

Síntese e caracterização de diferentes estruturas fibrosas de hidroxiapatita utilizando o método de réplica de fibras orgânicas (biotemplates)

Gian Francesco dos Reis Paganotto



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Engenharia de Materiais



Trabalho de conclusão de Curso

Síntese e caracterização de diferentes estruturas fibrosas de Hidroxiapatita utilizando o método de réplica de fibras orgânicas (biotemplates)

Gian Francesco dos Reis Paganotto

Pelotas, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Engenharia de Materiais



Trabalho de Conclusão de Curso

**Síntese e caracterização de diferentes estruturas fibrosas de Hidroxiapatita
utilizando o método de réplica de fibras orgânicas (biotemplates)**

Gian Francesco dos Reis Paganotto

Pelotas, 2014

Gian Francesco dos Reis Paganotto

Síntese e caracterização de diferentes estruturas fibrosas de Hidroxiapatita utilizando o método de réplica de fibras orgânicas (biotemplates)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de
Desenvolvimento Tecnológico da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Neftali Lenin Villarreal Carreño

Coorientador: Evandro Piva

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P131s Paganotto, Gian Francesco dos Reis

Síntese e caracterização de diferentes estruturas
fibrosas de hidroxiapatita utilizando o método de réplica de
fibras orgânicas (biotemplates) / Gian Francesco dos Reis
Paganotto ; Neftali Lenin Villarreal Carreño, orientador. —
Pelotas, 2013.

52 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Engenharia de Materiais) — Centro de Desenvolvimento
Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

1. Hidroxiapatita. 2. Biotemplates. 3. Método de réplica.
I. Carreño, Neftali Lenin Villarreal, orient. II. Título.

CDD : 620.11063

Elaborada por Aline Herbstrith Batista CRB: 10/1737

Gian Francesco dos Reis Paganotto

**Síntese e caracterização de diferentes estruturas fibrosas de Hidroxiapatita
utilizando o método de réplica de fibras orgânicas (biotemplates)**

**Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para
obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Materiais, Centro de
Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.**

Data da Defesa: 10/02/2014

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Neftali Lenin Villarreal Carreño (Orientador)
Doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos

.....
Prof.^a Dr.^a Giana da Silveira Lima
Doutora em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Fabrício Aulo Ogliari
Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

À minha esposa, pelo seu enorme incentivo, companheirismo, amizade, por seu amor, atenção e compreensão.

Aos meus pais, por todo carinho, educação, pelo apoio e incentivo, que contribuíram e muito na minha busca profissional.

Ao meu orientador, professor Dr. Neftali Lenin Villarreal Carreño pela orientação, credibilidade, atenção, apoio, por sua grande amizade e por seus ensinamentos.

A professora Dr^a, Margarete R. F. Gonçalves pela credibilidade, atenção, por seus conselhos, por sua grande amizade, por seu apoio e por seus ensinamentos.

Ao professor Dr. Evandro Piva, por sua orientação na pesquisa científica, por seu apoio, atenção, amizade, credibilidade e ensinamentos.

Aos professores do curso de Engenharia de Materiais por seus ensinamentos, pela disposição, amizade, apoio e atenção.

Aos colaboradores do curso de Engenharia de Materiais por sua amizade, me apoiar em minha formação contribuindo com suas tarefas e sempre dispostos a ajudar.

Agradeço também a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista.

O meu muito obrigado.

Resumo

PAGANOTTO, Gian Francesco dos Reis. Síntese e caracterização de diferentes estruturas fibrosas de Hidroxiapatita utilizando o método de réplica de fibras orgânicas (biotemplates). 2014. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Materiais) - Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

O desenvolvimento de biomateriais têm se mostrado fundamental para a melhoria do nível e da qualidade de vida da população. Este trabalho trata da síntese de uma biocerâmica, hidroxiapatita (HA), utilizando o método de réplica de biotemplates. Sua síntese ocorre a partir da realização da formação de uma resina pelo método Pechini, qual é impregnada em diferentes materiais orgânicos com estruturas porosas e entrelaçada. A estrutura escolhida e impregnada passa por um tratamento térmico para formar a hidroxiapatita em estrutura replicada. Posteriormente é realizada uma série de caracterizações para avaliar as propriedades da biocerâmica. Foi realizada análise por infravermelho (FTIR), difração de raios X (DRX), fluorescência de raios X (EDX), análise de fisissorção de nitrogênio (BET,BJH) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises demonstraram que a hidroxiapatita obtida apresenta estrutura cristalina hexagonal, segundo ficha PDF 89-6439. Os resultados de fisissorção de nitrogênio demonstraram que HA é mesoporosa. A análise química por EDX demonstrou a presença dos íons formadores da HA. A análise por infravermelho apresentou picos característicos da HA, convalidando os resultados obtidos pela análise de difração. As micrografias apresentaram as microestruturas dos materiais orgânicos e suas réplicas, utilizando o método do trabalho. O método utilizado mostrou-se eficaz para obtenção de biocerâmicas em variadas formas porosas, podendo ser aplicado como um scaffold, para área de regeneração óssea.

Palavras-chave: hidroxiapatita; biotemplates; método de réplica

Abstract

PAGANOTTO, Gian Francesco dos Reis. Synthesis and characterization of different fibrous structures Hydroxyapatite using the method replica organic fibers (biotemplates). 2014. 52f. Coursework (Graduate in Materials Engineering) - Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

The development of biomaterials have been shown to be critical to improving the level and quality of life. This work deals with the synthesis of a bioceramics, hydroxyapatite (HA) using the method replica biotemplates. Its synthesis occurs from the day of formation of a resin by Pechini method , which is steeped in different organic materials with porous structures and entwined . The structure chosen and impregnated undergoes heat treatment to form the hydroxyapatite structure replicated. Subsequently a number of characterizations to evaluate the properties of bioceramics is performed. By infrared analysis (FTIR) , X-ray diffraction (XRD) , X-ray fluorescence (EDX) analysis of nitrogen physisorption (BET , BJH) and scanning electron microscopy (SEM) was performed . The analyzes showed that the hydroxyapatite obtained has hexagonal crystal structure, according PDF 89-6439 record. The results of nitrogen physisorption showed that HA is mesoporous. Chemical analysis by EDX showed the presence of ions forming the HA. The infrared analysis showed characteristic peaks of HA, convalidando the results obtained by diffraction analysis. The micrographs show the microstructures of organic materials and their replicas using the method of working. The method used was effective for obtaining porous bioceramics in various forms and can be applied as a scaffold for bone regeneration area.

Key-words: Hydroxyapatite; biotemplates; method replica

Lista de Figuras

Figura 1- Ilustração do diagrama de mercado de produtos em dólares (US\$) por ano; a) músculos-esqueléticos, b) ortopédicos e c) implantes dentários.	6
Figura 2 - Fluxograma demonstrativo da classificação e relação dos biomateriais...	10
Figura 3- Tipos de interação entre implante e organismo: (a) Bioinertes e Biotoleráveis (b) Bioativos.....	12
Figura 4 - Abordagem geral de todo o processo de engenharia de tecidos.	14
Figura 5 - Estrutura hierárquica do osso compacto.....	19
Figura 6 - Diagrama de equilíbrio de fases do sistema CaO-P ₂ O ₅ , sob pressão parcial de água de 500 torr (66 kPa). Obs: HA= hidroxiapatita, C=CaO, P=P ₂ O ₅	22
Figura 7 - Representação da estrutura cristalina da hidroxiapatita (a) ao longo do eixo c e (b) no plano ab.....	23
Figura 8 - Fluxograma demonstrativo dos métodos mais usados por literaturas para produção de HA.	24
Figura 9 - Apresentação das principais reações envolvidas no métodos via úmida..	26
Figura 10 – Mecanismos da reação de poliesterificação; (a) formação do citrato metálico(b) formação da resina poliéster precursora da HÁ	28
Figura 11 - Ilustração do procedimento de impregnação no método de réplica	29
Figura 12 - Padrões de difração estabelecidos pela ISO 13779-3, onde (a) padrão de HA pura e (b) padrão de HA com 5% da fase TCP	31
Figura 13 - Análise por infravermelho (FTIR) de HA comercial.	31
Figura 14 - Fluxograma da rota seguida pelo trabalho.....	32
Figura 15 - Fotografia dos reagentes utilizados na reação via úmida.	33
Figura 16: Infravermelho para Hidroxiapatita. Réplica algodão 1200°C	39
Figura 17: (A) Isoterma de fisissorção de N ₂ e (B) análise de distribuição de poros.	41
Figura 18: Gráficos de difração de HA replicada dos biotemplates f1 (algodão), f2 (coco) e f3 (banana).....	42
Figura 19: Gráficos de difração de HA replicada dos biotemplates f4 (gaze), f5 (barbante) e f6 (esponja orgânica).....	43
Figura 20: Micrografia obtida para a fibra de coco à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.	45

Figura 21: Micrografia obtida para a fibra de banana à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.	45
Figura 22: Micrografia obtida para a gaze comercial à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.	46
Figura 23: Micrografia obtida para as fibras do cordão de barbante à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.	46
Figura 24: Micrografia obtida para a fibra da esponja orgânica à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.	46
Figura 25: Micrografia obtida para a fibra de algodão à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.	47
Figura 26: Micrografias obtidas para fibras replicadas de algodão.	47

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Diferentes fosfatos de cálcio e suas respectivas razões molares.	20
Tabela 2: Resultados dos cálculos obtidos pela análise de fisissorção	40
Tabela 3: Resultado Quantitativo da análise química da HA em diferentes biotemplates.....	44

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	4
2.1.	Geral	4
2.2.	Específicos	4
3.	Revisão Bibliográfica	5
3.1.	Biomateriais.....	5
3.1.1	Classificação dos Biomateriais	9
3.1.1.1	Biomateriais Biológicos ou Bioenxertos	10
3.1.1.2	Biomateriais Sintéticos.....	11
3.2	Engenharia Tecidual	13
3.3.	Biocerâmicas.....	15
3.3.1.	Cerâmicas Inertes (ou Quase Inertes).....	16
3.3.2.	Cerâmicas Porosas e Recobrimento Cerâmico	16
3.3.3.	Cerâmicas bioreabsorvíveis.....	17
3.3.4.	Cerâmicas Bioativas	17
3.4.	Fosfatos de Cálcio.....	17
3.5.	Hidroxiapatita	Erro! Indicador não definido.
3.5.1.	Características Químicas da Hidroxiapatita	20
3.5.2.	Características Cristalográficas da Hidroxiapatita	Erro! Indicador não definido.
3.5.3.	Métodos de obtenção de hidroxiapatita	23
3.5.3.1	Biotemplates.....	27
3.5.3.2	Método dos precursores poliméricos.....	27
3.5.3.3	Método de réplica.....	Erro! Indicador não definido.
3.5.4	Processos de caracterização de HA	Erro! Indicador não definido.
4	Metodologia	32
4.1.	Síntese química da resina precursora de hidroxiapatita utilizando o método de Pechini	32

4.2.	Impregnação das fibras orgânicas	34
4.3.	Calcinação.....	35
4.4.	Etapas de caracterização	35
4.4.1	Análise por Difração de raios X	35
4.4.2.	Espectrometria de fluorescência de raios x por energia dispersiva (EDX)	36
4.4.3.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
4.4.4.	Espectroscopia de infravermelho.....	37
4.4.5.	Análise da porosidade e área superficial (fisissorção de nitrogênio) 37	
5.	Resultados e discussão	38
5.1.	Síntese química método Pechini	38
5.2.	Fibras impregnadas.....	38
5.3.	Calcinação.....	39
5.4.	Caracterizações	39
5.5.	Análise por fisissorção de nitrogênio	40
5.6.	Difração de Raios X	41
5.7.	Espectrometria de fluorescência de raios x por energia dispersiva (EDX)	43
5.8.	Microscopia Eletrônica de varredura	44
5.9.	Avaliação In vitro	47
6.	Conclusão	48
	Referências	49

1. Introdução

O desgaste do corpo humano assim como a perda de suas funções é um processo que ocorre naturalmente com o envelhecimento. Mesmo que os fatores deste processo não sejam totalmente entendidos, as respostas do corpo em virtude deste envelhecimento são nítidas. Algumas partes do sistema biológico humano começam a perder suas propriedades e com o decorrer do tempo falham, causando uma série de inconvenientes. O mau funcionamento deste sistema gera diversos incômodos, tais como dores, processos inflamatórios e até a perda da funcionalidade de órgãos e tecidos que o constituem (ORÉFICE et al., 2012). Com isto, o desenvolvimento de biomateriais apresenta papel fundamental na melhoria do nível de vida das pessoas devido ao aumento da expectativa e da qualidade de vida, em função das melhorias nas condições de saúde e bem estar da população (VOLKMER, 2006).

O conhecimento sobre biomateriais não é algo recente, porém sua aplicação de forma adequada é, pois se faz necessário o entendimento de diversos fatores para sua utilização. Entre eles, e mais importante, é o comportamento biológico do corpo humano, e principalmente da região que receberá o implante, pois, a partir da necessidade do corpo será moldado o biomaterial coerente e mais adequado com propriedades definidas para tal ação (BICALHO et al., 2011).

O sistema biológico dos seres humanos está em constante evolução, apresentando uma série de modificações com o decorrer do tempo. Desta forma, a realização do estudo científico e desenvolvimento de determinado biomaterial, pode sofrer mudanças a qualquer momento, mesmo depois de confeccionado para sua aplicação, pois sua utilização tem de se adequar ao lugar em que será colocado. Desta forma, vêm crescendo cada vez mais o número de pesquisas relacionadas com o desenvolvimento e processamento de diferentes tipos de biomateriais com as mais variadas aplicações, os quais envolvem todas as classes de materiais, tais como os metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos (ANGELO, 2008; BICALHO et al., 2011; ORÉFICE et al., 2012).

Dentre os diversos tipos de biomateriais, as biocerâmicas apresentam um grande interesse de aplicação devido às suas propriedades mecânicas, inércia química, biocompatibilidade e/ou bioatividade, que dependerão do tipo de

biocerâmica aplicada (DOURADO, 2006; GERHARDT; BOCCACCINI, 2010; VOLKMER, 2006). As cerâmicas utilizadas como biomateriais são subdivididas em classes, de acordo com o tipo de interação com o sistema biológico, podendo ser classificadas como cerâmicas inertes (quase inertes) ou cerâmicas bioativas. Aquelas classificadas como inerte não interagem com o sistema biológico, mas também não apresentam elevado grau de rejeição, ou seja, são compatíveis e em certo grau tornam-se inertes. As cerâmicas bioativas interagem em certo grau com a região na qual é implantada favorecendo sua adaptação ao corpo e, muitas vezes, acelerando o processo de cura da região (BAUER et al., 2012; BICALHO et al., 2011; ORÉFICE et al., 2012; VOLKMER, 2006).

Dentre as cerâmicas bioativas, temos a classe dos fosfatos de cálcio, classe a qual pertence a hidroxiapatita (HA), cuja fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, possuindo composição química similar à fase mineral dos ossos e dentes humanos. A hidroxiapatita já é bastante utilizada nas áreas da odontologia e medicina, muitas vezes como substituto ósseo, devido às suas características como cerâmica bioativa. Tal similaridade favorece o crescimento ósseo nos locais onde a HA é implantada, por meio de ligações de natureza química, uma vez que as células da região onde será implantada a HA não fazem distinção entre a HA aplicada e a superfície óssea (AFSHAR et al., 2003; ANGELO, 2008; BAUER et al., 2012; DOURADO, 2006; HE et al., 2012; ORÉFICE et al., 2012; VOLKMER, 2006; WATARI et al., 2004).

Inúmeras técnicas são utilizadas para produção da HA, as quais são classificadas em função do processamento e/ou do estado e fase em que ocorrerão as reações originárias da HA. Porém, estas técnicas podem subdividir-se em três grupos. No primeiro grupo estão os métodos para síntese dos pós de HA, como os métodos via seca, via úmida e processos hidrotermais. Os pós formados por estes métodos muitas vezes são utilizados no segundo grupo para confeccionar as formas desejadas de HA. Assim, no segundo grupo enquadram-se os processos e métodos para produção de HA densa e macroporosa (contendo no máximo 5% em poros), que incluem métodos como sinterização sob pressão, prensagem a quente, prensagem isostática a quente (todos estes métodos são submetidos a sinterização) e demais métodos que produzam HA com as características descritas anteriormente. O último grupo consiste nos métodos aplicados à produção de HA porosa, como o

método da réplica de esponja polimérica, conversão hidrotermal de corais, reações no estado sólido com eliminações de gases, entre outros que visam produzir HA porosa (BICALHO et al., 2011; HE et al., 2010; HE et al., 2012; LACERDA, 2005; MOBASHERPOUR et al., 2007; MOTSKIN et al., 2009; ORÉFICE et al., 2012; RIGO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2012; SANTOS et al., 2005; VOLKMER, 2006).

Muitos estudos demonstram a utilização da HA como scaffolds (matriz extracelular), principalmente em combinação com outros materiais formando compósitos que usam a atribuição de bioatividade dado à HA. Além de todos os fatores relacionados com as propriedades biológicas, principalmente a biocompatibilidade do material, outro fator muito importante nos scaffolds são suas propriedades físico-químicas, as quais influenciam e muito nos resultados obtidos com sua utilização. O número, tamanho, distribuição e forma de poros, área superficial do material assim como sua forma são alguns dos diversos fatores que podem influenciar nas propriedades finais de um scaffold (ANGELO, 2008; BAUER et al., 2012; BICALHO et al., 2011; FROHBERGH et al., 2012; LACERDA, 2005; SADAT-SHOJAI et al., 2013; WATARI et al., 2004; ZAKHAROV et al., 2004; ZHAO et al., 2011).

A área do conhecimento que engloba o estudo dos scaffolds é a Engenharia de Tecidos, que envolve todo estudo e conhecimento sobre manipulação e desenvolvimento de organismos (células, tecidos, órgãos ou moléculas) para substituir ou melhorar partes do corpo defeituosas ou danificadas (ORÉFICE et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012; FROHBERGH et al., 2012).

Este trabalho visa o estudo da síntese e caracterização de HA em diversas formas fibrosas, usando diferentes fibras de origem orgânica como biotemplates, por meio de rota química pelo processo de réplica, visando sua posterior aplicação como scaffold na área da odontologia.

2. Objetivos

2.1. Geral

Realizar a síntese das diferentes fibras de HA utilizando o método dos precursores poliméricos e a técnica da réplica de fibras orgânicas (biotemplates), visando à obtenção de diferentes formatos de fibras para futura avaliação de suas propriedades como scaffold.

2.2. Específicos

- Realizar o controle estequiométrico por meio de cálculos de balanço a fim de obter reação correta com distribuição adequada de reagentes para obtenção dos produtos;
- Realizar o procedimento de síntese das diferentes fibras, controlando todo o processo de reações químicas, impregnação dos biotemplates e tratamentos térmicos;
- Caracterizar as fibras de HA quanto sua morfologia, composição de fases cristalográfica, composição e formação química, porosidade e área superficial.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Biomateriais

Os biomateriais apresentam grande campo de aplicação, devido essencialmente aos benefícios que trazem aos seres humanos quando ajudam a melhorar suas condições e nível de vida. Os custos associados aos biomateriais são os mais diversos, porém não estão entre os principais critérios de seleção de materiais. Em geral possuem custos relativamente altos e vêm ganhando cada vez mais espaço no quadro econômico do mercado mundial. Esta crescente demanda está associada, dentre outros fatores, com o aumento da população e da expectativa de vida. Como um exemplo, em 2000 o mercado mundial de biomateriais foi estimado em US\$ 23 bilhões, e a taxa de crescimento de 12% ao ano, ultrapassando, pela estimativa, US\$ 40 bilhões de dólares em 2005. Deste mercado, cerca de 35% é dos Estados Unidos (EUA), 25% da Europa e o restante (40%) dividido entre os demais países (FARIA et al., 2012; SOARES, 2006).

A figura 1 demonstra os histogramas de investimento em dólares dos Estados Unidos em 2009, com valores que superam o mercado mundial em 2000 (OLIVEIRA, 2010). Apesar de o Brasil estar representando uma parte pequena do mercado mundial, em 2004 o SUS (Sistema Único de Saúde) apresentou gastos de R\$ 145 milhões com próteses ortopédicas, das quais R\$ 30 milhões foram para compra de próteses para artroplastia total de quadril (FARIA et al., 2012; SOARES, 2006).

Biomateriais é uma classe de materiais com aplicação em dispositivos médicos e sistemas biológicos, utilizados em contato direto ou indireto com o corpo humano. Existem diversas definições para biomateriais, as quais partem de centros e comitês internacionais de pesquisas e desenvolvimento de biomateriais, e sua utilização é normatizada e fiscalizada por órgãos específicos, como por exemplo, ABNT e ANVISA (SOARES, 2006).

Todas as definições para biomateriais apresentam o mesmo princípio que é determinar as propriedades necessárias para que um material esteja incluso na classe dos biomateriais. Dentre as definições, uma das mais correntes é dada por

Park e Bronzino (2002), na qual descreve que “Biomateriais são todos os materiais que, de modo contínuo ou intermitente, entram em contato com fluidos corpóreos, mesmo que estejam localizados fora do corpo”.

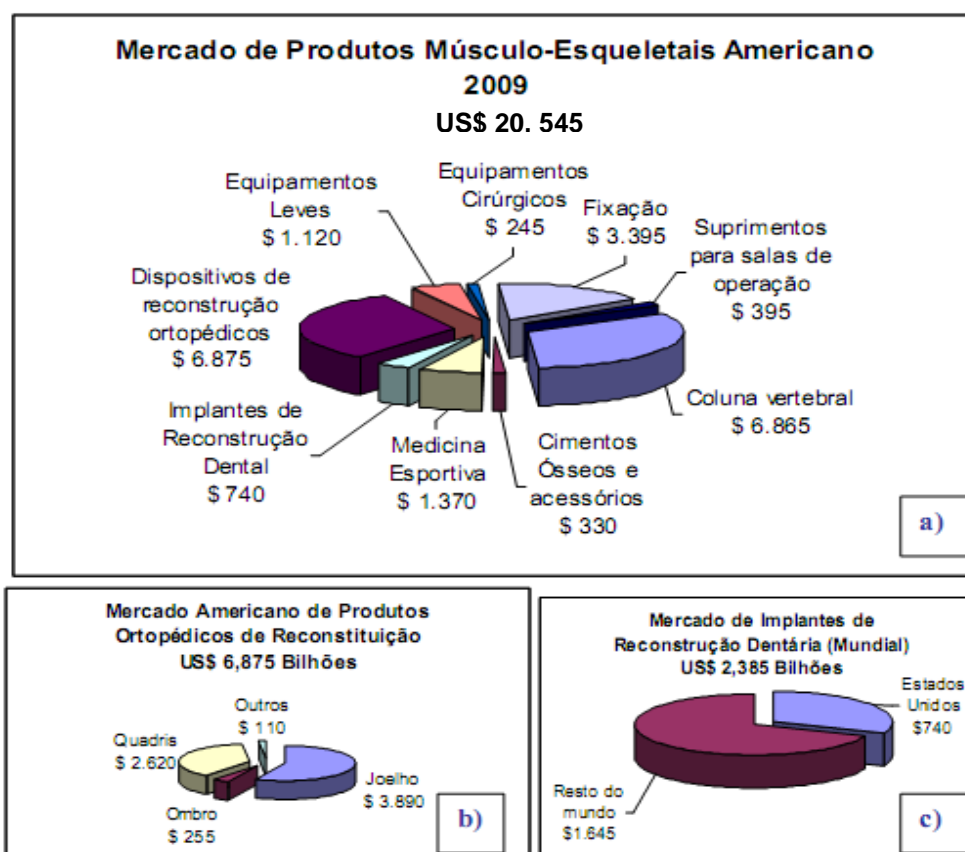


Figura 1- Ilustração do diagrama de mercado de produtos em dólares (US\$) por ano; a) músculos-esqueletais, b) ortopédicos e c) implantes dentários.
Fonte: Oliveira, 2010.

Entretanto, uma das definições mais aceitas pela comunidade pesquisadora foi dada na Conferencia de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas de 1982 como sendo “toda substância (com exceção das drogas) ou combinação de substâncias de origem sintética ou natural que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais” (ANGELO, 2008; WILLIAMS, 1987). Assim, uma maneira mais simplificada e ao mesmo tempo abrangente para definir os biomateriais pode ser dada como “qualquer material de qualquer natureza, que não seja vivo, não seja droga ou fármaco, que venha a melhorar, diagnosticar, substituir ou repor partes do

corpo do ser vivo animal”. Tal definição nos permite rotular, como biomateriais, todos os materiais empregados na medicina, odontologia, medicina veterinária e farmacologia, que possuem contato direto ou indireto com o corpo humano (CUNHA, 2010; ORÉFICE et al., 2012; VOLKMER, 2006).

Embora os biomateriais apresentem uma definição que amplia os horizontes para aplicação de diversos materiais, existem muitas etapas de caracterização e avaliação do empenho destes materiais para que sejam utilizados frente ao corpo humano. O maior e mais importante indicativo da aplicação dos diferentes materiais como biomateriais, é que estes sejam biocompatíveis. Este indicativo surge como ponto de partida para seleção de materiais em prol da confecção de qualquer biomaterial, desencadeando uma série de definições apresentadas por diferentes autores ao longo do tempo com o mesmo objetivo (BAUER et al., 2012; ORÉFICE et al., 2012; SADAT-SHOJAI et al., 2013; SHI et al., 2004; VOLKMER, 2006).

As primeiras considerações sobre definições de biocompatibilidade analisavam somente fatores iniciais da presença do material implantado no corpo, ou seja, avaliavam se o implante apresentaria rejeição ou não depois de implantados. Entretanto, a biocompatibilidade entendida hoje possui diferentes pontos de análises e segundo Oréfice (2012, p.483) sua definição tem de ser baseada em função das diversas interações que ocorrem entre o material e o organismo, principalmente na interface entre ambos.

Desta maneira, apresentar uma única definição para biocompatibilidade seria ignorar suas diversas variáveis, logo, seria uma definição incompleta. Dentro deste contexto diversas literaturas referem-se então a biocompatibilidade como sendo o resultado do estudo sobre o comportamento biológico do material, demonstrando a capacidade ou habilidade de apresentar um desempenho biológico satisfatório em uma situação específica. Então, para afirmar que um material em prática é biocompatível se faz necessário todo o processo de caracterização biológica *in vitro* e em *in vivo* (FROHBERGH et al., 2012; LACERDA, 2005; ORÉFICE et al., 2012; SHI et al., 2004; VOLKMER, 2006).

A avaliação de biocompatibilidade é de fundamental importância, e, como descrito anteriormente, é o ponto inicial da avaliação de um material para aplicação como biomaterial. Para isto, é necessária a classificação quanto a sua biofuncionalidade, a qual define que um biomaterial deve apresentar um conjunto de

propriedades que o tornem capaz de realizar uma função desejada no tempo necessário, apresentando o mínimo de reações alérgicas e/ou inflamatórias.

Em prática, um biomaterial tem de ser biocompatível e biofuncional ao mesmo tempo. Isto quer dizer que não adiantaria um material ser biocompatível, mas perder suas propriedades antes do tempo desejado, levando a falha do implante. Por isso tornam-se indispensáveis as caracterizações biológicas em biomateriais, as quais atualmente apresentam-se definidas em normas estabelecidas por órgãos nacionais e internacionais de normas técnicas (ASTM, ABNT, por exemplo). A avaliação *in vitro* é normalmente descrita pela literatura como sendo a análise inicial e indispensável para avaliar o comportamento e compatibilidade dos biomateriais empregando métodos de cultivo celular (GERHARDT; BOCCACCINI, 2010; ORÉFICE et al., 2012)

Em geral são realizados testes de citotoxicidade com células diferenciadas, podendo avaliar o comportamento do biomaterial em diferentes cultivos celulares, obtendo diversas respostas em termos de morfologia, proliferação, adesão, viabilidade entre outros, que dependerão da técnica de cultivo aplicada. Segundo Oréfica (2012, p.286), a toxicidade de um biomaterial é definida por “capacidade de liberar substâncias que possam causar danos ou morte celular, direta ou indiretamente, através da inibição de vias metabólicas”. Existem diversas normas para testes de avaliação *in vitro*, e dentre os mais utilizados por literaturas podem ser citados o Teste do Contato Direto (ASTM-F813), o Teste de Difusão em Agar (ASTM-F895) e o Teste de Eluição (USP 23) (FROHBERG et al., 2012; GERHARDT; BOCCACCINI, 2010; KRÜGER; GROLL, 2012; MOTSKIN et al, 2009; ORÉFICE et al., 2012; SHI et al, 2004; ZHAO et al., 2011).

A avaliação *in vitro* consegue aludir os mais variados comportamentos do biomaterial com as células, facilitando o entendimento da atuação dos biomateriais com o tecido original e, em alguns casos, aproximando-se dos resultados obtidos com a aplicação *in vivo*. Entretanto, a análise *in vivo* é fundamental para prever as possíveis reações adversas que ocorrerão a curto e longo prazo. Elas descrevem o comportamento do biomaterial em termos químico, físico e biológico perante o sistema biológico do corpo humano, que é acompanhado por equipes interdisciplinares por meio de avaliações clínicas, histológicas, mecânicas e químico-reacionais. A avaliação da ocorrência e tempo de degradação do biomaterial,

eliminação de materiais que tornam-se tóxicos, perda de propriedades mecânicas, resposta inflamatória, aguda e crônica só podem, muitas vezes, serem expressas como resultado final após testes *in vivo* (GERHARDT; BOCCACCINI, 2010; KRÜGER; GROLL, 2012; ORÉFICE et al., 2012; SHI et al., 2004).

Assim sendo, os fatores para a escolha de um biomaterial, que seja aceito clinicamente, seguem uma ordem de avaliação, que começa por uma criteriosa seleção dos possíveis biomateriais (levando em consideração o meio biológico em que irá atuar e as propriedades necessárias do local em que o biomaterial será implantado), seguido por sua avaliação *in vitro* (avaliando sua biocompatibilidade) e por fim os testes de avaliação *in vivo* (avaliando a biofuncionalidade). Desta maneira compondo os critérios fundamentais para aplicação clínica, o biomaterial deve:

- Ser biocompatível e biofuncional
- Apresentar propriedades mínimas exigidas pelo local a ser implantado (tais como resistência a degradação, mecânica, por exemplo)
- Ser esterilizável.

3.1.1 Classificação dos Biomateriais

Os biomateriais podem ser classificados segundo suas propriedades intrínsecas (mecânicas e físico-químicas) e composição química, e em função dos diferentes tipos de interação que realizam com o sistema biológico. Com a evolução do desenvolvimento e pesquisa nesta área de materiais, foi possível avaliar as diversas interações e o comportamento que estes apresentam em contato com o corpo, indicando as propriedades características dos diferentes materiais para aplicações específicas como biomateriais (ORÉFICE et al., 2012, SHI et al., 2004).

A figura 2 apresenta um fluxograma demonstrando todas as classes de biomateriais existentes, que são basicamente divididos em materiais biológicos (bioenxertos) e sintéticos. Também é possível evidenciar, a partir deste fluxograma, que a classificação do biomaterial não depende unicamente de sua composição, e sim, de sua associação com o meio biológico. Os materiais poliméricos, cerâmicos, metálicos e compósitos são classificados separadamente no estudo da ciência dos materiais, entretanto, quando é avaliada sua classificação em meio biológico, podem apresentar-se de maneira associada nos tópicos de classificação por meio de sua

interação com o meio biológico. Deste modo, muitas literaturas referenciam a classificação de biomateriais em função do seu comportamento no meio biológico. A seguir é descrito as definições destes diferentes comportamentos, assim como as definições da classificação dos materiais naturais (BAUER et al., 2012; GERHARDT; BOCCACCINI, 2010; GUASTALDI; APARECIDA, 2010; ORÉFICE et al., 2012; SHI et al., 2004; VOLKMER, 2006).

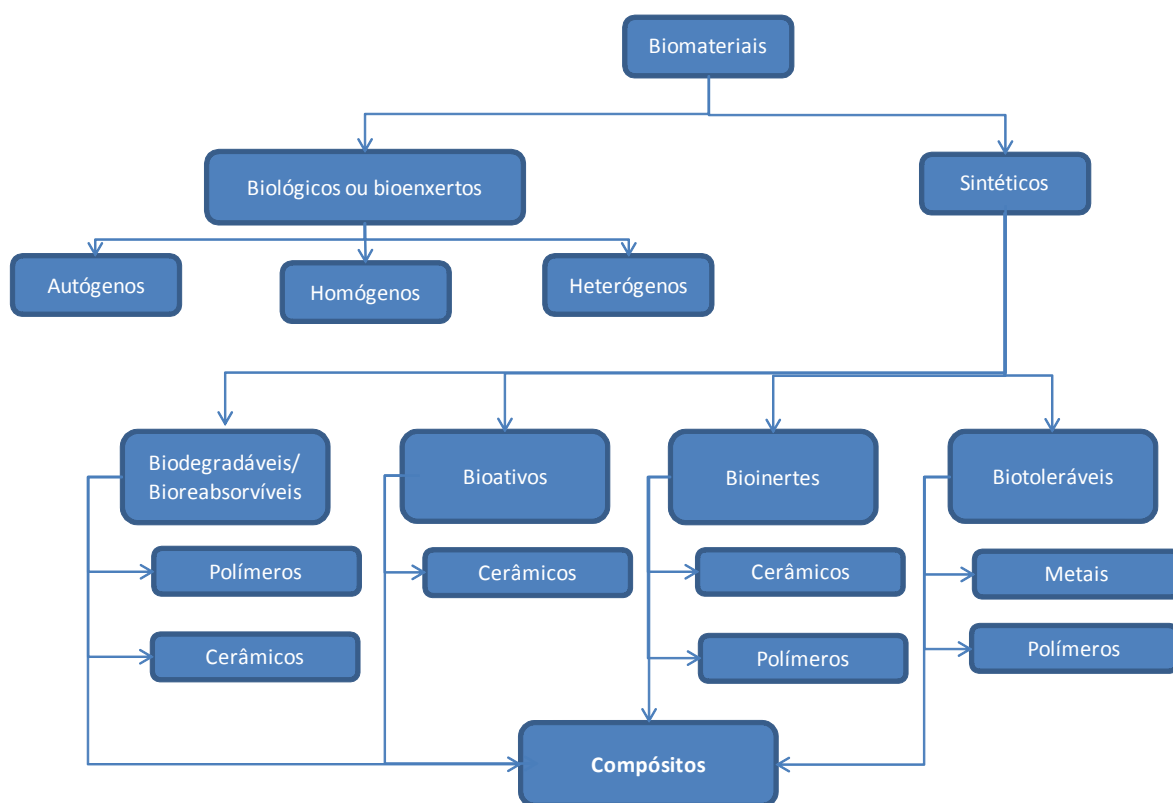


Figura 2 - Fluxograma demonstrativo da classificação e relação dos biomateriais.
 Fonte: O autor.

3.1.1.1 Biomateriais Biológicos ou Bioenxertos

Esta classe de biomateriais inclui aqueles que são formados parcial ou totalmente de materiais de tecidos vivos (sendo estes não utilizados em estado vivo). São classificados devido à origem do ser vivo de onde foram retirados, e também em função de sua aplicação. Esta última pode ser de duas formas. Uma é denominada como *viáveis*, no caso do biomaterial ser implantado ainda fresco, ou seja, pouco

depois de retirado do tecido vivo mantendo sua viabilidade preservada. E a outra é a *biolizada* onde os biomateriais, retirados de tecidos vivos, passam por processos químicos. Na classificação dos biomateriais biológicos é correto então considerar também a sua aplicação (FROHBERGH et al., 2012; ORÉFICE et al., 2012).

- Autógenos: são aqueles em que o tecido, originário do biomaterial, é retirado do próprio indivíduo em qual será aplicado.
- Homógenos: São aqueles em que o tecido é retirado de outro indivíduo da mesma espécie.
- Heterógenos: São os casos em que o tecido utilizado é retirado de outras espécies animais.

Uma vez que estes materiais partem de organismos vivos, era de se esperar bons resultados de aplicação dos mesmos. Entretanto, na prática ocorre o contrário do que se imagina. Estes biomateriais apresentam diversas modificações levando, muitas vezes, a contaminações e rejeições. Por isso o interesse pela utilização de biomateriais sintéticos cresce cada vez mais, pois com eles é possível ter um controle maior sobre suas propriedades, e muitos estudos apontam para a combinação entre biomateriais biológicos e sintéticos.

3.1.1.2 Biomateriais Sintéticos

Esta classe de biomateriais inclui os materiais cerâmicos, metálicos, poliméricos e compósitos. Escolher um biomaterial desta classe pelas suas propriedades intrínsecas não é o mais adequado, podendo até ser um erro fatal.

Como por exemplo, é avaliada a situação de um local a ser implantado e conclui-se que é necessário um material com elevada tenacidade a fratura e alta ductilidade. Estes fatores indicam para os materiais metálicos, e, até mesmo por custos, é escolhido um aço inox 314. Passado um tempo após o implante, o mesmo começa a demonstrar perda precoce de suas propriedades, isso agravado, por exemplo, devido ao meio onde foi implantado ser corrosivo. Logo, é imprescindível que a escolha do biomaterial leve em consideração as interações do biomaterial com o meio biológico.

Deste modo, é comum que os biomateriais sintéticos sejam também classificados em função de sua interação com os tecidos, ou seja, seu comportamento biológico, como descrito a seguir:

- **Biotoleráveis:** são materiais tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes (tecidos ósseos, por exemplo) através da formação de uma camada envoltória de tecido fibroso não aderente. Esta camada impede o contato direto entre o implante e o tecido, e quanto maior for a espessura desta camada, menor é a tolerância dos tecidos ao material, levando à possível instabilidade e falha do implante. Ocorre muitas vezes, nesta classe, a liberação de componentes do material implantado, o que não é desejado.

- **Bioinertes (Quase inertes):** são materiais também tolerados pelo organismo, porém formam uma camada de tecido fibroso com espessura menor e a liberação de componentes do implante é mínima ou nula. A figura 3.a elucida a formação do tecido fibroso entre implante e tecido ósseo, que ocorre também nos biotoleráveis.

- **Biodegradáveis e Bioreabsorvíveis:** são materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Materiais bioreabsorvíveis são distinguidos por seus produtos de degradação serem utilizados pelo corpo, geralmente para compor a função debilitada.

- **Bioativos:** São materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre implante e tecido ósseo, promovendo a osteointegração (reposição de tecido ósseo), principalmente em função da similitude química entre estes materiais e o tecido ósseo. Um dos principais materiais utilizados é a hidroxiapatita. A figura 3.b ilustra tal comportamento.

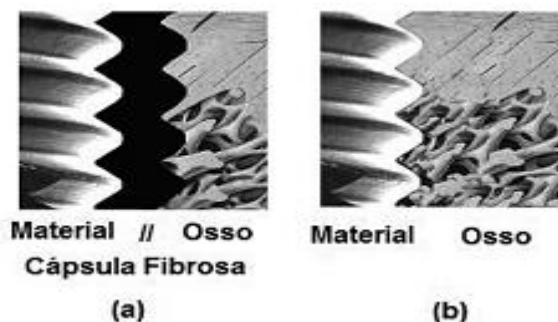


Figura 3- Tipos de interação entre implante e organismo: (a) Bioinertes e Biotoleráveis (b) Bioativos
Fonte: Guastaldi e Aparecida, 2010.

3.2 Engenharia Tecidual

É uma área do conhecimento na quais muitos biomateriais estão destinados, e que, devido aos diversos fatores positivos e a complexidade existente nesta área, aumenta cada vez mais o número de pesquisas relacionadas com o seu desenvolvimento. A complexidade do entendimento sobre engenharia de tecidos está no fato de sua ampla necessidade do conhecimento em diversas áreas da ciência, ou seja, ela pode ser considerada uma ciência multidisciplinar, envolvendo áreas como ciências biológicas, ciências da saúde, ciências dos materiais e engenharias. A engenharia de tecidos consiste basicamente na regeneração de órgãos e tecidos vivos, ou seja, na aplicação dos princípios e métodos de engenharia e ciências da vida visando desenvolver substitutos biológicos para restabelecer a função de um órgão debilitado ou perdido (LANGER; VACANTI, 1993; ORÉFICE et al., 2012).

Os processos abordados na engenharia de tecidos envolvem muitas etapas complexas, porém é possível explicá-la de forma resumida. Segundo Oréfice (2012, p.497), é essencial a existência de células com poder de resposta, uma matriz adequada de biomaterial sintético ou natural e cultivo adequado para células secretarem componentes da matriz extracelular. Estando tudo de acordo, células (células-tronco ou embrionárias), geralmente retiradas do próprio paciente, são expandidas em matriz tridimensional (Scaffold) providas de fatores de crescimento e diferenciação e posteriormente cultivadas *in vitro* criando o tecido vivo que será utilizado como substituto da região afetada do paciente. E, por adequação, o scaffold deveria ser degradado, reabsorvido ou integrado ao corpo para prevenir quaisquer tipos de riscos em longo prazo devido à presença do mesmo. A figura 4 demonstra todo processo descrito anteriormente.

No processo de engenharia de tecidos existem por definições três principais variáveis que são as matrizes (Scaffold), células (diferenciadas ou indiferenciadas) e os agentes bioativos. As matrizes apresentam-se em forma porosa tridimensional e atuam como estruturas para auxiliar as células na formação do tecido novo e em desenvolvimento. As arquiteturas obtidas nas matrizes são apropriadas aos arranjos tridimensionais celulares, servindo como guia e indicador de forma dos tecidos.

Dentre os diversos quesitos para seleção dos biomateriais adequados para aplicação como scaffold, destacam-se os biomateriais bioativos e bioreabsorvíveis, com boas propriedades mecânicas em meio fisiológica, baixa imunogeneidade e toxicidade. As estruturas formadas devem apresentar elevado grau de porosidade, distribuição homogênea e distribuição espacial, pois isso promove o ancoramento das células e a rápida regeneração dos tecidos. Matrizes feitas com HA têm apresentado grande interesse de aplicação na ET, devido suas propriedades bioativas, principalmente para aplicação em regeneração de tecidos ósseos, devido sua similaridade com o tecido ósseo original (FROHBERGH et al., 2012; GERHARDT; BOCCACCINI, 2010; LANGER; VACANTI, 1993; ORÉFICE et al., 2012).

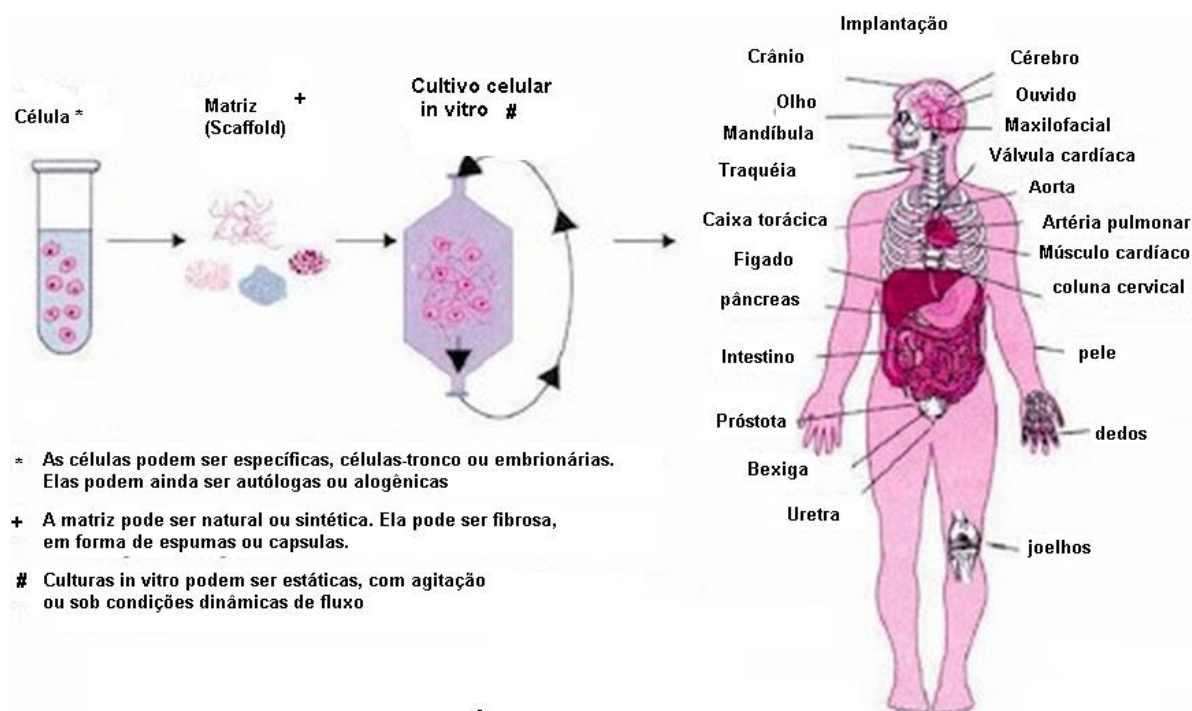


Figura 4 - Abordagem geral de todo o processo de engenharia de tecidos.
Fonte: Oréfice et al, 2012, p.497.

No caso das cerâmicas bioativas são utilizados vidros do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, vitrocerâmicas e fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita, e, no caso de cerâmicas biodegradáveis são empregados alguns vidros e fosfato de cálcio, como o fosfato tricálcico (FROHBERGH et al., 2012; GERHARDT; BOCCACCINI, 2010; ORÉFICE et al., 2012).

No caso dos polímeros, são utilizados polímeros sintéticos de composição biodegradável ou bioativa, como por exemplo, poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) etc. Recentemente têm sido mais utilizados os polímeros naturais, que possuem como vantagens sua degradabilidade controlada e fácil reconhecimento biológico, como exemplo, os alginatos, colágeno etc. (BITTENCOURT et al., 2009; ORÉFICE et al., 2012; PLACE et al., 2009).

Muitos estudos detêm-se no desenvolvimento de combinações entre estes biomateriais, gerando compósitos, os quais têm demonstrado resultados ótimos, devido a obtenção de propriedades melhores ou específicas para uma dada aplicação (PLACE et al., 2009; TAN et al., 2009).

3.3. Biocerâmicas

Os materiais cerâmicos são compostos inorgânicos, não metálicos, com elevada energia de ligação entre seus átomos fazendo com que possuam elevado ponto de fusão, e geralmente apresenta uma elevada dureza e comportamento frágil, baixa condutividade térmica e elétrica (ótimos isolantes). Tais características as tornam resistentes a corrosão, ao desgaste, a temperaturas elevadas e faz com que apresentem baixa deformação sobre esforços, baixa densidade em relação aos metais, e uma série de outras propriedades que podem ser específicas de cada tipo de cerâmica. Oferecem uma extensa faixa de aplicação na nossa vida cotidiana, e na área da saúde já é utilizada a um bom tempo (ORÉFICE et al., 2012).

Entretanto, a utilização das biocerâmicas intracorpórea, de maneira conhecida e com resposta satisfatória, data das últimas seis décadas. Pois, com os avanços da tecnologia em termos de pesquisa e análise dos materiais, foi possível avaliar suas aplicações na área biomédica, constatando em diferentes cerâmicos suas ótimas propriedades, podendo destacar-se principalmente sua estabilidade química elevada, biocompatibilidade e excelentes propriedades tribológicas. As biocerâmicas são classificadas como segue (ORÉFICE et al., 2012).

3.3.1. Cerâmicas Inertes (ou Quase Inertes)

Neste grupo as cerâmicas são bioinertes, ou seja, sua presença é tolerada pelo organismo, formando um envoltório de tecido fibroso. Este envoltório apresenta espessura relativamente pequena levando a uma boa adesão entre tecido e implante, porém, tal adesão é devido a um ancoramento mecânico. Esse fator não é problema se ocorrer um bom contato mecânico, entretanto, se sofrer movimento relativo acentuado, o implante pode afrouxar. Contudo, os cerâmicos desta classe costumam apresentar bons resultados de implante, que são usados na maioria das vezes em situações de necessidades de maiores esforços. E nesta classe estão a Alumina (Al_2O_3), Carbono (pirolítico, vítreo e depositado por vapor) e a Zircônia (ZrO_2) (tetragonal estabilizada com ítria (Y_2O_3) e parcialmente estabilizada com magnésia (MgO)).

3.3.2. Cerâmicas Porosas e Recobrimento Cerâmico

Estes tipos de biocerâmicas estão relacionados à disposição final para uso, nas quais podem ser empregadas tanto as cerâmicas bioativas quanto as inertes. As cerâmicas porosas são, muitas vezes, sintetizadas por técnicas específicas com o objetivo de se obter poros com tamanho mínimo de 100 μm . Entre as técnicas utilizadas estão o processo de incorporação de substâncias voláteis, rotas sol-gel, réplica de estrutura polimérica porosa e suspensão cerâmica.

Os processos de recobrimento consistem em recobrir superfícies dos mais variados biomateriais com uma camada fina ou espessa de biocerâmica. Em geral, para tal, são utilizados processos de deposição física ou química, em fase vapor, como por exemplo, a deposição física ou química em fase vapor (PVD ou CVD), deposição por rotação (spin coating), deposição por imersão (dip coating) etc.

Geralmente, estas cerâmicas são produzidas com as cerâmicas bioativas e as bioreabsorvíveis. Isto devido essencialmente às propriedades que elas apresentam frente ao tecido. No caso de revestimentos com cerâmicas bioativas, melhoram a adesão de implantes confeccionados com outros biomateriais, criando uma adesão superficial de caráter químico. As cerâmicas porosas permitem melhor interação com

o tecido, dependendo do tamanho de poros, e tornam o processo de osteocondução (criação de nova camada óssea) mais eficaz.

3.3.3. Cerâmicas bioreabsorvíveis

Esta classe destina-se a cerâmicas que são capazes de degradar-se progressivamente e serem substituídos pelo tecido hospedeiro. São poucas as cerâmicas existentes nesta classe de materiais, como o fosfato tricálcico, biovidros e vitrocerâmicas. Existem muitos estudos direcionados na obtenção de materiais que sejam reabsorvíveis e bioativos, e vários apontam para utilização combinada entre as próprias cerâmicas, caso do compósito fosfato tricálcico/ hidroxiapatita (TCP/HA). Estes estudos mostram a possibilidade de obter-se uma biocerâmica com resistência mecânica adequada ao tempo de permanência do implante (relacionado à taxa de degradação), bioatividade local e reabsorção do mesmo em tempo adequado a restauração do tecido.

3.3.4. Cerâmicas Bioativas

Nesta classe de cerâmicos estão aqueles que apresentam uma interação química com o tecido, ou seja, que são bioativos. As cerâmicas bioativas apresentam uma característica em comum muito importante, que é a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na superfície do implante, qual apresenta composição e estrutura equivalente a fase mineral do osso, fato que promove a ligação interfacial entre implante e tecido. Principalmente por este motivo, muitos estudos estão direcionados com a utilização deste tipo de cerâmicas junto a outros biomateriais, a fim de compor propriedades com excelência para aplicação. O biomaterial deste estudo faz parte desta classe de biomateriais.

3.4. Fosfatos de Cálcio

Entre as biocerâmicas, os fosfatos de cálcio, se destacam por apresentarem compostos com composição química símile a matriz óssea, o que favorece sua interação com os tecidos (BURDICK; MAUCK, 2011; RIGO et al., 2007; SHI et al.,

2004). Um osso natural consiste basicamente em 25% de água, 15% de material orgânico e 60% de fase mineral. No caso, os minerais são fosfatos de cálcio, e, entre eles, e em maior quantidade, a hidroxiapatita (BURDICK; MAUCK, 2011). A fase mineral dos ossos geralmente é composta por uma fase amorfa, fosfato de cálcio amorfo (FCA), e uma fase cristalina, a hidroxiapatita (DOURADO, 2006).

A figura 5 demonstra a estrutura hierárquica de um osso típico, e mostra a disposição e tamanho dos cristais de hidroxiapatita, os quais ficam distribuídos organizadamente entre as moléculas de colágeno, dando reforço mecânico-estrutural para as microfibrilas de colágeno, formando a estrutura de fibrila de colágeno, compondo as fibras que formam a lamela, que por sua vez molda o ósteom, que é responsável por estruturar o osso compacto (SADAT-SHOJAI et al, 2013; TAN et al., 2009). Fica evidente a complexidade envolvida na formação óssea, assim como, a formação de um compósito natural.

A hidroxiapatita, como descrito, faz parte da composição óssea, porém sua formação passa por uma série de modificações estruturais de fases, formando outros fosfatos de cálcio por calcificações normais e patológicas, como a hidroxiapatita carbonatada (HCA), que é formada como camada inicial em implantes de HA. Esta modificação que ocorre entre os fosfatos gera a formação de diferentes fosfatos de cálcio e para classificá-los utiliza-se a razão molar Ca/P (BURDICK; MAUCK, 2011; ORÉFICE et al., 2012)

Conforme se visualiza na tabela 1, existem vários fosfatos com razão variando de 0,5 a 2,0 e algumas formulações químicas muito parecidas (BURDICK; MAUCK, 2011). Este fato demonstra a necessidade do controle da composição destes tipos de biocerâmicas em sua síntese, pois pequenos desvios em cálculos estequiométricos, tratamentos térmicos, presença de água durante o processamento ou quando aplicada, e, diferentes níveis de pH podem alterar o resultado de sua composição (SHI et al., 2004; VAZ, 2007).

As biocerâmicas de fosfato de cálcio são a maior família de materiais inorgânicos com aplicações biológicas. E, dentre elas, a HA e o TCP recebem uma atenção especial, sendo os principais objetos de estudo e aplicações clínicas.

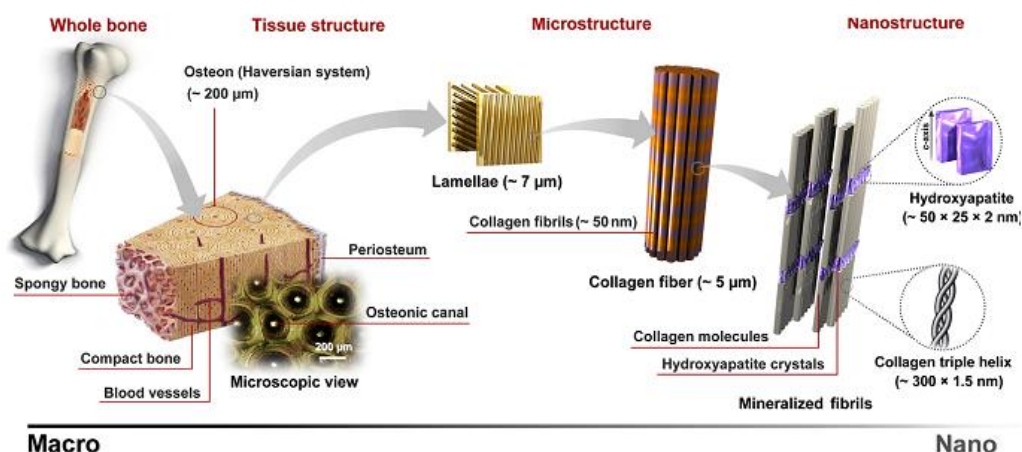


Figura 5 - Estrutura hierárquica do osso compacto.
 Fonte: Sadat-Shojai et al., 2013, p.7592.

3.5. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado, componente majoritário da fase mineral dos ossos e dentes humanos, representando 30% e 70% em massa respectivamente. A palavra hidroxiapatita é formada pela junção das palavras hidroxi e apatita. Hidroxi refere-se ao grupo hidroxila (OH) e apatita é um nome mineral. A hidroxiapatita é o material utilizado pelos vertebrados para compor o esqueleto, devido à sua capacidade de atuar como reserva de cálcio e fósforo (ANGELO, 2008; GUASTALDI; APARECIDA, 2010; ORÉFICE et al., 2012).

Devido à sua analogia química com a fase mineral dos tecidos ósseos, a HA é um dos biomateriais mais biocompatíveis conhecido, também sendo, dentre as cerâmicas de fosfato, a mais estudada e utilizada para finalidades clínicas. Isso porque favorece o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondutora), estabelecendo ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioativa), permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e demais células ósseas, sendo que estas não a distinguem da superfície óssea, o que indica grande similaridade química superficial. A superfície da hidroxiapatita permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo com que as moléculas d'água, proteínas e colágeno sejam absorvidas na superfície induzindo, assim, a regeneração tecidual (ANGELO, 2008; GUASTALDI; APARECIDA, 2010; JIANG et al., 2002; ORÉFICE et al., 2012).

Tabela 1 - Diferentes fosfatos de cálcio e suas respectivas razões molares.

Razão Ca/P	Fórmula química	Composto	Sigla
2.0	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	Fosfato tetracálcico	TTCP
1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita	HA
<1.67	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Fosfato de cálcio amorfo	ACP
1.5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\alpha\beta\gamma)$	Fosfato tricálcico	TCP($\alpha\beta\gamma$)
1.33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico	OCP
1.0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dicálcico dihidratado	DCPD
1.0	CaHPO_4	Fosfato dicálcico	DCP
1.0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7(\alpha\beta\gamma)$	Pirofosfato de cálcio	CPP
1.0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Pirofosfato de cálcio dihidratado	CPPD
0.7	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	Fosfato heptacálcico	HCP
0.67	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	Fosfato tetracálcico dihidratado	TDHP
0.5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato monocálcico monohidratado	MCPM
0.5	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2(\alpha\beta\gamma)$	Metafosfato monocálcico	CMP($\alpha\beta\gamma$)

Fonte: Adaptado de Burdick e Mauck, 2011.

3.5.1. Características Químicas da Hidroxiapatita

A HA faz parte da família das apatitas, sendo que apatita é o nome dado para os cristais com fórmula química genérica $\text{M}_{10}(\text{RO}_4)_X\text{X}_2$, onde o M pode ser substituído por diversos metais, mas sendo o cálcio o predominante, o R geralmente é o fósforo, mas pode também ser substituído por outros elementos, e o X é composto geralmente por hidroxilas podendo ainda ser substituído por grupos halogênios (VOLKMER, 2006; SHI et al., 2004; VAZ, 2007). A seguir são demonstrados os possíveis elementos que podem realizar substituições dentro das apatitas:

M = Ca, Sr, Ba, Cd, Pb, Mg, Na, K etc.

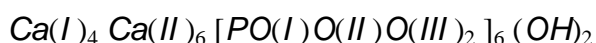
R = P, CO_3 , As, S, Si, Ge, Cr, B, etc.

X = O, CO_3 , O, BO_2 , F, Cl, Br, Vacâncias, etc.

A HA apresenta razão molar Ca/P igual a 1,67 e fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sendo parte da família das apatitas, é capaz de envolver diversas trocas iônicas, principalmente nos grupos de Ca e OH, este fator de transição é comum em HA biológica, e é o que as diferem da HA pura ou estequiométrica. A figura 6 demonstra o diagrama de fases para família de fosfatos, no qual é possível observar a dificuldade para obter fases distintas e a necessidade do controle estequiométrico para obter HA pura (ANGELO, 2008; LACERDA, 2005; VAZ, 2007).

3.5.2. Características Cristalográficas da Hidroxiapatita

A HA possui simetria hexagonal (grupo espacial $P 6_{3/m}$) e parâmetros de rede $a = b = 0.942 \text{ nm}$ e $c = 0.688 \text{ nm}$. A célula unitária da HA é formada por dez íons de Ca^{+2} , seis íons de fosfatos PO_4^{-3} e dois íons de hidroxila OH^- . Os íons de Ca^{+2} estão dispostos em dois sítios, sendo quatro íons no sítio I e seis íons no sítio II. Os vinte quatro íons de oxigênio ocupam três sítios na estrutura da HA, os seis íons de fosfatos e o grupo OH^- ocupam um sítio respectivamente. Dessa forma a representação da fórmula molecular na célula unitária, com a distribuição dos sítios é dada por:



Os Ca^{2+} situados no sítio (I) estão alinhados paralelamente ao eixo c e cercados por seis átomos de O, formando pirâmides poliédricas. As bases triangulares destas pirâmides são ocupadas acima e abaixo por três átomos de O (I) e por três átomos de O (II), respectivamente, conforme é mostrado na figura 7.a. Os seis átomos de Ca situados no sítio (II) estão dispostos em dois triângulos perpendiculares ao eixo c: um no plano $\frac{1}{4}$ e outro em $\frac{3}{4}$ de maneira que sua projeção no plano ab forma um hexágono, como demonstra a figura 7.b. (ANGELO, 2008; DOURADO, 2006; GUASTALDI; APARECIDA, 2010; VOLKMER, 2006).

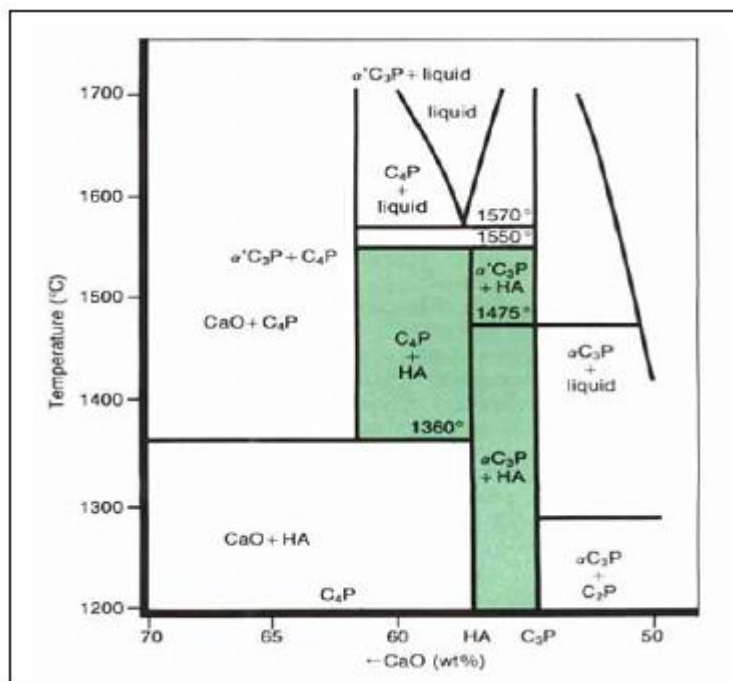


Figura 6 - Diagrama de equilíbrio de fases do sistema CaO-P₂O₅, sob pressão parcial de água de 500 torr (66 kPa). Obs: HA= hidroxiapatita, C=CaO, P=P₂O₅.
Fonte: Vaz, 2007.

A estrutura cristalina da HA lhe confere uma de suas mais importantes propriedades, a facilidade de substituições catiônicas e aniônicas, sendo referida como capaz de incorporar metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura. Esta característica faz com que a HA atue como reserva de cálcio e fósforo e um sistema regulador de diferentes íons nos líquidos corporais por meio de sua liberação ou armazenamento (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Além do que modificações na rede da HA podem acarretar mudanças de suas propriedades fazendo com que ela apresente diferentes respostas como biomaterial. Pois uma vez que haja mudança dos íons que compõem a HA, ocorrerão mudanças em sua estrutura cristalina, parâmetros de rede, textura superficial, solubilidade, e demais fatores que podem modificar o comportamento de degradação e adsorção em testes *in vitro* e *in vivo* (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; LACERDA, 2005; ORÉFICE et al., 2012).

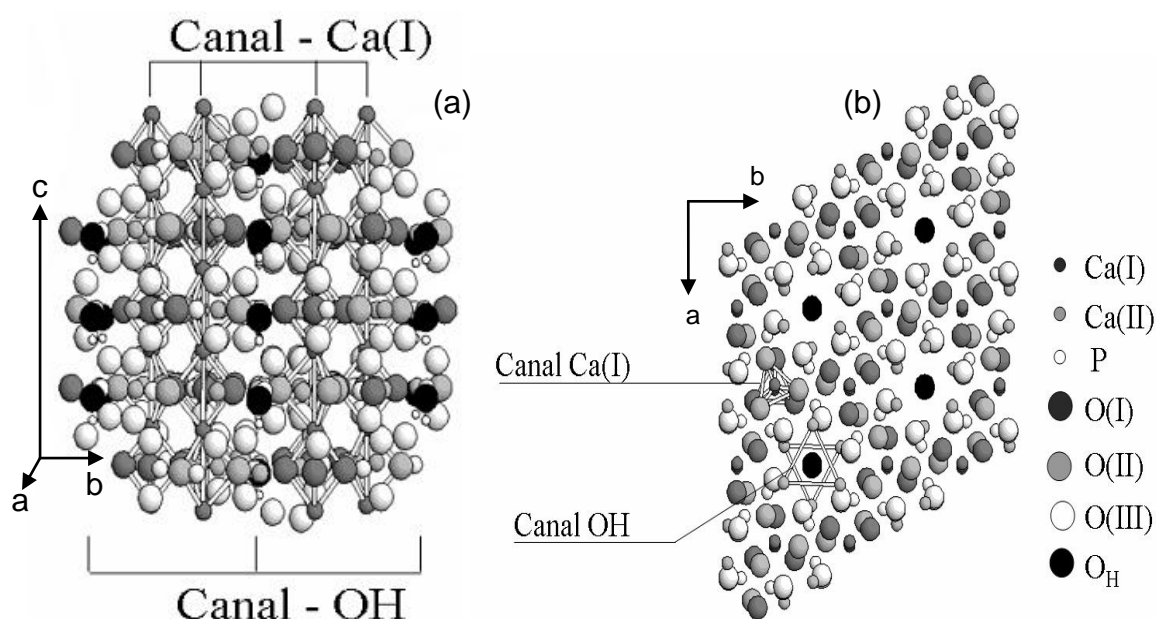


Figura 7 - Representação da estrutura cristalina da hidroxiapatita (a) ao longo do eixo c e (b) no plano ab.

Fonte: Adaptado de Dourado, 2006

A HA apresenta muitas propriedades interessantes que a indiquem como um ótimo biomaterial para aplicações biomédicas, entretanto, existem alguns fatores que limitam um pouco o seu uso clínico. Sua lenta biodegradação e sua fragilidade estão entre estes fatores. Porém a biodegradação tem sido resolvida pela modificação, substituição e adição de diferentes íons ou pela utilização de combinação de fases de fosfatos como fosfato tricálcico/hidroxiapatita (TCP/HA). A fragilidade é comum entre os cerâmicos, e na HA sintética, devido à distribuição de sua cristalização, se torna mais frágil ainda, limitando seu uso em partes estruturais (LACERDA, 2005; ORÉFICE et al., 2012; VAZ, 2007).

3.5.3. Métodos de obtenção de hidroxiapatita

Como já mencionado anteriormente, existem muitos métodos para obtenção de hidroxiapatita, os quais se baseiam no tipo de reações que estarão envolvidas em função do estado físico dos reagentes e dos materiais necessários para realizarem sua produção. Contudo, a escolha do método geralmente ocorre devido ao formato final obtido pela HA em função de sua microestrutura, seja ela nano ou microestruturada. Durante as últimas décadas pesquisadores da área de

biomateriais cerâmicos vêm desenvolvendo métodos de produção de HA por diferentes rotas, obtendo como resultados as mais diversas formas estruturais.

Estudos mostram a obtenção das mais variadas formas, como fibrosas, esféricas densas, esféricas porosas, estrutura florada, placas, formas replicadas de estruturas esponjosas, estruturas orgânicas, etc. Estas formas são obtidas como micro ou nanopartículas, formatos densificados, formatos porosos, sendo que a escolha destes, na maioria das vezes, específicos para dada aplicação (SADAT-SHOJAI et al., 2013; SHI et al., 2004; VOLKMER, 2006).

Desta maneira, os métodos mais usuais para síntese de HA podem ser classificados em função de sua forma estrutural para aplicação, como demonstra o fluxograma da figura 8, que apresenta alguns dos métodos existentes. Os métodos descritos para síntese de pós de HA são os mais empregados pela comunidade pesquisadora e indústria, pois com estes métodos é possível obter-se pó de HA nano e microestruturado e elevado controle da composição química. Estes pós apresentam inúmeras formas microestruturais para as mais variadas aplicações, podendo ser aplicado inclusive nos outros métodos para formar cerâmicas densificadas ou porosas (SADAT-SHOJAI et al., 2013; VOLKMER, 2006).

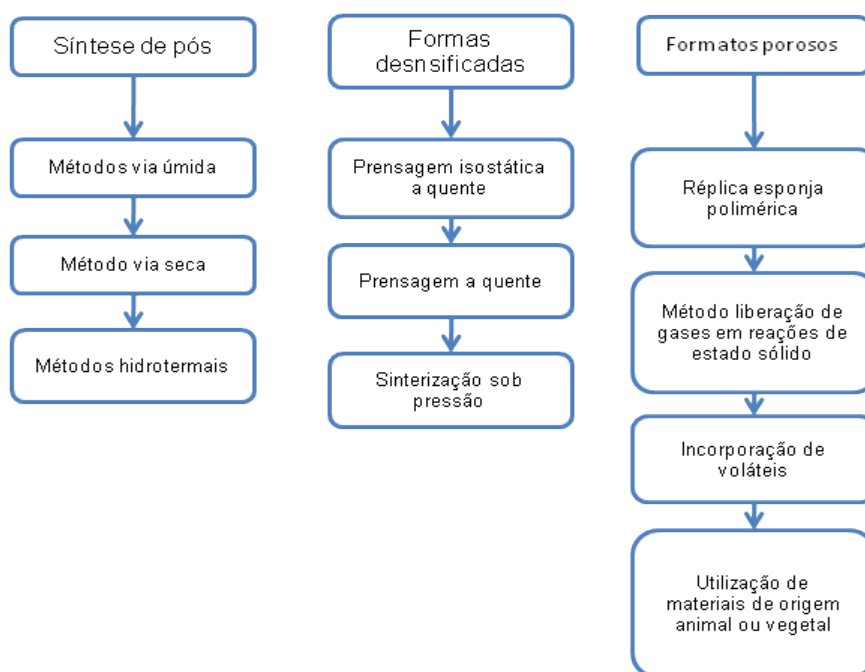


Figura 8 - Fluxograma demonstrativo dos métodos mais usados por literaturas para produção de HA.
Fonte: O autor.

O método via úmida apresenta o melhor controle da composição química de pós, obtendo na maioria das vezes pós nanoestruturados. Dentre todos os métodos utilizados na literatura este método é o mais aplicado, devido à obtenção de propriedades adequadas ao sistema biológico, como melhor biocompatibilidade. Neste método estão processos como precipitação química, reações sol-gel, reações de hidrólise, emulsões, método sonoquímico, etc. Neste método pode-se incluir basicamente os processos que ocorrem em estado líquido, processos de neutralização de soluções ácidas e básicas e reações de sais de cálcio e sais de fosfato (SADAT-SHOJAI et al., 2013; SHI et al., 2004). A figura 9 ilustra algumas das principais reações químicas utilizadas em processos via úmida, e uma das reações foi sublinhada pra demonstrar as reações básicas que ocorrerão na etapa de síntese química deste trabalho.

O método via seca tem seu princípio baseado no processamento de cerâmicos convencionais envolvendo reações no estado sólido, entretanto, outros processos vêm sendo desenvolvidos e enquadrados neste grupo, como por exemplo, a aspersão térmica, método mecanoquímico. Este método possibilita obter-se pós com partículas muito finas e alta cristalinidade, porém, a estequiometria não é tão homogênea quando comparado ao método via úmida. Mas, apesar do baixo controle estequiométrico, apresenta grande interesse pela indústria por apresentar, na maioria de suas reações, água como subproduto (SADAT-SHOJAI et al., 2013; SHI et al., 2004; VOLKMER, 2006).

Os métodos hidrotermais são considerados por literaturas como sendo um processo do método via úmida, pois apresentam os mesmos princípios de reações químicas, mudando sua rota no processo, qual passa por variação de pressão.

Os métodos de processamento de formas densificadas têm como base o princípio da formação de cerâmicas densas. Neste caso podem ser empregados os pós cerâmicos obtidos pelos métodos descritos anteriormente ou os pós podem ser obtidos no processamento por reações em estado sólido. No processamento de formas densificadas são utilizados métodos de prensagem a quente, para que a cerâmica obtenha a forma desejada e possa ser manuseada a verde, antes da sinterização. Tal método é utilizado com intuito de obterem-se formas pré-determinadas.

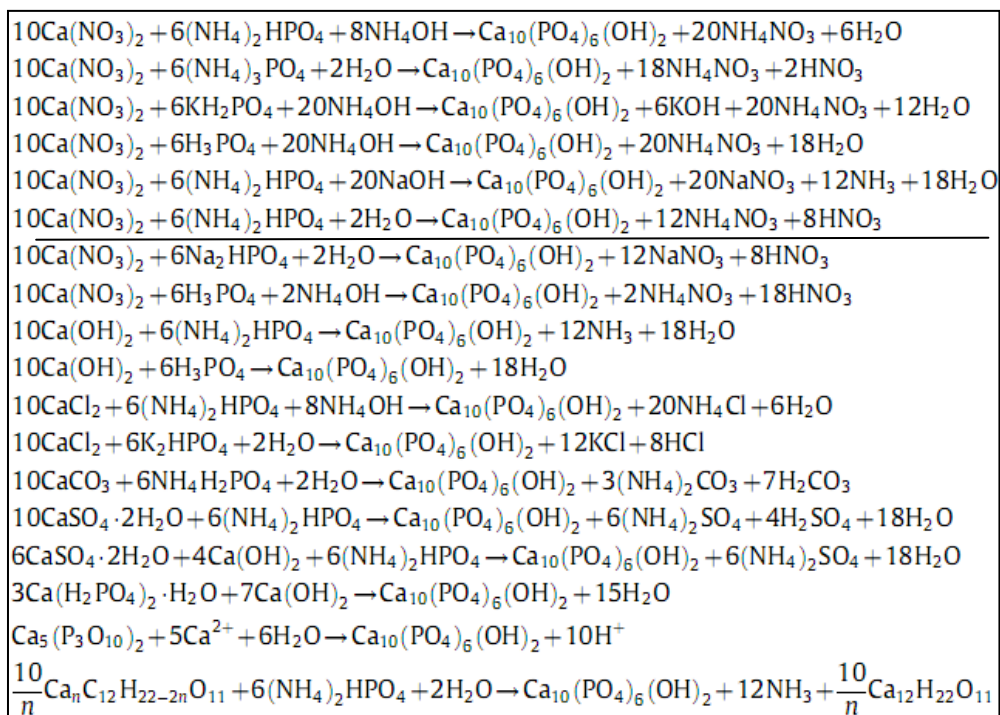


Figura 9 - Apresentação das principais reações envolvidas no métodos via úmida.

Fonte: Sadat-Shojai et al., 2013.

Os métodos relacionados a formação de HA porosa podem basear-se em todos os métodos descritos anteriormente, pois o objetivo da utilização deste método é produzir sistemas sólidos porosos. Entretanto, é filtrado devido às necessidades de aplicação biológica, tendo como ponto de partida uma boa biocompatibilidade, que está relacionada com a elevada pureza química. Muitos métodos têm sido utilizados para produção de HA porosa, quais partem do princípio de produção com arquiteturas que beneficiem os processos de regeneração do tecido ósseo.

O método da réplica de esponja polimérica consiste basicamente na aplicação duma solução em suspensão de HA, em uma esponja polimérica (geralmente poliuretano). Nesta ocorre a fixação das partículas por meio de ligações fracas, que são levadas para secagem em estufa e posterior tratamento térmico, obtendo a forma da espuma.

O método de liberação de gases em reações no estado sólido consiste na utilização de reagentes como CaCO_3 , que implicam na liberação de CO_2 e H_2O , executando a formação de bolhas e explodindo-as. O método de incorporação de voláteis consiste na utilização de uma composição de um pó contendo HA, ou seus precursores, e um pó de algum material com ponto de fusão reduzido, ou seja, que

volatilize, como por exemplo, o amido. Após tratamento térmico ocorre saída do reagente voláteis ficando poros na região onde o mesmo se encontrava.

O método de utilização de materiais de origem vegetal e animal para produção de HA ou para obtenção de HA com maior pureza têm sido muito estudados nos últimos anos, pois é possível obter diversas formas de HA e diferentes propriedades devidas sua modificação estrutural. Este método não é reconhecido recentemente, sendo que dados históricos mostram a tentativa do uso de osso animal em reparações ósseas por nossos antepassados maias, mas o entendimento e o estudo científico datam, assim como muitos biomateriais, de poucas décadas. Processos como a utilização de ossos de animais, como o bovino, muidos e sinterizados, conversão hidrotermal de corais, processo de extração de vegetais, utilização de cascas de ovos, são alguns dos existentes hoje e pesquisados como possíveis fontes e formas de se obter a HA. Dentro deste método existe também um método recente, qual consiste no procedimento de réplica de esponja polimérica, entretanto utiliza fibras vegetais como biotemplates (SADAT-SHOJAI et al., 2013; SHI et al., 2004; VOLKMER, 2006).

3.5.3.1 Biotemplates

A utilização de bio-estruturas para a síntese de cerâmicos tem atraído o interesse de muitos pesquisadores nos últimos anos. Em contraste com templates sintéticos, materiais naturais, como algodão, fibra de côco, bambu, etc. são baratos, abundantes e renováveis. Eles apresentam uma anatomia com uma escala variada em termos de tamanhos de fibra e distribuição das mesmas. É possível utilizar diferentes espécies com diferentes bio-estruturas como templates, os quais mantêm a microestrutura aproximadamente igual após calcinação (RATMANN, 2010).

3.5.3.2 Método dos precursores poliméricos

O método dos precursores poliméricos ou método Pechini, o qual foi o responsável por desenvolver este método, baseia-se na formação de uma resina polimérica produzida pela poliesterificação entre um complexo metálico quelatado

usando ácidos hidroxicarboxílicos (como ácido cítrico) e um álcool polihidróxi como o etileno glicol. Durante o aquecimento em temperaturas moderadas ocorrem as reações de esterificação e poliesterificação, havendo assim a formação da resina polimérica. O método de Pechini tem sido bastante empregado para produção de cerâmicos avançados, e diversos aperfeiçoamentos foram realizados, desde sua invenção por Pechini. Entre estes avanços estão às quantidades ideais de reagentes para ocorrer a formação da resina polimérica. Deste modo a utilização do método Pechini com ácido cítrico e etileno glicol, já são apresentados em estudos com valores ideais de distribuição. Desta forma, a razão molar entre ácido: metal é dada como 3:1, existindo alguns casos que atribuem razão de 4:1 em função da formação da rede de aprisionamento ideal do cátion metálico. E a quantidade de etileno glicol é dada pela razão ácido:álcool na proporção de 60:40, sendo que o volume de etileno glicol pode ser calculado pela fórmula da densidade. As figuras 10.a e 10.b demonstram o mecanismo das reações que ocorrem neste método (ANDRADE, 2006; RATMANN, 2010).

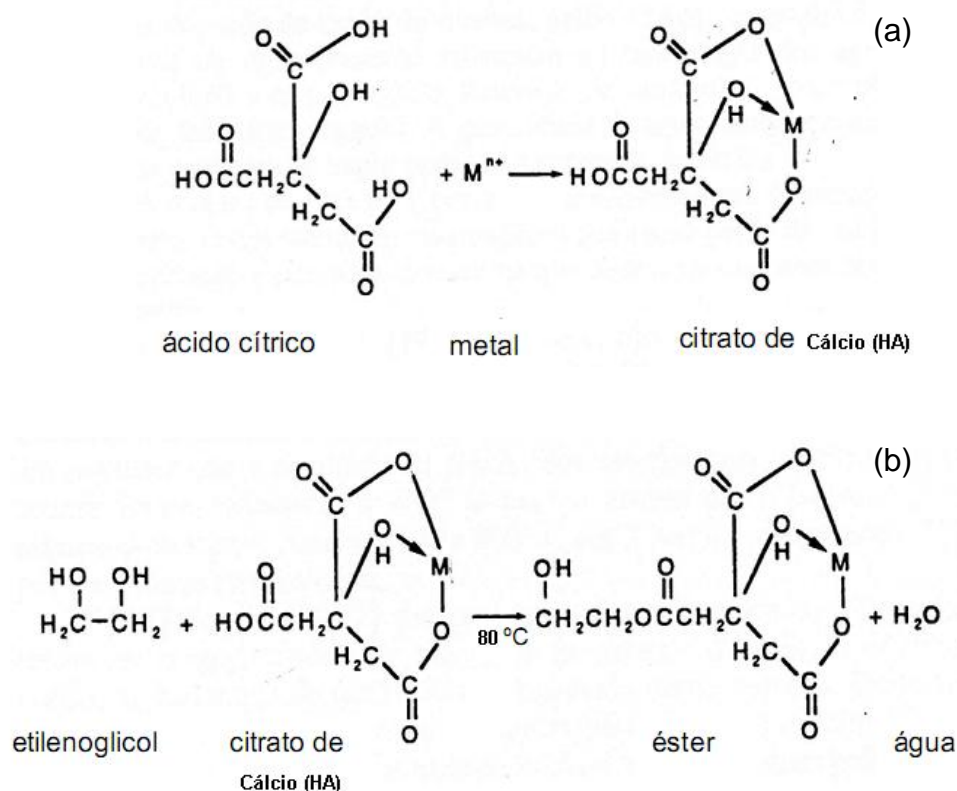


Figura 10 – Mecanismos da reação de poliesterificação; (a) formação do citrato metálico(b) formação da resina poliéster precursora da HÁ
Fonte: Adaptado de Andrade, 2006.

A figura 10.a apresenta a etapa de quelação entre os cátions metálicos e o ácido cítrico, formando o citrato metálico. A figura 10.b apresenta a poliesterificação da resina, na qual o etileno glicol reage com o citrato metálico (ácido hidroxicarboxílico).

Este método apresenta várias vantagens no processamento de pós cerâmicos, tais como, controle preciso e direto da estequiometria, mistura uniforme de multicomponentes em escala molecular e homogeneidade, pois reduzem a segregação dos íons durante processamento (RATMANN, 2010).

3.5.3.3 Método de réplica

Este método consiste no mesmo processo que o método de réplica de esponja polimérica, entretanto, utiliza como template fibras orgânicas (biotemplates). O processo ocorre pela impregnação dos biotemplates com suspensão cerâmica, que após tratamento térmico, replica a estrutura do template, eliminando toda a composição orgânica do template (RATMANN, 2010). Existem muitas variáveis a serem consideradas na utilização deste método, como o tipo de template a ser utilizado, sua molhabilidade, a viscosidade da solução de suspensão cerâmica, tratamentos térmicos adequados, etc. A figura 11 demonstra as etapas para impregnação das fibras.

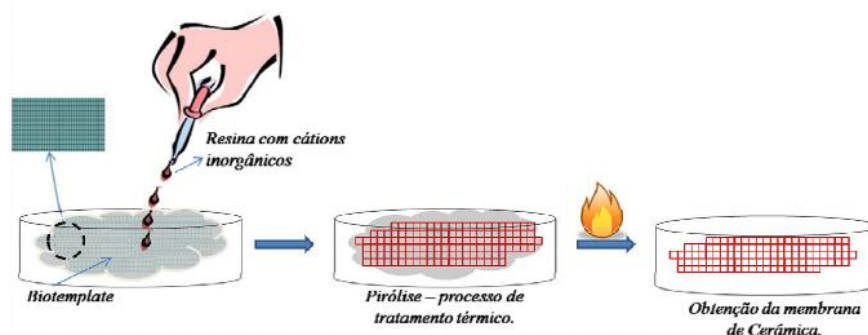


Figura 11 - Ilustração do procedimento de impregnação no método de réplica
Fonte: Ratmann, 2010.

3.5.4 Processos de caracterização de HA

Como mencionado anteriormente, existem algumas características que fazem com que a HA difere-se de demais biocerâmicas, e por isso é essencial, após sua síntese, avaliar sua estrutura cristalina e composição química. Muitas técnicas são usadas para avaliar a HA, porém algumas tornam-se essenciais, como a avaliação da estrutura cristalina por meio de difração de raios X (DRX), análise química que identifique no mínimo os compositores majoritários e se possível análise por infravermelho, pois este resultado avalia se a presença de outros fosfatos, que não tenham sido avaliados pelo DRX. A seguir, nas figuras 12 e 13, são ilustrados padrões de difração e de infravermelho.

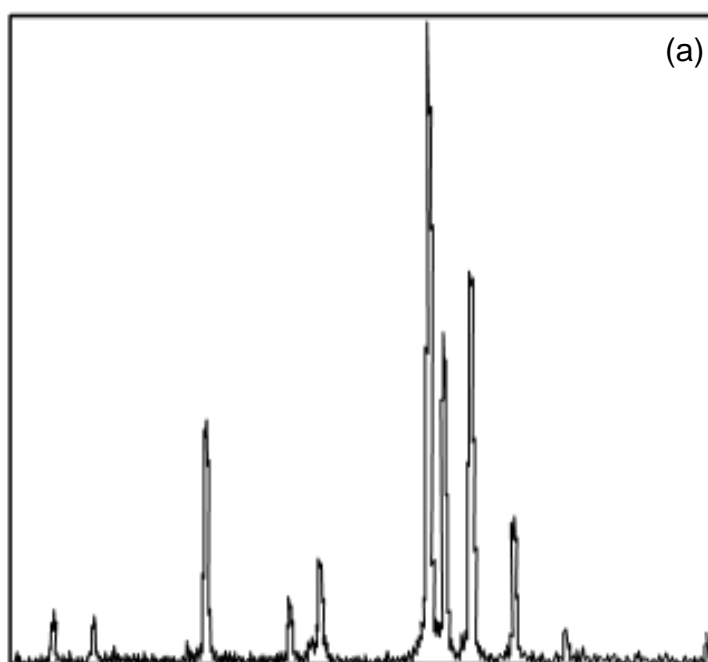


Figura 12 - Padrões de difração estabelecidos pela ISO 13779-3, padrão estrutural de HA sem presença de fases secundárias.

Fonte: ISO 13779-3

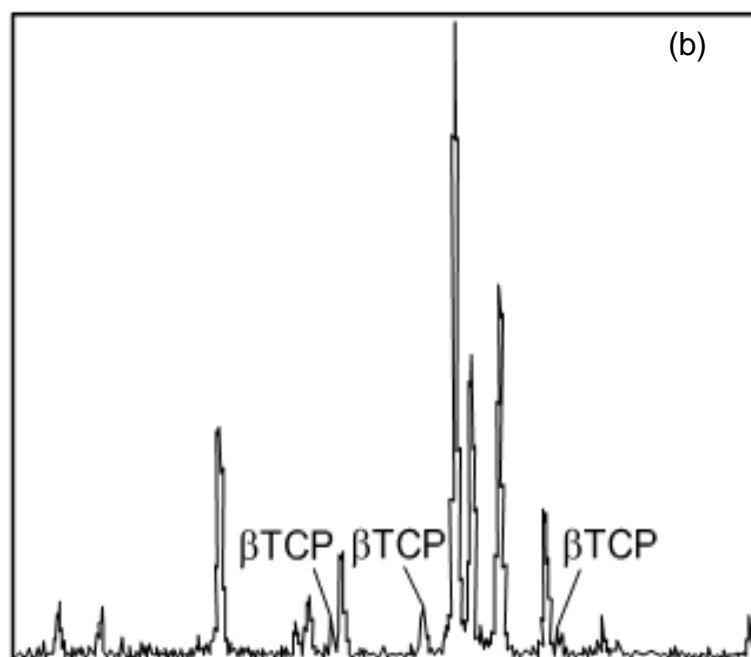


Figura 13 - Padrão de difração estabelecido pela ISO 13779-3, onde de HA pura e (b) padrão de HA com 5% da fase TCP
Fonte: ISO 13779-3

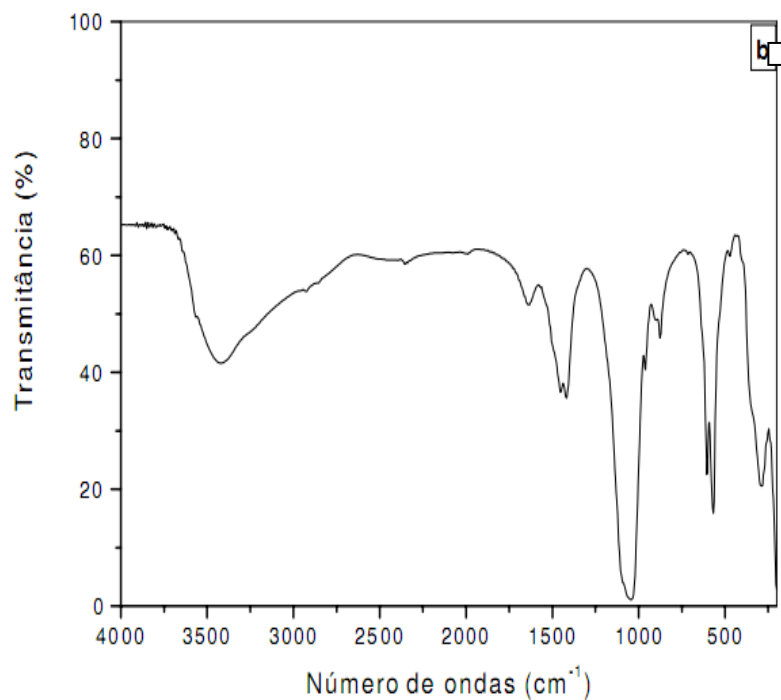


Figura 14 - Análise por infravermelho (FTIR) de HA comercial.
Fonte: Lacerda, 2005.

4 Metodologia

A metodologia do trabalho foi dividida em etapas, seguindo os passos de cada método escolhido, o fluxograma da figura 14 demonstra as etapas seguidas pelo trabalho.

4.1. Síntese química da resina precursora de hidroxiapatita utilizando o método de Pechini

Para realização da síntese química foi preciso inicialmente escolher qual tipo de reação seria utilizada no processo de obtenção de HA. Uma vez que o método de Pechini consiste no processo para obtenção de pós com distribuição homogênea e permite a manipulação da solução do complexo quelatado, foi escolhida porque manteria os precursores de HA distribuídos de forma estequiométrica por mais tempo, sem que ocorresse qualquer tipo de precipitação e, consequentemente, a produção de outro composto de cálcio.

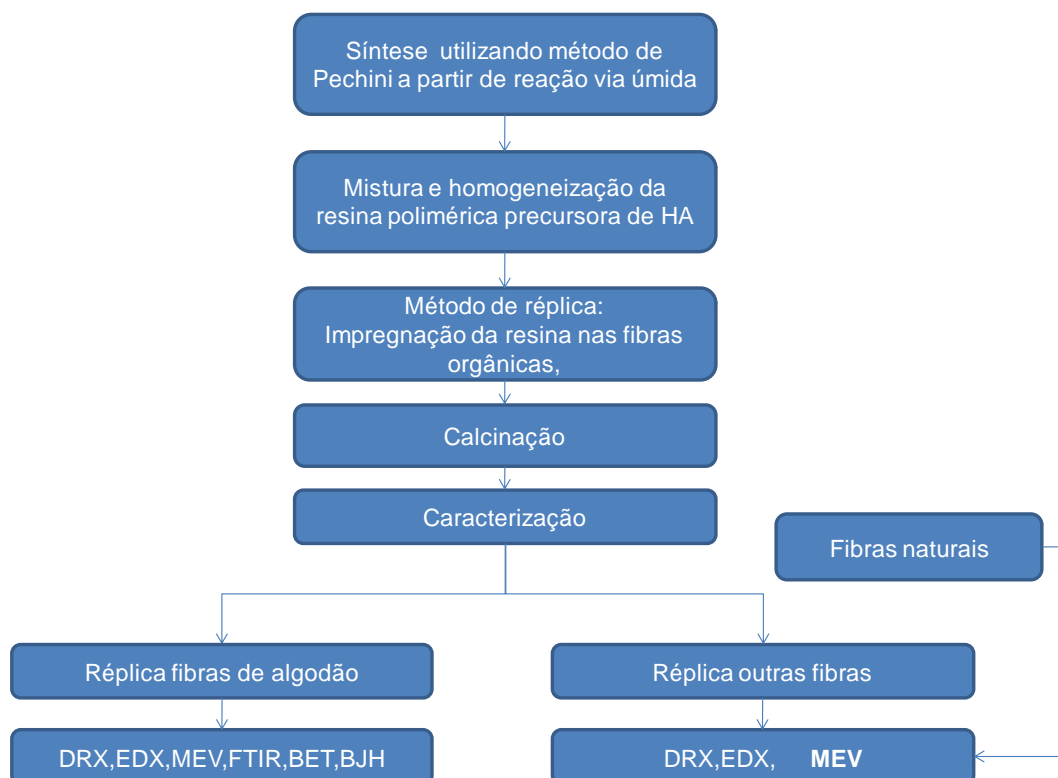
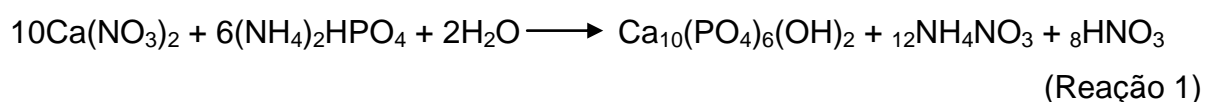


Figura 15 - Fluxograma da rota seguida pelo trabalho.
Fonte: O autor

Apesar da escolha do método, este não define que tipos de reações os íons tem de realizar para formar a cerâmica desejada, definindo em si somente os mecanismos para formar a resina polimérica. Desta forma, tendo a necessidade de haver reações no estado líquido, foi optado pelas reações via úmida, quais também apresentam melhor resposta para aplicação biológica. Dentre as diversas reações possíveis neste método, foi escolhida aquela que apresentava melhor interação com o método Pechini e melhor dissolução em meio aquoso, no caso foi escolhido a reação com o mecanismo:



- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – Nitrato de cálcio – demonstrado na figura 15 (6C).
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – Fosfato de amônio bibásico- demonstrado na figura 15 (4C).
- H_2O



Figura 16 - Fotografia dos reagentes utilizados na reação via úmida.
Fonte: O autor.

O mecanismo descrito anteriormente é para reação do método via úmida, sendo que o mesmo teve que ser adaptado para o método Pechini. Assim foi escolhido para ácido hidroxicarboxílico, o ácido cítrico, e para o álcool polihidróxi o etileno glicol, onde as fórmulas destes reagentes são demonstrados abaixo. Com isso na figura 10 a letra M seria substituída por todo o complexo da reação 1, formando um mecanismo extenso, que por fim tem a finalidade de distribuir os pontos de aprisionamento de cálcio direcionando para uma HA homogênea. A

solução complexa formada é responsável por manter a solução em estado homogêneo por um elevado tempo (não deixa a mesma precipitar).

- Ácido cítrico anidro. $C_6H_8O_7$
- Etileno glicol. $C_2H_4(OH)_2$

A razão molar entre ácido: metal utilizada foi de 3:1 e 4:1 avaliando qual era a melhor composição em função do tempo mínimos de segregação. O etileno glicol teve seu volume calculado através da fórmula da densidade, usando a massa dada pela razão ácido:álcool (60:40).

Obedecendo a razão de 3 mols de ácido para 1 mol de metal, o ácido cítrico foi pesado em uma balança de precisão (28,8195 gramas), misturado a 100ml de água destilada até sua homogeneização, formando a solução A. O nitrato de cálcio (11,8075 gramas) e o fosfato de amônio (3,9618 gramas) foram pesados e ambos adicionados sobre agitação a solução A, até completa homogeneização formando a solução B. Em seguida adicionou-se a ela o etileno glicol (17,25 ml), obedecendo a razão 40% etileno glicol/60% ácido cítrico (m/m), sob agitação até completa homogeneização sob temperatura de 45°C, formando a solução C final, ou seja, a resina pronta para ser impregnada sobre a fibra orgânica.

Para utilização da razão de 4 mols de ácido para 1 mol de metal, utilizou-se a mesma metodologia e as mesmas quantidades descritas anteriormente para razão molar 3:1, modificando apenas a massa de ácido cítrico (38,3397) e o volume de etileno glicol utilizado (22,94 ml).

4.2. Impregnação das fibras orgânicas

Esta etapa do processo consistiu basicamente no gotejamento da resina obtida pelo método descrito anteriormente, nas fibras dos biotemplates. O biotemplate de algodão comercial foi o primeiro a ser utilizado, até mesmo para avaliar inicialmente as características obtidas pelos métodos obtidos. A impregnação se deu por um gotejamento uniforme, com gotas espaçadas e sem embeber totalmente o algodão, deixando que a solução penetrasse vagarosamente a fibra utilizada. O excesso de solução fora retirada do algodão por deposição deste sobre

papel absorvente, sendo que a metodologia funcionava devido à relativa viscosidade da solução. Após, o algodão embebido na resina polimérica, foi seco em estufa entre 48 e 72 h à 80°C.

4.3. Calcinação

A etapa de calcinação é um dos fatores muito importante, pois com esta etapa fornecemos energia suficiente para que ocorra a transformação da fase de HA. A calcinação foi feita com os princípios de materiais cerâmicos, qual relatam a temperatura de calcinação como sendo maior ou igual a temperatura de decomposição de seus precursores. Isto equivale a temperaturas a partir de 650°C, porém, nessa temperatura o produto obtido de HA é muito frágil, pois os grãos de HA formam-se rapidamente em pedaços menores, buscando o equilíbrio químico não mantendo a estrutura desejada. Por isso, a temperatura escolhida nesta etapa do processo foi de 1200°C por atingir resistência mínima para manter as estruturas fibrosas e poder manuseá-las. Temperaturas menores também foram testadas no trabalho, mas não mostraram-se eficazes em termos de resistência mecânica-estrutural. A imagem 16 demonstra o forno usado no processo de calcinação, sendo este conhecido como forno Pechini por possuir filtros que inibem a liberação de gases provindos da queima da matéria orgânica presente na resina polimérica.

4.4. Etapas de caracterização

4.4.1 Análise por Difração de raios X

A técnica de difração de raios X é uma ferramenta muito utilizada para caracterização de estruturas dos materiais sólidos. Materiais sólidos cristalinos apresentam ordenação de longo alcance onde seus átomos arranjam-se de tal forma realizando ligações aos seus vizinhos de maior proximidade. Isto reflete diretamente nas propriedades dos materiais, principalmente as propriedades mecânicas, por isso então tornasse importante à caracterização por tal técnica, tendo conhecimento do tipo de estrutura do material e das propriedades previstas para o mesmo em sua utilização. A análise de difração de raios X foi realizada utilizando o difratômetro

XRD-6000 da Shimadzu, tendo por finalidade a caracterização das fases cristalinas presentes na HA. A análise foi realizada entre os ângulos de 10° a 80° , com step de $0,02^\circ$ e uma velocidade de avanço de $2^\circ/\text{minuto}$ atingindo o tempo de 0,6s. A tensão de excitação foi de 30 kV, a corrente de 30 mA, sendo o material analisado em forma de pó. O equipamento utilizado usava como fonte de radiação a linha $K\alpha$ do cobre, com comprimento de onda igual a $1,5406 \text{ \AA}$.

4.4.2. Espectrometria de fluorescência de raios x por energia dispersiva (EDX)

Esta técnica é utilizada para caracterização da composição química dos materiais. Nesta técnica são utilizados feixes de raios X que atingem o material (amostra) excitando os átomos de sua composição, quais ao voltarem ao seu estado fundamental emitem fótons com energia característica para cada átomo. Os diferentes fótons são identificados em função de suas energias através de um detector de raios X presente na câmara de análise do equipamento. Assim o equipamento gera um espectro relativo do número de contagens de pulsos em função da energia em keV, identificando os elementos químicos presentes na amostra. Os resultados podem ser expressos em forma de gráficos tendo como caráter uma análise qualitativa ou em tabelas expressando a porcentagem relativa dos átomos encontrados no material em uma análise de caráter quantitativa. O equipamento utilizado foi o EDX 720 da shimadzu, qual apresenta restrições de análise em algumas linhas espectrais, não identificando elementos como o oxigênio, carbono, etc. As análises foram realizadas colocando as amostras de HA em porta amostras específicos, sendo que esta análise é não destrutiva.

4.4.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica muito versátil para análise microestrutural. É possível ainda realizar outros tipos de caracterizações, devido às interações que ocorrem entre o equipamento e amostra. O procedimento de realização da análise é dado pela interação de um feixe de elétrons, gerados no equipamento, com a superfície da amostra. Tal interação apresenta como resultado

uma imagem com aparência tridimensional, fato da elevada profundidade de foco alcançada. A análise microscópica foi realizada utilizando microscópio eletrônico de varredura SSX 550 da Shimadzu. As amostras foram preparadas pelo método de recobrimento de filme fino de ouro, realizado pela técnica de sputtering, para obter a condutividade do feixe em sua superfície, uma vez que não são condutoras. As análises foram realizadas com diferentes aproximações, com intuito de avaliar a microestrutura das fibras replicadas, obtendo detalhes das suas dimensões, de seu entrelaçamento, das porosidades formadas devido seu entrelaçamento, e das porosidades formada por cada fibrila.

4.4.4. Espectroscopia de infravermelho

Esta técnica avalia as frequências de ligações químicas nos materiais. Indica os grupamentos de compostos orgânicos e inorgânicos, quando apresentam movimentos entre suas ligações que expressem resultados vibracionais com comprimento de onda dentro da região do vermelho. As amostras foram compactadas com Nujol e levadas ao infravermelho para realização da análise. O equipamento utilizado foi o IRPrestige-21 da Shimadzu.

4.4.5. Análise da porosidade e área superficial (fisissorção de nitrogênio)

As isotermas de adsorção-dessorção de N_2 a 77 K foram realizadas em equipamento Autosorb-1 Quantachrome Instruments. Foi utilizado o método BET para o cálculo de área superficial específica e o método BJH para o cálculo de distribuição de poro. As amostras foram previamente ativadas em 250 °C sob vácuo, durante 1 hora. Em seguida levadas a uma parte do equipamento para realização da análise de adsorção-dessorção, obtendo isotermas de adsorção-dessorção física de nitrogênio, a 77K. O valor da área superficial específica (área total exposta por grama) foi determinado pelo método de Brunauer-Emmett-Teller (BET) e o volume de poros foi calculado de acordo com o método Barrett-Joyner-Halenda (BJH).

5. Resultados e discussão

5.1. Síntese química método Pechini

A síntese demonstrou-se efetiva para formação da solução precursora de HA (resina polimérica), mantendo os íons em suspensão por longo tempo. Soluções foram deixadas em frascos específicos em período de um mês até ser visualizado a segregação de íons. A segregação é fortemente influenciada por variações de temperatura e umidade do meio, no caso das soluções produzidas para HA.

Outra observação importante sobre o processo do método Pechini é que a utilização da razão 3:1 de ácido para metal foi eficaz para aprisionar os cátions metálicos, demonstrando que a solução criou rede suficiente para aprisionar o complexo precursor de HA. E em relação à razão de 4:1 não houve variação significativa se comparado aos resultados de tempo de segregação da razão 3:1. Verificando-se também que aumentando a quantidade de ácido aumentou a viscosidade da resina e a quantidade de material orgânico. Estes resultados implicam em maior dificuldade na impregnação da resina na fibra e maior quantidade de subprodutos gerados na calcinação.

5.2. Fibras impregnadas

O tempo de envelhecimento das fibras impregnadas em estufa é crucial para obtenção da réplica das fibras. Consiste no tempo necessário para adesão da resina junto às fibras. Após impregnação a resina que fica dispersa sobre as fibras exercem forças que atuam na direção de isolamento das fibras acarretando em um problema de fechamento das fibras, não a replicando. Este problema é amenizado pela remoção do excesso de resina e pela distribuição adequada da mesma. Mas, a melhor maneira de evitar estes problemas é pelo processo de secagem, no qual a água presente na resina vai evaporando, e, ao mesmo tempo em que exerce forças para abertura das fibras, aumenta viscosidade da resina aderindo mais fortemente, uma vez que esta resina esteja bem distribuída.

5.3. Calcinação

O processo de calcinação foi realizado a uma taxa de aquecimento de 10°C/min., com rampa de suba até 1200°C, sendo mantida nesta temperatura por 120 min.

5.4. Caracterizações

Somente a HA replicada de algodão foi caracterizada por todas as técnicas descritas anteriormente. As demais fibras sintetizadas não foram analisadas a tempo de expressar seus resultados neste trabalho de conclusão, pelas técnicas de infravermelho, análise superficial e de porosidade. Sendo assim serão expressas as análises realizadas inicialmente nas fibras de algodão e posteriormente serão demonstrados os resultados incluindo as demais fibras reproduzidas.

5.5 Análise por infravermelho

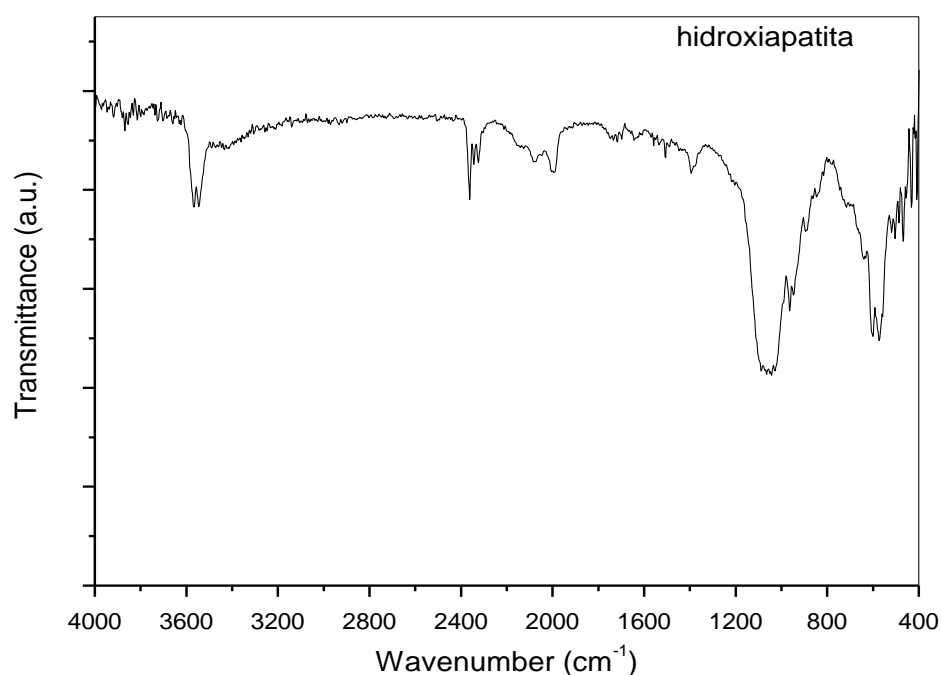


Figura 17: Infravermelho para Hidroxiapatita. Réplica algodão 1200°C

A figura 16 apresenta o espectro de absorção no infravermelho para a hidroxiapatita replicada em algodão. É possível observar com os picos entre 3700 e 3100 cm^{-1} , em conjunto com o pico de absorção em torno de 1600 cm^{-1} , a vibração de estiramento dos grupos -OH ligados ao hidrogênio. Os picos correspondentes ao -OH estrutural são os picos apresentados em 630 cm^{-1} e 3570 cm^{-1} , sendo o primeiro do grupo apatita. As bandas presentes em torno de 1090, 1039, 599 e 571 cm^{-1} caracterizam a fase HA. O pico presente em torno de 3640 cm^{-1} tem sido referido como sendo devido às vibrações de estiramento -OH do $\text{Ca}(\text{OH})_2$. As bandas localizadas em cerca de 490, 560, 600, 960, 900-1300 e 1950-2200 cm^{-1} são características de PO_4^{3-} (RIGO et al., 2007; VOLKMER, 2006).

Assim, o resultado indica a formação da estrutura típica da HA, uma vez que foram observados seus picos característicos.

5.5. Análise por fisissorção de nitrogênio

A tabela 2 apresenta os cálculos realizados para análise dos dados de fisissorção. Todos os dados da tabela referem-se ao ramo da adsorção. A área externa é calculada através do método estatístico T-Plot de De Bøer. A área de microporos foi obtida através do modelo Dubunin-Radushkevich. O diâmetro de poros é dado pelo método de BJH.

Tabela 2: Resultados dos cálculos obtidos pela análise de fisissorção

Material	S_{BET} (m^2/g)	S_{ext} (m^2/g)	S_{mic} (m^2/g)	V_{tot} (mL/g)	V_{mic} (mL/g)	V_{mes} (mL/g)	d_{poro} (\AA)
Algodão1200°C	4,792	3,979	11,40	0,08465	0,004063	0,08059	6,8

Onde: S_{BET} = Área superficial total específica; S_{ext} = Área externa aos poros; S_{mic} = Área de microporos; V_{tot} = Volume total (BJH); V_{mic} = Volume de microporos; V_{mes} = Volume de mesoporos; d_{poro} = diâmetro do poro na adsorção; D= Dimensão fractal pelo método de Neimark.

Na isoterma de fisissorção de N_2 da Figura 17a verifica-se que a amostra possui poros estreitos e fundos, havendo quantidade significativa de microporos.

Além disso, a distribuição de poros nessa mesma figura demonstrou que a fibra não é homogênea quanto ao diâmetro de poros, entretanto a amostra possui extensa variedade de poros na faixa de 2 a 50 nm; portanto é mesoporosa. Acredita-se que a análise não correlacionou o entrelaçamento entre as fibras, analisando somente a estrutura de cada fibrila.

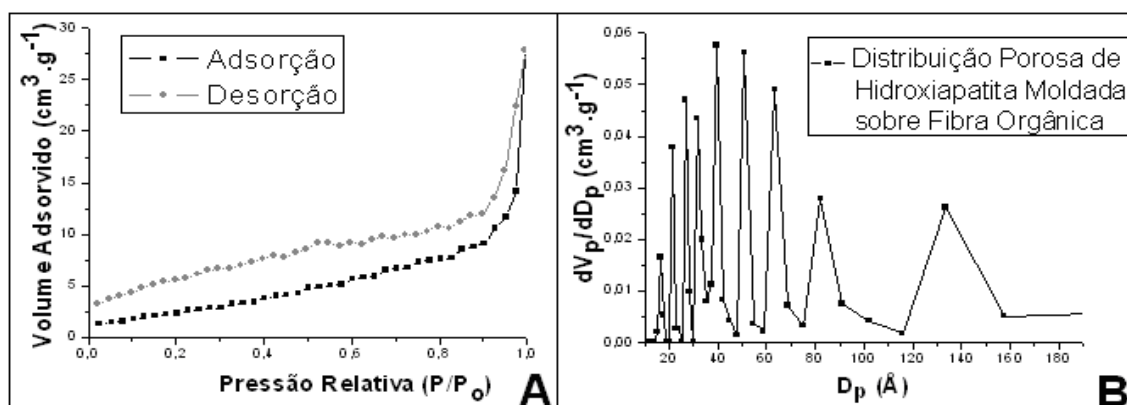


Figura 18: (A) Isoterma de fisissorção de N₂ e (B) análise de distribuição de poros.

5.6. Difração de Raios X

A análise por difração de raios X demonstrou e comprovou a formação da fase cristalográfica característica da hidroxiapatita. Os dados, apresentados nos gráficos das figuras 18 e 19, correspondem aos dados da ficha cristalográfica PDF 89-6439, segundo o segundo o comitê de padrões de fichas cristalográficas, JCPDS (*Joint Committee and Powder Diffraction Standards*). Esta ficha apresentou resultado mais próximo aos resultados obtidos com a análise, sendo que foi realizado a convalidação junto ao banco de dados de fichas cristalográficas de HA, partindo da avaliação da ficha PDF 09-0432, que representa o princípio da avaliação de estruturas de HA.

A ficha com maior afinidade apresentou pequeno desvio dos parâmetros de rede em relação a ficha 09-0432. A avaliação da estrutura cristalina também apresentou pequenos traços de beta fosfato tricálcico (β -TCP). A ficha correspondente encontrada foi PDF 09-0169, segundo JCPDS. A presença desta fase pode apresentar alguns inconvenientes em termos da descrição de propriedades biológica da HA. Entretanto estudos mostram que a presença de TCP em composições com HA melhora a degradabilidade da HA. Sendo que a ISO

13779-3, apresenta métodos de testes para análise química e avaliação da cristalinidade e pureza de fases, apresentando a característica estrutural de HA pura e sua possível contaminação por outras fases de fosfatos de cálcio. Este padrão estabelece as rotas para avaliação de fases e percentuais de contaminação.

A equação 1 demonstra um processo matemático utilizado para avaliar o percentual em massa de fase de β -TCP em HA. Ela é dada pela integração do pico de maior intensidade de cada fase presente no resultado de difração. Desta forma a avaliação do percentual de fase foi feito utilizando a equação 1, e para calcular a área do pico foi utilizado o software *Fytik* para análise de curvas e picos. O resultado demonstrou que existe a presença de aproximadamente 5% em massa de β -TCP. Esta quantia não causa alterações diretas nas propriedades da HA sendo que sua presença também não afeta a biocompatibilidade do material.

$$R_1 = \frac{\text{peak 210 or peak 211 integrated intensity of the apatite}}{\text{peak 0.2.10 integrated intensity of the } \beta\text{-tricalcium phosphate}} \quad (\text{equação 1})$$

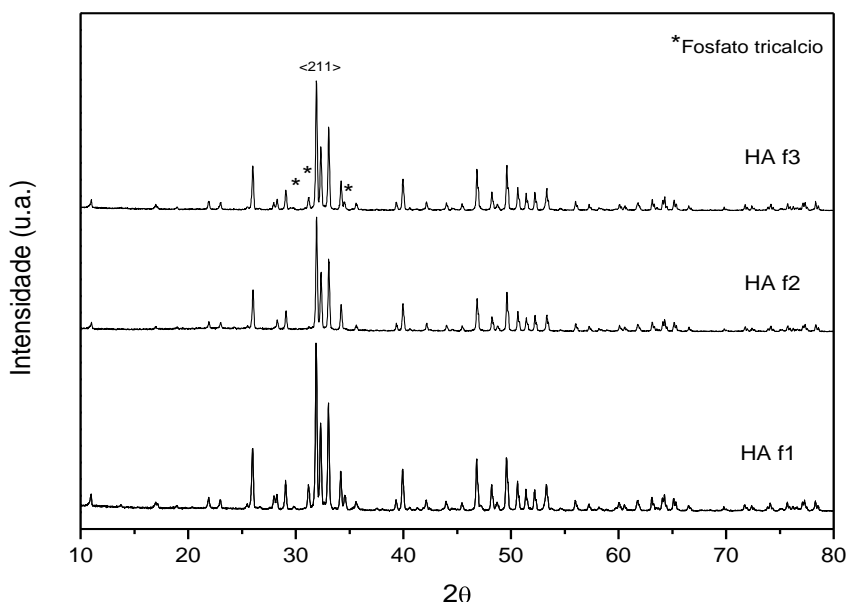


Figura 19: Gráficos de difração de HA replicada dos biotemplates f1 (algodão), f2 (coco) e f3 (banana).

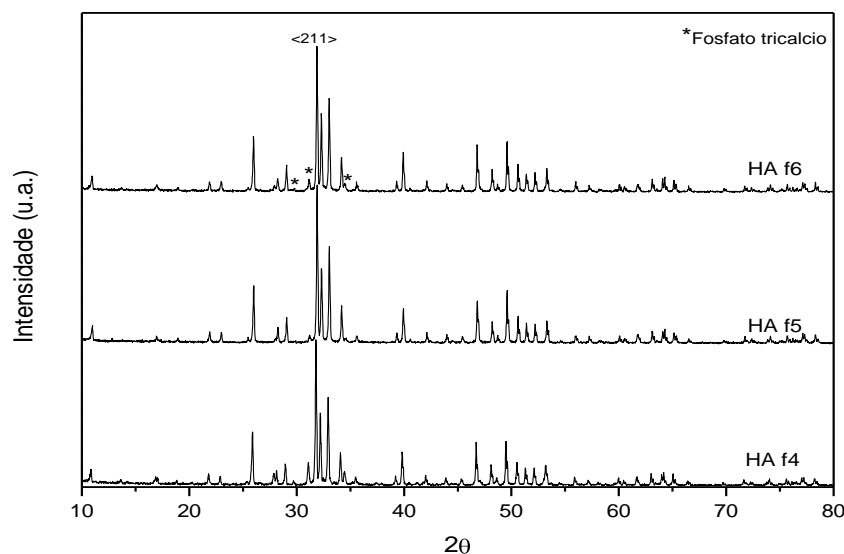


Figura 20: Gráficos de difração de HA replicada dos biotemplates f4 (gaze), f5 (barbante) e f6 (esponja orgânica).

Em todas as análises realizadas, os resultados apresentam-se semelhantes, com a mesma fase cristalina e mesmo padrão de difração. Isso era esperado uma vez que a metodologia da síntese química e tratamentos térmicos mantêm-se igual, existindo apenas erros associados à falha humana e de equipamentos.

5.7. Espectrometria de fluorescência de raios x por energia dispersiva (EDX)

As análises de fluorescência de raios X demonstram a presença dos elementos compositores da hidroxiapatita, no caso, cálcio e o fósforo. A análise realizada apresenta um caráter quantitativo, entretanto, devido a limitações do equipamento, não realiza análise de elementos como o oxigênio e o hidrogênio. Este fato não complicaria os resultados caso fossem expressos com valores adequados. Porém a presença dos átomos de oxigênio e hidrogênio na composição da cerâmica da HA interfere na obtenção dos percentuais relativos correspondentes a razão molar para formação de HA. Os resultados calculados de razão molar Ca/P para estas análises ultrapassam valores estabelecidos, 1,67, atingindo valores próximos a 3.

Com isso, esta análise não representa os valores reais das quantidades elementares existentes nesta cerâmica, mas sim representa uma análise qualitativa demonstrando a presença do cálcio e fósforo, e servindo também para indicar possíveis elementos traços. Dos elementos traços, o estrôncio está presente em todas as fibras, o silício e ferro na fibra 1 e o cobre e o zinco na fibra 3. Estes elementos costumam ser elementos traços da HA, servindo como mais um indicador da formação de HA. Os valores indicados para alguns destes elementos traços ultrapassam um pouco os valores admitidos, entretanto, devido às interferências que ocorrem nos resultados, estes valores podem apresentar desvios de suas quantidades verdadeiras.

Tabela 3: Resultado Quantitativo da análise química da HA em diferentes biotemplates.

Resultado Quantitativo (% relativo)						
Elemento/biotemplate	F1	F2	F3	F4	F 5	E 6
Ca	77,455	77,866	75,659	78,956	79,730	78,795
P	20,764	21,728	22,507	20,812	19,903	20,948
Sr	0,043	0,406	0,145	0,232	0,367	0,258
Si	1,625	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cu	0,000	0,000	1,647	0,000	0,000	0,000
Zn	0,000	0,000	0,043	0,000	0,000	0,000
Fe	0,113	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

F1= algodão F2= côco F3= Banana F4=Gaze F5= Barbante E6= Esponja orgânica

5.8. Microscopia Eletrônica de varredura

As micrografias obtidas pela aproximação de 20 a 50 vezes das diferentes fibras são apresentadas nas figuras 20 a 25. Elas demonstram a morfologia, o entrelaçamento, os poros, a textura superficial e as dimensões das fibras em seu estado natural (figuras posicionadas a esquerda), e depois do processo de réplica (figuras posicionadas a direita). Com as micrografias foi possível observar que as imagens da gaze, barbante e algodão apresentam maior entrelaçamento com fibras em menores dimensões, mantendo esses formatos após processo de réplica. A réplica da esponja orgânica demonstrou a formação de poros interconectados com variados tamanhos, estrutura que literaturas apresentam como possível scaffold. As

réplicas com biotemplates de côco e banana, figura 20 e 21, demonstraram menor eficácia no processo de réplica se comparadas aos outros biotemplates. Pois suas arquiteturas só mantiveram-se em partes, o que é explicado em função das fibras estarem bastante isoladas não apresentando uma caráter de absorção adequado, porém se pode induzir a utilização destas fibras, depois de tratamento superficial, para tentativa da formação de fibras ocas. As micrografias da figura 26 apresentam a réplica da fibra de algodão com aproximação de 500 e 2000 vezes, nas quais é possível detalhar mais as fibras replicadas, observando-se a formação dos grãos da cerâmica de HA sobre as fibras de algodão.

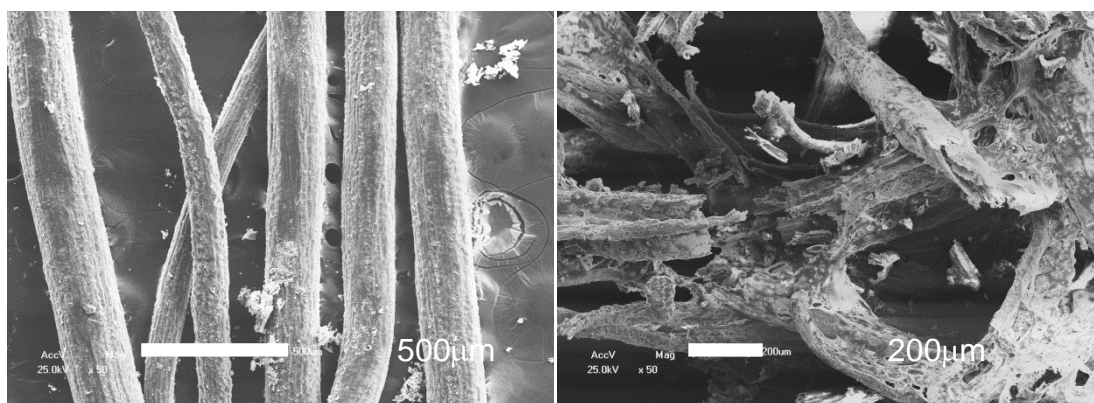


Figura 21: Micrografia obtida para a fibra de coco à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.

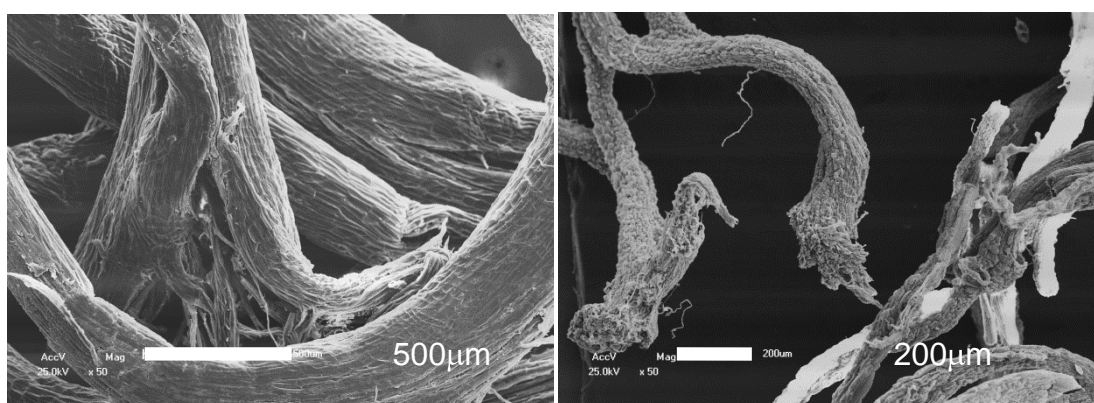


Figura 22: Micrografia obtida para a fibra de banana à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.

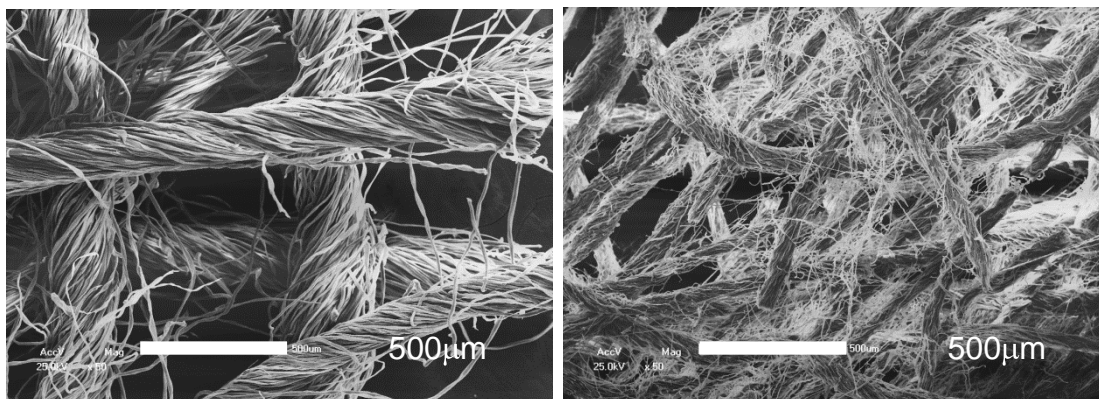


Figura 23: Micrografia obtida para a gaze comercial à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.

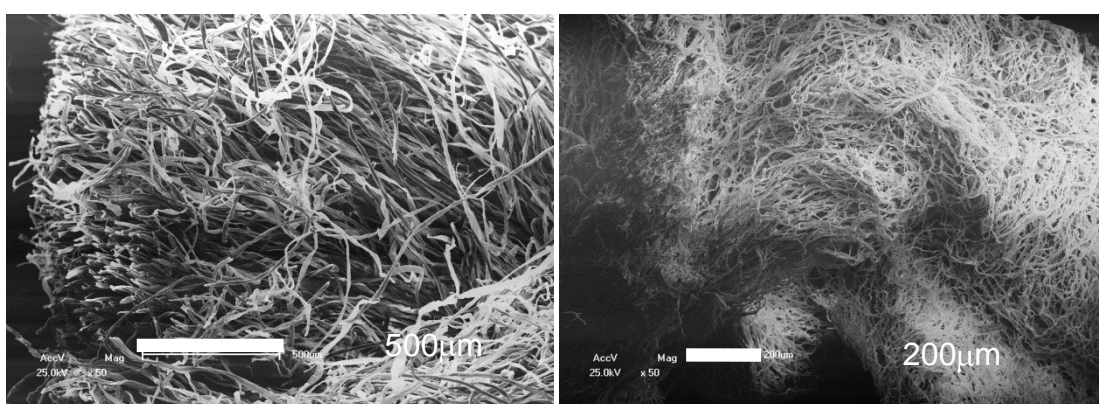


Figura 24: Micrografia obtida para as fibras do cordão de barbante à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.

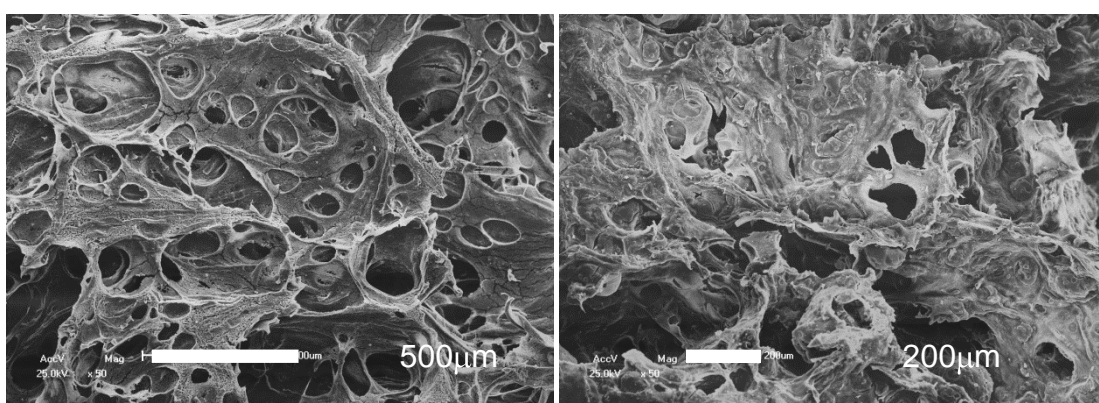


Figura 25: Micrografia obtida para a fibra da esponja orgânica à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.

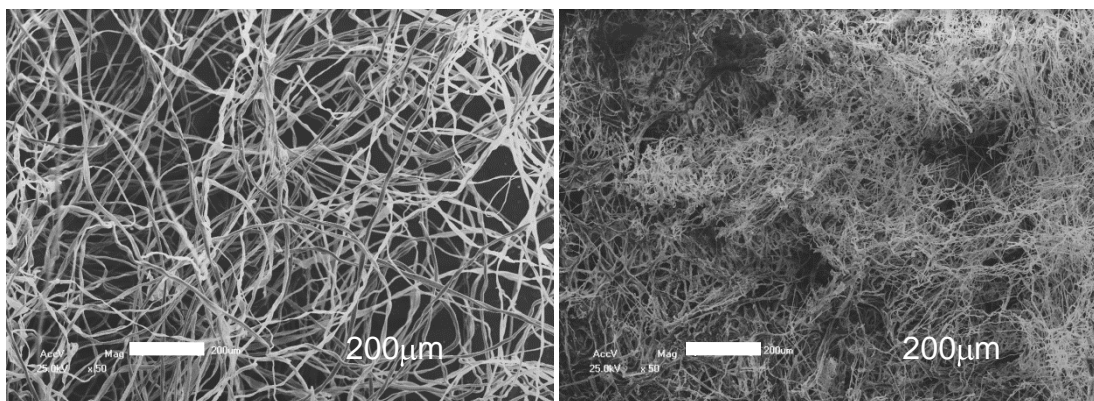


Figura 26: Micrografia obtida para a fibra de algodão à esquerda, e, para a fibra replicada à direita.

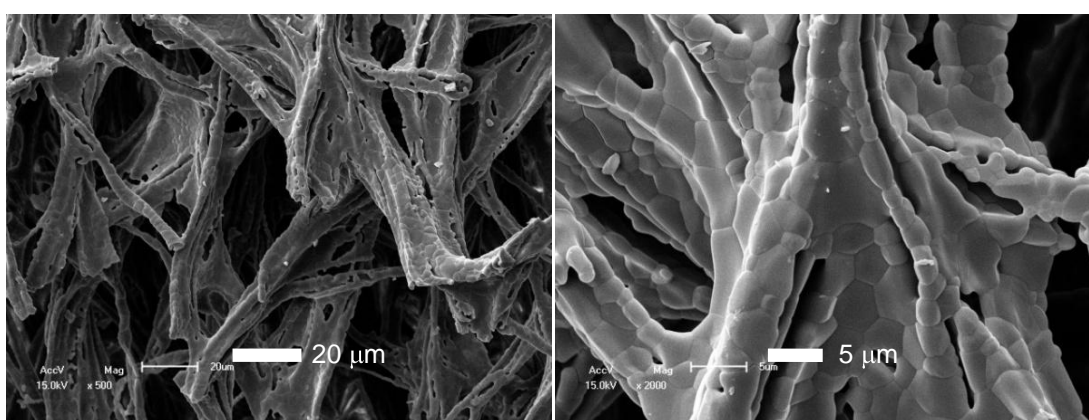


Figura 27: Micrografias obtidas para fibras replicadas de algodão.

5.9. Avaliação In vitro

As fibras produzidas inicialmente, que eram replicadas de algodão, foram utilizadas no trabalho de doutorado de Santana (2011), a qual realizou testes de citotoxicidade para utilizar o material na confecção de sua tese. O método utilizado para análise está descrito no referido trabalho.

Os resultados para a análise de citocompatibilidade demonstraram que a inclusão de nano/microfibras não aumentou a toxicidade celular (SANTANA, 2011).

6. Conclusão

Após avaliação dos resultados obtidos e dos estudos feitos em relação a produção de HA, foi possível avaliar que o método utilizado mostrou-se consistente para produção de HA com formatos diferenciados. Os resultados mostraram que o método Pechini é eficaz para produção de HA, podendo ainda ser alterado conforme a necessidade da reação via úmida. O processo de réplica é uma alternativa viável para obtenção de estruturas porosas e complexas, o qual pode ser adaptado conforme necessidade de aplicação. Os resultados da análise de fisssorção para as fibras de algodão mostraram que ela possui poros com tamanhos viáveis para aplicação como scaffold, obviamente necessitando todo o processo de caracterização das propriedades biológicas.

A avaliação do comportamento biológico e de suas propriedades como implante já é uma questão viável, sendo que estudos estão sendo feitos com estas fibras, um deles avaliou a citotoxicidade da hidroxiapatita, mostrando que o mesmo apresenta um grau inicial de biocompatibilidade. Isso demonstra que as metodologias aplicadas no trabalho apresentam potencial, mas, é necessário a realização do aperfeiçoamento da mesma, buscando novos biotemplates ou configuração dos mesmos, mudando a rota química aplicada no método Pechini e buscando por mais métodos de caracterização.

Referências

AFSHAR, A. et al. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. **Materials and Design**, v.24, p.197-202, 2003.

ANDRADE, Izangela Marculino de. **Síntese pelo método Pechini e caracterização de zircônia-céria e zircônia-céria-neodímio**. 2006. 118f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

ANGELO, Liliam Cristina. **Síntese e caracterização de nanocompósitos hidroxiapatita-gelatina obtidos pelo método de precipitação utilizando o método de Rietveld e IVTF**. 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

BAUER, S et al. Engineering biocompatible implants surfaces – Part I: Materials and surfaces. **Progress in Materials Science**, article in press, 2012.

BICALHO, Sheyla M. C. Máximo et al. **HAP-91® e COL.HAP-91® Casuísticas e Estudos Científicos**. 4.ed. Sabará:JHS Laboratório Químico Ltda, 2011. 414 p.

BITTENCOURT, R. A. C. et al. Cultura de condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginate. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.17, n.4, p.242-246, 2009.

BURDICK, Jason A.; MAUCK, Robert L. **Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A review of the past and future trends**. Philadelphia:Springer Wien New York, 2011. 576p.

CUNHA, Matheus Araújo da. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada obtidos por aspersão de solução em chama**. 2010. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

DOURADO, Érico Rodrigues. **Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio**. 2006. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FARIA, M. H. A. et al. Estudo da necessidade de desenvolvimento de materiais para implantes ósseos de baixo custo econômico. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION, 4., Taubaté, 2012.

FROHBERGH, M.E. et al. Electrospun hydroxiapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.33, p. 9167-9178, 2012.

GERHARDT, L.C.; BOCCACCINI, A.R. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Materials**, v.3, p. 3867-3910, 2010.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v.33, n.6, p. 1352-1358, 2010.

HE, J. et al. Hydroxiapatite-poly(L-lactide) nanohybrids via surface-initiated ATRP for improving bone-like apatite-formation abilities. **Applied Surface Science**, v.258, p. 6823-6830, 2012.

HE, W. et al. Synthesis of mesoporous structured hydroxyapatite particles using yeast cells as the template. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.21, p. 155-159, 2010.

JIANG, M. et al. Characterization of electronic structure and bonding in hydroxyapatite: Zn substitution for Ca. **Philosophical Magazine A**, v.82, n.11, p.2357-2377, 2002.

KRÜGER, R.; GROLL, J. Fiber reinforced calcium phosphate cements – On the way to degradable load bearing bone substitute? **Biomaterials**, v.33, p. 5887-5900, 2012.

LACERDA, Cássio André. **Obtenção de matrizes bioabsorvíveis à base de hidroxiapatita para aplicação em branquiterapia**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2005.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v.260, n.5110, p.920-926, 1993.

MOBASHERPOUR, I. et al. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method. **Journal of Alloys and Compounds**, v.430, p. 330–333, 2007.

MOTSKIN, M. et al. Hydroxiapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. **Biomaterials**, v.30, p. 3307-3317, 2009.

OLIVEIRA, Daniella Maria Pinheiro de. **Síntese e Caracterização de pós de fosfato tricálcio- β e de hidroxiapatita: elaboração de bifásicos HA/TCP- β para aplicações como substituto ósseo**. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2010.

ORÉFICE, Rodrigo Lambert et al. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. 1.ed [1.reimpr.]. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2012. 538 p.

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. **Biomaterials: Principles and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2002.

PLACE, E. S. et al. Complexity in biomaterials for tissue engineering. **Nature Materials**, v.8, 2009.

RATMANN, Cristiane Wienke Raubach. Obtenção de cerâmicas estruturais com propriedades ópticas, baseadas em métodos químicos, processo de réplica (biotemplates) e recobrimento tipo core-shell. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

RIGO, E.C.S. et al. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Dental Press Periodontia Implantol**, v.1, n.3, p. 39-50, 2007.

RODRIGUES, L.R. et al. Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite gel and its application as scaffold aggregation. **Materials Research**, v.15, n.6, p. 974-980, 2012.

SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v.9, p. 7591–7621, 2013.

SANTANA, Bianca Palma. **Obtenção, caracterização e aplicação (in vitro) de Nanoscaffold injetável funcionalizado com substâncias bioativas**. 2011. 145 f. Tese (Doutorado em Materiais Dentários) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2011.

SANTOS, M.L. et al. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando

precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química**, v.30, n.3, p. 29-35, 2005.

SHI, D. et al. **Biomaterials and Tissue Engineering**. Springer, v.2, 2004. p.1-98.

SOARES, G. A. Biomateriais. In: FÓRUM DE BIOTECNOLOGIA BIOMATERIAIS, 2005, Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio De Janeiro, 2006.

TAN, R. et al. Preparation and characterization of an injectable composite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, DOI 10.1007/s10856-009-3692-6, 2009.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biocompatibility**. Amsterdam: CRC press, v.1, 1987.

VAZ, Gerson José de Oliveira. Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Rede Temática em Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Ouro Preto, Belo Horizonte, 2007.

VOLKMER, Tiago Moreno. **Obtenção e caracterização de hidroxiapatita porosa pelo método *gelcasting* de espumas para uso como implantes**. 2006. 139 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ZAKHAROV, N.A. et al. Calcium Hydroxyapatite for Medical Applications. **Inorganic Materials**, v.40, n.6, p. 641–648, 2004.

ZHAO, H. et al. The structural and biological properties of hydroxiapatite-modified titanate nanowire scaffolds. **Biomaterials**, v.32, p. 5837-5846, 2011.