

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA

FOSFATOS DE CÁLCIO:
POROSIDADE, CRISTALINIDADE, POTENCIAL DE
INTERFACE E COMPORTAMENTO *IN VIVO*

Dissertação de Mestrado
ELIZABETE YOSHIE KAWACHI

Orientador: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran
Co-orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

CAMPINAS
Maio/1997



9750120

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

K179f Kawachi, Elizabete Yoshie
Fosfatos de cálcio : porosidade, cristalinidade, potencial de interface e o comportamento in vivo / Elizabete Yoshie Kawachi. -- Campinas, [SP : s.n.], 1997.

Orientador: Celso Aparecido Bertran.
Co-orientador: Lauro Tatsuo Kubota.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Biocompatibilidade. 2. Potencial de interface. I. Bertran, Celso Aparecido. II. Kubota, Lauro Tatsuo. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TIU UNICAMP
	K179f
V.	Ex.
TCMBO BC/	32117
PROC.	281/97
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/11/97
N.º CPD	

CM-00102669-9

*Pro Guilherminho
(minha vida) e pro Guilherme,
pelo amor e pelas alegrias.*

*Pros meus pais, Yuzo e Yuriko
por tudo o que fizeram
por mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao “chefinho”, orientador, amigo e leal fiador, Bertran, e ao querido co-orientador, Lauro, pelo maravilhoso trabalho que me permitiram desenvolver e por tudo que me ensinaram, na pesquisa e na vida.

Ao professor José Ângelo Camilli, João Cleber e todos do Departamento de Anatomia do IB que tornaram possível a interação Química-Biologia, fortificando o trabalho e aguçando minha curiosidade.

Aos amigos do grupo, pelo apoio e adoráveis seminários de grupo.

Aos amigos da Moradia, em especial da querida Valisère, mãe Dani, Fá, Lu, Cris e todos os agregados que por lá passaram, pelo carinho, amizade, companheirismo e toda vida compartilhada.

À Adélia, técnica e amiga, pelo sentido de trabalho, organização e amizade extremamente apurados.

Aos meus “escravinhos”, Zetti e Marli, pela força no laboratório.

Aos amigos do “café” do laboratório, pelos momentos de descontração, essenciais ao nosso bom rendimento.

De coração, a toda minha família e aos amigos que sempre estiveram por perto pra dar aquela força.

À diretoria, funcionários e professores do IQ que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao CNPq e Faep, pelo suporte financeiro.

ÍNDICE GERAL

Índice geral	i
Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	vi
 Resumo	 1
 Abstract	 3
 1. Introdução	 5
1.1. Classificação dos biomateriais para implantes ósseos e a relação com o tipo de resposta desenvolvida em meio fisiológico	7
1.2. Fase mineral do osso	10
1.3. Cerâmicas de fosfato de cálcio	12
1.4. Obtenção de pós cerâmicos	14
1.5. Cerâmicas densas e porosas	15
 2. Materiais e métodos	 19
2.1. Síntese dos fosfatos de cálcio	19
2.1.1. Síntese de HA, método 1 (HA-1)	19

2.1.2. Síntese de HA, método 2 (HA-2).....	19
2.1.3. Síntese de TCP	20
2.1.4. Síntese de CPP	21
2.2. Confeção dos corpos cerâmicos densos	21
2.3. Confeção dos corpos cerâmicos porosos	22
2.4. Caracterização dos materiais	23
2.4.1. Difração de raios X.....	23
2.4.2. Espectroscopia na região do infravermelho	24
2.4.3. Determinação da composição de Ca e P	25
2.4.3.1. Determinação de Ca	25
2.4.3.2. Determinação de P	26
2.4.4. Solubilidade em meio ácido	27
2.4.5. Porosimetria de mercúrio	28
2.4.6. Adsorção de gás	29
2.4.7. Microscopia eletrônica de varredura	31
2.4.8. Estudo <i>in vitro</i>	31
2.4.9. Estudos <i>in vivo</i>	33
3. Resultados e discussão	35
3.1. Difração de raios X e espectroscopia na região do infravermelho	35
3.1.1. Caracterização das amostras de HA.....	35
3.1.2. Caracterização das amostras de TCP e CPP	38
3.2. Determinação da composição de Ca e P	40

3.3. Solubilidade em meio ácido.....	42
3.4. Corpos cerâmicos.....	42
3.5. Medidas de potencial de interface.....	49
3.5.1. Eletrodos de HA.....	50
3.5.2. Eletrodos de TCP.....	53
3.5.3. Eletrodos de CPP.....	56
3.6. Comportamento <i>in vivo</i>	59
3.6.1. Implantes de corpos cerâmicos de HA densos.....	61
3.6.2. Implantes de corpos cerâmicos de HA porosos.....	64
4. Conclusões.....	68
5. Bibliografia.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema do sistema de eletrodos utilizado para as medidas de potencial de interface	32
Figura 3.1. Difrátogramas de raios X das amostras de HA.....	35
Figura 3.2. Espectros na região do infravermelho das amostras de HA.....	37
Figura 3.3. Difrátogramas de raios X de TCP e CPP	39
Figura 3.4. Micrografias dos corpos cerâmicos densos de HA e de CPP.....	43
Figura 3.5. Porogramas dos corpos cerâmicos densos de HA e CPP.....	45
Figura 3.6. Porograma e micrografia dos corpos cerâmicos porosos de HA.....	48
Figura 3.7. Gráficos de potencial relativo para eletrodos de HA em PECF à 25 °C.....	51
Figura 3.8. Gráficos de potencial relativo para eletrodos de HA em PECF à 37 °C.....	52
Figura 3.9. Gráficos de potencial relativo para eletrodos de TCP em PECF à 25 °C.....	54
Figura 3.10. Gráficos de potencial relativo para eletrodos de TCP em PECF à 37 °C.....	55
Figura 3.11. Gráficos de potencial relativo para eletrodos de CPP em PECF à 25 °C.....	57

Figura 3.12. Gráficos de potencial relativo para eletrodos de CPP em PECF à 37 °C.....	58
Figura 3.13. Foto de fêmures implantados com HA densa e porosa, duas semanas após a cirurgia.....	60
Figura 3.14. Foto de fêmures implantados com HA densa e porosa, 16 semanas após a cirurgia.....	61
Figura 3.15. Foto panorâmica da secção transversal de um implante de HA denso, quatro semanas após cirurgia.....	62
Figura 3.16. Foto de um implante de HA denso, duas semanas após cirurgia....	62
Figura 3.17. Foto de um implante de HA denso, 24 semanas após cirurgia	63
Figura 3.18. Foto panorâmica da secção transversal de um implante de HA poroso, 16 semanas após cirurgia.....	64
Figura 3.19. Foto de um implante de HA poroso, duas semanas após cirurgia.....	65
Figura 3.20. Foto de um implante de HA poroso, 24 semanas após cirurgia	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos.....	12
Tabela 2.1. Composição do descalcificador.....	27
Tabela 2.2. Composição química do fluido pseudo extracelular.....	33
Tabela 3.1. Bandas de absorção típicas para HA.....	38
Tabela 3.2. Composição de Ca e P em termos de % em massa	40
Tabela 3.3. Razão molar Ca/P	40
Tabela 3.4. Medidas de área superficial para corpos cerâmicos densos de HA.....	44
Tabela 3.5. Características dos corpos porosos obtidos por vários métodos.....	47

Fosfatos de cálcio: porosidade, cristalinidade, potencial de interface e comportamento in vivo

Elizabeth Yoshie Kawachi

Orientador: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

Co-orientador: Prof.Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Palavras-chave: cerâmicas, biocompatibilidade, potencial de interface

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm sido amplamente investigadas para substituição óssea devido à semelhança destes compostos com a fase mineral de ossos e dentes. Dentro deste contexto, foram estudadas a hidroxiapatita (HA), o fosfato de cálcio (TCP) e o pirofosfato de cálcio (CPP). As análises por difração de raios X e espectroscopia de infravermelho revelaram a incorporação de íons HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} durante a síntese de HA, o que levou à formação de uma mistura de HA, TCP e provavelmente CaO durante o processo de sinterização. A análise de TCP por difração de raios X apresentou uma mistura de β -TCP e β -CPP em sua estrutura cristalina, proporcionando a diminuição de sua solubilidade, enquanto que CPP apresentou-se apenas na fase β .

O comportamento dos materiais *in vitro* foi avaliado utilizando-se eletrodos construídos com os fosfatos de cálcio. O potencial elétrico relativo desenvolvido na interface entre os eletrodos e a solução que simula o fluido biológico foi medido a diferentes valores de pH e ao longo do tempo. A HA e o TCP apresentaram uma velocidade crescente para alcançar o estado de equilíbrio de

potencial de interface para valores de pH decrescentes e à temperatura ambiente. Para as determinações em temperatura fisiológica (37 °C) a cinética mostrou-se ainda mais rápida. O CPP não apresentou variação de potencial de interface em função do tempo em todos os valores de pH na faixa estudada.

O comportamento *in vivo* de corpos cerâmicos de HA implantados em fêmur de ratos revelou uma boa biocompatibilidade, apresentando um processo de regeneração semelhante ao natural, sem presença de reação inflamatória no período avaliado. As fotos de cortes histológicos revelaram que os corpos densos permitiram apenas o crescimento de fibras em seus microporos ($< 1 \mu\text{m}$), enquanto que os corpos porosos permitiram o crescimento de tecido ósseo e de sistema vascular através de seus macroporos (20 a 100 μm).

Calcium phosphates: porosity, crystallinity, interface potential and *in vivo* behaviour

Elizabeth Yoshie Kawachi

Supervisors: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Key words: ceramics, biocompatibility, interface potential

Calcium phosphate ceramics have been widely investigated as bone substitutes because of their affinity to bone and teeth mineral phase. In this context, three calcium phosphate ceramics were synthesized and studied: hydroxyapatite (HA), tricalcium phosphate (TCP) and calcium pyrophosphate (CPP). All the materials were analysed by X-ray diffractometry and infrared spectroscopy. Synthesis of HA incorporated HPO_4^{2-} and CO_3^{2-} ions, resulting in the formation of β -TCP and probably CaO during the sinterization process. The synthesis of TCP formed β -TCP and also β -CPP in a small amount, while CPP showed this compound only in β form.

The *in vitro* behaviour of the materials was tested by the electrodes construction using the calcium phosphate ceramics. The relative electric potential of the interface between these electrodes and a simulated body fluid was measured along the time, in different pH solutions and temperature. HA and TCP showed an increasing rate to reach the equilibrium state of the interface potential as the pH solutions were decreased at ambient temperature. At body temperature

(37 °C), the kinetic was much faster. CPP did not show interface potential change during the measurement time neither in the investigated pH nor in the temperature range.

The HA ceramic bodies *in vivo* behaviour implanted in rat femur has showed a good biocompatibility, showing a regeneration process similar to the natural ones, without the presence of inflammatory cells. Micrographies of the implanted region have showed that dense bodies enabled the growth of only fibrous tissue in their micropores ($< 1 \mu\text{m}$), but bone tissue has surrounded them. Porous bodies have enabled the growth of bone tissue and vascular systems through their macropores (20 to $100 \mu\text{m}$).

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem sido freqüente a formação de grupos de pessoas rotuladas de “geração saúde”. Estes grupos têm como características a preocupação com a alimentação natural e com a manutenção de uma boa forma física. Estas atitudes, associadas ao desenvolvimento da tecnologia em prol da qualidade de vida, têm resultado em um período de vida prolongado para uma parcela significativa da população.

Com isso, problemas geriátricos relacionados à degeneração de órgãos e tecidos e, em particular, a degeneração do esqueleto levando à disfunção dos ossos, dentes e juntas, têm sido associados ao aumento da expectativa de vida dos indivíduos, resultando em um interesse crescente por materiais e próteses que possam substituir com sucesso as partes afetadas.

A restauração de ossos fraturados e/ou a substituição de partes doentes do esqueleto dos seres humanos, também têm conduzido pesquisadores através de trilhas que resultem na diminuição do sofrimento das pessoas. A técnica do auto enxerto, utilizando material proveniente do corpo do próprio paciente, tem sido utilizada com esta finalidade desde o século passado, no entanto a necessidade de cirurgias adicionais para a obtenção do material aumenta significativamente o risco inerente a esta técnica. Além disso, há a dificuldade em se obter grandes quantidades de osso quando se trata, por exemplo, da substituição de grandes tumores^[1].

No início deste século, metais começaram a ser usados na substituição de ossos, mas foi a partir da metade do século que ocorreu um grande desenvolvimento no campo de implantes médicos e odontológicos, resultando em materiais denominados de biomateriais^[2], especialmente destinados à restauração ou reconstrução de partes ou funções do corpo, de maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável.

A importância dos biomateriais no mundo pode ser estimada através dos números apresentados pelos Estados Unidos, um dos países líderes nesta área. Estima-se que em 1996, 11 milhões de americanos portavam algum tipo de implante médico^[3].

O estágio de desenvolvimento dos implantes modernos pode ser avaliado pelo elevado percentual de sucesso alcançado nestas intervenções. Sabe-se que, na maioria dos casos, os implantes têm alcançado os resultados esperados para os quais eles foram designados, dado que vem atestar a importância dos biomateriais, no sentido de salvar e melhorar a qualidade de vida das pessoas, além de representar um mercado com grande participação econômica.

Um dos fatores que determina o sucesso de um implante é a estabilidade da interface tecido vivo/implante por um longo período de tempo^[2]. No entanto, os mecanismos que regem a interação dinâmica entre substâncias vivas e não vivas presentes nessa interface ainda representam um campo obscuro que necessita ser desvendado para que a vida útil dos biomateriais possa ser prolongada.

O avanço na área dos biomateriais depende fundamentalmente do desenvolvimento técnico e científico de vários campos do conhecimento humano, já que se trata de uma área multidisciplinar. Neste sentido, a contribuição de

profissionais da área química pode representar um passo significativo não só para a caracterização química e morfológica dos biomateriais, mas também para o entendimento do que ocorre na interface dos materiais implantados em meio biológico.

1.1. Classificação dos biomateriais para implantes ósseos e a relação com o tipo de resposta desenvolvida em meio fisiológico

Entre os diversos biomateriais utilizados podemos encontrar alguns tipos de metais, cerâmicas, polímeros, plástico, compósitos, vidros e cerâmicas vítreas^[2,4]. Cada um deles apresenta características próprias que os tornam adequados para o uso em determinadas regiões do corpo.

De acordo com a resposta desenvolvida na interface tecido vivo/implante, os biomateriais utilizados para implantes ósseos são classificados em quatro tipos principais^[2,5]:

- Tipo 1: material denso (microporoso), quase inerte;
- Tipo 2: material poroso (macroporoso), quase inerte;
- Tipo 3: material denso (microporoso), superfície reativa;
- Tipo 4: material reabsorvível.

Duas observações devem ser feitas com relação aos termos utilizados nesta classificação. Primeiro, muitos autores consideram em seus trabalhos o termo biomateriais “inertes” ou “biotolerados” para definir materiais não tóxicos que não se integram ao tecido hospede. No entanto, todo material, quando implantado, induz uma certa resposta dos tecidos vivos, mesmo que seja no

sentido de isolar o material. Segundo, na área dos biomateriais, a porosidade do material significa dimensões de poros muito maiores que aquelas consideradas normalmente entre os químicos. Segundo DUBININ, materiais macroporosos no contexto químico são aqueles que apresentam poros da ordem de $0,1 \mu\text{m}^{[6]}$. No entanto, para que um biomaterial seja considerado macroporoso ele deve apresentar poros da ordem do diâmetro Harvesiano (50 a $250 \mu\text{m}$)^[2] ou, segundo alguns autores, poros maiores que $100 \mu\text{m}^{[5]}$.

Assim, materiais microporosos quase inertes do Tipo 1 são aqueles que provocam a formação de uma cápsula fibrosa de espessura que varia de acordo com o material implantado e que separa o material do tecido ósseo hospede. Esta cápsula, apesar de ser adjacente ao tecido, não é ligada química ou biologicamente ao implante, o que resulta no movimento da interface tecido/biomaterial quando sob stress, limitando a vida útil de muitos materiais. Exemplos deste tipo de material são cerâmicas de alumina densa, borracha de silicone, aço inoxidável^[2].

Os materiais quase inertes e de grande área superficial (Tipo 2) permitem o crescimento de tecido ósseo através de seus poros, resultando em uma ligação mecânica, que aumenta a resistência do implante devido ao grande entrelaçamento que ocorre. Exemplos são cerâmicas porosas de alumina, metal revestido com hidroxiapatita, cerâmicas porosas de hidroxiapatita^[2].

Os materiais bioativos do Tipo 3 são aqueles que induzem uma reação biológica, resultando na formação de osso entre o tecido e o implante através de uma ligação química, ao contrário do que fazem os biomateriais do Tipo 1 e 2. Exemplos são biovidros, cerâmicas vítreas bioativas^[2].

Os materiais reabsorvíveis do Tipo 4 são desenvolvidos para serem repostos por tecido em regeneração ao mesmo tempo em que eliminam a interface original. Exemplos são sulfato de cálcio, fosfato de cálcio^[2].

Provavelmente, um dos primeiros materiais sistematicamente investigados para uso em implantes foi o sulfato de cálcio (gesso), $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$, primeiramente reportado em 1894 por Dreesman*. Este material é reabsorvível (Tipo 4) e não causa rejeição, no entanto, devido a sua baixa resistência mecânica, ele é facilmente fragmentado sendo rapidamente degradado. Por esses motivos, este material não tem recebido muita aplicação clínica nos dias de hoje.

Entre as biocerâmicas, a primeira a ser usada clinicamente de forma ampla foi a alumina densa ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$)^[7]. Devido a sua boa biocompatibilidade e alta resistência mecânica, este material é melhor designado para uso como prótese ortopédica em regiões que requeiram sustentação de peso ou em implantes dentários.

Sistemas compostos por fosfatos de cálcio também têm sido objeto de intensa investigação, já que é a partir destas substâncias que são derivados os minerais dos ossos e dentes. O uso de cerâmicas de fosfato de cálcio para aplicações médicas e odontológicas tem sido relatado de forma crescente a partir da década de 70^[5].

* Dreesman, em 1894, reportou o uso de $\text{Ca}(\text{SO}_4) \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ para preencher defeitos em ossos. Segundo o autor, o material foi prontamente reabsorvido e repostado por osso novo. Em *Ueber Knochenplombierung, Beitr. Klin. Chir.*, v. 9, p. 804, 1894.

1.2. Fase mineral do osso

A fase mineral dos ossos possui duas funções: concede estabilidade estrutural ao esqueleto e funciona como uma região de estoque de íons cálcio, fosfato, sódio, magnésio, carbonato e outros. Neste sentido, a fase mineral funciona como um reservatório que fornece estes íons ao fluido biológico e também como um depósito desintoxicante que armazena íons indesejáveis aos fluidos do corpo (exemplo: chumbo, estrôncio etc), mantendo os níveis biológicos necessários^[8].

Esta fase mineral do osso é composta por uma variedade de sais, não possuindo uma composição definida, visto que os ossos são tecidos que estão em constante renovação. Seu principal componente cristalino é a hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que constitui cerca de 23% em massa dos ossos e 90% do esmalte dental. Além da hidroxiapatita, outros fosfatos de cálcio também estão presentes durante as diferentes etapas do desenvolvimento ósseo, como por exemplo, o fosfato de octacálcio $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$, a monetita (CaHPO_4), a brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e fosfato de cálcio amorfo, uma substância com composição mal definida, que provavelmente apresenta uma fórmula que se aproxima de fosfato de cálcio $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ e de pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$).

A hidroxiapatita que compõe o esmalte dental é a apatita* mais cristalina produzida por organismos vivos, mas mesmo ela apresenta baixo grau de cristalinidade. Isto porque uma variedade de sais com estrutura semelhante à de hidroxiapatita pode ser encontrada, devido à troca de íons OH^- da hidroxiapatita

* Apatita apresenta fórmula geral $(\text{Ca}, \text{Z})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{Y})_6(\text{OH}, \text{X})_2$, onde $\text{Z}=\text{Mg}^{2+}, \text{Sr}^{2+}, \text{Ba}^{2+}$; $\text{Y}=\text{HPO}_4^{2-}, \text{CO}_3^{2-}$; $\text{X}=\text{Cl}^-, \text{F}^-$. No entanto, esta é uma definição de estrutura, podendo apresentar várias composições. As apatitas pertencem ao sistema hexagonal, grupo $\text{P6}_3/\text{m}$.

por F^- ou Cl^- , resultando em fluorapatita e cloroapatita, à troca de Ca^{2+} por outros íons divalentes com diâmetro maior que 0,97 Å e à troca de fosfato por carbonatos e sulfatos^[9].

Hidroxiapatita na sua forma estequiométrica apresenta 39,9% em peso de Ca, 18,5% de P e 3,38% de OH. O mineral de tecidos duros contém não só estes compostos como também apresenta traços de CO_3^{2-} . NELSON (1981) *apud* NORDSTRÖM^[10], determinou que hidroxiapatita apresentando sítios de fosfato substituídos por carbonatos são biologicamente mais reativas que o mesmo composto estequiométrico. Isto talvez explique a razão pela qual os ossos naturais sejam constituídos por hidroxiapatita contendo carbonatos ao invés de serem constituídos apenas pelo composto estequiométrico.

Tendo-se em vista que a fase mineral dos ossos é constituída por fosfatos de cálcio, principalmente por hidroxiapatita, grande atenção tem sido dispensada na utilização de fosfatos de cálcio como materiais para implantes em tecidos compactos. Acredita-se que a liberação de íons cálcio por estes implantes possa estimular a osteogênese, isto é, a capacidade de formar osso. No entanto, este resultado ainda não foi comprovado, apesar da possibilidade de se encontrar trabalhos que afirmem o contrário, equivocados provavelmente devido à superior biocompatibilidade dos fosfatos de cálcio em relação a outros materiais^[11].

Além da presença na fase mineral dos ossos, vários outros fosfatos de cálcio também ocorrem em calcificações normais e patológicas, o que têm despertado um interesse significativo no uso destes compostos como materiais de partida para obtenção de biomateriais. A Tabela 1.1 relaciona os fosfatos de cálcio e suas ocorrências no sistema biológico.

Tabela 1.1. Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos⁽¹²⁾

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ocorrências
Apatita	$(\text{Ca}, \text{Z})_{10}(\text{PO}_4, \text{Y})_6(\text{OH}, \text{X})_2$ (Z = Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ; Y = HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} ; X = Cl^- , F^-)	esmalte, dentina, osso, cálculo dentário, pedras, cálculo urinário, calcificação de tecido mole
Fosfato de octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	cálculos dentário e urinário
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	cálculo dentário, ossos decompostos
Fosfato de cálcio (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	cálculos dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias, calcificação de tecido mole
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	depósitos de pseudo- gotas em fluidos

1.3. Cerâmicas de fosfato de cálcio

Em geral, as cerâmicas de fosfato de cálcio apresentam ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de resposta a corpo estranho ou inflamatória e aparente habilidade em se ligar ao tecido hóspede. Estas características positivas podem ser explicadas pela natureza química destes materiais, ou seja, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, os quais participam do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica.

Uma forma conveniente de classificar os vários fosfatos de cálcio é pela sua razão molar Ca/P. Vários fosfatos de cálcio que possuem esta razão variando de 0,5 a 2,0 podem ser sintetizados pela precipitação a partir de soluções contendo íons cálcio e fosfato, sob condições alcalinas ou ácidas^[13]. Estas

cerâmicas são biocompatíveis e osteocondutoras (isto é, elas indicam o caminho para o crescimento ósseo, fazendo com que isto ocorra sobre a superfície e através dos poros do material).

Entre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita com razão Ca/P igual a 1,67 para o composto estequiométrico, é sem dúvida, a mais estudada para finalidades clínicas^[14-19], por ser o principal componente presente na fase mineral dos ossos. No entanto, o uso clínico de cerâmicas de hidroxiapatita pode ser limitado por sua lenta biodegradação^[20]. Estudos por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente apenas após 4 ou 5 anos de implante^[10]. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, de modo que ele possa ser degradado lentamente, enquanto é repostado por osso em formação, evitando a presença de material estranho ao organismo durante longos períodos de tempo.

A princípio, todas as biocerâmicas de fosfato de cálcio degradam, em diferentes níveis, segundo a ordem: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 > \text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Esta reabsorção é causada por dissolução físico-química, que depende do produto de solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico por desintegração física em partículas menores e por fatores biológicos, como a fagocitose, os leucócitos e os mediadores químicos que causam a redução do pH local. A velocidade de reabsorção pode aumentar com o aumento da área superficial (pó > sólido poroso > sólido denso), com o decréscimo da cristalinidade, com a diminuição do

tamanho dos grãos e, no caso da hidroxiapatita, por substituição de CO_3^{2-} nos sítios de fosfato e por Mg^{2+} , Sr^{2+} nos sítios de cálcio^[5].

Um dos materiais reabsorvíveis mais estudados é o fosfato de cálcio^[16-18,21-23], que apresenta razão Ca/P 1,5, e é tido como um material biodegradável e biocompatível, sendo parcialmente reabsorvido entre 6 e 15 semanas após o implante, dependendo da porosidade^[24].

Uma grande limitação para o uso de implantes compostos por fosfatos de cálcio reside na natureza cerâmica destes materiais, o que faz com que eles apresentem baixa resistência mecânica, limitando o seu emprego a regiões de baixo impacto.

1.4. Obtenção de pós cerâmicos

A confecção de corpos cerâmicos geralmente é feita a partir do material na forma de pó que é sinterizado a altas temperaturas. Os pós cerâmicos podem ser obtidos por via seca ou úmida.

Os processos por via seca (spray-drying, técnica hidrotérmica) resultam em pós cerâmicos muito finos e homogêneos. Porém, estes métodos geralmente não permitem a obtenção de materiais com composição estequiométrica bem definida, além do difícil controle das condições de síntese^[25].

Os processos por via úmida envolvem a preparação de uma solução homogênea de sais contendo um dos íons de interesse e a sua mistura com um agente precipitante, geralmente uma solução contendo o outro íon de interesse, de modo a se exceder o produto de solubilidade de algumas espécies químicas,

resultando em um precipitado que é separado da solução por filtração. Este precipitado pode ser o pó cerâmico desejado ou um intermediário que, após receber tratamento térmico, será convertido ao produto esperado^[26].

Os métodos de síntese por via úmida geralmente resultam em partículas aglomeradas, devido à tensão superficial da água. Estes aglomerados são apontados como os principais responsáveis pelos defeitos estruturais e de empacotamento que ocorrem nos corpos cerâmicos. No entanto, a técnica é simples, apresentando bom rendimento e baixo custo.

Alguns métodos de síntese têm sido desenvolvidos substituindo o solvente água por outro menos polar, de modo a diminuir a tensão superficial e evitar a aglomeração das partículas^[27].

1.5. Cerâmicas densas e porosas

Existem vários processos para confecção de implantes cerâmicos, sejam eles densos ou porosos. Implantes densos podem ser obtidos por compactação do pó cerâmico a altas pressões e posterior sinterização; por compactação do pó sob pressão e aquecimento simultâneos ou por moldagem do pó úmido e posterior sinterização.

Implantes porosos podem ser confeccionados misturando partículas de naftaleno de tamanho apropriado (ou um polímero ou substância orgânica que possa ser eliminada posteriormente) ao pó cerâmico e posteriormente removendo-os; umedecendo o material em pó com peróxido de hidrogênio e decompondo-o para liberar oxigênio gasoso ou pela troca hidrotérmica do

carbonato de cálcio de corais marinhos por fosfato de cálcio, o que resulta em “réplicas” de corais^[11].

Este último método tem sido muito empregado pois resulta em cerâmicas que apresentam macroporos com tamanhos e formas uniformes. Com relação ao tamanho dos poros, HULBERT, em 1970, demonstrou que poros acima de 100 μm favorecem o crescimento de osso através do material^[28]. Este tamanho de poros que define a porosidade ótima das cerâmicas se deve à necessidade de fornecer um suprimento sanguíneo ao tecido conectivo em crescimento, em outras palavras, em poros menores que 100 μm não há espaço suficiente para que se desenvolva um sistema vascular. Quando o tamanho dos poros é adequado, o crescimento ósseo no seu interior pode seguir o mesmo padrão morfológico, cronológico e metabólico da recuperação normal de uma fratura. Assim, o tamanho dos poros é um fator que exerce influência significativa no tipo de resposta do tecido em uma interface com uma superfície porosa.

Apesar da grande vantagem apresentada pelas cerâmicas porosas em permitir a invasão dos poros pelos tecidos em formação — fator que não ocorre em cerâmicas densas — esta não é a única característica que deve ser considerada quando se pensa em material para implante. O principal fator que deve ser considerado é o local onde o material será implantado. Se a região solicitar resistência à pressão, um material poroso não é o mais recomendado devido a sua baixa resistência mecânica, associada a sua grande área superficial. Em regiões de baixo impacto, a resistência mecânica apresentada pelas cerâmicas porosas quando isoladas é compensada pelo grande entrelaçamento que se desenvolve no material implantado, quando o osso cresce

através de seus poros, aumentando assim a resistência mecânica do implante poroso. Por isso, estudos biológicos e, se possível, laboratoriais, devem ser realizados para definir o uso de um biomaterial adequado com a forma apropriada para uso em diferentes regiões do corpo.

Neste trabalho foram estudados três fosfatos de cálcio: hidroxiapatita (HA), β -fosfato de cálcio (TCP)* e β -pirofosfato de cálcio (CPP). Estes compostos foram escolhidos por apresentarem propriedades químicas diferentes, em especial a solubilidade, característica principal que determina a biodegradação. CPP é um dos fosfatos de cálcio mais inertes, sendo praticamente insolúvel; HA é o componente principal da fase mineral dos ossos, não sendo total e rapidamente reabsorvível; TCP é o mais solúvel e reabsorvível entre eles [29].

Todos os materiais foram obtidos inicialmente na forma de pó, utilizando métodos por via úmida (métodos simples, de baixo custo, com bom rendimento e que resultam em produtos secundários de fácil descarte). Posteriormente, alguns foram moldados na forma de corpos densos e/ou porosos, obtendo-se desta forma materiais com diferentes áreas superficiais. Cada um dos materiais foi devidamente caracterizado segundo sua composição química, porosidade e a resposta desenvolvida em uma solução que simula o fluido biológico.

Estudos histológicos foram realizados apenas com HA com a colaboração do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp. Devido à falta de pessoal para trabalhar com os outros materiais, à falta de espaço para manter os animais de trabalho no biotério e à dificuldade em se obter corpos cerâmicos

* Fosfato de cálcio. Adotou-se a nomenclatura simples para designar o composto $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, de acordo com The Merck Index de 1996. No entanto, este composto também é conhecido como fosfato tricálcico ou, na designação universal inglesa, tricalcium phosphate, tendo símbolo convencional TCP.

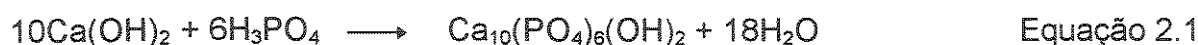
de TCP, este material e CPP não foram estudados histologicamente neste trabalho. TCP não foi moldado na forma de corpo cerâmico para não submetê-lo à sinterização, evitando sua transformação a α -TCP ou a CPP e impossibilitando seu manuseio e uso para os estudos histológicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Síntese dos fosfatos de cálcio

2.1.1. Síntese de HA, método 1 (HA-1)^[30]

HA-1 foi sintetizada por precipitação a partir de uma suspensão de hidróxido de cálcio e uma solução de ácido fosfórico, segundo a reação:

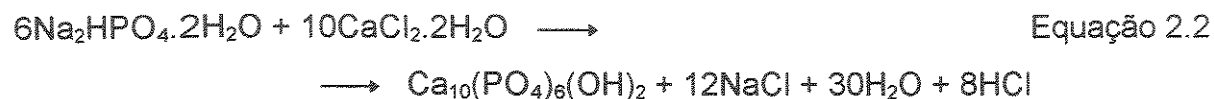


Em um béquer, foi adicionada uma solução de H_3PO_4 0,3 mol/L a uma suspensão contendo 0,5 mol de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ disperso em um litro de água, a uma velocidade de aproximadamente 7 mL/min, sob agitação magnética e temperatura reacional de 60 °C. O pH da reação foi mantido em torno de 8 com adição de NH_4OH . Terminada a adição, a suspensão foi mantida sob agitação a 60 °C por um dia. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada e seco em estufa a 60 °C. O material foi triturado, resultando em um pó fino.

2.1.2. Síntese de HA, método 2 (HA-2)^[13]

HA-2 foi obtida através da reação de precipitação a partir de uma solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,0 mol/L, adicionada lentamente a uma solução de

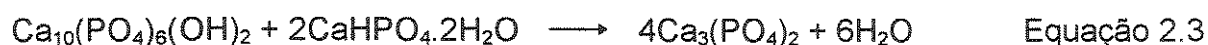
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,6 mol/L, a uma velocidade de aproximadamente 0,4 mL/min. A precipitação de HA ocorre segundo o descrito pela Equação 2.2:



A reação foi realizada em um balão de três bocas e conduzida a 50 °C sob agitação magnética, tendo mantido o pH entre 6,2 e 6,8 com adição de NH_4OH . O precipitado resultante foi filtrado a vácuo, lavado com água destilada e seco em estufa a 90 °C.

2.1.3. Síntese de TCP^[13]

O TCP foi obtido através da calcinação de uma mistura de dois materiais sólidos: HA-2 e monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCP, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), segundo a reação:

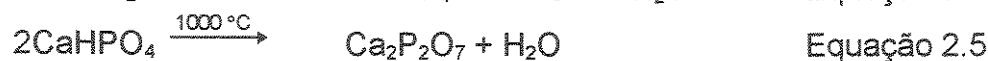


DCP foi obtido através de uma síntese semelhante à de HA-2 (Sessão 2.1.2), diferindo apenas na velocidade de adição da solução de Na_2HPO_4 , que foi vertida completamente em menos de um minuto, sobre a solução de CaCl_2 .

Os sólidos de HA-2 e DCP na forma de pó foram misturados em uma proporção de 1:2 mol respectivamente, triturados e suspensos em água para possibilitar o contato entre os dois materiais. Esta suspensão foi aquecida a 50 °C até toda água evaporar. O material seco resultante foi calcinado a 700 °C por 3 horas.

2.1.4. Síntese de CPP^[31]

CPP foi sintetizado em dois passos, segundo as reações:



Foram preparadas duas soluções: uma contendo monohidrogeno fosfato de sódio, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,50 mol/L e dihidrogeno fosfato de potássio, KH_2PO_4 , 0,04 mol/L e outra de CaCl_2 0,50 mol/L. As duas soluções foram aquecidas a 80 °C e adicionadas lentamente e à mesma velocidade (aproximadamente 5 mL/min) a uma terceira solução de KH_2PO_4 0,15 mol/L aquecida a 80 °C. Para controlar o pH do meio reacional, foram adicionadas três gotas de vermelho de metila a cada uma das três soluções (pH de viragem: 4,4 - 6,2)⁽³²⁾ e o meio reacional foi mantido ácido com adição de KH_2PO_4 . Terminada a reação, a solução foi filtrada à vácuo, o precipitado foi lavado com três porções de 250 mL de ácido fosfórico com pH 2 e depois com 250 mL de etanol absoluto. O material resultante foi o monohidrogeno fosfato de cálcio (HCP), o mesmo composto (DCP), porém não hidratado, obtido em uma das etapas da obtenção de TCP.

O material foi seco em estufa a 80 °C e sinterizado em mufla a 1000 °C por 3,5 horas.

2.2. Confeccção de corpos cerâmicos densos

Os corpos cerâmicos densos foram confeccionados apenas para HA-1 e CPP. Para TCP não foram feitos corpos cerâmicos para evitar sua exposição à

altas temperaturas, o que poderia levar à transformação do material em α -TCP ou CPP.

Os corpos densos foram preparados por prensagem, umedecendo o material em pó com uma solução de álcool polivinílico 0,2 % (massa/volume), obtendo-se uma pasta moldável. Esse material moldável foi colocado dentro de um cilindro de vidro de 3,0 mm de diâmetro interno, foi compactado com auxílio de um pequeno tubo de vidro de diâmetro igual ao do cilindro, formando um bastão de aproximadamente 1 cm de altura, que foi então extrudado. O bastão assim confeccionado foi seco em estufa a 60 °C por um período mínimo de uma hora e sinterizado a 1000 °C por 3 horas.

2.3. Confeção de corpos cerâmicos porosos

Apenas para HA-1 foram confeccionados corpos cerâmicos porosos, já que os testes histológicos só foram realizados com este material.

O princípio adotado para a elaboração dos corpos porosos foi misturar a pasta de HA e álcool polivinílico a um material polimérico ou que formasse uma quantidade significativa de gases ao ser decomposto por aquecimento a temperaturas da ordem de 500 °C. Foram feitas várias tentativas para obter corpos cilíndricos de 3,0 mm de diâmetro que apresentassem poros suficientemente grandes para permitir a vascularização e o crescimento de células ósseas. Os métodos desenvolvidos foram:

a) mistura de HA-1 e 10 % em massa de pó de acrílico. Umedecer a mistura com solução de álcool polivinílico 0,2% massa/volume (PVA). O acrílico em pó foi

obtido dissolvendo acrílico em acetona, vertendo sobre água para reprecipitar, filtrando e triturando o material seco;

b) umedecer HA-1 com solução de PVA e misturar com algodão hidrófilo;

c) suspender HA-1 em uma solução de PVA e saturar um pedaço de esponja de poliuretano com esta suspensão;

d) molhar HA-1 com uma solução de PVA saturada com açúcar refinado comercial (sacarose);

e) mistura de HA-1 e sacarose em uma proporção de 50 % em massa e molhada com solução de PVA;

f) mistura de 50 % em massa de HA-1 e sacarose molhada com solução de PVA saturada com sacarose;

g) mistura do resultado obtido na tentativa (f) levemente desagregado e separado granulometricamente em peneira de 0,053 mm com 25 % em massa de sacarose, molhada com solução de PVA.

Os materiais de todas as tentativas foram prensados em cilindro de vidro, da mesma forma como foram feitos os corpos densos. Os bastões foram secos a 60 °C por um período mínimo de 1 hora e sinterizados a 1000 °C por 5 horas.

2.4. Caracterização dos materiais

2.4.1. Difração de raios X

O método mais conveniente e rápido para identificação de fases cristalinas de sólidos é a difratometria de raios X. O difratograma padrão de uma rede cristalina é característico da substância estudada e a posição das linhas de

difração é independente da presença de outras fases na amostra. A técnica não é destrutiva e apenas pequenas quantidades da amostra em pó são suficientes para a identificação da fase cristalina presente.

O difratograma de raios X fornece o ângulo entre os raios de incidência e o difratado na amostra (2θ) versus a intensidade relativa. Através da equação de Bragg,

$$2d \sin\theta = n\lambda \quad \text{Equação 2.6}$$

onde λ é o comprimento de onda da radiação utilizada, é possível determinar o espaçamento d (Å) entre os planos atômicos da rede cristalina^[33].

A identificação dos materiais foi feita em difratômetro de Raios X Shimadzu, modelo XD-3A, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,5418$ Å), 35 kV, 25 mA e 2 °/min e utilizando como referência primária para a identificação das fases cristalinas as fichas de difração JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards)^[34].

2.4.2. Espectroscopia na região do infravermelho

Espectros na região do infravermelho são gerados pelos diferentes modos de vibração dos grupos funcionais de um composto. Estas vibrações ocorrem em frequências quantizadas e quando luz infravermelha de mesma frequência incide sobre a molécula, ocorre a absorção da energia que é convertida em energia de vibração e aumentando a amplitude destas vibrações. Assim, os espectros são obtidos medindo-se a intensidade relativa da luz transmitida (ou absorvida) em função do número de onda da radiação^[35].

Como a espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica baseada nos modos de vibração de grupos funcionais em amostras, esta técnica foi utilizada para verificar a presença de grupos funcionais estranhos à hidroxiapatita, como a incorporação dos grupos CO_3^{2-} ou HPO_4^{2-} , que aparecem como defeitos em sua rede cristalina e que não são identificáveis pelo método de difração de raios X.

As amostras de HA foram prensadas na forma de pastilhas usando-se KBr de grau espectroscópico e analisadas por espectroscopia na região de infravermelho de 4000 a 400 cm^{-1} , em um Espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR-1600.

2.4.3. Determinação da composição de Ca e de P

A razão molar Ca/P é uma das formas utilizadas para caracterizar a composição dos diferentes fosfatos de cálcio, principalmente das apatitas que podem apresentar diferentes composições. Os dois elementos foram determinados separadamente, utilizando métodos convencionais: titulação complexométrica para o cálcio e espectrofotometria de absorção para o fósforo^[36].

2.4.3.1. Determinação de Ca

Para a determinação do cálcio, o fosfato foi separado das amostras a fim de evitar a sua interferência durante este processo. Para tanto, dissolveu-se $0,0500\text{ g}$ do material em HNO_3 concentrado. Adicionou-se $12,0\text{ mL}$ de uma solução de NH_4NO_3 8% (m/V), aqueceu-se a $50\text{ }^\circ\text{C}$ e adicionou-se molibdato de

amônio 3% (m/V) até que a formação de precipitado amarelo de fosfomolibdato de amônio não fosse mais observada. O precipitado formado foi filtrado e lavado com solução contendo iguais volumes de NH_4NO_3 1% (m/V) e HNO_3 20% (V/V). O precipitado amarelo composto por fosfomolibdato de amônio foi descartado e a solução problema contendo íons cálcio foi diluída a 100,0 mL com água destilada.

Para cada amostra de fosfato de cálcio foram preparadas duas soluções problema e, para cada solução, foram feitas análises em triplicata.

As análises foram feitas titulando-se 10,00 mL da solução problema com ácido etilenodiaminotetraacético (sal dissódico), EDTA 0,01 mol/L, usando-se como indicador o Calcon, mantendo o meio básico (pH 12) com adição de 5,0 mL de NaOH 20% (m/V).

2.4.3.2. Determinação de P

O fosfato foi determinado pelo método do azul de molibdênio, através da medida de intensidade de cor desenvolvida quando o hetero-poliácido formado pela reação entre fosfato e molibdato é tratado com um agente redutor.

As determinações de fosfato foram feitas a partir de uma solução problema de cada material, dissolvendo-se cerca de 0,0200 g de HA em HNO_3 concentrado e diluindo-se a 100,0 mL com água destilada. Para cada amostra foram preparadas três soluções problema e para cada solução foram feitas determinações em triplicata.

Alíquotas de 0,80 mL da solução problema foram adicionadas a 20,0 mL de solução redutora (ácido ascórbico), mantendo-se esta solução em repouso por 48 horas, período após o qual as absorbâncias foram medidas em um

Espectrofotômetro Hitachi U-2000, a um comprimento de onda de 830 nm. Através de uma curva analítica de concentração de P_2O_5 versus absorvância pode-se determinar a concentração de P_2O_5 nas amostras de HA. Nesta análise o cálcio não apresenta interferência.

2.4.4. Solubilidade em meio ácido

A solubilidade dos materiais foi testada em solução de descalcificador, cuja composição é dada na Tabela 2.1. O descalcificador é uma solução comumente utilizada nos tratamentos histológicos de materiais ósseos, tendo a função de complexar o cálcio presente nas amostras. Assim, a fase mineral que concede a rigidez aos ossos é desfeita, possibilitando que o material seja cortado facilmente para o preparo de lâminas para as observações em microscópio óptico. O pH da solução é aproximadamente 2. Além da solubilidade dos fosfatos de cálcio aumentar em meio ácido^[37], a presença de citrato induz a complexação de cálcio na forma de citrato de cálcio solúvel, aumentando ainda mais a solubilidade dos materiais nesta solução. O teste foi feito colocando 10 mg de cada material em 10 mL de solução.

Tabela 2.1. Composição do descalcificador.

Componente	Concentração (mol/L)
Ácido fórmico	9,3
Formaldeído	3,6
Citrato de sódio	0,5

2.4.5. Porosimetria de mercúrio

A porosimetria de mercúrio tem sido muito utilizada para a caracterização da estrutura porosa de cerâmicas. O princípio do método reside no fato do mercúrio ser uma substância que não molha a maioria dos materiais. Conseqüentemente, ele não é adsorvido na superfície destas substâncias, sendo necessária a aplicação de uma pressão para que o mercúrio penetre nas aberturas e rachaduras do material. Esta técnica foi mencionada pela primeira vez em 1842 por Smetana*, mas apenas em 1921 é que Washburn* sugeriu como a distribuição de tamanhos de poros poderia ser obtida a partir de dados de pressão-volume para penetração de mercúrio dentro dos poros do material, através da relação

$$P_d = - 4\gamma \cos\theta \quad \text{Equação 2.7}$$

onde P é a pressão necessária para que o mercúrio penetre em poros de diâmetro d , γ é a tensão superficial do mercúrio (485 dina/cm) e θ o ângulo de contato entre o mercúrio e a amostra (130°). Assim, a baixas pressões, o mercúrio penetra nos poros de maior abertura e, à medida que a pressão aumenta, o líquido começa a penetrar nos poros de diâmetro cada vez menores.

Através dos gráficos de porosimetria é possível determinar a área superficial de uma amostra, por integração da curva de volume de mercúrio penetrado versus pressão, através da equação de Rootare e Prenzlow, que não requer geometria de poro específica^[38]:

* Smetana, J. *Sjlozpyt cili fysika*, Nàkladem Céského Museum, Pragne, p. 11, 1842.

* Washburn, E.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 7, p. 115-116, 1921.

$$S = - \frac{1}{4\gamma \cos \theta} \int_0^V P dV \quad \text{Equação 2.8}$$

A técnica de porosimetria de mercúrio é capaz de medir poros que apresentam diâmetros de 200 μm até 14 nm e áreas superficiais de até 25 cm^2/g têm sido determinadas.

A análise dos tamanhos de poros e de área superficial foram realizadas em um aparelho Poresizer da Micromeritics, modelo 9320.

2.4.6. Adsorção de gás

A segunda técnica empregada para determinar a área superficial das amostras baseia-se no princípio de que, quando um sólido é exposto a um gás, as moléculas desse gás tocam o sólido, podendo residir sobre a sua superfície por um tempo finito. Este fenômeno é conhecido como adsorção.

Quando a adsorção é resultado de forças de interação intermolecular, ela é chamada de adsorção física ou adsorção de Van der Waals. O método para determinação da área superficial utiliza esse tipo de adsorção e é baseada na determinação de uma isoterma de adsorção de gás, ou seja, de um gráfico da quantidade adsorvida V , à temperatura constante, versus a pressão de adsorção P .

Em 1918, Langmuir* propôs a primeira equação teórica relacionando a quantidade de gás adsorvida com a pressão. No entanto, seu modelo era restrito à adsorção em monocamadas. Em 1938, Brunauer, Emmett e Teller* sugeriram

* Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 40, p. 1361, 1918.

* Brunauer, Emmett e Teller. The adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 60, p. 309-316, 1938.

que a adsorção poderia ocorrer em mais de uma camada e propuseram uma generalização da equação de Langmuir para adsorção de gases em multicamadas. Esta generalização ficou conhecida como método BET devido às iniciais dos nomes dos três autores do método. A equação de BET é descrita por:

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m c} + \frac{c - 1}{V_m c} \frac{P}{P_0} \quad \text{Equação 2.9}$$

onde V é o volume de gás adsorvido a uma pressão P , P_0 é a pressão de vapor de saturação, V_m é o volume necessário para formar a monocamada (em cm^3/g de sólido) e c é uma constante que relaciona as forças de adesão e de coesão entre as moléculas da amostra e do gás. O gráfico de $P/V(P_0 - P)$ versus P/P_0 deve fornecer uma linha reta tendo inclinação $(c - 1)/V_m c$ e interceptando o eixo y em $1/V_m c$. A área superficial pode ser determinada através da seguinte equação^[39]:

$$S = 4,35V_m \quad \text{Equação 2.10}$$

A adsorção só ocorre a temperaturas próximas do ponto de ebulição do gás utilizado, sendo que geralmente é usado o nitrogênio no seu ponto de ebulição (77,4 °K) pois este gás tem baixa reatividade em relação à maioria dos materiais e é facilmente obtido. A adsorção de gás é uma técnica sensível a poros de diâmetros variando de 0,2 μm a 0,4 nm.

A área superficial determinada por adsorção de gás através do método BET foi feita utilizando um aparelho Flowsorb II da Micromeritics, modelo 2300.

2.4.7. Microscopia eletrônica de varredura

Esta técnica possibilita a análise de detalhes da estrutura microscópica de superfícies de fratura dos corpos cerâmicos e a grandeza dos microporos presentes.

As amostras foram fixadas em um suporte metálico sobre uma fita de carbono e metalizadas com uma camada de ouro por 400 s. A análise foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura, JEOL-T300 a uma aceleração de 20 mV.

2.4.8. Estudo *in vitro*

Um estudo do comportamento dos materiais em uma solução que simula o fluido biológico foi realizado, através de medidas eletroquímicas de potencial desenvolvido na interface do material com o fluido. Para tanto, foram construídos eletrodos com os fosfatos de cálcio, colocando um corpo cerâmico denso ou pó compactado na extremidade de uma ponteira de micropipeta com abertura de aproximadamente 3 mm de diâmetro. Sobre o corpo cerâmico foi colocada uma pasta de grafite contendo 40 % em massa de parafina derretida e, antes que a parafina endurecesse, foi fixado um fio de níquel-cromo para fazer o contato elétrico. A ponteira foi unida a um tubo de vidro e todas as junções e extremidades do eletrodo foram vedadas com parafilme. Os eletrodos foram mantidos em uma solução de NaH_2PO_4 10^{-4} mol/L com pH entre 5 e 7, por pelo menos 48 horas antes de serem usados^[40].

Foram feitas medidas de potencial de interface na junção cerâmica/solução que simula o fluido biológico, relativas ao potencial apresentado em solução de NaH_2PO_4 10^{-4} mol/L, à duas temperaturas (ambiente e fisiológica), em diferentes valores de pH e ao longo do tempo. Utilizou-se um potenciômetro Corning modelo 350, um eletrodo de referência de calomelano saturado e um eletrodo de vidro combinado para medir o pH, como esquematizado na Figura 2.1.

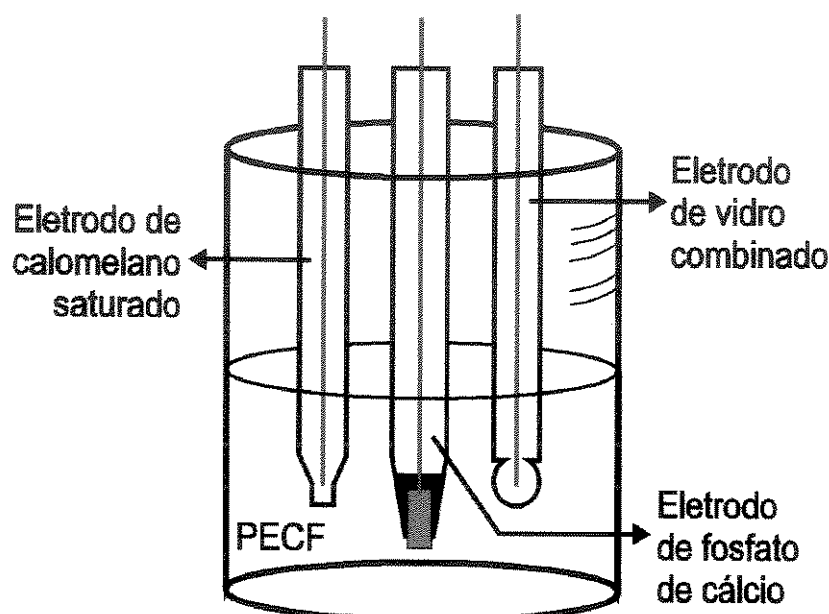


Figura 2.1. Esquema do sistema de eletrodos utilizado para as medidas de potencial de interface.

A solução que simula o fluido biológico ou fluido pseudo extracelular (PECF) é uma solução aquosa composta por NaCl , KCl , NaHCO_3 e KH_2PO_4 em quantidades equivalentes às concentrações desses íons no fluido biológico, como relacionado na Tabela 2.2. A solução recém preparada apresenta pH em torno de 7 e o ajuste a pH inferior foi feito com adição de ácido acético diluído.

Tabela 2.2. Composição química do fluido pseudo extracelular^[41]

Íon	Concentração no meio fisiológico (mmol/L)	Concentração no PECF (mmol/L)
Na ⁺	145	145
K ⁺	5	5
Cl ⁻	113	118
HCO ₃ ⁻	30	30
HPO ₄ ²⁻	1	1

2.4.9. Estudo *in vivo*

Os estudos *in vivo* foram realizados em ratos Wistar machos de 8 semanas de idade e aproximadamente 250 g de peso, fornecidos pelo CEMIB da Unicamp.

Os animais foram anestesiados com solução de Pentobarbital 50 mg/kg, via intraperitoneal, e os fêmures direito e esquerdo de todos os animais foram operados.

Após a tricotomia, foi feita uma incisão na pele, na face medial da coxa do animal. O músculo quadríceps foi separado dos adutores e afastado ântero-lateralmente. Exposta a diáfise do fêmur, foram feitas três incisões no perióstee, acima do disco epifisário de sua extremidade distal, sendo duas transversais com intervalo de aproximadamente 1 cm e uma longitudinal entre as duas. A partir da incisão longitudinal, a cortical do fêmur foi exposta, descolando e afastando-se cuidadosamente o perióstee delimitado entre as incisões transversais. Esse procedimento foi realizado raspando-se cuidadosa e firmemente a superfície do osso com a lâmina do bisturi, para preservar a camada interna osteogênica do perióstee.

Na superfície óssea exposta, a cortical foi desgastada e o osso esponjoso subjacente removido, com o auxílio de uma broca acoplada a um minimotor de baixa rotação e uma cureta, criando-se uma cavidade na diáfise do fêmur. A cavidade foi lavada com solução fisiológica e preenchida com um corpo cerâmico. No fêmur esquerdo foi implantado um corpo cerâmico de HA denso e no direito, um corpo cerâmico poroso.

Após o implante, o periósteo foi reposicionado através da sutura de suas bordas com fio de seda 8.0, de tal forma que as cavidades fossem completamente revestidas por ele. As incisões no músculo e na pele foram fechadas com fio de algodão 4.0.

Foram operados 36 ratos, mantidos em gaiolas com no máximo 4 ratos em cada, tratados com ração balanceada e água *ad libitum*. Grupos de seis animais foram sacrificados por inalação de éter após 1, 2, 4, 8, 16 e 24 semanas.

Após o sacrifício, os fêmures foram removidos, cuidadosamente dissecados para remoção de todo tecido muscular e para observações macro e estereoscópicas do local do implante. Em seguida, as amostras foram fixadas em formaldeído 10 % (V/V), submetidas a uma solução descalcificadora e incluídas em parafina. Foram feitos cortes de 6 a 7 μ m de espessura, no sentido longitudinal ao osso e transversal ao corpo cerâmico. Os cortes foram corados com HE (hematoxilina/eosina), analisados e fotografados em microscópio estereoscópico Carl Zeiss, modelo Citoval 2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Difração de raios X e espectroscopia na região do infravermelho

3.1.1. Caracterização das amostras de HA

As amostras sintetizadas HA-1 e HA-2 na forma de pó apresentaram estrutura típica de hidroxiapatita pouco cristalina, com picos de maior intensidade em $31,77^\circ$, $32,19^\circ$, $32,90^\circ$, relativos aos planos (211), (112) e (300), da rede cristalina de HA, respectivamente, de acordo com a Figura 3.1 (a) e (b).

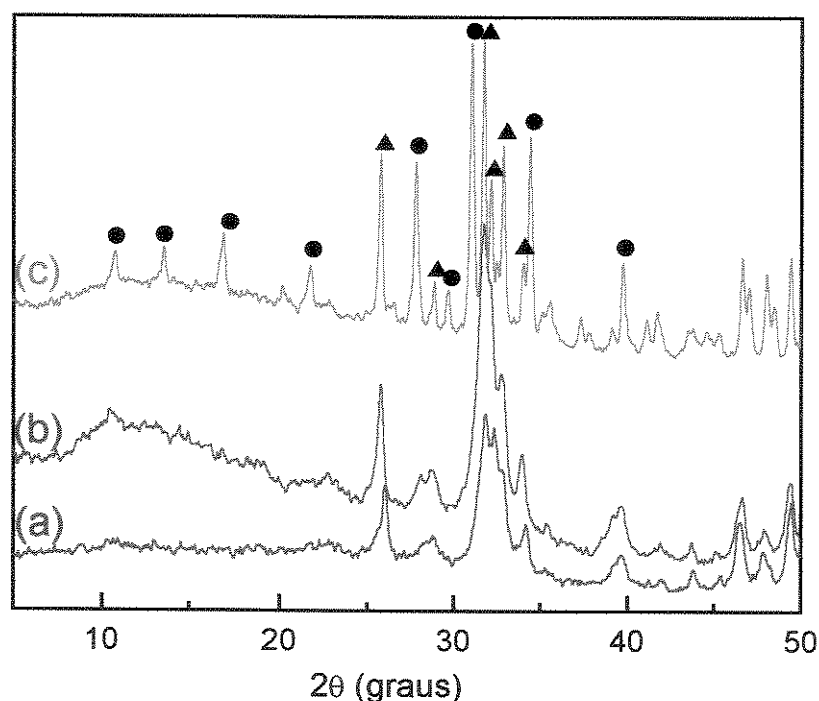
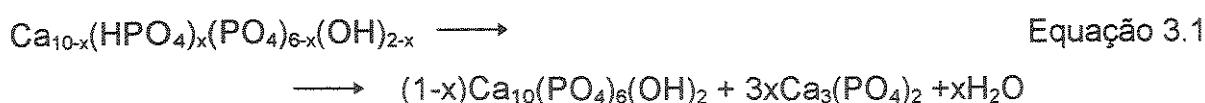


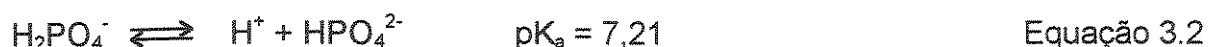
Figura 3.1. Difrátogramas de raios X das amostras de HA. Picos característicos de: ($\blacktriangle$)HA e ($\bullet$) β -TCP. (a) HA-2; (b) HA-1 e (c) HA-1 sinterizada a 1000°C .

O corpo cerâmico de HA sinterizado a 1000 °C apresentou uma mistura de estruturas cristalinas de hidroxiapatita e de fosfato de cálcio na fase β , como pode ser observado na Figura 3.1 (c). Esta mistura de estruturas cristalinas é obtida quando se aquece HA que não apresenta fórmula estequiométrica, isto é, um material que apresenta o grupamento HPO_4^{2-} em sua composição, conduzindo à seguinte reação durante a sinterização^[42].



A incorporação de grupos HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} na rede cristalina de HA pode ser verificada por espectroscopia na região do infravermelho. Em amostras de HA não estequiométricas, bandas de CO_3^{2-} ocorrem nas regiões de 1500-1400 e em 875 cm^{-1} , e as bandas de HPO_4^{2-} ocorrem na região de 862 cm^{-1} ^[43].

Pela Figura 3.2 (a) pode-se observar que HA-1 sintetizado na forma de pó apresenta bandas características de grupos CO_3^{2-} nas regiões de 1458,0, 1416,7 e 872,2 cm^{-1} . A presença de carbonato nessa amostra deve-se provavelmente à incorporação de CO_2 da atmosfera, visto que a reação de síntese foi realizada em sistema aberto. Além disso, a banda a 872,2 cm^{-1} também pode ser resultado da incorporação de íons HPO_4^{2-} que apresentam bandas em região próxima. A incorporação de HPO_4^{2-} pode ser suposta pelas condições de síntese do material. Em pH neutro, a reação de equilíbrio dos íons fosfato predominante é^[32]:



Como a reação foi conduzida a pH aproximadamente 8, ocorre favoravelmente a precipitação de HA com incorporação de HPO_4^{2-} , presença que leva à formação de TCP durante a sinterização do material, de acordo com a Equação 3.1.

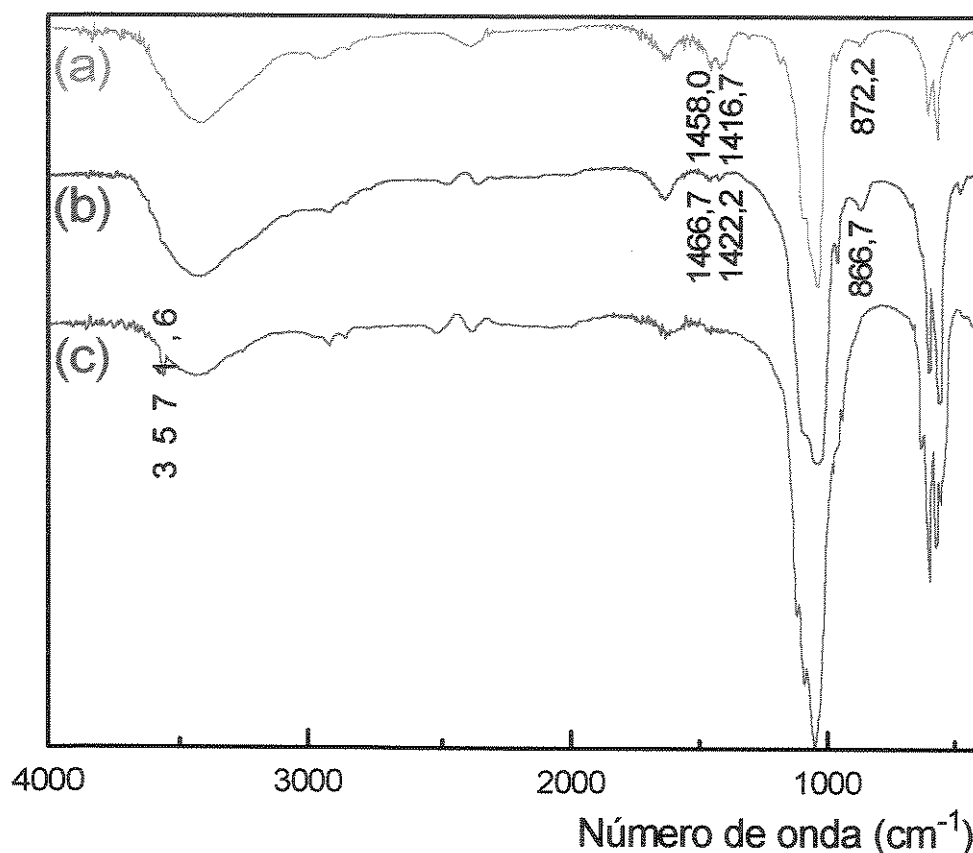


Figura 3.2. Espectros na região do infravermelho das amostras de: (a) HA-1; (b) HA-2 e (c) HA-1 sinterizado a 1000°C.

Na Figura 3.2 (b), referente à HA-2, a presença de carbonato não é muito evidenciada, já que aparecem bandas muito fracas a 1466,7 e 1422,2 cm^{-1} . A incorporação de uma menor quantidade de CO_2 da atmosfera deve-se às condições da síntese que foi realizada em um sistema semi-fechado, diferentemente da síntese de HA-1. Assim, a banda que aparece na região de

866,7 cm^{-1} pode ser designada quase exclusivamente aos íons HPO_4^{2-} , incorporados provavelmente devido ao pH reacional próximo de 6 e pelo excesso do material de partida (Na_2HPO_4) que é composto por estes íons.

Pela Figura 3.2 (c), pode-se observar que o material sinterizado a 1000 $^{\circ}\text{C}$ não apresenta as bandas referentes aos grupos CO_3^{2-} e HPO_4^{2-} , indicando uma completa transformação de HA-1 não estequiométrica em HA estequiométrica e TCP.

Tabela 3.1. Bandas de absorção típicas para HA^[42-46]

Região de absorção (cm^{-1})	Designação
3700-2500	H_2O adsorvida
3570	estiramento O-H de grupo OH^-
1615	H_2O adsorvida
1500-1400	C-O de grupo CO_3^{2-}
1080	deformação antissimétrica de grupo PO_4^{3-}
962	estiramento P-O de grupo PO_4^{3-}
862	estiramento P-O(H) em HPO_4^{2-}
875	C-O em grupo CO_3^{2-}
630	deformação O-H de grupo OH^-
600, 570, 470	deformação antissimétrica P-O de grupo PO_4^{3-}

3.1.2. Caracterização das amostras de TCP e CPP^[34]

O difratograma de TCP apresentado na Figura 3.3 (a) revelou a presença de picos de maior intensidade em 31,02°, 34,37° e 27,77°, característicos de fosfato de cálcio na fase β pouco cristalino e referente aos planos (217), (220) e (214). Além desses picos, pode-se observar a presença de picos característicos

de CPP na fase β em $29,55^\circ$, $27,68^\circ$ e $28,87^\circ$, referentes aos planos (008), (202) e (203).

O difratograma de CPP da Figura 3.3 (b) apresenta picos característicos apenas deste composto na fase β .

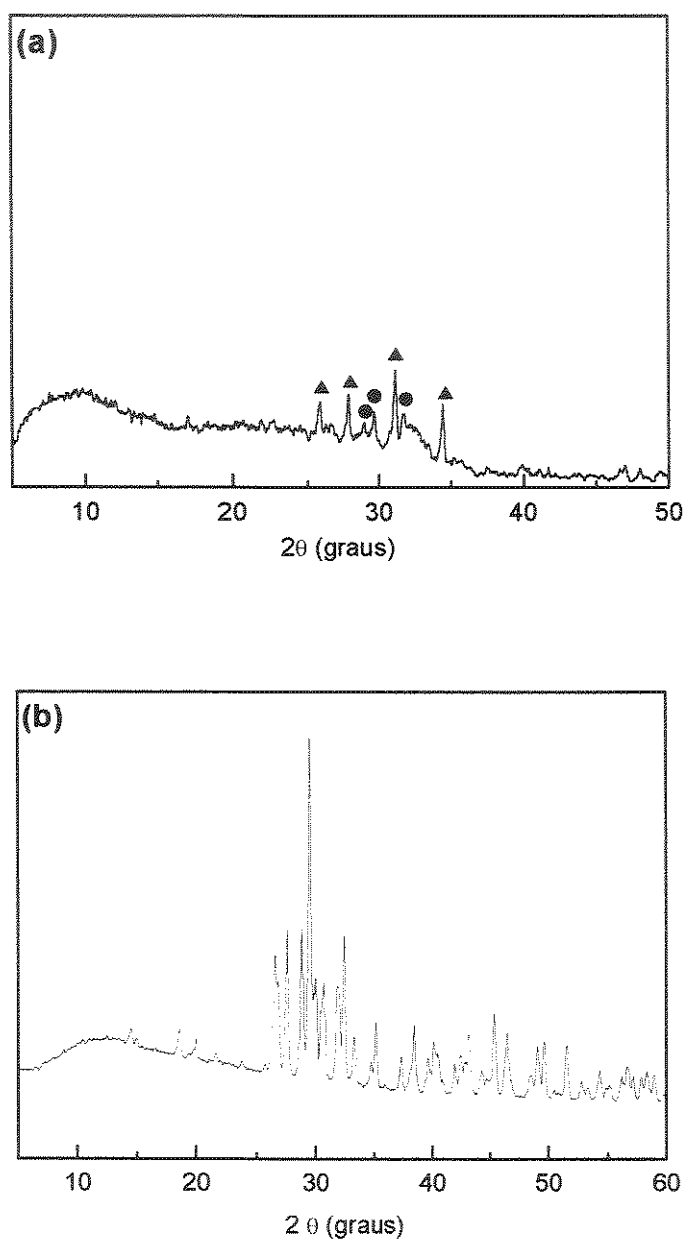


Figura 3.3: Difratogramas de raios X. Picos característicos de: ($\blacktriangle$) β -TCP e ($\bullet$) β -CPP. (a) TCP e (b) CPP.

3.2. Determinação da composição de Ca e P

A determinação da composição de Ca e P para os fosfatos de cálcio estudados resultaram todos em valores próximos aos esperados mas ligeiramente superiores para os valores de Ca e inferiores para os de P, o que fez com que os números calculados para a razão Ca/P fossem superiores aos esperados. Por isso, optou-se por reportar não apenas os resultados em termos de razão Ca/P, mas também em termos de percentual em massa nas amostras, como apresentado nas Tabelas 3.2 e 3.3.

Tabela 3.2. Composição de Ca e P em termos de % em massa

Composto	% Ca teórico	% Ca experimental	% P teórico	% P experimental
HA-1, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	39,9	$41,1 \pm 0,1$	18,5	$16,5 \pm 0,3$
HA-2, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	39,9	$38,0 \pm 0,1$	18,5	$17,3 \pm 0,3$
HA-1 sinterizado a 1000 °C, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	39,9	$41,8 \pm 0,3$	18,5	$18,2 \pm 0,4$
TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	38,8	$37,4 \pm 0,4$	20,0	$18,0 \pm 0,4$
CPP, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	31,5	$36,2 \pm 0,4$	24,4	$22,8 \pm 0,9$

Tabela 3.3. Razão molar Ca/P

Composto	Ca/P teórico	Ca/P experimental
HA-1	1,67	$1,910 \pm 0,009$
HA-2	1,67	$1,650 \pm 0,008$
HA-1 sinterizado a 1000 °C	1,67	$1,730 \pm 0,020$
TCP	1,5	$1,580 \pm 0,001$
CPP	1,0	$1,200 \pm 0,003$

Quando ocorre uma substituição de um grupo fosfato da HA estequiométrica por um grupo carbonato $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_5(\text{CO}_3)(\text{OH})_2]$, a razão molar Ca/P sobe de 1,67 para 2,00. Caso ocorra deficiência de cálcio, seja por livre vacância ou por substituição de Ca^{2+} por outro íon divalente, valores entre 1,67 e 2,00 podem ser encontrados.

HA-1, conforme análise por espectroscopia na região do infravermelho (Seção 3.1), revelou a presença de íons CO_3^{2-} , os quais elevaram o valor da razão Ca/P desse composto. A presença de íons HPO_4^{2-} também pode influenciar a razão, provocando a deficiência dos íons Ca^{2+} [11,42], tendo abaixado a razão Ca/P de 2,00 para 1,91. Quando esse material foi sinterizado a 1000 °C, o resultado foi um composto com razão molar Ca/P 1,73. Esse resultado, maior que o teórico, pode sugerir a presença de CaO na amostra, que pode ter se formado durante a sinterização do material, de acordo com a Equação genérica 3.3^[45]:



No entanto, a presença de CaO não pode ser determinada por difração de raios X ou por espectroscopia na região do infravermelho. Sua presença pode ser suposta apenas com base na composição do material de partida, HA-1, que apresenta a incorporação de grupos CO_3^{2-} que, após aquecimento, são convertidos a CaO, aumentando a quantidade de Ca.

No caso de HA-2, como ocorre apenas a presença de HPO_4^{2-} indicando uma deficiência em Ca, sua razão Ca/P ficou pouco abaixo do valor teórico.

3.3. Solubilidade em meio ácido

Os fosfatos de cálcio apresentam comportamento diferenciado quando são expostos ao meio fisiológico. Entre essas diferenças de comportamento, uma das principais é a solubilidade. Esperava-se a seguinte ordem de solubilidade dos compostos: TCP ($K_{ps} 2,07 \cdot 10^{-33}$), HA ($K_{ps} 10^{-113}$) e CPP (insolúvel)^[29]. Observou-se que HA dissolveu completamente e de imediato na solução de descalcificador e CPP não sofreu processo de dissolução. TCP, ao contrário do que se esperava, dissolveu apenas parcialmente. Este resultado pode estar associado à formação de CPP durante a calcinação de TCP, conforme verificado no difratograma da Figura 3.3 (a). Como CPP é um composto insolúvel, a fração deste composto presente na amostra de TCP permaneceria sem se dissolver, resultando no corpo de fundo observado na solução.

3.4. Corpos cerâmicos

Os corpos cerâmicos de HA densos apresentaram uma densificação do material após o processo de sinterização, resultando em uma diminuição média no seu diâmetro de 3,0 para 2,3 mm. Além disso, observação da superfície de uma fratura em microscópio eletrônico de varredura, mostrou que a densificação do corpo foi maior na superfície que em seu interior, formando uma casca externa mais compacta com aproximadamente 1 μm de espessura, como pode ser verificado na Figura 3.4 (a).

Os corpos cerâmicos densos de CPP também sofreram efeito de diminuição do seu diâmetro durante a sinterização, tendo sido reduzidos de 3,0 para 2,7 mm. Ao contrário da sinterização do corpo de HA, CPP apresentou uma sinterização homogênea, não sendo observada a formação de casca compacta.

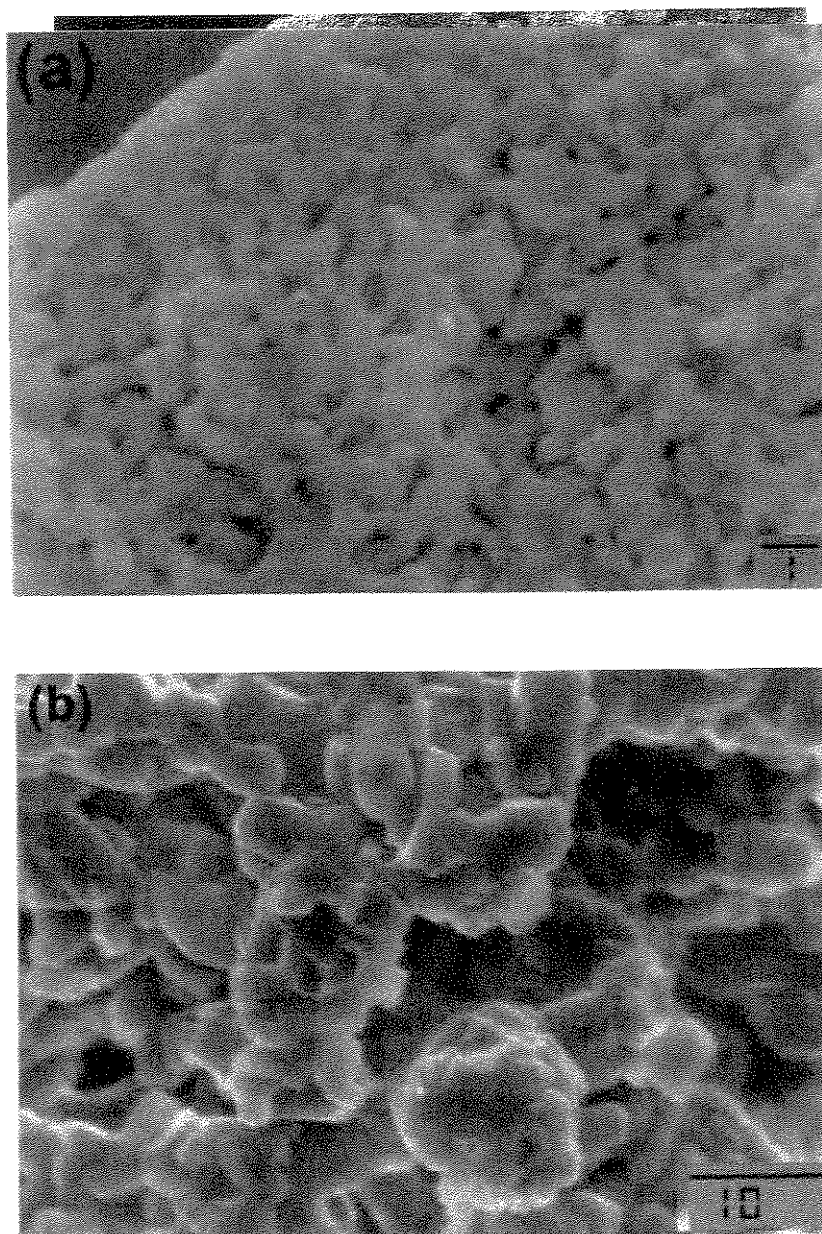


Figura 3.4.: Micrografias: (a) do corpo cerâmico de HA denso, mostrando a superfície mais compacta e (b) do corpo cerâmico de CPP denso.

Os corpos cerâmicos densos de HA foram caracterizados segundo suas áreas superficiais, tanto pelo método de porosimetria de mercúrio quanto pela técnica de BET. Os resultados obtidos pelos dois métodos apresentaram áreas superficiais diferentes, de acordo com a Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Medidas de área superficial para corpos cerâmicos densos de HA.

Método	Área superficial (m ² /g)
Porosimetria de mercúrio	8,67
Adsorção de gás	2,59

A casca compacta que aparece na Figura 3.4 (a) atua como se fosse formada por poros do tipo “ink-bottle”, ou seja, poros de abertura estreita e corpo largo. No método da porosimetria, o mercúrio começa a invadir o corpo cerâmico apenas quando é aplicada uma pressão suficientemente grande para que ele penetre nos poros menores da casca, considerando todo o interior do corpo como se fosse formado por longos canais de diâmetro igual ao dos poros dessa casca. Com isso, a área superficial determinada por esse método é maior que seu valor real^[47]. No método da adsorção de gás, poros do tipo “ink-bottle” não interferem na medida da área superficial já que o nitrogênio é adsorvido de forma homogênea por toda a superfície do corpo. Pode-se considerar, portanto, que a área superficial dos corpos cerâmicos de HA devem equivaler a 2,59 m²/g. Em termos da distribuição dos poros dos corpos cerâmicos densos, a porosimetria de mercúrio nos fornece uma indicação sobre a dimensão dos poros da casca

compacta, que apresenta microporos da ordem de $0,2\ \mu\text{m}$ de diâmetro, de acordo com o porograma da Figura 3.5 (a).

Nos porogramas abaixo, a curva em vermelho representa o volume total de mercúrio que penetrou em toda a amostra a cada diâmetro de poro, ou seja, a cada pressão aplicada e a curva em azul representa o volume de mercúrio que penetrou na amostra em um dado valor de diâmetro de poro ou de pressão aplicada.

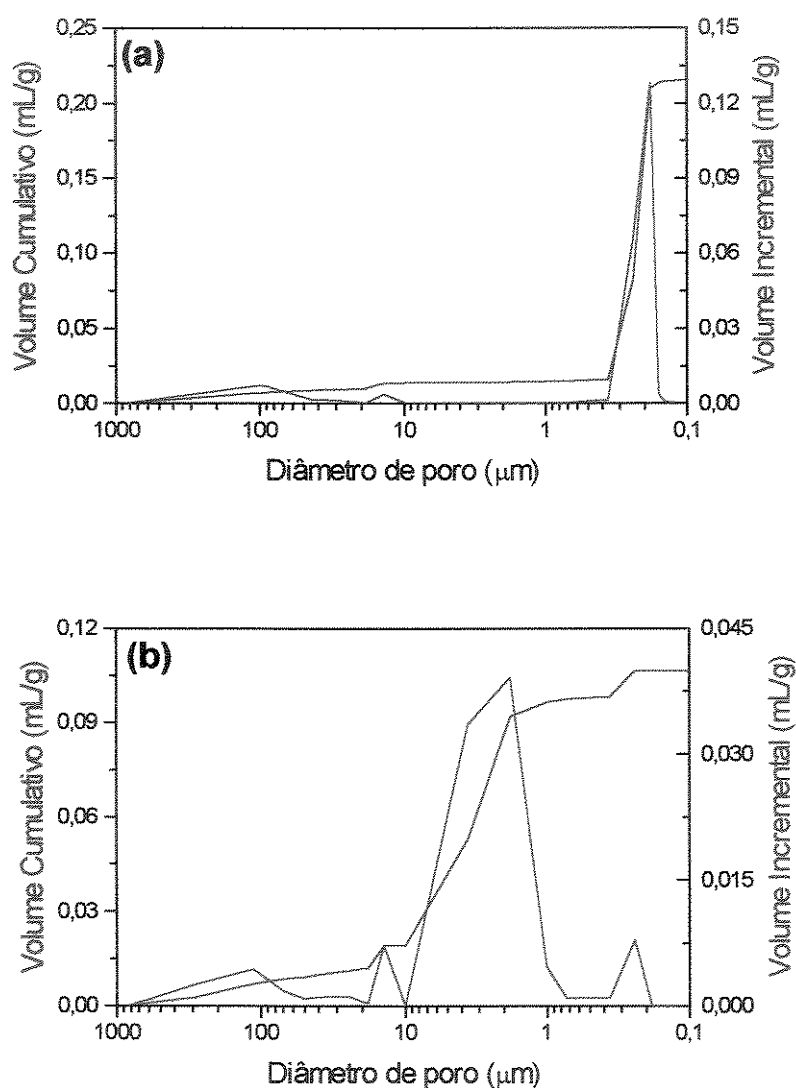


Figura 3.5. Porogramas dos corpos cerâmicos densos de: (a) HA e (b) CPP.

Os corpos densos de CPP analisados por porosimetria de mercúrio apresentaram área superficial de $9,84 \text{ m}^2/\text{g}$ e poros da ordem de $3 \text{ }\mu\text{m}$, como mostrado no porograma da Figura 3.5 (b). Este valor de poros é concordante com o fato de que os corpos densos de CPP sofreram menor efeito de sinterização que os corpos de HA. Como não houve a formação da casca compacta na superfície dos corpos de CPP seu porograma apresentou uma faixa larga de tamanhos de poros entre 1 a $10 \text{ }\mu\text{m}$, ao contrário do porograma de HA que apresentou uma faixa estreita de tamanho de poros, apenas em torno de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro, referentes à casca do bastão.

Esta diferença de comportamento durante a sinterização pode ser explicada pelo ponto de fusão dos dois compostos. HA possui ponto de fusão abaixo de $1100 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura na qual começa a se decompor. Durante o processo de sinterização a superfície do corpo começaria a fundir, formando a casca compacta. Já o CPP tem ponto de fusão $1230 \text{ }^\circ\text{C}$, mantendo sua estrutura durante a sinterização^[48].

Para obter corpos cerâmicos porosos de HA com diâmetro de poros na faixa de $100 \text{ }\mu\text{m}$ foram feitas várias tentativas. Todas resultaram em corpos mais porosos e menos resistentes que os corpos densos. Os métodos utilizados e as características dos poros estão relacionados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Características dos corpos porosos obtidos por vários métodos

Tentativa	Método (mistura de HA em pó com)	Características do corpo
a	Acrílico e solução de PVA	Poros com a forma de canais da ordem de 10 μm de diâmetro
b	Algodão e solução de PVA	Poros com a forma de canais da ordem de 10 μm de diâmetro
c	Esponja de poliuretano e solução de PVA	Estrutura como negativo da esponja, com poros da ordem de 10 μm
d	Solução de PVA saturada de sacarose	Poros da ordem de 10 μm
e	50% de sacarose e solução de PVA	Poros abaixo de 10 μm
f	50% de sacarose e solução de PVA saturada de sacarose	Material colapsado na forma de grãos
g	Grânulos da tentativa f com 25% de sacarose e solução de PVA saturada de sacarose	Poros entre 20 e 100 μm

Quando partículas esféricas são colocadas lado a lado, forma-se entre elas espaços livres e interligados. Quanto maior o tamanho das partículas, maior o espaço entre elas. Assim, quando a tentativa f resultou em grãos colapsados, surgiu a idéia de separar os grãos de maior dimensão ($> 0,053 \text{ mm}$), aglutiná-los com PVA e sinterizá-los para que fossem formados espaços entre eles. Assim, a tentativa g resultou em grãos provenientes de uma primeira sinterização (tentativa f), apresentando microporos na faixa de $0,4 \mu\text{m}$ de diâmetro, que foram aglutinados e sinterizados novamente, formando macroporos na faixa de $100 \mu\text{m}$ entre eles, como pode ser observado pelas Figuras 3.6 (a) e (b). A área superficial dos corpos cerâmicos porosos determinada por porosimetria de mercúrio foi de $12,71 \text{ m}^2/\text{g}$.

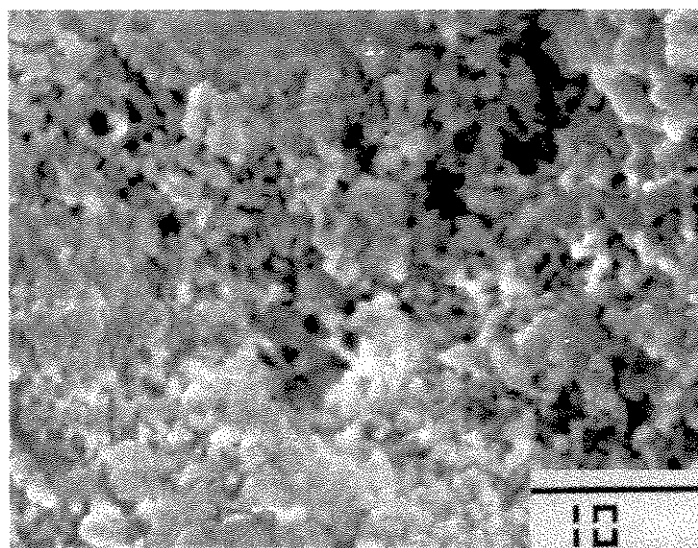
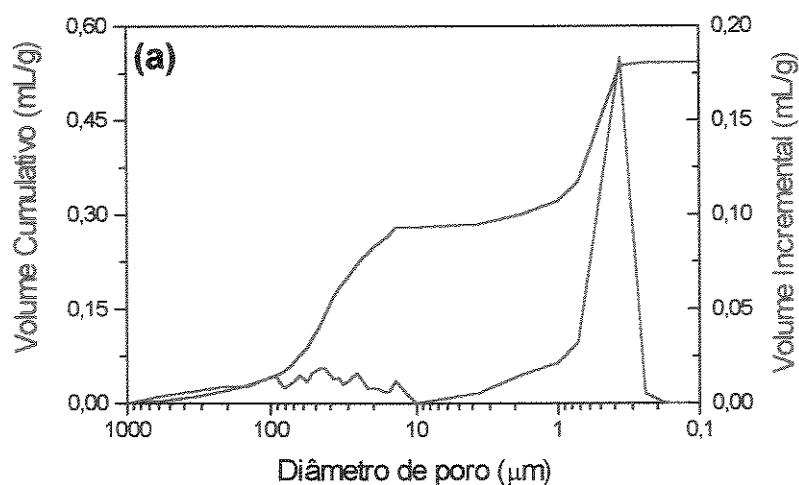


Figura 3.6: (a) Porograma e (b) micrografia dos corpos cerâmicos porosos de HA.

A grande quantidade de poros diminuiu sensivelmente a resistência mecânica da cerâmica, sendo possível no entanto manipular o material sem que ele se desagregasse.

Pó de TCP foi analisado por adsorção de gás apresentando área superficial de $7,61 \text{ m}^2/\text{g}$.

3.5. Medidas de potencial de interface

Para tentar caracterizar o que acontece na interface do biomaterial com o fluido biológico foram feitas medidas de potencial de interface, em diferentes valores de pH. Os valores foram escolhidos levando-se em consideração que toda vez que ocorre uma lesão no corpo ou um processo inflamatório o pH do meio fisiológico sofre um abaixamento de 7,2 até aproximadamente 5,2^[2]. Com base nesta informação, as medidas de potencial de interface foram realizadas em pH 5, 6 e 7 para avaliar o que ocorre com os biomateriais em pH biológico.

Antes de serem utilizados, os eletrodos foram deixados em repouso por um período mínimo de 48 horas em uma solução de NaH_2PO_4 10^{-4} mol/L. Este procedimento foi adotado para garantir uma completa permeabilização do corpo cerâmico pela solução de fosfato, de modo a permitir a estabilidade dos eletrodos. Além disso, a concentração da solução de fosfato foi escolhida de acordo com os resultados obtidos em trabalho anterior, no qual verificou-se que eletrodos de HA apresentam uma faixa de resposta linear do potencial elétrico versus $-\log[\text{fosfato}]$, em concentrações que variam entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-1}$ mol/L e em pH igual a 5^[40]. Por isso, utilizou-se uma solução com concentração e pH dentro dessa faixa determinada para manter os eletrodos.

Medidas de potencial elétrico são possíveis devido à formação de uma camada elétrica na interface entre o eletrodo e a solução, resultante da dissolução ou absorção de íons Ca^{2+} ou PO_4^{3-} pelo material. Em termos gerais, essa camada é formada por cargas de sinais opostos resultantes da troca dos íons entre a cerâmica e a solução, o que produz um gradiente de potencial na

interface e que foi denominada de dupla camada elétrica. Este potencial é medido em relação a um eletrodo de referência (calomelano), resultando no potencial relativo de interface.

Foram montados gráficos da diferença de potencial de interface medido em PECF e em NaH_2PO_4 versus o tempo em que os eletrodos permaneceram imersos em solução, para todos os materiais a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) e fisiológica (37 °C) e nos diferentes valores de pH. Todos os gráficos são apresentados na mesma escala de potencial para possibilitar comparações entre eles.

3.5.1. Eletrodos de HA

Os eletrodos de HA foram confeccionados usando corpos cerâmicos densos sinterizados a 1000 °C por 3 horas. As medidas de potencial a temperatura ambiente foram feitas usando 3 eletrodos construídos a partir de um único corpo cerâmico de aproximadamente 2 cm de altura que foi quebrado em três partes. O uso de um único bastão para confeccionar os eletrodos serviu para verificar a reprodutibilidade das medidas, de modo a evitar diferenças de preparo e de sinterização do material.

A Figura 3.7 mostra a evolução do potencial relativo de interface dos eletrodos E1, E2 e E3 em função do tempo, para valores de pH 5, 6 e 7.

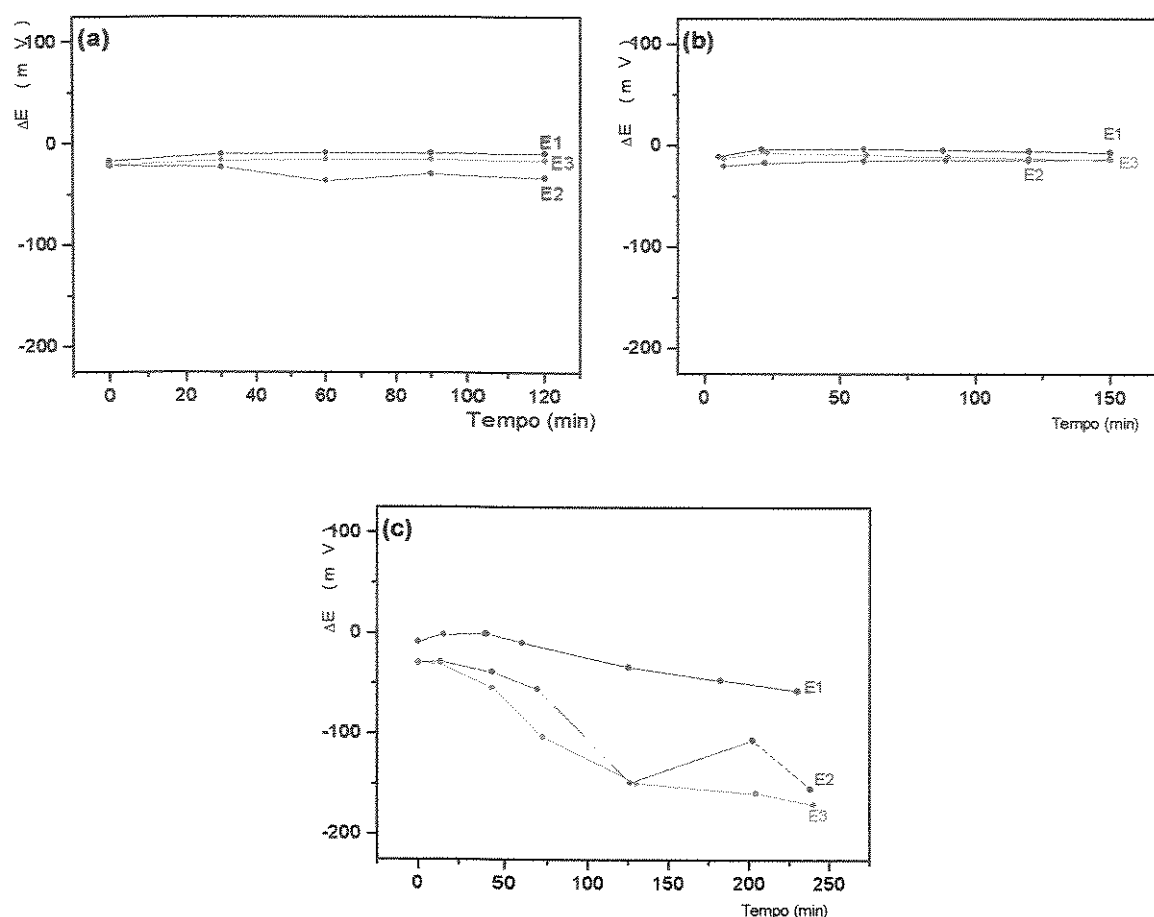


Figura 3.7. Gráficos de potencial relativo para eletrodos de HA em PECF à 25 °C e pH 5 (a), 6 (b) e 7 (c).

Pode-se observar que em pH 5 e 6 os eletrodos de HA apresentam pouca variação de potencial ao longo do tempo, enquanto que em pH 7 há uma variação de potencial diferenciada para cada eletrodo. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que a pH baixo HA começa a sofrer um processo de dissolução, fazendo com que o equilíbrio iônico de Ca^{+2} e PO_4^{3-} na dupla camada elétrica seja rapidamente alcançado em pH 5 e 6. Já em pH 7, como o processo de dissolução é pouco significativo, o equilíbrio demora mais para se estabelecer e isto ocorre em tempos diferentes para cada eletrodo.

Na Figura 3.8 podemos observar medidas de potencial de interface para cinco eletrodos de HA na forma de corpos cerâmicos densos (Seção 2.2) em PECF à temperatura fisiológica. Neste caso, é possível verificar que a variação de potencial em todos os valores de pH foi pequena, inclusive em pH 7.

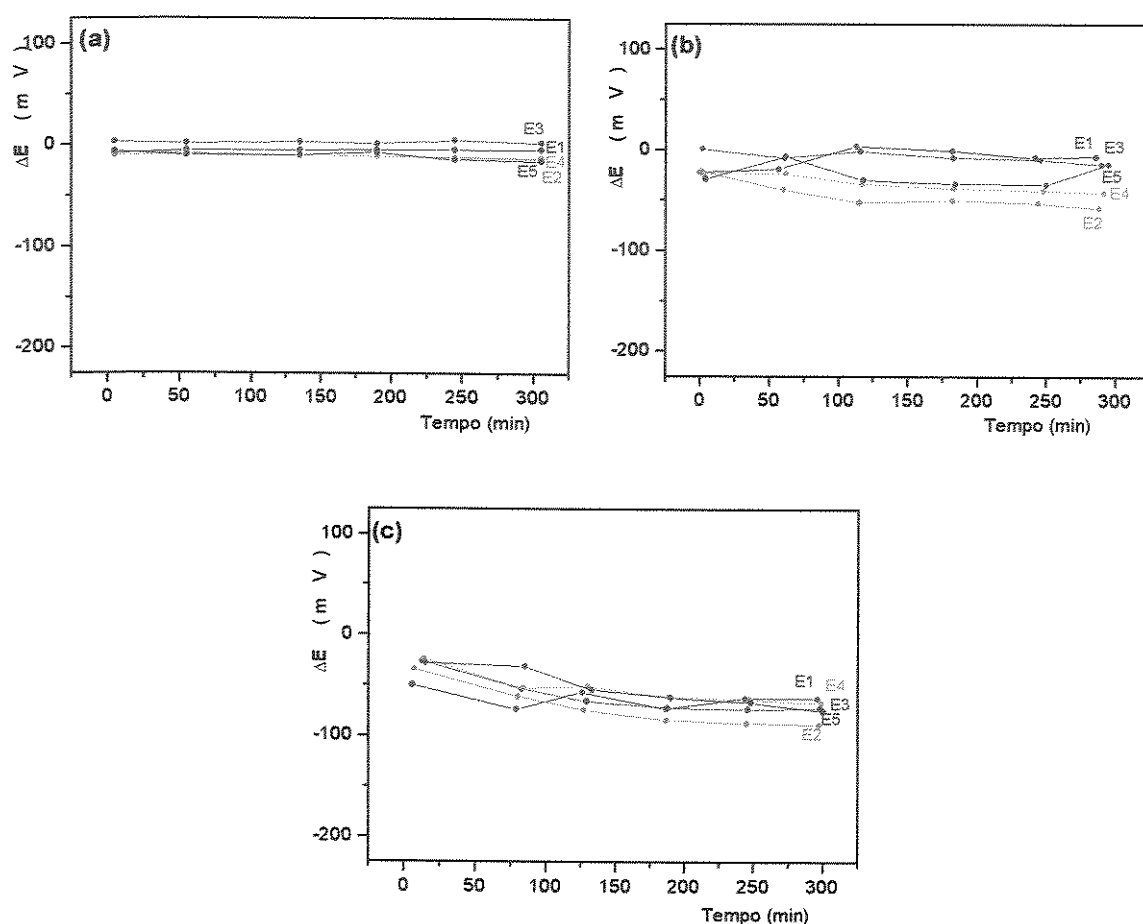


Figura 3.8. Gráficos de potencial relativo para eletrodos de HA em PECF à 37 °C e pH 5 (a), 6 (b) e 7 (c).

Na temperatura fisiológica, a solubilidade da HA aumenta, fazendo com que mesmo em pH 7 ocorra dissolução, levando a uma cinética de equilíbrio de potencial de interface crescente em valores de pH menores e a temperaturas

próximas à fisiológica. Estes resultados indicam que HA participa do equilíbrio cálcio-fósforo com o fluido biológico, de modo a atingir esse equilíbrio mais rapidamente quando sua solubilidade é maior, isto é, a pH baixo e temperatura fisiológica. Estes resultados podem fornecer uma indicação sobre o que ocorre com a fase mineral do osso e que favorece o processo de reparação de um trauma, fazendo com que o equilíbrio de troca iônica entre o material e o fluido ocorra mais rapidamente.

3.5.2. Eletrodos de TCP

Foram confeccionados cinco eletrodos a partir de pó de TCP, mas apenas três deles puderam ser utilizados. Como o material estava na forma de pó, mesmo após compactação, ele se desagregava lentamente quando entrava em contato com o líquido, fazendo com que as medidas de potencial não pudessem ser registradas, devido à permeação do líquido através do material comprometendo o contato metálico.

Os gráficos de potencial para estes eletrodos são mostrados na Figura 3.9.

Assim como no caso da HA, os eletrodos de TCP apresentaram pouca variação de potencial em pH 5. Já em pH 6, os eletrodos apresentaram uma variação de potencial, indicando uma cinética mais lenta. Em pH 7, assim como no caso da HA, os eletrodos apresentaram uma variação diferenciada de potencial, novamente indicando que neste pH a cinética para atingir o equilíbrio de potencial de interface é mais lenta e varia para cada eletrodo.

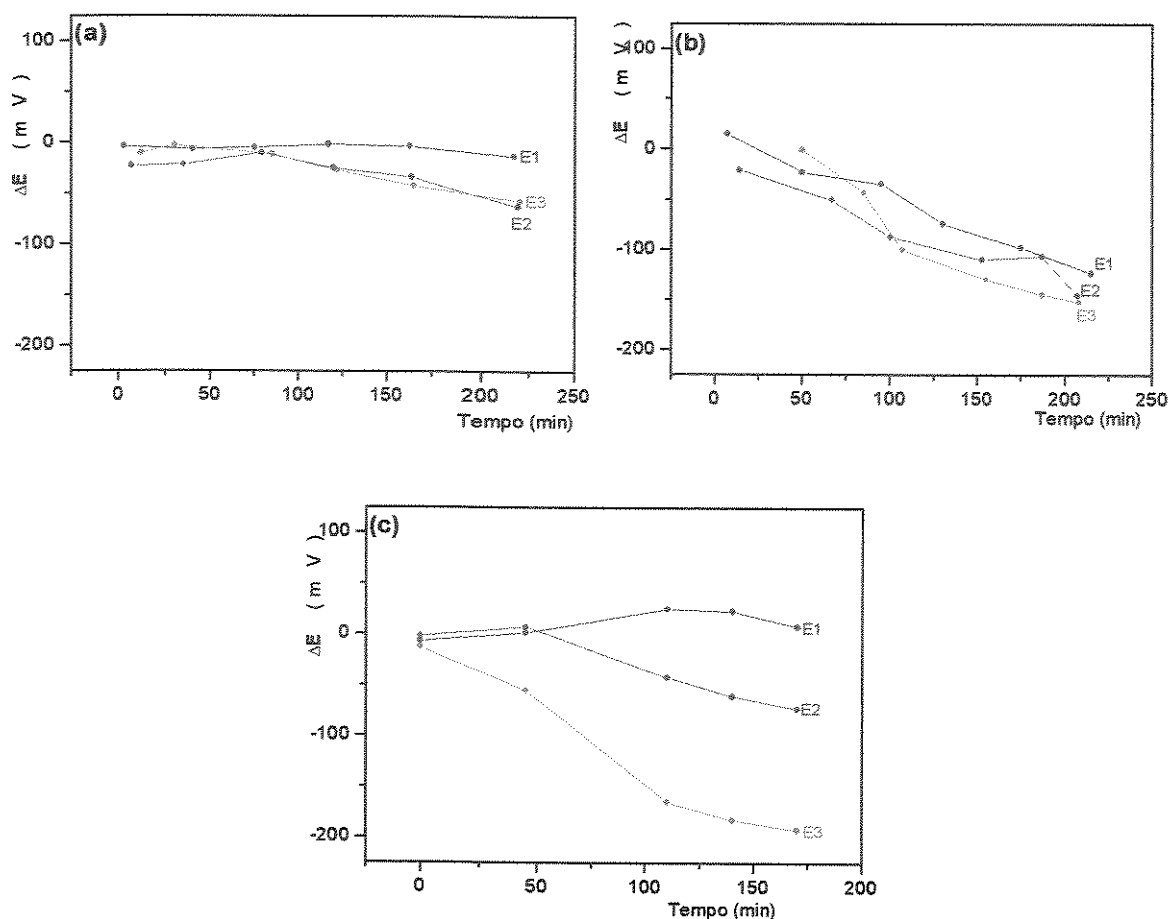


Figura 3.9. Gráficos de potencial relativo de eletrodos de TCP em PECF à 25 °C e pH 5 (a), 6 (b) e 7 (c).

Para as medidas em temperatura fisiológica foram montados cinco eletrodos a partir de pó de TCP compactado, os quais apresentaram variações de potencial de interface de acordo com a Figura 3.10.

Nesta temperatura, todos os eletrodos apresentaram uma variação menor de potencial em todos os valores de pH, assim como foi observado para o caso dos eletrodos de HA.

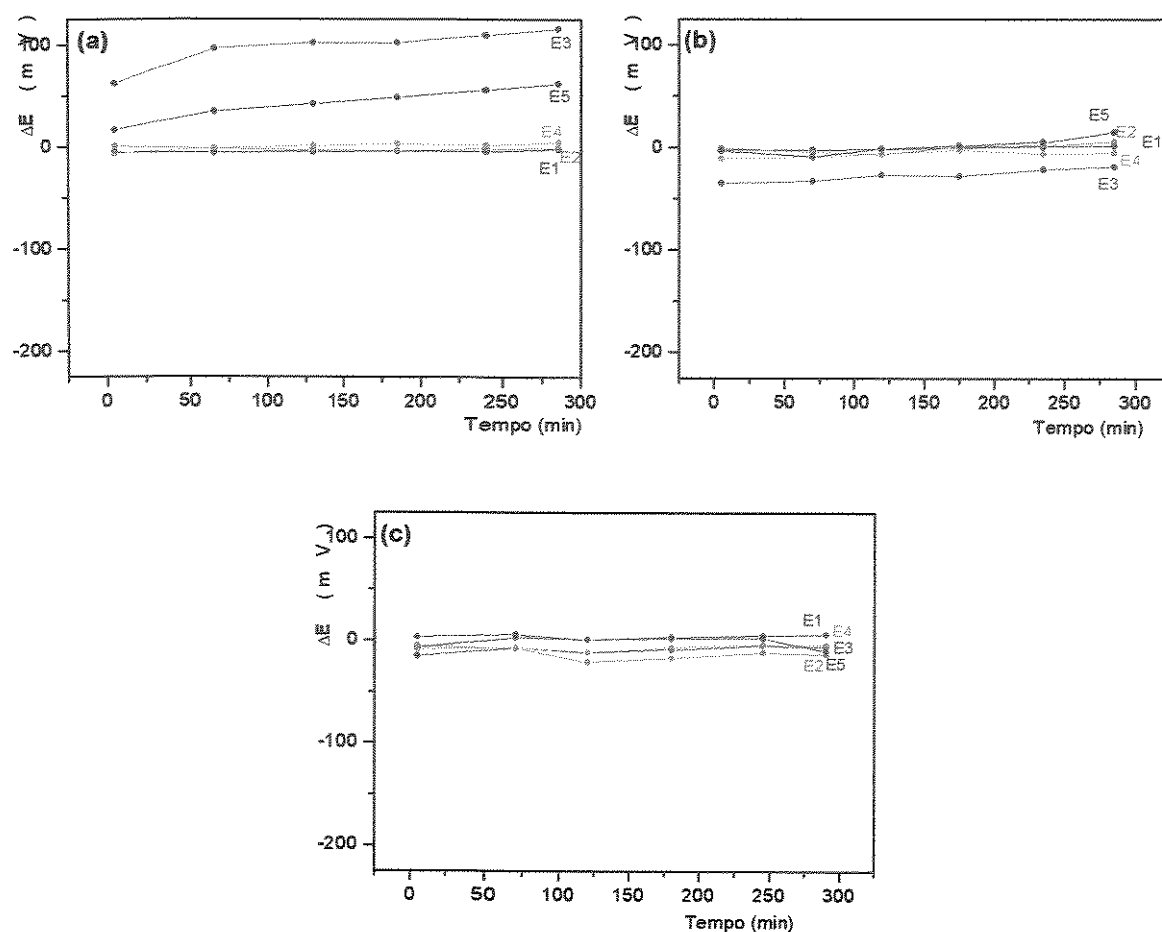


Figura 3.10. Gráficos de potencial relativo de eletrodos de TCP em PECF à 37 °C e pH 5 (a), 6 (b) e 7 (c).

À temperatura ambiente, o processo de dissolução do material é mais pronunciado em pH baixo, fazendo com que o equilíbrio cálcio-fósforo entre o material e o fluido seja estabelecido mais rapidamente que em pH superior. Quando a temperatura aumenta para 37 °C, o processo de dissolução é intensificado, fazendo com que o equilíbrio seja estabelecido com maior rapidez em todos os valores de pH e tornando pequena a variação de potencial de interface do material com o fluido.

Apesar do TCP ser um material reabsorvível, ou seja, mais solúvel que a HA, as respostas de potencial de interface para os dois casos foram semelhantes. Se tomarmos o produto de solubilidade e a composição dos materiais e considerarmos soluções saturadas de cada um, teremos uma concentração de cálcio semelhante para os dois. Assim, podemos dizer que a quantidade de íons em ambos os casos é similar, resultando em uma dupla camada elétrica que atua basicamente da mesma forma.

3.5.3. Eletrodos de CPP

Foram feitos cinco eletrodos para as medidas em temperatura ambiente e cinco para as medidas em temperatura fisiológica, a partir de corpos cerâmicos densos de CPP (Seção 2.2).

As medidas em temperatura ambiente foram realizadas apenas em pH 7 e 8, como mostra a Figura 3.11. Nestes valores de pH não se observou a variação de potencial de interface como havia sido notado nos casos de HA e TCP. No caso de CPP não se pode falar em processo de dissolução, já que este material apresentou-se insolúvel (Seção 3.3).

Em trabalho anterior, verificou-se que eletrodos de CPP não respondiam à presença de íons cálcio ou fosfato em solução^[40], podendo-se concluir disso que CPP não apresenta variação de potencial pela simples razão de não responder aos íons em solução, em discordância da ausência de variação de potencial no caso de HA e TCP, relacionada com a rapidez em atingir a condição de equilíbrio de potencial de interface.

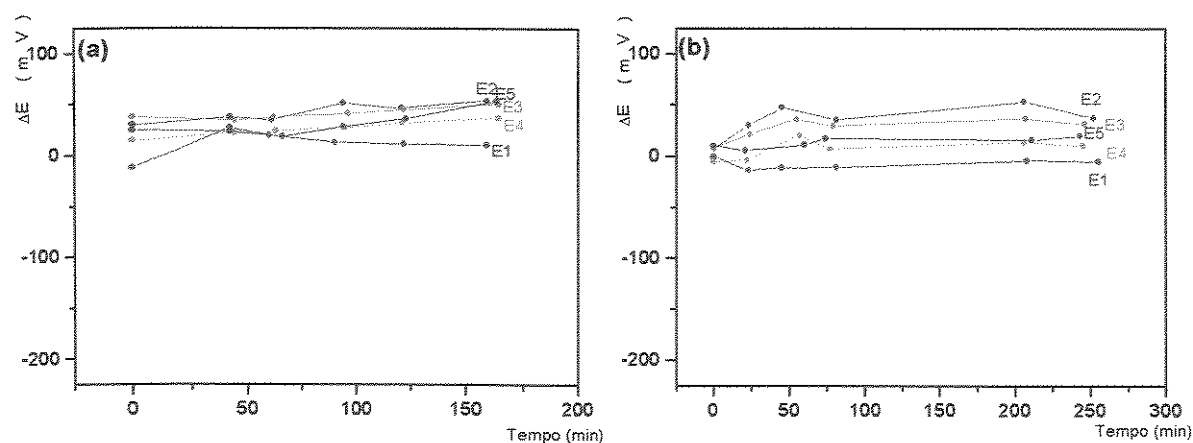


Figura 3.11. Gráficos de potencial relativo de eletrodos de CPP em PECF à 25 °C e pH 7 (a) e 8 (b).

Pode-se observar na Figura 3.12 que mesmo em temperatura fisiológica ocorre pouca variação de potencial, ainda referente à inércia dos eletrodos de CPP frente aos íons cálcio e fosfato.

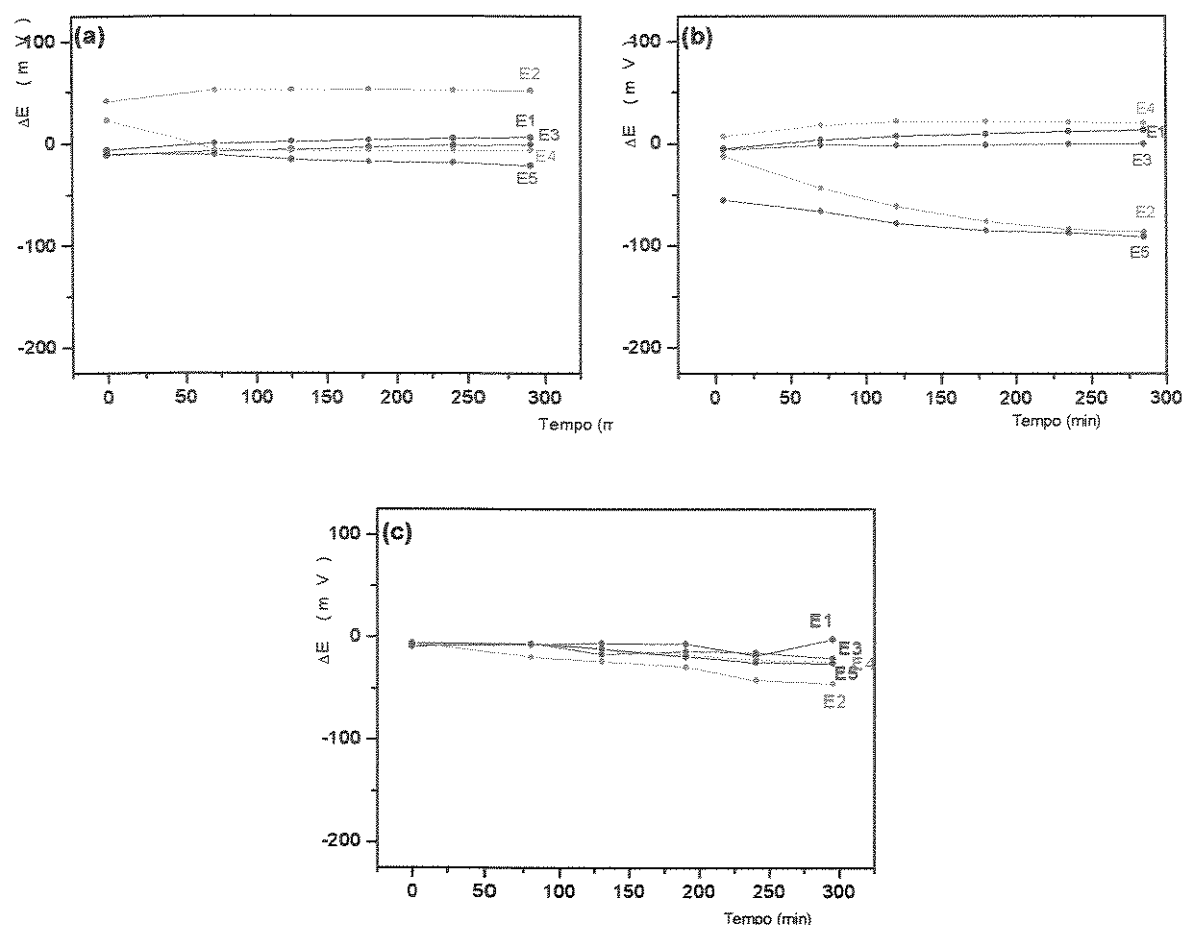


Figura 3.12. Gráficos de potencial relativo de eletrodos de CPP em PECF à 37 °C e pH 5 (a), 6 (b) e 7 (c).

Acredita-se que estas medidas de potencial de interface estejam diretamente relacionadas com os processos de recuperação de traumas ósseos e com o sucesso de implantes de fosfatos de cálcio. No entanto, a dificuldade em se interpretar os resultados obtidos em termos do que ocorre com a dupla camada elétrica e o efeito que ela pode causar em um organismo vivo tornam necessários estudos complementares para sua total compreensão e utilização de forma devida.

3.6. Comportamento *in vivo*

O processo de recuperação de uma ferida ocorre de maneira similar entre os mamíferos e representa a reconstrução da estrutura e da função das partes afetadas. Assim, estudos *in vivo* para determinar a eficiência de um biomaterial podem ser realizados em diversos tipos de animais: ratos, coelhos, cachorros, carneiros, macacos e em seres humanos, tendo a função de estudar e investigar as propriedades de biocompatibilidade de um determinado material utilizado como implante. Apesar do sistema biológico de cada animal responder à presença de um corpo estranho de diferentes formas e em diferentes velocidades^[16], é possível determinar a versatilidade dos materiais e ainda tentar compreender os processos que ocorrem na interface do material com os tecidos vivos.

Observação macroscópica dos fêmures de ratos implantados revelou um processo natural de formação de calo ósseo nos fêmures retirados após uma e duas semanas de implante. Após quatro semanas, eles já não apresentavam o calo ósseo, indicando que a sua modelagem ocorreu entre duas e quatro semanas, como em um processo normal de regeneração.

A formação do calo apresentou-se mais desenvolvida no fêmur implantado com material denso que no implantado com material poroso. Como a formação de calo é um processo que ocorre tanto na parte interna quanto externa do osso, no caso do material poroso, o calo interno cresceu através dos poros da cerâmica, enquanto no material denso a falta de espaço interno fez com que o calo crescesse além de suas dimensões normais, como pode ser visto na Figura 3.13.

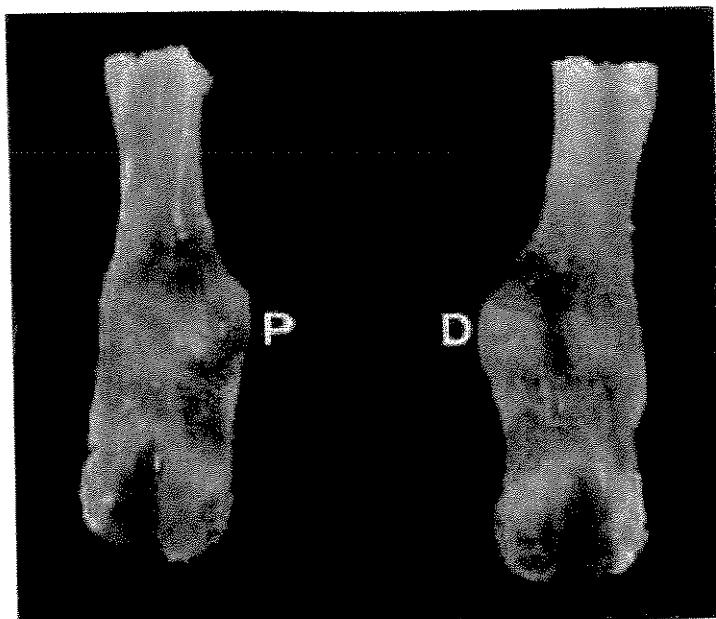


Figura 3.13. Foto de fêmures implantados com HA, duas semanas após a cirurgia: **(P)** implante de HA poroso; **(D)** implante de HA denso.

Nos animais com 16 e 24 semanas após o implante, período após o qual o calo ósseo já havia sido completamente reabsorvido, é possível notar nitidamente a presença do corpo cerâmico de HA denso no interior do canal medular, o mesmo não acontecendo com o corpo cerâmico poroso, como pode ser observado na Figura 3.14.

Apesar dos materiais terem sido submetidos à solução de descalcificador, algumas amostras ainda apresentam a presença do corpo cerâmico que foi implantado e que não foi dissolvido pela solução.

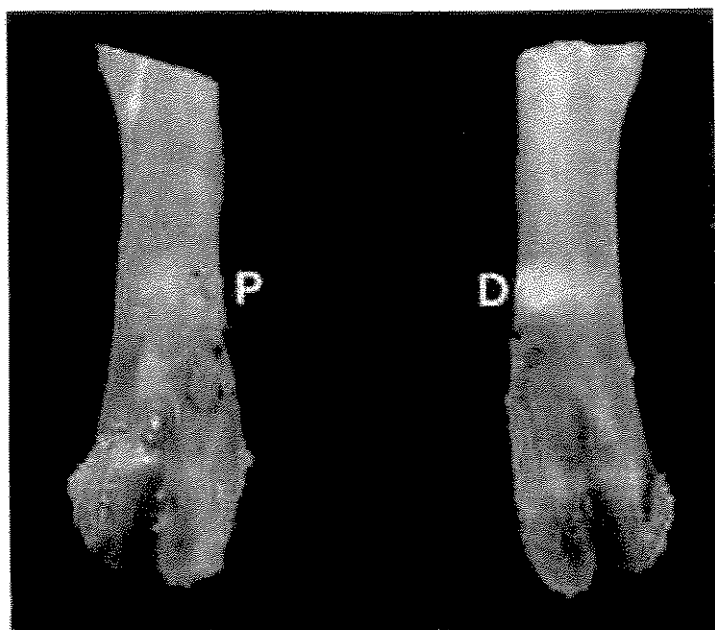


Figura 3.14. Foto de fêmures implantados com HA, 16 semanas após cirurgia: (P) implante de HA poroso; (D) implante de HA denso.

3.6.1. Implantes de corpos cerâmicos de HA densos

Em todos os cortes histológicos de implantes de HA na forma de corpo cerâmico denso pode-se observar a formação de uma camada de tecido ósseo neoformado envolvendo completamente o material e constituindo um tecido contínuo à cortical do fêmur, como mostra a Figura 3.15.

Em alguns casos, pode-se observar a presença de uma cápsula fibrosa envolvendo a cerâmica e separando-a do tecido ósseo neoformado. Na região interna do corpo cerâmico, pode-se observar uma rede de fibras que invadiu os microporos do material, como mostra a Figura 3.16.

A lesão feita na cortical dos fêmures apresenta-se totalmente reparada após quatro semanas de implante, não sendo possível a distinção entre o tecido

compacto do fêmur e o tecido ósseo neoformado, no local onde o periósteo reveste a falha óssea.

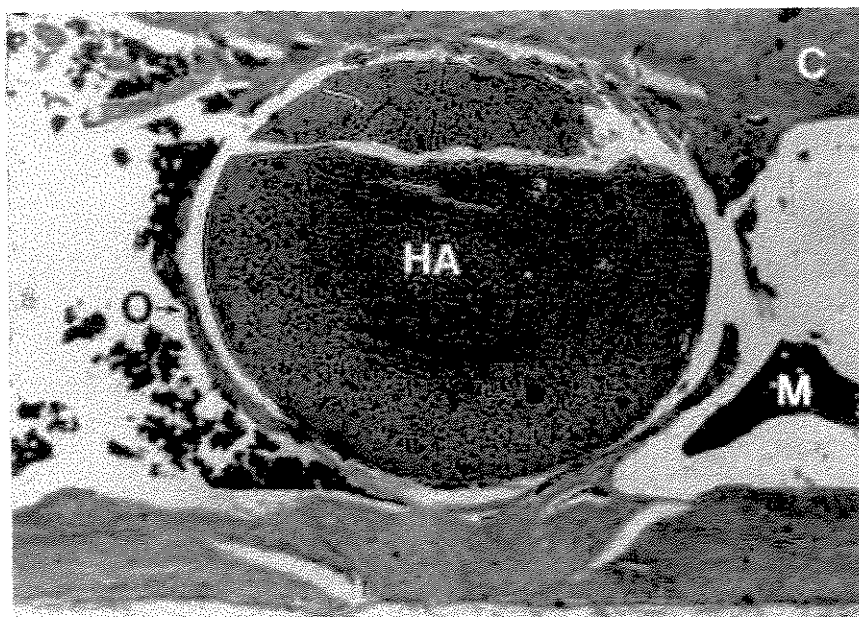


Figura 3.15. Foto panorâmica da secção transversal de um implante de HA denso, quatro semanas após cirurgia, mostrando as paredes de tecido ósseo compacto (C), a região de implante da HA, rodeada por tecido ósseo neoformado(O) e medula óssea (M). Aumento de aproximadamente 40 vezes.

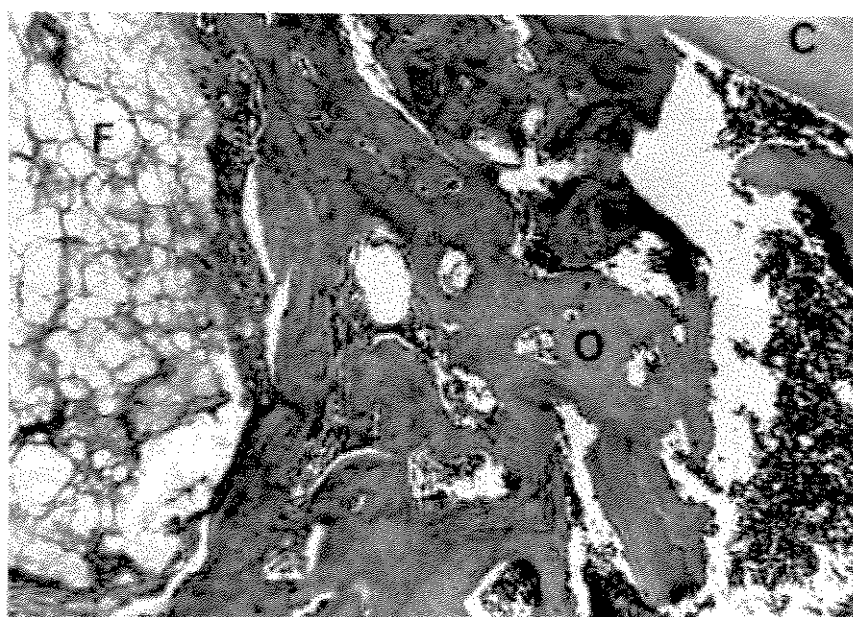


Figura 3.16. Foto de implante de HA denso, duas semanas após cirurgia. Invasão de rede de fibras (F) e formação de tecido ósseo (O). Aumento de aproximadamente 250 vezes.

Nas primeiras semanas de implante, a cerâmica apresenta-se completamente invadida por uma rede de fibras que começa a ser lentamente reabsorvida ao longo do tempo. Além da diminuição da rede de fibras, ocorre também a redução da camada de tecido ósseo neoformado, podendo-se notar a diferença entre os tecidos ósseos formados em duas semanas e os formados em 24 semanas. Com 24 semanas após o implante os tecidos apresentam-se mais organizados e parecidos com o osso compacto que em implantes de duas semanas. A porção de tecido ósseo neoformado envolve completamente a cerâmica e é contínua à cortical do fêmur. Em alguns locais pode-se observar a presença de uma cápsula fibrosa entre a cerâmica e o tecido e em outros locais o tecido ósseo apresenta-se em contato direto com o material, como pode ser visto na Figura 3.17.

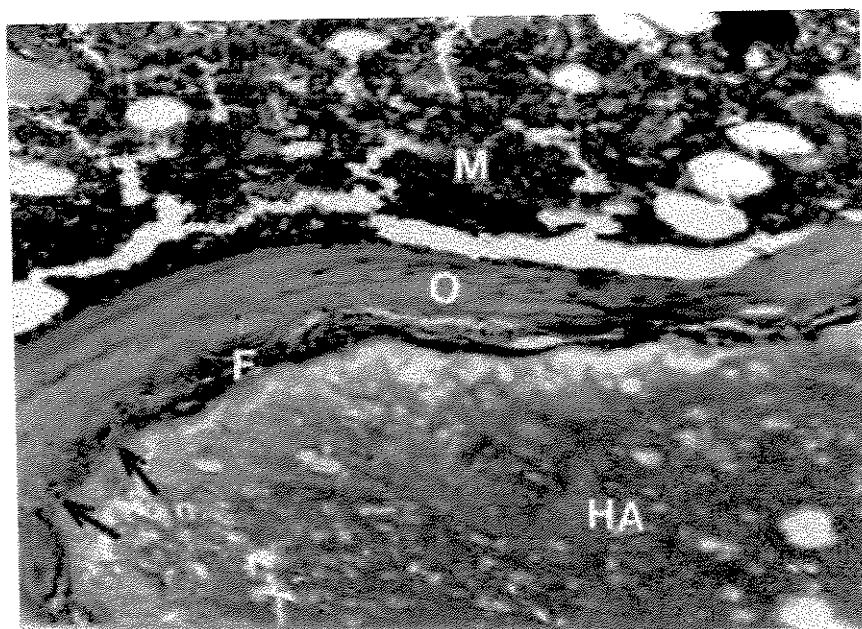


Figura 3.17. Foto de um implante de HA denso, 24 semanas após cirurgia. Diminuição de da camada de tecido ósseo neoformado (O) envolvendo a cerâmica. Presença de cápsula fibrosa (F) em alguns locais da interface e ausência em outros (indicados por setas). Aumento de aproximadamente 250 vezes.

3.6.2. Implantes de corpos cerâmicos de HA porosos

Os cortes histológicos dos implantes de material poroso revelaram a invasão de tecido ósseo neoformado através do material, como observado na Figura 3.18, juntamente com trabéculas, vasos sanguíneos e medula óssea. Aparentemente, os grãos de HA que foram aglomerados durante o processo de sinterização (Seção 2.3) foram inicialmente desagregados após serem implantados, resultando em espaços maiores que os constituídos exclusivamente pelos macroporos, o que facilitou a invasão de tecido ósseo. Nos locais onde os grãos de HA foram eliminados pelo processo de descalcificação aparece uma rede de fibras que cresceu através dos microporos da cerâmica, como no caso dos implantes de material denso, de acordo com a Figura 3.19.

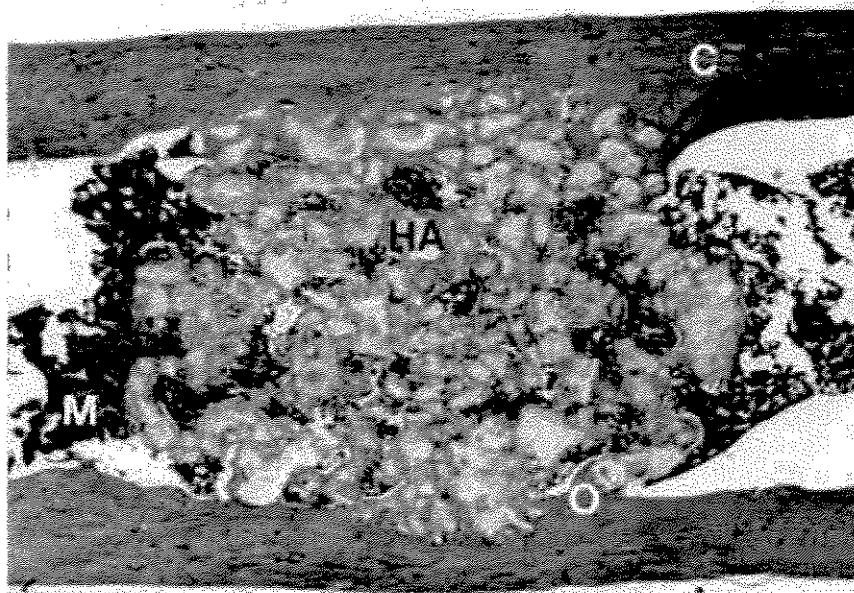


Figura 3.18. Foto panorâmica da secção transversal de um implante de HA poroso, 16 semanas após cirurgia. Invasão de tecido ósseo (O) e medula óssea (M) pelos espaços entre os grãos da cerâmica. O tecido ósseo apresenta-se contínuo à cortical do fêmur (C). Aumento de aproximadamente 40 vezes.

Quatro semanas após o implante, a falha óssea da cortical apresenta-se completamente preenchida por osso formado subperiostealmente, tendo aspecto semelhante aos tecidos encontrados em outras áreas.

Pode-se observar a diminuição de tecido ósseo neoformado ao longo do tempo, com preenchimento dos espaços vazios por trabéculas, vasos sanguíneos e medula óssea, indicando que o material poroso permite que a recuperação óssea seja conduzida lentamente como em um processo natural.

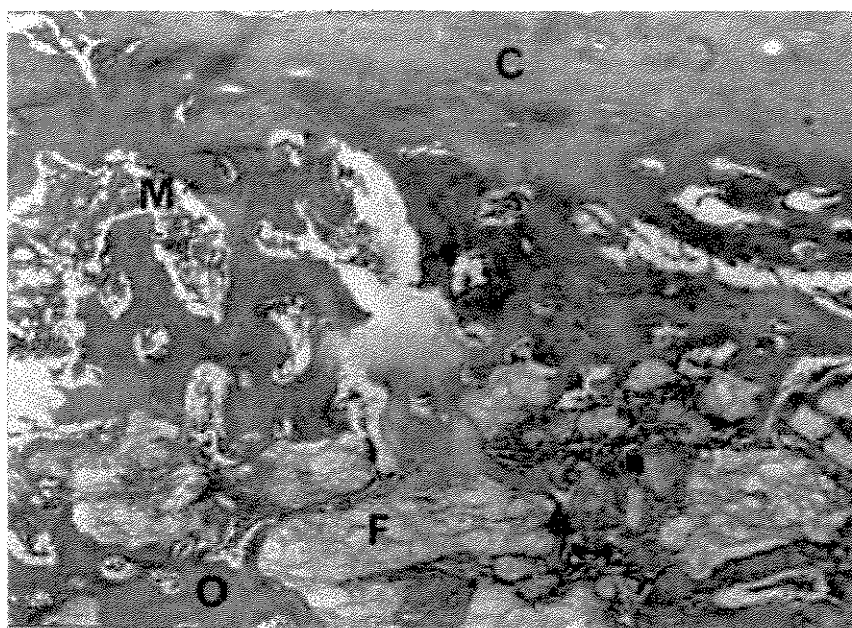


Figura 3.19. Foto de um implante poroso de HA, duas semanas após cirurgia. Invasão dos microporos dos grãos por fibras (F) e dos espaços entre grãos por tecido ósseo contínuo à cortical (O) e medula óssea (M). Aumento de aproximadamente 250 vezes.

Após 24 semanas de implante, a quantidade de tecido ósseo diminui, juntamente com o aumento de medula óssea, já que o material foi implantado no canal medular. O tecido ósseo apresenta-se mais organizado e semelhante à cortical, com a qual ela apresenta-se contínua, como mostra a Figura 3.20.

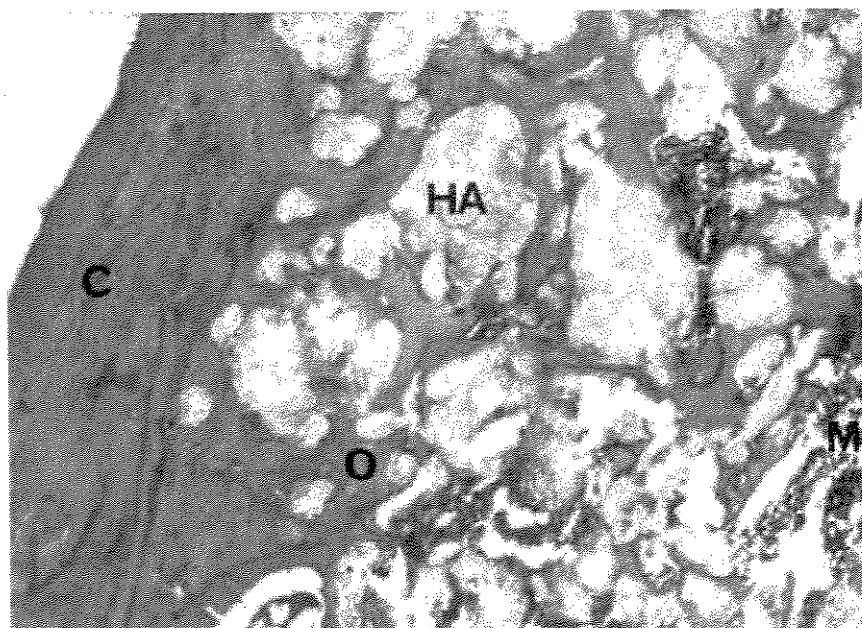


Figura 3.20. Foto de um implante poroso de HA, 24 semanas após cirurgia. Diminuição do tecido fibroso nos grãos de HA e de tecido ósseo (O) através dos espaços entre os grãos e aumento de medula óssea (M). Aumento de aproximadamente 250 vezes.

Em nenhum dos casos, tanto nos implantes de cerâmica densa como de porosa, foi observada a presença de células inflamatórias nos locais de implante, durante o período estudado.

Os resultados histológicos mostram a biocompatibilidade da HA sintetizada e sinterizada na forma de corpos cerâmicos, apresentando a formação de tecido ósseo ao redor do material, no caso do corpo denso e através dele, no caso do corpo poroso, sempre apresentando-se contínua à cortical do fêmur. Os microporos do material denso e dos grãos que formam o material poroso possibilitaram a invasão de fibras, cuja tendência foi a lenta reabsorção ao longo do tempo.

Um fator que conduziu à uma grande vantagem com relação aos materiais utilizados foi o método de obtenção dos corpos porosos, no qual o material é formado por grãos que são aglomerados formando macroporos entre eles e que, quando implantados, sofrem um processo de dissolução na sua superfície durante o primeiro estágio da regeneração do trauma e se desagregam, permitindo uma maior invasão de tecido ósseo através dos espaços livres entre os grãos, maiores que os macroporos originais.

4. CONCLUSÕES

Os fosfatos de cálcio foram caracterizados por difração de raios X e espectroscopia de infravermelho, revelando que os materiais sintetizados apresentavam impurezas, como: HA contendo traços de CO_3^{2-} e HPO_4^{2-} que, após sinterização, resultou em uma mistura de HA e β -TCP; TCP sendo uma mistura de fases β -TCP e β -CPP, o que levou a uma solubilidade parcial do composto, já que CPP é insolúvel; CPP apresentou-se apenas na forma β . Todas estas características resultaram dos processos de síntese escolhidos para cada material. Todos os métodos utilizados foram de fácil execução, baixo custo e bom rendimento.

O comportamento *in vitro* avaliado pelas medidas de potencial de interface apresentado por eletrodos construídos com os fosfatos de cálcio imersos em solução que simula o fluido extra celular (PECF) revelou que eletrodos de HA e TCP apresentam uma cinética para alcançar o equilíbrio de potencial de interface crescente em valores de pH decrescentes e a temperaturas próximas à fisiológica.

Para o caso dos eletrodos de CPP, eles não apresentaram resposta a íons cálcio ou fosfato presentes na solução, mantendo um potencial constante, independente do pH e da temperatura do meio.

Com isso, concluímos que HA e TCP são materiais capazes de participar do equilíbrio iônico com o fluido biológico, fator que ocorre mais agilmente em pH

baixo e temperatura fisiológica, condições naturalmente apresentadas pelo organismo durante um processo de recuperação de um trauma ou inflamatório. CPP representa um material praticamente inerte que não participa do equilíbrio iônico com o meio. Apesar dos resultados obtidos, o comportamento da dupla camada elétrica formada na interface dos materiais ainda deve ser melhor estudado, visto que esta é uma resposta que deve estar diretamente relacionada aos processos de regeneração óssea.

O comportamento *in vivo* avaliado por implantes de corpos cerâmicos densos e porosos de HA em fêmures de ratos revelou uma boa biocompatibilidade do material, sem a presença de células inflamatórias.

Os corpos cerâmicos densos comportaram-se como materiais quase inertes, permitindo o crescimento ósseo apenas ao seu redor, apresentando a formação de uma cápsula fibrosa adjacente a eles e a formação de rede fibrosa nos seus microporos de diâmetros menores que 1 μm .

Os corpos porosos apresentaram uma característica interessante que permitiu uma maior invasão de tecido ósseo: o método de obtenção da cerâmica, que foi formada a partir da sinterização de grãos, de modo a obter aglomerados, com macroporos da ordem de 20 a 100 μm . Após o implante, os grãos se desagregaram, formando espaços livres maiores que os macroporos, permitindo um incrível crescimento ósseo.

Em todos os casos ocorreu um processo de recuperação semelhante ao natural, com a diminuição de osso e de tecido fibroso ao longo do tempo e a reposição simultânea por medula óssea no canal medular e restauração completa do trauma.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] SANTOS, R.G. *Materiales bioactivos para implantes oseos: características y aplicaciones*. Havana, Cuba: Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 1992, p. 5-25.
- [2] HENCH, L.L. and ETHRIDGE, E.C. *Biomaterials: An Interfacial Approach*. New York: Academic Press, 1982, 385p.
- [3] EISENBERGER, P. Biomaterials and medical implant science: present and future perspectives: a summary report. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 32, p. 143-147, 1996.
- [4] PARK, J.B. *Biomaterials: an introduction*. 2 ed., New York: Plenum Press, 1980.
- [5] HENCH, L.L. Bioceramics: From Concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
- [6] DUBININ, M.M. Adsorption in micropores. *J. Colloid Interfac. Sci.*, v. 23, n. 4, p. 487-499, 1967.
- [7] HULBERT, S.F., COOKE, F.W. et al. Attachment of prostheses to the muskulo-skeletal system by tissue ingrowth and mechanical interlocking. *Biomed. Mater. Symp.*, v. 4, p. 1-23, 1970.
- [8] POSNER, A.S. The Mineral of bone. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, v. 200, p. 87-99, 1985.

-
- [9] DE GROOT, K. *Biocompatibility of clinical implant materials*. Flórida: CRC Press, 1981, v. 1, p. 199-222.
- [10] NORDSTRÖM, E.G. and KARLSSON, K.H. Carbonate-dopped hydroxyapatite. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v. 1, n. 3, p. 182-184, 1990.
- [11] JARCHO, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, n. 157, p. 259-278, 1981.
- [12] LE GEROS, R.Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. São Francisco: Meyers, 1991.
- [13] ANDO, J. Tricalcium phosphate and its variation. *Bull. Chem. Soc. Japan*, v. 31, n. 2, p. 196-201, 1958.
- [14] VAN BLITTERSWIJK, C.A.; GROTE, J.J. et al. Bioreactions at the tissue/hydroxyapatite interface. *Biomaterials*, v. 6, p. 246-251, 1985.
- [15] RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*, v. 17, n. 1, p. 31-35, 1996.
- [16] FRAYSSINET, P.; TROUILLET, J.L. et al. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials*, v. 14, n. 6, p. 423-429, 1993.
- [17] GAO, T.J.; LINDHOLM, T.S. et al. Microscopic evaluation of bone-implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects. *Biomaterials*, v. 16, n. 15, p. 1175-1179, 1995.

- [18] EGGLI, P.S.; MÜLLER, W. et al. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, n. 232, p. 127-138, 1988.
- [19] BAGAMBISA, F.B.; JOOS, U. et al. Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 27, p. 1047-1055, 1993.
- [20] DE GROOT, K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomater*, v. 1, n. 47, p. 47-50, 1980.
- [21] WINTER, M.; GRISS, P. et al. Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomater.*, v. 2, p. 159-161, 1981.
- [22] KLEIN, C.P.A.T.; DRIESSEN, A.A. et al. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 17, p. 769-784, 1983.
- [23] JARCHO, M.; SALSBUURY, R.L. et al. Synthesis and fabrication of β -tricalcium phosphate (whitlockite) ceramics for potential prosthetic applications, *J. Mater. Sci.*, v. 14, p. 142-150, 1979.
- [24] LAVERNIA, C. and SHOENUNG, J.M. Calcium phosphate ceramics as bone substitutes. *Ceramic Bull.*, v. 70, n. 1, p. 95-100, 1991.
- [25] HONDA, T. et al. Post-composition control of hydroxyapatite in an aqueous medium, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v. 1, p. 114-117, 1990.
- [26] HAYEK, E. and NEWESLEY, H. *Inorganic Syntheses*, New York: McGraw Hill, 1963, v. 7, p. 63-65.

- [27] LERNER, E.; AZOURY, R. et al. Rapid precipitation of apatite from ethanol-water solution. *J. Crystal Growth*, v. 97, p. 725-730, 1989.
- [28] HULBERT, S.F., YOUNG, F.A. et al. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 4, p. 433-456, 1970.
- [29] *Phosphorus compounds: analytical chemistry of phosphorus compounds*. New York: Wiley Interscience, 1972, v. 37, p. 344-347.
- [30] OSAKA, M.; MIURA, Y. et al. Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v. 2, p. 51-55, 1991.
- [31] JENSEN, A.T. and RATHLEV, J. *Inorganic Syntheses*. New York: McGraw Hill, 1953, v. 4, p. 19-22.
- [32] BACCAN, N.; ANDRADE, J.C. de et al. *Química Analítica quantitativa elementar*. 2 ed. Campinas: Unicamp, 1985.
- [33] HALMANN, M. *Analytical chemistry of phosphorus compounds*. New York: Wiley Interscience, 1972, v. 37, p. 336-337.
- [34] *Powder diffraction file inorganic*. Joint Committee on Powder and Diffraction Standards. 1972
- [35] SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C. et al. *Spectrometric identification of organic compounds*. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 1981, p. 95.
- [36] VOGEL, A.I. *A text-book of quantitative inorganic analysis: theory and practice*. 4 ed. London: Longmans, 1978, p. 320, 756.

-
- [37] EMSLEY, J. and HALL, D. *The chemistry of phosphorus*. London: Harper and Row, 1976, p. 5-24.
- [38] LOWELL, S. and SHIELDS, J.E. *Powder surface area and porosity*. 2 ed. Londres: Chapman and Hall, 1984.
- [39] ALLEN, T. *Particle size measurement*. 3 ed. Londres: Chapman and Hall, 1981, p. 465-513.
- [40] PETRUCCELLI, G.C.; KAWACHI, E.Y. et al. Hydroxyapatite-based electrode: a new sensor for phosphate. *Analytical Communications*, v. 33, p. 227-229, 1996.
- [41] HOMSY, CA. Bio-compatibility in selection of materials for implantation. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 4, p. 341-356, 1970.
- [42] ISHIKAWA, K.; DUCHEYNE, P. et al. Determination of the Ca/P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v. 4, p. 165-168, 1993.
- [43] SZYMANSKI, H.A. and ERICKSON, R. *Infrared band handbook*. New York: IFI/plenum, 1970, v. 2.
- [44] ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. et al. A calcium hydroxyapatite precipitated from an aqueous solution. *J. Crystal Growth*, v. 84, p. 515-532, 1987.
- [45] ZHOU, J.; ZHANG, J.C. et al. High temperature characteristics of synthetic hydroxyapatite. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v. 4, p. 83-85, 1993.

-
- [46] MITCHELL, P.C.H.; PARKER, S.F. et al. Hydrated sites in biogenic amorphous calcium phosphates: an infrared, raman, and inelastic neutron scattering study. *J. Inorg. Biochem.*, v.62, p. 183-197, 1996.
- [47] MIKIJEJLJ, B.; VARELA, J.A. et al. Equivalence of surfaces areas determined by nitrogen adsorption and mercury porosimetry. *Ceramic Bull.*, v.70, n.5, p. 829-831, 1991.
- [48] WEAST, R.C. and LIDE, D.R. *Handbook of chemistry and physics*. 70 ed. Flórida: CRC Press, 1989.