

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA**

JULIANE BOIKO

**INFLUÊNCIA DA SECAGEM E DO TEMPO DE
ENVELHECIMENTO NA OBTENÇÃO DE
COMPOSITOS DE HIDROXIAPATITA - COLÁGENO
BOVINO**

Ponta Grossa
2009

JULIANE BOIKO

**INFLUÊNCIA DA SECAGEM E DO TEMPO DE
ENVELHECIMENTO NA OBTENÇÃO DE
COMPOSITOS DE HIDROXIAPATITA - COLÁGENO
BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada para a obtenção do título de mestre pela Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Masetto Antunes.

Co-orientador: Prof. Dr. André Vitor Chaves Andrade

Ponta Grossa
2009

TERMO DE APROVAÇÃO**JULIANE BOIKO****"INFLUÊNCIA DA SECAGEM E DO TEMPO DE ENVELHECIMENTO NA
OBTENÇÃO DE COMPOSITOS DE HIDROXIAPATITA – COLÁGENO BOVINO"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Presidente:



Prof. Dr. André Vitor Chaves de Andrade
Departamento de Física, UEPG/PR



Prof. Dr. Christiane Philippini Ferreira Borges
Departamento de Química, UEPG/PR



Prof. Dr. Fábio André dos Santos
Departamento de Odontologia, UEPG/PR

Ponta Grossa, 02 de março de 2009.

Dedicatória

*Aos meus pais, Severo e Maria, pelo seu amor, incentivo e apoio em
todos os momentos da minha vida.*

Ao meu irmão Gustavo por sempre estar ao meu lado mesmo distante.

*Ao Zaqueu, meu grande companheiro nessa jornada e na minha vida,
por estar sempre ao meu lado.*

Agradecimentos

Aos meus pais que sempre se preocuparam em investir em minha educação, devotando muito amor e confiança.

Ao meu irmão que sempre, com muito carinho colaborou em meus estudos.

Ao meu noivo, grande companheiro, que sempre está presente em todos os momentos.

A minha orientadora, professora Sandra pela orientação, confiança, incentivo e apoio no decorrer da realização deste trabalho, e pelos vínculos afetivos formados durante esses anos, que espero, perdure por muitos ainda.

Ao meu co-orientador, professor André Vitor, pela dedicação, auxílio, paciência, generosidade e confiança depositados e que tanto contribuíram para a realização deste trabalho.

À professora Chistiane Phillippini Ferreira Borges, pela amizade, e dedicação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, que tanto contribuíram para meu enriquecimento intelectual.

Aos colegas de pós-graduação Fernando Perotta, Liliam Ângelo e Rodrigo Sayka pelo auxílio prestado à realização deste trabalho.

As alunas de Iniciação Científica Simone Ferraz e Cristiane pela colaboração, auxílio e amizade.

Em especial, aos amigos que fiz, Joelma, Talita, Jussany, Cristiane, Cliciane e Fabio pelo companheirismo, apoio, e pelas horas de descontração e conversas proporcionadas.

À Universidade Jaume I, Castellon de La Plana, na Espanha pela colaboração com as análises realizadas para a elaboração desse trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada pela oportunidade de realização deste curso.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

As apatitas têm sido largamente estudadas nos últimos anos como biocerâmicas com o intuito de buscar materiais cada vez mais biocompatíveis com os tecidos biológicos. Inevitavelmente, a implantação de qualquer tipo de material em um organismo humano origina uma resposta do organismo característica que não depende somente da natureza e composição do biomaterial, mas também de fatores tão específicos como à forma, o tamanho, a geometria e as propriedades e características superficiais, com respeito aos materiais. Neste trabalho estudou-se a síntese da hidroxiapatita-colágeno bovino analisando a influência da secagem e do tempo de envelhecimento nas características morfológicas e estruturais da hidroxiapatita. A secagem foi realizada por dois métodos: estufa e liofilização. As amostras foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho, análise térmica diferencial e termogravimétrica, difratometria de raios X, distribuição do tamanho médio das partículas, área superficial específica pelo método BET e microscopia eletrônica de varredura e transmissão. As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão revelam a formação de aglomerados de cristais de tamanhos nanométricos, e com forma acicular. Pela análise de raios X verifica-se que a presença de colágeno durante a síntese não compromete a estabilidade da fase hidroxiapatita. Entretanto, observa-se a influência da presença de colágeno, da secagem e do tempo de envelhecimento nos resultados obtidos de distribuição do tamanho médio de partículas e área superficial específica. Os resultados mostram a importância do processamento nas características finais do material, sendo que no processo de liofilização e com tempo de envelhecimento de 30 dias ocorre um aumento da área superficial específica do pó, cujo o valor determinado é de 89,10 m²/g, sendo assim apresentam maior tendência em formar aglomerados do que as secas em estufa.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, colágeno, compósitos.

ABSTRACT

Apatites have been widely studied lately as bioceramics in the search for materials which are more and more biocompatible with biological tissues. Unavoidably, the implant of any kind of material in a human body originates a response from this body, characteristic which does not depend only on the nature and composition of the biomaterial, but also on factors as specific as form, size, geometry and properties and superficial characteristics, regarding these materials. This work studied the synthesis of bovine collagen-hydroxyapatite analyzing the influence of drying and ageing time on the morphologic and structural characteristics of hydroxyapatite. Drying was carried out through two methods: oven and freeze drying. Samples were characterized through spectroscopy in the infrared region, differential thermal and thermogravimetric analyses, X-ray diffractometry, particle average size distribution, specific superficial area through BET method and transmission and scanning electronic microscopy. The micrographs obtained through transmission electronic microscopy reveal the formation of crystal agglomerates of nanometric size with acicular form. However, the influence of collagen and drying methods on the results obtained from distribution of particles average size, specific superficial area and SEM was observed. By comparing drying methods, it can be said that freeze dried samples presented different characteristics among themselves, although they still present desired characteristics to obtain apatites for future applications.

Keywords: Hydroxiapatite, collagen, composites

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Cela unitária da hidroxiapatita	14
Figura 2 –	Estrutura da Hidroxiapatita ao longo do eixo <i>c</i>	21
Figura 3 –	Molécula de colágeno: molécula em tripla hélice formada pelo entrelaçamento de três cadeias alfa	23
Figura 4 –	Estrutura do colágeno em forma de triplete	25
Figura 5 –	Esquema de deposição da hidroxiapatita nos tecidos humanos	31
Figura 6 –	Efeito da quantidade e do tamanho das partículas na eficiência de empacotamento	42
Figura 7 –	Relação qualitativa existente entre densidade relativa e o arredondamento relativo para empacotamentos monodispersos aleatórios de partículas	43
Figura 8 –	Representação esquemática das formas de poros que podem ocorrer nas partículas	44
Figura 9 –	Diferentes tipos de Isotermas.	45
Figura 10–	Curva TG para a amostra HAP – 1 com envelhecimento de 1 dia e secagem em estufa (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).	50
Figura 11–	Curvas de TG / DTA para a amostra HAP – Lio – 1 com envelhecimento de 1 dia e secagem em estufa. (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).	51
Figura 12–	Curvas de TG / DTA para a amostra HAP/Col – 1 com tempo de envelhecimento de 1 dia e secagem em estufa. (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).	52
Figura 13–	Curvas de TG / DTA para a amostra HAP/Col – Lio – 1 com 1 dia de envelhecimento e liofilizada. (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).	53
Figura 14–	Curvas de TG / DTA para a amostra HAP/Col - 30 com envelhecimento de trinta dias e secagem em estufa. (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).	53
Figura 15–	Curvas de TG / DTA para a amostra HAP/Col – Lio – 30 com envelhecimento de trinta dias e liofilizada. (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).	54
Figura 16–	Espectros de IV das amostras de HAP – 1, HAP – 14, HAP – 30 com envelhecimento de 1, 14 e 30 dias respectivamente com secagem em estufa, preparadas na forma de pastilhas de KBr.	56

Figura 17–	Espectros de IV das amostras de HAP – Lio – 1, HAP – Lio – 14, HAP – Lio – 30 com envelhecimento de 1, 14 e 30 dias respectivamente liofilizadas, preparadas na forma de pastilhas de KBr	56
Figura 18 –	Espectros de IV das amostras de HAP/Col – 1, HAP/Col – 14, HAP/Col – 30 com envelhecimento de 1, 14 e 30 dias respectivamente com secagem em estufa, preparadas na forma de pastilhas de KBr.	57
Figura 19 –	Espectros de IV das amostras de HAP/Col – Lio – 1, HAP/Col – Lio – 14, HAP/Col – Lio – 30 com envelhecimento de 1, 14 e 30 dias respectivamente liofilizadas, preparadas na forma de pastilhas de KBr.	57
Figura 20 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP, com tempo de envelhecimento de 1 dia e secagem em estufa	61
Figura 21 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP tempo de envelhecimento de 1 dia e liofilizada.	62
Figura 22 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP, tempo de envelhecimento de 14 dias e secagem em estufa	62
Figura 23 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP, tempo de envelhecimento de 14 dias e liofilizada.	63
Figura 24–	Difratograma de raios X da amostra de HAP, tempo de envelhecimento de 30 dias e secagem em estufa.	63
Figura 25 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP, tempo de envelhecimento de 30 dias e liofilizada.	64
Figura 26 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP/Col, tempo de envelhecimento de um dia e secagem em estufa.	64
Figura 27 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP/Col, tempo de envelhecimento de um dia e liofilizada.	65
Figura 28 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP/Col, tempo de envelhecimento de quatorze dias e secagem em estufa.	65
Figura 29 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP/Col, tempo de envelhecimento de quatorze dias e liofilizada.	66
Figura 30 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP/Col, tempo de envelhecimento de trinta dias e secagem em estufa.	66
Figura 31 –	Difratograma de raios X da amostra de HAP/Col, tempo de envelhecimento de trinta dias e liofilizada.	67
Figura 32 –	Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP com tempo de envelhecimento de um dia e com secagem em	69

- estufa; (b) HAP com tempo de envelhecimento de um dia e liofilizada.
- Figura 33 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP/Col com tempo de envelhecimento de um dia e com secagem em estufa; (b) HAP/Col com tempo de envelhecimento de um dia e liofilizada. 69
- Figura 34 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP com tempo de envelhecimento de quatorze dias e com secagem em estufa; (b) HAP com tempo de envelhecimento de quatorze dias e liofilizada. 69
- Figura 35 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP/Col com tempo de envelhecimento de quatorze dias e com secagem em estufa; (b) HAP/Col com tempo de envelhecimento de quatorze dias e liofilizada. 70
- Figura 36 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP com tempo de envelhecimento de trinta dias e com secagem em estufa; (b) HAP com tempo de envelhecimento de trinta dias e liofilizada. 70
- Figura 37 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP/Col com tempo de envelhecimento de trinta dias e com secagem em estufa; (b) HAP/Col com tempo de envelhecimento de trinta dias e liofilizada. 71
- Figura 38 – Micrografias obtidas por MEV da HAP com envelhecimento de um dia: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x. (d) liofilizada com aumento de 2400x. 73
- Figura 39– Micrografias obtidas por MEV da HAP/Col com envelhecimento de um dia: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x e (d) liofilizada com aumento de 2400x. 74
- Figura 40 – Micrografias obtidas por MEV da HAP com envelhecimento de quatorze dias: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x. (d) liofilizada com aumento de 1200x. 74
- Figura 41 – Micrografias obtidas por MEV da HAP/Col com envelhecimento de quatorze dias: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x. (d) liofilizada com aumento de 1200x. 75
- Figura 42 – Micrografias obtidas por MEV da HAP com envelhecimento de trinta dias: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x. (d) liofilizada com aumento de 1200x. 76

- Figura 43 – Micrografias obtidas por MEV da HAP/Col com envelhecimento de trinta dias: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x. (d) liofilizada com aumento de 1200x. 76
- Figura 44 – Micrografias obtidas por MEV do colágeno: (a) com aumento de 200x. (b) com aumento de 500x. 77
- Figura 45 – Micrografias obtidas das amostras de HAP com envelhecimento de um dia: (a) HAP – 1 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP – 1 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP – 1 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP – 1 (Liofilizada) com aumento de 250.000x 82
- Figura 46 – Micrografias obtidas das amostras de HAP/Col com envelhecimento de um dia: (a) HAP/Col – 1 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP/Col – 1 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP/Col – 1 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP/Col – 1 (Liofilizada) com aumento de 250.000x. 83
- Figura 47 – Micrografias obtidas das amostras de HAP com envelhecimento de quatorze dias: (a) HAP – 14 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP – 14 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP – 14 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP – 14 (Liofilizada) com aumento de 250.000x. 84
- Figura 48 – Micrografias obtidas das amostras de HAP/Col com envelhecimento de quatorze dias: (a) HAP/Col – 14 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP/Col – 14 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP/Col – 14 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP/Col – 14 (Liofilizada) com aumento de 250.000x. 85
- Figura 49 – Micrografias obtidas das amostras de HAP com envelhecimento de trinta dias: (a) HAP – 30 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP – 30 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP – 30 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP – 30 (Liofilizada) com aumento de 250.000x. 86
- Figura 50 – Micrografias obtidas das amostras de HAP com envelhecimento de trinta dias: (a) HAP/Col – 30 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP/Col – 30 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP/Col – 30 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP/Col – 30 (Liofilizada) com aumento de 250.000x. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação das biocerâmicas	07
Tabela 2 –	Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos e suas relações Ca/P	10
Tabela 3 –	Distribuição e Tipos de Colágeno	24
Tabela 4 –	Algumas aplicações biomédicas do colágeno	26
Tabela 5 –	Composição dos aminoácidos do colágeno	28
Tabela 6 –	Bandas de IV observadas nos pós de hidroxiapatita obtidos	58
Tabela 7 –	Resumo das distribuições granulométricas dos pós	71
Tabela 8 –	Razão molar Ca/P das amostras de HAP sintéticas e HAP/Col secas em estufa e liofilizadas.	78
Tabela 9 –	Área Superficial Especifica pelo metodo de BET das amostras de HAP e HAP-Lio.	79
Tabela 10 –	Área Superficial Especifica pelo método de BET das amostras de HAP/Col e HAP/Col –Lio.	80

LISTA DE SIGLAS

BET	Isoterma de Adsorção desenvolvida por Brunauer, Emmet e Teller
Ca-dHAP	Hidroxiapatita deficiente em Cálcio
CHAP – A	Hidroxiapatita Carbonatada tipo A
CHAP –AB	Hidroxiapatita Carbonatada tipo AB
CHAP – B	Hidroxiapatita Carbonatada tipo B
CPPD	Pirofosfato de cálcio dihidratado
DCPD	Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria de varredura diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X
EGA	Análise dos gases desprendidos
Gly	Glicina
HAP	Hidroxiapatita
HAP/Col	HAP/Col: Compósito de Hidroxiapatita e Colágeno
HAP – Lio	Amostra de Hidroxiapatita Liofilizada
Hypro	Hidroxiprolina
IV	Espectroscopia na região do Infravermelho
JCPDS	Joint Committee of Powder Diffraction Standards
JHS	Indústria de Materiais para a Medicina e Odontologia
LIMAC- UEPG	Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos da Universidade
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

OCP	Fosfato de octacálcio
Pro	Prolina
TCP	Fosfato de cálcio
TG	Termogravimetria
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFPR	Universidade Federal do Paraná
β -TCP	Beta- Fosfato tricálcio

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	01
2.	REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1	BIOMATERIAIS	05
2.2	BIOCERAMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO	08
2.3	HIDROXIAPATITA	11
2.4	FATORES QUE INTERFEREM NA MICROESTRUTURA DA HIDROXIAPATITA	14
2.5	HIDROXIAPATITA CARBONATA	19
2.6	COLAGENO NO TECIDO BIOLÓGICO	21
2.7	TECIDO ÓSSEO	28
2.8	COMPOSITOS DE FOSFATOS DE CÁLCIO E COLÁGENO	31
3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	34
3.1	OBTENÇÃO DOS PÓS DE HIDROXIAPATITA E COLÁGENO	34
3.1.1	Reagentes e reação	35
3.1.2	Envelhecimento	36
3.1.3	Secagem	36
3.1.3.1	Estufa	36
3.1.3.2	Liofilização	36
3.2	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	37
3.2.1	Análise Térmica	38
3.2.2	Difração de Raios X	39
3.2.3	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	40
3.2.4	Análise Granulométrica do Tamanho de Partículas	41

3.2.5	Avaliação da área superficial específica pelo método BET	43
3.2.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão	44
3.2.7	Microscopia Eletrônica de Varredura	45
3.2.8	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
4.1	ANÁLISE TÉRMICA	47
4.2	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO	53
4.3	DIFRAÇÃO DE RAIOS X	57
4.4	ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DO TAMANHO DE PARTÍCULAS	66
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E EDS DOS PÓS	70
4.6	ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA – BET	77
4.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	78
5.	CONCLUSÕES	86
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	88
7.	REFERÊNCIAS	89
8.	ANEXOS	97

1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento de novas tecnologias que proporcionam uma melhoria na qualidade e expectativa de vida das pessoas, teve-se o aumento em grande número de pesquisas sobre a utilização de materiais para restaurar ou substituir partes danificadas dos tecidos, esses materiais são denominados de biomateriais¹. Há várias definições para o termo biomaterial; uma dessas definições aponta como sendo um material com uso para substituições totais ou em parte de uma função do corpo de maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente confiável.² Eles podem ser classificados em sintéticos que abrangem as cerâmicas, metais e polímeros sintéticos; em naturais como o colágeno, seda, queratina, polissacarídeos e tecidos naturais; e em biomateriais compósitos, que são compostos por mais de um tipo de material.³ São tolerados de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos.^{1,4}

Um aspecto de enorme importância sobre as possibilidades de aplicação dos biomateriais é a necessidade de que tanto os componentes, como os produtos que se regeneram em processos biodegradativos dependem da biocompatibilidade. A biocompatibilidade é uma propriedade inerente a qualquer tipo de materiais para qualquer aplicação como: odontológicas, otorrinolaringologia, cicatrização, cirurgia ortopédica, entre outras. Esta propriedade se define como a capacidade de um determinado material para dar uma resposta apropriada em uma aplicação específica. Com respeito às características dos biomateriais, o fator mais importante se modula na resposta do organismo humano, sendo que essa resposta está associada, também, a fatores como: composição, forma, tamanho, geometria e as propriedades superficiais do biomaterial.⁵

Dentre estes materiais, podemos citar as cerâmicas de fosfato de cálcio. As cerâmicas compostas de cálcio e fosfato, hidroxiapatita e fosfato tricálcio, têm sido utilizados em várias condições clínicas nas quais é necessário o emprego de enxertos aloplásticos que apresentem

biocompatibilidade com o tecido ósseo. Tem sido mostrado que produtos caracterizados como sendo hidroxiapatita pura apresentam biocompatibilidade diferente de produtos formados pela mistura de hidroxiapatita e fosfato tricálcio.³ Resultados preliminares utilizando cultura de células sugerem que a presença de maior porcentagem de microporos interfere de maneira negativa com a biocompatibilidade da hidroxiapatita. Tais evidências sugerem que o comportamento biológico destas cerâmicas é dependente de vários fatores, dentre eles a composição química e as características morfológicas e estruturais do produto, justificando a necessidade de se investigar a influência de várias etapas do processo de obtenção da hidroxiapatita sobre o produto final. Em relação a composição química para melhoria da biocompatibilidade e da osteocondução podemos obter compósitos ou nanocompósitos do tipo hidroxiapatita – colágeno.⁵

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano, representando 30% do total das proteínas do organismo. Essa família das proteínas do colágeno inclui moléculas geneticamente distintas, produzidas por diversos tipos celulares e podem ser distinguidas pela composição bioquímica, características morfológicas, distribuição, funções e patologia. Existem mais de 20 espécies diferentes de colágeno, destas somente 14 são bem conhecidas, sendo o colágeno do tipo I o mais abundante.^{3,6,7}

As aplicações do colágeno devem-se principalmente a algumas propriedades importantes no desenvolvimento de biomateriais como baixa resposta imunológica; baixo índice de alergenicidade; biodegradabilidade (susceptível à ação de collagenases e outras substâncias celulares). Também podemos destacar que o material pode ser processado de várias formas como folhas, tubos, esponjas, pós, soluções, dispersões e injetáveis.^{3,7}

A formação de compósitos de hidroxiapatita e colágeno possuem grande importância para a sua utilização como biomaterial devido aos seus componentes individuais possuírem características essenciais, como por exemplo, o colágeno promove cicatrização de fraturas e

regeneração óssea e é também um agente hemostático e a hidroxiapatita tem sido amplamente utilizada na preparação de compósitos devido à sua similaridade com o tecido calcificado do osso humano. Porém, apresenta fragilidade característica das cerâmicas, portanto, sua combinação com colágeno torna seu uso como biomaterial mais vantajoso.⁸

Sabe-se que a estrutura cristalina da hidroxiapatita (HAP) é conhecida por permitir substituições aniônicas e catiônicas mantendo sua eletroneutralidade. A substituição desses íons causa alterações notáveis em sua estrutura. Uma dessas substituições pode ser a inserção do íon carbonato (CO_3^{2-}) nos sítios dos íons PO_4^{3-} e OH^- .^{9,10}

Além de cálcio, fosfato e íons hidroxila, o componente inorgânico de tecidos ósseos contém uma proporção significativa de íons de carbonato, embora a quantidade seja pequena, estudos demonstraram que estes íons podem desempenhar um papel significativo na bioquímica desses tecidos.¹¹

A microestrutura e propriedades resultantes da suspensão de HAP têm grande variação com os parâmetros da síntese, dessa maneira é importante o controle rígido durante a síntese do material. Os valores de pH do sistema durante e após a reação, a temperatura e a pureza dos reagentes de partida, e o método de síntese adotado são de grande importância para a formação de HAP. As propriedades da síntese dos pós de HAP, como a cristalinidade, morfologia e tamanho ou área das partículas afetará efetivamente a sua aplicação como um biomaterial.^{6,12}

Segundo o que diz Rigo et. al, o tempo de envelhecimento da reação é uma das variáveis críticas para a obtenção de pureza e características cristalográficas do um material. Embora seja de grande importância para o processo, há uma grande dificuldade em encontrar artigos relacionando o tempo de envelhecimento utilizado no processo. Tratando-se deste parâmetro da reação para a obtenção dos compósitos de hidroxiapatita, ainda são pouco estudados.¹³

O tempo de envelhecimento utilizado para as amostras de hidroxiapatita e colágeno foram de 1, 14 e 30 dias, com a realização de análises de caracterização. Também foram obtidas amostras com tempos de envelhecimento de 7, 21 e 60 dias porem não foram caracterizadas e utilizadas neste trabalho.

As amostras foram separadas em dois grupos, onde foram diferenciados pelo método de secagem adotado, estufa e liofilização. Para o primeiro grupo a secagem utilizada foi por estufa a uma temperatura de 90 °C a 100 °C, e o segundo grupo foi seco por liofilização onde ocorre um processo de sublimação da água contida nas amostras.

O objetivo geral deste trabalho de mestrado foi propor e avaliar uma rota de síntese para a produção de nanocompósitos de HAP e colágeno bovino, obtidos por reação de precipitação associada diretamente ao colágeno, com composição química e cristalinidade similar a uma apatita biológica.

Com este trabalho buscou-se obter informações mais específicas, realizando um estudo das condições de síntese e processamento na obtenção de nanocompósitos de hidroxiapatita e colágeno bovino. Desta forma os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Observar as alterações provenientes dos métodos de secagem por estufa e liofilização.
- Analisar as possíveis mudanças ocorridas decorrentes dos diferentes tempos de envelhecimento adotados durante o processo que foram de um, quatorze e trinta dias.
- Verificar a morfologia e tamanho das partículas obtidas.
- Verificar o efeito da adição de colágeno na hidroxiapatita.
- Foram avaliadas as possíveis alterações provenientes de dois diferentes métodos de secagem: estufa e liofilização e, dos diferentes tempos de envelhecimento.

Portanto neste trabalho foi realizado um estudo das condições de síntese e processamento na obtenção de nanocompósitos de hidroxiapatita e colágeno bovino. Foram avaliadas as alterações provenientes de dois métodos de secagem: estufa e liofilização e, de diferentes tempos de envelhecimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMATERIAIS

O aumento da expectativa de vida do homem, e a consciência sobre os problemas de estrutura óssea, decorrentes de processos inflamatórios, acidentes ou osteoporose, tem levado pesquisadores, principalmente dos países mais desenvolvidos, à procura de materiais que possam substituir de forma apropriada os ossos danificados sendo a introdução de materiais no corpo humano uma das formas mais usuais de se restaurar ou substituir partes ou a totalidade de tecidos não-produtivos, e fruto de traumas ou tumores.^{1,14,15.}

Durante muito tempo a utilização de materiais na recuperação de órgãos ou tecidos ocorreu de maneira empírica e pouca atenção era dada à investigação e compreensão das propriedades biológicas dos materiais empregados antes de se iniciar a sua utilização clínica. Informações sobre a eficiência e utilidade desses materiais eram obtidas à medida que se iniciava o seu uso.⁴

A utilização de materiais para o reparo de tecidos vivos tem aumentado consideravelmente nas últimas três décadas, graças ao desenvolvimento de novos materiais e a uma melhor compreensão dos mecanismos de sua interação com os organismos vivos. Relatos do uso de enxertos ósseos com sucesso datam do início do século XIX, contudo esses enxertos limitavam-se ao osso autógeno e algumas tentativas de utilizar osso homogêneo ou xenógeno.^{3,4.}

Os materiais utilizados na substituição de ossos enquadram-se em uma classe denominada de biomateriais, devem apresentar propriedades físicas e biológicas com os tecidos vivos hospedeiros, estimulando uma resposta adequada dos mesmos. Tais propriedades caracterizam a biocompatibilidade, provocando reações que favoreçam o desenvolvimento de processos como: fixação de implantes, regeneração de tecidos anfitriões

ou biodegradação da matéria, sendo que grande parte dos materiais bioativos são cerâmicas.^{15,16}

Os biomateriais são usados de maneira a interagir com sistemas biológicos, servindo por um período longo com a mínima falha. Eles devem ser inertes, degradáveis, absorvíveis e favorecerem o crescimento ósseo por condução e, se possível, por indução.^{3, 17,18}

Essas características dependem das propriedades físicas e químicas do material, que devem ser compatíveis com as reações fisiológicas do osso, e os tipos de interação entre tecido-implante são fundamentalmente dependentes do tipo de material e podem ser reunidos nos seguintes grupos: inertes, porosos, bioativos e reabsorvíveis, como podem ser observados na tabela 1. As propriedades químicas e a morfologia estrutural da superfície influenciará severamente na interação entre o implante e o ambiente biológico e conseqüentemente na sua performance como implante.^{1, 3, 16, 17, 19}

Tabela 1 – Classificação das biocerâmicas¹

Tipo de biocerâmica	Interações com os tecidos	Exemplos
Inertes	Não há interações químicas e nem biológicas	Alumina
Porosas	Ocorre o crescimento interno dos tecidos através dos poros	Aluminatos e hidroxiapatita porosos
Bioativas	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, hidroxiapatita e vitro-cerâmicas
Reabsorvíveis	As cerâmicas são degradadas e substituídas pelos tecidos	Gesso e fosfato tricálcico

Algumas características são fundamentais para se utilizar materiais em organismos vivos:

- ser biocompatível, isto é, não induzir a respostas teciduais ou imunológicas;

- não ser tóxico nem carcinogênico;
- ser quimicamente estável;
- ter estabilidade mecânica adequada;
- ter peso, densidade e forma adequada;
- ser relativamente barato, reproduzível e de fácil fabricação;
- ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função para a qual foi projetado com a máxima eficiência.³

Sabe-se hoje que não existem materiais inertes, pois sempre estão ocorrendo algum tipo de interação entre o tecido receptor e o material implantado, tal conhecimento é crucial no controle da resposta biológica a um implante e é possível através de modificações na topografia da superfície do material implantado, tal como rugosidade e relevo, tentar direcionar a resposta biológica do tecido receptor.⁴

Mais recentemente, o desenvolvimento de materiais considerados bioativos e biodegradáveis vem sendo enfatizado já que, além de substituir tecidos traumatizados, estes materiais também podem propiciar a recuperação do tecido danificado através da atuação em metabolismos intra e extracelulares pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento.¹⁴

A aplicação dos biomateriais ocorre em diversos campos da medicina, como por exemplo: em próteses ortopédicas ou cirurgias cardiovasculares, órgãos artificiais, materiais para reparação de tecidos e sistemas de liberação de fármacos. A utilização de biomateriais no reparo de partes danificadas do tecido ósseo tem revolucionado a ortopedia e a odontologia atuais. O emprego de substâncias químicas que facilitem a reparação óssea, através da osteogênese, osteoindução e osteocondução, é alvo de pesquisas constantes.^{3, 16, 17}

E em se tratando de materiais biodegradáveis, um dos grandes objetivos de bioengenheiros e cientistas é a produção de biomateriais capazes de substituir tecidos

danificados por certo período de tempo durante o qual o processo de reparo natural da área afetada estaria sendo promovido.^{3, 16.}

Em termos de biomateriais, uma análise da estrutura dos tecidos que constituem o corpo humano permite mostrar que os mesmos são tipicamente compósitos, formados por dois ou mais componentes que, em conjunto, são responsáveis pelas propriedades finais do tecido, e a partir disso, sugere-se que a substituição de tecidos vivos por materiais sintéticos pode estar ligada ao desenvolvimento de compósitos especiais capazes de reproduzir as propriedades dos tecidos humanos. Uma alternativa para o cumprimento simultâneo destes requisitos é a combinação das propriedades mecânicas e físicas dos materiais bioinertes ou biotoleráveis com as propriedades biológicas das biocerâmicas.^{16,20.}

Tal tipo de organização estrutural em materiais sintéticos se assemelha a estrutura presente em alguns tecidos vivos, como o osso, onde o constituinte inorgânico, que é basicamente hidroxiapatita e entidades orgânicas como o colágeno, se interagem em diminuta escala, formando nanofases ligadas entre si por ligações químicas de primeira ordem, isso ocorre quando um material bioativo é implantado no corpo humano, e uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorrem na interface tecido-implante, e que resultam em uma forte interação interfacial associada à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada na superfície do implante.^{14,16}

Dentre esses fatores, destaca-se o fraco desempenho dos materiais utilizados atualmente que são projetados para executarem suas funções por um período máximo de 10 anos, e com o aumento do tempo de vida médio da população, torna-se necessário o desenvolvimento de biomateriais com propriedades superiores e capazes de cumprir suas atividades por tempos mais prolongados.¹⁴

2.2 BIOCERAMICAS DE FOSFATOS DE CÁLCIO

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas por apresentarem biocompatibilidade, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações e aparente habilidade em interagir com o tecido hospedeiro, seu uso tem se estendido desde o emprego isolado do material até outras formas de utilização, como em revestimentos de próteses metálicas ou associadas a materiais poliméricos, tais como o colágeno. Tais vantagens podem ser explicadas pela natureza química destes materiais que por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluído biológico e a cerâmica.^{1,5}

Em geral, os fosfatos de cálcio ocorrem em calcificações normais e patológicas, o que tem despertado um interesse significativo no uso destes compostos como materiais de partida para obtenção de biomateriais. Uma forma usual de classificação dos diversos fosfatos de cálcio pode ser através da razão molar Ca/P dos precursores da síntese. Desta forma, vários fosfatos de cálcio que possuem uma razão variando de 0,5 a 2,0 podem ser sintetizados pela precipitação a partir de soluções contendo íons cálcio e fosfato, sob condições alcalinas ou ácidas. A tabela 2 relaciona os principais fosfatos de cálcio, suas ocorrências no sistema biológico e suas relações Ca/P.^{1,15, 21.}

Tabela 2 – Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos e suas relações Ca/P¹⁵

Nome do composto	Fórmula química	Ocorrências	Ca/P
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Ossos decompostos, cálculo dentário	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Depósitos de pseudo-gotas de fluídos	1,0
Fosfato de octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dentário e urinário	1,33
Fosfato de cálcio (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Cálculo dentário e urinário, cáries dentárias, pedras salivares, calcificação de tecidos	1,5
Hidroxiapatita (HAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário e urinário, pedras, calcificação do tecido	1,67

A utilização de cerâmicas como biomateriais foi relatada pela primeira vez com a utilização sulfato de cálcio ou gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$) 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 sua utilização como implantes de biocerâmicas.¹

A década de 70 marcou o início do uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que possibilitam a sua classificação como biocerâmicas, e a primeira com uso muito difundido nesse período foi a alumina densa ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), que se apresenta como bioinerte.^{1, 22}

A alumina densa vem sendo utilizada ainda com frequência em próteses ortopédicas que substituam ossos ou parte deles, submetidos a esforços elevados, na sua atividade funcional, devido a sua boa biocompatibilidade e elevada resistência mecânica.^{1, 22.}

As cerâmicas podem ser produzidas por uma série complexa e demorada de reações de síntese utilizando principalmente, hidróxido de cálcio e ácido fosfórico. Ao final dessas reações de síntese, obtêm-se as cerâmicas na forma de um pó, isto é, constituídas por um aglomerado de partículas em simples justaposição, mantidas juntas por ligações muito fracas.²³

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 o Plasma Spray, que permitem aliar as vantagens intrínsecas das biocerâmicas com resistência do metal.¹

A dimensão dos poros de um biomaterial pode favorecer o crescimento ou não do osso através do material, poros maiores que 100 μm favorecem o crescimento do osso através do material, de maneira similar ao sistema haversiano do osso humano, beneficiando a

osteocondução na formação do osso novo e sua aplicação em uma implantação óssea. Este tamanho de poro define uma porosidade ótima as biocerâmicas e está relacionada à necessidade de fornecer um suprimento sanguíneo ao tecido conectivo em crescimento, os quais permitem o desenvolvimento de um sistema de vasos capilares entremeado com a cerâmica porosa. E em se tratando de microporos, uma maior porcentagem de poros menores que 10 μm interferem de maneira negativa com a biocompatibilidade da hidroxiapatita.^{1,24,25.}

Para a 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-se com a liberação de oxigênio gasoso formando poros. No caso de cerâmicas de fosfato de cálcio, alternativamente pode-se proceder à troca hidrotérmica do íon carbonato do carbonato de cálcio por íons fosfato, processo de formação dos corais marinhos que resultam em “replicas de corais”, que apresentam naturalmente a porosidade adequada.¹

2.3 HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita (HAP) ocupa posição de destaque entre os biomateriais, por sua larga aplicação no campo da medicina e da odontologia, como um substituto ósseo e dentário em implantes. Sua fórmula estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67. Das fases de apatitas conhecidas, a HAP é a fase mais estável termodinamicamente em meio fisiológico.^{15, 20}

As propriedades biológicas da hidroxiapatita sintética são bem documentadas na literatura, como a bioatividade e biocompatibilidade, e recebe uma aceitação especial como substituto ósseo. Sendo que já foi utilizada na correção de defeitos ósseos no homem e em

várias espécies animais, com resultados satisfatórios o suficiente para ser indicada como alternativa para os enxertos ósseos em rotinas clínica.^{17, 25.}

O uso da HAP para finalidades clínicas se deve primeiramente à alta biocompatibilidade e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro (osteointegração), favorecendo o crescimento do osso sobre o material ou entre ele (osteoidução), sendo sua composição química similar à dos ossos e dentes. Apresenta ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas inflamatórias ou a corpos estranhos, estas características somadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas, fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para a ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos. Por outro lado, é limitado devido a sua lenta biodegradação. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação.^{1,15,21}

Estudos indicam que as propriedades da HAP e a reatividade de sua superfície são fortemente dependentes das condições de síntese empregadas, o que determina sua composição e microestrutura, e é vantajosa por causa de sua composição uniforme, alta biocompatibilidade, segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica).^{17,26,27.}

O crescimento da HAP, tanto no meio biológico quanto em soluções aquosas, ocorre em meio contendo, além de íons cálcio e fósforo, elementos-traços essenciais tais como: Mg^{2+} , HCO^{3-} , K^{+} e Na^{+} .²⁰

É importante salientar que o potencial de aplicação tecnológica da HAP não se restringe à medicina. Na área de controle ambiental, o material é proposto como absorvente de metais pesados em rejeitos industriais e em águas poluídas devido a sua capacidade em remover cátions metálicos, como catalisador na decomposição de compostos organoclorados poluentes, provenientes da indústria metalúrgica e da incineração de lixo industrial. Na

catálise industrial, a HAP cerâmica aparece como uma base sólida capaz de catalisar a decomposição de álcoois, assim como a oxidação do metano.^{15, 26}

A estrutura da hidroxiapatita é formada por grupos fosfatos, onde o fósforo se liga com o oxigênio, e grupos hidroxila, esses grupos, juntamente com o cálcio, distribuem-se espacialmente segundo um sistema hexagonal, pertencente ao grupo espacial $P6_3/m$ e dimensões de cela unitária $a=c=9,42 \text{ \AA}$ e $b= 6,88 \text{ \AA}$, conforme a figura 1. Deformações na rede são causadas pelo deslocamento das hidroxilas formando a estrutura monoclínica da hidroxiapatita, um arranjo mais fechado, com grupo espacial $P2_1/b$.^{15, 27}

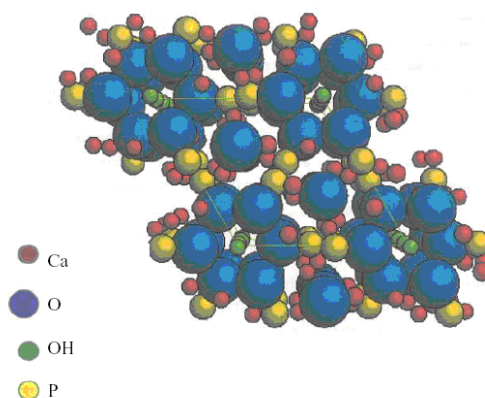


Figura 1 – Cela unitária da hidroxiapatita.²⁷

Uma das características estruturais interessantes da HAP, é que ela permite que os grupos hidroxila (OH^-) sejam retirados com relativa facilidade, gerando canais vazios entre os hexágonos formados pelos íons de cálcio, por onde podem conduzir para dentro da estrutura do material cerâmico, outros íons e moléculas. A estrutura dos fosfatos cerâmicos permite aos íons de cálcio serem substituídos por uma grande variedade de metais, como chumbo (Pb^{2+}), cádmio (Cd^{2+}), cobre (Cu^{2+}), zinco (Zn^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}), cobalto (Co^{2+}), ferro (Fe^{2+}), entre essas substituições iônicas podemos destacar as ocorridas pelo grupo carbonato (CO_3^{2-}). Essas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da hidroxiapatita.^{15, 27, 28, 29.}

Outra característica da HAP é sua capacidade de adsorção, podendo fixar moléculas de outra substância em sua superfície. Essa propriedade possibilita o seu uso em implantes, suporte para antibióticos e drogas anticancerígenas, e pode ser empregada na liberação controlada de medicamentos em tratamentos prolongados de infecções e doenças ósseas.²⁷

2.4 FATORES QUE INTERFEREM NA MICROESTRUTURA DA HIDROXIAPATITA

Há um grande número de relatos na literatura a respeito da produção e síntese da hidroxiapatita enfatizando as variações no comportamento e propriedades do material de acordo com o método utilizado. Com a evolução das pesquisas, tornou-se claro que apenas imitando a composição dos ossos não é suficiente para obter materiais com composições e propriedades semelhantes a do osso natural.³⁰

Segundo Afshar et al (2003), para se obter HAP totalmente pura é importante ter um controle rígido da atmosfera durante a síntese. Alguns parâmetros como, natureza e composição do material de partida, influência do CO_3^{2-} na síntese, controle do pH, tempo de envelhecimento, razão de adição do ácido, razão Ca/P, temperatura da solução, e meio na qual a reação está sendo processada, precisam ser sempre controlados, sendo que complicações com a maioria dos métodos convencionais de precipitação devem-se a dificuldade em controlar esses fatores, o que podem conduzir a ligeiras diferenças na estequiometria, cristalinidade e morfologia do material.^{15, 31,32,33}

A microestrutura e propriedades resultantes da suspensão de HAP têm grande variação com os parâmetros da síntese. Os valores de pH do sistema durante e após a reação, a temperatura e a pureza dos reagentes de partida, e a síntese propriamente dita são de grande importância para a formação de HAP. As propriedades da síntese dos pós de HAP, como a

cristalinidade, morfologia e tamanho ou área das partículas afetará efetivamente a sua aplicação como um biomaterial.¹²

A hidroxiapatita sintética pode ser produzida por uma variedade de precursores e por diferentes processos incluindo precipitação, sol-gel e processamento hidrotérmico.^{31,34}

Os pós-cerâmicos podem ser obtidos por via seca ou úmida. O processo por via seca chama atenção, pela alta reprodutividade e o baixo custo, e o processo por via úmida destaca-se por sua relativa simplicidade e baixo custo, além de permitir a obtenção de um biomaterial homogêneo, reativo e de composição estequiométrica melhor definida, e ainda possibilita um controle nas condições de síntese.^{35,36,37}

Os processos por via seca resultam em pós-cerâmicos muito finos e homogêneos, enquanto que os processos por via úmida envolvem a preparação de uma solução homogênea de sais contendo um dos íons de interesse e a sua mistura com um agente precipitante, geralmente uma solução contendo o outro íon de interesse. A hidroxiapatita precipitada por via úmida possui características similares às do tecido ósseo e dentário, diferente da hidroxiapatita sintetizada a altas temperaturas.^{15,35}

A síntese de fosfatos de cálcio via precipitação química apresenta vantagens quando comparada aos métodos tradicionais de produção de hidroxiapatita, devido ao seu baixo custo e simplicidade, no entanto a maioria dos procedimentos sintéticos apresenta a formação de produtos não estequiométricos e mistura de fases. Os processos de precipitação consistem na adição de grupos fosfatos a suspensões que contenham íons cálcio, podendo partir de diferentes reagentes. Dependendo do processo de fabricação, as propriedades da hidroxiapatita apresentam características diferentes. Quando sintetizadas em altas temperaturas, apresentam boa cristalinidade e cristais grandes. Quando sintetizadas em baixas temperaturas, apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos.¹³

O processo sol-gel é um método que permite uma mistura em nível molecular dos íons cálcio e fósforo que é capaz de melhorar a homogeneidade química e física resultando em uma granulação mais fina. A escolha dos precursores e solventes comuns para a obtenção do sol deve sempre utilizar reagentes mais reativos que em geral são os alcóxidos dos respectivos cátions e ânions que devem compor a fase inorgânica final desejada.⁵

A síntese pelo processo hidrotérmico consiste na obtenção de um composto através da reação de materiais precursores na presença de uma solução hidrotérmica. Nesse processo pode-se controlar a estrutura cristalina através da temperatura, do tempo e da pressão de processamento. Essa síntese é realizada em temperaturas entre 275 °C e 375 °C, sob pressão de vapor de 12000 psi.³⁸

A hidroxiapatita com razão Ca/P equivalente a 1,667 com composição estequiométrica, tem sido a mais estudada para finalidades clínicas, por ser o principal componente presente na fase mineral dos ossos.³⁵

Segundo Raynaud et al, a síntese está condicionada a influenciar na composição dos pós. Ele relaciona quatro casos diferentes que dependem da relação de Ca/P do precipitado. O primeiro caso fala da razão Ca/P entre 1,50 e 1,667, valores que correspondem para a formulação química de uma hidroxiapatita deficiente em cálcio (Ca-dHAP). Com estas condições experimentais era possível obter uma boa reprodutibilidade, sendo que seus pós poderiam ser processados com uma divergência relativa de Ca/P estimada e inferior a 1%, com um pH constante em 7 e com o aumento da temperatura. Amostras sintetizadas com Ca/P iguais a 1,50 , são obtidas com composição correspondente a apatita tricálcio fosfato $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$, mas sua obtenção totalmente pura exige um controle muito rígido dos parâmetros da síntese e de difícil obtenção. Amostras que foram obtidas com Ca/P iguais a 1,667 , valores da HAP estequiométrica podem ser sintetizadas com uma alta reprodutibilidade e precisão. Este fato pode ser explicado porque sua composição pode ser

obtida dentro de uma grande variedade de parâmetros de síntese. O pH deve ser básico e com uma temperatura acima de 90 °C, e os valores dos reagentes iniciais devem ser fixos para obter essa razão. Amostras com Ca/P maiores que 1,667 são obtidas em condições de síntese semelhantes às usadas para a HAP estequiométrica quando as relações dos reagentes iniciais ultrapassarem 1,667.^{37,39}

A estabilidade térmica da variedade de amostras de HAP preparadas por diferentes métodos úmido-químicos tem sido estudada. As sínteses a altas temperaturas envolvem normalmente reações no estado sólido, e conduzem a apatitas com alto grau de pureza e cristalinidade, porém com pequenas áreas específicas. As sínteses a baixas temperaturas usam técnicas tradicionais de co-precipitação, em solução aquosa, hidrólise e envelhecimento de precursores. Os resultados mostram que a estabilidade química da hidroxiapatita depende intrinsecamente da estequiometria e estrutura do cristal, sendo que a elevada temperatura de decomposição implica na boa estabilidade térmica da HAP.^{15,26.}

Segundo Raynaud et al, aquecendo as amostras em faixas de temperaturas diferentes pode-se observar a decomposição do material, quando aquecidas em faixas acima de 700°C observa-se a decomposição das amostras em uma mistura bifásica de HAP e β -TCP e acima de 750°C os picos de difração da HAP desaparecem por completo.^{11,40}

Segundo Rodriguez et al., quando as reações de síntese realizam-se em temperaturas próximas a 90 °C, obtêm-se um produto com razão Ca/P de 1,67. Em temperaturas de 25-37°C são obtidas amostras na escala do osso humano, enquanto que quando sinterizadas a 90°C são similares ao esmalte do dente. Segundo Chen e Tien, os compósitos de hidroxiapatita e colágeno em temperatura de 37 a 40°C possuem uma semelhança maior com os compósitos obtidos naturalmente.^{41,42}

A síntese das amostras de HAP são dependentes da variação do pH durante o processo de obtenção do material. Para sínteses com valores de pH baixos (pH = 4–6) exigem

temperaturas mais altas para a precipitação acontecer. Conseqüentemente, com este fato é difícil controlar as exigidas relações entre HAP/TCP nos pós resultantes, outro fator crítico é o baixo pH (<7) que não favorece a incorporação de grupos de hidroxila básicos na rede da HAP. O grupo coordenado por Kikuchi et al., obteve resultados para pH mais elevados satisfatórios onde nanocristais de HAP alinhados ao longo do eixo c de fibras de colágeno foram obtidos em pH entre 8-9 e temperatura de 40°C de forma semelhante aos encontrados no osso natural.^{11,43}

A estabilidade dos fosfatos de cálcio à temperatura ambiente e em soluções aquosas é determinada pelo pH, sendo que se forem inferiores a 4,8, a fase mais estável é fosfato dicálcio, monetita (CaHPO_4); em pHs superiores a 4,8 a fase mais estável é a hidroxiapatita. Fatores como temperatura e o potencial aplicado entre eletrodos podem alterar esses valores de pH. As fases instáveis mais relevantes são $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β -fosfato tricálcio) e $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (fosfato tetracálcio).³⁵

O tamanho reduzido dos cristais e a baixa cristalinidade estão relacionados com a presença de defeitos na rede das apatitas biológicas, e a solubilidade dos fosfatos também pode ser associada à baixa cristalinidade. Segundo Legeros (1994) e Elliot (1994) a extensão da dissolução será função da composição, tamanho da partícula, porosidade (micro e macroporosidade), área superficial específica e cristalinidade (tamanho e perfeição do cristal). Entretanto, Legeros (2002) também sugere que a presença de uma matriz orgânica pode promover um efeito protetor diminuindo a extensão de dissolução de cristais de HAP com baixa cristalinidade.^{29,33,44}

Segundo Rigo et al, durante o envelhecimento das amostras, os cristais formados estão sujeitos a um processo de dissolução e recristalização, no qual os cristais menores desaparecem e os maiores, crescem mais rapidamente, e em conseqüência disto, o número total de cristais diminui, assim como a área superficial específica. O crescimento das

partículas durante o envelhecimento comprova que a precipitação continua mesmo após o gotejamento de todo o volume de ácido.¹³

Segundo Rodriguez et al., tempos de reação muito longos produzem um aumento na relação Ca/P, tendo por resultado uma diminuição da deficiência de cálcio da amostra e um aumento no tamanho dos cristais.⁴¹

Os dois métodos de secagem utilizados nesse trabalho, estufa e liofilização, são encontrados em artigos utilizados nos processos de obtenção da hidroxiapatita separadamente, e não comparando as alterações ocorridas no material decorrentes deste parâmetro da síntese. Tendo em vista a importância dos parâmetros da síntese já mencionados e citados por Araujo, Afshar, Bandyopadhyay e Sena, é de grande importância obter maiores informações acerca destes métodos de secagem e sua possível influência.^{15,31,32,33}

Estudos enfatizam que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradativamente após 4 ou 5 anos de implante, enquanto que outras biocerâmicas começam por volta de 10 anos após o implante, o preenchimento de falhas ósseas com HAP ocorre em menor período de tempo com a utilização de grânulos menores, também consideram que as partículas com tamanho menor apresentam reabsorção mais rápida, atuando como material osteocondutor.^{14,15,35}

2.5 HIDROXIAPATITA CARBONATADA (CHAP)

A apatita biológica difere da hidroxiapatita sintética e estequiométrica na sua composição, cristalinidade e estequiometria. As apatitas biológicas não são estequiométricas, portanto a razão Ca/P é diferente de 1,67.^{21,29,45}

Dentre as numerosas possibilidades de substituições iônicas na estrutura da HAP, apresentam extrema importância as substituições de grupos aniônicos da HAP pelo íon

carbonato (CO_3^{2-}). Vários trabalhos têm mostrado que íons carbonatos estão presentes em apatitas sintéticas e naturais em dois sítios aniônicos da estrutura denominados tipo A e tipo B.^{11,33}

Chama-se hidroxiapatita carbonatada do tipo A (CHAP – A) a apatita cujo íon carbonato substitui o íon hidroxila (OH^- , sítio monovalente) e hidroxiapatita carbonatada do tipo B (CHAP – B) a apatita cujo íon carbonato substitui o íon fosfato (PO_4^{3-} , sítio trivalente). As CHAP – B são semelhantes às apatitas encontradas no esmalte dentário e no osso cortical. A incorporação de íons carbonato na apatita provoca mudanças na morfologia, parâmetros de rede, tamanho do cristal, deformação e uma maior solubilidade.^{33, 46}

Além dessas duas substituições, o íon CO_3^{2-} pode ser inserido em ambos os sítios de PO_4^{3-} e de OH^- , formando um hidroxiapatita carbonatada do tipo AB (CHAP – AB). Estes tipos de substituições contribuem para alterar os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a solubilidade e a estabilidade da estrutura de HAP.^{21,29}

A estrutura de uma hidroxiapatita pode ser observada na figura 2.

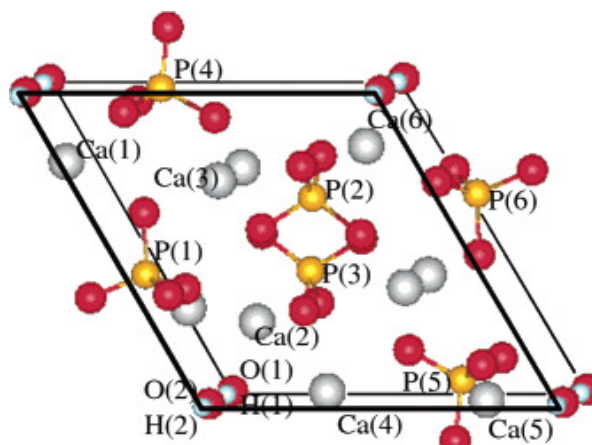


Figura 2 – Estrutura da Hidroxiapatita ao longo do eixo c.⁴⁷

A presença de íons carbonatos na estrutura da hidroxiapatita provoca um aumento da solubilidade e reatividade química, podendo influenciar na cristalinidade da estrutura e tamanho dos cristais. A formação de cristais menores contribui para um aumento da área superficial e da taxa de dissolução, provocando também um alargamento dos picos de

difração. Biologicamente, quanto maior o teor de carbonato incorporado à apatita tanto maior é sua atividade metabólica.^{10,21,36}

A morfologia dos cristais sofre alterações quando ocorre substituição do PO_4^{3-} e OH^- pelo grupo CO_3^{2-} , os cristais passam a ter uma morfologia mais esférica em vez de aciculiforme (em forma de agulha) com o aumento do teor de carbonato.^{21,36}

Com o aumento do teor de carbonato, a decomposição das CHAP acontece em temperaturas menores, formando como fase secundária o óxido de cálcio (CaO), sendo que a estabilidade térmica também é influenciada com a presença do íon carbonato.²⁹

A estrutura de uma CHAP ainda não foi determinada de forma precisa e há muitas propostas sobre sua configuração. Em uma hidroxiapatita, grupo fosfato apresenta duas faces paralelas inclinadas ao eixo c . Estudos indicam que para uma carbonato apatita do tipo B, o triângulo formado pelos oxigênios do grupo CO_3^{2-} ocupa uma das faces do grupo PO_4^{3-} inclinada com relação ao eixo c , e na CHAP do tipo A, o grupo carbonato encontra-se num plano paralelo ao eixo c .^{10,45,46,49,50,51,52}

Os íons carbonatos nos sítios do fosfato e do hidróxido nas apatitas biológicas estão distribuídos numa razão de 10:1 simultaneamente, sendo que a ocupação do sítio A tende a aumentar com a idade dos ossos. A maior parte das apatitas biológicas são formadas pelo tipo CHAP-B e estão presentes em ossos recém formados, enquanto que as do tipo CHAP-A, estão presentes em ossos mais velhos apresentando na superfície uma baixa afinidade com as células osteoblásticas.^{46,53}

A utilização de CHAP sintéticas como materiais para a substituição óssea tem recebido grande destaque, pois apresenta uma composição mais similar às apatitas biológicas se comparada a hidroxiapatita sintética. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que o controle do teor de carbonato nas apatitas influencia a resposta biológica do material, enfatizando sua importância, pois propicia a ligação do tecido com o implante.^{11,54}

O tipo de substituição na apatita é influenciado pelas condições em que se processa a reação. Os métodos de síntese juntamente com os parâmetros da preparação determinam o tipo da substituição.⁵²

2.6 COLÁGENO NO TECIDO BIOLÓGICO

Os organismos animais pluricelulares são abundantemente constituídos de colágeno, uma proteína cuja principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta resistência elástica, e constitui uma família de proteínas que se diferenciaram durante a evolução, para exercer funções diversificadas.^{3,6}

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano, representando 30% do total das proteínas do organismo. A família de proteínas do colágeno é produzida por diversos tipos celulares e se distingue pela composição bioquímica, características morfológicas, distribuição, funções e patologia.^{3,6}

Ao contrário dos polímeros sintéticos, que apresentam misturas de cadeias compostas com um comprimento variável de unidades repetitivas, o colágeno possui tamanho, estrutura e uma sequência específica de aminoácidos. Cada molécula de colágeno tem a forma de um bastão pequeno e rígido formado pelo entrelaçamento em tríplice hélice de três cadeias polipeptídicas chamadas de cadeias alfa observada na figura 3, esta estrutura justifica as propriedades físicas e biológicas dos colágenos como a rigidez, solidez e estabilidade.^{3,6,7,33}



Figura 3 – Molécula de colágeno: molécula em tripla hélice formada pelo entrelaçamento de três cadeias alfa ⁷

Além de seu papel estrutural nos tecidos, o colágeno apresenta também a função de orientar tecidos em desenvolvimento, fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial.³

Os principais aminoácidos encontrados na composição do colágeno são glicina (33,5%), prolina (12%) e hidroxiprolina (10%), entre eles a hidroxiprolina é característica da estrutura primária do colágeno.^{6,55.}

Existem mais de 20 espécies diferentes de colágeno, destas somente 14 são bem conhecidas conforme a tabela 3. Dentre os vários tipos de colágeno existentes, o colágeno do tipo I, é o mais abundante.^{3,6,7,33.}

Tabela 3 – Distribuição e Tipos de Colágeno^{· (adaptado,6,7,33)}

Tipo de Colágeno	Distribuição no Tecido
I	Pele, tendão, osso, córnea, dentina, fibrocartilagem, grandes vasos, intestino, útero, derme, ligamentos
II	Cartilagem hialina e elástica, notocórdio e disco intervertebral
III	Grandes vasos, parede uterina, derme, músculos, intestino, válvula do coração, gengiva (geralmente coexiste com o tipo I exceto no osso, tendão e na córnea)
IV	Lâminas basais, cápsula do cristalino
V	Córnea, membranas da placenta, osso, grandes vasos, cartilagem hialina, gengiva, tecidos fetais, pele, osso, placenta
VI	Pele, músculo do coração
VII	Pele, placenta, pulmão, cartilagem, córnea
VIII	Produzido pelas células endoteliais
IX	Cartilagem
X	Cartilagem hipertrófica e mineralizada
XI	Cartilagem, disco intervertebral, humor vítreo
XII	Tendão embrionário, pele, ligamento periodontal bovino
XIII	Pele fetal, mucosa intestinal
XIV	Epitélio

O colágeno do tipo I, o mais abundante, tem como unidade básica o tropocolágeno, uma macromolécula linear semiflexível com cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. É formada por três cadeias polipeptídicas denominadas de cadeias α , duas iguais

(α_1) e uma diferenciada (α_2), contendo 1055 e 1029 resíduos aminoácidos, respectivamente. A estrutura primária destas unidades é caracterizada pela repetição do triplete glicina (Gly), 33%, prolina (Pro), 12% e hidroxiprolina (Hypro), 11%. No conjunto, sua estrutura é helicoidal na forma de uma tripla hélice estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas como pode ser observada na figura 4. A aproximação das três cadeias, duas α_1 e uma α_2 , só é possível porque elas têm aminoácidos de cadeia lateral pequena, como a alanina, ou sem cadeia lateral, como a glicina. A ligação de duas cadeias α entre si forma uma unidade β . Esta unidade é estável, devido às pontes covalentes que se formam entre elas, envolvendo resíduos lisil ou hidroxilisil, com conformação inflexível e conferindo-lhe rigidez. Essas pontes aumentam progressivamente com o envelhecimento do colágeno.^{3,6,55}

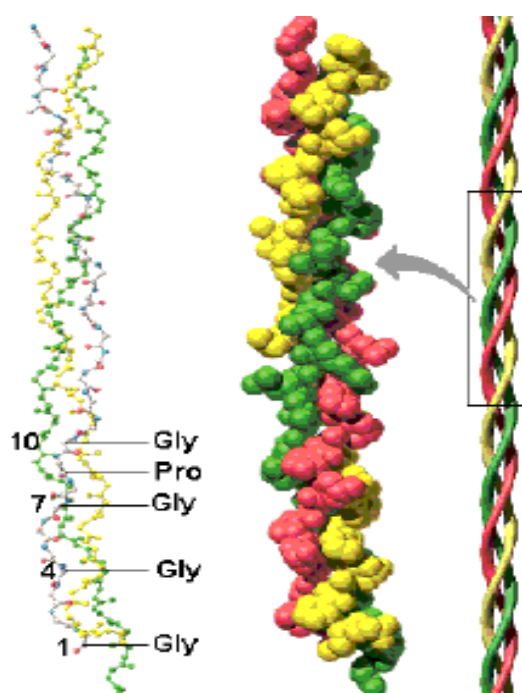


Figura 4 - Estrutura do colágeno em forma de triplete.³

Cada cadeia polipeptídica é formada por aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos. As diferenças na estrutura química dessas cadeias são responsáveis pelos vários tipos de colágeno e suas funções diferenciadas.^{54, 56}

Como a formação das fibras no colágeno tipo I ocorre a um pH 6,4, tem-se neste valor a máxima interação eletrostática entre as moléculas de tropocolágeno, fazendo com que a resultante de cargas na molécula seja igual a zero.³

As aplicações do colágeno devem-se principalmente a algumas propriedades importantes no desenvolvimento de biomateriais como baixa resposta imunológica e baixa alergenicidade; biodegradabilidade; biocompatibilidade; propriedades hemostáticas; susceptível a modificações químicas que permitam o controle da biodegradabilidade.³

Colágeno solúvel é obtido por processos físico-químicos e pode ser utilizado na forma de filmes, esponja ou gel na liberação controlada de fármacos. Sua combinação com fosfatos de cálcio tem sido relatada em estudos de liberação de antibióticos e na melhora da estabilidade dos lisossomos. A tabela 4 apresenta algumas das aplicações biomédicas do colágeno.³

Tabela 4 – Algumas aplicações biomédicas do colágeno.³

Forma	Aplicações
Colágeno: cerâmicas fosfatadas	Reconstrução de tecidos (preenchimento de cavidades ósseas), reconstrução plástica.
Compósitos	Biocerâmicas do tipo fosfatos de cálcio: colágeno para reconstrução óssea.
Esponjas	Agentes hemostáticos
Gel de colágeno injetável	Preenchimento
Membranas, esponjas ou géis biodegradáveis	Sistemas de liberação de fármacos
Membranas protetoras e cicatrizantes	Atelocolágeno, colágeno: elastina, colágeno com propriedades diferenciadas
Membranas	Membranas periodontais
Próteses	Confecção de válvulas cardíacas e vasos sanguíneos
Revestimento	Próteses vasculares

Durante o processo evolutivo, certas proteínas estruturais foram modificando-se sob as influências do meio ambiente e das necessidades funcionais dos organismos animais, desenvolvendo graus variáveis de rigidez e de resistência às trações. Essas proteínas são conhecidas, coletivamente, como colágenos e os principais exemplos de seus diversos tipos são encontrados na pele, ossos, cartilagem, músculo liso e lamina basais. O colágeno dos tendões formam estruturas altamente assimétricas com grande resistência tensional, na pele formam fibras flexíveis, frouxamente trançadas e nas regiões duras dos dentes e ossos as fibras colágenas estão associadas a hidroxiapatita.^{6,56}

Inicialmente admitia-se que a síntese de colágeno estaria restrita a um pequeno número de células, como os fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos e condroblastos. Porém, atualmente sabe-se que essa atividade é muito generalizada e que muitos tipos celulares produzem colágeno.⁶

A temperatura de dissolução do colágeno é diferente em cada espécie, porém, em todas elas, é apenas um pouco acima da temperatura corpórea. No caso do colágeno bovino é de 39 °C, mantendo a estabilidade da tripla hélice do colágeno até essa temperatura, sem que as pontes de hidrogênio entre os filamentos de glicina, prolina e hidroxiprolina sejam rompidas.⁵⁷

A estrutura do colágeno bovino possui grande similaridade química com o colágeno presente em humanos principalmente comparando-se os aminoácidos em maior quantidade como a prolina, glicina e hidroxiprolina. Observa-se essa similaridade nos dados apresentados na tabela 5.⁵⁸

Tabela 5 – Composição dos aminoácidos do colágeno.⁵⁸

AMINOÁCIDOS	BOI (PELE)	PEIXE (PELE)	HOMEM (PELE)	COLÁGENO COMERCIAL
Alanina	105	106	114,5	37,7
Glicina	334	338	324,4	21,4
Valina (BCAA)	19	25	24,5	30,3
Leucina (BCAA)	25	25	24,8	2,3
Isoleucina (BCAA)	11	15	10,4	3,7
Prolina	129	106	125,1	12,3
Fenilalanina	13	13	12,6	1,9
Tirosina	4,7	3,3	3,5	1,0
Serina	38	61	36,9	3,55
Treonina	17	23	18,3	3,1
Cistina	Traços	0	Traços	0
Metionina	6,6	18	7,0	2,5
Argenina	48	51	49,0	9,5
Histidina	4,6	13	5,4	1,5
Lisina	25	27	26,6	3,4
Ácido aspártico	48	43	47,2	5
Ácido glutâmico	72	68	77,7	10,9
Hidroxiprolina	92	60	90,9	9,0
Hidroxilisina	6,8	5,5	5,9	0,8

O colágeno a gelatina, têm sido largamente empregados em produtos médicos, farmacêuticos e de consumo por mais de 100 anos, no entanto até a década de 80 a sua utilização como biomaterial era restrita a produção de fios cirúrgicos principalmente devido à dificuldade de obtenção. A introdução de novos processos de obtenção do colágeno associadas às novas potencialidades de aplicação tanto na medicina quanto na odontologia, aumentam significativamente o uso desta proteína como biomaterial nas formas de membranas, tubos, pós, esponjas, soluções injetáveis, entre outras.^{3,33}

2.7 TECIDO ÓSSEO

O osso é a estrutura básica de sustentação e proteção dos órgãos do corpo é composto por uma matriz orgânica resistente, que é acentuadamente reforçada por depósitos de sais de cálcio. O osso compacto médio contém, em peso, cerca de 30% de matriz e 70% de sais. O osso recém formado pode ter porcentagem consideravelmente mais alta de matriz em relação aos sais, e armazena aproximadamente 99% do cálcio do organismo.^{59,60.}

A matriz óssea possui constituintes inorgânicos e orgânicos. O componente orgânico da matriz óssea constitui aproximadamente 35% do peso seco do osso e é formada por fibras colágenas (95%) constituídas quase exclusivamente de colágeno do tipo I e por uma pequena quantidade de proteoglicanas e glicoproteínas adesivas.^{6,59,60.}

Na parte inorgânica do osso, que perfaz 65% de seu peso seco, os sais principalmente de cálcio e fósforo, são depositados na matriz orgânica do osso, junto com outros componentes, incluindo íons bicarbonato, citrato, magnésio, sódio e potássio em pequenas quantidades. O cálcio e o fósforo existem basicamente, na forma de cristais de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, mas o fosfato de cálcio está presente também na fase amorfa.^{6,59,60.}

A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. Se o osso for descalcificado (isto é, todos os minerais retirados do osso), ele ainda mantém sua forma original, mas se torna tão flexível que pode ser dobrado como um pedaço de borracha. Se o componente orgânico for retirado do osso, o esqueleto mineralizado ainda mantém sua forma original, mas ele se torna extremamente quebradiço e pode ser fraturado com facilidade.^{6,59}

As fibras de colágeno do osso, como as dos tendões, têm grande força tênsil, enquanto os sais de cálcio exibem grande força compressiva. Essas propriedades combinadas,

juntamente com o grau de coesão entre as fibras colágenas e os cristais, resultam em estrutura óssea dotada de força tênsil e força compressiva extremas.⁶⁰

Nos tecidos humanos, os cristais de HAP depositados são similares a hidroxiapatita do osso. A deposição ocorre em duas etapas: iniciação (ou nucleação) e proliferação (ou crescimento). A nucleação é a acomodação de hexágonos de hidroxiapatita na intimidade da molécula de colágeno ou osteonectina.¹⁵

A fase intracelular da nucleação ocorre nas mitocôndrias de células mortas ou lesadas. A fase extracelular ocorre em estruturas denominadas “vesículas da matriz” (organelas extracelulares que têm composição e atividade enzimática distinta das membranas plasmáticas que lhes deram origem). Possuem 25 a 250 nm de diâmetro e são originadas de células degeneradas ou necróticas, na vizinhança da área de calcificação. Fosfolipídios ácidos presentes nessas vesículas, principalmente a fosfatidilserina, agem como captadores e precipitadores de cálcio. Além disso, fosfatases também presentes nessas vesículas parecem reprimir os mecanismos inibitórios da precipitação dos sais, representados pelos pirofosfatos e proteoglicanos. A proteólise destes aumenta a formação da hidroxiapatita por permitir maior mobilidade de íons, facilitando a saturação dos fluidos extracelulares. A proliferação do núcleo é a progressão autocatalítica da deposição dos sais e é influenciada por múltiplos fatores extracelulares, tais como: cálcio, fósforo, pH do tecido, vitamina D, balanço hormonal, suprimento sanguíneo, e solução de continuidade de tecidos moles. Esse processo pode ser observado na figura 5.¹⁵

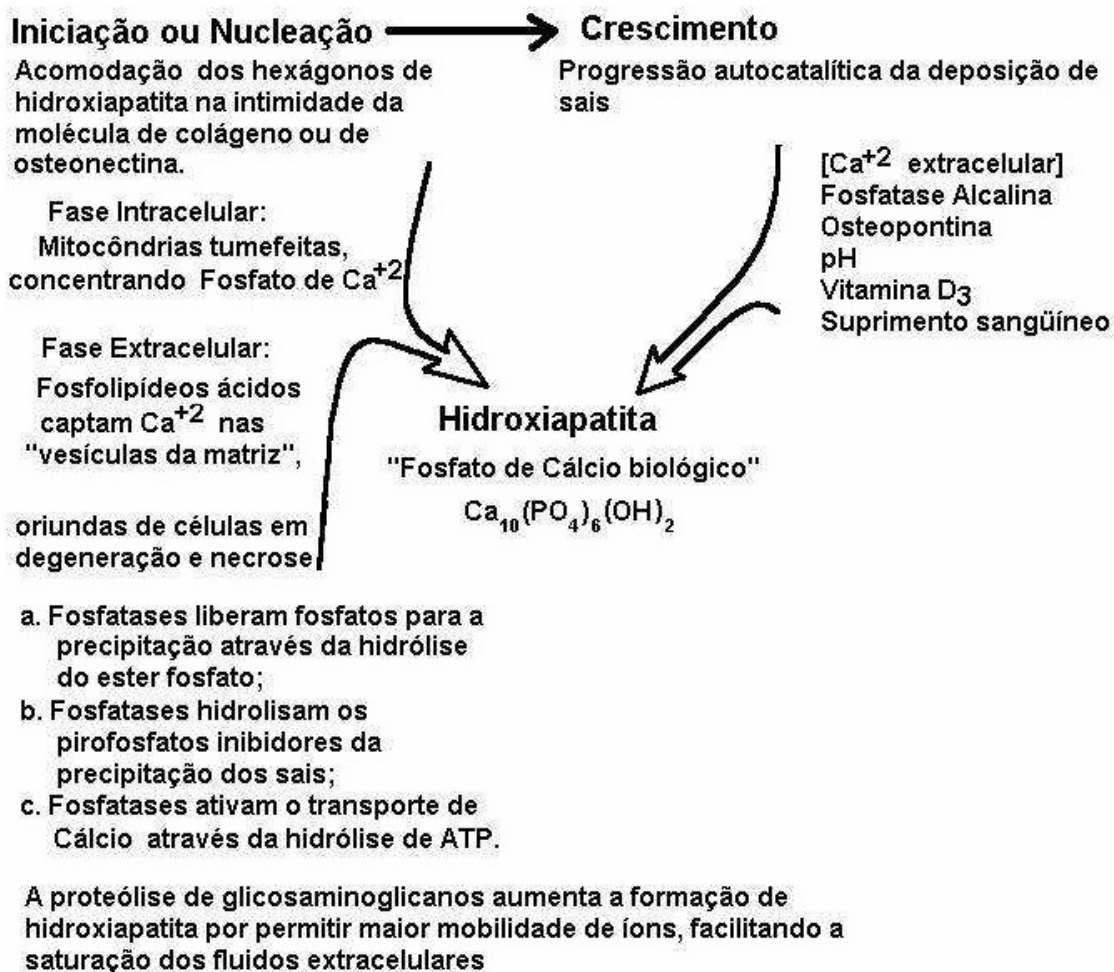


Figura 5 – Esquema de deposição da hidroxiapatita nos tecidos humanos¹⁵

Através dos padrões de difração de raios X, foi possível a observação da semelhança química superficial entre a fase mineral dos ossos e da hidroxiapatita sintética. Os íons magnésio, sódio, potássio e carbonato também estão presentes entre os tecidos ósseos, embora os padrões de difração por raios X não tenham conseguido mostrar cristais definidos formados por esses sais. Por conseguinte, acredita-se que estejam conjugados aos cristais de hidroxiapatita, em vez de organizados em seus próprios cristais distintos.^{1,60}

Cada fibra de colágeno do osso compacto é composta por segmentos periódicos repetidos, os cristais de hidroxiapatita ficam adjacentes a cada segmento da fibra, estando firmemente ligados a ela. Esta íntima ligação impede o "cisalhamento" do osso; isto é, impede que os cristais e as fibras de colágeno escapem de seu lugar, o que é essencial para manter a

força do osso. Além disso, as fibras de colágeno adjacentes superpõem-se uns aos outros, causando também a superposição dos cristais de hidroxiapatita, como tijolos unidos entre si em uma parede.⁶⁰

2.8 COMPOSITOS DE FOSFATOS DE CÁLCIO E COLAGENO

Existem algumas desvantagens específicas que ainda limitam o uso da HAP para substituição de tecidos ósseos que sofrem alta tensão, tais como sua natureza frágil, a porosidade e resistência mecânica e o problema de migração das partículas. Os ossos são tecidos que requerem certo grau de resistência mecânica para manter sua vitalidade, desse modo a segurança a longo prazo de um implante permanente de HAP é questionável. Com o intuito de minimizar, ou mesmo superar estes problemas, uma solução seria associá-la a um material com características adequadas. Nesse sentido, a hidroxiapatita tem sido empregada junto a vários biopolímeros, tais como colágeno, cola de fibrila, gelatina, quitosana e o alginato.^{33,61,62,63,64}

A possibilidade de combinar materiais para a formação de compósitos, de um modo geral, tem atraído a atenção de muitos pesquisadores devido às vantagens da associação desses diferentes materiais. Clinicamente, o colágeno ou a gelatina tem sido utilizado como um efetivo biomaterial, pois possui uma boa biocompatibilidade, adesividade, propriedades de plasticidade, e propriedades hemostáticas.⁶²

Os compósitos de HAP e colágeno apresentam características singulares, uma vez que são os principais constituintes da fase mineral e orgânica do osso, respectivamente. Essa interação entre fosfato de cálcio e colágeno e a maturação e qualidade das fibras de colágeno são importantes para o comportamento mecânico dos tecidos ósseos.^{62,65}

Um aspecto fundamental na síntese do compósito HAP e colágeno é o crescimento do fosfato de cálcio sobre a matriz de colágeno em meio aquoso de forma semelhante ao osso natural, em sua estrutura e composição. Alguns estudos mostram que as propriedades mecânicas dos compósitos produzidos são menores do que os valores obtidos para o osso natural. Em compósitos de HAP e gelatina é esperado um aumento na osteocondutividade e biodegradação junto com eficiência mecânica, possuindo a característica de força e resistência para uso ortopédico.^{33,62}

Compósitos de hidroxiapatita deficiente em cálcio e colágeno produzidos por Tenhuisen e colaboradores em 1995, em uma reação ácido-base entre precursores do fosfato de cálcio [CaHPO_4 e $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$], na presença de uma matriz de colágeno a 38 °C foi possível verificar que a formação da HAP aumenta à medida que a concentração de colágeno aumenta, e que a presença de colágeno afeta o pH e as concentrações de cálcio e fosfato.⁶⁶

Em 1999, Bradt e colaboradores, promoveram a formação de fosfato de cálcio sobre as fibrilas de colágeno. Acreditavam que para alcançar propriedades similares ao osso seria essencial mimetizar não somente a composição, como também sua estrutura. Nesse estudo a formação das fibrilas de colágeno e a mineralização ocorrem num único processo. As reações são iniciadas pela mistura de um ácido a uma solução de colágeno, cálcio e um tampão de fosfato. Foi estudado também a influência da adição do poliaspartato na mineralização, verificando-se que a sua adição melhora a interação entre o fosfato de cálcio e o colágeno.⁶⁷

O grupo coordenado pelos professores Kikuchi e Tanaka, talvez seja o que tenha chegado mais próximo de uma configuração composicional e estrutural do compósito HAP e colágeno semelhante ao osso. Para produção do compósito HAP e colágeno foi utilizado o método de precipitação por titulação, utilizando-se como reagentes uma solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (61,3 mmol.L⁻¹ de H₂O) e uma solução de H_3PO_4 (99,6 mmol.L⁻¹ de H₂O) contendo 5g de colágeno. A razão em peso de HAP e colágeno utilizada foi fixada em 4:1, e variou-se a

temperatura e pH de síntese entre 25-40 °C e 7-9, respectivamente. Nanocristais de HAP alinhados ao longo do eixo c de fibras de colágeno foram obtidos em pH 8-9 e 40 °C de forma semelhante aos encontrados no osso natural.^{33,43,65}

Compósitos de hidroxiapatita e colágeno são biomateriais em potencial porque seus componentes individuais possuem características essenciais e isoladas a um biomaterial. O colágeno promove cicatrização de fraturas e regeneração óssea e é também um agente hemostático. Além disso, possui um baixo índice de irritabilidade ou alergenicidade (2%), é biodegradável, possui habilidade em promover crescimento celular e é de fácil obtenção. O aspecto mais importante na utilização de colágeno na forma de compósitos com biocerâmicas é o fato dessa proteína ser a matriz em que os sais de fosfato de cálcio se depositam para dar origem ao tecido ósseo. A hidroxiapatita tem sido amplamente utilizada na preparação de compósitos devido à sua similaridade com o tecido calcificado do osso humano. Apresenta fragilidade característica das cerâmicas, portanto, sua combinação com colágeno torna seu uso como biomaterial mais vantajoso.⁸

No mercado brasileiro encontramos disponível comercialmente um compósito de Hap/Col na forma de esponja. Segundo o fabricante JHS Laboratório Químico, o processo de obtenção do material mantém intacta a configuração helicoidal das moléculas de colágeno e também sua estrutura fibrosa, e sua composição é de 25% de colágeno e 75% de HAP. O material é fornecido na forma de mantas de formatos e volumes médios diferentes, prontas para o uso em condições cirúrgicas.⁶⁸

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 OBTENÇÃO DOS PÓS DE HIDROXIAPATITA E COLÁGENO

Os compósitos de hidroxiapatita e colágeno foram obtidos pelo método aquoso ou reação via úmida. Neste processo a precipitação ocorre devido a reação do ácido fosfórico (H_3PO_4) e uma suspensão de hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] conforme a equação 1, que utiliza proporções dos reagentes ácido fosfórico e hidróxido de cálcio ajustados para a razão Ca/P de 1,67.

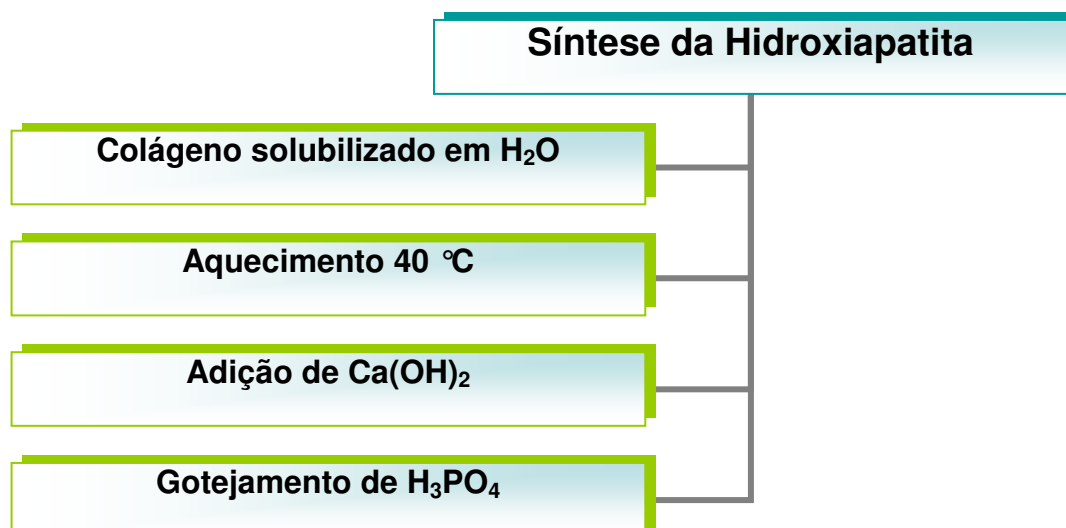


O colágeno bovino foi adicionado e solubilizado em água, antes da adição do hidróxido de cálcio a solução, com aquecimento constante em temperatura de 40 °C, podendo variar dois graus acima ou abaixo, devido à natureza protéica do colágeno.

Esse método foi escolhido devido a simplicidade e ao baixo custo para a sua realização, a possibilidade do controle dos parâmetros da síntese, como pH, temperatura, velocidade de gotejamento, e por proporcionar características similares as do tecido ósseo e dentário.

Os cuidados durante o processo de síntese do pós objetivaram a obtenção como fase principal a hidroxiapatita. Todas as sínteses foram realizadas obtendo-se uma amostra controle, contendo apenas a hidroxiapatita e uma amostra com hidroxiapatita e colágeno.

O esquema utilizado para o preparo das amostras segue no fluxograma abaixo:



3.1.1 Reagentes e reação

As amostras sem a adição de colágeno foram preparadas utilizando os reagentes Ca(OH)_2 (Vetec) e H_3PO_4 (85% P.A. – CRQ) para o preparo das soluções com água destilada.

As amostras com adição de colágeno foram chamadas de HAP/Col e HAP/Col – Lio, e preparadas com uma concentração de 4g/L de colágeno. O colágeno utilizado foi o bovino, escolhido pela similaridade dos aminoácidos e quantidades das moléculas em sua composição com as moléculas de colágeno tipo I de humanos como já observado na tabela 5.

O colágeno foi solubilizado em água a uma temperatura de aproximadamente 40 °C, a essa solução foi acrescentado Ca(OH)_2 sob agitação constante. A seguir foi iniciado o gotejamento lento de H_3PO_4 .

A temperatura foi controlada e mantida constante durante o processo. O pH também foi controlado durante e após o término da adição da solução ácida mantendo-se em 12, e quando necessário foi ajustado com hidróxido de amônio.

3.1.2 Envelhecimento

Sabe-se que tempos de envelhecimento prolongados e a velocidade de gotejamento da solução do ácido fosfórico lenta, geralmente favorecem as razões Ca/P próximas a da hidroxiapatita estequiométrica (1,67) e alta cristalinidade, assim, foi adicionado lentamente a fonte de fosfato sobre a solução de cálcio. Deste modo adotou-se tempos de envelhecimento para as amostras de 1, 14, e 30 dias e a velocidade de gotejamento de aproximadamente uma gota por segundo.

3.1.3 Secagem

Sintetizou-se as amostras de HAP e HAP/Col em dois grupos para o primeiro grupo utilizou-se a secagem em estufa e para o segundo grupo de amostras utilizou-se a liofilização.

3.1.3.1 Estufa

Ao término do período de envelhecimento, secaram-se as amostras do primeiro grupo foram secas completamente em estufa à temperatura de 110°C por um período de 24 horas.

Após a secagem, as amostras foram desaglomeradas em almofariz de ágata e peneirou-se em uma peneira de malha 80 e malha 200.

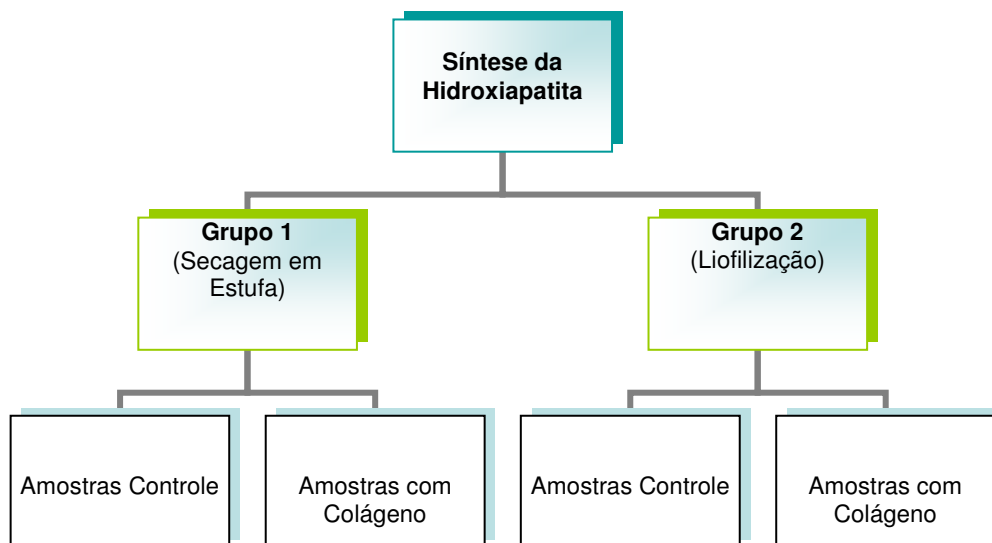
3.1.3.2 Liofilização

A liofilização é um processo de desidratação usado tipicamente para preservar um material perecível ou torná-lo mais conveniente para o transporte. O processo ocorre através

do congelamento do material e reduzindo-se a pressão circunvizinha permite que a água congelada no material sublime diretamente da fase sólida ao gás e muito mais rapidamente com a aplicação do vácuo. O índice de água extremamente reduzido inibe a ação dos microorganismos e das enzimas que normalmente estragam ou degradam as substâncias.

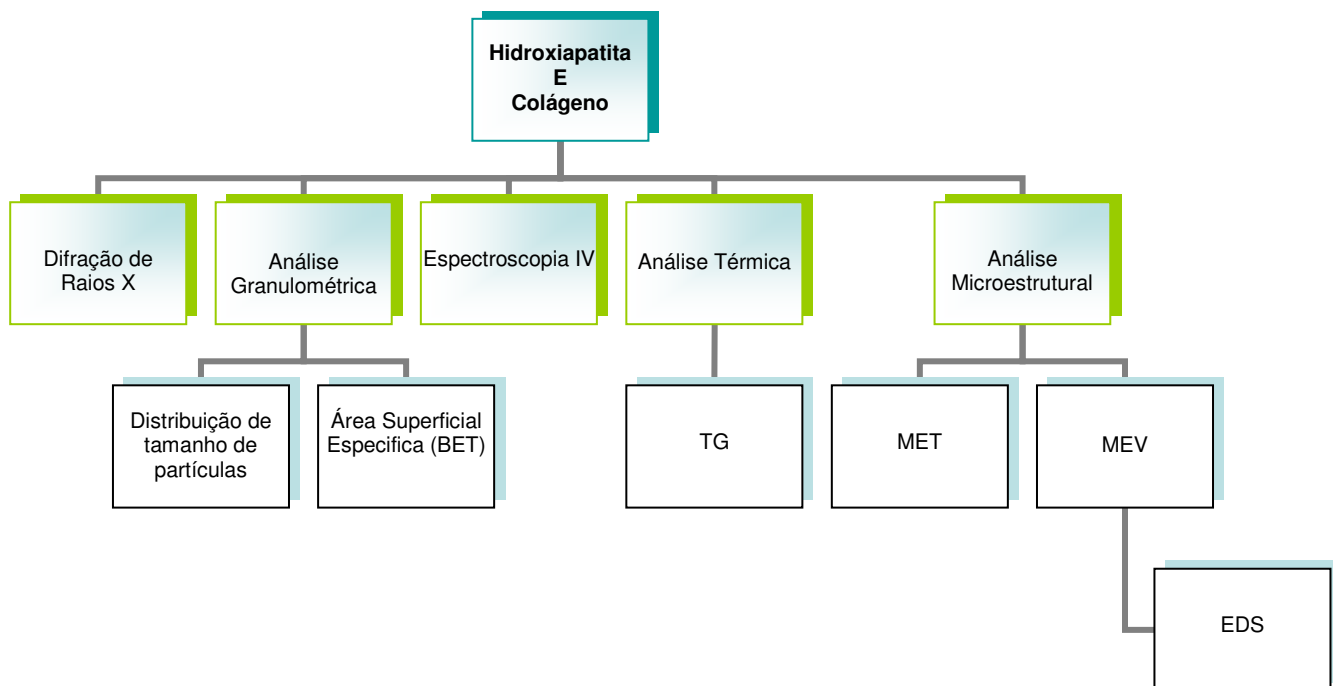
Após a precipitação das amostras do segundo grupo, aguardando-se o tempo de envelhecimento, congelou-se as amostras por 24 horas a uma temperatura de menos 50 °C, após levou-se ao liofilizador por 3 dias.

O processamento dos dois grupos de amostras está representado no fluxograma abaixo:



3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram caracterizadas conforme mostra o fluxograma abaixo:



3.2.1 Análise Térmica

Denominamos métodos térmicos de análise as técnicas em que as variações de propriedades físicas ou químicas de uma substância como área superficial, porosidade, calor específico, tamanho de partícula, são medidas em função da temperatura. Os métodos que envolvem mudanças no peso ou na energia se enquadram nesta definição.^{69,70}

A análise térmica inclui uma série de técnicas entre elas a termogravimetria (TG) em que se mede a mudança de peso de uma substância em função da temperatura ou do tempo, na análise térmica diferencial (DTA) se mede a diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência em função da temperatura quando estes são submetidas a um processo térmico controlado; na calorimetria de varredura diferencial (DSC) em que se mede a diferença de energia cedida a uma substância e a um material de referência em função da temperatura quando são submetidas a um processo térmico controlado; e a análise dos gases desprendidos (EGA) mede-se qualitativa e quantitativamente os produtos voláteis formados

durante a análise térmica. Estes métodos são de grande utilidade para o controle da qualidade e aplicações de investigação sobre produtos industriais como polímeros, fármacos, metais e ligas.^{69,71.}

A análise térmica pode ser realizada em condições isotérmicas ou em condições não-isotérmicas. Os resultados deverão ser expressos como a fração decomposta de sólido ou conversão da transformação (α) em função da temperatura ou do tempo, já que não é possível considerar o termo da concentração para o estudo cinético de sólidos.⁶⁹

A maior parte das reações acontece com absorção ou liberação de calor, o qual afeta a temperatura do sistema. Esta é uma das razões pela qual resulta mais conveniente trabalharem em condições não-isotérmicas controladas, assim essas condições são frequentemente utilizadas em experimentos como termogravimetria, termogravimetria diferencial, calorimetria diferencial de varredura e análise térmica diferencial. Nesses experimentos, uma mudança numa propriedade extensiva do sistema é medida em função da temperatura.⁶⁹

As análises foram realizadas na Universidade Jaume I, Castellon de La Plana, na Espanha em um equipamento da marca Mettler Toledo modelo SDTA 851.

3.2.2 Difração de Raios X

A difração de raios X (DRX) representa o fenômeno de interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material, relacionado ao espalhamento coerente. A técnica consiste na incidência da radiação em uma amostra e na detecção dos fótons difratados, que constituem o feixe difratado.⁷⁰

Quando uma substância cristalina é sujeita a um feixe de raios X incidindo segundo um determinado ângulo, os diferentes planos ou camadas de átomos ou íons dos cristais

refletem parte da radiação, sendo o ângulo de reflexão igual ao ângulo de incidência. Em um material onde os átomos estejam arranjados periodicamente no espaço, características das estruturas cristalinas, o fenômeno da difração de raios X ocorre nas direções de espalhamento que satisfazem a Lei de Bragg dada na equação 1.^{15, 70,72}

Os dados de raios X das amostras secas em estufa foram coletados em um difratômetro SHIMADZU Modelo XRD 6000, com tubo de cobre operando a 40 kV e 30 mA, a 2 θ no alcance de 5 a 110°, para a confirmação da presença da fase de Hidroxiapatita e foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar na Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG. As amostras liofilizadas foram analisadas por esse mesmo equipamento com exceção das amostras HAP-Lio-1, HAP/Col-Lio-1 e HAP/Col-Lio-30 que os dados foram coletados em um difratômetro Brucker D4 Cu K α .

3.2.3 Espectroscopia de absorção na Região de Infravermelho

A radiação infravermelha (IR) corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. A porção de maior utilidade está situada entre 4000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹.³⁵ A absorção no infravermelho envolve uma ressonância entre a diferença de níveis de energia da molécula e a radiação eletromagnética. E essa absorção de radiação infravermelha causa transições de níveis vibratórios de energia das moléculas.^{35,73,74}

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula.⁷³

A espectroscopia no infravermelho permite identificar algumas substituições ou alterações importantes na composição da HAP, particularmente nos grupos fosfatos e

hidróxidos. Essas informações são obtidas pela excitação dos modos de energia vibracionais destes grupos moleculares dentro da estrutura dos sólidos. Pode-se diferenciar a substituição dos grupos OH^- e PO_4^{3-} pelos grupos CO_3^{2-} por meio da presença de bandas em 873, 1465, 1534 cm^{-1} e 874, 1420, 1455 cm^{-1} , respectivamente.³¹

As amostras foram obtidas na forma de pastilhas de KBr, e analisadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Os dados foram coletados em um equipamento da marca Nicolet 4700 FT-IR e foram realizadas no LIMAC-UEPG.

3.2.4 Análise Granulométrica do Tamanho de Partículas

Diversas propriedades dos materiais cerâmicos estão associadas ao empacotamento das partículas que os constituem.⁷⁵

O estudo de empacotamento de partículas pode ser definido como:

O problema da correta seleção da proporção e do tamanho adequado dos materiais particulados, de forma que os vazios maiores sejam preenchidos com partículas menores, cujos vazios serão novamente preenchidos com partículas ainda menores e assim sucessivamente.⁷⁵

Isso pode ser observado na figura 6:

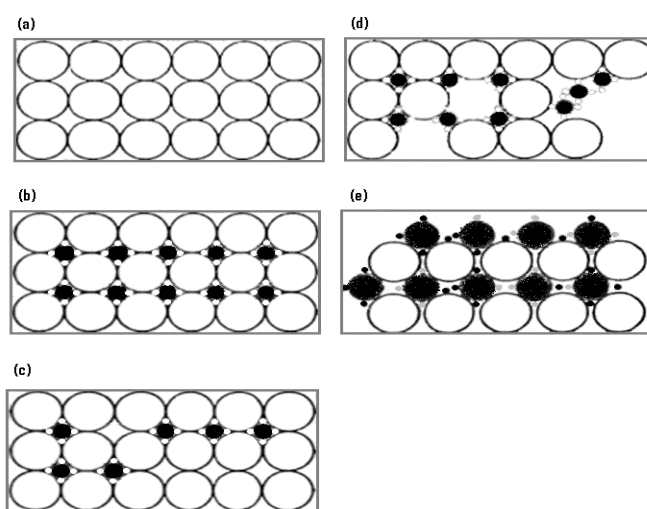


Figura 6 – Efeito da quantidade e do tamanho das partículas na eficiência de empacotamento: (a) sistema monodisperso; (b) máxima densidade de empacotamento teórica; (c) deficiência de partículas pequenas; (d) deficiência de partículas grandes; (e) distribuição inadequada de tamanho de partículas.⁷⁵

A análise granulométrica de partículas sólidas compreende a determinação do tamanho das mesmas, e a frequência com que ocorrem em uma determinada classe ou faixa de tamanho.⁷⁶

As partículas podem ter várias formas, que podem alterar ou influenciar determinadas propriedades, tais como fluidez, empacotamento, interação com fluidos e poder de cobertura de pigmentos. Quanto mais afastada do formato esférico for a partícula, menor é a densidade de empacotamento de uma distribuição que a contenha, conforme ilustrado na figura 7, quanto menor o tamanho das partículas irregulares, maior esse efeito, em função da maior área superficial específica.^{75,76}

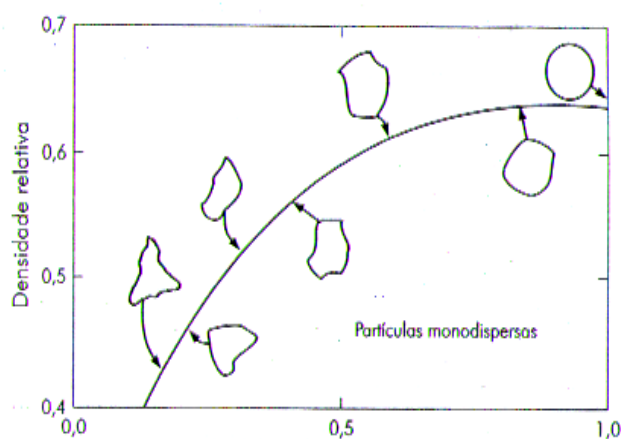


Figura 7 – Relação qualitativa existente entre densidade relativa e o arredondamento relativo para empacotamentos monodispersos aleatórios de partículas.⁷⁵

Através do controle da distribuição granulométrica é possível otimizar a densidade de empacotamento em sistemas compostos por partículas não esféricas. Geralmente, a densidade se eleva com o valor do quociente entre os tamanhos (diâmetros) das partículas maiores e os das menores.⁷⁵

A porosidade das partículas é outro fator complicador na obtenção de empacotamentos de alta densidade relativa. As partículas podem ser totalmente densas, com porosidade interna fechada, ou com porosidade aberta, conforme ilustrado na figura 8. Para se

obter um empacotamento de máxima densidade para uma dada distribuição granulométrica, é necessário que se utilizem partículas densas e com a menor porosidade possível.⁷⁵

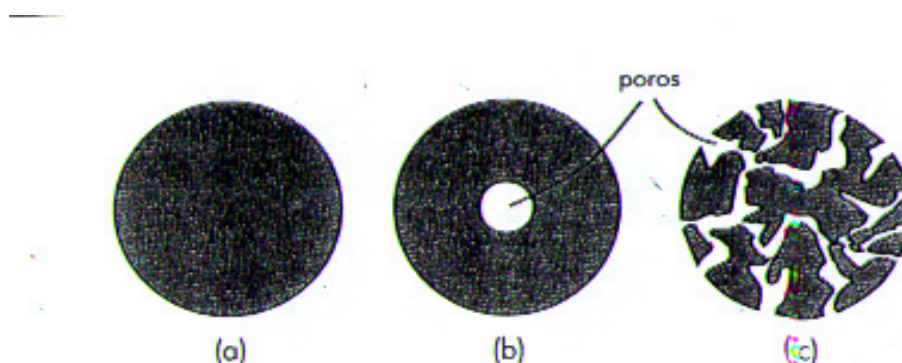


Figura 8 – Representação esquemática das formas de poros que podem ocorrer nas partículas: (a) partícula densa (isenta de poros); (b) partícula com poro interno fechado; (c) partícula com poros abertos.⁷⁵

Os pós de hidroxiapatita e da hidroxiapatita associada ao colágeno foram caracterizados a partir da análise granulométrica em um granulômetro a laser CILAS 920N.314 do LIMAC-UEPG, onde foram obtidos gráficos de distribuição de tamanhos médios de partículas.

3.2.5 Avaliação da área superficial específica pelo método BET

Quando um sólido é exposto a um gás ou vapor, à temperatura e pressão definidas, este sólido começa a adsorver o material presente na fase gasosa. A determinação da quantidade de mols adsorvidos pode ser realizada através de diferentes métodos. Em um sistema fechado, após o equilíbrio, devido à diminuição de massa na fase gasosa, a pressão se torna constante e igual a um valor (P) menor que o valor inicial (P_i). Isto permite o acompanhamento do fenômeno através da variação de pressão do sistema ou do aumento da massa de adsorvente.⁷⁷

Brunauer e colaboradores realizaram uma sistematização de inúmeros dados experimentais para diferentes sólidos e adsorvatos em diferentes condições. Isto permitiu que a maioria das isotermas experimentais fossem classificadas em cinco categorias principais, apresentadas na Figura 9. Para comparação de diferentes adsorvatos, a pressão parcial (P) aparece normalizada pela pressão de vapor (P_0) na temperatura estudada.⁷⁷

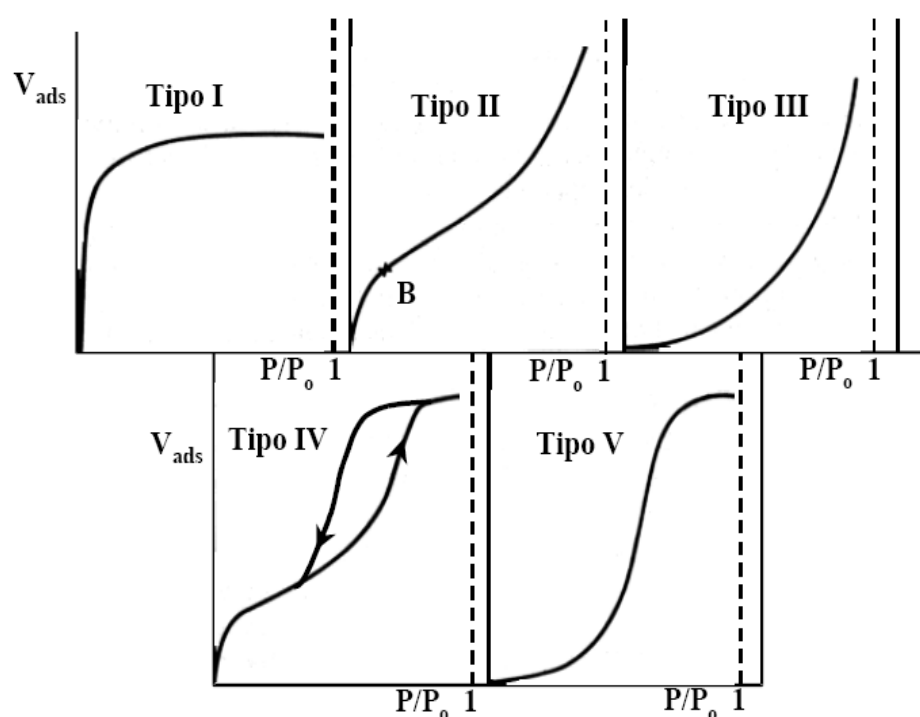


Figura 9 – Diferentes tipos de Isotermas.⁷⁷

Observando-se os tipos de isotermas, Brunauer e colaboradores verificaram que a isoterma do **tipo I** se caracteriza pela aproximação a uma quantidade limite da espécie adsorvida. É obtida quando ocorrem fenômenos de interações químicas entre adsorvente e adsorvato. As isotermas do **tipo II** são exemplos comuns do comportamento observado na adsorção física. Em valores baixos de P/P_0 (0,1-0,3) ocorre a formação da monocamada e, a medida que o valor de P/P_0 se aproxima da unidade, ocorre a condensação capilar. O **ponto B**, normalmente denominado “joelho” da isoterma, corresponde à completa formação da monocamada. Isotermas do **tipo IV** são semelhantes a do **tipo II**, exceto que neste caso existe

um volume de poro máximo indicado pela aproximação do valor limite à medida que P/P_0 se aproxima da unidade. Este é um tipo de curva relativamente comum para diversas estruturas porosas. As isotermas do **tipo III e tipo V** são relativamente raras, aparecendo quando as forças que originam a monocamada são fracas.⁷⁷

A área superficial do pó pode ser calculada pelo volume de gás adsorvido na superfície do sólido, em geral, os sólidos adsorvem gases fracamente devido à presença somente das forças de Van der Waals, desse modo para que os gases sejam suficientemente adsorvidos, as amostras sólidas são resfriadas até o ponto de ebulição dos gases. O nitrogênio com uma área de $16,2 \text{ \AA}^2$ até seu ponto de ebulição de 77K, e é o gás normalmente escolhido para análise da área superficial. Após um determinado tempo, a massa do sólido e a pressão do gás assumem um valor constante. A quantidade de gás adsorvida será calculada pela diminuição da pressão por meio da aplicação das leis dos gases ou pela massa de gás adsorvida pelo sólido. Esta quantidade é próxima da necessária para cobrir toda a superfície usando uma pequena amostra. Este método é denominado de BET e foi desenvolvido por Brunauer, Emmet e Teller.^{37,78,79}

Para a determinação da área superficial específica dos pós das composições estudadas foi utilizado nitrogênio como gás de adsorção e o equipamento Quantachrome modelo Nova 1200 do LIMAC – UEPG e um Equipamento Micromeritics modelo Gemini V da Universidade Jaume I, Castellon de La Plana, Espanha.

3.2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A imagem vista na MET é formada por um feixe de elétrons que passa pela amostra. Uma vez que materiais sólidos são altamente absorventes para feixes de elétrons, para uma amostra poder ser examinada, deve ser preparada na forma de uma película muito fina.⁸⁰

Um microscópio eletrônico de transmissão consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de 10^{-5} mm Hg. Um microscópio de transmissão moderno possui cinco ou seis lentes magnéticas, além de várias bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas localizadas ao longo do caminho do feixe eletrônico.⁸¹

O poder de resolução atinge valores na faixa de 0,2 nm e permite a observação não apenas de pequenos detalhes morfológicos da microestrutura, mas também da estrutura cristalina dos materiais.⁸²

São três os principais mecanismos de contraste que geram aspectos bem diferentes nas imagens observadas: contraste por espessura de massa, quanto maior o número atômico, menor será o número de elétrons transmitidos e mais escura aparecerá a região na imagem; contraste por difração, os elétrons difratados podem ser removidos e permitem a observação de defeitos cristalinos e partículas de segunda fase; e contraste de fase recombinação dos feixes transmitidos e difratados no plano da imagem para resolução direta da rede cristalina.⁸²

Para a análise as amostras foram dissolvidas em uma solução de álcool isopropílico e colocadas no ultra-som por dois minutos. Retirou-se um pouco do sobrenadante. Com o auxílio de um conta-gotas, foi pingado em uma telinha própria para análise de MET algumas gotas dessa solução e esperou-se um tempo de 2 horas até a secagem completa para o início da análise.

As análises de MET têm por objetivo detectar a presença de defeitos e identificação de outras fases presentes na hidroxiapatita sintetizada e foram realizadas na Universidade Federal do Paraná (UFPR) no Laboratório de Microscopia em um equipamento de Microscopia Eletrônica de Transmissão da marca JEOL modelo 1200 EX II.

3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura se apresenta como a técnica que permite alcançar aumentos muito superiores aos da microscopia ótica. Dependendo do material pode atingir até 900 000 vezes, mas normalmente, em análises de materiais o aumento é da ordem de 10 000 vezes.⁸¹

O microscópio eletrônico de varredura é geralmente utilizado para observações de amostras espessas, ou seja não transparente a elétrons. Como resultado das interações do feixe de elétrons com a superfície da amostra, essas radiações fornecem informações características sobre a amostra como topografia da superfície, composição e estrutura cristalográfica e assim é utilizado para a análise microestrutural de materiais sólidos.^{81,82}

A caracterização morfológica da superfície das partículas de HAP e HAP/Col foram investigadas usando a Microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde foi possível a observação da forma e tamanho das partículas. Através da técnica de Energia Dispersiva de raios X (EDS) obtiveram-se resultados para a determinação dos teores de cálcio e fósforo das amostras.

Para as análises das amostras de HAP, HAP e colágeno e do colágeno puro foram preparadas uma suspensão dos pós em álcool isopropílico com o objetivo de separar os aglomerados. Após o preparo da suspensão as amostras foram colocadas sobre um suporte. Fez-se necessário esperar que o álcool isopropílico evaporasse. As amostras foram metalizadas com uma camada de Au.

As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura, utilizando um equipamento da marca SHIMADZU, modelo SS 550, acoplado a um sistema de detecção, EDS. As medidas foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos (LIMAC) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

3.2.8 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X

Através da identificação dos raios X emitidos pela amostra, na interação com o feixe eletrônico, é possível determinar a composição de regiões com até 1 μm de diâmetro. É uma técnica não destrutiva, podendo determinar quantidades de até 1-2% dos elementos presentes na amostra.⁸¹

Outra característica importante da microanálise é a possibilidade de se obter o mapa da composição da região em observação, permitindo que se correlacione a metalografia eletrônica com informações microcomposicional detalhada. Essa técnica permite a determinação qualitativa e quantitativa da composição de uma amostra em certa região e foi realizada por um detector de energia dispersiva acoplado ao microscópio eletrônico de varredura.⁸¹

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho incluem as caracterizações físico-químicas dos pós de hidroxiapatita obtidos pelo método de precipitação com secagem em estufa e liofilização. Serão apresentados e discutidos neste capítulo com base nas medidas realizadas utilizando-se espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e transmissão, EDS, análise granulométrica do tamanho de partículas, BET e análise térmica.

4.1 ANALISE TÉRMICA

As análises foram realizadas até a temperatura de 1200°C com taxa de aquecimento de 5°C/min em ar (atmosfera oxidante).

As figuras 10 e 11 ilustram as curvas de TG das amostras HAP-1 e HAP-Lio - 1. A perda de massa total foi de 8,09% para a amostra de hidroxiapatita seca em estufa e para a amostra HAP – Lio - 1 o total desta perda foi de 9,43%.

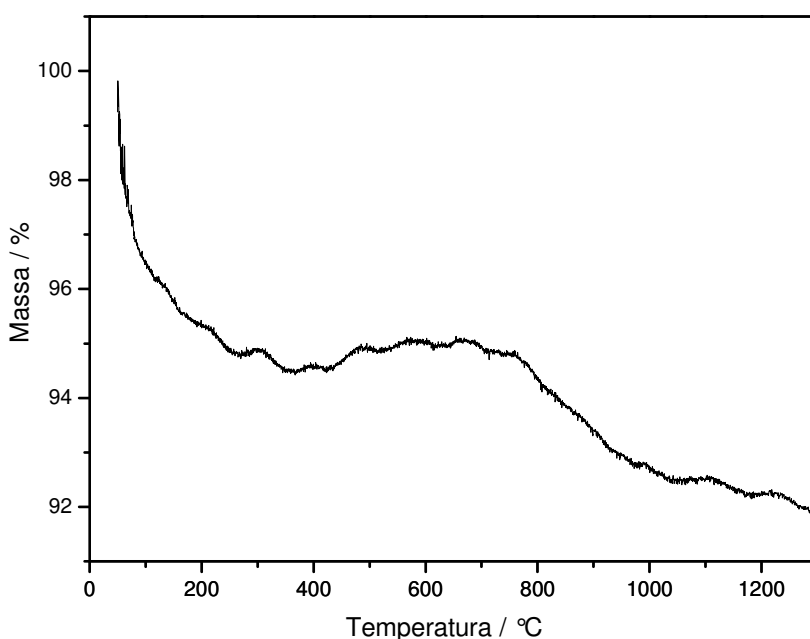


Figura 10 – Curva TG para a amostra HAP – 1 com envelhecimento de 1 dia e secagem em estufa (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).

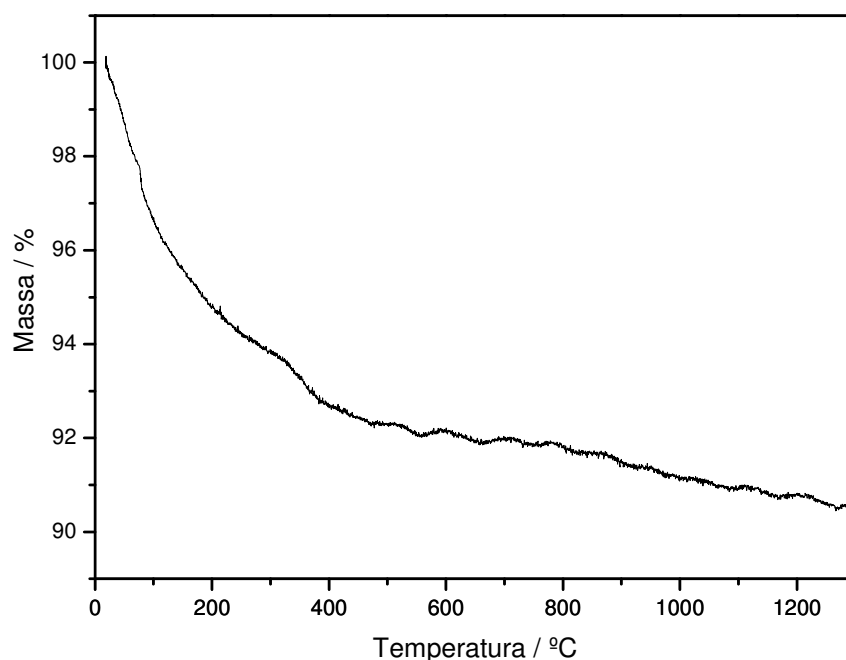


Figura 11 – Curvas de TG / DTA para a amostra HAP – Lio – 1 com envelhecimento de 1 dia e secagem em estufa. (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).

Para a amostra de HAP a perda de massa mais significativa, em torno de 5,5%, ocorre até a temperatura de aproximadamente 400°C, que pode estar associada à perda parcial de moléculas como H₂O e CO₂.⁴⁶

Após 400°C, a massa permanece praticamente constante, voltando a diminuir na faixa de 800-1000°C, possivelmente relacionada às reações de decomposição da hidroxiapatita deficiente em cálcio, podendo levar a formação de HAP estequiométrica e TCP e a eliminação completa das moléculas de CO₂, o que está de acordo com o verificado por Landi et al.⁴⁶ A partir da temperatura de 1000°C a contínua perda de massa pode estar associada a desidroxilação e/ou decomposição da hidroxiapatita.⁸³ Mostafa verificou que a amostra de Ca-dHAP tende a se transformar em β-TCP em torno de 900°C e que as amostras de HAP estequiométrica eram estáveis nesta temperatura.⁴⁸ Já Raynaud et al. verificou que aquecendo amostras em temperaturas diferentes, em faixas acima de 700 °C pode-se observar

a decomposição do material em HAP e β -TCP, e acima de 750 °C os picos de difração da HAP desaparecem por completo.⁴⁰

Nas figuras 12 e 13 estão ilustradas as curvas de TG das amostras de HAP/Col - 1 e HAP/Col – Lio – 1 e nas figuras 14 e 15 ilustram as curvas de TG das amostras HAP/Col – 30 e HAP/Col-Lio-30.

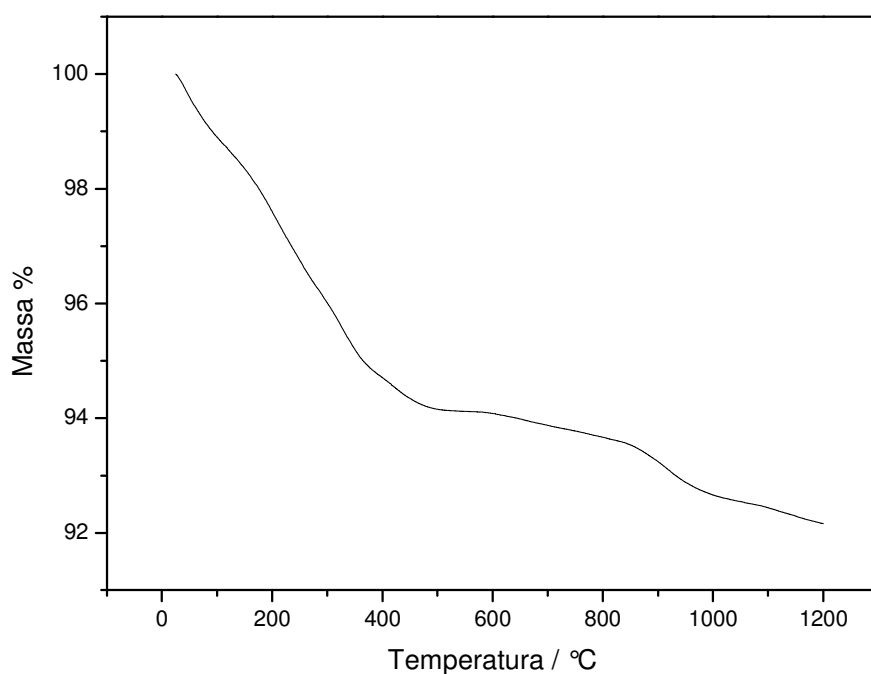


Figura 12 – Curvas de TG / DTA para a amostra HAP/Col – 1 com tempo de envelhecimento de 1 dia e secagem em estufa. (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).

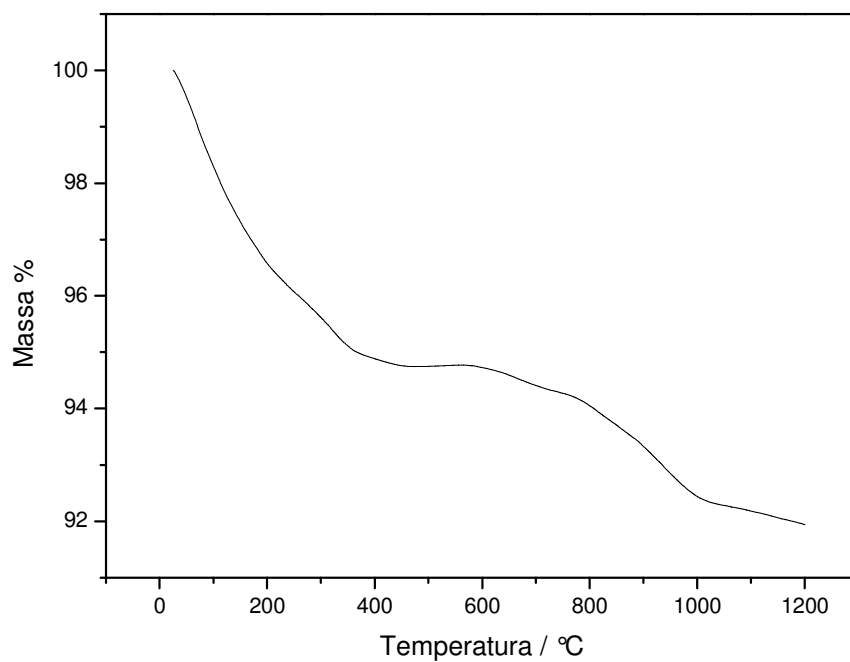


Figura 13 – Curvas de TG / DTA para a amostra HAP/Col – Lio – 1 com 1 dia de envelhecimento e liofilizada. (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).

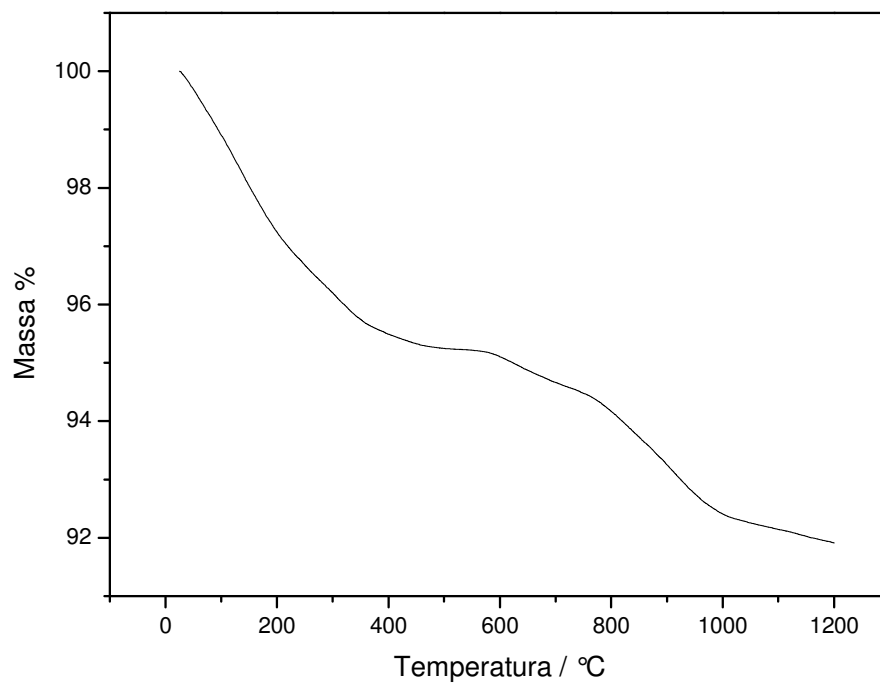


Figura 14 – Curvas de TG / DTA para a amostra HAP/Col - 30 com envelhecimento de trinta dias e secagem em estufa. (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).

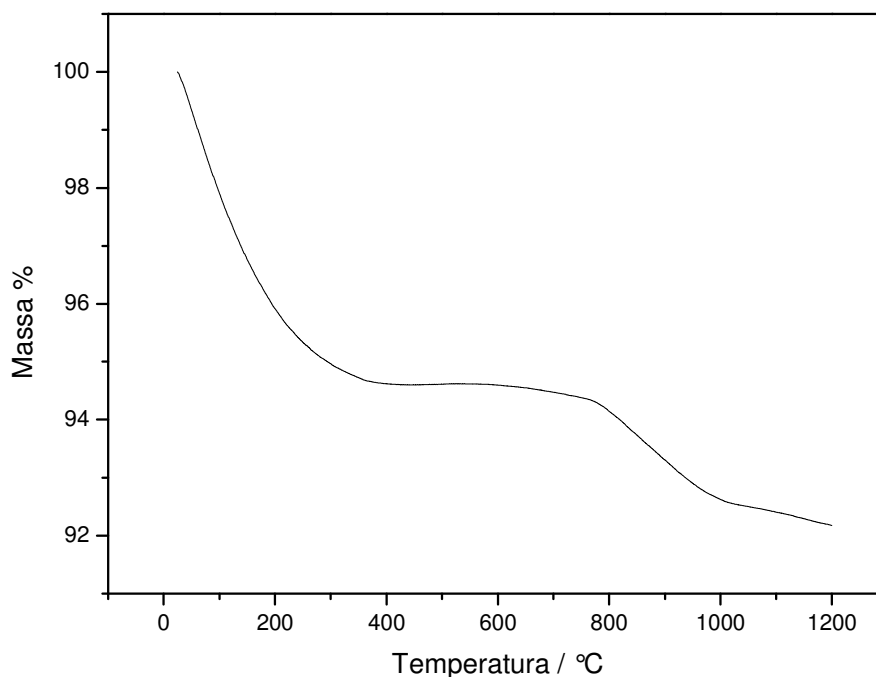


Figura 15 – Curvas de TG / DTA para a amostra HAP/Col – Lio – 30 com envelhecimento de trinta dias e liofilizada. (taxa de aquecimento de 5°C/min em ar).

Para as amostras com colágeno a perda de massa total foi de 7,8% para a amostra de hidroxiapatita associada ao colágeno seca em estufa e tempo de envelhecimento de um dia, e de 8,2% para a amostra de hidroxiapatita associada ao colágeno liofilizada e envelhecida por um dia, para a amostra envelhecida por trinta dias seca em estufa a perda de massa foi de 8,3% e para a amostra de hidroxiapatita associada ao colágeno envelhecida por trinta dias e liofilizada a perda de massa foi de 7,9%.

Diversas mudanças ocorrem na estrutura e estequiometria dos pós de hidroxiapatita quando submetidas a tratamentos térmicos. O aquecimento a temperaturas menores de 250°C induz à perda de água fisicamente adsorvida. Em temperaturas entre 250 - 400 °C, a água de cristalização e íons de impureza de HPO_4 são perdidos. Na faixa de temperatura entre 400 - 1000 °C, os íons de CO_3 (carbonato) do tipo-A que substituem os íons de OH^- na rede da HAP e do tipo-B que substituem os íons de PO_4^{3-} , são perdidos, geralmente isso começa por

volta de 550 °C e normalmente se completa entre 850 °C a 1000 °C. A perda de carbonato é normalmente seguida pela formação de CaO e hidroxiapatita.^{10,84}

Em temperaturas acima de 850 °C ocorre a desidratação da HAP, a perda de íons de OH⁻. A decomposição da HAP se dá a temperaturas acima de 1050 °C. Porém segundo estudos realizados por Yanbao Li, os pós de HAP são estáveis termicamente em temperaturas abaixo de 700 °C e se decompõe em β -TCP e HAP em temperaturas acima desse valor.^{84,85}

Picos forte em torno de 250-300 °C resultam da decomposição de material orgânico, que pode variar entre 200 a 450 °C, indicando a destruição e Pirólise de conformação de hélice de colágeno, e acima desse valor ocorre a carbonização. Os valores em tais temperaturas de degradação mostram que a forte interação entre moléculas orgânicas/inorgânicas muito influenciam a resistência térmica do material. Nas amostras de HAP/Col e HAP/Col-Lio foram observados essa decomposição na faixa de 250-300°, atribuídas a decomposição do colágeno presentes nas amostras. Aumentos de perdas de peso com o aumento de concentração de colágeno gradualmente são esperados.^{86,87,88}

Comparando-se os métodos de secagem nas amostras, observa-se que a amostra liofilizada de HAP apresentou uma maior perda de massa ao longo do programa de aquecimento da análise termogravimétrica, e comparando-se as amostras com colágeno, a amostra seca em estufa apresentou uma maior perda de massa em comparação com a amostra liofilizada. A diferença mais evidente na secagem é nos primeiros estágios de aquecimento, em torno de 400 °C, onde espera-se ocorrer a eliminação de água, pode-se sugerir que o processo mais eficaz na eliminação das moléculas de água seja pelo processo de secagem em estufa e garantir uma maior eliminação dessas moléculas, e nas amostras com colágeno apresentam picos fortes em torno de 250-300 °C referentes a decomposição do colágeno.

4.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO

Os espectros de IV dos pós de HAP e HAP/Col obtidos com diferentes tempos de envelhecimento e pelos métodos de secagem em estufa e liofilização são apresentados nas figuras 16 -19. As bandas observadas nestes espectros estão apresentadas na tabela 6.

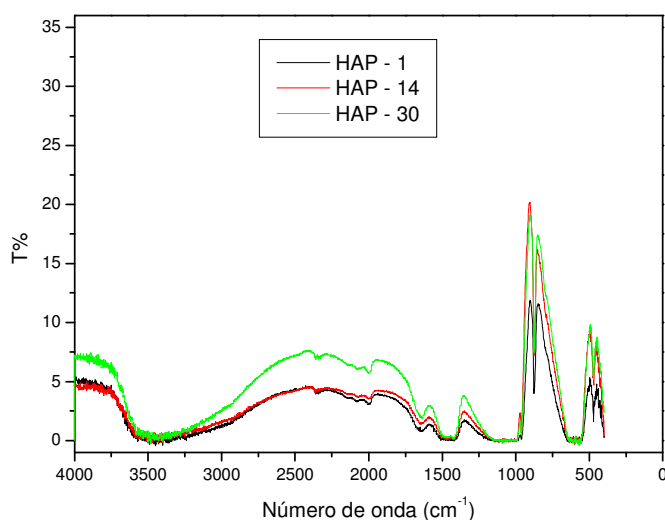


Figura 16 – Espectros de IV das amostras de HAP – 1, HAP – 14, HAP – 30 com envelhecimento de 1, 14 e 30 dias respectivamente com secagem em estufa, preparadas na forma de pastilhas de KBr.

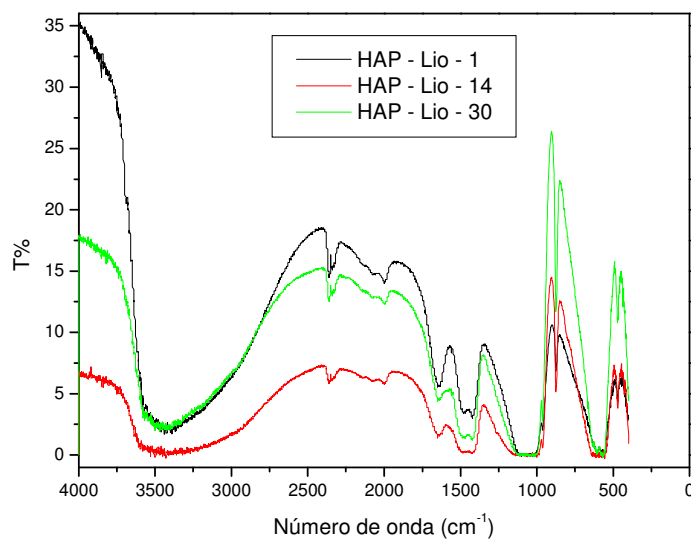


Figura 17 – Espectros de IV das amostras de HAP – Lio – 1, HAP – Lio – 14, HAP – Lio – 30 com envelhecimento de 1, 14 e 30 dias respectivamente liofilizadas, preparadas na forma de pastilhas de KBr.

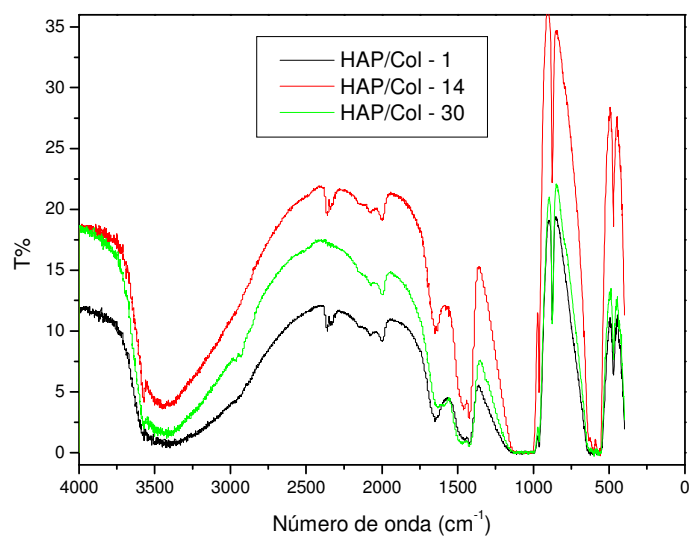


Figura 18 – Espectros de IV das amostras de HAP/Col – 1, HAP/Col – 14, HAP/Col – 30 com envelhecimento de 1, 14 e 30 dias respectivamente com secagem em estufa, preparadas na forma de pastilhas de KBr.

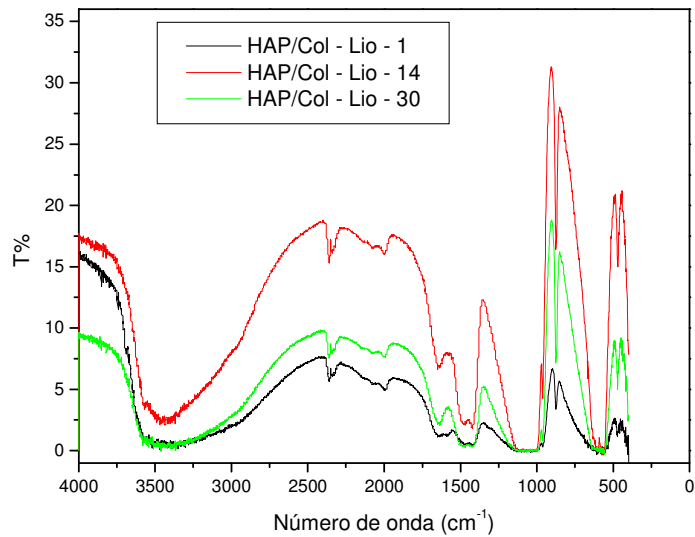


Figura 19 – Espectros de IV das amostras de HAP/Col – Lio – 1, HAP/Col – Lio – 14, HAP/Col – Lio – 30 com envelhecimento de 1, 14 e 30 dias respectivamente liofilizadas, preparadas na forma de pastilhas de KBr.

Tabela 6 – Bandas de IV observadas nos pós de hidroxiapatita obtidos.

Grupo	HAP - 1	HAP - 14	HAP - 30	HAP- Lio - 1	HAP- Lio - 14	HAP- Lio - 30	HAP/ Col - 1	HAP/ Col - 14	HAP/ Col - 30	HAP/ Col - Lio - 1	HAP/ Col - Lio- 14	HAP/ Col - Lio - 30
OH ⁻ v	3575	3575	3566	3575	3610	3575	3550	3550	3575	3550	3550	3550
δ	652	650	650	670	670	670	635	635	635	628	628	628
H ₂ O v	----	----	----	----	----	----	----	----	3498	----	----	3498
v	1672	1672	1672	1650	1650	1650	1680	1680	1680	1685	1685	1685
CO ₂	2358	2358	2358	2355	2355	2355	2355	2355	2355	2365	2365	2365
	2329	2349	2339	2329	2329	2329	2325	2325	2325	2320	2320	2320
PO ₄ ³⁻ δ	1980	1980	1980	1950	1951	1951	1985	1985	1985	1991	1991	1991
v	1050	1050	1050	1070	1070	1070	1055	1055	1055	1055	1055	1055
v	----	----	----	980	980	980	998	999	998	975	975	975
δ	598	598	598	555	555	555	605	605	605	605	605	605
δ	545	545	545	478	478	478	565	565	565	570	570	570
δ	470	470	470	398	398	398	485	485	485	493	493	493
CO ₃ ²⁻	1475	1475	1475	1465	1465	1465	1458	1458	1458	1475	1475	1475
	----	----	----	1420	1420	1420	1425	1425	1425	1438	1438	1438
	873	873	873	868	868	868	875	875	875	875	879	875
HPO ₄ ²⁻	873	873	873	868	868	868	875	875	875	875	879	875
NH v	----	----	----	----	----	----	****	****	****	****	****	****
δ	----	----	----	----	----	----	1565	1565	1565	1570	1570	1570
δ	----	----	----	----	----	----	1467	1467	1467	1472	1472	1472
C=O v	----	----	----	----	----	----	1645	1645	1645	1653	1653	1653
R- COO- v assim	----	----	----	----	----	----	1680	1680	1680	1677	1677	1677
	----	----	----	----	----	----	1550	1550	1550	1555	1555	1555
v sim	----	----	----	----	----	----	1400	1400	1400	1400	1400	1400
R- COOH v	----	----	----	----	----	----	****	****	****	****	****	****
v	----	----	----	----	----	----	1710	1710	1710	1705	1705	1705
v	----	----	----	----	----	----	1420	1420	1420	1430	1430	1430
δ	----	----	----	----	----	----	1315	1315	1315	1320	1320	1320

(v = estiramento e δ= deformação)

Foram observadas em todas as amostras com pequenas variações, bandas de estiramento de O-H em aproximadamente 3575cm⁻¹ do grupo hidroxila da HAP, e o estiramento de P-O (de grupos PO₄³⁻) entre 1070 a 1050 nas amostras com exceção das secas em estufa em todos os tempos de envelhecimento, sendo observado apenas uma única banda em torno de 1055 cm⁻¹, bem como O-H de água absorvida nas regiões de 3498cm⁻¹ observadas com maior evidência apenas nas amostras de HAP/Col com envelhecimento de 30 dias secas em estufa e liofilizadas e isto é devido ao método de secagem utilizado, e uma banda em torno de 1685 a 1650 cm⁻¹ também referentes ao O-H da água. A presença de

bandas de deformação P-O (de grupo PO_4^{3-}) em torno de 1985, 605, 565 e 485 cm^{-1} e de O-H (do grupo OH^- , da hidroxiapatita) a 650 cm^{-1} também estão presentes nestes espectros.

As bandas observadas na região de 2355 e 2329 cm^{-1} e identificadas em todas as amostras podem ser atribuídas ao CO_2 do ambiente absorvido durante a reação, já o dubleto em 1465-1420 cm^{-1} observado nas amostras com exceção apenas das amostras com HAP secas em estufa que apresentaram apenas uma banda em torno de 1475 cm^{-1} e a banda em torno de 875 cm^{-1} identificadas em todas as amostras típicas do grupo CO_3^{2-} , características da hidroxiapatita carbonatada. De acordo com Elliot (1994), a existência de uma banda em 873 cm^{-1} e de duas bandas em torno de 1420 e 1455 cm^{-1} indicam a presença do grupo CO_3^{2-} , característicos da hidroxiapatita carbonatada do tipo B.²⁹

A explicação para o aparecimento da banda atribuída ao CO_2 deve-se ao fato da presença dessa molécula na atmosfera e que pode ter sido absorvida pelas soluções durante a síntese na forma de íons CO_3^{2-} , incorporando-se na estrutura da hidroxiapatita com grande facilidade, em substituição aos íons PO_4^{3-} ou aos íons OH^- do retículo cristalino. A quantidade de CO_3^{2-} incorporado na apatita é dependente da concentração deste íon na solução, e de acordo com a literatura a quantidade máxima é de 22% (em massa) e maiores concentrações podem levar a formação da calcita.^{29,83, 89}

Existem dois tipos de apatitas carbonatadas, de acordo com o tipo de substituição do grupo CO_3^{2-} : tipo A, quando substitui o sítio dos íons OH^- , e tipo B quando substitui os íons PO_4^{3-} . Pode-se utilizar os espectros de infravermelho para identificar o tipo de substituição do íon carbonato, uma vez que para a apatita carbonatada tipo A há o aparecimento de um dubleto em 1528 e 1465 cm^{-1} e para a do tipo B em 1455 e 1413 cm^{-1} , dessa maneira pode-se concluir que o íon carbonato está substituindo o sítio dos grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$ caracterizando uma CHAP do tipo B.²⁹

A presença do CO_2 das amostras também pode ser comprovada pelos resultados obtidos nas análises por EDS que mostram uma razão Ca/P maior em relação ao valor teórico para a HAP que deveria ser de 1,667, isto foi referenciado teoricamente nos estudos de MIYAKE, et al., mostram que em hidroxiapatitas sintéticas a substituição de um grupo fosfato da célula unitária da HAP por um grupo carbonato, faz com que a razão molar Ca/P suba de 1,67 para 2,00. Como o material foi produzido em atmosfera aberta e em solução aquosa, é provável que tenha ocorrido a incorporação de CO_3^{2-} provenientes do ar.⁹⁰

Os espectros de infravermelho das amostras sintetizadas, com a adição de colágeno são semelhantes, indicando que sua presença não provocou mudança nas faixas de absorção dos grupos funcionais da hidroxiapatita. O aparecimento de bandas, por exemplo, em aproximadamente 1390 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} , respectivamente, que são referentes aos grupos COO^- e do grupo amida do colágeno, podem ser associadas a sua exclusividade nas amostras. Apenas as bandas próximas a 1660 cm^{-1} foram observadas. O não aparecimento dessas bandas está relacionado à sobreposição das bandas da hidroxiapatita formada sobre as bandas do colágeno.⁸³

O alargamento das bandas que se localizam nas regiões 590 a 610 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} indica materiais pouco cristalinos. Um aumento do teor de carbonato nas amostras contribui para a diminuição da cristalinidade. Sua presença também afeta a estabilidade térmica da HAP, resultando na decomposição em CaO como fase secundária.^{45, 91}

4.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Para uma possível aplicação dos pós obtidos é necessário identificar as fases cristalográficas presentes no material, para verificar se houve obtenção da HAP. Assim, a identificação do material obtido, bem como as modificações estruturais provocadas pelas

variações no tempo de envelhecimento e secagem foi estudada a partir das medidas de difratometria de raios X. A cristalinidade da HAP foi avaliada qualitativamente pelos picos de difração de raios X, pois amostras contendo picos acentuados e agudos tem maior cristalinidade do que amostras que apresentem picos de difração largos e de baixa intensidade.

As figuras 20, 21, 22, 23, 24 e 25 apresentam os difratogramas de raios X dos pós de hidroxiapatita (HAP) obtidos sem a presença de colágeno secas em estufa e liofilizadas e as figuras 26, 27, 28, 29, 30 e 31 apresentam os difratogramas das amostras de raios X dos pós de hidroxiapatita e colágeno.

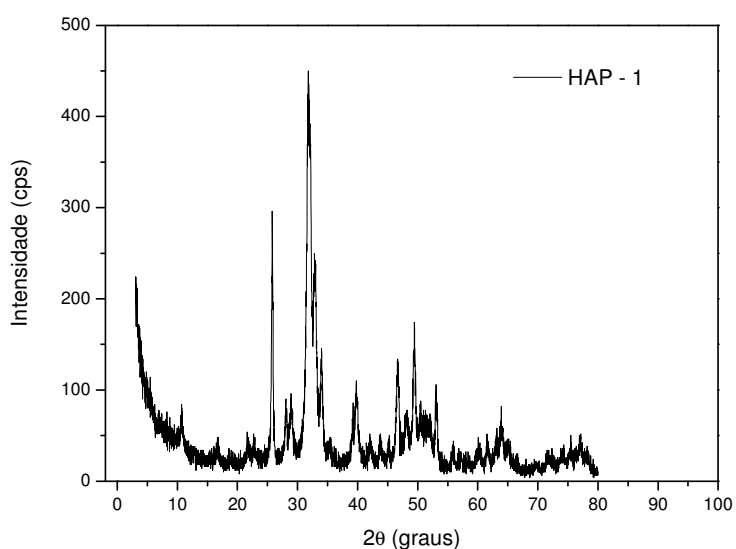


Figura 20 – Difratograma de raios X da amostra de HAP, tempo de envelhecimento de 1 dia e secagem em estufa

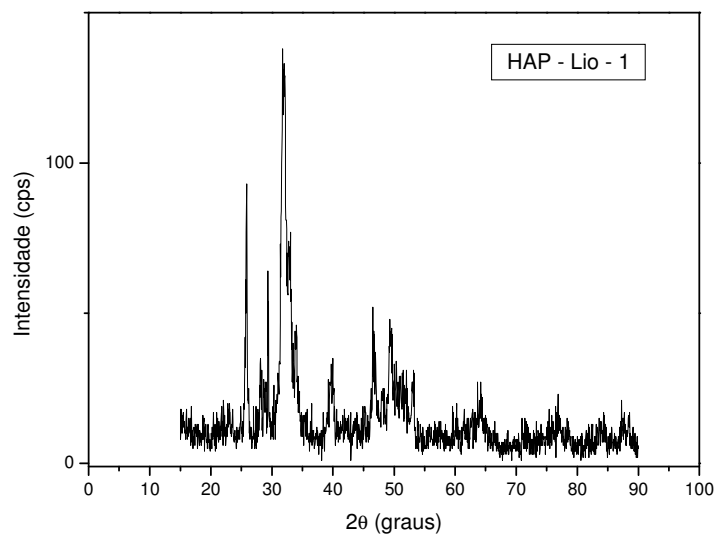


Figura 21 – Difratoograma de raios X da amostra de HAP tempo de envelhecimento de 1 dia e liofilizada.

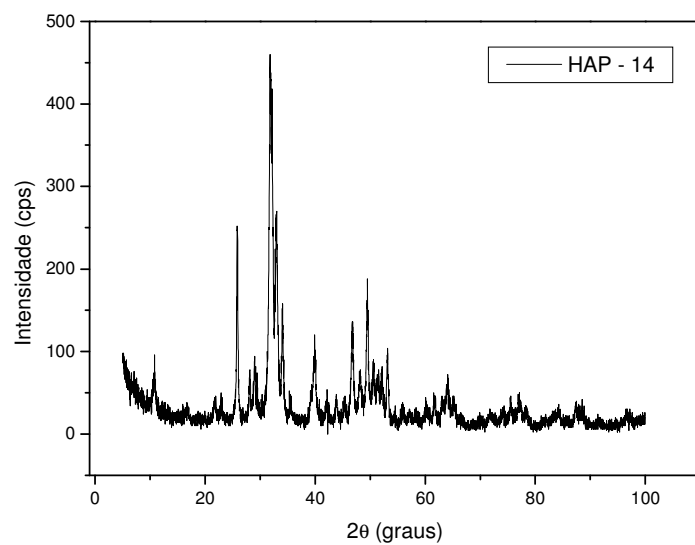


Figura 22 – Difratoograma de raios X da amostra de HAP, tempo de envelhecimento de 14 dias e secagem em estufa

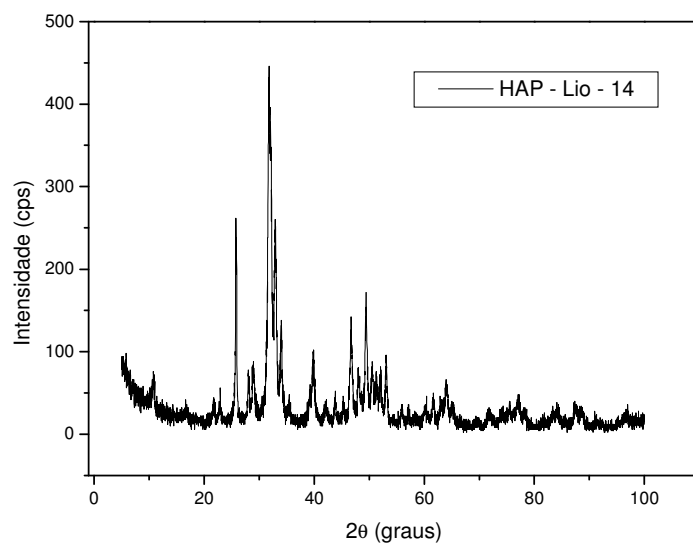


Figura 23 – Difratoograma de raios X da amostra de HAP, tempo de envelhecimento de 14 dias e liofilizada.

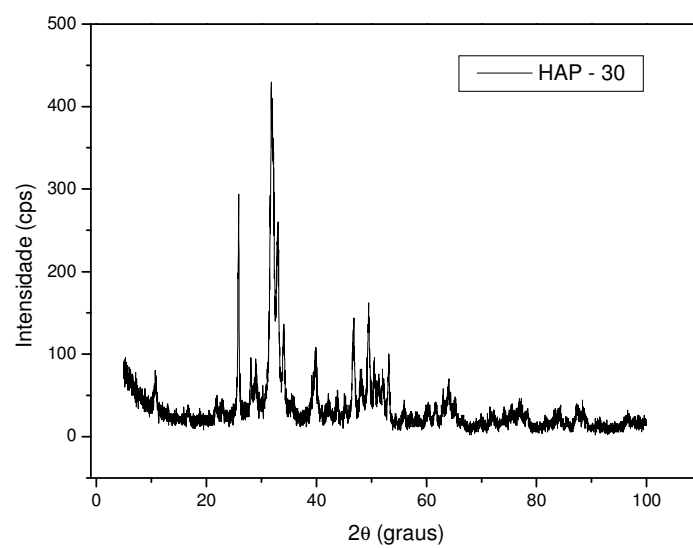


Figura 24 – Difratoograma de raios X da amostra de HAP, tempo de envelhecimento de 30 dias e secagem em estufa

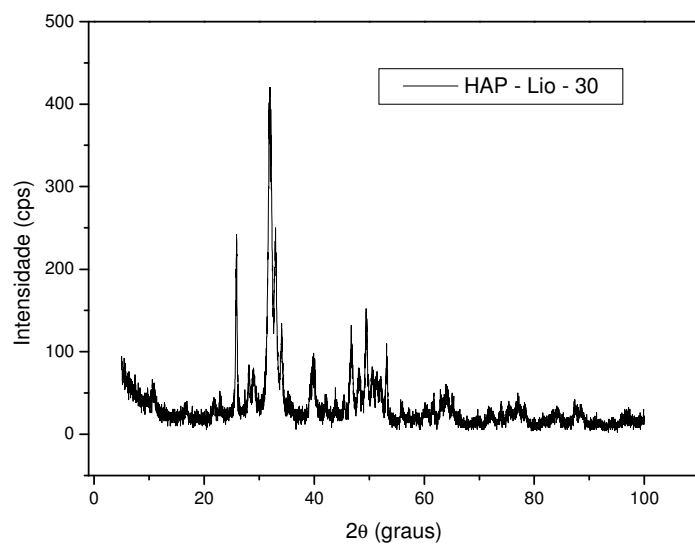


Figura 25 – Difratoograma de raios X da amostra de HAP, tempo de envelhecimento de 30 dias e liofilizada.

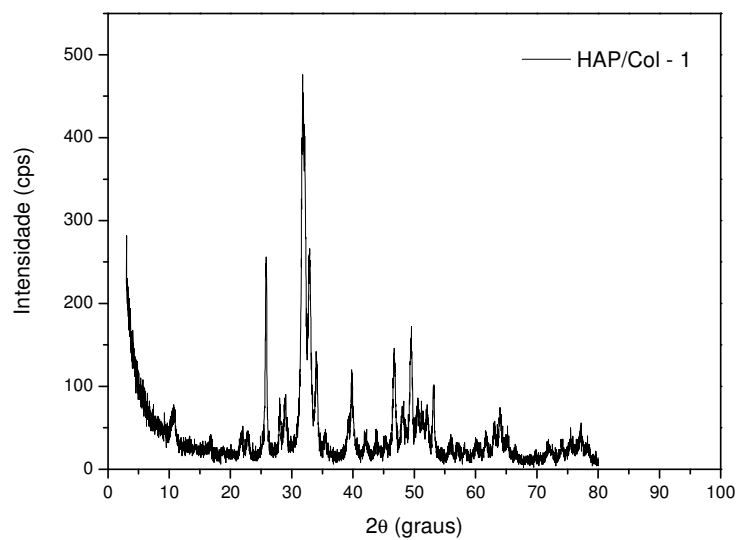


Figura 26 – Difratoograma da amostra de HAP/Col, tempo de envelhecimento de 1 dia e secagem em estufa.

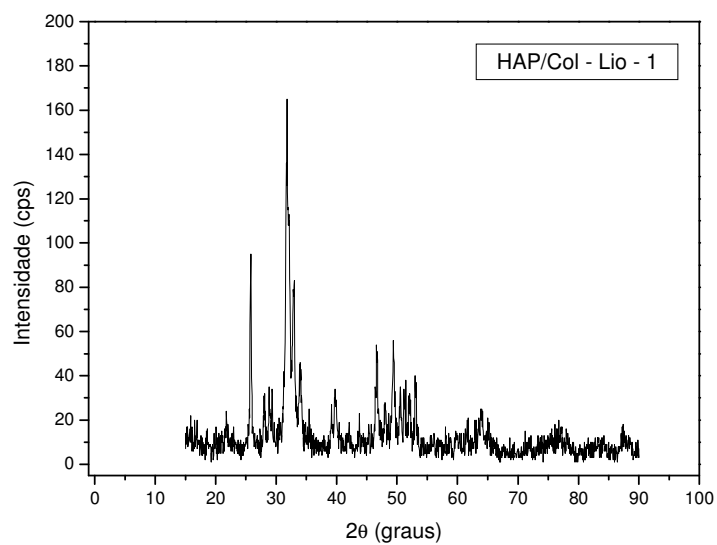


Figura 27 – Difratoograma da amostra de HAP/Col, tempo de envelhecimento de 1 dia e liofilizada

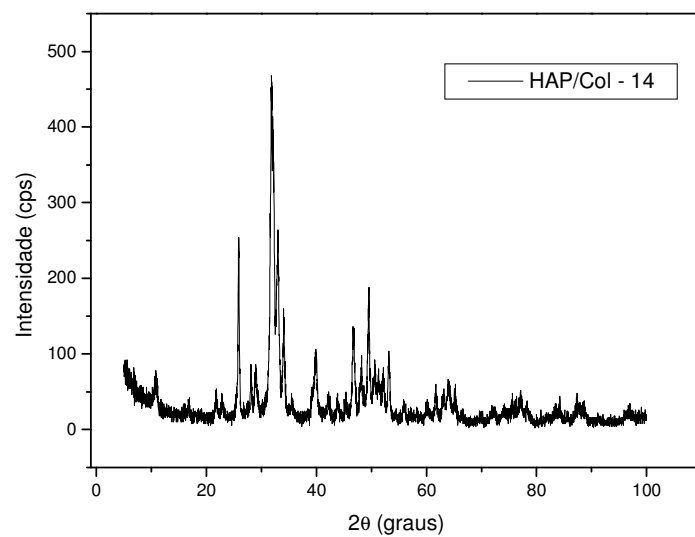


Figura 28 – Difratoograma da amostra de HAP/Col, tempo de envelhecimento de 14 dias e secagem em estufa.

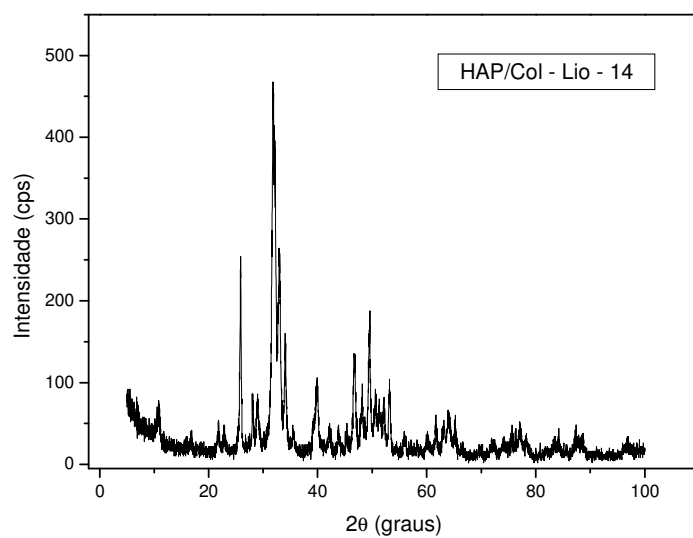


Figura 29 – Difratoograma da amostra de HAP/Col, tempo de envelhecimento de 14 dias e liofilizada.

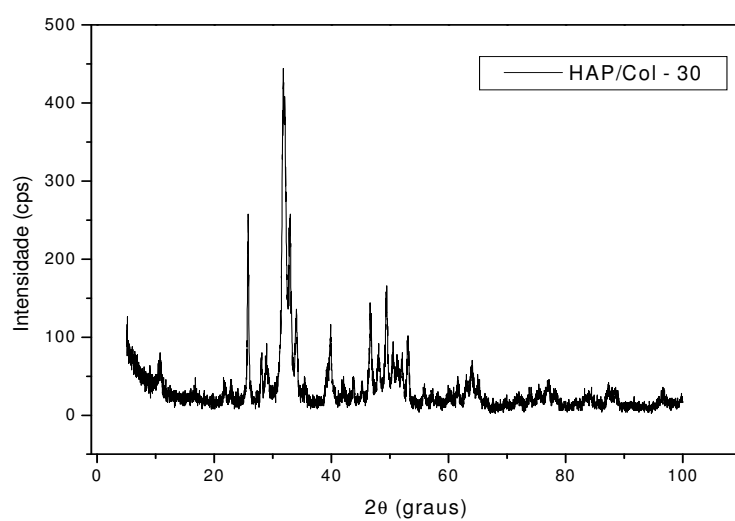


Figura 30 – Difratoograma de raios X da amostra de HAP/Col – 30, tempo de envelhecimento de 30 dias e secagem em estufa.

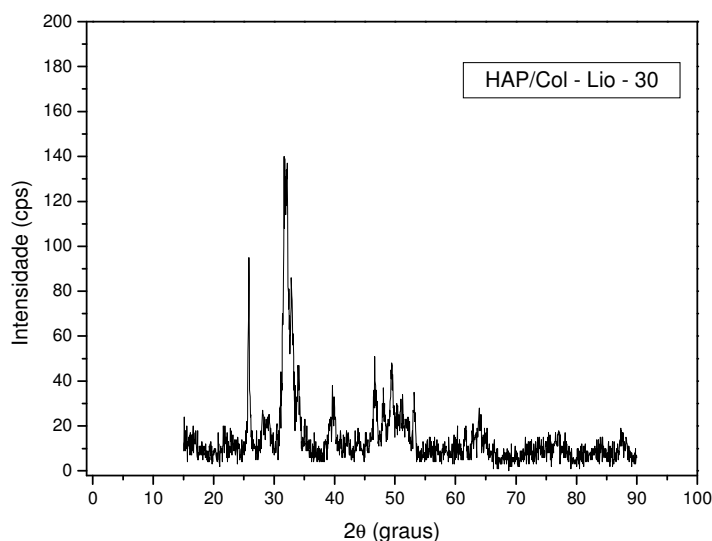


Figura 31 – Difratograma de raios X da amostra de HAP/Col – Lio - 30, tempo de envelhecimento de 30 dias e liofilizada.

Pela análise comparativa do difratograma padrão disponível no banco de dados JCPDS (Ficha 9-432) verifica-se a presença de picos característicos da hidroxiapatita em todas as amostras.

Dois grupos de picos de reflexão de DRX podem ser usados para monitorar a formação da HAP; um em $2\theta = 26,0^\circ$ e o outro grupo está variando de $2\theta = 31,8^\circ$ (211) ao $2\theta = 32,9^\circ$ (112) e $39,8^\circ$ (310).⁹²

A dificuldade da observação das reflexões nas regiões de 25° e entre $31-34^\circ$ pode estar relacionada a presença de grupamentos carbonatos na estrutura da HAP formada, uma vez que as reflexões para HAP e hidroxiapatita carbonatada são: $25,90^\circ$; $31,80^\circ$ e $32,93^\circ$ (Ficha JCPDS 9-432) e $25,75^\circ$; $32,19^\circ$ e $33,43^\circ$ (Ficha JCPDS 19-272), respectivamente.³³

Entretanto, nas amostras sintetizadas verificou-se a formação de hidroxiapatita carbonatada do tipo B (CHAP-B), uma vez que, foi possível verificar a partir de análises de IV que os grupos PO_4^{3-} estavam sendo substituídos por grupos CO_3^{2-} levando a formação de apatita carbonatada, os grupos PO_4^{3-} ou OH^- , ou ambos, são substituídos pelo grupo CO_3^{2-} .

Em todas as amostras obtidas observa-se um determinado grau de cristalinidade com uma variação na largura e intensidade dos picos. Nos difratogramas apresentados nas figuras HAP/Col -Lio-1 e HAP/Col-Lio-30, com a presença de colágeno nota-se uma pequena variação na cristalinidades das amostras e na amostra de HAP-Lio-1 sem a presença de colágeno. Provavelmente, a alteração desse parâmetro está relacionada com o aumento do tempo de envelhecimento e nas condições de síntese. Na temperatura da aproximadamente 40°C e pH em torno de 12, o colágeno em solução aquosa dissocia as ligações iônicas porque a maioria dos grupos carboxílicos mudam para a forma protonada, resultando na interação entre os íons Ca^{2+} e íons R-COO^- , formando os íons complexos Cálcio-colágeno. Estes complexos podem interagir com os íons PO_4^{3-} devido aos efeitos de supersaturação, e espera-se que o grau de cristalização da fase HAP diminua com o índice crescente de colágeno.^{23,52}

Pode-se observar picos de difração menos acentuados e mais largos nas amostras de HAP-Lio-1, HAP/Col-Lio-1 e HAP/Col-Lio-30 que caracterizam uma baixa cristalinidade destas amostras e acredita-se que podem estar associadas a presença de carbonato.

4.4 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DO TAMANHO DE PARTÍCULAS

As Figuras 32, 33, 34, 35, 36 e 37 apresentam, respectivamente, os histogramas das distribuições granulométricas e volume dos pós de HAP e HAP/Col que foram submetidas a secagem em estufa e liofilizadas e a tabela 10 mostram os resultados obtidos. A distribuição de tamanho de partículas das amostras foi determinada por difração a laser, que avalia somente os aglomerados ou partículas suspensas no solvente.

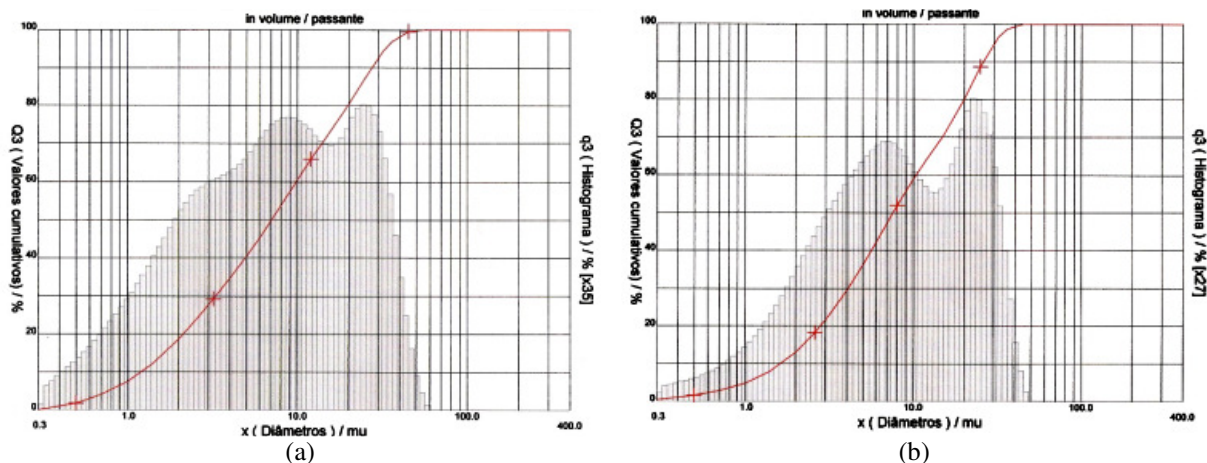


Figura 32 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP com tempo de envelhecimento de um dia e com secagem em estufa; (b) HAP com tempo de envelhecimento de um dia e liofilizada.

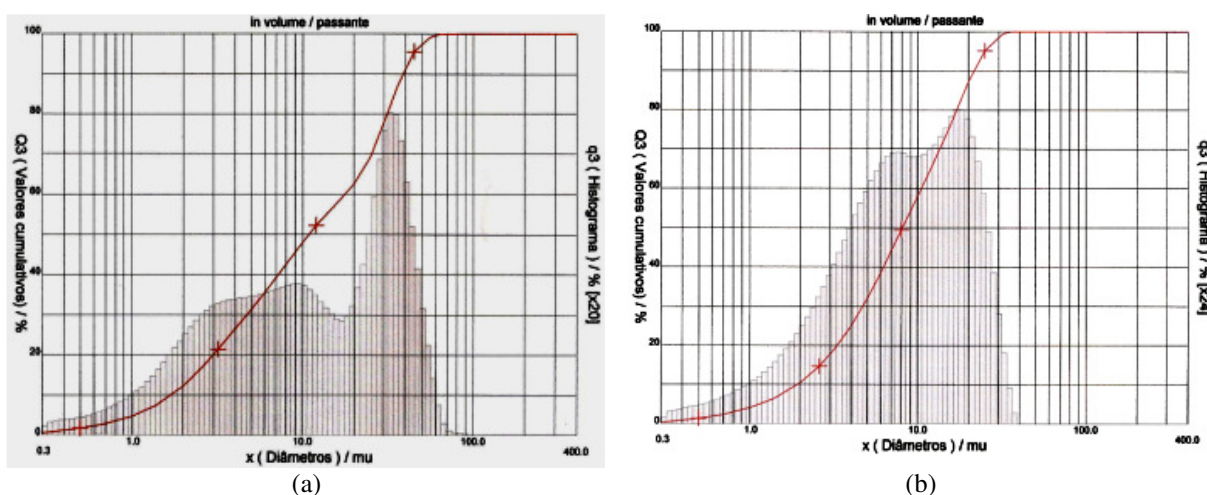


Figura 33 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP/Col com tempo de envelhecimento de um dia e com secagem em estufa; (b) HAP/Col com tempo de envelhecimento de um dia e liofilizada.

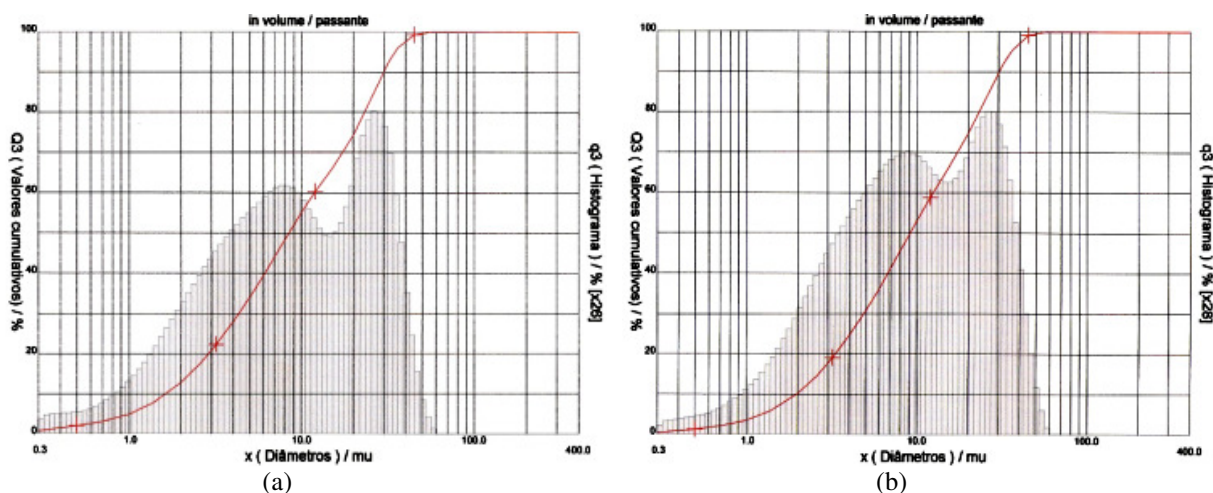


Figura 34 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP com tempo de envelhecimento de quatorze dias e com secagem em estufa; (b) HAP com tempo de envelhecimento de quatorze dias e liofilizada.

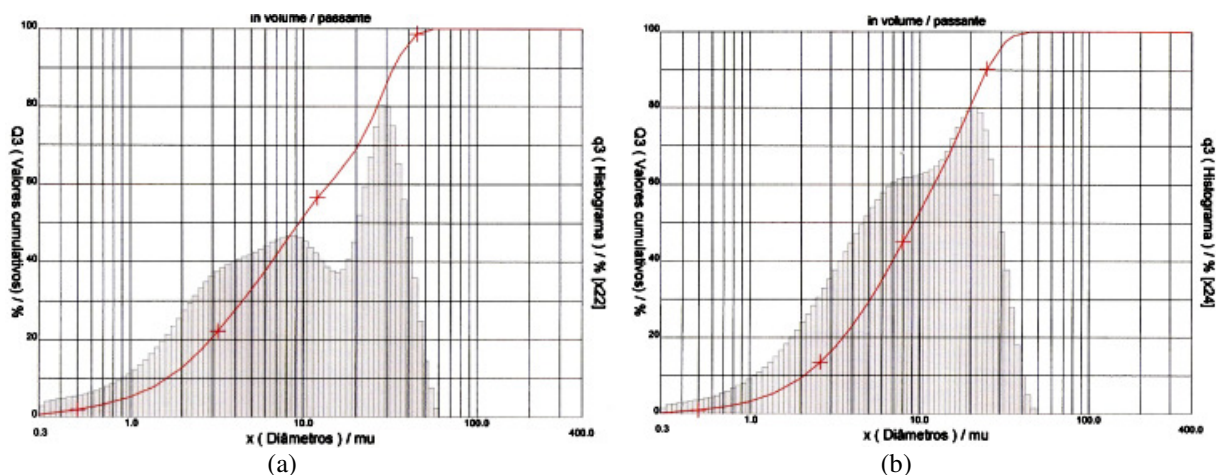


Figura 35 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP/Col com tempo de envelhecimento de quatorze dias e com secagem em estufa; (b) HAP/Col com tempo de envelhecimento de quatorze dias e liofilizada.

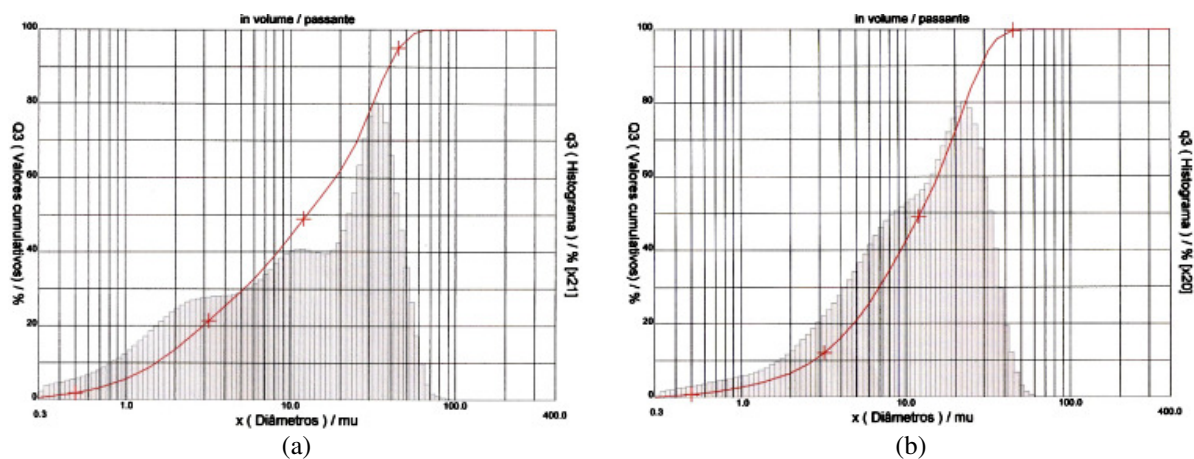


Figura 36 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP com tempo de envelhecimento de trinta dias e com secagem em estufa; (b) HAP com tempo de envelhecimento de trinta dias e liofilizada.

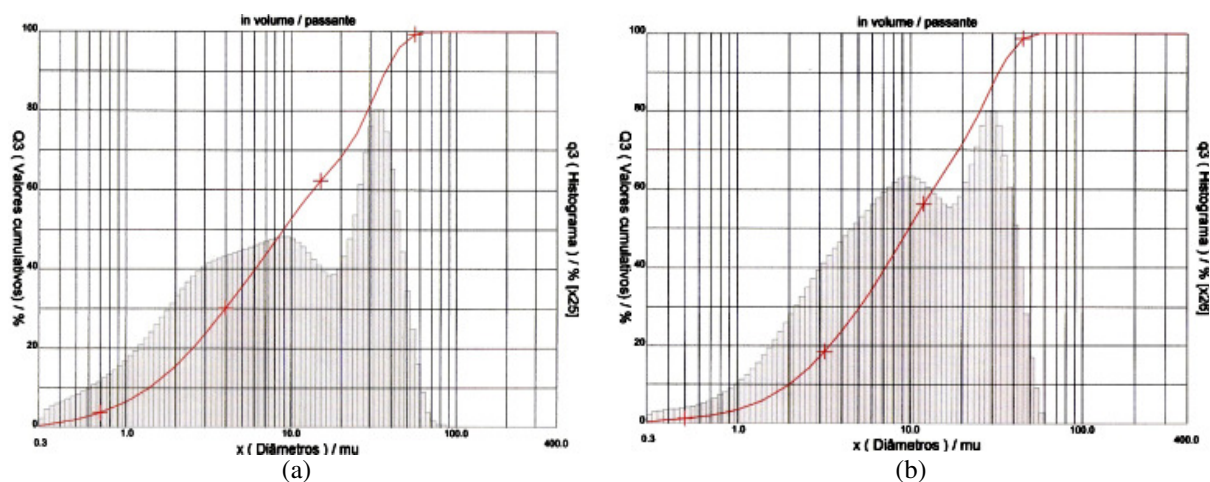


Figura 37 – Histograma da distribuição granulométrica e volume passante das amostras de: (a) HAP/Col com tempo de envelhecimento de trinta dias e com secagem em estufa; (b) HAP/Col com tempo de envelhecimento de trinta dias e liofilizada.

A formação dos aglomerados das partículas de HAP podem ser explicados pelo mecanismo de agregação-aglomeração-crescimento-nucleação proposto por Rodriguez et. al., de acordo com esse mecanismo, a formação das partículas se dá por: nucleação e crescimento para formar cristais de tamanho nanométrico; agregação de nanocristais por atrações físicas; crescimento de cristais adicionais dentro dos agregados para formar aglomerados estáveis que continuam a crescer distintamente na faixa de tamanho micrométrico. Segundo Gomez-Morales et al. citado por Mosfata et al., os processos de agregação das partículas são dirigidos por forças diferentes; na escala nanométrica/coloidal, a minimização da energia superficial livre seria responsável pela agregação, enquanto cargas elétricas superficiais seriam responsáveis pela agregação de partículas de escala micrométrica. Estes fatores poderiam explicar a presença de duas faixas de tamanho de partículas observadas nas amostras sintetizadas, provavelmente decorrentes de um processo de agregação primário, com partículas de tamanho submicrométrico, que continuam a crescer até alcançar tamanhos maiores (micrométrico), explicando a presença da segunda faixa da distribuição do tamanho de partículas.^{83,93,94}

Na Tabela 7 apresentam-se os dados de distribuição do tamanho de partículas para os pós das amostras de HAP e HAP/Col secas em estufa e liofilizadas.

Tabela 7 – Resumo das distribuições granulométricas dos pós

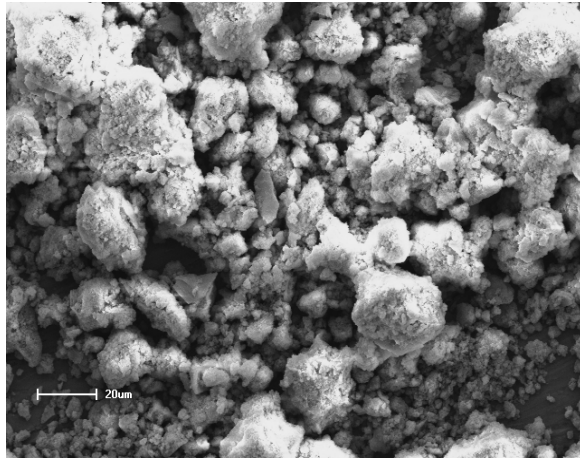
Amostra	Diâmetro a 10 %	Diâmetro a 50 %	Diâmetro a 90 %	Diâmetro Médio
HAP – 1 dia	1,2 µm	7,08 µm	31,6 µm	13,29 µm
HAP-Col – 1 dia	1,75 µm	11,5 µm	39,7 µm	17,65 µm
HAP – 14 dias	1,76 µm	8,58 µm	29,90 µm	13,41 µm
HAP-Col – 14 dias	1,64 µm	9,29 µm	33,09 µm	14,67 µm
HAP – 30 dias	1,58 µm	12,54 µm	36,48 µm	16,86 µm
HAP-Col – 30 dias	1,39 µm	8,69 µm	37,90 µm	15,99 µm
HAP – Lio - 1 dia	1,62 µm	7,57 µm	26,07 µm	11,15 µm
HAP-Col – Lio - 1 dia	1,93 µm	8,09 µm	21,63 µm	10,24 µm
HAP – Lio – 14 dias	1,98 µm	9,13 µm	30,32 µm	13,15 µm
HAP-Col – Lio – 14 dias	2,09 µm	9,23 µm	24,87 µm	11,78 µm
HAP – Lio – 30 dias	2,74 µm	12,27 µm	28,89 µm	14,34 µm
HAP/Col – Lio – 30 dias	2,01 µm	9,87 µm	32,53 µm	14,16 µm

Comparando as figuras 32, 33, 34, 35, 36 e 37, nota-se que as amostras de hidroxiapatita convencional apresenta-se com uma granulometria mais fina que as amostras associadas ao colágeno, com exceção apenas da amostra com envelhecimento de trinta dias e com secagem em estufa; já nas amostras de HAP e HAP/Col liofilizadas pode-se observar que as partículas nos pós apresentam-se com tamanhos muito próximos com exceção apenas das amostras obtidas com envelhecimento de quatorze dias que a HAP apresentou um tamanho maior em comparação a amostra HAP/Col com mesmo tempo de envelhecimento.

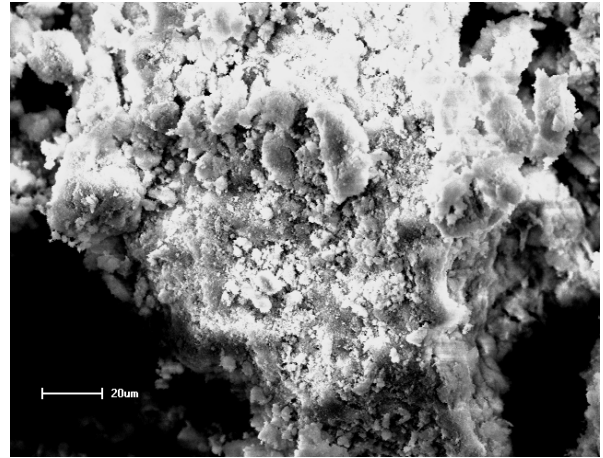
Observou-se através dos dados obtidos dos diâmetros médios das partículas dos pós que apresentam-se com tamanhos maiores nas amostras HAP/Col com um dia de envelhecimento, HAP e HAP/Col com trinta dias de envelhecimento nas amostras secas em estufa e HAP e HAP/Col com envelhecimento de trinta dias para as amostras liofilizadas. Os menores tamanhos foram encontrados nas amostras HAP e HAP/Col com um dia de envelhecimento e HAP/Col com envelhecimento de quatorze dias, liofilizadas obtidas na faixa de 10 a 12 μm .

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E EDS DOS PÓS

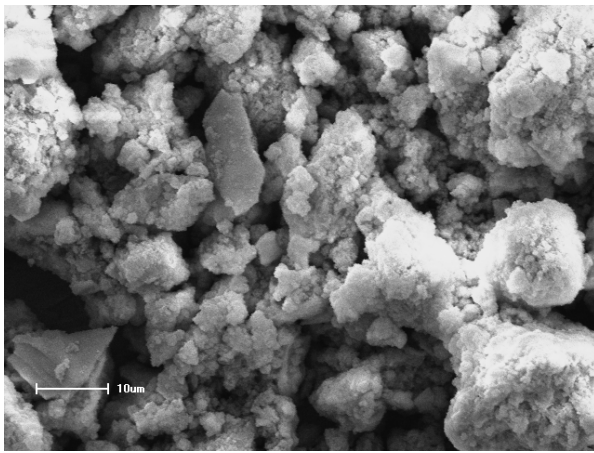
A estrutura e a superfície das partículas de HAP pura e associadas ao colágeno foram investigadas usando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias das figuras 38, 40 e 42, mostram os detalhes da estrutura e superfície das amostras de HAP sintetizadas e secas em estufa a uma temperatura de 100 °C, por um período de vinte e quatro horas comparadas às amostras de HAP sintetizadas e liofilizadas com tempos de envelhecimento de 1, 14 e 30 dias. As micrografias das figuras 39, 41 e 43, mostram os detalhes da estrutura e superfície das amostras de HAP/Col sintetizadas e secas em estufa a uma temperatura de 100 °C por um período de vinte e quatro horas comparadas as amostras de HAP/Col sintetizadas e liofilizadas com tempos de envelhecimento de 1, 14 e 30 dias.



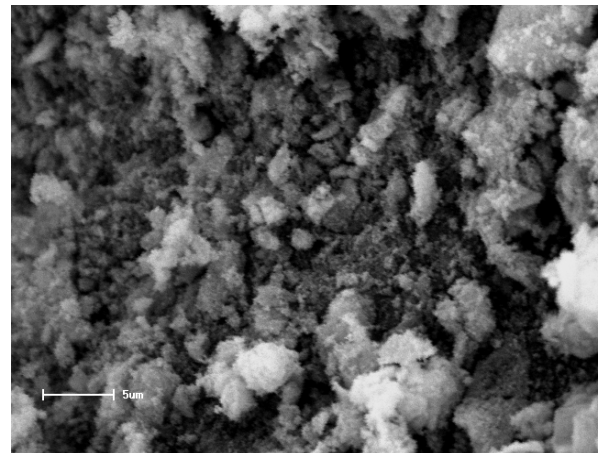
(a)



(b)

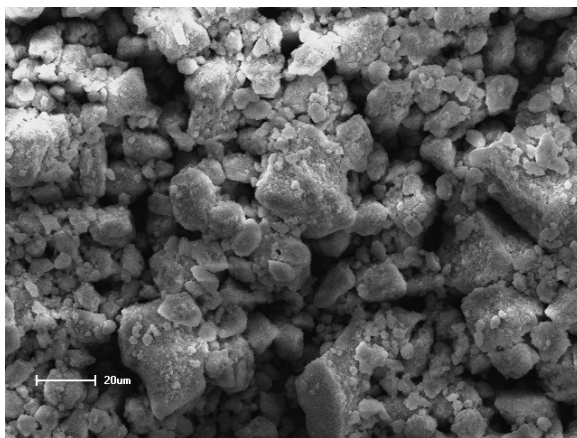


(c)

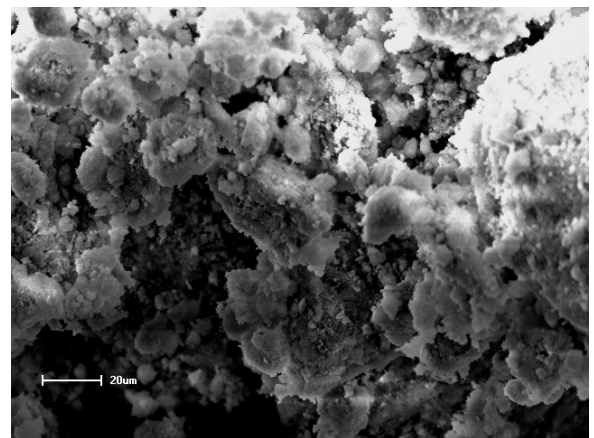


(d)

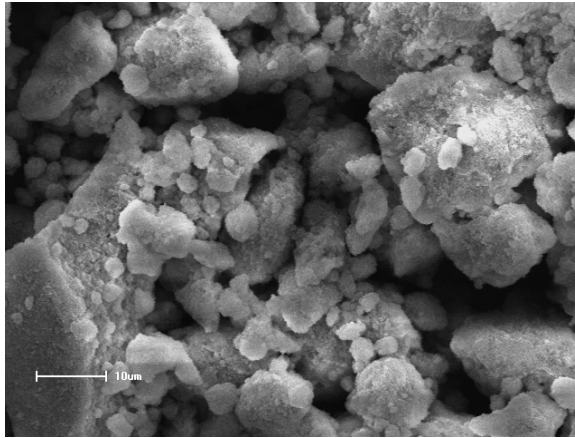
Figura 38 – Micrografias obtidas por MEV da HAP com envelhecimento de um (1) dia: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x. (d) liofilizada com aumento de 2400x.



(a)



(b)

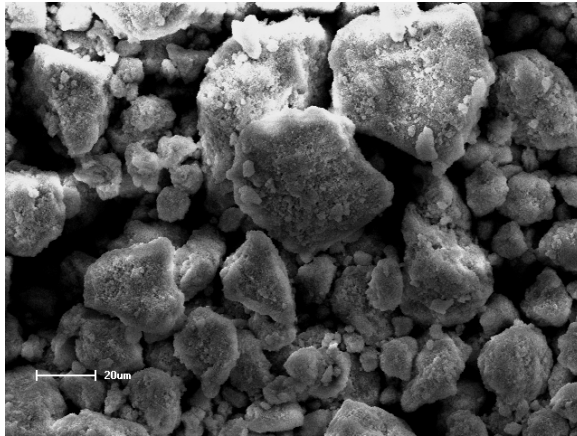


(c)

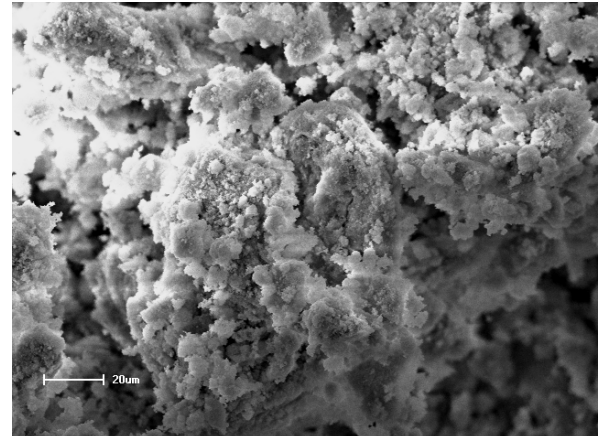


(d)

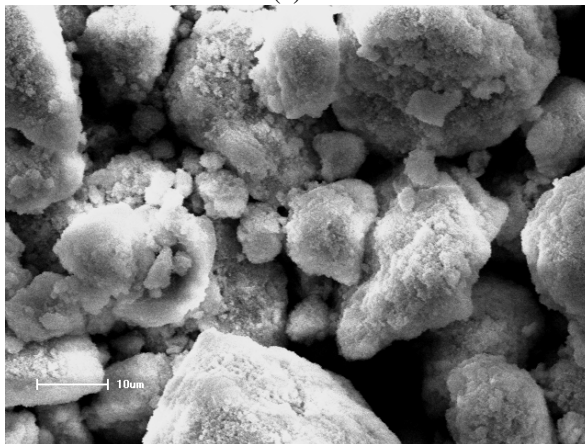
Figura 39 – Micrografias obtidas por MEV da HAP/Col com envelhecimento de um dia: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x e (d) liofilizada com aumento de 2400x.



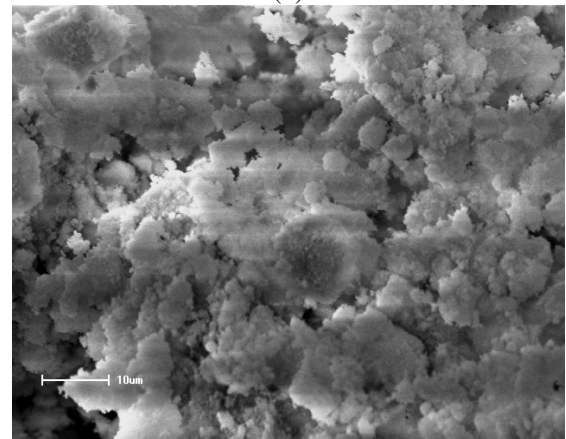
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 40 – Micrografias obtidas por MEV da HAP com envelhecimento de quatorze dias: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x. (d) liofilizada com aumento de 1200x.

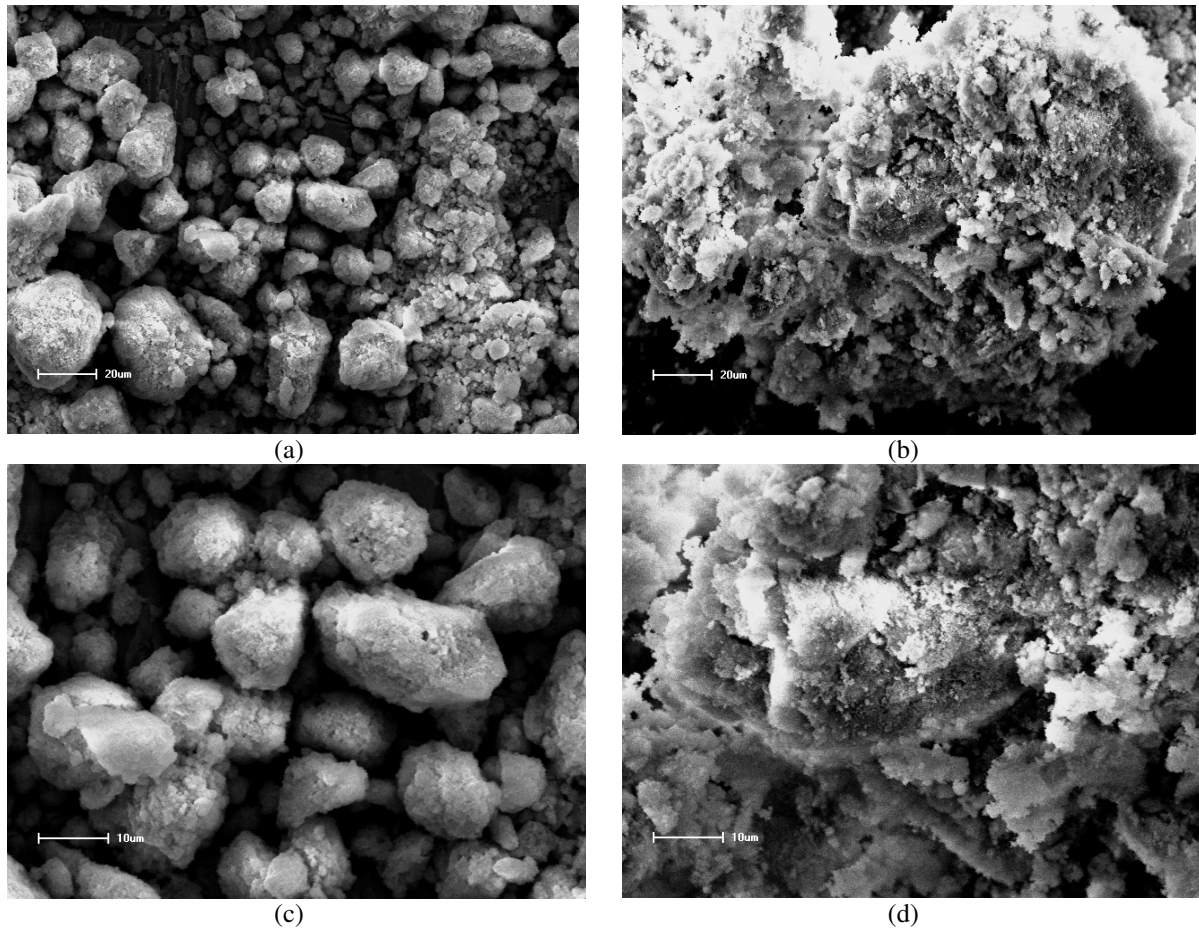
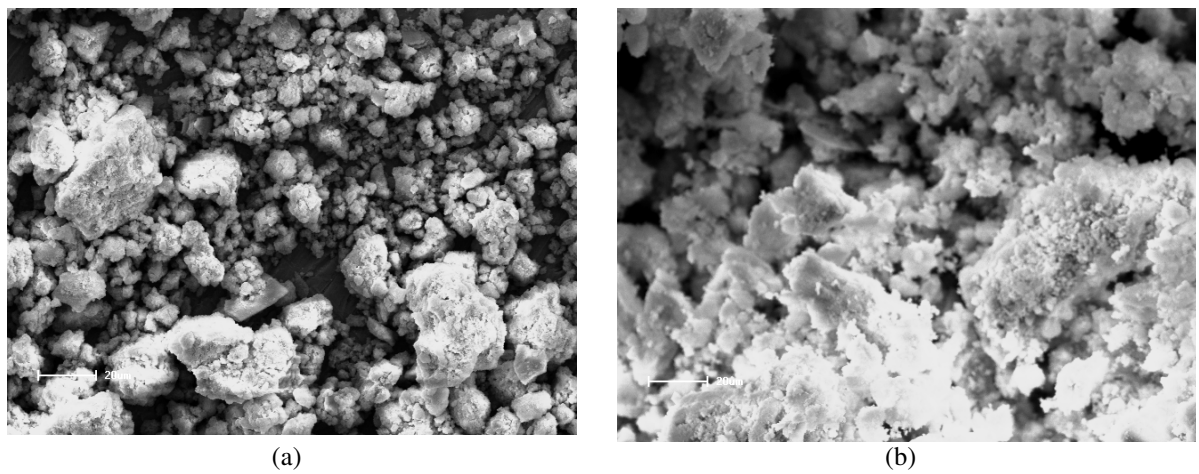


Figura 41 – Micrografias obtidas por MEV da HAP/Col com envelhecimento de quatorze dias: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x. (d) liofilizada com aumento de 1200x.



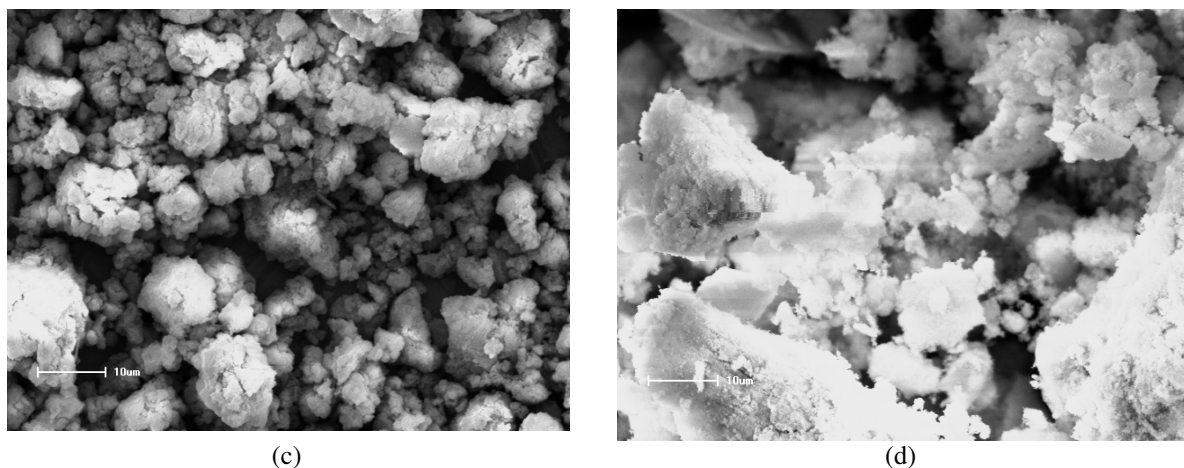


Figura 42 – Micrografias obtidas por MEV da HAP com envelhecimento de trinta dias: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x. (d) liofilizada com aumento de 1200x.

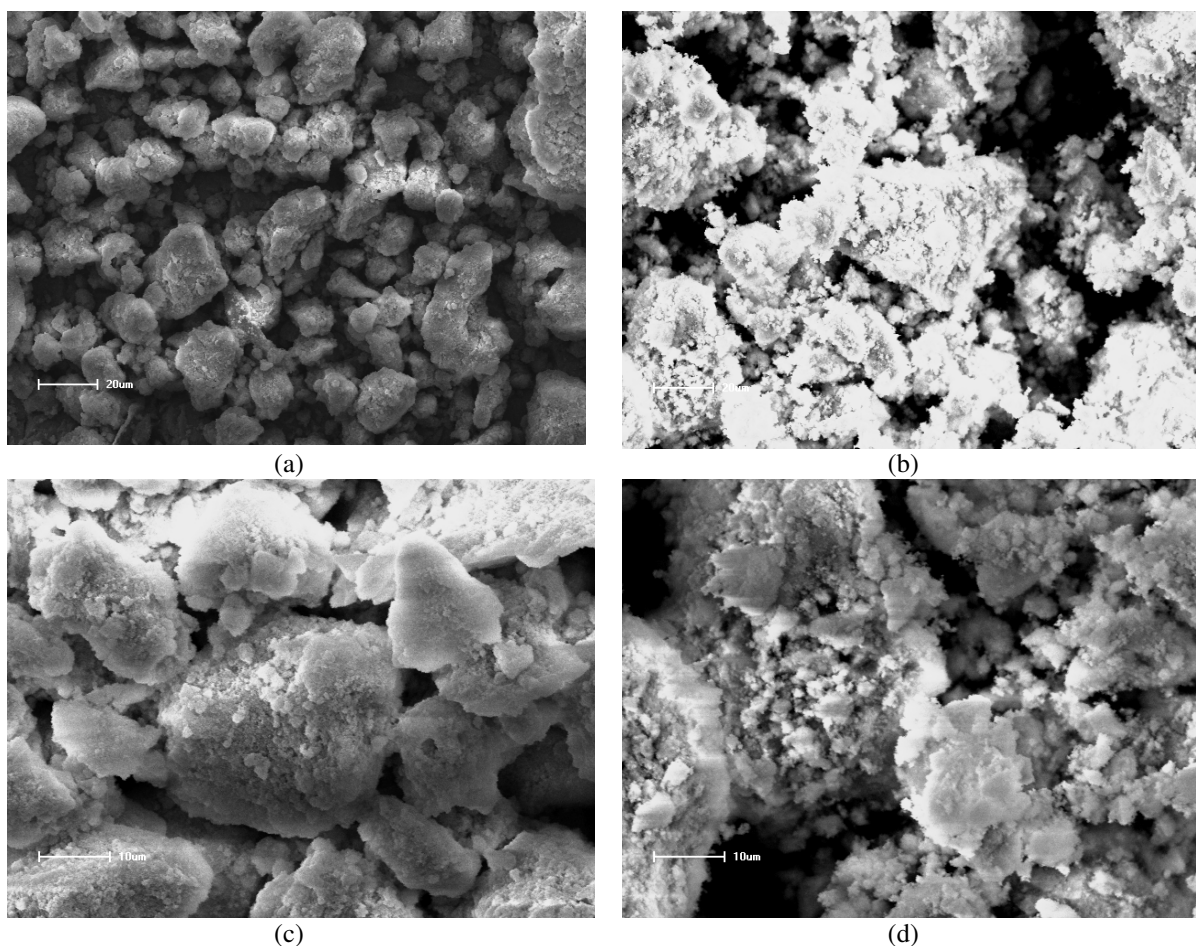


Figura 43 – Micrografias obtidas por MEV da HAP/Col com envelhecimento de trinta dias: (a) seca em estufa com aumento de 500x. (b) liofilizada com aumento de 500x. (c) seca em estufa com aumento de 1200x. (d) liofilizada com aumento de 1200x.

As micrografias da figura 44, mostram os detalhes da estrutura e superfície de uma amostra de colágeno bovino utilizado para as amostras de HAP associadas ao colágeno.

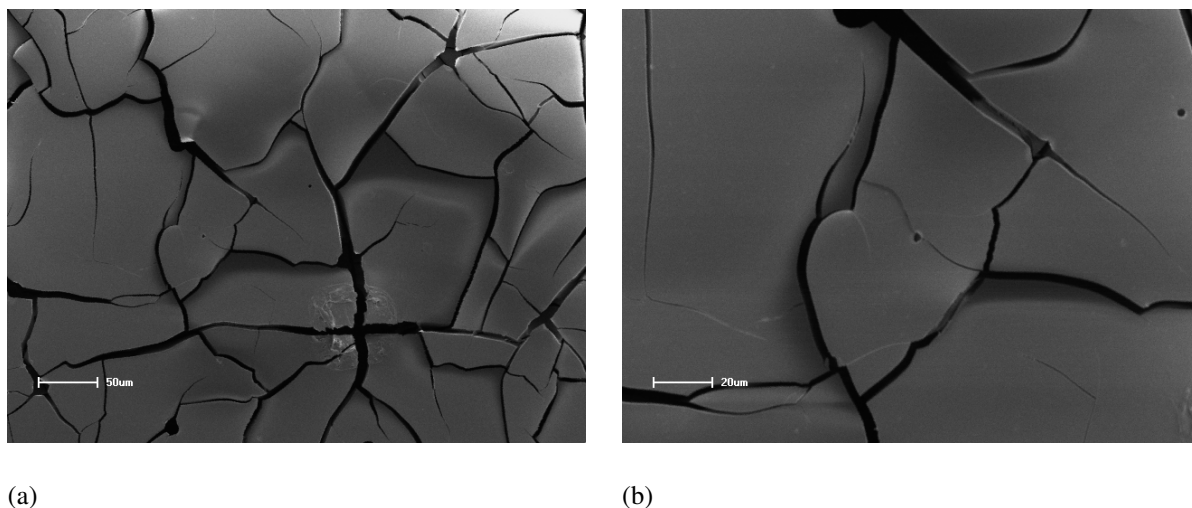


Figura 44 – Micrografias obtidas por MEV do colágeno: (a) com aumento de 200x. (b) com aumento de 500x.

Através dos resultados obtidos pela análise de MEV observou-se que há formação de aglomerados de partículas em escala nanométrica observadas nas figuras 38-43. Com diferentes aumentos, estas micrografias podem revelar que cada grão micrométrico na verdade é formado por muitas partículas de tamanho ainda menor, com tendência a formar aglomerados deixando poros entre eles. Os poros são características desejadas em alguns materiais, pois permitem a circulação do fluido fisiológico entre o material.⁵

As diferenças nas distribuições de tamanho de partícula para as amostras HAP e HAP – Lio podem ser observadas nas figuras 38, 40 e 42 nas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura. As micrografias mostram que a amostra liofilizada tem maior tendência em formar aglomerados, sendo formadas por grânulos com tamanhos menores e com superfície mais rugosa.^{83,94} Segundo Kothapalli et al., partículas pequenas formam aglomerados maiores, com rugosidade superficial, indicando amostras com uma área superficial específica elevada.⁹⁵

A Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS), foi realizada nas amostras em três pontos distintos que apresentam a mesma relação de elementos químicos, determinou-se a composição de Ca e P das amostras de HAP pura e associadas ao colágeno com secagem em estufa e liofilizadas em todos os tempos de envelhecimento, resultando em valores

superiores para os de Ca e inferiores para os de P, portanto a razão Ca/P experimental apresenta valores maiores que os teóricos em todos os casos. Os resultados em termos de razão Ca/P das amostras, são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Razão molar Ca/P das amostras de HAP sintéticas e HAP/Col secas em estufa e liofilizadas determinadas por EDS.

Amostra	Tempo de Envelhecimento (dias)	Ca/P Teórico	Ca/P Experimental
HAP	1	1,67	1,99
HAP – Lio	1	1,67	2,23
HAP	14	1,67	1,94
HAP – Lio	14	1,67	1,97
HAP	30	1,67	2,29
HAP – Lio	30	1,67	2,11
HAP/Col	1	1,67	2,01
HAP/Col – Lio	1	1,67	1,83
HAP/Col	14	1,67	2,03
HAP/Col – Lio	14	1,67	2,35
HAP/Col	30	1,67	1,91
HAP/Col – Lio	30	1,67	2,01

Os estudos de MIYAKE, et al. mostram que nas hidroxiapatitas sintéticas, similares a ossos e dentes, os íons carbonato localizam-se em canais e ocupam os mesmos sítios dos íons fosfato numa razão de 10:1. A substituição de um grupo fosfato da célula unitária da HAP por um grupo carbonato faz com que a razão molar Ca/P aumente de 1,67 para 2,00. Levando-se em conta que as amostras de HAP e HAP/Col foram produzidas em atmosfera aberta e em solução aquosa, o desvio observado na estequiometria provavelmente deve-se a incorporação do CO_3^{2-} proveniente do ar. O CO_2 do ar pode ser incorporado a qualquer solução aquosa através da reação com íons hidroxila OH^- livres na solução formando o ácido carbônico H_2CO_3 , sendo íon carbonato (CO_3^{2-}) uma das numerosas possibilidades de substituições iônicas na estrutura da HAP. Vários trabalhos têm mostrado que íons carbonatos estão presentes em apatitas sintéticas e naturais em dois tipos de sítios aniônicos da estrutura, denominadas tipo A e tipo B.^{11,90}

A explicação para o aumento na razão Ca/P pode ser comprovada através do aparecimento de bandas características na região do IV referentes aos íons CO_3^{2-} que podem ter sido formados pela absorção do CO_2 na solução durante a síntese, e são observados na tabela 6 e pela análise de EDS observados na tabela 8. O íon carbonato pode ser incorporado a estrutura da hidroxiapatita, em substituição aos íons PO_4^{3-} ou aos íons OH^- do retículo cristalino podendo formar uma Hidroxiapatita Carbonatada do tipo A ou do tipo B dependendo da substituição ocorrida, observando-se os espectros de IV acredita-se que houve a formação de uma CHAP do tipo B pois há a ocorrência de bandas em 1455 e 1413 cm^{-1} características deste tipo de CHAP.⁵²

A quantidade de CO_3^{2-} incorporado na apatita é dependente da concentração deste íon na solução, deste modo a substituição dos íons PO_4^{3-} pelos íons CO_3^{2-} ocasionaria um aumento da concentração de íons cálcio nas amostras acarretando em uma razão Ca/P maior em todas as amostras em relação ao valor teórico de 1,67, observados na Tabela 8.

4.6 Área Superficial Específica – BET

Durante a obtenção dos pós de hidroxiapatita por processamentos diferentes verificou-se variações nos valores da área superficial específica das amostras dos pós de HAP e HAP/Col, pelo método de BET, os resultados obtidos podem ser observados na tabela 9 e 10 para as amostras secas em estufa e liofilizadas com envelhecimento de 1, 14 e 30 dias.

Tabela 9 – Área Superficial Específica pelo método de BET das amostras de HAP e HAP-Lio.

AMOSTRAS	TEMPO DE ENVELHECIMENTO	Área SUPERFICIAL ESPECÍFICA (m^2/g)
HAP	1	69,1670
HAP-Lio	1	69,2101
HAP	14	60,0443
HAP-Liofilizada	14	69,5385
HAP	30	59,1439
HAP-Lio	30	68,3138

Tabela 10 – Área Superficial Específica pelo método de BET das amostras de HAP/Col e HAP/Col – Lio

AMOSTRAS	TEMPO DE ENVELHECIMENTO	Área SUPERFICIAL ESPECÍFICA (m ² /g)
HAP/Col	1	67,7954
HAP/Col-Lio	1	69,5385
HAP/Col	14	55,1558
HAP/Col-Lio	14	57,4789
HAP/Col	30	64,4718
HAP/Col-Lio	30	68,3138

Verifica-se que a presença do colágeno e o processo de secagem por estufa e liofilização levaram a obtenção de pós de HAP com menor área superficial específica do que os encontrados nas amostras de HAP. Os resultados obtidos para as amostras, HAP – 30 (59,14 m²/g) e HAP/Col – Lio – 14 (57,47 m²/g) são semelhantes ao determinado por Saeri et al.³⁴ que também sintetizou a hidroxiapatita utilizando método de precipitação, através da reação entre Ca(OH)₂ e H₃PO₄ na temperatura de 40°C e posterior secagem em estufa, apenas diferindo na temperatura de secagem que era de 80°C, e a adotada neste trabalho foi de 100°C em estufa. Os resultados obtidos também se aproximam dos encontrados por Landi et al., que era de 51,3 m²/g, esse valor é consistente com um tamanho de partícula média de cerca de 20 nm.^{34,46}

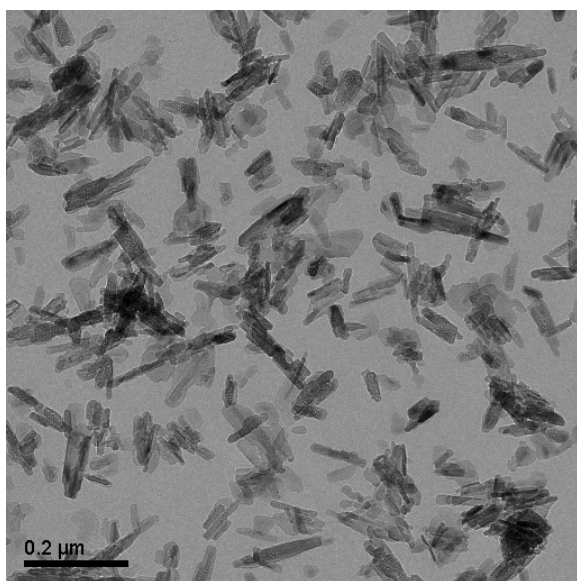
De acordo com Saeri et al., deve-se esperar que partículas muito pequenas e que possuem uma grande área superficial venham a formar aglomerados maiores minimizando sua energia superficial e um aumento do tamanho das partículas promove uma diminuição na área superficial específica dos pós de HAP.³⁴ Portanto, espera-se que as amostras com uma área superficial específica maior como é o caso das amostras HAP – 1, HAP/Col – 1, HAP – Lio – 14, e HAP/Col – Lio – 14, tenham uma maior tendência em formar aglomerados em comparação as amostras que possuem uma menor área superficial específica. Pode-se comprovar através das micrografias obtidas por MEV nas figuras 39, 40 e 41.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

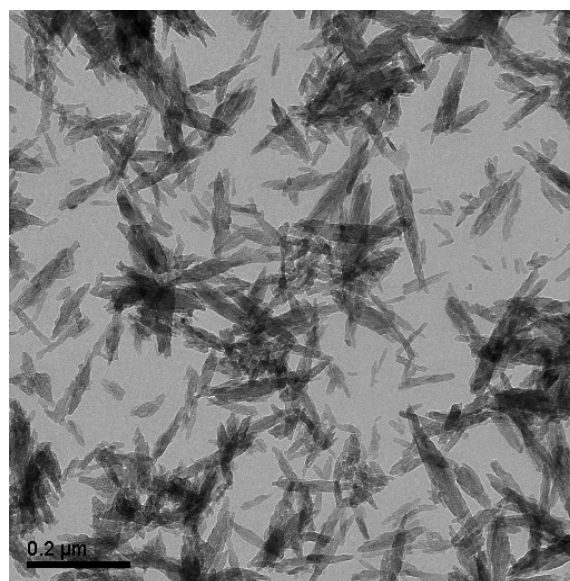
As análises de MET têm por objetivo detectar a presença de defeitos e identificação de outras fases presentes na hidroxiapatita sintetizada. As figuras 45, 46, 47, 48, 49 e 50 mostram as micrografias dos pós das amostras de HAP e HAP/Col com aumentos diferentes e comparadas pelos métodos de secagem em estufa e liofilizadas.

Através das análises dos pós das amostras não calcinadas contendo colágeno bovino por meio da microscopia eletrônica de transmissão, foi possível observar que a presença de moléculas de colágeno na estrutura da HAP não altera a morfologia das partículas sendo que apresentam forma acicular como pode-se observar nas figuras 46, 48 e 50.

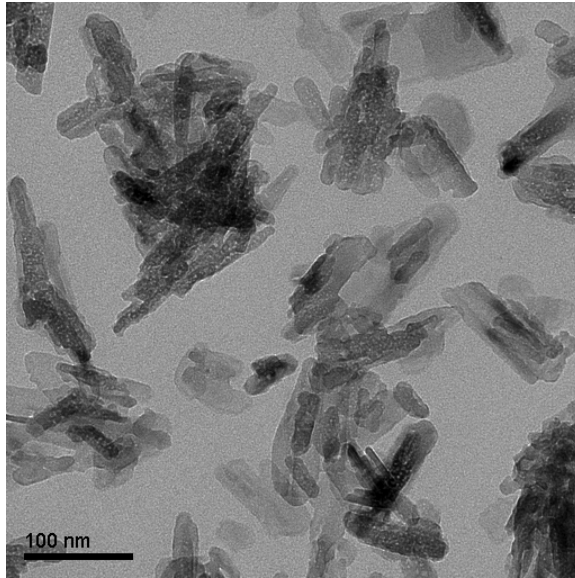
Através das micrografias observa-se a formação de aglomerados de partículas com distribuição de tamanhos na ordem de 20-100 nanômetros indicando que o sistema é nanoestruturado. Não se observa variações de tamanho de partículas com a associação de colágeno nas amostras.



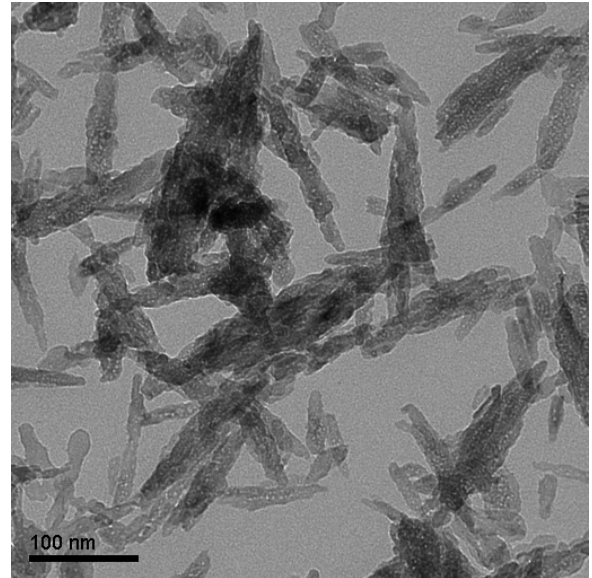
(a)



(b)

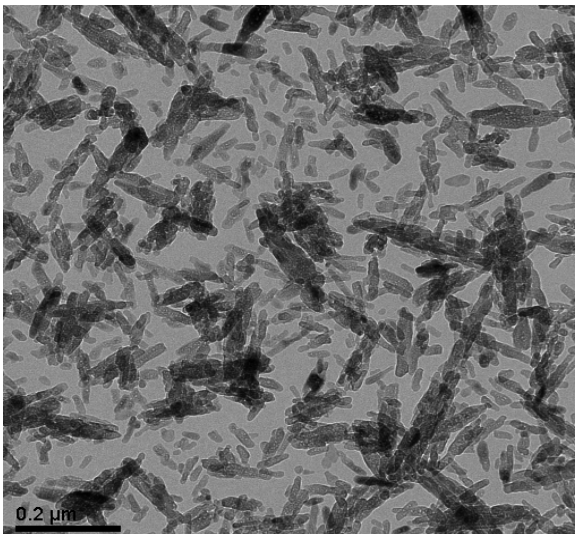


(c)

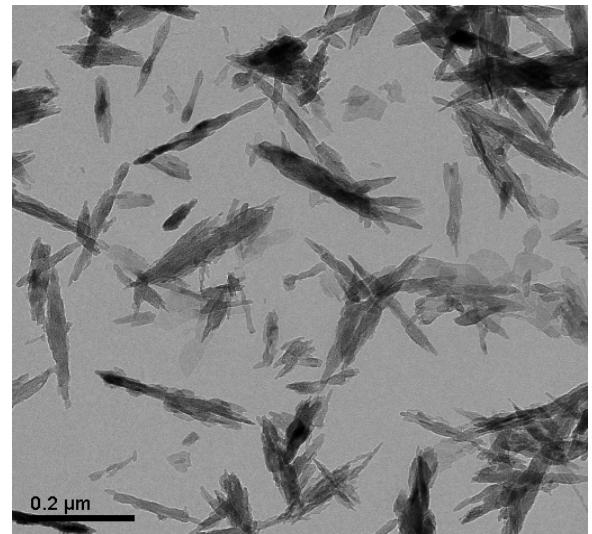


(d)

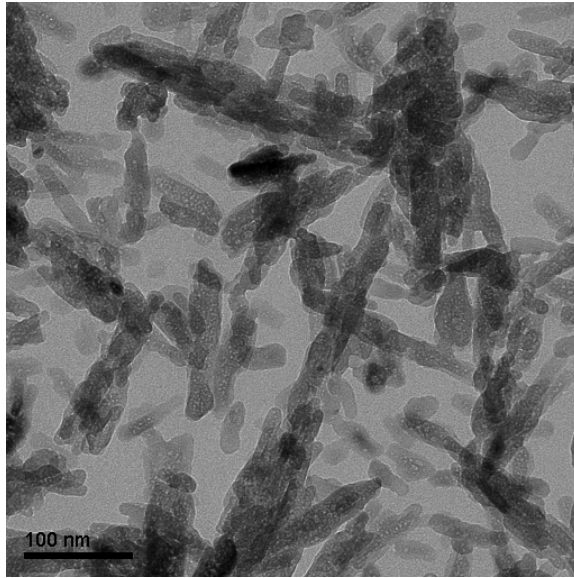
Figura 45 – Micrografias obtidas das amostras de HAP com envelhecimento de um dia: (a) HAP – 1 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP – 1 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP – 1 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP – 1 (Liofilizada) com aumento de 250.000x.



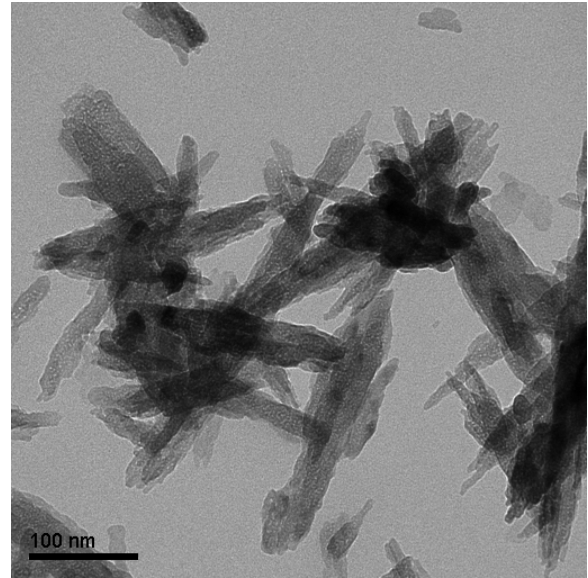
(a)



(b)

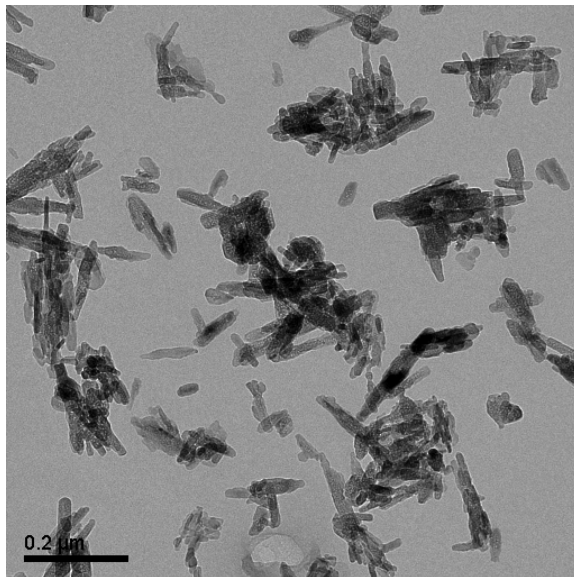


(c)

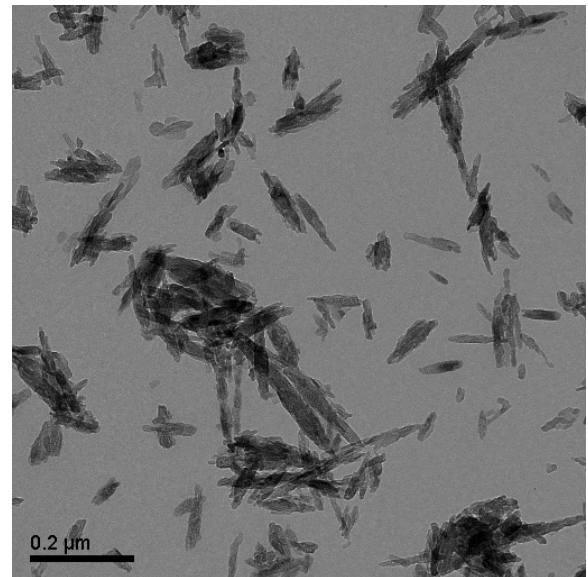


(d)

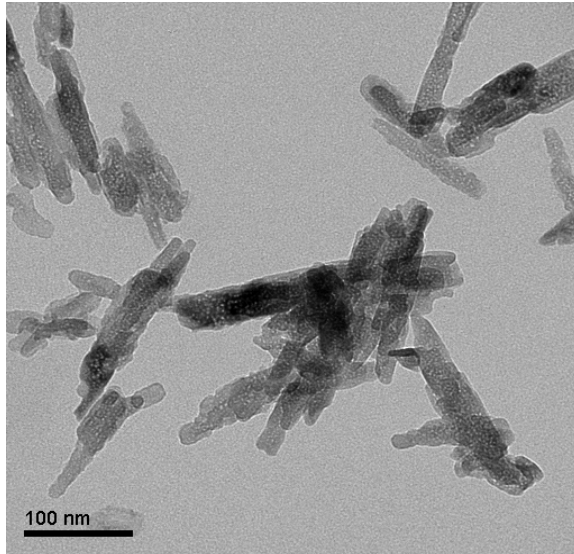
Figura 46 – Micrografias obtidas das amostras de HAP/Col com envelhecimento de um dia: (a) HAP/Col – 1 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP/Col – 1 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP/Col – 1 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP/Col – 1 (Liofilizada) com aumento de 250.000x.



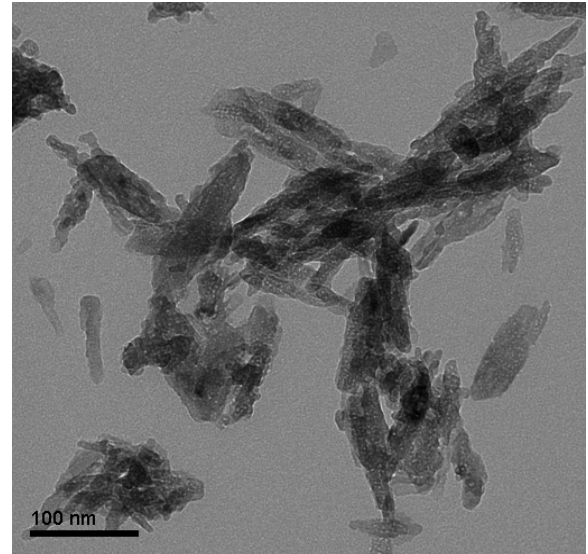
(a)



(b)

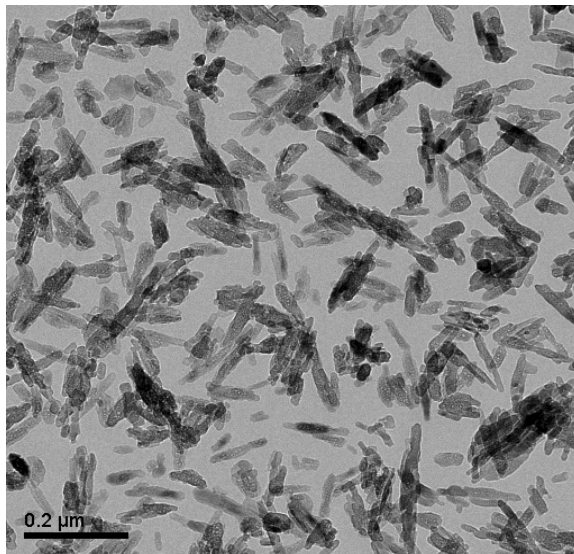


(c)

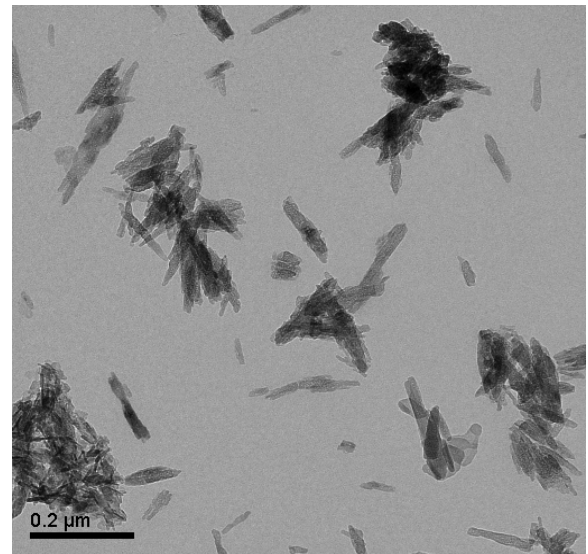


(d)

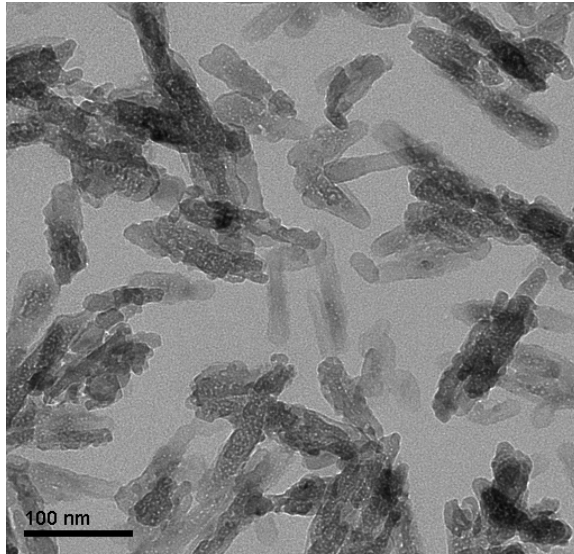
Figura 47 – Micrografias obtidas das amostras de HAP com envelhecimento de quatorze dias: (a) HAP – 14 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP – 14 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP– 14 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP – 14 (Liofilizada) com aumento de 250.000x.



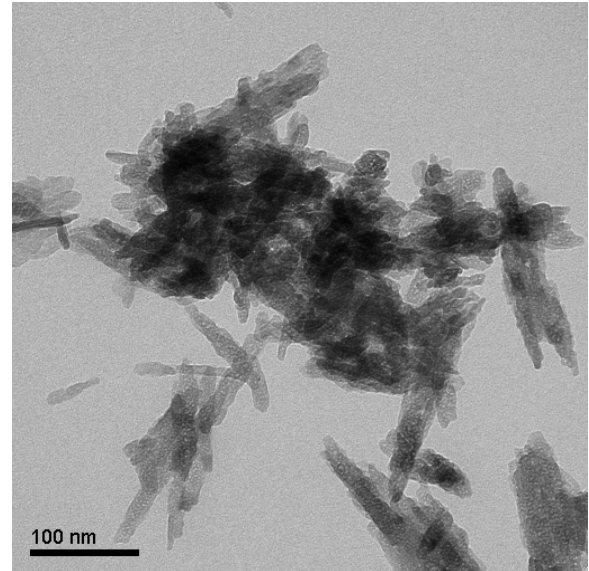
(a)



(b)

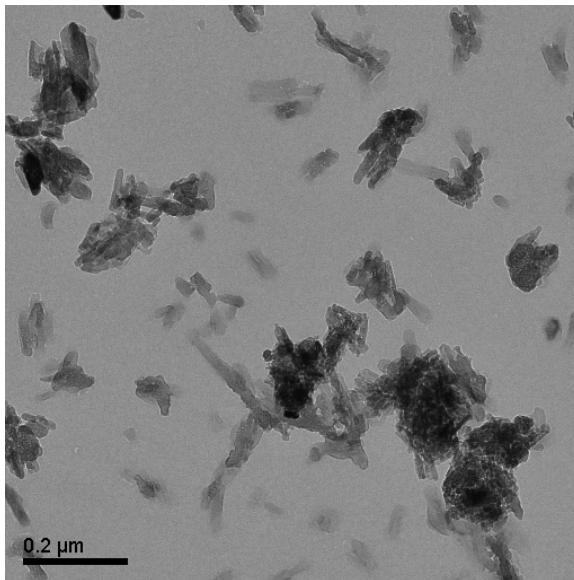


(c)

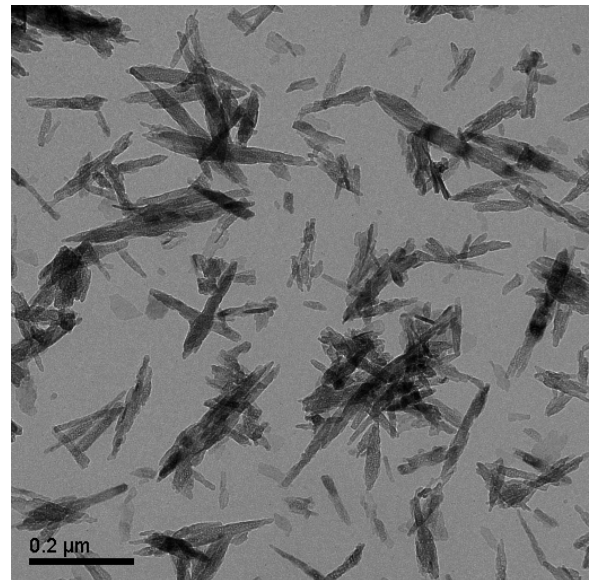


(d)

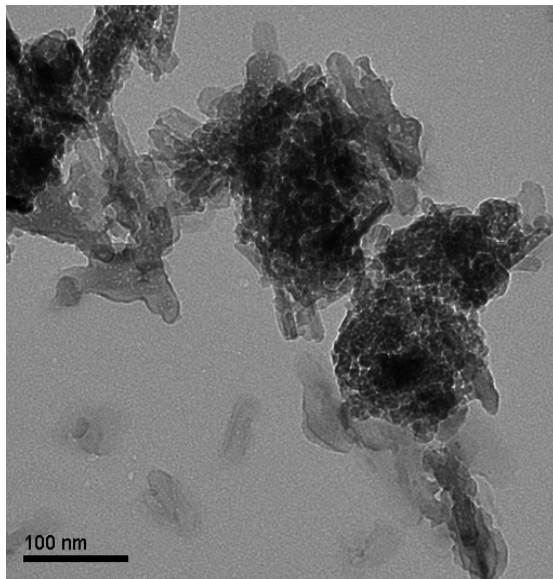
Figura 48 – Micrografias obtidas das amostras de HAP/Col com envelhecimento de quatorze dias: (a) HAP/Col – 14 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP/Col – 14 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP/Col – 14 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP/Col – 14 (Liofilizada) com aumento de 250.000x.



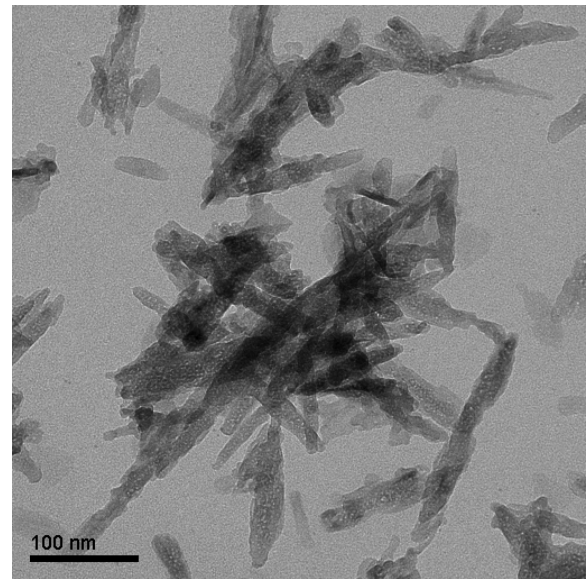
(a)



(b)

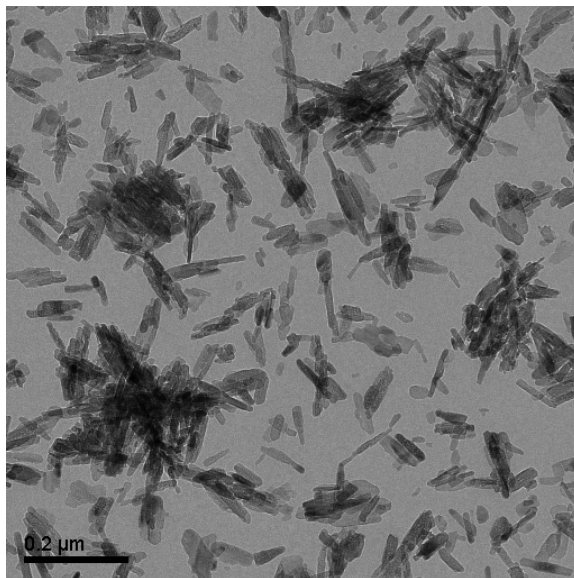


(c)

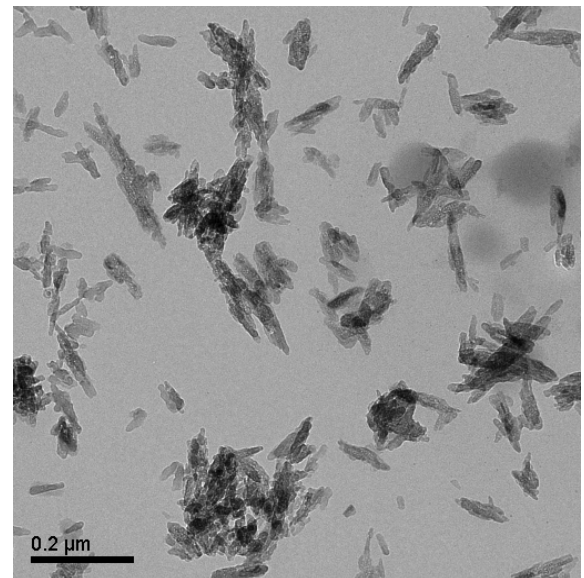


(d)

Figura 49 – Micrografias obtidas das amostras de HAP com envelhecimento de trinta dias: (a) HAP – 30 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP – 30 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP– 30 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP – 30 (Liofilizada) com aumento de 250.000x.



(a)



(b)

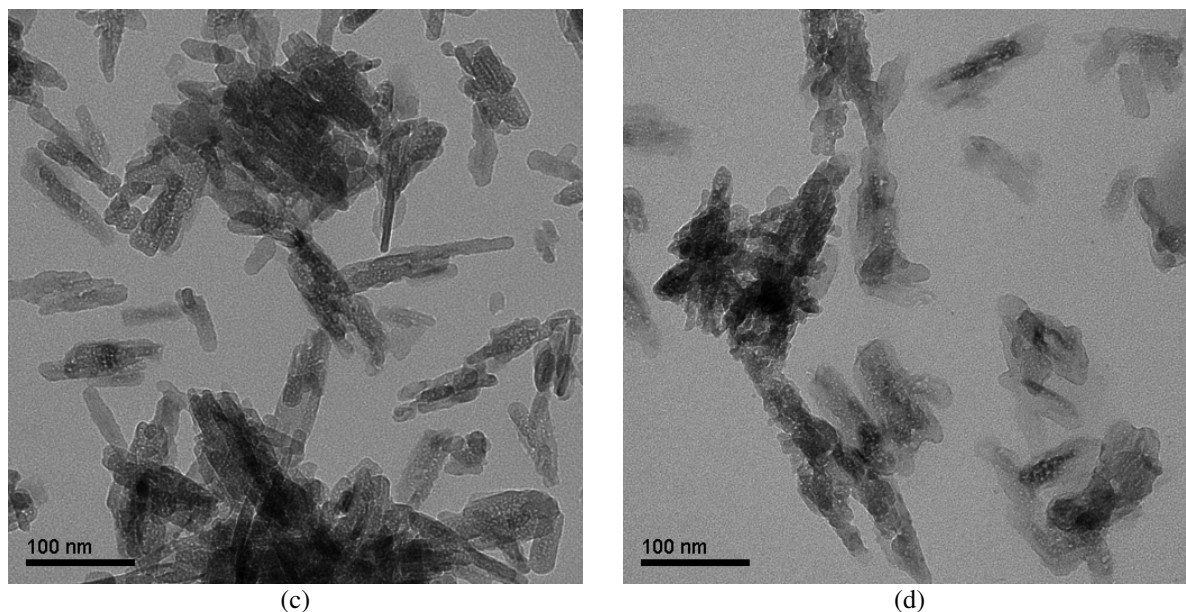


Figura 50 – Micrografias obtidas das amostras de HAP com envelhecimento de trinta dias: (a) HAP/Col – 30 (estufa) com aumento de 120.000x; (b) HAP/Col – 30 (Liofilizada) com aumento de 120.000x; (c) HAP/Col – 30 (estufa) com aumento de 250.000x; (d) HAP/Col – 30 (Liofilizada) com aumento de 250.000x.

Cristais de hidroxiapatita normalmente apresentam-se na forma acicular, e estão diretamente relacionados aos parâmetros da síntese como temperatura, tempo de envelhecimento e o tipo de substituinte, alterando o tamanho de partículas, porosidade, área superficial e cristalinidade. Entretanto, Legeros (2002) também sugere que a presença de uma matriz orgânica pode promover um efeito protetor diminuindo a extensão de dissolução de cristais de HAP com baixa cristalinidade.^{33, 96, 97.}

A substituição de íons de carbonato tem o efeito de induzir a uma baixa cristalinidade e a um alto número de defeitos estruturais dentro da estrutura da HAP.¹¹ Legeros observou em estudos de MET que mudanças na cristalinidade e morfologia das partículas da HAP que apresentam-se na forma acicular para formas mais arredondadas acontecem pela substituição crescente nos íons da hidroxiapatita por íons carbonatos, sugerindo também que um aumento na bioatividade e solubilidade observadas devem estar associadas a formação de CHAP. A incorporação do CO_3^{2-} promove o crescimento ao longo das dimensões radiais. O pH também influencia na morfologia do material, sendo que amostras sintetizadas em pH elevado tendem a formar cristais esféricos.^{11,96,97}

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigada a influência do processamento na obtenção de nanocompósito HAP-colágeno bovino. A análise dos resultados obtidos pela caracterização dos compósitos obtidos permitiu-se chegar às seguintes conclusões:

- O método de síntese empregado proporcionou a produção de hidroxiapatita carbonatada, levando a relação Ca/P superior a 1,67, isto se deve, provavelmente a incorporação do íon CO_3^{2-} na estrutura das amostras, sendo que o íon CO_3^{2-} está inserido no sítio B que substitui o grupo PO_4^{3-} , formando uma CHAP do tipo B. Portanto, a incorporação do íon carbonato provocou alterações nas características estruturais da hidroxiapatita obtida.

- O processamento utilizando mostrou eficiente para a obtenção de nanocompósitos de HAP/Colágeno bovino. A natureza nanocristalina dos pós nos diferentes processamentos foi confirmada pela microscopia eletrônica de transmissão, as partículas são muito pequenas com variações de tamanho nanométricos.

- A influência do tempo de envelhecimento e secagem na morfologia das amostras ficou nitidamente comprovada pelas análises de MEV, distribuição granulométrica e determinação da área superficial específica. As amostras que apresentam maior tendência em formar aglomerados são as liofilizadas, sendo constituídas por grânulos com tamanhos menores e com superfície mais rugosa e uma maior área superficial específica em relação as secas em estufa.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Verificar as propriedades mecânicas dos compósitos.
- Estudo do comportamento “in vitro” e “in vivo” dos compósitos obtidos.
- Caracterização pelo método de Rietveld nas amostras obtidas pela análise de DRX.
- Estudo da formação do compósito variando outros parâmetros de síntese, tais como concentração de colágeno, tempo de envelhecimento, pH, precursores e método de síntese adotado.
- Incorporação de fármacos para produção de sistemas de liberação controlada.

7. REFERÊNCIAS

1. KAWACHI, E.Y.; BERTRAN, C.A., REIS, R.R., ALVES, O.L. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. **Química Nova**, v.23, n.4, p. 518-522, 2000.
2. RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **BIOMATERIALS SCIENCE: An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 2006.
3. VULCANI, V.C. **Matrizes de Colágeno para Liberação Controlada de Progesterona**. 2004, 77 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.
4. ROCHA, L.B. **Estudo de Biocompatibilidade de matrizes de colágeno aniônico para reparo de defeitos ósseos**. 2000, 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – área Patologia experimental). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.
5. SANTOS, M.L.; FLORENTINO, A.O.; SAEKI, M.J. Síntese de hidroxiapatita pelo método Sol-Gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química**, v. 30, n. 3, p. 29-35, 2005.
6. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica – texto e atlas**. 10ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.103-105 p.
7. FRIESS, W. Collagen – Biomaterial for Drug Delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 113-136, 1998.
8. OGAWA, C.A.; PLEPIS, A.M.G. Liberação In Vitro de Cloridrato de Ciprofloxacina em Compósitos Hidroxiapatita: Colágeno. **Polímeros**, v.12, n.2., 2002.
9. MOREIRA, E.L.; ARAUJO, J.C.; MORAES, V.C.A.; MOREIRA, A.P.D. **Análise por Difração de raio X de uma Hidroxiapatita carbonatada usando o método de Rietveld**. Revista Matéria, v.11, n.3, p.494-502, 2007.
10. IVANOVA, T.I.; KAMENETSKAYA, O.V.F.; KOL'TSOV, A.B.; UGOLKOV, V.L. **Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite Thermal Decomposition**. Journal of Solid State Chemistry, v.160, p.340-349, 2001
11. PORTER, A.; N. PATEL, N.; BROOKS, R.; BEST, S.; N. RUSHTON, N.; BONFIELD, W. Effect of carbonate substitution on the ultrastructural characteristics of hydroxyapatite implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.16, p.899-907, 2005.

12. PANG, Y.X.; BAO,X. Influence of Temperature, ripening time and calcination on the morphology and Crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. **Journal of the European Ceramic Society**, v.23, p.1697-1704, 2003.
13. RIGO, E.C.S.; GEHRKE, S.A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Rev. Dental Press Periodontia Implantol.**, Maringá, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.
14. SILVA, P.E.J.; ORÉFICE, R.L. Compósitos Bioativos Obtidos a Partir da Inserção de Vidro Bioativo em Matriz de Poli (Metacrilato de Metila). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.11, n.3, p. 109-115, 2001.
15. ARAUJO, T.S. **Produção de Hidroxiapatita Pura e Dopada para Aplicação em Biosensores**. 2006, 85 f. Dissertação (Mestrado em Física em Física da matéria condensada). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.
16. PEREIRA, A.P.V.; VASCONCELOS, W.L.; ORÉFICIE, R.L. Novos Biomateriais: Híbridos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, out/dez ,1999.
17. VITAL, C.C., BORGES, A.P.B. ; FONSECA, C.C. ; TSIOMIS, A.C. ; CARVALHO, T.B. ; FONTES, E.B. ; SENA, M.P. ; FÓFANO, G. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v.58, n.2, abril, 2006.
18. MUDALI, U.K.; SRIDHAR, T.M.; RAJ, B. Corrosion of bio implants. **Sadhana**. v..28, n. 3, p. 601-637, jun./ago., 2003.
19. VANDIVER, J.; DEAH, D.; PATEL, N.; BONFIELD, W.; ORTIZ, C. Nanoscale variation in surface charge of synthetic hydroxyapatite detected by chemically and spatially specific high-resolution force spectroscopy. **Biomaterials**, v.26, n.3, p.271-283, 2005.
20. APARECIDA, A.H.; LIA, M.V.; SANTOS, M.L.; GUASTALDI, A.C. Influência dos íons K^+ e Mg^{2+} na obtenção de biomiméticas. **Eclética Química**, v. 30, n.4, p. 13-18, 2005.
21. HENCH, L.L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. World Scientific, v.1, p.139-180, 1993.
22. SANTOS, F.S. **Síntese de Hidroxiapatita por precipitação química e Avaliação da Evolução Cristalina**. Trabalho de conclusão de Curso – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006.
23. CHANG, M.C.; KO, C.C.; DOUGLAS, W.H. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. **Biomaterials**, v. 24, p.2853-2862, 2003.
24. ROSA, A.L.; SHAREEF, M.Y.; NOORT, R.V. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesqui. Odontol. Brás**, v.14, n.3, p. 273-277, jul./set., 2000.

25. MACIAS, R.J.R.; MORALES, J.G.; CLEMENTE, R.R.; FOLÁ, F.B. Biomaterial de Restauracion Ósea. **Ver. Cubana Invest Biomed**, v.18, n.3, p. 203-207, 1999.
26. FREITAS, J.S.; SALOMÃO, G.C.; GOMES, M.F.T. Remoção de Íons Metálicos de Soluções Aquosas, por Apatitas Sintéticas, usando o Método de Troca iônica em Coluna. **Eclética Química**, v. 25, p. 19-29, 2000.
27. ROSSI, A. M. ; TERRA, J. ; MAVROPOULOS, E. ; MOREIRA, E.L. A Ciência e Tecnologia das Biocerâmicas. **Revista do CBPF**, p. 54-56, 2001.
28. DOROZHKIN, S.V.; EPPLÉ, M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphate. **Chemical International Education**, v.41, p.3130-3146, 2002.
29. ELLIOT, J.C. **Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates**, Amsterdam: Elsevier v.18., p.104, 1994.
30. HU, K.; YANG, X.J.; CAI, Y.L.; CUI, Z.D.; WEI, Q. Preparation of bone-like composite coating using a modified simulated body fluid with high Ca and P concentrations. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p. 1902–1906, 2006.
31. AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SAERI, M. R.; SORRELL, C.C. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. **Materials and Design**, v. 24, p. 197-202, 2003.
32. BANDYOPADHYAY, A.; BERNARD, S.; XUE, W.; BOSE, S. Calcium Phosphate – Based Resorbable Ceramics: Influence of MgO, ZnO, and SiO₂ Dopants. **J. Am. Ceram. Soc**, v.89, n.9, p.2675-2688, 2006.
33. SENA, L. **Produção e Caracterização de Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações Biomédicas**. 2004. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro.
34. SAERI, M.R.; AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SORRELL, C.C. The wet precipitation process of hydroxyapatite. **Materials Letters**, v.57, p.4064-4069, 2003.
35. SILVA, M.H.P. **Apostila de Biomateriais**. Disponível em: <http://www.mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduação/pdf_p3/ApostilaBiomateriais.pdf> Acesso em: abril/2007.
36. LEGEROS, Z.R. **Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine**. Karger, 1991.
37. OLIVEIRA, F.P. **Obtenção de Biocerâmicas à base de hidroxiapatita com incorporação de oxifosfato de nióbio (V): uma avaliação das propriedades mecânicas**. 2006, 50 f. Projeto de Qualificação (Mestrado em Química Aplicada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

38. MENDES FILHO, A.A. **Síntese e Caracterização de Hidroxiapatita e Compósitos a partir de matéria-prima reciclada**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Ouro Preto, 2006.
39. RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D.; THOMAS, P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. **Biomaterials**, v. 23, p. 1065–1072, 2002.
40. RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D.; THOMAS, P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering. **Biomaterials**, v. 23, p. 1073–1080, 2002.
41. RODRÍGUEZ, L. M.; REGÍ, V. Controlled crystallization of calcium phosphate apatites. **Chem. Mater.**, v. 12, p. 2460–2465, 2000.
42. CHEN, M.T.; TIEN, W. **Effects of pH and temperature on microstructure and morphology of collagen/hydroxyapatite matrix synthesized in vitro**. Department of Bioindustry Biotechnology, Da Yeh University.
43. KIKUCHI, M.; ITOH, S.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. **Biomaterials**, v.22, p. 1705–1711, 2001.
44. LEGEROS, R.Z. **Biological and Synthetic Apatites**. In: BROWN, P.W.; CONSTANTZ, B., **Hydroxyapatite and Related Materials**, CRC Press, Boca Raton, p. 3–28, 1994.
45. TADIC, D.; PETERS, F.; EPPL, M. Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. **Biomaterials**, v. 23, p. 2553–2559, 2002.
46. LANDI, E.; CELOTTI, G.; LOGROSCINO, G.; TAMPIERI, A. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 23, p. 2931–2937, 2003.
47. ASTALA, R.; STOTT, M. J. First Principles Investigation of Mineral Component of Bone: CO₃ Substitutions in Hydroxyapatite. **Chem. Mater.** v.17, p. 4125–4133, 2005.
48. SUETSUGU, Y.; Takahashi, Y.; Okamura, F.P.; Tanaka, J. Structure Analysis of A-Type Carbonate Apatite by a Single-Crystal X-Ray Diffraction Method. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 155, p. 292–297, 2000.
49. FLEET, M.E.; LIU, X. Carbonate apatite type A synthesized at high pressure: new space group P₃ and orientation of channel carbonate ion. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 174, p. 412–417, 2003.
50. FLEET, M.E.; LIU, X. Location of type B carbonate ion in type A–B carbonate apatite synthesized at high pressure. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 177, p. 3174–3182, 2004.

51. WILSON, R.M.; ELLIOTT, J.C.; DOWKER, S.E.P.; SMITH, R.I. Rietveld structure refinement of precipitated carbonate apatite using neutron diffraction data. **Biomaterials**, v. 25, p. 2205–2213, 2004.
52. ANGELO, L. C. **Síntese e Caracterização de Nanocompósitos Hidroxiapatita-Gelatina obtidos pelo Método de Precipitação utilizando o Método de Rietveld e IVTF**. 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
53. LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; VICHI, L.; SANDRI, M. Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite. **Biomaterials**, v.25, p. 1763–1770, 2004.
54. KRAJEWSKI, A.; MAZZOCCHI, M.; BULDINI, P.L.; RAVAGLIOLI, A.; TINTI, A.; TADDEI, P.; FAGNANO, C. Synthesis of carbonated hydroxyapatites: efficiency of the substitution and critical evaluation of analytical methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 744–747, p. 221–228, 2005
55. VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G.; GUIA, M.M. **Biblioteca Biomédica: Química Fisiológica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1979.
56. MURRAY, R.P.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A. **Harper: Bioquímica**. 9ª ed. Tradução: Ezequiel Warsbich; Fernando Salvador Moreno; Renato Najjar e Renato Carvalho Najjar. São Paulo: Atheneu, 2002. 60, 695-707 p.
57. DORNELLES, C.; COSTA, S.S.; LAUX, M.; WEBER, R. Estudo comparativo da dissolução de três diferentes marcas de colágeno utilizadas em técnicas cirúrgicas otológicas. **Rev. Brás. Otorrinolaringol.** v. 69, n.6, p. 744-751, 2003.
58. Colágeno – Pura Essence. Disponível em:
<http://www.maxway.com.br/maxway/essence/kollagen-3.htm>. Acesso em: 27 de julho de 2008.
59. GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia** – Em cores. 1ª ed. Tradução: Leila Francisco de Souza e Maria das Graças Fernandes Sales. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999. 108-122 p.
60. GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10ª ed. Tradução: Charles Alfred Esberard, et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 840-845 p.
61. BAKOS, D.; SOLDAN, M.; HERNANDEZ-FUENTES, I. Hydroxyapatite Collagen-hyaluronic acid composite. **Biomaterials**, v. 20, p. 191-195, 1999.
62. SIVAKUMAR, M.; RAO, P.M. Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite–gelatin composite microspheres. **Biomaterials**, v. 23, p. 3175–3181, 2002.

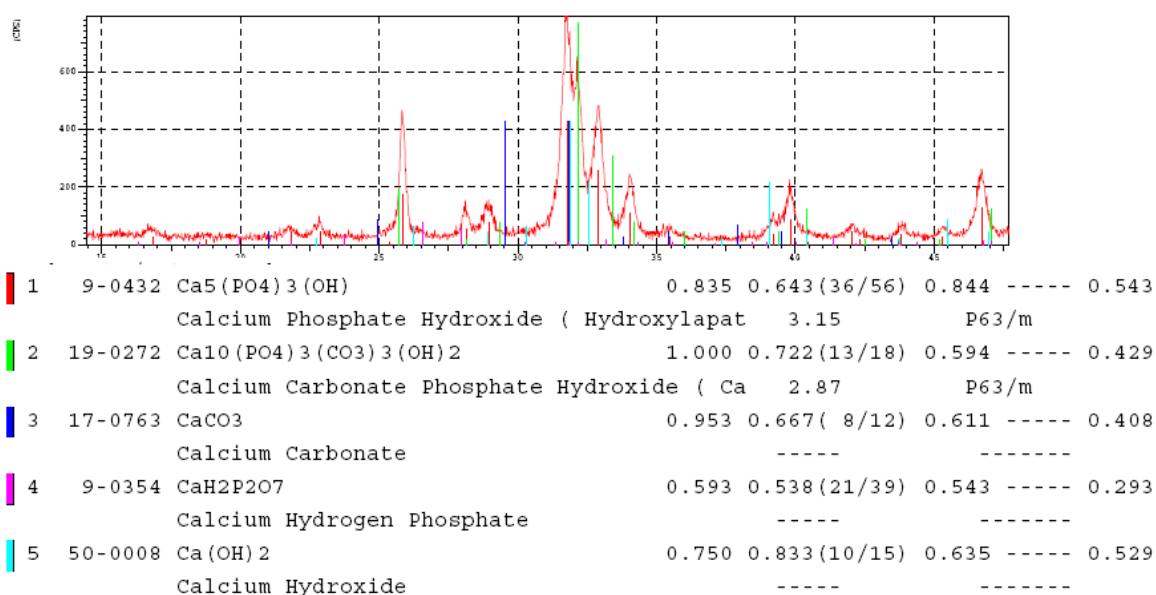
63. HSU, F.Y.; CHUEH, S.C.; WANG, I.J. Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth. **Biomaterials**. v. 20, p. 1931-1936, 1999.
64. DU, C.; CUI, F.Z.; ZANG, W.; FENG, Q.I.; ZHU, X.D.; de GROOT, K. **Formation of Calcium Phosphate/Collagen Composites Through Mineralization of Collagen Matrix**. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 50, p. 518-527, 2000.
65. CHANG, M.C.; TANAKA, J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. **Biomaterials**, v. 23, p. 4811-4818, 2002.
66. TENHUISEN, K.S.; MARTIN, R.I.; KLIMKIEWICZ, M.; BROWN, P.W. Formation and Properties of a Synthetic Bone Composite: Hydroxyapatite-Collagen. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 29, p. 803-810, 1995.
67. BRADT, J. H.; MERTIG, M.; TERESIAK, A.; POMPE, W. Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation. **Chem. Mater**, v. 11, p. 2694-2701, 1999.
68. JHS – JHS Laboratório Químico; <http://www.jhs.med.br/produtos.htm>; acesso em 10 de outubro de 2008.
69. PIMENTEL, A.S.; ARBILLA, G. Cinética não-isotérmica na Análise Térmica dos Sólidos. **Química Nova**, v. 21, n.3, 1998.
70. MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M.J.K. **Vogel – Análise Química Quantitativa**. 6ª ed. Tradução: Julio Carlos Afonso, Paula Fernandes de Aguiar e Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 386-397 p.
71. GOBBO, L. A. **Os compostos do clínquer Portland: sua caracterização por difração de raios-X e quantificação por refinamento de Rietveld**. 2003. Dissertação (Mestrado em Geociências). Instituto de Geociências (IGc), Universidade de São Paulo, São Paulo.
72. CULLITY, B.D. **Elements of X-Ray Diffraction**. 2ª ed. Addison – Wesley Publishing Company, Inc; 1978.
73. SILVERTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MARRIL, J.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 70-77 p.
74. SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista (Ed. UNESP), 1996.
75. OLIVEIRA, I.R.; STUDART, A.R.; PILEGGI, R.J.; PANDOLFELLI, V.C. **Dispersão e empacotamento de Partículas**. São Paulo: Fazendo Arte, 2000. 119-173.

76. LIMA, R.M.F.; LUZ, J.A.M. Análise granulométrica por técnicas que se baseiam na sedimentação gravitacional: Lei de Stokes. **Rev. Esc. Minas.** v.54, n.2, Apr./June, 2001.
77. SALIN, V.M.M.; BORGES, C.P.; ALVES, T.L.M.; FERRAZ, H.C. Fenômenos Interfaciais: *Escola Piloto 2005*. **Programa de Engenharia Química/COPPE**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. P.78-95.
78. TEIXEIRA, V.G.; COUTINHO, F.M.B.; GOMES, A.S. Principais Métodos de Caracterização da Porosidade de Resinas à Base de Divinilbenzeno. **Química Nova**, v.24, n.6, p. 808-818, 2001.
79. SHAW, D.J. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**. Tradução: Juergen Maar Heinrich. São Paulo: Editora Edgar Blucher, 1975.
80. CALLISTER, W.D.J. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 5ª ed. Tradução: Sergio Murilo Stamile Soares. Rio de Janeiro: LTC editora, 2002. 56-57 p.
81. PADILHA, A. F. **Microscopia Eletrônica de Transmissão. Dep. De Engenharia Metalúrgica e de Materiais da EPUSP**. Disponível em: http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_3_MET_PMI-2201.pdf. Acesso em: 19/12/2007
82. KESTENBACH, H. J.; BOTTA, W. J. F. **Microscopia eletrônica: transmissão e varredura**. Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais. São Paulo, 1994.
83. OLIVEIRA, F. P. **INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO NA OBTENÇÃO DE BIOCERÂMICAS À BASE DE HIDROXIAPATITA**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
84. DOURADO, E. R. **Preparação e Caracterização de Hidroxiapatita Nanoestruturada Dopada com Estrôncio**. 2006. Dissertação de Mestrado. CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS Rio de Janeiro, dezembro 2006.
85. LI, Y.; TJANDRA, W.; TAM, K.C. Synthesis and characterization of nanoporous hydroxyapatite using cationic surfactants as templates. **Materials Research Bulletin**, v. 43, p. 2318-2326, 2008.
86. YE, X.; ZHOU, Y.; SUN, Y.; CHEN, J.; WANG, Z. Structure and infrared emissivity of collagen/SiO₂ composite. **Applied Surface Science**. v. 254, p. 5975-5980, 2008.
87. DJOŠI, M.S.; MIŠKOVIĆ-STANKOVIĆ, V.B.; MILONJIĆ, S.; KAČAREVIĆ-POPOVIĆ, Z.M.; BIBIĆ, N.; STOJANOVIĆ, J. Electrochemical synthesis and characterization of hydroxyapatite powders. **Materials Chemistry and Physics**, v. 111, p. 137-142, 2008.
88. BATISTA, T. M.; MARTINS, V. C. A.; BENTO, C. A. S.; PLEPIS, A. M. G. Efeito do pH na Calcinação In Vitro de Pele Porcina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.17, n.4, p.289-293, 2007.

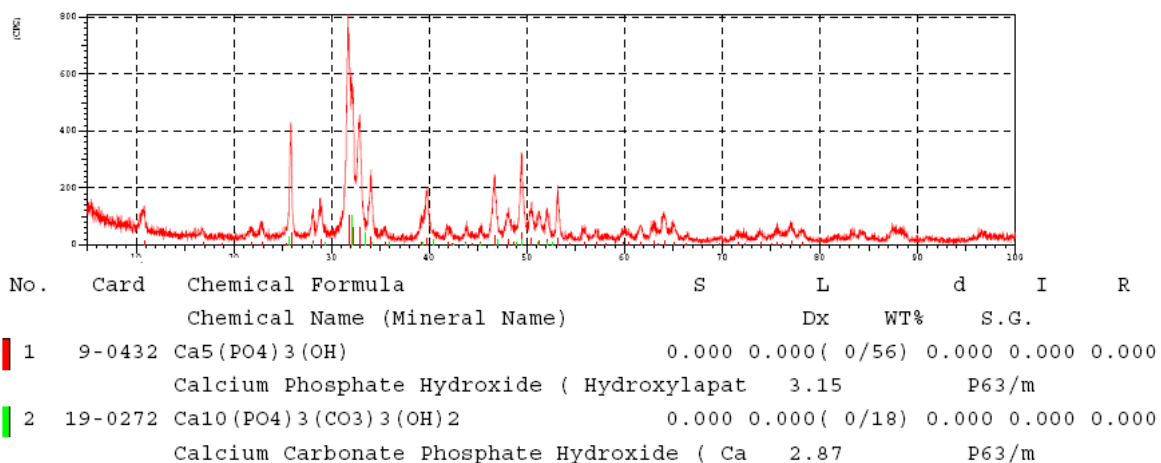
89. ROSSI, A. M., MOREIRA, J., MAVROPOULOS, E., SOARES, G. A., MOURE, G. T. Dissolution of Calcium-Deficient Hydroxyapatite Synthesized at Different Conditions. **Materials Characterization**, v.50, n.2-3, p.203 – 207, 2003.
90. MIYAKE, M.; WOTANABE, K.; NAZYAMA, Y.; NAGOSAWA, H.; SUZUKI, T.; **Synthetic Carbonate Apatites as Inorganic Cation Exchangers. J. Chem. Soc. Faraday Trans**, v.86, n. 12, p. 2303-2306, 1990.
91. MILLER, L.M.; VAIRAVAMURTHY, V.; CHANCE, M.R.; MENDELSON, R.; PASCHALIS, E.P.; BETTS, F.; BOSKEY, A.L.;_In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO_4^{3-} vibration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1527, p.11-19, 2001.
92. LI, J.; CHEN, Y.; YIN, Y.; YAO, F.; YAO, K. Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan–gelatin network film in situ. **Biomaterials**, v. 28, p. 781-790, 2007.
93. RODRIGUEZ-CLEMENTE, R.; LOPEZ-MACIPE A.; GOMEZ-MORALES J.; TORRENT-BURGUES J.; CASTANO V.M. Hydroxyapatite Precipitation: A Case of Nucleation-Aggregation-Agglomeration-Growth Mechanism. **Source: Journal of the European Ceramic Society**, v.18, n.9, p. 1351-1356, 1998.
94. MOSTAFA, N.Y.; Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. **Materials Chemistry and Physics**, v. 94, p. 333–341, 2005.
95. KOTHAPALLI, C.R.; WEI, M.; LEGEROS, R.Z.; SHAW, M.T. Influence of temperature and aging time on HA synthesized by the hydrothermal method. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.16, p. 441-446, 2005.
96. LIU, J.; YE, X.; WANG, H.; ZHU, M.; WANG, B.; YAN, H. The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. **Ceramics International**, v.29, p. 629-633, 2003.
97. LEGEROS, R.Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphate. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 395, p. 81-98, 2002.

8. ANEXOS

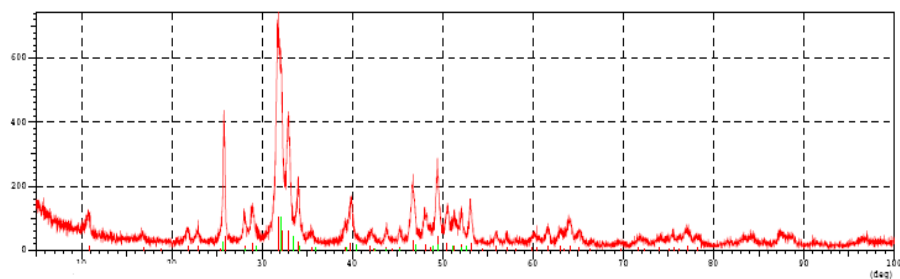
Identificações das fases presentes nas amostras obtidas por Difração de Raios X



Anexo 1 – Identificação da amostra de HAP-7 com envelhecimento de sete dias seca em estufa.

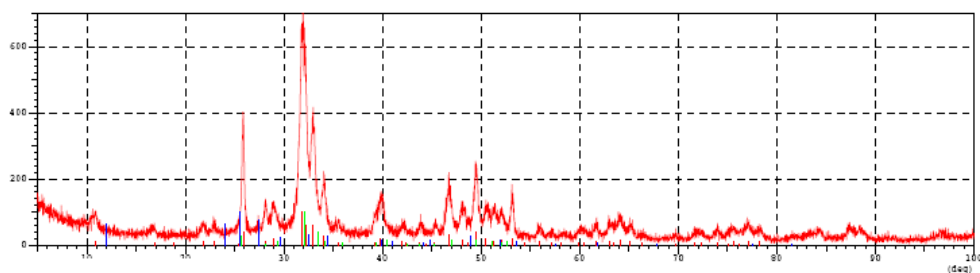


Anexo 2 – Identificação da amostra de HAP/Col-7 com envelhecimento de sete dias seca em estufa.



No.	Card	Chemical Formula	S	L	d	I	R
		Chemical Name (Mineral Name)		Dx	WT%	S.G.	
1	9-0432	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)	0.000	0.000(0/56)	0.000	-----	0.000
		Calcium Phosphate Hydroxide (Hydroxylapat	3.15			P63/m	
2	19-0272	Ca ₁₀ (PO ₄) ₃ (CO ₃) ₃ (OH) ₂	0.000	0.000(0/18)	0.000	-----	0.000
		Calcium Carbonate Phosphate Hydroxide (Ca	2.87			P63/m	

Anexo 3 – Identificação da amostra de HAP-Lio-14 com envelhecimento de quatorze dias liofilizada.



No.	Card	Chemical Formula	S	L	d	I	R
		Chemical Name (Mineral Name)		Dx	WT%	S.G.	
1	9-0432	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)	0.000	0.000(0/56)	0.000	0.000	0.000
		Calcium Phosphate Hydroxide (Hydroxylapat	3.15			P63/m	
2	19-0272	Ca ₁₀ (PO ₄) ₃ (CO ₃) ₃ (OH) ₂	0.000	0.000(0/18)	0.000	0.000	0.000
		Calcium Carbonate Phosphate Hydroxide (Ca	2.87			P63/m	
3	1-0588	Ca(H ₂ PO ₂) ₂	0.000	0.000(0/19)	0.000	0.000	0.000
		Calcium Hydrogen Phosphite	-----			-----	

Anexo 4 – Identificação da amostra de HAP-30 com envelhecimento de trinta dias seca em estufa.