

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

JOSÉ RICARDO MUNIZ FERREIRA

**CASCA DE OVO DE AVESTRUZ COMO FONTE DE CÁLCIO
PARA RECOBRIMENTO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO E
SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA E HIDROXIAPATITA
CONTENDO ZINCO**

Rio de Janeiro

2015

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

JOSE RICARDO MUNIZ FERREIRA

**CASCA DE OVO DE AVESTRUZ COMO FONTE DE CÁLCIO PARA
RECOBRIMENTO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO E SÍNTESE DE
HIDROXIAPATITA E HIDROXIAPATITA CONTENDO ZINCO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em
Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como
requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em
Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores:

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva –D.C.

Prof. Luis Henrique Leme Louro – Ph.D.

Rio de Janeiro

2015

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ

CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmear ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do autor e do orientador.

620.11 Muniz Ferreira, José Ricardo.

F383c Casca de Ovo de Avestruz como Fonte de Cálcio para Recobrimento de superfícies de titânio e síntese de hidroxiapatita e hidroxiapatita contendo zinco / José Ricardo Muniz Ferreira; orientado por Marcelo Henrique Prado da Silva, Luis Henrique Leme Louro– Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2015.

127 p.: il.

Tese (Doutorado) – Instituto Militar de Engenharia – Rio de Janeiro, 2015.

1. Curso de Ciência dos Materiais – teses e dissertações. 2. Hidroxiapatita – Zinco. I. Silva, Marcelo Henrique Prado da. II. Louro, Luis Henrique Leme. III. Título. IV. Instituto Militar de Engenharia.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

JOSÉ RICARDO MUNIZ FERREIRA

**CASCA DE OVO DE AVESTRUZ COMO FONTE DE CÁLCIO PARA
RECOBRIMENTO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO E SÍNTESE DE
HIDROXIAPATITA E HIDROXIAPATITA CONTENDO ZINCO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores: Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.C.
Prof. Luis Henrique Leme Louro – Ph.D.

Aprovada em 30 de julho de 2015 pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.C. do IME – Presidente

Prof. Luis Henrique Leme Louro – Ph.D. do IME

Prof^a. Leila Rosa de Oliveira Cruz – D.C. do IME

Prof^a. Mônica Diuana Calasans Maia – D.C. da UFF

Prof. Alexandre Malta Rossi – D.C. do CBPF

Prof. Rubens Lincoln Santana Blazutti Marçal – D.C. do IME

Rio de Janeiro

2015

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Ana Paula por mais uma demonstração de amor incondicional, cumplicidade e fé em meus sonhos que vem se transformando ao longo dessa união em nossas conquistas;

Ao meus filhos Luisa , Davi e Gabriel que me ensinam todos os dias sobre a simplicidade do amor e a importância de aproveitarmos intensamente cada pequeno momento e gesto em nossas vidas;

Aos meus Pais, que em presença (mãe) ou memória(pai) são minhas mais importantes referências e exemplos a seguir. Minha mãe Edimea, guerreira incansável e pilar fundamental em minha vida, minha mais profunda gratidão;

A minha irmã Anne, meus sobrinhos Pedro, Lucas e Anna Carolina (afilhada), e minha sobrinha neta Liz, por serem presentes em minha vida e fonte inesgotável de energia para me abastecer;

Aos meus afilhados Bernardo, Luana Meneghim e Luana Salume que são presentes de Deus em minha vida;

A toda minha família que direta ou indiretamente me fizeram forte o bastante para seguir adiante apesar das dificuldades impostas;

Aos meus professores e orientadores Prof. Marcelo H. Prado da Silva e Prof. Luís Henrique Leme Louro pela confiança, apoio, amizade e ensinamentos que farão parte para sempre de minha vida;

Aos colegas do IME Fábio, Talita, Juciane, Joneo e Gabriel que foram amigos generosos, ao longo dessa trajetória, contribuindo, cada um a sua maneira, para edificação desse sonho;

Aos amigos e anjos da guarda Andréa, Flávia, Rubens, Daniel, pela amizade construída em sua mais simples e sincera forma expressão. A alegria de tê-los como presentes em minha vida é uma benção que vai além da cumplicidade científica que aproximou e nutriu incontáveis encontros e bate papos;

Aos professores, colegas e profissionais Prof. José Brant de Campos, Prof^a Cleonice Martins, Dra. Rosecler Alves Pereira, Dr. Márcio Botrel, Dr. Vitor Ramos, Dr. Carlos Ospina, Francisco de Assis e Joel dos Santos que se mostraram verdadeiros “MESTRES”, despidos de qualquer vaidade e soberba, não se furtando a dar seu melhor empenho para que conseguisse realizar meus experimentos e compreender seus resultados. Minha mais sincera gratidão e profundo respeito;

Ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) por toda atenção e gentileza em abrir seus laboratórios e equipe sempre que solicitados, tornando possível a realização de diversos experimentos;

Aos amigos de jornada e fé Silvio Panteleão e Eduardo Dias por terem sempre acreditado em meus sonhos, me inspirado e estimulado a sair da “zona de conforto” para alcançar conquistas que jamais imaginei poder realizar;

Aos amigos e parceiros Gustavo Modesto e Roberto Fanganiello pelo espírito de cumplicidade e verdadeira irmandade com que abraçaram meus sonhos, tornando-os possíveis e reais;

Ao velho e querido amigo Walker, a quem Deus me concedeu a chance de ter o convívio resgatado, pelo apoio e amizade incondicionais ao longo dessa trajetória;

À equipe da R-Crio por acreditarem em mim e em meus ideais que hoje são nossos. Agradeço a Deus por esse novo lar que me foi concedido cheio de desafios, mas também repleto de profissionais de excelência;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro que permitiu a realização do presente trabalho;

A Deus, que sempre conduziu meus passos e jamais permitiu que a chama da esperança deixasse de incandescer.

“O sucesso não é a chave para felicidade. A felicidade é a chave para o sucesso”.

Albert Schweitzer

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11	
LISTA DE TABELAS	18	
LISTA DE SIGLAS	19	
1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Posicionamento do trabalho proposto	22
1.2	Objetivo	26
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	Casca de ovo de avestruz como fonte de cálcio para produção de ha	27
2.2	Obtenção de ha e zn-ha a partir de recobrimentos de monetita/bruxita	29
2.3	Justificativa para a incorporação do zinco à hidroxiapatita	31
2.4	Toxicidade	33
2.5	Bioatividade	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Preparo da solução precursora	38
3.2	Precipitação do pó de HA	39
3.3	Síntese de hidroxiapatita contendo zinco (2%)	40
3.4	Recobrimento das placas de ti com solução precursora	42
3.5	Teste de toxicidade	42
3.6	Teste de bioatividade	47
3.7	Análise química	52
3.7.1	Fluorescência de raios X (FRX)	52
3.7.2	Espectrofotometria de absorção atômica em chama	52
3.7.3	Espectrofotometria UV-Visível	52
3.8	Técnicas de caracterização	53
3.8.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS)	53
3.8.2	Difração de Raios X (DRX)	54
3.8.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	54

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	Síntese do pó	55
4.1.1	Difração de Raios X da Hidroxiapatita e Zinco- Hidroxiapatita	55
4.1.2	Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos pós de HA e Zn-HA verdes e tratados termicamente a 700 ^o C, 900 ^o C e 1100 ^o C.	63
4.1.3	Análise química das amostras de HA e Zn-HA tratadas termicamente a 1100 ^o C.....	69
4.2	Pastilhas prensadas	70
4.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das pastilhas prensadas de HA e Zn-HA tratadas termicamente a 700 ^o C, 900 ^o C e 1100 ^o C.....	70
4.3	Recobrimentos sobre placas de titânio	74
4.3.1	Difração de Raios X das amostras de titânio recobertas sem Zn, após os tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ^o C	74
4.3.2	Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) das amostras de titânio recobertas sem Zn, após tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ^o C	77
4.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS) das amostras recobertas sem Zn, após os tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ^o C	80
4.3.4	Difração de Raios X das amostras recobertas com Zn, após os tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ^o C	83
4.3.5	Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) das amostras recobertas com Zn, após tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ^o C.....	85
4.3.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS) das amostras recobertas com Zn, após tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ^o C	87
4.3.7	Difração de Raios X das amostras recobertas sem Zn, após tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ^o C seguidas de conversão em KOH.....	90
4.3.8	Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) das amostras recobertas sem Zn, após tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ^o C seguidas de conversão em KOH	92
4.3.9	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS) das amostras recobertas sem Zn, após tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ^o C seguidas de conversão em KOH.	95

4.3.10	Difração de Raios X das amostras recobertas com Zn, após tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ⁰ C seguidas de conversão em KOH.....	97
4.3.11	Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) das amostras recobertas com Zn, após tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ⁰ C seguidas de conversão em KOH	99
4.3.12	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS) das amostras recobertas com Zn, após tempos de 1h, 2h e 4h a 80 ⁰ C seguidas de conversão em KOH.	103
4.4	Toxicidade	105
4.5	Bioatividade.....	108
5	CONCLUSÃO	117
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
7	ANEXOS	125
7.1	Anexo 1	126

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1.1	Fotografia de ovos: (a) Avestruz e (b) Galinha,	26
FIG. 2.1	(a) Micrografia (MEV) da casca do ovo do avestruz e (b) da membrana de revestimento interno do ovo , ambas com aumento de 1000x.....	28
FIG. 2.2	Diagrama de BERTRAND demonstrando a relação entre o efeito tóxico e terapêutico dos elementos essenciais	31
FIG. 2.3	Estruturas anatômicas de um ovo de galinha fertilizado, evidenciando a localização da membrana corioalantóide e da janela de 1,5cm ² aberta na casca do ovo para realização do experimento. Adaptado de VALDES <i>et al.</i> (2002).....	34
FIG. 2.4	(a) Ilustração de Bioatividade em Fluido Corpóreo Simulado (SBF). KOKUBO,1998.(b)Micrografia eletrônica (esquerda) e corte transversal (direita), demonstrando a deposição da hidroxiapatita por bioatividade. Adaptado de KOKUBO e TAKADAMA, 2006.	35
FIG. 2.5	Gráfico de estabilidades (mecânica, biológica e total). BOGAERDE, 2015.....	36
FIG. 3.1	Eletromicrografia (MEV) do pó da casca do ovo de avestruz (a) e respectivo padrão de difração de raios X (b).....	37
FIG. 3.2	Preparo da solução precursora, após adição de ácido láctico	39
FIG. 3.3	Difração de raios X do Pó verde (sem tratamento térmico).....	40
FIG. 3.4	Eletromicrografia (MEV) do pó verde (sem tratamento térmico) do ovo de avestruz (a) e respectivo padrão de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (b)	40
FIG. 3.6	Exame do ovo com auxílio de um ovoscópio.	44
FIG. 3.7	Abertura da janela no ovo.	44
FIG. 3.8	Janela fechada com auxílio de uma fita adesiva.	45
FIG. 3.9	Coleta da amostra para aplicação sobre a membrana corioalantóide	45
FIG. 3.10	Aplicação do pó sobre a membrana corioalantóide.	45
FIG. 3.11	Vista aproximada do pó dispersadosobre a membrana corioalantóide.....	46
FIG. 3.12	(a) Imagem do pó aglutinado sobre a membrana após 11 dias da aplicação. (b) Excisão da membrana corioalantóide para análise histopatológica.....	46
FIG. 3.13	Fragmento da membrana corioalantóide imersa em formol 10% para análise histopatológica	47

FIG. 3.14	Eletrmicrografias(MEV) da superfície de biovidros antes e após 7 dias de imersão em meio de McCoy. LÁZARO G.S. <i>et al.</i> , 2014	49
FIG. 3.15	Placas de titânio recobertas por 4h com e sem Zn, antes e após conversão	50
FIG. 3.16	Pastilhas de HA(a) e Zn-HA(b) tratadas termicamente (700 ⁰ C, 900 ⁰ C, 1100 ⁰ C) e esterilizadas em autoclave.....	50
FIG. 3.17	Meio de Cultura de McCoy	50
FIG. 3.18	Pastilhas de HA(c) e Zn-HA(d) tratadas termicamente (700 ⁰ C, 900 ⁰ C, 1100 ⁰ C), imersas em meio de McCoy para o ensaio de bioatividade	51
FIG. 3.19	Incubadora Panasonic calibrada para realização do ensaio de bioatividade (e,f) .	51
FIG. 3.20	Controle de temperatura e tensão de CO ₂ da incubadora.....	51
FIG. 4.1	Difratograma de raios X da amostra HA sintetizada não tratada termicamente...	55
FIG. 4.2	Difratograma de raios X da amostra Zn-HA sintetizada não tratada termicamente.	56
FIG. 4.3	Difratograma de raios X da amostra HA tratada termicamente a 700 ⁰ C.....	57
FIG. 4.4	Difratograma de raios X da amostra Zn-HA tratada termicamente a 700 ⁰ C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m), ZnO (P63mc, ▼) e CaO (Fm-3m, ●).	58
FIG. 4.5	Difratograma de raios X da amostra HA tratada termicamente a 900 ⁰ C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m) e Whitlockita (P63mc, ▲).	59
FIG. 4.6	Difratograma de raios X da amostra Zn-HA tratada termicamente a 900 ⁰ C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m), ZnO (P63mc, ▼) e CaO (Fm-3m, ●).	60
FIG. 4.7	Difratograma de raios X da amostra HA tratada termicamente a 1100 ⁰ C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m) e Whitlockita (P63mc, ▲).	60
FIG. 4.8	Difratograma de raios X da amostra Zn-HA tratada termicamente a 1100 ⁰ C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m) e CaO (Fm-3m, ●).....	61
FIG. 4.9	Espectro de FTIR da HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz não tratada termicamente.....	64
FIG. 4.10	Espectro de FTIR da HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 700 ⁰ C.....	64
FIG. 4.11	Espectro de FTIR da HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 900 ⁰ C.....	65

FIG. 4.12	Espectro de FTIR da HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 1100°C.....	65
FIG. 4.13	Espectro de FTIR da Zn-HA obtida a partir da síntese com casca de ovo de avestruz em presença de Zn não tratada termicamente.....	66
FIG. 4.14	Espectro de FTIR da Zn-HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 700°C.....	67
FIG. 4.15	Espectro de FTIR da Zn-HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 900°C.....	67
FIG. 4.16	Espectro de FTIR da Zn-HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 1100°C.....	68
FIG. 4.17	Eletromicrografia (MEV) de pastilha de HA 80.000X tratada a 700°C	71
FIG. 4.18	Eletromicrografia (MEV) de pastilha de HA 80.000X tratada a 900°C	71
FIG. 4.19	Eletromicrografia (MEV) de pastilha de HA 80.000Xtratada a 1100°C	72
FIG. 4.20	Eletromicrografia (MEV) de pastilha de Zn-HA 80.000X tratada a 700°C	73
FIG. 4.21	Eletromicrografia (MEV) de pastilha de Zn-HA 80.000X tratada a 900°C	73
FIG. 4.22	Eletromicrografia (MEV) de pastilha de Zn-HA 100.000X tratada a 1100°C	74
FIG. 4.23	Difratograma de raios X da placa de Titânio.....	75
FIG. 4.24	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti após 1h a 80°C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m) e Whitlockita (P63mc, ▲)	75
FIG. 4.25	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti após 2h a 80°C. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH ₂ (I4/mmm) e bruxita (Ia, ▲).....	76
FIG. 4.26	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti após 4h a 80°C. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH ₂ (I4/mmm), bruxita (Ia, ▲) e monetita (P-1, ●)	77
FIG. 4.27	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 1 hora.	78
FIG. 4.28	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 2 horas.....	79
FIG. 4.29	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 4 horas.....	79
FIG. 4.30	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora por 1h a 80°C. Aumentos de 1000X e 5000X.....	80
FIG. 4.31	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora por 2h a 80°C. Aumentos de 1000X e 5000X.....	81

FIG. 4.32	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora por 4h a 80 ⁰ C. Aumentos de 1000X e 5000X.....	81
FIG. 4.33	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio polida sem recobrimento.....	81
FIG. 4.34	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta após 1h a 80 ⁰ C.	82
FIG. 4.35	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta após 2h a 80 ⁰ C.	82
FIG. 4.36	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta após 4h a 80 ⁰ C.	82
FIG. 4.37	Difratograma de raios X da amostra recoberta em placa de Ti e presença de Zn, após 1h a 80 ⁰ C. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH ₂ (I4/mmm), bruxita (Ia, ▲).	83
FIG. 4.38	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti e presença de Zn, após 2h a 80 ⁰ C. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH ₂ (I4/mmm), bruxita (Ia, ▲) e ZnO (Pa-3, ▼).	84
FIG. 4.39	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti e presença de Zn, após 4h a 80 ⁰ C. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH ₂ (I4/mmm), bruxita (Ia, ▲) e ZnO (Pa-3, ▼).	85
FIG. 4.40	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta em presença de zinco após 1 hora	86
FIG. 4.41	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta em presença de zinco após 2 horas ..	86
FIG. 4.42	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta em presença de zinco após 4 horas ..	87
FIG. 4.43	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora com Zn por 1h a 80 ⁰ C. Aumentos de 1000X e 5000X.....	88
FIG. 4.44	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora com Zn por 2h a 80 ⁰ C. Aumentos de 1000X e 5000X.....	88
FIG. 4.45	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora com Zn por 4h a 80 ⁰ C. Aumentos de 1000X e 5000X.....	88
FIG. 4.46	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta com Zn após 1h a 80 ⁰ C.	89
FIG. 4.47	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta com Zn após 2h a 80 ⁰ C.	89
FIG. 4.48	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta com Zn após 4h a 80 ⁰ C.	89

FIG. 4.49	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti após 1h a 80 ⁰ C seguido de conversão com KOH. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH ₂ (I4/mmm) e HA (P63/m,*).	90
FIG. 4.50	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti após 2h a 80 ⁰ C seguido de conversão com KOH. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH ₂ (I4/mmm) e HA (P63/m,*).	91
FIG. 4.51	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti após 4h a 80 ⁰ C seguido de conversão com KOH. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH ₂ (I4/mmm) e HA (P63/m,*).	92
FIG. 4.52	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 1 hora e conversão em KOH.	93
FIG. 4.53	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 2 horas e conversão em KOH.	94
FIG. 4.54	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 4 horas e conversão em KOH.	94
FIG. 4.55	Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com HA imersas em solução precursora por 1h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X	95
FIG. 4.56	Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com HA imersas em solução precursora por 2h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X	95
FIG. 4.57	Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com HA imersas em solução precursora por 4h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X	96
FIG. 4.58	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com HA imersas em solução precursora por 1h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C.	96
FIG. 4.59	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com HA imersas em solução precursora por 2h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C.	97
FIG. 4.60	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com HA imersas em solução precursora por 4h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C.	97
FIG. 4.61	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti em presença de Zn após 1h seguido de conversão com KOH. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH ₂ (I4/mmm) e HA (P63/m,*).	98
FIG. 4.62	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti em presença de Zn após 2h seguido de conversão com KOH. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), e HA (P63/m,*).	98

FIG. 4.63	Difratograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti em presença de Zn após 4h seguido de conversão com KOH. Identificação de uma única fase cristalina: HA (P63/m,*).	99
FIG. 4.64	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 1 hora em presença de Zn após a conversão em KOH.	100
FIG. 4.65	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 2 horas em presença de Zn após a conversão em KOH.	100
FIG. 4.66	Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 4 horas em presença de Zn após a conversão em KOH.	101
FIG. 4.67	Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com Zn imersas em solução precursora por 1h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X.	103
FIG. 4.68	Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com Zn imersas em solução precursora por 2h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X.	103
FIG. 4.69	Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com Zn imersas em solução precursora por 4h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X.	104
FIG. 4.70	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com Zn imersas em solução precursora por 1h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C.	104
FIG. 4.71	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com Zn imersas em solução precursora por 2h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C.	105
FIG. 4.72	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com Zn imersas em solução precursora por 4h e convertidas em solução de KOH a 60 ⁰ C.	105
FIG. 4.73	Imagem histológica utilizando Hematoxilina Eosina da amostra HA 700 ⁰ C – seta evidenciando cristais de hidroxiapatita. Notar que os cristais estão aglutinados e não há presença de célula entre cada cristal, (aumento 10X).	106
FIG. 4.74	Imagem histológica utilizando Hematoxilina Eosina da amostra HA 700 ⁰ C – seta evidenciando cristais de hidroxiapatita. Notar que os cristais estão aglutinados e não há presença de célula entre cada cristal, (aumento 40X).	106
FIG. 4.75	Imagem histológica utilizando Hematoxilina Eosina da amostra Zn-HA 900 ⁰ C – setas: células inflamatórias envolvendo os cristais de hidroxiapatita. Notar que os cristais estão dispersos pela membrana e há presença de célula envolvendo cada cada cristal, (aumento 10X).	107

FIG. 4.76	Eletromicrografia de Pastilha de HA tratada termicamente a 700 ⁰ C após imersão em meio de McCoy por 14 dias	109
FIG. 4.77	Eletromicrografia de Pastilha de HA tratada termicamente a 900 ⁰ C após imersão em meio de McCoy por 14 dias	109
FIG. 4.78	Eletromicrografia de Pastilha de HA tratada termicamente a 1100 ⁰ C após imersão em meio de McCoy por 14 dias	110
FIG. 4.79	Eletromicrografia de Pastilha de Zn-HA tratada termicamente a 700 ⁰ C após imersão em meio de McCoy por 14 dias	110
FIG. 4.80	Eletromicrografia de Pastilha de Zn-HA tratada termicamente a 900 ⁰ C após imersão em meio de McCoy por 14 dias	111
FIG. 4.81	Eletromicrografia de Pastilha de Zn-HA tratada termicamente a 1100 ⁰ C após imersão em meio de McCoy por 14 dias	111
FIG. 4.82	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Monetita/Bruxita e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 1000X.....	112
FIG. 4.83	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Monetita/Bruxita e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 5000X.....	112
FIG. 4.84	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Monetita/Bruxita, contendo Zn e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 1000X.....	113
FIG. 4.85	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Monetita/Bruxita, contendo Zn e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 5000X.....	113
FIG. 4.86	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com HA e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 1000X	114
FIG. 4.87	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com HA e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 5000X	114
FIG. 4.88	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Zn-HA e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 1000X	115
FIG. 4.89	Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Zn-HA e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 5000X	115

LISTA DE TABELAS

TAB. 2.1	Teor de zinco em tecidos e órgãos humanos e fosfatos de cálcio. Adaptado de ITO <i>et al.</i> 2005	32
TAB. 4.1	Resultados de Identificação de fases por DRX e de grupos funcionais por FTIR das amostras de HA e Zn-HA com e sem tratamento térmico.	69
TAB. 4.2	Análise química para verificação dos percentuais de Ca, P e Zn em amostras de pós de HA e Zn-HA tratados termicamente à 1100 ⁰ C	70
TAB. 4.3	Resultados de por DRX e de FTIR das amostras de placas de Ti recobertas nos tempos de 1, 2 e 4 horas antes e após conversão em KOH.....	102

LISTA DE SIGLAS

CAM	Membrana Corioalantóide
DRX	Difração de Raios X
EDS	Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia
FTIR	Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier
FRX	Espectroscopia de Fluorescência de raios X (FRX)
HA	Hidroxiapatita
H.E.	Análise Histológica
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
SBF	Solução de Fluido Corpóreo
Zn-HA	Zinco - Hidroxiapatita

RESUMO

Neste trabalho, usou-se a casca do ovo de avestruz como fonte de cálcio para sintetizar a hidroxiapatita (HA) por via úmida. Este cálcio é obtido do carbonato, CaCO_3 presente majoritariamente na casca do ovo, que difere de outras fontes usuais tais como o hidróxido de cálcio, Ca(OH)_2 e o nitrato de cálcio, $\text{Ca(NO}_3)_2$. O objetivo foi pesquisar a viabilidade de aproveitamento desta casca, através de caracterizações de pós de HA e de HA contendo Zn (2%) dando origem a Zn-HA. Os resultados obtidos demonstraram que a fonte de cálcio (CaCO_3) foi eficiente na síntese da HA. Os pós sintetizados de HA e Zn-HA foram tratados termicamente a 700°C , 900°C e 1100°C . Nas amostras de HA foi detectada uma segunda fase: Whitlockita (900°C e 1100°C). Já nas amostras de Zn-HA foram observadas as presenças de óxido de zinco e óxido de cálcio a 700°C e 900°C , e somente óxido de cálcio a 1100°C . A resposta dos pós de HA e Zn-HA ao teste de toxicidade foi satisfatória. Para o teste de bioatividade, os pós de HA e Zn-HA prensados e tratados termicamente foram imersos por 14 dias em meio de McCoy. Não foi observada a formação da “bone-like apatite”, que caracterizaria a bioatividade. Em uma segunda etapa do trabalho, o desempenho desses cerâmicos foi avaliado em termos do recobrimento em substrato de titânio. Em análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a incorporação do zinco sugere ter melhorado a qualidade dos recobrimentos após a conversão em meio alcalino através do KOH. As amostras de HA e Zn-HA demonstraram-se bioativas, com resultados mais expressivos de formação de “bone-like apatite” nas placas recobertas por bruxita, monetita e Zn-HA em relação as amostras recobertas com HA.

ABSTRACT

The purpose of this work was to investigate the possibility of using ostrich eggshells as a calcium source to synthesize hydroxyapatite (HA) by a wet route. In this method, calcium is obtained as calcium carbonate (CaCO_3), which is the main component of eggshells and is significantly different from other usual calcium sources such as calcium hydroxide, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, and calcium nitrate, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. The results showed that CaCO_3 derived calcium was effective for the synthesis of pure HA and 2% Zn-HA powders. In addition, both HA and Zn-HA powders were heat-treated at 700°C , 900°C , and 1100°C . In the HA samples a whitlockite phase was detected in samples treated at 900°C and 1100°C . In the Zn-HA samples, zinc oxide and calcium oxide phases were detected in samples treated at 700°C and 900°C and calcium oxide was detected in samples treated at 1100°C . The toxicity responses of the samples were satisfactory with and without zinc addition. For the bioactivity tests, HA and Zn-HA powders were pressed, heat treated and immersed for 14 days in a McCoy medium. The formation of “bone-like apatite” which would characterize bioactivity was not observed. The ceramic performance of the material was evaluated in terms of covering a titanium substrate. Scanning electron microscopy (SEM) observations suggested that Zn addition improves the substrate covering after treatment in an alkaline KOH solution. The HA and Zn-HA samples were bioactive. The brushite, monetite and Zn-HA phases provided better “bone-like apatite” covering than pure HA.

1 INTRODUÇÃO

1.1 POSICIONAMENTO DO TRABALHO PROPOSTO

A capacidade regenerativa do organismo vivo foi observada por Aristóteles em 330 a.C., a partir do comportamento verificado na cauda perdida por um lagarto e que conseguiu ser reconstituída integralmente (NADIG, 2009). O processo de regeneração caracteriza-se pela formação de um tecido na área de um defeito existente, idêntico ao original em termos qualitativos (LINDHE et al., 2010).

GRANJEIRO, 2006, apontou as biocerâmicas como parte do universo dos biomateriais que vêm assumindo uma importância crescente ao longo das últimas décadas, com grande desta que para aplicação em técnicas que visam à regeneração de defeitos ósseos considerados críticos, decorrentes de procedimentos cirúrgicos, traumas, infecções, neoplasias ou de malformações congênitas.

Dentre as biocerâmicas, as hidroxiapatitas apresentam-se como o principal grupo indicado para uso em diferentes terapias ósseo regenerativas. Isto justifica-se porque estes materiais compõem o constituinte inorgânico predominante dos ossos, correspondendo a cerca de 95% do volume dessa porção (fosfato de cálcio- 85%, carbonato de cálcio- 10% e fluoreto de cálcio e magnésio- 5%) e 65% do peso ósseo total (LYNCH *et al.*, 1999; GARG, 1999).

A hidroxiapatita é representada pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ sob uma razão estequiométrica entre cálcio e fósforo de 1,67 (SUCHANEK e YOSHIMURA, 1998). Aquela presente no tecido ósseo, por conta do pH do fluido corpóreo, em torno de 7,0, apresenta-se deficiente em cálcio sob a fórmula $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$, condição que permite a constante remodelação do tecido ósseo, considerada positiva para a homeostase (condição de equilíbrio dinâmico) do organismo, garantindo a regeneração (“turn-over”) tecidual. Isso ocorre devido à instabilidade estrutural da hidroxiapatita (HA), por conta da deficiência em cálcio, que expõe essa HA a trocas iônicas com o meio (DALCONI *et al.*, 2003). O trabalho de REY *et al.*, 2007 comenta vários modelos abordando as substituições iônicas na apatita existente da fase mineral do osso. Seguindo o modelo de BONEL, o grupo fosfato, PO_4^{3-} , trivalente pode ser substituído por espécies bivalentes de grupos HPO_4^{2-} ou CO_3^{2-} sendo a variação de carga compensada por vacâncias aniônicas e catiônicas nos sítios OH^- , a fórmula geral dessa estrutura seria Ca_{10-}

$x(\text{PO}_4)_{6-x} (\text{HPO}_4 \text{ ou } \text{CO}_3^{2-}) (\text{OH})_{2-x}$ sendo $0 \leq x \leq 2$. No caso da hidroxiapatita sintética, tem-se uma variação na sua composição devido às condições alcalinas do meio utilizado, produzindo um material com excesso de íons cálcio e OH^- , levando a fórmula $\text{Ca}_{10-x+u} (\text{PO}_4)_{6-x} (\text{HPO}_4 \text{ ou } \text{CO}_3^{2-})_x (\text{OH})_{2-x+2u}$ sendo $0 \leq x \leq 2$ e $0 \leq u \leq x/2$.

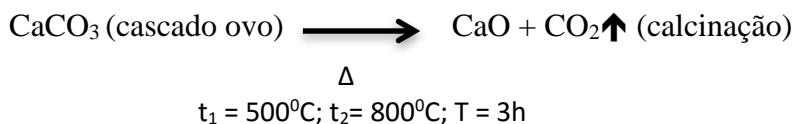
Diversas são as fontes disponíveis de hidroxiapatita, ou insumos que permitem realizar sua síntese. Essas, segundo MISCH (1999), podem ser classificadas de acordo com sua origem:

- ✓ Autógena – A fonte de hidroxiapatita se dá a partir do próprio indivíduo. É considerada no meio clínico e científico, como padrão ouro, por apresentar propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, potencializando significativamente o processo de regeneração óssea. Contudo, implica na obtenção de tecido ósseo a partir de sítios doadores secundários (ramo de mandíbula, crista ilíaca), é uma fonte limitada de enxerto e significativa imprevisibilidade de resultados (GLOWACKI e MULLIKEN, 1985; EL-GHANNAM, 2004).
- ✓ Alógena ou Homógena – Oriunda de indivíduos distintos, porém de mesma espécie, a partir de doadores vivos ou cadáveres, ambas disponíveis em bancos de ossos humanos devidamente regulamentados e licenciados por órgãos reguladores competentes. Sua aplicação é controversa, uma vez que pode induzir reações imunológicas e trazer risco de transmissão de doenças, tanto virais quanto bacterianas (BUCK, MALININ *et al.*, 1989). A necessidade de tratar previamente o biomaterial para garantir segurança à saúde do paciente submetido à enxertia que faz uso dessa fonte de hidroxiapatita pode interferir, significativamente, na qualidade e quantidade do resultado de sua aplicação.
- ✓ Xenógena ou Heterógena – Obtida a partir de fonte animal, porém de espécies diferentes. Os biomateriais xenógenos têm sido estudados desde a década de 60 (SCOPP *et al.*, 1996). Sua resistência biomecânica é semelhante à do osso humano. Tratamentos adequados prévios a sua utilização podem evitar respostas imunológicas ou inflamatórias adversas (MISCH, 2000; WENZ, 2001). Os xenoenxertos podem ser produzidos a partir de osso de origem animal cortical ou medular. Uma das limitações associada à utilização dos enxertos xenógenos está ligada a aspectos culturais e religiosos, além da possibilidade de transmissão de doenças;

- ✓ Aloplástica ou Sintética – Pode ser produzida laboratorialmente a partir da fosfatação de compostos carbonatados. Em razão do alto controle relativo à transmissão de doenças dos materiais alógenos e xenógenos, essa opção vem ganhando grande apelo comercial e espaço em pesquisas, visando o desenvolvimento de um biomaterial com propriedades cada vez melhores, capaz de proporcionar resultados mais previsíveis. Algumas outras características são percebidas como vantagens significativas no uso de biomateriais sintéticos, entre elas, parâmetros e produção otimizados facilitando o controle de sua síntese, possibilidade de produção em escala ilimitada, forma e características pré-determinada sem relação à macroestrutura (formato tridimensional, diâmetro dos poros) e à microestrutura (porosidade, interconectividade dos poros) (BEHRAVESH, YASKO *et al.*, 1999; LENDLEIN e LANGER, 2002; GUNATILLAKE e ADHIKARI, 2003).

No caso da produção da hidroxiapatita, cascas de ovos estão sendo utilizadas como fonte de CaCO_3 para uso em processo de síntese (CALIMAN *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2012).

CALIMAN *et al.*, (2010) descreveram uma rota por via úmida para síntese da HA, utilizando a casca do ovo de avestruz como fonte de carbonato de cálcio. Essa rota pode ser assim descrita:



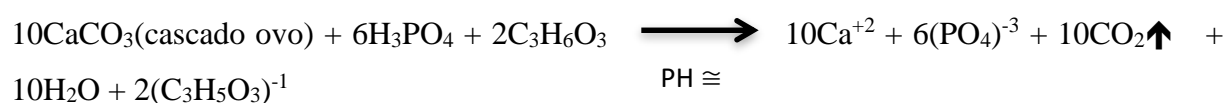
Para realização deste trabalho de tese, cascas de ovos de avestruz, que são ricas em CaCO_3 e consideradas resíduos de descarte, foram utilizadas como fonte de cálcio para o processo de síntese da HA e da Zn-HA (FIG. 1.1). Nesse caso, o CaCO_3 foi utilizado diretamente na reação de síntese da HA e da Zn-HA sem tratamento térmico prévio, como o descrito no trabalho de

CALIMAN *et al.*, (2010). Dessa forma, o trabalho proposto buscou aproveitar um material que hoje é descartado na natureza, agregando valor ao mesmo.

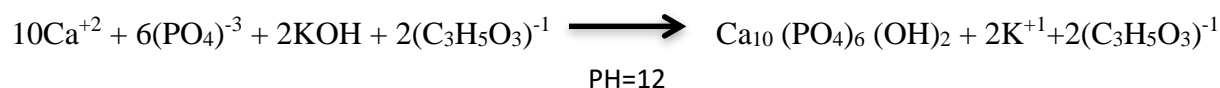
Equação resumida para síntese da HA:



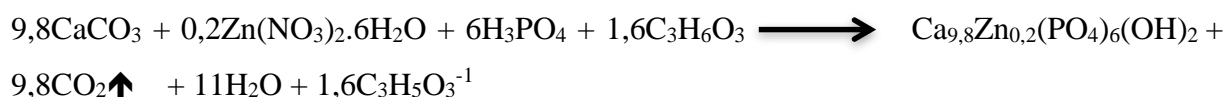
1ª Etapa da Equação:



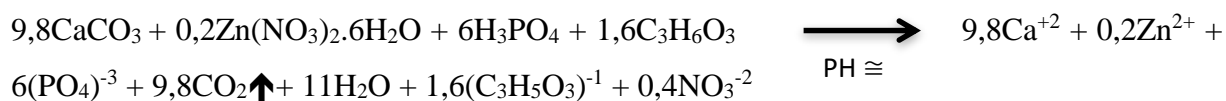
2ª Etapa da Equação:



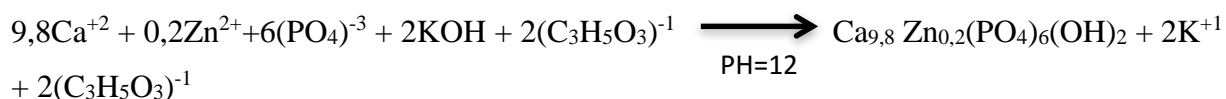
Equação resumida para síntese da Zn-HA:



1ª Etapa da Equação:



2ª Etapa da Equação:



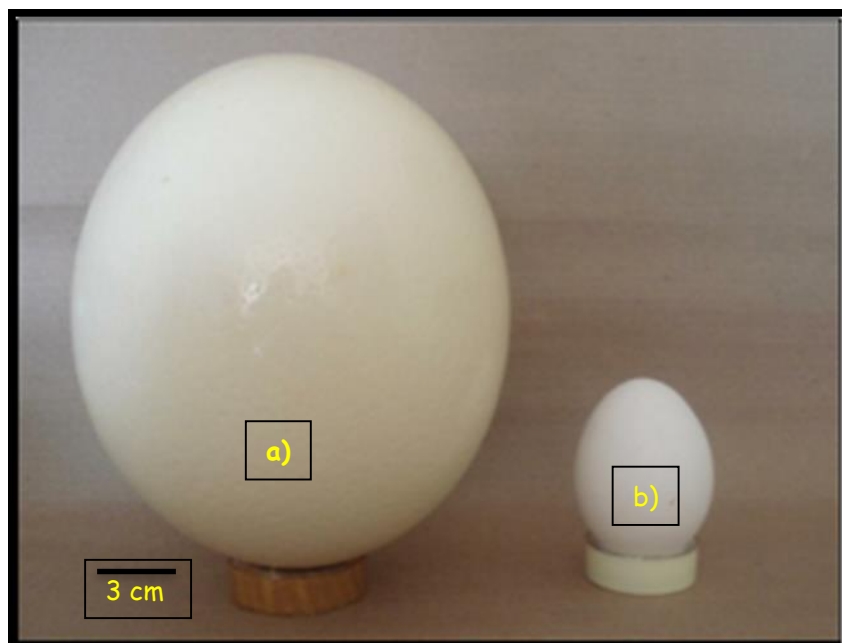


FIG. 1.1 Fotografia de ovos: (a) Avestruz e (b) Galinha, CALIMAN *et al.*, 2010.

1.2 OBJETIVO

O presente trabalho tem, como objetivo, investigar e apresentar a casca do ovo de avestruz como fonte de cálcio para obtenção da hidroxiapatita (HA) e Zinco-Hidroxiapatita (Zn-HA) sob a forma de pós e recobrimentos sobre placas de titânio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CASCA DE OVO DE AVESTRUZ COMO FONTE DE CÁLCIO PARA PRODUÇÃO DE HA

O avestruz é uma ave nativa da África que, ao longo dos anos, teve sua criação expandida para outros continentes. A ema, originária do Brasil, é o parente mais próximo do avestruz. Contudo, por não ter vocação para criação em cativeiro, a ema acabou não sendo considerada como fonte para pesquisa visando produção futura de cascas de ovos em escala comercial. A estrutiocultura teve início na década de 90 no Brasil, e hoje ocupa a segunda posição como produtor, atrás apenas da África do Sul. O fato de não termos criado o hábito de consumo desse ovo da mesma forma como é feito com o ovo da galinha, faz com que a coleta das cascas dos ovos de avestruz se dê de modo mais simplificado, em uma única origem.

Um avestruz fêmea é capaz de produzir aproximadamente 60 ovos por ano. Cada ovo de avestruz pesa em média 1,5kg (SUZAN *et al.*, 2007; CALIMAN *et al.*, 2010).

O ovo do avestruz possui características que garantem nutrição e segurança para o embrião fecundado. O cálcio presente na casca é uma fonte importante de nutriente para o embrião em desenvolvimento, enquanto que a espessura da casca, de aproximadamente 2mm, traz proteção contra predadores (DUPOIRIEUX, 1999).

Estruturalmente, a casca desse ovo é constituída por três camadas denominadas: cutícula (camada externa), camada esponjosa e camada lamelar. Todas elas apresentam íntima relação com proteínas constitutivas e proteoglicanas, que representam 2% do peso total da casca do ovo (RIVERA *et al.*, 1999; DURMUS *et al.*, 2003; 2007). Ainda, segundo os autores, essas proteínas ligadas aos cristais de calcita deverão exercer influência sobre a resistência mecânica da casca do ovo, através da criação de um compósito polímero-cerâmico, semelhante àquele encontrado na estrutura óssea, que permite rigidez ao tecido e ao mesmo tempo, garante boa tenacidade (FIG. 2.1). Dentre as proteoglicanas presentes na casca de ovo, a osteopontina é uma proteína que desempenha um papel significativo na calcificação dos osteoblastos, aumentando a adesão sobre a matriz e se ligando a hidroxiapatita.

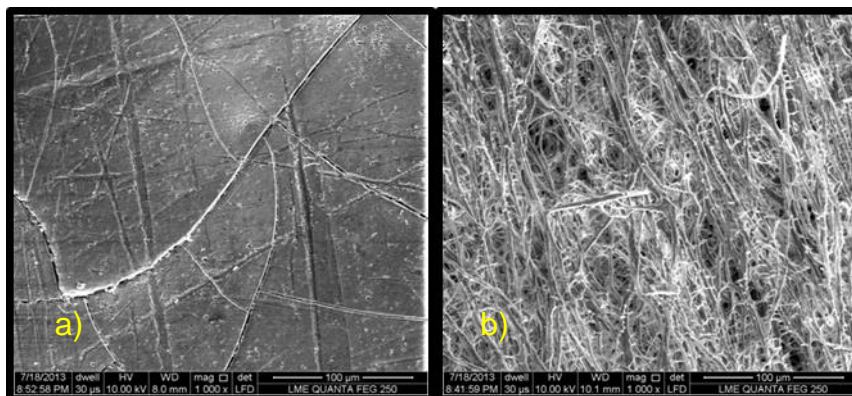


FIG. 2.1(a) Micrografia (MEV) da casca do ovo do avestruz e (b) membrana de revestimento interno do ovo, ambas com aumento de 1000x

Em relação à composição, segundo DUPOIRIEUX (1999), 97% da casca do ovo do avestruz é de origem mineral distribuídos entre carbonato de cálcio (97,4%), fosfato de magnésio (1,9%) e fosfato tricálcio (0,7%).

DURMUS *et al.*, 2003; 2007, demonstraram, em seus experimentos, que a própria casca do ovo, particulada para preenchimento, apresenta biocompatibilidade e capacidade de auxiliar no processo regenerativo de defeitos críticos criados em calotas cranianas de coelhos.

A utilização do CaCO_3 , constituinte predominante da casca do ovo de avestruz como fonte de cálcio na rota de síntese da hidroxiapatita, passou a ser considerada como alternativa para a construção de um biomaterial sintético (CALIMAN *et al.*, 2010).

Diversas são as vias possíveis para produção da hidroxiapatita. SHOJAI *et al.*, 2013 apresentaram cinco métodos para síntese da HA nanoestruturada. São eles:

- ✓ Método Seco – Apresenta um baixo custo de produção e menor complexidade quando comparado aos outros métodos. Contudo, resulta em HA com alta cristalinidade, baixa pureza e partículas grosseiras (PRAMANIK S. *et al.*, 2007; FAHAMI A. *et al.*, 2011)
- ✓ Método Úmido - A HA normalmente é produzida por precipitação. Permite maior controle sobre a morfologia e tamanho das partículas. Entretanto, é considerado um processo complexo, de difícil controle sobre a cristalinidade, demanda maior tempo para síntese de modo a dificultar uma produção em escala comercial (GRAHAM S. *et al.*, 1996; ZHANG Y. *et al.*, 2008). As vias mais comuns são: precipitação química, hidrólise convencional, método de sol-gel, método hidrotérmico, emulsão e método sonoquímico (ZHANGA G. *et al.*, 2011);

- ✓ Método de Alta Temperatura – Permite maior controle sobre o surgimento de fases indesejáveis, origina uma HA de alta cristalinidade e boa homogeneidade química. Nesse método são utilizadas as vias por combustão e pirólise (AIZAWA M., *et al.*, 1999; AYERS R.A., *et al.*, 2007);
- ✓ Método Biogênico – Para síntese da HA são utilizadas diversificadas fontes de insumos de origem natural, tais como resíduos de osso, cascas de ovo, exoesqueleto de organismos marinhos, biomoléculas e biomembranas. Há um grande interesse por parte da comunidade científica em ampliar os estudos nesse segmento em razão das características físico-químicas favoráveis da HA obtida através desse método (ZHAO H., *et al.*, 2008; SOBCZAK A., *et al.*, 2009);
- ✓ Método de Combinação – Busca através da combinação entre os diversos métodos e vias existentes, alcançar um melhor resultado com maior previsibilidade sobre o processo de síntese da HA. Os principais limitadores desse método são o aumento no custo operacional em razão do maior grau de complexidade envolvido (WANG J., *et al.*, 2009).

Neste estudo, foi utilizada a via úmida descrita por PRADO *et al.*, (2001). Nesta rota, adotou-se a casca do ovo do avestruz como fonte primária de cálcio, na forma de CaCO_3 .

2.2 OBTENÇÃO DE HA E ZN-HA A PARTIR DE RECOBRIMENTOS DE MONETITA/BRUXITA

BRANEMARK (1985) conceituou a osteointegração como sendo a conexão estrutural e funcional direta entre o tecido ósseo vivo e ordenado e a superfície do implante submetido à carga. Considerado até hoje, este conceito não tratou de um aspecto de grande importância para os resultados clínicos de longo prazo, no que diz respeito ao percentual de área osteointegrada necessária para garantir longevidade ao tratamento com implantes (SMITH *et al.*, 1989).

A partir da década de 90, empresas produtoras de implantes passaram a se preocupar com o conceito de aumento de área superficial para garantir maior quantidade de osteointegração. Começaram então a surgir os chamados tratamentos de superfície dos implantes e suas diferentes metodologias. O conceito de conexão direta entre o implante e o osso, preconizado

por BRANEMARK, precisou ser posto em discussão quando observou-se que o processo de osteointegração está intimamente ligado às reações químicas e interações biológicas ocorridas na superfície do implante, a partir do momento em que ele entra em contato com os fluidos corpóreos e com as células vivas (NOVAES, 2010). Ainda, segundo o autor, a qualidade da superfície (hidrofílica) deverá permitir uma melhor interação com o tecido circunvizinho. Materiais ditos bioativos como biovidros e cerâmicas de fosfato de cálcio (hidroxiapatitas) possuem afinidade química com as células ósseas, o que lhes confere a capacidade de desempenhar a osteocondutividade, acelerando a produção de osteoblastos e com isso, a osteointegração (KOKUBO, 1998).

A hidroxiapatita, até então, já conhecida como um biomaterial com grande potencial para uso em tratamentos envolvendo regeneração óssea, passou a ser considerada também em tratamentos de superfícies de implantes (YANG *et al.*, 2004). A técnica mais usual à época, denominada plasma-spray, apresentava alguns problemas que colocavam em risco a previsibilidade de sucesso no longo prazo utilizando implantes com esse tipo de tratamento superficial. Dentre esses problemas, podem ser citados, a alta temperatura para obtenção da HA, sua decomposição química, ausência de interface química entre o revestimento e o substrato, espessura do revestimento e as trincas no revestimento. Tais problemas contribuíram para desacreditar essa técnica.

A espessura média de recobrimento alcançado pela técnica do plasma-spray é de aproximadamente 200 μm em função do emprego de altas temperaturas para a realização da técnica (em torno de 3000°C), segundo NOVAES (2010). A deposição de um composto intermediário, monetita (CaHPO_4) ou mesmo a bruxita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), em um pH de aproximadamente 5, e sua subsequente conversão em HA, dá origem a um recobrimento com espessura que poderá variar entre 10 e 30 μm . Essa menor espessura deverá proporcionar maior resistência mecânica para o recobrimento, segundo NIMB *et al.*, (1993); YANG *et al.*, (2004).

À temperatura ambiente, em solução aquosa, a estabilidade do fosfato de cálcio poderá ser determinada de acordo com o pH do meio:

- a) Em $\text{pH} \leq 5$ a monetita (CaHPO_4) deverá prevalecer como composto mais estável. De acordo com o teor de água, a bruxita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) poderá surgir;
- b) Em $5 < \text{pH} < 9$, o fosfato octacálcio ou HA cálcio deficiente irão prevalecer: $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$;
- c) Em $\text{pH} > 9$, a HA $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ deverá ser a fase estável.

Após o recobrimento em pH ácido, a conversão da monetita/bruxita pode então ser realizada, bastando que o material recoberto com monetita seja imerso em uma solução 0,1M de NaOH, ou KOH, ou ainda NH₄OH a 60⁰C por 48h elevando o pH para aproximadamente 12 (PRADO *et al.*, 2001).

2.3 JUSTIFICATIVA PARA A INCORPORAÇÃO DO ZINCO À HIDROXIAPATITA

Segundo NOVAES JR. *et al.*(2002), um biomaterial não deve causar resposta inflamatória exacerbada, induzir respostas antigênicas, tão pouco carcinogênicas. Assim, poderá ser considerado biocompatível. Pela incorporação de determinados elementos é possível alterar as propriedades estruturais da hidroxiapatita e dessa forma, modular a resposta tecidual (WEBSTER *et al.*, 2004).

Existem elementos químicos que, dependendo da dose, poderão proporcionar efeitos positivos ou deletérios ao indivíduo, e a essa característica é dado o nome de efeito tóxico (FIG. 2.2). Cerca de 24 elementos são considerados essenciais para a vida de um mamífero: H, C, N, O, F, Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, Sn, e I. Obviamente não há consenso absoluto em relação a essa lista, contudo, sabe-se que cada um desses elementos, em doses não tóxicas, é relevante para o equilíbrio fisiológico (RONCONI e SADLER, 2006).

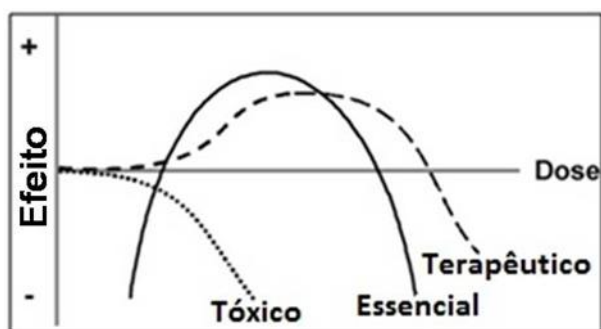


FIG. 2.2 Diagrama de BERTRAND demonstrando a relação entre o efeito tóxico e terapêutico dos elementos essenciais

Dentre esses elementos, o zinco, que é um cátion divalente, é considerado um mineral essencial, ou seja, precisa estar presente no organismo em quantidade suficiente para desempenhar funções importantes de modo a contribuir para sua homeostase. É considerado, dentre os metais de transição, o segundo íon com maior concentração no organismo humano (TAB. 2.1), ficando atrás apenas do ferro (RONCONI e SADLER, 2006). Algumas funções

relacionadas à presença do zinco são conhecidas, classificadas como catalíticas e estruturais, tais como a estimulação à atividade osteogênica e a inibição da atividade osteoclástica (MOONGA e DEMPSTER, 1995). Cerca de 10% das proteínas codificadas pelo genoma humano (o proteoma) potencialmente têm sequências de ligação ao zinco, o que significa que o zinco é fundamental para fisiologia dessas proteínas (ANDREINI *et al.*, 2006).

TAB. 2.1 Teor de zinco em tecidos e órgãos humanos e fosfatos de cálcio. Adaptado de ITO *et al.* 2005

Órgãos e tecidos humanos	Concentração
Todo o corpo	28 - 33 ppm
Epiderme	70,5 ppm
Derme	12,6 ppm
Músculo	38 - 57 ppm
Osso	125 - 250 ppm
Plasma sanguíneo (Homem)	0,72 - 1,21 ppm
Plasma sanguíneo (Mulher)	0,69 – 1,15 ppm
Próstata	102 ppm
Rim	52 – 75 ppm
Fosfatos de cálcio	
β -tricálcio	0 – 6,17%
α -tricálcio	0 – 1,26% (1450 ⁰ C)
Hidroxiapatita sinterizada	0 – 0,13% (1150 ⁰ C)
Apatita pobremente cristalizada	0 – 1,1% (temp. ambiente)

A associação do zinco à HA na síntese da Zn-HA contribui para formação de um biomaterial com menor cristalinidade, o que é interessante em processos de regeneração óssea, onde a remodelação e substituição do biomaterial por tecido ósseo nativo são passos fundamentais (ITO *et al.*, 2005). KAWAMURA *et al.*, 2000, verificaram a influência da ZnTCP/HA (biomaterial compósito de fosfato tricálcio contendo zinco e hidroxiapatita) na

formação óssea em defeitos críticos criados em fêmur de coelhos. Constatou-se um aumento de 51% na formação de um novo osso comparando-se Zn-HA com 0,316% em peso de zinco, em comparação a TCP/HA sem zinco. SOGO *et al.* (2005), verificaram um aumento na proliferação de osteoblastos com Zn-HA, quando comparados a HA em ensaios *in vitro*. Além disso, os autores atentaram para uma relação molar frequente de (Ca+Zn)/P em torno de 1,67.

2.4 TOXICIDADE

Segundo PRESGRAVE, *et al.* (2010), um método alternativo aos ensaios “*in vivo*”, deve demonstrar com segurança a possibilidade de substituir, reduzir ou refinar a realização de experimentos com animais.

O teste de toxicidade pode ser realizado a partir de experimentos com ovos de galinha fecundados (VALDES *et al.*, 2002). A resposta inflamatória e vascular a partir da deposição do biomaterial sobre a membrana corioalantóide (CAM) do ovo permitirá verificar uma reação característica de toxicidade ou não (FIG. 2.3). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o uso da membrana corioalantóide para análise de toxicidade é considerado um teste “*in vitro*” (ANVISA, 2014).

A posição assumida pelo Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA) durante sua 23^a reunião ordinária realizada em março de 2014 foi aprovada a proposta da câmara de materiais alternativos substitutivos que sugere a substituição progressiva e segura dos testes com animais por materiais alternativos validados. Esse parecer do CONCEA, somado às dificuldades que envolvem a aplicação da metodologia “*in vivo*” e custos financeiros necessários, sugerem a busca e a indicação de experimentos mais simples, menos dispendiosos e invasivos, porém tão eficazes quanto àqueles tradicionais (VALDES *et al.*, 2002).

A biocompatibilidade pode ser entendida como a capacidade do biomaterial desempenhar sua função em um organismo vivo sem induzir respostas adversas a sua presença (RATNER *et al.*, 2004). Segundo DE GROOT *et al.*, 1990, biomateriais baseados em fosfatos de cálcio apresentam propriedades de biocompatibilidade.

Para verificação da biocompatibilidade, o teste de toxicidade corresponde a uma primeira etapa reconhecida pelo Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*) através da ISO 10993 (INTERNATIONAL STANDARD, 1992).

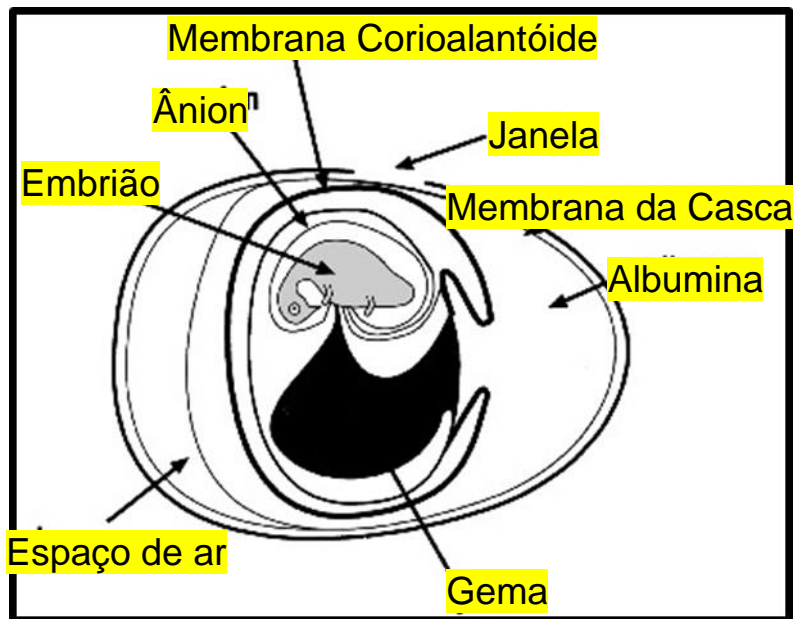


FIG. 2.3 Estruturas anômicas de um ovo de galinha fertilizado, evidenciando a localização da membrana corioalantóide e da janela de 1,5cm² aberta na casca do ovo para realização do experimento.

Adaptado de VALDES *et al.*(2002)

2.5 BIOATIVIDADE

De acordo com a conferência de consenso ESB de 1987, um material bioativo é “aquele que foi projetado para induzir a atividade biológica específica” (WILLIAMS, 1987). KOKUBO e TAKADAMA, 2006, apontaram como requisito essencial para um material se ligar ao osso vivo, a formação de apatita semelhante a osso (“*bone-like apatite*”) sobre sua superfície, quando implantados no organismo vivo. Ainda de acordo com os autores, a formação da apatita pode ser reproduzida em um fluido corpóreo simulado (SBF), com concentrações de íons quase iguais às do plasma sanguíneo humano. Assim, de acordo com a definição de bioatividade de Kokubo e Takadama, um material bioativo permite a formação de apatita óssea sobre sua superfície, ao ser imerso em uma solução de soro semelhante àquela que compõe o fluido corpóreo (FIG. 2.4).

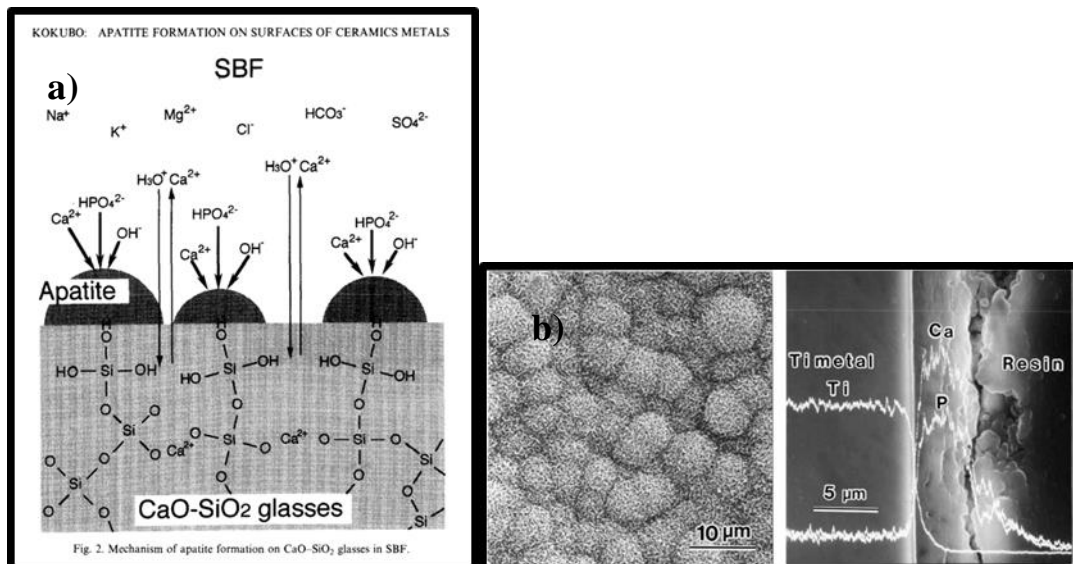


FIG. 2.4(a) Ilustração de Bioatividade em Fluido Corpóreo Simulado (SBF). KOKUBO,1998. (b)Micrografia eletrônica (esquerda) e corte transversal (direita), demonstrando a deposição da hidroxiapatita por bioatividade. Adaptado de KOKUBO e TAKADAMA, 2006.

Um bom entendimento a respeito da bioatividade e suas implicações nos processos de remodelação óssea (*turn-over*), osteointegração de biomateriais e regeneração em defeitos ósseos críticos permite que sejam estudados e desenvolvidos biomateriais cada vez mais assertivos e promissores em relação à melhora na qualidade e previsibilidade das terapias ósseo reconstitutivas.

O sucesso na implantodontia se caracteriza pelo evento da osteointegração. Contudo, para que ela seja alcançada, o implante deverá passar primeiramente pela estabilização primária, garantida por um íntimo contato físico entre implante e osso. É esperado que essa estabilidade inicial seja perdida, por conta de uma remodelação óssea nas áreas de contato com o implante. A conquista da estabilidade secundária promovida por uma interação química e biológica entre osso e implante deverá garantir o sucesso do implante em longo prazo, permitindo que o mesmo possa ser submetido a cargas mastigatórias (FIG. 2.5). Biomateriais bioativos tendem a diminuir o espaço de tempo existente entre a perda da estabilidade primária e ganho de estabilidade secundária. Por essa razão, tem sido consenso entre pesquisadores e a indústria, o desejo em se buscar combinações que tornem o processo de osteointegração cada vez mais simples, rápido, eficaz e duradouro. Nesse sentido, uma conjugação perfeita entre o material do implante (titânio) + projeto do implante + tratamento superficial do implante + associação a fatores de indução (proteínas morfogenéticas ou células) aponta para aquela que poderá ser a receita perfeita nessa

construção (OSTAMN *et al.*, 2006; ROCHA e ELIAS, 2010; ROKN *et al.*, 2011; JAVED *et al.*, 2013).

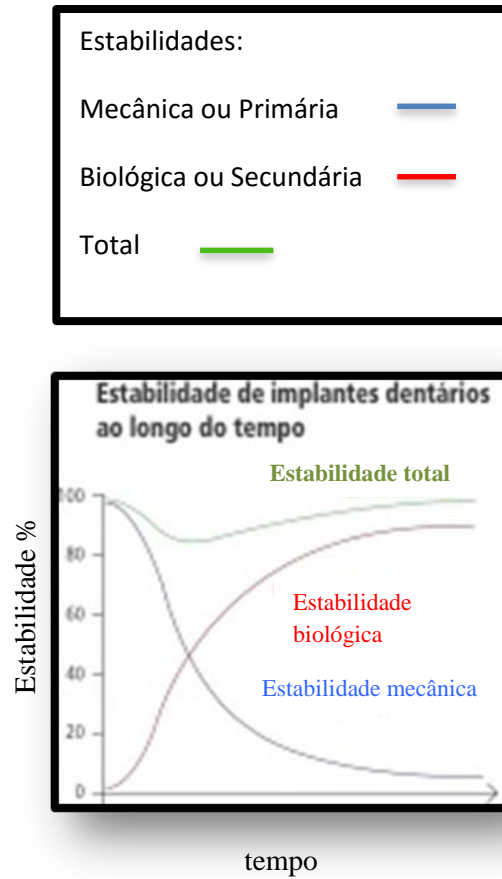


FIG. 2.5 Gráfico de estabilidades (mecânica, biológica e total). BOGAERDE, 2015

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Em um trabalho preliminar, FERREIRA *et al.* (2014), apresentaram a casca do ovo do avestruz como uma fonte de CaCO_3 para síntese de hidroxiapatita seguindo o protocolo descrito por PRADO *et al.*, (2001), que difere da rota apresentada por CALIMAN *et al.*, (2010). Os materiais utilizados foram:

- H_3PO_4 (ácido orto-fosfórico, Merck[®], com 85% de concentração)
- $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (ácido lático, Vetec[®], com 98% de pureza)
- CaCO_3 (obtido a partir da maceração da casca do ovo de avestruz)

A análise por difração de raios X confirmou a presença de 100% de calcita no pó da casca de ovo de avestruz (FIG. 3.1). Assumiu-se 100% de pureza.

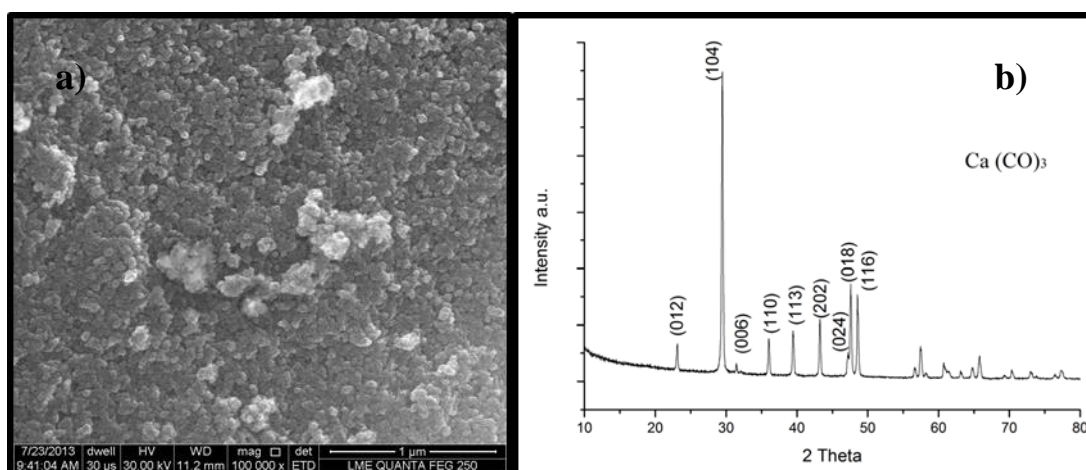


FIG. 3.1 Eletromicrografia (MEV) do pó da casca do ovo de avestruz (a) e respectivo padrão de difração de raios X (b)

Para o presente trabalho, as amostras de hidroxiapatita (HA) e de hidroxiapatita contendo zinco (Zn-HA) foram sintetizadas em laboratório, seguindo a rota de precipitação estabelecida por PRADO *et al.*, (2001), com substituição de Ca(OH)_2 por CaCO_3 , além da incorporação de Zn.

Os processos de síntese tanto da HA quanto da Zn-HA foram segmentados em duas etapas, de modo a permitir a realização de experimentos cujas reações esperadas estavam condicionadas à fase do processo de síntese. Desse modo, pode-se dividir e elencar os

experimentos de acordo com as seguintes fases: Síntese de pós de hidroxiapatita com e sem Zn, e recobrimentos de HA com e sem Zn sobre placas de titânio.

3.1 PREPARO DA SOLUÇÃO PRECURSORA

Com o objetivo de obter um material com razão Ca/P igual a 1,67, foram preparadas soluções com concentrações 0,5M de Ca^{+2} e 0,3M de $(\text{PO}_4)^{-3}$ e 1M de ácido láctico, o que equivale a uma razão ($\text{Ca/P} = 0,5/0,3=1,67$). A FIG. 3.2 ilustra a solução preparada.

A síntese da HA, ocorreu de acordo com o protocolo abaixo:

- 12,5g de pó de casca de ovo de avestruz obtidos por maceração em grau e pistilo. Foi utilizada uma peneira com 0,250mm de abertura para obtenção de um pó homogêneo e com partículas finas.
- O material foi disperso em 250ml de água deionizada sob agitação em um Becker com o intuito de formar uma dispersão;
- Foi preparada uma solução 1Molar de ácido láctico diluindo 25ml do ácido em 225ml de água deionizada. Em seguida, a solução de ácido láctico foi adicionada à solução contendo o pó da casca do ovo ainda sob agitação;
- Para obtenção de 250ml de uma solução 0,3Molar de ácido fosfórico (H_3PO_4), foram diluídos 5ml do ácido em 245ml de água deionizada. A solução com 250ml contendo ácido fosfórico foi então gotejada lentamente à solução precursora, com o objetivo de atingir um pH próximo a 3 deixando sob agitação por 24h;
- Nesta condição, a solução precursora pôde ser separada em duas porções. Uma porção contendo 250ml da solução, serviu para o recobrimento das placas de titânio. A outra porção contendo 500ml seguiu a rota da síntese prevista nessa técnica, recebendo KOH a 1Molar em quantidade suficiente para elevar o pH da solução a 12, mantida sob agitação por 2h e em seguida, mais 46h em repouso para fins de precipitação da hidroxiapatita.

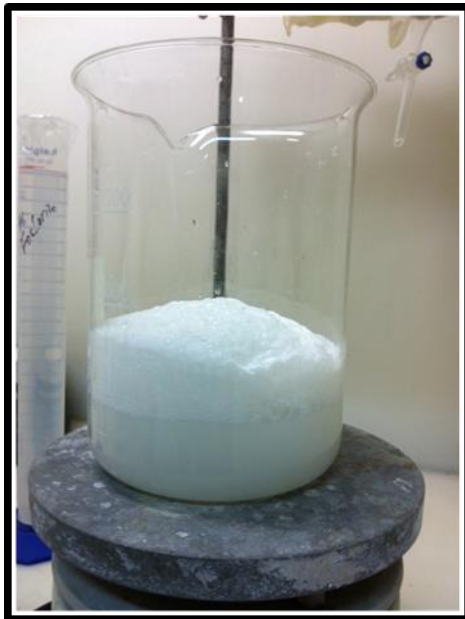
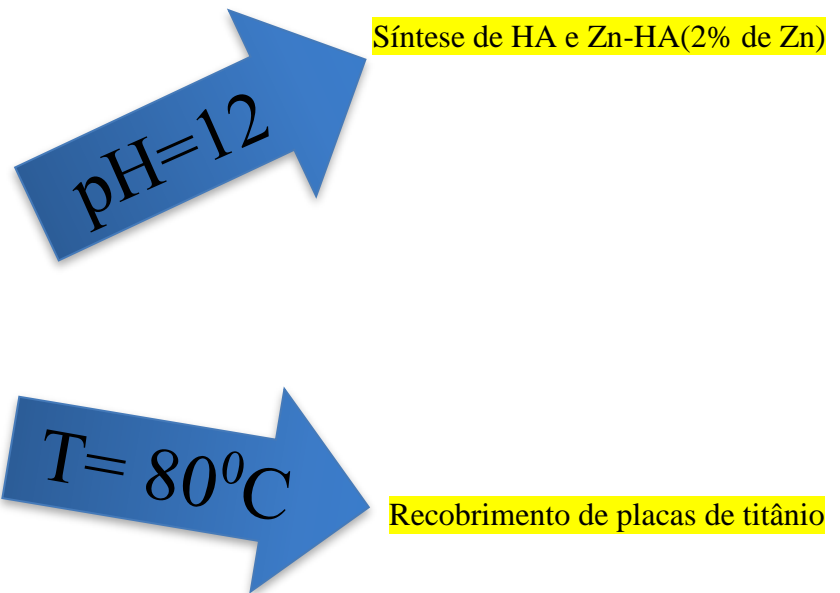


FIG. 3.2 Preparo da solução precursora, após adição de ácido láctico.



3.2 PRECIPITAÇÃO DO PÓ DE HA

Para alcançar e manter por 48h o pH em torno de 12 de modo a permitir a precipitação da hidroxiapatita (HA), foram acrescentados aproximadamente 350ml de solução 1Molar de KOH a 500ml da solução precursora. Após essas 48h com o pH estabilizado em 12, uma sequência de 3 filtrações seguidas de ressuspensão em água deionizada foi realizada até que o pH da solução, na saída do filtro, estivesse neutralizado ($\text{pH} = 7$), garantindo a eliminação do KOH nas lavagens sucessivas.

Uma parte do pó, obtido por precipitação, foi também submetido à difração de raios X, demonstrando a presença de hidroxiapatita (FIG. 3.3). Outra parte do pó obtido pela precipitação foi submetido à espectroscopia por dispersão de energia (EDS), onde foi observada a presença do Ca do P como principais elementos presentes (FIG. 3.4)

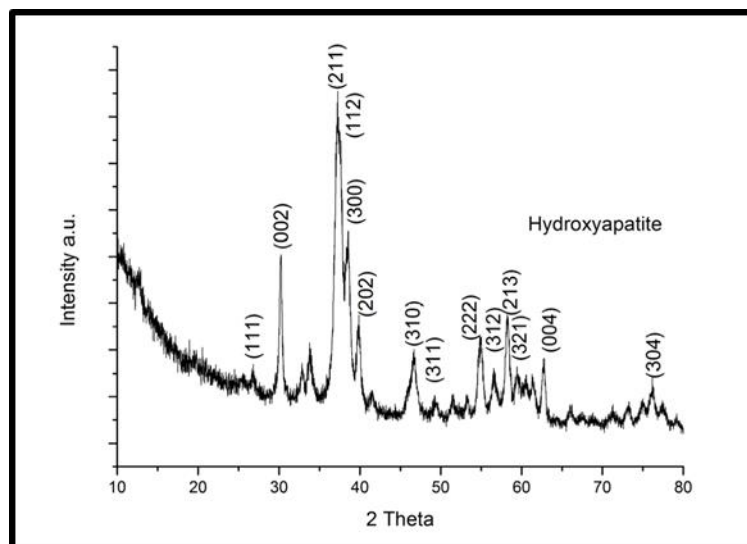


FIG. 3.3 Difração de raios X do Pó verde (sem tratamento térmico).

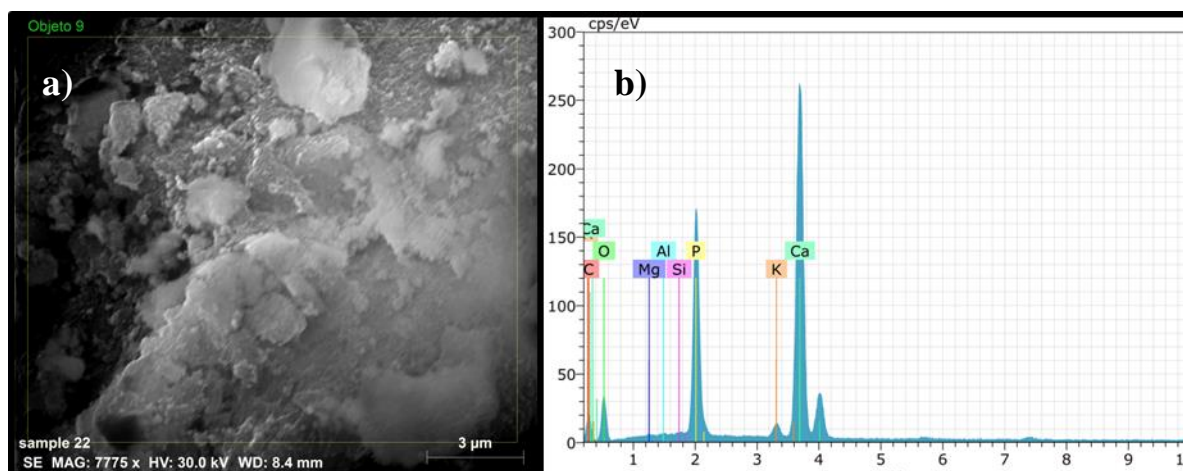


FIG. 3.4 Eletromicrografia (MEV) do pó verde (sem tratamento térmico) do ovo de avestruz (a) e respectivo padrão de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (b)

3.3 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA CONTENDO ZINCO (2%)

Para síntese da Zn-HA, foi seguida a mesma sequência de eventos previstos para obtenção da solução precursora na síntese da HA. Foi introduzido o nitrato de zinco $Zn(NO_3)_2$ com 98% de pureza na reação para obtenção da Zn-HA. Por não se tratar de um composto com 100% de pureza e por termos o objetivo de incorporar 2% de zinco a HA, se fez necessário realizar um

cálculo estequiométrico prévio para se estabelecer a massa adequada a ser utilizada de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:

1. Preparo da solução precursora com zinco a 2%



2. Conversão para massa

Dados:

$$\text{PM CaCO}_3 = 100,09 \text{ g/mol}$$

$$\text{PM Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 297,47 \text{ g/mol}$$

$$\text{Ca}^{+2} \longrightarrow 0,49 \text{ mols} \times 100,09 \text{ g/mol} = 49,0441 \text{ g}$$

Considerando 98% de pureza:

$$(49,0441 \text{ g} \times 100) : 98 = 50,045 \text{ g de CaCO}_3$$

$$\text{Zn}^{+2} \longrightarrow 0,01 \text{ mols} \times 297,47 \text{ g/mol} = 2,9747 \text{ g}$$

Considerando 98% de pureza:

$$(2,9747 \text{ g} \times 100) : 98 = 3,0354 \text{ g de Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$$

Os demais reagentes, participaram com as mesmas concentrações utilizadas na síntese da HA. Os pós de HA e Zn-HA foram divididos em 4 porções para cada uma das sínteses. Uma porção de HA e outra de Zn-HA não foram submetidas a tratamento térmico (pó verde). Essas porções foram submetidas às análises por DRX, FTIR e EDS para confirmar o produto obtido através da rota de síntese descrita. As outras 3 porções de cada síntese, passaram por tratamentos térmicos distintos nas temperaturas de 700⁰C, 900⁰C e 1100⁰C respectivamente, por 2 horas. O forno EDG do laboratório de cerâmicas do IME foi utilizado para realização desses tratamentos térmicos, a uma taxa de aquecimento de 5⁰C por minuto. Em seguida, cada uma dessas amostras tratadas termicamente foi analisada por DRX e FTIR para identificação das fases presentes. As amostras submetidas aos tratamentos térmicos foram analisadas ainda em relação a bioatividade, toxicidade em membranas corioalantóides e análise química, conforme descrito em cada técnica de análise realizada neste trabalho.

3.4 RECOBRIMENTO DAS PLACAS DE TI COM SOLUÇÃO PRECURSORA

Volume de 250ml das soluções precursoras de HA e Zn-HA foram destinados ao recobrimento de 6 placas de titânio, formando-se grupos, definidos em função do tempo de imersão na solução:

- a) 1h
- b) 2h
- c) 4h

Após cada intervalo de tempo, uma amostra de cada grupo, foi removida, lavada em água ultra pura e levada a uma estufa, à temperatura de 60⁰C por 24 horas para secagem. As placas recobertas foram submetidas às análises em MEV-EDS, FTIR e DRX. Os resultados foram confrontados para verificar possíveis diferenças entre as soluções precursoras utilizadas e a influência dos diferentes tempos de imersão na qualidade final dos recobrimentos.

Preparo da solução de KOH a 0,1M e conversão dos recobrimentos com monetita/bruxita em HA e Zn-HA:

- 1 mol de KOH = 56,11g/mol de KOH em 1litro de água ultrapura, o que corresponde a 1Molar de KOH.
- 0,1Molar de KOH = 5,611g/mol de KOH em 1 litro de água ultrapura.

As placas ficaram imersas em solução de KOH 0,1M em banho maria a uma temperatura de 60⁰C por um período de 48h. Após esse período, as placas foram lavadas com água ultra pura e secadas em estufa à 60⁰C por 24h, concluindo o processo de conversão da monetita/bruxita em HA e Zn-HA.

As placas recobertas com monetita/bruxita, convertidas em HA e Zn-HA foram igualmente submetidas às análises em MEV-EDS, FTIR e DRX.

3.5 TESTE DE TOXICIDADE

O teste de toxicidade foi realizado em conjunto por dois laboratórios especializados em análises de materiais aviários. A primeira etapa envolveu a seleção dos ovos fertilizados livres

de patógenos, a incubação desses ovos e a exposição das membranas corioalantóides. Posteriormente as amostras de pó foram depositadas, seguindo uma nova incubação. A remoção do fragmento de interesse da membrana corioalantóide e acondicionamento de maneira adequada para realização do exame histopatológico, foram conduzidos gentilmente pelo Dr. Márcio Botrel, Médico Veterinário do Laboratório Avícola Uberlândia-MG. Nessa primeira etapa, foram preparadas amostras de pó de HA e Zn-HA verdes e tratadas termicamente a 700^oC, 900^oC e 1100^oC. O experimento foi realizado em triplicata, num total de 24 ovos de frango SPF (livres de patógenos específicos, do inglês *Specific Pathogen Free*) férteis. Estes foram selecionados através de ovoscopia (técnica que permite verificar a fecundação, a idade e possíveis defeitos presentes em ovos) e marcados no limite inferior da câmara de ar.

Após 11 dias de incubação, em capela de fluxo laminar, dois pequenos orifícios foram feitos na casca de cada um dos ovos: um, acima da marca feita a lápis, e outro no mesmo alinhamento mais ou menos no meio do plano maior de cada ovo. Utilizando uma agulha de insulina, ovoscópio (aparelho emissor de luz que permite realizar a ovoscopia), uma mangueira fina de silicone (para criar uma pressão negativa por aspiração), foi criada uma falsa câmara de ar em todos os ovos com o intuito de destacar a membrana corioalantóide da membrana da casca. Com auxílio de uma broca (drill) e respectivos implementos, uma janela de aproximadamente 1cm² foi aberta em cada ovo, exatamente acima do ponto onde foi criada a falsa câmara de ar, expondo desta maneira uma área de membrana corioalantóide maior do que 1cm².

Aproximadamente 70 mg de cada amostra de pó de HA e Zn-HA, previamente esterilizadas em autoclave à 121^oC por 20 minutos, foram depositadas sobre a membrana corioalantóide, com auxílio de um pequeno dispositivo estéril. Os ovos foram fechados com auxílio de uma fina camada de plástico (polipropileno) e incubados novamente. Após 07 dias da inoculação, os ovos foram retirados da incubadora, com aproximadamente 21 dias de gestação. Todas as membranas corioalantóides dos ovos foram retiradas, respectivamente identificadas, imersas em formol a 10% e enviadas para análise histopatológica (FIG. 3.5 a FIG. 3.13).



FIG. 3.5 Demarcação da janela para abertura da casca.

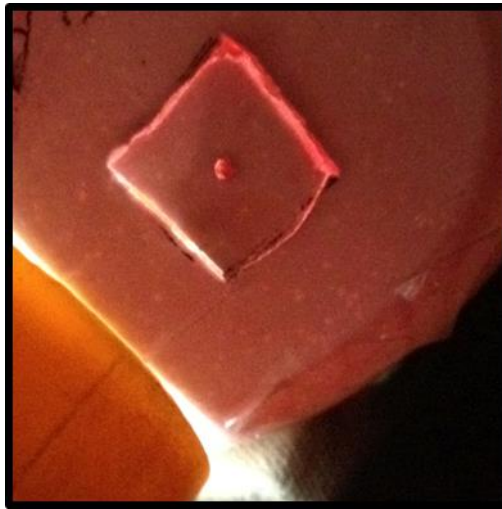


FIG. 3.6 Exame do ovo com auxílio de um ovoscópio.

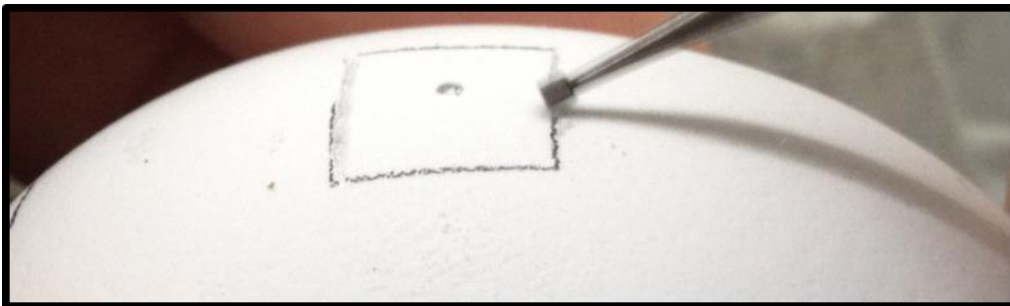


FIG. 3.7 Abertura da janela no ovo.

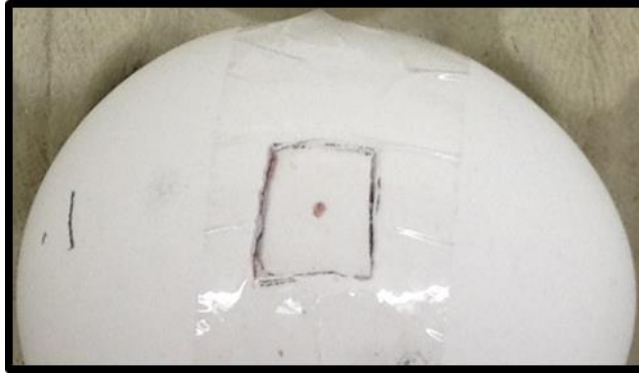


FIG. 3.8 Janela fechada com auxílio de uma fita adesiva.

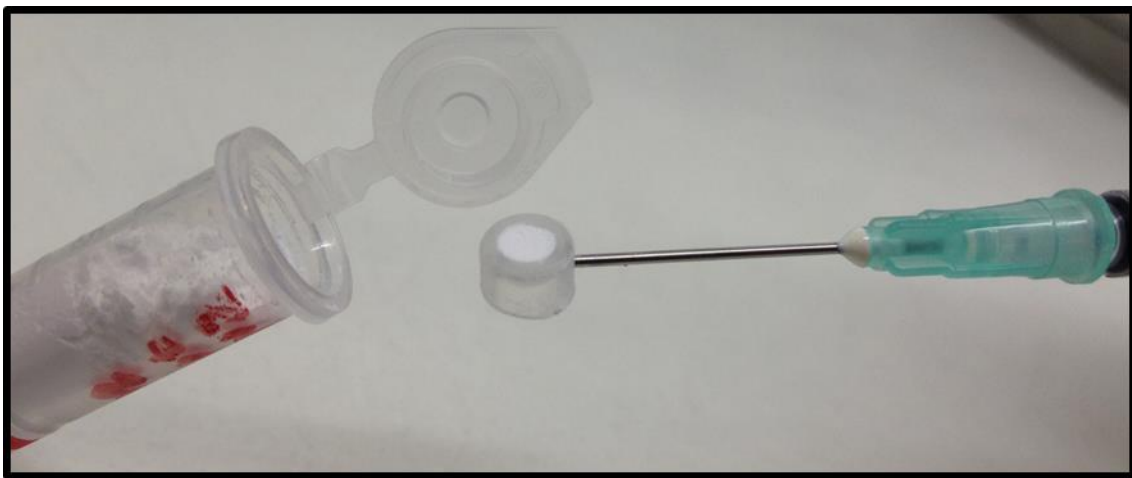


FIG. 3.9 Coleta da amostra para aplicação sobre a membrana corioalantóide



FIG. 3.10 Aplicação do pó sobre a membrana corioalantóide.



FIG. 3.11 Vista aproximada do pó dispersado sobre a membrana corioalantóide



FIG. 3.12 (a) Imagem do pó aglutinado sobre a membrana após 11 dias da aplicação. (b) Excisão da membrana corioalantóide para análise histopatológica



FIG. 3.13 Fragmento da membrana corioalantóide imersa em formol 10% para análise histopatológica

A segunda etapa do experimento, correspondente à análise histopatológica das membranas corioalantóides com conteúdos de HA e Zn-HA, foi conduzida, gentilmente, pela Dra. Rosecler Alves Pereira, Médica Veterinária, no Laboratório de Patologia Veterinária RoseVetbr em Canoas-RS.

Para a realização dessa análise, cada membrana corioalantóide foi coletada e numerada por pessoa não vinculada ao experimento, sendo esse número revelado após o término de todos os exames, para leitura cega. As membranas foram fixadas em formol a 10%, desidratadas, clarificadas e impregnadas em parafina, seccionadas a 5 μ m e coradas por hematoxilina e eosina para análise pelo método histoquímico.

3.6 TESTE DE BIOATIVIDADE

Para realização da análise de bioatividade, foram confeccionadas 3 pastilhas a partir do pó de HA verde e 3 pastilhas a partir do pó de Zn-HA verde. Cada pastilha foi prensada, utilizando 300mg de pó, pesados previamente. A prensagem foi feita através de carga uniaxial utilizando

uma prensa SKAY no laboratório de cerâmica do IME (Instituto Militar de Engenharia). Em seguida, as pastilhas foram tratadas termicamente a 700^oC, 900^oC e 1100^oC.

As pastilhas foram submetidas à análise por MEV para identificação de fases antes e após o ensaio de bioatividade, de modo a evidenciar as alterações decorrentes do experimento, correspondentes à deposição de HA, o que efetivamente caracteriza a bioatividade.

O comportamento *in vivo* de cerâmicas bioativas é função da sua composição química, das fases presentes e do histórico de processamento, onde reações de superfície ocorrem mediante interação com o tecido (KNABE *et al.*, 2008). A liberação de íons de cálcio e fosfato por esses materiais, segundo diversos autores, gera um potencial bioativo e até mesmo capacidade osteoindutiva em uma biocerâmica (BOYDE *et al.*, 1999; ZAPANTA *et al.*, 2002; DE BRUJIN *et al.*, 2008; YUAN *et al.*, 2010).

O meio utilizado neste experimento para o teste de bioatividade foi o McCoy, conforme descrito no ANEXO deste trabalho, citado por diversos autores como um meio simulador de fluido corpóreo capaz de induzir a deposição de HA sobre uma superfície bioativa em condições de tensão de CO₂ e temperatura adequadas. THOUVEREY C. *et al.*, 2009, avaliaram o mecanismo da biogênese de microvesículas celulares que participam na síntese de proteínas da matriz extracelular e na mineralização da matriz. Esses autores realizaram um ensaio com o intuito de verificar a capacidade de mineralizar as microvesículas. Para isso, observaram, a partir de cultivo celular em meio de McCoy, a produção de nódulos aparentes de cálcio, e com isso, a bioatividade.

LÁZARO G.S. *et al.*, 2014, puderam certificar o potencial bioativo em biovidros lançando mão da imersão em meio de McCoy por 7 dias, em condições de pH, temperatura e tensão de CO₂ controlados (FIG. 3.14). O mesmo protocolo para o ensaio de bioatividade das pastilhas foi replicado para as placas de titânio recobertas por 4h, com e sem a incorporação de 2% de zinco no processo de síntese, bem como em placas recobertas antes e após a conversão em HA e Zn-HA (FIG. 3.15).

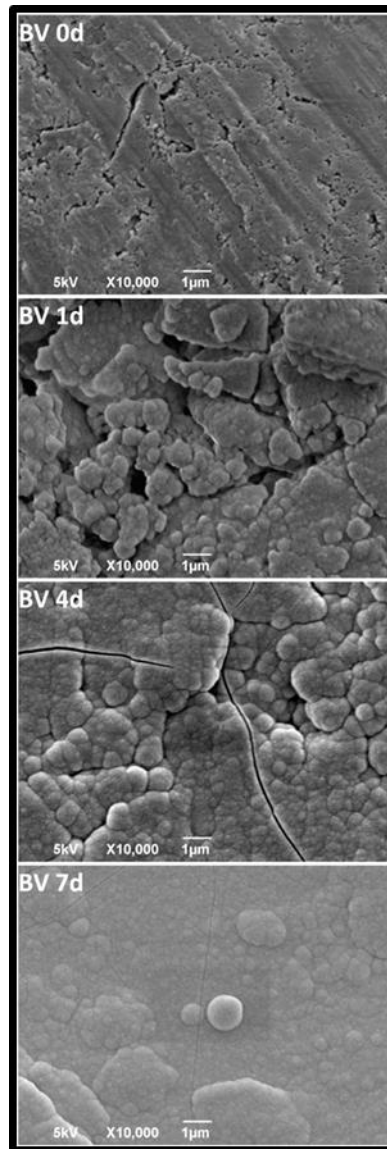


FIG. 3.14 Eletromicrografias (MEV) da superfície de biovidros antes e após 7 dias de imersão em meio de McCoy. LÁZARO G.S. *et al.*, 2014

As amostras foram esterilizadas em autoclave (para não contaminar o meio de cultura) e em seguida imersas em 20ml de meio McCoy individualmente. Foram então acondicionadas em uma incubadora de CO₂ Panasonic, modelo COM-19AIC-PA a temperatura de 37⁰C e tensão de CO₂ de 5% por 14 dias. Após esse período, as pastilhas foram retiradas, novamente submetidas a esterilização em autoclave para então serem analisadas por MEV (FIG. 3.15 a FIG. 3.20).



FIG. 3.15 Placas de titânio recobertas por 4h com e sem Zn, antes e após conversão

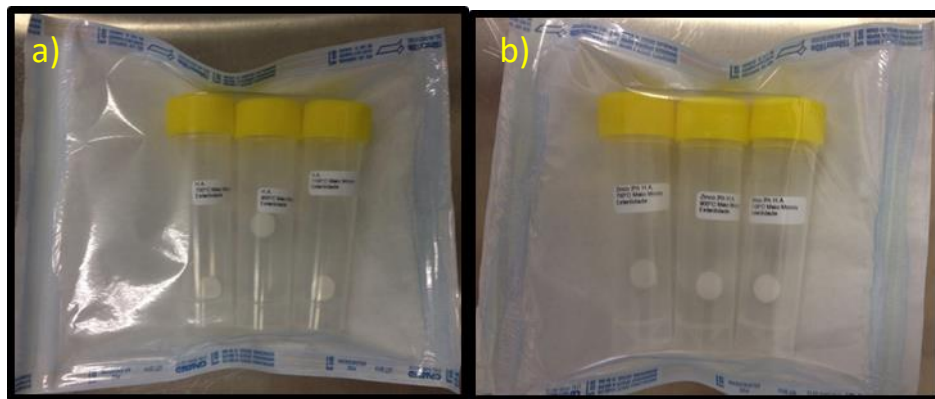


FIG. 3.16 Pastilhas de HA(a) e Zn-HA(b) tratadas termicamente (700°C, 900°C, 1100°C) e esterilizadas em autoclave.



FIG. 3.17 Meio de Cultura de McCoy

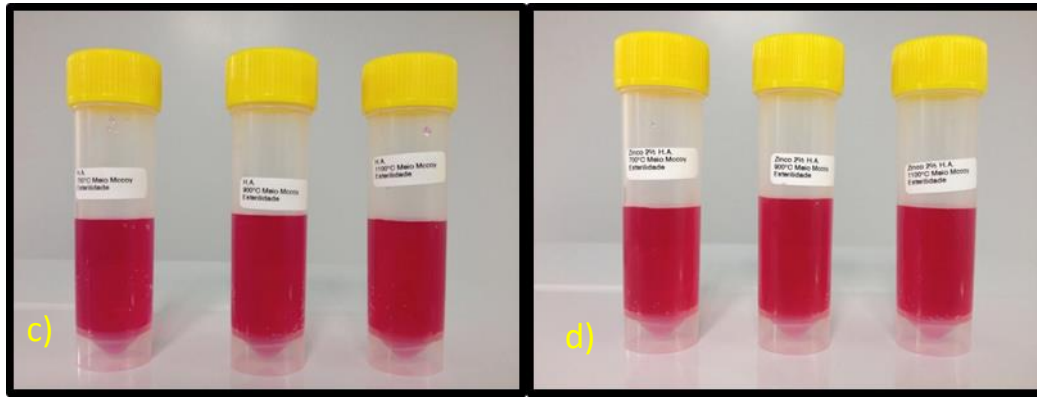


FIG. 3.18 Pastilhas de HA(c) e Zn-HA(d) tratadas termicamente (700^oC, 900^oC, 1100^oC), imersas em meio de McCoy para o ensaio de bioatividade



FIG. 3.19 Incubadora Panasonic calibrada para realização do ensaio de bioatividade (e,f)



FIG. 3.20 Controle de temperatura e tensão de CO₂ da incubadora.

3.7 ANÁLISE QUÍMICA

3.7.1 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (FRX)

A análise química da amostra de hidroxiapatita para avaliar as concentrações de Ca e P foi realizada no laboratório de química analítica do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), através da técnica de fluorescência de raios X (FRX). Buscou-se verificar o comportamento da razão estequiométrica $\text{Ca}^{+2}/\text{P}^{-3}$ e $(\text{Ca}^{+2} + \text{Zn}^{+2})/\text{P}^{-3}$, respectivamente em amostras de pó de HA e Zn-HA, tratadas termicamente a 1100°C.

3.7.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA

O equipamento utilizado para analisar o Cálcio e o Zinco nas amostras de HA e Zn-HA foi o Espectrofotômetro de Absorção Atômica (AAS) - modelo 6800 - SHIMADZU.

Realizada no laboratório de química analítica do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), a preparação das amostras foi feita através da solubilização com HNO_3 . Para isso, foi pesado 0.1g da amostra para 100ml da solução ácida a 5%, em sua primeira diluição. O cálcio e o zinco foram analisados por Espectrofotometria de Absorção Atômica em Chama de Ar-Acetileno, medindo a absorbância em 422,7nm e 213,9nm respectivamente.

3.7.3 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL

O Fósforo foi analisado tratando uma alíquota da amostra com solução de Vanadomolibdica e medindo a absorbância do complexo formado em 420 nm, pelo método de espectrofotometria no UV-Visível. Foi utilizado espectrofotômetro UV-Visível - modelo 2450 – SHIMADZU. A curva de calibração foi montada com padrões Merck 99,99% de pureza. Essa análise também foi realizada no laboratório de química analítica do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

3.8 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.8.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV), ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS)

As análises por Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas no equipamento modelo Quanta FEG 250, da marca FEI.

- a) Caracterização dos pós de HA e Zn-HA sintetizados, antes do tratamento térmico.

Uma pequena quantidade do precipitado foi aspirada no fundo do Becker, 48h após a precipitação, antes das filtrações e lavagens, com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Em seguida, feita a diluição dessa pequena porção, a suspensão foi gotejada sobre uma lamínula de vidro já fixada sobre o porta amostra através de uma fita de dupla face.

- b) Caracterização das pastilhas de HA e Zn-HA tratadas termicamente antes e após o ensaio de bioatividade.

As pastilhas de HA e Zn-HA, tratadas às temperaturas de 7000C, 9000C e 11000C, foram observadas em MEV com EDS. Foi feita deposição de platina nas pastilhas com o objetivo de melhorar a qualidade da imagem no MEV.

- c) Caracterização dos recobrimentos antes e após a conversão.

As placas recobertas, antes e após conversão em HA ou Zn-HA, foram observadas em MEV com EDS. Foi realizada a deposição de platina para obtenção de imagens com melhor qualidade.

3.8.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Para realização das análises por DRX das amostras em pó de HA e Zn-HA após síntese e tratamento térmico a 700⁰C, 900⁰C e 1100⁰C, foi utilizado o difratômetro Panalytical X'PERT PRO do departamento de Física Aplicada do CBPF (Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas). As condições experimentais utilizadas foram: comprimento de onda Cu K α 1 λ =1,548Å, varredura com passo 0,05⁰, de 10⁰ a 80⁰, e tempo de coleta de 100 segundos por passo. A identificação das fases cristalinas presentes nas amostras foi obtida através da análise dos difratogramas utilizando-se o programa X'PERT PRO.

3.8.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As análises por infravermelho foram aplicadas às amostras de HA e Zn-HA dos pós verdes, dos pós tratados termicamente a 700⁰C, 900⁰C e 1100⁰C e das superfícies recobertas nos tempos de 1h, 2h e 4h antes e após a conversão. Esse ensaio foi realizado no laboratório do CBPF. Inicialmente foram preparadas pastilhas contendo aproximadamente 98,8% de meio dispersante (KBr) ou 0,1g, que não deve interferir no sinal, e 0,2% da amostra em pó. As pastilhas foram confeccionadas utilizando uma prensa com 80kN de carga ou 8 toneladas. A varredura para leitura da imagem foi realizada com 128 passos. Na análise das placas de Ti recobertas, operou-se o equipamento em modo de refletância difusa atenuada (ATR) sem a necessidade de preparo prévio das amostras.

O aparelho utilizado para a análise do pó verde e das amostras tratadas termicamente é da marca Shimadzu, modelo IR Prestige-21 (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer). Para análise das placas recobertas, utilizou-se um módulo extra do equipamento, modelo AIM-8800 (Automatic Infrared Microscope), que possui um microscópio com capacidade máxima de aumento de 50x.

A faixa de comprimento de onda utilizada para construção dos gráficos ficou definida entre 4000 e 400 cm⁻¹, registrando a quantidade de energia transmitida (transmitância). O objetivo dessa análise foi investigar a composição química dos grupos moleculares presentes nas amostras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DO PÓ

4.1.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DA HIDROXIAPATITA E ZINCO- HIDROXIAPATITA

As caracterizações realizadas nas amostras de HA e Zn-HA em pó, antes dos tratamentos térmicos, permitiram avaliar suas estruturas cristalinas, considerando a escolha de um produto natural como reagente (casca de ovo). Os difratogramas das amostras de HA e Zn-HA sintetizadas a partir da fonte de cálcio fornecida pela casca de ovo de avestruz, sem tratamento térmico, são apresentados nas FIG. 4.1 e FIG. 4.2. É possível observar picos de difração largos, devido à dimensão nanométrica das partículas, bem como a baixa cristalinidade das mesmas.

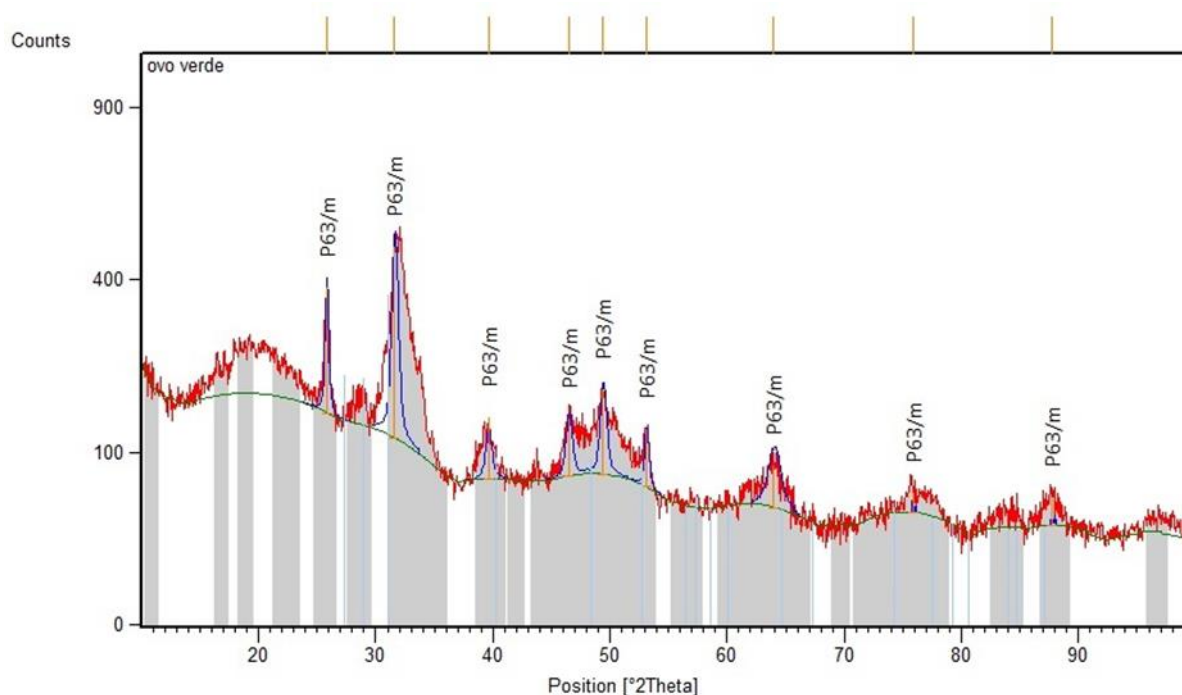


FIG. 4.1 Difratograma de raios X da amostra HA sintetizada não tratada termicamente.

A fase hidroxiapatita foi identificada em ambas as amostras. Utilizando-se o programa X'PERT PRO foi possível pesquisar numa base de dados a ficha cristalográfica mais adequada

às fases cristalinas obtidas, podendo-se verificar o seu sistema cristalino e grupo espacial. Para a amostra de HA, foi encontrado o JCPDS 00-024-0033 com fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, e para a Zn-HA, a JCPDS 01-089-6437 com fórmula química $\text{Ca}_{10.042}(\text{PO}_4)_{5.952}(\text{OH})_{2.292}$. Em ambos os casos tem-se uma estrutura em sistema cristalino hexagonal e grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$.

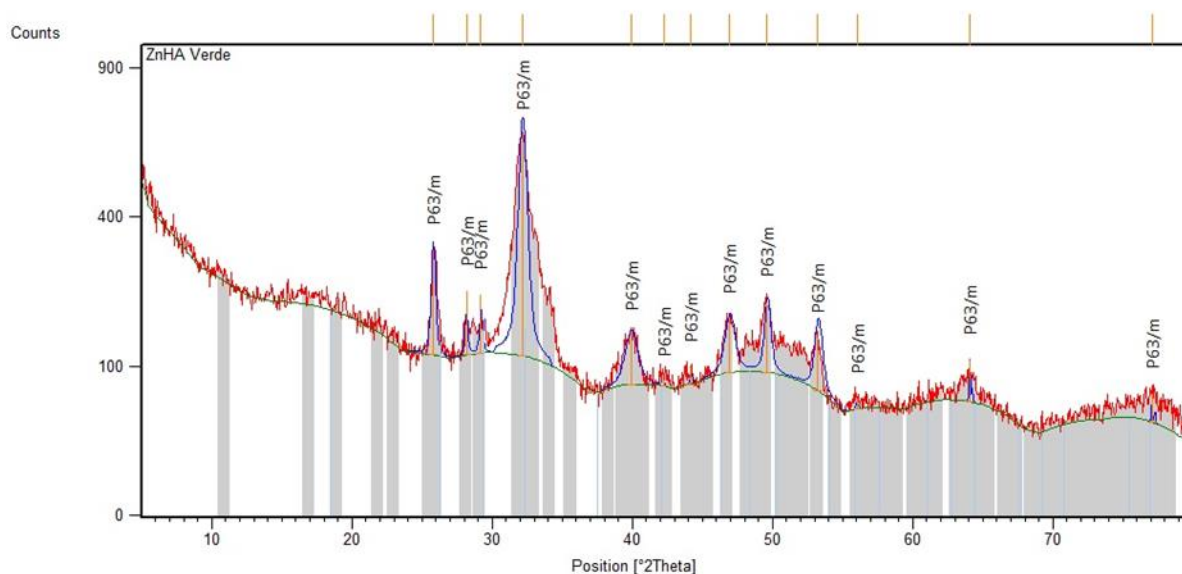


FIG. 4.2 Difratoograma de raios X da amostra Zn-HA sintetizada não tratada termicamente.

A mesma análise foi realizada para as amostras tratadas termicamente a 700°C , 900°C e 1100°C . Os difratogramas obtidos apresentaram picos mais estreitos devido, provavelmente, ao aumento da dimensão dos cristais durante o processo de aquecimento, bem como ao aumento na cristalinidade. Nas FIG. 4.3 e FIG. 4.4 são mostrados os difratogramas das amostras tratadas a 700°C .

A análise do difratograma da amostra de HA tratada a 700°C indicou a presença de uma única fase cristalina, identificada como HA, onde a ficha cristalográfica mais indicada foi JCPDS 00-024-0033 ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que possui grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, similar ao resultado encontrado para a amostra de HA não tratada termicamente.

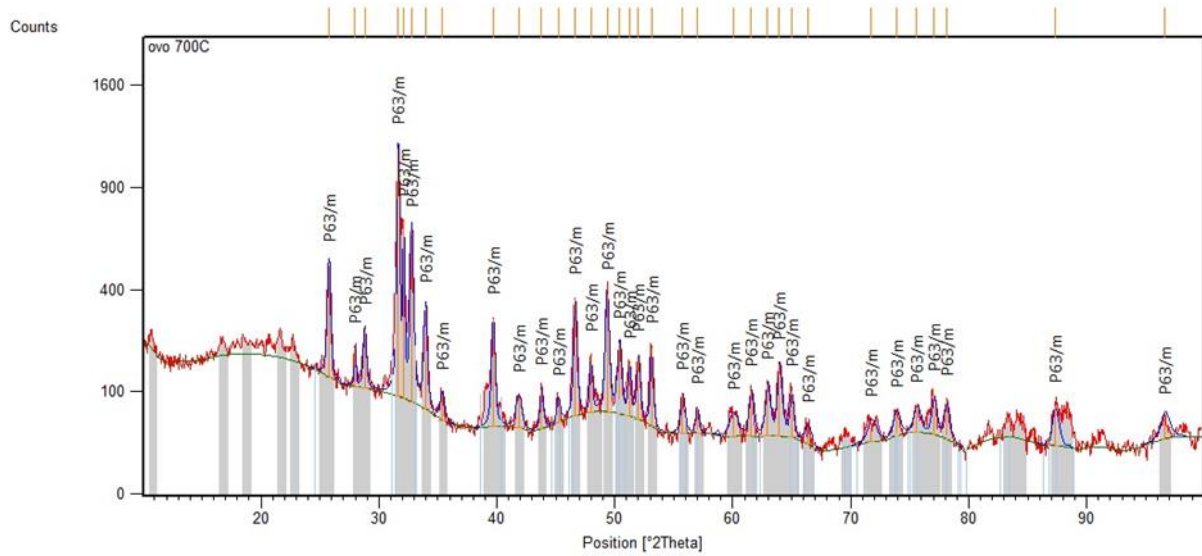


FIG. 4.3 Difratoograma de raios X da amostra HA tratada termicamente a 700°C.

A análise do difratograma da amostra de Zn-HA tratada a 700°C indicou a presença de três fases cristalinas, sendo fase majoritária a HA. As fichas cristalográficas mais indicadas foram: HA, JCPDS 01-089-6437 ($\text{Ca}_{10.042}(\text{PO}_4)_{5.952}(\text{OH})_{2.292}$ – sistema hexagonal e grupo espacial $P6_3/m$), zircita, JCPDS 01-089-7102 (ZnO - sistema hexagonal e grupo espacial $P6_3mc$), óxido de cálcio, JCPDS 01-078-0649 (CaO – sistema cúbico e grupo espacial $Fm-3m$). A não estequiometria da ficha JCPDS 01-089-6437 pode ser explicada pela presença do íon Zn na estrutura cristalina da HA, que tende a compartilhar elétrons através de ligação covalente, ao contrário do íon Ca que possui ligação iônica com seus vizinhos (TERRA, 2009).

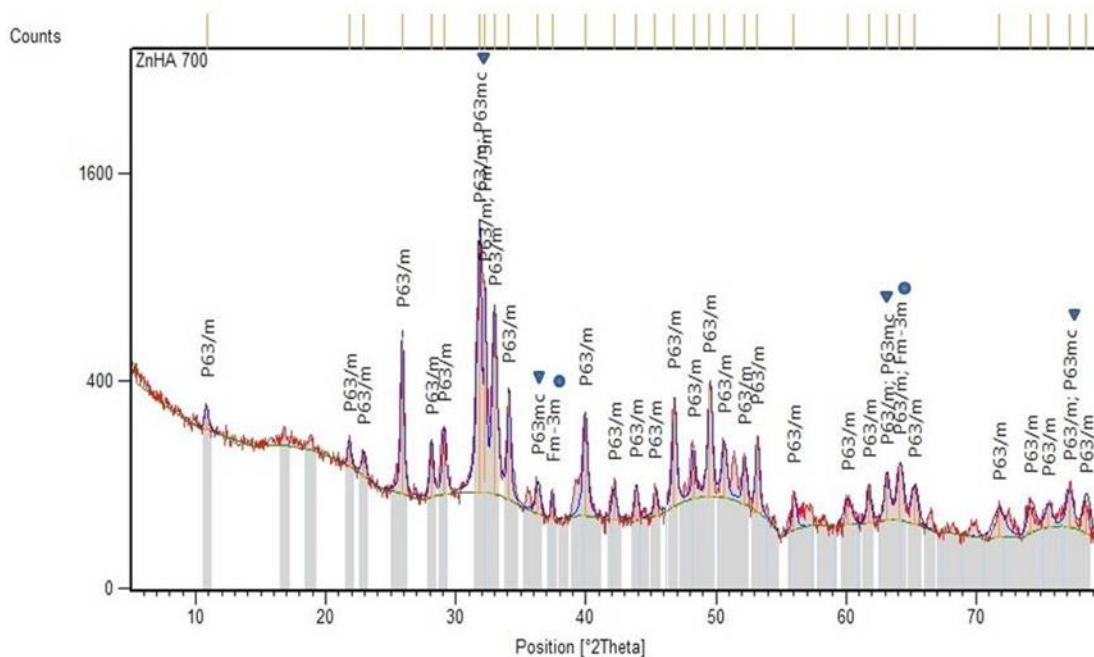


FIG. 4.4 Difratoograma de raios X da amostra Zn-HA tratada termicamente a 700°C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m), ZnO (P63mc, ▼) e CaO (Fm-3m, ●).

A análise do difratograma da amostra de HA tratada a 900°C constatou a presença de duas fases identificadas como: HA (majoritária) com a ficha cristalográfica mais indicada JCPDS 00-024-0033($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) - sistema hexagonal e grupo espacial P63/m), e Whitlockita JCPDS 00-009-0169 ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) – sistema romboédrico e grupo espacial R-3c), como pode ser verificado na FIG. 4.5. Picos não identificados de $2\theta = 81,6157^\circ$ e $91,0074^\circ$ podem estar relacionados a alguma fase minoritária ou impureza presente.

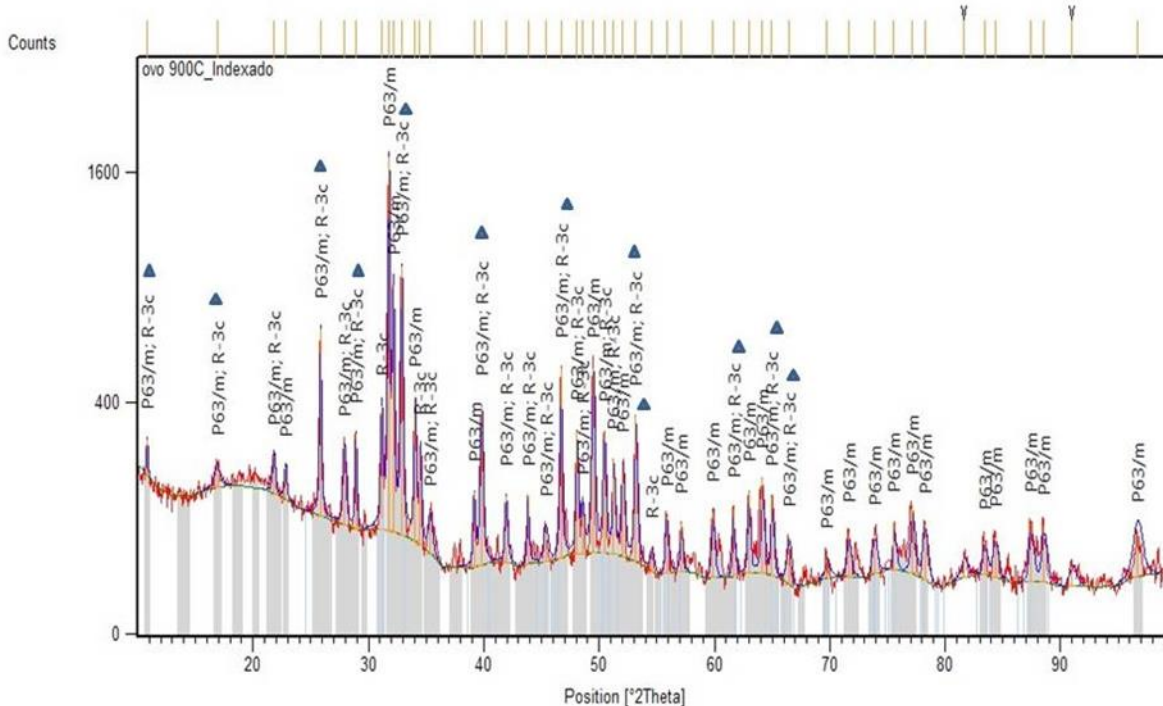


FIG. 4.5 Difratoograma de raios X da amostra HA tratada termicamente a 900°C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m) e Whitlockita (P63mc, ▲).

A análise do difratograma da amostra Zn-HA tratada a 900°C indicou a presença de três fases cristalinas, identificadas como: HA (majoritária) com a ficha cristalográfica mais indicada JCPDS 01-089-6437 ($\text{Ca}_{10.042}(\text{PO}_4)_5.952(\text{OH})_{2.292}$, grupo espacial P63/m), zincita JCPDS 01-089-7102 ($\text{ZnO}, \text{P63}_{\text{mc}}$) e óxido de cálcio JCPDS 01-078-064 ($\text{CaO}, \text{Fm-3m}$), (FIG. 4.6).

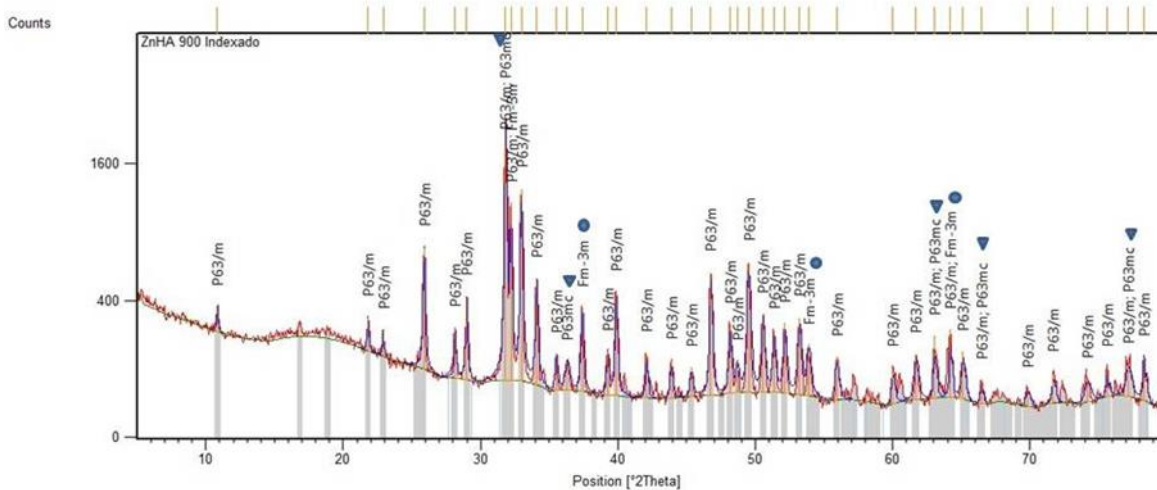


FIG. 4.6 Difratoograma de raios X da amostra Zn-HA tratada termicamente a 900°C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m), ZnO (P63mc, ▼) e CaO (Fm-3m, ●).

A análise do difratograma da amostra HA tratada a 1100°C indicou a presença de duas fases identificadas como HA (JCPDS 00-024-0033 - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, P63/m) e Whitlockita (JCPDS 00-009-0169 - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, R-3c). Picos não identificados em valores de $2\theta = 81,6372^\circ$, $90,8083^\circ$ e $97,5363^\circ$ podem estar relacionados a alguma fase minoritária ou impureza presente, como pode ser observado na FIG. 4.7 abaixo.

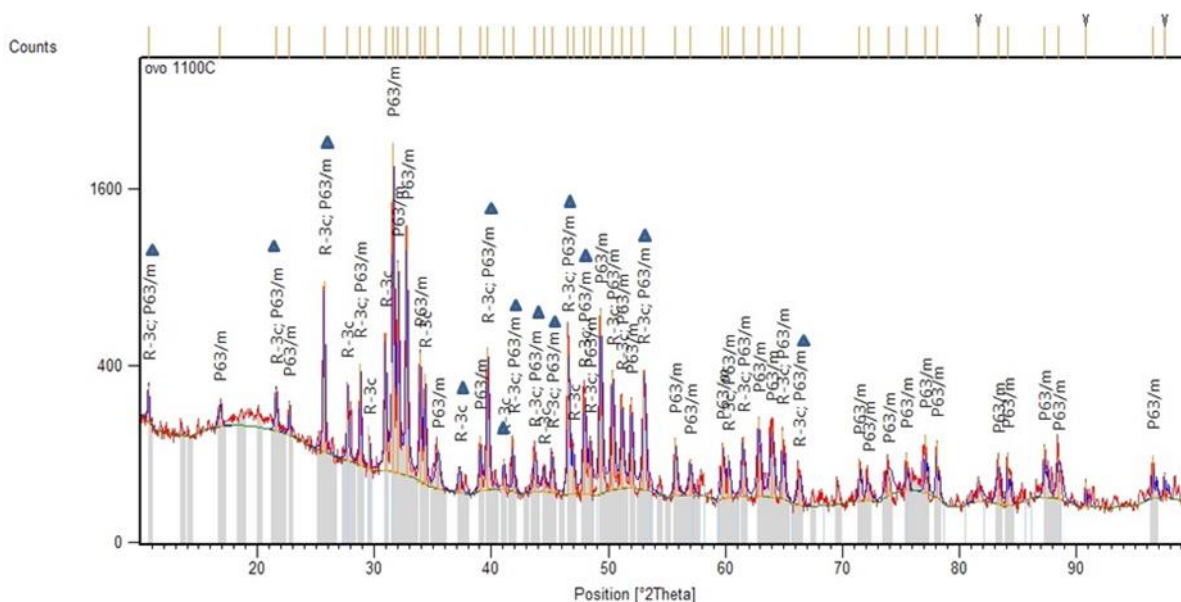


FIG. 4.7 Difratoograma de raios X da amostra HA tratada termicamente a 1100°C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m) e Whitlockita (P63mc, ▲).

A análise da amostra Zn-HA tratada a 1100°C constatou a presença de duas fases identificadas como HA, JCPDS 01-089-6437 ($\text{Ca}_{10.042}(\text{PO}_4)_5.952(\text{OH})_2.292$, P63/m) e óxido de cálcio, JCPDS 01-078-0649 (CaO , Fm-3m), (FIG. 4.8).

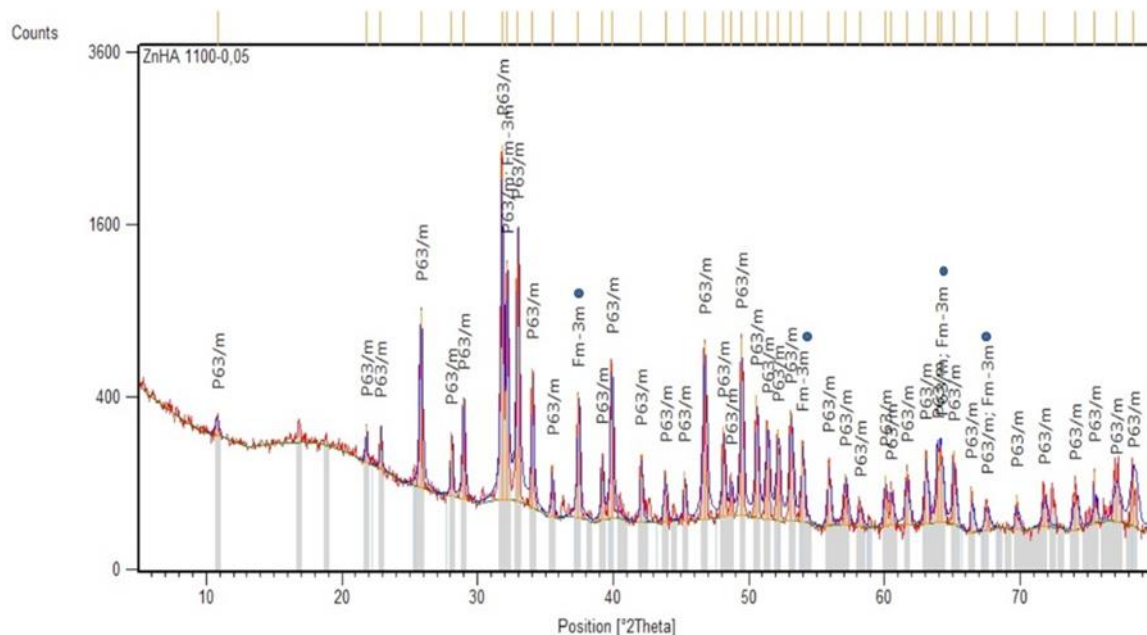


FIG. 4.8 Difratoograma de raios X da amostra Zn-HA tratada termicamente a 1100°C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m) e CaO (Fm-3m, ●).

O trabalho de GOMES *et al* (2012) estudou o efeito da temperatura no processo de incorporação de zinco na estrutura da HA em amostras de Zn-HA sintetizadas via sol-gel, com teores de Zn até 1% (mol) de substituição. O tratamento térmico provocou a decomposição do material com formação de Whitlockita, CaO e ZnO a partir de 600°C. Os resultados apresentados neste trabalho de tese foram diferentes, não evidenciando a formação de Whitlockita, o que sugere uma maior estabilidade térmica da Zn-HA ao utilizar um método de síntese em duas etapas.

Por outro lado, defeitos causados pela incorporação de Zn podem explicar a ocorrência dos óxidos de cálcio e de zinco no material. Segundo IVANOVA *et al*, (2001) a formação de óxidos após tratamento térmico é um comportamento típico de HA com a presença extra de íons carbonato.

O trabalho de GROSS *et al* (2013) estudou o mecanismo da substituição de zinco em HA a partir de duas rotas de síntese. Na primeira amostras de Zn-HA foram obtidas por síntese em via úmida e na segunda pela cristalização hidrotérmica de fosfato de cálcio amorfo (ACP) em

presença de solução de $\text{Zn}(\text{NO})_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os resultados obtidos por análise térmica (TG/DSC) indicaram que a presença de zinco na fase de fosfato de cálcio precursora amorfa (ACP) é efetiva e garantiu a sua estabilidade química, sendo necessária uma temperatura superior para a ocorrência da sua cristalização em hidroxiapatita.

O tratamento térmico aplicado nas amostras de HA e Zn-HA até a temperatura de 1100°C provocou um aumento na cristalinidade na estrutura dos materiais, o que pode ser atribuído à melhoria dos processos difusionais favorecidos pela ativação térmica. O trabalho de GROSS *et al* (2013) estudou o mecanismo da substituição de zinco em HA a partir de amostras de Zn-HA obtidas por síntese em via úmida e pela cristalização de amostra de fosfato de cálcio amorfo (ACP) em presença de solução de $\text{Zn}(\text{NO})_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os resultados de análise térmica (TG/DSC) das amostras de HA e Zn-HA obtidas pela cristalização de ACP indicaram que a presença de zinco na estrutura do material amorfo (ACP) é efetiva, e garantiu a sua estabilidade, uma vez que foi necessária uma temperatura superior para a ocorrência da cristalização em Zn-HA. Comparando-se os resultados de análise química e DRX das amostras de Zn-HA com e sem tratamento térmico obtidas a partir da sua síntese em meio aquoso e da cristalização térmica de ACP em presença de solução de zinco foi verificado uma capacidade superior para o último caso, atingindo-se até 20% em mol de substituição Zn em relação a Ca sem ocorrência de decomposição a 1000°C . Enquanto que, para a rota de síntese em via úmida, atingiu-se até 5% em mol de substituição Zn^{2+} por Ca^{2+} . Os autores sugerem que a formação da Zn-HA a partir da síntese em meio aquoso ocorre produzindo defeitos em sítios de Ca durante a sua cristalização, enquanto que o preparo a partir da cristalização de ACP, isto é, cristalização térmica ocorre sem a produção de defeitos na rede da HA. Este resultado sugere a possível incorporação de zinco a partir de tratamentos térmicos em uma fase de fosfato de cálcio amorfa. Por analogia, é possível explicar a ausência da ZnO após tratamento térmico a 1100°C por um processo semelhante que favorece a estabilidade da fase Zn-HA.

4.1.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DOS PÓS DE HA E ZN-HA VERDES E TRATADOS TERMICAMENTE A 700°C, 900°C E 1100°C.

A análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR) e DRX de fosfatos de cálcio submetidos a tratamento térmico está bem definida nos trabalhos de RAYNAUD *et al* (2002) e PENA e VALLET-REGI (2003) que foram utilizados neste trabalho para identificar os grupos funcionais relativos às bandas de FTIR encontradas e confirmar as fases identificadas por DRX. Os materiais que possuem baixa razão $\text{Ca/P} \leq 1,50$, como as fases monetita e bruxita, se decompõem em TCP e $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, os que possuem $1,50 \leq \text{Ca/P} \leq 1,67$ se decompõem em HA e TCP, e os que possuem valores de razão $\text{Ca/P} \geq 1,67$ produzem HA e CaO.

Pode-se considerar a região de $1020\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$ como a principal para bandas vibracionais de grupos fosfatos. De acordo com o número de bandas presentes e sua posição, pode-se distinguir a fase cristalina presente, por exemplo, as bandas de grupos O-H em 3570 cm^{-1} e 630 cm^{-1} são típicas de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), enquanto que a bruxita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) apresenta bandas de hidroxila em $3541, 3580, 3282$ e 3166 cm^{-1} , TORTET *et al.*, 1997.

A FIG. 4.9 demonstra o espectro de FTIR da amostra de HA sintetizada a partir da casca de ovo de avestruz. Pode-se observar a presença de bandas características de grupos fosfatos de alta intensidade em $1089, 1034$ e 960 cm^{-1} , típicas da fase hidroxiapatita, PENA e VALLET-REGI (2003), além de banda em 3570 cm^{-1} relativa a grupos OH^{-1} . As bandas extras existentes ocorrem devido à presença de água em 1643 cm^{-1} , e grupos carbonato em 1416 cm^{-1} que estão associados ao material.

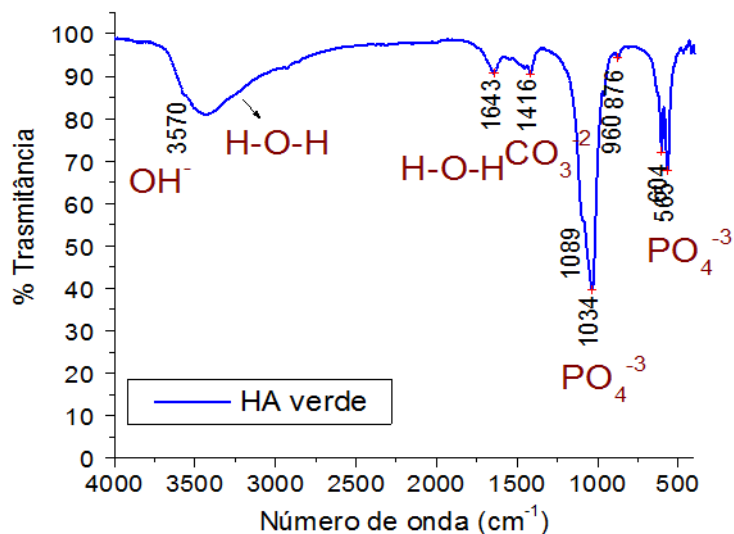


FIG. 4.9 Espectro de FTIR da HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz não tratada termicamente.

Os resultados das análises de FTIR das amostras de HA tratadas termicamente a 700°C, 900°C e 1100°C são mostrados nas FIG. 4.10 a FIG. 4.12. É possível observar a permanência de bandas dos grupos fosfato em valores próximos aos encontrados na amostra sem tratamento térmico em 1088, 1034, 954 cm^{-1} e hidroxila 3570 cm^{-1} , que são relativas à fase hidroxiapatita.

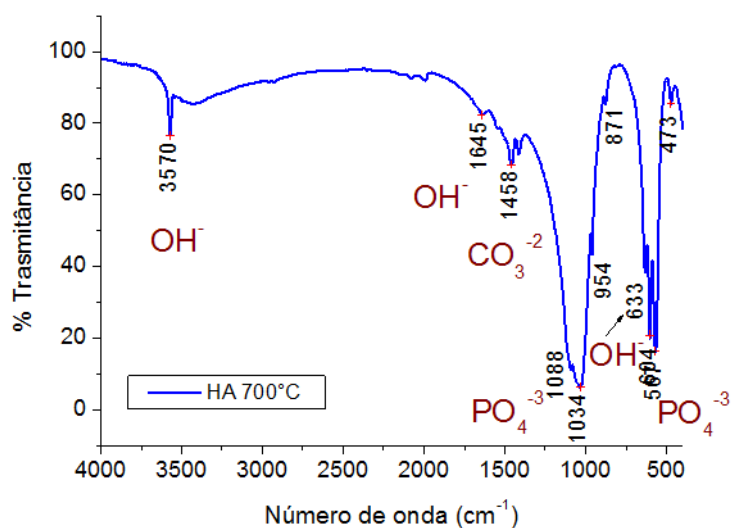


FIG. 4.10 Espectro de FTIR da HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 700°C.

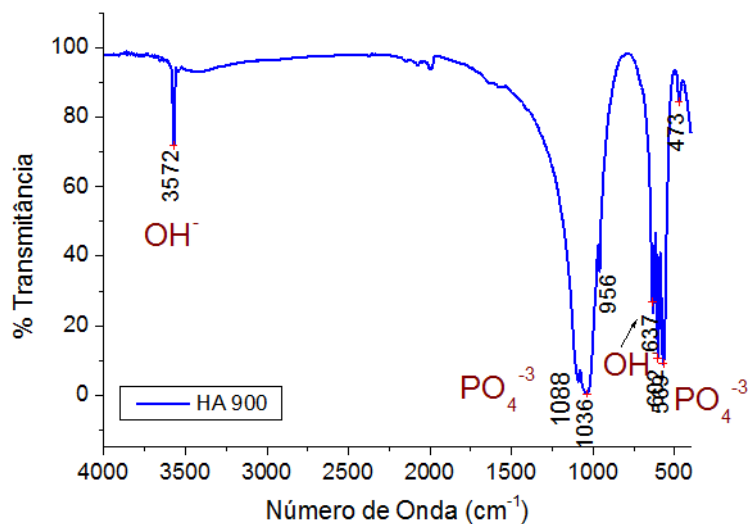


FIG. 4.11 Espectro de FTIR da HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 900°C.

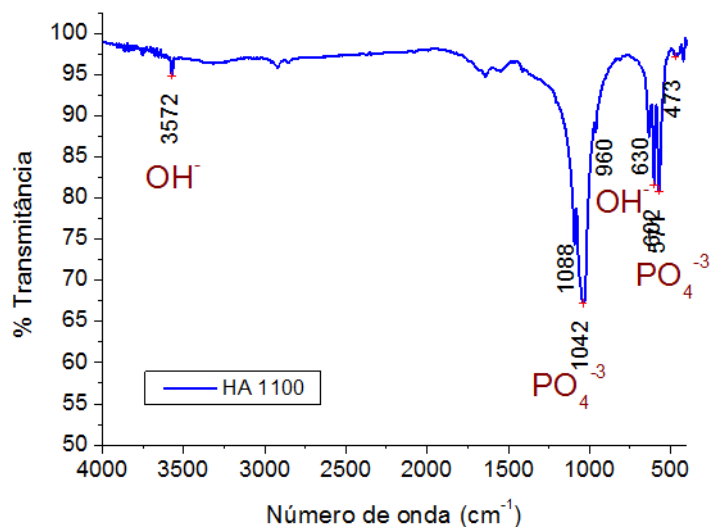


FIG. 4.12 Espectro de FTIR da HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 1100°C.

A FIG. 4.13 demonstra o espectro de FTIR da amostra de Zn-HA sintetizada a partir da casca de ovo de avestruz em presença de zinco. Pode-se observar a presença de banda intensa característica de grupo fosfatos em torno de 1035 cm⁻¹, além de banda larga de água, em torno

de 3448cm^{-1} , e aos grupos OH^{-1} em 1641 cm^{-1} . Além disso, bandas extras existentes ocorrem devido à presença de grupos carbonato em 1425 cm^{-1} .

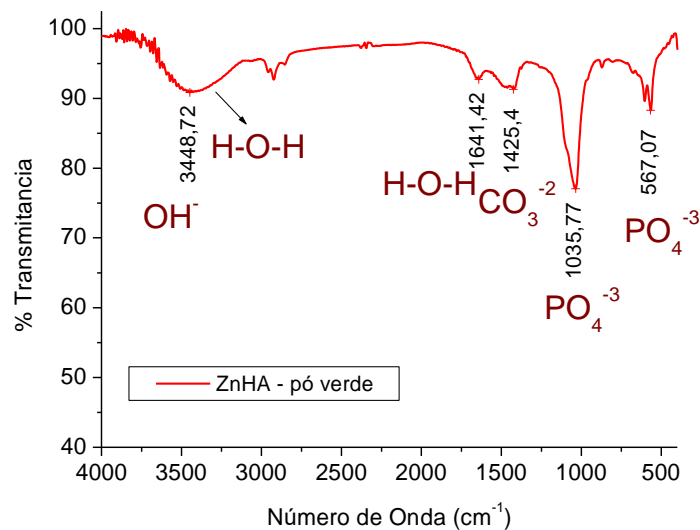


FIG. 4.13 Espectro de FTIR da Zn-HA obtida a partir da síntese com casca de ovo de avestruz em presença de Zn não tratada termicamente.

Os resultados das análises de FTIR das amostras de Zn-HA tratadas termicamente a 700°C , 900°C e 1100°C são mostrados nas FIG. 4.14 a FIG. 4.16. É possível observar a presença de bandas de grupos hidroxila em torno de 3572 cm^{-1} e de grupos fosfato em torno de 1099 cm^{-1} , 1039 cm^{-1} e 958 cm^{-1} que são típicas da fase hidroxiapatita em todas as amostras, e a ausência das bandas relativas à presença de água em 1641 cm^{-1} , além da redução da banda de carbonato na região entre $1570\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ para as temperaturas de 900°C e 1100°C .

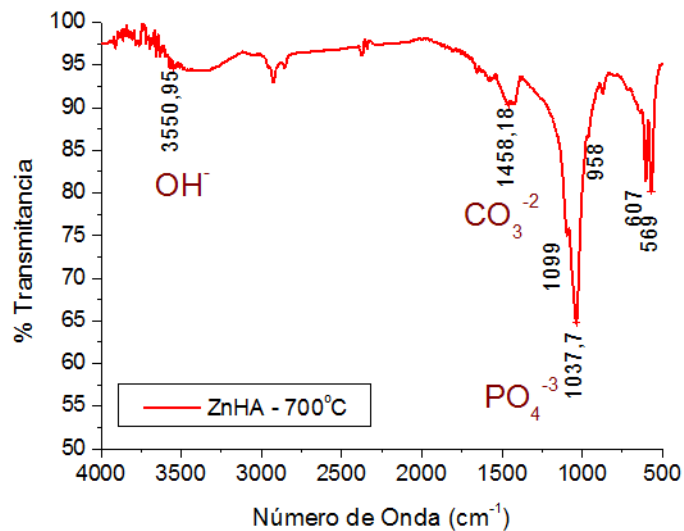


FIG. 4.14 Espectro de FTIR da Zn-HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 700°C.

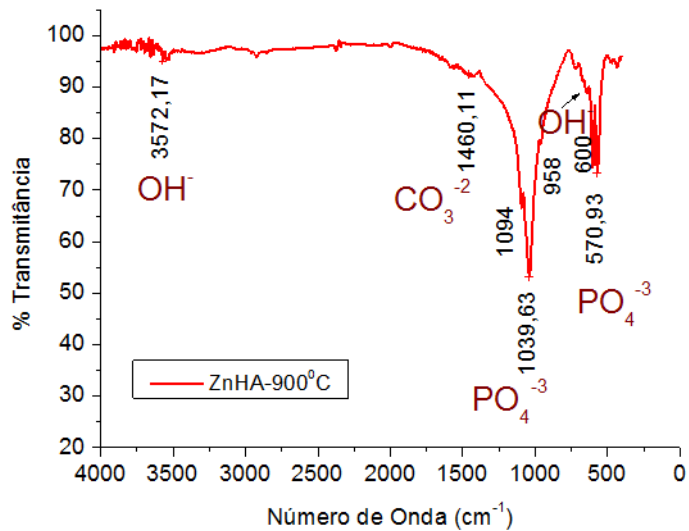


FIG. 4.15 Espectro de FTIR da Zn-HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 900°C.

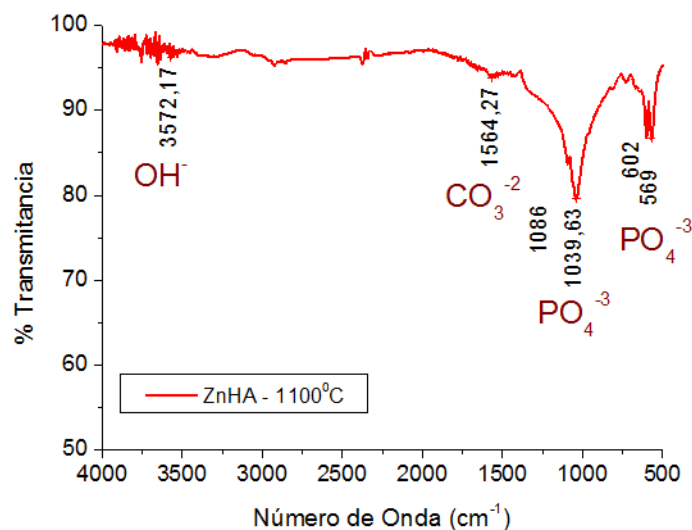


FIG. 4.16 Espectro de FTIR da Zn-HA obtida a partir da casca de ovo de avestruz, tratada termicamente a 1100°C.

Os resultados obtidos pelas análises de DRX e FTIR nas amostras de HA e Zn-HA tratadas, ou não termicamente foram complementares, e permitiram identificar as fases cristalinas presentes, a estabilidade térmica, o efeito da inserção de íons zinco na estrutura da HA e a presença de íons carbonato. O tratamento realizado para a identificação de fases pelos difratogramas de raios X das amostras de HA e Zn-HA sem tratamento térmico e tratadas termicamente a 700°C, não identificou a estrutura da carbonatoapatita e, provavelmente, parte do carbonato identificado pelos espectros de FTIR devem estar substituindo sítios de PO_4^{3-} e OH^- ou adsorvido na superfície dos materiais.

O artigo de REY *et al* (2007) descreve a existência de uma camada superficial hidratada em nanocristais de apatita obtidos por síntese via úmida ou encontrados em amostras biológicas. Segundo os autores, a dimensão nanométrica causa uma maior contribuição das características de superfície nas propriedades dos materiais e, desta forma, uma região superficial hidratada nos nanocristais de apatita possui menor energia interfacial e abriga íons provenientes do meio aquoso. De forma análoga, é possível sugerir que o carbonato identificado pela análise de FTIR das amostras de HA e Zn-HA esteja aprisionado nessa região. O tratamento térmico a 700°C realizado nas amostras da HA e Zn-HA causou a parcial redução do íon carbonato através da sua decomposição e liberação na forma de CO_2 , FIG. 4.10 e FIG. 4.14.

Vale salientar que os óxidos frequentemente são ativos na região do Infravermelho distante (FAR), sendo assim os óxido de cálcio e zinco encontrados nas análises de DRX das amostras de Zn-HA tratadas a 900°C e 1100°C (FIG. 4.6 e FIG. 4.8) não foram detectados na análise por FTIR, pois os aparelhos convencionais operam na região do infravermelho médio, FIG. 4.15 e FIG. 4.16. A TAB. 4.1 resume os resultados de DRX e FTIR obtidos nas amostras de HA e Zn-HA com e sem tratamento térmico.

TAB. 4.1 Resultados de Identificação de fases por DRX e de grupos funcionais por FTIR das amostras de HA e Zn-HA com e sem tratamento térmico.

Amostra em pó	DRX	FTIR
HA	HA (JCPDS 00-024-0033)	Bandas HA + banda Carbonato
HA 700	HA (JCPDS 00-024-0033)	Bandas HA + banda Carbonato
HA 900	HA - JCPDS 00-024-0033 e Whitlockita (JCPDS 00-009-0169 - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	Bandas HA
HA 1100	HA - JCPDS 00-024-0033 e Whitlockita (JCPDS 00-009-0169 - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	Banda HA + Banda em 1193 cm^{-1}
Zn-HA	HA (JCPDS 01-089-6437)	Bandas HA + banda Carbonato
Zn-HA 700	HA [JCPDS 01-089-6437, $\text{Ca}_{10.042}(\text{P O}_4)_{5.952}(\text{OH})_{2.292}$] -P63m, ZnO [JCPDS 01-089-7102,)-P63mc e CaO [JCPDS 01-078-0649] -Fm-3m	Bandas HA + banda Carbonato
Zn-HA 900	HA [JCPDS 01-089-6437, $\text{Ca}_{10.042}(\text{P O}_4)_{5.952}(\text{OH})_{2.292}$], ZnO [JCPDS 01-089-7102,) e CaO [JCPDS 01-078-0649]	Bandas HA + banda Carbonato
Zn-HA 1100	HA [JCPDS 01-089-6437, $(\text{Ca}_{10.042}(\text{PO}_4)_{5.952}(\text{OH})_{2.292})$] e CaO [JCPDS 01-078-0649]	Banda HA + banda Carbonato

4.1.3 ANÁLISE QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE HA E ZN-HA TRATADAS TERMICAMENTE A 1100°C

De acordo com os resultados obtidos na TAB. 4.2, pode-se observar que para a amostra de HA tratada termicamente a 1100°C, a análise de FRX indicou uma razão Ca/P = 1,57, o que aponta uma deficiência em cálcio estando de acordo com o resultado verificado no DRX, que demonstrou duas fases distintas (HA + Whitlockita).

Para a amostra de Zn-HA tratada termicamente a 1100⁰C, o resultado à análise química indicou uma razão Ca + Zn /P = 1,66, que caracteriza uma relação estequiométrica, sugerindo um material mais estável em relação a HA obtida e tratada nas mesmas condições.

Em relação à adição de Zn na síntese, o percentual de Zn utilizado na reação foi de 2%. Os resultados obtidos pela análise por fluorescência indicaram 1,95% de Zn. Então, utilizando a fórmula teórica: Ca_{9,8} Zn_{0,2}(PO₄)₆ (OH)₂ e valores de 0,831836 mols de Ca + 0,016514 mols de Zn, sendo igual a 0,84835 (100% de cátions). Então, 0,016514 mols de Zn equivalem a 1,95% de zinco que podem ter sido incorporados nos sítios catiônicos.

TAB. 4.2 Análise química para verificação dos percentuais de Ca, P e Zn em amostras de pós de HA e Zn-HA tratados termicamente à 1100⁰C

LABORATÓRIO DE FRX / AAS / UV - CBPF - DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA									
Entrada	Saída	Lote	%(g) Ca	(mol)Ca	%(g) P	(mol)P	Ca/P	%(g)Zn	(mol) Zn
18/12/14	07/01 /15	HA	34,07	0,850050	16,8	0,542390	1,57	-	
18/12/14	07/01 /15	Zn- HA	33,34	0,831836	15,8	0,510105	1,66	1,08	0,016514

4.2 PASTILHAS PRENSADAS

4.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS PASTILHAS PRENSADAS DE HA E ZN-HA TRATADAS TERMICAMENTE A 700⁰C, 900⁰C E 1100⁰C

A análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG- SEM) nos discos de HA e Zn-HA tratados termicamente a 700⁰C, 900⁰C e 1100⁰C mostrou o crescimento de cristais a partir da escala nanométrica para a escala micrométrica (FIG. 4.17 a FIG. 4.22). Foi possível observar a existência de contornos de grão e poros em todas as amostras indicando o processo de coalescimento de grãos.

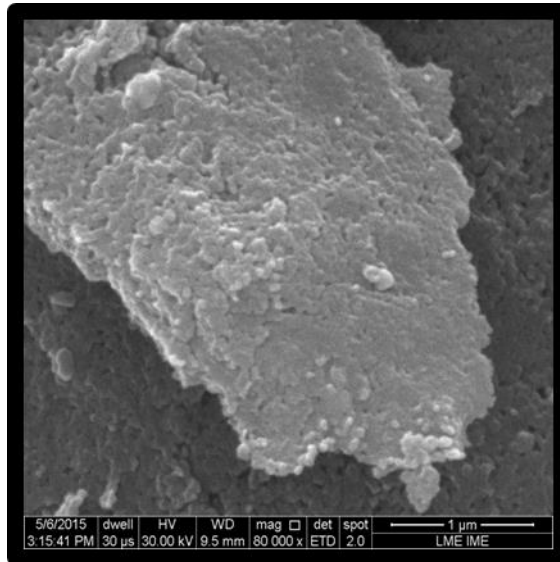


FIG. 4.17 Eletromicrografia (MEV) de pastilha de HA 80.000X tratada a 700°C

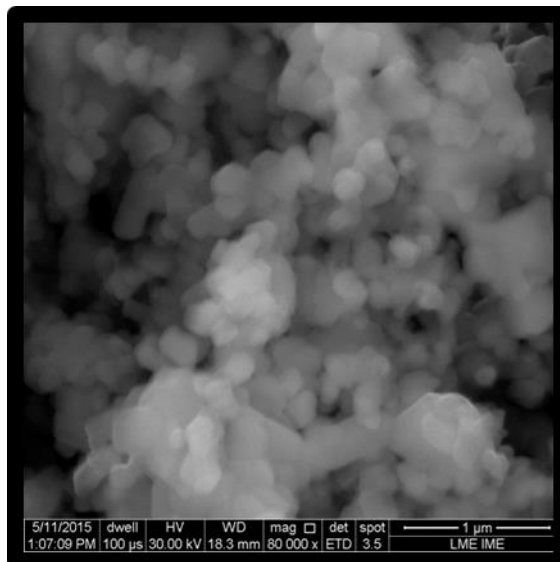


FIG. 4.18 Eletromicrografia (MEV) de pastilha de HA 80.000X tratada a 900°C

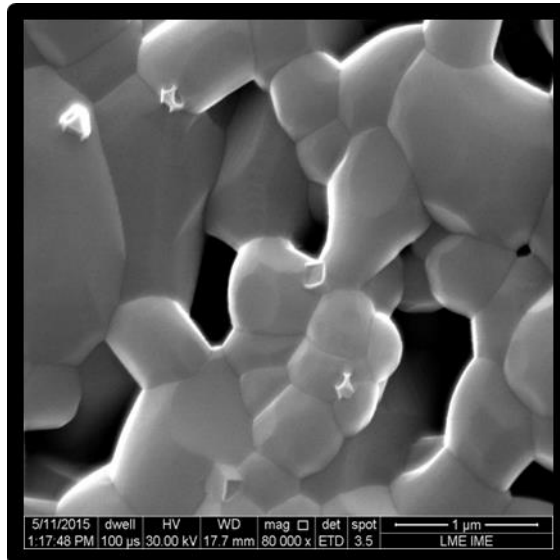


FIG. 4.19 Eletromicrografia (MEV) de pastilha de HA 80.000Xtratada a 1100^oC

As amostras de HA e Zn-HA tratadas termicamente a 1100^oC apresentaram dimensões de tamanho de grão superiores às amostras tratadas a temperaturas inferiores. Um significativo aumento na fração de poros foi também observado ao MEV como consequência do tratamento térmico. Este resultado sugere que a 1100^oC tem-se energia de ativação suficiente para promover processos difusionais responsáveis pelo crescimento de grãos e coalescimento de poros.

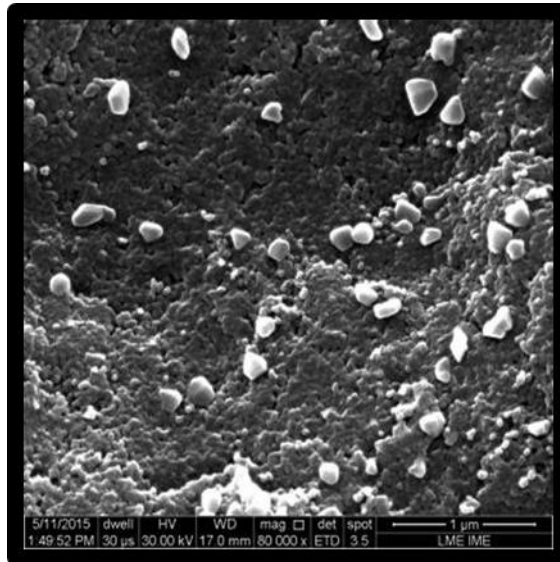


FIG. 4.20 Eletromicrografia (MEV) de pastilha de Zn-HA 80.000X tratada a 700^oC

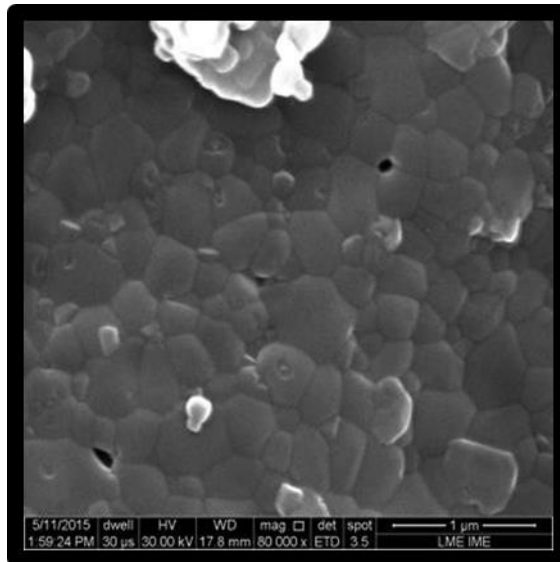


FIG. 4.21 Eletromicrografia (MEV) de pastilha de Zn-HA 80.000X tratada a 900^oC

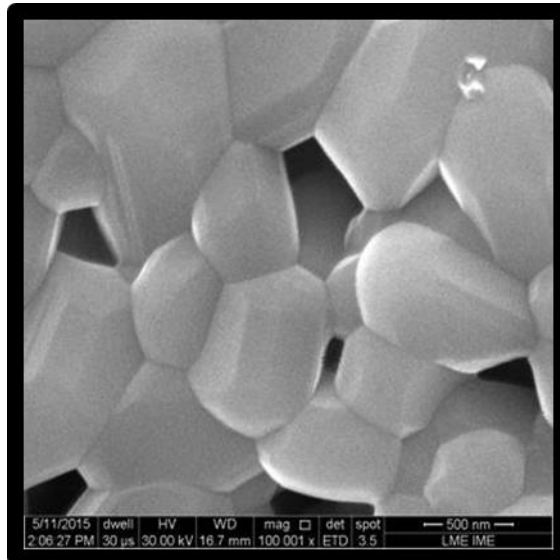


FIG. 4.22 Eletromicrografia (MEV) de pastilha de Zn-HA 100.000X tratada a 1100°C

4.3 RECOBRIMENTOS SOBRE PLACAS DE TITÂNIO

4.3.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DAS AMOSTRAS DE TITÂNIO RECOBERTAS SEM ZN, APÓS OS TEMPOS DE 1H, 2H E 4H A 80°C

Para os recobrimentos em placas de titânio, fez-se a análise de DRX do substrato e das amostras obtidas antes do tratamento de conversão para hidroxiapatita. A FIG. 4.23 mostra o difratograma do substrato com a identificação de duas fases: Ti com ficha cristalográfica mais adequada JCPDS 01-089-3073 (majoritária, sistema cristalino hexagonal e grupo espacial $P6_3/mmc$) e TiH_2 JCPDS 00-009-0371 (sistema cristalino tetragonal e grupo espacial $I4/mmm$).

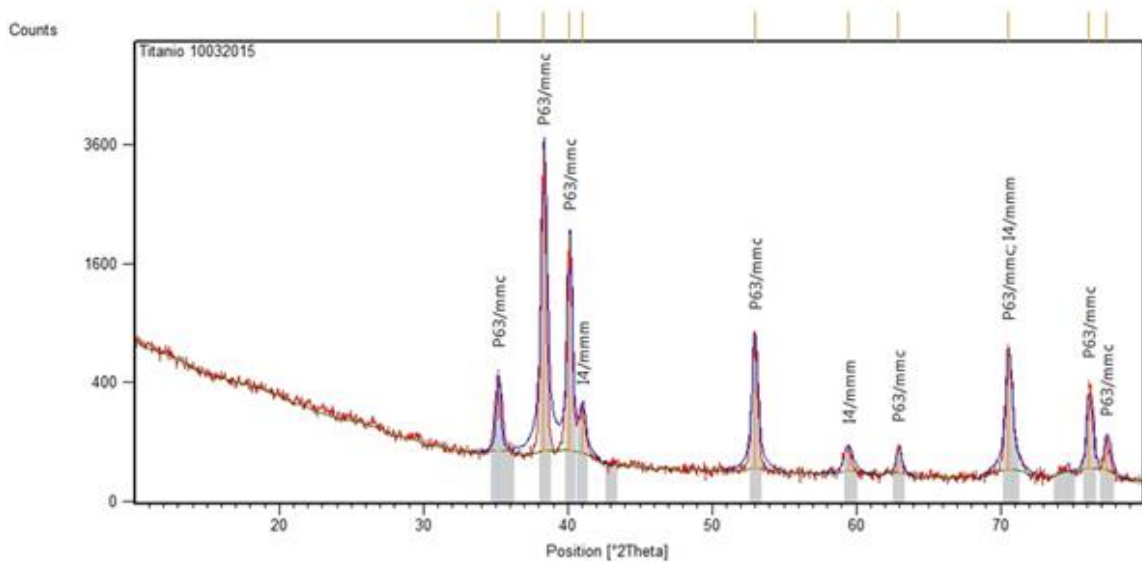


FIG. 4.23 Difratoograma de raios X da placa de Titânio.

As FIG. 4.24 a FIG. 4.26 mostram os resultados obtidos após tempos de 1h, 2h e 4h a 80⁰C.

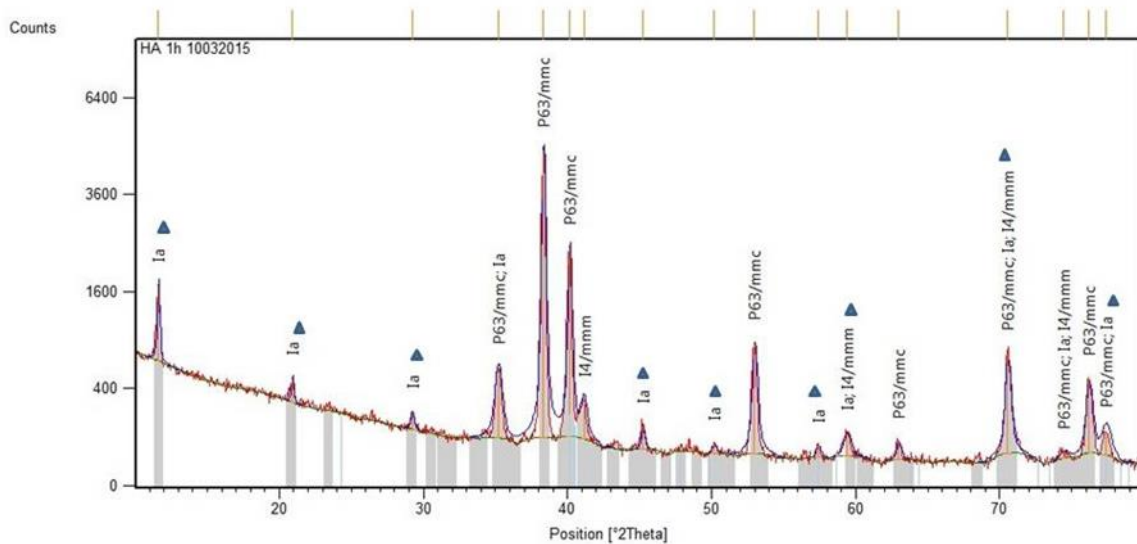


FIG. 4.24 Difratoograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti após 1h a 80⁰C. Identificação de fases cristalinas: HA (P63/m) e Whitlockita (P63mc, ▲)

Analisando os resultados da amostra após 1h de recobrimento, tem-se como fase majoritária o substrato de Ti JCPDS 01-089-3073 (P63/mmc) e como fase secundária o

recobrimento bruxita JCPDS 00-011-0293 (sistema cristalino monoclinico e grupo espacial Ia, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), além de TiH_2 JCPDS 00-009-0371 ($I4/mmm$). Esse resultado sugere uma camada fina de recobrimento no substrato ou regiões não recobertas. PRADO *et al.*, (2001), indicaram a formação de monetita em placas de Titânio após 1h de recobrimento. Segundo SIVAKUMAR *et al.*,(1998) as fases cristalinas monetita e bruxita apresentam grande semelhança estrutural, podendo ocorrer uma transformação de fase entre as mesmas dependendo da concentração de cálcio e disponibilidade de íons H^+ do meio aquoso. Este fato poderia explicar o resultado obtido neste trabalho de tese.

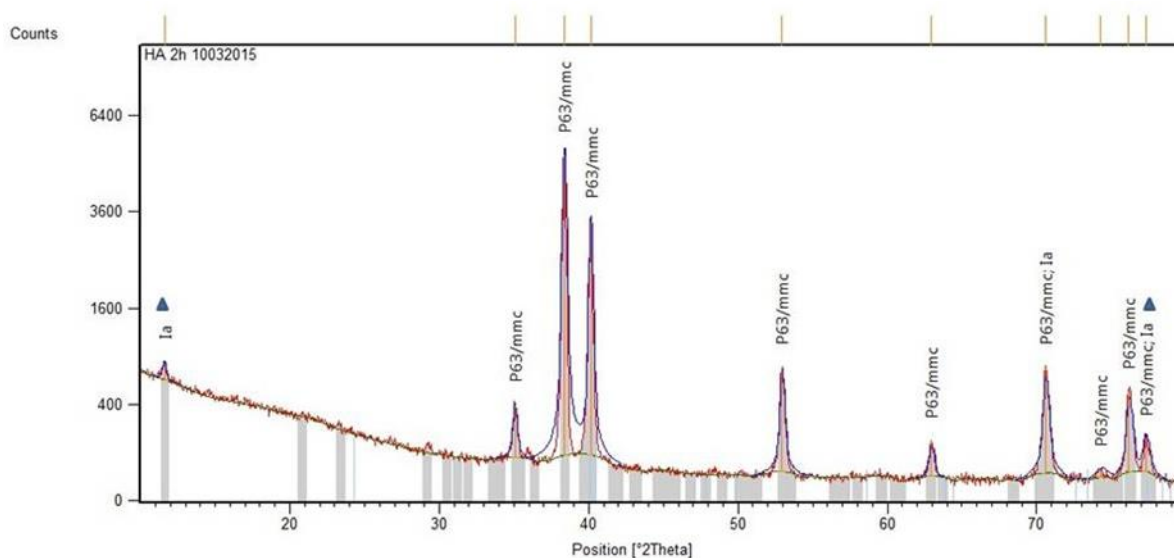


FIG. 4.25 Difratoograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti após 2h a 80°C . Identificação de fases cristalinas: Ti ($P63/mmc$), TiH_2 ($I4/mmm$) e bruxita (Ia, \blacktriangle).

Um resultado similar foi encontrado na amostra recoberta durante 2h, sendo Ti (JCPDS01-089-3073, $P63/mmc$) e bruxita (JCPDS 00-011-0293, Ia), indicando um processo lento de formação da camada de fosfato de cálcio sobre a placa de Ti.

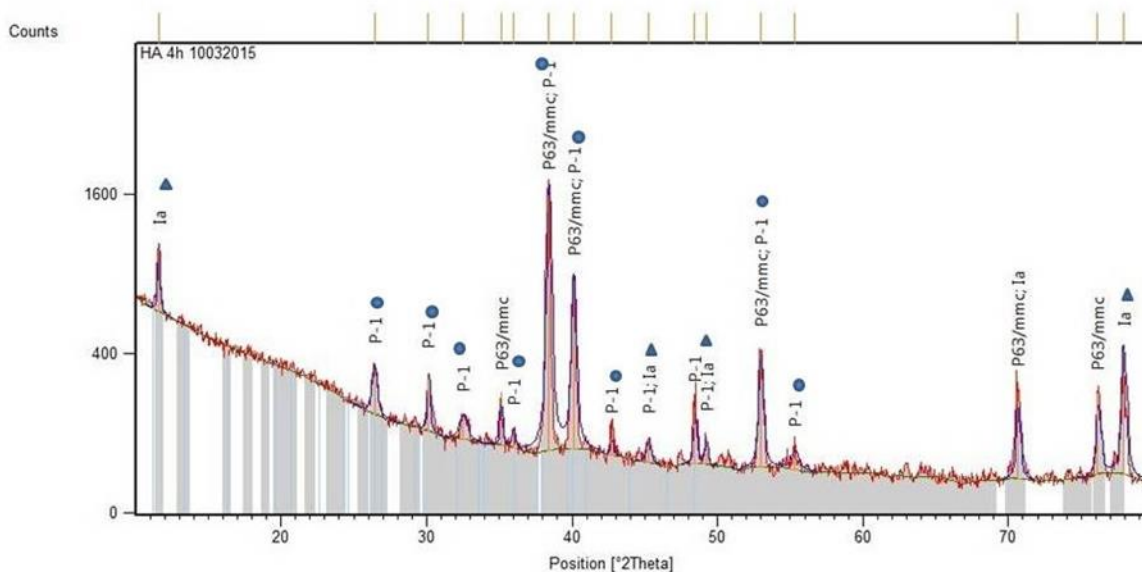


FIG. 4.26 Difratoograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti após 4h a 80°C. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH₂ (I4/mmm), bruxita (Ia, ▲) e monetita (P-1, ●).

No caso da amostra recoberta após 4h, um resultado diferente foi encontrado, obtendo-se ainda um sinal forte do substrato de Titânio JCPDS 01-089-3073 (Ti, P6₃/mmc) e a presença das fases monetita JCPDS 01-075-1520 (CaHPO₄, P-1) e bruxita JCPDS 00-011-0293 (CaHPO₄·2H₂O, Ia) como recobrimento, sugerindo uma transformação de fase do recobrimento de bruxita ao longo do tempo de tratamento hidrotérmico.

4.3.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DAS AMOSTRAS DE TITÂNIO RECOBERTAS SEM ZN, APÓS TEMPOS DE 1H, 2H E 4H A 80°C

A FIG. 4.27 mostra o espectro de FTIR da amostra da placa de Ti recoberta após 1h. KOUTSOPOULOS, 2002 menciona bandas de bruxita em 3535, 3515, 3479, 3437, 3320, 3280, 3230, 3160, 2365, 1700, 1645, 1217, 1130, 1064, 1051, 996, 986, 980, 873, 790, 660, 576 e 528 cm⁻¹. É possível observar a presença de bandas relativas à fase bruxita em valores próximos aos citados na literatura em 3534 cm⁻¹, 3478 cm⁻¹, 3273 cm⁻¹ e 3161 cm⁻¹ devido à presença de grupos OH e em 1200, 1119, 1055, 984, 872 e 779 cm⁻¹ devido aos grupos fosfato.

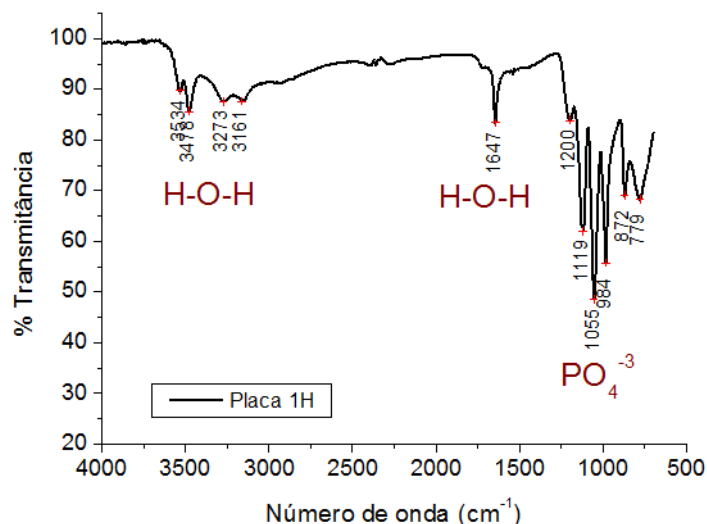


FIG. 4.27 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 1 hora.

Os resultados das análises de FTIR das amostras das placas de Ti recobertas nos tempos de 2h e 4h são mostrados nas FIG. 4.28 e FIG. 4.29. Um resultado diferente ao tempo de 1h foi obtido, percebe-se à ausência de bandas OH⁻ e variação de posição e perfil das bandas na região dos grupos fosfatos. O trabalho de TORTET *et al*, (1997) apresenta um espectro de FTIR da fase monetita e cita as suas bandas relativas a presença de grupos fosfatos em 1450-1300, 1170, 1131, 1081, 996, 891, 578, 532, 420, 404 cm⁻¹. O espectro de FTIR obtido neste trabalho sugere a obtenção da fase monetita para a placa de Ti recoberta no tempo de 2h e 4h, apesar da análise de DRX apenas identificar a ocorrência de uma transformação bruxita-monetita no tempo de 4h. A análise por FTIR poderia ser mais sensível ao processo de transição de fases.

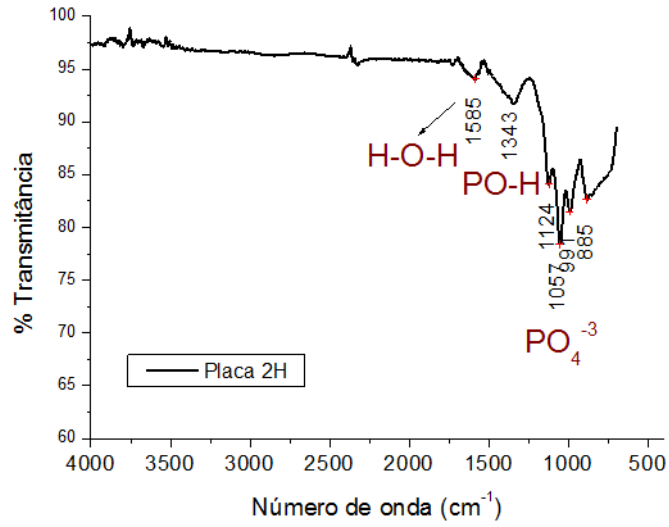


FIG. 4.28 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 2 horas.

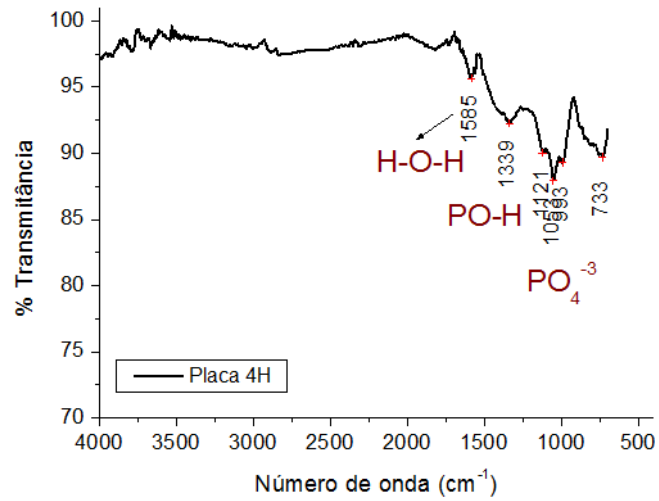


FIG. 4.29 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 4 horas.

4.3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV), ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS) DAS AMOSTRAS RECOBERTAS SEM ZN, APÓS OS TEMPOS DE 1H, 2H E 4H A 80°C

As imagens obtidas por MEV para os recobrimentos sobre placas de titânio após imersão em solução precursora, apresentaram uma morfologia característica típica de monetita (cristais em forma de placas), com micrografias semelhantes às que foram apresentadas por PRADO *et al.*, (2001). Foi possível observar ainda um aumento significativo na área recoberta após 2h de imersão da placa de titânio, quando comparado ao período de 1h (FIG. 4.30 e FIG. 4.31). Entre 2h e 4h, essa diferença já não foi discrepante ao MEV (FIG. 4.31 e FIG. 4.32).

As análises de EDS feitas a partir de regiões selecionadas nas eletromicrografias em MEV detectaram a presença somente de Ti na placa polida sem recobrimento (FIG. 4.33). Nas placas recobertas, foram detectados Ca e P oriundos da fase monetita formada, e Ti proveniente do substrato (FIG. 4.34 a FIG. 4.36).

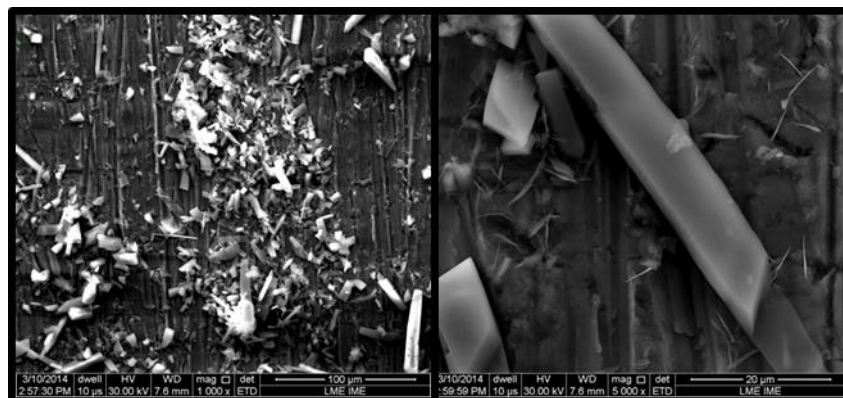


FIG. 4.30 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora por 1h a 80°C. Aumentos de 1000X e 5000X.

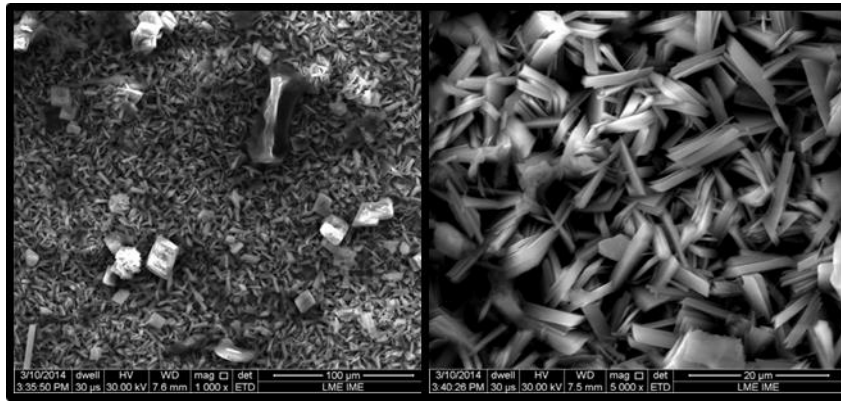


FIG. 4.31 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora por 2h a 80°C.
Aumentos de 1000X e 5000X.

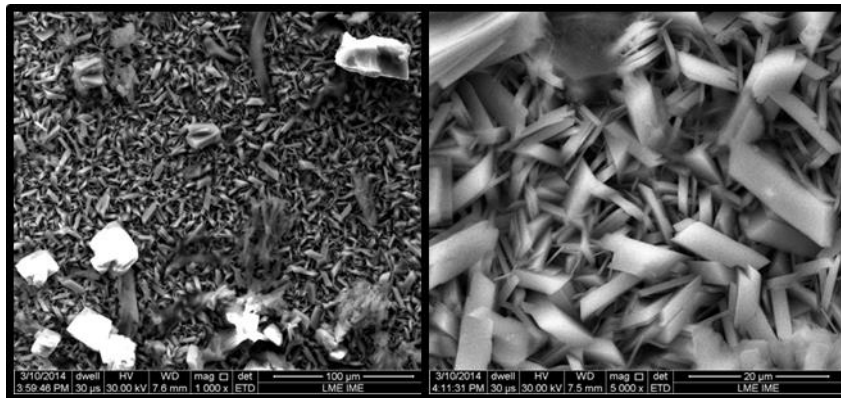


FIG. 4.32 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora por 4h a 80°C.
Aumentos de 1000X e 5000X

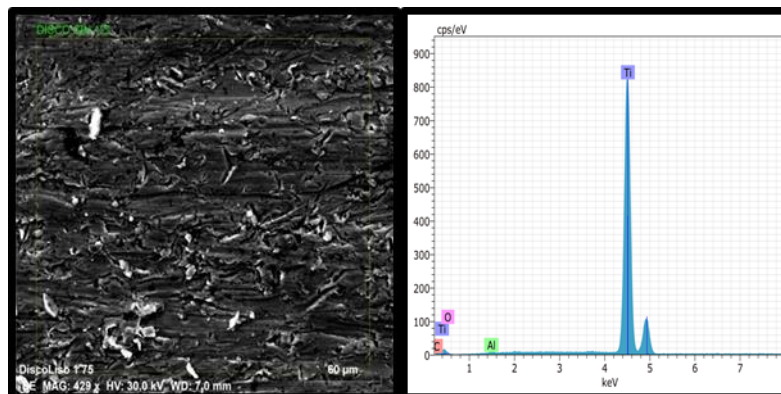


FIG. 4.33 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio polida sem recobrimento.

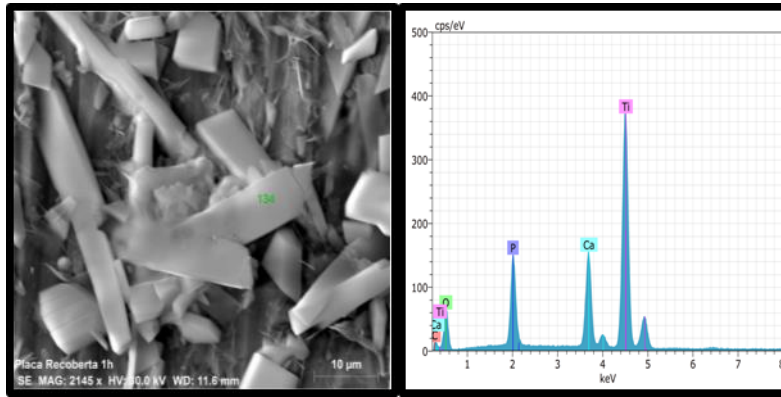


FIG. 4.34 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta após 1h a 80°C.

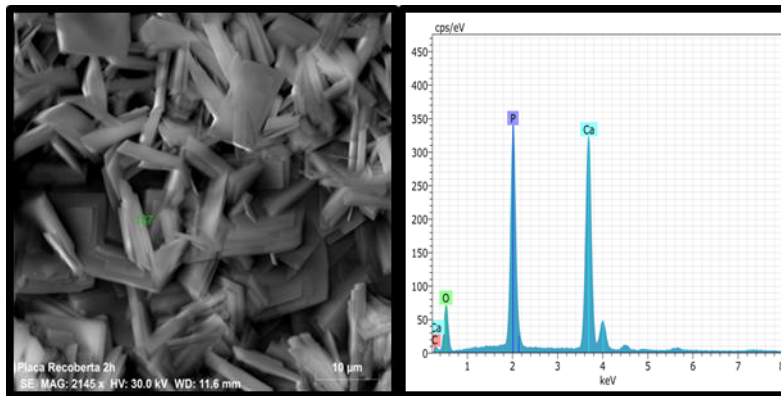


FIG. 4.35 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta após 2h a 80°C.

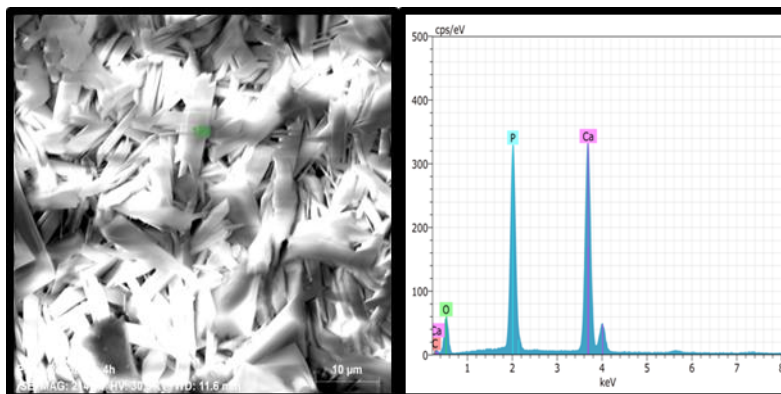


FIG. 4.36 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta após 4h a 80°C.

4.3.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DAS AMOSTRAS RECOBERTAS COM ZN, APÓS OS TEMPOS DE 1H, 2H E 4H A 80°C

As FIG. 4.37 a FIG. 4.39 mostram os resultados obtidos após análises por DRX nas amostras recobertas após 1h, 2h e 4h a 80°C .

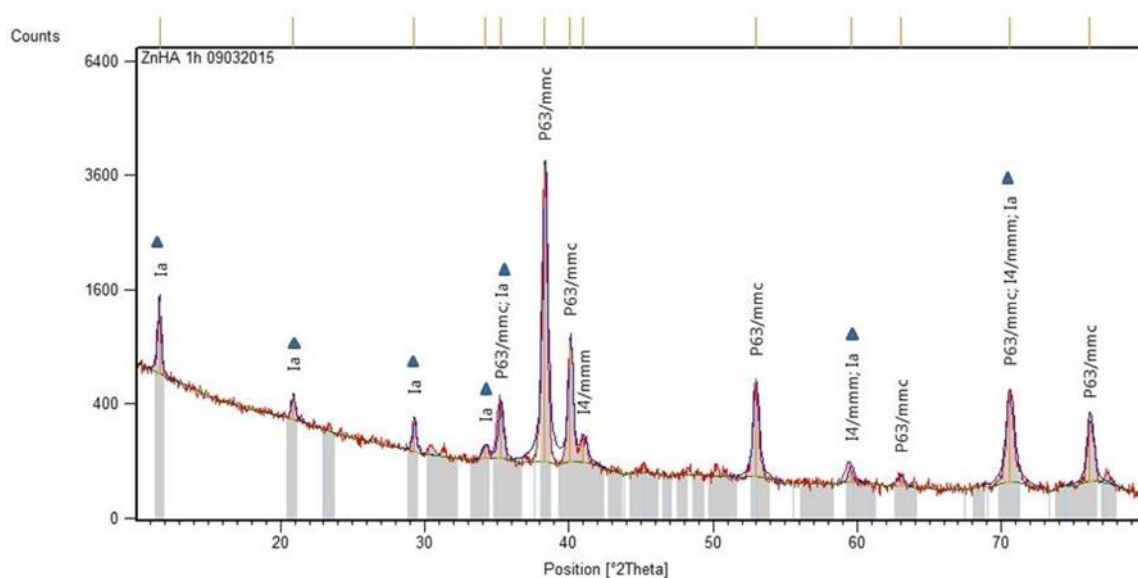


FIG. 4.37 Difratoograma de raios X da amostra recoberta em placa de Ti e presença de Zn, após 1h a 80°C. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH₂ (I4/mmm), bruxita (Ia, ▲).

A análise dos difratogramas das amostras recobertas após 1 hora indicou como fase majoritária o substrato de titânio JCPDS 01-089-3073 (P63/mmc) e a sua fase secundária, TiH₂ JCPDS 00-009-0371 (I4/mmm). No recobrimento obtido, foi caracterizada a fase bruxita JCPDS00-011-0293 (Ia) como uma camada fina de recobrimento.

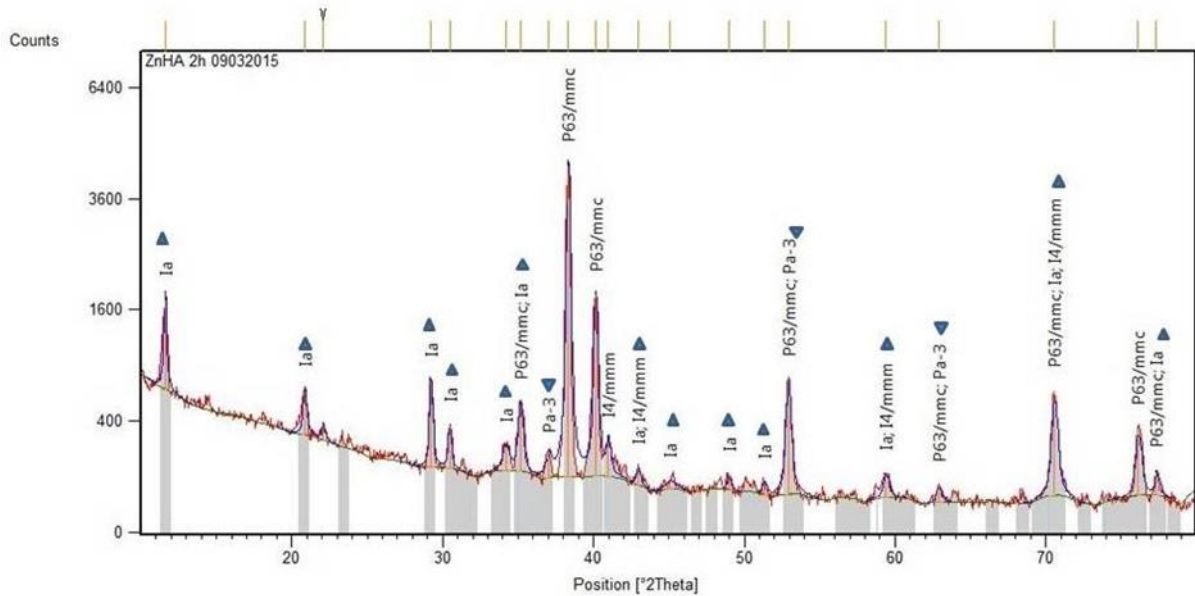


FIG. 4.38 Difratoograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti e presença de Zn, após 2h a 80°C. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH₂ (I4/mmm), bruxita (Ia, ▲) e ZnO (Pa-3, ▼).

Um resultado similar foi encontrado na amostra recoberta após 2h, sendo encontradas as fases Ti majoritária JCPDS 01-089-3073, (P63/mmc), TiH₂ JCPDS 00-009-0371 (I4/mmm) características do substrato e as fases bruxita JCPDS 00-011-0293 (Ia) e óxido de zinco JCPDS 01-077-2414 (sistema cúbico e grupo espacial Pa-3), revelando a formação de um sistema bifásico na camada de recobrimento. Picos não identificados em valores de $2\theta = 22,0733^\circ$ e $23,8338^\circ$, podem estar relacionados a alguma fase minoritária ou impureza presente.

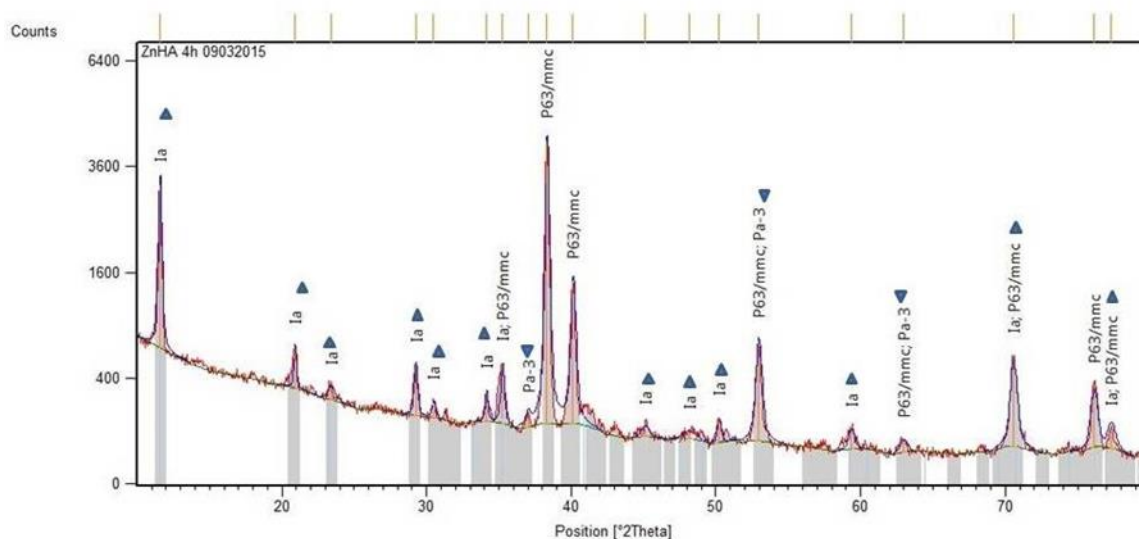


FIG. 4.39 Difratoograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti e presença de Zn, após 4h a 80°C. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH₂ (I4/mmm), bruxita (Ia, ▲) e ZnO (Pa-3, ▼).

Para as amostras recobertas após 4h foi identificado a presença das fases bruxita JCPDS 00-011-0293(CaPO₃(OH).2H₂O, Ia), além de ZnO JCPDS 01-077-2414 (Pa-3) e do substrato Ti JCPDS 01-089-3073 (P6₃/mmc).

4.3.5 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DAS AMOSTRAS RECOBERTAS COM ZN, APÓS TEMPOS DE 1H, 2H E 4H A 80°C

Os resultados das análises de FTIR das amostras das placas de Ti recobertas com HA em presença de zinco são mostrados nas FIG. 4.40 a FIG. 4.42. É possível observar uma grande similaridade nos perfis dos espectros das amostras obtidas nos tempos de 1h e 2h, apesar das bandas obtidas serem menos definidas e mais largas que os espectros de FTIR obtidos nas amostras preparadas na ausência de zinco. A presença de uma banda larga em torno de 3280 cm⁻¹ ocorre provavelmente devido aos grupos OH⁻ da fase bruxita, assim como bandas de grupos fosfatos na região de 1700-1200 cm⁻¹, o que foi confirmado pelos resultados de DRX.

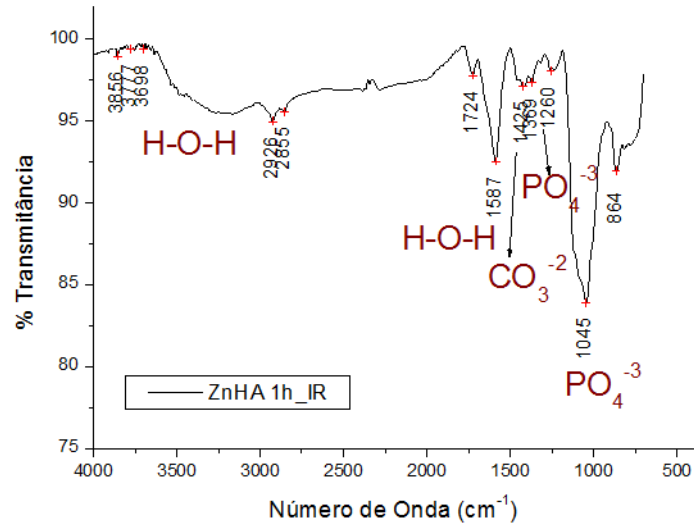


FIG. 4.40 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta em presença de zinco após 1 hora

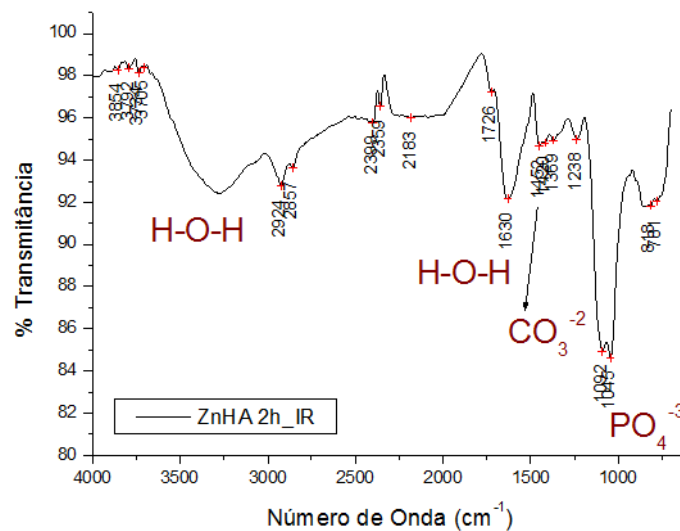


FIG. 4.41 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta em presença de zinco após 2 horas

Comparando-se os resultados de FTIR de placas de Ti recobertas na presença e na ausência de zinco, com dados da literatura (TORTET *et al*, 1997), observa-se uma similaridade maior nos perfis dos espectros para as amostras obtidas na ausência de zinco. Esse resultado poderia ser explicado pela inserção do zinco na rede da bruxita, causando alguma variação na intensidade e na posição das bandas.

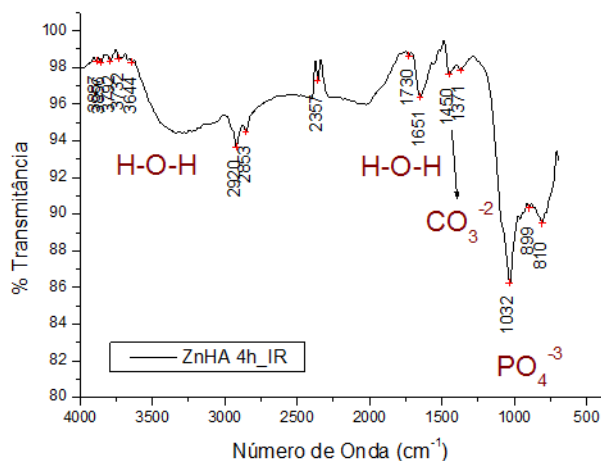


FIG. 4.42 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta em presença de zinco após 4 horas

4.3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV), ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS) DAS AMOSTRAS RECOBERTAS COM ZN, APÓS TEMPOS DE 1H, 2H E 4H A 80°C

Considerando-se as amostras de recobrimento obtidas a partir de solução precursora modificada com a inserção de zinco, verificou-se que os recobrimentos apresentaram morfologia diferente da acicular, sugerindo um efeito da presença de zinco na formação da fase existente (FIG. 4.43 a FIG. 4.45). A análise por EDS detectou a presença do elemento zinco nos tempos de 1h e 2h (FIG. 4.46 a FIG. 4.48). No caso do resultado obtido para o tempo de 4h (FIG. 4.48), não foi detectado o Zn, o que pode estar relacionado à dissolução de alguma fase secundária contendo o Zn.

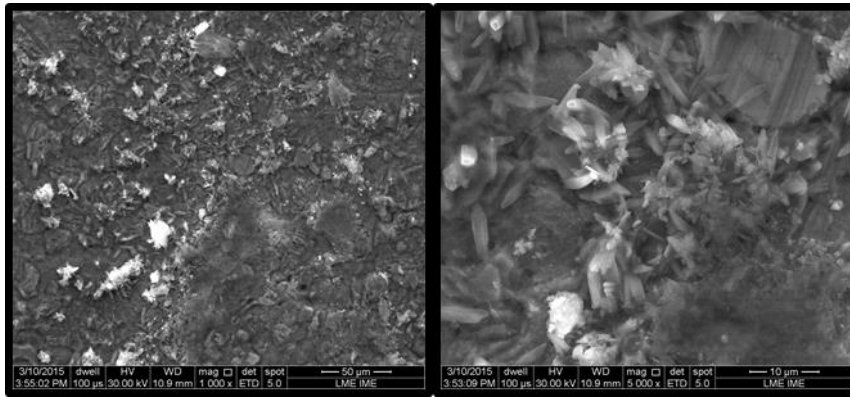


FIG. 4.43 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora com Zn por 1h a 80°C. Aumentos de 1000X e 5000X.

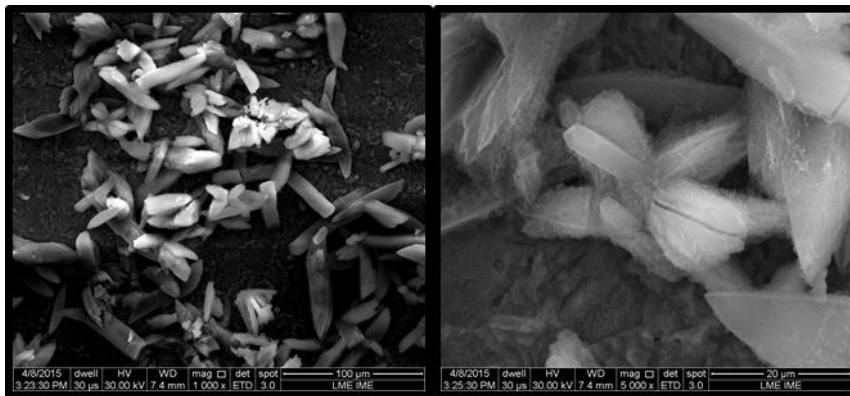


FIG. 4.44 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora com Zn por 2h a 80°C. Aumentos de 1000X e 5000X.

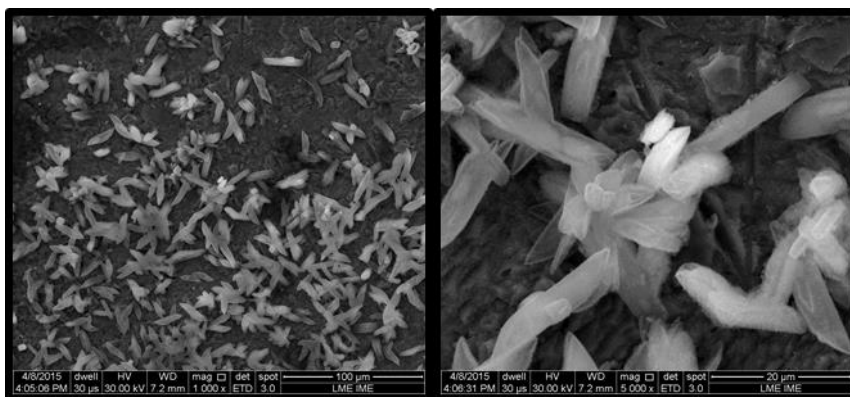


FIG. 4.45 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio imersa em solução precursora com Zn por 4h a 80°C. Aumentos de 1000X e 5000X.

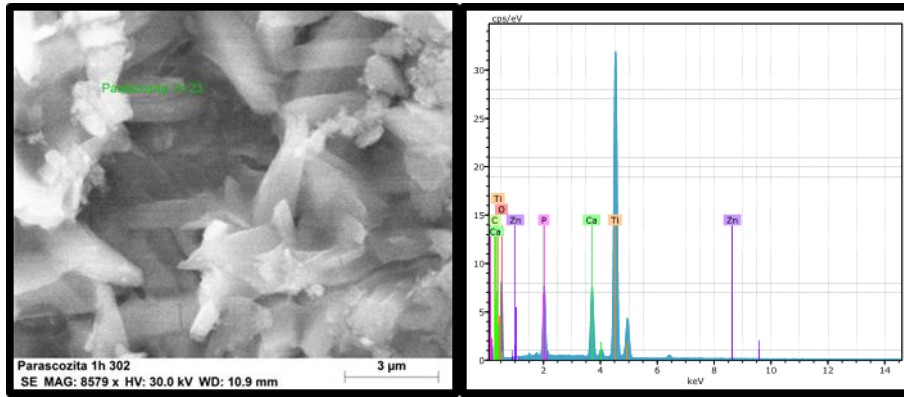


FIG. 4.46 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta com Zn após 1h a 80°C .

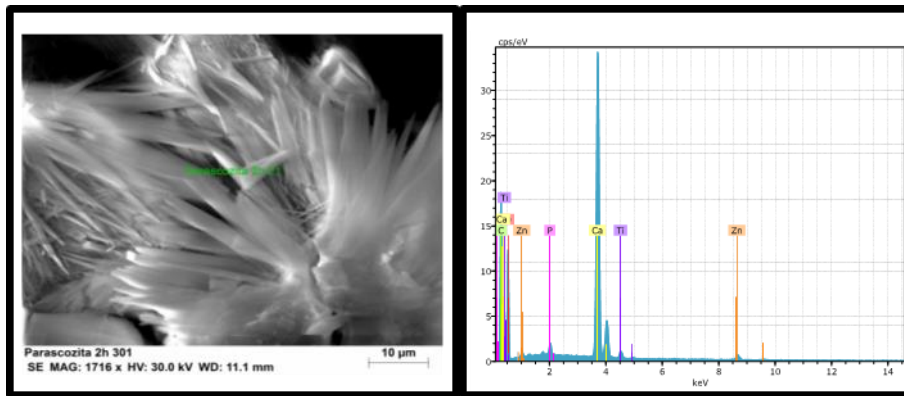


FIG. 4.47 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta com Zn após 2h a 80°C.

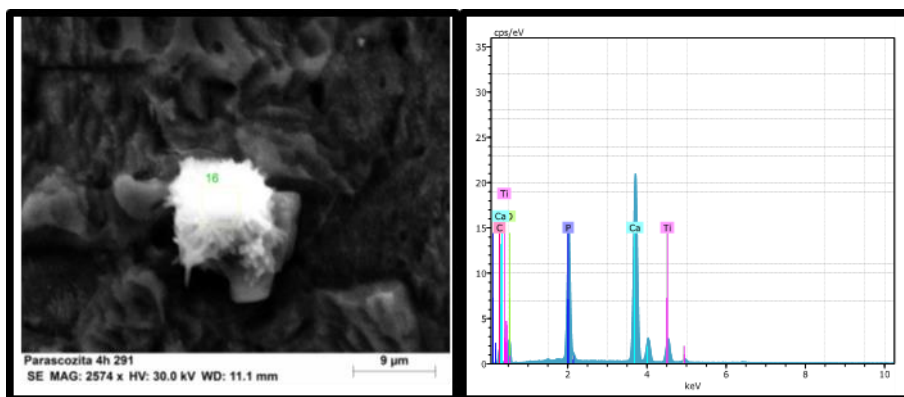


FIG. 4.48 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS da placa de titânio recoberta com Zn após 4h a 80°C.

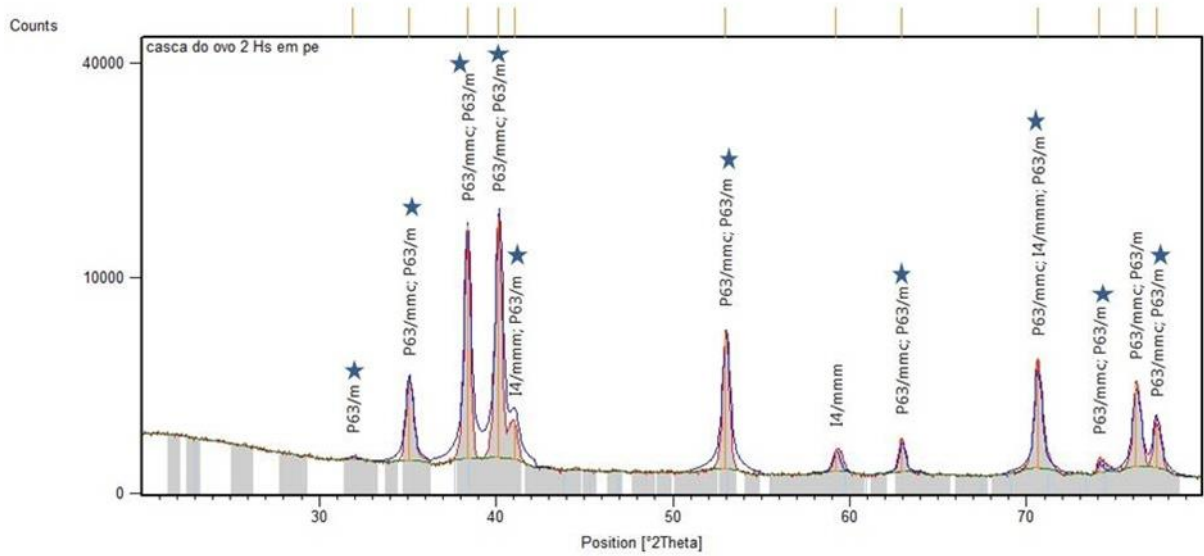


FIG. 4.50 Difratoograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti após 2h a 80°C seguido de conversão com KOH. Identificação de fases cristalinas: Ti (P63/mmc), TiH₂ (I4/mmm) e HA (P63/m,*).

A análise dos difratogramas das amostras recobertas em placa de Ti após 4 horas e convertidas em KOH indicou a presença de picos do substrato de titânio JCPDS 01-089-3073 (P63/mmc), além de picos com baixa intensidade, pertencentes à hidroxiapatita (JCPDS 01-086-0740, P63/m), (FIG. 4.51). A presença de picos característicos de hidroxiapatita ficou melhor evidenciada pelo difratograma no tempo de 4h de recobrimento quando comparadas aos tempos de 1h e 2h.

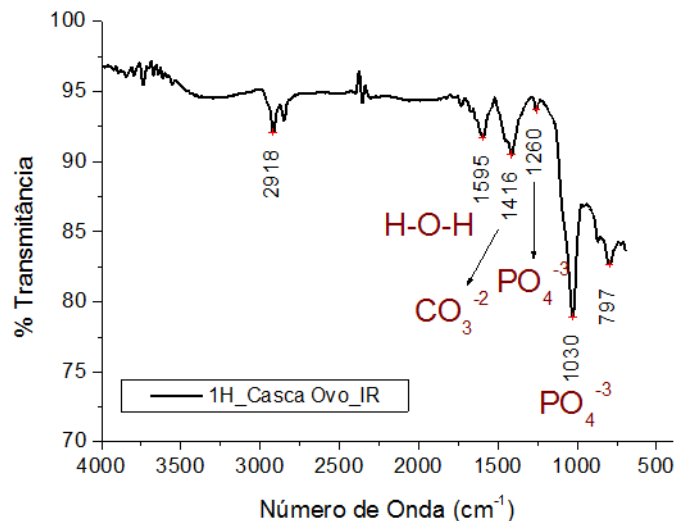


FIG. 4.52 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 1 hora e conversão em KOH.

A FIG. 4.52. mostra o espectro obtido para a amostra de placa de Ti após 1 hora seguido de conversão em KOH. Observa-se a presença de uma banda intensa centrada em 1030 cm^{-1} , característica de grupos fosfato. De acordo com a literatura, esta banda está relacionada a fase hidroxiapatita, PENA e VALLET-REGI (2003), e confirma o resultado encontrado na análise de DRX. Além disso, é possível observar bandas adicionais não relacionadas a essa fase, em 1260 cm^{-1} e em 797 cm^{-1} , que coincidem com os valores das bandas encontradas nos espectros de FTIR das placas de Ti antes da conversão em KOH. Este resultado sugere a presença de fases precursoras de monetita/bruxita no tempo de 1 hora.

Um resultado similar foi encontrado nos espectros de FTIR das amostras de placas de Ti após 2h e 4h seguidas de conversão em KOH, FIG. 4.53 e FIG. 4.54. Vale a pena ressaltar a presença de bandas de grupos carbonato nessas amostras em valores próximos a 1420 cm^{-1} , que estão presentes na solução e são facilmente adsorvidos pela fase HA.

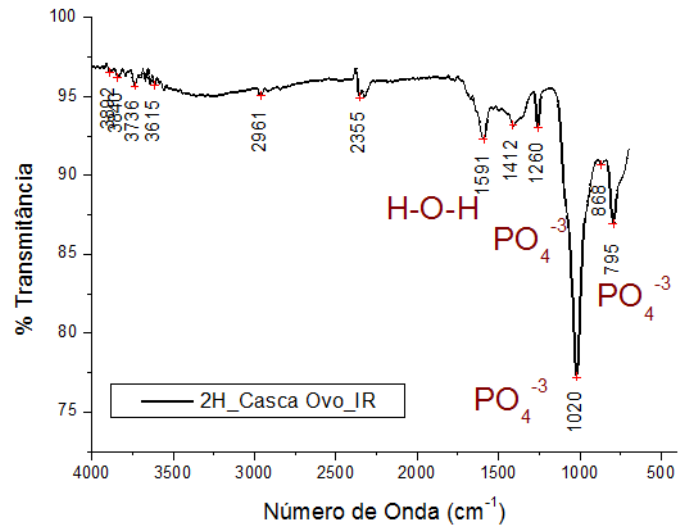


FIG. 4.53 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 2 horas e conversão em KOH.

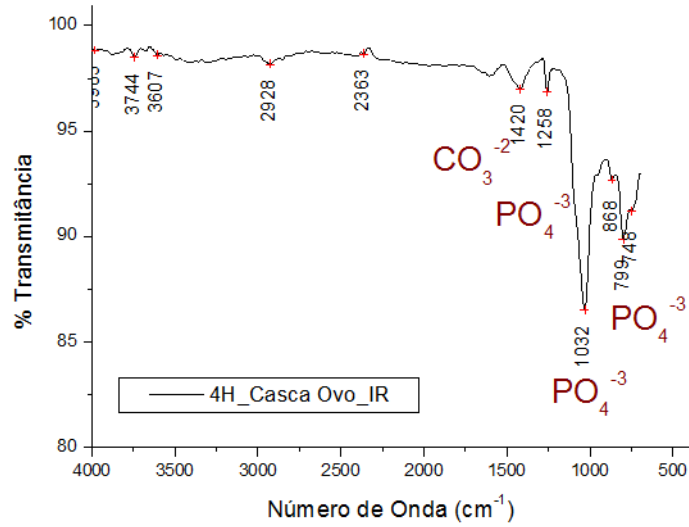


FIG. 4.54 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 4 horas e conversão em KOH.

4.3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV), ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS) DAS AMOSTRAS RECOBERTAS SEM ZN, APÓS TEMPOS DE 1H, 2H E 4H A 80°C SEGUIDAS DE CONVERSÃO EM KOH.

As placas recobertas com as soluções precursoras de HA foram convertidas pela imersão em solução de 0,1M KOH, de acordo com protocolo já descrito. Em seguida, foram submetidas a novas análises por MEV e EDS. As amostras de HA foram separadas de acordo com o tempo destinado ao recobrimento (1h, 2h e 4h). Os aumentos aplicados para essa avaliação foram de 1000X, 5000X e 20.000X, e são mostrados para as imagens obtidas conforme as (FIG. 4.55 a FIG. 4.57). Os resultados observados ao MEV sugerem um recobrimento mais significativo nas amostras com maior tempo de exposição (4h).

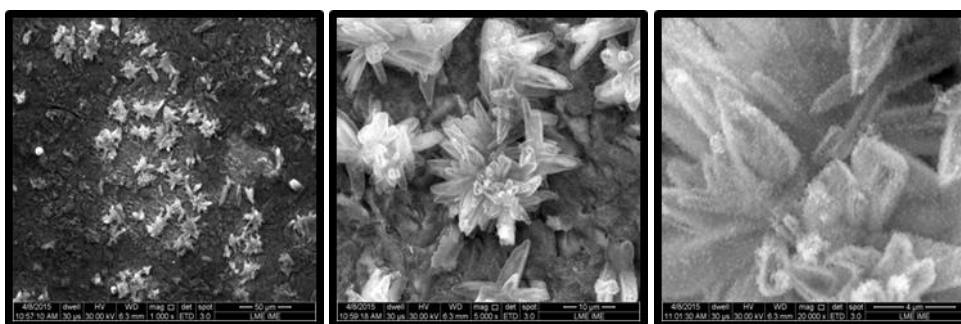


FIG. 4.55 Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com HA imersas em solução precursora por 1h e convertidas em solução de KOH a 60°C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X

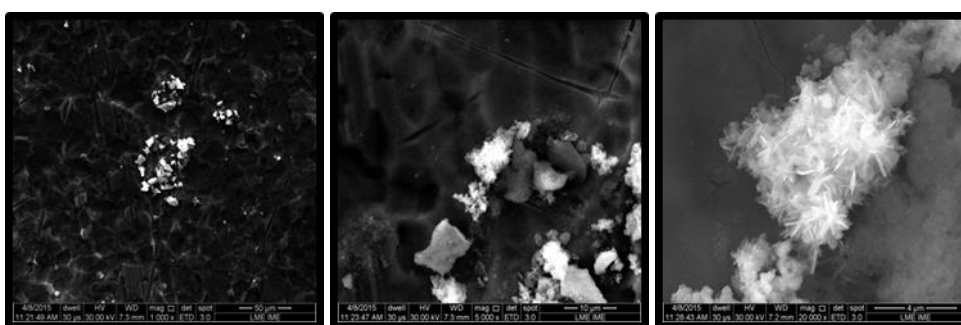


FIG. 4.56 Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com HA imersas em solução precursora por 2h e convertidas em solução de KOH a 60°C . Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X

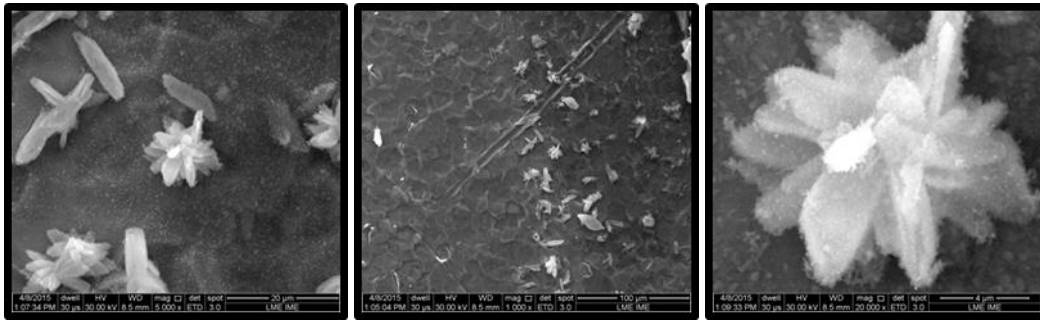


FIG. 4.57 Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com HA imersas em solução precursora por 4h e convertidas em solução de KOH a 60°C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X

As análises de EDS mostradas nas (FIG. 4.58 a FIG. 4.60) mostram a presença dos elementos Ca e P em todas as amostras. A detecção de Pt deve-se ao filme depositado propositalmente sobre as amostras para análise de MEV.

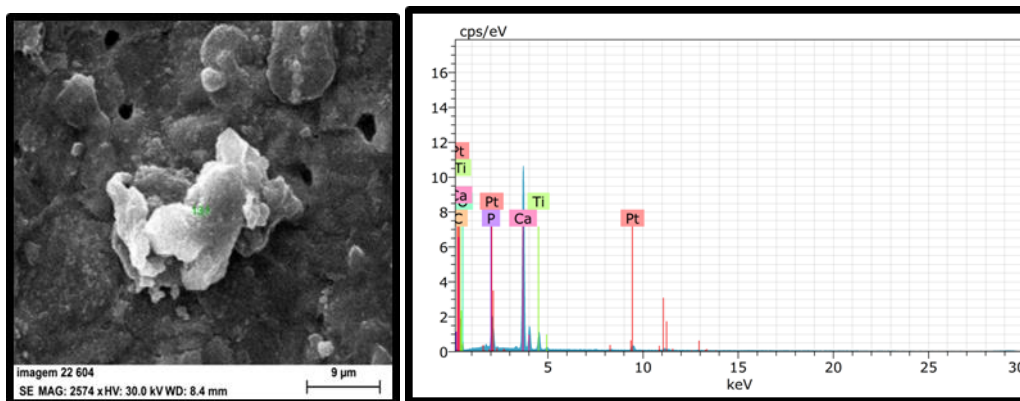


FIG. 4.58 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com HA imersas em solução precursora por 1h e convertidas em solução de KOH a 60°C.

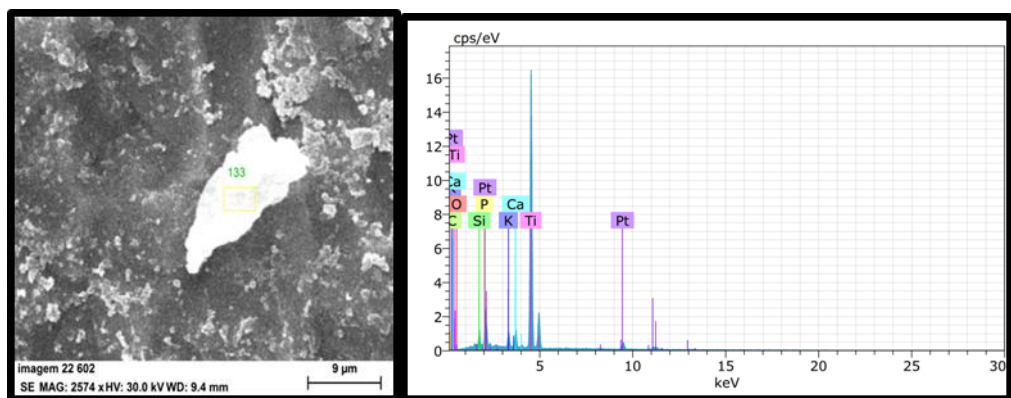


FIG. 4.59 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com HA imersas em solução precursora por 2h e convertidas em solução de KOH a 60°C.

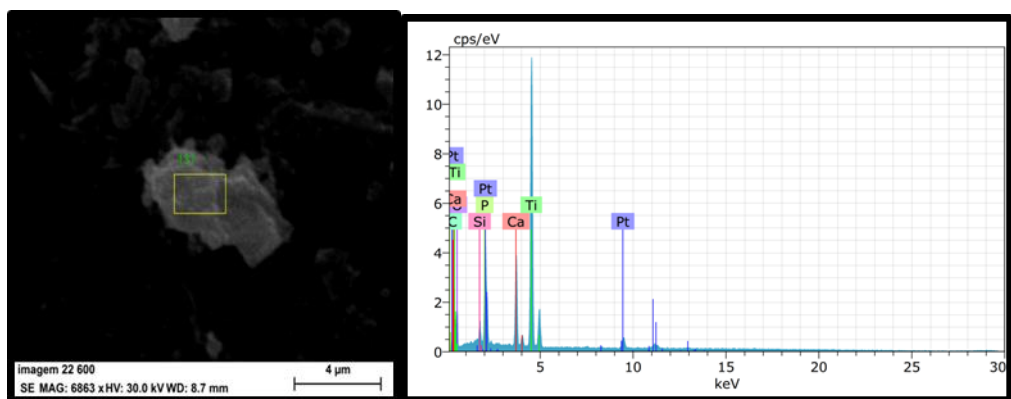


FIG. 4.60 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com HA imersas em solução precursora por 4h e convertidas em solução de KOH a 60°C.

4.3.10 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DAS AMOSTRAS RECOBERTAS COM ZN, APÓS TEMPOS DE 1H, 2H E 4H A 80°C SEGUIDAS DE CONVERSÃO EM KOH

A análise dos difratogramas das amostras recobertas após 1 e 2 horas em presença de Zn, seguidas de conversão em KOH indicaram como fase majoritária o substrato de titânio JCPDS 01-089-3073 ($P6_3/mmc$), FIG. 4.61 e FIG. 4.62. O recobrimento obtido foi caracterizado como a fase hidroxiapatita JCPDS 01-086-1199 ($Ca_{9,74}(PO_4)_6(OH)_{2,08}P6_3/m$) com a detecção de sinal na região de seus picos principais em torno de 32° e com baixa intensidade.

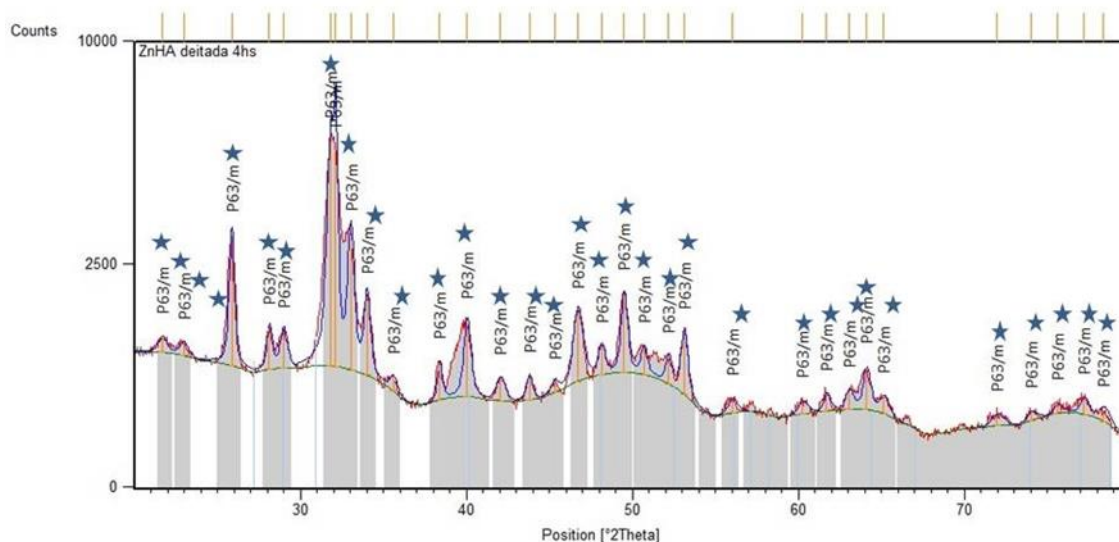


FIG. 4.63 Difratoograma de raios X de amostra recoberta em placa de Ti em presença de Zn após 4h seguido de conversão com KOH. Identificação de uma única fase cristalina: HA (P63/m,*).

4.3.11 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DAS AMOSTRAS RECOBERTAS COM ZN, APÓS TEMPOS DE 1H, 2H E 4H A 80°C SEGUIDAS DE CONVERSÃO EM KOH

As FIG. 4.64 a FIG. 4.66 mostram os resultados das análises de FTIR obtidas para as amostras de placas de Ti recobertas após 1h, 2h e 4h em presença de zinco, e convertidas em KOH. Observando-se a FIG. 4.64, verifica-se um comportamento similar ao das amostras obtidas na ausência de Zn. A banda intensa situada em torno de 1024 cm^{-1} é relativa a grupos fosfatos, e está possivelmente relacionada a fase hidroxiapatita conforme dados da literatura, PENA e VALLET-REGI (2003). As bandas encontradas em 1261 cm^{-1} e em 804 cm^{-1} são relativas a grupos fosfatos, e sugerem a presença da fase precursora na amostra de placas de Ti recobertas após 1h, FIG. 4.64.

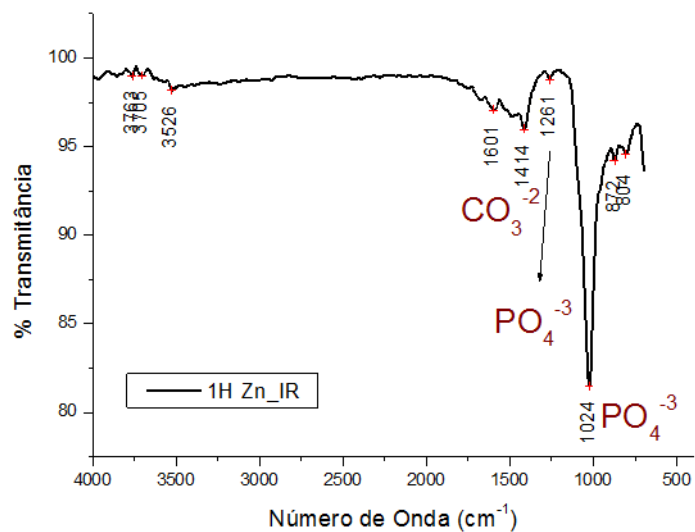


FIG. 4.64 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 1 hora em presença de Zn após a conversão em KOH.

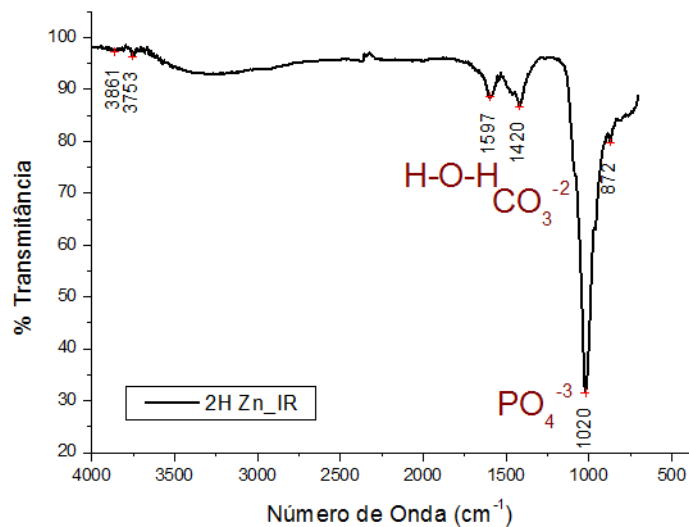


FIG. 4.65 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 2 horas em presença de Zn após a conversão em KOH.

A análise de FTIR das amostras de placas de Ti recoberto após 2h e 4h em presença de zinco e convertida em KOH sugere uma maior eficiência na conversão de bruxita-hidroxiapatita, uma vez que não se observa a ocorrência de bandas de fosfato relativas as fases precursoras em 1280 e 797 cm^{-1} , FIG. 4.65 e FIG. 4.66.

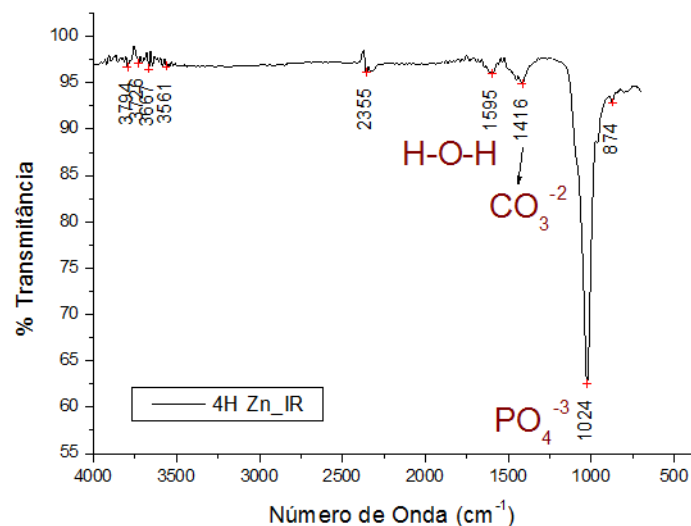


FIG. 4.66 Espectro de FTIR de placa de Ti recoberta após 4 horas em presença de Zn após a conversão em KOH.

Comparando-se os resultados de recobrimentos em placas de Ti obtidos nesse trabalho, verifica-se uma formação de uma camada de fosfato de cálcio precursor mais eficiente nos experimentos contendo zinco, sendo identificada como bruxita a fase cristalina obtida. Na ausência do íon Zn, observou-se a transformação de fase bruxita/monetita ao longo do tempo, sugerindo um processo dinâmico de dissolução e reprecipitação na superfície do substrato, reduzindo a qualidade do recobrimento final de HA. Para reduzir esse efeito, um tempo superior a 4h seria necessário, permitindo que a transformação em monetita fosse concluída, e posteriormente a conversão em HA fosse realizada.

A TAB. 4.3 resume os resultados de identificação de fases por DRX e de grupos funcionais por FTIR obtidos nas amostras de placas de Ti recobertas nos tempos de 1, 2 e 4 horas antes e após conversão em KOH.

TAB. 4.3 Resultados de por DRX e de FTIR das amostras de placas de Ti recobertas nos tempos de 1, 2 e 4 horas antes e após conversão em KOH.

Amostra Placa	DRX	FTIR
1H sol precursora	Bruxita (JCPDS 00-011-0293), placa Ti (JCPDS 01-089-3073), TiH₂ (JCPDS 00-009-0371)	Bandas de Bruxita
2 H sol precursora	Bruxita (JCPDS 00-011-0293,,), placa Ti (JCPDS 01-089-3073)	Bandas de Monetita
4 H sol Precursora	Monetita (JCPDS 01-075-1520) e Bruxita (JCPDS 00-011-0293, placa Ti (JCPDS 01-089-3073)	Bandas de Monetita
1H sol precursora + Zn	Bruxita (JCPDS00-011-0293), placa Ti JCPDS 01-089-3073, TiH₂ (JCPDS 00-009-0371)	Bandas de OH e fosfato
2 H sol precursora + Zn	Bruxita (JCPDS 00-011-0293) e ZnO (JCPDS01-077-2414), placa Ti JCPDS 01-089-3073, TiH₂ (JCPDS 00-009-0371)	Bandas de OH e fosfato
4 H sol Precursora + Zn	Bruxita (JCPDS 00-011-0293), e ZnO (JCPDS JCPDS01-077-2414), placa Ti (JCPDS 01-089-3073)	Bandas de OH e fosfato
1H conv KOH	Pico de baixa intensidade na região principal da HA , placa Ti (JCPDS 01-089-3073), TiH₂ (JCPDS 00-009-0371)	Bandas de HA e fase precursora
2 H conv KOH	Pico de baixa intensidade na região principal da HA , placa Ti (JCPDS 01-089-3073)	Bandas de HA e fase precursora
4 H conv KOH	Aumento intensidade de pico na região principal da HA (provável JCPDS01-086-0740), placa Ti (JCPDS 01-089-3073), TiH₂ (JCPDS 00-009-0371)	Bandas de HA e fase precursora
1H conv KOH + Zn	HA (JCPDS 01-086-1199), placa Ti (JCPDS 01-089-3073), TiH₂ (JCPDS 00-009-0371)	Bandas de HA e fase precursora
2 H conv KOH + Zn	HA (JCPDS 01-086-1199), placa Ti (JCPDS 01-089-3073),	Bandas de HA
4 H conv KOH + Zn	HA (JCPDS 01-086-1199).	Bandas de HA

4.3.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV), ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS) DAS AMOSTRAS RECOBERTAS COM ZN, APÓS TEMPOS DE 1H, 2H E 4H A 80°C SEGUIDAS DE CONVERSÃO EM KOH.

As amostras recobertas nos tempos de 2h e 4h apresentaram um recobrimento mais significativo em relação a placa recoberta durante 1h (FIG. 4.67 a FIG. 4.69). O recobrimento com Zn-HA também mostrou-se mais eficiente pela análise em MEV quando comparado ao recobrimento obtido com HA.

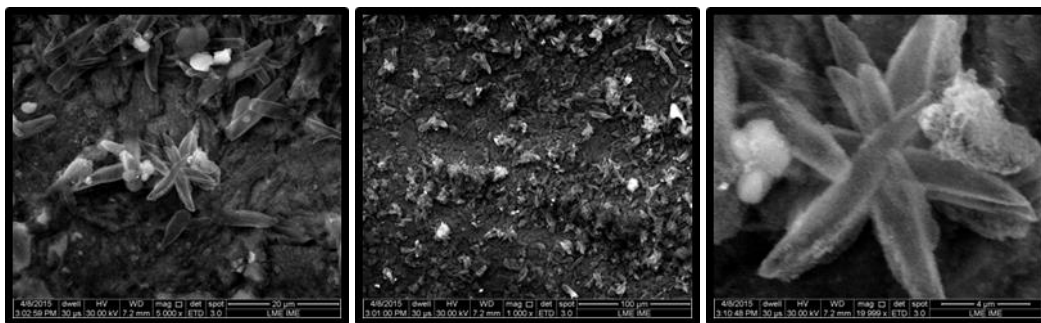


FIG. 4.67 Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com Zn imersas em solução precursora por 1h e convertidas em solução de KOH a 60°C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X

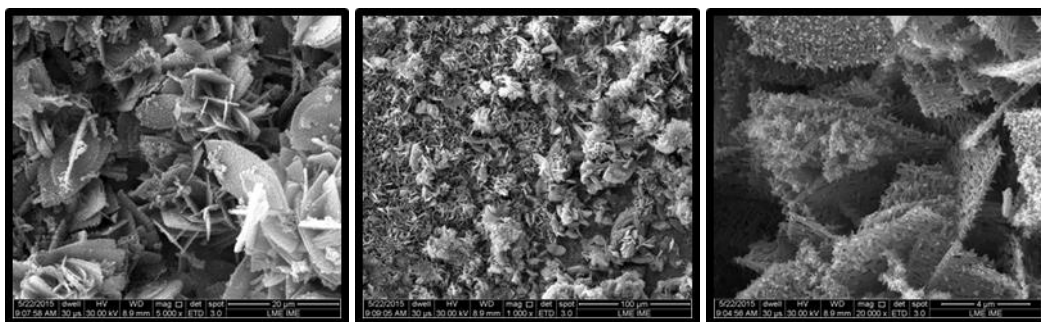


FIG. 4.68 Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com Zn imersas em solução precursora por 2h e convertidas em solução de KOH a 60°C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X

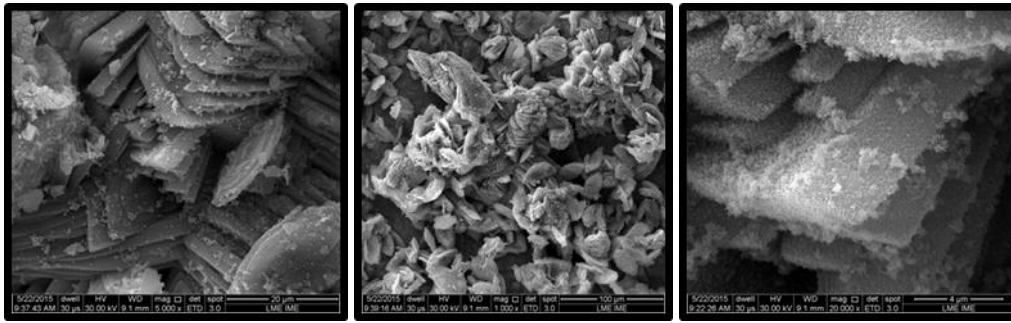


FIG. 4.69 Eletromicrografias (MEV) de placas de titânio recobertas com Zn imersas em solução precursora por 4h e convertidas em solução de KOH a 60°C. Aumentos de 1000X, 5000X e 20.000X

No caso das amostras convertidas a partir de solução precursora contendo zinco, os resultados obtidos indicam a presença desse elemento em todas as amostras além de Ca e P. A detecção do elemento Ti se deu apenas na amostra recoberta e convertida, sendo esse recobrimento obtido após 1h de imersão em solução precursora (FIG. 4.70). Os melhores recobrimentos foram considerados em tempos superiores, em razão da diminuição do sinal do substrato (FIG. 4.71 e FIG. 4.72).

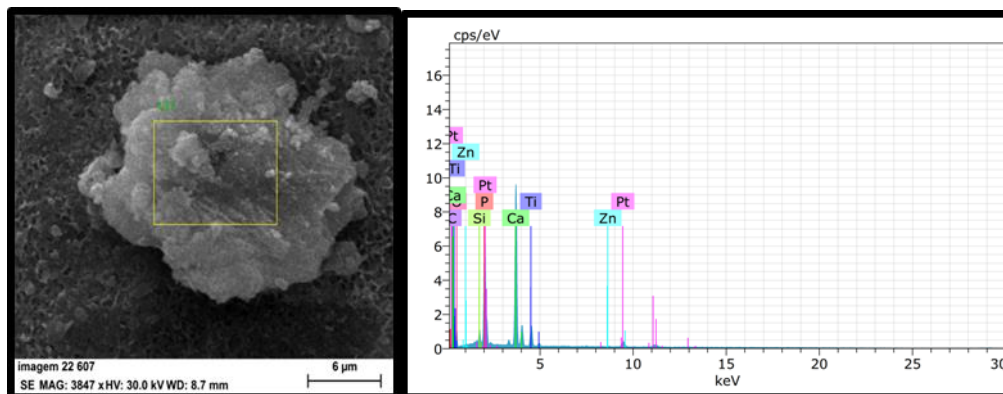


FIG. 4.70 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com Zn imersas em solução precursora por 1h e convertidas em solução de KOH a 60°C.

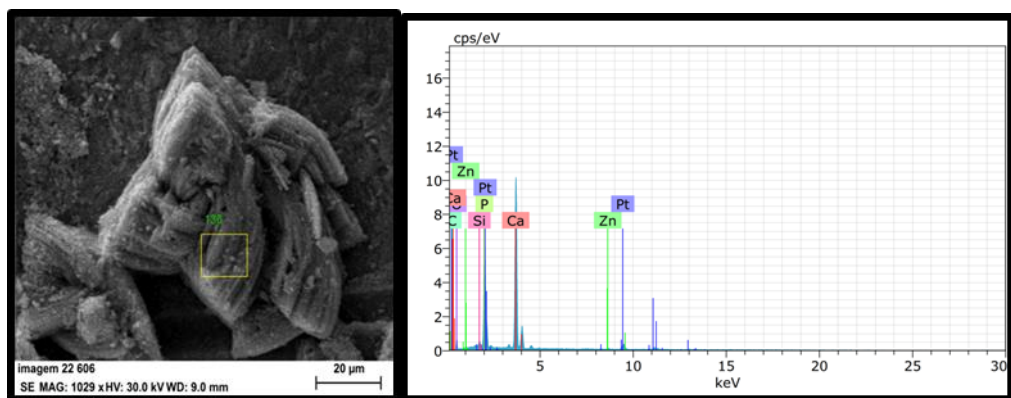


FIG. 4.71 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com Zn imersas em solução precursora por 2h e convertidas em solução de KOH a 60°C.

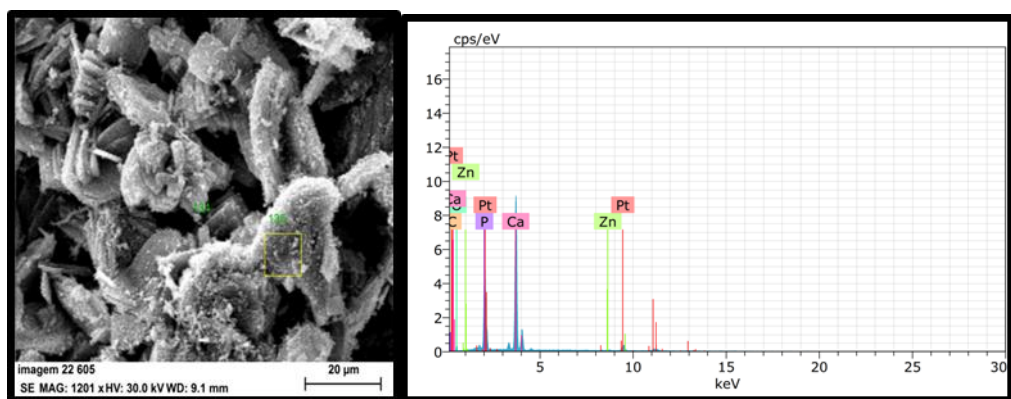


FIG. 4.72 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) da placa de titânio recoberta com Zn imersas em solução precursora por 4h e convertidas em solução de KOH a 60°C.

4.4 TOXICIDADE

O ensaio com a CAM (Membrana Corioalantóide) permitiu avaliar a toxicidade das amostras de HA e Zn-HA tratadas termicamente a 700°C, 900°C e 1100°C. As imagens mostradas nas FIG. 4.73 a FIG. 4.75 foram selecionadas por melhor representarem os resultados obtidos nas análises histopatológicas das amostras de HA e Zn-HA em pó tratadas termicamente. Foi verificada a presença de uma resposta inflamatória entre leve e moderada em todas as amostras testadas, com ausência de fibroplasia, o que é esperado em processos de regeneração. Segundo VALDES *et al.*, (2001) e ZIJLSTRA *et al.*, (2006) os processos de inflamação, hiperemia (aumento do volume sanguíneo em determinada região) e angiogênese

são esperados e estão correlacionados de acordo com sua intensidade à ausência de toxicidade. A presença de células inflamatórias em uma resposta leve, é fundamental para ativação de fatores endoteliais que deverão permitir que ocorra a angiogênese, que é considerada fundamental em eventos clínicos de reparação ou regeneração de feridas.

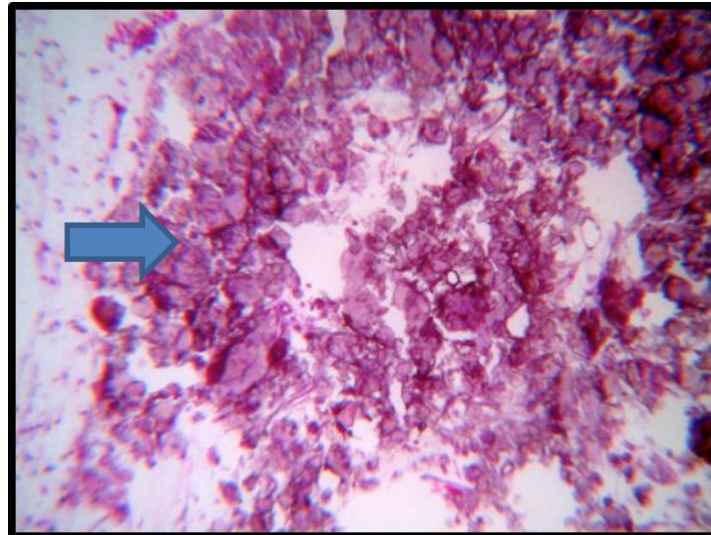


FIG. 4.73 Imagem histológica utilizando Hematoxilina Eosina da amostra HA 700^oC – seta evidenciando cristais de hidroxiapatita. Notar que os cristais estão aglutinados e não há presença de célula entre cada cristal, (aumento 10X).

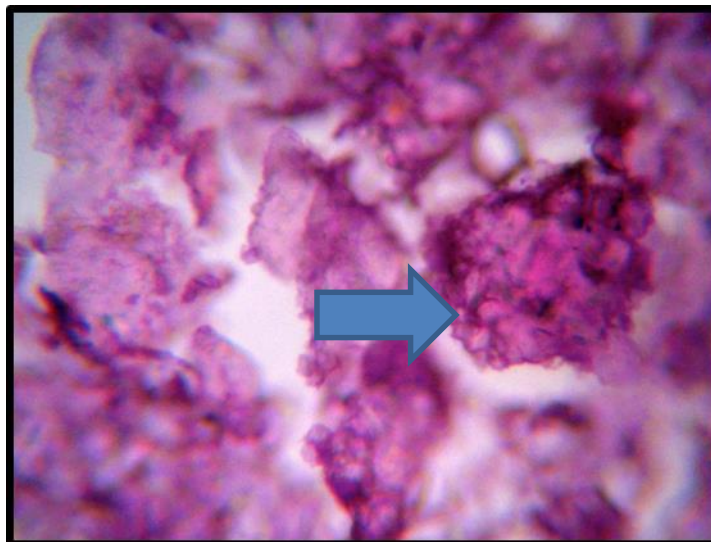


FIG. 4.74 Imagem histológica utilizando Hematoxilina Eosina da amostra HA 700^oC–seta evidenciando cristais de hidroxiapatita. Notar que os cristais estão aglutinados e não há presença de célula entre cada cristal, (aumento 40X).

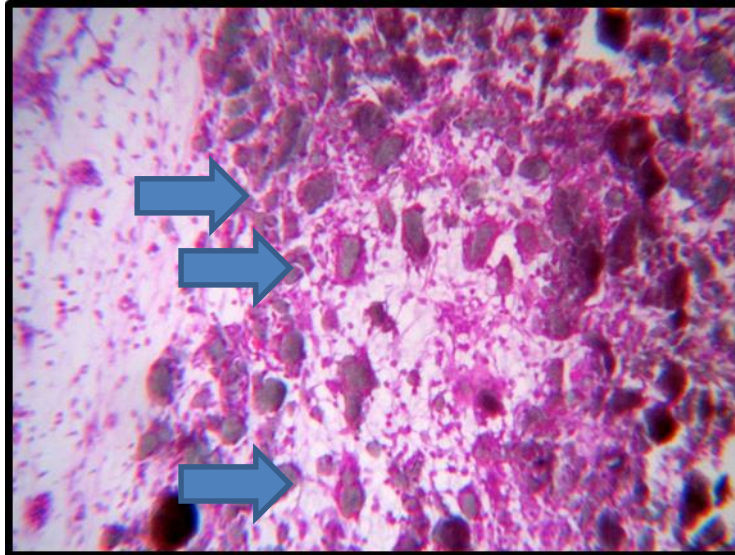


FIG. 4.75 Imagem histológica utilizando Hematoxilina Eosina da amostra Zn-HA 900°C– setas: células inflamatórias envolvendo os cristais de hidroxiapatita. Notar que os cristais estão dispersos pela membrana e há presença de célula envolvendo cada cristal, (aumento 10X).

O laudo apresentado pelo Laboratório de Patologia Veterinária RoseVetbr em Canoas-RS pode ser observado:

Os resultados verificados para o pó sintetizado de HA pura indicaram uma resposta inflamatória leve, caracterizada pela ausência de células. Além disso, um infiltrado inflamatório de baixa intensidade verificado através do indicativo de uma única (+) e uma pequena congestão (presença de sangue no interior de vasos na região analisada) com até duas (++) confirmaram os achados.

375-15 – 3452/15 – HA (Hidroxiapatita) Pura/ (1) – 700°C:

A – Presença do material: focal sem a presença de células; infiltrado inflamatório difuso (+); congestão (0)

376-15 – 3453/15 – HA (Hidroxiapatita) Pura/ (2) – 900°C:

A – Presença do material: focal sem a presença de células; infiltrado inflamatório multifocal predominantemente heterofílico (neutrófilo) (+); congestão (++)

377-15 – 3454/15 – HA (Hidroxiapatita) Pura/ (3) – 1100°C:

A – Presença do material: focal sem a presença de células; infiltrado inflamatório multifocal (+); congestão (+)

As amostras contendo o pó sintetizado de Zn-HA apresentaram sinais característicos de uma resposta inflamatória moderada. A evidência da presença de células inflamatórias somada a um infiltrado inflamatório moderado (++), permitiram identificar a intensidade da resposta inflamatória. O nível de congestão leve, sugere uma resposta inflamatória entre leve e moderada em todas as amostras verificadas contendo Zn.

378-15 – 3455/15 – Zn-HA (Hidroxiapatita Dopada com Zinco 2%)/ (4) – 700°C

A – Presença do material: focal com a presença de pérolas de queratina (possível presença de fragmento da casca do ovo); infiltrado inflamatório multifocal predominantemente heterofílico (neutrófilo) (++); congestão (++)

379-15 – 3456/15 – Zn-HA (Hidroxiapatita Dopada com Zinco 2%)/ (5) - 900°C

A – Presença do material: focal com a presença de células inflamatórias ao redor dos cristais; infiltrado inflamatório multifocal (++); congestão (++)

380-15 – 3457/15 – Zn-HA (Hidroxiapatita Dopada com Zinco 2%)/ (6) - 1100°C

A – Presença do material: focal com a presença de células inflamatórias ao redor dos cristais; infiltrado inflamatório multifocal (++); congestão (+)

4.5 BIOATIVIDADE

O teste de bioatividade que foi feito nas pastilhas tratadas termicamente com e sem Zn, não mostrou a deposição de HA em MEV em nenhuma das amostras verificadas (FIG. 4.76 a FIG. 4.81). Em contrapartida, as placas recobertas com e sem Zn, antes e após a conversão com KOH apresentaram imagens características de formação de “bone-like apatite” caracterizando bioatividade (FIG. 4.82 a FIG. 4.89).

Uma maior área superficial específica, bem como a ausência de tratamento térmico, são características diferenciais entre as placas recobertas e as pastilhas que podem ter influenciado nos resultados obtidos.

Entre as placas, as que foram recobertas com Monetita, Bruxita e Zn-HA apresentaram maior formação de “bone-like apatite”, se comparadas as placas recobertas com HA. Uma maior solubilidade da Monetita, Bruxita e Zn-HA podem explicar tal resultado.

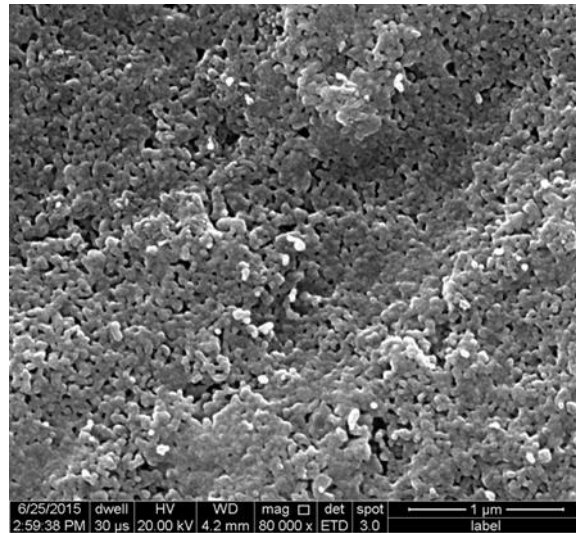


FIG. 4.76 Eletromicrografia de Pastilha de HA tratada termicamente a 700⁰C após imersão em meio de McCoy por 14 dias

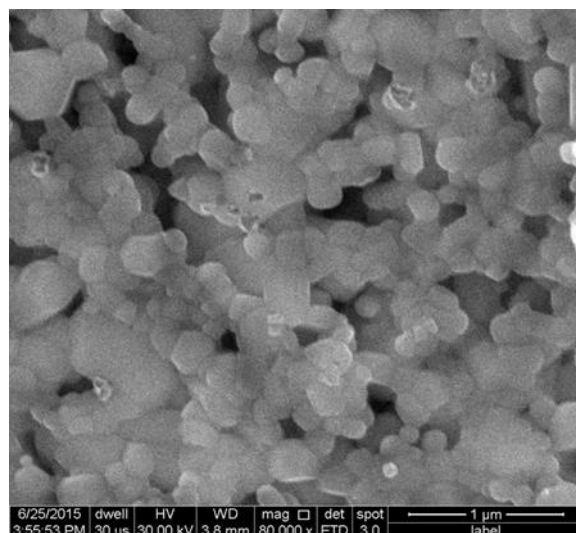


FIG. 4.77 Eletromicrografia de Pastilha de HA tratada termicamente a 900⁰C após imersão em meio de McCoy por 14 dias

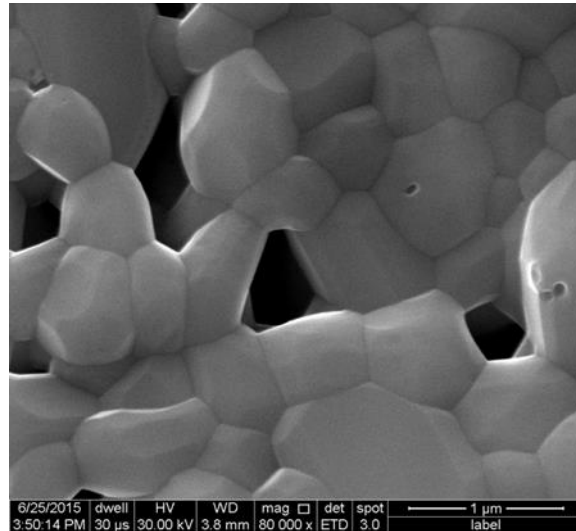


FIG. 4.78 Eletromicrografia de Pastilha de HA tratada termicamente a 1100^oC após imersão em meio de McCoy por 14 dias

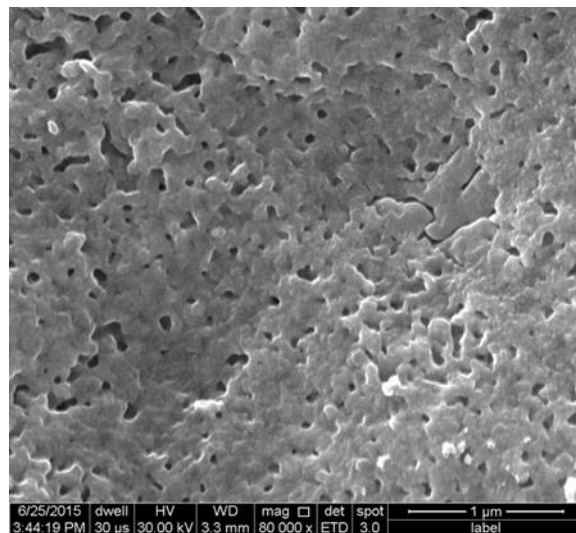


FIG. 4.79 Eletromicrografia de Pastilha de Zn-HA tratada termicamente a 700^oC após imersão em meio de McCoy por 14 dias

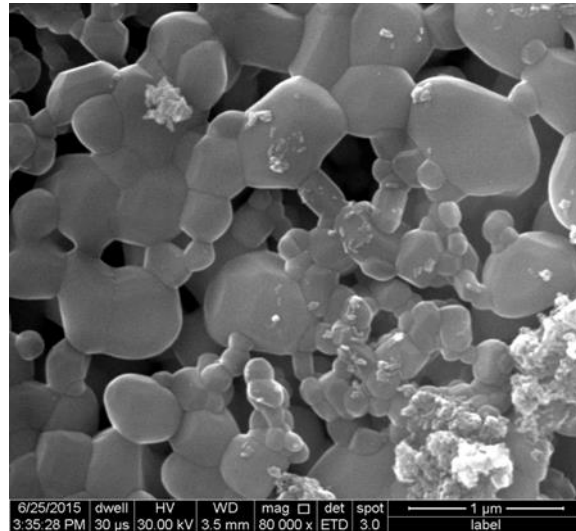


FIG. 4.80 Eletromicrografia de Pastilha de Zn-HA tratada termicamente a 900⁰C após imersão em meio de McCoy por 14 dias

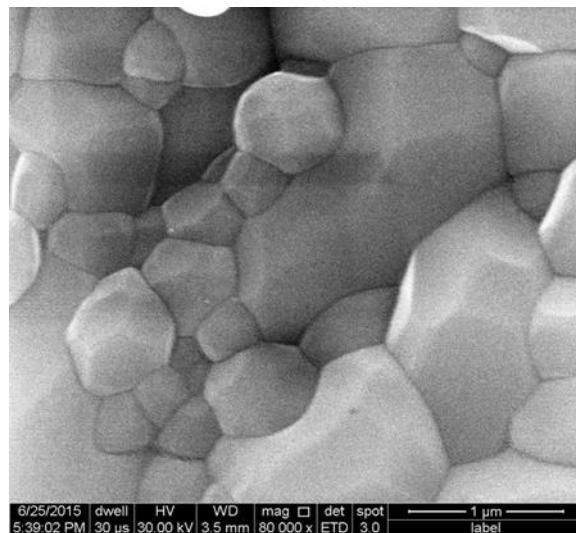


FIG. 4.81 Eletromicrografia de Pastilha de Zn-HA tratada termicamente a 1100⁰C após imersão em meio de McCoy por 14 dias

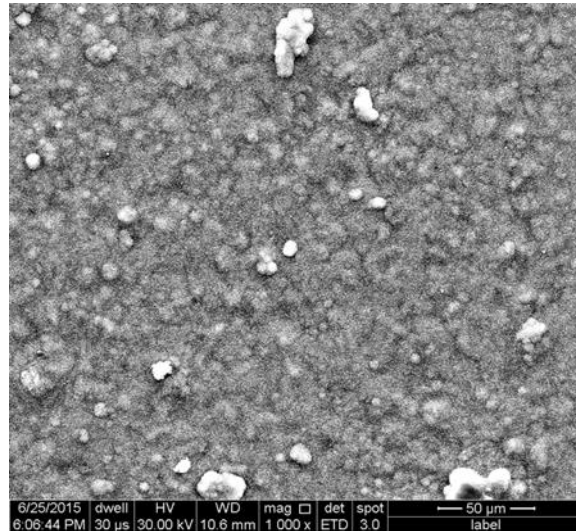


FIG. 4.82 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Monetita/Bruxita e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 1000X

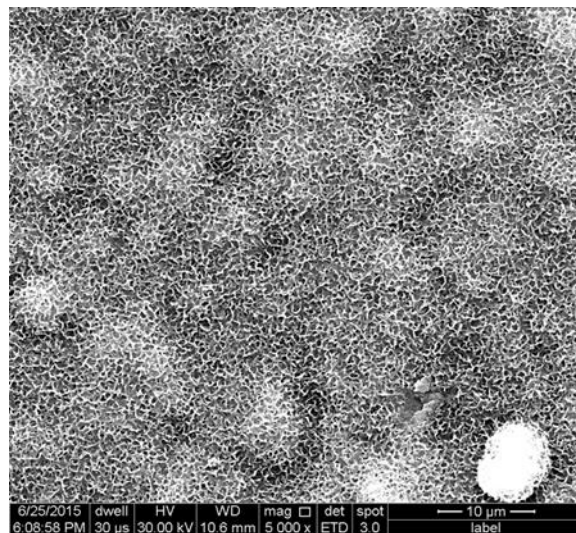


FIG. 4.83 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Monetita/Bruxita e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 5000X

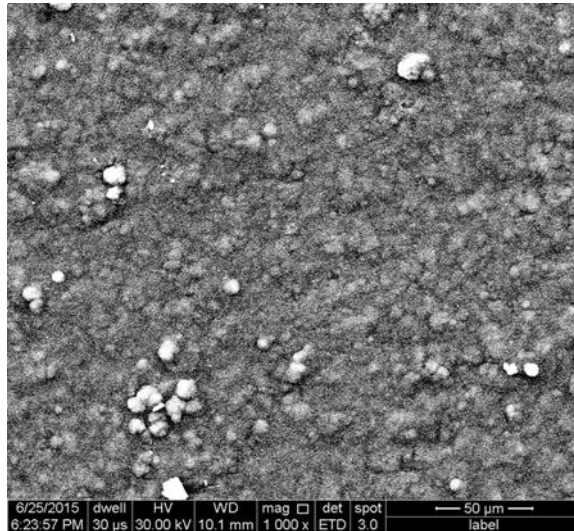


FIG. 4.84 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Monetita/Bruxita, contendo Zn e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 1000X

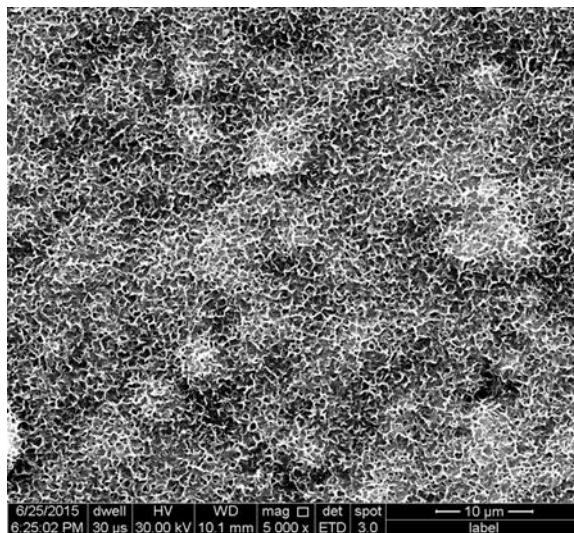


FIG. 4.85 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Monetita/Bruxita, contendo Zn e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 5000X

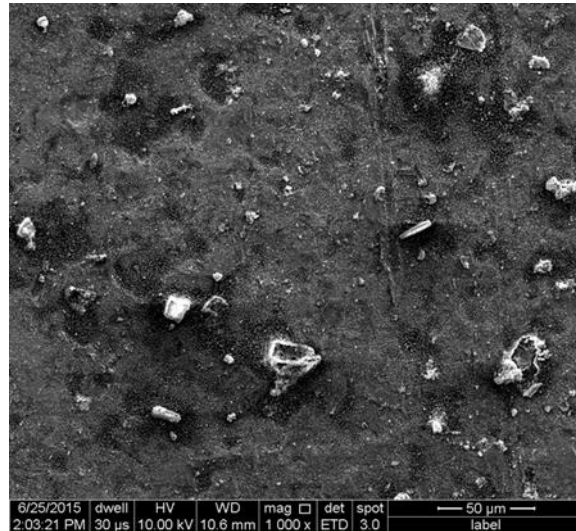


FIG. 4.86 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com HA e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 1000X

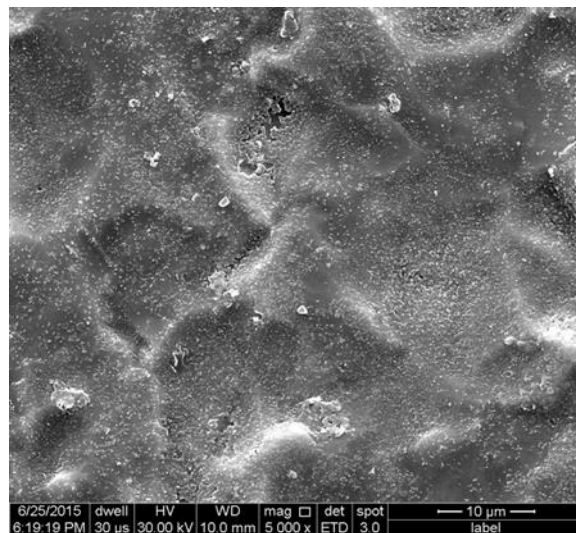


FIG. 4.87 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com HA e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 5000X

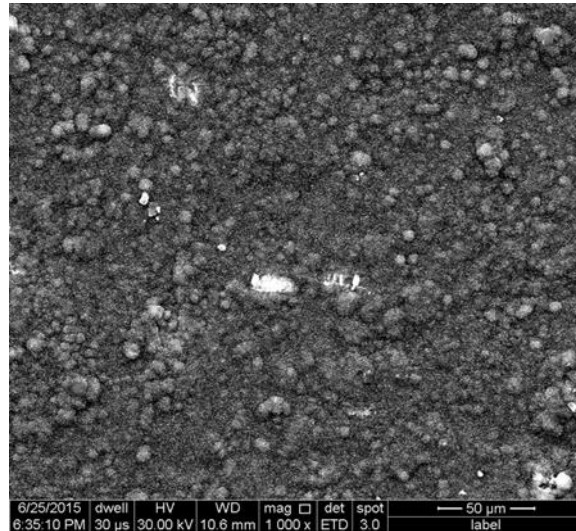


FIG. 4.88 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Zn-HA e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 1000X

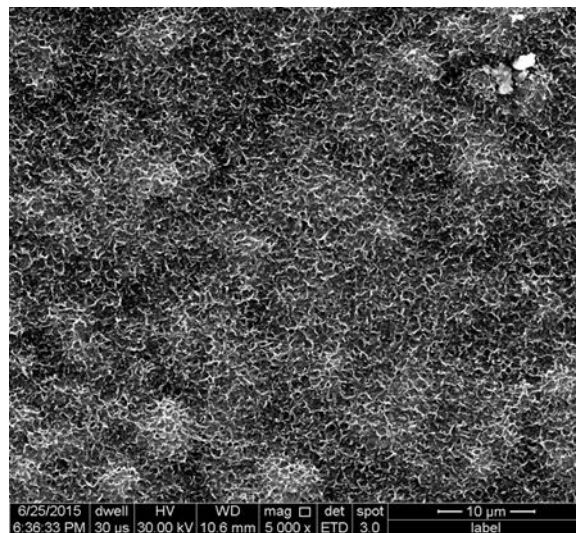


FIG. 4.89 Eletromicrografia (MEV) de placa de titânio recoberta com Zn-HA e imersa em meio de McCoy por 14 dias. Aumento de 5000X

O trabalho em revisão de SURMENEV *et al* (2014) apresenta uma ampla discussão sobre as características fundamentais em recobrimentos de fosfatos de cálcio sobre implantes visando uma osteointegração permanente e/ou osteogênese. A princípio, um recobrimento denso, homogêneo, altamente aderente, bioativo e biocompatível têm sido buscado para revestimentos em implantes dentários e próteses ortopédicas. Atualmente mais de 1 milhão de próteses são implantadas nos EUA, obtendo-se um sucesso de cerca de 90% dos casos. As falhas ocorrem basicamente devido a infecções, rejeição, alta taxa de reabsorção óssea, sendo observada na

maioria dos casos, uma formação insuficiente de novo tecido ósseo na área do implante. Alguns trabalhos vem acompanhando resultados em protocolos de tratamentos de implantes e próteses em estudos de longa duração (após 10 anos). Além disso, os efeitos dos protocolos cirúrgicos, dos projetos dos implantes, e características adicionais dos recobrimentos (estrutura, espessura, topografia, porosidade e molhabilidade) sobre os resultados desses tratamentos também são foco cada vez mais relevante em pesquisas visando contribuir para a melhoria do desempenho dos implantes e próteses existentes.

O presente trabalho de tese apresentado investigou alguns pontos críticos em relação aos pós sintetizados e na formação de recobrimentos de HA e de Zn-HA sobre placas de titânio. Características como: a homogeneidade, a identificação de fases, estrutura cristalina presente, bioatividade e a toxicidade foram analisadas. Trabalhos futuros devem abordar além das análises feitas, características como resistência, biocompatibilidade, molhabilidade, entre outras, bem como a adição de constituintes orgânicos como proteínas colagênicas, peptídeos, proteínas morfogenéticas e células (células tronco induzidas, mesenquimais ou diferenciadas), e sua interação em ensaios pré-clínicos e clínicos.

5 CONCLUSÃO

O uso da casca de ovo de avestruz mostrou ser eficaz como fonte de cálcio para a obtenção dos pós de HA e Zn-HA, seguindo a metodologia descrita por PRADO *et al.*, (2001).

Os pós de HA e Zn-HA demonstraram-se não tóxicos no teste de CAM (membrana corioalantóide). Foi observada no exame histopatológico, uma resposta inflamatória entre leve e moderada, compatível com uma reação característica de ausência de toxicidade.

As pastilhas de HA e Zn-HA tratadas termicamente não responderam satisfatoriamente ao teste de bioatividade. A área superficial específica das pastilhas bem como os tratamentos térmicos podem ter contribuído para que não ocorresse a resposta desejada.

A casca do ovo de avestruz também foi eficiente como fonte de cálcio para recobrimentos de placas de titânio com bruxita e monetita. Esses recobrimentos, após conversão em meio alcalino (KOH), foram caracterizados em HA e Zn-HA. A monetita foi observada como uma fase intermediária após a conversão em KOH, exceto nas amostras de Zn-HA depositadas em 2h e 4h.

As placas recobertas por bruxita, monetita e Zn-HA, demonstraram maior bioatividade em relação as placas recobertas por HA. Uma maior solubilidade da bruxita, monetita e também da Zn-HA, poderiam justificar essa diferença.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, VENTURINI M. **Química analítica qualitativa abertura de amostras**, Universidade de Itaúna, 2007.
- ANDREINI C., BANCI L., BERTINI I., ROSATO A. J. **Recobrimento de superfícies de titânio**. *Proteome Res.* 5 (2006)196.
- ANVISA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos** www.anvisa.gov.br/cosméticos/guia/html/pag05.htm. Acesso em 02 de maio de 2014.
- BEHRAVESH E., YASKO A.W., *et al.* **Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications**. *Clin Orthop Relat Res*, n.367 Suppl, Oct, p.S118-29. 1999.
- BOGAERDE L.V. **Protocolos cirúrgicos e de controle para maximizar o sucesso em situações clínicas avançadas**. *Revista Dentista Hoje*, 12 março 2015.
- BOYDE A., CORSI A., QUARTO R., CANCEDDA R., BIANCO P. **Conduction on large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism**. *Bone* 1999;24:579–89.
- BRANEMARK P.I.: **Introduction to Osseointegration**. In **Branemark P-I, Zarb G, Albrektsson T (eds): Tissue Integrated Prosthesis**. Chicago, Quint Publishing, 1985, pp 11-76.
- CALIMAN L.B., SILVA S.N., FERREIRA J.R.M., MODESTO G., DELLA V.P. **Caracterização de casca de ovo de avestruz para síntese de hidroxiapatita**. 54^o Congresso Brasileiro de Cerâmica, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 30 de maio a 02 de junho, 2010.
- DALCONI M. C., MENEGHINI C., NUZZO S. *et al.* **“Structure of bioapatite fetal bones: An x-ray diffraction study”**. *Nuclear instruments and methods in physics research*, 2003, vol. 200, pp. 406-410
- DE BRUIJN J.D., SHANKAR K., YUAN H., HABIBOVIC P. **Induction and its evaluation**. In: **Kokubo T, editor. Bioceramics and their clinical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing; 2008. p. 199–219.
- DE GROOT K, KLEIN C.P.A.T., WOLKE J.G.C., DE BLIECK J.M.A. **Hogervorst, Handbook of Bioactive Ceramics II**. CRC Press, 1990, pp. 3-16.
- DUPOIRIEUX L. **Ostrich eggshell as a bone substitute: a preliminary report of its biological behaviour in animals – a possibility in facial reconstructive surgery**. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1999, No. 37, pg. 467–471.
- DURMUS E., CELIK I., AYDIN M.F., YILDIRIM G., SUR E. **Evaluation of the Biocompatibility and productive Activity of Ostrich Eggshell Powder in**

- Experimentally Induced Calvarial Defects in Rabbits.** Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2007, 82-89.
- DURMUS E., CELIK I., OZKAN Y., AYDIN M.F., OZTURK A. **Evaluation of the potential beneficial effects of ostrich eggshell combined with eggshell membranes in healing of cranial defects in rabbits.** J Int Med Res, 2003, 31:223–230.
- FAHAMI A., EBRAHIMI-KAHRIZSANGI R., NASIRI-TABRIZI B. **Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite/titanium nanocomposite.** Solid State Sciences, Volume 13, Issue 1, January 2011, Pages 135-141.
- FERREIRA J.R.M., ROCHA D.N., LOURO L.H.L., PRADO M.H.S. **Phosphating of Calcium Carbonate for Obtaining Hydroxyapatite From the Ostrich Egg Shell.** Key Engineering Materials Vol. 587 (2014) pp 69-73 © (2014) Trans Tech Publications, Switzerland doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.587.69.
- GARG A.K. **“Grafting Materials in repair and Restoration”.** In: **Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics.** Quintessence Books (publishing), 1999, Cap 5.
- GOMES S., NEDELEC, JEAN-MARIE, RENAUDIN G., **The effect of temperature on the insertion of zinc into hydroxyapatite.** Acta Biomaterialia 8 (2012) 1180–1189.
- GRAHAM S., BROWN P. W. **Reactions of octacalcium phosphate to form hydroxyapatite.** Journal of Crystal Growth Volume 165, Issues 1–2, 2 July 1996, Pages 106–115
- GRANJEIRO J.M. **Papel dos biomateriais e da bioengenharia na medicina regenerativa.** Innovations Implant Journal - Biomaterials And Esthetics, 2006, vol. 01, nº 02,dez.
- GROSS K.A., KOMAROVSKA L., VIKSNA A., **Efficient zinc incorporation into hydroxyapatite through crystallization of an amorphous phase could extend the properties of zinc apatites.** Journal of the Australian Ceramic Society Volume 49[2], (2013), 129-135.
- GUNATILLAKE P.A., ADHIKARI R. **Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering.** Eur Cell Mater, v.5, May 20, p.1-16; discussion 16. 2003.
- GURU P.S., DASH S. **Advances in Colloid and Interface Science** (2014).
- HU W., MA J., WANG J., ZHANG S., **Fine structure study on low concentration zinc substituted hydroxyapatite nanoparticles.** Materials Science and Engineering C 32 (2012) 2404–2410.
- INTERNATIONAL STANDARD: **Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods.** ISO 10993-5, 1992.
- ITO A., OTSUKA M., KAWAMURA H. **“Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation”.** Current Applied Physics, 2005, issue 5 (July), v. 5, pp. 402-406.

- IVANOVA T.I., KAMENETSKAYA O.V.F., KOL'TSOV A.B. and UGOLKOV V.L. **Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition.** Journal of Solid State Chemistry 160, 340-349 (2001).
- JAVED F., AHMED H.B., CRESPI R., ROMANOS G.E., **Role of primary stability for successful osseointegration of dental implants: Factors of influence and evaluation.** Interventional Medicine & Applied Science, Vol. 5 (4), pp. 162–167 (2013).
- KAWAMURA H., ITO A., MIYAKAWA S., LAYROLLE P., *et al.*, 2000, “**Stimulatory effect of zinc-releasing calcium phosphate implant on bone formation in rabbit femora**”. J. Biomed. Mater. Res., v. 50, pp. 184-190.
- KNABE C., DUCHEYNE P. **Cellular response to bioactive ceramics. In: Kokubo T, editor. Bioceramics and their clinical applications.** Cambridge: Woodhead Publishing; 2008. p.133–64.
- KOKUBO T. “**Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment**”. Acta Mater, 1998,46 (7), 2519-2527.
- KOKUBO T., TAKADAMA H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?” Biomaterials 27 (2006) 2907–2915.
- KOUTSOPOLOS, S. **Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods.** J Biomed Mater Res 62 (2002) 600-612.
- KUMAR G.S., THAMIZHAVEL A., GIRIJA E.K. **Microwave conversion of eggshells into flower-like hydroxyapatite nanostructure for biomedical applications.** Materials Letters 76 (2012) 198-200.
- LÁZARO G.S., SANTOS S.C., RESENDE C.X., DOS SANTOS E.A. **Individual and combined effects of the elements Zn, Mg and Sr on the surface reactivity of a SiO₂·CaO·Na₂O·P₂O₅ bioglass system.** Journal of Non-Crystalline Solids 386, 2014 19–28
- LEGEROS R.Z. **Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates.** Clin Orthop Relat R 2002; 395:81–98.
- LEGEROS R.Z., TAHERI M.H., QUIROLGICO G.B., LEGEROS J.P. “**Formation and stability of apatites: Effects of some cationic substituents**”, In: **Proceedings of Intern. Cong. Phosphorus Compounds**, Boston, 1980, pp. 89-103.
- LENDLEIN A., LANGER R. **Biodegradable, elastic shape-memory polymers for potential biomedical applications.** Science, v.296, n.5573, May 31, 2002, p.1673-6.
- LINDHE J., LANH N.P., KARRING T. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral.** 5ª Ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2010.
- LYNCH S.E., GENCO R., MARX R.E. **Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics.** Quintessence Books (publishing). 1999.

- MAVROPOULOS E. **A hidroxiapatita como absorvedor de metais**. [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 1999. 105 p.
- MISCH C. **Contemporary implant dentistry**. 2.ed. Chicago: Mosby, 1999.
- MISCH C.E. **Biomateriais utilizados em implantes dentários**. In: Misch CE, editor. **Implantes dentários contemporâneos**. 2. ed. São Paulo: Ed. Santos; 2000. p.271-302.
- MOONGA B.S, DEMPSTER D.W. **“Zinc is a potent inhibitor os osteoclastic bone resorption *in vitro*”**. J. Bone Miner Res., 1995, v. 10, pp. 453-457.
- NADIG R.R. **Stem cell therapy - Hype or hope? A review**. J Conserv Dent, 2009, 12: 131-138.
- NIMB L., GOTFREDSEN K., STEEN J.J. **Mechanical failure of hydroxyapatite coated titanium and cobalt chromium molybde num alloy implants. An animal study**. Acta Orthop Belg, 1993, 59:333–8.
- NOVAES A.B.; SOUZA S.L.S.; BARROS R.R.M.; PEREIRA K.K.Y.; IEZZI G.; PIATTELLI A. **Influence of Implant Surfaces on Osseointegration**. Braz Dent, 2010, J., 21(6), 471-48.
- NOVAES JÚNIOR A.B., TABA JR. M., PONTES, C.C. **“Recursos e soluções em implantes - Biomateriais em regeneração”**. In: CARDOSO R.J.A., GONÇALVES E.A.N. **Odontologia**, , São Paulo, Artes Médicas, 2002, vol. 5.
- OSPINA RAMIREZ, C. A., **Estudo por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução de nanopartículas de hidroxiapatita e hidroxiapatita carbonatadas em diferentes estágios de Cristalização**. Tese de doutorado, CBPF, 2010.
- OSTMAN P.O., HELLMAN M., WENDELHAG I., SENNERBY L. **Resonance frequency analysis measurements of implants at placement surgery**. Int J Prosthodont. 2006 Jan-Feb; 19(1):77-83; discussion 84.
- PEÑA J., VALLET-REGI M. **Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique**. Journal of the European Ceramic Society 23 (2003) 1687–1696
- PIMENTEL M.F., NETO B.B. **“Calibração: uma revisão para químicos analíticos”**. Quím. Nova, 19 (1996), 268.
- PRADO DA SILVA M.H., LIMA J.H.C., SOARES G.A., ELIAS C.N., DE ANDRADE M.C., BEST S.M., GIBSON I.R. **Transformation of monetite to hydroxyapatite in bioactive coatings on titanium**. Surf Coat Technol., 2001,137:270–6.
- PRAMANIK S., AGARWAL A.K., RAI K.N., GARG A. **Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process**. Ceramics International Volume 33, Issue 3, April 2007, Pages 419–426.
- PRESGRAVE O.A.F., CALDEIRA C., GIMENES I., FREITAS J.C.B.R., NOGUEIRA S.T.B., OLIVEIRA N.D.E., OLIVEIRA A.G.L., SILVA R.S., ALVES E.N., PRESGRAVE R.F.

- Métodos alternativos ao uso de animais: uma visão atual.** Ciênc Vet Trop. 2010;13(1):106-17.
- RATNER B.D., HOFFMAN A.S., SCHOEN F.J., LEMONS J.E. **Biomaterials science: a multidisciplinary endeavor.** In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Londres: Elsevier Academic Press; 2004. p.1-9.
- RAYNAUD S., CHAMPION E., BERNACHE-ASSOLLANT D., THOMAS P. **Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders.** Biomaterials 23 (2002) 1065–1072
- REY C., COMBES, C., DROUET C., SFIHI H., BARROUG A. **Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials.** Materials Science and Engineering C vol. 27 (n° 2) (2007).
- RIBEIRO C. **Processamento e Caracterização de cerâmicas à base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico,** 2003.
- RIVERA E.M., ARAIZA M., BROSTOW W., CASTAÑO V.M., DÍAS-ESTRADA J.R., HERNÁNDEZ R., RODRÍGUEZ J.R. **Synthesis of hydroxyapatite from eggshells.** Materials Letters, 1999, v. 41, 128-134.
- ROCHA F.A., ELIAS C.N. **Influência da técnica cirúrgica e da forma do implante na estabilidade primária.** Rev Odontol Bras Central 2010;18(48):26-29.
- ROKN AR., RASOULI GHAHROUDI AAR., MESGARZADEH A., MIREMADI A.A., YAGHOUBI S. **Evaluation of stability changes in tapered and parallel wall implants: a human clinical trial.** Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (2011; Vol. 8, No.4).
- RONCONI L., SADLER P.J. **Using coordination chemistry to design new medicines.** Coordination Chemistry Reviews 251 (2007) 1633–1648
- SCHMITZ J.P., HOLLINGER J.O. **The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.** Clinical Orthopaedics and Related Research, 1986, vol. 205, pp. 299–308.
- SCOPP I.W., KASSOUNY D.Y., MORGAN F.H. **Bovine bone (Boplant).** J Periodontol 1996; 37:400-7.
- SHOJAI M.S., KHORASANI M.T., KHOSHDARGI E.D., JAMSHIDI A. **Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures.** Acta Biomaterialia 9 (2013) 7591–7621
- SIVAKUMAR, E. K. GIRJA, S. N. KALKURA, C. SUBRAMANIAN. **Crystallization and Characterization of Calcium Phosphates: Brushite and Monetite.** Cryst. Res. Technol., 33 (2), 1998, pg 197-205.
- SMITH, DALE E., ZARB, GEORGE A. **Criteria for success of osseointegrated endosseous implants.** Journal of prosthetic dentistry., 1989, Denmark, v. 62, n. 5, p.567-572. nov.

- SOBCZAK A., KIDA A., KOWALSKI Z., WZOREK Z. **Evaluation of the biomedical properties of hydroxyapatite obtained from bone waste**. Polish Journal of Chemical Technology Volume 11, Issue 1, 1 January 2009, Pages 37-43
- SOGO Y., ITO A., FUKASAWA K., *et al.*, 2005. **“Zinc-containing calcium phosphate ceramics with a (Ca+Zn)/P molar ratio of 1.67”**. Key Engineering Materials, Vols. 284-286, pp. 31-34.
- SUCHANEK W., YOSHIMURA M. **Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants**. Journal of Materials Research, 1998, v. 13, n. 1, p. 94 -117.
- SUZAN E., GAMEIRO A.H. **Perspectivas e desafios do sistema agroindustrial do Avestruz no Brasil**. Informações Econômicas, SP, 2007, v.37, n°10, out.
- SURMENEV R. A., SURMENEVA M. A., IVANOVA A. A. **Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – A review**. Acta Biomaterialia 10 (2014) 557–579.
- THOUVEREY C., STRZELECKA-KILISZEK A., BALCERZAK M., BUCHET R., PIKULA S. **Matrix Vesicles Originate From Apical Membrane Microvilli of Mineralizing Osteoblast-Like Saos-2 Cells**. Journal of Cellular Biochemistry 106:127–138 (2009).
- TORTET L., GAVARRI J.R., NIHOUL G. **Study of Protonic Mobility in CaHPO₄ · 2H₂O (Brushite) and CaHPO₄ (Monetite) by Infrared Spectroscopy and Neutron Scattering**. Journal of Solid State Chemistry 132, 6-16,1997.
- TSALEV D.L, ZAPRIANOV Z.K. **Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmentak Health Practice**. AAS 1985, Vol 1, segunda edição.
- VALDES T.I., KREUTZER D., MOUSSY F. **The chick chorioallantoic membrane as a novel *in vivo* model for the testing of biomaterials**. Wiley Periodicals, Inc., 2002, pp. 273-282.
- WANG J., SHAW L.L. **Synthesis of high purity hydroxyapatite nanopowder via sol–gel combustion process**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine June 2009, Volume 20, Issue 6, pp 1223-1227
- WEBSTER T.J., MASSA-SCHLUETER E.A., SMITH J.L., SLAMOVICH E.B. **“Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations”**. Biomaterials, 2004, vol. 23, pp. 4285-4294.
- WENZ B., OESCH B., HORST M. **Analysis of the risk of transmitting bovinespangiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone**. Biomaterials 2001 Jun; 22(12):1599-60.
- XU J., BUTLER I.S., GILSON D.F.R. FT. **Raman and high-pressure infrared spectroscopic studies of dicalcium phosphate dihydrate (CaHPO₄·2H₂O) and anhydrous dicalcium phosphate (CaHPO₄)**. Spectrochimica Acta,1999, part A 55, pp. 2801-2809.

- YANG Y., KIM K.H., ONG J.L. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process—an alternative to plasma spraying.** *Biomaterials*, 2004, pp. 327-337.
- YUAN H *et al.* Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting.** *PNAS* 2010;107:13614–9.
- ZHANG Y., LU J. A Mild and Efficient Biomimetic Synthesis of Rodlike Hydroxyapatite Particles with a High Aspect Ratio Using Polyvinylpyrrolidone As Capping Agent.** *Cryst. Growth Des.*, 2008, 8 (7), pp 2101–2107
- ZHAO H., HE W., WANG Y., ZHANG X., LI Z., YAN S., ZHOU W., WANG G. Biomineralization of large hydroxyapatite particles using ovalbumin as biosurfactant.** *Materials Letters* Volume 62, Issue 20, 31 July 2008, Pages 3603–3605
- ZIJSTRA A., *et al.* Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells.** *Blood*, v.5, p. 317-327, 206.

7 **ANEXOS**

7.1 ANEXO 1



Atená Comércio de Produtos Para Laboratórios Ltda - www.bioatena.com.br
R. Presidente Alves, 584 - Jd. Flamboyant / Campinas - vendas@bioatena.com.br
Fone: 19 3386.1629 / Fax: 19 2121.9937 / Cel: 11 8219.7938 ou 6842.6810

MEIO McCOY'S

DEFINIÇÃO - Originalmente desenvolvido para manutenção das células de tumor do fígado através da modificação dos aminoácidos encontrados no BME. Esta formulação também pode ser usada na cultura de medula óssea, pele, gengiva, rim, glândulas supra-renais, pulmão, baço, embriões de ratos e outros tipos celulares.

APLICAÇÃO - Usado na cultura primária de células de uma ampla variedade de tecidos. Recomenda-se a utilização na produção de vírus em culturas de células primárias.

ARMAZENAMENTO - Manter a uma temperatura de 2 a 6°C.

VALIDADE - 12 meses

COMPOSIÇÃO

AMINOÁCIDOS	mg/L	VITAMINAS	mg/L	SAIS INORGÂNICOS	mg/L	OUTROS COMPONENTES	mg/L
Glicina	7,50	Ácido Ascórbico	0,50	CaCl ₂ (anhyd.)	100,00	Bacto-Peptona	-----
L-Alanina	13,90	Biotina	0,20	MgSO ₄ • 7H ₂ O	200,00	Glicose (Dextrose)	3.000,00
L-Arginina • HCL	42,10	Cloreto de Colina	5,00	KCl	400,00	Glutathione (reduzida)	0,50
L-Asparagina	45,00	D-Ca Pantotenato	0,20	NaHCO ₃	2.200,00	HEPES	5.958,00
L-Ácido Aspártico	19,97	Ácido Fólico	10,00	NaCl	5.100,00	Vermelho de Fenol	10,00
L-Cistina	31,50	Nicotinamida	0,50	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	580,00		
L-Ácido Glutâmico	22,10	Ácido Nicotínico	0,50				
L-Glutamina	219,20	Ácido p-aminobenzóico	1,00				
L-Histidina HCl • H ₂ O	20,96	Piridoxal HCL	0,50				
L-Hidroxiprolina	19,70	Piridoxina HCL	0,50				
L-Isoleucina	39,36	Riboflavina	0,20				
L-Leucina	39,36	Tiamina HCL	0,20				
L-Lisina • HCl	36,50	Vitamina B12	2,00				
L-Metionina	14,90	i-Inositol	36,00				
L-Fenilalanina	16,50						
L-Prolina	17,30						
L-Serina	26,30						
L-Treonina	17,90						
L-Triptofano	3,10						
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	26,20						
L-Valina	17,60						

CÓDIGO	DESCRIÇÃO	EMBALAGEM	FABRICANTE
V0262	MEIO McCOY'S C/HEPES E SFB 10%, S/PEPTONA	FRASCO 100 ML	VITROCELL



ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS

PRODUTO	MEIO MCCOY'S 500ML
LOTE	01/2015
DATA DE FABRICAÇÃO	10/04/2015
PRAZO DE VALIDADE	01 ANO
CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM	+2 A +6C°.

pH (25° C)	S/ NaHCO ₃ : 5,1 ± 0,3 C/ NaHCO ₃ : 7,0 ± 0,3	APROVADO
Osmolaridade mOsm/Kg.H ₂ O:	S/ NaHCO ₃ : 240 ± 5% C/ NaHCO ₃ : 290 ± 5%	APROVADO
Esterilidade	-----	N/A
Curva de crescimento	Célula CPF Célula CHO	APROVADO