

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PREPARAÇÃO DE PASTAS DE BIOCERÂMICAS A PARTIR DE FOSFATOS DE
CÁLCIO E QUITOSANA APLICÁVEIS EM OSTEOINTEGRAÇÃO

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau
de Mestre em Química

Mellatie Rodney Finisie

Florianópolis, Santa Catarina – Brasil

Fevereiro de 2001

**PREPARAÇÃO DE PASTAS DE BIOCERÂMICAS A PARTIR DE FOSFATOS DE
CÁLCIO E QUITOSANA APLICÁVEIS EM OSTEOINTEGRAÇÃO.**

MELLATIE RODNEY FINISIE

**Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros
da banca examinadora**



Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira

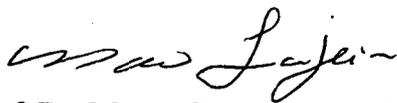
(orientador)



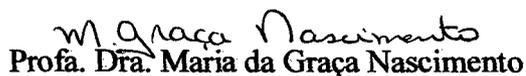
Prof. Dr. Valdir Soldi

(Coordenador do curso de Pós – Graduação)

Banca Examinadora



Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira



Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento



Prof. Dr. Eduardo Antônio Pinheiro



Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente

*“O ser humano, quando não encontra a si mesmo,
não é capaz de encontrar coisa alguma”.*

Poeta alemão:

Johann Wolfgang Von Goethe (1749 – 1832)

*Dedico este trabalho à minha irmã Caçula
falecida (1998) e meu pai falecido (1981), por
serem meus eternos companheiros e amigos.....*

AGRADECIMENTOS

Meu carinho e minha gratidão às seguintes pessoas:

A DEUS pela força, saúde, capacidade, amor e tudo que eu preciso para ser quem sou. Não tenho palavra bastante para agradecer o SENHOR.

À minha mãe, Agnes, que sempre deu e encheu minha vida de amor e fé. Pela dedicação e sofrimento nos momentos difíceis, que sempre me apoiou e me ensinou a viver, a esta guardarei sempre em meu coração, MUITO OBRIGADO.

Aos meus irmãos, por serem sempre amigos e companheiros nos bons e maus momentos.

À minha família, pelo amor e apoio, que sempre me deram. Em especial ao meu irmão ALVIN H. FINISIE, pelo incansável apoio e incentivo, pela compreensão, preocupação e a função como pai, MUITO OBRIGADO por ser como meu pai.

À CARLA, pela amizade e atenção, durante todo o tempo que fui orientando do PROF. DR. MAURO C. M. LARANJEIRA no grupo QUITTECH .

Ao PROF^o DR. MAURO C. M. LARANJEIRA e PROF^o DR. VALFREDO T. FÁVERE, pela oportunidade de realização deste trabalho junto ao grupo QUITTECH, e o apoio nos momentos mais difíceis durante o curso, meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas do grupo QUITTECH, pela compreensão, apoio e amizade.

Ao curso de pós-graduação em Química, pelo apoio e oportunidade dados durante a realização do curso. Aos conhecidos que me apoiaram na minha permanência aqui no Brasil, nos momentos mais difíceis e nos bons momentos.

À Banca examinadora, MUITO OBRIGADO.....

SUMÁRIO

INDICE DE FIGURAS.....	IX
INDICE DE TABELAS.....	X
INDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Biocerâmicas.....	4
2.2 Tipos de Interação Biocerâmica-Tecido.....	8
2.3 Cerâmicas Porosas.....	10
2.4 Cerâmicas de Fosfatos de Cálcio.....	13
2.5 Síntese e morfologia de biocerâmicas.....	17
2.6 Hidroxiapatita (HAp).....	20
2.7 Fosfatos de Cálcio Reabsorvíveis.....	24
2.8 Remodelação e Mimetização.....	25
2.9 Polímeros Naturais.....	32
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Reagentes e Equipamentos.....	37

4.1.1 Reagentes.....	37
4.1.2 Equipamentos.....	37
4.2 Métodos.....	38
4.2.1 Síntese de Hidroxiapatita (HAp).....	38
4.2.2 Síntese de Fosfato Tricálcico (TCP).....	38
4.2.3 Preparação das soluções aquosas dos Biopolímeros.....	39
4.2.4 Síntese de HApIII (<i>in situ</i>).....	39
4.2.5 Preparação das pastas biocerâmicas:.....	39
4.2.6 Testes de desintegração dos compósitos biocerâmicos	40
4.2.7 Preparação do fluido corporal sintético.....	41
4.2.8 Obtenção de uma porosidade melhor usando pó de alumínio.....	42
4.2.9 Caracterização dos compósitos biocerâmicos não desintegrados.. ..	43
4.2.9.1 Determinação da razão Ca/P.....	43
4.2.9.2 Espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR).....	43
4.2.9.3 Análise de Difração de Raios- X.....	44
4.2.9.4 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
4.2.9.5 Porosimetria por Intrusão de mercúrio.....	45
4.2.9.6 Análise Termogravimétrica (TGA)	46
4.2.9.6 Teste de Resistência Mecânica.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1. Espectroscopia de absorção na região de infravermelho.....	47
5.2. Difração de raios- X: HAp, QTS e Compósitos.....	50
5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura dos compósitos.....	52

5.4. Porosimetria a base de mercúrio	54
5.5. Análise por microsonda de Energia Dispersiva de raios-X.....	56
5.6. Estudos Termogravimétricos de: QTS, HAp, e Compósitos.....	57
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparação da força de ligação interfacial de titânio Poroso com e sem revestimento de Plasma-spray HAp.....	21
Figura 2. Segmentos dos biopolímeros	33
Figura 3. Resultados de Espectros de absorção de FTIR.....	49
Figura 4. Difractogramas obtidas.....	51
Figura 5. Micrografias de pastilhas dos compósitos.....	53
Figura 6. Resultados da porosimetria dos compósitos.....	55
Figura 7. Análises por microsonda de energia dispersiva de raios- X.....	56
Figura 8. Termograma de amostra da QTS 100 %.....	58
Figura 9. Termogramas das amostras	59
Figura 10. Termograma da amostra AmI,	61
Figura 11. Termograma da amostra AmIII,	62

INDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação das biocerâmicas.....	8
Tabela 2.	Parâmetro de rigidez, <i>B</i> , para quitosana e alguns.....	26
Tabela 3.	Aplicações clínicas dos biomateriais	28
Tabela 4.	Ocorrência de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos.....	35
Tabela 5.	Composições das pastas preparadas.	40
Tabela 6.	Composição química do SBF.....	42
Tabela 7.	Bandas características de grupo fosfato, amino, e hidroxila.....	50

INDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	Alumínio
Ca	Cálcio
DCPD	Fosfato dicálcico dihidratado (Brushita)
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
HAp	Hidroxiapatita
HAp100	Hidroxiapatita sintetizada a partir de nitrato de cálcio e fosfatos de amônio dibásico.
HApIII	Hidroxiapatita sintetizada a partir de TCP, DCPD e sulfato de condroitina na presença de succinato de sódio.
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
P	Fósforo
QTS	Quitosana
SBF	Fluído Corporal Sintético
TCP	Fosfato tricálcico
TetCP	Fosfato tetracálcico
TGA	Análise Termogravimétrica
Tr	Transversal

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a preparação de pastas de hidroxiapatita (HAp) com quitosana (QTS), utilizada como suporte para uma biocerâmica aplicável na osteointegração. Foram preparadas pastilhas não desintegráveis da pasta de hidroxiapatita com QTS. A HAp utilizada na preparação das pastas foi sintetizada de duas maneiras diferentes, ou seja partir de nitrato de cálcio e fosfato de amônio dibásico, HAp100, e a partir de fosfato tricálcico (TCP), brushita e sulfato de condroitina na presença de succinato de sódio, HApIII. As pastas foram preparadas a partir da mistura do pó de HAp com uma solução de QTS 4% e transformadas em pastilhas. Foi observado que a pastilha não se desintegrou na presença de solução fisiológica devido à insolubilidade da QTS em água. A morfologia dos compósitos também foi estudada, sendo observado que as pastilhas preparadas a partir de HAp100 possuem uma superfície porosa, devido a uma distribuição uniforme dos grãos, superior das obtidas a partir de HApIII. A porosimetria mostrou poros maiores que 100 μm , e uma porosidade de até aproximadamente 80%. A espectroscopia na região do infravermelho mostrou deslocamentos das bandas características dos grupos amino e fosfato para número de onda menor, devido às interações entre estes grupos. O estudo de difração de raios-X demonstrou uma cristalinidade melhor para a HAp100, apresentando uma melhor resolução dos picos de difração.

ABSTRACT

The preparation of calcium phosphate-chitosan paste, as a bioceramic was investigated for bone-formation application. The non-decayed pastilles were prepared from the phosphate-chitosan paste. The hydroxyapatite powder used for the paste preparing was synthesized in two different ways: - from calcium nitrate and dibasic ammonium phosphate, giving HAp100. The other way was from a mixture of TCP, DCPD and chondroitin sulfate with sodium succinate, which led to the formation of HApIII. The pastes were prepared by mixing HAp powder with a chitosan solution 4 %, and transformed into pastilles consecutively. It was observed that the pastilles did not decayed in physiological serum, due to the insolubility of chitosan in water. It was also studied the morphology of the prepared composite, in which it was observed that composites prepared from HAp100, demonstrated a porous surface due to a better uniform distribution of the grain, than those from HApIII. The porosimetry results showed pores larger than 100 μm , and a porosity of almost 80%. The infrared spectroscopy results showed shift of the characteristic bands of the amine and phosphate groups to lower frequencies, due to interactions between these groups. The XRD study demonstrated a better cristallinity for HAp100, revealing a better peaks resolution.

1. INTRODUÇÃO

O tema central do trabalho abrange o estudo e desenvolvimento de um compósito cerâmico envolvendo polímeros e fosfato de cálcio para fins biomédicos.

A escolha de um material para ser usado como biomaterial passa necessariamente pela análise de um conjunto de requisitos que devem ser encontrados. O efeito do ambiente orgânico no material (corrosão, degradação) e o efeito do material no organismo são fenômenos que devem ser estudados com extremo cuidado, pois a eles está associada a chamada "biocompatibilidade"¹. Dentre esses dois últimos aspectos, a interação dos tecidos vivos com o biomaterial, associada com o tipo de resposta do organismo à presença do material, é o ponto mais desafiador no desenvolvimento de biomaterial.

Os tipos de interações entre tecido-implante são fundamentalmente dependentes do tipo de material e podem ser reunidos nos seguintes grupos: tóxico, não-tóxico (muitas vezes chamada de bioinerte), bioativo e biodegradável^{1,2}. Ultimamente, o desenvolvimento de materiais considerados bioativos e biodegradáveis vêm sendo enfatizado já que, além de substituir tecidos traumatizados, estes também podem propiciar a recuperação do tecido danificado através da atuação em metabolismos intra e extracelulares responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento.

Cerâmicas usadas para a recuperação e reconstrução de partes doentes ou danificadas do sistema músculo-esquelético, denominadas biocerâmicas, podem ser bioinertes (alumina, dióxido de zircônio), reabsorvíveis (fosfato tricálcico), bioativas (hidroxiapatita, vidros bioativos, e vitro-cerâmicos), ou porosas para crescimento de tecidos (metais encobertos por hidroxiapatita, alumina)^{2,3}. Aplicações incluem substituição de

quadril, joelhos, dentes, tendões, e ligamentos, recuperação para doenças peridentais, reconstrução maxilofacial, aumento e estabilização da maxila, fusão espinal, e enchimentos de ossos depois da cirurgia de tumor.

Revestimentos de carbono são trombos resistentes e são usados para válvulas protéticas de coração^{2,3}. Os mecanismos de ligação do tecido às cerâmicas bioativas estão começando a ser entendidos, os quais podem resultar no desenho molecular da biocerâmica para ligação interfacial com tecidos duros e moles. Compósitos estão sendo desenvolvidos com alta dureza e módulos elásticos compatíveis com o osso. O tratamento terapêutico tem sido realizado por aplicação localizada de isótopos radioativos via pérolas de vidro.

Em termos de materiais biodegradáveis, um dos grandes objetivos dos bioengenheiros e cientistas é a produção de biomateriais capazes de substituir tecidos danificados por um certo período de tempo durante o qual o reparo natural da área afetada estaria sendo promovido¹. O material ideal para esta função, além de ser biodegradável, estimularia a regeneração do tecido que iria progressivamente substituindo o implante nas funções requeridas.

O PMMA e outros polímeros de metacrilato são amplamente usados como olhos artificiais, dentes, cimento de osso e lentes de contatos. Outros biomateriais úteis incluem polímeros de silicone, usados como tubos de traquéia e em ligamentos de dedos e ossos. O polietileno de alto peso molecular, que junto com PMMA e compostos de aço inox e de titânio, são à base de ligamentos de quadril⁴.

Embora, nenhum destes materiais tenha sido especificamente desenhado como um biomaterial, a maioria foi produzida originalmente para apresentarem aplicações bem diferentes. Uma consequência óbvia disso é que o sistema imunológico do corpo humano

usualmente detecta este material como “estranho”. O processo de implante usualmente resulta em inflamação no sítio do implante. Este atrai leucócitos (células brancas) conhecidos como macrófagos ao sítio do implante. Se a tentativa dos macrófagos de digerir o material é inútil, estes se unem para formar macrófagos de multinúcleos chamados células gigantes de corpo estranho⁴.

Finalmente, forma-se usualmente um tecido cicatrizado ao redor do implante e o corpo efetivamente “rejeita” o implante⁴. Este previne o crescimento de tecido normal no sítio do implante, e muitas vezes limita o tempo de vida útil do implante, particularmente se a inflamação ocorrer repetidamente.

Os biomateriais capazes de livrar-se de ataques pelo sistema imunológico do corpo, e de estimulação de crescimento de tecido, são potencialmente muito mais efetivos e menos caros. Com esta meta em mente, pesquisadores vêm estudando por muitos anos a ligação de células a vários biomateriais. A observação de ligação óssea direta na superfície de óxido de titânio (como em implantes de quadril), por exemplo, já vem sendo conduzida extensivamente como um material protético na medicina e odontologia⁴. O desenvolvimento de outros biomateriais novos e melhores é necessário, quando se adquire um conhecimento mais claro da interface do biomaterial-tecido, e particularmente dos fatores que afetam o crescimento de tecido novo⁴.

A principal característica do cimento estudado é envolver *in situ* uma hidroxiapatita, que é o principal composto na fase mineral do osso^{5,6}.

O sistema quitosana-HAp pode levar a preparação de compósitos com bioatividade (biodegradabilidade) controlada. A quitosana é um polímero insolúvel em água (e conseqüentemente no ambiente fisiológico) e a HAp é biodegradável por que possui de alto

teor de agentes modificadores de reticulado (cálcio e fósforo)¹ e está sendo cogitada para ser usado na osteointegração⁷.

O desenvolvimento de biocerâmicas e de próteses constituídas destes materiais deve ocorrer sob as mesmas condições de interdisciplinaridade que determinam o desenvolvimento de qualquer outro biomaterial. Dentro deste contexto, os profissionais da área de Química podem contribuir de forma significativa para a evolução desta e para o aumento do leque de sua aplicabilidade, através do desenvolvimento de novos e eficazes biomateriais e também na elucidação dos mecanismos que governam a regeneração óssea².

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biocerâmicas

A descoberta do uso do fogo pelo homem há milênios atrás, na transformação irreversível da argila em cerâmica tradicional levou à formação de uma sociedade rural e uma melhoria na qualidade de vida. Nas quatro últimas décadas tem ocorrido uma revolução adicional no uso de cerâmicas para melhorar substancialmente a qualidade de vida. Esta revolução consiste no uso inovador de cerâmicas desenhadas especialmente para a recuperação e reconstrução de partes do corpo doentes ou danificadas^{1,3,7}. As cerâmicas usadas para esta proposta são denominadas biocerâmicas^{1,3}. As biocerâmicas podem ser de monocristal, policristalino (alumina ou hidroxiapatita), vidro (biovidro), vitro-cerâmicos

(ceravital ou A/W vitro-cerâmicos), ou compósitos (aço inox-biovidro reforçado com fibra ou polietileno-hidroxiapatita (PE-HAp))³.

Cerâmicas e vidros têm sido usados durante um longo tempo na indústria de produtos relacionados com a proteção da saúde, como na fabricação de óculos, instrumentos diagnósticos, manufaturação de produtos químicos, termômetros, frascos de cultura de tecidos, e fibra ótica para endoscopia³. Os vidros são usados como veículos para enzimas, anticorpos e antígenos, porque têm notavelmente algumas vantagens, tais como resistência ao ataque microbiano, a mudanças de pH, a condições de solventes, a temperatura e pressão elevada³. As cerâmicas também são amplamente usadas na odontologia como materiais restaurativos, e dentaduras, etc. Estas aplicações são chamadas de cerâmicas dentais como discutido por Preston⁸. As biocerâmicas são também utilizadas como implantes para recuperar partes do corpo, usualmente os tecidos duros do sistema músculo-esquelético, tais como ossos ou dentes. Também pode ser incluída a aplicação de revestimento cerâmico em fibra de carbono para a substituição de válvulas do coração. Várias composições cerâmicas têm sido testadas *in vitro*, porém poucas composições têm sido aplicadas em estudos clínicos^{9,10}. É conhecido que o sucesso clínico requer a realização simultânea de uma interface estável com o tecido a ser conectado e uma compatibilidade do comportamento mecânico do implante com o tecido a ser substituído^{2,3}.

A utilização de cerâmicas como biomaterial remonta a 1894, quando Dreesman *apud* Kawachi e col. relatou o uso de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$) como um possível substituto para ossos. Este material apresenta uma resistência mecânica muito baixa, e é completamente reabsorvido pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e

degradação. Tais propriedades, pouco atrativas, praticamente excluíram a utilização do gesso como biocerâmica implantável.

A década de 70 marcou o início do uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que possibilitam a sua classificação como biocerâmicas. A primeira biocerâmica com uso muito difundido neste período foi a alumina densa ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$)², que se apresenta como bioinerte. Este material, devido a sua boa compatibilidade e elevada resistência mecânica, vem sendo usado com frequência até hoje em próteses ortopédicas que substituam ossos ou parte deles, quando submetidos, na sua atividade funcional a esforços elevados². Exemplos típicos do emprego de alumina são as próteses para a substituição da cabeça do fêmur que faz a articulação com o íliaco e a substituição de dentes por dentes artificiais implantáveis².

Além da alumina densa, outras cerâmicas como o dióxido de zircônio (ZrO_2), dióxido de titânio (TiO_2), fosfatos de cálcio e vitro-cerâmicos de sílica/fosfato de cálcio, atualmente apresentam uso difundido. O uso das biocerâmicas tem se estendido desde o emprego isolado do material até outras formas de utilização, como por exemplo, no revestimento de próteses metálicas ou na associação com materiais poliméricos, tal como o colágeno^{2,3}.

Devido ao aumento do número de biocerâmicas utilizadas como biomateriais e os diversos aspectos envolvidos na interação com os tecidos vivos, tem-se procurado classificá-los em diversos grupos. Assim em termos gerais, as biocerâmicas são classificadas em bioinertes e bioativas^{11,12}. De acordo com a reunião da associação européia para biomateriais realizada na Inglaterra em 1968 *apud* Williams, o termo bioinerte não é

adequado já que todo material induz algum tipo de resposta do tecido hospedeiro, mesmo que mínima, devendo por este motivo ser evitado. No entanto, o termo ainda é comumente utilizado, tendo sido definido por June Wilson¹³ como sendo um material que apresenta uma resposta mínima, não resultando na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, formando uma cápsula fibrosa aos materiais bioinertes como a alumina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), zircônia (ZrO_2), o dióxido de titânio (TiO_2)^{11,12}. Por outro lado, uma biocerâmica bioativa (termo ainda aceito) é definida como aquela que induz uma atividade biológica específica¹⁴. Como exemplos destas últimas, destacam-se a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e os biovidros.

Outra classificação corrente é a estabelecida por Larry Hench^{3,15}, na qual as cerâmicas são agrupadas em 4 classes, de acordo com a resposta desenvolvida na interface do tecido vivo/implante: (Tabela 1).

Uma das desvantagens apresentadas pelas biocerâmicas é a reduzida resistência mecânica, que restringe seu uso às regiões que não requeiram sustentação. Uma forma de contornar tal restrição é a utilização de metais revestidos com cerâmicas por técnicas como Plasma Spray, que permitem aliar as vantagens intrínsecas das biocerâmicas com a resistência do metal².

As biocerâmicas têm sido empregadas nas formas densas ou porosas, como indicado na Tabela 1. Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas podem favorecer o crescimento do tecido através deles, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, a resistência do material *in vivo*.

Tabela 1. Classificação das biocerâmicas^{2,3,9}.

Tipo de biocerâmica	Tipo de interações com os tecidos	Exemplos
1 (Inertes)	Cerâmicas densas, não porosas, inertes; conectadas por crescimento de osso dentro de irregularidades da superfície; não há interações químicas nem biológicas (chamada fixação morfológica).	Al ₂ O ₃ (monocristal e policristalino)
2 (Porosas)	Ocorre o crescimento interno dos tecidos através dos poros (chamada fixação biológica).	Al ₂ O ₃ (policristalino poroso), Metais porosos revestidos com hidroxiapatita.
3 (Bioativas)	Cerâmicas densas, não porosas, com superfícies reativas; ocorre uma forte ligação na interface osso-implante (chamada fixação bioativa).	Vidros bioativos, Vitro-cerâmicos bioativas, Hidroxiapatita
4 (Reabsorvíveis)	As cerâmicas reabsorvíveis densas, não porosas (ou porosas), são degradadas e substituídas lentamente pelos tecidos.	Sulfato de cálcio (gesso de Paris), TCP, Sais de fosfato de cálcio

2.2. Tipos de Interações Biocerâmicas-Tecido

O mecanismo da interação entre biocerâmica e o tecido está diretamente relacionado ao tipo de resposta do tecido na interface do implante. Nenhum material implantado em tecidos vivos é inerte; todos os materiais induzem uma resposta dos tecidos vivos. Os

quatro tipos de respostas permitem diferentes significados na realização da interação de próteses com o sistema músculo-esquelético (Tabela 1).

A Tabela 1 resume o mecanismo de interação, com exemplos. A reatividade relativa está muito correlacionada com a velocidade da formação de uma ligação interfacial do implante com o tecido vivo⁹.

O nível da reatividade relativa influencia a espessura da zona interfacial ou camada entre o material e o tecido. Análises das falhas de materiais de implantes durante os últimos 20 anos, geralmente mostram a falha originada a partir da interface do biomaterial-tecido^{16,17}. Quando um biomaterial é inerte (tipo 1, Tabela 1) e a interface não é quimicamente ou biologicamente ligada, há movimento relativo e desenvolvimento progressivo de uma cápsula fibrosa não-aderente tanto nos tecidos moles quanto nos duros. O movimento na interface biomaterial-tecido leva eventualmente, à deterioração na função do implante ou do tecido na interface ou ambos. A espessura da cápsula não-aderente varia extensivamente, dependendo tanto dos materiais, quanto da extensão do movimento relativo³.

O tecido fibroso na interface com implantes densos de alumina de grau-medicinal, pode ser muito fino^{10,18}. Conseqüentemente, como será discutido posteriormente, pode ser considerado clinicamente um sucesso, quando implantes de alumina com uma conexão mecânica muito rígida forem compactados principalmente por compressão. Ao contrário, se um implante do tipo 1, inerte, está compactado de tal maneira que o movimento interfacial pode ocorrer, a cápsula fibrosa pode tornar-se algumas centenas de micrômetros sobressaída e rapidamente afrouxar o implante. O afrouxamento leva invariavelmente às

falhas clínicas, por uma variedade de razões, incluindo fraturas do implante ou do osso adjacente.

O implante de osso em uma interface com biocerâmica do tipo 1, inerte, é muitas vezes estruturalmente fraco causado por doença, morte localizada do osso (especialmente se o chamado cimento de osso, poli-metilmetacrilato (PMMA), for usado), ou protegendo da deformação quando o módulo elástico mais alto do implante evita o osso de sofrer uma determinada tensão.

O conceito anterior de inerte, aplicado para as biocerâmicas microporosas (tipo 2 Tabela 1), pode favorecer o crescimento do tecido dentro dos poros na superfície ou através do implante, como descrito por Hulbert e col.¹⁰, muitos anos atrás. O aumento da área interfacial entre o implante e os tecidos resulta em um crescimento da resistência inércia ao movimento do dispositivo no tecido. A interface é estabelecida pelo tecido vivo nos poros. O método de interação na qual o osso vivo cresce dentro dos poros de uma biocerâmica, é muitas vezes denominada fixação biológica. É capaz de resistir aos estados mais complexos com maior deformação do que os implantes do tipo 1, os quais atingem somente fixação morfológica.

2.3. Cerâmicas Porosas

A porosidade é um fator importante que leva à integração entre o tecido vivo e o implante. A vantagem principal oferecida por um implante de cerâmica porosa (tipo 2, Tabela 1) é o seu caráter inerte combinado com a estabilidade mecânica da interface altamente entrelaçada, desenvolvida quando o osso cresce dentro dos poros da cerâmica.

Estudos mostram que quando a resistência mecânica não é o requerimento principal, cerâmicas porosas inertes podem fornecer um implante funcional^{3,9,10}.

Quando os poros forem maiores que 100 μm , o osso crescerá dentro dos canais de poros de interconexão próximo à superfície, e manterá a vascularidade e viabilidade de longo-termo. Desta maneira o implante serve como uma ponte estrutural e modelo ou estrado para formação de osso. As microestruturas de certos corais fazem um material de aplicação quase ideal para o lançamento de estruturas com tamanho de poros altamente controlados. White e col. *apud* Hench desenvolveram o processo “replamineform” para duplicar a microestrutura porosa de corais que têm um alto grau de tamanho de poros uniformes e interconexões¹⁹. A primeira etapa é trabalhar o coral com microestrutura própria dentro da forma desejada. A forma do coral trabalhada é queimada liberando gases de dióxido de carbono do calcário (CaCO_3), formando óxido de cálcio, enquanto mantém a microestrutura do coral original. A estrutura de óxido de cálcio serve como um material de aplicação para formação de material poroso. Depois que o material desejado é lançado dentro dos poros, o óxido de cálcio é facilmente removido do material por dissolução em ácido clorídrico diluído.

As primeiras vantagens do processo de “replamineform” são que o tamanho dos poros e a microestrutura são uniformes e controlados, e há interconexão completa dos poros. Materiais porosos da “replamineform” de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, óxido de titânio, fosfatos de cálcio, poliuretano, borracha de silicone, PMMA, e ligas de cobalto-cromo têm sido usados como implantes de osso, sendo os fosfatos de cálcio os mais aceitáveis.

As superfícies de cerâmicas porosas podem também ser preparadas através da mistura de metal solúvel ou partículas de sais nos poros da superfície. O tamanho do poro e a estrutura são determinados pelo tamanho e a forma das partículas solúveis que são subsequenteiramente removidas com um hidróxido adequado. A camada da superfície porosa produzida por esta técnica é uma parte integral da fase cerâmica densa subjacente.

Materiais como alumina também podem ser feitos porosos pelo uso de um agente espumante, que desenvolve gases durante o aquecimento. Alumina porosa e aluminato de cálcio poroso usado por Hulbert e col. *apud* Hench em alguns de seus estudos de crescimento do osso, foram produzidos pela mistura de pó de carbonato de cálcio com pó fino de alumina.

Materiais porosos são mais fracos que a forma densa equivalente. À medida que a porosidade aumenta, a força do material diminui rapidamente, como indicada pela equação de Ryskewitch, Equação 1;

$$\sigma = \sigma_0 e^{-cp} \quad \text{eq. 1}$$

onde σ é força do material poroso, σ_0 é a força do material em porosidade zero, c é uma constante, e p é a porosidade.

Muitas áreas da superfície também estão expostas, de tal maneira que os efeitos do ambiente responsáveis pela diminuição da força, tornam-se muito mais importantes para materiais não-porosos densos⁹.

2.4. Cerâmicas de Fosfatos de Cálcio

Biocerâmicas a base de fosfato de cálcio têm sido usadas na medicina e na odontologia há aproximadamente 20 anos, como foi descrito por Hulbert e col.¹⁰, de Groot^{20,21}, de Groot e Le Geros²², Jarcho²³, e Williams²⁴. Aplicações incluem implantes dentários, dispositivos percutâneos, uso em tratamento periodontal, aumento de ruga alveolar, ortopédicos, cirurgia maxilofacial, otorrinolaringologia e cirurgia espinal. As diferentes fases de cerâmicas de fosfato de cálcio que são usadas, dependem do material desejado, reabsorvível ou material bioativo.

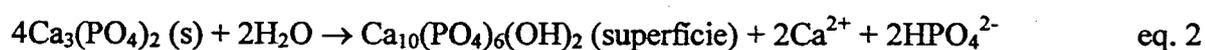
As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas, por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações, e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro. Tais características positivas podem ser explicadas pela natureza química destes materiais, que por serem formados basicamente por íons de cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica².

Uma forma conveniente de classificar os vários fosfatos de cálcio é através de sua razão cálcio/fósforo (Ca/P). Vários fosfatos de cálcio que possuem razão variando de 0,5 a 2,0 podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons cálcio e fosfato, sob condições alcalinas ou ácidas². Estes fosfatos podem ser transformados em cerâmicas biocompatíveis e osteocondutoras (isto é, com capacidade para fazer com que o crescimento ósseo ocorra sobre a superfície e através dos poros do material)².

As fases estáveis de cerâmicas de fosfato de cálcio dependem consideravelmente da temperatura e/ou da presença de água, durante o processamento ou no uso ambiental. Na

temperatura do corpo humano, somente dois fosfatos de cálcio são estáveis em contato com meios aquosos, tais como fluidos corporais; em $\text{pH} < 4,2$ a fase estável é $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fosfato dicálcico ou brushita, DCPD), enquanto em $\text{pH} \geq 4,2$ a fase estável é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HAp). Em temperaturas mais altas, outras fases tais como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β -fosfato tricálcico, TCP) e $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (fosfato tetracálcico, TetCP) estão presentes. As fases de fosfatos de cálcio não hidratados, preparados em alta temperatura, interagem com água ou fluidos corporais, à 37°C para formar HAp.

(A HAp é formada sobre superfícies expostas de TCP pela seguinte reação representada pela Equação 2;



Portanto, a solubilidade de uma superfície de TCP se aproxima a de HAp e com a formação do íon HPO_4^{2-} o pH da solução diminui. Com isso a solubilidade de TCP aumenta e a reabsorção melhora.) Williams²⁴ discutiu a importância da razão Ca/P na determinação da solubilidade e tendência para a reabsorção no corpo. A presença de microporos no material sinterizado pode aumentar a solubilidade destas fases²⁰⁻²⁴.

Sinterização de cerâmicas de fosfato de cálcio usualmente ocorre na faixa de 1000-1500°C seguindo da compactação do pó na forma desejada^{2,24}. As fases formadas em temperatura elevada não dependem somente da temperatura de sinterização, mas também da pressão parcial da água na atmosfera de sinterização. Com água presente, HAp pode ser formada e é uma fase estável até 1360°C ⁹. Sem adição de água, TetCP e TCP são as fases

estáveis. A faixa de temperatura de estabilidade de HAp aumenta com a pressão parcial da água. Devido às barreiras cinéticas que afetam as velocidades de formação das fases estáveis de fosfato de cálcio, é muitas vezes difícil prever a fração de volume das fases de elevada temperatura que são formadas durante a sinterização, e sua estabilidade relativa quando resfriadas à temperatura ambiente.

Pós de materiais para a preparação de cerâmicas à base de fosfato de cálcio podem ser obtidos misturando em uma solução aquosa as razões molares apropriadas de solução de nitrato de cálcio e solução de fosfato de amônio, os quais resultam em precipitado de HAp com razão estequiométrica.

Os íons de Ca^{2+} , PO_4^{3-} , e OH^- podem ser substituídos por outros íons durante o processo ou devido às vizinhanças fisiológicas. Por exemplo, podem ser formados a fluorapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}(\text{F})_x$ onde $0 < x < 2$ e carbonato apatita, HCA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}(\text{CO}_3)_x$ onde $0 < x < 2$. A fluorapatita é encontrada no esmalte dental e HCA está presente no osso.

O comportamento mecânico de cerâmicas de fosfato de cálcio influencia fortemente sua aplicação como implantes²². As forças por tração e compressiva dependem do volume total da porosidade. A porosidade pode estar na forma de microporos (<1 μm em diâmetro, devido à sinterização não completa) ou macroporos (>100 μm em diâmetro, criado para permitir crescimento do osso).

A dependência da força compressiva (σ_c) e volume de poro total (V_p) são descritos por de Groot e col.²¹, pela Equação 3;

$$\sigma_c = 700 \exp(-5V_p) \quad \text{eq. 3}$$

onde V_p está na faixa 0 a 0.5, sendo σ_c é expressa em Mpa. A força por tração (σ_t) depende gradativamente da fração do volume de microporosidade (V_m), (Equação 4), sendo expressa em Mpa.

$$\sigma_t = 220 \exp(-20V_m) \quad \text{eq. 4}$$

Os implantes de HAp em soluções fisiológicas apresentam baixa confiabilidade sob cargas por tração³. Conseqüentemente, em dispositivos clínicos as biocerâmicas de fosfato de cálcio deviam ser usadas como pós, pequenos implantes não compactados, tais como usados no meio da orelha, implantes dentais com pinos de metal reforçado, revestimento dos implantes de metal, implantes porosos de resistência reduzida, onde crescimento ósseo serve como uma fase reforçada, ou a fase bioativa em um compósito polímero-biocerâmica.

Os mecanismos de ligação de implantes de HAp densas parecem ser diferentes daqueles descritos para vidros bioativos. Uma matriz de osso celular de osteoblastos diferenciados, pode aparecer na superfície de implantes de HAp densas, produzindo uma banda estreita amorfa de densidade eletrônica de largura de somente 3 a 5 μm . Entre esta

área e as células, pacotes de colágeno poderão ser vistos. Quando o sítio termina o estágio de maturação, a zona de ligação encolhe para uma profundidade de somente 0,05 a 0,2 μm .

Ogiso e col. *apud* Hench, mostraram através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), análises de imagem de interfaces cristalinas de osso de HAp densas, um alinhamento epitaxial dos cristalitos de osso crescido quase perfeito com os cristais da apatita no implante.

Uma conseqüência dessa zona de ligação ultrafina é um gradiente muito elevado no módulo elástico na interface da ligação entre HAp e osso. Esta é uma das principais diferenças entre as apatitas bioativas, vidros bioativos e vitro-cerâmicos. As implicações desta diferença sobre a resposta interfacial do implante ao estiramento aplicado e a vitalidade do osso foi discutido por Larry Hench⁹. O significado clinica desta diferença ainda é desconhecido.

2.5. Síntese e Morfologia de Biocerâmicas

O grande número de artigos relacionados com as rotas de síntese tem mostrado uma profunda influência dos métodos de preparação sobre as propriedades das biocerâmicas. Entre as variáveis determinantes destas propriedades, a estequiometria, estrutura cristalina e a porosidade são determinantes para o comportamento biológico de tais materiais². Genericamente, a preparação de uma cerâmica e portanto, de uma biocerâmica, envolve 3

etapas fundamentais: (i) preparo do pó; (ii) secagem parcial do bloco conformado e (iii) aquecimento a altas temperaturas para obtenção do bloco sinterizado.

(A síntese de fosfato de cálcio tem sido realizada por vários métodos, envolvendo precipitações em soluções aquosas, reações de estado sólido, métodos hidrotérmicos, processo sol-gel e, mais recentemente, microemulsão².

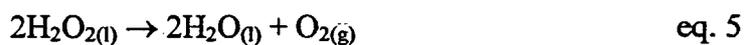
Após a síntese, o pó é moldado na forma desejada, por compactação a altas pressões ou umectação do pó e posteriormente submete-se à sinterização a temperaturas elevadas. Outra alternativa é a compactação sob pressão e aquecimento de maneira simultânea. Para melhorar a coesão das partículas e tornar os corpos mais densos, pode ser feita a adição de água ou substâncias orgânicas, como o poli (álcool vinílico), seguidas da secagem parcial do bloco².)

Com relação à dimensão dos poros, em 1970 Hulbert *apud* Kawachi e col. Demonstrou que poros maiores que 100 μm favorecem o crescimento do osso através do material. Este tamanho de poro, que define a porosidade ótima das biocerâmicas, está relacionado à necessidade de fornecer um suprimento sanguíneo ao tecido conectivo em crescimento, fator que só ocorre em materiais com poros maiores que 100 μm , os quais permitem o desenvolvimento de um sistema de vasos capilares entremeado com a cerâmica porosa.

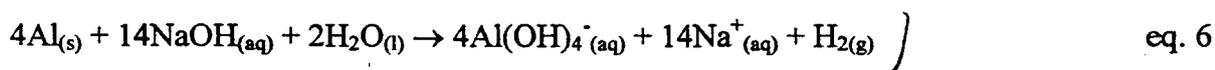
É importante salientar que o conceito de material poroso, sob a ótica da biocompatibilidade, está fundamentado em dimensões de poros, completamente diferente do que é usual para a Química. Segundo o Subcomitê para a caracterização de sólidos porosos da IUPAC²⁵, materiais macroporos apresentam poros com dimensões maiores que

50 nm. Contudo, para que um biomaterial seja considerado macroporos é necessário que ele apresente poros da ordem do diâmetro Harvesiano ($50 \text{ a } 250 \mu\text{m}$)².

(Para obtenção de cerâmicas com poros dessa grandeza, as técnicas comumente utilizadas consistem na mistura de algum polímero ou substância orgânica ao material em pó, que é eliminado posteriormente durante as etapas de consolidação da cerâmica, ou o umedecimento do material em pó com peróxido de hidrogênio, que posteriormente decompõe com a liberação de oxigênio gasoso formando poros² (Equação 5).



Também pode ser empregada a utilização de um metal em pó, que é posteriormente eliminado por dissolução com a liberação de hidrogênio gasoso formando poros. Um exemplo é o uso de alumínio neste trabalho, onde a equação 6 representa a reação da dissolução de alumínio.



No caso de cerâmicas de fosfato de cálcio, alternativamente pode-se proceder à troca hidrotérmica do íon carbonato do carbonato de cálcio que formam os corais marinhos por íons fosfato, resultando em “réplicas de corais”^{2,23,26}, que apresentam naturalmente a porosidade adequada. Mais recentemente, fosfatos de cálcio têm sido usados para o preparo de suportes esponjosos²⁷ para a fixação de células ósseas, capazes de induzir a restauração do osso, através de estratégias de engenharia de tecidos^{28,29}.

Cimentos de fosfato de cálcio são materiais que têm sido desenvolvidos há mais ou menos 10 anos na França como também no Japão e nos Estados Unidos da América⁵. Esses materiais biocompatíveis novos são bioreabsorvíveis, o qual significa que podem ser substituídos a tempo por novo osso, e também são osteocondutores, favorecendo a formação de osso.

2.6. Hidroxiapatita (HAp)

Um segundo revestimento biocerâmico, que tem alcançado um nível significativo de aplicação clínica é o uso de HAp como um revestimento poroso de superfícies de metal para fixação de próteses ortopédicas. Esta abordagem combina os métodos de fixação biológica e bioativa (Tabela 1) e origina a partir de observações de Ducheyne e col.³⁰, em 1980, que pó de HAp nos poros de um implante poroso de metal-revestido afetaria significativamente a velocidade e a vitalidade do osso crescido dentro dos poros.

Um grande número de investigadores tem explorado várias idéias na aplicação de revestimento de HAp, geralmente com revestimento da técnica Plasma Spray sendo o preferido³. A Fig. 1 mostra que existe uma melhoria substancial da força de ligação interfacial da etapa inicial de implantes revestidos com HAp por Plasma Spray, quando comparados com materiais metálicos com superfícies porosas sem o revestimento³. Embora, os estudos de longa duração de animais e experiências clínicas de suportes dentários compactados e próteses ortopédicas sugerem, que os revestimentos com HAp possam degradar ou sair, as conseqüências clínicas ainda estão sendo discutidas³.

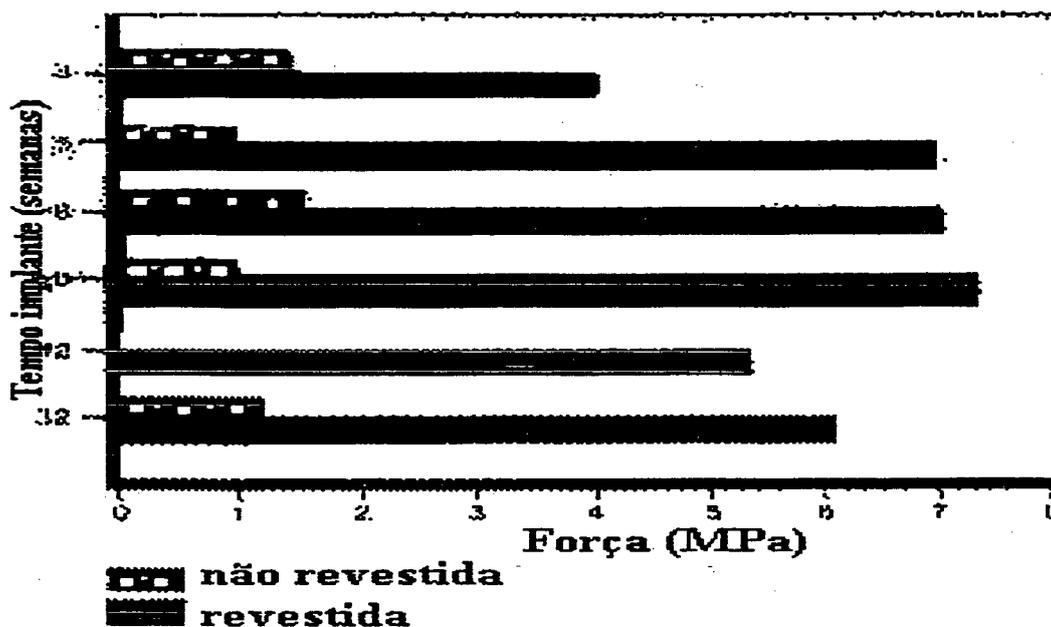
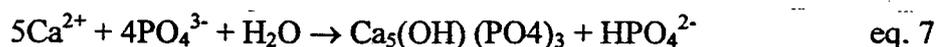


Figura 1. Comparação da força de ligação interfacial de dióxido de titânio poroso com e sem revestimentos de HAp pela técnica do Plasma Spray (Figura 23 na Referência 03, p. 1505).

A hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HAp) é o ortofosfato de cálcio, estável em meio neutro e alcalino. A sua preparação na forma pura é difícil, visto que na reação de precipitação sempre o íon monohidrofosfato (HPO_4^{2-}) se forma de acordo com a seguinte reação (Equação 7);



A HAp é o principal constituinte inorgânico dos ossos, e dentes humanos e de animais. Apresentam uma razão de Ca/P de 1,67 e conteúdo de água de 1,79 % em massa. É também conhecido que hidroxiapatitas precipitam sob condições de solução de razões

Ca/P mais baixas ($< 1,67$) e excessos de conteúdos de água comparado com hidroxiapatita estequiométrica. Tais hidroxiapatitas precipitadas são denominadas de hidroxiapatitas não estequiométricas ou hidroxiapatitas deficientes em cálcio (também conhecidas como DAp). A composição química de DAp é expressa, em geral, pela Equação 8.



A composição de HAp estequiométrica e HAp não estequiométrica é de muita importância nas áreas biológica e industrial, sendo usado como material para separação cromatográfica de bio-macromoléculas, desidratação catalítica de álcoois^{31,32}, e produção de ossos e dentes artificiais³³⁻³⁶. Os pós de HAp para tais aplicações são normalmente preparados por métodos de precipitação e hidrólise. As características do pó de HAp preparado, mostram uma dependência sensível às condições de preparação, como por exemplo o sistema de reação usado, os materiais de partida, o pH, a temperatura, o tempo de desenvolvimento, temperatura de calcinação, etc.

Duas estruturas que têm sido consideradas como as mais freqüentemente usadas são a HAp estequiométrica e a Whitlockita (TCP). Existem opiniões conflitantes com relação a suas propriedades biológicas. (Vários autores acreditam que possuem semelhanças³⁷, enquanto outros, afirmam que a β - Whitlockita (β -TCP) é mais degradável³⁸ que a apatita, quando implantada em tecido de ossos.) A brushita é uma forma granular, ácida, de fosfato de cálcio preparada a partir de um sal de cálcio e extensamente convertida em HAp por tratamento com álcali.

A evolução para hidroxiapatita é um resultado de reações ácido-básicas entre fosfatos básicos (fase sólida) e fosfatos ácidos (fase líquida). Após a mistura das fases, a brushita imediatamente formada, é então transformada em fosfato octacálcico, o qual finalmente se transforma em hidroxiapatita³⁹. Estes cimentos são usados principalmente para operações de enchimento de osso, que requer operações cirúrgicas “pesadas”. Em alguns casos, pode ser interessante colocar o cimento no sítio cirúrgico utilizando sonda, que não requer tais operações pesadas. Por isso, é importante fazer o cimento injetável^{5,39}.

Vários adjuvantes foram estudados para tornar o cimento mais injetável, enquanto mantém as propriedades físico-químicas adequadas para uso cirúrgico; ou seja tempo de sedimentação conveniente para cirurgia, desintegração do cimento em fluidos biológicos quanto menor possível e propriedades mecânicas adequadas ao tipo de operação.

A hidroxiapatita de cálcio (HAp: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), o principal componente inorgânico dos tecidos duros em ossos, é um membro da família das apatitas, incluindo compostos com estruturas similares, mas não necessariamente de composições idênticas. Apatitas biológicas, as quais compõem as fases minerais de tecidos calcificados (esmalte, dentina, e osso), diferenciam de HAp pura em estequiometria, composição e cristalinidade, e em outras propriedades físicas e mecânicas. São usualmente observadas⁴⁰ as substituídas com carbonato e deficientes em cálcio.

2.7. Fosfatos de Cálcio Reabsorvíveis

A reabsorção ou biodegradação de cerâmicas de fosfato de cálcio é causada por dissolução físico-química, a qual depende do produto de solubilidade do material e pH do seu meio ambiente (fases de superfícies novas podem ser formadas por exemplo, fosfato de cálcio amorfo, fosfato dicálcico dihidrato, fosfato octacálcico, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3\text{H} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, e HAp anionicamente substituída); desintegração física em partículas pequenas devidas ao ataque químico preferencial de fronteiras de grão; e fatores biológicos, tais como fagocitose, o qual causa uma diminuição do pH local²².

Todas as cerâmicas do fosfato de cálcio biodegradam para graus diferentes na seguinte ordem: $\alpha\text{-TCP} > \beta\text{-TCP} \gg \text{HAp}$.

A velocidade de reabsorção pode aumentar com o aumento da área superficial ($A_{\text{pó}} > A_{\text{sólido poroso}} > A_{\text{sólido denso}}$), decréscimo da cristalinidade, decréscimo da perfeição do cristal, diminuição do tamanho do cristal e do grão e, no caso da HAp, pela substituição de CO_3^{2-} , nos sítios de fosfatos e por Mg^{2+} , Sr^{2+} nos sítios de cálcio^{2,3}. (Os fatores que resultam em uma diminuição da velocidade de biodegradação incluem substituição de F em HAp, substituição de Mg^{2+} em $\beta\text{-TCP}$ e diminuição das razões $\beta\text{-TCP}/\text{HAp}$ em fosfato de cálcio bifásico.) Devido a estas variáveis, é necessário controlar a microestrutura e estado da fase da biocerâmica de fosfato de cálcio reabsorvível na adição, para conseguir o controle composicional preciso para produzir uma dada velocidade de reabsorção no corpo.) Atualmente, existem poucos dados sobre as cinéticas destas reações e as variáveis que a influenciam.

(Entre os materiais que apresentam velocidade de reabsorção apreciável, um dos mais estudados é o fosfato tricálcico (TCP)^{2,41-43}, com razão Ca/P igual a 1,5. Este material é biodegradável e biocompatível, sendo parcialmente reabsorvido entre 6 e 15 semanas após o implante, dependendo da porosidade⁴⁴.)

2.8. Remodelação e Mimetização

Adam Curtis e seus colegas na Universidade de Glasgow mostraram que células aderem-se com características topográficas, tais como sulcos paralelos (cauterizados) gravados dentro de uma superfície do biomaterial⁴. Tais efeitos dependem do tamanho das feições e o tipo de célula. Certas células tais como fibroblastos, células responsáveis para a produção de matriz extracelular na cura de ferimento e remodelação de tecido, migrarão ao longo dos rastros (trilhos). Outros, por exemplo macrófagos, permanecerão “digeridos” dentro das feições⁴. Tais controles raros de comportamento de célula serão decisivamente importante para o desenho de novos biomateriais capazes de controlar o novo crescimento de tecido.

Os materiais utilizados na substituição de osso enquadram-se na classe denominada de biomateriais³ e devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos. Tais propriedades caracterizam a biocompatibilidade^{14,45}.

Em geral, biomateriais utilizados na reposição dos chamados tecidos moles são muito diferentes daqueles usados na substituição de tecidos duros (ossos e dentes). Para os

tecidos duros, dependendo do esforço mecânico a que são submetidos, alguns materiais podem ser mais apropriados que outros, devido à sua maior resistência. A Tabela 2 relaciona algumas aplicações de biomateriais sintéticos².

Tabela 2: Aplicações clínicas dos biomateriais^{2,11}.

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros Polietileno PTFE Poliéster Poliuretano PMMA Silicone	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo	Suturas, artérias, veias; maxilo facial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); cimento, tendão artificial; oftalmologia.
Metais e ligas Aço inoxidável Liga de titânio Liga de cobalto-cromo	Alta força de tensão, alta resistência a desgaste, energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes); implantes dentários
Cerâmicas e vidros Alumina Zircônia Carbono Fosfato de cálcio Porcelana Vidros bioativos	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia, alta resistência à compressão	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traquéias artificiais
Compósitos Fibra de carbono-resina termofixa Fibra de carbono-termoplástico Carbono-carbono Fosfato de cálcio-colágeno	boa biocompatibilidade, inércia, resistência à corrosão, alta força de tensão	Material de fabricação incompatível	Válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas de joelhos (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade)

Simplesmente, pode-se dizer que o corpo humano é constituído por três componentes básicos: água, colágeno e hidroxiapatita². Este último composto representa a fase mineral do osso e dentes, que é responsável por fornecer estabilidade estrutural ao corpo, protegendo órgãos vitais como pulmões e coração e funcionando como um depósito regular de íons. Tal fase representa aproximadamente 5% do total de um indivíduo adulto¹².

De Jong foi o primeiro a observar a semelhança entre os padrões de difração de raios-X da fase mineral do osso e da hidroxiapatita, em 1926¹¹. Entretanto, a fase mineral dos ossos não possui uma composição muito bem definida, além de mostrar variações durante os estágios de maturação e envelhecimento dos tecidos duros. Sua estrutura cristalina e razão Ca/P, no entanto, assemelham-se às da hidroxiapatita, apresentando ainda a presença dos íons Na⁺, Mg²⁺, CO₃²⁻, citratos e, em menores quantidades, K⁺, Cl⁻ e F⁻. Levando-se em consideração apenas os elementos principais, a composição da fase mineral pode ser representada pela fórmula abaixo da apatita contendo vacâncias iônicas⁴⁶:



Onde \square representa uma vacância.

Além da hidroxiapatita, vários outros fosfatos de cálcio também ocorrem em calcificações normais e patológicas⁴⁷, o que vem despertando interesse significativo nas possibilidades de uso destes materiais como biocerâmicas^{48,49}.

A Tabela 3 relaciona diversos fosfatos de cálcio e suas ocorrências em sistemas biológicos².

Tabela 3: Ocorrência de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos².

Fosfato de cálcio	Formula química	Razão Ca/P	Ocorrências
Apatita	$(Ca,Z)_{10}(PO_4,Y)_6(OH,X)_2$ (Z = Mg ²⁺ , Sr ²⁺ , Ba ²⁺ ; Y = HPO ₄ ²⁻ , CO ₃ ²⁻ ; X = Cl ⁻ , F ⁻)	Varia com Z Y	Esmalte, dentina, osso, cálculo urinário, calcificação de tecido mole
Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 2H_2O$	1,33	Cálculo dentário e urinário
Monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1,0	Cálculo dentário, ossos decompostos
Fosfato tricálcico (TCP)	$Ca_3(PO_4)_2$	1,5	Cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias, calcificação de tecido mole
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	1,0	Depósitos de pseudogotas em fluidos

Os fluidos corporais sintéticos (SBF), preparados de acordo com as análises químicas de fluido corporal humano, com concentrações de íons quase iguais àquelas dos constituintes do plasma do sangue humano, foram inicialmente usadas por Kokubo e col.⁵⁰

para provar a similaridade entre comportamento de certas composições de vitro-cerâmicos *in vitro* e *in vivo*. Nestes estudos, amostras de vitro-cerâmicos foram submersas em soluções de SBF e foi observado que as suas superfícies estavam encobertas com uma apatita deficiente em cálcio pobremente cristalizada e apatita contendo carbonato, as quais foram similares as apatitas de osso⁵¹. Portanto, a formação de uma camada de apatita nas superfícies de vidro e vitro-cerâmico foi confirmada ser uma condição essencial para a ligação de implantes feitos a partir de tais materiais ao redor do osso vivo no corpo humano.

Kokubo e col.^{51,52} propuseram que os íons, dissolvidos das amostras da vitro-cerâmico imersas em SBF, aumentaram o grau da supersaturação do fluido corporal ao redor do osso, e a sílica hidratada que forma na superfície das vitro-cerâmicos fornece os sítios favoráveis para posterior nucleação da apatita. Uma vez que a apatita está nucleada, pode crescer espontaneamente no ambiente corporal⁵³.

Pós de HAp geralmente são sintetizados a partir de soluções aquosas para uso em aplicações biocerâmicas. É conhecido que hidroxapatita de cálcio é a menos solúvel e o composto mais estável das fases de fosfato de cálcio em soluções aquosas em valores de pH maiores que 4,2⁵⁰. Entretanto, HAp tem sido usualmente preparada em meio altamente alcalino^{48,54-58} para assegurar a estabilidade térmica e a pureza da fase dos pós-resultantes da sinterização em temperatura elevada (1100-1300°C). (A síntese química de pós de HAp em meio aquoso neutro e/ou levemente ácido é conhecida por ser uma tarefa mais complicada e difícil^{50,56}. Existem estudos que focalizam a determinação dos parâmetros de síntese de HAp em pH 7,4 e em temperatura fisiológicas (37°C)^{50,57})

(O grau de supersaturação, presença de grãos, temperatura, pH, e força iônica são fatores conhecidos que afetam a síntese de biocerâmicas de fosfato de cálcio, a partir de soluções aquosas^{50,58-60}.)

O efeito de depósito intencional de HAp tem resultado em um papel importante na indução da formação das fases que normalmente não nucleariam^{60,61}. O processo de depósito do precipitado de HAp e fosfato octacálcico (OCP: $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) foi investigado usando TCP (Withlockita), fosfato dicálcico dihidratado (DCPD; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fluoreto de cálcio, fosfato de cálcio amorfo (ACP), OCP e própria HAp, como materiais de grão^{50,58-61}.

As HAp e OCP crescem demasiadamente em soluções e foram também estudadas devidas aos interesses biológicos destas fases que precipitam durante mineralização de tecido duro. Foi mostrado que é possível incorporar apatita no OCP, e vice versa, na vizinhança do valor de pH fisiológico de 7,4⁵⁰.

Eletrólitos que foram adicionados para alterar a força iônica das soluções também influenciam o curso da precipitação^{50,58-61}. NaCl, KCl, ou KNO_3 foram adicionados às soluções de precipitação como um eletrólito de fundo para manter a força iônica constante em um valor próximo àqueles do plasma humano ou saliva.

(De Groot e col.⁵⁸ estudaram as características de HAp sintetizada em temperatura elevada e reportaram que HAp sintética com uma razão de Ca/P próxima a 1,67 era estável somente até 1200°C quando sinterizada em uma atmosfera de ar seco ou úmido. Foi observado que acima de 1200°C, a HAp perde gradualmente os grupos OH e transforma em oxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$). Quando aquecida a 1450°C, a oxiapatita⁵⁸ se dissociou nas fases TCP, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ e $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$.)

(Por outro lado, Tas e col. reportaram recentemente⁴⁸ que pós de HAp puros sintetizados em água pura pode resistir, sem decomposição, em temperaturas tão altas quanto 1300°C quando aquecidos em uma atmosfera de ar por 6 h.)

A HAp sintética é usada principalmente em aplicações de substituição de tecido duro, pois é capaz de sofrer osteogênese de ligação e ser quimicamente estável *in vivo* por um longo período de tempo^{65,66}. Estudos realizados nas HAp sinterizadas mostraram⁶⁷ que a força por tração de HAp diminuiu drasticamente correspondendo à decomposição de HAp em TCP, e desidroxilação associada.

As propriedades superficiais e condições de síntese de hidroxiapatita, preparada usando água pura em meio altamente alcalino, foi previamente examinada usando diferentes soluções incluindo SBF^{55,68,69}. Fluidos corporais sintéticos (SBF) metastáveis foram previamente experimentados^{50,70-74} para incubar e facilitar a nucleação espontânea e crescimento de uma hidroxiapatita carbonatada e hidroxiapatita semelhante ao osso em sílica imersa ou géis de dióxido de titânio, amostras de biovidro e titânio em pH e temperatura fisiológicos. Entretanto, sínteses químicas de pós de HAp usando soluções de SBF mantidas em pH e temperatura fisiológicas (i.e. respectivamente , 7,4 e 37°C) em vez de água pura, não haviam sido tentadas, usando nitrato de cálcio e fosfato de amônio dibásico.

2.9. Polímeros Naturais

A quitosana, QTS, um poli-2-amino-2-desoxi- β -(1,4)-D-glucopiranosose, é derivada da quitina, poli-2-acetamido-2-desoxi- β -(1,4)-D-glucopiranosose. A quitina é tipicamente extraída das cascas de crustáceos tais como camarão, caranguejo e lagosta, e da pena de lula. Este mesmo polímero pode ser encontrado também na casca de alguns insetos tais como besouros, baratas e em alguns fungos.

A quitina é obtida por desproteinização em banho quente de NaOH 5%, e finalmente desmineralização em um banho gelado de HCl 2%. A QTS é a forma N-desacetilada da quitina que é obtida depois de tratamento da quitina com NaOH 50% a quente⁷. O termo QTS é usualmente usado para moléculas de quitina que são desacetiladas até um ponto onde se tornam solúveis em sistema ácido aquoso diluído (por exemplo, 1-10% por volume de ácido acético aquoso). As estruturas da quitina, da quitosana, do biopolímero celulose que são estruturalmente semelhantes, e do sulfato de condroitina são mostradas na Figura 2⁷⁵.

A quitina, é um dos polissacarídeos naturais mais abundantes e a quantidade global total da quitina acessível é estimada em 1.10^9 toneladas. É obtida principalmente como subproduto da indústria do camarão⁷⁵. Embora a estrutura molecular de quitosana seja considerada como um copolímero de N-acetil-glucosamina e glucosamina, usualmente o conteúdo de glucosamina é superior a 90%. A QTS é também encontrada em vários fungos. A quitina, a quitosana, e seus derivados foram estudados somente extensivamente a partir de 1970, e seu potencial para materiais funcionais tem surgido de maneira crescente⁷⁵.

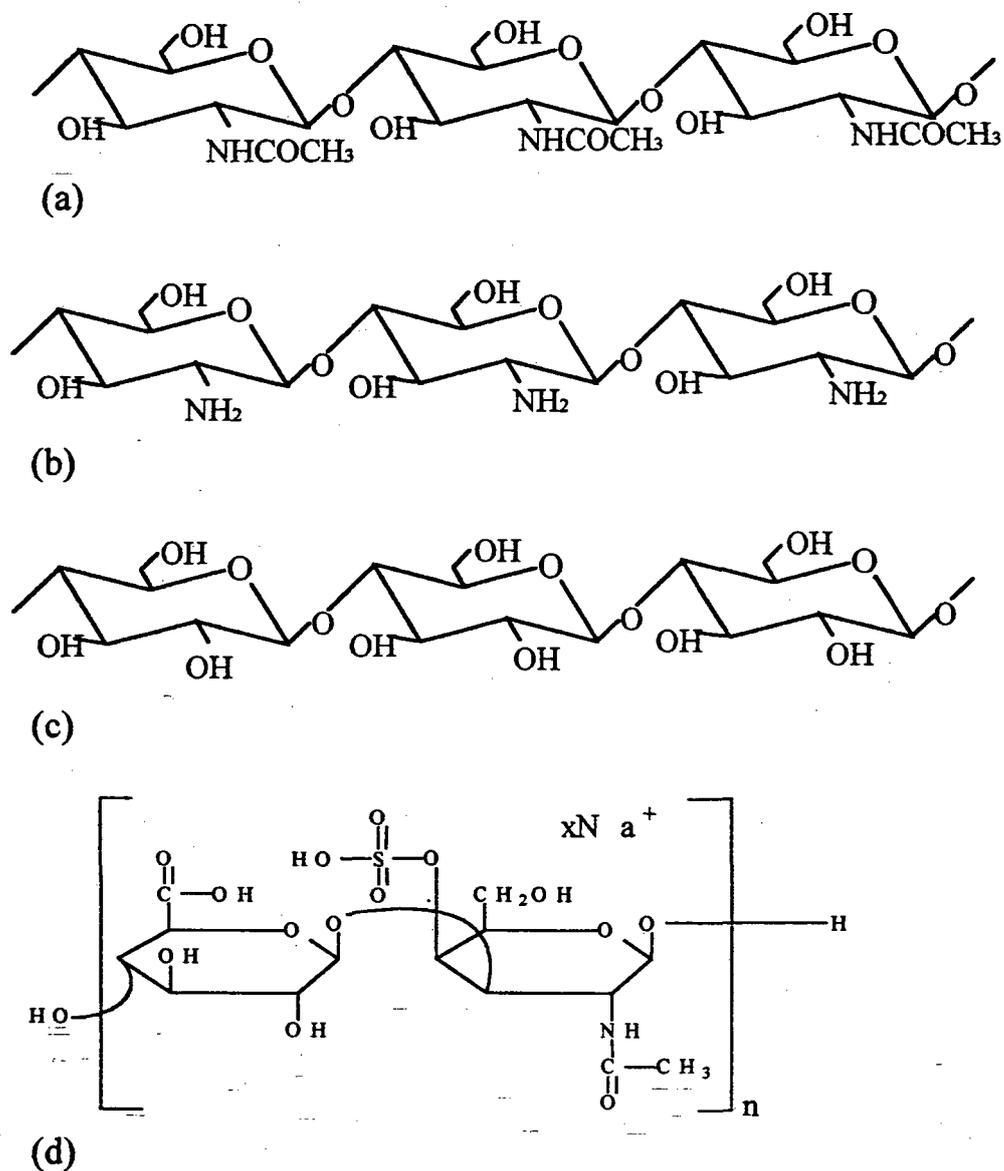


Figura 2. Segmentos dos biopolímeros: (a) quitina, (b) quitosana, (c) celulose, e (d) sulfato de condroitina

Devido à sua natureza catiônica (grupo amino protonado), a QTS forma espontaneamente complexos insolúveis em água com polieletrólitos aniônicos. Portanto,

QTS tem sido usada principalmente como um flocculante para o tratamento de água residuária^{76,77}. Recentemente, tem sido utilizada nos campos biomédico e farmacêutico devido a sua propriedade favorável de biodegradabilidade, toxicidade baixa, e boa biocompatibilidade¹.

A viscosidade intrínseca (η) de soluções de QTS é dependente do pH e força iônica. Se o pH da solução for aumentado, as repulsões eletrostáticas inter- e intramoleculares entre cargas catiônicas são reduzidas por que a QTS tem um grupo amino protonado⁷⁵. Assim, as cadeias de QTS⁻ se tornam mais próximas e o volume hidrodinâmico das moléculas de QTS diminuem. Este efeito pode aumentar as ligações de hidrogênio inter- e intracadeias. Similarmente, quando a força iônica cresce, a viscosidade intrínseca decresce devido ao efeito de proteção dos contra- íons. Embora, a molécula de QTS seja preferencialmente rígida, a flexibilidade de alguns polissacarídeos tem sido investigada em termos de um “parâmetro de rigidez” B , (i.e., a dependência de viscosidade intrínseca com a força iônica).

O resumo dos valores de B para uma variedade de polímeros está apresentada na Tabela 4⁷⁵. O valor de B da QTS foi estimado como 0,08. Terbojevich e col. obtiveram valores de B a partir de 0,043 a 0,091 para a QTS com graus de acetilação na faixa de 52,2% a 12,1% *apud* Kubota e col.. Estes valores são essencialmente os mesmos que aqueles encontrados para carboximetilcelulose e ácido hialurônico, porém maior que o DNA e menor que poliacrilato. Estas propriedades de solução da QTS afetam amplamente a formação de complexos macromoleculares.

Tabela 4. Parâmetro de rigidez, *B*, para quitosana e alguns polímeros⁷⁴.

Polímero	Grau de acetilação (%)	<i>B</i>
Quitosana	12,1	0,091
	20,1	0,060
	42,1	0,061
	52,2	0,043
Poli fosfato	-	0,44
Poli acrilato	-	0,23
Xantato de amilose	-	0,22
Carboximetilamilose	-	0,20
Ácido hialurônico	-	0,065
Pectinato de sódio	-	0,044
DNA	-	0,006

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de pastas de biocerâmicas a partir de fosfato de cálcio e quitosana em condições fisiológicas aplicáveis em osteointegração.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Síntese de HAp por precipitação, e *in situ*, para a preparação de biocerâmicas a temperatura fisiológica.
- 3.2.2. Preparação de pastas a partir de pó de HAp e uma solução de quitosana 4%.
- 3.2.3. Preparação de pastilhas a partir das pastas de biocerâmicas.
- 3.2.4. Testes das pastilhas depois de serem injetadas em uma solução de NaOH 2 mol/L, contra desintegração em solução fisiológica por 48 horas.
- 3.2.5. Preparação de uma composição que apresente as propriedades características adequadas para uso biomédico.
- 3.2.6. Caracterização das pastilhas de biocerâmica que não desintegram em solução fisiológica através das técnicas de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura (MEV), porosimetria, análise termogravimétrica (TGA) e resistência mecânica à compressão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

4.1.1. REAGENTES

Os reagentes utilizados na preparação dos compósitos biocerâmicos foram: Fosfato de amônio dibásico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ – Lafan, Hidróxido de sódio (NaOH) – Labsynth, Nitrato de cálcio tetrahidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ – Vetec, Hidróxido de amônio (NH_4OH) – Merck, Vanadato de amônio (NH_4VO_3) – Merck, Molibdato de amônio tetrahidratado $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ – Vetec, Ácido nítrico (HNO_3) – Merck, Cloreto de amônio (NH_4Cl) – Merck, EDTA – Sigma, Nitrato de potássio (KNO_3) – Pronta Química, Negro de solocromo – Grupo Química, Sulfato de magnésio (MgSO_4) – Reagen, Quitosana – Farma, Fosfato de cálcio dibásico dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) – Riedel- DE Haën, Cloreto de sódio (NaCl) – Synth, Succinato de sódio ($\text{NaO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CCO}_2\text{Na}$) – Sigma, Sulfato de condroitina – Kin Master Produtos Químicos LTDA.

4.1.2. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados durante a preparação e caracterização dos compósitos biocerâmicos foram: Espectrofotômetro de Infravermelho FT Perkin Elmer 16 PC, Espectrofotômetro MC VIS – 724, Balanças analíticas: Shang Ping FA 6104 e PR 1000,

Moinho-Anaysen Mühle A10, Aparelho de Microscopia Eletrônica de Varredura, Philips XL30 do Labmat no departamento de Engenharia Mecânica, Aparelho de difração de raios-X "Miniflex Goniômetro" no Departamento da Física.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Síntese de HAp100⁴⁷.

Foi adicionado gota a gota uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,156 M a uma solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,4 M a uma temperatura de 60°C , mantendo o pH em 8,0 com $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}$. A mistura foi fervida e agitada vigorosamente por 2 horas. A seguir o precipitado foi filtrado em temperatura ambiente, lavado três vezes com água destilada e seco para obter o produto.

4.2.2. Síntese de TCP⁴⁷.

Foram misturados soluções equimolares de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em uma temperatura de 60°C , mantendo o pH em 7,0 com $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}$. A mistura foi fervida e agitada por 2 horas. A seguir, o precipitado foi filtrado à temperatura ambiente, e lavado com água destilada e seco para obter produto.

4.2.3. Preparação das soluções aquosas dos biopolímeros QTS e sulfato de condroitina.

A solução de QTS foi preparada na concentração de 4 % em peso em ácido acético 3 %. A solução de sulfato de condroitina foi preparada na concentração de 5 % em peso em água, para preparar um cimento de HAp.

4.2.4. Síntese de HApIII (*in situ*)⁶.

Foi misturado TCP e DCPD em uma razão de 9:1, com sulfato de condroitina 25% em peso, na presença de succinato de sódio 60% do peso total da mistura TCP e DCPD. O precipitado foi filtrado e coletado. Depois de seco foi transformado em HApIII em pó.

4.2.5. Preparação das pastas biocerâmicas: a partir de HAp e QTS (dissolvida em ácido acético 3%).

As pastas foram preparadas variando as percentagens de HAp's de 0 a 98 % com uma solução de QTS a 4 %. O pó foi transformado em pastas, por que o objetivo era obter um material com propriedades biocerâmicas, para ser injetado na forma pastosa no local desejado. As composições A até D não formaram pastas, e portanto não foram aproveitadas, pois não corresponderam ao objetivo do trabalho (Tabela 5).

Tabela 5: Composições das pastas preparadas.

Amostras	% HAp	% QTS
A	0,0	100,0
B	10,0	90,0
C	25,0	75,0
D	40,0	60,0
I	55,6	44,4
II	71,4	28,6
III	86,2	13,8
IV	93,1	6,9
V	96,2	3,8
VI	98,0	2,0

4.2.6. Testes de desintegração dos compósitos biocerâmicos em solução fisiológica.

Pastas dos compósitos biocerâmicos contidas em uma seringa de 1 cm de diâmetro com a parte inferior cortada foram injetadas na forma de pastilhas em uma solução de NaOH 2 mol/L, e em seguida na solução fisiológica a 37°C. Após 48 h., as pastilhas não desintegradas, foram retiradas, lavadas e imersas por uma semana no fluido corporal sintético. Depois de lavadas e liofilizadas foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas, teste de resistência mecânica, análises termogravimétricas e difração de

raios-X. As pastilhas tiveram um diâmetro de 1 cm, e o processo ocorreu a frio em uma temperatura de 37°C.

4.2.7. Preparação do fluido corporal sintético (SBF).

O SBF é conhecido como uma solução tampão metaestável^{51,53}, e mesmo uma pequena mudança não desejada em ambas as etapas da preparação e na temperatura de manutenção, pode afetar drasticamente a pureza da fase e a estabilidade dos pós de HAP produzidos em temperatura elevada, bem como as cinéticas nos processos de precipitação.

Neste estudo os reagentes NaCl (99,5%), NaHCO₃ (99,5%), KCl (99,0%), Na₂HPO₄·2H₂O (99,5%), MgCl₂·6H₂O (99,0%), Na₂SO₄, (CH₂OH)₃CNH₂ (99,5%), CaCl₂·H₂O (99,0%) e HCl (37 vol%,) foram usados na preparação do SBF.

A solução de SBF⁷¹⁻⁷⁴ foi preparada dissolvendo quantidades apropriadas dos reagentes em água deionizada. Os reagentes foram adicionados, um por um, depois que cada reagente foi completamente dissolvido em 700 mL de água, na ordem dada na Tabela 6. Um total de 40 mL de uma solução de HCl 1 mol/L foi consumido para o ajuste do pH durante a preparação de 1 L da solução de SBF. Uma alíquota de 15 mL desta solução ácida foi adicionada antes da adição do sexto reagente, CaCl₂·H₂O. A parte restante da solução de HCl foi usada durante titulação subsequente. Seguindo a adição do oitavo reagente (tris(hidroximetil)amino metano), a temperatura da solução foi aumentada para 37°C. Esta solução foi então titulada com HCl 1 mol/L a um pH de 7,4 em 37°C. Durante o processo de titulação, a solução também foi continuamente diluída com adições consecutivas de água

deionizada para completar o volume final a 1 L. A solução de SBF preparada pode ser guardada em 5°C por um mês, sem degradação.

Tabela 6. Composição química do SBF⁴⁰.

Ordem	Reagentes	Quantidades (g/L)
1	NaCl	6,547
2	NaHCO ₃	2,268
3	KCl	0,373
4	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	0,178
5	MgCl ₂ •6H ₂ O	0,305
6	CaCl ₂ •2H ₂ O	0,368
7	Na ₂ SO ₄	0,071
8	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057

4.2.8. Obtenção de uma porosidade melhor usando pó de alumínio.

Foi misturado pó de HAp com pó de alumínio (0,2 – 1,1% de Al), em seguida a mistura foi transformada em pasta com uma solução de QTS 4%. As pastilhas obtidas após o preenchimento da seringa, foram submersas em uma solução de NaOH 2 mol/L. As pastilhas foram retiradas da solução depois as finais da liberação de gases, lavadas com

solução de pH fisiológico e deixadas por 48 horas em soro fisiológico. Em seguida, foram imersas e deixadas por uma semana no fluido corporal sintético à 37°C. Depois da lavagem com água deionizada, foram liofilizadas e caracterizadas pelas técnicas adequadas, tais como IV, XRD, MEV, TGA, etc.

4.2.9. Caracterização dos compósitos biocerâmicos não desintegrados.

4.2.9.1. Determinação da razão Ca/P

A determinação da razão Ca/P foi feita para poder classificar o material sintetizado. A quantidade de cálcio foi determinada por uma titulação complexométrica com o EDTA, usando como indicador Erio-T Negro, enquanto o fósforo foi determinado colorimetricamente a 465 nm como fosfovanadomolibdato, que tem uma coloração amarela intensa.

4.2.9.2. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho com FTIR foram obtidos em faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , de amostras na forma de pó misturadas com KBr de grau espectroscópico (Infravermelho FT Perkin Elmer 16 PC). Os espectros de FTIR são provocados pelos diferentes modos vibracionais e rotacionais de uma molécula. Para que um modo vibracional apareça no espectro de infravermelho com FTIR, é necessário que ocorra modificação no momento do dipolo durante a vibração.

Os espectros de absorção no infravermelho podem ser usados para a identificação de compostos puros ou para a detecção de identificação de impurezas. Os compostos inorgânicos têm bandas de absorção largas, enquanto os orgânicos podem apresentar numerosas bandas mais estreitas. O espectro de absorção de um composto no infravermelho pode ser considerado como uma espécie de impressão digital do composto.

4.2.9.3. Análise de difração de raios- X

A análise de difração de raios- X foi feita no laboratório do Departamento de Física da UFSC, onde os pós das amostras de diferentes composições e de amostras de HAp foram examinados com o Miniflex Goniômetro usando radiação (k_{α}) da lâmpada Cu/ 30 kV/ 15 mA. As análises foram feitas para determinar a cristalinidade do material obtido. Os difractogramas, foram obtidos em etapas de intervalo de $0,050^{\circ}$ com 1,0 seg. de contagem em cada etapa.

4.2.9.4. Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises das amostras do material obtido usando MEV do laboratório de materiais (LABMAT) da UFSC, foram feitas para determinar a morfologia e a porosidade de superfícies fraturadas ou não. As amostras foram preparadas por simples secagem ao ar livre e no liofilizador. As amostras na forma de pastilhas cortadas e não cortadas, foram recobertas com uma camada fina de ouro, para dar condições de análises microscópicas e

foram também analisadas através da microsonda de energia dispersiva de raios- X, EDX. Um feixe de elétrons colide com a amostra e desprende elétrons que serão detectados. A análise de EDX foi feita para conferir se todo alumínio que foi utilizado como artifício para a obtenção de poros nas pastilhas de biocerâmicas, foi eliminado por dissolução em meio alcalino em virtude da sua toxicidade.

4.2.9.5. Porosimetria por intrusão de mercúrio

A técnica de porosimetria por intrusão de mercúrio foi realizada no laboratório do departamento de Engenharia Mecânica da UFSC, para discutir a porosidade dos compósitos cerâmicos preparados. Nesta técnica uma pressão foi exercida sobre a superfície do mercúrio, começando com uma pressão baixa de 18 mbar até uma alta de 4000 mbar para determinar tamanho de poros de 500 – 3 μm . A porosidade total por unidade de massa foi calculada a partir do volume total de intrusão, enquanto a distribuição de tamanho de poros foi calculada a partir da equação de Washburn (Equação 9).

$$d = -4\gamma\cos\theta.p^{-1} \quad \text{eq. 9}$$

Onde d é o tamanho dos poros expresso em μm , γ é a tensão superficial de mercúrio (0,48 N/m), e θ o ângulo de contato.

4.2.9.6. Análise Termogravimétrica (TGA)

Análise termogravimétrica (TGA) foi realizada no laboratório do Departamento de Química da UFSC com uma velocidade de 10°C por minuto sob atmosfera de nitrogênio de alta pureza. As análises de TGA foram empregadas para caracterizar os compósitos, a interação entre os grupos amino protonados da QTS e fosfato da HA, e também a transformação de HAp em TCP e/ou TetCP, acompanhada com a perda de moléculas de água. Na análise por TGA uma mudança no peso da amostra foi medida enquanto esta foi aquecida com uma velocidade constante.

Esta técnica é efetiva para análise quantitativa de reações térmicas que são acompanhadas por mudanças de massa, tais como evaporação, decomposição, absorção de gás, desorção e desidratação. A mudança na amostra afeta o equilíbrio da balança. Este desequilíbrio é recompensado com uma força elétrica, a qual generaliza uma força eletromagnética adicional para reconstruir o equilíbrio. A quantidade da força eletromagnética adicional é proporcional à mudança da massa. O termograma mostrará estas mudanças de detalhes estruturais, composicionais e desidratação nas temperaturas onde elas ocorrerão.

4.2.9.7. Teste de Resistência Mecânica

O teste de resistência mecânica foi realizado nas pastilhas secas uniaxial em direção vertical (no eixo z) usando uma prensa no laboratório no Departamento de Química (lab QMC 208). O teste tem como objetivo medir a carga máxima suportada pelo compósito cerâmico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Espectroscopia de absorção na região de infravermelho.

A caracterização das amostras de QTS, HAp, e compósitos preparados, bem como interações entre os grupos amino protonado da QTS e fosfato da HAp e as hidroxilas presentes em ambos materiais foram monitoradas por espectroscopia na região do infravermelho. Os deslocamentos das bandas características de fosfato, de amino protonado e hidroxila, são atribuídos às possíveis interações e formação de ligação de hidrogênio entre estes grupos funcionais.

A formação de HAp em soluções aquosas resulta em uma apatita com estrutura cristalina e propriedades de superfície similar ao osso. Os resultados das análises químicas e medidas espectrofotométricas mostraram que a HAp apresenta estado sólido simples de moléculas com simetria tetraédrica onde as bandas passam a ser permitidas devido ao relaxamento da simetria molecular pela regra de seleção. Devido à sua influência de simetria do sítio, a simetria ideal do íon fosfato tribásico no estado livre ou distorcido é tetraédrica um membro do grupo de ponto T_D ⁷⁸.

Nesta condição de simetria ideal, somente pouca banda de absorção em 566 cm^{-1} e 1034 cm^{-1} correspondendo ao grupo PO_4^{3-} e 3444 cm^{-1} ao OH^- foram claramente observadas. Os espectros de IV foram obtidos de amostras em pastilha de KBr. O espectro de IV da HAp100 mostra bandas nas frequências 1034 e 566 cm^{-1} correspondentes ao PO_4^{3-} e em 3444 cm^{-1} ao íon OH^- (Figura 3b). O espectro de IV da HApIII, mostrado na

Figura 3d, mostra absorções em respectivamente 1034 cm^{-1} , 564 cm^{-1} e 3442 cm^{-1} , que correspondem aos grupos PO_4^{3-} e íon OH^- .

No espectro IV da QTS na Figura 3a, pode-se observar as bandas características. As bandas 2922 e 1380 cm^{-1} , correspondem ao grupo amino, e a em 3444 cm^{-1} corresponde à hidroxila. A Figura 3g, mostra o espectro da amostra AmIII, observa-se uma banda a 2080 cm^{-1} , que corresponde à banda de grupo amino da QTS (2922 cm^{-1}). Também podem ser observadas as bandas características de grupos fosfatos no espectro da amostra AmIII (1032 e 564 cm^{-1}) que praticamente não foram alteradas, e que correspondem às dos grupos fosfatos da HAp, respectivamente em 1034 e 566 cm^{-1} .

Nos espectros de IV das amostras AmV, e AmVI (Figuras 3f, e 3e), além do desaparecimento quase total da banda característica a 2922 cm^{-1} , outras bandas características do grupo amino são deslocadas para 1652 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} , respectivamente nestas amostras. A banda característica do grupo OH^- foi deslocada de $14,0$, $6,0$, $6,0$, e $4,0\text{ cm}^{-1}$ para 3458 , 3450 , 3440 , e 3448 cm^{-1} para as amostras AmI, AmIII, Am5, e AmVI; respectivamente. As bandas características para o grupo íon PO_4^{3-} foi deslocada para 1032 e 564 cm^{-1} na amostra AmIII (fig. 3g).

Estes deslocamentos indicam que ocorreram interações entre os grupos funcionais, tais como grupo amino protonado da QTS e PO_4^{3-} da HAp. Este pode representar a ligação de fosfato com este sítio (Tabela 6).

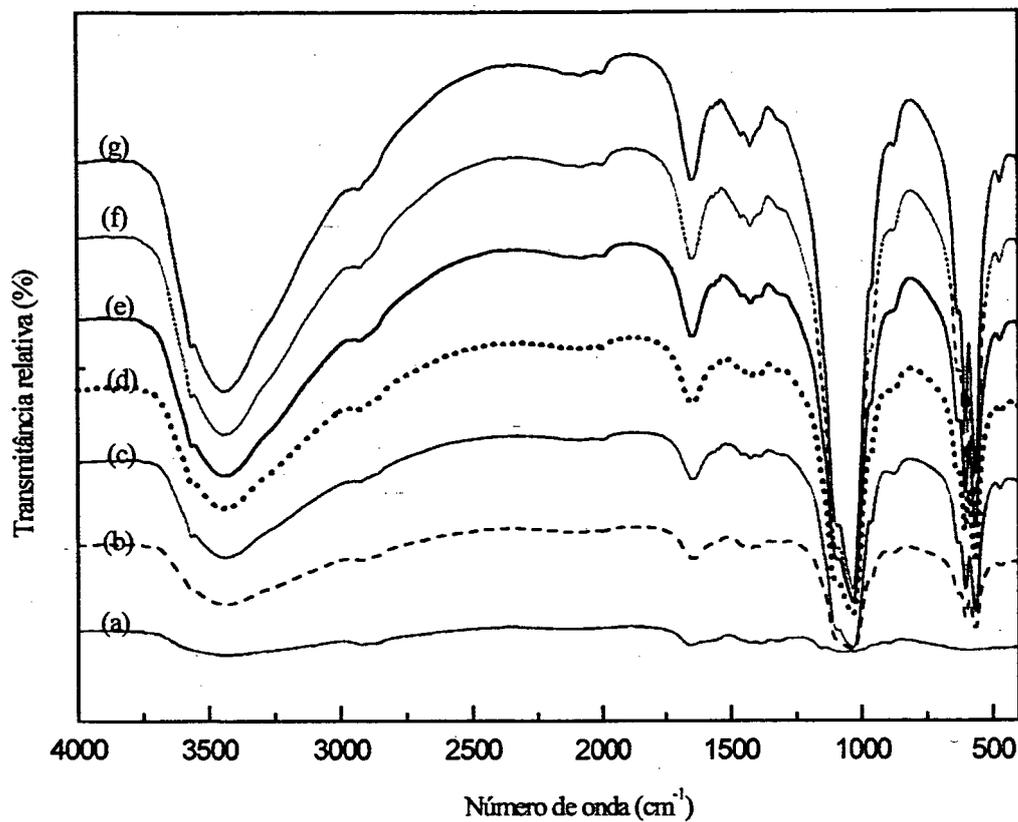


Figure 3. Espectros de absorção de FTIR de (a) QTS, (b) HAp100, (c) HApIII, (d) compósito AmI, (e) compósito AmIII, (f) compósito AmV, e (g) compósito AmVI.

Estes deslocamentos estão apresentados na Tabela 7. Não foram observados deslocamentos nos espectros do infravermelho das amostras de compósitos AmV e AmVI,

para as bandas características do grupo fosfato da HAp. Este resultado sugere que a interação não causou uma mudança significativa nas bandas características, mas foi o suficiente para causar mudanças no comportamento mecânico.

Tabela 7. Deslocamentos das bandas características dos grupos funcionais no espectro de FTIR.

Amostras	Número de onda (cm^{-1})		
	PO_4^{3-}	Amino	OH
HA100	566; 1034	-	3444
HAIII	564; 1034	-	3442
QTS	-	2922; 1380	3444
AmI	566; 1034	2080; 1422	3458
AmIII	564; 1032	2080; 1422	3450
AmV	566; 1034	-; 1652	3440
AmVI	566; 1034	-; 1640	3448

5.2. Difração de raios-X: HAp, QTS e Compósitos.

A técnica de difração de raios-x foi utilizada para observar a cristalinidade das amostras de QTS, HAp, e compósitos. Como o sinal (pico) de difractograma está relacionado com a cristalinidade de um material, observa-se para materiais com uma

crystalinidade maior, uma melhor resolução deste pico apresentando uma intensidade maior no valor de 2θ . Para as amostras de materiais amorfos existe um alargamento do sinal resultando numa pobre resolução com conseqüente diminuição da sua intensidade.

A Figura 4 mostra uma comparação dos difratogramas de raios- X, de HAp100, HApIII, e de composições diferentes AmII e AmV respectivamente. Observa-se que os difratogramas dos compósitos assemelham ao de HAp100 na Fig. 4c considerando os resultados da HAp com o número 60521 no cartão ICSD como padrão.

Pode-se observar que a HAp100 (Figura 4c) demonstra uma cristalinidade melhor que a HApIII (Figura 4b).

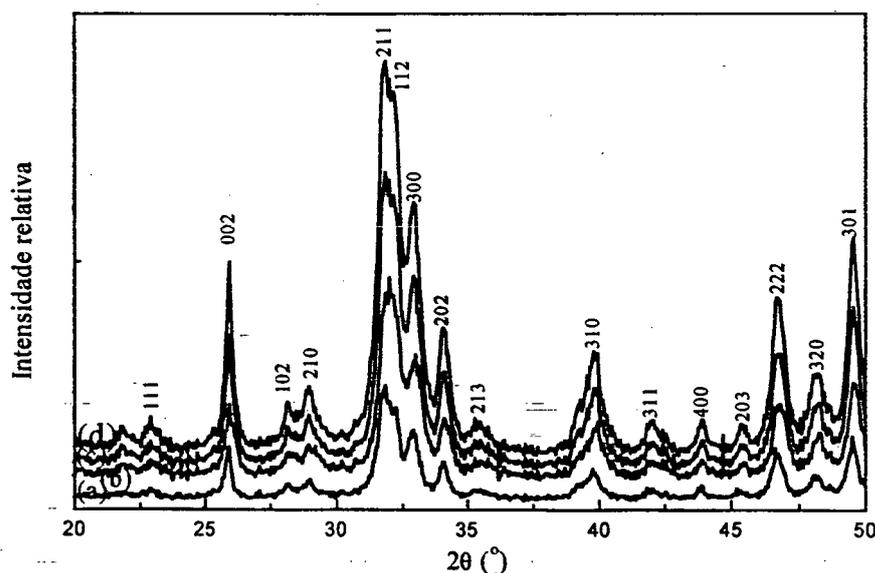


Figura 4. Difratogramas de raios X obtidos de pós de amostras de; (a) compósito V, (b) compósito II, (c) HAp100, e (d) HApIII.

Nos difractogramas de raios-X dos compósitos AmII e AMV, não foram observados picos de QTS, provavelmente devido à baixa intensidade destes picos, que correspondem ao número 39-1894 no cartão JCPDS, os quais podem ser encobertos pelos picos de HAp que possuem intensidades maiores. Também pode ser observado que os picos característicos da HAp dos compósitos AmV e AmII nos difractogramas mostrados nas Figuras 4a e 4d, respectivamente, não foram alterados.

5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura dos compósitos.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura permite que as superfícies de materiais sólidos sejam examinadas, com relação à porosidade e sua morfologia.

Na Figura 5, todas as micrografias obtidas demonstram superfícies porosas para os compósitos preparados a partir de HAp100, obtido a partir de nitrato de cálcio e fosfato de amônio dibásico, enquanto os compósitos preparados a partir de HApIII mostram uma superfície pobre em poros. A micrografia 5a mostra a forma não desintegrada em solução fisiológica da pastilha obtida da composição V. A micrografia 5b do compósito AmIII, mostra uma superfície porosa, a qual revela microcristais distribuídos mais homogeneamente que a superfície do compósito AmIII preparada a partir da HApIII (micrografia 5c). Isto corresponde ao esperado, pois conforme análises de difração de raios-X, a HApIII demonstrou uma cristalinidade inferior à de HAp100.

A HApIII demonstra uma irregularidade na morfologia, pois o tamanho dos cristais no compósito não está uniformemente distribuído, enquanto o da HAp100 demonstra uma distribuição melhor, uma vez que os compósitos preparados a partir do mesmo apresentam

cristais mais uniformemente distribuídos. As micrografias 5d e 5e, mostram que há uma certa interconexão dos poros.

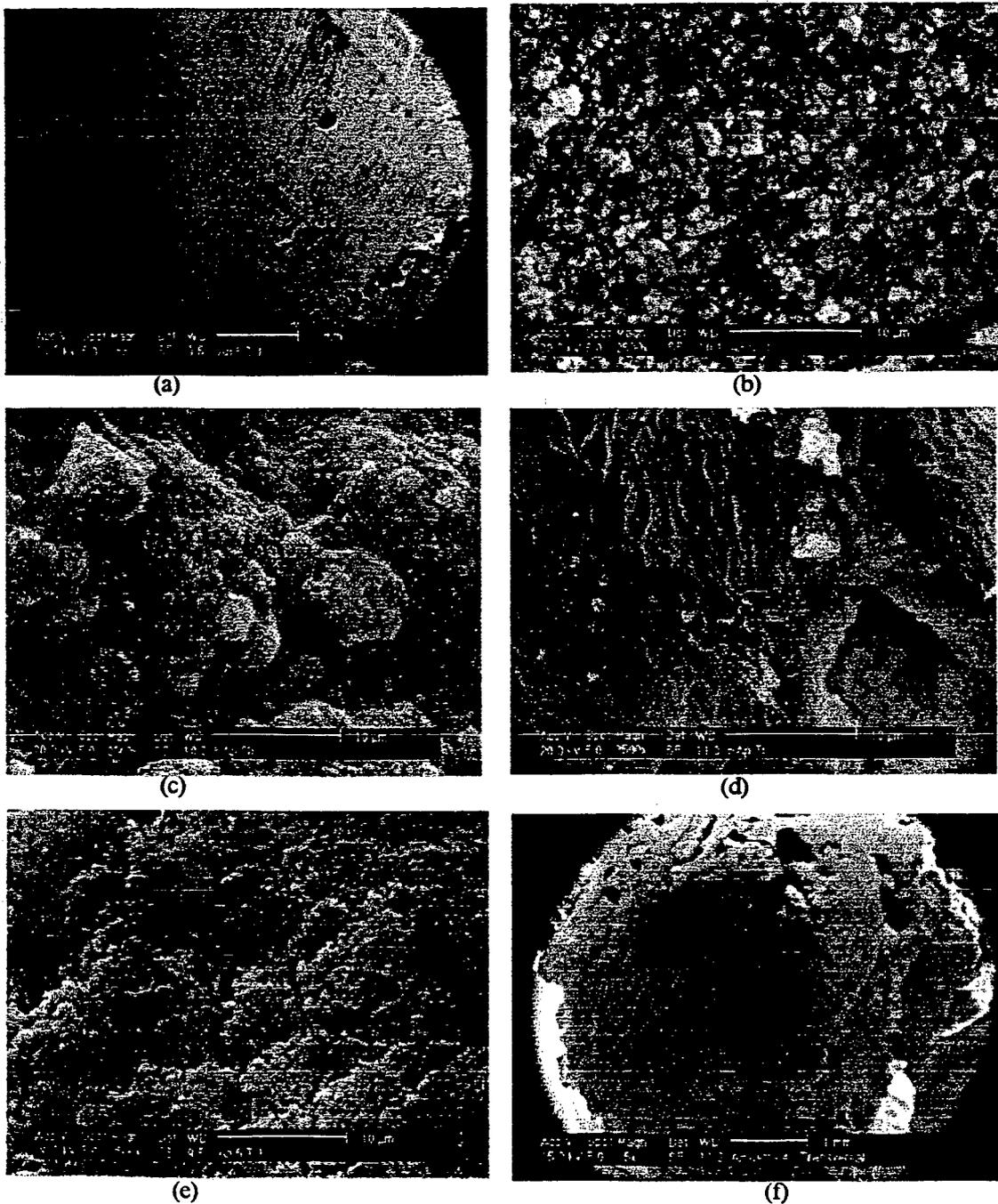


Figura 5. Micrografias obtidas das pastilhas dos compósitos; (a) AmV, (b) AmIII, (c) AmIII (a partir da HApIII), (d) AmI seção transversal, (e) AmV seção transversal, e (f) AmIV seção transversal (com 0,3% Alumínio).

A micrografia 5f, mostra que poros com dimensões maiores que 100 μm foram obtidos com o uso de pó do alumínio 0,3% em peso do compósito da composição IV. A dissolução de alumínio, liberando gases de hidrogênio fez com que o compósito ficasse mais poroso.

A porosidade final das amostras depende da proporção líquida – sólido – Al usada no processo de preparação das pastas.

Após as análises das micrografias das amostras de compósitos na presença de alumínio foi verificada uma melhoria na porosidade e na morfologia do compósito biocerâmico. Assim, pode-se sugerir o uso de alumínio como agente formador de poros em materiais onde a porosidade e a interconexões de poros são os principais requisitos para a osteointegração.

5.4. Porosimetria a base de mercúrio dos compósitos com/sem adição de pó de alumínio.

A técnica de porosimetria a base de mercúrio foi empregada com a finalidade de observar a distribuição dos poros, a área superficial e a característica microestrutural dos compósitos preparados com e sem alumínio.

A Figura 6, mostra os resultados obtidos da porosimetria onde se observa que o uso de pó de alumínio melhorou a porosidade dos compósitos. Foram também obtidas uma porosidade de aproximadamente 80% e dimensões de poros maiores que 100 μm , onde a distribuição dos macroporos não alterou praticamente a superfície específica, como a dos

microporos. A Figura 6a, mostra que o compósito Am97 preparado a partir da HApIII com o uso de 0,3% de alumínio, apresentou uma porosidade com poros maiores que $100 \mu\text{m}$. Comparando a Figura 6c, com as figuras 6a, 6b, e 6d, observa-se que ocorreu uma melhoria da dimensão dos poros com o uso de alumínio. Também se observa que a superfície específica dos compósitos varia gradativamente no intervalo de diâmetro inferior a $0,5 \mu\text{m}$, ao contrário do intervalo de diâmetro maior que $0,5 \mu\text{m}$, onde a superfície é praticamente constante. Pois quanto maior for o volume de mercúrio na superfície maior a superfície específica, e quanto maior o volume de mercúrio penetrado através dos poros, menor a superfície específica.

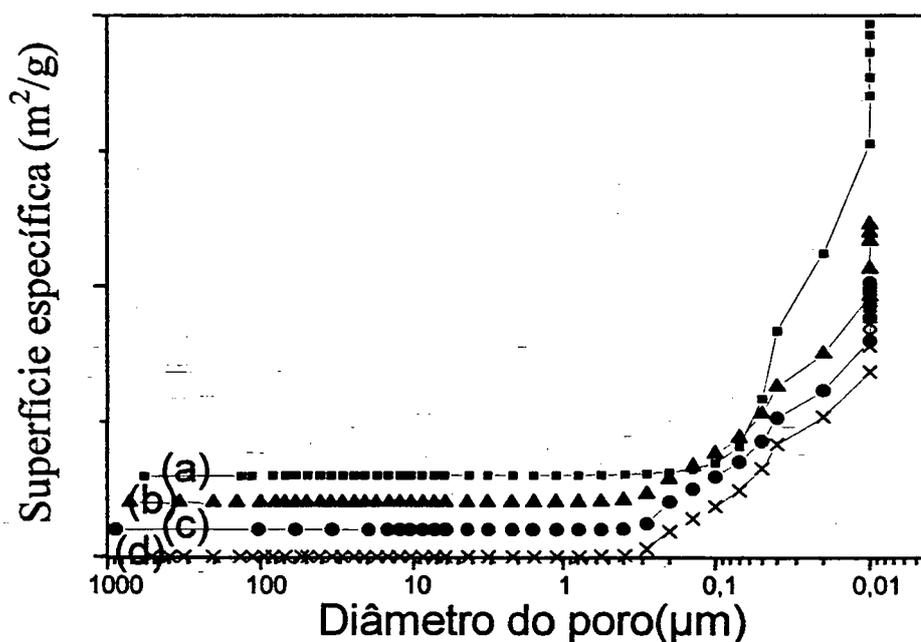


Figura 6. Resultados da porosimetria dos compósitos; (a) Am97 (HApIII/QTS/0,3% Al), (b) AmVI (HAp100/QTS/0,2% Al), (c) AM94,5, e (d) Am95 (HAp100/QTS/0,5% Al).

5.5. Análise por microsonda de Energia Dispersiva de raios-X.

Para verificar a presença de possível alumínio residual no processo de obtenção de poros de dimensões favoráveis ($> 100\mu\text{m}$) para aplicação em osteointegração foi realizada a análise de EDX de um dos compósitos preparados (AmIV).

A Figura 7, mostra os elementos presentes no compósito AmIV, obtidos da análise por microsonda de energia dispersiva de raios-X, onde não foi observada a presença de resíduo de alumínio. Isto é bom por que o compósito não devia apresentar resíduo de alumínio devido ao fato da sua toxicidade.

A remoção total do alumínio das amostras biocerâmicas por dissolução com hidróxido de sódio justifica a utilização deste método para a preparação de biomateriais porosos.

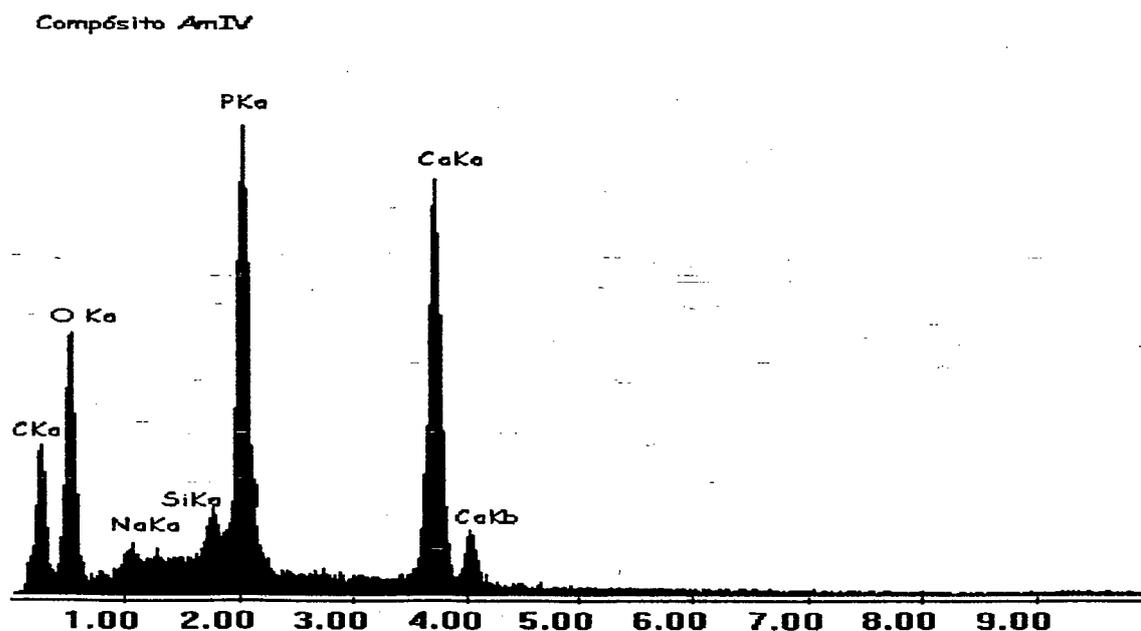


Figura 7. Análise por microsonda de energia dispersiva de raios-X.

5.6. Estudos Termogravimétricos de: QTS, HAp, e Compósitos.

As análises termogravimétricas de QTS, HAp, e compósitos foram realizadas com a finalidade de verificar a influencia da temperatura sobre a resistência térmica destes materiais. Essas informações juntamente com a comparação dos espectrogramas FTIR disponíveis na literatura de QTS e HAp e dos compósitos permitirão avaliar as possíveis transformações de fases da HAp, decomposição e eliminação do material polimérico e interações entre os grupos amino protonado da QTS e fosfato da HAp e as hidroxilas presentes em ambos materiais. Os deslocamentos nas temperaturas de decomposição do material polimérico podem ser atribuídos às possíveis interações entre estes grupos funcionais.

Na Figura 8, QTS representa o termograma da quitosana pura, e QTS' a derivada do termograma de QTS, para poder observar melhor as temperaturas, as quais houve perdas em massa caracterizando a decomposição térmica do material polimérico.

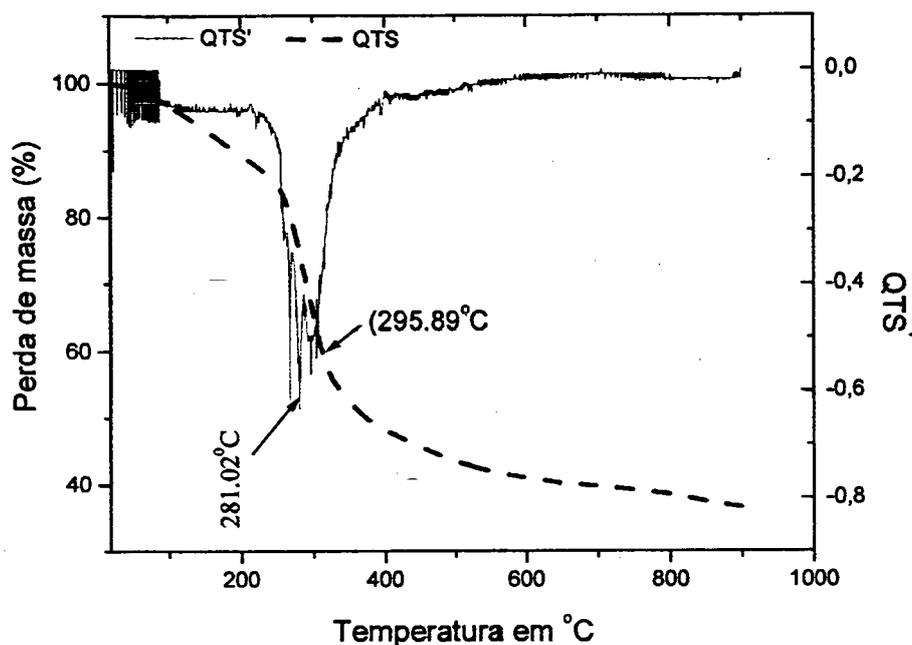


Figura 8: Termograma de amostra da QTS 100 %, obtido na análise termogravimétrica.

Na Figura 9, estão apresentados os termogramas das amostras de QTS, AmI, AmIII, HApIII e HAp100. Analisando-se os termogramas, pode-se observar uma perda de 4,186% de massa a 72,94°C, que provavelmente é devido à umidade da amostra HApIII. Não foi observada mais nenhuma perda de massa desta amostra, o que pode ser considerado que não ocorreu transformação de fases durante o aquecimento, já que a transformação de fase da HAp é acompanhada com a perda de moléculas de água.

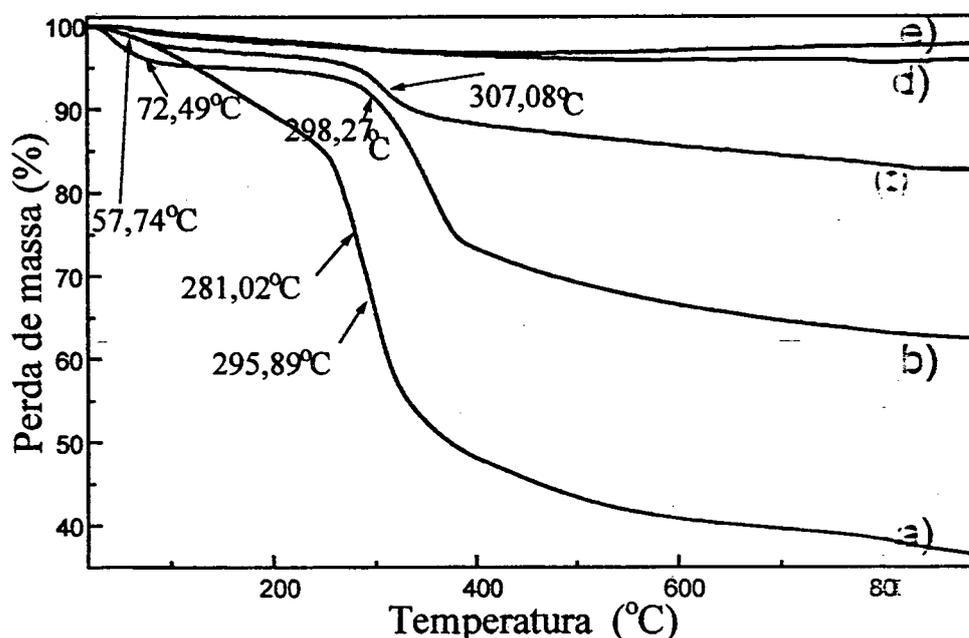


Figura 9. Termogramas das amostras de: (a) QTS, (b) compósito AmI, (c) compósito AmIII, (d) HAIII, e (e) HA100.

No termograma 9e da amostra HA100, não ocorreu perda significativa de massa. Este resultado indica que provavelmente não ocorreu transformação de fase do composto sintetizado. O termograma 9a de QTS100%, mostra perdas nas temperaturas de 281,02°C e 295,89°C, que provavelmente caracterizam a decomposição e eliminação do material polimérico (ver Fig. 8).

Pode-se observar no termograma da amostra AmI uma perda de massa de 5,810% a 72,49°C (ver termograma 9b e Fig. 10), que pode ser provavelmente devido à umidade, e uma de 24,025% a 298,27°C, correspondente à perda vista no termograma de QTS100%,

provavelmente devido à eliminação do material polimérico. O deslocamento na temperatura de 295,89°C para 298,27°C na termograma 9b do compósito AmI, não foi tão grande, provavelmente devido a maior presença de grupos amino protonados em relação aos fosfatos nesta composição, o que não resultou em uma interação significativa entre estes grupos funcionais.

Pode-se também observar na termograma 9c do compósito AmIII uma perda em massa de 3,097% a 57,74°C que pode ser provavelmente devido à umidade, e uma de 14,209% a 307,08°C (termograma 9c e Fig. 11), que pode ser considerando correspondente à decomposição do material orgânico, mas com deslocamento significativo. O deslocamento provavelmente é devido à interação de fosfato com grupo amino protonado da QTS, já que a presença deste grupo em relação ao grupo fosfato não é tão grande nesta composição, como na composição da amostra AmI. O desaparecimento do pico observado no termograma 9a da QTS100% (em temperatura 281,02°C) nos termogramas 9b e 9c dos compósitos AmI e AmIII, pode ser devido à interação entre grupo amino da QTS e grupo fosfatos da HA.

A transformação de HAp em TCP, TetCP ou outro fosfato de cálcio é acompanhada com a perda de moléculas de água que poderia ser anotada no termograma, como perdas de massas. Como os termogramas 9d e 9e não mostram essas perdas significativas pode-se dizer que não houve transformação de fases das HAp's.

A Figura 10, representa o termograma do compósito com a composição I, amostra AmI, (Tabela 5) e a derivada do termograma de AmI, representado por AmI'. Assim pode-se observar a perda de massa em uma temperatura de 298,27°C, que corresponde à decomposição do material orgânico.

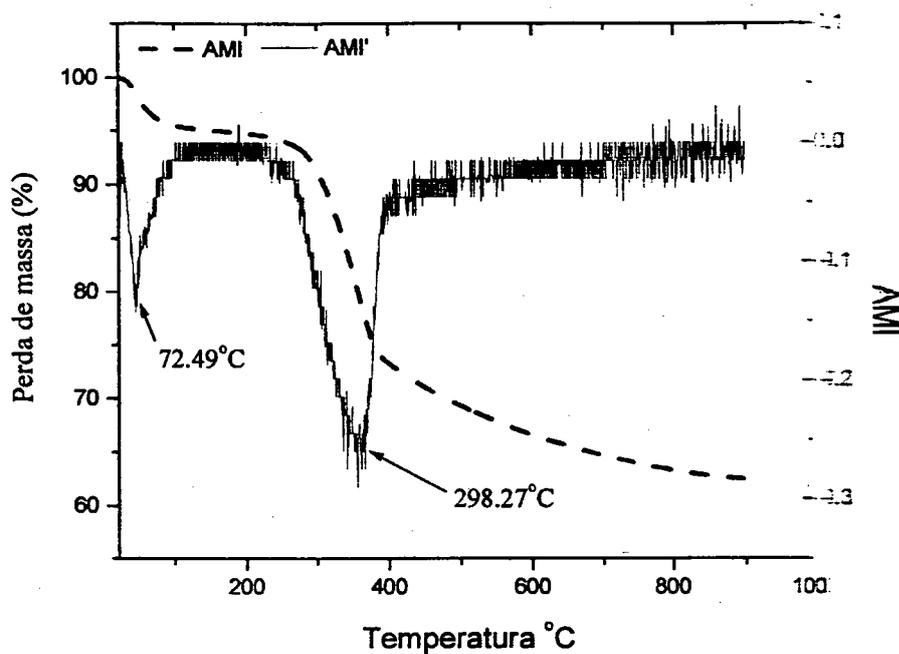


Figura 10: Termograma da amostra AmI, obtido na análise termogravimétrica.

A Figura 11, representa o termograma do compósito com a composição III, amostra AmIII (Tabela 5), e a derivada do termograma de AmIII, representado por AmIII'. Observa-se melhor as perdas de massas nas temperaturas 57,74 e 307,08°C, que correspondem umidade e a decomposição do material orgânico respectivamente.

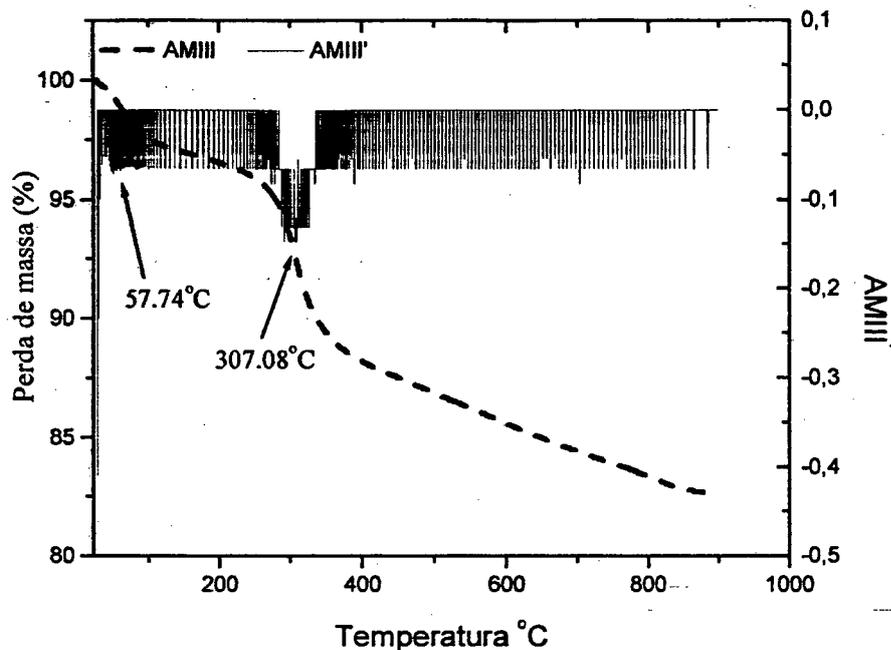


Figura 11: Termograma da amostra AmIII, obtido na análise termogravimétrica.

As pastilhas de composto biocerâmico foram submetidas a teste de carga máxima. As propriedades mecânicas destas pastilhas desenvolvidas a frio mostraram forças compressivas na faixa de 3 – 7 MPa. As amostras preparadas juntas com alumínio demonstraram uma diminuição na carga máxima aplicada, o que era esperado com o aumento da porosidade e está concordante com equação 4, a de Ryskewitch. As propriedades compressivas das pastilhas na direção z exibem a maior dependência composicional. A porosidade dos compostos cerâmicos cresce com aumento da quantidade de alumínio e a força compressiva decresce. A força compressiva mostrou uma variação com a composição das pastilhas.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho, permitem obter as seguintes conclusões:

- A síntese eficiente de HA foi feita por duas maneiras formando HAp100, e HApIII. As HAp mostram cristalinidade diferente, onde a HAp100 mostrou uma cristalinidade melhor que a HApIII. A razão de Ca/P ficou na faixa de 1,65 – 1,70 (Ca/P = 1,69). A água tem um papel importante tanto como meio reacional para dissolução e precipitação bem como moléculas de ligação em compostos cristalinos.

- A HAp formou microcristais irregulares. As pastas preparadas não desintegraram devido à insolubilidade da QTS em solução fisiológica ou alcalina.

- A partir da comparação dos espectros de absorção de FTIR, pode-se concluir que os deslocamentos observados das bandas características de grupos amino e fosfato são atribuídos à interação destes e pela formação de ligação de hidrogênio.

- Compósitos preparados a partir de HAp100, são mais porosos e cristalinos, podendo ser usados como biocerâmica na osteointegração do que os preparados a partir de HApIII.

- O objetivo principal deste trabalho foi alcançado com uso de pó de alumínio, pois conseguiu um material poroso, tamanho de poro superior a 50 μm , que tem uma certa resistência mecânica, e não desintegra em solução fisiológica.

- O uso de pó fino de alumínio 0,3 – 0,5 % em peso melhorou a porosidade e a morfologia do compósito biocerâmico. O desaparecimento do pico caracterizado da QTS, nos termogramas dos compósitos evidencia a interação entre grupo amino protonado da QTS e fosfato da HAp.

- Assim, a metodologia empregada para produzir pastas de compósitos biocerâmicos preparados a partir de fosfato de cálcio e biopolímero, poderá ser uma alternativa para obter e aplicar estes materiais na osteointegração.

7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira A. P. V., Vasconcelos W. L. e Oréface R. L. Novos biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 9, p. 104-109, 1999.
2. Kawachi E. Y., Betran C. A., Reis dos R. R. and Alves O. L. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. *Química Nova* 23 (4), p. 518-522, 2000.
3. Hench, L. L. Biocerâmics: from Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.*, 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
4. France R. M. and Haddow D. B. *Biomaterials to order* In Chemistry in Britain. 36, n. 6, p. 29-31 2000.
5. Leroux L., Hatima Z., Frèchea M. and Lacouta J. L. Effects of Various Adjuvants (Lactic acid, Glycerol, and Chitosan) on the Injectability of a Calcium Phosphate Cement. *Bone* 25, Issue 2, p. 31-34, 1999.
6. Satoshi M., Zasshi K. S. G. Mechanical Properties of Newly Developed Calcium-phosphate Cement for Base Cement. *Jorn. CA Section: 63 (Pharmaceuticals)*, 50 (3), p. 504 – 514, 1996.
7. Jonathan Z. Knaul, Samuel M. Hudson, Katherine A.M. Creber. Improved Mechanical Properties of Chitosan Fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 72, p. 1721 – 1732 1999.
8. Preston J. D. Properties in Dental Ceramics. In Proceedings of the IVTH *International Symposium on dental materials*. Quintessa Publishing Chicago, IL, 1988.
9. Hench L. L. and Ethridge E. C. In *Biomaterials; An Interfacial Approach*. Academic Press. New York, p. 3, 1982.

10. Hulbert S. F., Bokros J. C., Hench L. L., Wilson J., and Heimke G. *Ceramics in Clinical Applications: Past, Present, and Future*; p.189 – 213 In High Tech. Ceramics, edited by P. Vincenzini Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1987.
11. Aoki, H. Transactions. *JWRI*, 17, p. 107, 1988.
12. Vallet-Regí, M. Introduction to the World of Biomaterials. *Anales de Química*, 93, p. 6-14, 1997.
13. Wilson, J. Biocompatibility and Tissue Response to Implants. *Anales de Química*, 93, p. 15-16, 1997.
14. In *Definitions in Biomaterials*; Williams, D. F. Ed.; Elsevier, Amsterdam, p. 66-71, 1987.
15. Hench, L. L. Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.*, 81, p. 1705-1728, 1998.
16. Hench L. L. Bioactive Ceramics. p. 54 in *Bioceramics: Materials Characteristics versus in Vivo Behavior*, vol. 523, edited by P. Ducheyne and J. Lemons, Annals of New York Academy of Sciences, New York, 1988.
17. Gross U., Kinne R., Schmitz H. J., and Strunz V. The Response of Bone to Surface Active Glass/Glass-Ceramics. *CRC Crit. Rev. Biocompat.* 4, p. 2, 1988.
18. Christel P., Meunier A., Dorlot J. M., Crolet J. M., Witvolet J., Sedel L., and Boutin P. M. Biomechanical Compatibility and Design of Ceramic Implants for Orthopedic surgery. p. 234 in *Bioceramics: Materials Characteristics versus in Vivo Behavior*, vol. 523, edited by P. Ducheyne and J. Lemons, Annals of New York Academy of Sciences, New York, 1988.

19. Sivakumar, M., Kumar Sampath, T. S.; Shantha, K. L.; Rao Panduranga, K. Development of Hydroxyapatite Derived from Indian Coral. *Biomaterials*, **17**, p. 1709 – 1714, 1996.
20. De Groot K. *Bioceramics of Calcium Phosphate*; p. 1- 32, CRC Press. Boca Raton, FL. 1983.
21. De Groot K., Klein C. P. A. T., Wolke J. G. C. de and Blicck-Hogervorst J. Chemistry of Calcium Phosphate Bioceramics. p. 3 – 15 in *Handbook of Bioactive Ceramics*, Vol. II, Calcium Phosphate and Hydroxylapatite Ceramics, Edited by T. Yamamuro, L. L. Hench, and J. Wilson. CRC Press. Boca Raton, FL, 1990.
22. De Groot K., and Le Geros R. Significance of Porosity and Physical Chemistry of Calcium Phosphate Ceramics. p. 268 – 77 in *Bioceramics: Materials Characteristics versus in Vivo Behavior*, vol. 523, edited by P. Ducheyne and J. Lemons, Annals of New York Academy of Sciences, New York, 1988.
23. Jarcho, M. Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **157**, p. 259, 1981.
24. Williams D. F. The Biocompatibility and Clinical Uses of Calcium Phosphate Ceramics. p. 43 – 66 in *Biocompatibility of Tissue Analogs*. Vol. II, Edited by D. F. Williams. CRC Press. Boca Raton, FL. 1985.
25. Rouquerol, J. In *Studies in Surface Science and Catalysis*; Rouquerol, J.; Rodriguez-Reinoso, F.; Sing, K. S. W. e Unger, K. K., Eds; Elsevier Science, Amsterdam, **87**, p. 1-9, 1994.

26. Felício-Fernandes G. and Laranjeira M. C. M. Calcium Phosphate Biomaterials from Marine Algae. Hydrothermal Synthesis and Characterisation. *Química Nova* 23 (4), p. 441- 446, 2000.
27. Baksh, D.; Davies, J. E. e Kim, S. Three Dimensional Matrices of Calcium Polyphosphate Support Bone Growth in Vitro and in Vivo. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 9, p. 743, 1998.
28. Ferroni, M. *Folha de São Paulo* 1999, Caderno 5, p. 14.
29. Shea, L. D.; Smiley, E.; Bonadio, J. e Mooney, D. J. DNA Delivery from Polymer Matrices for Tissue Engineering. *Nature Biotech.* 17, p. 551, 1999.
30. Ducheyne P., Hench L. L., Kagan A., Martens M., Burssens A., and Mulier J. C. The Effect of Hydroxyapatite Impregnation of Skeletal Bonding of Porous Coated Implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, 14, p. 225, 1980.
31. Hayek E. and Stadlmann W. Darstellung Von Reinem Hydroxylapatit für Adsorptionszwecke. *Angew. Chem.*, 67, p. 327, 1955.
32. Bernadi, G.; Giro, M.; Gaillard, C. Chromatography of Polypeptides and Proteins on Hydroxyapatite Columns Some New Developments. *Biochim. Biophys. Acta*, p. 278-409, 1972.
33. Main, R. K.; Wilkins, M. J.; Cole, L. J. A Modified Calcium Phosphate for Column Chromatography of Poly-Nucleotides and Proteins. *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, p. 6490-6495, 1959.
34. Spencer, M. *J. Chromatogr.* 1978, 166, 423; Spencer, M.; Neave, E. J.; Webb, N.L. *J. Chromatogr.*, 166, p. 447, 1978.

35. Muench, K. H.; Berg, P. Resolution of Aminoacyl Transfer Ribonucleic Acid by Hydroxylapatite Chromatography. *Biochem.*, **5**, p. 982-985, 1966.
36. Hayek E., Newesely H., Hassenteufel W., and Krismer B. *Monatsh.* **91**, p. 249, 1960.
37. Bett, J. A. S.; Christner, L. G.; Hall, W. K. Studies of Hydrogen Held by Solids .12. Hydroxyapatite Catalysts. *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, p. 5535, 1967.
38. Hayek E., Mullner F., and Koller K. Zur Kenntnis des Hydroxylapatits. *Monatsh Chem.*, **82**, p. 959-969, 1951.
39. Lacout J.L., Mejdoubi E. and Hamad M. Crystallisation Mechanism of Calcium Phosphate Cement for Biological Uses. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **7**, p. 371-374, 1996.
40. Cüneyt Tas A. Synthesis of Biomimetic Ca-Hydroxyapatite Powders at 37°C in Synthetic Body Fluids. *Biomaterials* **21**, p. 1429-1438, 2000.
41. Frayssinet, P. e Trouillet, J. L. Osseointegration of Macroporous Calcium-Phosphate Ceramics Having a Different Chemical-Composition. *Biomaterials*, **14**, p. 423-429, 1993.
42. Bohner, M.; Lemaître, J.; Legrand, A. P.; d'Espinose, J. B. e Belgrand, B. Synthesis, X-ray Diffraction and Solid-State P-31 Magic Angle Spinning NMR Study of Alpha-Tricalcium Orthophosphate. *J. Mater. Sci.; Mater. Med.*, **7**, p. 457-463, 1996.
43. Gão, T. J.; Tuominen, T. K.; Lindholm, T. S.; Kommonen, B. e Lindholm, T. C. Morphological and Biomechanical Difference in Healing in Segmental Tibial Defects Implanted with Biocoral (R) or Tricalcium Phosphate Cylinders. *Biomaterials*, **18**, p. 219-223, 1997.
44. Lavernia, C.; Shoenung, J. M. Calcium-Phosphate Ceramics as Bone Substitutes; *Am. Cer. Soc. Bull.*, **70**, p. 95-100, 1991.

45. Williams, D. F. In *Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials*; Williams, D., Ed.; Pergamon Press, Oxford, p. 52, 1990.
46. Videau, J. J. e Dupuis, V. Phosphates and Biomaterials; *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.*, **28**, p. 303-343, 1991.
47. Cüneyt Tas A., Korkusuz F. Timucin M., Akkas N. An Investigation of the Chemical Synthesis and High-Temperature Sintering Behavior of Calcium Hydroxyapatite (HA) and Tricalcium Phosphate (TCP) Bioceramics. *J. Materials Sci Materials in Medicine* **8** p. 91-96, 1997.
48. Le Geros, R. Z. In *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*: Meyers; São Francisco, 1991.
49. Hench L. L. Cementless Fixation; In *Biomaterials and Clinical Applications*. Edited by A. Pizzoferrato, P. G. Marchetti, A. Ravglioli, and A. J. C. Lee, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, p. 23, 1987.
50. Kokubo T. Surface Chemistry of Bioactive Glass Ceramics. *J. Non-Cryst. Solids* **120**, p. 138-151, 1990.
51. Ohtsuki C., Kokubo T. and Yamamuro T. Mechanism of HA Formation of CaO-SiO₂-P₂O₅ Glasses in Simulated Body Fluid. *J. Non-Cryst. Solids* **143**, p. 84-92, 1992.
52. Li P., Ohtsuki C., Kokubo T., Nakanishi K. and Soga N. Apatite Formation Induced by Silica Gel in Simulated Body Fluid. *J. Am. Ceram. Soc.* **75**, p. 2094-2097, 1992.
53. Neuman W. and Neuman M. The Chemical Dynamics of Bone Mineral. In: *University of Chicago Press, Chicago*, p. 34, 1958.

54. Jarcho M., Bolen C.H., Thomas M.B., Babock J., Kay J.F. and Doremus R.H. Hydroxyapatite Synthesis and Characterization in Dense Polycrystalline Form. *J. Mater. Sci.* **11**, p. 2027-2035, 1976.
55. Asada M., Miura Y., Osaka A., Oukami K. and Nakamura S. Hydroxyapatite Crystal Growth on Calcium Hydroxyapatite Ceramics. *J. Mater. Sci.* **23**, p. 3202-3205, 1988.
56. Ebrahimpour E., Johnson M., Richardson C.F. and Nancollas G.H. The Characterization of HA Precipitation. *J. Colloid. Interface Sci.* **159**, p. 158-163, 1993.
57. Simsek FA. Chemical Preparation of Calcium Hydroxyapatite in Synthetic Body Fluids at 37°C and its Coating on Titanium and Stainless Steel Strips. *MSc thesis. Middle East Technical University, Ankara, Turkey*, July 1997.
58. Zhou J., Zhang X., Chen J., Zeng S. and de Groot K. High Temperature Characteristics of Synthetic Hydroxyapatite. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **4**, p. 83-85, 1993.
59. Lazic S. Microcrystalline Hydroxyapatite Formation from Alkaline Solutions. *J. Crystal. Growth* **147**, p. 147-154, 1995.
60. Haugbert J.C., Zawacki S.J. and Nancollas G.H. The Growth of Octacalcium Phosphate on Tricalcium Phosphate. *J. Crystal Growth* **63**, p. 83-90, 1983.
61. Haugbert J.C. and Nancollas G.H. Kinetics of Crystallization of Octacalcium Phosphate. *J. Phys. Chem.* **88**, p. 2478-2481, 1983.
62. Nelson D.G.A., Salimi H. and Nancollas G.H. Octacalcium Phosphate and Apatite Overgrowths: a Crystallographic and Kinetic Study. *J. Colloid. Interface Sci.* **110**, p. 32-39, 1985.
63. Inskeep W.P. and Silvertooth J.C. Kinetics of Hydroxyapatite Precipitation at pH 7.4 to 8.4. *Geochim Chosmochim Acta* **52**, p. 1883-1893, 1988.

64. Graham S. and Brown P.W. The Low Temperature Formation of Octacalcium Phosphate. *J. Crystal. Growth* **132**, p. 215-225, 1993.
65. Alliot-Litch B., Gregoire M., Orly I. and Menanteau J. Cellular Activity of Osteoblast in the Presence of HA: an in Vitro Experiment. *Biomaterials* **12**, pp. 752-756, 1991.
66. Oguchi H., Ishikawa K., Mizoue K., Seto K. and Eguchi G. Long-term Histological Evaluation of HA Ceramics in Humans. *Biomaterials* **16**, p. 33-38, 1995.
67. Rusy A.J., Wei M., Sorrell C.C., Dickson M.R., Brandwood A. and Milthorpe B.K. Sintering Effects on the Strength of HA. *Biomaterials* **16**, p. 409-415, 1995.
68. Klein C.P.A.T., de Blicq Hogerworst J.M.A., Wolke J.G.C. and de Groot K. Studies of Solubility of Different Calcium Phosphate Ceramic Particles in Vitro. *Biomaterials* **11**, p. 509-512, 1990.
69. Yubao L., Klein C.P.A.T., Xingdong Z. and de Groot K. Formation of a Bone Apatite-like Layer on the Surface of Porous HA Ceramics. *Biomaterials* **15**, p. 835-840, 1994.
70. Li P., Kangasniemi I., de Groot K. and Kokubo T. Bone-like Hydroxyapatite Induction by a Gel-derived Titania on a Titanium Substrate. *J. Am. Ceram. Soc.* **77**, p. 1307-1312, 1994.
71. Li P., Nakanishi K., Kokubo T. and de Groot K. Induction and Morphology of HA Precipitated from Metastable Simulated Body Fluids on Sol-gel Prepared Silica. *Biomaterials* **14**, p. 963-968, 1993.
72. Li P., Kangasniemi I., de Groot K., Kokubo T. and Yli-Urpo A.U. Apatite Crystallization from Metastable Calcium Phosphate Solution on Sol-gel Prepared Silica. *J. Non-Cryst. Solids* **168**, p. 281-286, 1994.

73. Cho S.O., Nakanishi K., Kokubo T., Soga N., Ohtsuki C., Nakamura T., Kitsugi T. and Yamamuro T. Dependence of Apatite Formation on Silica gel on its Structure: Effect of Heat Treatment. *J. Am. Ceram. Soc.* 78, p. 1769-1774, 1995.
74. Kokubo T., Miyaji F., Kim H.M. and Nakamura T. Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals. *J. Am. Ceram. Soc.* 79, p. 1127-1129, 1996.
75. Kubota Naoji and Kikuchi Yasuo. *Macromolecular Complexes of Chitosan in Polysaccharides* ed. by Severian Dumitriu New York Chapter 18, p. 596, 1998.
76. Huang Chihpin & Chen Yin. Coagulation of Colloidal Particles in Water by Chitosan. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 66, p. 227-232, 1996.
77. Huang Chihpin, Chen Shuchuan and Pan Ruhsing Jill. Optimal Condition for Modification of Chitosan: A Biopolymer for Coagulation of Colloidal Particles *Wat. Res.* 34. No. 3, p. 1057-1062, 2000.
78. Nakamoto, K. *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, John Wiley and Sons, Inc., New York, p. 103, 1966.