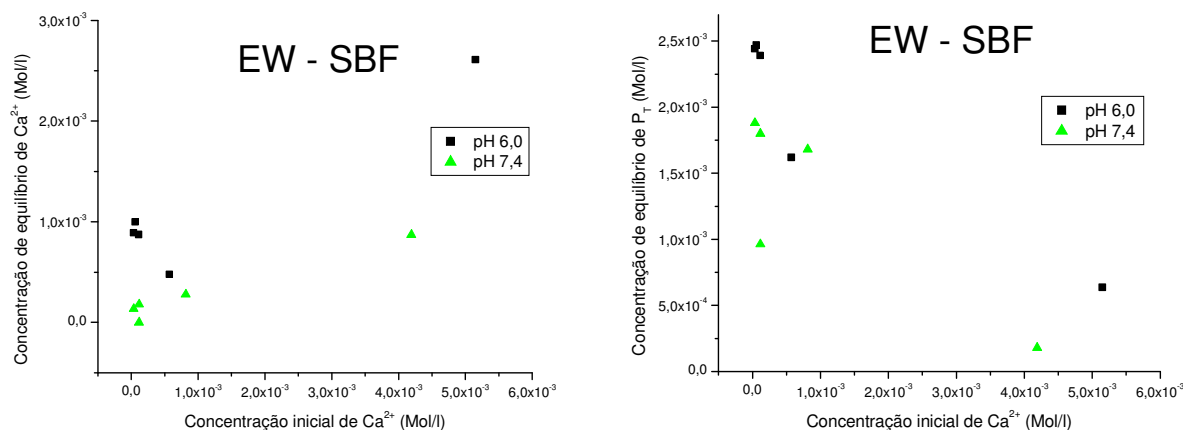


Figura 41: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em SBF a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em emulsão água/óleo.

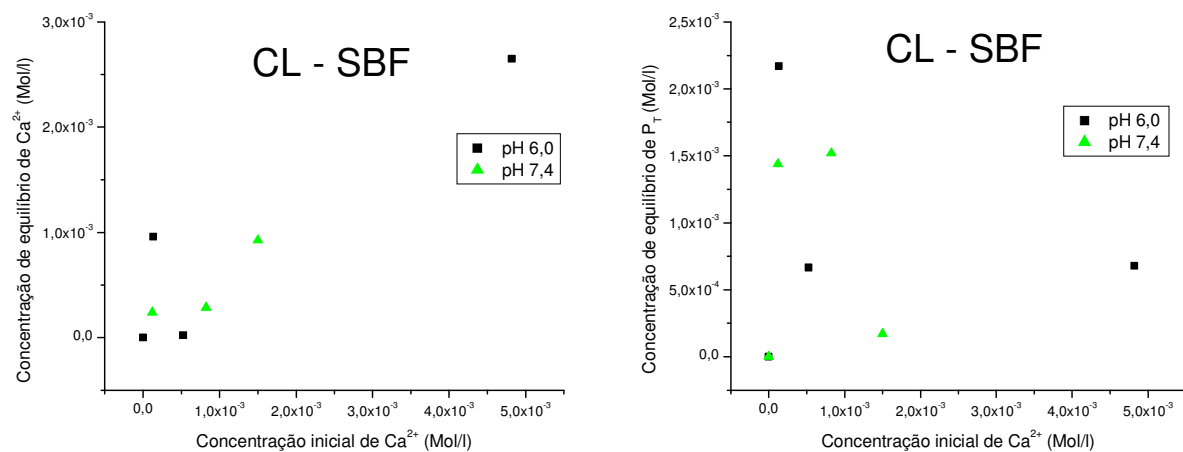


Figura 42: Gráficos das concentrações de Ca e P no equilíbrio em função da concentração inicial de Ca, em soluções de SBF a pH 6 e 7,4 para fosfato de cálcio sintetizado em cristal líquido.

A partir dos gráficos apresentados nas Figuras 33 a 42 é possível observar que à medida que se aumenta a concentração inicial de cálcio temos uma diminuição da concentração de P no equilíbrio.

Nos gráficos dos sistemas fosfato de cálcio solução de NaCl é possível observar um comportamento linear para a concentração de íons cálcio e um comportamento de decaimento exponencial para a concentração de fósforo a medida que a concentração de íons cálcio iniciais aumenta. Já para os sistemas formados por soluções de SBF é possível observar o comportamento aleatório para a concentração das espécies estudadas. O comportamento dos dois sistemas se assemelha em pH próximos de 6.

É interessante notar também a semelhança de comportamento entre os fosfato de cálcio sintetizados em sistemas organizados, hidroxiapatita e a matriz óssea inorgânica.

5.3.2- Adsorção de Íons Ca^{2+} na Superfície de Fosfatos de Cálcio.

Como apresentado na introdução é possível determinar se uma isoterma de adsorção segue o modelo de Langmuir a partir de gráficos de C_2/n^s_2 em função de C_2 . A observação de retas nestes gráficos com coeficiente angular igual a $1/n^s$ e coeficiente linear igual a $1/n^s b$ indica que o sistema pode ser descrito de acordo com uma isoterma de Langmuir.

As Figuras 43 a 47 apresentam os gráficos de C_2/n^s_2 em função de C_2 obtidos para as isotermas de adsorção realizadas com os fosfatos de cálcio.

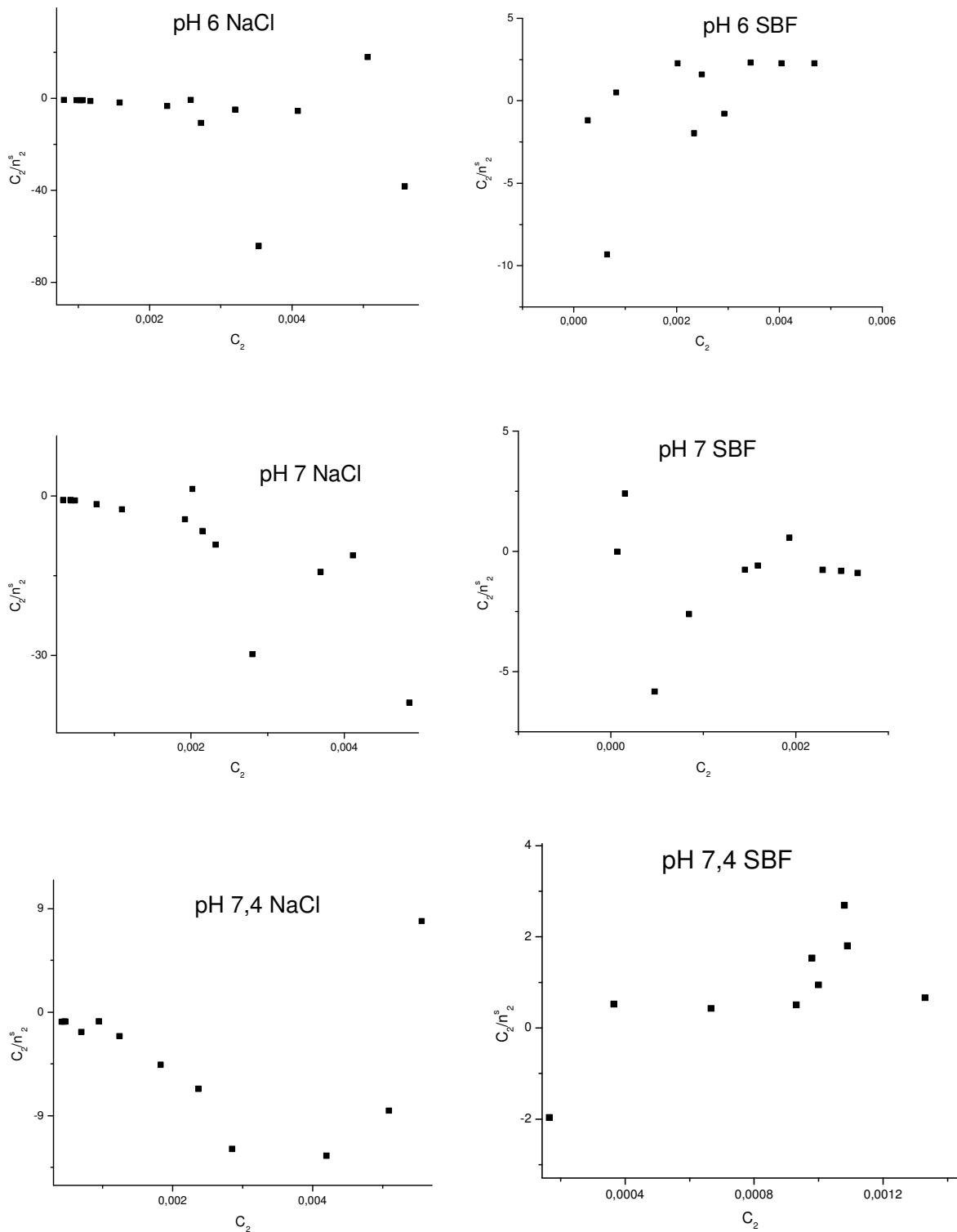
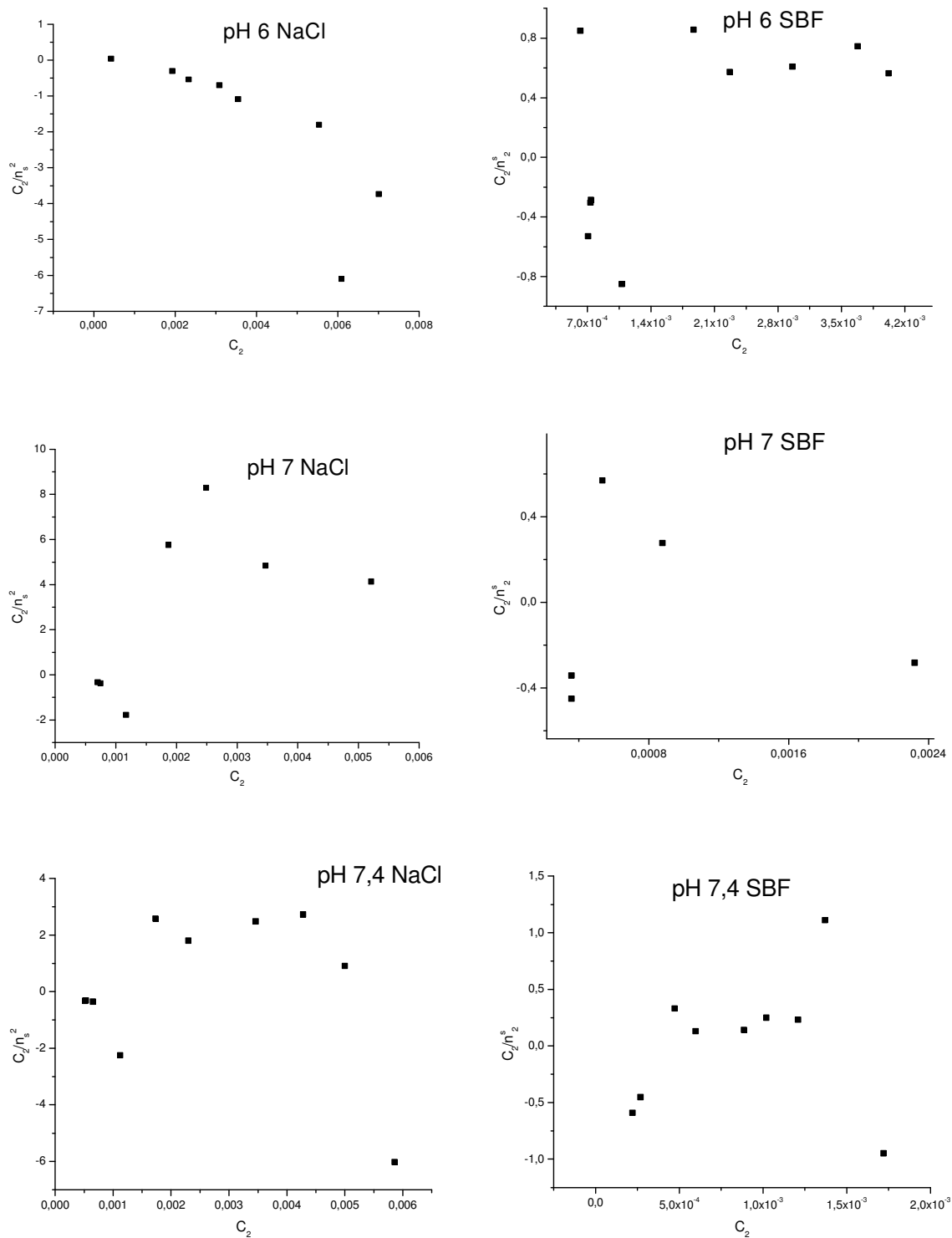


Figura 43: Isotermas de adsorção para hidroxiapatita a diferentes pH em solução de NaCl e SBF construídas segundo uma isoterma de Langmuir.



Fig

ura 44: Isotermas de adsorção para matriz óssea inorgânica proveniente de animais de um ano de idade a diferentes pH em solução de NaCl e SBF construídas segundo uma isoterma de

Langmuir.

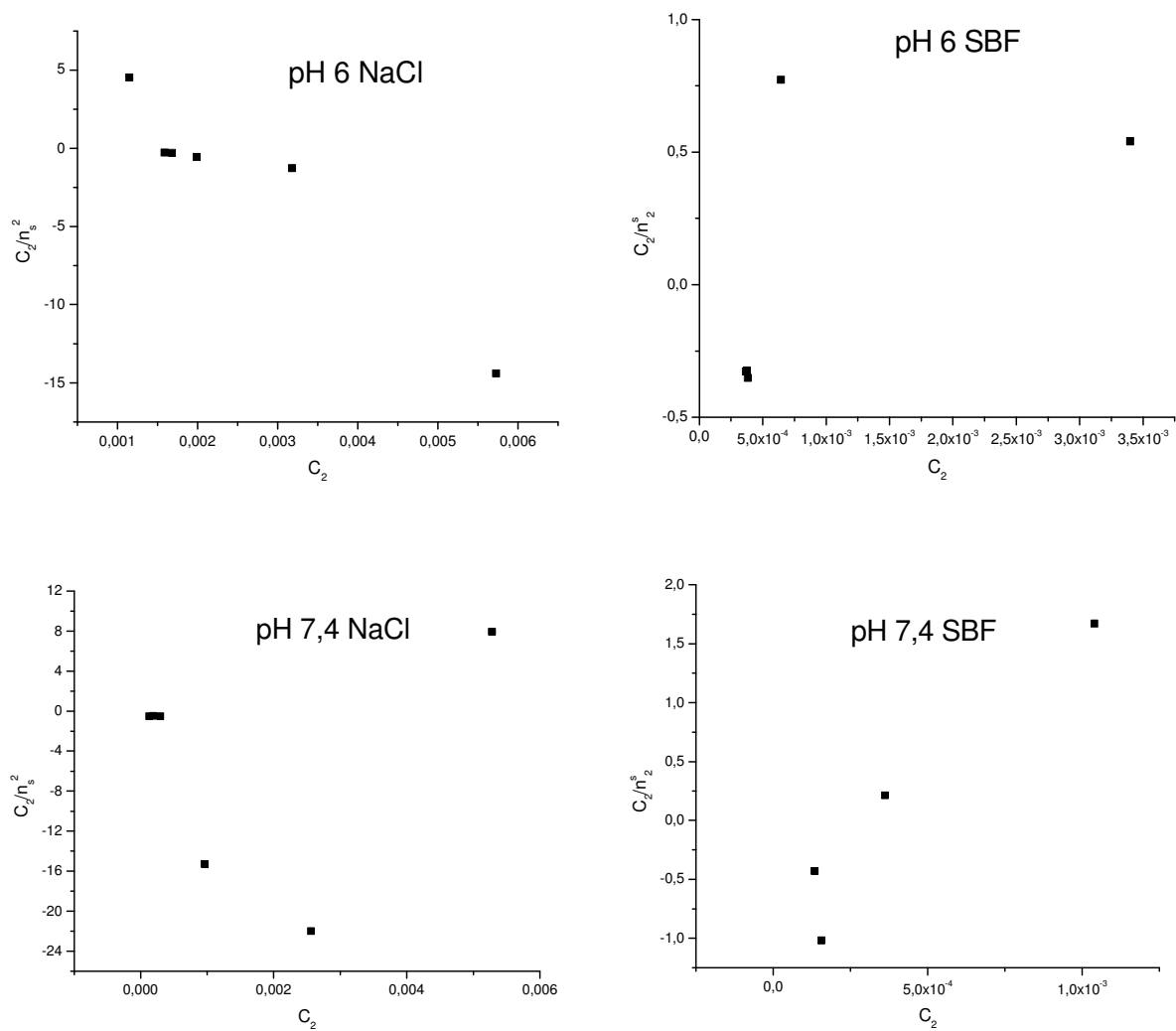


Figura 45: Isotermas de adsorção para fosfato de cálcio obtido em sistema de microemulsão a diferentes pH em solução de NaCl e SBF construídas segundo uma isoterma de Langmuir.

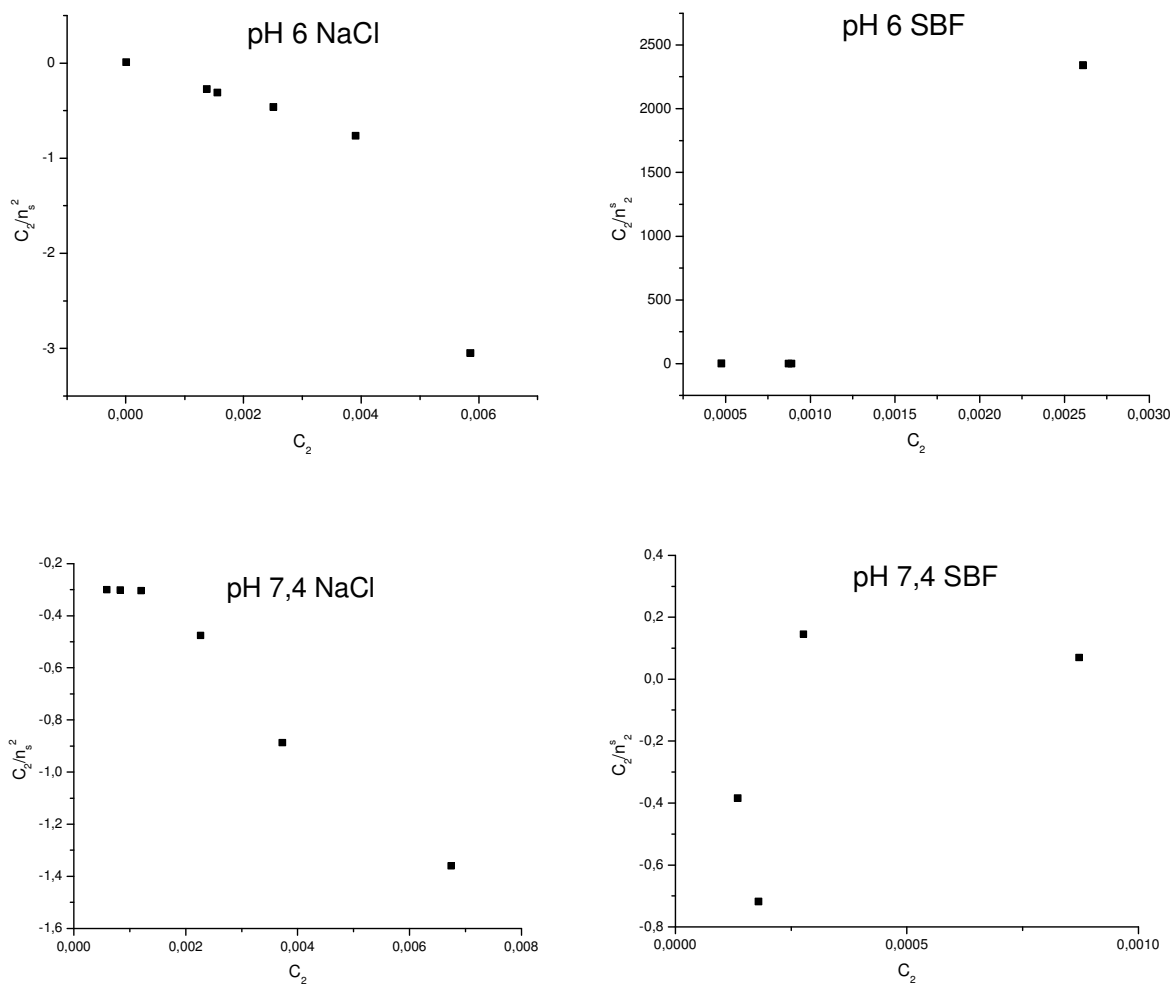


Figura 46: Isotermas de adsorção para fosfato de cálcio obtido em sistema de água em óleo a diferentes pH em solução de NaCl e SBF construídas segundo uma isoterma de Langmuir.

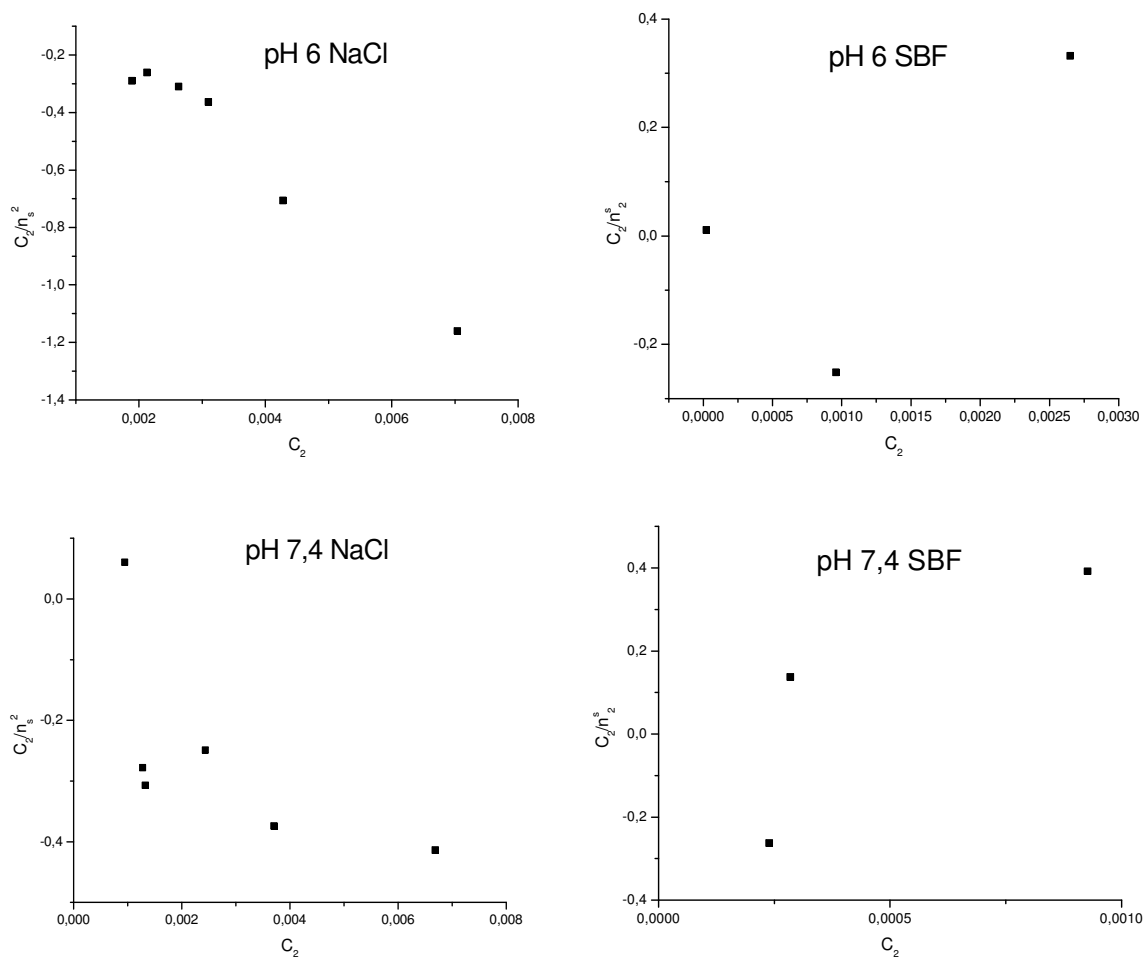


Figura 47: Isotermas de adsorção para fosfato de cálcio obtido em sistema de cristal líquido a diferentes pH em solução de NaCl e SBF construídas segundo uma isoterma de Langmuir.

Nos gráficos apresentados nas Figuras 43 a 47 é possível notar algumas regiões formadas por retas com coeficiente angular negativo. Este comportamento indica que caso ocorresse uma adsorção de íons cálcio na superfície dos fosfatos de cálcio estudados esta não ocorre de acordo com uma isoterma de Langmuir em nenhum dos casos estudados. Dessa forma, o modelo original de Gramain, que considera que durante a dissolução dos fosfatos de cálcio, ocorre uma adsorção de íons cálcio segundo uma isoterma de Langmuir, não pode ser estendido para o

equilíbrio entre fosfato de cálcio e soluções aquosas.

Apesar de não ser possível descrever o equilíbrio entre os fosfatos de cálcio e soluções contendo diferentes concentrações de íons Ca^{2+} por uma isoterma de Langmuir, a hipótese de que os fosfatos de cálcio adsorvem os íons cálcio não pode ser ainda descartada, uma vez que existem outros modelos de isotermas de adsorção.

Novamente, como apresentado na introdução, a adsorção de íons pode ocorrer também de acordo com o modelo de adsorção de Freundlich. Neste modelo é esperado que gráficos de $\log n^s_2$ em função de $\log C_2$ apresentem retas. Exemplos de gráficos obtidos a partir destes parâmetros para as isotermas estudadas a diferentes pH em soluções de NaCl e SBF, são apresentados nas Figuras 48 e 49.

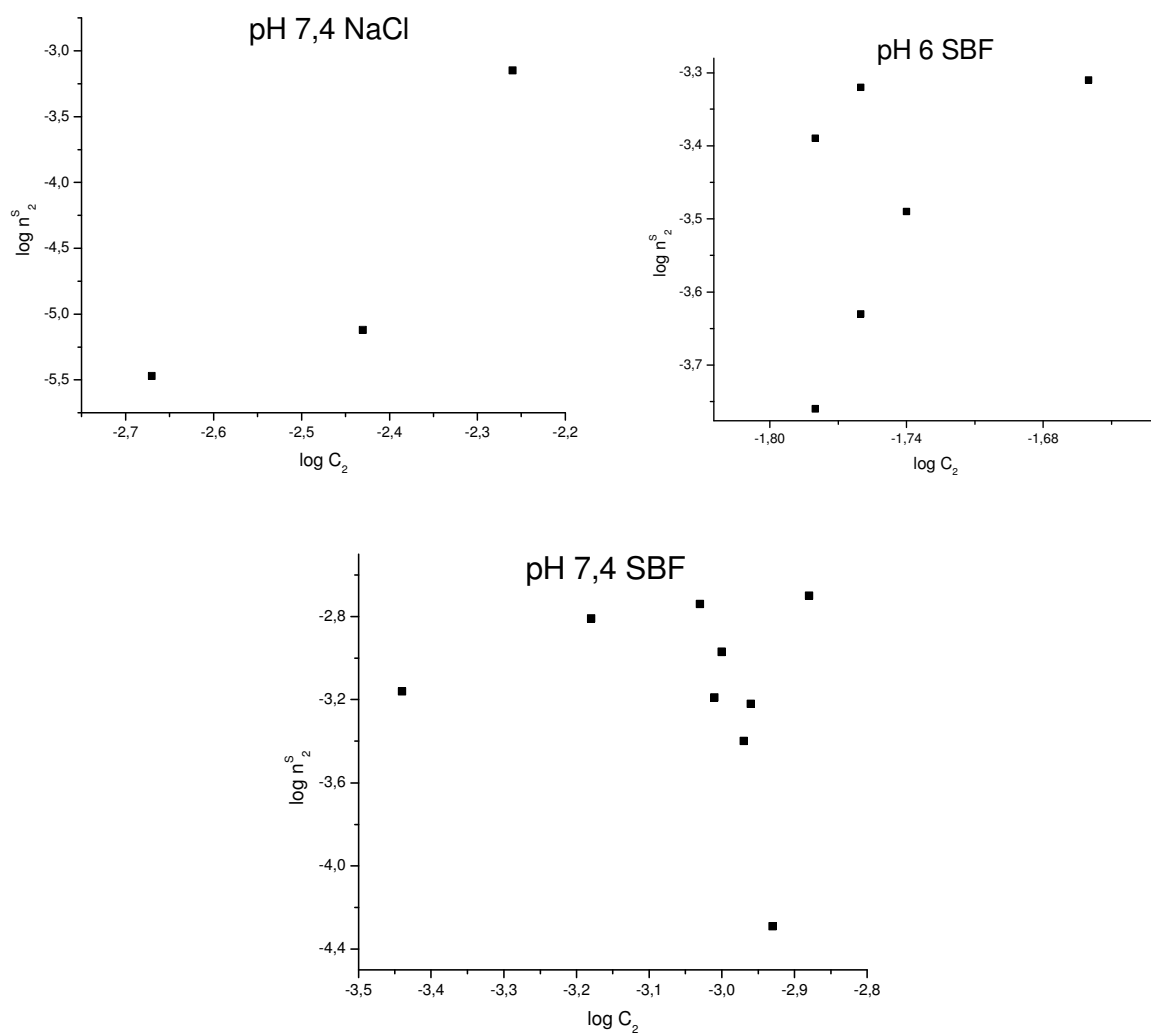


Figura 48: Isotermas de adsorção de íons Ca^{2+} segundo o modelo de Freundlich para hidroxiapatita a diferentes pH em solução de NaCl e SBF.

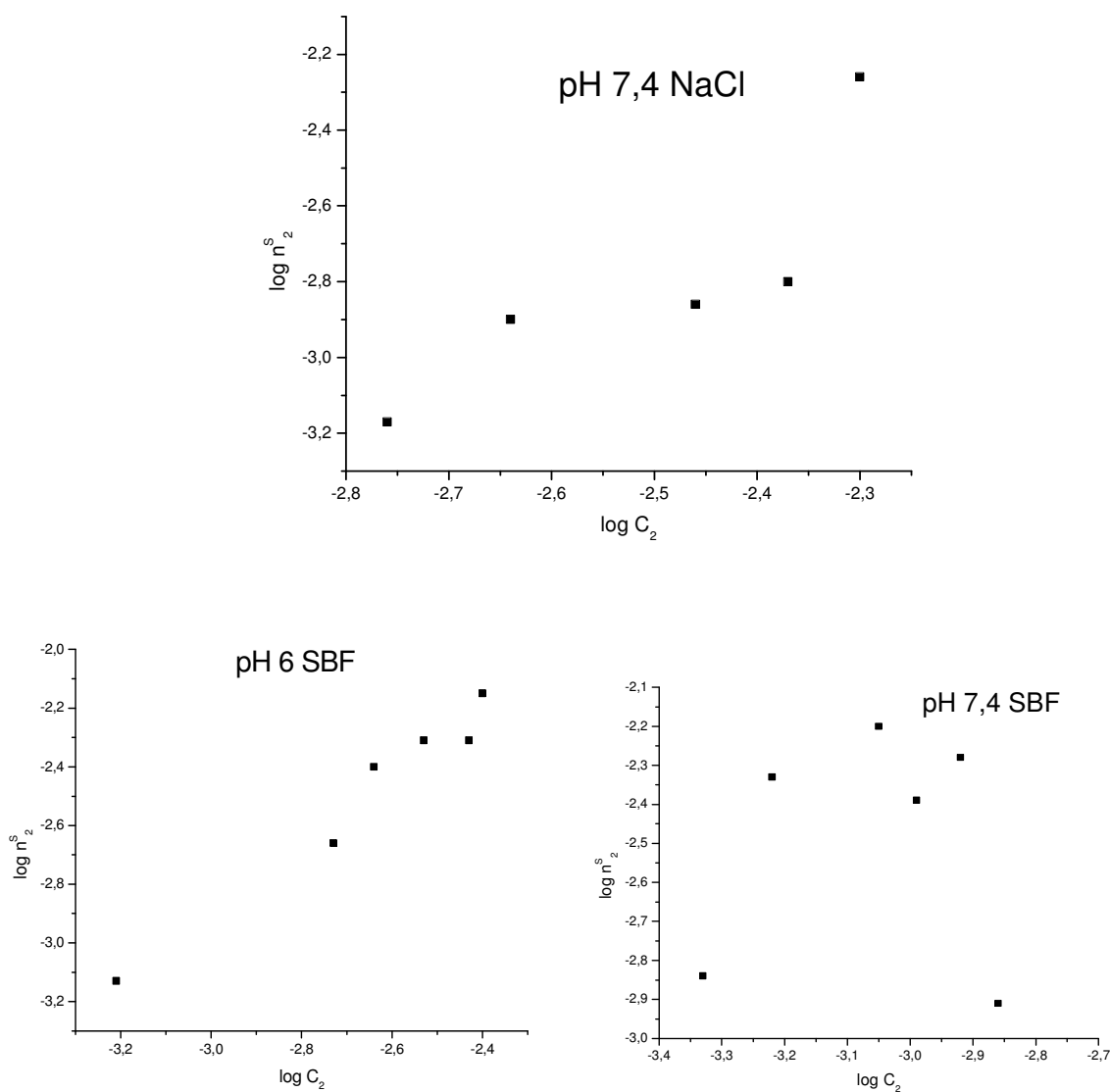


Figura 49: Isotermas de adsorção de íons Ca^{2+} segundo o modelo de Freundlich para matriz óssea inorgânica a diferentes pH em solução de NaCl e SBF.

Não foi possível tratar os dados de isotermas de adsorção a pH 6 devido ao fato de que a maioria dos valores de n_2^s foram negativos, em função da acentuada dissolução dos fosfatos de cálcio neste pH.

Analisando os gráficos das isotermas de adsorção tratadas de acordo com o modelo de Freundlich, é possível observar que também neste caso o modelo de

adsorção não consegue descrever satisfatoriamente o sistema fosfato de cálcio/solução aquosa.

Uma vez que não é possível tratar os sistemas estudados por isotermas de adsorção, podemos afirmar que no sistema não ocorre de fato uma simples adsorção dos íons cálcio na superfície dos fosfatos de cálcio. Estes resultados mostram que o modelo de Gramain que tratam a dissolução dos fosfatos de cálcio não pode ser estendido para a condição de equilíbrio destes materiais.

Portanto, como não é possível descrever o sistema em equilíbrio fosfato de cálcio/solução aquosa por uma isoterma de adsorção e até o momento, não foi comprovado que essa adsorção ocorra ao longo da dissolução, é razoável considerar que o equilíbrio de fosfatos de cálcio (particularmente apatitas e matriz óssea inorgânica) deve ser abordado por outro enfoque.

De forma geral, a solubilidade dos sólidos é tratada pelo conceito de equilíbrio de solubilidade e descreve sistemas em equilíbrio idênticos aos sistemas utilizados aqui para se estudar a adsorção de íons Ca^{2+} por fosfatos de cálcio quando suspensos em soluções de NaCl e SBF.

Dessa forma o equilíbrio entre os fosfatos de cálcio e as soluções foram estudados assumindo-se um equilíbrio termodinâmico entre a superfície destes e a solução, como é demonstrado no item 5.3.3.

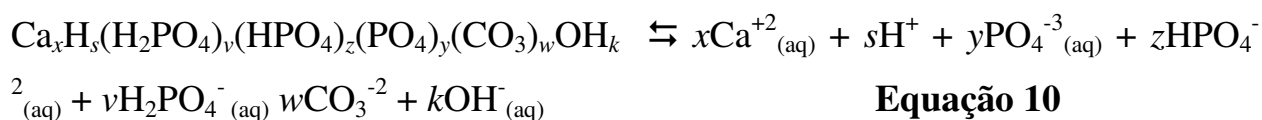
5.3.3 – Equilíbrio de Solubilização dos Fosfatos de Cálcio

Os processos de dissolução e o equilíbrio dos fosfatos de cálcio com soluções aquosas podem ser tratados com o mesmo formalismo matemático comumente aplicado a uma reação química.

Os fosfatos de cálcio de interesse deste trabalho são: ²²

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$; $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; CaHPO_4 ; $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e fosfato de cálcio amorfo, com diferentes estequiometrias e cristalinidade, semelhante à fase óssea inorgânica.

Assim, a dissolução de qualquer um dos fosfato de cálcio pode ser representada pela Equação 10.



Onde: x , y , z , v , s , w e k são os coeficientes estequiométricos dos respectivos íons.

A constante de equilíbrio para a dissolução dos fosfatos de cálcio pode ser escrita na forma:

$$K = (\text{Ca}^{+2})^x (\text{H})^s (\text{H}_2\text{PO}_4^{-})^v (\text{HPO}_4^{-2})^z (\text{PO}_4^{-3})^y (\text{CO}_3^{-2})^w (\text{OH}^{-})^k \quad \text{Equação 11}$$

onde (X) representa é a atividade da espécie X.

A Equação 11 pode ser reescrita de forma a representar todas as equações de equilíbrios para os diferentes tipos de fosfato de cálcio, como apresentado abaixo:

$$K_{HA} = ([\text{Ca}^{+2}] \gamma_{\text{Ca}^{+2}})^5 ([\text{PO}_4^{-3}] \gamma_{\text{PO}_4^{-3}})^3 ([\text{OH}^{-}] \gamma_{\text{OH}^{-}})$$

$$K_{\text{CaHPO}_4} = ([\text{Ca}^{+2}] \gamma_{\text{Ca}^{+2}}) ([\text{HPO}_4^{-2}] \gamma_{\text{HPO}_4^{-2}})$$

$$K_{CHA} = ([Ca^{+2}] \gamma_{Ca^{+2}})^{10} ([PO_4^{-3}] \gamma_{PO_4^{-3}})^6 ([CO_3^{-2}] \gamma_{CO_3^{-2}})$$

•
•
•

Onde [X] é a concentração dos íons na solução após o equilíbrio e γ é o coeficiente de atividade iônica.

Com a concentração de Ca, P_T (obtida por ICP-OES), pH, solubilidade de CO_2 em água e as equações de equilíbrio (tanto de equilíbrio dos fosfatos: Equações 12 a 15 como as equações de equilíbrio dos carbonatos: Equações 21 a 24) é possível determinar a concentração de todas as espécies da solução:

$$[PO_4^{-3}] + [HPO_4^{-2}] + [H_2PO_4^{-}] + [H_3PO_4] = [P_T] \quad \text{Equação 12}$$

$$H_3PO_4 \rightleftharpoons H_2PO_4^{-} + H^{+} \quad pK_1 = 2,19 \quad \text{Equação 13}$$

$$H_2PO_4^{-} \rightleftharpoons HPO_4^{-2} + H^{+} \quad pK_2 = 7,18 \quad \text{Equação 14}$$

$$HPO_4^{-2} \rightleftharpoons PO_4^{-3} + H^{+} \quad pK_3 = 12,3 \quad \text{Equação 15}$$

Uma vez que as isotermas foram realizadas a pH 6; 7 e 7,4 podemos considerar que a concentração de H_3PO_4 nas soluções é zero.

O coeficiente de atividade iônica pode ser calculado pela Equação 16 (Lei de Debye-Huckel estendida).¹⁰⁴

$$\ln \gamma_i = \frac{-z_i^2 A I^{\frac{1}{2}}}{1 + B a I^{1/2}} \quad \text{Equação 16}$$

Onde:

z é a carga do íon, a é um parâmetro referente ao tamanho da esfera de hidratação dos íons e I é a força iônica do meio, expressa por:

$$I = \frac{1}{2} \sum z_i^2 \left(\frac{b_i}{b^\theta} \right) \quad \text{Equação 17}$$

Onde b é a molalidade e b^θ é a molalidade padrão da substância e A e B são obtidos a partir da teoria de Debye-Huckel onde:

$$A = 1,825 \times 10^6 (\epsilon T)^{-3/2} \quad \text{Equação 18}$$

$$B = 50,3 (\epsilon T)^{-1/2} \quad \text{Equação 19}$$

ϵ é a constante dielétrica do meio e T é a temperatura em Kelvin. Para a água, temos $\epsilon = 78,30$.

A partir do coeficiente de atividade dos íons na solução e da respectiva concentração é possível determinar a constante de equilíbrio.

Neste trabalho, para a obtenção do coeficiente de atividade dos íons presentes nas soluções algumas considerações foram feitas:

1. A molalidade foi aproximada para molaridade, pois a conversão da molaridade dos íons para molalidade, usando-se a densidade das soluções observa mostra que numericamente são muito semelhantes.

2. As concentrações de CO_3^{2-} e HCO_3^- nas soluções provenientes do tampão de controle de pH pelo borbulhamento de CO_2 foram estimadas a partir da solubilidade do CO_2 em água a 37°C e das equações de equilíbrio para as espécies iônicas presentes em solução (Equações 20 a 23).

$$[\text{H}_2\text{CO}_3] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] = [\text{C}_T] \quad \text{Equação 20}$$

$$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \quad \text{pK}_s = 2,78 \quad \text{Equação 21}$$



Nos sistemas estudados as concentrações máximas de HCO_3^- e de CO_3^{2-} , provenientes do borbulhamento de CO_2 , conforme descrito no procedimento de obtenção de isothermas são respectivamente $4,6 \times 10^{-4}$ e 5×10^{-7} mol/l. As concentrações de HCO_3^- e de CO_3^{2-} não alteram de forma significativa a força iônica do meio e, portanto, tais íons foram desconsiderados nos cálculos da força iônica das soluções.

3. Uma vez que a variação das concentrações de Ca e P_T devido à dissolução dos fosfatos de cálcio é relativamente pequena, foi considerado que esta variação não altera de forma significativa a força iônica do meio.

4. Como os equilíbrios foram realizados a valores de pH próximos de sete foi considerado que a variação da concentração dos íons H^+ e OH^- também não altera a força iônica das soluções.

A partir das equações e considerações apresentadas, os coeficientes de atividade dos íons presentes nas soluções foram determinados e são apresentados na Tabela 9. Os cálculos para a determinação dos coeficientes de atividade de todos os íons na solução são apresentados de forma detalhada no Apêndice 1.

Tabela 9: Coeficiente de atividade dos íons presentes nas soluções estudadas.

Soluções	Coeficientes de atividade						
	γ_{H^+}	γ_{OH^-}	$\gamma_{\text{Ca}^{+2}}$	$\gamma_{\text{CO}_3^{2-}}$	γ_{PQ^3}	γ_{HPQ^2}	$\gamma_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}$
SBF	0,912	0,866	0,638	0,616	0,307	0,591	0,877
NaCl	0,916	0,873	0,653	0,631	0,326	0,608	0,883

Impondo a equação da constante de equilíbrio para hidroxiapatita (Equação 24) para todos os equilíbrios estudados foram obtidos os valores de K_{HA} para todos os fosfatos em equilíbrio com as soluções. As Tabelas 10 a 14 apresentam os valores médios das constantes de equilíbrio para cada pH estudado.

$$K_{HA} = ([Ca^{+2}] \gamma_{Ca^{+2}})^5 ([PO_4^{-3}] \gamma_{PO_4^{-3}})^3 ([OH^-] \gamma_{OH^-}) \quad \text{Equação 24}$$

Tabela 10. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 24 para o sistema hidroxiapatita/solução.

Solução	pH	K
SBF	6,6	$(5 \pm 5) \times 10^{-52}$
	7	$(1 \pm 3) \times 10^{-51}$
	7,4	$(2 \pm 3) \times 10^{-50}$
NaCl	6	$(4 \pm 6) \times 10^{-57}$
	7	$(1 \pm 2) \times 10^{-56}$
	7,4	$(2 \pm 10) \times 10^{-51}$

Tabela 11. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 24 para o sistema matriz óssea inorgânica/solução.

Solução	pH	K
SBF	6	$(6 \pm 8) \times 10^{-52}$
	7	$(1 \pm 1) \times 10^{-51}$
	7,4	$(2 \pm 2) \times 10^{-50}$
NaCl	6	$(8 \pm 10) \times 10^{-55}$
	7	$(2 \pm 3) \times 10^{-52}$
	7,4	$(3 \pm 3) \times 10^{-52}$

Tabela 12. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 24 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de micro-emulsão/solução.

Solução	pH	K
SBF	6	$(1 \pm 3) \times 10^{-52}$
	7,4	$(2 \pm 3) \times 10^{-51}$
NaCl	6	$(7 \pm 3) \times 10^{-56}$
	7,4	$(8 \pm 9) \times 10^{-55}$

Tabela 13. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 24 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de emulsão de água em óleo/solução.

Solução	pH	K
SBF	6	$(1 \pm 1) \times 10^{-51}$
	7,4	$(6 \pm 7) \times 10^{-51}$
NaCl	6	$(1 \pm 3) \times 10^{-54}$
	7,4	$(5 \pm 6) \times 10^{-56}$

Tabela 14. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 24 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de cristal líquido /solução.

Solução	pH	K
SBF	6	$(1 \pm 1) \times 10^{-51}$
	7,4	$(6 \pm 6) \times 10^{-51}$
NaCl	6	$(1 \pm 1) \times 10^{-53}$
	7,4	$(2 \pm 4) \times 10^{-48}$

Os resultados numéricos obtidos para K_{HA} nos pH estudados para todos os fosfatos de cálcio estudados são semelhantes aos resultados apresentados na literatura ($pK \approx 52 - 60$) para hidroxiapatita²².

É possível observar que à medida que o pH aumenta, temos um aumento significativo no valor de K_{HA} . Alguns valores de K_{HA} em pH maiores se aproximam dos valores existentes na literatura para octacálcio fosfato ($pK \approx 48$)²² que tem a fórmula elementar $Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$. Este composto é considerado um dos precursores da hidroxiapatita²².

É interessante notar também que existe um padrão de aumento do valor da constante de equilíbrio com o aumento do pH, e que esse aumento é observado em todos os fosfatos estudados, tanto nas soluções de NaCl quanto nas de SBF.

A variação dos valores de K_{Ha} confirmam as observações existentes na literatura, de que o equilíbrio de fosfatos de cálcio (particularmente hidroxiapatita) em solução aquosa não pode ser descrito pela equação da constante de equilíbrio apresentada na Equação 24.

Uma hipótese que pode ser levantada para se explicar a causa da variação da constante de equilíbrio para hidroxiapatita e fosfatos de cálcio semelhantes é que, ao se suspender a hidroxiapatita em uma solução aquosa, ocorre uma modificação

da superfície desta. Com a modificação da superfície, o equilíbrio dessa nova superfície e a solução não pode ser mais descrito pela Equação 24.

Um método possível para avaliar a hipótese da modificação na superfície dos fosfatos de cálcio é aplicar diferentes equações de equilíbrio aos sistemas estudados e avaliar os resultados obtidos para as constantes resultantes destas equações. Desta forma é possível determinar se alguma das equações é capaz de descrever o sistema de forma satisfatória.

As Tabelas 15 a 18 apresentam os resultados obtidos para hidroxiapatita e matriz óssea inorgânica em soluções de SBF e NaCl em pH 6. As Tabelas 19 e 20 apresentam as médias das constantes de equilíbrio obtidas para todos os fosfatos de cálcio de interesse deste trabalho aplicados aos equilíbrios de hidroxiapatita e matriz óssea suspensas nas soluções estudadas nos diversos pH (exceto para a fórmula de equilíbrio de composição CaHPO_4).

As tabelas obtidas para todos os fosfatos de cálcio com a constante de equilíbrio calculada para cada concentração de cálcio em cada pH são apresentadas de forma completa no Apêndice 2.

Tabela 15: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes formulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita pH 6 solução de NaCl.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
1e-56	1e-08	1e-96	6e-12	8e-104	7e-32	5,42e-03
1e-56	1e-08	1e-96	8e-12	1e-103	7e-32	4,71e-03
5e-57	9e-09	2e-97	7e-12	3e-104	4e-32	4,01e-03
1e-56	1e-08	1e-96	1e-11	2e-103	8e-32	3,59e-03
3e-57	8e-09	8e-98	8e-12	1e-104	3e-32	3,23e-03
8e-58	6e-09	6e-99	4e-12	1e-105	1e-32	2,75e-03
1e-57	8e-09	2e-98	9e-12	6e-105	2e-32	2,21e-03
2e-57	9e-09	3e-98	1e-11	1e-104	3e-32	8,88e-05
4e-58	6e-09	2e-99	6e-12	8e-106	1e-32	1,59e-03
7e-58	9e-09	6e-99	2e-11	5e-105	2e-32	8,14e-04
2e-58	7e-09	4e-100	2e-11	7e-106	8e-33	4,34e-04
3e-58	9e-09	1e-99	3e-11	3e-105	1e-32	1,40e-04
5e-58	1e-08	2e-99	4e-11	6e-105	2e-32	1,23e-04
3e-58	9e-09	7e-100	3e-11	2e-105	1e-32	8,59e-05
2e-56	1e-08	7e-97	1e-11	4e-103	1e-31	4,86e-05

Tabela 16: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes formulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita pH 6,6 solução de SBF.

Ca₅(PO₄)₃OH	CaHPO₄	Ca₁₀(PO₄)₆(CO₃)	Ca(H₂PO₄)₂	Ca₈H₂(PO₄)₆	Ca₃(PO₄)₂	Concentração de Ca²⁺ inicial (Mol/L)
1e-51	8e-08	9e-88	4e-11	6e-96	7e-29	6,05e-03
1e-51	1e-07	1e-87	6e-11	1e-95	8e-29	5,15e-03
2e-51	1e-07	2e-87	9e-11	2e-95	9e-29	4,39e-03
4e-52	8e-08	1e-88	5e-11	2e-96	4e-29	6,65e-04
6e-52	1e-07	3e-88	1e-10	6e-96	5e-29	3,48e-03
7e-52	1e-07	3e-88	1e-10	8e-96	6e-29	1,56e-03
4e-52	1e-07	9e-89	1e-10	3e-96	4e-29	2,57e-03
4e-54	4e-08	1e-92	5e-11	2e-99	3e-30	1,82e-03
8e-54	6e-08	4e-92	1e-10	1e-98	4e-30	6,04e-04
1e-55	3e-08	9e-96	6e-11	2e-101	4e-31	1,17e-04
2e-55	3e-08	3e-95	7e-11	5e-101	5e-31	4,26e-05
1e-55	3e-08	1e-95	7e-11	3e-101	4e-31	4,01e-05

Tabela 17: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes formulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica pH 6 solução de NaCl.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
1e-54	4e-08	1e-92	8e-11	6e-100	1e-30	6,49e-03
6e-55	4e-08	4e-93	8e-11	3e-100	1e-30	5,82e-03
5e-55	4e-08	3e-93	9e-11	2e-100	9e-31	4,69e-03
2e-55	3e-08	3e-94	7e-11	3e-101	5e-31	3,76e-03
3e-55	4e-08	6e-94	2e-10	1e-100	7e-31	2,65e-03
3e-55	4e-08	9e-94	2e-10	2e-100	8e-31	1,94e-03
1e-55	4e-08	1e-94	2e-10	4e-101	4e-31	1,04e-03
1e-55	4e-08	1e-94	4e-10	7e-101	5e-31	1,53e-04
6e-54	7e-08	1e-91	4e-10	2e-98	4e-30	8,37e-05
2e-55	5e-08	2e-94	5e-10	2e-100	6e-31	7,93e-05

Tabela 18: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes formulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica pH 6,6 solução de SBF.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
2e-51	1e-07	2e-87	7e-11	2e-95	1e-28	5,97e-03
2e-51	1e-07	3e-87	9e-11	3e-95	1e-28	5,17e-03
1e-51	1e-07	1e-87	1e-10	2e-95	8e-29	4,29e-03
6e-52	1e-07	2e-88	1e-10	7e-96	6e-29	3,37e-03
5e-52	1e-07	2e-88	2e-10	7e-96	5e-29	2,60e-03
5e-53	8e-08	1e-90	1e-10	2e-97	1e-29	8,11e-04
5e-54	5e-08	2e-92	1e-10	7e-99	4e-30	8,51e-04
3e-53	9e-08	7e-91	3e-10	2e-97	1e-29	1,23e-04
4e-53	1e-07	1e-90	3e-10	3e-97	1e-29	7,90e-05
4e-56	9e-09	1e-96	3e-12	3e-103	1e-31	4,29e-05

Tabela 15: Valores das constantes de solubilidade obtidos a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita /solução.

Fórmula elementar do fosfato de cálcio utilizada para o cálculo de K.	Solução	pH	K
Ca₁₀(PO₄)₆(CO₃)	SBF	6,6	$3 \pm 5 \times 10^{-88}$
		7	$5 \pm 10 \times 10^{-88}$
		7,4	$4 \pm 7 \times 10^{-87}$
	NaCl	6	$3 \pm 5 \times 10^{-97}$
		7	$2 \pm 6 \times 10^{-97}$
		7,4	$2 \pm 7 \times 10^{-87}$
Ca(H₂PO₄)₂	SBF	6,6	$8 \pm 3 \times 10^{-11}$
		7	$1 \pm 1 \times 10^{-11}$
		7,4	$2 \pm 2 \times 10^{-12}$
	NaCl	6	$1 \pm 1 \times 10^{-11}$
		7	$8 \pm 3 \times 10^{-14}$
		7,4	$1 \pm 4 \times 10^{-12}$
Ca₈H₂(PO₄)₆.5H₂O	SBF	6,6	$4 \pm 5 \times 10^{-96}$
		7	$1 \pm 2 \times 10^{-96}$
		7,4	$9 \pm 10 \times 10^{-96}$
	NaCl	6	$5 \pm 10 \times 10^{-104}$
		7	$6 \pm 7 \times 10^{-105}$
		7,4	$2 \pm 8 \times 10^{-97}$
Ca₃(PO₄)₂	SBF	6,6	$3 \pm 3 \times 10^{-29}$
		7	$4 \pm 4 \times 10^{-29}$
		7,4	$1 \pm 1 \times 10^{-28}$
	NaCl	6	$3 \pm 3 \times 10^{-32}$
		7	$3 \pm 3 \times 10^{-32}$
		7,4	$1 \pm 4 \times 10^{-29}$

Tabela 16: Valores das constantes de solubilidade obtidos a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução.

Fórmula elementar do fosfato de cálcio utilizada para o cálculo de K.	Solução	pH	K
Ca₁₀(PO₄)₆(CO₃)	SBF	6,6	$6 \pm 9 \times 10^{-88}$
		7	$2 \pm 2 \times 10^{-88}$
		7,4	$7 \pm 8 \times 10^{-87}$
	NaCl	6	$1 \pm 3 \times 10^{-92}$
		7	$1 \pm 4 \times 10^{-89}$
		7,4	$2 \pm 3 \times 10^{-89}$
Ca(H₂PO₄)₂	SBF	6,6	$1 \pm 0,8 \times 10^{-10}$
		7	$3 \pm 1 \times 10^{-11}$
		7,4	$4 \pm 4 \times 10^{-12}$
	NaCl	6	$2 \pm 1 \times 10^{-10}$
		7	$1 \pm 1 \times 10^{-12}$
		7,4	$7 \pm 6 \times 10^{-13}$
Ca₈H₂(PO₄)₆.5H₂O	SBF	6,6	$8 \pm 10 \times 10^{-96}$
		7	$5 \pm 7 \times 10^{-96}$
		7,4	$4 \pm 6 \times 10^{-95}$
	NaCl	6	$2 \pm 6 \times 10^{-99}$
		7	$2 \pm 3 \times 10^{-98}$
		7,4	$2 \pm 3 \times 10^{-98}$
Ca₃(PO₄)₂	SBF	6,6	$4 \pm 4 \times 10^{-29}$
		7	$5 \pm 3 \times 10^{-29}$
		7,4	$1 \pm 1 \times 10^{-28}$
	NaCl	6	$1 \pm 1 \times 10^{-30}$
		7	$1 \pm 0,9 \times 10^{-29}$
		7,4	$1 \pm 0,7 \times 10^{-29}$

Nas Tabelas 15 a 18, é possível observar que a constante de equilíbrio proveniente da Equação 25 correspondente à formula elementar do CaHPO₄ é a

que menos sofre variação nas diferentes soluções e pHs estudados.

$$K_{CaHPO_4} = ([Ca^{+2}] \gamma_{Ca^{+2}}) ([HPO_4^{-2}] \gamma_{HPO_4^{-2}}) \quad \text{Equação 25}$$

A observação de que a constante de equilíbrio obtida para os sistemas estudados a partir da Equação 25 não se altera com o pH e com a concentração inicial de íons Ca^{2+} indica que a essa equação pode descrever de forma satisfatória esse sistema em equilíbrio.

As Tabelas 21 a 25 apresentam os valores da constante de equilíbrio obtidos a partir da Equação 25 para os sistemas estudados.

Tabela 17. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 25 para o sistema hidroxiapatita/solução.

Solução	pH	K / 10^{-8}
SBF	6	7 ± 3
	7	4 ± 2
	7,4	3 ± 2
NaCl	6	$0,9 \pm 0,1$
	7	$0,2 \pm 0,08$
	7,4	$0,7 \pm 0,4$

Tabela 18. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 25 para o sistema matriz óssea inorgânica /solução.

Solução	pH	$K / 10^{-8}$
SBF	6	8 ± 3
	7	7 ± 1
	7,4	5 ± 2
NaCl	6	4 ± 1
	7	$2 \pm 0,4$
	7,4	$1 \pm 0,3$

Tabela 19. Valor médio da constante de equilíbrio obtida a partir da Equação 25 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de micro-emulsão /solução.

Solução	pH	$K / 10^{-8}$
SBF	6	5 ± 2
	7,4	3 ± 2
NaCl	6	$3 \pm 0,8$
	7,4	$0,7 \pm 0,1$

Tabela 20. Valor médio da constante de equilíbrio obtido a partir da Equação 25 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de emulsão água em óleo /solução.

Solução	pH	$K / 10^{-8}$
SBF	6	$10 \pm 0,6$
	7,4	6 ± 4
NaCl	6	9 ± 3
	7,4	$4 \pm 0,7$

Tabela 21. Valor médio da constante de equilíbrio obtido a partir da Equação 25 para o sistema fosfato de cálcio obtido a partir de micro-emulsão /solução.

Solução	pH	$K / 10^{-8}$
SBF	6	8 ± 9
	7,4	5 ± 4
NaCl	6	10 ± 4
	7,4	2 ± 3

Os resultados apresentados nas Tabelas 21 a 25 mostram que os valores da constante de equilíbrio não variam de forma significativa ao se utilizar a Equação 25 para todos os materiais estudados confirmando os resultados apresentados nas Tabelas 15 a 28.

Uma vez que a Equação 25 representa o equilíbrio do fosfato de cálcio monetita (CaHPO_4) foram realizados experimentos de isotermas de equilíbrio com monetita (CaHPO_4), nas mesmas condições experimentais em que foram realizados os equilíbrios com os demais fosfatos de cálcio. Os resultados da constante de equilíbrio calculados como CaHPO_4 são apresentados na Tabela 26.

Tabela 22: Constante de equilíbrio de CaHPO_4 em soluções de NaCl e SBF.

Solução	$K / 10^{-7}$
SBF	2 ± 1
NaCl	$1,9 \pm 0,4$

O valor da constante de equilíbrio de solubilidade do composto CaHPO_4 apresentado na Tabela 26 é o mesmo reportado na literatura para monetita²².

É interessante notar que, de forma geral, as constantes de equilíbrio determinadas para os materiais estudados apresentam a mesma ordem de grandeza (10^{-8}). A formação do composto CaHPO_4 após a suspensão dos fosfatos de cálcio na superfície dos materiais não foi demonstrada até o momento por trabalhos na literatura assim como pelas caracterizações realizadas neste trabalho (item 5.4). A incapacidade de detectar essa nova fase superficial é uma indicação de que essa nova superfície deve ser formada apenas por algumas camadas atômicas.

As novas tecnologias de estudo de superfícies a partir de técnicas como TOF-SIMS e espectroscopia de FTIR entre outras, têm possibilitado avanços no estudo das camadas superficiais dos compostos (primeira camada atômica). A partir destes avanços, é possível esperar que trabalhos onde sejam realizadas novas medidas possam confirmar ou refutar a hipótese da formação de uma superfície composta predominantemente por íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} na superfície dos fosfatos de cálcio, em equilíbrio com uma solução aquosa.

5.4– Caracterização dos Fosfatos de Cálcio Após a Suspensão dos Sólidos em Soluções de NaCl ou SBF.

Uma vez que os resultados dos estudos de equilíbrio dos fosfatos de cálcio em soluções aquosas mostraram que possivelmente ocorre uma modificação na superfície destes sólidos, hidroxiapatita e matriz óssea inorgânica foram caracterizadas após suspensão e equilíbrio em SBF.

Os fosfatos de cálcio sintéticos cristalinos apresentam as mesmas características dos materiais já caracterizados na literatura. Nas figuras e tabelas apresentadas no item 5.1, são reportados os difratogramas de raios x, espectros de

infravermelho, micrografias de varredura eletrônica, termogramas e razão Ca/P obtida por ICP-OES destes materiais antes da suspensão.

As Figuras 50 a 53 apresentam os espectros de FTIR e difratogramas de raios x obtidos após diferentes períodos de suspensão dos materiais em SBF.

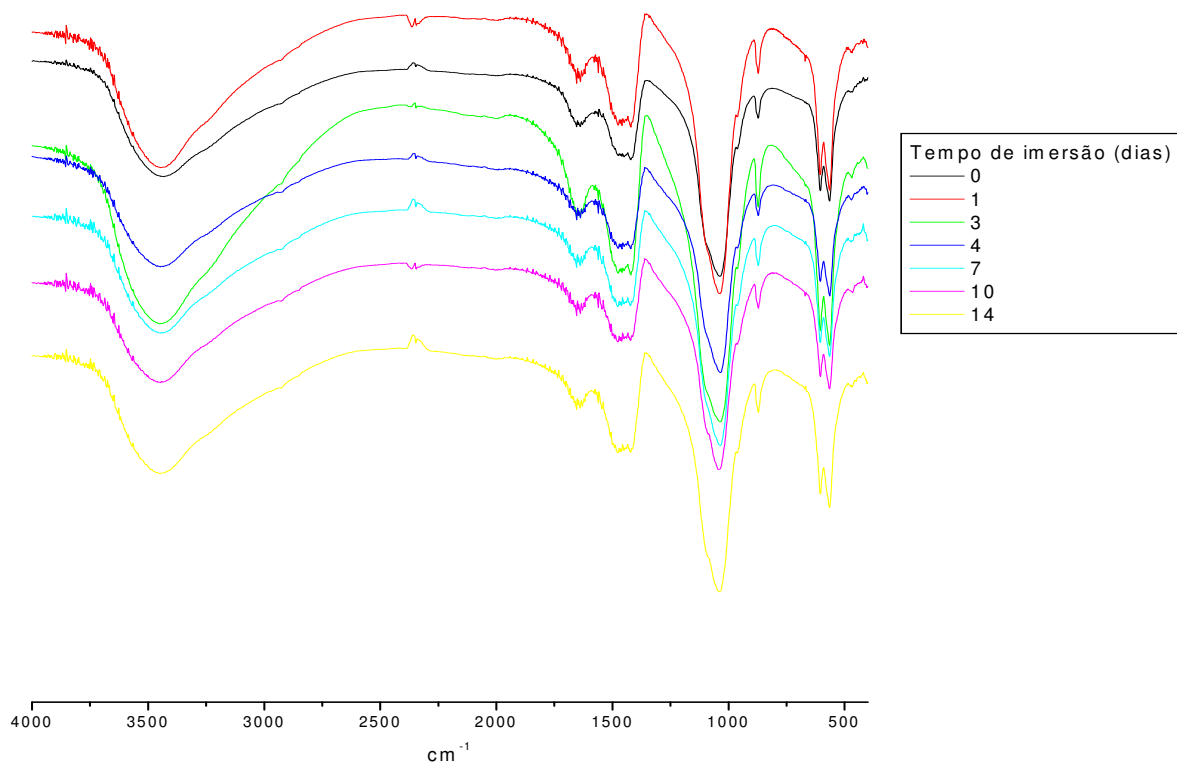


Figura 50: Espectros de FTIR da matriz óssea inorgânica suspensos por diferentes períodos em SBF.

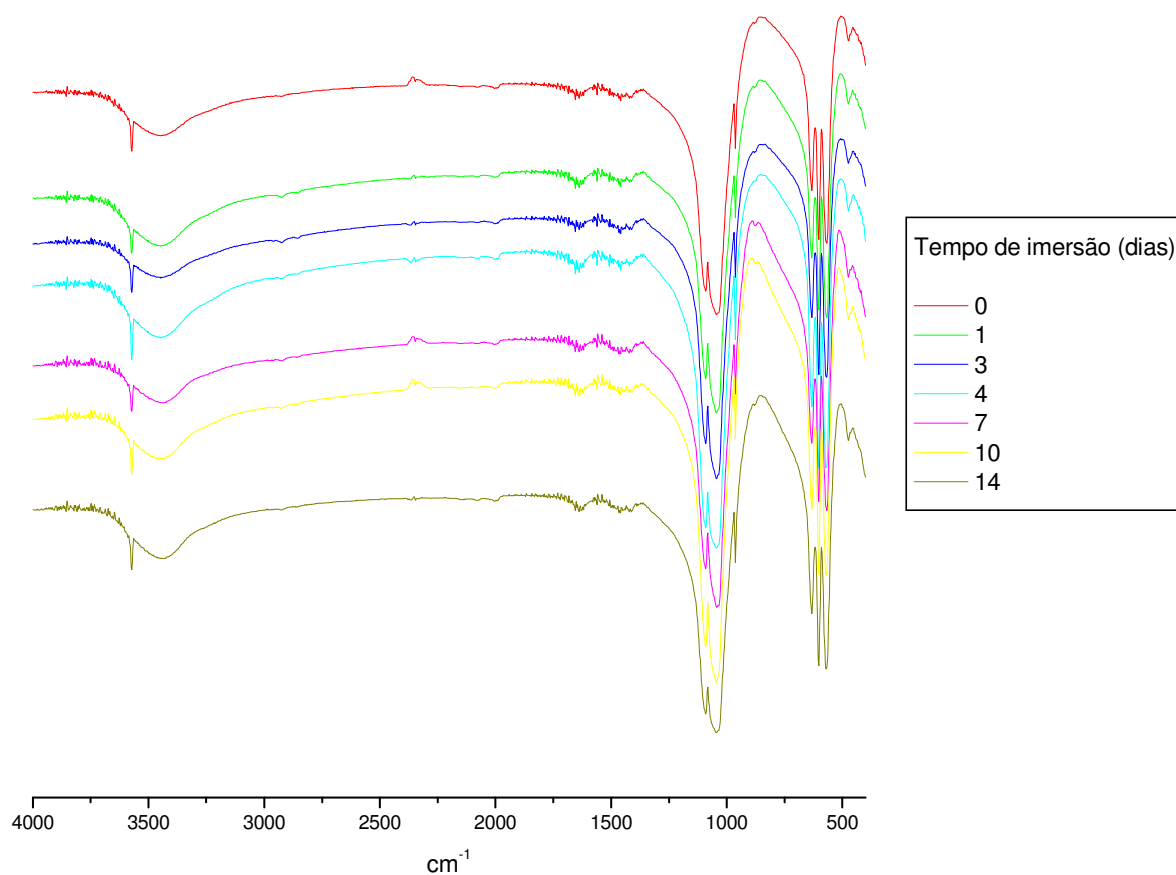


Figura 51: Espectros de FTIR de hidroxiapatita suspensos por diferentes períodos em SBF.

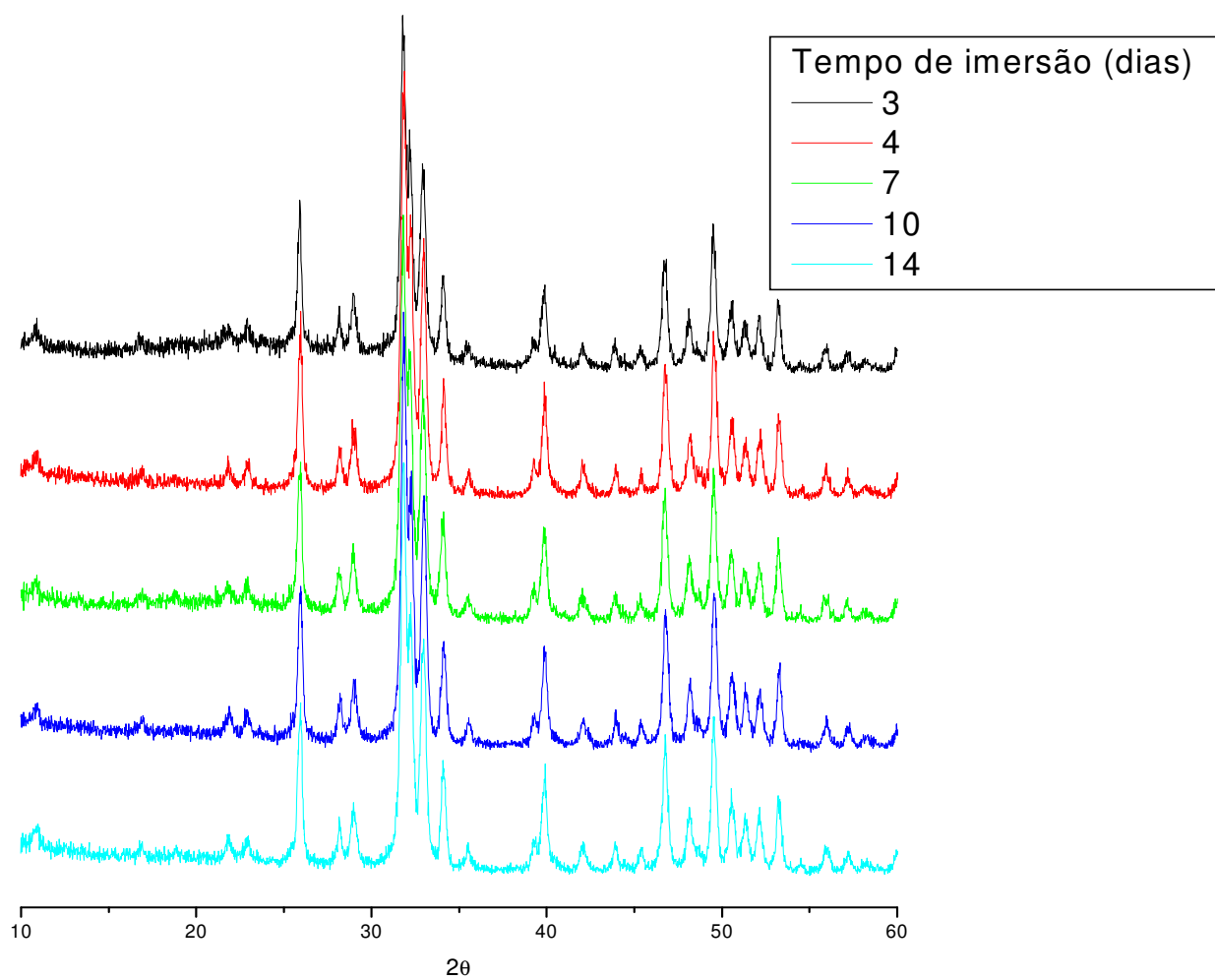


Figura 52: Difratomogramas de raios x de hidroxiapatita suspensos por diferentes períodos em SBF.

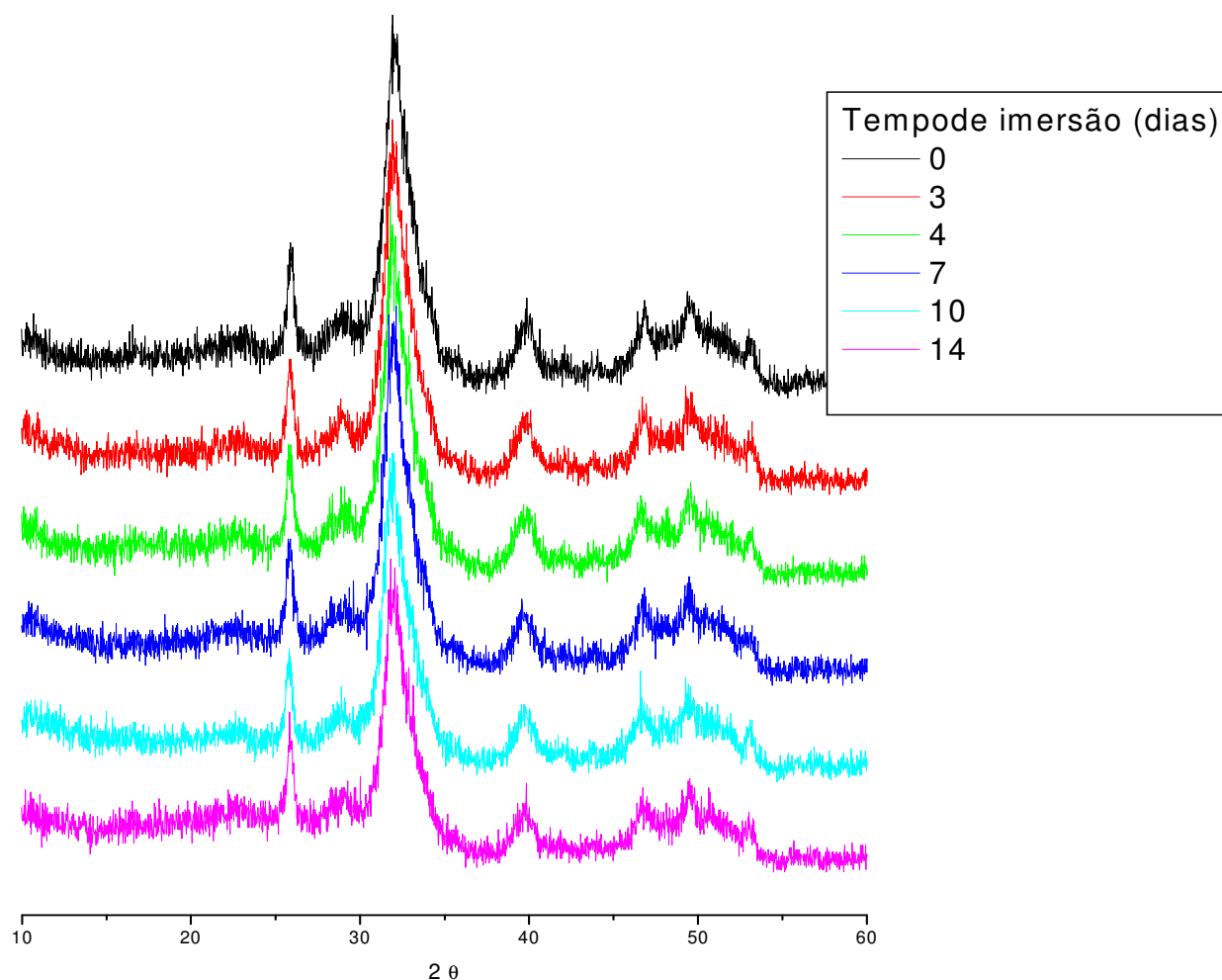


Figura 53: Difratoigramas de raios x de hidroxiapatita suspensos por diferentes períodos em SBF.

Os resultados apresentados mostram que não ocorre uma modificação significativa que possam ser detectadas nos materiais após a suspensão nas soluções.

Ao longo dos estudos realizados neste trabalho foi observado que aproximadamente a metade da massa dos fosfatos é dissolvida após o 1º dia de suspensão, e, portanto a ausência de alterações significativas na composição química destes fosfatos não pode ser atribuída a uma solubilidade reduzida destes materiais.

A não observância de alterações novamente confirma a hipótese de que as modificações observadas nos estudos de equilíbrio são modificações que ocorrem apenas na superfície dos fosfatos de cálcio estudados.

5.5- Considerações Sobre os Modelos de Dissolução e Equilíbrio de Fosfatos de Cálcio em Soluções Aquosas

A observação do comportamento anômalo para os sistemas apatias/solução aquosa tem sido reportada em vários trabalhos na literatura. Estes trabalhos demonstram que para estes sistemas o processo de dissolução não ocorre respeitando a estequiométrica dos materiais^{80, 105, 79, 71}.

Uma vez que este fenômeno é reportado em inúmeros trabalhos realizados por diferentes autores, nas mais diversas condições experimentais, vários pesquisadores, têm proposto modelos na tentativa de explicar esse comportamento não usual das apatitas.

Até o momento os vários modelos propostos podem ser agrupados em oito modelos⁷¹. sobre a dissolução de apatitas em soluções aquosas:

- Modelo do controle de dissolução por difusão e cinética;
- Modelo de dissolução polinuclear;
- Modelos de formação da camada de cálcio;
- Modelo de dissolução estequiométrica/não estequiométrica;
- Modelo de dissolução química;
- Modelo de formação de defeitos na superfície;

- Modelo de troca de íons;
- Modelo de catálise por hidrogênios.

De forma geral, é possível afirmar que todos estes modelos apresentam qualidades e defeitos, uma vez que nenhum destes é capaz de descrever de forma completa todos os fenômenos que ocorrem na superfície das apatitas durante a dissolução ou equilíbrio em solução aquosa. Ainda assim, estes modelos têm o mérito de serem capazes de tratar de forma relativamente satisfatória os fenômenos que ocorrem nas condições para os quais foram propostos.

Apesar do aparente sucesso em descrever fenômenos observados na dissolução ou equilíbrio das apatitas em soluções aquosas, grande parte destes modelos não é capaz de explicar, ou ignora a falta da existência de uma constante de solubilidade definida para as apatitas.

É possível notar entre os modelos existentes, três explicações diferentes para este problema da constante de solubilidade. A primeira explicação afirma que as apatitas apresentam o fenômeno de Equilíbrio de Solubilidade Metaestável (MES)^{80, 79}, onde em vez de um equilíbrio termodinâmico, temos um sistema cuja velocidade de dissolução das partículas é bem maior que a de precipitação/crescimento das mesmas.

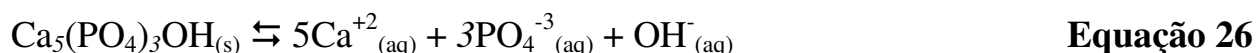
Outra explicação, da qual faz parte o modelo de Gramain afirma que, ao longo da dissolução existe uma adsorção, ou mesmo desorção preferencial de determinados íons na superfície dos materiais⁸⁵.

E, por fim, a última explicação afirma que a superfície dos fosfatos de cálcio é composta por vários sítios a partir dos quais ocorre a dissolução. Neste modelo, a dissolução se encerra à medida que os sítios de dissolução são consumidos ao longo do processo de solubilização.

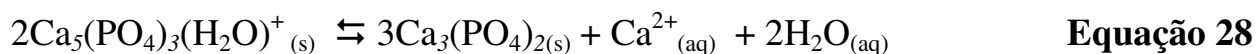
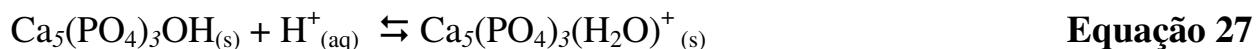
Assim, é possível concluir que nenhuma das explicações para o

comportamento das apatitas, fornece uma explicação satisfatória para a variação da constante de equilíbrio destes materiais (10^{-52} a 10^{-60}). Neste trabalho, demonstramos que não é possível descrever o comportamento do sistema por uma adsorção de íons cálcio na superfície do material; por fim, a questão dos sítios de adsorção não é capaz de explicar a constante de equilíbrio diferenciada, uma vez que mesmo que os materiais se dissolvam através de sítios de dissolução, não há relação entre o processo de dissolução e a constante de equilíbrio.

Alguns autores⁷¹ afirmam que a dissolução das apatitas não pode ser descrita pela Equação 26.



ao contrário afirmam que a dissolução das apatitas ocorre em quatro etapas, segundo as Equações 27 a 30.



A indicação de que as apatitas dissolvem-se de acordo com estas quatro equações e de que a dissolução ocorre na superfície destes materiais permite esperar que em algum momento da dissolução seja possível encontrar na superfície, os íons que tomam parte das equações. As Equações 29 e 30 podem sofrer um deslocamento do equilíbrio à medida que as concentrações iônicas são alteradas nas soluções e dessa forma, é possível esperar que a solução apresente

uma determinada concentração de íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} ou PO_4^{3-} , e que a superfície formada pelos compostos apresentados nas Equações 29 e 30 estejam em equilíbrio com a solução.

Para soluções com pH próximo do valor do pH fisiológico ($\text{pH} \approx 7,4$) o íon fosfato de maior concentração na solução é o HPO_4^{2-} . Dessa forma, é esperado que as Equações 29 e 30 (devido ao equilíbrio dos íons HPO_4^{2-} com os íons H_2PO_4^-) sejam deslocadas para a formação do composto CaHPO_4 na superfície do material. Portanto, é possível esperar que o equilíbrio entre esta nova superfície formada e a solução aquosa seja muito semelhante ao equilíbrio do composto puro CaHPO_4 e solução aquosa.

Essa afirmação confirma os resultados apresentados neste trabalho onde demonstramos que o sistema apatita/solução aquosa pode ser descrito pela equação de equilíbrio de acordo com a composição de CaHPO_4 .

6 – Conclusões

6.1- Caracterização da Matriz Óssea Inorgânica

Os resultados do efeito da desproteínação com hidrazina sobre a matriz óssea inorgânica, permitem afirmar que o processo de desproteínação desenvolvido por Termine não altera de forma significativa a matriz óssea inorgânica.

Em relação à caracterização da matriz óssea inorgânica, os resultados apresentados neste trabalho mostram que as modificações pelas quais a matriz óssea inorgânica passa ao longo da vida dos animais ocorre apenas até o sexto mês de vida dos mesmos. Além disso, os resultados mostram que não existe uma diferença significativa das características das matrizes ósseas para os ossos estudados (crânio e fêmur) apesar das diferenças anatômicas e de estímulo mecânico aos quais estes ossos são submetidos ao longo da vida dos animais.

Quanto à concentração das espécies presentes na matriz óssea inorgânica, os resultados demonstram que existe uma correlação entre os parâmetros cristalográficos do plano de difração 310 e a concentração de íons carbonato. Demonstramos também que a linha de base dos difratogramas (comumente relacionada a uma fase amorfa) não pode ser correlacionada com a concentração dos íons carbonato na matriz óssea inorgânica.

Os resultados das microscopias de varredura eletrônica da matriz óssea inorgânica mostraram que esta é formada por partículas da ordem de 20 nm que se aglomeram em estruturas globulares da ordem de 70 nm de diâmetro e por placas com 5-10 nm de espessura e comprimentos variados.

A partir destes resultados foi sugerido um modelo para a nanoarquitetura dos ossos. Este modelo é fundamental para a produção de biomateriais com a finalidade de substituição óssea uma vez que, para se criar um material realmente biomiméticos é primeiramente necessário que se conheça a estrutura do material que se deseja mimetizar.

6.2- Estudo da Superfície dos Fosfatos de Cálcio

Os resultados apresentados permitiram demonstrar que o equilíbrio fosfato de cálcio/solução aquosa não pode ser descrito como uma isoterma de adsorção. Desta forma, o modelo de Gramain onde a dissolução das apatitas é descrita por uma isoterma de adsorção não pode ser estendido ao sistema em equilíbrio.

A partir destes mesmos estudos de isotermas de adsorção foi possível verificar que o sistema formado por fosfato de cálcio/ solução aquosa pode ser descrito pelo equilíbrio entre o composto CaHPO_4 sugerindo que a superfície dos fosfatos de cálcio se modifica formando este composto.

A modificação da superfície pode explicar de forma satisfatória os resultados de dissolução não estequiométrica das apatitas e o comportamento anômalo do equilíbrio entre a superfície destas apatitas e a solução, reportados na literatura.

O esclarecimento das transformações que ocorrem na superfície das apatitas, dentre elas a matriz óssea inorgânica, são de grande importância para o entendimento de todos os processos biológicos nos quais estes materiais tomam parte. Essa importância é confirmada pela afirmação comum nos trabalhos de que a

biocompatibilidade dos materiais é uma propriedade da superfície, ao invés de uma propriedade do “bulk” do material.

Apêndice 1

Cálculo da constante de atividade dos íons presentes nas soluções estudadas.

O coeficiente de atividade iônica pode ser calculado pela Equação 31 (Lei de Debye-Huckel estendida).¹⁰⁴

$$\ln \gamma_i = \frac{-z_i^2 A I^{\frac{1}{2}}}{1 + B a I^{1/2}} \quad \text{Equação 31}$$

Onde:

z é a carga do íon, a é um parâmetro referente ao tamanho da esfera de hidratação dos íons e I é a força iônica do meio, expressa por:

$$I = \frac{1}{2} \sum z_i^2 \left(\frac{b_i}{b^\theta} \right) \quad \text{Equação 32}$$

onde b é a molalidade e b^θ é a molalidade padrão da substância.

A e B são obtidos a partir da teoria de Debye-Hueckel onde:

$$A = 1,825 \times 10^{-6} (\epsilon T)^{-3/2} \quad \text{Equação 33}$$

$$B = 50,3 (\epsilon T)^{-1/2} \quad \text{Equação 34}$$

ϵ é a constante dielétrica do meio e T é a temperatura em Kelvin. Para a água, temos $\epsilon = 78,30$.

Desta forma primeiramente é necessário determinar a concentração dos íons presentes nas soluções estudadas. Os íons e espécies presentes na solução de SBF são: Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , H_3PO_4 , H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , HSO_4^- , H_2SO_4 . Uma vez que os estudos foram realizados em pH próximos a

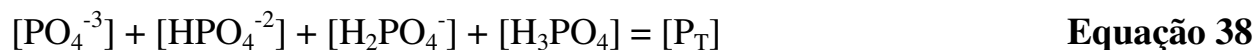
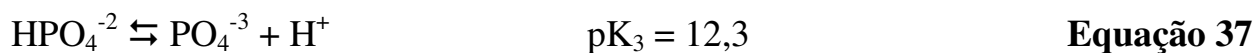
7, para a determinação da força iônica na solução é possível considerar zero a concentração das espécies PO_4^{3-} , H_3PO_4 , HCO_3^- , SO_4^{2-} , HSO_4^- , H_2SO_4 , H_3PO_4 e H_2SO_4 .

A concentração dos íons na solução de SBF é:

Tabela 23: Concentração dos íons no SBF.

Íon	Concentração (mMol/L)
Na^+	142,0
K^+	5,0
Mg^{2+}	1,5
Ca^{2+}	2,5
Cl^-	103,0
HCO_3^-	27,0
HPO_4^{2-}	1,0
SO_4^{2-}	0,5

É possível estimar a concentração da espécie HPO_4^{2-} . Para isso podemos utilizar as equações de equilíbrio e o balanço de massa.



O valor de pK pode ser determinado pela equação:

$$-\log K = pK$$

Equação 39

Com as equações anteriores é possível obter as equações:

$$a_{H_3PO_4} = \frac{a_{H_2PO_4} \times a_{H^+}}{K_1}$$

Equação 40

$$a_{H_2PO_4} = \frac{a_{HPO_4} \times a_{H^+}}{K_2}$$

Equação 41

$$a_{HPO_4} = \frac{a_{PO_4} \times a_{H^+}}{K_3}$$

Equação 42

Como afirmado anteriormente é possível assumir que a concentração do íon H_3PO_4 e PO_4^{3-} é zero. Desta forma a Equação 40 pode ser descartada. E o balanço de massa passa a ser então:

$$[HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-] = [P_T]$$

Equação 43

Nos experimentos realizados a concentração de fósforo foi determinada por ICP-OES. Esta técnica apresenta a concentração do elemento na solução e não a atividade deste. Dessa forma devemos reescrever a Equação 41 e 42 em função da concentração destes íons, assim:

$$[H_2PO_4] \times \gamma_{H_2PO_4} = \frac{[HPO_4] \times \gamma_{HPO_4} \times a_{H^+}}{K_2}$$

Equação 44

onde γ é o coeficiente de atividade da espécie. Com estas equações a Equação 43 (balanço de massa) pode ser reescrita da forma:

$$P_T = [\text{HPO}_4] + \frac{[\text{HPO}_4] \times \gamma_{\text{HPO}_4} \times K_3}{a_{\text{H}^+}} \quad \text{Equação 45}$$

Para se resolver a Equação 45 é necessário que seja assumido que:

$$[\text{H}_2\text{PO}_4] \times \gamma_{\text{H}_2\text{PO}_4} \approx [\text{H}_2\text{PO}_4] \quad \text{Equação 46}$$

Ao se assumir que a Equação 46 é verdadeira é possível determinar a concentração de íons HPO_4^- e $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ pela Equação 44 e 45. Na força iônica estudada sabemos que a Equação 46 não é totalmente correta, mas ao usá-la é possível se ter uma estimativa da concentração destes íons na solução. Nos sistemas estudados o grande responsável pela força iônica são os íons Na^+ e Cl^- são os que determinam praticamente a força iônica pois estão presentes em quantidade muito superior aos outros íons, e portanto a utilização da Equação 45 é razoável.

A partir da Equação 44 e 45 temos:

$$P_T = [\text{HPO}_4] \times \left(1 + \frac{[\text{HPO}_4] \times K_3}{a_{\text{H}^+}} \right) \quad \text{Equação 47}$$

Assim a partir da Equação 41 e 43 determina-se a concentração dos íons HPO_4^{2-} e H_2PO_4^- nas soluções estudadas

Em relação aos íons H^+ e OH^- a atividade é obtida diretamente do pH da solução. Foram utilizados pH de 6,0 6,6, 7,0 e 7,4 e portanto os valores de pOH podem ser obtidos pela equação:

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14$$

Equação 48

A determinação da atividade é obtida pela equação:

$$-\log a_{\text{H}^+ \text{ ou } (\text{OH}^-)} = \text{p}(\text{H ou OH})$$

Equação 49

Dessa forma, são obtidos os valores das atividades dos íons OH^- e H^+ .

Por fim como nos sistemas estudados foi realizado o controle do pH por meio de borbulhamento de CO_2 no sistema é necessário determinar se a concentração de CO_2 dissolvido na solução não é capaz de alterar a força iônica do meio.

A solubilidade do CO_2 em água a 35°C (valor tabelado próximo a temperatura de 37°C utilizado nos experimentos) é de $2,69 \times 10^{-2} \text{ Mol/L}^{106}$. Com este dado e utilizando as Equações 50 a 53 da mesma forma utilizada para a determinação da concentração dos íons fosfatos é possível estimar a concentração máxima de íons na solução que são gerados devido ao borbulhamento de CO_2 na solução.

$$[\text{H}_2\text{CO}_3] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] = [\text{C}_\text{T}]$$

Equação 50



$$\text{pK}_s = 2,78$$

Equação 51



$$\text{pK}_1 = 6,35$$

Equação 52



$$\text{pK}_2 = 10,33$$

Equação 53

As concentrações máximas encontradas de HCO_3^- e de CO_3^{2-} , provenientes do borbulhamento, são respectivamente $4,6 \times 10^{-4}$ e $5 \times 10^{-7} \text{ Mol/L}$. As concentrações encontradas de HCO_3^- e de CO_3^{2-} não alteram de forma significativa

a força iônica do meio e, portanto, tais íons foram desconsiderados nos cálculos da força iônica das soluções.

Para o cálculo da força iônica devemos utilizar a Equação 32 que esta em função da molalidade das espécies. A molalidade pode ser expressa de acordo com a equação:

$$m = \frac{n_i}{W}$$

Equação 54

onde m é a molalidade, n_i o número de moles e W a massa do solvente. A densidade de NaCl de 0,1 molal é de 1,000 ml/g a 30 °C e com concentração de 0,25 molal é de 0,9943 ml/g a 30 °C. A partir destes dados é possível determinar a densidade de uma solução de 0,18 molal (concentração semelhante a concentração encontrada nas soluções estudadas).

A partir destes dados é possível determinar que a concentração de 0,18 molal teríamos a concentração de 0,18080 molar. Como estas concentrações são muito próximas neste trabalho é possível considerar:

$$1 \text{ molal} \cong 1 \text{ molar}$$

Equação 55

Assim a Equação 32 foi utilizada da forma como apresentada, mas considerando-se que a concentração das espécies é dada em molaridade. Ao se substituir as concentrações determinadas na Equação 32 é possível determinar que a força iônica da solução de SBF é de 0,156 e de NaCl de 0,149.

Com os valores da força iônica para o sistema é possível retornar as Equações 35 e 36 utilizando-se a temperatura em kelvins de 310,15 K resta apenas

o parâmetro a referente ao tamanho da esfera de hidratação dos íons para a determinação do coeficiente de atividade das espécies presentes nas soluções estudadas. Os valores de a para os íons de interesse são apresentados na Tabela 28¹⁰⁷.

Tabela 24: Parâmetro a

Íon	Parâmetro a
Ca^{2+}	6
PO_4^{-3}	4
HPO_4^{2-}	4
$\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$	4
CO_3^{-2}	3
OH^-	9
H^+	5

Com estes parâmetros e utilizando-se a Equação 1 é possível portanto determinar o coeficiente de atividade dos íons nas soluções. Os resultados são apresentados na Tabela 29.

Tabela 25: Coeficiente de atividade dos íons presentes nas soluções estudadas.

Soluções	Coeficientes de atividade						
	γ_{H^+}	γ_{OH^-}	$\gamma_{\text{Ca}^{+2}}$	$\gamma_{\text{CO}_3^{2-}}$	$\gamma_{\text{PO}_4^{3-}}$	$\gamma_{\text{HPO}_4^{2-}}$	$\gamma_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}$
SBF	0,912	0,866	0,638	0,616	0,307	0,591	0,877
NaCl	0,916	0,873	0,653	0,631	0,326	0,608	0,883

A determinação do coeficiente de atividade dos íons de interesse foram determinados para a concentração de íons encontrada na solução de SBF e NaCl contendo concentrações de Ca e P idênticas as concentrações encontradas no fluido biológico. Em nosso trabalho a concentração de íons Ca e P na solução foi variada ao longo da dissolução dos fosfatos de cálcio e dessa forma é necessário se avaliar se a dissolução destes não altera de forma significativa a força iônica do meio e portanto a atividade das espécies.

A concentração de íons Ca^{2+} na solução variou de 10^{-4} a 10^{-6} Mol/L e a dissolução dos mesmo liberara apenas 10^{-5} Mol/L de P na solução. Uma vez que a concentração de NaCl é de aproximadamente $1,8 \times 10^{-1}$ é possível afirmar com segurança que a variação da concentração destas espécies não altera a força iônica do meio e portanto a atividade dos íons.

Outro fato considerado, foi a variação da concentração de H^+ e OH^- uma vez que o pH das soluções variou de 6 a 7,4 nos diferentes estudos. Novamente aqui a variação é insignificante para alterar a força iônica do meio. Essa mesma variação é acompanhada pela variação da concentração de íons carbonato na solução uma vez que o pH foi controlado pelo borbulhamento de CO_2 na solução. A variação destes íons esta compreendida no intervalo de 10^{-7} a 10^{-5} o que é novamente insignificante para a força iônica do meio.

Apêndice 2

“Constantes de Equilíbrio” determinadas a partir de diferentes composições de fosfatos de cálcio para os sistemas fosfato de cálcio/solução

Tabela 26: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de NaCl a pH 6,0.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
1e-56	1e-08	1e-96	6e-12	8e-104	7e-32	5,42e-03
1e-56	1e-08	1e-96	8e-12	1e-103	7e-32	4,71e-03
5e-57	9e-09	2e-97	7e-12	3e-104	4e-32	4,01e-03
1e-56	1e-08	1e-96	1e-11	2e-103	8e-32	3,59e-03
3e-57	8e-09	8e-98	8e-12	1e-104	3e-32	3,23e-03
8e-58	6e-09	6e-99	4e-12	1e-105	1e-32	2,75e-03
1e-57	8e-09	2e-98	9e-12	6e-105	2e-32	2,21e-03
2e-57	9e-09	3e-98	1e-11	1e-104	3e-32	8,88e-05
4e-58	6e-09	2e-99	6e-12	8e-106	1e-32	1,59e-03
7e-58	9e-09	6e-99	2e-11	5e-105	2e-32	8,14e-04
2e-58	7e-09	4e-100	2e-11	7e-106	8e-33	4,34e-04
3e-58	9e-09	1e-99	3e-11	3e-105	1e-32	1,40e-04
5e-58	1e-08	2e-99	4e-11	6e-105	2e-32	1,23e-04
3e-58	9e-09	7e-100	3e-11	2e-105	1e-32	8,59e-05
2e-56	1e-08	7e-97	1e-11	4e-103	1e-31	4,86e-05

Tabela 27: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de NaCl a pH 7,0.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
5e-56	3e-09	2e-96	8e-14	2e-104	8e-32	5,50e-03
4e-56	4e-09	2e-96	1e-13	2e-104	8e-32	4,76e-03
8e-57	2e-09	7e-98	5e-14	1e-105	3e-32	3,88e-03
1e-58	2e-09	7e-101	1e-13	5e-108	3e-33	3,51e-03
1e-58	1e-09	3e-101	5e-14	3e-108	3e-33	3,08e-03
1e-57	2e-09	1e-99	3e-14	4e-107	9e-33	2,74e-03
1e-57	2e-09	1e-99	5e-14	5e-107	9e-33	2,14e-03
7e-57	2e-09	3e-98	7e-14	9e-106	3e-32	1,94e-03
9e-57	3e-09	5e-98	1e-13	2e-105	3e-32	1,63e-03
7e-58	2e-09	3e-100	7e-14	4e-107	8e-33	8,12e-04
4e-58	2e-09	1e-100	1e-13	2e-107	6e-33	4,47e-04
2e-56	3e-09	4e-98	6e-14	4e-105	5e-32	1,10e-04
4e-56	4e-09	2e-97	1e-13	2e-104	8e-32	8,39e-05
3e-56	4e-09	1e-97	1e-13	1e-104	7e-32	9,55e-05
3e-56	4e-09	8e-98	2e-13	2e-104	7e-32	5,97e-05

Tabela 28: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de NaCl a pH 7,4.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
4e-50	2e-08	3e-86	5e-14	3e-96	2e-28	6,00e-03
3e-53	7e-09	9e-92	3e-14	8e-101	3e-30	4,70e-03
2e-53	7e-09	4e-92	4e-14	6e-101	3e-30	3,97e-03
5e-53	7e-09	2e-91	3e-14	2e-100	4e-30	3,75e-03
1e-56	8e-09	9e-97	3e-12	7e-104	7e-32	-
9e-53	6e-09	2e-91	1e-14	1e-100	5e-30	2,68e-03
1e-53	6e-09	7e-93	3e-14	2e-101	2e-30	2,14e-03
2e-53	5e-09	1e-92	2e-14	2e-101	2e-30	2,13e-03
7e-54	4e-09	2e-93	2e-14	5e-102	1e-30	1,56e-03
2e-56	7e-09	6e-97	2e-12	9e-104	9e-32	8,26e-04
7e-55	4e-09	2e-95	3e-14	4e-103	4e-31	4,12e-04
7e-56	2e-08	7e-96	2e-11	3e-102	2e-31	1,63e-04
3e-55	6e-09	7e-96	2e-13	6e-103	3e-31	9,07e-05
6e-55	7e-09	2e-95	2e-13	2e-102	4e-31	8,17e-05
1e-55	8e-09	3e-96	8e-13	6e-103	2e-31	8,03e-05

Tabela 29: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de SBF a pH 6,6.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
1e-51	8e-08	9e-88	4e-11	6e-96	7e-29	6,05e-03
1e-51	1e-07	1e-87	6e-11	1e-95	8e-29	5,15e-03
2e-51	1e-07	2e-87	9e-11	2e-95	9e-29	4,39e-03
4e-52	8e-08	1e-88	5e-11	2e-96	4e-29	6,65e-04
6e-52	1e-07	3e-88	1e-10	6e-96	5e-29	3,48e-03
7e-52	1e-07	3e-88	1e-10	8e-96	6e-29	1,56e-03
4e-52	1e-07	9e-89	1e-10	3e-96	4e-29	2,57e-03
4e-54	4e-08	1e-92	5e-11	2e-99	3e-30	1,82e-03
8e-54	6e-08	4e-92	1e-10	1e-98	4e-30	6,04e-04
1e-55	3e-08	9e-96	6e-11	2e-101	4e-31	1,17e-04
2e-55	3e-08	3e-95	7e-11	5e-101	5e-31	4,26e-05
1e-55	3e-08	1e-95	7e-11	3e-101	4e-31	4,01e-05

Tabela 30: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de SBF a pH 7,0.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
4e-51	3e-08	8e-88	6e-13	1e-96	8e-29	2,49e-03
1e-51	3e-08	1e-88	2e-12	3e-97	4e-29	2,67e-03
1e-50	5e-08	5e-87	1e-12	9e-96	1e-28	2,29e-03
1e-51	5e-08	2e-88	5e-12	1e-96	6e-29	1,93e-03
6e-52	4e-08	4e-89	4e-12	4e-97	3e-29	1,59e-03
2e-51	6e-08	3e-88	1e-11	4e-96	7e-29	1,45e-03
1e-51	7e-08	1e-88	3e-11	4e-96	6e-29	8,46e-04
2e-52	7e-08	5e-90	4e-11	6e-97	3e-29	4,74e-04
1e-54	3e-08	2e-94	2e-11	2e-100	1e-30	1,54e-04
1e-54	2e-08	1e-94	2e-11	1e-100	1e-30	1,46e-04
1e-54	2e-08	1e-94	2e-11	1e-100	1e-30	1,50e-04

Tabela 31: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema hidroxiapatita/solução de SBF a pH 7,4.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
4e-50	3e-08	5e-87	1e-13	5e-96	2e-28	9,80e-04
5e-50	3e-08	1e-86	9e-14	8e-96	2e-28	1,18e-03
4e-50	2e-08	7e-87	9e-14	6e-96	2e-28	1,09e-03
1e-49	2e-08	3e-86	6e-14	1e-95	3e-28	1,08e-03
1e-51	2e-08	2e-89	2e-13	9e-98	3e-29	1,00e-03
2e-50	2e-08	1e-87	1e-13	1e-96	1e-28	9,31e-04
6e-51	5e-08	1e-87	3e-12	8e-96	1e-28	1,33e-03
2e-50	7e-08	7e-87	4e-12	6e-95	3e-28	6,67e-04
6e-51	7e-08	5e-88	8e-12	2e-95	1e-28	3,65e-04
2e-52	4e-08	1e-90	6e-12	1e-97	2e-29	1,65e-04
7e-54	2e-08	8e-94	3e-12	4e-100	2e-30	8,48e-05
7e-55	1e-08	8e-96	2e-12	1e-101	6e-31	5,48e-05

Tabela 32: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de NaCl a pH 6,0.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
1e-54	4e-08	1e-92	8e-11	6e-100	1e-30	7,01e-03
6e-55	4e-08	4e-93	8e-11	3e-100	1e-30	6,09e-03
5e-55	4e-08	3e-93	9e-11	2e-100	9e-31	5,54e-03
2e-55	3e-08	3e-94	7e-11	3e-101	5e-31	4,24e-03
3e-55	4e-08	6e-94	2e-10	1e-100	7e-31	3,55e-03
3e-55	4e-08	9e-94	2e-10	2e-100	8e-31	3,09e-03
1e-55	4e-08	1e-94	2e-10	4e-101	4e-31	2,33e-03
1e-55	4e-08	1e-94	4e-10	7e-101	5e-31	1,93e-03
6e-54	7e-08	1e-91	4e-10	2e-98	4e-30	1,88e-03
2e-55	5e-08	2e-94	5e-10	2e-100	6e-31	1,85e-03

Tabela 33: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de NaCl a pH 7,0.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$,	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
1e-51	2e-08	1e-88	4e-13	1e-97	3e-29	5,21e-03
5e-53	1e-08	4e-91	3e-13	1e-99	6e-30	3,47e-03
2e-52	2e-08	6e-90	7e-13	2e-98	2e-29	2,49e-03
7e-53	2e-08	5e-91	6e-13	3e-99	7e-30	1,87e-03
4e-53	2e-08	2e-91	1e-12	3e-99	6e-30	1,17e-03
3e-53	2e-08	1e-91	3e-12	4e-99	6e-30	7,49e-04
5e-53	3e-08	3e-91	5e-12	1e-98	8e-30	7,01e-04

Tabela 34: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de NaCl a pH 7,4.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
4e-52	1e-08	2e-89	1e-13	1e-98	2e-29	5,80e-07
3e-52	1e-08	9e-90	2e-13	8e-99	1e-29	6,84e-07
1e-51	2e-08	1e-88	2e-13	1e-97	4e-29	9,93e-07
7e-52	2e-08	3e-89	2e-13	4e-98	2e-29	1,11e-06
3e-52	2e-08	4e-90	3e-13	1e-98	1e-29	1,58e-06
4e-52	2e-08	6e-90	3e-13	2e-98	2e-29	1,92e-06
2e-52	2e-08	2e-90	8e-13	2e-98	1e-29	3,89e-06
1e-52	3e-08	6e-91	2e-12	2e-98	1e-29	7,79e-06
9e-53	2e-08	3e-91	2e-12	1e-98	1e-29	8,57e-06
9e-53	2e-08	3e-91	2e-12	1e-98	1e-29	8,72e-06

Tabela 35: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de SBF a pH 6,6.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
2e-51	1e-07	2e-87	7e-11	2e-95	1e-28	4,02e-03
2e-51	1e-07	3e-87	9e-11	3e-95	1e-28	3,68e-03
1e-51	1e-07	1e-87	1e-10	2e-95	8e-29	2,96e-03
6e-52	1e-07	2e-88	1e-10	7e-96	6e-29	2,27e-03
5e-52	1e-07	2e-88	2e-10	7e-96	5e-29	1,87e-03
5e-53	8e-08	1e-90	1e-10	2e-97	1e-29	1,08e-03
5e-54	5e-08	2e-92	1e-10	7e-99	4e-30	6,23e-04
3e-53	9e-08	7e-91	3e-10	2e-97	1e-29	7,08e-04
4e-53	1e-07	1e-90	3e-10	3e-97	1e-29	7,35e-04
4e-56	9e-09	1e-96	3e-12	3e-103	1e-31	7,39e-04

Tabela 36: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de SBF a pH 7,0.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
2e-51	5e-08	4e-88	4e-12	2e-96	7e-29	2,32e-03
2e-51	8e-08	5e-88	2e-11	9e-96	9e-29	1,19e-03
3e-51	1e-07	6e-88	4e-11	2e-95	1e-28	8,78e-04
5e-52	8e-08	2e-89	4e-11	2e-96	4e-29	5,35e-04
1e-52	6e-08	1e-90	4e-11	2e-97	2e-29	3,57e-04
1e-52	6e-08	1e-90	4e-11	3e-97	2e-29	3,57e-04

Tabela 37: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema matriz óssea inorgânica/solução de SBF a pH 7,4.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
8e-51	3e-08	1e-87	5e-13	2e-96	1e-28	1,37e-03
2e-50	4e-08	6e-87	4e-13	7e-96	2e-28	1,72e-03
6e-50	4e-08	2e-86	3e-13	2e-95	3e-28	1,21e-03
1e-50	4e-08	3e-87	1e-12	1e-95	2e-28	1,02e-03
3e-50	7e-08	2e-86	3e-12	9e-95	3e-28	8,86e-04
2e-50	8e-08	8e-87	6e-12	9e-95	3e-28	5,98e-04
3e-50	1e-07	1e-86	1e-11	2e-94	3e-28	4,73e-04
3e-51	6e-08	1e-88	9e-12	6e-96	9e-29	2,69e-04
8e-52	5e-08	1e-89	7e-12	9e-97	4e-29	2,21e-04
2e-52	4e-08	7e-91	5e-12	9e-98	2e-29	1,73e-04

Tabela 38: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido por Microemulsão /solução de NaCl a pH 6,0.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
5e-56	2e-08	2e-95	2e-11	2e-102	2e-31	5,73e-03
1e-55	3e-08	1e-94	1e-10	3e-101	4e-31	3,18e-03
5e-56	3e-08	2e-95	2e-10	1e-101	3e-31	1,99e-03
1e-55	5e-08	1e-94	5e-10	8e-101	4e-31	1,68e-03
9e-56	4e-08	8e-95	5e-10	7e-101	4e-31	1,59e-03
6e-57	2e-08	4e-97	2e-10	8e-103	8e-32	1,15e-03

Tabela 39: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido por Microemulsão /solução de NaCl a pH 7,0.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
2e-55	4e-09	3e-95	9e-14	2e-103	2e-31	5,28e-3
2e-54	8e-09	1e-93	2e-13	1e-101	9e-31	2,56e-3
4e-55	7e-09	3e-95	3e-13	1e-102	3e-31	9,6-4e
2e-54	1e-08	1e-94	5e-13	1e-101	9e-31	3,e-4
3e-56	6e-09	8e-98	7e-13	5e-104	9e-32	1,9e-4
7e-56	6e-09	2e-97	4e-13	1e-103	1e-31	1,3e-4

Tabela 40: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido por Microemulsão /solução de SBF a pH 6,6.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
8e-52	9e-08	4e-88	6e-11	6e-96	6e-29	3,40e-03
1e-53	7e-08	7e-92	2e-10	3e-98	6e-30	6,43e-04
1e-54	4e-08	7e-94	1e-10	7e-100	1e-30	3,83e-04
1e-54	4e-08	7e-94	1e-10	8e-100	1e-30	3,75e-04
9e-55	4e-08	5e-94	1e-10	6e-100	1e-30	3,68e-04

Tabela 41: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido por Microemulsão /solução de SBF a pH 7,4.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
1e-51	2e-08	2e-89	2e-13	6e-98	3e-29	1,04e-03
9e-51	8e-08	1e-87	1e-11	4e-95	2e-28	3,62e-04
2e-52	4e-08	6e-91	6e-12	1e-97	2e-29	1,56e-04
1e-52	3e-08	2e-91	5e-12	3e-98	1e-29	1,34e-04
2e-54	2e-08	1e-94	2e-12	9e-101	1e-30	6,54e-05

Tabela 42: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em emulsão água em óleo /solução de NaCl a pH 6,0.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
2e-56	5e-08	3e-95	2e-09	2e-101	2e-31	5,86e-03
3e-57	5e-08	2e-96	4e-09	4e-102	9e-32	3,91e-03
6e-54	1e-07	4e-91	3e-09	2e-97	6e-30	2,51e-03
8e-55	1e-07	7e-93	2e-09	7e-99	2e-30	1,56e-03
3e-55	8e-08	1e-93	2e-09	1e-99	1e-30	1,38e-03

Tabela 43: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em emulsão água em óleo /solução de NaCl a pH 7,4.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
4e-56	8e-08	2e-94	6e-09	2e-100	4e-31	6,75e-03
2e-57	4e-08	5e-97	3e-09	1e-102	6e-32	3,73e-03
1e-57	4e-08	1e-97	2e-09	5e-103	4e-32	2,27e-03
1e-55	6e-08	9e-95	1e-09	2e-100	5e-31	1,20e-03
1e-56	4e-08	2e-96	6e-10	5e-102	1e-31	8,32e-04
2e-55	4e-08	6e-95	3e-10	1e-100	5e-31	5,95e-04

Tabela 44: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em emulsão água em óleo /solução de SBF a pH 6,6.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
3e-51	2e-07	6e-87	3e-10	1e-94	2e-28	2,61e-03
1e-53	8e-08	7e-92	3e-10	5e-98	6e-30	4,77e-04
7e-52	2e-07	3e-88	1e-09	6e-95	8e-29	8,73e-04
8e-52	2e-07	4e-88	1e-09	8e-95	9e-29	8,91e-04
1e-51	3e-07	1e-87	2e-09	2e-94	1e-28	1,00e-03

Tabela 45: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em emulsão água em óleo /solução de SBF a pH 7,4.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
8e-51	4e-08	1e-87	1e-12	5e-96	1e-28	8,72e-04
2e-50	1e-07	7e-87	3e-11	3e-94	3e-28	2,77e-04
3e-51	9e-08	1e-88	3e-11	2e-95	1e-28	1,80e-04
8e-52	7e-08	1e-89	2e-11	2e-96	5e-29	1,35e-04

Tabela 46: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em cristal líquido /solução de NaCl a pH 6,0.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
4e-55	1e-07	2e-92	9e-09	7e-99	1e-30	7,04e-03
2e-55	1e-07	4e-93	7e-09	3e-99	1e-30	4,28e-03
4e-53	2e-07	1e-89	6e-09	3e-96	2e-29	3,10e-03
2e-53	2e-07	5e-90	6e-09	2e-96	1e-29	2,63e-03
5e-54	1e-07	3e-91	4e-09	2e-97	6e-30	2,13e-03
3e-54	1e-07	8e-92	3e-09	5e-98	4e-30	1,89e-03

Tabela 47: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em cristal líquido /solução de NaCl a pH 7,4.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	CaHPO_4	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Concentração de Ca^{2+} inicial (Mol/L)
3e-56	4e-08	7e-96	7e-10	2e-101	2e-31	9,51e-04
6e-56	9e-08	5e-94	8e-09	4e-100	5e-31	6,69e-03
1e-56	6e-08	1e-95	4e-09	2e-101	2e-31	3,71e-03
1e-47	8e-07	1e-80	9e-10	4e-89	2e-26	2,44e-03
4e-56	5e-08	2e-95	1e-09	5e-101	3e-31	1,33e-03
9e-55	8e-08	5e-93	1e-09	5e-99	2e-30	1,28e-03

Tabela 48: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em cristal líquido /solução de SBF a pH 6,6.

Ca₅(PO₄)₃OH	CaHPO₄	Ca₁₀(PO₄)₆(CO₃)	Ca(H₂PO₄)₂	Ca₈H₂(PO₄)₆	Ca₃(PO₄)₂	Concentração de Ca²⁺ inicial (Mol/L)
4e-51	2e-07	1e-86	3e-10	2e-94	2e-28	2,65e-03
2e-61	2e-09	3e-107	3e-12	7e-111	1e-34	2,33e-05
8e-52	2e-07	4e-88	1e-09	7e-95	9e-29	9,58e-04

Tabela 49: Valores das constantes de solubilidade obtidas a partir de diferentes fórmulas estequiométricas para o sistema fosfato de cálcio obtido em cristal líquido /solução de SBF a pH 7,4.

Ca₅(PO₄)₃OH	CaHPO₄	Ca₁₀(PO₄)₆(CO₃)	Ca(H₂PO₄)₂	Ca₈H₂(PO₄)₆	Ca₃(PO₄)₂	Concentração de Ca²⁺ inicial (Mol/L)
9e-51	4e-08	1e-87	1e-12	6e-96	1e-28	9,27e-04
2e-50	1e-07	5e-87	3e-11	2e-94	3e-28	2,85e-04
6e-51	9e-08	6e-88	2e-11	4e-95	2e-28	2,39e-04

Referências

- 1- Landis WJ. *Connect. Tissue Res.* 1996, 35:1-8.
- 2- Bertazzo S, Bertran CA. *Key Eng. Mat.* 2006, 309-311:7-10.
- 3- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Ripamonti A, Roveri N, Romanello M, Suarez Kn, Moro L. J. *Inorg. Biochem.* 1997, 68:45-51.
- 4- Gryn timer M. J. *Mater. Sci.* 1976, 11:1691-1696.
- 5- Matsushima N, Tokita M, Hikichi K. *Biochim. Biophys. Acta* 1986, 3:574-579.
- 6- Pellegrino ED, Biltz RM. *Nature* 1968, 219:1261-1262.
- 7- Legeros RZ, Balmain N, Bonel G. *Calcified Tissue Int.* 1987, 41:137-144.
- 8- Wu YT, Glimcher MJ, Rey C, Ackerman JL. *J. Mol. Biol.* 1994, 244:423-435.
- 9- Cho GY, Wu YT, Ackerman JL. *Science* 2003, 300:1123-1127.
- 10- Karsenty G, *Nature* 2003, 423:316-317.
- 11- Rensberger JM, Watabe M. *Nature* 2000, 406:619-622.
- 12- Peterlik H, Roschger P, Klaushofer K, Fratzl P. *Nature Mater.* 2006, 5:52-55.
- 13- Biltz RM, Pellegrino ED. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 1969, 51:456-&.
- 14- Dietz AA. *Arch. Biochem.* 1949, 23:211-221.
- 15- Lai CC, Singer L, Armstrong WD. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 1975, 57:516-522.
- 16- Hoag GN, Brown RG, Smart ME, Subden RE. *Growth* 1976, 40:3-11.
- 17- Legeros RZ, Trautz OR, Legeros JP, Klein E. *Science* 1967, 155:1409-141.
- 18- Burnell JM, Teubner EJ, Miller AG. *Calcified Tissue Int.* 1980, 31:13-19.
- 19- Handschin RG, Stern WB. *Bone* 1995, 16:S355-S363.
- 20- Bonar LC, Roufosse AH, Sabine WK, Gryn timer MD, Glimcher MJ. *Calcified Tissue Int.* 1983, 35:202-209.
- 21- Miller LM, Vairavamurthy V, Chance MR, Mendelsohn R, Paschalis EP, Betts F, Boskey AL. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1527:11-19.
- 22- Elliott JC. *Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates.* Amsterdam: Elsevier; 1994.
- 23- Nelson DGA, Williamson BE. *Aust. J. Chem.* 1982, 35:715-727.
- 24- Lakes R. *Nature* 1993, 361:511-515.
- 25- Tong W, Glimcher MJ, Katz JL, Kuhn L, Eppell SJ, *Calcified Tissue Int.* 2003, 72:592-598.
- 26- A. R. Matthew, Et Al. *Bone* 33, 270-282 (2003).
- 27- S. Weiner, T. Arad, W. Traub, *Febs Lett.* 285, 49-54 (1991).
- 28- W. L. Landis, K. J. Hodgins, J. Arena, M. J. Song, B. F McEwen, *Microsc. Res. Techniq.* 33, 192-202 (1996).
- 29- Landis WJ, Et Al. *J. Struct. Biol.* 1996, 117:24-35.

-
- 30- Holden C. *Science* 1992, 255:1638-1638.
 - 31- Landis WJ, Song MJ, Leith A, McEwen L, McEwen BF. *J. Struct. Biol.* 1993, 110:39-54.
 - 32- Glimcher MJ. *Rev. Mod. Phys.* 1959, 31:359-393.
 - 33- Weiner S, Arad T, Sabanay I, Traub W. *Bone* 1997, 20:509-514.
 - 34- Su X, Sun K, Cui FZ, Landis WJ, *Bone* 2003, 32:150-162.
 - 35- Sasaki N, Et Al. *J. Mater. Sci-Mater. M.* 2002, 19:333-337.
 - 36- Hassenkam T, Et Al. *Bone* 2004, 35:4-10.
 - 37- Hassenkam, T Et Al. *Micron* 2005, 36:681-687.
 - 38- Ge J, Cui FZ, Wang X, Wang Y, *Mater. Sci. Eng.* 2007, 27:46-50.
 - 39- Lendinara L, Accorsi C, Agostini C, Angelini G, Baruffaldi F, Fini M, Motta M, Giavaresi G. *Magn. Reson. Imaging.* 2001, 19:745-753.
 - 40- ZivV, Weiner S. *Connect. Tissue Res.* 1993, 29: 1.
 - 41- Carlstrom D, Finean JB. *Biochim. Biophys. Acta* 1954, 13:183-191.
 - 42- Rogers KD, Daniels P. *Biomaterials* 2003, 23:2577-2585.
 - 43- Peters F, Schwarz K, Epple M. *Thermoch. Acta* 2000, 361:131-138.
 - 44- Chatterji S, Wall JC, Jeffery JW , *Calcified Tissue Int.* 1981, 33:567-574.
 - 45- Fratzl P, Fratzl-Zelman N, Klaushofer K, Vogl G, Koller K. *Calcif Tissue Int.* 1991, 48:407-413.
 - 46- Termine JD, Eanes ED, Greenfie DJ, Nylen MU, Harper RA. *Calcified Tissue Res.* 1973, 12:73-90.
 - 47- Finean JB, Engstrom A. *Biochim. Biophys. Acta* 1953, 11:178-189.
 - 48- Walters MA, Leung YC, Blumenthal NC, Legeros RZ, Konsker KA J. *Inorg. Biochem.* 1990, 39:193-200.
 - 49- Kim HM, Rey C, Glimcher MJ. *J. Bone Miner. Res.* 1995, 10:1589-1601.
 - 50- Landis WJ, Paine MC, Glimcher MJ. *J. Ultra Mol. Struct. R.* 1977, 59:1-30.
 - 51- Landis WJ, Glimcher MJ. *J. Ultra Mol. Struct. R.* 1978, 63:188-223.
 - 52- Carter DH, Scully AJ, Heaton DA, Young MPJ, Aaron JE. *Bone* 2002, 31:389-395.
 - 53- Tomazic BB, Brown WE, Eanes ED. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993, 27:217-225.
 - 54- Matsushima N, Hikichi K, *Biochim. Biophys. Acta* 1989, 992:155-159.
 - 55- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Ripamonti A, Roveri N, Romanello M, Suarez KN, Moro L. *J. Inorg. Biochem.* 1997, 68:45-51.
 - 56- Taylor MG, Parker SF, Mitchell PCH. *J. Mol. Struct.* 2003, 651:123-126.
 - 57- Bertazzo S, Bertran CA, *Key Eng. Mat.* 2006, 309-311:3-6.
 - 58- Barry AB, Baig AA, Miller SC, Higuchi WI. *Calcified Tissue Int.* 2002, 71:167-171.

-
- 59- Bushinsky DA, Gavrilov KL, Chabala JM, Levi-Setti R. *J. Bone Miner. Res.* 2000, 15:2026-2032.
- 60- Baig AA, Fox JL, Wang Z, Higuchi WI, Miller SC, Barry AM, Otsuka R. *Calcified Tissue Int.* 1999, 64:329-339.
- 61- Kim HM, Rey C, Glimcher MJ. *Calcified Tissue Int.* 1996, 59:58-63.
- 62- Roufosse AH, Landis WJ, Sabine WK, Glimcher MJ. *J. Ultra Mol. Struct. R.* 1979, 68:235-255.
- 63- Ong JL, Hoppe CA, Cardenas HL, Cavin R, Carnes DL, Sogal A, Raikar GN. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 39:176-183.
- 64- Blair HC. *Bioessays* 1998, 20:837-846.
- 65- Brujin JD, Blitterswijk AA, Davies JE. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29:89-99.
- 66- Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. *Exp. Cell Res.* 1988, 175:266-276.
- 67- Jallot E, Irigaray JL, Weber G, Frayssinet P. *Surf. Interface Anal.* 1999, 27:648-652.
- 68- Newton M, Hukins DWL, Harding G. *Phys. Med. Biol.* 1992, 37:1339-1347.
- 69- Rey C, Kim HM, Gerstenfeld L, Glimcher MJ. *Connect. Tissue Res.* 1996, 35:397-403.
- 70- Rehman I, Smith R, Hench LL, Bonfield W. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29:1287-1294 .
- 71- Dorozhkin SV. *Prog. Cryst. Growth Ch.* 2002, 44:45-61.
- 72- Mafé S, Manzanares JA, Reiss H, Thomann JM., Gramain PH. *J. Phys. Chem.* 1992, 96:861-866.
- 73- Schaad P, Poumier F, Voegel JC, Gramain P. *Colloid Surface A* 1997, 121:217-228.
- 74- Thomann JM, Voegel JC, Gramain PH. *J. Colloid Interf. Sci.* 1993, 157:369-374.
- 75- Gramain PH, Voegel JC, Gumpfer M, Thomann JM. *J. Colloid Interf. Sci.* 1987, 118:148-157.
- 76- Thomann JM, Voegel JC, Gramain PH. *Colloid Surface* 1991, 54:145-159.
- 77- Tang RK, Hass M, Wu WJ, Gulde S, Nancollas GH. *J. Colloid Interf. Sci.* 2003, 260:379-384.
- 78- Tang RK, Henneman ZJ, Nancollas GH. *J. Cryst. Growth* 2003, 249:614-624.
- 79- Hsu J, Fox JL, Higuchi WI, Powell GL, Otsuka M, Baig A, Legros RZ. *J. Colloid Interf. Sci.* 1994, 167:414-&.
- 80- Hsu J, Fox JL, Powell GL, Otsuka M, Higuchi WI, Yu D, Wong J, Legeros RZ. *J. Colloid Interf. Sci.* 1994, 168:356-&.
- 81- Christoffersen J, Christoffersen MR, *J. Cryst. Growth* 1982, 57:21-26.

-
- 82- Bertazzo S, Solubilidade de fosfatos de cálcio em fluido corpóreo simulado. Biocompatibilidade e propriedades da interface fosfato de cálcio/solução. Dissertação de Mestrado (2002) Instituto de Química - Unicamp.
- 83- Chander S, Fuerstenau DW. J. Colloid Interf. Sci. 1979, 70:506-&.
- 84- Somasundaran P. J. Colloid Interf. Sci. 1968 27:659-&.
- 85- Shimabayashi S, Nakagaki M. Chem. Pharmac. Bull. 1983, 31:2976-&.
- 86- Adamson AW. Physical Chemistry of Surfaces, 6th Edition Wiley-Interscience, 1997
- 87- Ducheyne P, Qiu Q. Biomaterials 1999, 20:2287-2303.
- 88- Lopez-Macipe A, Rodriguez-Clemente R, Hidalgo-Lopez A, Arita I, Garcia-Garduno MV, Rivera E, Castano VM, J. Mater. Synth. Proces. 1998,6 :21-26.
- 89- Kawachi YE, Síntese de Nanopartículas de Fosfatos de Cálcio em Ambientes Líquidos Confinados. Tese de Doutorado (2001) Instituto de Química - Unicamp.
- 90- Handschin RG, Stern WB. Calcified Tissue Int. 1992, 51:111-120.
- 91- Akkus O, Adar F, Schaffler MB. Bone 2004, 34:443-453.
- 92- Hammond C. The Basis Of Crystallography And Diffraction Second Edition. Oxford: Oxford University Press; 2001.
- 93- Trebacz H, Pikus S. Journal Of Bone And Mineral Metabolism. 2003, 21:80-85.
- 94- Von Dreele RB, Larson AC (2001) Gsas – General Structure Analysis System.
- 95- Koutsopoulos S. J. Biomed. Mater. Res. 2002, 62:600-612.
- 96- Bagambisa FB, Joos U, Schilli W. Cell Mater. 1993, 3:93-102.
- 97- Eanes ED, Posner AS, T. New York Acad. Sci. 1965, 28:233-&.
- 98- Eanes ED, Gillessen IH, Posner AS. Nature 1965, 208:365-&.
- 99- Ordström EG, Karlsson KH. J. Mater. Sci. Mater. Med. 1990, 1:182-184.
- 100- Kandori K, Yasukawa A, Ishikawa T. Chem. Mat. 1995, 7:26-32.
- 101- Gadaleta SJ, Paschalis EP, Betts F, Mendelsohn R, Boskey AL. Calcified Tissue Res. 1996, 58:9-16.
- 102- www.Crystallography.Net
- 103- Rogers KD. Powder Diffraction. 1997, 12:175-179
- 104- Levine IN. Physical Chemistry – Thrid Edition – Mcgraw-Hill Book Company, 1988
- 105- Shellis RP, Lee AR, Wilson RM. J. Colloid Interf. Sci. 1999, 218:351-&.
- 106- David RL. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 87th Edition TF-CRC; 87 edition, 2006.
- 107- Butler JN. Ionic equilibrium: A mathematical approach - Addison-Wesley, 1964.