

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

TATIANA JORGE FERNANDES

**SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA NANOMÉTRICA COM PVP:
SINTERIZAÇÃO E ADSORÇÃO DE ALBUMINA BOVINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências dos Materiais.

Orientador: Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.C
Orientadora: Prof^a. Elena Mavropoulos Oliveira Tude – D.C

Rio de Janeiro

2011

c2011

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 a referência bibliográfica completa.

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

547.2 F363s	Fernandes, Tatiana Jorge Síntese de hidroxiapatita nanométrica com PVP: Sinterização e adsorção de albumina bovina /Tatiana Jorge Fernandes - Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2011. 110 p.: il. Dissertação (mestrado) – Instituto Militar de Engenharia - Rio de Janeiro, 2011. 1. Hidroxiapatita. 2. Polivinilpirrolidona. 3. Albumina bovina I. Título II. Instituto Militar de Engenharia. CDD 547.2
----------------	---

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

TATIANA JORGE FERNANDES

**SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA NANOMÉTRICA COM PVP: SINTERIZAÇÃO
E ADSORÇÃO DE ALBUMINA BOVINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia de Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências dos Materiais.

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

Orientadora: Prof^a. Elena Mavropoulos Oliveira Tude – D.C

Aprovada em 30 de maio de 2011 pela seguinte Banca Examinadora:



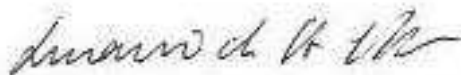
Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.C do IME



Prof^a. Elena Mavropoulos Oliveira Tude – D.C do CBPF



Prof. Luis Henrique Leme Louro – PhD do IME



Luciano de Andrade Gobbo – D.C da Panalytical

Rio de Janeiro

2011

Ao meu filho Vitor, meu grande companheiro, por ter entrado na minha vida, me transformado em mãe e me ensinado a sentir o amor incondicional.

Aos meus filhos Felipe e Isabella, que nasceram durante o mestrado e foram mais dois presentes maravilhosos na minha vida, me ensinando que é possível doar ainda mais.

Ao meu marido Sérgio, meu grande amor, que entrou na minha vida para dar alegria e para formar esta família linda que temos. A vida com você, mesmo nos momentos difíceis, é maravilhosa de ser vivida.

Ao meu pai e grande amigo Marco Antonio, *in memoriam*, por todo amor que dele recebi e pelo exemplo de força, honra, competência e fé que são e sempre serão os princípios da minha vida.

“Hoje, em meio aos abraços, falta o seu calor.

Em meio aos olhares cheios d’água, faltam as suas lágrimas.

No momento em que chamarem meu nome, faltará seu grito.

Porém, quando subir no palco para receber meu diploma, eu o sentirei ao meu lado, sorrindo e feliz.

Sentirei sua mão carinhosa afagar meus cabelos e neste instante o abraçarei em silêncio, sorrirei para você e deixarei fluir esta emoção em misto de imensa alegria e saudade.

E esta falta o traz de volta, pois sua presença vive em meu coração.

E viver no coração dos que ficam não é partir.”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Heloisa Helena, que junto com meu pai, sempre acreditou na minha vocação acadêmica, e à minha sogra Neosina, por ajudarem a cuidar dos meus filhos para que eu possa trabalhar e estudar e pelo amor dedicado a eles.

Ao meu irmão, primo, tios, tias e avós, por fazerem parte da história da minha vida.

À Neide, pela coragem, carinho e disposição para cuidar dos meus filhos.

Ao professor Marcelo Prado, meu orientador, pela atenção e exemplo constante de profissionalismo e ética.

À professora Elena Mavropoulos, minha orientadora, pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e suporte técnico sempre que foi necessário.

Ao professor Luis Henrique Leme Louro, pela serenidade, experiência profissional e pelas aulas de reposição que gentilmente me deu depois do nascimento do meu filho.

Aos amigos adquiridos no IME, pela troca de experiências e ajuda nas análises e nos estudos: Ana Paula, Cilene, Luciana, Ricardo, Rubens, Adriana e Felipe.

Ao professor Alexandre Malta Rossi, por ter permitido que parte do meu trabalho experimental fosse realizada no laboratório de Materiais Biocerâmicos do CBPF.

Aos amigos adquiridos no CBPF, pela ajuda nas análises: Leonny, Alejandro, Andréa e, em especial ao Fábio, pelo comprometimento e profissionalismo.

Ao engenheiro Carlos Roberto (IME), pelos conhecimentos laboratoriais transmitidos com paciência e dedicação.

À química Sílvia Albuquerque (CBPF), pelos conhecimentos transmitidos que foram essenciais para a realização deste trabalho e pela paixão pela Química que me comoveu.

Ao técnico Joel Santos (IME), pelo auxílio nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao professor Brant e à Valéria (CBPF), pela colaboração nas análises de refinamento pelo método de Rietveld e de difração de raios X.

Ao professor Luciano de Andrade Gobbo (Panalytical), pela colaboração valiosa nos conceitos e na técnica de refinamento pelo método de Rietveld.

Ao professor André Pinto e à pós-doutoranda Tatiana Marcondes (CBPF), pela colaboração na análise de microscopia eletrônica de alta resolução.

Ao pesquisador Michel (CEPEL) e ao técnico Eliandro (UEZO) pela disponibilidade

para me ajudar nas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Às professoras Ana Elena Bressiani e Ivana Cosentino (IPEN) pela colaboração na análise por adsorção gasosa.

À Heloisa, pela disponibilidade e pelos préstimos recebidos na secretaria.

À Eduardo Cruz e Simone Amaral, sócios-proprietários da empresa Silvestre Labs, por terem permitido que eu fizesse o mestrado durante o período em que trabalhei com eles.

Ao Hélio Anastácio, proprietário da Equifarma, pelo exemplo constante de profissionalismo e liderança, pelo incentivo e pela oportunidade que me proporcionou de trabalhar com novos desafios e crescer profissionalmente.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	09
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Biomateriais.....	17
1.2 Objetivo.....	22
1.3 Posicionamento do trabalho.....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Histofisiologia do tecido ósseo.....	24
2.2 Engenharia Tecidual Óssea.....	28
2.3 Fosfatos de cálcio	31
2.3.1. Hidroxiapatita.....	33
2.3.1.1 Rotas de síntese da hidroxiapatita.....	37
2.4 Albumina bovina sérica	49
2.5 Técnicas de caracterização da hidroxiapatita.....	52
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
3.1 Síntese de Hidroxiapatita.....	58
3.2 Sorção de Albumina bovina.....	60
3.3 Dessorção de Albumina bovina.....	63
4 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL OBTIDO.....	64
4.1 Análise de Difração de raios X (DRX).....	64
4.2 Análise de Refinamento pelo Método de Rietveld.....	64
4.3 Análise de Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)...	64
4.4 Análise de Adsorção gasosa pela teoria de Brunauer-Emmett-Teller (BET).....	65
4.5 Análise de Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	65
4.6 Análise de Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG).....	66
4.7 Análise de Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	66

4.8	Análise de Sorção de Albumina bovina.....	66
4.9	Análise de Dessorção de Albumina bovina.....	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1	Difração de raios X (DRX).....	68
5.2	Refinamento pelo método de Rietveld.....	71
5.3	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	73
5.4	Adsorção gasosa pela teoria de Brunauer-Emmett-Teller (BET).....	83
5.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	84
5.6	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG).....	86
5.7	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	88
5.8	Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-VIS) - Sorção e Dessorção de BSA.....	90
5.9	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) após a sorção da BSA.....	92
6	CONCLUSÕES.....	101
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 2.1	Diagrama das células ósseas (JUNQUEIRA <i>et al.</i> , 1995).....	26
FIG. 2.2	Organização estrutural do osso (RHO <i>et al.</i> , 1998).....	27
FIG. 2.3	Processo da Engenharia Tecidual (<i>National Science Foundation Workshop, 1988</i>).....	28
FIG. 2.4	Associação de células mononucleares de perióstio de ratos e biomaterial xenógeno em meio osteoindutor (SILVA, 2008).....	29
FIG. 2.5	Número de artigos recuperados no PUBMED por período de tempo (GRANJEIRO, 2010).....	30
FIG. 2.6	Estrutura do cristal de HA (adaptado de IVANOVA <i>et al.</i> , 2001).....	34
FIG. 2.7	Esquema da cela unitária do cristal da HA na escala nanométrica (SOUZA, 2010).....	34
FIG. 2.8	Aglomerado bidimensional simulado em um ambiente de computação gráfica e modelagem de sólidos (VASCONCELOS e PINTO, 1997).....	44
FIG. 2.9	Fórmula estrutural do PVP (AMORIM <i>et al.</i> , 2006).....	46
FIG. 2.10	Espectro na região do infravermelho para o PVP (AMORIM <i>et al.</i> , 2006).....	46
FIG. 2.11	Estrutura da BSA (cedida por MAVROPOULOS, 2011).....	52
FIG. 3.1	Amostras de HA durante o processo de liofilização.....	59

FIG. 3.2 Tubos contendo soluções de HA imersas em BSA e controles contendo Milli-Q [®] sob agitação.....	62
FIG. 5.1 Comparação dos difratogramas das amostras verdes de HA das sínteses preparadas no estudo.....	68
FIG. 5.2 Comparação dos difratogramas das amostras CTT de HA das sínteses preparadas no estudo.....	69
FIG. 5.3 Difratograma da amostra HA PVP CTT.....	70
FIG. 5.4 Gráfico de Rietveld da amostra HA 88 CTT.....	72
FIG. 5.5 Gráfico de Rietveld da amostra HA 40 CTT.....	72
FIG. 5.6 Gráfico de Rietveld da amostra HA 24 CTT.....	73
FIG. 5.7 Gráfico de Rietveld da amostra HA PVP 24 CTT.....	73
FIG. 5.8 Espectro das amostras verdes de HA, obtido por FTIR.....	74
FIG. 5.9 Espectro da amostra HA 88, obtido por FTIR.....	74
FIG. 5.10 Espectro da amostra HA 40, obtido por FTIR.....	75
FIG. 5.11 Espectro da amostra HA 24, obtido por FTIR.....	75
FIG. 5.12 Espectro da amostra HA PVP 24, obtido por FTIR.....	76
FIG. 5.13 Espectro das amostras CTT de HA, obtido por FTIR.....	79
FIG. 5.14 Espectro da amostra HA 88 CTT, obtido por FTIR.....	79

FIG. 5.15 Espectro da amostra HA 40 CTT, obtido por FTIR.....	80
FIG. 5.16 Espectro da amostra HA 24 CTT, obtido por FTIR.....	80
FIG. 5.17 Espectro da amostra HA PVP 24 CTT, obtido por FTIR.....	81
FIG. 5.18 Micrografias (MEV) das amostras: HA 88 (A), HA 40 (B), HA 24 (C) e HA PVP 24 (D) (100 x).....	84
FIG. 5.19 Micrografias (MEV) das amostras: HA 88 CTT (A), HA 40 CTT (B), HA 24 CTT (C) e HA PVP 24 CTT (D) (100x).....	85
FIG. 5.20 Micrografias (MEV) das amostras: HA 88 (A), HA 40 (B), HA 24 (C) e HA PVP 24 (D) (2000x).....	85
FIG. 5.21 Micrografias (MEV) das amostras: HA 88 CTT (A), HA 40 CTT (B), HA 24 CTT (C) e HA PVP 24 CTT (D) (2000x).....	86
FIG. 5.22 Micrografias (MEV-FEG) das amostras: HA 88 (A), HA 40 (B), HA 24 (C) e HA PVP 24 (D) (130.000 x).....	87
FIG. 5.23 Micrografias (MEV-FEG) das amostras: HA 88 CTT (A), HA 40 CTT (B), HA 24 CTT (C) e HA PVP 24 CTT (D) (10.000x).....	87
FIG. 5.24 Micrografias (MEV-FEG) das amostras de HA PVP 24 (50.000x) (A), HA PVP 24 (170.000x) (B).....	88
FIG. 5.25 Micrografias (MET) das amostras: HA 88 CTT (A) e HA 40 CTT (B) (43.000x).....	88
FIG. 5.26 Micrografias (MET) das amostras: HA 88 CTT (A) e HA 40 CTT (B) (71.000x).....	89

FIG. 5.27	Micrografia (MET) da amostra HA 24 CTT (43.000x).....	89
FIG. 5.28	Imagem gerada pelo programa <i>ImageJ</i>	89
FIG. 5.29	Curva Padrão de BSA.....	90
FIG. 5.30	Espectro da amostra HA 88 sorvida com BSA, obtido por FTIR.....	93
FIG. 5.31	Espectro da amostra HA 40 sorvida com BSA, obtido por FTIR.....	93
FIG. 5.32	Espectro da amostra HA 24 sorvida com BSA, obtido por FTIR.....	94
FIG. 5.33	Espectro da amostra HA PVP 24 sorvida com BSA, obtido por FTIR.....	94
FIG. 5.34	Espectro da amostra HA 88 CTT sorvida com BSA, obtido por FTIR.....	97
FIG. 5.35	Espectro da amostra HA 40 CTT sorvida com BSA, obtido por FTIR.....	97
FIG. 5.36	Espectro da amostra HA 24 CTT sorvida com BSA, obtido por FTIR.....	98
FIG. 5.37	Espectro da amostra HA PVP 24 CTT sorvida com BSA, obtido por FTIR.....	98

LISTA DE TABELAS

TAB. 2.1	Propriedades Mecânicas do Osso Cortical (SOMCHAI, 1992).....	24
TAB. 2.2	Principais fosfatos de cálcio (modificado de BOHNER, 2000).....	31
TAB. 2.3	Rotas de síntese, condições e características morfológicas da HA.....	42
TAB. 3.1	Reagentes para obtenção da hidroxiapatita estequiométrica.....	58
TAB. 3.2	Nomenclatura e condições das sínteses utilizadas no estudo.....	60
TAB. 3.3	Descrição dos tubos contendo amostras de HA verde e com tratamento térmico (CTT) imersas em solução de BSA e água Milli-Q®.....	61
TAB. 5.1.	Grupos funcionais identificados nas amostras verdes, por espectroscopia de infravermelho.....	76
TAB. 5.2.	Grupos funcionais identificados nas amostras CTT, por espectroscopia de infravermelho.....	81
TAB. 5.3	Área de superfície específica das amostras com tratamento térmico.....	83
TAB. 5.4	Resultados da sorção da BSA.....	90
TAB. 5.5	Grupos funcionais identificados nas amostras verdes sorvidas com BSA, por espectroscopia de infravermelho.....	95
TAB. 5.6	Grupos funcionais identificados nas amostras CTT sorvidas com BSA, por espectroscopia de infravermelho.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	-	Albumina bovina sérica
BET	-	Brunauer-Emmett-Teller
Ca	-	Cálcio
CBPF	-	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEPEL	-	Centro de Pesquisas de Energia Elétrica
CTT	-	Com tratamento térmico
DRX	-	Difração de raios X
FTIR	-	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
TCP	-	Fosfato tricálcio
α -TCP	-	Fosfato tricálcio alfa
β -TCP	-	Fosfato tricálcio beta
β -TCPW	-	Fosfato tricálcio beta <i>Whitlokite</i>
P	-	Fósforo
HA	-	Hidroxiapatita
KOH	-	Hidróxido de potássio
IV	-	Infravermelho
IME	-	Instituto Militar de Engenharia
IPEN	-	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Ca ²⁺	-	Íon cálcio
CO ₃ ²⁻	-	Íon carbonato
PO ₄ ³⁻	-	Íon fosfato
OH ⁻	-	Íon hidroxila
JCPDS	-	<i>Joint Committee of Powder Diffraction Standards</i>
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-FEG	-	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução
MET	-	Microscopia eletrônica de transmissão
PVP	-	Polivinilpirrolidona
BMPs	-	Proteínas ósseas morfogenéticas
UV-VIS	-	Ultravioleta-visível

RESUMO

Há um interesse crescente em desenvolver cerâmicas sintéticas bioativas que mimetizem a apatita natural. Hidroxiapatita (HA), com e sem a presença de polivinilpirrolidona (PVP), foi sintetizada pelo método de precipitação em solução aquosa. HA foi sintetizada sem a presença de PVP, utilizando hidróxido de cálcio, ácido orto-fosfórico e ácido láctico como materiais precursores, através de diferentes tempos de envelhecimento dos precipitados (24, 40 e 88 horas). O valor do pH da solução foi ajustado a 12, utilizando hidróxido de potássio (KOH). Os precipitados foram filtrados em sistema de vácuo, adicionando-se água Milli-Q[®] para a retirada do KOH e obtenção do pH 7. Após a secagem, desagregação e peneiração, os pós foram sinterizados a 1100°C. HA nanométrica foi obtida na presença de PVP a 3% em peso, utilizando os mesmos reagentes com 24 horas de envelhecimento dos precipitados. A solução de 1mg/ml de albumina bovina sérica (BSA) foi associada à HA sem tratamento térmico e com tratamento térmico (CTT) nas quatro sínteses obtidas (HA 88, HA 40, HA 24 e HA PVP 24).

Os resultados das análises de difração de raios X e de refinamento pelo método de Rietveld apresentaram hidroxiapatita pouco cristalina e/ou nanométrica nas amostras de HA sem a presença de PVP. A amostra HA PVP 24 CTT apresentou outras fases de fosfato de cálcio. O grupo carbonato B esteve presente em todas as amostras de HA, de acordo com a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A análise pela teoria de Brunauer-Emmett-Teller (BET) apresentou baixos valores da área de superfície nas amostras de HA CTT que foram atribuídos à alta temperatura de sinterização (1100°C). As micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV), de alta resolução (MEV-FEG) e de transmissão (MET) apresentaram partículas submicrométricas e nanométricas, formando diversos aglomerados. Foi verificada uma associação entre os cristais de HA e o PVP, formando um novelo e criando um ambiente confinado para os cristais, o que possivelmente dificultou o crescimento do tamanho dos grãos.

Os melhores resultados da espectroscopia de UV-Visível (UV-VIS) foram obtidos das amostras STT: HA PVP 24 sorveu 100% da BSA, seguida da HA 24 (50,05%), HA 88 (27,54%) e HA 40 (13,84%). A BSA sorvida não desorveu da HA sob ação da água Milli-Q[®]. Os resultados de FTIR apresentaram maior capacidade de ligação da BSA à amostra HA PVP 24, indicando que a estrutura morfológica pode influenciar na interação do biomaterial com a proteína.

ABSTRACT

There is a growing interest in developing bioactive synthetic ceramics that mimic natural apatite. Hydroxyapatite (HA), with and without the presence of polyvinylpyrrolidone (PVP), was synthesized by the precipitation method from aqueous solution. HA was synthesized without the presence of PVP, using calcium hydroxide, orthophosphoric acid and lactic acid as starting materials, by different times of precipitated aging (24, 40 and 88 hours). The pH of the solution was adjusted at 12, using potassium hydroxide (KOH). The precipitates were filtered by vacuum system, adding repeatedly Milli-Q[®] water to remove KOH and obtain pH 7. After drying, disaggregation and sifting, the powders were sintered at 1100°C. Nanometric HA was obtained in the presence of 3wt% PVP, using the same reagents with 24 hours of precipitates aging. Bovine serum albumin (BSA) solution (1mg/ml), was associated to HA with and without heat treatment at the four syntheses obtained (HA 88, HA 40, HA 24 e HA PVP 24).

The results showed hydroxyapatite with low crystallinity and/or nanometric at HA samples without the presence of PVP, according to X-ray diffraction analysis and Rietveld refinement method. HA PVP 24 heated at 1100°C sample showed other calcium phosphate phases. The B-type carbonate group was seen in all HA samples, according to the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The surface area measurements (BET) showed low values in all samples heated at 1100°C due to high temperature of sintering. The scanning electron microscopy (SEM), high-resolution scanning electron microscopy (SEM-FEG) and transmission electron microscopy (TEM) micrographs showed submicrometric and nanometric particles, forming several agglomerates. The results showed association between HA crystals and PVP in the form of a clew, confining the HA nanorods crystals, which possibly raised difficulties for the grain size growth.

The best ultraviolet spectroscopy results were obtained for non-treated hydroxyapatite: HA PVP 24 adsorbed 100% of total BSA concentration, followed by HA 24 (50,05%), HA 88 (27,54%) and HA 40 (13,84%). Adsorbed BSA was not released from HA after desorption experiment under the action of Milli-Q[®] water. FTIR results of HA PVP 24 presented high binding ability with BSA, showing that the morphological structure may influence the interaction of the biomaterial with the protein.

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOMATERIAIS

O aumento da expectativa de vida e, com isto, a busca por uma vida não somente longa, mas com qualidade, exige das Ciências da Saúde uma interação com a Engenharia de Materiais. Materiais têm sido pesquisados para que encontrem soluções, principalmente, para as doenças crônicas e degenerativas e, especificamente, os traumas e patologias que levam à perda óssea.

A regeneração óssea é um dos processos de reparo mais importantes do corpo porque o osso é um tecido extremamente dinâmico e tem a capacidade de sofrer regeneração quando lesionado. No entanto, esta capacidade regenerativa é limitada pelo tamanho da lesão. Defeitos ósseos extensos, provocados por traumas, extirpação de tumores e outras patologias não se regeneram espontaneamente.

Nas últimas décadas, a partir dos avanços da bioengenharia óssea tecidual, diferentes materiais têm sido sugeridos como substitutos ósseos, no sentido de funcionarem como arcabouço de matriz extracelular e permitirem neoformação óssea. Diversas propriedades são necessárias a estes substitutos, tais como: bioatividade, osteocondução, osteoindução, biocompatibilidade e biodegradação. Adicionalmente, devem ter custos acessíveis, e sejam facilmente produzidos e moldados (LE GEROS *et al.*, 1995; BURG *et al.*, 2000; PILLIAR *et al.*, 2001).

De acordo com HELMUS E TWEDEN, 1995, o termo biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde em 1982 como: “Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo”.

Quanto ao tipo de material, os biomateriais podem ser polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais que são manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos que entram em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos (GRANJEIRO, 2010).

CARVALHO *et al.*, (2004), propuseram uma nova classificação para estes materiais, baseada em suas propriedades. Os autores definiram, quanto à origem, um biomaterial autógeno como aquele obtido de áreas doadoras do próprio indivíduo; homogêneo como obtido de indivíduos de espécie semelhante ao receptor; heterogêneo como obtido de indivíduos de espécies diferentes do receptor, sendo mais comumente obtido de bovinos; sintético, como materiais de implante de natureza metálica, cerâmica ou polimérica (além dos compósitos).

Quanto à reação biológica, os autores definiram material biotolerado como aquele caracterizado pela presença de tecido conjuntivo fibroso entre o implante e o tecido ósseo; material bioinerte como aquele caracterizado por uma neoformação óssea de contato; bioativo como aquele capaz de promover uma reação físico-química entre o implante e o osso, sendo resultado de uma adaptação química e microestrutural com o tecido ósseo.

Quanto às características físicas, no enxerto mineralizado, os componentes orgânicos são removidos e a matriz inorgânica é preparada na forma de grânulos com dimensões variadas. Já no desmineralizado, os componentes inorgânicos e celulares são removidos, permanecendo os componentes da matriz extracelular, podendo ou não incluir as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs).

Em relação às propriedades biológicas, a osteocondução é definida como a capacidade do biomaterial em conduzir o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte. A osteoindução envolve a formação de novo osso a partir das células osteoprogenitoras do leito receptor, derivadas das células mesenquimais indiferenciadas, que se diferenciam sob a influência de um ou mais agentes indutores. Material osteogênico é aquele que utiliza o processo pelo qual células ósseas vivas são enxertadas em um leito receptor e permanecem com a capacidade de formação de novo tecido ósseo. O material osteopromotor é caracterizado pelo uso de meios físicos (membranas ou barreiras) que promovem o isolamento anatômico de um local, permitindo a seleção e proliferação de um grupo de células a partir do leito receptor, e impedem a ação de fatores concorrentes inibitórios ao processo de regeneração. Osteoestimulação significa que o material proporciona uma maior concentração e atividade dos osteoblastos do que os vistos nos materiais meramente osteocondutivos.

A história do desenvolvimento dos materiais permite identificar três gerações de biomateriais. A primeira geração de biomateriais para a regeneração do tecido ósseo e dentário era constituída por materiais inertes que não induzem respostas tóxicas, mas que

não estabelecem ligação com o tecido no local do implante (HENCH, 1980). Esta geração mostra-se empírica, onde o acaso, e não o projeto era responsável pela eficiência do biomaterial. Foi a era de ouro, aço, marfim, madeira, vidro, silicone, acrílico, polimetilmetacrilato, entre outros, utilizados para preencher, recobrir e conectar. (GRANJEIRO, 2010).

A segunda geração de biomateriais teve início com a introdução do princípio da bioatividade, ou seja, a capacidade que alguns biomateriais possuem de provocar a ligação química com tecidos vivos, sem formar a camada fibrosa que os separa do tecido. Estes materiais, como a hidroxiapatita e os biovidros bioativos, apresentam em geral, módulo de elasticidade muito superior ao de tecidos vivos (SILVA, 1999).

A utilização de materiais e implantes para Bioengenharia constitui a terceira geração de biomateriais. A construção do tecido-projetado é baseada na própria célula do paciente que pode ser produzida e usada para selecionar um tratamento farmacêutico favorável. Exemplificam essa etapa os implantes teciduais para regenerar o tecido e não simplesmente substituí-lo, como componentes biológicos geneticamente modificados (células ou BMPs) associados com cerâmicas de fosfato de cálcio, colágeno ou hidrogéis, superfícies de titânio com revestimentos nanométricos de cerâmicas de fosfato de cálcio e estruturas tridimensionais de cerâmicas de fosfato de cálcio associadas às células.

O melhor biomaterial com intuito de promover osteogênese de um defeito ósseo continua sendo o osso autógeno, por apresentar células do próprio hospedeiro, propiciando formato e suporte adequados ao novo tecido ósseo em formação, além de possuir osteocondução e osteoindução. A desvantagem do seu uso é a disponibilidade limitada, o que favorece possíveis complicações pós-operatórias relacionadas ao procedimento de coleta (BOO *et al*, 2002).

Em substituição ao enxerto autógeno, existem alguns exemplos de biomateriais como: colágeno, hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcio beta (β – TCP), ácido polilático glicólico, biovidro, dentre outros. A busca por um material com propriedades físico-químicas otimizadas, biologicamente aceitável e possível de ser comercializado é o grande objetivo das pesquisas sobre o tema. (SILVA *et al*, 2008).

Os biomateriais devem ser utilizados de forma que permitam sua vascularização e devem ter como pré-requisitos comprovada biocompatibilidade, aplicação clínica e ausência de riscos trans-operatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas, além da aceitação pelo paciente (SERVICE, 2000).

De acordo com CARVALHO *et al.*, (2004), a biocompatibilidade é uma propriedade que os materiais devem apresentar para que eles possam ser utilizados em um sistema biológico, sem provocar reações adversas e nem impedir a diferenciação tecidual característica do local da implantação. Segundo os autores, os biomateriais devem possuir as seguintes propriedades: não induzir à formação de trombos como resultado do contato entre o sangue e o biomaterial; não induzir resposta imunológica adversa; não ser tóxico; não ser carcinogênico; não perturbar o fluxo sanguíneo e não produzir resposta inflamatória aguda ou crônica que impeça a diferenciação própria dos tecidos adjacentes.

Os biomateriais abrangem todos os elementos implantados no organismo humano com fins terapêuticos. Diferenciam-se pela escala e pelos processos de produção, mas o objetivo final é a bioengenharia de suportes acelulares ou celularizados a serem implantados no processo de regeneração. A escala macroscópica inclui implantes metálicos, mineralizados ou orgânicos. A escala microscópica inclui estudos de conjuntos celulares, determinados pelas interações célula-célula e célula-matriz. A escala nanométrica desenvolve os biomateriais em escala infracelular, com atenção para os processos de adesão, migração e interação celular com as estruturas tridimensionais (BOROJEVIC, 2005).

De acordo com GRANJEIRO, 2010, os materiais cerâmicos são cada vez mais importantes na clínica médica e odontológica para a regeneração do tecido ósseo e dentário. Em conjunto com as terapias celulares, buscam conciliar biocompatibilidade, porosidade, resistência mecânica e propriedades de superfície compatíveis com a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras.

Um grande desafio atual reside em produzir biocerâmicas comerciais com características físico-químicas e morfológicas tais que, quando implantadas nas regiões lesadas, estimulem a osteogênese. Para esta finalidade, devem propiciar a formação de estruturas semelhantes aos elementos de matriz extracelular, facilitar a mobilização, expansão e integração de populações de células regenerativas internas e fomentar o reparo de lesões ou a renovação de tecidos degenerados. Além destas funções, as biocerâmicas devem ser biodegradáveis pelo organismo permitindo que todo o tecido ósseo perdido seja regenerado.

O processamento térmico é de fundamental importância para obtenção dos produtos cerâmicos, pois dele dependem o desenvolvimento das propriedades finais destes produtos. Esse tratamento compreende as etapas de secagem e sinterização (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CERÂMICA, 2010).

Após a etapa de formação, as peças em geral continuam a conter água, proveniente da preparação da massa. Para evitar tensões e, conseqüentemente, defeitos nas peças, é necessário eliminar essa fase líquida, de forma lenta e gradual, em secagens intermitentes ou contínuas, a temperaturas variáveis entre 50 °C e 150 °C.

Na sinterização, os produtos adquirem suas propriedades finais. As peças são submetidas a um tratamento térmico a temperaturas elevadas, abaixo do ponto de fusão. Os materiais cerâmicos cristalinos e, mais especificamente, os cerâmicos finos, possuem temperaturas absolutas de fusão em torno de 2000°C, devido à natureza das ligações químicas presentes em suas estruturas (UNICAMP, 1997). Durante esse tratamento, ocorre uma série de transformações em função dos componentes da massa, tais como: perda de massa, desenvolvimento de novas fases cristalinas, transformações de fases, fusão de fase vítrea e a formação dos grãos.

Portanto, em função do tratamento térmico e das propriedades das diferentes matérias-primas, são obtidos produtos para as mais diversas aplicações. Essas propriedades, somadas ao ambiente mecânico, influenciam na velocidade e extensão do processo de reabsorção do material enxertado, assim como na indicação ou restrição da sua aplicação clínica.

Devido a sua similaridade com a fase inorgânica do tecido ósseo e sua propriedade osteocondutora, a hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tem sido usada como a mais importante biocerâmica bioativa para implantes ósseos.

Adicionalmente, quando um material é implantado em um tecido biológico, as primeiras interações que ocorrem são entre as biomoléculas e a superfície do biomaterial. As células não se ligam diretamente à superfície do material bioativo. A ligação ocorre por meio de glicoproteínas da matriz extracelular. A adesão das células é observada pelo seu espalhamento e reorganização das proteínas do citoesqueleto. Nos pontos de contato das células com o biomaterial, ocorrem trocas de informações com a matriz extracelular, resultando em ativação gênica, espalhamento e remodelamento das células (ELIAS *et al.*, 2008).

A hidroxiapatita possui alta afinidade com as proteínas, apresentando simetria hexagonal com parâmetros de célula unitária $a = b = 0,943 \text{ nm}$ e $c = 0,688 \text{ nm}$ e dois sítios de ligação diferentes - sítios cálcio (Ca) e fósforo (P). Apesar de sua carga de superfície total negativa, a hidroxiapatita possui uma alta afinidade de adsorção à albumina bovina (BSA) carregada negativamente devido à presença dos sítios Ca, ricos em íons cálcio (KANDORI *et al.*, 2009).

1.2 OBJETIVO

É natural dentre os pesquisadores a busca não apenas por um enxerto ósseo ideal, mas também por formas alternativas de acelerar a neoformação óssea no local enxertado, melhorando também a qualidade óssea neoformada.

O presente trabalho teve como objetivo a produção de hidroxiapatita sintética nanoestruturada, com e sem adição de dispersante, e a investigação da influência da adsorção da albumina bovina ao material sintetizado.

A hidroxiapatita foi sintetizada pelo método de precipitação em solução aquosa, rota utilizada no Laboratório de Materiais Cerâmicos do Instituto Militar de Engenharia (IME), com diferentes tempos de envelhecimento dos precipitados (24 horas (padrão), 40 horas e 88 horas). Com o tempo padrão de 24 horas, foi realizada outra síntese, com os mesmos reagentes utilizados nas soluções anteriores, onde foi adicionado o polímero polivinilpirrolidona (PVP) na concentração de 3%, com o objetivo de dispersar os aglomerados de HA, totalizando quatro sínteses.

A albumina bovina (BSA), em concentração de 1mg/ml, foi associada à hidroxiapatita em diferentes condições (sem tratamento térmico e com tratamento térmico) nas quatro sínteses realizadas para caracterização físico-química da HA e avaliação da sorção e dessorção de BSA.

1.3 POSICIONAMENTO DO TRABALHO

A síntese de hidroxiapatita pode ser realizada utilizando-se várias técnicas, como a síntese por moagem reativa dos pós precursores e outras empregando a precipitação em soluções aquosas. Esta última produz HA não estequiométrica e de baixa estabilidade térmica, que resulta na decomposição parcial da HA em α - e β -TCP, fosfato tricálcio alfa e fosfato tricálcio beta, respectivamente (RIMAN *et al*, 2002, KWEH *et al*, 1999).

O método de precipitação em solução aquosa foi adotado no presente estudo. As partículas de hidroxiapatita são obtidas por precipitação a partir de soluções de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) e ácido láctico ($\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{HOH}$) que são preparadas separadamente e deixadas sob agitação. O valor do pH da solução é ajustado pela adição de hidróxido de potássio (KOH) para obtenção de pó em pH 12.

Os precipitados são filtrados em sistema de vácuo, adicionando-se abundantemente água Milli-Q[®] para a retirada do KOH até que a água da resuspensão atinja a neutralidade, de pH 7, e são secos pelo processo de liofilização durante 24 horas. O pó resultante é desagregado em um almofariz de ágata e é feita a peneiração do pó. Posteriormente, há o tratamento térmico a 1100°C.

Com o objetivo de estimar a quantidade de BSA adsorvida sobre as amostras de HA na forma verde e com tratamento térmico (CTT), foi realizada imersão das amostras de HA em solução de BSA na concentração de 1 mg/ml.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTOFISIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado em constante processo de reabsorção e neoformação (GARG, 2004). Como o osso é uma mistura de fibras tenazes (fibrilas de colágeno do tipo I) e partículas sólidas (cristais de fosfato de cálcio), ele apresenta boa resistência tanto a cargas compressivas quanto a cargas trativas, podendo assumir diferentes morfologias e funções, de acordo com sua localização no esqueleto humano (SILVA, 1999).

O osso representa o maior reservatório de cálcio do corpo humano. Consequentemente, além das funções de sustentação e proteção de órgãos vitais, ele desempenha um terceiro papel, no metabolismo, realizando a troca de minerais com o sangue. A quarta função do osso é filtrar os íons gerados no sangue que podem substituir íons de cálcio ou ser incorporados à rede dos cristais de apatita, ou ainda serem aderidos à matriz orgânica (SOMCHAI, 1992). As propriedades mecânicas do osso cortical estão apresentadas na TAB. 2.1

TAB. 2.1 Propriedades Mecânicas do Osso Cortical (SOMCHAI, 1992).

PROPRIEDADES MECÂNICAS	LONGITUDINAL (L)	TRANSVERSAL (T)
Lim. Res. à compressão (MPa)	70-280	53
Lim. Res. à tração (MPa)	70-160	50-53
Módulo de Young (GPa)	11-21	5-13
Microdureza (kg/mm ²)	30-60	-
Tenacidade à fratura (MPa.m ^{1/2})	2-5	8

A matriz óssea é composta por um arranjo complexo de fibras colágenas impregnadas com sais minerais, em sua grande maioria, nanopartículas de fosfato de cálcio (85% pp),

carbonato de cálcio (10% pp) e pequena quantidade de fluoreto de cálcio e magnésio fluoretado (5% pp) (DALEN e OLSSON, 1974).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode ser dividido em dois tipos, baseado na densidade e quantidade de porosidade (GARG, 2004). O osso cortical corresponde a 85% do osso do corpo humano e é constituído por uma estrutura densa e compacta, caracterizada por pouca atividade metabólica e pequena presença de células. O osso medular corresponde aos 15% restantes, tem função de receber cargas e responder a necessidades fisiológicas (MUNDY, 1999). A microestrutura do osso é composta de osso primário ou entrelaçado, osso secundário ou lamelar e células ósseas.

Do ponto de vista histológico, o tecido ósseo pode ser classificado em primário ou imaturo, secundário ou lamelar. Ambos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz extracelular. No tecido ósseo primário, as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, em menor conteúdo mineral e maior quantidade de osteócitos incluídos. No tecido ósseo secundário, as fibras colágenas organizam-se em lamelas que adquirem uma porção paralela umas às outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno dos canais e vasos, formando os sistemas de *Havers* (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Há três tipos de células ósseas distintas das células medulares que pertencem ao sistema hematopoiético. Elas são (HANCOX, 1972; JUNQUEIRA *et al.*, 1995; MUNDY, 1999; TEN CATE, 2001):

Osteoblastos: São derivados das células osteoprogenitoras, responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos da matriz. Durante a osteogênese, secretam fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento beta transformador (*TGF-β*), fator de crescimento derivado das plaquetas (*PDGF*), proteínas osteomorfogénicas (*BMPs*), fator de crescimento insulina like (*IGF*).

A porção orgânica da matriz, produzida pelos osteoblastos, é predominantemente constituída por colágeno do tipo I (85%), com pequenas quantidades de colágeno tipo III e V (5%). As proteínas não-colágenas representam os 10% restantes. A porção inorgânica é composta basicamente de íons fosfato e cálcio formando a hidroxiapatita.

A atividade de síntese pode ser medida pela morfologia destas células: quando empenhadas na produção de matriz, elas têm citoplasma basofílico e um formato cuboidal a colunar, ao passo que quando a atividade de síntese diminui, elas se tornam planas e os

basófilos citoplasmáticos diminuem. Estes processos citoplasmáticos se tornam mais evidentes quando essas células envolvem-se a si mesmas em matriz sintetizada nova. Quando isto ocorre, estas células são chamadas de osteócitos.

A matriz nova que é depositada na superfície de ossos mais velhos é chamada osteóide, e fica entre a superfície do osso mais velho e a camada de osteoblastos. Esta nova matriz não é calcificada ainda e a aposição de osso é completada quando os sais de cálcio são depositados nesta nova matriz.

Osteócitos: São células maduras (anteriormente osteoblastos) que se tornaram inclusas na matriz que elas formaram, comunicando-se com o meio externo através de prolongamentos dentro dos canalículos. Esses canalículos são responsáveis pelas trocas teciduais através de fluidos, sendo responsáveis pela manutenção do tecido.

Osteoclastos: São células gigantes multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea controlada pelo paratormônio. São derivadas da fusão de monócitos que atravessam capilares sanguíneos. Estão localizadas em escavações presentes no tecido mineralizado denominadas de lacunas de *Howship*. A FIG. 2.1 mostra esquematicamente as células ósseas.

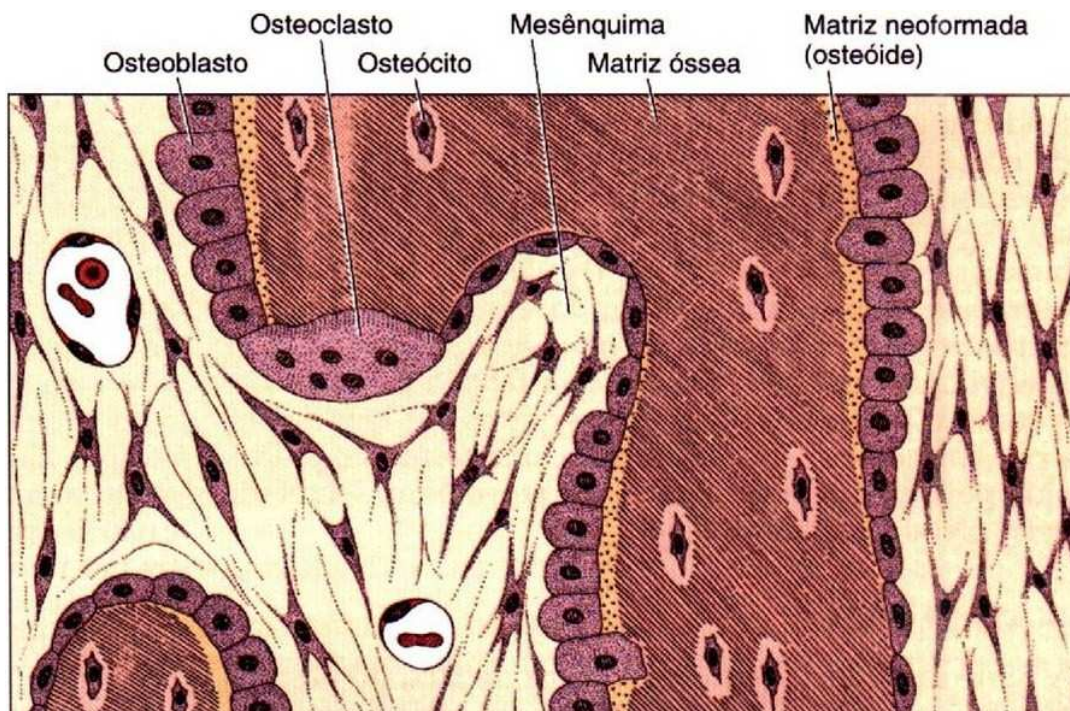


FIG. 2.1 Diagrama das células ósseas (JUNQUEIRA *et al.*, 1995).

A fim de entender as propriedades do osso, torna-se necessário conhecer as propriedades mecânicas dos seus componentes e a relações estruturais entre elas nos vários níveis de organização (FIG. 2.2). Estes níveis e estruturas são divididos em: macroestrutura (osso cortical e esponjoso); microestrutura (sistema Harvesiano, ósteons, trabéculas individuais), sub-microestrurura (lamelas); nanoestrurura (colágeno fibrilar com fase mineral) e sub-nanoestrutura (estrutura molecular dos elementos constituintes, tais como o mineral, o colágeno e as proteínas não-colágenas). Essa estrutura hierarquicamente organizada possui um arranjo e orientação de componentes irregulares, contudo aperfeiçoados, produzindo um material heterogêneo e anisotrópico (RHO *et al*, 1998).

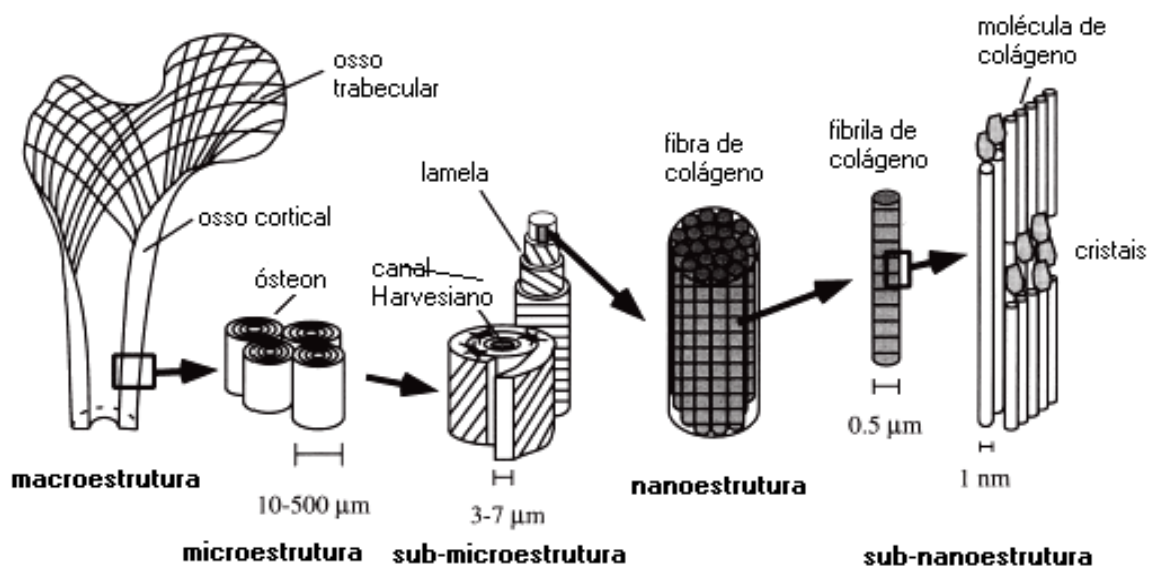


FIG. 2.2 Organização estrutural do osso (RHO *et al*, 1998).

Quando as fibras de colágeno são distribuídas num arranjo planar tem-se uma lamela (3-7 μm de espessura). Em alguns casos, essas lamelas de fibras de colágeno mineralizadas formam camadas concêntricas (3-8 lamelas) ao redor de um canal para criar o que é conhecido como ósteon ou canal harvesiano (RHO *et al*. 1998).

Cristais de apatita semelhantes a placas estão dispostos em espaços discretos, dentro das fibrilas de colágeno, portanto limitando o possível crescimento primário dos cristais e forçando-os a serem discretos e descontínuos. Os cristais crescem numa orientação cristalina específica, com o eixo c dos cristais aproximadamente paralelos ao eixo de comprimento das fibrilas de colágeno. A dimensão média da fase mineral é de 50x25x3 nm³ (RHO *et al*., 1998).

2.2 ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

A Engenharia de Tecidos é um campo multidisciplinar que requer a interação de profissionais da área biológica, engenharias e especialidades clínicas. Apesar do grande avanço no desenvolvimento de biomateriais osteosubstitutos, não se obteve, ainda, o biomaterial ideal capaz de mimetizar as propriedades e características de células viáveis especializadas em produzir seus respectivos tecidos. Neste sentido, a Bioengenharia de Tecidos surge como uma abordagem capaz de aliar células, substratos adequados (carreadores ou *scaffolds*) e fatores de crescimento para a criação de tecidos em laboratório, autógenos e passíveis de serem aplicados como agentes terapêuticos (FIG 2.3) (NEREM, 1992).

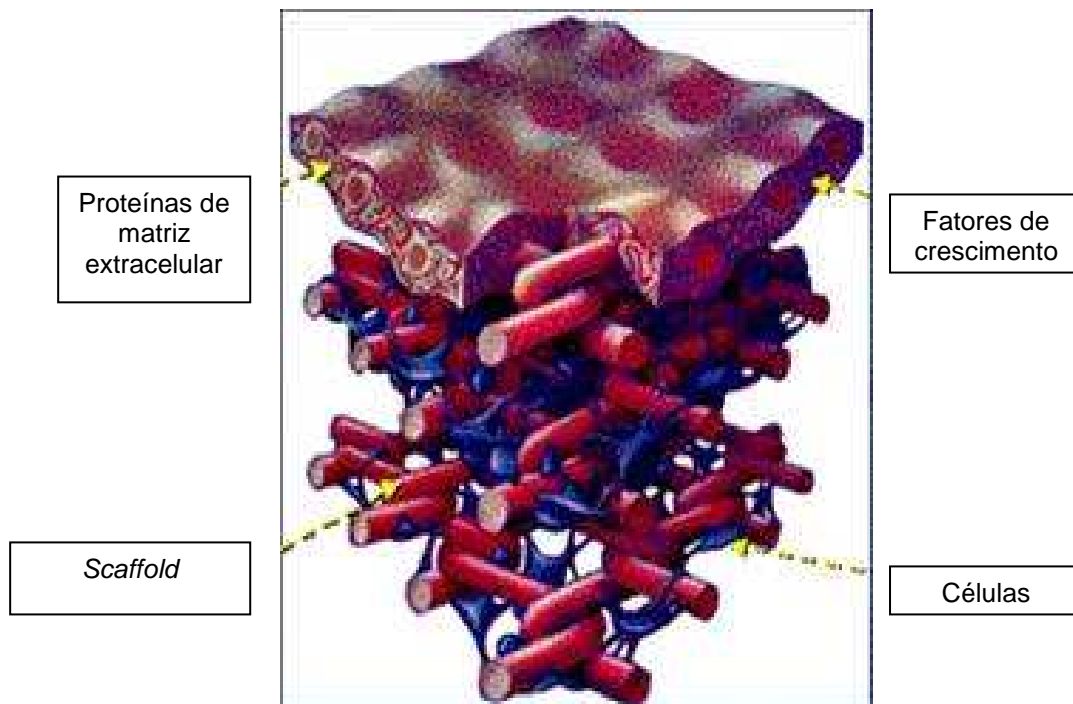


FIG. 2.3 Processo da Engenharia Tecidual (*National Science Foundation Workshop, 1988*).

As estratégias da Engenharia de Tecidos envolvem o uso de células isoladas para substituir funções específicas, substâncias que induzem a proliferação de células e tecidos (fatores de crescimento como as proteínas morfogenéticas ósseas), ambas combinadas a matrizes que atuam como suportes (carreadores) para células ou proteínas (UEDA *et al.*, 2000).

De acordo com SILVA, 2008, células mononucleares do periósteo de ratos foram associadas a um biomaterial biocompatível de origem xenógena em um meio osteoindutor (DMEM: HAM F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* com uma mistura de nutrientes *Ham's F-12*) com 10% de soro fetal bovino, 20 nM de dexametazona, 50 microgramas/ml de ácido ascórbico, 10 mM de beta-glicerofosfato) (FIG 2.4). Depois de 21 dias, a análise de Von Kossa apresentou nódulos de mineralização e o teste de fosfatase alcalina determinou a presença de população celular osteogênica. A presença de células osteoprogenitoras foi confirmada pela presença de transcritos do gene CBFA-1 (*core binding factor alpha 1*). O autor concluiu que células osteoprogenitoras podem ser isoladas do periósteo de ratos e cultivadas sobre um arcabouço xenogênico biocompatível apresentando potencial aplicação para a terapia celular de perdas ósseas.

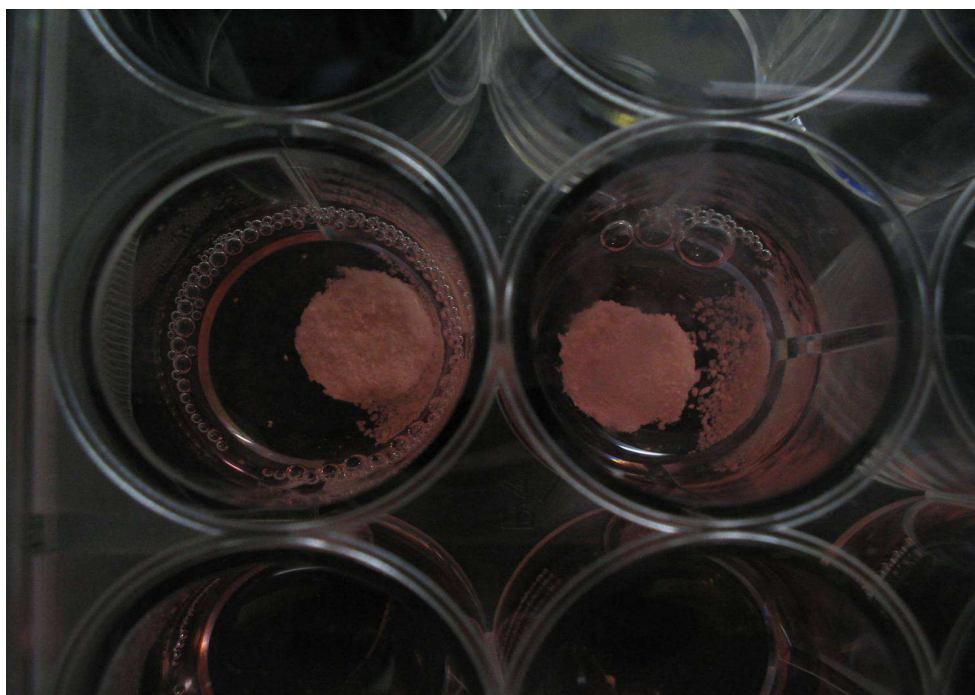


FIG. 2.4 Associação de células mononucleares de periósteo de ratos e biomaterial xenógeno em meio osteoindutor (SILVA, 2008).

Utilizando a base de dados do PUBMED e as palavras chaves *Biomaterials* OU *Medical Device*, é possível recuperar 777.017 referências sobre o tema (entre 1960 e novembro de 2006), crescendo linearmente ano a ano. Por outro lado, utilizando os descritores *Tissue engineering* ou *Bioengineering*, no mesmo período, foram obtidas 16.548 referências, tendo, na década de 60, apresentado apenas 24 artigos contra mais de 12.090 artigos entre 2001 e

2006. Este crescimento exponencial está relacionado ao enorme avanço das técnicas de Biologia Celular e Molecular, bem como dos processos e equipamentos para pesquisa vividos no final dos anos 90, mas em contínua expansão (FIG 2.5) (GRANJEIRO, 2010).

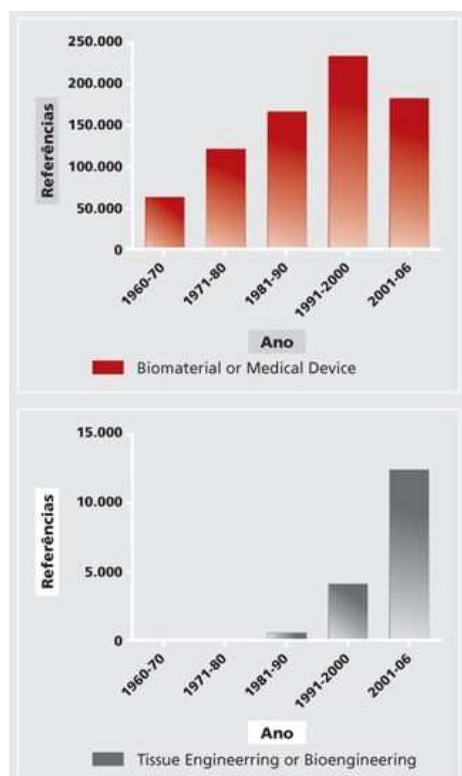


FIG. 2.5 Número de artigos recuperados no PUBMED por período de tempo (GRANJEIRO, 2010).

O conceito de Bioengenharia e Biomimética abrange a engenharia de complexos celulares e moleculares que podem substituir as estruturas de tecidos e órgãos, incluindo a Engenharia Celular e Tecidual, visando a substituição terapêutica de estruturas multicelulares, teciduais ou equivalentes a órgãos. Essa parte da Medicina, denominada de Medicina Regenerativa, visa o reparo de tecidos lesados ou degenerados por substitutos funcionalmente e estruturalmente equivalentes.

A introdução de biomateriais nas regiões lesadas é uma ação da Medicina Regenerativa, que propicia *in vivo* a formação de estruturas semelhantes aos elementos de matriz extracelular e de mediadores intercelulares associados, facilita a mobilização, expansão e integração de populações de células regenerativas internas e fomenta o reparo de lesões ou de regeneração e renovação de tecidos degenerados. Os avanços da área da genômica contribuem para este processo, tendo acesso às informações moleculares necessárias para

definir o perfil do paciente e às necessidades de células envolvidas nos procedimentos planejados, e controlando a interação entre as células manipuladas, os tecidos internos e os elementos estruturais extracelulares (BOROJEVIC, 2005).

2.3 FOSFATOS DE CÁLCIO

Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos com razões Ca/P que podem variar de 0,5 a 2,0. Apresentam merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas e foram propostos em 1920, por Albee e Morriison, para aplicações biomédicas, uma vez que o fosfato tricálcio, quando injetado nos defeitos ósseos, demonstrou crescimento ósseo mais rápido do que nos defeitos não tratados (LEGEROS, 2002).

As apatitas são muito estudadas e são formadas sob condições variadas, mas comumente ocorrem como minerais agregados a rochas ígneas. Os cristais são hexagonais, prismáticos e podem se tornar alongados, sempre terminando em faces dipiramidais (SILVA, 1999).

Podemos dividir os fosfatos de cálcio em duas categorias: (i) os que são obtidos pelo método de precipitação em solução aquosa próximo à temperatura ambiente (os 6 primeiros compostos apresentados na TAB 2.2) e (ii) os que são obtidos por síntese térmica ou decomposição (os 6 últimos compostos apresentados na TAB. 2.2) (BOHNER, 2000).

TAB. 2.2 Principais fosfatos de cálcio (modificado de BOHNER, 2000).

Nome	Fórmula	Ca/P	Mineral	Símbolo
Dihidrogeno fosfato de Cálcio monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.50	-	MCPM
Monohidrogeno fosfato de cálcio	CaHPO_4	1.00	Monetita	D CPA
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00	Brushita	D CPD
Fosfato octacálcio	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	-	OCP
Hidroxiapatita deficiente em cálcio	$\text{Ca}_{10-x}\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2$	1.50-1.67	-	CD-HA
Fosfato de cálcio amorfo n = 3-4.5; 15-20% H ₂ O	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1.5	-	ACP
Dihidrogeno fosfato de	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	-	MCP

Cálcio				
α -Fosfato tricálcio	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	-	α -TCP
β -Fosfato tricálcio	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	-	β -TCP
Hidroxiapatita (800°C)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	1.67	Hidroxiapatita	HA
Oxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1.67	-	OXA
Fosfato tetracálcio	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.00	Hilgentsockita	TetCP

Os fosfatos de cálcio de relevância biológica são: fosfato de cálcio amorfo, brushita, monetita, fosfato de cálcio octacálcio, fosfato de cálcio tricálcio, pirofosfato de cálcio e apatita. Dentre as fases minerais presentes em calcificações normais (não patológicas), as apatitas são as mais comumente encontradas (SILVA, 1999).

As apatitas são definidas pela fórmula química $\text{M}_{10}(\text{Y})_6\text{Z}_2$ e formam diferentes soluções sólidas através da substituição de sítios M^{2+} , XO_4^{3-} ou Z . As espécies M^{2+} são cátions metálicos divalentes como Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} ou Cd^{2+} . As espécies Y^{3-} é especificamente um dos ânions trivalentes: PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} , CrO_4^{3-} ou MnO_4^{3-} . Os ânions monovalentes Z são geralmente F^- , OH^- , Br^- ou Cl^- (KOHN E DUCHEYNE, 1992). As carbonatoapatitas são formadas a partir da substituição de Z_2 pelo ânion divalente CO_3^{2-} .

A fluorapatita, hidroxiapatita e cloroapatita são exemplos de membros que pertencem ao grupo das apatitas e diferenciam-se pelos seus ânions predominantes (F , OH e Cl , respectivamente). A hidroxiapatita pura é um sal duplo de fosfato tricálcio e hidróxido de cálcio e tem estequiometria $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ou $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (LEGEROS e LEGEROS, 1993).

As apatitas biológicas diferem da HA sintética em composição, tamanho do cristal, morfologia e estequiometria. A razão Ca/P da HA sintética é de 1,67, mas em geral, as apatitas biológicas são não-estequiométricas (1,63 e 1,61 para o esmalte e a dentina e 1,71 para o osso). A deficiência em cálcio nas apatitas é refletida pela formação de fosfato tricálcio beta (β -TCP) após calcinação a partir de 700°C (LEGEROS, 1994).

Entre os materiais sintéticos, os fosfatos de cálcio são os que apresentam melhores sucessos em enxertos e aumento de volume de osso, provavelmente pelo fato do osso vital ser composto de 60% a 70% de fosfato de cálcio. Vários trabalhos têm mostrado que íons carbonatos estão presentes em apatitas sintéticas e naturais, em dois tipos de sítios aniônicos da estrutura.

Os dois fosfatos de cálcio mais usados são a hidroxiapatita e o fosfato tricálcio. A hidroxiapatita e o fosfato tricálcio são usados para enxerto de osso na forma de grânulos, arcabouços e blocos densos que servem para a formação de um novo osso. A hidroxiapatita (HA), o fosfato tricálcio (TCP) e outros fosfatos de cálcio são biocompatíveis em virtude da liberação de íons fósforo e cálcio para os tecidos vizinhos (ANUSAVICE, 2005).

De forma genérica, as biocerâmicas de fosfato de cálcio degradam, com uma velocidade dada pela seguinte ordem (SILVA, 1999; KAWACHI *et al.*, 2000; ALBUQUERQUE, 2004): $\text{CaH}(\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Brushita) > CaHPO_4 (Monetita) > $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Fosfato Octacálcio) > $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (1-TCP) > $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA). A velocidade de reabsorção pode aumentar com o aumento da área superficial (A pó > A sólido poroso > A sólido denso), com o decréscimo de cristalinidade e, no caso da hidroxiapatita, pela substituição de CO_3^{2-} nos sítios de Mg^{2+} , Sr^{2+} nos sítios de cálcio (HENCH e POLAK, 2002).

2.3.1 HIDROXIAPATITA

A reparação óssea tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que pode determinar sucesso ou fracasso em situações como traumas, patologias e anomalias. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, há mais de 150 doenças e síndromes associadas a problemas articulares e esqueléticos (BIOMET, 2004). Um material ideal para enxertia óssea do ponto de vista biológico e biomecânico é aquele que consegue ser completamente repostado por novo osso formado pelo hospedeiro.

A hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] é uma das biocerâmicas mais frequentemente utilizadas para reconstrução óssea e dentária (RODRIGUES *et al.*, 2003). Tem excelente compatibilidade com tecido ósseo e alta osteocondutividade (SUCHANEK *et al.*, 1998). É considerada um material bioativo que permite a osseointegração, pois forma um elo químico direto com o osso subjacente sem a formação de tecido fibroso (TEIXEIRA *et al.*, 2000).

Hidroxiapatita (HA) é um composto de composição, estequiometria - $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - e cristalografia definidas. A hidroxiapatita pertence ao sistema hexagonal, com grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, que é caracterizado por uma simetria perpendicular a três eixos “a” equivalentes (a_1 , a_2 , a_3), formando ângulos de 120° entre si. A sua cela unitária consiste em grupos de Ca (cálcio), PO_4 (fosfato) e OH (hidroxila) empacotados juntos em um arranjo (SILVA, 1999), como visto nas FIGs. 2.6 e 2.7.

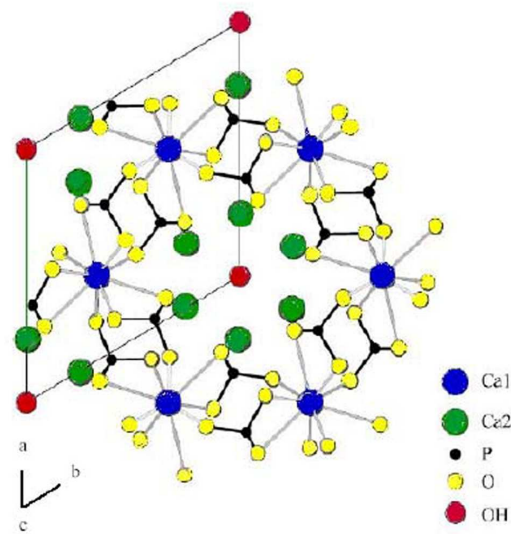


FIG. 2.6 Estrutura do cristal de HA (adaptado de IVANOVA *et al.*, 2001).

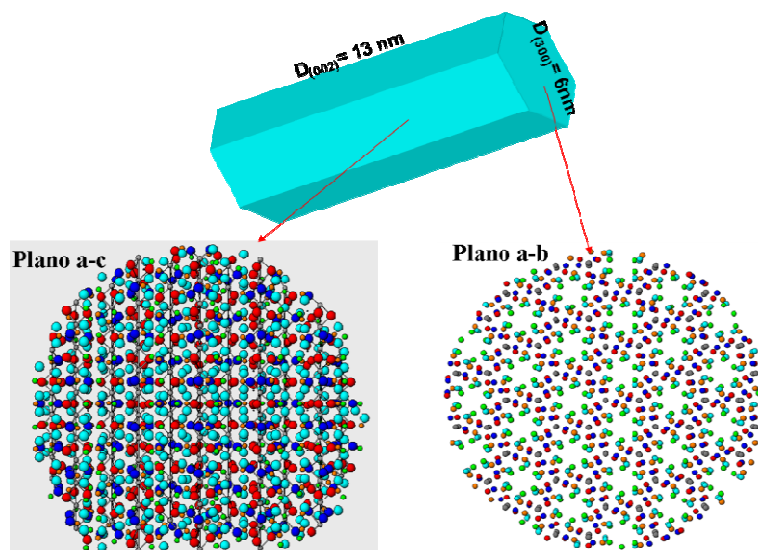


FIG. 2.7 Esquema da cela unitária do cristal da HA na escala nanométrica (SOUZA, 2010).

A cela unitária hexagonal da hidroxiapatita contém 10 íons cálcio em sítios não equivalentes, quatro no sítio 1 (Ca1) e seis no sítio 2 (Ca2). Os íons cálcio no sítio 1 estão alinhados em colunas, enquanto os íons cálcio do sítio 2 estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção *c* da estrutura. Os cátions do sítio 1 estão coordenados a 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4 e também a 3 outros átomos de oxigênio distantes. A existência de dois sítios de íons cálcio traz consequências importantes

para a hidroxiapatita, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion (RAYNAULD *et al.*, 2001).

Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria (eixo c). Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons oxigênio (O^{2-}) e de íons cálcio (Ca^{2+}) estão ligados entre si por íons fosfato. Os átomos de oxigênio dos íons hidroxila estão situados a 0.9 Å abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio e a ligação O-H forma um ângulo de aproximadamente 30° com a direção C. Dos quatro átomos de oxigênio que constituem os grupos fosfatos, dois estão situados em planos perpendiculares à direção c e os outros dois são paralelos a esta direção (RAYNAULD *et al.*, 2001).

A estrutura da hidroxiapatita permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com facilidade. O Ca^{2+} pode ser substituído por cátions metálicos tais como o Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , etc. Os grupos fosfatos podem ser substituídos por carbonatos e vanadatos e as hidroxilas por carbonatos, fluoretos e cloretos. Essas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da hidroxiapatita (RAYNAULD *et al.*, 2001).

De acordo com SOUZA, 2010, diferentes fases de fosfato de cálcio podem ser estabilizadas ou desestabilizadas pela presença de cátions e ânions, sendo ou não incorporados de forma significativa à estrutura cristalina, mas que poderiam influenciar sensivelmente os processos de nucleação e crescimento subsequente do cristal. Dentre as numerosas possibilidades de substituições iônicas na estrutura da HA, apresentam extrema importância as substituições de grupos aniônicos da HA pelo íon carbonato (CO_3^{2-}).

Chama-se hidroxiapatita carbonatada do tipo A (CHA-tipo A) a apatita cujo íon carbonato substitui o íon hidroxila (OH, sítio monovalente) e hidroxiapatita carbonatada do tipo B (CHA-tipo B) a apatita cujo íon carbonato substitui o íon fosfato (PO_4^{3-} , sítio trivalente). As CHA-tipo B são semelhantes às apatitas encontradas no esmalte dentário e no osso cortical. A incorporação de íons carbonato na apatita provoca mudanças na morfologia, parâmetros de rede, tamanho do cristal, deformação e maior solubilidade (ELLIOT, 1994; LEGEROS, 1994).

A presença de íons carbonatos na estrutura da hidroxiapatita provoca um aumento da solubilidade e da taxa de dissolução dos cristais da apatita. Além disso, a presença de íons carbonato tem grande efeito na cristalinidade da estrutura e tamanho de cristal. A formação

de cristais menores contribui para um aumento da área superficial e da taxa de dissolução, como também provoca um alargamento dos picos de difração. Estudos mostram que a substituição pelo íon carbonato gera uma grande desordem estrutural criando vacâncias de Ca^{2+} e OH^- . Esta desordem também reflete na periodicidade dos planos cristalográficos observada pelos raios X (LEGEROS, 1991; HENCH e WILSON, 1993).

Os cristais do osso mineral são de tamanho nanométrico e com grande área de superfície. Estes cristais crescem em uma matriz orgânica e têm ligações frouxas de cristal para cristal. Ao contrário, a hidroxiapatita de tamanho micrométrico apresenta área de superfície baixa e tem ligações fortes de cristal para cristal (SANOSH *et al.*, 2008). Segundo FERRAZ *et al.*, 2004, a presença do fosfato de cálcio no osso é sob a forma de cristais de tamanho nanométrico de aproximadamente 5 a 20 nm de largura por 60 nm de comprimento com uma fase não-estequiométrica pouco cristalizada contendo CO_3^{2-} , Na^+ , F^- e outros íons.

Comparada com as cerâmicas convencionais, as características da HA de fase nano, como tamanho do grão, tamanho do poro e molhabilidade, podem controlar a interação com proteínas (adsorção, configuração e bioatividade), além de modular uma adesão aperfeiçoada de osteoblastos e funcionalidade em longo prazo. Estas funções aperfeiçoadas dos osteoblastos são proliferação, síntese de fosfatase alcalina e deposição mineral de cálcio (FERRAZ *et al.*, 2004).

A topografia do tamanho do grão nanométrico e a molhabilidade da superfície são propriedades de materiais nanocerâmicos que não somente promovem adsorção seletiva aumentada da vitronectina (uma proteína que serve de mediadora para a adesão de osteoblastos), mas também afeta as conformações que aumentam as funções dos osteoblastos (FERRAZ *et al.*, 2004). Consequentemente é esperado que as cerâmicas de HA nanométrica tenham uma melhor bioatividade do que as dos cristais de HA convencionais (KALITA *et al.*, 2007).

Adicionalmente, os materiais de HA nanoestruturada podem melhorar a sinterabilidade e a densificação devido à melhor área de superfície, o que poderia aperfeiçoar a resistência à fratura e outras propriedades mecânicas críticas (MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2005; KALITA *et al.*, 2007; BANERJEE *et al.*, 2007).

Desta forma, muitos esforços têm sido feitos para produzir materiais sintéticos de nano-HA (LEGEROS, 1991), incluindo a síntese por precipitação, síntese hidrotérmica, hidrólise, síntese mecânico-química e sol-gel.

2.3.1.1 ROTAS DE SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

O pré-requisito para aplicação clínica da hidroxiapatita na substituição óssea é preparar pós de HA que apresentem características desejáveis como área de superfície alta, pequenos tamanhos de grãos e baixo grau de aglomeração de partículas, sendo todas estas propriedades dependentes do processo utilizado (KONG *et al.*, 2002).

A preparação de HA carbonatada nanoestruturada exige modificações nas técnicas de síntese a fim de mimetizar estruturalmente as bioapatitas, tais como utilização de baixa temperatura, alto valor de pH, adição lenta dos reagentes e tempo de digestão pequeno, que contribuem para a produção de nano cristais de apatita (RODRÍGUES-LORENZO, 2000). Estes parâmetros de síntese afetam a morfologia, o tamanho de partícula e a cristalinidade do material e, essas propriedades influenciam diretamente no tipo de aplicação da apatita (ÂNGELO, 2008).

Em função da alta complexidade e diversificação na química dos fosfatos de cálcio, pode-se facilmente modificar as características do material variando-se o método utilizado na sua preparação. Por isso, a escolha e o controle da metodologia adotada no preparo do material são fundamentais para cada aplicação do produto final (SENA, 2004).

A HA pode ser sintetizada a partir de meios aquosos (por precipitação em solução aquosa, síntese hidrotérmica e hidrólise de outros fosfatos de cálcio) e não aquosos (reação em fase sólida). Reações em fase sólida geralmente geram produtos estequiométricos, cristalinos e puros, porém requerem temperaturas relativamente altas por um longo tempo. Além disso, a sinterabilidade dos pós é geralmente baixa. No caso da precipitação em solução aquosa, onde a temperatura não excede 100° C, podem-se preparar cristais de tamanho nanométricos. Sua cristalinidade e razão Ca/P dependem fortemente das condições de preparação. A síntese hidrotérmica, utilizando temperatura elevada em soluções sob alta pressão, promove a formação de cristais com alto grau de cristalinidade e com razão Ca/P próximo ao valor estequiométrico (Ca/P = 1,67) (ELLIOT, 1994).

Segundo CUNHA *et al.*, 2004, a síntese de HA pode ser realizada utilizando-se várias técnicas, como a síntese por mistura mecânica dos pós precursores e outras empregando a precipitação em soluções aquosas. Os métodos que utilizam a mistura mecânica apresentam como vantagem a simplicidade e baixo custo, e como desvantagem a baixa cristalinidade, heterogeneidade química e instabilidade térmica.

De acordo com os mesmos autores, os métodos baseados na precipitação podem ser classificados em duas rotas mais comumente utilizadas. Uma delas é baseada na mistura de dihidrogeno fosfato de amônio com nitrato de cálcio: $10 \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 + 6 (\text{NH}_4)_2 \text{H}_2\text{PO}_4 + 8 \text{ NH}_4\text{OH} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 20 \text{ NH}_4\text{NO}_3 + 6 \text{ H}_2\text{O}$. A principal desvantagem deste método é a contaminação do produto final pelo íon nitrato, requerendo lavagens intensivas para a sua remoção. Um segundo processo utiliza ácido ortofosfórico com uma suspensão de hidróxido de cálcio. Este processo apresenta como único subproduto a água: $10\text{Ca}(\text{OH})_2 + 6\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ca}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 18 \text{ H}_2\text{O}$

Estas técnicas de precipitação apresentam como característica a influência de parâmetros como temperatura de reação, concentração e natureza dos reagentes, taxa de mistura e tempo de residência nas características do produto, gerando HA não estequiométrica, e de baixa estabilidade térmica, que resulta na decomposição parcial da HA em α e β -TCP.

A síntese de fosfatos de cálcio via precipitação química apresenta vantagens devido ao seu baixo custo e simplicidade. No entanto, a maioria dos procedimentos sintéticos apresenta a formação de produtos não estequiométricos e mistura de fases, que se deve à presença de vacâncias e substituições iônicas na rede, tais como carbonatos, hidrogenofosfatos, potássio, sódio, nitrato e cloreto. Os processos de precipitação consistem na adição de grupos fosfatos a suspensões que contenham íons cálcio, podendo partir de diferentes reagentes. A reação de neutralização que utiliza ácido ortofosfórico e hidróxido de cálcio apresenta maior potencial para produção da HA, uma vez que se tem apenas água como subproduto da reação (RIGO *et al.*, 2007).

Os métodos de precipitação apresentam variáveis, tais como pH, temperatura de obtenção, concentração molar dos reagentes, taxa de adição de reagentes, tempo de agitação, tempo de envelhecimento e temperatura de calcinação. O tempo de envelhecimento e a cinética de reação são variáveis críticas para a pureza e características cristalográficas do material obtido. A composição dos reagentes está relacionada à pureza do material, que pode apresentar, ou não, íons não esperados na rede, além de diferenças nas características morfológicas e cristalográficas. A taxa na qual os reagentes são adicionados influencia na taxa de nucleação dos cristais. A velocidade de gotejamento está diretamente relacionada à cinética da reação. A adição lenta de íons fosfato proporciona menor taxa de nucleação e maior taxa de crescimento, o que implica na obtenção de partículas maiores. Pelo contrário, altas taxas de adição de reagentes permitem a formação de maiores números de núcleos, mas sem que haja tempo suficiente para crescimento de grão (RIGO *et al.*, 2007).

A formação de um sólido envolve precipitação a partir de uma solução e cristalização. Estes dois processos ocorrem simultaneamente se o precipitado é cristalino, mas se o sólido obtido não é cristalino, a razão com a qual tais etapas acontecem determina a cristalinidade do material. Esta razão pode ser controlada pela variação da saturação da solução e pelo tempo médio de cristalização, que tem como parâmetros a temperatura e a taxa de gotejamento. A temperatura na qual a precipitação se processa tem grande importância na fase obtida e na conversão de uma em outra fase. O tamanho da partícula e a morfologia também são influenciados pela temperatura. Temperaturas mais altas permitem a obtenção de pós mais cristalinos (RIGO *et al.*, 2007).

AFSHAR *et al.*, 2003, prepararam HA a partir de suspensão de hidróxido de cálcio 0,5M, a qual foi aquecida por 1 hora em 40°C e agitada constantemente. Sobre ela foi adicionada ácido fosfórico 0,3M a uma taxa de 2 gotas/s. O pH foi controlado por meio da adição de NH₄OH. Os resultados apresentaram partículas com forma de bastão de escala nanométrica (50 nm) mediante a análise das micrografias de microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG). A alta intensidade das bandas de carbonato (ν_3) em 1450-1550 cm⁻¹, de acordo com os resultados de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), revela que alguns dos íons de carbonato são substituídos nos grupos de fosfatos, indicando que o precipitado em presença de dióxido de carbono no ar transforma-se em HA carbonatada tipo A-B.

Em 2007, FONSECA preparou a mesma rota utilizada neste estudo para obtenção de HA nanométrica produzida por precipitação em meio aquoso. A solução utilizada para obtenção dos pós teve a seguinte composição: 0,5 M de hidróxido de cálcio, 0,3 M de ácido fosfórico e 1 M de ácido láctico. As soluções foram agitadas separadamente por 30 minutos. Em um Becker contendo solução de Ca(OH)₂ sob agitação constante, foi adicionada a solução de C₃H₆O₃, e mantida por 30 minutos sob agitação. Em seguida, H₃PO₄ foi adicionado lentamente à mistura anterior e a solução foi mantida em agitação por 24 horas em temperatura ambiente. A suspensão obtida, denominada transparente, mostrou pH 3,8. Para a obtenção de precipitados com pH 12, adicionou-se uma base forte de hidróxido de potássio (KOH). Ao término do período de envelhecimento, os precipitados foram filtrados em sistema de vácuo, lavando-se abundantemente com água deionizada até atingir pH 7. Os pós foram secos em estufa a 60°C, desagregados em almofariz de ágata e peneirados. As análises em difração de raios X (DRX) nas amostras obtidas revelaram picos definidos e presença majoritária de HA. Foi observada ainda a presença da fase α -TCP em amostras sinterizadas

a 1100°C, fato este confirmado por análise de Rietveld e atribuído ao caráter nanométrico das partículas dos pós.

De acordo com WANG e SHAW, 2009, o método de precipitação aquosa é capaz de sintetizar HA nanométrica. Os autores utilizaram nitrato de cálcio e fosfato diamônio como reagentes e hidróxido de amônio concentrado para ajustar o pH para 11-12. O pó foi sinterizado a diferentes temperaturas (850 °C, 900 °C e 1200 °C). A imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) indicou a morfologia das partículas com geometria cilíndrica e comprimento médio de 50 nm. A análise pela teoria de Brunauer-Emmett-Teller (BET) indicou área de superfície específica de 120 m²/g. A análise de imagem quantitativa revelou o tamanho do diâmetro do grão nas amostras de HA sinterizadas a 850 °C, 900 °C e 1200 °C, encontrando tamanhos de 67 nm, 83 nm e 732 nm, respectivamente.

Segundo RAJABI-ZAMANI *et al.*, 2008, a técnica mais comum para a preparação de pós de HA é a precipitação. Entretanto, esta técnica necessita de um alto valor de pH para evitar a formação de monofosfato de cálcio e de alta temperatura de sinterização para formar HA cristalina. A técnica de sol-gel não necessita de alto valor de pH ou alta temperatura de sinterização (450°C), oferecendo uma mistura molecular de cálcio e fósforo que melhora a homogeneidade química dos materiais resultantes, além de resultar na formação de partículas nanométricas, de acordo com imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).

Utilizando a mesma técnica de sol-gel, SANOSH *et al.*, 2008, prepararam e caracterizaram pós de nano HA, tendo como reagentes nitrato de cálcio, ácido fosfórico, água destilada e amônia para ajuste do pH. O gel de HA foi seco e calcinado em diferentes temperaturas entre 200 e 800°C. Os difratogramas de DRX do pó de HA calcinado em temperaturas até 600°C apresentaram apenas picos de HA, enquanto os resultados dos pós tratados termicamente a 700 e 800°C apresentaram picos principalmente de HA, com picos menores de CaO. Através da análise de MET, foram encontrados tamanhos de partículas entre 20 e 60 nm.

Analisando o método de síntese de HA nanocristalina por precipitação aquosa, foram utilizados o nitrato de cálcio e o fosfato diamônio como fontes de cálcio e fósforo, e hidróxido de amônia como solução de ajuste de pH. Os autores observaram através da análise de MET que as micrografias do pó de HA antes do tratamento térmico apresentaram partículas esféricas com tamanho entre 8 e 20 nm. Quando a temperatura aumentou para 1200° C, as partículas de HA chegaram entre 40 e 50 nm com morfologia hexagonal. O

tamanho do grão aumentou gradualmente de tamanho quando a amostra foi aquecida de 100 a 1200° C. A fase da HA não foi transformada em outras fases de fosfatos de cálcio, quando a amostra foi aquecida a temperaturas acima de 1200° C, de acordo com a análise de DRX. (MOBASHERPOUR *et al.*, 2007).

Em um estudo comparativo entre a HA convencional e a HA nanoestruturada, foram encontradas, através da análise BET, partículas de HA de 31 nm na amostra de HA nano e 7400 nm na amostra de HA convencional. A HA nano foi sintetizada através do método de precipitação química seguido por um tratamento hidrotérmico por duas horas a 200 °C. Os reagentes utilizados, nitrato de cálcio e fosfato de amônio, foram adicionados lentamente a taxa de 3,6 ml/min. O hidróxido de amônio concentrado foi utilizado para manter a mistura em um pH de 10. De acordo com os autores, durante o tratamento hidrotérmico, uma cristalização alta pôde ser alcançada a temperaturas relativamente baixas, mas sob pressão maior que a atmosférica, resultando em HA cristalina de tamanho nanométrico (BALASUNDARAM *et al.*, 2006).

Através das análises de FTIR e DRX, foi avaliada a síntese de HA carbonatada obtida pelo método por precipitação aquosa. Foram utilizados óxido de cálcio e nitrato de cálcio como os reagentes de cálcio e ácido fosfórico como reagente de fósforo. Os íons carbonato foram introduzidos utilizando hidrogenocarbonato de amônio (NH₄HCO₃) e hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO₃). A decomposição significativa dos pós de HA carbonatada (tipo B ou AB) foi observada quando foram aquecidos a 800 °C. (SLÓSARCZYK *et al.*, 2005).

Através de estudos realizados para a síntese de HA pelo método de precipitação homogênea, foram utilizados cloreto de cálcio, dihidrogeno fosfato de amônio e hidróxido de amônio como reagentes. As reações foram conduzidas a 25 e 70 °C por 1 e 7 horas. Os grânulos formados foram calcinados a 800°C por 1 hora.. Segundo os autores, a reação, realizada em meio amoniacal, diferencia-se do processo utilizando o nitrato de cálcio pelo emprego de cloreto de cálcio. A vantagem da utilização deste reagente deve-se à maior facilidade de lavagem dos íons cloreto, quando comparado aos íons nitrato. O resultado de quantificação de fase, obtido pelo refinamento de Rietveld dos dados de DRX revela que a amostra foi constituída por cerca de 81% de HA e 19% de β-TCP (concentração em massa). As curvas de distribuição granulométrica mostram que os pós obtidos após calcinação apresentam-se na forma de aglomerados, constituídos por partículas submicrométricas, de acordo com as micrografias de MEV. (CUNHA *et al.*, 2004).

A síntese de nano-HA foi estudada através de irradiação com microondas. Uma mistura estequiométrica de cloreto de cálcio e fosfato de sódio foi moída e colocada em uma vasilha de Teflon. O tempo de irradiação no forno de microondas foi de 30 minutos. De acordo com os autores, o tempo de reação é menor e mais econômico no método de irradiação com microondas, produzindo grandes quantidades de pó de nano-HA. A presença de carbonato foi confirmada por FTIR. A análise de DRX do pó foi de encontro com as fichas padronizadas de HA. As imagens de MEV apresentaram agregados de partículas com tamanho esférico. A análise de MET apresentou a formação de partículas irregulares esféricas com tamanho de aproximadamente 100 nm (PARHI *et al.*, 2004).

Analisando o método de precipitação aquosa para a síntese de HA nanométrica, foram utilizados nitrato de cálcio e ácido fosfórico como materiais precursores. Através da análise por DRX, foi verificada a fase única da HA e através da análise de medida de superfície (BET), foram verificados tamanhos de grãos de aproximadamente 60 nm e área de superfície de 62 m²/g. As cerâmicas de HA foram obtidas sinterizando os pós a temperaturas de 1000 a 1200 °C. A fase da HA foi decomposta em α -TCP quando sinterizada a 1300 °C (KONG *et al.*, 2002).

As rotas de síntese citadas nesta revisão estão apresentadas, de forma resumida, na TAB. 2.3.

TAB. 2.3 Rotas de síntese, condições e características morfológicas da HA.

Rota	Condições (Reagentes, Temperatura)	Tamanho da partícula	Referência
Precipitação por solução aquosa	Nitrato de cálcio e ácido fosfórico (1000 a 1200°C)	60 nm (BET)	KONG <i>et al.</i> , 2002
Precipitação por solução aquosa	Hidróxido de cálcio, ácido fosfórico e hidróxido de amônio (1200°C)	50 nm (MEV-FEG)	AFSHAR <i>et al.</i> , 2003

Precipitação por solução aquosa	Hidróxido de cálcio, ácido fosfórico, ácido láctico e hidróxido de potássio (1100°C)	Nanométrico (DRX /Rietveld)	FONSECA, 2007
Precipitação por solução aquosa	Nitrato de cálcio, fosfato diamônio, amônia (1200°C)	40 e 50 nm (MET)	MOBASHERPOUR <i>et al.</i> , 2007
Precipitação por solução aquosa	Nitrato de cálcio, fosfato diamônio, amônia (850, 900 e 1200°C)	67 nm, 83 nm e 732 nm (BET)	WANG e SHAW, 2009
Precipitação homogênea	Cloreto de cálcio, dihidrogeno fosfato de amônio e hidróxido de amônio (800°C)	Submicrométrico (MEV)	CUNHA <i>et al.</i> , 2004
Irradiação com microondas	Cloreto de cálcio e fosfato de sódio (30 min)	100 nm (MET)	PARHI <i>et al.</i> , 2004
Precipitação seguida por tratamento hidrotérmico	Nitrato de cálcio, fosfato de amônio, hidróxido de amônio (200°C)	31 nm (BET)	BALASUNDARAM <i>et al.</i> , 2006
Sol-gel	Nitrato de cálcio, água, pentóxido de P, etanol (450°C)	Nanométrico (MET)	RAJABI-ZAMANI <i>et al.</i> , 2008
Sol-gel	Nitrato de cálcio, ácido fosfórico, água destilada e amônia (200-800°C)	20-60 nm (MET)	SANOSH <i>et al.</i> , 2008

A preparação da HA com nanopartículas individuais (sem agregados) é um problema atual da indústria da nanotecnologia. O controle sobre o tamanho e a morfologia é pobre nos

diversos métodos de síntese de hidroxiapatita. Na formação de aglomerados, partículas pequenas tendem a se agregar, reduzindo a energia livre total do sistema. Mesmo quando as partículas primárias têm forma esférica e tamanhos uniformes, dependendo do tipo do processamento e das forças envolvidas, os aglomerados podem apresentar orientações preferenciais de partículas.

Quando ocorre a formação de aglomerados, a densidade de empacotamento das partículas varia de região para região da amostra. No entanto, a distribuição do pó é essencial para determinar os mecanismos de densificação, especialmente nos casos onde a tensão desempenha um papel importante, tal como o caso da sinterização a alta pressão isostática.

Grupos de partículas fracamente ligadas podem se comportar como pseudopartículas maiores chamadas aglomerados. No caso de pós cerâmicos extremamente finos, a densidade de empacotamento é geralmente muito baixa. Uma das possíveis razões para isto é que as unidades de empacotamento básicas são aglomerados duros (agregados de baixa densidade formados durante a síntese do pó). Esses agregados crescem à custa do acúmulo, em posições aleatórias, de pequenas partículas em movimento browniano em torno de um núcleo original e são auto-similares com o aumento de seus tamanhos, comportando-se, portanto, como fractais (VASCONCELOS e PINTO, 1997).

De acordo com estes autores, um algoritmo bastante simples para a simulação geométrica de um aglomerado de partículas pode ser utilizado considerando-se que existam forças atrativas entre as partículas (forças de van der Waals ou eletrostáticas, por exemplo), as quais são responsáveis pela interrupção da movimentação de cada partícula. A FIG. 2.8 apresenta um aglomerado bidimensional simulado com esse algoritmo.



FIG. 2.8 Aglomerado bidimensional simulado em um ambiente de computação gráfica e modelagem de sólidos (VASCONCELOS e PINTO, 1997).

Características de fluxo de partículas muito finas são também afetadas pela aglomeração de partículas. Com a finalidade de criar grãos para fluírem livremente, essas partículas são comumente aglomeradas em formas e tamanhos reprodutíveis através de alguma técnica de granulação adequada. Apesar de grande incidência de sistemas nos quais alguma forma de aglomeração ocorre, os mecanismos que governam a sua formação, os quais dependem das forças entre as partículas, aglomerados e paredes dos recipientes, são, em geral, pouco conhecidos (SIMONS, 1996).

Com o objetivo de superar o problema com a aglomeração das partículas de hidroxiapatita, alguns surfactantes têm sido utilizados como mediadores (SUPOVÁ, 2009). Os surfactantes são uma classe de compostos que possuem a propriedade de reduzir tensões interfaciais. A palavra surfactante deriva da expressão inglesa “surface active agent”. Em geral, são constituídos por um grupo polar (cabeça polar) e uma cadeia, ou duas, de hidrocarbonetos não polares (parafínicas). Quando dissolvidos em água, ocorre a formação, ou auto-associação, de agregados entre os grupos não polares e a água por meio de forças eletrostáticas. Tais agregados são denominados micelas; do latim “pequenos agregados” (VIANA, 2008).

De acordo com QIU *et al.*, 2008, o polímero polivinilpirrolidona (PVP) é um surfactante que pode desempenhar um importante papel na síntese da HA como estabilizador para retardar o crescimento do cristal ou prevenir aglomeração. Devido a sua alta complexidade, propriedade de adesão, não toxicidade e solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos, o PVP tem sido amplamente utilizado em vários setores da indústria, como medicina, farmacologia e indústria têxtil. Os autores sintetizaram HA na presença de PVP a 5% e os resultados de FTIR indicaram bandas características do PVP (2700 – 3100 cm^{-1}), mesmo depois das amostras com PVP terem sido lavadas com água e álcool. Os autores concluíram que o PVP apresentou alta afinidade com a HA.

O PVP é considerado um polímero eco-amigável que tem sido utilizado como um material ligante nos sistemas do grupo carbonila do PVP e o grupo hidroxila da HA. Durante a degradação do polímero, foi verificado que as moléculas de HA parecem exercer uma ação catalítica (MENDES *et al.*, 2010).

O PVP contém um anel lactama que é uma parte da unidade monomérica de repetição. A alta polaridade do anel pode ser atribuída à forte estabilização de ressonância, facilitada pela geometria planar do anel. (AMORIM *et al.*, 2006). As unidades catiônicas (N-C=O) deste polímero no anel lactama e estes grupos polares estão envolvidos para a associação com

moléculas de água através da ligação de hidrogênio. A associação do anel lactama (especialmente, com o grupo carbonila) do PVP com a água tem sido observada através de estudos de viscosimetria e espectrofotometria (KHAN e GUL, 2006). A fórmula estrutural deste polímero é apresentada na FIG. 2.9 e o espectro na região do infravermelho é apresentado na FIG. 2.10.

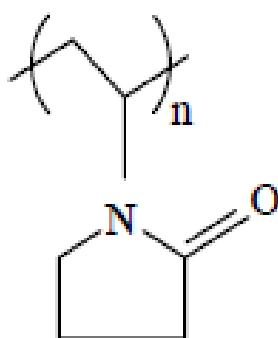


FIG. 2.9 Fórmula estrutural do PVP (AMORIM *et al.*, 2006).

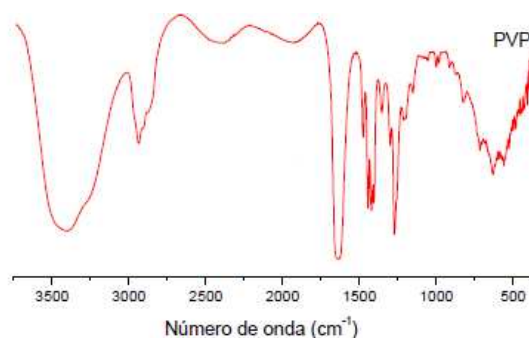


FIG. 2.10 Espectro na região do infravermelho para o PVP (AMORIM *et al.*, 2006).

Fibras de HA foram produzidas por combinação das técnicas de electrofiação e de sol-gel. O sistema sol-gel utilizado teve o nitrato de cálcio tetra hidratado e o pentóxido de fósforo, como precursores de cálcio e fósforo, respectivamente. As fibras foram obtidas por electrofiação de misturas de soluções de PVP e do gel obtido. Após sinterização das membranas produzidas por electrofiação, obtiveram-se nano e microfibras de HA com diâmetros no intervalo de, aproximadamente, 60 nm a 1 μm . O PVP utilizado teve influência na forma, promovendo a formação de fibras de HA mais cilíndricas. O PVP apresentou as bandas características a 2950, 1656, 1459 e 1288 cm^{-1} , correspondentes a C-H, C=O, C-H (grupos cíclicos) e C-N, respectivamente. A membrana não sinterizada apresentou as bandas citadas para o PVP, bem como a banda a 3800 cm^{-1} , resultante da deformação simétrica do

grupo hidroxila presente na HA. Verificou-se, igualmente, a presença das bandas a 600 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} , característicos do grupo fosfato da HA. Todas as outras bandas características da HA foram mascaradas pelas bandas do PVP. Verificou-se, para temperaturas de sinterização de 600°C e 700°C , a existência de CaO e de β -TCP nas fibras de HA. O estudo realizado revelou a substituição de íons fosfato por íons carbonato, sendo uma HA do tipo B (FRANCO *et al.*, 2010).

Através da síntese hidrotérmica, foi produzida nano-HA em presença de PVP. Nitrato de cálcio e (mono) hidrogenofosfato de sódio foram utilizados como reagentes e o PVP foi adicionado às soluções sob agitação durante 30 minutos. Em seguida, a mistura foi levada à autoclave e aquecida a $180\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. A suspensão resultante foi lavada com água destilada e etanol durante várias vezes e seca a $50\text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas. A análise de DRX apresentou picos característicos de estrutura cristalina de HA pura. As imagens de MEV e MET demonstraram que as partículas de HA apresentavam diâmetro de 20 – 25 nm. O papel do PVP, de acordo com os autores, deve-se a dois fatores: efeito espacial e efeitos de ligação de hidrogênio e eletrostática. Devido aos grupos hidroxila estarem localizados abundantemente na superfície do cristal de hidroxiapatita, a ligação de hidrogênio é formada entre o PVP e a HA, prevenindo a aglomeração das partículas (DU *et al.*, 2009).

Nano-HA esférica foi sintetizada utilizando nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e fosfato de amônia ($\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) como reagentes e polivinilpirrolidona (PVP) como mediador. A solução de PVP foi gotejada na solução com os reagentes e deixada por cinco dias sob temperatura ambiente. Os depósitos obtidos foram lavados por três a quatro vezes com água destilada e duas vezes com álcool absoluto, foram filtrados e depois secos em temperatura ambiente por 24 horas. As imagens de MET demonstraram que, quando não havia PVP ou quando esta concentração era extremamente baixa (0,01%), as amostras obtidas ficavam seriamente aglomeradas e a forma era floculada. Quando a concentração de PVP aumentava (0,01 – 1%), a aglomeração das partículas reduzia e a forma dos grânulos passava de floculada para esferóide. Quando a concentração era alta (1 – 3%), as formas das amostras eram principalmente esferóides com 30 – 50 nm de diâmetro, enquanto que nas concentrações muito altas (3 – 5%), as formas eram esferóides e o tamanho das partículas era quase o mesmo, entre 40 e 50 nm. A análise de DRX indicou que as características dos picos correspondem à da HA e que a HA sintetizada na presença de PVP teve picos mais baixos e mais largos, quando comparados com a HA sintetizada na ausência de PVP. A análise de FTIR comprovou que à medida que a concentração de PVP aumentava, a

intensidade das bandas de absorção dos grupos de fosfato ficava mais baixa e mais larga, indicando que a cristalinidade da HA diminuía continuamente quando o conteúdo de PVP aumentava (QIU *et al.*, 2008).

Nanopartículas de HA foram sintetizadas a 60 °C através de uma rota biomimética utilizando $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3PO_4 , e NH_4OH . O PVP foi utilizado como agente de nivelamento para regular a nucleação e o crescimento do cristal de HA. Os resultados de DRX combinados com MET de alta resolução indicaram a presença de uma fase única do pó de HA obtida em apenas uma etapa. A adição do PVP facilitou o crescimento preferencial da HA nanocristalina através do eixo 002. Foram encontrados cristais de HA com 10-20 nm de diâmetro e 250-300 nm de comprimento. Através da análise de FTIR, pôde-se concluir que o efeito do PVP no cristal de HA (formando ligações de hidrogênio em um estágio mais cedo de reação) funcionou na morfologia do cristal, mas não na fase de composição do produto. O potencial zeta aumentado na amostra 3 (5 dias) demonstrou que a interação entre o PVP e a HA ocorreu principalmente no estágio primário de reação, estando de acordo com os resultados de FTIR. Os autores relataram que o PVP foi introduzido no trabalho devido ao grupo imida (N-CdO) na sua estrutura, que existe também na estrutura molecular do colágeno, para ajudar no entendimento do processo de biomineralização (ZHANG e LU, 2008).

A seleção e avaliação de qualquer material ou dispositivo para uso em humanos requer um programa estruturado de avaliação. Para garantir que o produto final se comporte como pretendido e seja seguro, este programa deve incluir testes físico-químicos, mecânicos e biológicos e avaliações pré-clínicas dos materiais segundo as normatizações da ISO (*International Organization for Standardization*) (GRANJEIRO, 2010).

Em 2005, CRUZ *et al.*, realizaram um estudo para analisar por meio de MEV diferentes tipos de partículas dos seguintes substitutos ósseos: osso bovino orgânico e inorgânico, osso humano descalcificado, congelado e seco e de hidroxiapatita. A análise morfológica das partículas foi realizada pelo método visual com o auxílio do MEV. As partículas de osso humano e osso bovino orgânico esponjoso mostraram-se típicas de osso trabecular com maior porosidade do que as partículas de osso orgânico cortical e inorgânico. As partículas de HA não apresentaram porosidade. Os autores concluíram que as partículas dos oito substitutos ósseos foram irregulares e diferiram quanto à presença de porosidades.

CONZ *et al.*, 2005 caracterizaram seis hidroxiapatitas granulares para aplicação em área médico-odontológica como material de enxerto. A caracterização físico-química foi

realizada por meio de MEV, DRX, FTIR e análise da área superficial específica (BET). Os resultados mostraram que apenas um dos produtos teve a caracterização perfeitamente de acordo com a especificação do fabricante: tamanho de partículas entre 250-600 μ m, área de superfície de 84,5 m²/g e baixa cristalinidade. Os autores relataram que os poros aumentam a área de superfície do material, porém o aumento da temperatura de sinterização provoca uma redução da porosidade das biocerâmicas, alertando que este parâmetro deve ser criteriosamente utilizado com o objetivo de produzir mais ou menos porosidade em um determinado material. Segundo os autores, os parâmetros de cristalinidade, área superficial e composição podem ser usados para estimar a biodegradabilidade da HA e como critério de controle de qualidade desses materiais.

Em 2008, DALAPICULA e CONZ caracterizaram seis biomateriais de enxerto ósseo, sendo cinco de origem xenógena e um de origem alógena. A análise da distribuição granulométrica das amostras foi realizada pelo peneiramento em peneiras com passagem de 125 μ m até 1.000 μ m. Após a passagem nas peneiras, foi realizada a pesagem dos biomateriais dentro da faixa granulométrica, possibilitando a verificação da distribuição granulométrica das amostras. O resultado demonstrou que todas as amostras, exceto uma, eram constituídas de HA com diferentes intensidades de incorporação de carbonatos, com diferentes faixas granulométricas, área de superfície variando de 0,18 m²/g a 81,4 m²/g e cristalinidade variando de baixa a alta, demonstrando que apesar da semelhança de suas composições, os biomateriais analisados apresentaram grande diferença de parâmetros físico-químicos. De acordo com os autores, as propriedades físico-químicas são responsáveis pela integração dos biomateriais ao tecido vivo e devem ser sempre avaliadas antes de serem utilizados em pacientes, após a realização de testes em laboratórios e, preferencialmente, em animais.

Diante do exposto, é natural dentre os pesquisadores a busca não apenas por um enxerto ósseo ideal, mas também por formas alternativas de acelerar a neoformação óssea no local enxertado, melhorando também a qualidade óssea neoformada.

2.4 ALBUMINA BOVINA SÉRICA

A interação de proteínas com superfícies sólidas inorgânicas é a chave para aplicações importantes e atuais. A investigação da adsorção de proteínas em superfícies sólidas é importante para várias aplicações biológicas, tais como implantes artificiais, estratégias de

purificação de proteínas, biosensores e sistemas de liberação de fármacos (DUNNE *et al.*, 2010). De acordo com os mesmos autores, a força primária direcionada para adsorção de proteínas é a interação hidrofóbica, apesar da contribuição eletrostática e das forças de van der Waals também desempenharem seus papéis.

A hidroxiapatita apresenta alta afinidade por proteínas (TANAKA *et al.*, 2007). Quando um material é implantado, as proteínas presentes no fluido biológico adsorvem nele rapidamente, resultando em uma monocamada entre o material implantado e o fluido biológico. Acrescido a este fator, surgirão interações com diferentes tipos de células.

A tendência das moléculas de proteínas em adsorver a superfícies sólidas é determinada por vários fatores, incluindo pH, temperatura, propriedades da proteína e características da superfície do material. A estrutura morfológica, como o tamanho dos grãos, também poderia influenciar na interação do biomaterial com o meio ambiente biológico. Considerando que as proteínas agem como um contato entre a superfície do implante e aderindo células *in vivo*, a adsorção de proteínas específicas sobre os materiais implantados pode ser um fator importante para o aumento da adesão de osteoblastos nas superfícies do implante.

A albumina bovina sérica (BSA, pI=4.8; PM=69.000 Da; tamanho de 11.6 x 2.7 x 2.7nm), proteína principal do sangue, é frequentemente utilizada como uma proteína de referência durante os experimentos de adsorção (KAWASAKI *et al.*, 2003).

VILLARREAL *et al.*, 1998, avaliaram o efeito da sinterização de diferentes superfícies de fosfato de cálcio na adsorção de proteínas e de osteoblastos. Utilizando 1 mg/mL de solução de albumina, a proteína adsorveu seletivamente nas superfícies de fosfato de cálcio. No estudo *in vitro*, utilizando células osteoblásticas, não houve resposta estatística entre as células cultivadas sobre a hidroxiapatita sinterizada e a brushita sinterizada após oito dias de incubação. Entretanto, foi observada uma produção de proteína estatisticamente mais alta quando as células foram cultivadas sobre as superfícies de corpo verde de fosfato de cálcio, comparadas com as superfícies de fosfato de cálcio sinterizado, sugerindo a possível influência dos tratamentos térmicos das superfícies de fosfato de cálcio na síntese de proteínas. A baixa atividade de fosfatase alcalina e a alta produção de osteocalcina nas superfícies de fosfato de cálcio sinterizado sugeriram que as células cultivadas sobre as superfícies de fosfato de cálcio sinterizado diferenciaram-se e mineralizaram-se em uma proporção mais rápida que as células cultivadas sobre as superfícies de corpo verde de fosfato de cálcio. De acordo com os autores, esta diferença na proporção de diferenciação e mineralização pode ser atribuída à adsorção seletiva de proteína. A composição estrutural e

química das superfícies de fosfato de cálcio exerceu um papel importante na direção da expressão das características dos osteoblastos.

Nanopartículas de hidroxiapatita foram produzidas utilizando a BSA durante a síntese biomimética. Os resultados de MET apresentaram partículas de HA com tamanho de 30-40 nm e morfologia acicular e com ótimo grau de cristalinidade, como exigido para aplicações biomédicas. Através da análise de DRX, as partículas de HA sintetizadas com 0,5% de BSA revelaram a presença dos principais picos conhecidos (211), (002), (112) e (202). Os resultados de FTIR demonstraram bandas referentes aos grupos hidroxila e fosfato e bandas amplas ($3700\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$) e mais estreita (1630 cm^{-1}) de água adsorvida, presentes em apatitas biológicas. A banda em 1385 cm^{-1} confirmou a presença do grupo amida da BSA. As bandas presentes em 1092 cm^{-1} , 1046 cm^{-1} e $631\text{--}560\text{ cm}^{-1}$ confirmaram a presença dos íons fosfato (NAYAR *et al.*, 2006).

Em 2008, MAVROPOULOS *et al.*, avaliaram a capacidade de adsorção da BSA após tratamento térmico. Amostras de HA sintetizadas pelo método de precipitação em solução aquosa foram tratadas termicamente a 300, 500, 700, 900 e 1100°C e foram incubadas com a BSA em uma proporção de 80 mg BSA/g HA. Uma alíquota do sobrenadante foi analisada por espectrometria de UV. A área de superfície foi analisada pelo método BET. Os resultados demonstraram que o tratamento térmico acima de 900°C provocou um aumento de 20 a 30% no tamanho dos cristais de HA, diminuiu a área de superfície e a taxa de adsorção à BSA.

Em 2011, MAVROPOULOS *et al.*, avaliaram a capacidade de adsorção e bioatividade da BSA à superfície de HA, sintetizada pelo método de precipitação em solução aquosa em forma de pó e em discos. Tubos contendo 0.1 g de HA em triplicata foram incubados em solução de 2mg/mL de BSA e agitados durante 24 horas a 37 °C. Após este período, uma alíquota do sobrenadante foi retirada e analisada através de espectrometria de ultravioleta-visível (UV-VIS). Para analisar a dessorção de BSA, as amostras foram imersas em solução tampão de fosfato, agitadas novamente durante 24 horas e analisadas através de espectrometria de UV-VIS. O teste de bioatividade *in vitro* foi realizado através da imersão do material na solução chamada *simulated body fluid* (SBF) que é acelular, livre de proteínas e apresenta pH 7,4. O aumento na concentração de fosfato causou uma diminuição da adsorção da BSA à superfície de HA, sendo atribuído à afinidade dos grupos de fosfato aos sítios de cálcio da HA. Não houve dessorção da BSA nas amostras de HA. A bioatividade na superfície de HA coberta com BSA foi menor do que na superfície de HA sem a adsorção de

BSA. As bandas de carbonato verificadas pela análise de FTIR (872 cm^{-1} , 1419 cm^{-1} , 1445 cm^{-1} e 1478 cm^{-1} confirmaram que a camada de BSA sobre a superfície de HA foi capaz de induzir o recobrimento de apatita carbonatada na superfície do disco de HA. A FIG. 2.11, cedida pela autora, representa a estrutura da BSA.

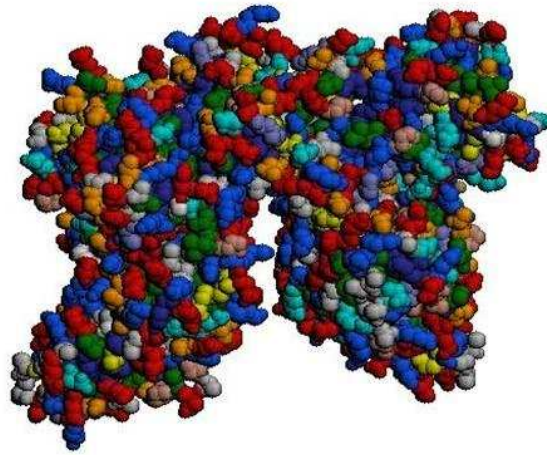


FIG. 2.11 Estrutura da BSA (cedida por MAVROPOULOS, 2009).

Desta forma, mostra-se oportuno avaliar a adsorção da albumina bovina à hidroxiapatita sintética nanométrica.

2.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA

Difração de raios X

Trata-se de uma das principais técnicas de caracterização de materiais, muito utilizada na área de biomateriais, identificando fases cristalinas. É um fenômeno de interação entre a radiação eletromagnética e a matéria ordenada. Os raios X são produzidos a partir do bombardeio do anodo por elétrons do catodo, acelerados por alta voltagem.

Para se obter a difração é necessário que o comprimento de onda da radiação incidente seja da mesma ordem de grandeza do espaçamento interatômico do material analisado, da ordem de angstroms, com condições geométricas que satisfaçam a Lei de Bragg (FORMOSO, 1984).

O feixe difratado pode ser percebido por detectores e os difratogramas são obtidos e comparados com os sistemas cristalinos catalogados no *International Center for Diffraction Data* (ICDD), antigo *Joint Committee of Powder Diffraction Standards* (JCPDS) da

American Society for Testing and Materials (ASTM). Tratamentos matemáticos possibilitam a identificação precisa dessas fases, do grau de cristalinidade do material e do tamanho médio dos cristais (LENNINGER, 1998). Analisando os picos, pode-se identificar pelo seu alargamento a diminuição de cristalinidade. Porém, o caráter nanométrico das partículas também demonstra alargamento dos picos (FONSECA, 2007).

Refinamento pelo método de Rietveld

O método de Rietveld é uma técnica de refinamento da estrutura cristalina em que a diferença entre o difratograma calculado com base nesta estrutura cristalina e o difratograma observado é mínima possível, ou seja, a convergência seja alcançada. O objetivo é a quantificação das fases cristalinas.

O modelo estrutural adotado por Rietveld inclui vários tipos de parâmetros. Os parâmetros da estrutura cristalina são: coordenadas (x,y,z) da posição dos átomos na célula unitária; deslocamentos vibratórios dos átomos; densidade ocupacional das posições atômicas; dimensões (a,b,c) da célula unitária e ângulos (α,β,γ) entre os vetores. Os parâmetros do perfil das reflexões são: largura das reflexões, assimetria e forma. Os parâmetros globais são: a função de fundo que engloba o comprimento de onda (α_1, α_2) e o zero da escala 2θ . Os parâmetros da intensidade incluem o fator de escala, que ajusta a altura de todas as reflexões do difratograma observado, e o parâmetro de correção da orientação preferencial dos cristalitos da amostra (SENA, 2004).

A análise de Rietveld é realizada através do ajuste dos dados de difração por um modelo matemático fenomenológico, que utiliza o método dos mínimos quadrados visando a minimização do resíduo R_Y , dado por:

$R_{Y(x)} = \sum w_i (y_i - y_{ci})^2$, onde y_i e y_{ci} são respectivamente as intensidades observadas e calculadas na escala 2, w_i é um fator de peso da distribuição e x é o vetor dimensional cujas coordenadas são os parâmetros a serem refinados (YOUNG, 1995).

A adoção de um modelo adequado e a qualidade do difratograma são requisitos essenciais para obtenção de um ajuste perfeito no refinamento. Por exemplo, largura das reflexões individuais do difratograma é fortemente influenciada pelas características do equipamento, que introduz um componente instrumental, cuja determinação é necessária quando se pretende calcular tamanho e as tensões dos cristalitos (SENA, 2004).

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise pelo FTIR pode revelar os grupos funcionais e modos vibracionais na molécula, tipos de substituição possíveis de ocorrer e a cristalinidade. É uma ferramenta valiosa para complementar as informações obtidas nos ensaios de difração de raios X.

A radiação de infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. O fato de cada grupo funcional absorver uma dada frequência característica permite que por meio de um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, o espectro de IV, seja possível caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido (CIENFUERGOS e VAITSMAN, 2000).

Acessórios como o ATR (*Attenuated Total Reflectance*) permitem uma maior energia superficial no sistema, com isso a resposta do detector do espectrômetro IV-TF é maior, resultando em uma maior sensibilidade (CIENFUERGOS e VAITSMAN, 2000). A aquisição de dados pelo método de refletância difusa permite analisar a superfície do material de forma não destrutiva, podendo-se detectar teores na ordem de uma parte por milhão dos compostos presentes (HENCH e ETHRIDGE, 1982).

A espectroscopia no infravermelho permite identificar algumas substituições ou alterações importantes na composição da HA, particularmente nos grupos fosfatos e hidroxila. Essas informações são obtidas pela excitação dos modos de energia vibracionais destes grupos moleculares dentro da estrutura dos sólidos. Pode-se diferenciar a substituição dos grupos OH⁻ e (PO₄³⁻) pelos grupos (CO₃²⁻) por meio da presença de bandas em 873, 1465, 1534cm⁻¹ e 874, 1420, 1455cm⁻¹, respectivamente (ELLIOT, 1994)

Adsorção gasosa pela teoria de Brunauer-Emmett-Teller (BET)

A área específica (área por unidade de massa) constitui o somatório das áreas específicas externas e internas dos grãos de hidroxiapatita. A área específica está intimamente relacionada com outra grandeza, o volume poroso (volume de vazios por unidade de massa).

A quantidade de moléculas adsorvidas, formando uma monocamada na superfície de um sólido, pode ser utilizada para calcular a sua área específica. Normalizada em relação à massa, esta quantidade é chamada de capacidade da monocamada, sendo definida como a quantidade de adsorbato que pode estar contida numa monocamada totalmente preenchida

na superfície de 1g de sólido.

A análise de Brunauer-Emmett-Teller (BET) corresponde à extensão da isoterma de Langmuir para a adsorção de multicamadas. Quando a equação BET é verificada, um gráfico de $P/V(P_0 - P)$ vs. P/P_0 deverá representar uma reta. A partir dos coeficientes linear e angular dessa reta, é possível calcular C e V_m .

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{(C - 1) P}{V_m C P_0}$$

V – volume do gás adsorvido à pressão P, onde $P < P_0$;

V_m – volume de gás adsorvido na monocamada (expresso nas mesmas unidades de V);

P_0 – pressão de saturação do adsorbato gasoso, à temperatura a que é efetuado o ensaio;

C – constante relacionada exponencialmente com os calores de adsorção e de liquefação do gás;

$$C = e^{(q_a - q_L)/RT}$$

q_a – calor de adsorção na primeira camada;

q_L – calor de liquefação do adsorbato em todas as outras camadas.

Qualquer vapor condensável e inerte pode ser utilizado no método BET. No entanto, as medições são mais precisas com moléculas menores e esféricas (CAPT 5., 2010).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O princípio de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura envolve a interação entre elétrons e matéria, que resulta em um sinal que é captado por um sensor. Um feixe de elétrons gerado em um canhão é colimado por um conjunto de lentes eletromagnéticas que agem como condensadores. Dentro da coluna de alto vácuo, os elétrons gerados a partir de um filamento de tungstênio, por aplicação de corrente, são acelerados por uma diferença de potencial entre catodo e anodo entre 0,3 keV a 30 keV. O feixe gerado passa por lentes condensadoras que reduzem o seu diâmetro e por uma lente objetiva que o focaliza sobre a amostra. Logo acima da lente objetiva existem dois estágios

de bobinas eletromagnéticas responsáveis pela varredura do feixe sobre a amostra (MANNHEIMER, 2002).

Como consequência, uma série de sinais é emitida, dos quais se destaca inicialmente elétrons secundários. Estes elétrons são captados por um detector cuja resposta modula o brilho de um tubo de raios catódicos, e que é varrido em sincronismo com o feixe eletrônico (ORÉFICE *et al.*, 2006). Portanto, a cada ponto da amostra corresponde um ponto da tela, e nele é mapeada a resposta do objeto ao feixe de excitação. O aumento é obtido pela relação entre a área varrida sobre a amostra, e a área da tela do tubo (ALBUQUERQUE, 2004).

Com a microscopia eletrônica de varredura obtemos imagens de superfícies polidas ou rugosas, com grande profundidade de campo e alta resolução, possui fácil interpretação das imagens, com aparência tridimensional, aquisição de sinal digital, possibilitando processamento dos sinais e manipulação e processamento das imagens (FONSECA, 2007).

A fonte de emissão por efeito de campo (FEG – *Field Emission Gun*) tem como princípio básico de funcionamento a criação de campos elétricos intensos em formas pontiagudas. Permite a ampliação da superfície em dezenas de milhares de vezes com uma pequena voltagem de aceleração de elétrons, reduzindo efeitos de acúmulo de cargas na superfície de materiais isolantes e a profundidade de penetração do feixe em algumas dezenas de nanômetros (SENA, 2004).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica altamente eficaz para a observação direta de estruturas, formando imagens em níveis atômicos. A emissão de elétrons pelo catodo permite a formação da imagem do objeto na objetiva quando defletidos por lentes eletromagnéticas, e, de maneira semelhante ao que ocorre no microscópio óptico, a condensadora focaliza o feixe no plano do objeto. Pelo fato dos elétrons serem facilmente desviados pelo objeto, é necessário utilizar amostras muito finas.

A preparação da amostra é a maior limitação do MET, pois esta deve ser suficientemente fina para que a intensidade de feixe que a atravessa consiga gerar uma imagem interpretável. Além disso, o processo utilizado na preparação da amostra pode afetar sua estrutura e composição.

Enquanto no microscópio óptico a luz é absorvida pelas estruturas coradas, no eletrônico os elétrons são desviados por porções do objeto que contenham átomos de elevado peso

atômico. Como resultado, as estruturas que desviam os elétrons, chamadas de elétrondensas, aparecem escuras na tela fluorescente. A capacidade de desviar os elétrons depende do número atômico, por isso, no caso de materiais biológicos, se costuma impregnar os cortes com metais pesados a fim de aumentar o contraste, resultando assim uma imagem nítida e bem visível. Os íons metálicos mais usados para essa “coloração eletrônica” são ósmio, chumbo e urânio (SENA, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Pós de hidroxiapatita foram sintetizados com diferentes tempos de envelhecimento dos precipitados pelo método de rotina no Laboratório de Cerâmica do Instituto Militar de Engenharia - IME. Os reagentes empregados foram adquiridos pela Merck (Darmstadt, Alemanha) e pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil).

As etapas de filtração, liofilização e sinterização foram realizadas no Laboratório de Biomateriais do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF.

3.1 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA

Nesta dissertação, a HA foi obtida pelo método de precipitação em solução aquosa com os reagentes da TAB. 3.1.

TAB. 3.1 Reagentes para obtenção da hidroxiapatita estequiométrica.

Reagente	Pureza	P.M.	Fornecedor	Quantidade	Volume
Hidróxido de cálcio Ca(OH) ₂	96%	74,10 g/mol	Merck	9,65 g	250 ml
Ácido láctico C ₃ H ₆ O ₃	85%	90,08 g/mol	Vetec	22 ml	250 ml
Ácido fosfórico (orto) H ₃ PO ₄	85%	98 g/mol	Merck	5 ml	250 ml
Hidróxido de potássio KOH	85%	56,11 g/mol	Merck	11,22 g	170 ml

A solução utilizada para obtenção dos pós teve a seguinte composição: 0,5 M de hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂], 0,3 M de ácido fosfórico [H₃PO₄] e 1 M de ácido láctico [C₃H₆O₃]. As soluções foram agitadas separadamente por 60 minutos em um agitador magnético macro sem aquecimento (Quimis, São Paulo, Brasil). Em um béquer contendo solução de 0,5 M Ca(OH)₂ sob agitação constante, foi adicionada a solução 1M de C₃H₆O₃, e mantida por 30 minutos sob agitação. Em seguida, a solução de 0,3 M de H₃PO₄ foi adicionada lentamente a mistura anterior. Após esta adição, a solução foi mantida em

agitação por 24 horas em temperatura ambiente. A suspensão obtida, denominada transparente, mostrou pH 3,5.

Para atingir o pH 12, necessário para a precipitação da HA, adicionou-se KOH à solução transparente. Nesta condição houve o envelhecimento dos precipitados na capela com exaustão em diferentes tempos para as três sínteses preparadas (24 horas (padrão), 40 horas e 88 horas). Após a formação dos precipitados, foi realizada filtração através de uma bomba à vácuo de teflon (Edwards, Neuberger, Alemanha) e a solução foi ressuspensa em água Milli-Q[®] (Millipore Corporate, MA, EUA) por três vezes até a obtenção do pH 7 desejado. O sólido obtido foi seco em um liofilizador (Freezone 1 – Labconco, USA) por 24 horas (FIG. 3.1) e desagregado através de um almofariz de ágata e peneiras de 63 μm e 37 μm (Granutest – Telastem Peneiras para Análises, São Paulo, Brasil). Parte do sólido sofreu tratamento térmico através de um forno mufla (Quimis, São Paulo, Brasil) por 8 horas até atingir 1.100°C para a obtenção de HA altamente cristalina.



FIG. 3.1 Amostras de HA durante o processo de liofilização.

Uma nova síntese com os mesmos reagentes, realizada através da mesma rota e com tempo padrão de 24 horas de envelhecimento dos precipitados, foi obtida, sendo adicionado o polímero polivinilpirrolidona (PVP) a 3%, após a adição da solução de KOH, com o intuito de dispersar os aglomerados. Durante a filtração através da bomba à vácuo de teflon,

a solução foi ressuspensa em água Milli-Q[®] por três vezes e lavada com etanol por duas vezes. O pH 7 desejado foi atingido e o sólido obtido foi seco no liofilizador por 24 horas, desagregado e parte deste também sofreu tratamento térmico na mesma condição das síntese anteriores. A TAB. 3.2 apresenta o nome dado às diferentes sínteses com as condições específicas de cada uma.

TAB. 3.2 Nomenclatura e condições das sínteses utilizadas no estudo.

SÍNTESE	CONDIÇÕES
HA 88 VERDE	88 horas de envelhecimento do precipitado
HA 40 VERDE	40 horas de envelhecimento do precipitado
HA 24 VERDE	24 horas de envelhecimento do precipitado
HA PVP 24 VERDE	24 horas de envelhecimento do precipitado adição de PVP a 3%
HA 88 CTT	88 horas de envelhecimento do precipitado com tratamento térmico a 1100°C
HA 40 CTT	40 horas de envelhecimento do precipitado com tratamento térmico a 1100°C
HA 24 CTT	24 horas de envelhecimento do precipitado com tratamento térmico a 1100°C
HA PVP 24 CTT	24 horas de envelhecimento do precipitado adição de PVP a 3% com tratamento térmico a 1100°C

3.2 SORÇÃO DE ALBUMINA BOVINA

Com o objetivo de estimar a quantidade de albumina bovina (BSA) adsorvida sobre as amostras de HA na forma verde e com tratamento térmico (CTT) a 1100°C, foi realizada imersão das amostras de HA em solução de BSA (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 1 mg/ml.

O experimento foi realizado em triplicata. Numeraram-se 32 tubos tipo corning 50 mL e pesou-se exatamente 0,200 g de cada amostra. Preparou-se uma solução de BSA de concentração 1 mg/mL. Adicionaram-se aos tubos 15 ml de solução de BSA e, como

controle, utilizou-se água Milli-Q[®], de acordo com a TAB. 3.3. Os tubos foram deixados sob agitação constante por 24 horas em um agitador horizontal (CT-150 Kline) a uma temperatura de 37°C com velocidade de 60 rpm (FIG. 3.2). Após esse tempo, retiraram-se os tubos do agitador para centrifugação durante 3 minutos em uma centrífuga (CT-6000R Cientec) com velocidade de 5000 rpm com o objetivo de separar a HA da BSA.

TAB. 3.3 Descrição dos tubos contendo amostras de HA verde e com tratamento térmico (CTT) imersas em solução de BSA e água Milli-Q[®].

Tubo	Descrição
1	HA 88 verde + 15 ml Água Milli-Q [®]
2	HA 88 verde + 15 ml Solução BSA
3	HA 88 verde + 15 ml Solução BSA
4	HA 88 verde + 15 ml Solução BSA
5	HA 40 verde + 15 ml Água Milli-Q [®]
6	HA 40 verde + 15 ml Solução BSA
7	HA 40 verde + 15 ml Solução BSA
8	HA 40 verde + 15 ml Solução BSA
9	HA 24 verde + 15 ml Água Milli-Q [®]
10	HA 24 verde + 15 ml Solução BSA
11	HA 24 verde + 15 ml Solução BSA
12	HA 24 verde + 15 ml Solução BSA
13	HA PVP 24 verde + 15 ml Água Milli-Q [®]
14	HA PVP 24 verde + 15 ml Solução BSA
15	HA PVP 24 verde + 15 ml Solução BSA
16	HA PVP 24 verde + 15 ml Solução BSA
17	HA 88 CTT + 15 ml Água Milli-Q [®]
18	HA 88 CTT + 15 ml Solução BSA
19	HA 88 CTT + 15 ml Solução BSA
20	HA 88 CTT + 15 ml Solução BSA
21	HA 40 CTT + 15 ml Água Milli-Q [®]
22	HA 40 CTT + 15 ml Solução BSA
23	HA 40 CTT + 15 ml Solução BSA

24	HA 40 CTT + 15 ml Solução BSA
25	HA 24 CTT + 15 ml Água Milli-Q®
26	HA 24 CTT + 15 ml Solução BSA
27	HA 24 CTT + 15 ml Solução BSA
28	HA 24 CTT + 15 ml Solução BSA
29	HA PVP 24 CTT + 15 ml Água Milli-Q®
30	HA PVP 24 CTT + 15 ml Solução BSA
31	HA PVP 24 CTT + 15 ml Solução BSA
32	HA PVP 24 CTT + 15 ml Solução BSA



FIG. 3.2 Tubos contendo soluções de HA imersas em BSA e controles contendo Milli-Q® sob agitação.

Foi retirada uma alíquota de 10 ml do sobrenadante e reservada. O teor sorvido foi quantificado por diferença através de espectrofotometria de UV-VIS (UV-2450 Shimadzu). Após a sorção, o pó foi lavado com água Milli-Q® (15 ml) e submetido à agitação por mais 1 hora. Após esse período, o material foi centrifugado novamente durante 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pó foi colocado em estufa a 37°C (TE-420 Tecnal) para secagem e posterior caracterização.

3.3 DESSORÇÃO DE ALBUMINA BOVINA

Com o objetivo de analisar a fração de BSA fracamente adsorvida na HA, foi realizado o ensaio de dessorção, que seguiu as mesmas condições do experimento de sorção, porém as amostras sintetizadas de HA sorvidas com BSA ficaram sob agitação em tubos com água Milli-Q[®]. Após 24 horas de agitação, o material foi centrifugado, uma alíquota de 15 ml do sobrenadante foi retirada e reservada para posterior quantificação. Após este ensaio, o pó foi colocado em estufa com temperatura de 37°C para secagem e posterior caracterização através de análise de FTIR.

4 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL OBTIDO

4.1 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

As análises de difração de raios X das amostras verdes e CTT de HA foram realizadas no CBPF em um difratômetro X'Pert Pro Panalytical utilizando tensão de 40 kV e corrente de 40 mA, com uma varredura de 10 a 60° 2 θ , com passo 0,02° 2 θ e um tempo de coleta de 50 segundos por passo. A identificação das fases presentes foi feita através do programa X'Pert HighScore. As fichas JCPDS utilizadas foram a 09-0432 (HA) e a 09-0691 (β -TCP), 700681 (Fosfato tricálcio beta *Whitlockite* - β -TCPW) e 09-0348 (α -TCP).

4.2 ANÁLISE DE REFINAMENTO PELO MÉTODO DE RIETVELD

As análises quantitativas das amostras CTT de HA foram realizadas pelo Método de Rietveld no CBPF através do programa TOPAS, versão acadêmica, que utiliza nos cálculos a metodologia de parâmetros fundamentais (PF). Nestes cálculos, os parâmetros de ajuste foram: o parâmetro de rede, o tamanho de cristalito e a escala, sendo que este último determina a concentração das fases presentes. Foram utilizadas as fendas fixa e automática e a medição do tamanho dos cristalitos foi feita através do método Debye-Sherrer. As fichas ICSD (*International Crystal Structure Database*) utilizadas foram a 26204 (HA), 200202 (β -TCP), 92300 (α -TCP), 67432 (β -TCPW).

4.3 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para identificar a presença de grupos funcionais, modos vibracionais da molécula, tipos de substituições possíveis de ocorrer e cristalinidade, utilizou-se o equipamento de infravermelho (IR) (FT-IR Prestige – 21/ Shimadzu), no CBPF, nas amostras de HA verdes e com tratamento térmico, antes e após a sorção da BSA. Usaram-se pastilhas transparentes de KBr preparadas em um mistura de proporção 1:10 (amostra/ KBr), seguida de uma pressão uniaxial do pó sob vácuo. Todos os espectros foram obtidos entre 4000 e 400 cm⁻¹ e na resolução de 4 cm⁻¹.

As frequências de vibração ativa em infravermelho da HA utilizadas foram indicadas de acordo com os resultados de REHMAN *et al.*, 1995; KOUTSOPOULOS, 2002; SLÓSARCZYK *et al.*, 2005. As frequências de vibração ativa em infravermelho do PVP foram de acordo com BAIA *et al.*, 2008 e MENDES *et al.*, 2010 e da BSA foram indicadas baseadas nos resultados encontrados em KAIDEN *et al.*, 1987.

4.4 ANÁLISE DE ADSORÇÃO GASOSA PELA TEORIA DE BRUNAUER-EMMETT-TELLER (BET)

A área de superfície do sólido foi medida por meio de adsorção gasosa, baseando-se na teoria de BET, em que C é uma constante, P_o é a pressão de saturação do gás, V_a é o volume de gás adsorvido à pressão P , e V_m é o volume de gás adsorvido para completar a monocamada:

$$\frac{P}{V_a(P_o - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C - 1}{V_m C} \left(\frac{P}{P_o} \right)$$

Um gráfico de $P/V_a(P_o - P)$ X P/P_o apresentou aspecto linear, com intercepto igual a $1/V_m C$ e coeficiente angular igual a $(C - 1)/V_m C$. Então, os valores de V_m e de C puderam ser determinados por regressão linear. Conhecendo o volume da monocamada (V_m), foi possível determinar a área de superfície específica da amostra, multiplicando a área ocupada por uma molécula do gás pelo total de moléculas que formam a monocamada.

Foram analisadas todas as amostras com tratamento térmico através do equipamento ASAP2000 (Micromeritics) no IPEN. A secagem dos pós foi feita a 300° C durante seis horas, obtendo-se os resultados após este período.

4.5 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia superficial das amostras verdes e CTT de HA foi investigada pela análise de microscopia eletrônica de varredura (Jeol JSM – 5800 LV) no IME. Para possibilitar a análise microestrutural, as amostras foram recobertas com ouro, depositado por um metalizador (Balzers Union) sob corrente de 35 mA por 180 segundos.

4.6 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO (MEV-FEG)

A morfologia superficial das amostras verdes e CTT de HA também foi investigada pela análise de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (e-Line – Raith) no CBPF.

A solução contendo pó de hidroxiapatita diluída em álcool isopropílico foi agitada no ultrassom por cinco minutos, depositada em cima de um *wafer* de silício tipo P (100) que foi colocado no porta-amostra do aparelho. Foram utilizados dois detectores de elétrons secundários: In lens e SE2.

4.7 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A morfologia superficial das amostras tratadas termicamente foi investigada pela análise de microscopia eletrônica de transmissão (G^2 – TECNAI) no CEPTEL, operando a 200 kV, para complementar as informações obtidas no MEV.

A solução contendo pó de hidroxiapatita diluída em álcool isopropílico foi depositada em grades de cobre de 200 mesh contendo filme carbono (CF200 Cu – Electron Microscopy Sciences).

A medição do tamanho de partículas foi realizada através dos programas *Image J* e *Photoshop*, em que cada partícula foi isolada através do recurso *Binary Watershed lines* e modificada com o recurso *Drawing of Binary Watershed*.

4.8 ANÁLISE DE SORÇÃO DE ALBUMINA BOVINA

Primeiramente, foi realizada a curva padrão de BSA, baseada nas leis de Lambert-Beer que são o fundamento da espectrofotometria. Elas são tratadas simultaneamente, processo no qual a quantidade de luz absorvida ou transmitida por uma determinada solução depende da concentração do soluto e da espessura da solução.

O teor sorvido de BSA foi quantificado por um espectrofotômetro de UV-VIS (UV-2450 – Shimadzu) no CBPF. Uma alíquota de 15 ml do sobrenadante da solução de BSA imersa nas amostras verdes e CTT de HA e outra alíquota com a mesma quantidade da solução de

água Milli-Q[®] imersa nas amostras de HA foram retiradas após a centrifugação para a quantificação da sorção.

4.9 ANÁLISE DE DESSORÇÃO DE ALBUMINA BOVINA

O teor de dessorção de BSA foi quantificado por um espectrofotômetro de UV-VIS (UV-2450 – Shimadzu) no CBPF que seguiu as mesmas condições da análise de sorção. Uma alíquota de 15 ml do sobrenadante da solução de água Milli-Q[®] imersa nas amostras de HA que foram sorvidas com BSA foi retirada após a centrifugação para a quantificação da dessorção.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Foram obtidos difratogramas das amostras verdes (sem tratamento térmico) e sinterizadas (com tratamento térmico a 1100°C) das sínteses de HA com diferentes tempos de envelhecimento do precipitado e da síntese de HA com adição de PVP a 3% para identificação das fases formadas presentes, bem como da fração de fases.

A análise em difração de raios X das amostras verdes apresentou picos largos, com padrão característico de uma hidroxiapatita pouco cristalina e/ou nanométrica semelhante ao padrão da fase mineral do osso humano (SANOSH *et al.*, 2008). Os padrões de difração de raios X para os diferentes tempos de envelhecimento do precipitado não apresentaram diferença específica e indicaram a presença de HA, de acordo com a ficha n° 09-0432 do JCPDS, destacando os principais planos cristalinos (FIG. 5.1).

A identificação de uma hidroxiapatita pouco cristalina pode ser atribuída à temperatura ambiente na qual a precipitação se processou, estando de acordo com os estudos de RIGO *et al.*, 2007. As análises por difração de raios X das amostras tratadas termicamente apresentaram um aumento de cristalinidade (FIG. 5.2), quando comparadas às amostras não tratadas termicamente (FIG. 5.1).

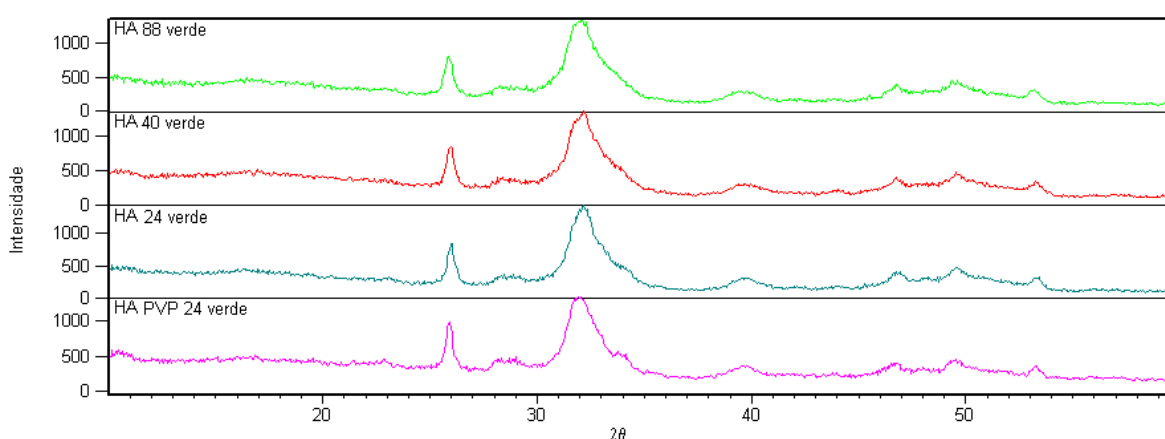


FIG. 5.1 Comparação dos difratogramas das amostras verdes de HA das sínteses preparadas no estudo.

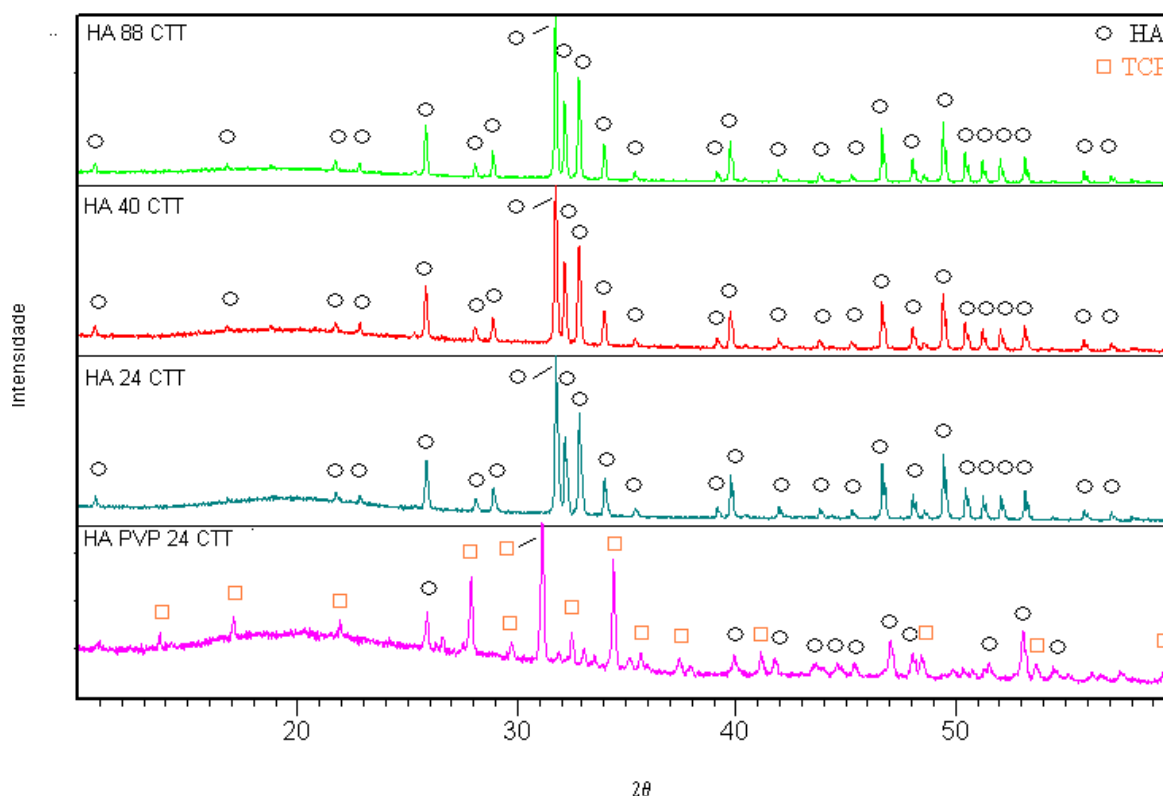


FIG. 5.2 Comparação dos difratogramas das amostras CTT de HA das sínteses preparadas no estudo.

Os padrões de difração de raios X para os diferentes tempos de envelhecimento do precipitado, sem a presença do PVP, não apresentaram diferença significativa e indicaram presença de hidroxiapatita como única fase nas amostras HA 88 CTT, HA 40 CTT e HA 24 CTT analisadas, de acordo com a ficha JCPDS n° 09-0432 da HA.

Observou-se na amostra HA PVP 24 CTT a presença de hidroxiapatita e a decomposição em fosfato tricálcio beta (β -TCP), composto de estrutura romboédrica de fórmula β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, fosfato tricálcio alfa (α -TCP), composto de estrutura ortorrômbica de fórmula α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e fosfato tricálcio beta *Whitlockite* (β -TCPW), composto de estrutura trigonal de fórmula $\text{Ca}_9 \text{Mg}_{0,7} \text{Fe}_{0,5} (\text{PO}_4)_6 (\text{PO}_3\text{OH})$, de acordo com as fichas 09-0432 (HA), 09-0691 (β -TCP), 09-0348 (α -TCP) e 700681 (β -TCPW), segundo JCPDS (FIG. 5.3).

Os resultados da amostra HA PVP 24 CTT mostraram estar de acordo com aqueles obtidos por FRANCO *et al.*, 2010, que encontraram a fase β -TCP nas amostras de HA na presença de PVP. Entretanto, outros estudos (DU *et al.*, 2009, QIU *et al.*, 2008 e ZHANG e LU, 2008) encontraram uma fase única de HA na presença de PVP. A presença das fases β -TCP, α -TCP e β -TCPW na amostra HA PVP 24 CTT pode ser atribuída à alteração de pH

observada após adição de PVP. A solução, antes com pH em torno de 3,5, alcançou pH em torno de 5. Nessa faixa de pH, a brushita é a fase mais estável, à temperatura ambiente. Ainda que KHAN e GUL (2006) tenham demonstrado a influência da unidade catiônica do PVP na síntese da HA, SOUZA (2010) demonstrou que diferentes fosfatos de cálcio podem ser estabilizadas ou desestabilizadas pela presença de cátions e ânions, sendo ou não incorporados de forma significativa à estrutura cristalina. De fato, os resultados de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) indicaram a presença de uma banda em 2308 cm^{-1} na amostra HA PVP 24 CTT. O valor de referência da monetita (DCPA) é 2300 cm^{-1} e da brushita (DCPD), é 2365 cm^{-1} . Como a monetita ocorre em temperaturas da ordem de 80°C , é mais provável que a banda observada seja característica da brushita.

As pesquisas de RIMAN *et al*, 2002 e KWEH *et al*, 1999 afirmam que o método de precipitação produz HA não estequiométrica e de baixa estabilidade térmica, que resulta na decomposição parcial da HA em α - e β -TCP após tratamento térmico. A presença da fase α -TCP também foi encontrada nos estudos de FONSECA, 2007, que preparou HA através do mesmo método de precipitação em solução aquosa utilizado neste estudo, e foi atribuída ao caráter nanométrico das partículas dos pós, que aumenta sua reatividade.

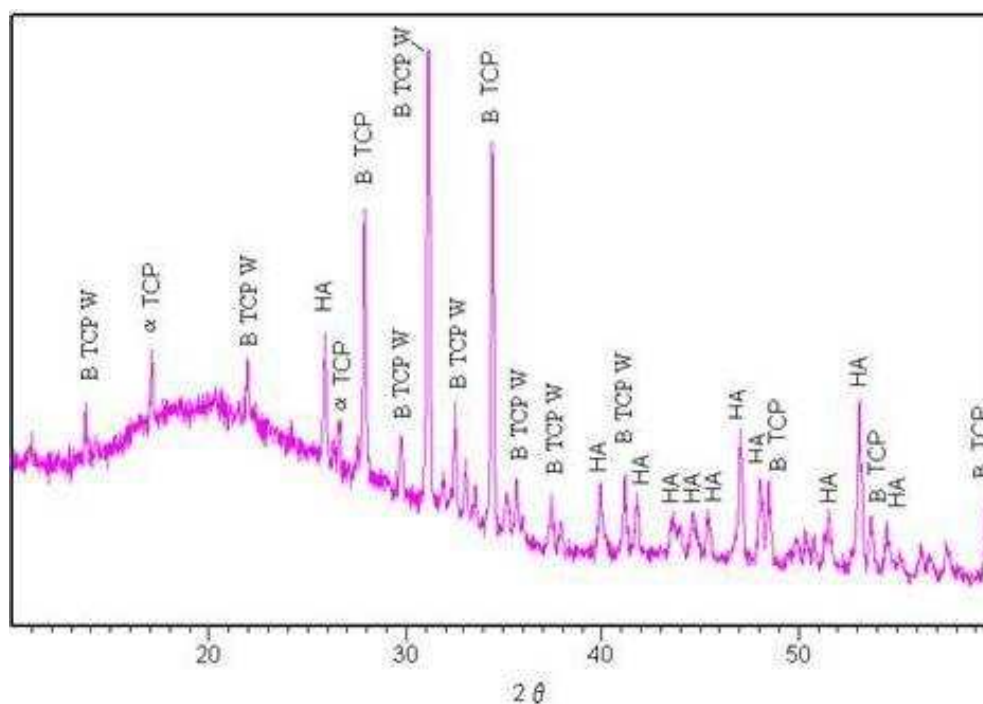


FIG. 5.3 Difratoograma da amostra HA PVP CTT.

5.2 REFINAMENTO PELO MÉTODO DE RIETVELD

Para a análise quantitativa, foi realizado o refinamento pelo método de Rietveld dos dados de difração de raios X, onde foi revelada a percentagem das fases presentes. A curva azul indica o resultado experimental e a vermelha o resultado calculado. Pode-se observar o encaixe entre sinal e ruído em relação ao resultado experimental, que foi obtido pela qualidade de ajuste, “*goodness of fitting*”, oferecida pelo cálculo de Rietveld. A curva cinza indica a diferença entre o resultado experimental e o calculado.

O resultado de quantificação de fases revelou que as amostras HA 88 CTT, HA 40 CTT e HA 24 CTT (FIG. 5.4 – FIG. 5.6) são constituídas por 100% de HA (concentração em peso). A análise quantitativa da amostra HA PVP 24 CTT mostrou a presença majoritária de β -TCPW (70,36%), seguida das fases β -TCP (12,67%), HA (9,96%) e α -TCP (7,01%). A fase β -TCPW é uma fase β -TCP com estrutura mais complexa, empacotamento mais denso e com velocidade de degradação menor do que as fases β -TCP e α -TCP, respectivamente, e maior do que a fase HA. Este resultado mostrou-se relevante, já que uma fase intermediária de velocidade de degradação é desejada nos materiais cerâmicos utilizados para enxertia óssea. Adicionalmente, o PVP não só atuou como dispersante, mas também induziu a decomposição da hidroxiapatita em fosfato tricálcio. Estudos futuros com ensaios biológicos *in vitro* de citotoxicidade e biocompatibilidade devem ser realizados. A partir destes resultados, estudos pré-clínicos devem ser conduzidos para que análises histológicas e histomorfométricas possam comprovar a qualidade e quantidade de formação óssea desejadas a partir da reabsorção/degradação do material obtido.

Através do refinamento de Rietveld dos difratogramas, foi determinado o tamanho médio dos cristalitos, sendo encontrados os resultados de 291,46 nm, 195,53 nm e 192 nm para as amostras HA 88 CTT, HA 40 CTT e HA 24 CTT, respectivamente. Este comportamento é esperado, já que o envelhecimento é um processo termicamente ativado e então dependente de temperatura e tempo. Aumentando o tempo, aumentou-se o tamanho médio dos cristalitos. Para a amostra HA PVP 24 CTT, foram encontrados os resultados de 129,25 nm para a fase β -TCPW, 113,93 nm para a fase β -TCP, 39,36 nm para a fase HA e 45,27 nm para a fase α -TCP. Foi medido o tamanho de maior dimensão, considerando a visão tridimensional dos cristalitos.

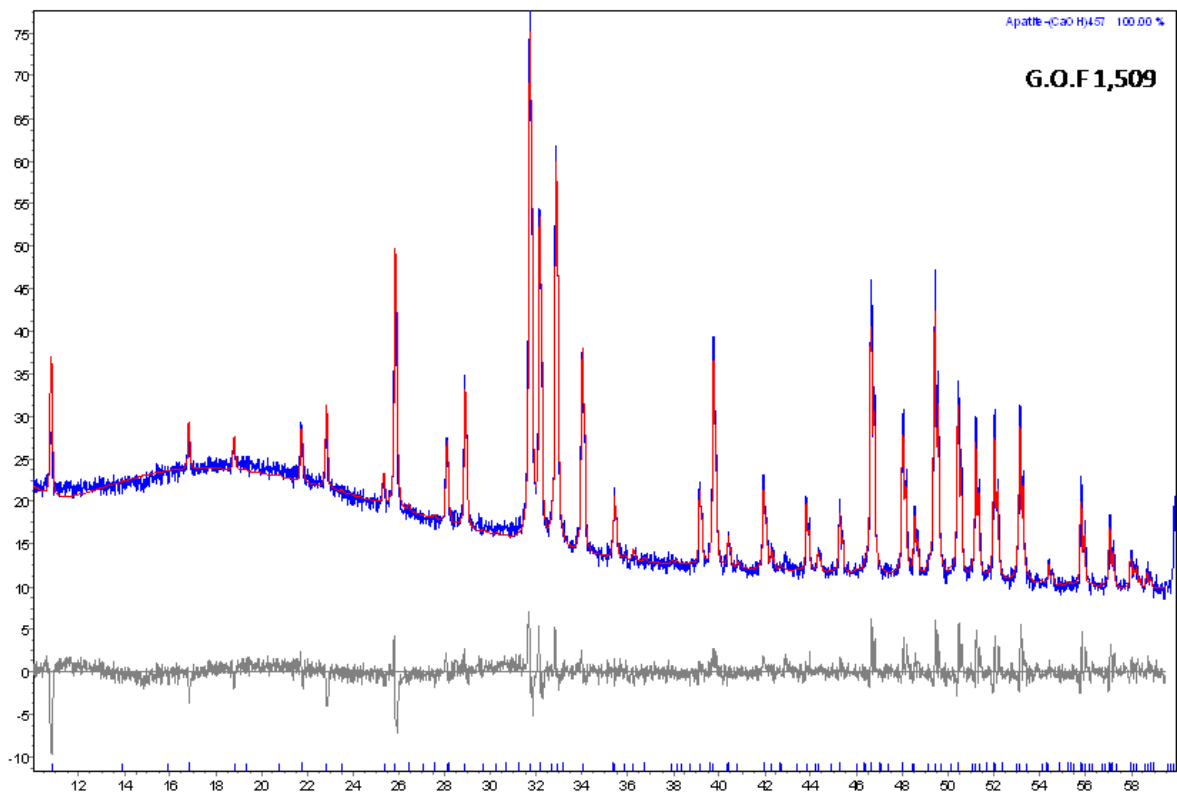


FIG. 5.4 Gráfico de Rietveld da amostra HA 88 CTT.

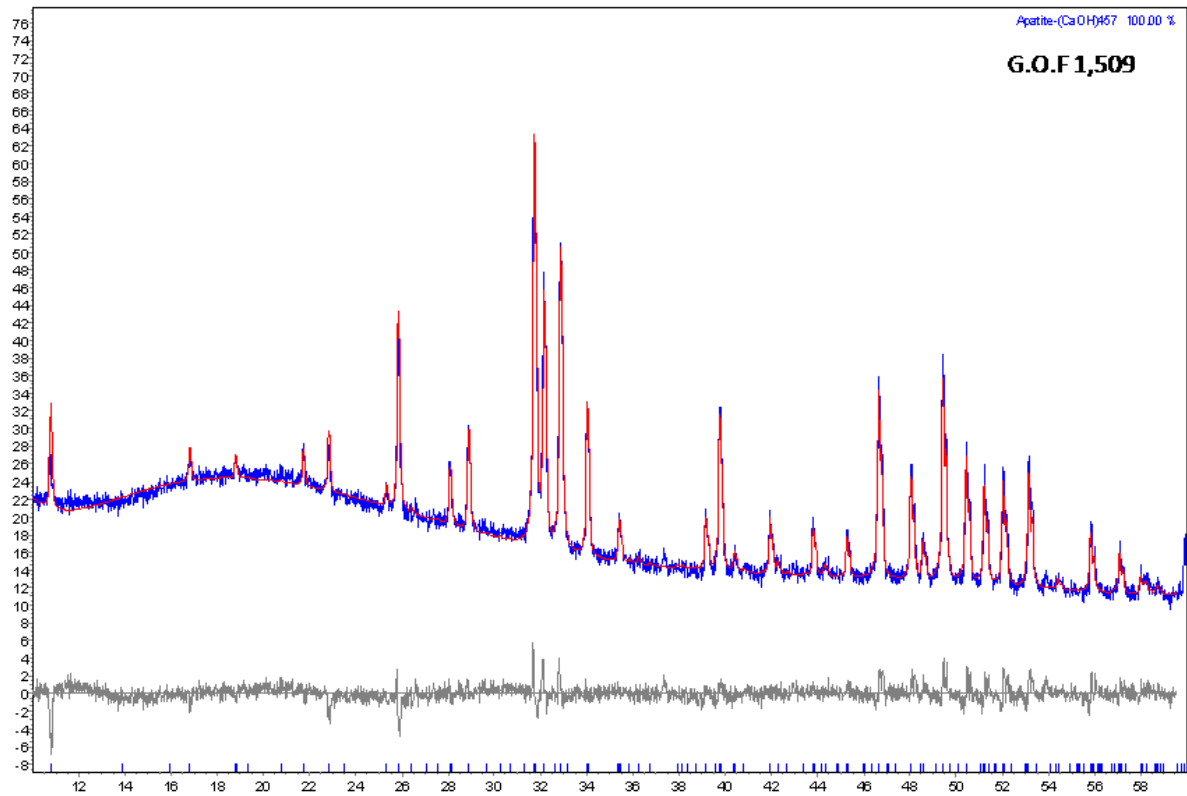


FIG. 5.5 Gráfico de Rietveld da amostra HA 40 CTT.

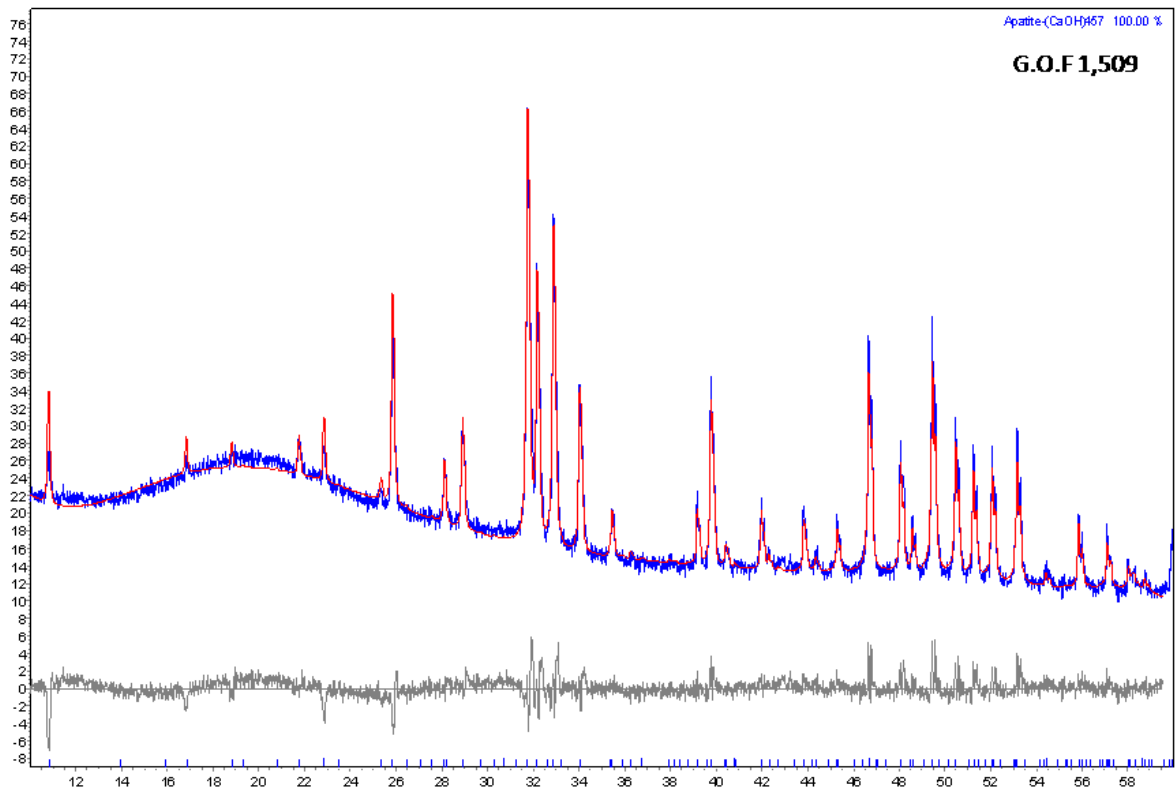


FIG. 5.6 Gráfico de Rietveld da amostra HA 24 CTT.

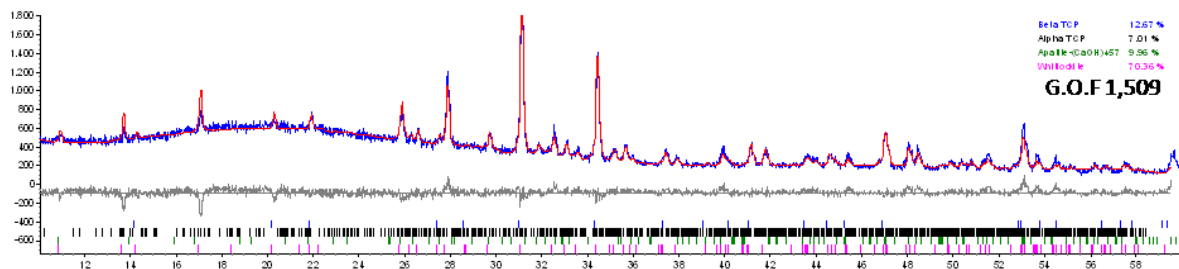


FIG. 5.7 Gráfico de Rietveld da amostra HA PVP 24 CTT

5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A FIG. 5.8 mostra os espectros das amostras verdes de HA e as figuras subsequentes mostram os espectros de cada amostra separadamente (FIG. 5.9 – FIG. 12). A TAB. 5.1 indica os modos vibracionais presentes.

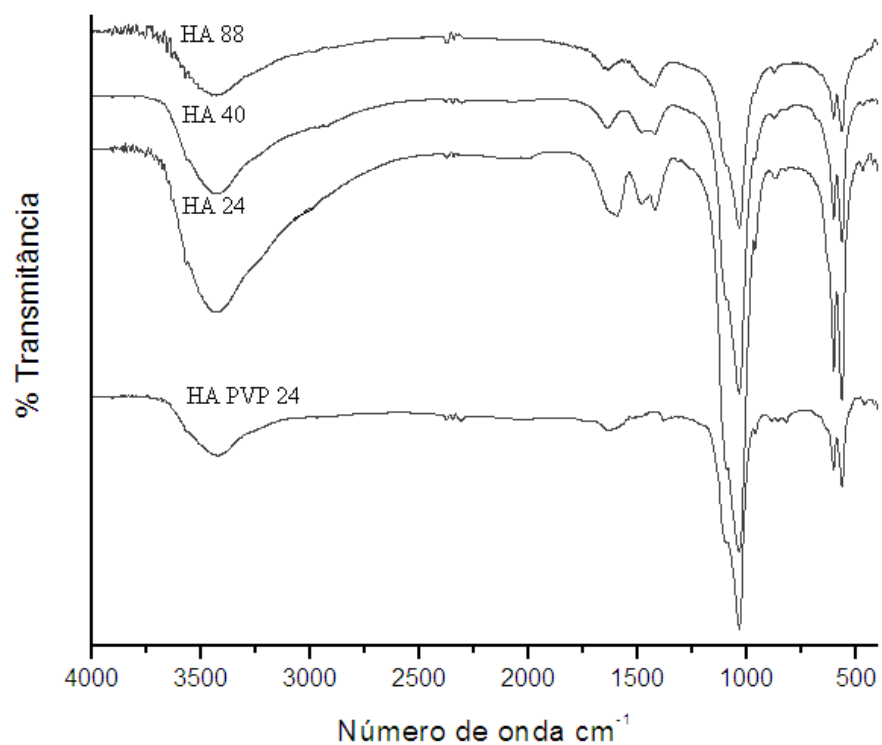


FIG. 5.8 Espectro das amostras verdes de HA, obtido por FTIR.

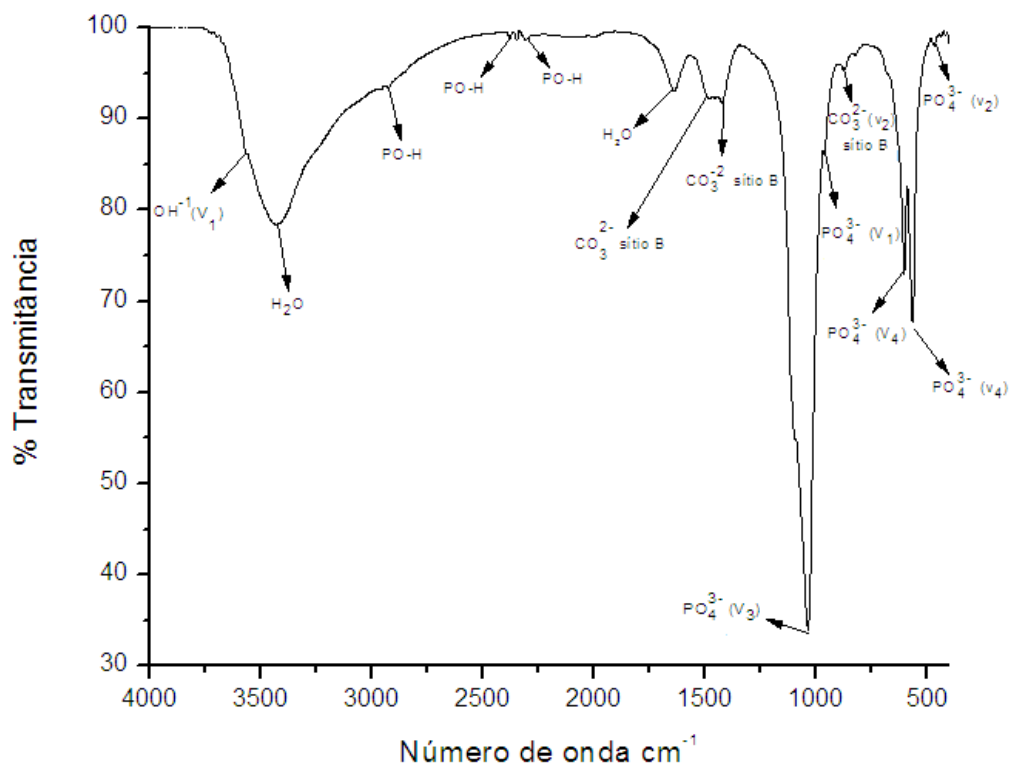


FIG. 5.9 Espectro da amostra HA 88, obtido por FTIR.

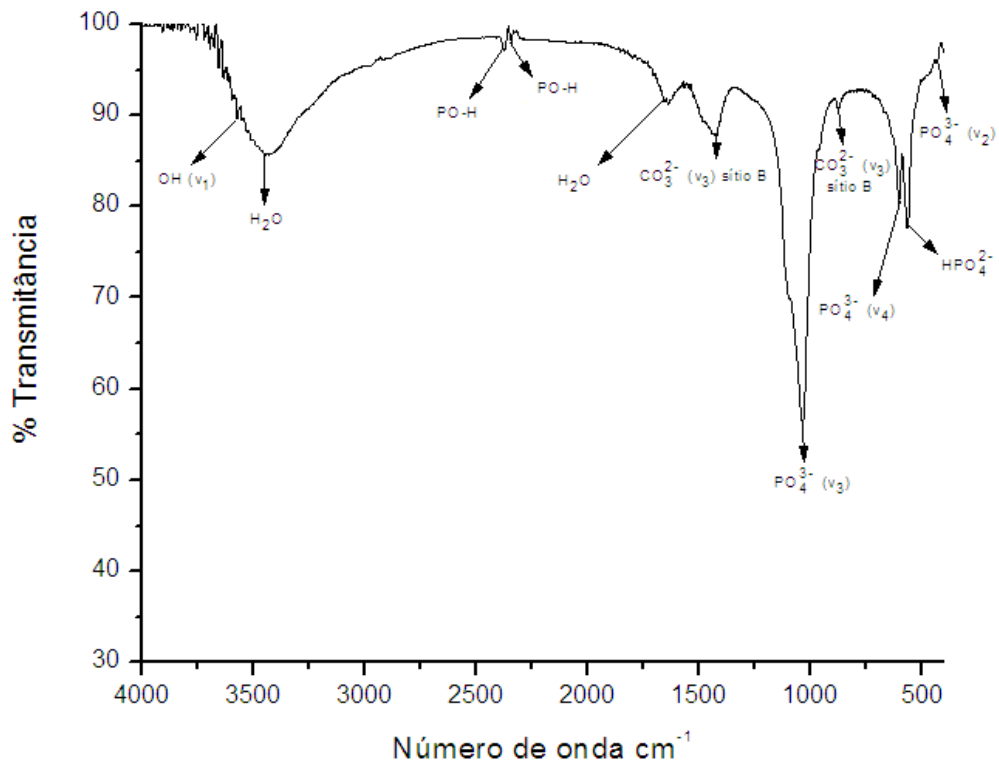


FIG. 5.10 Espectro da amostra HA 40, obtido por FTIR.

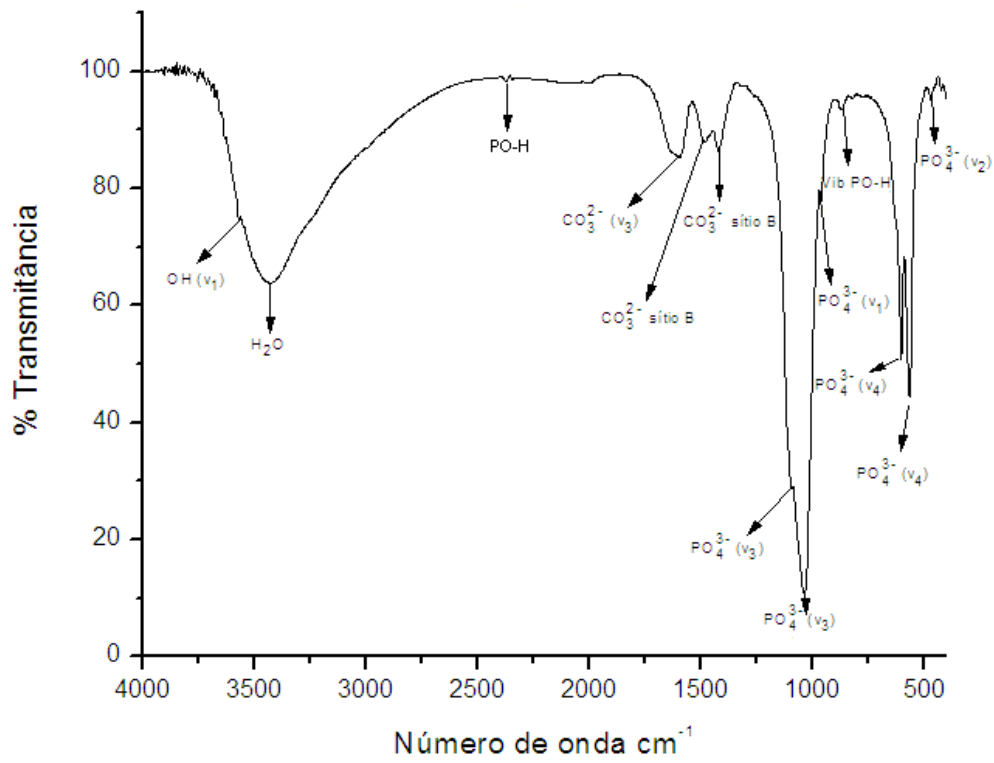


FIG. 5.11 Espectro da amostra HA 24, obtido por FTIR.

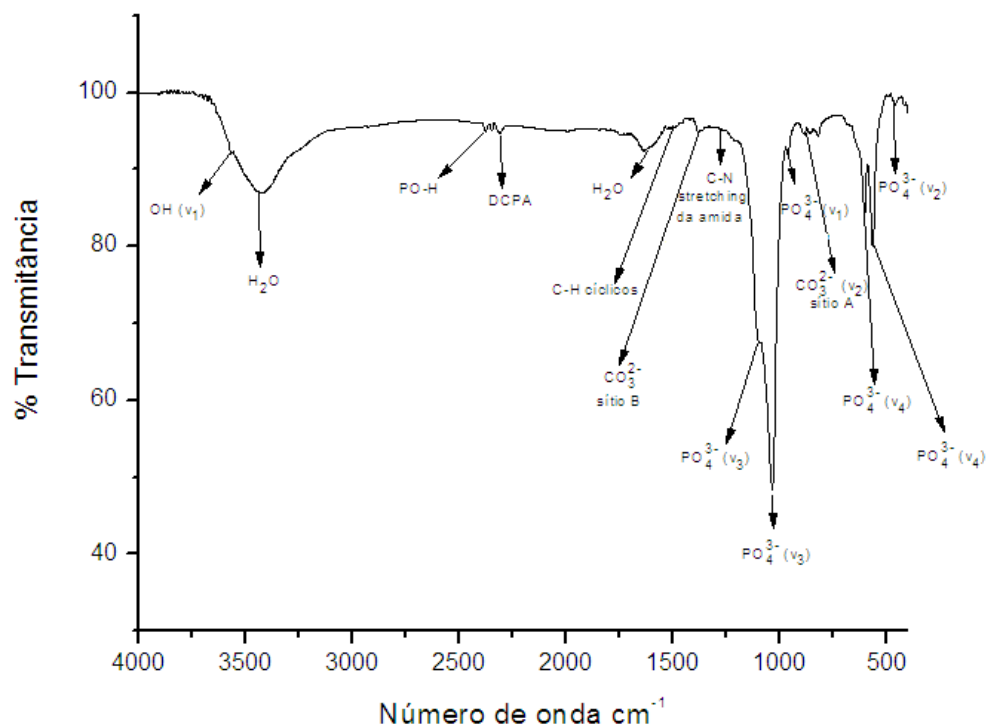


FIG. 5.12 Espectro da amostra HA PVP 24, obtido por FTIR.

TAB. 5.1 Grupos funcionais identificados nas amostras verdes, por espectroscopia de infravermelho.

AMOSTRAS	FREQUENCIAS (cm^{-1})	GRUPOS FUNCIONAIS	REFERÊNCIAS
HA 88	3570	OH (ν_1)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3437	H ₂ O	KOUTSOPOULOS, 2002
	1639	H ₂ O	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2923	PO-H	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2379/2347	PO-H	KOUTSOPOULOS, 2002
	1500/1417	CO ₃ ²⁻ B	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	875	CO ₃ ²⁻ (ν_2) B	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	962	PO ₄ ³⁻ (ν_1)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	468	PO ₄ ³⁻ (ν_2)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1035	PO ₄ ³⁻ (ν_3)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	605/569	PO ₄ ³⁻ (ν_4)	REHMAN <i>et al.</i> , 2005

HA 40	3572	OH (v ₁)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3451	H ₂ O	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1639	H ₂ O	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2382/2341	PO-H	KOUTSOPOULOS, 2002
	1423	CO ²⁻ ₃ B	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	875	CO ²⁻ ₃ (v ₂) B	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1041	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	604	PO ³⁻ ₄ (v ₄)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	549	HPO ²⁻ ₄	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	433	PO ³⁻ ₄ (v ₂)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
HA 24	3570	OH (v ₁)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3458	H ₂ O	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2382	PO-H	KOUTSOPOULOS, 2002
	1595	CO ²⁻ ₃ (v ₃)	REHMAN <i>et al.</i> , 2005
	1486	CO ²⁻ ₃ B	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1417	CO ²⁻ ₃ B	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1093	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1041	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	962	PO ³⁻ ₄ (v ₁)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	867	Vib P-OH	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	604/569	PO ³⁻ ₄ (v ₄)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	470	PO ³⁻ ₄ (v ₂)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
HA PVP 24	3570	OH (v ₁)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3451/1636	H ₂ O	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2376	PO-H	KOUTSOPOULOS, 2002
	2308	D CPA	KOUTSOPOULOS, 2002
	1461	C-H cíclicos	BAIA <i>et al.</i> , 2008
	1381	CO ²⁻ ₃ B	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1266	C-N (amida)	BAIA <i>et al.</i> , 2008
	1097/1028	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	961	PO ³⁻ ₄ (v ₁)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	884	CO ²⁻ ₃ (v ₂) A	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	604/569	PO ³⁻ ₄ (v ₄)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005

Os espectros FTIR de todas as amostras de HA verdes mostraram a presença de bandas que correspondem aos grupamentos funcionais fosfato (PO₄³⁻), hidroxila (OH), ligação PO-H, água (H₂O) e carbonato do tipo B (CO₃²⁻ B).

As bandas de carbonato do tipo B (1595 cm⁻¹, 1486 cm⁻¹ e 1417 cm⁻¹) apresentaram-se mais evidentes na HA 24, devendo-se a presença do grupo (CO₃²⁻) substituindo o sítio dos grupos (PO₄³⁻). Estas bandas são características da hidroxiapatita carbonatada do tipo B, semelhante às apatitas encontradas no esmalte dentário e no osso cortical (ELLIOT, 1994; LEGEROS, 1994). A banda presente em 867 cm⁻¹ na HA 24 pode ser atribuída à presença do grupo hidrogenofosfato (HPO₄²⁻), pelo estiramento da ligação P-OH, confirmando os resultados de RIGO *et al.*, 2007.

Na amostra HA PVP 24, foram encontradas as bandas referentes ao hidrogenofosfato de cálcio anidro (DCPA), fase mineral denominada monetita, e ao carbonato do tipo A (CO₃²⁻ A). Foram também encontradas as bandas características do PVP, como 1461 e 1261 cm⁻¹ correspondentes aos grupos funcionais CH deformação de CH₂ dos grupos cíclicos e C-N *stretching* da amida, em consonância com os resultados encontrados por FRANCO *et al.*, 2010, QIU *et al.*, 2008.

A FIG. 5.13 mostra os espectros de infravermelho das amostras de HA CTT e nas figuras subseqüentes são apresentados os espectros das amostras HA 88 CTT, HA 40 CTT, HA 24 CTT e HA PVP 24 CTT separadamente (FIG. 14 – FIG. 17). Na TAB. 5.2 são indicados os modos vibracionais presentes.

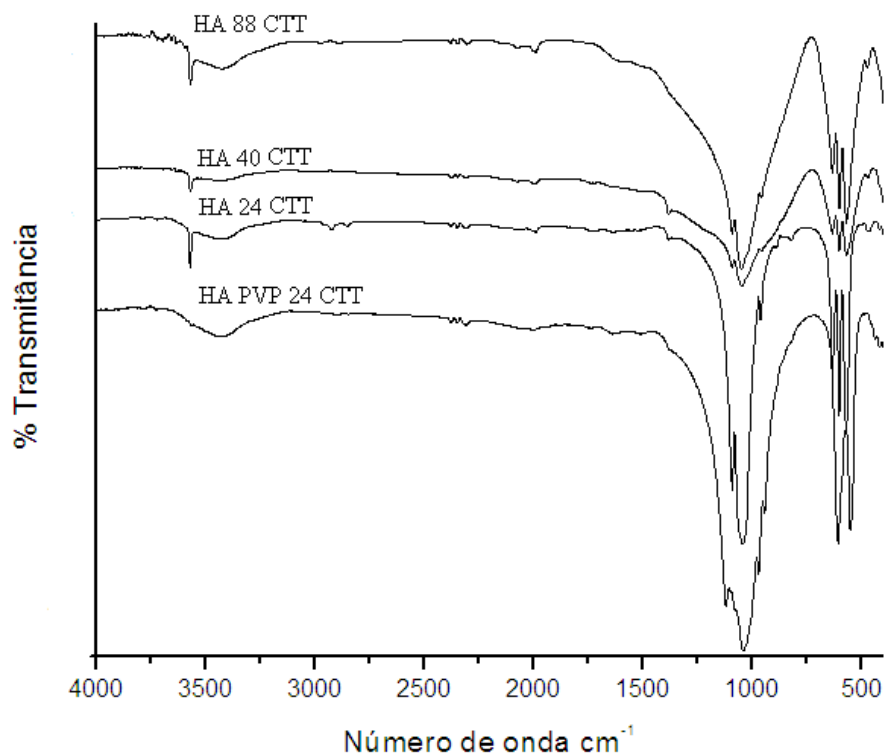


FIG. 5.13 Espectro das amostras CTT de HA, obtido por FTIR.

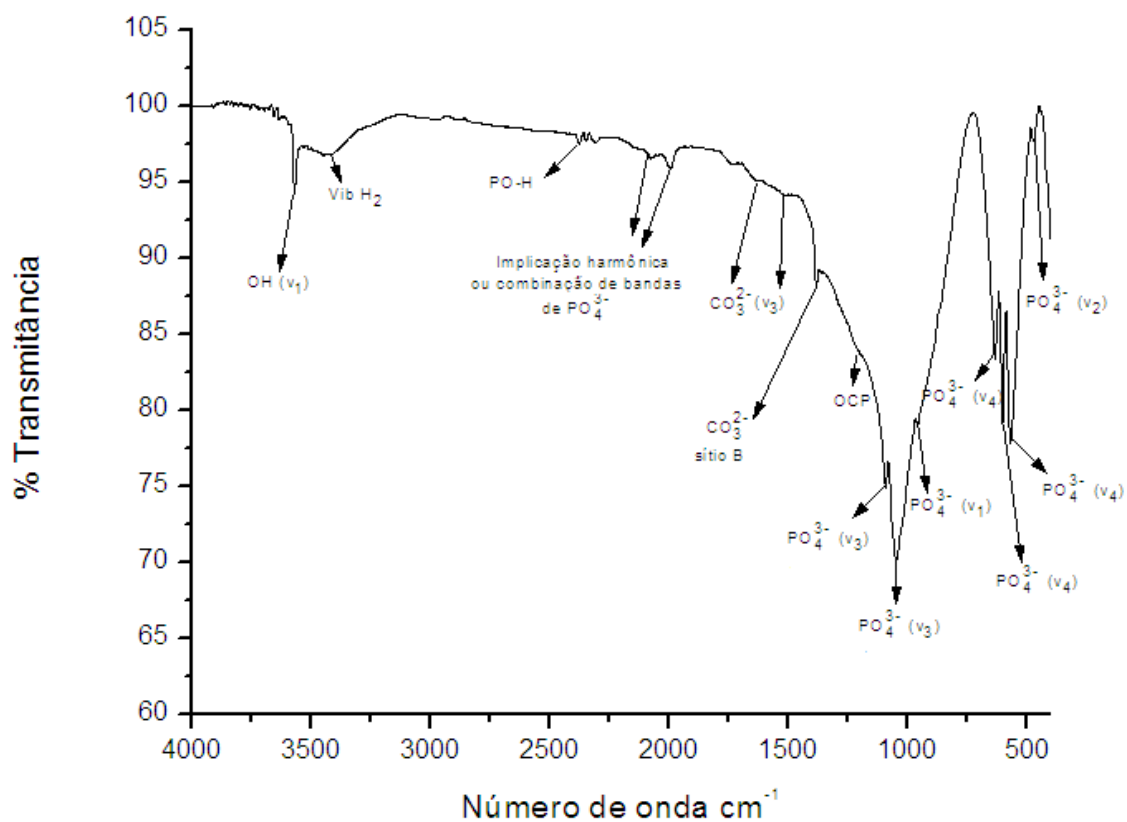


FIG. 5.14 Espectro da amostra HA 88 CTT, obtido por FTIR.

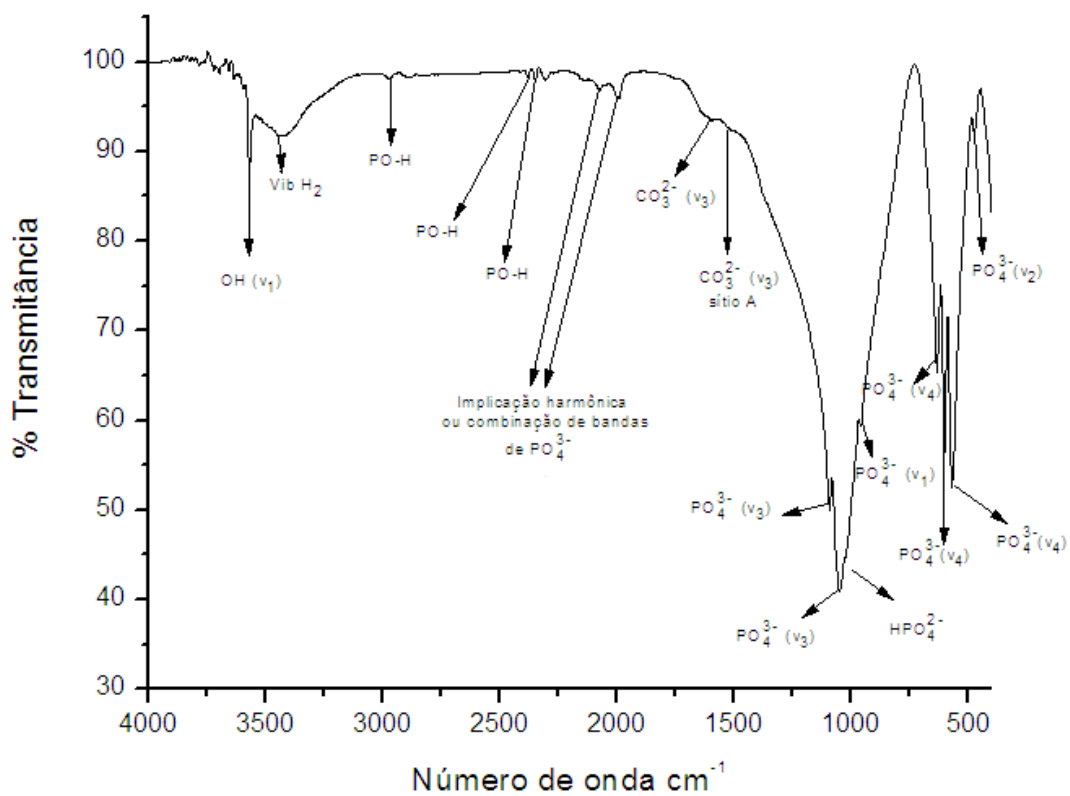


FIG. 5.15 Espectro da amostra HA 40 CTT, obtido por FTIR.

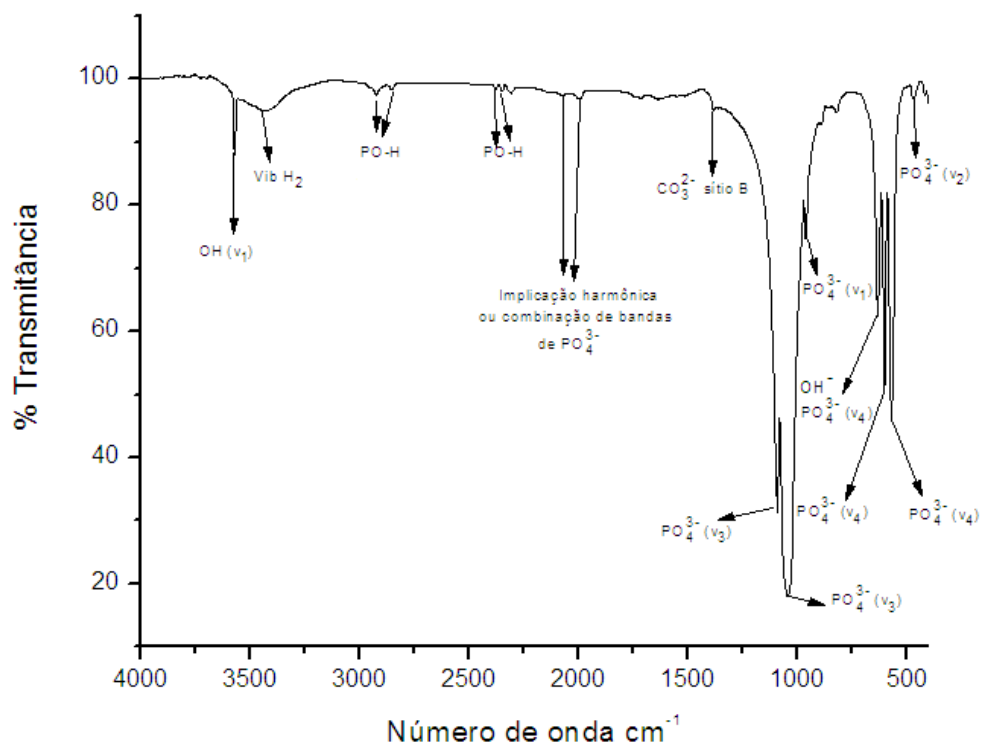


FIG. 5.16 Espectro da amostra HA 24 CTT, obtido por FTIR.

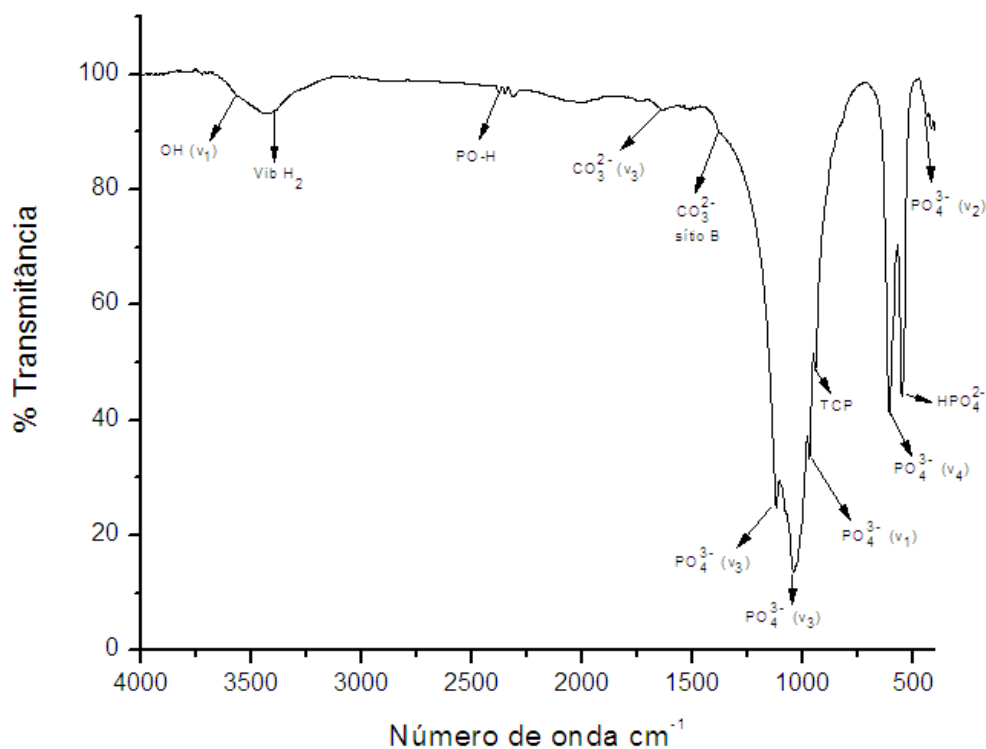


FIG. 5.17 Espectro da amostra HA PVP 24 CTT, obtido por FTIR.

TAB. 5.2 Grupos funcionais identificados nas amostras CTT, por espectroscopia de infravermelho.

AMOSTRAS	FREQUENCIAS (cm ⁻¹)	GRUPOS FUNCIONAIS	REFERÊNCIAS
HA 88	3568	OH (ν ₁)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3410	Vib H	KOUTSOPOULOS, 2002
	2376	PO-H	KOUTSOPOULOS, 2002
	2073/2000	IH/CB de PO ₄ ³⁻	KOUTSOPOULOS, 2002
	1633/1520	CO ₃ ²⁻ (ν ₃)	REHMAN <i>et al.</i> , 2005
	1381	CO ₃ ²⁻ B	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1183	OCP	KOUTSOPOULOS, 2002
	1091/1049	PO ₄ ³⁻ (ν ₃)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	956	PO ₄ ³⁻ (ν ₁)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	632/601/568	PO ₄ ³⁻ (ν ₄)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	470	PO ₄ ³⁻ (ν ₂)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005

HA 40	3570	OH (v_1)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3437	Vib H	KOUTSOPOULOS, 2002
	2972/2380/2347	PO-H	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2075/1991	IH/CB de PO^{3-}_4	KOUTSOPOULOS, 2002
	1592	CO^{2-}_3 (v_3)	REHMAN <i>et al.</i> , 2005
	1548	CO^{2-}_3 (v_3) A	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1090/1041	PO^{3-}_4 (v_3)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1020	HPO^{2-}_4	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	958	PO^{3-}_4 (v_1)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	632/604/569	PO^{3-}_4 (v_4)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	472	PO^{3-}_4 (v_2)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
HA 24	3570	OH (v_1)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3458	Vib H	KOUTSOPOULOS, 2002
	2923/2852	PO-H	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2378/2349	PO-H	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2076/2003	IH/CB de PO^{3-}_4	KOUTSOPOULOS, 2002
	1382	CO^{2-}_3 B	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1097/1041	PO^{3-}_4 (v_3)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	965	PO^{3-}_4 (v_1)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	632/604/569	PO^{3-}_4 (v_4)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	469	PO^{3-}_4 (v_2)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
HA PVP 24	3566	OH (v_1)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3411	Vib H	KOUTSOPOULOS, 2002
	2387	PO-H	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1637	CO^{2-}_3 (v_3)	REHMAN <i>et al.</i> , 2005
	1381	CO^{2-}_3 B	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1125/1041	PO^{3-}_4 (v_3)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	965	PO^{3-}_4 (v_1)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	944	TCP	KOUTSOPOULOS, 2002
	604	PO^{3-}_4 (v_4)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	549	HPO^{2-}_4	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	434	PO^{3-}_4 (v_2)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005

Os espectros FTIR de todas as amostras de HA CTT sintetizadas no estudo mostraram a presença de bandas que correspondem aos grupamentos funcionais fosfato (PO_4^{3-}), hidroxila (OH^-), carbonato (CO_3^{2-}), ligação PO-H e vibração dos átomos de hidrogênio pertencentes ao grupo hidrogenofosfato (Vib H).

As bandas presentes em $2073/2000 \text{ cm}^{-1}$ na HA 88 CTT, $2075/1991 \text{ cm}^{-1}$ na HA 40 CTT e $2076/2003 \text{ cm}^{-1}$ na HA 24 CTT podem ser atribuídas a uma implicação harmônica ou combinação de bandas de fosfato (PO_4^{3-}). A banda 1183 cm^{-1} presente na HA 88 CTT é referente ao fosfato octacálcio (OCP), precursor da HA. As bandas 1020 e 549 cm^{-1} presentes na HA 40 CTT e na HA PVP 24 CTT, respectivamente, são referentes ao hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) presente na hidroxiapatita deficiente em cálcio, de acordo com os estudos de RIGO *et al.*, 2007.

A amostra de HA PVP 24 CTT apresentou ainda a banda 944 cm^{-1} , referente à fase do fosfato tricálcio (TCP), verificada no resultado de difração de raios X e nos estudos de FRANCO *et al.*, 2010, FONSECA, 2007.

5.4 ADSORÇÃO GASOSA PELA TEORIA DE BRUNAUER-EMMETT-TELLER (BET)

Os resultados da área de superfície específica das amostras com tratamento térmico revelaram que a HA 88 CTT apresentou menor área de superfície, de acordo com a TAB. 5.3, indicando a relação de maior tamanho de cristalitos com menor valor de área de superfície. Os baixos valores da área de superfície das amostras foram atribuídos à alta temperatura de sinterização (1100°C), de acordo com CONZ *et al.*, 2005.

Amostra	S (m^2/g)
HA 88 CTT	$1,5 \pm 0,1$
HA 40 CTT	$3,2 \pm 0,2$
HA 24 CTT	$2,5 \pm 0,2$
HA PVP 24 CTT	$1,47 \pm 0,06$

TAB. 5.3 Área de superfície específica das amostras com tratamento térmico.

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise morfológica revelou partículas pequenas, formando diversos aglomerados (FIG. 5.18 - FIG. 5.21). Nas amostras obtidas após a sinterização a 1100°C, observou-se a coalescência dos cristalitos da HA. Foi observado também que o tamanho dos grânulos mostrou-se diretamente proporcional ao tempo de envelhecimento dos precipitados (HA 88 > HA 40 > HA 24).

A micrografia da amostra HA PVP 24 (100x) apresentou uma associação entre os cristais de HA e o PVP, formando um novelo e criando um ambiente confinado para os cristais, o que possivelmente dificultou o crescimento do tamanho dos grãos (FIG. 5.18 D).

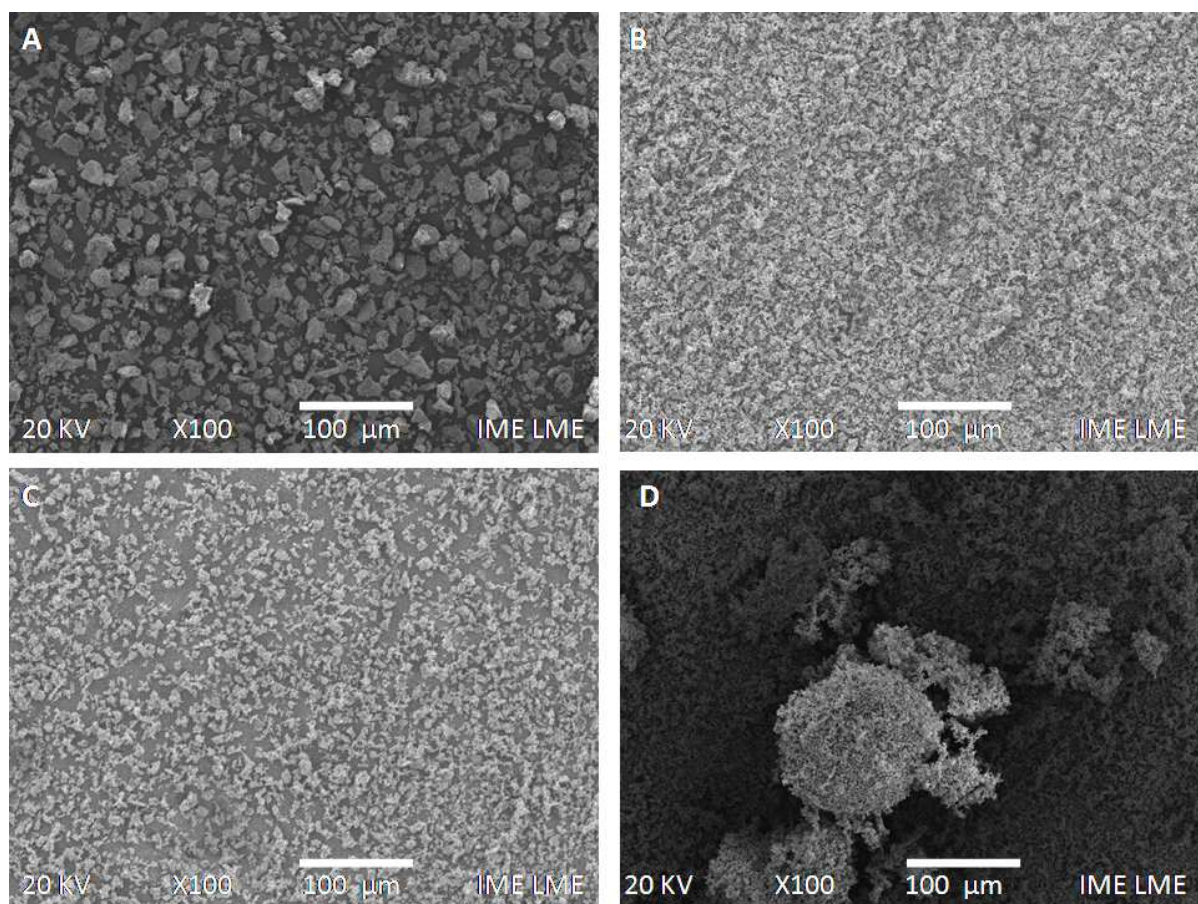


FIG. 5.18 Micrografias (MEV) das amostras: HA 88 (A), HA 40 (B), HA 24 (C) e HA PVP 24 (D) (100 x).

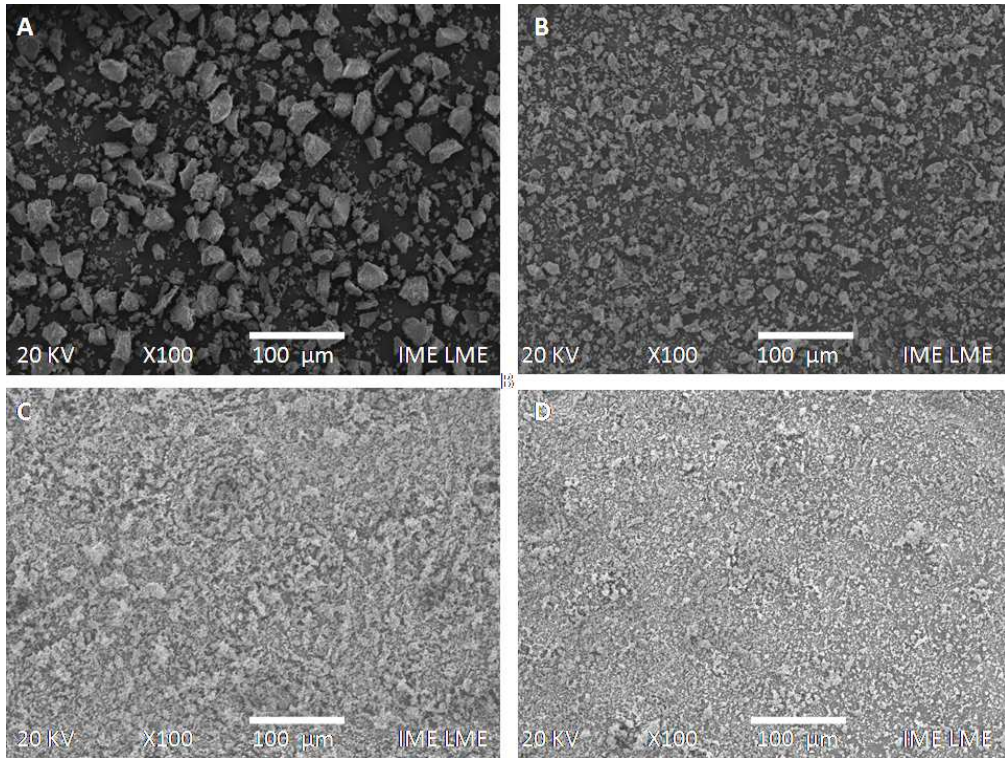


FIG. 5.19 Micrografias (MEV) das amostras: HA 88 CTT (A), HA 40 CTT (B), HA 24 CTT (C) e HA PVP 24 CTT (D) (100x).

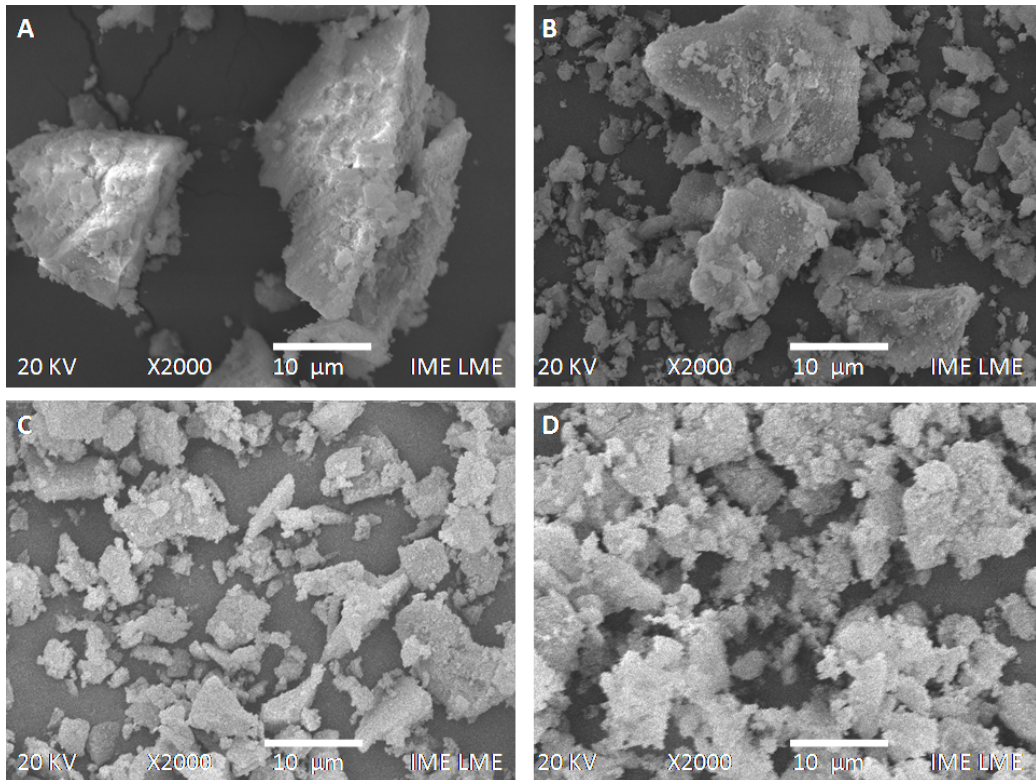


FIG. 5.20 Micrografias (MEV) das amostras: HA 88 (A), HA 40 (B), HA 24 (C) e HA PVP 24 (D) (2000x).

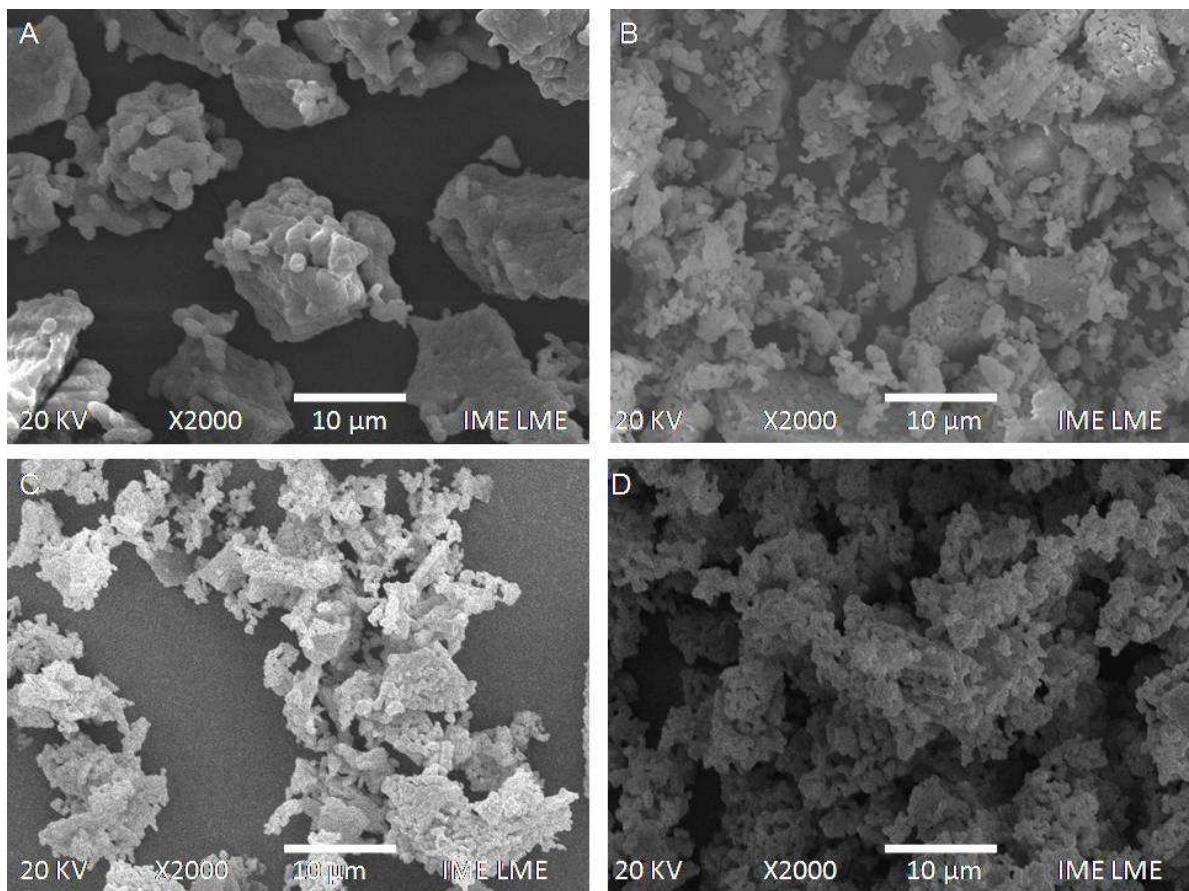


FIG. 5.21 Micrografias (MEV) das amostras: HA 88 CTT (A), HA 40 CTT (B), HA 24 CTT (C) e HA PVP 24 CTT (D) (2000x).

5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO (MEV-FEG)

A análise morfológica das amostras verdes revelou partículas nanométricas, formando diversos aglomerados (FIG. 5.22). Nas amostras obtidas após a sinterização a 1100°C, foram observados os contornos de grãos (FIG. 5.23). As micrografias comprovaram que o tamanho dos grânulos mostrou-se diretamente proporcional ao tempo de envelhecimento dos precipitados (HA 88 > HA 40 > HA 24), observado nas micrografias de MEV.

A FIG. 5.24 A apresenta a HA verde sob a forma de um novelo. Entretanto, não se diferenciou o PVP da HA. A FIG. 5.24 B apresentou o tamanho nanométrico das partículas de HA com a adição do PVP, indicando que o polímero dificultou o crescimento do tamanho dos grãos, estando de acordo com os relatos de QIU *et al.*, 2008.

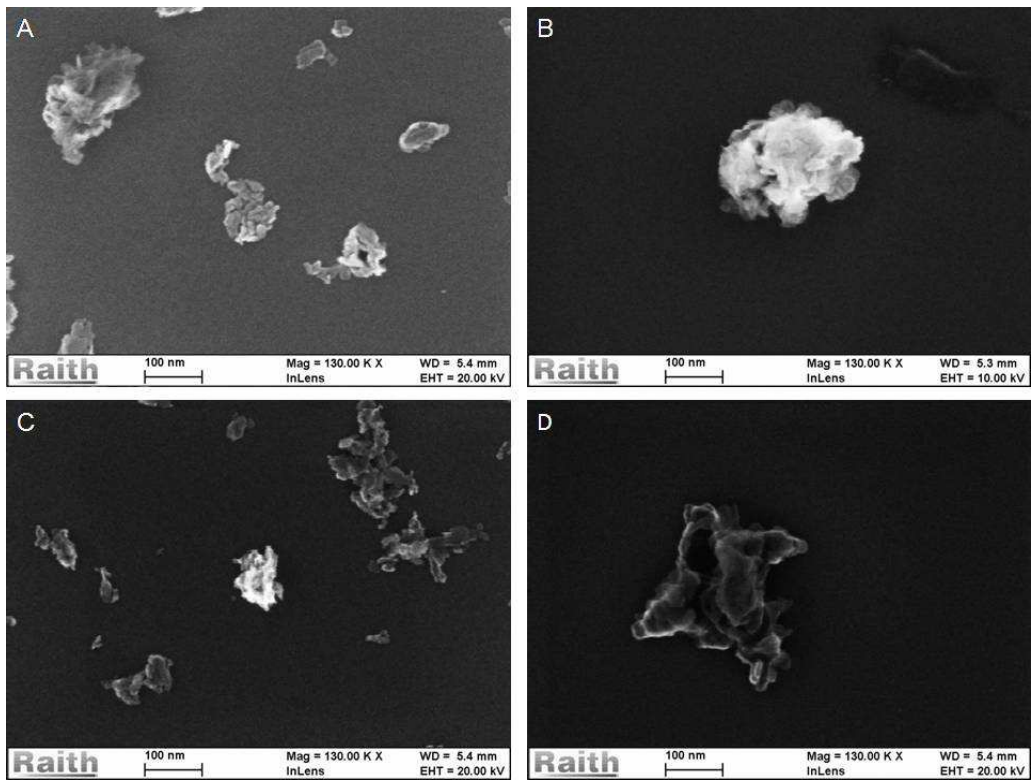


FIG. 5.22 Micrografias (MEV-FEG) das amostras: HA 88 (A), HA 40 (B), HA 24 (C) e HA PVP 24 (D) (130.000 x).

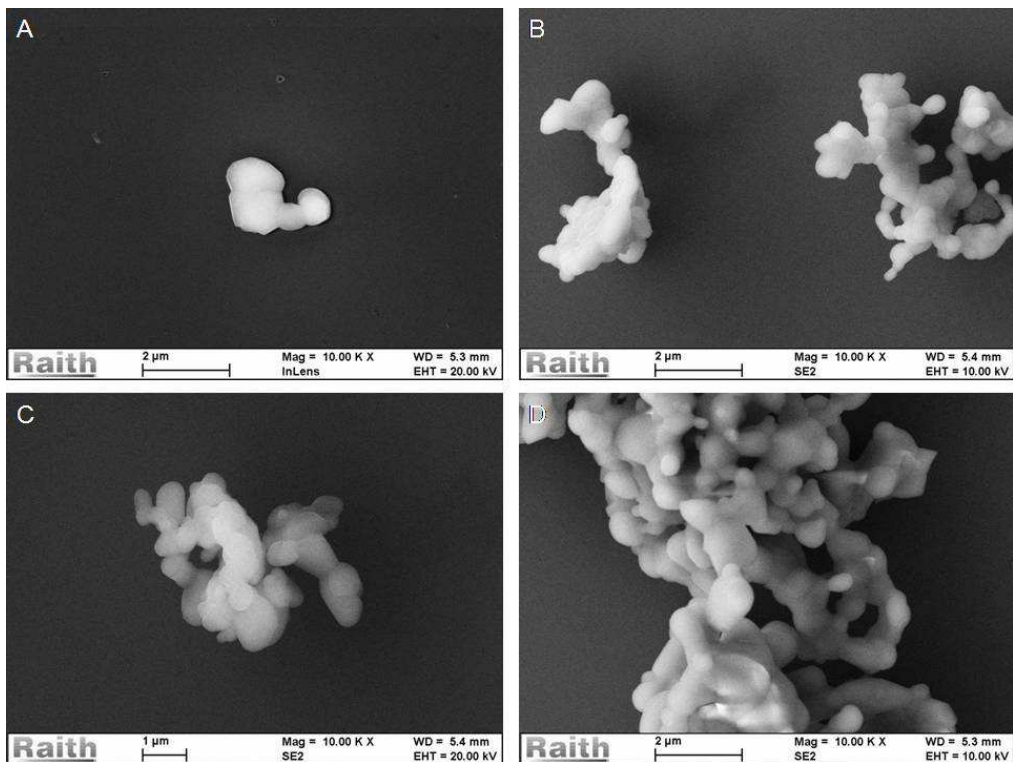


FIG. 5.23 Micrografias (MEV-FEG) das amostras: HA 88 CTT (A), HA 40 CTT (B), HA 24 CTT (C) e HA PVP 24 CTT (D) (10.000x).

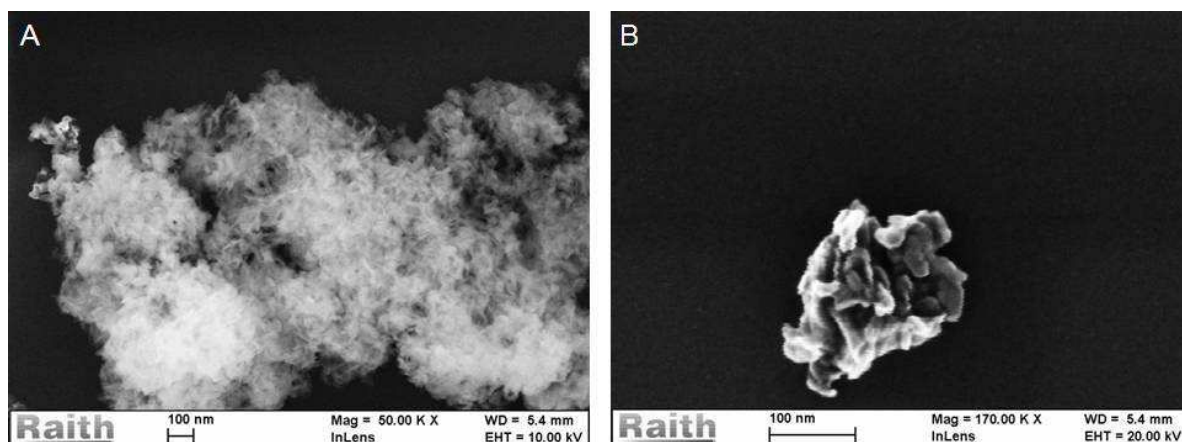


FIG. 5.24 Micrografias (MEV-FEG) das amostras de HA PVP 24 (50.000x) (A), HA PVP 24 (170.000x) (B).

5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A microanálise morfológica das amostras tratadas termicamente revelou partículas submicrométricas esféricas, com tamanho médio de 375 nm, 308 nm e 145 nm nas amostras HA 88 CTT, HA 40 CTT e HA 24 CTT, respectivamente, formando diversos aglomerados (FIG. 5.25, FIG. 5.26 e FIG. 5.27 A).

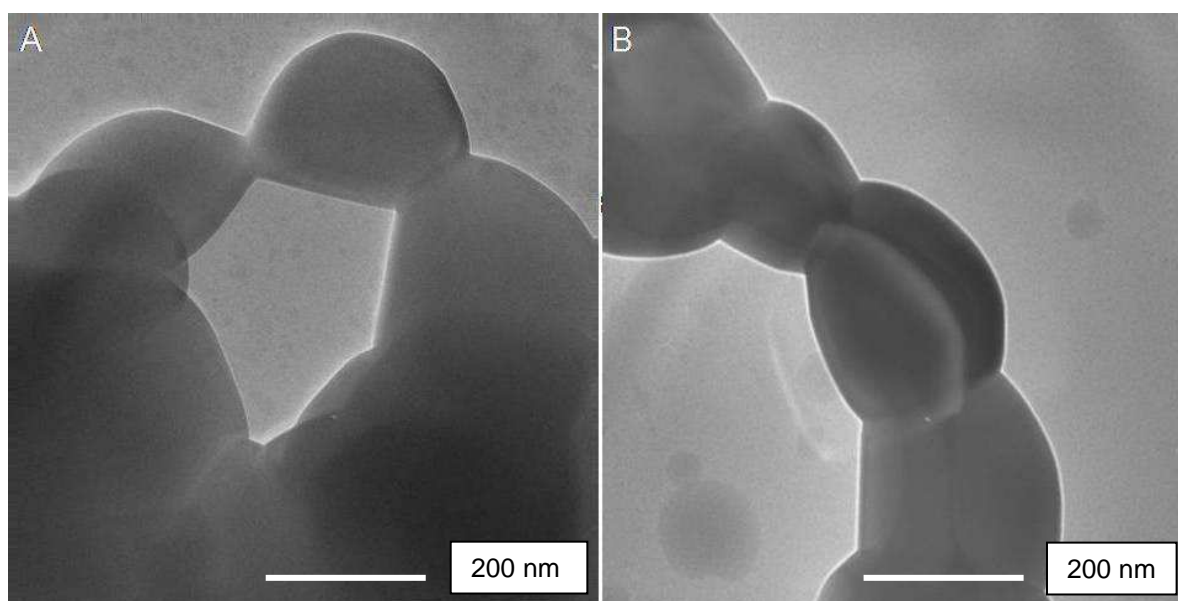


FIG. 5.25 Micrografias (MET) das amostras: HA 88 CTT (A) e HA 40 CTT (B) (43.000x).

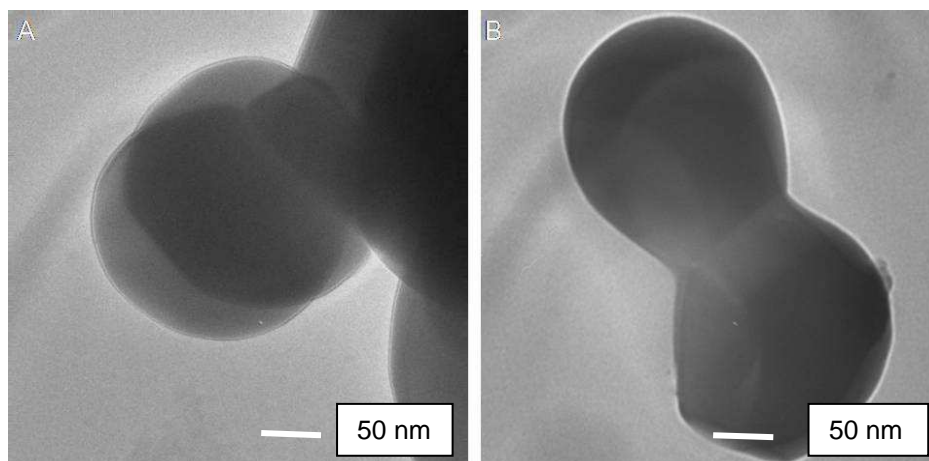


FIG. 5.26 Micrografias (MET) das amostras: HA 88 CTT (A), HA 40 CTT (B) (71.000x).

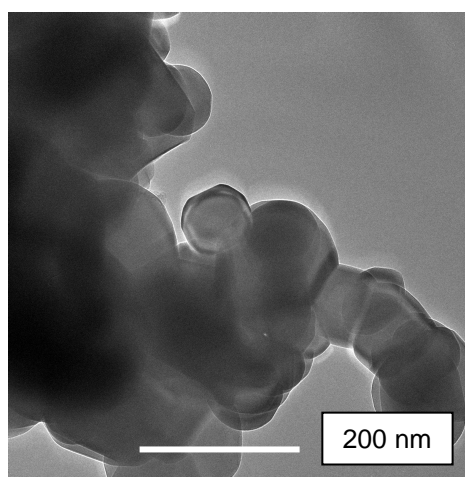


FIG. 5.27 Micrografia (MET) da amostra HA 24 CTT (43.000x).

A medição do tamanho das partículas de HA, através do recurso *Drawing of Binary Watershed modificado* do programa *ImageJ*, pode ser vista na FIG. 5.28.

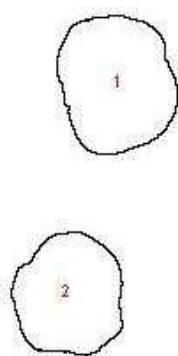


FIG. 5.28 Imagem gerada pelo programa *ImageJ*.

5.8 ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS) – SORÇÃO E DESSORÇÃO DE BSA

Os resultados da sorção e dessorção de BSA foram quantificados no espectrofotômetro de UV-Visível a partir da construção da curva padrão de BSA que apresentou uma relação linear crescente entre a absorbância e a concentração de proteína (FIG. 5.29). A TAB. 5.4 apresenta os valores encontrados da sorção da BSA.

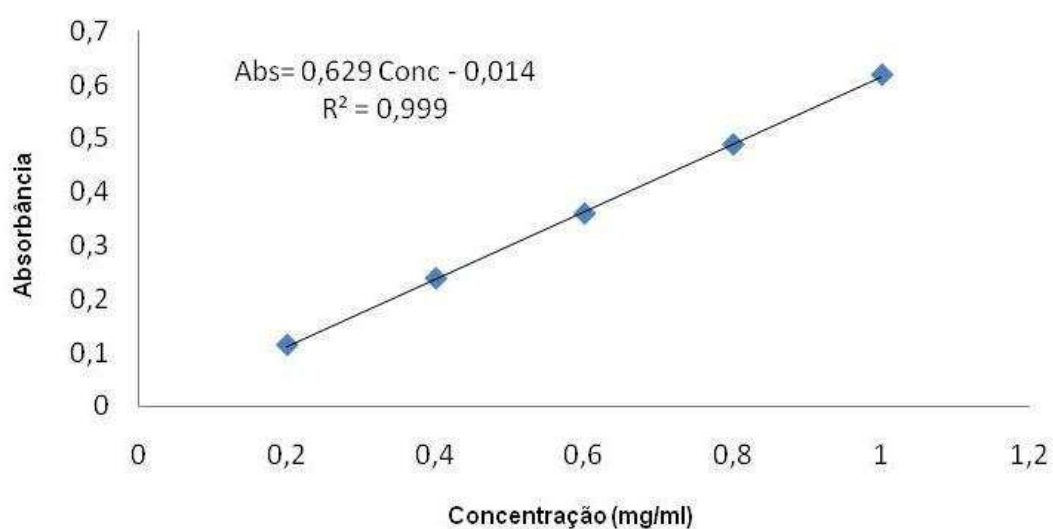


FIG. 5.29 Curva Padrão de BSA.

TAB. 5.4 Resultados da sorção da BSA.

Tubo	Abs	C lida (mg/mL)	Sorvido (mg/mL)	Média	Desvio	Sorvido (%)	Média	Desvio
1	-0,006	0,000	*	*	*	*	*	*
2	0,404	0,664	0,355	0,281	0,09	34,84	27,54	9,08
3	0,432	0,709	0,310			30,42		
4	0,516	0,842	0,177			17,37		
5	-0,017	0,000	*	*	*	*	*	*
6	0,505	0,824	0,195	0,141	0,08	19,14	13,84	7,62
7	0,516	0,843	0,176			17,27		
8	0,595	0,967	0,052			5,10		
9	-0,032	0,000	*	*	*	*	*	*
10	0,315	0,522	0,497	0,510	0,04	48,77	50,05	4,41
11	0,330	0,546	0,473			46,42		
12	0,275	0,459	0,560			54,96		

13	-0,044	0,000	*	*	*	*	*	*
14	-0,035	0,000	1,019			100		
15	-0,028	0,000	1,019	1,019	0	100	0	0
16	-0,036	0,000	1,019			100		
17	-0,044	0,000	*	*	*	*	*	*
18	0,563	0,916	0,103			10,11		
19	0,554	0,902	0,117	0,109	0,01	11,48	10,73	0,70
20	0,56	0,911	0,108			10,60		
21	-0,051	0,000	*	*	*	*	*	*
22	0,537	0,875	0,144			14,13		
23	0,532	0,868	0,151	0,150	0,01	14,82	14,72	0,55
24	0,529	0,864	0,155			15,21		
25	-0,060	0,000	*	*	*	*	*	*
26	0,516	0,842	0,177			17,37		
27	0,555	0,904	0,115	0,139	0,03	11,29	13,67	3,25
28	0,548	0,893	0,126			12,37		
29	-0,067	0,000	*	*	*	*	*	*
30	0,537	0,876	0,143			14,03		
31	0,539	0,879	0,140	0,14	0,00	13,74	13,74	0,29
32	0,541	0,882	0,137			13,44		

Os resultados da sorção da BSA, através da análise de espectroscopia de UV-VIS, são baseados na área de superfície das amostras. Devido aos baixos valores da área de superfície das amostras com tratamento térmico, a sorção da BSA apresentou valores significativamente menores, quando comparados com as amostras verdes, estando em consonância com os resultados de VILLARREAL *et al.*, 1998 e MAVROPOULOS *et al.*, 2008.

Os resultados da sorção da BSA das amostras verdes demonstraram que a HA PVP 24 sorveu 100% da BSA, seguida da HA 24 (50,05%). As amostras HA 88 e HA 40 sorveram valores menores de BSA, 27,54% e 13,84%, respectivamente.

Após a quantificação da dessorção da BSA, foi observado que os valores correspondentes a absorvância eram negativos, ou muito próximos de zero, demonstrando que a BSA sorvida não dessorveu sob ação da água Milli-Q[®], estando de acordo com MAVROPOULOS *et al.*, 2011.

Foi confirmada a solubilidade do PVP na presença de água e de BSA através de um experimento em que foram adicionados 15 ml de água Milli-Q[®] em três tubos tipo “corning” contendo 0,200 g de PVP e 15 ml de BSA em um tubo tipo “corning” contendo a mesma

quantidade de PVP. Os tubos foram colocados no agitador e verificou-se que o PVP foi dissolvido completamente nas soluções de água Milli-Q® e de BSA.

5.9 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) APÓS A SORÇÃO DA BSA

Foram obtidos espectros de infravermelho das amostras verdes de HA após a sorção da BSA (FIG. 5.30 – FIG. 5.33). Na TAB 5.5 são indicados os modos vibracionais presentes nas amostras verdes sorvidas com BSA.

Os espectros de FTIR de todas as amostras verdes de HA contendo água Milli-Q® foram utilizados como controles para comparação com as amostras sorvidas com BSA.

A presença de grande número de bandas amplas e mais estreitas de água adsorvida e de fosfato em todas as amostras verdes sorvidas com BSA ficou de acordo com os resultados encontrados por NAYAR *et al.*, 2006. Na amostra HA PVP 24, foi encontrada maior quantidade de bandas de água adsorvida. Este fato pode ser atribuído à associação do grupo carbonila do PVP com a água (KHAN e GUL, 2006).

A amostra de HA PVP 24 após a sorção com BSA apresentou bandas pronunciadas dos grupos Amida I e Amida II (1660 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , respectivamente) e uma banda mais estreita de Amida III (1306 cm^{-1}), comprovando maior capacidade de sorção de BSA, quando comparada com as outras amostras. A amostra de HA 24 apresentou duas bandas pronunciadas de Amida I (1658 cm^{-1} e 1652 cm^{-1}) e uma banda mais estreita de Amida II (1520 cm^{-1}). As amostras HA 88 e HA 40 sorveram menor quantidade de BSA, apresentando cada amostra apenas uma banda pronunciada de Amida I (1652 cm^{-1} na HA 88 e 1657 cm^{-1} na HA 40). Os resultados de FTIR apresentaram maior capacidade de ligação da BSA à amostra HA PVP 24 que apresentou menor tamanho de partículas nas análises de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Este fato, segundo TANAKA *et al.*, 2007, sugere que a estrutura morfológica pode influenciar na interação do biomaterial com a proteína.

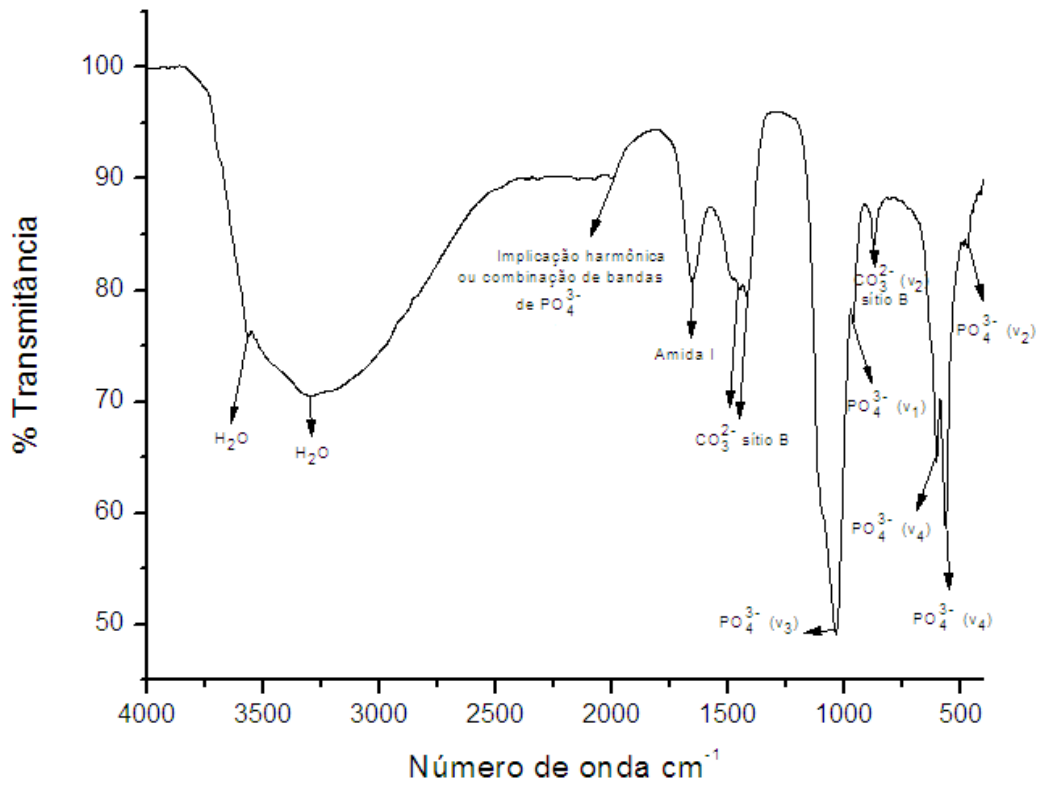


FIG. 5.30 Espectro da amostra HA 88 sorvida com BSA, obtido por FTIR.

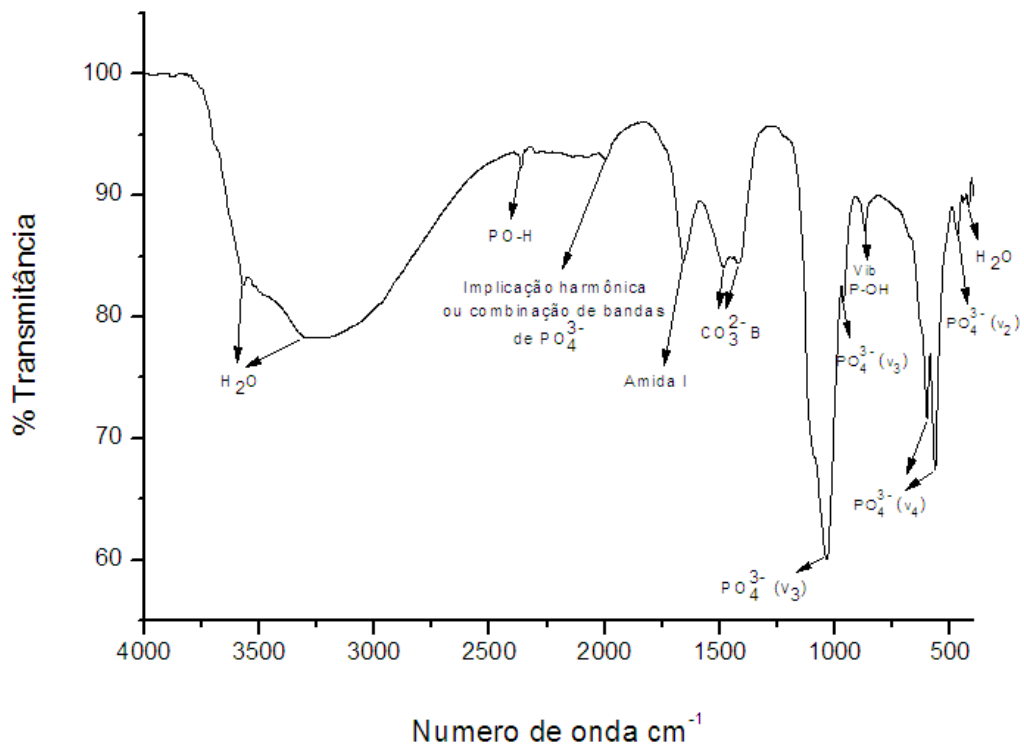


FIG. 5.31 Espectro da amostra HA 40 sorvida com BSA, obtido por FTIR.

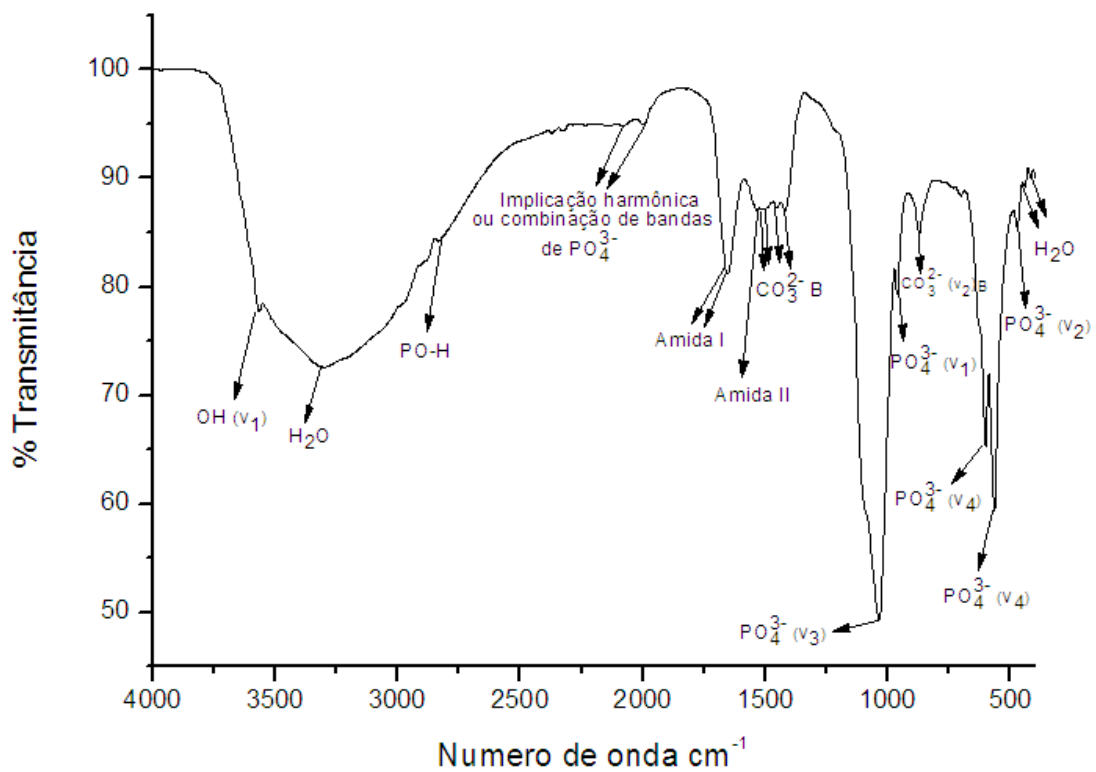


FIG. 5.32 Espectro da amostra HA 24 sorvida com BSA, obtido por FTIR.

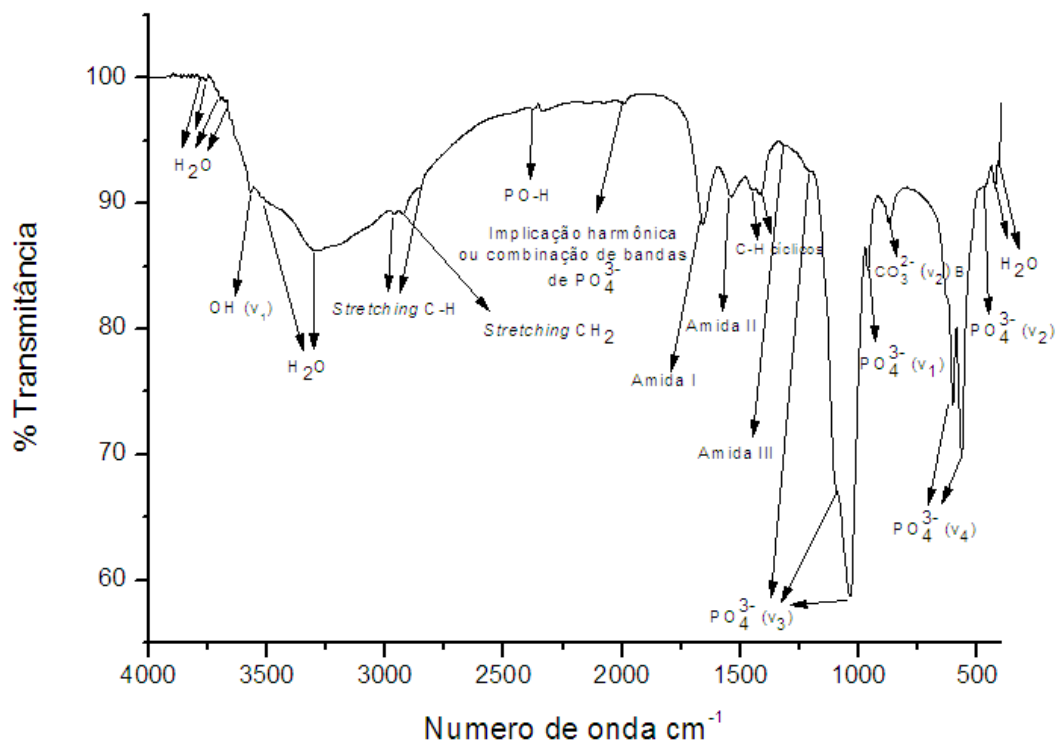


FIG. 5.33 Espectro da amostra HA PVP 24 sorvida com BSA, obtido por FTIR.

TAB. 5.5 Grupos funcionais identificados nas amostras verdes sorvidas com BSA, por espectroscopia de infravermelho.

AMOSTRAS	FREQUENCIAS (cm ⁻¹)	GRUPOS FUNCIONAIS	REFERÊNCIAS
HA 88	3676/3299	H ₂ O	KOUTSOPOULOS, 2002
	2000	IH/CB de PO ³⁻ ₄	KOUTSOPOULOS, 2002
	1652	Amida I	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1450/1417	CO ²⁻ ₃ B	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1035	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	965	PO ³⁻ ₄ (v ₁)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	875	CO ²⁻ ₃ (v ₂) B	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	604/565/468	PO ³⁻ ₄ (v ₄)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
HA 40	3577/3298	H ₂ O	KOUTSOPOULOS, 2002
	2362	PO-H	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1995	IH/CB de PO ³⁻ ₄	KOUTSOPOULOS, 2002
	1657	Amida I	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1484/1418	CO ²⁻ ₃ B	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1032/962	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	866	Vib P-OH	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	601/567	PO ³⁻ ₄ (v ₄)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	468	PO ³⁻ ₄ (v ₂)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	420	H ₂ O	KOUTSOPOULOS, 2002
HA 24	3567	OH (v ₁)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3306	H ₂ O	KOUTSOPOULOS, 2002
	2836	PO-H	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2077/2000	IH/CB de PO ³⁻ ₄	KOUTSOPOULOS, 2002
	1658/1652	Amida I	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1520	Amida II	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1512/1500	CO ²⁻ ₃ B	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1451/1419	CO ²⁻ ₃ B	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1036	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	962	PO ³⁻ ₄ (v ₁)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005

	873	CO_3^{2-} (ν_2) B	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	602/565	PO_4^{3-} (ν_4)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	471	PO_4^{3-} (ν_2)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	442/419	H_2O	KOUTSOPOULOS, 2002
HA PVP 24	3758/3718	H_2O	KOUTSOPOULOS, 2002
	3697/3676	H_2O	KOUTSOPOULOS, 2002
	3570	OH (ν_1)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3502	H_2O	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3289	H_2O	KOUTSOPOULOS, 2002
	2962	<i>Stretching</i> C-H	MENDES <i>et al.</i> , 2010
	2927	<i>Stretching</i> CH_2	MENDES <i>et al.</i> , 2010
	2855	<i>Stretching</i> C-H	MENDES <i>et al.</i> , 2010
	2381	PO-H	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1996	IH/CB de PO_4^{3-}	KOUTSOPOULOS, 2002
	1660	Amida I	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1540	Amida II	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1450	C-H cíclicos	MENDES <i>et al.</i> , 2010
	1419	C-H cíclicos	BAIA <i>et al.</i> , 2008
	1306	Amida III	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1204/1090/1036	PO_4^{3-} (ν_3)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	962	PO_4^{3-} (ν_1)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	872	CO_3^{2-} (ν_2) B	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	603/566	PO_4^{3-} (ν_4)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	432	PO_4^{3-} (ν_2)	KOUTSOPOULOS, 2002
	425/410	H_2O	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005

Foram obtidos espectros de infravermelho das amostras CTT de HA após a sorção da BSA (FIG. 5.34 – FIG. 5.37.). Na TAB 5.6 são indicados os modos vibracionais presentes nas amostras CTT sorvidas com BSA.

Os espectros de FTIR de todas as amostras CTT de HA contendo água Milli-Q® foram utilizados como controles para comparação com as amostras sorvidas com BSA. Os espectros de FTIR de todas as amostras de HA CTT sorvidas com BSA obtidas no estudo

mostraram a presença de bandas que correspondem aos grupamentos funcionais fosfato (PO_4^{3-}) e implicação harmônica ou combinação de bandas de fosfato (PO_4^{3-}).

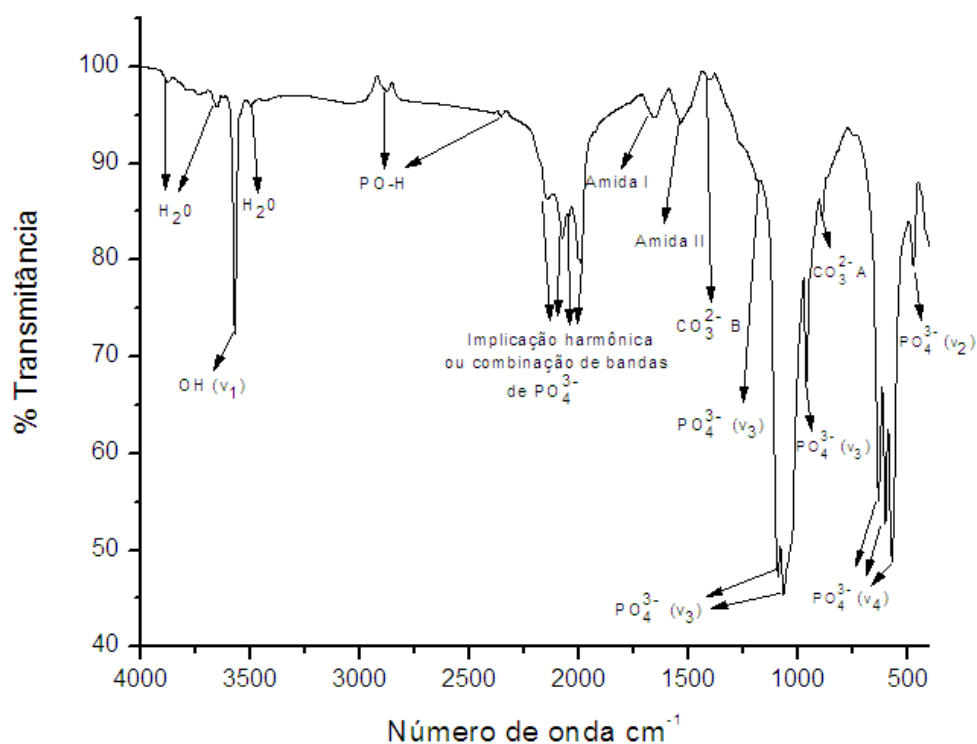


FIG. 5.34 Espectro da amostra HA 88 CTT sorvida com BSA, obtido por FTIR.

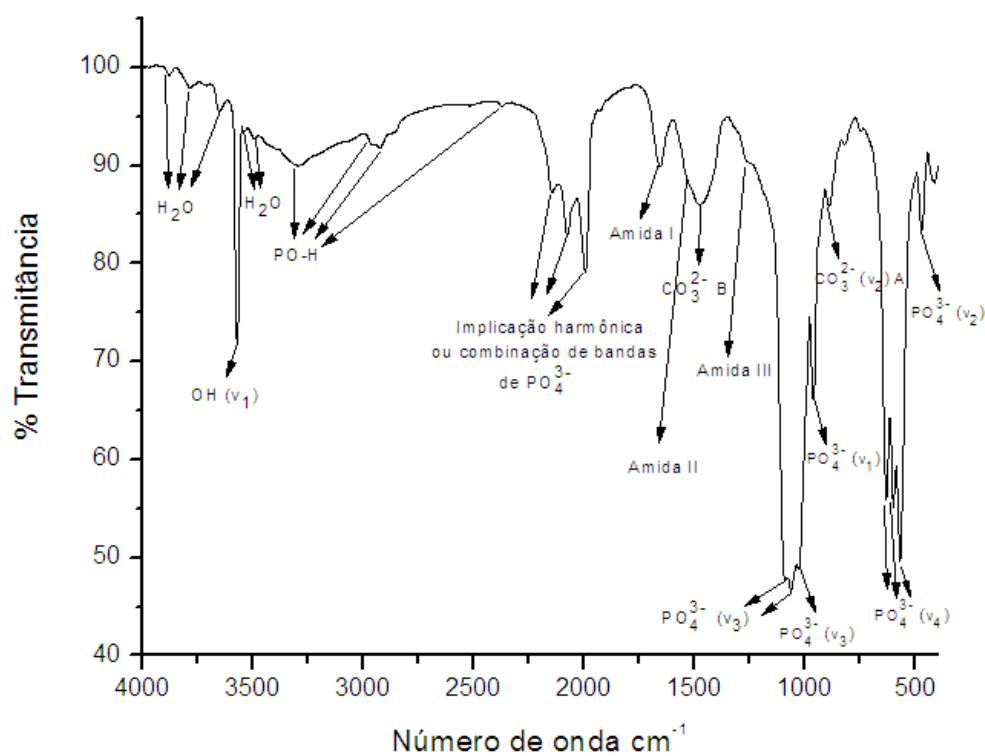


FIG. 5.35 Espectro da amostra HA 40 CTT sorvida com BSA, obtido por FTIR.

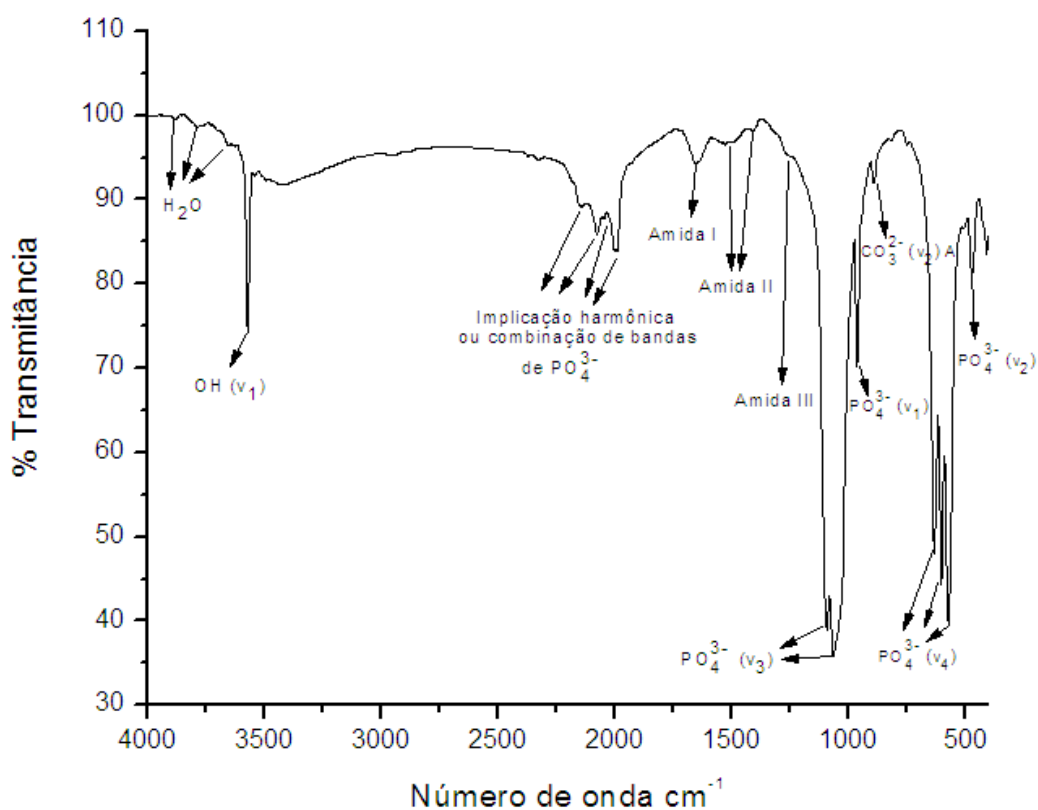


FIG. 5.36 Espectro da amostra HA 24 CTT sorvida com BSA, obtido por FTIR.

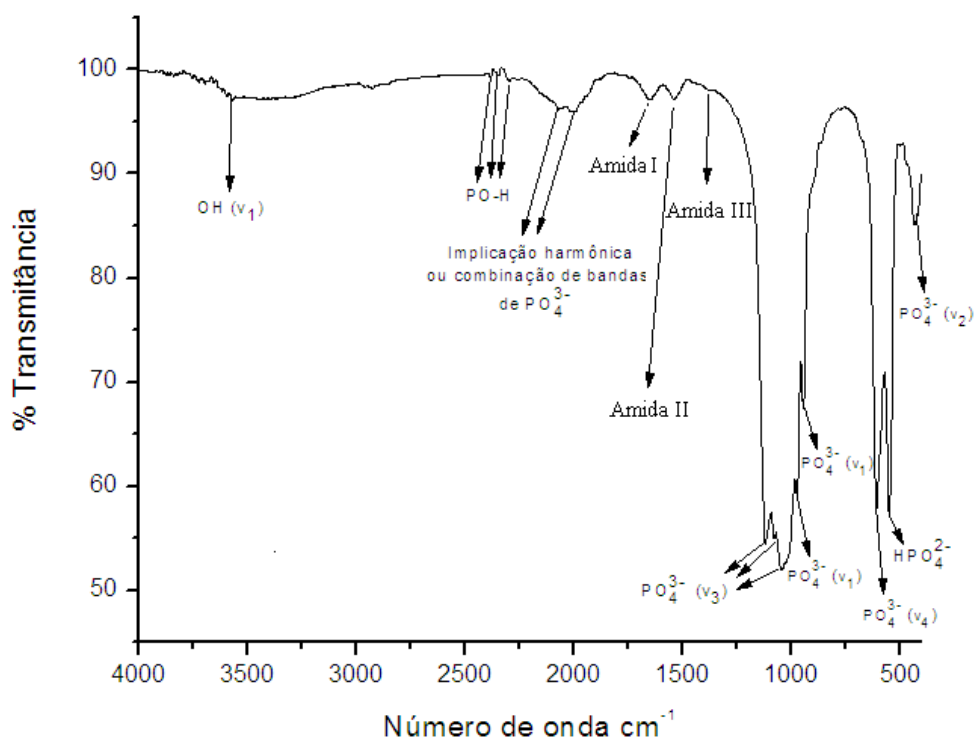


FIG. 5.37 Espectro da amostra HA PVP 24 CTT sorvida com BSA, obtido por FTIR.

TAB. 5.6 Grupos funcionais identificados nas amostras CTT sorvidas com BSA, por espectroscopia de infravermelho.

AMOSTRAS	FREQUENCIAS (cm ⁻¹)	GRUPOS FUNCIONAIS	REFERÊNCIAS
HA 88	3880/3651	H ₂ O	KOUTSOPOULOS, 2002
	3570	OH (v ₁)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3497	H ₂ O	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2875/2356	PO-H	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2143/2077	IH/CB de PO ³⁻ ₄	KOUTSOPOULOS, 2002
	2001/1989	IH/CB de PO ³⁻ ₄	KOUTSOPOULOS, 2002
	1652	Amida I	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1534	Amida II	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1409	CO ²⁻ ₃ B	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1188/1091	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1066/966	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	890	CO ²⁻ ₃ (v ₂) A	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	633/602/572	PO ³⁻ ₄ (v ₄)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	472	PO ³⁻ ₄ (v ₂)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
HA 40	3880/3787/3653	H ₂ O	KOUTSOPOULOS, 2002
	3572	OH (v ₁)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3538/3494	H ₂ O	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	3296/2961	PO-H	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2926/2370	PO-H	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2146/2076/1994	IH/CB de PO ³⁻ ₄	KOUTSOPOULOS, 2002
	1658	Amida I	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1523	Amida II	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1477	CO ²⁻ ₃ B	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	1257	Amida III	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1089/1063/1030	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	962	PO ³⁻ ₄ (v ₁)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	889	CO ²⁻ ₃ (v ₂) A	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	632/600/569	PO ³⁻ ₄ (v ₄)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	470	PO ³⁻ ₄ (v ₂)	SLÓSARCZYK <i>et al.</i> , 2005

HA 24	3883/3789/3653	H ₂ O	KOUTSOPOULOS, 2002
	3570	OH (v ₁)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	2146/2076	IH/CB de PO ³⁻ ₄	KOUTSOPOULOS, 2002
	2048/2001	IH/CB de PO ³⁻ ₄	KOUTSOPOULOS, 2002
	1658	Amida I	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1546	Amida II	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1528	Amida II	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1247	Amida III	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
	1092/1065	PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	962	PO ³⁻ ₄ (v ₁)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	891	CO ²⁻ ₃ (v ₂) A	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	633/602/572	PO ³⁻ ₄ (v ₄)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	472	PO ³⁻ ₄ (v ₂)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
	HA PVP 24	3575/3718	OH (v ₁)
2383/2346/2297		PO-H	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
2069/1994		IH/CB de PO ³⁻ ₄	KOUTSOPOULOS, 2002
1652		Amida I	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
1541		Amida II	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
1308		Amida III	KAIDEN <i>et al.</i> , 1987
1119/1080/1045		PO ³⁻ ₄ (v ₃)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
974/945		PO ³⁻ ₄ (v ₁)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
608		PO ³⁻ ₄ (v ₄)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
550		HPO ²⁻ ₄	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005
433		PO ³⁻ ₄ (v ₂)	SLÓŠARCZYK <i>et al.</i> , 2005

A amostra de HA PVP 24 CTT apresentou bandas pronunciadas dos grupos Amida I e Amida II (1652 cm⁻¹ e 1541 cm⁻¹, respectivamente) e uma banda mais estreita de Amida III (1308 cm⁻¹). A amostra de HA 24 CTT apresentou bandas pronunciadas de Amida I (1658 cm⁻¹), Amida II (1546 cm⁻¹ e 1528 cm⁻¹) e Amida III (1247 cm⁻¹). A amostra de HA 40 CTT apresentou bandas pronunciadas de Amida I (1658 cm⁻¹) e Amida III (1257 cm⁻¹) e uma banda estreita de Amida II (1523 cm⁻¹). A amostra de HA 88 CTT apresentou bandas pronunciadas de Amida I e II (1652 cm⁻¹ e 1534 cm⁻¹, respectivamente).

6 CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho, a partir dos resultados encontrados nas análises de caracterização físico-química das amostras de hidroxiapatita sintetizadas e de sorção e dessorção da BSA, pode concluir-se que:

1. Hidroxiapatita nanométrica pode ser sintetizada na presença do polímero PVP;
2. Foi possível obter hidroxiapatita pouco cristalina e/ou nanométrica semelhante ao padrão da fase mineral do osso humano em todas as amostras verdes de HA e nas amostras HA 88 CTT, HA 40 CTT e HA 24 CTT, de acordo com as análises de difração de raios X e de refinamento pelo método de Rietveld;
3. A amostra sintetizada com adição de PVP (HA PVP 24 CTT) apresentou outros fosfatos de cálcio após a sinterização. Esse resultado é atribuído à decomposição da brushita e da hidroxiapatita cálcio deficiente. A hipótese da precipitação de brushita aponta para a presença de hidroxiapatita cálcio deficiente, concomitantemente. Essa conclusão está embasada nos resultados das análises em FTIR, que indicaram a presença de bandas de brushita ou monetita;
4. Foi possível obter hidroxiapatita carbonatada do tipo B, semelhante às apatitas encontradas no esmalte dentário e no osso cortical, em todas as amostras de HA, de acordo com as análises de FTIR, com bandas de carbonato mais fortemente pronunciadas nas amostras de HA com 24 horas de envelhecimento dos precipitados;
5. As amostras de HA CTT apresentaram baixos valores da área de superfície que foram atribuídos à alta temperatura de sinterização (1100°C), indicando a relação de maior tamanho de cristalitos com menor valor de área de superfície;
6. Foi possível sintetizar partículas submicrométricas e nanométricas, formando diversos aglomerados. O resultado do tamanho dos grânulos foi diretamente proporcional ao tempo de envelhecimento dos precipitados (HA 88 > HA 40 > HA 24), de acordo com as análises de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. O tempo de 24

horas de envelhecimento dos precipitados propiciou a formação de partículas nanométricas de HA;

7. Foi verificada uma associação entre os cristais de HA e o PVP, formando um novo e criando um ambiente confinado para os cristais, o que possivelmente dificultou o crescimento dos grãos;
8. A HA PVP 24 sorveu 100% da BSA, seguida da HA 24 (50,05%). As amostras HA 88 e HA 40 sorveram valores menores de BSA, 27,54% e 13, 84%, respectivamente. Os resultados das amostras de HA CTT não apresentaram diferença significativa e foram menores do que os valores encontrados nas amostras verdes, de acordo com a análise de espectroscopia de UV-VIS, baseada na área de superfície das amostras. A BSA sorvida não desorveu sob ação da água Milli-Q®;
9. Os resultados de FTIR apresentaram maior capacidade de ligação da BSA à amostra HA PVP 24, que apresentou menor tamanho de partículas, sugerindo que a estrutura morfológica pode influenciar na interação do biomaterial com a proteína.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SAERI, M. R.; SORRELL, C. C. **Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite**. *Materials & Design*, v. 24, p. 197-202, 2003.
- ALBUQUERQUE, J. S. V. **Produção de cerâmicas bioativas porosa de apatitas nanométricas para aplicações biomédicas**. 2004. Tese (Engenharia e Ciência de Materiais), Universidade Federal do Ceará, 2004.
- AMORIM, A. M.; FRANZOI, A. C.; PIRES, A. T. N.; BERTOLINO, J. R. **Complexos formados entre poliacrilamida (PAA), polivinilpirrolidona (PVP) e sais de Cu (II): Propriedades térmicas e espectroscópicas**. In: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006, Foz do Iguaçu.
- ÂNGELO, L. C. **Síntese e caracterização de nanocompósitos hidroxiapatita-gelatina obtidos pelo método de precipitação utilizando o método de Rietveld e IVTF**. 2008. Dissertação (Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.
- ANUSAVICE, K. J. **Phillips Materiais Dentários**, 11^a ed, Elsevier, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CERÂMICA. Informações técnicas – Definição e Classificação. [online] 2010. Disponível: http://www.abceram.org.br/asp/abc_51.asp [capturado em 24 mai 2010].
- BAIA, J.; Lia, Y.; ZHANGA, C.; LIANGA, X.; YANG, Q. **Preparing AgBr nanoparticles in poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) nanofibers**. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.329, p. 165-168, 2008.
- BALASUNDARAM, G.; SATO, M.; WEBSTER, T. J. **Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD**. *Biomaterials*, v. 27, p. 2798-2805, 2006.
- BANERJEE A, BANDYOPADHYAY A, BOSE S. **Hydroxyapatite nanopowder synthesis, densification and cell-materials interaction**. *Mater Sci Eng C*, v. 27, p. 729-35, 2007.
- BIOMET. 2004. Biomet Annual Report, Biomet Inc., Warsaw, Indiana, USA, 2004.
- BOHNER, M. **Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphate Cements**. *Injury International Journal of the Care of the Injury*, v. 31, S-D37-47, 2000.
- BOO, J. S. *et al.* **Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold**. *J Craniof Surg*, v. 13, n. 2, p. 231-239, 2002.

- BOROJEVIC, R. **Medicina Regenerativa: terapias celulares, bioengenharia e biomimética.** Seminários temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C,T&I. Parcerias Estratégicas, n. 20, p. 1639-1647, 2005.
- BURG, K. L. J.; PORTER, S.; KELLAN, J. F. **Biomaterial developments for bone tissue engineering.** Biomaterials; v. 21, p. 2347-59, 2000.
- CAPT. 5. Caracterização de Catalisadores. [online]. 2010. Disponível: <https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/45814/1/Capt%205%20-%20Caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20de%20Catalisadores.doc> [capturado em 26 jul 2010].
- CARVALHO, P. S.; BASSI, A. P.; PEREIRA, L. A. **Revisão e proposta de nomenclatura para biomateriais.** Implant News, v. 1, n. 3, p. 255-9, 2004.
- CIENFUERGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental.** Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2000.
- CONZ, M. B.; SOARES, G. A.; GRANJEIRO, J. M. **Physicochemical characterization of six comercial hydroxyapatite for medical-dental applications as bone graft.** J Appl Oral Sci, v. 13, n. 2, p. 136-40, 2005.
- CRUZ, G. A.; SALLUM, E. A.; TOLEDO, S. **Estudo da morfologia de diferentes substitutos ósseos por meio de microscopia eletrônica de varredura.** Rev Periodontia, v. 15, n. 3, p. 21-28, 2005.
- CUNHA, S. M.; LAZAR, D. R. R.; USSUI, V.; LIMA, N. B.; BRESSIANI, A. H. A. **Síntese de hidroxiapatita por precipitação homogênea.** In: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais, 2004, Porto Alegre.
- DALAPICULA, S. S.; CONZ, M. B. **Caracterização físico-química de biomateriais para enxerto ósseo de origem alógena e xenógena.** Implant News, v. 5, n. 2, p. 205-13, 2008.
- DALEN, N.; OLSSON, K. E. **Bone mineral content and physical activity.** Acta Orthop Scand, v. 45, p. 170-176, 1974.
- DU, X.; CHU, Y.; XING, S.; DONG, L. **Hydrothermal synthesis of calcium hydroxyapatite nanorods in the presence of PVP.** J Mater Sci, v. 44, p. 6273-6279, 2009.
- DUNNE, G. *et al.* **Experimental tensiometric protein adsorption studies.** Surfaces A: Physicochem Eng. Aspects, v. 5, p. 364-367, 2010.
- ELIAS, C. N.; LIMA, J. H. C.; SANTOS, M. V. **Modificações na superfície dos implantes dentários: da pesquisa básica à aplicação clínica.** Implant News, v. 5, n. 5, p. 467-76, 2008.

- ELLIOT, J. C. **Structure and Chemistry of the Apatite and Other Calcium Orthophosphates**, 1^a ed., Amsterdam: Elsevier, 1994.
- FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J.; MANUEL, C. M. **Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies**. J. Applied Biomaterials & Biomechanics., v. 2, p. 74-80, 2004.
- FONSECA, F. M. **Biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por gelcasting**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais), Instituto Militar de Engenharia, 2007.
- FORMOSO M.L.L. **Difratometria de raios X**. In GOMES C.B. Técnicas analíticas instrumentais aplicadas à Geologia. São Paulo: Edgard Blucher, cap 1, p. 2-8, 1984.
- FRANCO, P. Q.; SILVA, J. C.; BORGES, J. P. **Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação**. Ciência & Tecnologia dos Materiais, v. 22, n. 1/2, p. 57-64, 2010.
- GARG, A.K. **Bone Physiology for dental implantology**. In: GARG AK Bone Biology, harvesting, grafting for dental implants. Rationale and clinical applications. Quintessence Publishing, Nova Deli China, cap. 1, p. 3-19, 2004.
- GRANJEIRO, J. M. **Papel dos Biomateriais e da Bioengenharia na Medicina Regenerativa**. 20 mai 2009. Disponível: http://www.biomateriais.com.br/telas/colunistas/conteudo.asp?id_colunista=4&id_area=6 [capturado em 24 mai 2010].
- HANCOX, N. M. *Biology of Bone*. Cambridge University Press, 1972.
- HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. **Materials Selection**. In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A, v. 2, p.1429-1463, 1995.
- HENCH, L. L. **Biomaterials**. Science, v. 208, p. 826-831, 1980.
- HENCH, L.L.; ETHRIDGE, E.C. **Characterization of Ceramic Surfaces**, Biomaterials, an Interface Approach. Academic Press, p. 76-82, 1982.
- HENCH, L.; POLAK, J. M. *Third Generation Biomedical Materials Science*, v. 295, p. 1014-1017, 2002.
- HENCH, L. L., WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. World Scientific, v. 1, p. 139-80, 1993.
- IVANOVA, T. I., FRANK-KAMENETSKAYA, O. V., KOL'TSOV, A. B., UGOLKOV, V. L. **Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition**. Journal of Solid State Chemistry, v. 160, p. 340-349, 2001.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Tecido ósseo**. In. Histologia básica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.; KELLEY, R.O. *Basic Histology*, 8. ed., U.S.A.: Appleton & Lange, 1995.
- KAIDEN, K; MATSUI, T; TANAKA, S. **A Study of the Amide III Band by FT-IR Spectrometry of the Secondary Structure of Albumin, Myoglobin, and γ -Globulin.** *Applied Spectroscopy*, v. 41, n. 2, p. 180-184, 1987.
- KALITA S. J., BHARDWAJ A.; BHATT H. A. **Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering.** *Mater Sci Eng C*, v. 27, p. 441-9, 2007.
- KANDORI, K; ODA, S; FUKUSUMI, M; MORISADA, Y. **Synthesis of positively charged calcium hydroxyapatite nano-crystals and their adsorption behavior of proteins.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 73, p. 140-45, 2009.
- KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. **Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar.** *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.
- KAWASAKI, K.; KAMBARA, M.; MATSUMURA, H.; NORDE, W. A. **Comparison of the Adsorption of Saliva Proteins and Some Typical Proteins Onto the Surface of Hydroxyapatite.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 32, p. 321-334, 2003.
- KOHN, D. H.; DUCHEYNE, P. **Materials for Bone and Joint Replacement.** In: CAHN, R.W.; HAASEN, P.; KRAMER, E.J. *Materials Science and Technology, A Comprehensive Treatment*, v. 14, WILLIAMS, D.F., 1 ed., Chapter 2., Cambridge, U.K., VCH, 1992.
- KONG, L. B.; MA, J.; BOEY, F. **Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process.** *J Materials Science*, v. 37, p. 1131-1134, 2002.
- KOUTSOPOULOS, S. **Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods.** *J Biomed Mater Res*, v. 62, p. 600-612, 2002
- KWEH, S.W.K.; KHOR, K.A.; CHEANG, P. **The production and characterization of hydroxyapatite (HA) powders.** *J.Mater.Process.Tech.*, v. 89-90, p. 373-377, 1999.
- LEGEROS, R. Z. **Biological and Synthetic Apatites.** In: BROWN, P.W.; CONSTANTZ, B. *Hydroxyapatite and Related Materials*, CRC Press, Boca Raton, p. 3-28, 1994.
- LEGEROS, R. Z. **Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine.** *Monographs in Oral Science*, v. 15, Basel: Karger, 1991.
- LEGEROS, R. Z. **Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphate.** *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 395, p. 81-98, 2002.
- LEGEROS, R. Z.; LEGEROS, J. P. **Dense Hydroxyapatite.** In: HENCH, L. L., WILSON, J. (eds), *An Introduction to Bioceramics*, 1 ed., chapter 9, Gainesville, USA, World Scientific, 1993.

- LEGEROS, R. Z; LEGEROS, J. P.; DACULSI, G.; KIJKOWSKA, R. **Calcium phosphate biomaterials: preparation, properties and biodegradation**. In: Wise DL, editors. Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering. Part A: materials, v. II. New York, USA: Marcel Dekker; p.1429-63, 1995.
- LENNINGER, J. Princípios de Bioquímica, Cap. 7, ed. Savier, p.118-142, 1998.
- MANNHEIMER W. **Microscopia dos Materiais- Uma Introdução**. Ed. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise , e-papers, 2002.
- MAVROPOULOS, E.; ROCHA, N. C.; ROCHA-LEÃO, M. H.; SANTOS, S. R.; ROSSI, A. M. **BSA adsorption on hydroxyapatite after thermal treatment**. Key Engineering Materials, v. 361-363, p. 127-130, 2008.
- MAVROPOULOS, E.; COSTA, A. M.; COSTA, L. T.; ACHETE, C. A.; MELLO, A.; GRANJEIRO, J. M.; ROSSI, A. M. **Adsorption and bioactivity studies of albumin onto hydroxyapatite surface**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 83, p. 1-9, 2011.
- MENDES, L. L.; RODRIGUES, R. C.; SILVA, E. P. **Thermal, structural and morphological assessment of PVP/HA composites**. J Therm Anal Calorim (2010), DOI 10.1007/s10973-010-0835-4.
- MOBASHERPOUR, I; HESHAJIN M. S.; KAZEMZADEH A.; ZAKERI M. **Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method**. J Alloys and Compounds, v. 430, p. 330-333, 2007.
- MUNDY, G. R. **Bone remodeling**. In: MUNDY, G. R. Bone Remodeling and its disorders. 2ed. London: Martin Dunitz, p. 1-11, 1999.
- MURUGAN R.; RAMAKRISHNA S. **Development of nanocomposites for bone grafting**. Compos Sci Technol, v. 65, p. 2385-406, 2005.
- NAYAR, S.; SINHA, M. K.; BASUD, D.; SINHA, A. **Synthesis and sintering of biomimética hydroxyapatite nanoparticles for biomedical applications**. J Mater Sci: Mater Med, v. 17, p. 1063-1068, 2006.
- NEREN, R. M. **Tissue Engineering in the USA**. Med. Biol. Eng. Comput, v.30, p..CE8, 1992.
- ORÉFICE R. L., PEREIRA M. M., MANSUR H. S. Biomateriais- Fundamentos e Aplicações , Rio de Janeiro: Ed.Cultura Médica, 2006.
- PARHI, P.; RAMANAN, A.; RAY, A. R. **A convenient route for the synthesis of hydroxyapatite through a novel microwave-mediated metathesis reaction**. Materials Letters, v. 58, p. 3610-3612, 2004.

- PILLIAR, R.M.; FILLAGGI, M. J.; WLLS, J. D.; GRYNPAS, M. D.; KANDEL, R. A. **Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute application – in vitro characterization.** *Biomaterials*, v. 22, p. 963-72, 2001.
- PRADO DA SILVA, M. H. **Recobrimento de titânio com hidroxiapatita: Desenvolvimento do processo de deposição eletrolítica e caracterização biológica *in vitro*.** 1999. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais), Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, 1999.
- QIU, C. F.; XIAO, X. F.; LIU, R. F.; SHE, H. D. **Biomimetic synthesis of spherical nano-hydroxyapatite with polyvinylpyrrolidone as template.** *Materials Science and Technology*, v. 24, n. 5, p. 612-617, 2008.
- RAJABI-ZAMANI, A. H.; BEHNAMGHADER A.; KAZEMZADEH A. **Synthesis of nanocrystalline carbonated hydroxyapatite powder via nonalkoxide sol-gel method.** *Materials Science and Engineering C*, v. 28, p. 1326-1329, 2008.
- RAYNAULD, S., CHAMPION, E., BERNACHE-ASSOLANT, D., LAVAL, J. P. **Determination of Calcium/ Phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using X-ray diffractometry.** *J. Am. Ceram. Soc.*, v.84, p. 355-66, 2001.
- REHMAN, I; SMITH, R; HENCH, L L; BONFIELD, W. **Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy.** *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 29, n. 10, p. 1287-94, 2005.
- RHO, J-Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P., **Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone,** *Medical Engineering & Physics*, v. 20, p. 92-102, 1998.
- RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação.** *Rev Dental Press Periodontia Implantol*, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.
- RIMAN, R. E.; SUCHANEK, W. L.; BYRAPPA, K.; CHEN, C-W.; SHUK, P.; OAKES, C. S. **Solution synthesis of hidroxyapatite designer particles.** *Solid State Ionics*, v.151, p. 393-402, 2002.
- RODRIGUES, C. V. M.; SERRICELLA, P.; LINHARES, A. B. R.; GUERDES, R. M.; BOROJEVIC, R.; ROSSI, M. A.; DUARTE, M. E. L.; FARINA, M. **Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering.** *Biomaterials*, v. 24, p. 4987- 4997, 2003.
- RODRÍGUES-LORENZO, L. M.; VALLET-REGI, M. **Controlled Crystallization of Calcium Phosphate Apatites.** *Chemistry of Materials*, v. 12, p. 2460-2465, 2000.
- SANOSH, K. P.; CHU, M-C; BALAKRISHNAN, A; KIM, T. N.; CHO, S-J. **Preparation and characterization of nano-hidroxyapatite powder using sol-gel technique.** *Bull. Mater. Sci.*, v. 32, n. 5, p. 465–470, 2008.

- SENA, L. A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas**. 2004. Tese (Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- SERVICE, R. F. **Tissue engineers build new bone**. Science, v. 289, n. 484, p. 1498-500, 2000.
- SILVA, I. I. C. **Avaliação do potencial osteogênico de células progenitoras de sangue de cordão umbilical humano e periósteo de ratos e do potencial osteocondutor de xenoenxerto bovino na terapia de perdas ósseas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia), Universidade Federal Fluminense, 2008.
- SILVA, I. I. C.; RAMIREZ C. M.; CASTRO L.O.; MIRANDA T. R. S.; GRANJEIRO J. M. **Osteogenic potential of rat periosteal mesenchymal progenitor cells and biological compatibility of hydroxyapatite/collagen carrier: in vitro study**. The 8th World Biomaterial Congress, May 2008, Amsterdam.
- SIMONS, S. J. R. **Modelling of agglomerating systems: From spheres to fractals**. Powder Technology, v. 87, n. 1, p. 29-41, 1996.
- SLÓSARCZYK, A.; PASZKIEWICZ Z.; PALUSZKIEWICZ C. **FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods**. J Molecular Structure, p. 657-661, 2005.
- SOMCHAI, P. 1992. Ph.D. Dissertation, Queen Mary and Westfield College, University of London, 1992.
- SOUZA, C. A. S. **Produção e caracterização de hidroxiapatita com atividade antimicrobiana**. 2010. Tese (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- SUCHANEK, W.; YOSHIMURA, M. **Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants**. J Mater Res, v. 13, n. 1, p. 94-117, 1998.
- SUPOVÁ, M. **Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review**. J Mater Sci: Mater Med, v. 20, p. 1201-1213, 2009.
- TANAKA, T.; HIROSE, M.; KOTOBUKI, N.; OHGUSHI, H.; FURUZONO, T.; SATO, J. Mater. Sci. Eng., v. 817, n. 27, 2007.
- TEIXEIRA, R. G.; VIDAL, B. C.; SANTOS, E. P. **Reposicionamento cirúrgico de um segundo molar inferior direito impactado com cárie – Relato de caso**. Jornal Brasileiro de Ortodontia Facial, v. 5, n. 30, p. 76-81, 2000.
- TEN CATE, R. Histologia bucal. **Desenvolvimento, estrutura e função**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

- UEDA, M. **Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery**. Materials Science and Engineering, v.13, p.7-14, 2000.
- UNICAMP. **Processamento de materiais cerâmicos**. [online] 2011. Disponível: ftp://ftp.fem.unicamp.br/pub/EM833/CER3_97.DOC [capturado em 11 mai 2011].
- VASCONCELOS, V.; PINTO, L. C. M. **Estudo de orientação de partículas em aglomerados gerados por modelos bidimensionais**. Cerâmica, v. 43, n. 283-284, 1997.
- VIANA, R. B. **Espectroscopia de infravermelho de cristalitos de surfactantes**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica), Universidade de São Paulo, 2008.
- VILLARREAL, D. R.; SOGAL, A.; ONG, J. L. **Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces**. Journal of Oral Implantology, v. 24, n. 2, p. 67-73, 1998.
- WANG, J.; SHAW, L. L. **Nanocrystalline hydroxyapatite with simultaneous enhancements in hardness and toughness**. Biomaterials (2009), doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.048.
- YOUNG R.A. **The Rietveld Method**. International Union of Crystallography Monographs on Crystallography, Ed. Oxford Science Publications, n. 5, p.5-38, 1995.
- ZHANG, Y.; LU, J. **A mild and efficient biomimética synthesis of rodlike hydroxyapatite particles with a high aspect ratio using polyvinylpyrrolidone as capping agent**. Crystal growth & Design, v. 8, n. 7, p. 2101-2107, 2008.