

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

LILIAM CRISTINA ANGELO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS HIDROXIAPATITA-
GELATINA OBTIDOS PELO MÉTODO DE PRECIPITAÇÃO UTILIZANDO O
MÉTODO DE RIETVELD E IVTF

PONTA GROSSA
2008

LILIAM CRISTINA ANGELO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS HIDROXIAPATITA-
GELATINA OBTIDOS PELO MÉTODO DE PRECIPITAÇÃO UTILIZANDO O
MÉTODO DE RIETVELD E IVTF

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

Orientador: Prof. Dr. André Vitor Chaves de
Andrade.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Regina
Masetto Antunes.

PONTA GROSSA
2008

Dedicatória...

Aos meus pais Felipe Beniz Angelo (In memoriam) e Neuza Silvestrini Angelo pelo dom da vida e pelo incentivo, apoio e orientação nos momentos difíceis. Sacrificaram-se muitas vezes por minha causa, deixando os seus sonhos para mais tarde...

Ao meu irmão Lucas Felipe Angelo, que muitas vezes é amado a distância...por eu estar ocupada com os estudos...

Ao professor José Caetano Zurita da Silva (In memoriam) pelo incentivo e dedicação incessante à pesquisa...

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Felipe (*In memoriam*), pelo incentivo, apoio e rigidez, cobrando de mim sempre as melhores notas. Pelo exemplo de honra, força, honestidade, e principalmente de coragem, simplesmente “meu herói”. Sei que onde quer que esteja, está sempre olhando por mim, e feliz, sorrirá orgulhoso por esta conquista que também é dele.

À minha mãe, Neuza, pelo apoio, compreensão, dedicação, e espera....obrigada por estar sempre do meu lado....meu exemplo de vida....meu braço direito, minha melhor amiga.

Ao meu irmão, Lucas, simplesmente por amá-lo incondicionalmente....mesmo distante, sempre recebi seu carinho, tão importante, principalmente quando nos encontramos longe de nossos familiares.

Ao meu orientador, André Vitor Chaves de Andrade, pela orientação, ajuda, oportunidades, apoio, confiança, incentivo e presença desde os primeiros passos deste projeto de pesquisa. Dando forças sempre, para que juntos, pudéssemos superar os obstáculos dolorosos da perda de nosso companheiro e amigo José Caetano Zurita da Silva. Evidentemente os vínculos afetivos formados durante estes anos transgridem a relação professor-estudante dando como resultado uma forte relação de amizade e companheirismo, que espero perdure por muitos anos.

À minha co-orientadora, Sandra, pela dedicação, generosidade, ajuda e confiança depositada para a realização deste trabalho.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Química Aplicada, que contribuíram grandemente para meu enriquecimento intelectual. Em especial à professora Christiane Philippini Ferreira Borges e Jacqueline Marques pelo companheirismo e dedicação.

Aos amigos de pós-graduação, Fernando Perotta, Fernando Ferreira, Rodrigo Alexandre Sayka, Marilei Casturina Mendes, Kelly Iarosz e Jaqueline pelos momentos de descontração e amizade adquirida.

Em especial, às minhas amigas, Daniele Nascimento, Jociani Ascari e Juliane Bocardi pelo companheirismo, compreensão e apoio, pela amizade verdadeira e preciosa que me proporcionaram.....obrigada pelas horas de conversas, desabafos e descontração.

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

Aos órgãos governamentais CAPES, CNPq, FAPESP, Fundação Araucária e Paraná Tecnologia, pelo suporte financeiro.

Obrigada a todos aqueles, inclusive não citados, que contribuíram, incentivaram ou participaram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*"Não fiquem maravilhados diante do novo,
nem assustados pelo que ontem vos era desconhecido.
Não recuem diante do mistério,
mas procurem enfrentá-lo e desvendá-lo...
Não se considerem os únicos donos da verdade e do conhecimento,
pois um diploma não faz o cientista.
Somente assim poderão cumprir sua missão, ser úteis ao próximo...
E façam tudo com amor,
pois será um dia esplêndido aquele em que, dos progressos da ciência,
participará também o coração".*

(Pasteur)

RESUMO

Apatitas nanoestruturadas com cristalinidade e composição similar a apatita do osso têm sido amplamente investigadas nos últimos anos. Devido ao osso ser um tecido que requer algum grau de tensão mecânica para manter sua vitalidade, têm sido empregados vários biopolímeros, como o compósito HAP/Gelatina a fim de minimizar este problema. Este biomaterial de característica singular apresenta os principais constituintes da fase mineral e orgânica do osso, respectivamente. O objetivo deste trabalho foi propor uma rota de síntese na qual a HAP fosse obtida por reação de precipitação diretamente sobre o colágeno e verificar o efeito da adição de gelatina na estrutura cristalina da HAP. A síntese empregada foi por via úmida através do gotejamento de uma solução contendo H_3PO_4 sobre o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ junto a adição de soluções de gelatina com diferentes concentrações (3 e 4 g/L, designadas, GEL1 e GEL2, respectivamente). Controlou-se a temperatura da síntese em aproximadamente 42°C e o pH após o término do gotejamento foi mantido em 12. Após os períodos de 1 e 21 dias de envelhecimento as amostras foram caracterizadas. As análises de DRX mostraram que as amostras com adição de gelatina apresentavam volumes de cela unitária maiores nos dois períodos de envelhecimento estudados, quando relacionados com as amostras controle. As amostras GEL2 apresentaram volumes menores que as amostras GEL1, devido as maiores interações ocorridas entre os íons Ca^{2+} da HAP e dos íons $\text{R}-\text{COO}^-$ da gelatina. Com a formação da calcita, CaCO_3 , como segunda fase para estas amostras, íons Ca^{2+} foram retirados da estrutura da HAP, originando uma HAP deficiente em cálcio, e isso, provavelmente, faz com que o volume da cela unitária diminua. Nas amostras tratadas termicamente, observou-se uma redução do volume da cela unitária mais significativa nas amostras controle (AC) e GEL1, quando se envelheceu por mais tempo as amostras. Para as amostras não tratadas termicamente, observou-se que no mesmo período de envelhecimento (21 dias), o volume da cela unitária também é menor devido principalmente à decomposição das carbonato apatitas em CaO . Quanto às microdeformações da rede cristalina, observou-se que o tamanho de cristalito é diretamente proporcional à redução da microdeformação, devido à diminuição das tensões internas no cristal na medida em que ele cresce. As análises de IVTF mostraram a formação de carbonato apatita do tipo B, devido à substituição dos PO_4^{3-} por CO_3^{2-} . A substituição foi mais evidente nas amostras controle (AC) e GEL1 com menor tempo de envelhecimento; nas amostras GEL2, as bandas de fosfato foram mais evidentes. As micrografias obtidas por MEV revelaram a formação de aglomerados e que os cristais são nanoestruturados. Estes resultados confirmam que a presença da gelatina afeta diretamente as propriedades estruturais da HAP. O método de síntese empregado neste estudo se mostrou eficaz na produção de nanocristais de apatitas mimetizando estruturalmente uma apatita biológica.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, gelatina, difração de raios X.

ABSTRACT

Nano-structured hydroxyapatite with crystallinity and composition similar to bone apatite has been widely investigated in last years. Because the bone is a tissue that requires some degree of mechanics tension to keep its vitality, has been used some biopolymers, as the composite HAP/gelatin, in order to minimize this problem. This biomolecule shows a singular characteristic, once that is the main mineral and organic phase bone constituent, respectively. The objective of this work was to consider a route of synthesis in which the hydroxylapatite was gotten by precipitation reaction directly on the collagen and to check out the effect of the gelatin addition in the hydroxylapatite crystal structure. The synthesis used was the wet precipitation through the dripping of a solution contains H_3PO_4 on the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ together the addition of gelatin solutions with different concentrations (3 and 4 g/L, named GEL1 and GEL2 respectively). Temperature of the synthesis was controlled in approximately 42°C and pH after the ending of the dripping was kept in 12. After the periods of 1 and 21 days of aging the samples had been characterized. The DRX analyses had shown that the samples with gelatin addition shows bigger unit cell volumes in the two periods of aging studied, when related with the samples control. Samples (GEL2) shows lesser volumes than samples GEL1, which had the biggest interactions occurred between ions Ca^{2+} of the HAP and ions $\text{R}-\text{COO}^-$ of the gelatin. With the calcite, CaCO_3 , formation as second phase for these samples, ions Ca^{2+} are removed of the HAP structure, originating a calcium deficient HAP, and this, probably, makes with that the unit cell volume diminishes. However, in the thermally treated samples, a unit cell volume reduction more significant occurs to sample control (AC) and GEL1, when the samples are aging for more time. For the samples did not treat thermally; it was observed in the same time of aging (21 days), the unit cell volume also is lesser must mainly by the decomposition. mainly the decomposition of carbonate apatites in CaO . On the microstrains of the crystal, were observed that when crystallite size increases there is a consequent microstrains reduction due to reduction of the internal tensions in the crystal while it grows. The FTIR analysis shows that type B carbonate apatite occurs, due the groups PO_4^{3-} are substituted by groups CO_3^{2-} . The substitution was more evident in the control samples (AC) and GEL1 with lesser aging time, in samples GEL2, the phosphate bands are more evidences. The SEM (scanning electron microscopy) micrographs show that there are formation of agglomerates and that the crystals are nano-structured. These results confirm that the gelatin presence affects directly the HAP structural properties. The method of synthesis presented in this study is a useful tool to production of nano crystals of the apatites structurally mimicking biological apatite.

Keywords: Hydroxylapatite, gelatin, x-ray diffraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Investimentos feitos pelos EUA em 2005 no emprego de dispositivos utilizados na reconstrução ortopédica.....	3
Figura 2- Expectativa de vida da população nos anos de 1990 e 2000 comparada com a qualidade óssea de pessoas de mesma idade.....	9
Figura 3- Efeito da idade na durabilidade do osso em homens e mulheres.....	9
Figura 4- Estrutura cristalina da HAP. Projeção no plano 001.....	13
Figura 5- Esquema da localização do colágeno no tecido ósseo.....	21
Figura 6- Estrutura química do colágeno do tipo I. (a) Cadeia peptídica; (b) Enovelamento em tripla hélice; (c) Microfibrilas.....	23
Figura 7- Gráfico de Rietveld da AC após 1 dia de envelhecimento.....	47
Figura 8- Gráfico de Rietveld da amostra GEL1 após 1 dia de envelhecimento.....	49
Figura 9- Gráfico de Rietveld da amostra GEL2 após 1 dia de envelhecimento.....	50
Figura 10- Fases presentes nas amostras AC, GEL1 e GEL2 após 1 dia de envelhecimento.....	51
Figura 11- Variação do volume da cela unitária para a AC, GEL1 e GEL2 após 1 dia de envelhecimento.....	51
Figura 12- Gráfico de Rietveld da AC após 21 dias de envelhecimento.....	53
Figura 13- Gráfico de Rietveld da amostra GEL1 após 21 dias de envelhecimento.....	54
Figura 14- Gráfico de Rietveld da amostra GEL2 após 21 dias de envelhecimento.....	55
Figura 15- Variação do volume da cela unitária para a AC, GEL1 e GEL2 após 21 dias de envelhecimento.....	56
Figura 16- Fases presentes nas amostras AC, GEL1 e GEL2 após 21 dias de envelhecimento.....	57

Figura 17- Variação do volume da cela unitária das AC, GEL1 e GEL2 após os tempos de envelhecimento estudados.....	58
Figura 18- Gráfico de Rietveld da AC sinterizada, após 1 dia de envelhecimento.....	61
Figura 19- Gráfico de Rietveld da amostra GEL1 sinterizada, após 1 dia de envelhecimento.....	62
Figura 20- Gráfico de Rietveld da amostra GEL2 sinterizada, após 1 dia de envelhecimento.....	63
Figura 21- Fases presentes nas amostras AC, GEL1 e GEL2 sinterizadas, após 1 dia de envelhecimento.....	64
Figura 22- Variação do volume da cela unitária para a AC, GEL1 e GEL2 sinterizadas, após 1 dia de envelhecimento.....	65
Figura 23- Gráfico de Rietveld da AC sinterizada, após 21 dias de envelhecimento.....	66
Figura 24- Gráfico de Rietveld da amostra GEL1 sinterizada, após 21 dias de envelhecimento.....	67
Figura 25- Gráfico de Rietveld da amostra GEL2 sinterizada, após 21 dias de envelhecimento.....	68
Figura 26- Variação do volume da cela unitária para a AC, GEL1 e GEL2 sinterizadas, após 21 dias de envelhecimento.....	69
Figura 27- Fases presentes nas amostras AC, GEL1 e GEL2 sinterizadas, após 21 dias de envelhecimento.....	70
Figura 28- Variação do volume da cela unitária das amostras AC, GEL1 e GEL2 sinterizadas, após os tempos de envelhecimento estudados.....	72
Figura 29- Gráfico de distribuições de microdeformações de rede das amostras controle. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) Após 21 dias de envelhecimento.....	74
Figura 30- Representação do tamanho de cristalito das amostras controle. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) Após 21 dias de envelhecimento.....	75
Figura 31- Gráfico de distribuições de microdeformações de rede das amostras GEL1. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) Após 21 dias de envelhecimento.....	75
Figura 32- Representação do tamanho de cristalito das amostras GEL1. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) Após 21 dias de envelhecimento.....	76

Figura 33- Gráfico de distribuições de microdeformações de rede das amostras GEL2. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) Após 21 dias de envelhecimento.....	77
Figura 34- Representação do tamanho de cristalito das amostras GEL2. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) Após 21 dias de envelhecimento.....	77
Figura 35- Espectros de IVTF das apatitas sintetizadas após os dois períodos de envelhecimento estudados.....	80
Figura 36- Espectro de IVTF da gelatina utilizada para a síntese dos compósitos HAP/GEL.....	82
Figura 37- Espectros de IVTF das amostras controle após os dois períodos de envelhecimento estudados.....	84
Figura 38- Espectros de IVTF dos compósitos HAP/GEL após os dois períodos de envelhecimento estudados.....	85
Figura 39- Microscopias dos pós das apatitas sintetizadas (a) Amostra Controle com 1 dia de envelhecimento (b) Amostra Controle com 21 dias de envelhecimento (c) GEL1 com um dia de envelhecimento (d) GEL1 com 21 dias de envelhecimento (e) GEL2 com 1 dia de envelhecimento (f) GEL2 com 21 dias de envelhecimento.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplo do uso clínico de biomateriais.....	11
Tabela 2- Logaritmo da constante do produto de solubilidade de alguns fosfatos de cálcio.....	14
Tabela 3- Composição química dos principais tecidos humanos calcificados.....	19
Tabela 4- Distribuição e tipos de colágeno.....	22
Tabela 5- Características do colágeno como biomaterial.....	24
Tabela 6- Condições de síntese do compósito HAP/GEL e das amostras de controle.....	34
Tabela 7- Funções instrumentais que representam os efeitos instrumentais sobre o perfil de difração.....	37
Tabela 8- Coeficientes e constantes obtidas do refinamento de estrutura do CeO ₂ utilizados como padrão em todos os refinamentos de estrutura das amostras presentes neste trabalho.....	37
Tabela 9- Estrutura da hidroxiapatita conforme a ficha ICSD #203027, adotada para o início do refinamento da estrutura.....	46
Tabela 10- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da AC com 1 dia de envelhecimento.....	48
Tabela 11- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL1 com 1 dia de envelhecimento.....	49
Tabela 12- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL2 com 1 dia de envelhecimento.....	50
Tabela 13- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da AC com 21 dias de envelhecimento.....	53
Tabela 14- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL1 com 21 dias de envelhecimento.....	54
Tabela 15- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL2 com 21 dias de envelhecimento.....	55
Tabela 16- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da AC sinterizada com 1 dia de envelhecimento.....	61

Tabela 17- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL1 sinterizada com 1 dia de envelhecimento.....	62
Tabela 18- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL2 sinterizada com 1 dia de envelhecimento.....	63
Tabela 19- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da AC sinterizada com 21 dias de envelhecimento.....	67
Tabela 20- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL1 sinterizada com 21 dias de envelhecimento.....	68
Tabela 21- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL2 sinterizada com 21 dias de envelhecimento.....	69
Tabela 22- Absorções características no IV dos grupos funcionais estudados...	79

LISTA DE SIGLAS

ACP: Fosfato de cálcio amorfo

AC: Amostra controle

a_k : Função de assimetria

COL: Colágeno

CD-HAP: Hidroxiapatita Deficiente

CHAP: Hidroxiapatita carbonatada

CHAP-A: Hidroxiapatita carbonatada do tipo A

CHAP-B: Hidroxiapatita carbonatada do tipo B

CHAP-AB: Hidroxiapatita carbonatada do tipo AB

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DCP: Monoidrogeno fosfato de cálcio

DCPD: Monoidrogeno fosfato de cálcio diidratado

DRX: Difração de raios X

D_{wd} : Estatística de Durbin- Watson

EUA: Estados Unidos da América

EXAFS: Espectroscopia de absorção de raios X

IVTF: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

fwhm: (full-width-at-half-maximum): Largura-total-a-meia-altura de um pico de difração. No texto serão mantidas as iniciais do nome em inglês, por ser parte do jargão internacional

f: Fase presente na amostra

F_g : Funções de largura-total-a-meia-altura

G: Função de perfil gaussiana

G_k : Função de perfil G_k adotada no programa GSAS semelhante à função pseudo-Voigt de Thompson, Cox & Hastings

GEL: Gelatina

GEL1: Compósito HAP/GEL com adição de 3 g/L de gelatina

GEL2: Compósito HAP/GEL com adição de 4 g/L de gelatina

GPa: Giga Pascal

(Gly-X-Y)_n: Sequência de aminoácidos repetitiva (Gly: glicina; X: prolina (Pro) e Y: hidroxiprolina (Hyp))

HAP: Hidroxiapatita

HAP/GEL: Compósito hidroxiapatita/gelatina

HAP/COL: Compósito hidroxiapatita/colágeno

HAP/PLLA: Compósito hidroxiapatita/ácido polilático

h, k, l: Índices de Miller

I_o: Intensidades observadas

I_c, Intensidades calculadas

JHS: Indústria de materiais para a medicina e odontologia

JCPDS: Joint Committee of Powder Diffraction Standards

k^a : Multiplicidade da reflexão

k^o: Pico de Bragg

L: Função de perfil lorentziana.

L_{p_k}: Fator de Lorentz-polarização

LIMAC: Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos

M: Função de minimização

m: Massa da cela unitária

MCPA: Diidrogenofosfato de cálcio anidro

MCPM: Diidrogenofosfato de cálcio monoidratado

MPa: Mega Pascal

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

N_{obs} : Número total de observações

N_{var} : Número de variáveis

OCP: Fosfato octacálcico

PLLA: Ácido polilático

PGA: Ácido poliglicólico

PE: Polietileno

pV: Função de perfil pseudo-Voigt

P_k : Função orientação preferencial

RNA: Ácido ribonucleico

R_{wp} : Índice ponderado da qualidade do refinamento em função dos pontos do perfil de difração de raios X

R_p : Índice da qualidade do refinamento padrão

R_B : Índice da qualidade do refinamento em função das intensidades dos picos de Bragg

TTCP: Tetracálcio fosfato

IVTF: Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier

V: Volume da cela unitária

y_{bi} : Intensidade da radiação de fundo (background)

XPS: Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

β -TCP: Beta-Tricálcio fosfato

α -TCP: Alfa-Tricálcio fosfato

LISTA DE SÍMBOLOS MAIS RELEVANTES

$|F_k|$: Fator de estrutura onde estão todos os parâmetros estruturais

η : Fração Lorentziana para a função de perfil pseudo-Voigt

η_m : Coeficiente misturador das contribuições gaussiana e lorentziana

Φ : Ângulo de fase

S_ϕ : Fator de escala da fase ϕ o qual é utilizado na análise quantitativa

$\omega(2\theta)$: Função que define a distribuição do comprimento de onda da radiação X

Γ : Largura-total-a-meia-altura (sigla em inglês, fwhm)

γ : Alargamento de linha lorentziano

σ^2 : Variância gaussiana

2θ : Ângulo de Bragg

χ^2 : “goodness of fit” ou precisão do ajuste

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	1
INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
II.1 BIOMATERIAIS	7
II.2 BIOMATERIAIS CARÂMICOS	10
II.3 HIDROXIAPATITA	10
II.4 HIDROXIAPATITA CARBONATADA (CHAP)	15
II.4.1 Preparação da Carbonato Apatita Tipo A	17
II.4.2 Preparação da Carbonato Apatita do Tipo B	17
II.5 APATITA BIOLÓGICA	18
II.6 COLÁGENO NO TECIDO BIOLÓGICO	20
II.6.1 Tipos de Colágeno	21
II.7. COMPÓSITOS FOSFATO DE CÁLCIO/COLÁGENO	24
CAPÍTULO III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
III.1 SISTEMA UTILIZADO PARA A SÍNTESE	31
III.1.1 Síntese e Preparação da Hidroxiapatita	31
III.1.1.1 Amostra Controle	32
III.1.1.2 Amostras com adição de gelatina (Compósitos HAP/GEL)	32
III.1.2 Envelhecimento	33
III.1.3 Secagem	34
III.1.4 Sinterização	34
III.2 CARACTERIZAÇÃO DAS APATITAS SINTETIZADAS	35
III.2.1 Difração de Raios X	35
III.2.1.1 Coleta de dados de difração de raios X	35
III.2.1.2 Identificação das fases	36
III.2.1.3 Refinamento de Rietveld	36
III.2.1.4 Método de Rietveld e alguns modelos matemáticos utilizados no programa GSAS	38
III.2.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho	44

III.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
IV.1 Refinamento das estruturas pelo Método de Rietveld das amostras não tratadas termicamente	46
IV.1.1 Amostras com 1 dia de envelhecimento	47
IV.1.2 Amostras com 21 dias de envelhecimento	52
IV.1.3 Estudo comparativo	57
IV.2 Refinamento das estruturas pelo Método de Rietveld das amostras tratadas termicamente	60
IV.2.1 Amostras com 1 dia de envelhecimento	60
IV.2.2 Amostras com 21 dias de envelhecimento	66
IV.2.3 Estudo comparativo	71
IV.3 Análise de tamanho de cristalito e microdeformação da rede cristalina	72
IV.4 Caracterização estrutural das apatitas nanoestruturadas por Espectroscopia de Infravermelho	78
IV.4.1 Estudo Comparativo	82
IV.5 Caracterização morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura	86
CAPÍTULO V. CONCLUSÕES	89
CONCLUSÕES	90
PERSPECTIVAS FUTURAS	92
REFERÊNCIAS	93

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O ser humano, no seu processo de evolução, tem se preocupado em restaurar ou substituir partes danificadas do tecido ósseo. Já em meados do século XVII, Fallopius implantou uma placa de ouro para restaurar um defeito craniano, e desde então se tem usado os implantes para a substituição de partes danificadas do sistema ósseo.

A partir dessa tentativa, numerosos materiais têm sido utilizados, mas muito poucos têm tido resultados satisfatórios já que a maioria provoca, em maior ou menor grau, uma resposta imunológica negativa do organismo receptor.^{1, 2}

De acordo com Williams (1987), os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo.³

Os principais avanços no campo dos biomateriais têm ocorrido principalmente devido ao aumento do número de pacientes que necessitam obter melhora na qualidade de vida. O crescimento da expectativa de vida aumenta o número de pacientes nos hospitais em função principalmente da ocorrência de osteoporose e de outras patologias envolvendo fraturas e perdas ósseas. No Brasil, 8,6 % da população tem mais de 60 anos e estima-se que o número de idosos duplique em relação ao de hoje, chegando a 32 milhões em 2025.⁴

Nos Estados Unidos são investidos anualmente mais de cinco bilhões de dólares em dispositivos usados na reconstrução ortopédica (Figura 1).⁵ Além disso, a ampliação do número de pacientes nos hospitais também está diretamente

correlacionada à proliferação de veículos de transporte, gerando aumento no número de acidentes com lesões graves. O desenvolvimento das técnicas cirúrgicas também tem expandido a demanda por próteses, implantes e equipamentos médicos.⁶

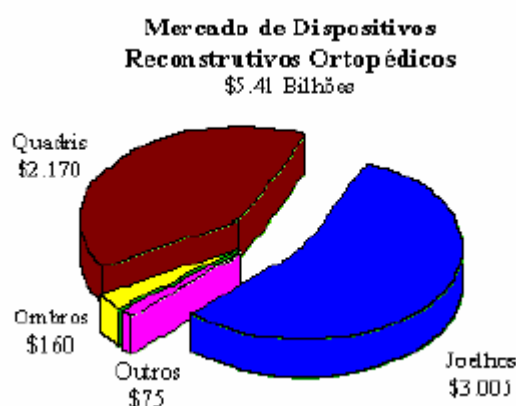


Figura 1- Investimentos feitos pelos EUA em 2005 no emprego de dispositivos utilizados na reconstrução ortopédica (Extraído de BIOMET, 2005).

O osso humano é composto por material orgânico e inorgânico e por substâncias essenciais como a água. A fase orgânica é constituída principalmente pelo colágeno tipo-I, por proteínas não-colagênicas e por células que atuam na formação e na dissolução da matriz óssea. A fase inorgânica é constituída majoritariamente por hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e contém pequenas quantidades de: Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , Cl^- e F^- .⁷

A hidroxiapatita é uma das principais biocerâmicas usadas na regeneração de tecidos ósseos. A similaridade com a parte inorgânica dos tecidos calcificados no que se refere a estequiometria, cristalinidade e composição química fazem com que esta biocerâmica seja utilizada como material biocompatível e bioreabsorvível no preenchimento de defeitos ósseos ou como cobertura em implantes metálicos.^{8, 9, 10}

A hidroxiapatita carbonatada é um sistema de grande importância devido a sua similaridade com a bioapatita dos tecidos calcificados e por sua alta taxa de dissolução em meio biológico. Poucos trabalhos têm sido realizados sobre métodos de preparação de hidroxiapatita, em especial das hidroxiapatitas carbonatadas nanoestruturadas e sobre a caracterização química e estrutural deste material. A preparação de materiais nanoestruturados exige modificações nas técnicas de síntese a fim de mimetizar estruturalmente as bioapatitas. Exemplo disto é a utilização de baixa temperatura, alto valor de pH, adição lenta dos reagentes e tempo de digestão pequeno, que contribuem para a produção de nano cristais de apatita.¹¹ Estes parâmetros de síntese afetam a morfologia, o tamanho de partícula e a cristalinidade do material e, essas propriedades influenciam diretamente no tipo de aplicação da apatita.¹²

Existem algumas desvantagens específicas que ainda limitam o uso da HAP cerâmica para substituição de tecidos duros, tais como sua natureza frágil, a realidade conflitante entre porosidade e resistência mecânica e o problema de migração das partículas. A fim de minimizar, ou até mesmo superar estes problemas, uma solução seria misturá-la a um ligante adequado. Nesse sentido, têm sido empregados vários biopolímeros, tais como colágeno, cola de fibrila, gelatina, quitosana e alginato.^{13, 14, 15, 16}

Assim, o objetivo geral desse trabalho foi propor uma rota de síntese na qual a HAP fosse obtida por reação de precipitação diretamente sobre o colágeno, com composição química e cristalinidade similar a uma apatita biológica.

De um modo específico desejou-se verificar o efeito da adição de gelatina comercial na estrutura cristalina da HAP e em algumas das suas propriedades, tais como cristalinidade, defeitos cristalinos e microdeformação.

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos. O Capítulo I apresenta a introdução do trabalho realizado.

O Capítulo II traz a revisão da literatura, que aborda uma definição para os biomateriais, enfatizando a biocerâmica de hidroxiapatita e suas aplicações.

O Capítulo III descreve o procedimento experimental utilizado para a obtenção e caracterização do compósito HAP/GEL.

O Capítulo IV apresenta os resultados obtidos a partir das técnicas de caracterização de DRX, Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho e Microscopia Eletrônica de Varredura junto à discussão da análise desses resultados.

O Capítulo V traz as conclusões a respeito dos estudos realizados nesta dissertação.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 BIOMATERIAIS

Biomateriais são materiais naturais ou sintéticos usados para restaurar ou substituir tecidos danificados, interagindo com o sistema biológico e recuperando sua função.^{17, 18} A demanda por novos biomateriais para regeneração ortopédica e dentária tem crescido fortemente nos últimos 20 anos devido ao número crescente de casos clínicos que necessitam destes materiais e também pelo aumento da expectativa de vida do indivíduo.

Uma pesquisa divulgada nos Estados Unidos em 1994 mostrou que são produzidos anualmente mais de 5.000.000 (cinco milhões) de implantes no país e mais de 3.000.000 (três milhões) na Europa. São realizados anualmente nos EUA mais de 500.000 procedimentos com enxertos ósseos e estima-se que o dobro seja realizado no resto do mundo.⁵ Estima-se que o mercado de implantes tenha taxa de crescimento de 11 % ao ano, o que demonstra grande interesse pela produção de biomateriais para uso ortopédico e dentário, tanto que o período entre 2000-2010 foi declarado pelas Nações Unidas como sendo “a década do osso e da junta.”¹⁹

No Brasil, o uso de implantes ortopédicos tem crescido devido ao grande número de acidentes de trabalho, de trânsito e pela violência. Estima-se que no Brasil sejam realizadas cerca de 150 mil próteses de quadril e joelho e 50 a 100 mil implantes dentários por ano.²⁰

Grande parte dos biomateriais usados no nosso país é importada gerando gastos elevados pela Previdência Social. Desta forma, o desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro na área de biomateriais tornou-se uma obrigação para

atender às necessidades da população no que se refere à melhoria da saúde pública e redução de custos.

A primeira geração de biomateriais (durante os anos 1960 e 1970) abrangia os materiais bioinertes, ou seja, aqueles que eram tolerados pelo organismo e não provocavam reações inflamatórias ou infecciosas no local da implantação. Nessa época destacaram-se os implantes de titânio e aço. Nos anos 1980, surgiu a segunda geração de biomateriais, baseada nos materiais bioativos e bioreabsorvíveis. As cerâmicas (hidroxiapatita-HAP, β -tricálcio fosfato-TCP), biovidros e polímeros (colágeno-COL, ácido L-poliláctico-PLLA, ácido poliglicólico-PGA, etc) são exemplos destes biomateriais. As características de bioatividade e bioreabsorção foram inicialmente associadas aos biomateriais de forma individual, ou seja, produziam-se materiais apenas bioativos ou apenas bioreabsorvíveis. Posteriormente, esses conceitos foram unificados e passou-se a produzir materiais que possuíam ambas características. Exemplos destes materiais são os compósitos de HAP/COL, HAP/PLLA, dentre outros. Esses materiais são capazes de estabelecer ligação com o tecido ósseo e após certo tempo sofrer degradação, promovendo a osteointegração e a osteocondução, contribuindo para a regeneração natural do tecido.^{21, 22, 23}

A terceira geração de biomateriais começou a surgir no final da década de 1990 e consiste na produção de biomateriais com potencial regenerativo do próprio tecido pela estimulação de genes que iniciam o reparo no local da perda ou da doença óssea. Essa geração de materiais está associada à técnica de engenharia de tecidos e à regeneração de tecido *in situ*. A primeira refere-se ao emprego de “scaffolds”, como materiais de sustentação, e estes são associados a células e proteínas necessárias para regeneração do tecido vivo. As células são cultivadas e

após sua diferenciação são implantadas no paciente. A segunda emprega materiais na forma de compósitos constituídos de biomateriais, fatores de crescimento e biomoléculas que têm a propriedade de estimular a regeneração do tecido quando introduzidas no local do reparo.^{23, 24, 25}

Portanto, a nova geração de biomateriais tem como objetivo diminuir o risco de rejeição do tecido, acelerar o período de recuperação e aumentar a qualidade dos implantes e da vida das pessoas (Figura 2), uma vez que a formação óssea tem sua atividade diminuída com a idade (Figura 3).²⁴

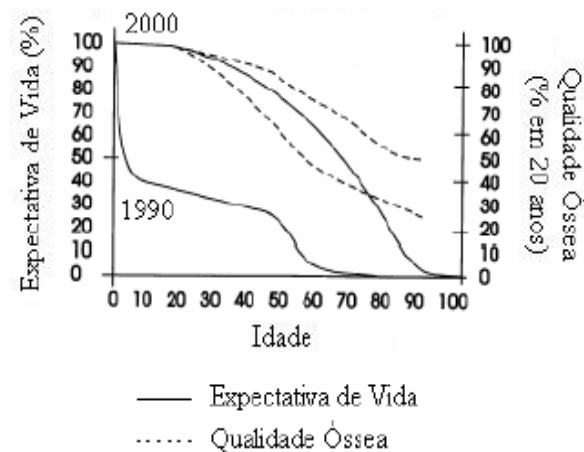


Figura 2- Expectativa de vida da população nos anos de 1990 e 2000 comparada com a qualidade óssea de pessoas de mesma idade (Extraído de HENCH, 1998).

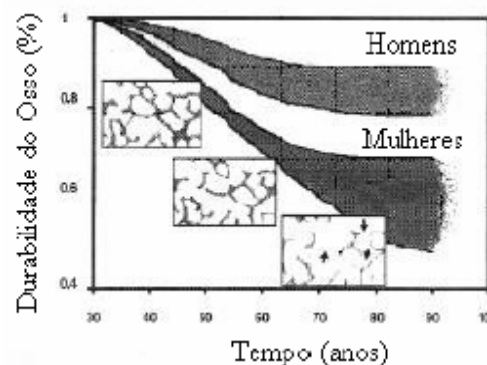


Figura 3- Efeito da idade na durabilidade do osso em homens e mulheres (Extraído de HENCH, 2000).

II.2 BIOMATERIAIS CERÂMICOS

Os primeiros dados sobre a utilização de materiais cerâmicos como enxerto ósseo começam com Albee em 1920, que utilizou uma cerâmica de fosfato tricálcico para regenerar um defeito ósseo e para a formação de osso novo. Entretanto, somente 50 anos depois começaram a aparecer diferentes tipos de cerâmicas de fosfato de cálcio como materiais implantáveis para aplicação em medicina e odontologia. Em 1974 foi publicada a primeira aplicação odontológica do β -fosfato tricálcico no tratamento de doenças periodontais,^{26, 27} seguindo-se em 1975, pelo trabalho de Nery *et al*, com β -fosfato tricálcico, com a introdução do conceito de porosidade como uma característica importante para estes tipos de biocerâmicas.

A grande aceitação das biocerâmicas a base de sais de fosfato de cálcio deve-se, principalmente, ao seu alto grau de biocompatibilidade, que provavelmente está associado a sua similaridade química com os materiais normalmente encontrados no tecido ósseo. Entre as cerâmicas com melhor desempenho estão os biovidros, a alumina, a β -TCP (Beta-Fosfato tricálcico) e a hidroxiapatita.²⁹

II.3 HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita (HAP) é o principal constituinte inorgânico dos tecidos calcificados representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes, respectivamente. Por ser um material com composição química e estrutura similar à fase mineral dos tecidos ósseos, ela é amplamente usada como biomaterial na área médica (Tabela 1). A HAP é biocompatível com o tecido ósseo, não induzindo a rejeição por parte do tecido, e é bioativa, permitindo a ligação química entre o

material e o tecido ósseo (osteointegração) e favorecendo o crescimento ósseo sobre a superfície do material ou entre ele (osteocondução).^{29, 30, 31, 32, 6}

Tabela 1- Exemplo do uso clínico de biomateriais (Adaptada de SHIRTLIFF & HENCH, 2003).

Aplicação	Materiais
Ortopédica	Al ₂ O ₃ ZrO ₃ estabilizado Pó de HAP Pó de vidro bioativo
Recobrimento de superfície – ligação bioativa	HAP Cerâmicas de vidro bioativas
Preenchimento ósseo	Fosfato Tricálcio Sais fosfatos cálcio
Implantes dentários	Al ₂ O ₃ HAP Vitrocerâmicas
Tendão e ligamentos artificiais	Compósitos de PLLA/fibra de carbono
Obliteração de espaços periodontais	HAP Compósito PLLA/HAP Fosfato Tricálcio Sais de fosfatos cálcio Vitrocerâmicas
Reconstrução maxilofacial	Al ₂ O ₃ HAP Compósito HAP/PE Vitrocerâmicas
Cirurgia espinhal	Cerâmicas de vidro bioativas HAP
Tratamento terapêutico de tumores	Vidros de aluminossilicatos dopados com terras raras
Válvulas cardíacas artificiais	Recobrimento com carbono pirolítico
Otolaringologia	Al ₂ O ₃ HAP Vidros bioativos Vitrocerâmicas Compósito HAP/PE

^[a] HAP – Hidroxiapatita, PE – Polietileno e PLLA – ácido polilático.

O uso da HAP não se restringe à área médica como material biocompatível, no tratamento de defeitos e enxertos ósseos. Ela também é empregada na área

ambiental, como absorvedor de metais pesados em rejeitos industriais, solos e águas poluídas.^{30, 33} Na área farmacêutica é utilizada como separador de proteínas em coluna cromatográfica.³⁴ Na catálise, a HAP tem sido proposta em reações de desidratação e desidrogenação de álcoois e oxidação do metano.^{30, 33} Essa variedade de aplicações faz da HAP um dos sistemas mais promissores no desenvolvimento de novos materiais a base de fosfatos.

A hidroxiapatita possui fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e cristaliza-se segundo o grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, num sistema hexagonal, com parâmetros de rede a e c iguais a 9,418 e 6,884 Å, respectivamente. Os átomos de cálcio e os oxigênios do grupo PO_4^{3-} formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de maior simetria (eixo c), como pode ser visto na Figura 4. O grupo fosfato apresenta um arranjo tetraédrico e é constituído por diferentes sítios: 1 O(I), 1 O(II) e 2 O(III). Os dez íons Ca^{2+} apresentam arranjos diferentes: quatro cálcios constituem o sítio Ca(I) e estão rodeados por nove oxigênios (3 O(I), 3 O(II) e 3 O(III)). Os outros seis, constituem o sítio Ca(II) e estão rodeados por seis oxigênios (1 O(I), 1 O(II) e 4 O(III)) e uma hidroxila. Os átomos de Ca(II) formam triângulos ao longo do eixo c apresentando rotação de 60° de cada um. A HAP é uma variação da fluorapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, onde o grupo hidroxila não está localizado exatamente no centro do triângulo de Ca(II) encontrando-se deslocado ao longo do eixo c de aproximadamente 0,20 Å.^{29, 30, 31, 35}

A estrutura da HAP permite facilmente substituições catiônicas e aniônicas. Os íons Ca^{2+} podem ser parcialmente ou completamente substituídos por K^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} e os íons PO_4^{3-} por F^- , Cl^- , HPO_4^{2-} , AsO_4^{3-} , CO_3^{2-} e VO_4^{3-} . Substituições no canal da hidroxila também podem ocorrer por Cl^- , F^- e CO_3^{2-} . Dentre

as diversas possibilidades de substituições iônicas em sua estrutura as substituições pelo grupo carbonato, CO_3^{2-} , apresentam grande relevância.^{30, 18}

A estrutura da hidroxiapatita está representada pela Figura 4.

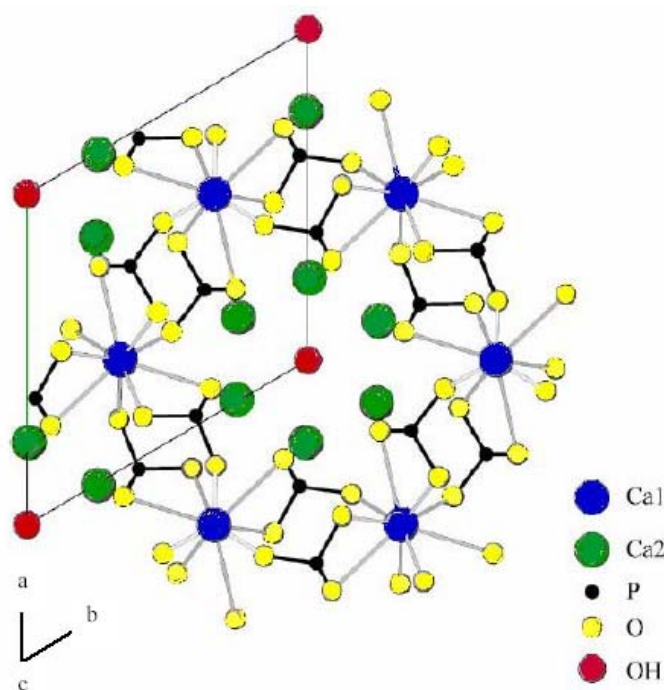


Figura 4- Estrutura cristalina da HAP. Projeção no plano 001 (Adaptada de IVANOVA, 2001).

As propriedades da hidroxiapatita são fortemente dependentes do método de preparação. Valores da razão Ca/P e algumas substituições influenciam, dentre outros fatores, a estabilidade do material. Hidroxiapatitas estequiométricas, ou seja, com razão Ca/P igual a 1,6667, apresentam boa cristalinidade e são estáveis até 1200°C. Em temperaturas acima de 900°C, este material passa por um processo de densificação transformando-se em um material cerâmico. Cerâmica vem da palavra grega “*keramus*” que significa coisa queimada. Numa definição simplificada, materiais cerâmicos são compostos de elementos metálicos e não metálicos, com exceção do carbono. Dessa forma, as apatitas deficientes em cálcio ($\text{Ca/P} < 1,67$)

decompõem-se em β - fosfato tricálcio (β -TCP) a partir de 800°C, enquanto que as apatitas ricas em cálcio ($\text{Ca/P} > 1,67$) decompõem-se em CaO .^{36, 8, 30}

A solubilidade das apatitas é um fator importante para seu comportamento *in vivo*. Fatores como morfologia, composição, tamanho de cristal e cristalinidade, afetam a dissolução do material.^{8, 37} A Tabela 2 apresenta os valores do logaritmo da constante do produto de solubilidade de alguns fosfatos de cálcio.¹⁸ Observa-se que a hidroxiapatita é o sistema menos solúvel dos diversos tipos de fosfatos de cálcio e que a solubilidade depende da razão Ca/P .

Tabela 2- Logaritmo da constante do produto de solubilidade de alguns fosfatos de cálcio ^[a] (Extraído de DOROZHUKIN, 2002).

Nome	Fórmula	Ca/P	Símbolo	Solubilidade a 25°C, -log(Ksp)
Dihidrogeno fosfato de cálcio monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.50	MCPM	1,14
Dihidrogeno fosfato de cálcio anidro	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	MCPA	1,14
Monohidrogeno fosfato de cálcio	CaHPO_4	1.00	DCP	6,90
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00	DCPD	6,59
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	OCP	96,6
Hidroxiapatita Deficiente	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2$	1.50-1.67	CD-HAP	≈ 85,1
Fosfato de cálcio amorfo n= 3-4.5; 15-20% H_2O	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1.5	ACP	[b]
α - Fosfato Tricálcio	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	α -TCP	25,5
β - Fosfato Tricálcio	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	β -TCP	28,9
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	HAP	116,8
Fosfato Tetracálcio	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.00	TTCP	38-44

^[a] A solubilidade é dada como o logaritmo do produto iônico para dado composto (excluindo a água de hidratação) com concentrações em mol/L; ^[b] Não pode ser medido precisamente. Entretanto, os seguintes valores são reportados na literatura: 25,7 (pH 7,40), 29,9 (pH 6,00) e 32,7 (pH 5,28).

II.4 HIDROXIAPATITA CARBONATADA (CHAP)

A substituição pelo grupo carbonato na estrutura da hidroxiapatita pode ocorrer de duas maneiras distintas: o íon CO_3^{2-} pode substituir o íon PO_4^{3-} formando uma carbonato apatita do tipo B (CHAP-B), como também pode substituir o íon OH^- , formando uma carbonato apatita do tipo A (CHAP-A). Além destas duas substituições, o íon CO_3^{2-} pode ser inserido em ambos os sítios de PO_4^{3-} e de OH^- , formando uma carbonato apatita do tipo AB (CHAP-AB). Estes tipos de substituição contribuem para alterar os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a solubilidade e a estabilidade da estrutura da HAP.^{29, 30}

A substituição no sítio A causa uma expansão do parâmetro a e uma contração do parâmetro c . Isto ocorre porque o íon carbonato é maior que o hidróxido. A substituição no sítio B tem efeito contrário, ou seja, ocorre uma contração do parâmetro a e uma expansão do parâmetro c , uma vez que o íon fosfato é maior que o íon carbonato.^{29, 30, 36} Uma explicação para a expansão ou contração do eixo c não é detalhada na literatura.

A presença de carbonato na estrutura da apatita proporciona um aumento da solubilidade e da taxa de dissolução dos cristais da apatita. Além disso, a presença de íons carbonato tem grande efeito na cristalinidade da estrutura e tamanho de cristal. A formação de cristais menores contribui para um aumento da área superficial e da taxa de dissolução, como também provoca um alargamento dos picos de difração. Estudos mostram que a substituição pelo íon carbonato gera uma grande desordem estrutural criando vacâncias de Ca^{2+} e OH^- . Esta desordem também reflete na periodicidade dos planos cristalográficos observada pelos raios X.

A substituição do íon OH^- por um íon CO_3^{2-} provoca alterações na estrutura que são recompensadas pela neutralização das cargas. Nesta substituição, dois hidróxidos são trocados por um carbonato e uma vacância de OH^- .^{30, 38}



A substituição de um íon PO_4^{3-} por um íon CO_3^{2-} produz grandes mudanças na estrutura local do sítio. Para manter a neutralidade das cargas, a substituição gera uma perda de um grupo OH^- e um íon Ca^{2+} .^{30, 38}



A morfologia do cristal sofre alterações quando ocorre substituição do PO_4^{3-} e OH^- pelo grupo CO_3^{2-} . Os cristais que apresentam forma acicular passam a ter morfologia mais esférica com o aumento do teor de carbonato.^{36, 29}

A estabilidade térmica da apatita também é influenciada pela presença do íon carbonato. A CHAP decompõe-se em temperaturas menores com o aumento do teor de carbonato. Na decomposição da CHAP, óxido de cálcio (CaO) é formado como fase secundária.³⁰

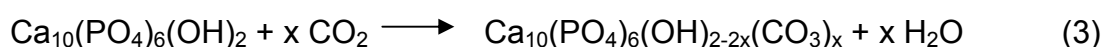
A estrutura de uma carbonato apatita ainda não foi determinada de forma precisa e há muitas propostas sobre sua configuração. Em uma hidroxiapatita, o grupo fosfato apresenta duas faces paralelas e duas faces inclinadas ao eixo c . Estudos indicam que para uma carbonato apatita do tipo B, o triângulo formado pelos oxigênios do grupo CO_3^{2-} ocupa uma das faces do grupo PO_4^{3-} inclinada com

relação ao eixo *c*. Na carbonato apatita do tipo A, o grupo CO_3^{2-} encontra-se num plano paralelo ao eixo *c*.^{38, 39, 40, 41, 42, 43, 44}

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.

II.4.1 Preparação da Carbonato Apatita Tipo A

As carbonato apatitas do tipo A são preparadas a partir da HAP sob fluxo de CO_2 , em alta temperatura, aproximadamente 900°C . A formação de CHAP-A ocorre segundo a reação abaixo:

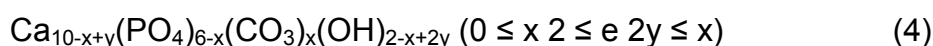


Essas apatitas possuem alto grau de cristalinidade e são estáveis em temperaturas acima de 800°C .^{36, 30}

II.4.2 Preparação da Carbonato Apatita Tipo B

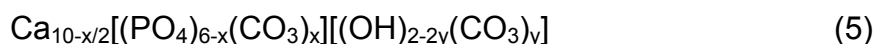
As carbonato apatitas do tipo B são preparadas em meio aquoso através da mistura de uma solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ com outra contendo $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ numa temperatura de $80\text{-}100^\circ\text{C}$ e pH igual a 11, mantido pela adição de NH_4OH .

A fórmula geral que representa uma CHAP-B é dada por:³⁰



Na síntese por via úmida uma pequena parte dos íons OH^- são também substituídos por CO_3^{2-} , dando origem a uma carbonato apatita do tipo AB, CHAP-AB. A substituição do sítio A é favorecida em baixos teores de carbonato.³⁰

A fórmula química que representa a substituição nos dois sítios é representada por:⁵²



II.5 APATITA BIOLÓGICA

A apatita biológica difere da hidroxiapatita sintética e estequiométrica na composição, cristalinidade e estequiometria. As apatitas biológicas não são estequiométricas, ou seja, apresentam razão $\text{Ca/P} \neq 1,67$ e contêm impurezas estruturais, principalmente íons CO_3^{2-} . A fórmula geral para a apatita biológica é dada por:



onde M representa alguns cátions tais como Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Pb^{2+} e Y alguns ânions tais como HPO_4^{2-} , VO_4^{3-} .^{29, 30, 45}

A apatita biológica presente na dentina e esmalte apresenta diferentes teores de carbonato: 5,6 e 3,5 % em massa, respectivamente.⁴⁶ No osso, a quantidade de carbonato varia de 4-8 % em massa e depende da idade, do tipo de tecido, da fase (formação ou maturação) e da existência de patologia.^{30, 47} A Tabela 3 mostra a composição de diferentes tipos de tecidos calcificados. A diferença no teor de CO_3^{2-}

destas amostras modifica a taxa de dissolução da apatita, o tamanho, a forma dos cristais e a cristalinidade, como mencionado anteriormente.

Tabela 3- Composição química dos principais tecidos humanos calcificados (Extraído de DOROZHKIN, 2002).

Composição (% massa) Componentes Tamanho típico	Esmalte	Dentina	Osso	Hidroxiapatita
Ca	35,5	35,1	34,8	39,6
P	17,7	16,9	15,2	18,5
Ca/P	1,63	1,61	1,71	1,67
Na	0,50	0,60	0,90	-
Mg	0,44	1,23	0,72	-
K	0,08	0,05	0,03	-
CO ₃ ²⁻	3,50	5,60	7,40	-
F ⁻	0,01	0,06	0,03	-
Cl ⁻	0,30	0,01	0,13	-
P ₂ O ₇ ⁴⁻	97	70	65	100
Componentes Inorgânicos totais	1,50	20	25	-
H ₂ O	1,50	10	10	-
Parâmetro a (Å)	9,441	9,421	9,41	9,430
Parâmetro c (Å)	6,880	6,887	6,89	6,891
Índice de cristalinidade (HAP = 100)	70-75	33-37	33-37	100
Tamanho típico de cristal	100 x 50 x 50 µm	35 x 25 x 4	35 x 25 x 4	200-600
Produto de decomposição a 800 °C	β-TCP + HAP	β-TCP + HAP	HAP + CaO	HAP

Nas apatitas biológicas, os íons carbonatos ocupam simultaneamente o sítio do fosfato e do hidróxido numa razão aproximada de 10:1. A ocupação do sítio A tende a aumentar com a idade dos ossos. A maior parte das apatitas biológicas são

do tipo CHAP-B e estão presentes em ossos recém formados, enquanto que a CHAP-A está presente em ossos mais velhos e sua superfície apresenta baixa afinidade para as células osteoblásticas.^{47, 48}

As carbonato-apatitas sintéticas têm sido propostas como materiais para substituição óssea por apresentar composição mais similar à apatita biológica quando comparadas com a hidroxiapatita.⁴⁹ Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que o controle do teor de carbonato nas apatitas influencia a resposta biológica do material⁵⁰ e que a carbonato-apatita é um material promissor, pois propicia a ligação do tecido com o implante.⁵¹

II.6 COLÁGENO NO TECIDO BIOLÓGICO

O colágeno é reconhecido como a proteína mais abundante presente nos vertebrados, constituindo cerca de 90% da parte orgânica da matriz extracelular. Devido à sua complexidade estrutural, o termo colágeno é aplicado genericamente, podendo descrever moléculas individuais, uma fibrila natural *in vitro* ou *in situ* e agregados.⁵²

O colágeno e seu derivado, a gelatina, têm sido largamente empregados em produtos médicos, farmacêuticos e de consumo por mais de 100 anos.⁵³

O colágeno é um material extracelular produzido por células, como os fibroblastos, quando a hélice tripla é secretada por estas células. Suas terminações são clivadas, resultando em um arranjo de moléculas insolúveis, as fibras de colágeno.^{54, 55, 56} Um esquema mais detalhado de sua localização no osso é mostrado na Figura 5.

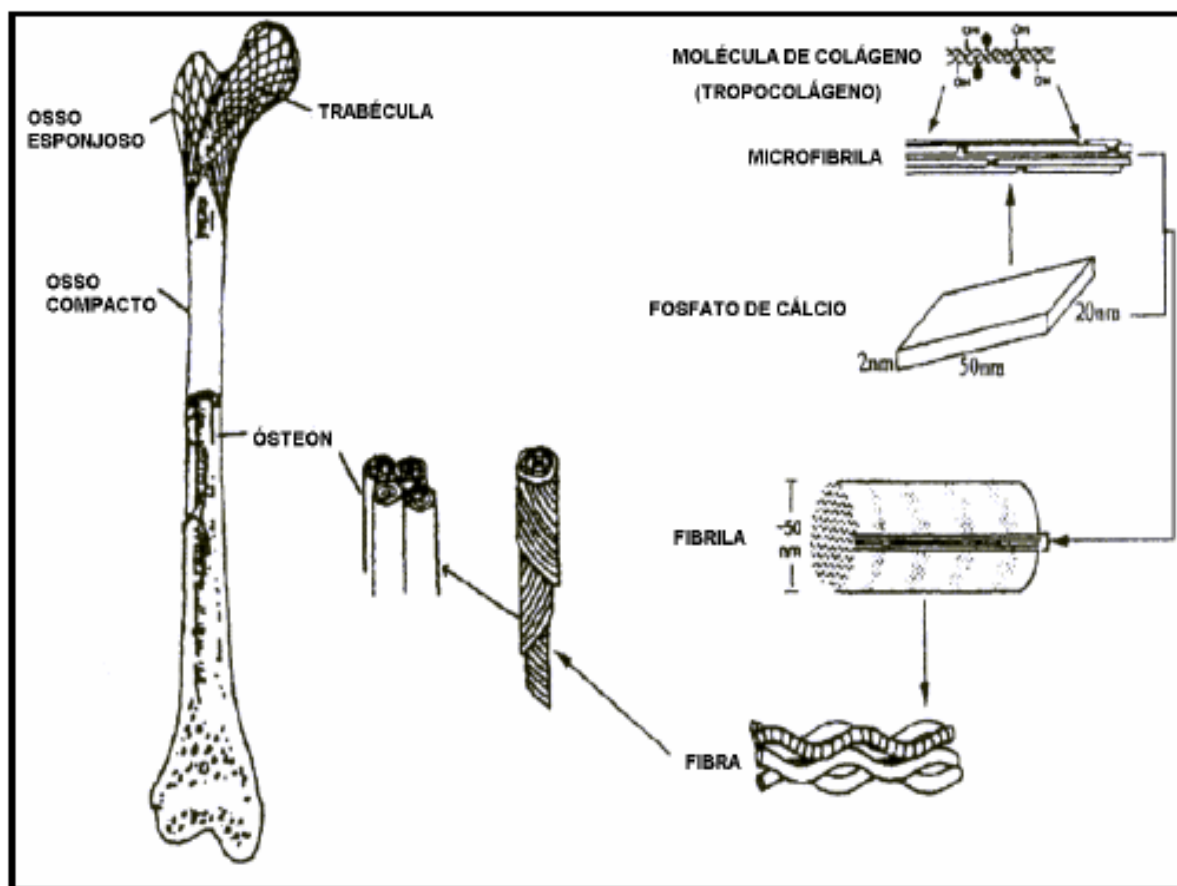


Figura 5- Esquema da localização do colágeno no tecido ósseo (LAWSON & CZERNUSKA, 1998).

II.6.1 Tipos de Colágeno

Existem mais de 20 espécies diferentes de colágeno, das quais somente 13 são bem conhecidas (Tabela 4).^{57, 58}

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 seqüência específica de aminoácidos. Dentre todos os tipos de colágenos existentes, mostrados na Tabela 4, o colágeno do tipo I tem despertado muita atenção por ser a proteína extracelular mais abundante, sendo também apontado como responsável pela manutenção da resistência mecânica nos ossos.^{52, 57, 58}

Tabela 4 – Distribuição e tipos de colágeno (modificado de FRIESS, 1998).

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, 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
VI	Pele, músculo do coração
VII	Pele, placenta, pulmão, cartilagem, córnea
VIII	Produzido pelas células endoteliais
IX	Cartilagem
X	Cartilagem hipertrópica e mineralizada
XI	Cartilagem, disco intervertebral, humor vítreo
XII	Tendão embrionário de frango, ligamento periodontal bovino
XIII	Pele fetal, mucosa intestinal

A molécula de colágeno consiste em três cadeias polipeptídicas entrelaçadas, formando uma estrutura chamada hélice tripla (Figuras 5 e 6). Cada cadeia polipeptídica possui aproximadamente 1038 resíduos de aminoácidos (Figura 6a).⁵²

A estrutura da hélice tripla (Figura 6b) é permitida devido a uma sequência de aminoácidos repetitiva chamada (Gly-X-Y)_n, onde Gly é glicina, X freqüentemente prolina (Pro) e Y hidroxiprolina (Hyp). Para a molécula de colágeno do tipo I, duas cadeias são idênticas, denominadas α_1 , e uma é homóloga, mas quimicamente distinta, denominada α_2 .^{52, 53, 55, 56}

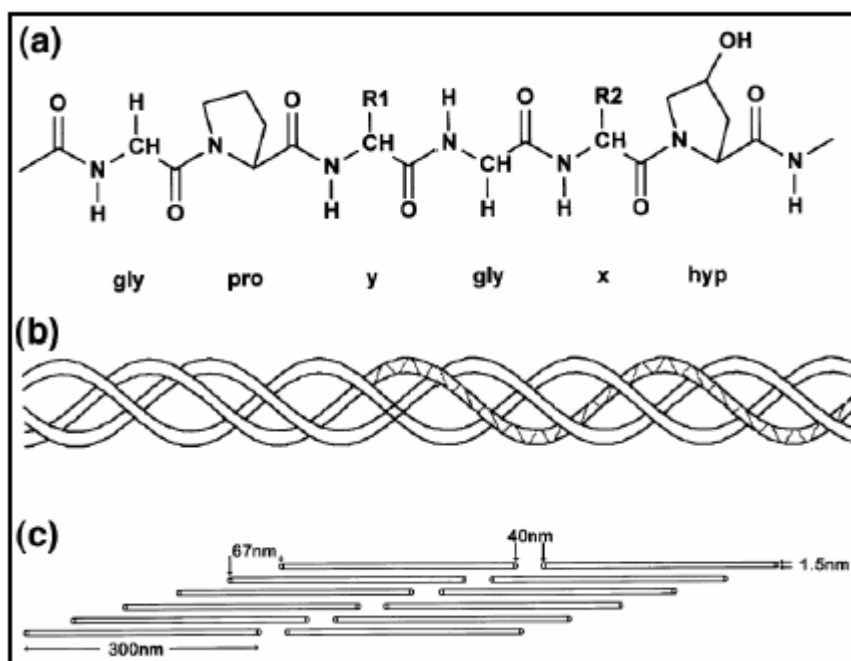


Figura 6- Estrutura química do colágeno do tipo I. (a) Cadeia peptídica; (b) Enovelamento em tripla hélice; (c) Microfibrilas (FRIESS, 1998).

A gelatina é essencialmente o colágeno desnaturado e pode ser obtida por processos químicos, enzimáticos ou térmicos.⁵⁹ A desnaturação é a perda da estrutura tridimensional do colágeno. Os principais agentes de desnaturação são: mudanças no pH (alteram as interações eletrostáticas entre aminoácidos carregados); mudanças na concentração do sal – força iônica (devido à mesma razão) e mudanças na temperatura (altas temperaturas reduzem a força das ligações de hidrogênio). Em alguns casos é possível a renaturação do colágeno, ou seja, a recuperação de sua estrutura em hélice tripla.⁶⁰

Vantagens e desvantagens do uso de colágeno como biomaterial são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5- Características do colágeno como biomaterial (KUKUROVA *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2001).

Vantagens	Desvantagens
Disponível abundantemente e facilmente purificado de organismos vivos (constitui mais que 30% dos tecidos de vertebrados)	Variabilidade do colágeno isolado (Ex. densidade de ligações cruzadas, tamanho da fibra, traços de impureza, etc.)
Não-alérgico	Hidrofílico, o que leva ao intumescimento e mais rápida liberação (no caso do uso em dispositivos de liberação controlada)
Biodegradável e bioreabsorvível	Variabilidade na taxa de degradação quando comparado com a degradação hidrolítica
Baixa antigenicidade	Propriedades de manuseio Complexas
Não-tóxico e biocompatível	Efeitos secundários, tais como a possibilidade de transmissão de encefalopatia bovina (“vaca louca”)
Sinérgico com componentes bioativos	
Plástico biológico devido à alta resistência mecânica	
Boa compatibilidade com células (adesão, crescimento e migração)	
Hemostático – promove a coagulação sangüínea	
Sua biodegradabilidade pode ser regulada por ligações cruzadas	
Compatível com polímeros sintéticos	

II.7 COMPÓSITOS FOSFATO DE CÁLCIO/COLÁGENO

Devido ao osso ser um tecido que requer algum grau de tensão mecânica para manter sua vitalidade, a segurança em longo prazo de um implante permanente de HAP é questionável. A fim de minimizar, ou até mesmo superar estes problemas, uma solução seria misturá-la a um “ligante” adequado. Nesse sentido, têm sido

empregados vários biopolímeros, tais como colágeno, cola de fibrila, gelatina, quitosana e alginato.^{48, 54, 56, 61, 62, 63}

O compósito de HAP/COL apresenta característica singular, uma vez que são os principais constituintes da fase mineral e orgânica do osso, respectivamente.⁵⁶ No osso, a interação fosfato de cálcio/colágeno possui papel importante na determinação das suas propriedades mecânicas.⁶⁴

Um aspecto fundamental na síntese do compósito HAP/COL é o crescimento do fosfato de cálcio sobre a matriz de colágeno em meio aquoso de forma semelhante ao osso natural, estruturalmente e composicionalmente. Alguns estudos mostram que as propriedades mecânicas dos compósitos produzidos são de menor alcance que os valores obtidos para o osso.⁶⁵

Em 1995, Tenhuisen *et al.*, produziram compósitos contendo hidroxiapatita deficiente em cálcio microcristalina e colágeno. Nesse estudo foi realizada uma reação ácido-base entre precursores do fosfato de cálcio (CaHPO_4 e $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$), na presença de uma matriz de colágeno a 38°C. As razões em massa entre HAP: Colágeno nos compósitos obtidos foram de 4,5:1, 11:1, 22:1. Verificou-se que a taxa de 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.

Alguns pesquisadores acreditam que, para alcançar propriedades similares às do osso é essencial mimetizar não somente a composição, como também sua estrutura.

Em 1999, Bradt *et al.*, promoveram a formação de fosfato de cálcio sobre fibrilas de colágeno. Nesse estudo a formação das fibrilas de colágeno e a mineralização ocorrem num único processo. As reações são iniciadas pela mistura simultânea de um ácido a uma solução de colágeno contendo cálcio e um tampão

neutralizador contendo fosfato. Além disso, foi estudada a influência do poliaspartato na mineralização. Verificou-se que a adição de poliaspartato melhora a interação entre o fosfato de cálcio e o colágeno.

Du e colaboradores (2000) obtiveram um método simples para produzir a matriz de fosfato de cálcio/colágeno. Pelo ajuste das condições de reação, obtiveram vários tipos de compósitos, incluindo os compósitos de fosfato de cálcio não cristalino/colágeno, hidroxiapatita carbonatada pouco cristalina/colágeno e hidroxiapatita carbonatada pouco cristalina + fosfato tricálcico/colágeno. Testes histológicos destes materiais revelaram uma resposta tecido-célula promissora para o compósito hidroxiapatita carbonatada pouco cristalina + fosfato tricálcico/colágeno.

O grupo coordenado pelos professores Kikuchi *et al.*, (1999) talvez seja o que tenha chegado mais próximo de um arranjo composicional e estrutural do compósito HAP/colágeno semelhante ao osso.^{68, 69, 70, 71} Para produção do compósito HAP/colágeno foi utilizado o método de precipitação por titulação, utilizando-se como reagentes uma solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($61,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ de H_2O) e uma solução de H_3PO_4 ($99,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ de H_2O) contendo 5g de colágeno. A razão em massa de HAP/COL 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. Testes mecânicos realizados apresentaram variação com o grau de organização do compósito: os valores máximos encontrados para resistência à flexão em 3 pontos e módulo de Young foram $39,5 \pm 0,88 \text{ MPa}$ e $2,5 \pm 0,38 \text{ GPa}$, respectivamente. Em 2002, Chang e Tanaka usaram a Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS) para avaliar esses

compósitos, confirmando a formação de uma ligação covalente entre o Ca^{2+} da HAP e grupamentos R-COO^- da molécula de colágeno.

Outros trabalhos publicados não avançaram em relação aos resultados já obtidos. Em 2003, Roveri e colaboradores produziram o compósito HAP/COL tipo I (razão em massa 80/20) pelo processo de neutralização usando solução de Ca(OH)_2 e H_3PO_4 . O pH da reação foi ajustado entre 9-10 e a temperatura em 25°C . Foi verificado por microscopia eletrônica de transmissão (MET) que os nanocristais de HAP estão alinhados com seus eixos *c* ao longo do comprimento das fibras de colágeno.

Em 2004, um estudo desenvolvido por Bigi e colaboradores investigou o efeito da gelatina na força de compressão, na evolução da fase e na microestrutura do cimento de fosfato de cálcio. O compósito composto por aproximadamente 18% de gelatina e 82% de α -tricálcico fosfato foi preparado a partir de uma solução aquosa de gelatina contendo o α -tricálcico fosfato. 5% em água de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados ao pó antes de misturar com a fase líquida. Duas formulações do cimento foram preparadas usando duas relações diferentes de líquido/pó, e suas propriedades comparadas com amostras de controle, preparadas sem gelatina. A presença da gelatina acelera a reação de ajuste, e melhora as propriedades mecânicas dos cimentos. A força de compressão aumenta com a reação de ajuste até 10.7-14.0 MPa para os cimentos com gelatina, visto que as amostras de controle exibem valores muito mais baixos. As propriedades mecânicas melhoradas dos cimentos compostos com respeito às amostras de controle podem ser relacionadas com a redução total da microestrutura e sua porosidade mais compacta.

Em 2005, Shu *et al.*, investigaram o efeito da gelatina na nucleação e no crescimento de cristais de hidroxiapatita carbonatada (CHAP) e a influência

subseqüente na microestrutura das amostras sinterizadas. Os pós nanocristalinos de hidroxiapatita carbonatada (CHAP) foram preparados com nitrato de cálcio tetraidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e hidrogenofosfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ na presença de diferentes concentrações de gelatina em solução aquosa. Os resultados de difratometria de raios X (DRX), combinados com a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), indicaram que a concentração da solução de gelatina é um fator predominante na inibição da nucleação e no crescimento dos cristais de hidroxiapatita; esta inibição pode estar fortemente relacionada à interação entre íons Ca^{2+} na solução e íons $\text{R}-\text{COO}^-$ das moléculas de gelatina. A análise por IVTF mostrou que o pó com 4% em água de gelatina, após o tratamento térmico a 900°C por 2 horas, exibiu a fase monofásica de CHAP. A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que o pó obtido após o tratamento térmico a 900°C era composto de partículas de CHAP nanocristalinas de (50-100 nm), e que as amostras subseqüentemente sinterizadas eram altamente porosas.

Teng e seus colaboradores (2006) verificaram o efeito da adição do alginato quanto à estrutura e morfologia em nanocompósitos de hidroxiapatita/gelatina. Com o aumento da quantidade de alginato, formou-se uma rede cross-linked do polímero de alginato/gelatina, que induziu a um deslocamento gradual para o vermelho de picos de absorção orgânica na análise de espectroscopia de infravermelho. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) indicaram que o desenvolvimento de nanocristais de HAP em uma mistura aquosa de alginato/gelatina foi altamente influenciada pelo índice de alginato. No índice crescente de alginato, as dimensões dos cristais aumentaram e no índice elevado de alginato, os cristais tenderam a agregar-se em conjuntos separados. Os resultados

análises por difração de elétrons indicaram que o alginato promoveu o alinhamento preferencial no sentido *c* dos nanocristais de HAP. Os resultados da análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que uma quantidade elevada de alginato, levava a formação de grandes cristais de HAP após os compostos serem calcinados por 4 horas a 600°C.

No mercado brasileiro existe comercialmente à disposição um compósito HAP/COL em forma esponjosa. É um material composto de 25% de colágeno e 75% de HAP. Segundo o fabricante JHS, o processo de fabricação mantém intacta a configuração helicoidal das moléculas de colágeno, assim como sua estrutura fibrosa. Este material é comercializado em embalagem, contendo de uma a três mantas com volumes médios de 0,9 ou 0,3 cm³, selada e esterilizada em óxido de etileno.

CAPÍTULO III

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

III.1 SISTEMA UTILIZADO PARA A SÍNTESE

O sistema utilizado para a síntese da hidroxiapatita teve as seguintes etapas:

- Síntese de hidroxiapatita;
- Envelhecimento;
- Secagem e desaglomeração;
- Sinterização

III.1.1 Síntese e Preparação dos Compósitos

O método escolhido para a obtenção da hidroxiapatita foi o método aquoso ou reação por via úmida, representada pela equação 7. Com este método, a precipitação da hidroxiapatita ocorre devido à reação do ácido fosfórico H_3PO_4 (85% P.A - Nuclear) e uma suspensão contendo hidróxido de cálcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (P.A - Nuclear).



Em comparação com outros métodos sugeridos na literatura, este método foi escolhido em virtude da simplicidade da reação, do baixo custo dos reagentes, da facilidade de sua compra e do grau de pureza adequado. O subproduto da reação é a água, não causando maiores problemas quanto à utilização do produto da reação

como biomaterial. Tanto o ácido fosfórico quanto o hidróxido de cálcio são muito utilizados pela comunidade científica nas reações de precipitação.

Com o objetivo de se obter como principal fase a hidroxiapatita, tendo em vista a sua grande importância como biomaterial, as proporções dos reagentes nas reações executadas foram ajustadas para o valor da razão Ca/P igual a 1,67. Foram avaliadas as condições de processo de precipitação química (tempo, temperatura, concentração dos reagentes) que permitiram a obtenção da fase hidroxiapatita.

Tendo em vista a aplicação da hidroxiapatita e para evitar ao máximo as contaminações, foi utilizada água destilada para o preparo das soluções das amostras de controle e dos compósitos de HAP/GEL.

III.1.1.1 Amostra Controle

As amostras controle (AC) foram preparadas a partir do método de precipitação por titulação, onde são utilizados, como reagentes, soluções de Ca(OH)_2 e H_3PO_4 , de acordo com a equação 7.

III.1.1.2 Amostras com adição de gelatina (Compósitos HAP/Gelatina)

Primeiramente, foram preparadas as soluções de gelatina, em duas diferentes concentrações, 3 e 4 g/L, as quais foram designadas como GEL1 e GEL2. A gelatina comercial utilizada (Dr. Oetker®, sem sabor e sem cor) foi escolhida para o desenvolvimento do trabalho, para verificar se as propriedades da gelatina comercial seriam similares as de colágeno puro, uma vez que, a gelatina comercial é obtida a partir do colágeno, ossos e pele de suínos. A gelatina foi dissolvida com água

destilada a uma temperatura de aproximadamente 42°C. Posteriormente, estas soluções foram usadas para dissolver o Ca(OH)_2 .

As soluções das amostras controle e os compósitos (Gelatina + H_3PO_4 + Ca(OH)_2), foram colocadas em um béquer, sob agitação constante e aquecidas até aproximadamente 42°C. A seguir, foi realizado o gotejamento de H_3PO_4 (1,2 mol/L). A solução foi adicionada lentamente, controlando-se o gotejamento para o valor de 2 a 5 mL/min.

Durante a adição de H_3PO_4 , a temperatura do conteúdo do béquer de vidro foi mantida constante a 42°C, com uma variação inferior a $\pm 2^\circ\text{C}$. A rotação foi mantida a 200 rpm. Para tanto, foi utilizado um agitador mecânico com controlador de temperatura. Para ajustar o pH na faixa desejada, em torno de 12, foi necessária a adição de solução de NH_4OH concentrada.

III.1.2 Envelhecimento

Terminada a adição da solução de H_3PO_4 , o conteúdo do béquer de vidro foi mantido à temperatura ambiente por dois diferentes períodos de envelhecimento, 1 e 21 dias, a fim de verificar qual seria o efeito da gelatina no comportamento da estrutura cristalina a curto e longo prazo.

Durante este processo de obtenção, o pH foi monitorado e mantido entre 10 e 12 até a completa reação dos reagentes da hidroxiapatita. É de fundamental importância a manutenção dos valores de pH até que a reação se complete, garantindo assim a formação única de fase hidroxiapatita. Na tabela 6 a seguir, são apresentadas às condições de síntese das amostras controle e dos compósitos.

III.1.3 Secagem

Ao término dos diferentes períodos de envelhecimento mediu-se o pH. Após a decantação foi retirado o excesso de água. O resíduo no béquer foi seco completamente em estufa à temperatura de 110°C por 24 horas, para a retirada de água dos compósitos. Após a secagem o resíduo foi desaglomerado em almofariz de ágata.

Tabela 6- Condições de síntese do compósito HAP/GEL e das amostras de controle.

Condições de Síntese
Temperatura: 42°C
pH: 10-12
Agitação média: 200 rpm
Tempo de envelhecimento: 1 e 21 dias
Razão Ca/P teórica: 1,6667
Concentração de Ca(OH)_2 : 2,0 mol/L
Concentração de H_3PO_4 : 1,2 mol/L

III.1.4 Sinterização

As amostras foram acondicionadas em cadinhos de alumina e sinterizadas a temperatura de 1000°C por uma hora, em um forno da marca JUNG, modelo 0914 com limite de 1400°C em atmosfera de ar, com controle automático de temperatura e tempo. O resfriamento foi feito ao ar e após a sinterização, as amostras foram caracterizadas.

De modo simplificado, o procedimento experimental utilizado para a obtenção dos compósitos é dado pelo fluxograma a seguir.

III.2 CARACTERIZAÇÃO DAS APATITAS SINTETIZADAS

III.2.1 Difração de Raios X

Os materiais obtidos foram caracterizados por Difração de Raios X para determinação de fases e características do cristal. As medidas de DRX para as amostras obtidas logo após os períodos de envelhecimento foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos – LIMAC - da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

III.2.1.1 Coleta de dados de difração de raios X

Os dados de raios X foram coletados em um difratômetro SHIMADZU XRD-6000 com geometria Bragg-Brentano com tubo de cobre operando a 40 kV e 30 mA. As medidas foram feitas no modo de varredura passo-a-passo com passos de $0,02^\circ$ e tempo por passo igual a 6s, no alcance de 5° a 110° . Foram utilizadas fendas de divergência e espalhamento iguais a $1,0^\circ$ e fenda de recepção igual a 0,15 mm.

Para estudar a estabilidade térmica dos materiais e o aparecimento de fases secundárias, um segundo experimento foi realizado, no qual as amostras foram acondicionadas em cadinhos de alumina e sinterizadas a temperatura de 1000°C . A taxa de aquecimento empregada foi de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ e as amostras permaneciam na temperatura máxima por 1 hora, em um forno da marca JUNG, modelo 0914 com limite de 1400°C em atmosfera de ar, com controle automático de temperatura e tempo. O resfriamento foi feito ao ar e após a sinterização das amostras, foram

realizadas as medidas de DRX, no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos – LIMAC - da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

III.2.1.2 Identificação das fases

As fases foram identificadas utilizando-se o programa de identificação da Shimadzu. As fases identificadas foram confirmadas pelo Método de Rietveld.

O método de Rietveld permite a caracterização de materiais pelo uso da difração de Raios X, sendo possível fazer indexação de fases cristalinas, refinamentos de célula unitária, análise quantitativa de fases, determinação de tamanho de cristal, microestrutura e orientação preferencial.

III.2.1.3 Refinamento de Rietveld

Após a identificação das fases, foram realizadas buscas pelos modelos estruturais das fases $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, do CaCO_3 e CaO no banco de dados “on-line” ICSD (Inorganic Crystal Structure Database), disponibilizado no Brasil pela CAPES. Os modelos estruturais adotados nos refinamentos de Rietveld correspondem a fichas correspondentes aos códigos ICSD 26204, 16710 e 26959, respectivamente. Nas amostras não-sinterizadas foram utilizadas somente as duas primeiras fichas, pois não foi identificada a fase CaO nestas amostras. Nas amostras sinterizadas, todas as fichas foram utilizadas, uma vez que estas três fases foram identificadas em nas amostras.

Para o refinamento de estruturas pelo Método de Rietveld escolheu-se o programa GSAS, pois além de ser de fácil utilização, apresenta modelos

matemáticos que permitem que se alcance bons resultados no ajuste de perfil, principalmente quando anisotropias associadas a microdeformações do retículo cristalino estão presentes.^{78, 79}

Como as amostras não-sinterizadas apresentaram anisotropia associada à reflexão (002), a função de ajuste de perfil adotada foi a de número quatro para comprimento de onda constante, pois esta função incorpora o modelo fenomenológico de Peter Stephens, que corrige os efeitos provocados no perfil por estas anisotropias. Coeficientes de perfil obtidos do refinamento da estrutura de uma amostra padrão de CeO_2 , sinterizada a 1450 °C por 4 horas, foram utilizados num arquivo instrumental denominado “XRD6000.prm”. Este arquivo é utilizado pelo programa GSAS para correções do alargamento de perfil associado às aberrações ópticas associadas ao equipamento. As aberrações ópticas são provocadas pela convolução de seis funções instrumentais⁸¹ (Tabela 7). Estes coeficientes de perfil (Tabela 8) foram utilizados como ponto de partida para os ajustes de perfil em todas as análises.

Tabela 7- Funções instrumentais que representam os efeitos instrumentais sobre o perfil de difração. (KLUG, H.P; ALEXANDER, L.E, 1974)

Função	Nome	Efeito sobre o perfil de difração
gI	Fonte de raios X	perfil simétrico
gII	Planaridade da superfície da amostra	perfil assimétrico
gIII	Divergência axial	perfil assimétrico
gIV	Transparência da amostra	perfil assimétrico
gV	Fenda receptora	perfil simétrico
gVI	Função desalinhamento	perfil simétrico

Tabela 8- Coeficientes e constantes obtidas do refinamento de estrutura do CeO_2 utilizados como padrão em todos os refinamentos de estrutura das amostras presentes neste trabalho.

GU	GV	GW	LX	H/L	S/L
2,51041	-1,44963	2,75051	5,25064	0,04022030	0,0380076

O objetivo do refinamento das estruturas cristalinas pelo Método de Rietveld é minimizar a diferença entre o difratograma calculado e o difratograma observado. Os refinamentos foram realizados até que o melhor ajuste possível fosse atingido, isto é, até que os indicadores do refinamento fossem os melhores possíveis.

Após o término dos refinamentos de Rietveld, cálculos foram realizados a partir dos dados obtidos do programa GSAS, para a determinação de tamanho de cristalito da fase HAP e a distribuição das microdeformações geradas para as amostras sintetizadas.

III.2.1.4 Método de Rietveld e alguns modelos matemáticos utilizados no programa GSAS

A principal técnica utilizada pelo programa GSAS é o método dos mínimos quadrados e a função de minimização é não-linear. No GSAS a função de minimização é determinada pela equação (7).

$$M = f_p \sum M_p \quad (7)$$

Onde f_p é um fator de peso ajustável quando vários difratogramas são utilizados em refinamentos simultâneos pelo GSAS. Este recurso do programa não foi utilizado neste trabalho.

O χ^2 reduzido ou “goodness of fit” é definido pela função minimização segundo a equação (8).

$$\chi^2 = \frac{M}{(N_{obs} - N_{var})} \quad (8)$$

Onde N_{obs} é o número total de observações e N_{var} é o número de variáveis utilizadas no refinamento mínimo quadrado.

Os dados de difração de pó contribuem para a função minimização segundo a equação (9).

$$M_p = \sum w(I_o - I_c)^2 \quad (9)$$

Onde I_o são as intensidades observadas e I_c , as calculadas. De um modo geral, a intensidade calculada (I_c) dos pontos é determinada pela função (10).

$$I_c = \sum_{\phi} S_{\phi} \sum_k J_{k\phi} Lp_{k\phi} |F_{k\phi}|^2 G_{ik\phi} a_{ik\phi} P_{k\phi} + y_{bi} \quad (10)$$

Onde S_{ϕ} é o fator de escala da fase ϕ o qual é utilizado na análise quantitativa, J_k é a multiplicidade da k^a reflexão, Lp_k é o fator de Lorentz-polarização, $|F_k|$ o fator de estrutura onde estão todos os parâmetros estruturais, G_k é uma função para ajustar o perfil do k^o pico de Bragg cuja variação da largura a meia altura está relacionada com o tamanho médio de cristalito e com as microdeformações na rede, a_k é a função de assimetria, P_k é a função orientação preferencial e, y_{bi} é a intensidade da radiação de fundo (background) no i^o ponto.

A função de perfil G_k adotada no programa GSAS é semelhante à função pseudo-Voigt de Thompson, Cox & Hastings (Função (11)).

$$pVTCHZ = \eta L + (1 - \eta)G \quad (11)$$

Onde L é a função de distribuição lorentziana e G a função de distribuição gaussiana. O parâmetro η é o parâmetro misturador determinado pela equação (12).

$$\eta = 1,36603\left(\frac{\gamma}{\Gamma}\right) - 0,47719\left(\frac{\gamma}{\Gamma}\right)^2 + 0,11116\left(\frac{\gamma}{\Gamma}\right)^2 \quad (12)$$

Onde a Γ é largura-total-a-meia-altura (full-width-at-half-maximum em inglês, sigla fwhm), γ é o alargamento de linha lorentziano e Γ_g , funções (13), (14) e (15), respectivamente.

$$\Gamma = \sqrt[5]{\Gamma_g^5 + 2,69269\Gamma_g^4\gamma + 2,42823\Gamma_g^3\gamma^2 + 4,47163\Gamma_g^2\gamma^3 + 0,07842\Gamma_g\gamma^4 + \gamma^5} \quad (13)$$

$$\gamma = \frac{X + X_e \cos \phi}{\cos \theta} + \gamma_s d^2 \operatorname{tg} \theta \quad (14)$$

$$\Gamma_g = \sqrt{(8 \ln 2) \sigma^2} \quad (15)$$

Onde σ^2 é a variância gaussiana, função (16).

$$\sigma^2 = (U + \sigma_s^2 d^4) \operatorname{tg}^2 \theta + V \operatorname{tg} \theta + W + \frac{P}{\cos^2 \theta} \quad (16)$$

$$\sigma_s = (1 - \eta_m) \Gamma_s \quad (17)$$

$$\gamma_s = \eta_m \Gamma_s \quad (18)$$

Onde η_m é o coeficiente misturador das contribuições gaussiana e lorentziana, σ_s e γ_s (funções (17) e (18), respectivamente) para o alargamento de linha anisotrópico segundo Peter Stephens, Γ_s . No caso mais geral, o triclinico, existem 15 parâmetros independentes S_{HKL} que podem ser ajustados no GSAS, função (19).

$$\begin{aligned} \Gamma_s^2 = & S_{400}h^4 + S_{040}k^4 + S_{004}l^4 + 3(S_{220}h^2k^2 + S_{202}h^2l^2 + S_{022}k^2l^2) + \\ & 2(S_{310}h^3k + S_{103}hl^3 + S_{031}k^3l + S_{130}hk^3 + S_{301}h^3l + S_{013}kl^3) + \\ & 4(S_{211}h^2kl + S_{121}hk^2l + S_{112}hkl^2) \end{aligned} \quad (19)$$

No caso do sistema cristalino Hexagonal (6/m e 6/mmm), que é o caso da estrutura cristalina da hidroxiapatita, grupo espacial P 6₃/m, Γ_s^2 torna-se (Função (20)).

$$\Gamma_s^2 = S_{400}(h^4 + k^4 + 3h^2k^2 + 2h^3k + 2hk^3) + S_{004}l^4 + 3S_{202}(h^2l^2 + k^2l^2 + hkl^2) \quad (20)$$

Assim, no programa GSAS, apenas três parâmetros necessitam ser ajustados, S_{400} , S_{004} e S_{202} . O refinamento desses parâmetros permite a visualização das distribuições de microdeformações do retículo cristalino utilizando o Método de Rietveld e o modelo fenomenológico de Peter Stephens.

Outra rotina importante incorporada ao programa GSAS é a análise quantitativa de fases. Nesta análise a quantidade em massa de cada fase presente é calculada pela Método de Howard & Hill, equação (21).

$$W_p = \frac{S_f \cdot m_f}{\sum_{f=1}^{N_f} S_f \cdot m_f} \quad (21)$$

Onde m_f é a massa da cela unitária da fase “f” e S é o fator escala desta fase.

A qualidade do refinamento dos mínimos quadrados é indicada pelas equações R_p (22), R_{wp} (23) e S (24).

Se R_p e R_{wp} estão diminuindo, o refinamento está convergindo para um mínimo. Se não variam mais é porque o mínimo foi atingido.

$$R_p = \frac{\sum |I_o - I_c|}{\sum I_o} \quad (22)$$

$$R_{wp} = \sqrt{\frac{M_p}{\sum w I_o^2}} \quad (23)$$

Onde $w_i = 1/y_o$ é o peso atribuído a cada observação.

No programa GSAS o valor do “goodness-of-fit”, S, não é obtido diretamente, mas pode ser calculado a partir da equação (24). R_e é o valor estatisticamente esperado para R_{wp} . Pelo exame da equação (25), obtém-se que o valor mínimo possível para o valor de S é 1, portanto quanto mais próximo de 1 estiver o valor de S, melhor será o refinamento.

$$S = \sqrt{\chi^2} \quad (24)$$

$$R_e = \frac{R_{wp}}{\sqrt{\chi^2}} \quad (25)$$

A qualidade do refinamento da estrutura (tipo de átomo, posição atômica e deslocamento atômico) é fornecida pela equação (26).

$$R(F^2) = \frac{\sum |F_o^2 - SF_c^2|}{\sum |F_o^2|} \quad (26)$$

Estas funções são úteis porque através delas o operador do programa pode tomar a decisão de continuar, parar ou finalizar o refinamento, uma vez que o refinamento pode ser finalizado quando os parâmetros refinados não variam mais e a função de minimização atingiu seu valor mínimo.

Como programa GSAS não tem a determinação do tamanho de cristalito incorporada à sua rotina, optou-se pela obtenção dos dados das posições das reflexões paralelas (010) e (020), (002) e (004), do parâmetro misturador da função pseudo-Voigt modificada de Tompson, Cox & Hastings (1987) para cada reflexão e fwhm correspondentes a partir dos resultados fornecidos pelo GSAS. Estas informações foram utilizadas como dados de entrada no formalismo desenvolvido por Andrade (2003)⁸⁴, que utiliza a convolução de duas funções pseudo-Voigt (uma aproximação do método “double-Voigt”^{85, 86, 87, 88} para a determinação de tamanho de cristalito e microdeformações de famílias de planos paralelos.

III.2.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

As medidas de absorção na região do infravermelho foram realizadas num Espectrômetro IVTF-8400 SHIMADZU, instalado no laboratório de Química Inorgânica da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

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.³⁴

III.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A fim de obter informações sobre a morfologia e homogeneidade do material, o pó das apatitas sintetizadas foi analisado por Microscopia Eletrônica de Varredura em um equipamento marca SHIMADZU, modelo SS 550, instalado no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos (LIMAC), da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Para desagregação dos cristais, foi feita uma dispersão com álcool isopropílico durante 10 minutos. A qualidade das imagens foi otimizada recobrindo-se as amostras com Au.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Refinamento das estruturas pelo Método de Rietveld das amostras não tratadas termicamente

O método utilizado para a análise quantitativa de fase, tamanho de cristalito e microdeformação foi o de Rietveld e o programa utilizado foi o GSAS. A estrutura adotada como ponto de partida para o refinamento de Rietveld corresponde à estrutura citada na ficha ICSD #26204 (Tabela 9), qual fornece o modelo estrutural da HAP. A função de perfil adotada no GSAS foi a número 4, que incorpora o modelo fenomenológico de Peter Stephens para o alargamento de linha anisotrópico.

Os resultados deste estudo mostraram que o desenvolvimento de cristais de HAP ocorre nos dois índices de gelatina pesquisados, confirmado com as medidas de DRX.

Os difratogramas de raios X das amostras controle (AC), GEL1 e GEL2, em diferentes períodos de envelhecimento estudados, são apresentados a seguir.

Tabela 9- Estrutura da hidroxiapatita conforme a ficha ICSD #26204, adotada para o início do refinamento da estrutura.

Hidroxiapatita; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$; $P 6_3/m$; hexagonal					
$a = b = 9,417 \text{ \AA}$ e $c = 6,874 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 527,9 \text{ \AA}^3$; $d = 3,180 \text{ g/cm}^3$; $Z = 2$					
átomos	Wyckoff	x	y	z	sof
Ca1	4f	2/3	1/3	0,00144 (8)	1,0
Ca2	6h	-0,00657 (5)	0,24706 (5)	1/4	1,0
P	6h	0,36860 (6)	0,39866 (6)	1/4	1,0
O1	6h	0,4850 (2)	0,3289 (2)	1/4	1,0
O2	6h	0,4649 (2)	0,5871 (2)	1/4	1,0
O3	12i	0,2580 (1)	0,3435 (1)	0,0703 (2)	1,0
O4	4e	0,0	0,0	0,1979 (6)	0,5
H	4e	0,0	0,0	0,04 (2)	0,5

IV.1.1 Amostras com 1 dia de envelhecimento

Pôde-se observar que as amostras com um dia envelhecimento possuem picos característicos de uma hidroxiapatita, pela comparação do difratograma padrão disponível no banco de dados ICSD #26204.

Os difratogramas apresentaram perfis constituídos de picos largos que podem estar associados a diferentes características do material: presença de cristais com dimensões nanométricas e presença de defeitos na estrutura.^{8, 30}

A Figura 7 apresenta o gráfico de Rietveld após o término do refinamento da amostra controle (AC).

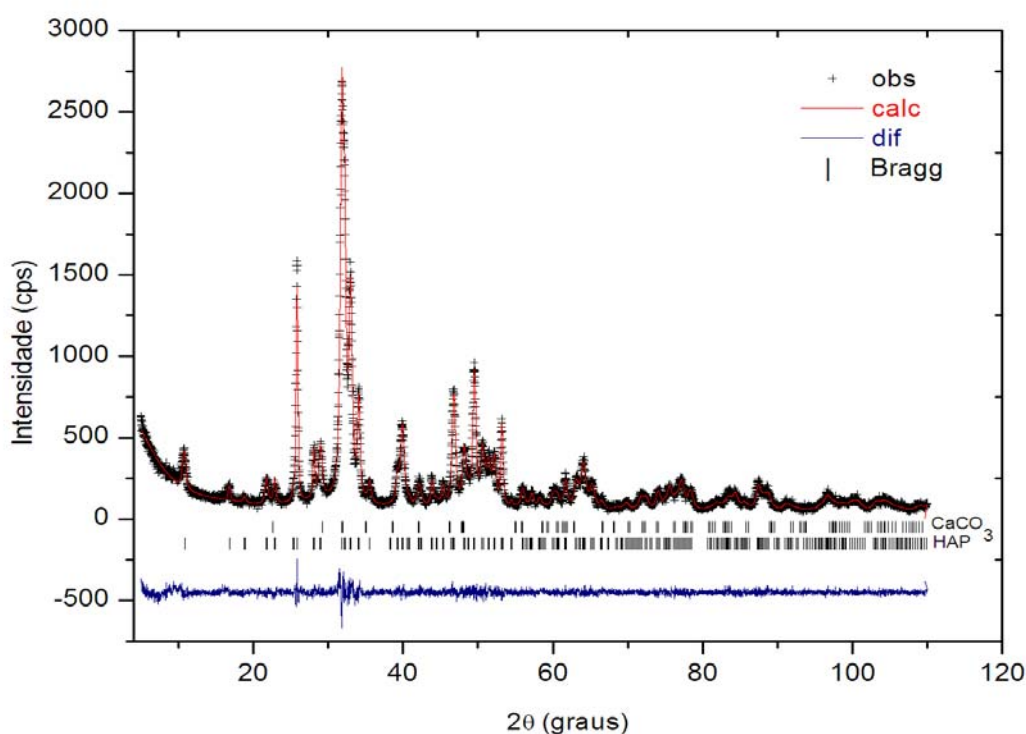


Figura 7- Gráfico de Rietveld da AC após 1 dia de envelhecimento.

Os índices de concordância finais obtidos no refinamento são dados na Tabela 10.

Tabela 10- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da AC com 1 dia de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – P 6 ₃ /m – hexagonal						
$a = b = 9.4114 (3) \text{ \AA}$ e $c = 6.8921 (2) \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 528.683 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	0,0003 (4)	1,0	0,86 (2)
Ca2	6f	0,2571 (2)	0,0088 (2)	0,2500	1,0	0,89 (6)
P	6f	0,3678 (2)	0,3976 (3)	0,2500	1,0	2,39 (5)
O1	6f	0,4903 (4)	0,3272 (4)	0,2500	1,0	1,27 (6)
O2	6f	0,4708 (5)	0,5920 (6)	0,2500	1,0	2,44 (6)
O3	12i	0,2512 (6)	0,3337 (3)	0,0686 (4)	1,0	2,86 (6)
O4	4e	0,0	0,0	0,1756 (2)	0,5	1,67 (1)
H	4e	0,0	0,0	0,2023 (3)	0,5	2,12 (1)
$R_{wp} = 8,1\%$ $R_p = 6,1\%$ $R_B = 1,66\%$ $Dwd = 1,64\%$						

Os indicadores da qualidade do refinamento obtidos com o programa GSAS foram: $R_{wp}=8,1\%$, $R_p= 6,1\%$ e $R_B= 1,66\%$ indicam a boa qualidade do refinamento.

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° (310). Como mostrado na Figura 7, há picos fortes da reflexão em $2\theta = 26.0^\circ$, 31.8° e 39.8° , indicando a formação de HAP. ⁸⁹

Embora em quantidades muito pequenas, de aproximadamente 0,2% em massa, segundo os dados quantitativos gerados pelo programa GSAS, verificou-se a formação de uma fase secundária, a calcita (CaCO_3), como pode ser visto na Figura 7, na página anterior.

A entrada de carbonato na estrutura da HAP, a qual propicia a formação desta segunda fase, deve-se principalmente às condições de síntese, realizada em sistema aberto.

A seguir, é dado o gráfico de Rietveld para a amostra GEL1 (Figura 8). Os fatores de concordância finais obtidos no refinamento da mesma amostra são mostrados na Tabela 11.

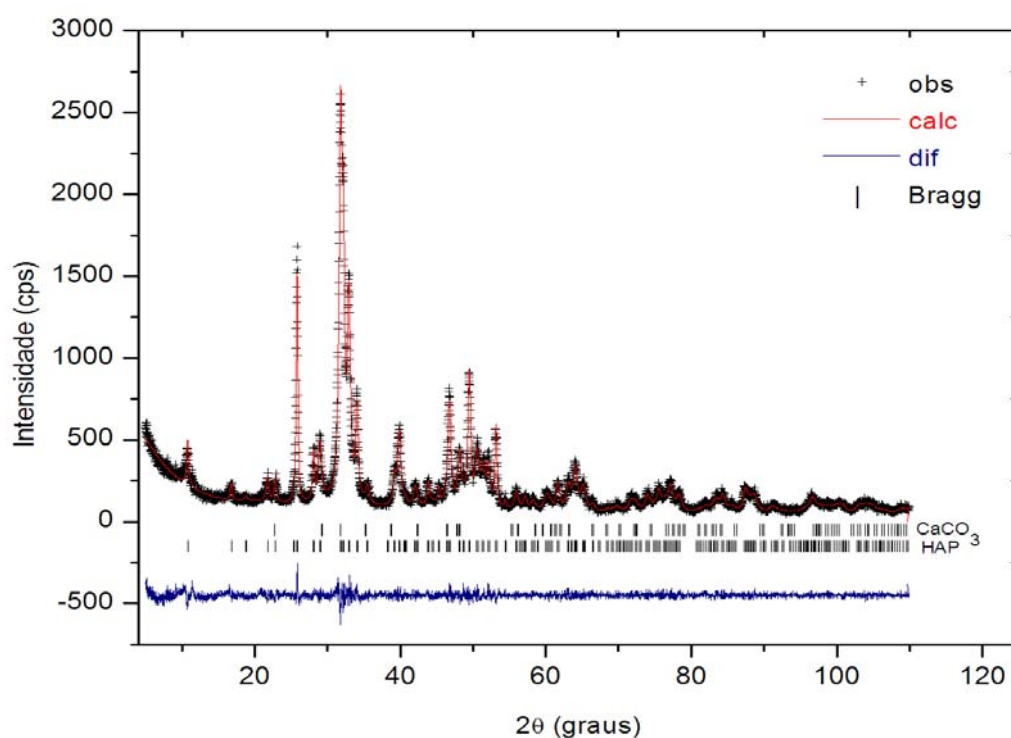


Figura 8- Gráfico de Rietveld da amostra GEL1 após 1 dia de envelhecimento.

Tabela 11- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL1 com 1 dia de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $\text{P } 6_3/\text{m}$ – hexagonal						
$a = b = 9.4145 \text{ (3) \AA}$ e $c = 6.8914 \text{ (2) \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 528.991 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	0,0021 (4)	1,0	0,81 (2)
Ca2	6f	0,2581 (2)	0,0086 (2)	0,2500	1,0	0,84 (2)
P	6f	0,3723 (3)	0,3954 (3)	0,2500	1,0	2,28 (5)
O1	6f	0,4816 (5)	0,3285 (5)	0,2500	1,0	1,91 (2)
O2	6f	0,4692 (5)	0,5902 (5)	0,2500	1,0	1,71 (2)
O3	12i	0,2444 (4)	0,3307 (4)	0,0721 (4)	1,0	5,40 (2)
O4	4e	0,0	0,0	0,1870 (1)	0,5	5,92
H	4e	0,0	0,0	0,2063 (5)	0,5	5,92
$R_{\text{wp}} = 8,1\%$ $R_p = 6,1\%$ $R_B = 1,5\%$ $D_{\text{wd}} = 1,61\%$						

O gráfico de Rietveld a seguir (Figura 9), corresponde à amostra GEL2. Os parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld, são dados na Tabela 12.

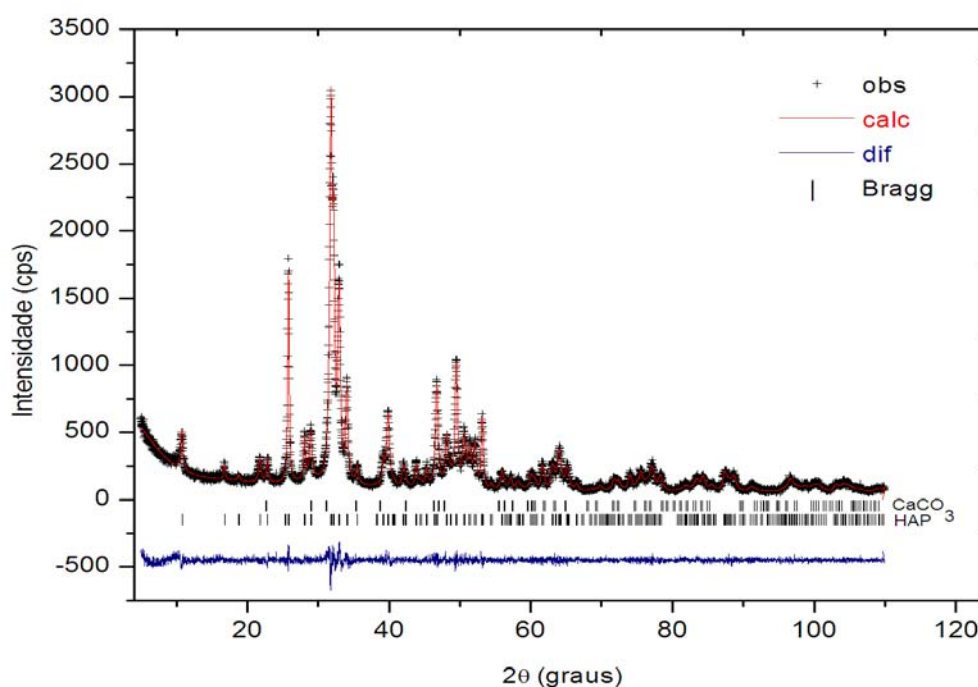


Figura 9- Gráfico de Rietveld da amostra GEL2 após 1 dia de envelhecimento.

Tabela 12- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL2 com 1 dia de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $P 6_3/m$ – hexagonal						
$a = b = 9.4126 (2) \text{ \AA}$ e $c = 6.8928 (2) \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 528.869 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	0,0012 (4)	1,0	1,42 (2)
Ca2	6f	0,2562 (2)	0,0083 (2)	0,2500	1,0	1,44 (2)
P	6f	0,3692 (3)	0,3972 (3)	0,2500	1,0	2,76 (6)
O1	6f	0,4840 (4)	0,3223 (5)	0,2500	1,0	1,86 (2)
O2	6f	0,4651 (5)	0,5877 (5)	0,2500	1,0	3,49 (2)
O3	12i	0,2496 (4)	0,3366 (3)	0,0683 (4)	1,0	4,51 (1)
O4	4e	0,0	0,0	0,1882 (1)	0,5	1,23
H	4e	0,0	0,0	0,2107 (4)	0,5	1,23
$R_{wp} = 7,7\%$ $R_p = 5,8\%$ $R_B = 1,6\%$ $D_{wd} = 1,67\%$						

Verificou-se que tanto as amostras controle (AC) como os compósitos GEL1 e GEL2, apresentaram uma fase secundária, a calcita, CaCO_3 , como pode ser visto na Figura 10. Embora esta fase esteja presente, as amostras apresentaram um alto grau de pureza. Segundo a quantificação realizada pelo programa GSAS, a calcita presente nas amostras tem proporções menores que 1%.

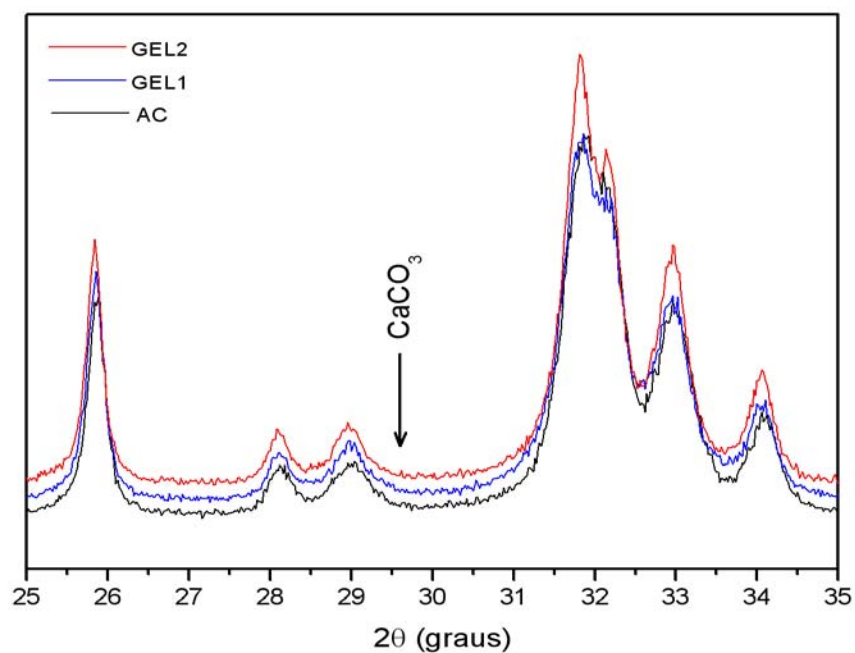


Figura 10- Fases presentes nas amostras AC, GEL1 e GEL2 após 1 dia de envelhecimento.

Observou-se que o volume da cela unitária das amostras com adição de gelatina é maior em relação à amostra controle. (Figura 11)

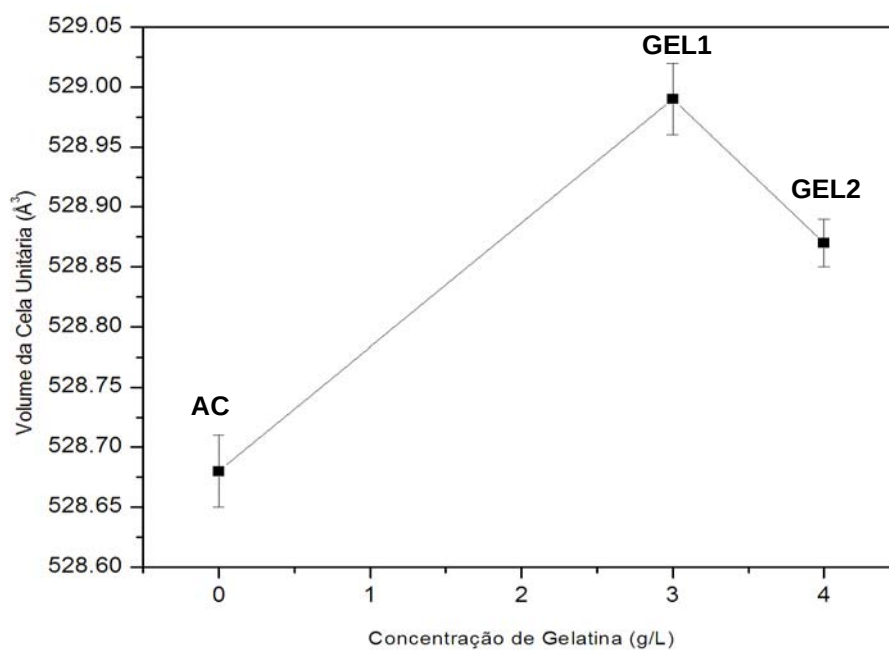


Figura 11- Variação do volume da cela unitária para a AC, GEL1 e GEL2 após 1 dia de envelhecimento.

A amostra controle apresentou um volume de $528,683 \text{ \AA}^3$, enquanto a amostra GEL1, teve um volume de $528,991 \text{ \AA}^3$, e a amostra GEL2 $528,869 \text{ \AA}^3$. Este aumento no volume da cela unitária das amostras com adição de gelatina, pode estar associado à interação covalente que ocorre entre os íons Ca^{2+} da HAP e os íons $\text{R}-\text{COO}^-$ da gelatina, bem como ao simples fato de ter sido adicionado a solução de gelatina nos compósitos.

O volume da cela unitária da amostra GEL2 ($528,869 \text{ \AA}^3$) é menor que o volume da amostra GEL1 ($528,991 \text{ \AA}^3$), esta diminuição pode estar associada a maior interação entre os íons Ca^{2+} da HAP com os íons $\text{R}-\text{COO}^-$ da gelatina, ou ainda, os grupos fosfato, PO_4^{3-} , da amostra GEL2 podem ter sido substituídos por grupos carbonato, CO_3^{2-} , formando carbonato apatita do tipo B, CHAP-B. Esta interação pode entre os íons pode ser a precursora da formação da fase secundária nas amostras com adição de gelatina.

IV.1.2 Amostras com 21 dias de envelhecimento

Após 21 dias de envelhecimento, verificou-se também a presença de picos característicos de uma hidroxiapatita como fase principal e como fase secundária houve também a formação de calcita.

O gráfico de Rietveld para a amostra controle (AC) e os parâmetros estruturais obtidos são dados seqüencialmente, na Figura 12 e Tabela 13, respectivamente.

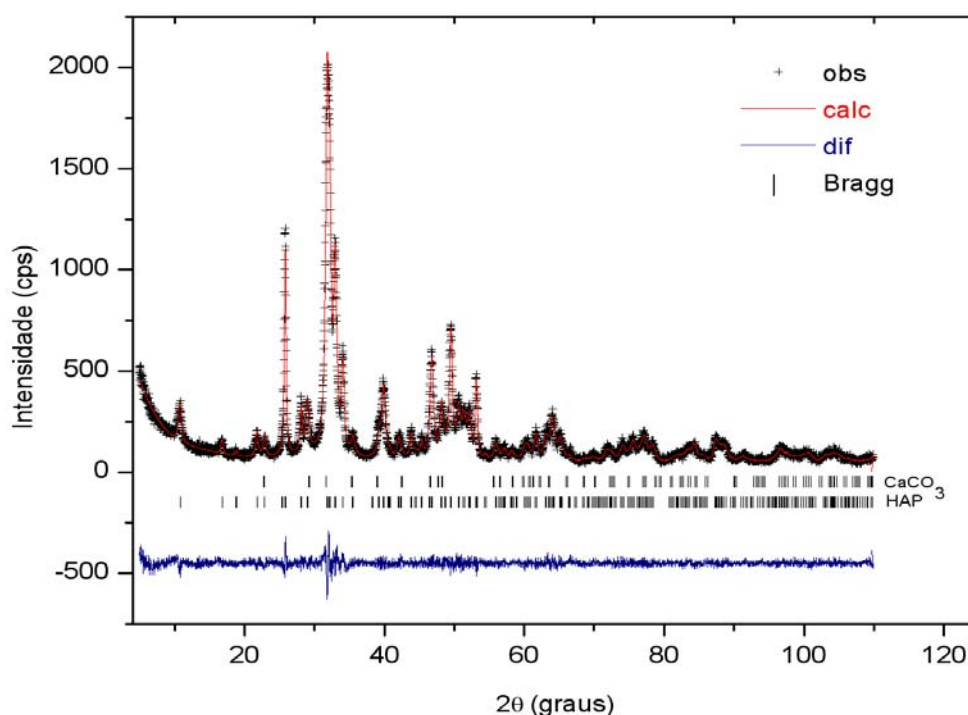


Figura 12- Gráfico de Rietveld da AC após 21 dias de envelhecimento.

Tabela 13- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da AC com 21 dias de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $\text{P } 6_3/m$ – hexagonal						
$a = b = 9.4130 (3) \text{ \AA}$ e $c = 6.8949 (2) \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 529.084 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	-0,0005 (5)	1,0	0,35 (2)
Ca2	6f	0,2567 (2)	0,0097 (2)	0,2500	1,0	0,37 (2)
P	6f	0,3724 (3)	0,3982 (3)	0,2500	1,0	2,99 (7)
O1	6f	0,4855 (5)	0,3243 (6)	0,2500	1,0	2,08 (2)
O2	6f	0,4673 (6)	0,5912 (5)	0,2500	1,0	1,96 (2)
O3	12i	0,2489 (5)	0,3355 (4)	0,0707 (5)	1,0	4,59 (1)
O4	4e	0,0	0,0	0,1924 (2)	0,5	0,33 (3)
H	4e	0,0	0,0	0,2064 (3)	0,5	0,33 (3)
$R_{\text{wp}} = 8,9\%$ $R_p = 6,1\%$ $R_B = 1,7\%$ $D_{\text{wd}} = 1,69\%$						

Na Figura 13 é dado o gráfico de Rietveld e a seguir os parâmetros estruturais (Tabela 14) obtidos para amostra GEL1 com 21 dias de envelhecimento são apresentados.

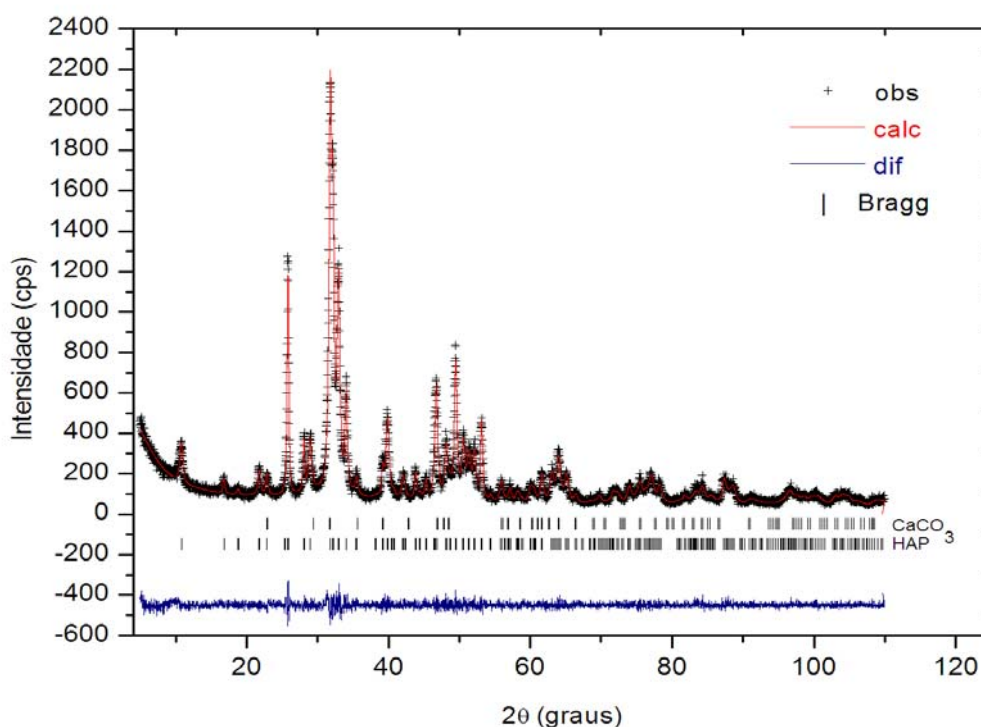


Figura 13- Gráfico de Rietveld da amostra GEL1 após 21 dias de envelhecimento.

Tabela 14- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL1 com 21 dias de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $P 6_3/m$ – hexagonal						
$a = b = 9.4209 \text{ (3) \AA}$ e $c = 6.8978 \text{ (2) \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 530.180 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	- 0,0043 (4)	1,0	1,48 (2)
Ca2	6f	0,2565 (2)	0,0084 (2)	0,2500	1,0	1,51 (2)
P	6f	0,3710 (3)	0,3948 (3)	0,2500	1,0	3,49 (6)
O1	6f	0,4933 (6)	0,3322 (6)	0,2500	1,0	5,59 (3)
O2	6f	0,4680 (5)	0,5856 (5)	0,2500	1,0	4,14 (2)
O3	12i	0,2454 (4)	0,3352 (3)	0,0679 (4)	1,0	4,04 (1)
O4	4e	0,0	0,0	0,1778 (1)	0,5	2,57
H	4e	0,0	0,0	0,2027 (3)	0,5	2,57
$R_{wp} = 8,6\%$ $R_p = 6,5\%$ $R_B = 2,5\%$ $Dwd = 1,80\%$						

Na Figura 14 é dado o gráfico de Rietveld para a amostra GEL2. Os parâmetros estruturais obtidos para a amostra GEL2 são dados na Tabela 15.

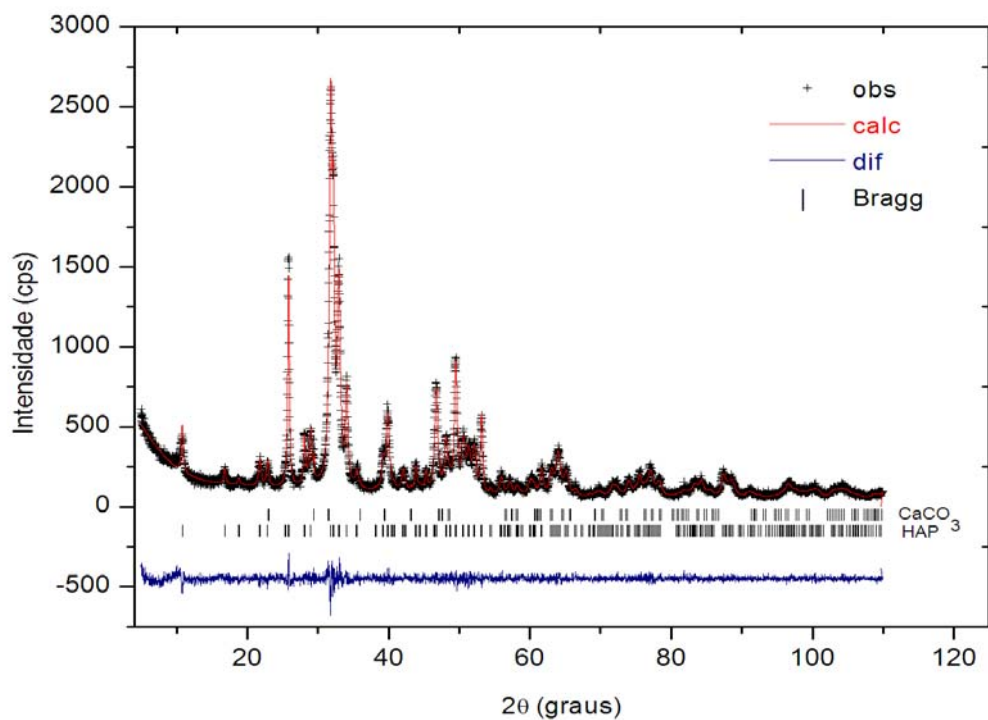


Figura 14- Gráfico de Rietveld da amostra GEL2 após 21 dias de envelhecimento.

Tabela 15- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL2 com 21 dias de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $P 6_3/m$ – hexagonal						
$a = b = 9.4204 (3) \text{ \AA}$ e $c = 6.8962 (2) \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 530.001 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	- 0,0010 (4)	1,0	0,96 (2)
Ca2	6f	0,2572 (2)	0,0092 (2)	0,2500	1,0	0,99 (2)
P	6f	0,3703 (3)	0,3964 (3)	0,2500	1,0	2,74 (6)
O1	6f	0,4831 (5)	0,3249 (5)	0,2500	1,0	2,15 (7)
O2	6f	0,4692 (6)	0,5888 (5)	0,2500	1,0	3,32 (7)
O3	12i	0,2468 (4)	0,3330 (4)	0,0692 (4)	1,0	3,74 (7)
O4	4e	0,0	0,0	0,1898 (1)	0,5	2,92
H	4e	0,0	0,0	0,2173 (5)	0,5	2,92
$R_{wp} = 7,9\%$ $R_p = 6,0\%$ $R_B = 1,6\%$ $Dwd = 1,65\%$						

A variação de volume da cela unitária das amostras refinadas após 21 dias de envelhecimento é dada na Figura 15.

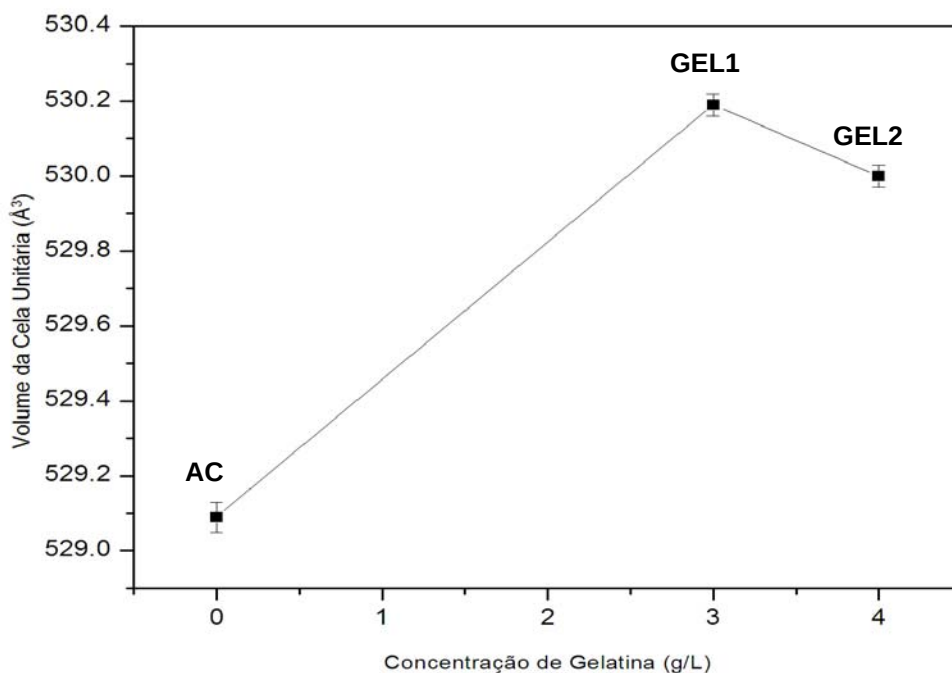


Figura 15- Variação do volume da cela unitária para a AC, GEL1 e GEL2 após 21 dias de envelhecimento.

Observou-se novamente, que o volume da cela unitária da amostra GEL2, foi menor que o da amostra GEL1.

Em relação à amostra controle, as amostras com adição de gelatina, apresentaram volumes maiores, seguindo o mesmo comportamento das amostras com único dia de envelhecimento.

Verificou-se que com o aumento do tempo de envelhecimento, a formação da calcita tornou-se mais evidente, como pode ser visto na Figura 16.

A amostra com maior concentração de gelatina (GEL2) apresentou a formação desta fase mais significativa em relação às outras amostras com o mesmo tempo de envelhecimento. De modo que, os resultados da análise quantitativa de fases gerada pelo programa GSAS, mostraram que para a amostra GEL2, a porcentagem de CaCO_3 foi de 0,69% em massa, enquanto as amostras GEL1 e AC, apresentaram 0,19% em massa e 0,66% em massa de CaCO_3 , respectivamente.

Desta forma, podemos dizer que quanto maior a concentração de gelatina, e maior o tempo de envelhecimento, mais calcita é formada. A redução de volume ocorrido junto a maior formação de calcita nas amostras com maior concentração de gelatina, pode estar associada principalmente à formação de carbonato apatita do tipo B. Os grupos fosfato, PO_4^{3-} , podem ter sido substituídos por grupos carbonato, CO_3^{2-} e como os íons CO_3^{2-} são menores que os íons PO_4^{3-} , a redução de volume ocorre. Também podemos associar a formação da calcita com a redução do volume, com a retirada dos íons Ca^{2+} da estrutura da HAP, para a formação desta fase.

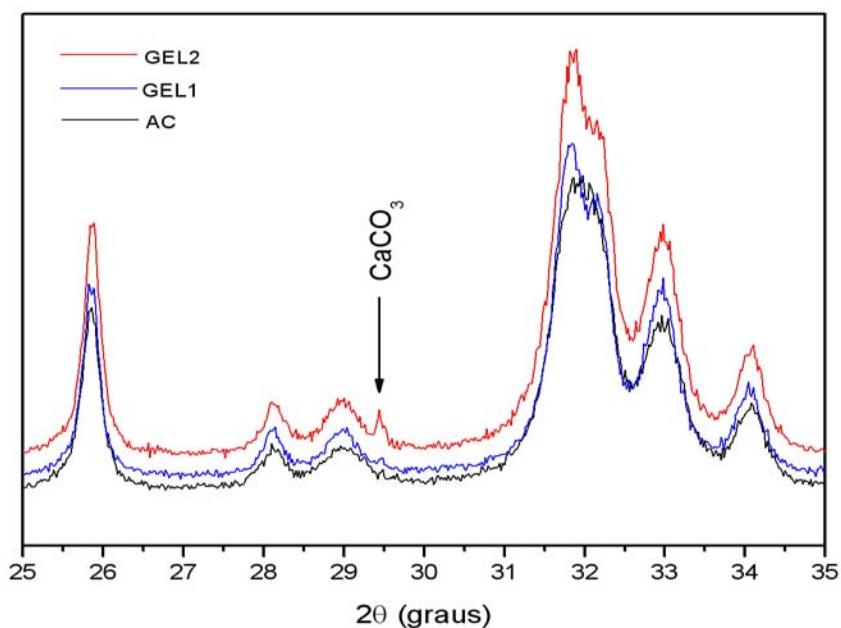


Figura 16- Fases presentes nas amostras AC, GEL1 e GEL2 após 21 dias de envelhecimento.

IV.1.3 Estudo Comparativo

A Figura 17 apresenta a variação dos volumes de cela unitária de todas as amostras com os dois tempos de envelhecimento estudados.

Verificou-se que as amostras controle mantiveram-se com valores de volume de cela unitária semelhantes nos dois períodos de envelhecimento. Com relação às amostras com adição de gelatina, o volume da cela unitária das amostras controle foi menor, isto porque, nas amostras controle, a variação de volume é somente devida à entrada de carbonato na estrutura cristalina da hidroxiapatita.

Desta forma, observou-se que as amostras GEL2, em qualquer dos períodos de envelhecimento, sofrem uma diminuição do volume da cela unitária com relação à amostra GEL1. Esta redução no volume da cela unitária pode ser devida à formação de uma apatita carbonatada (CHAP), como mencionado anteriormente.

Quando há formação de apatita carbonatada, os grupos PO_4^{3-} ou OH^- , ou ambos, são substituídos pelo grupo CO_3^{2-} . Nas amostras sintetizadas verificou-se a formação de carbonato apatita do tipo B (CHAP-B), uma vez que, verificou-se que os grupos PO_4^{3-} estavam sendo substituídos por grupos CO_3^{2-} como pode ser verificado a partir das análises de IVTF, discutidas posteriormente. Como os grupos CO_3^{2-} são menores que os grupos PO_4^{3-} esta redução do volume da cela unitária nas amostras com maior concentração de gelatina pode ocorrer.^{29, 30, 36}

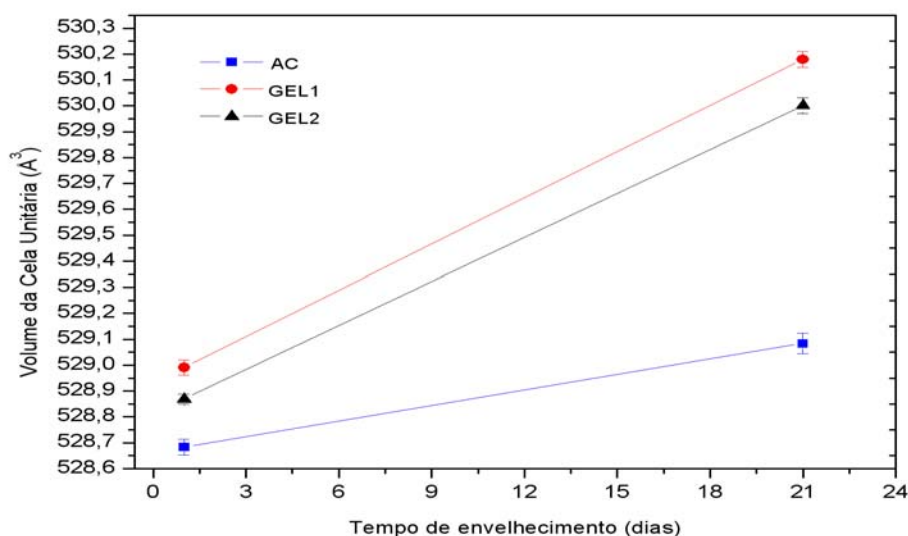


Figura 17- Variação do volume da cela unitária após os tempos de envelhecimento estudados.

Avaliando-se os gráficos de Rietveld de todas as amostras nos dois períodos de envelhecimento, pôde-se observar que os cristais formados possuem dimensões nanométricas e são anisotrópicos no tamanho, pois os perfis das reflexões (002) são mais estreitos que os das demais reflexões, sugerindo que os cristalitos são maiores segundo a direção [002].

A dificuldade de ajuste das reflexões nas regiões de 25° e entre $31-34^\circ$ pode estar relacionada à presença de grupamentos carbonatos na estrutura da HAP formada, uma vez que as reflexões para HAP e para hidroxiapatita carbonatada são: $25,90$; $31,80$ e $32,93$ (Ficha JCPDS 9-432) e $25,75$; $32,19$ e $33,43$ (Ficha JCPDS 19-272), respectivamente.⁵⁴ Além disso, a dificuldade de ajuste das reflexões também pode estar associada ao efeito anisotrópico que as amostras apresentaram devido à microdeformações de rede e tamanhos de cristalito dos compósitos.

A formação e o desenvolvimento dos cristais de HAP são influenciados pelo excesso de gelatina, em um volume constante de solução aquosa para a formação destes cristais. Sabe-se que a taxa de formação mineral do osso biológico é altamente dependente de fatores como pH e concentração de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , bem como de outros íons fisiológicos. Da mesma forma, a formação da HAP sintética também é influenciada por estes fatores.⁹⁰

A única variável nesta reação de captação é a concentração de gelatina, que pode ser correlacionada com a concentração relativa dos íons carboxílicos $\text{R}-\text{COO}^-$ fisiologicamente importantes. O íon carboxilato pode ser um sítio ativo na coordenação de íons Ca^{2+} para formar íons complexos.⁹⁰

Com o aumento do tempo de envelhecimento e nas condições de síntese, a temperatura de aproximadamente 42°C e pH em torno de 12, a gelatina 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 $\text{R}-\text{COO}^-$, formando os íons complexos Cálcio-Gelatina.⁷⁴

Estes complexos podem interagir com os íons PO_4^{3-} devido aos efeitos de supersaturação. Embora o grau de cristalização da fase HAP caia com o índice crescente de gelatina, a anisotropia cristalina é mantida.⁹⁰

IV.2 Refinamento das estruturas pelo Método de Rietveld das amostras tratadas termicamente

O estudo da estabilidade térmica das amostras foi acompanhado por DRX. Observou-se um estreitamento dos picos de difração com o tratamento térmico de $1000^\circ\text{C}/1$ hora.

Da mesma forma que as amostras não tratadas termicamente, estas, apresentaram como fase majoritária a HAP.

IV.2.1 Amostras com 1 dia de envelhecimento

Verificou-se que, após a sinterização, as amostras apresentaram uma terceira fase. Além da fase de CaCO_3 , as amostras apresentaram a fase de CaO .

A seguir é dado o difratograma obtido a partir da AC sinterizada. Os parâmetros estruturais desta mesma amostra são dados na Tabela 16.

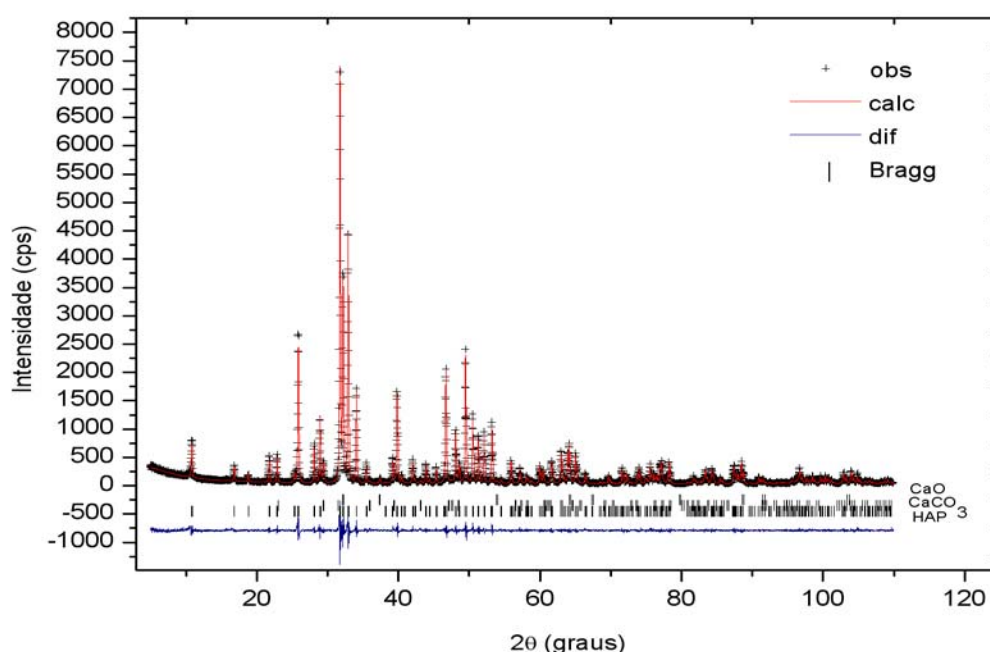


Figura 18- Gráfico de Rietveld da AC sinterizada após 1 dia de envelhecimento.

Tabela 16- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da AC sinterizada com 1 dia de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $P 6_3/m$ – hexagonal						
$a = b = 9.4212 \text{ (5) \AA}$ e $c = 6.8830 \text{ (6) \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 529.075 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	0,0024 (3)	1,0	1,52 (2)
Ca2	6f	0,2536 (2)	0,0071 (2)	0,2500	1,0	1,53 (2)
P	6f	0,3678 (2)	0,3980 (2)	0,2500	1,0	1,48 (1)
O1	6f	0,4851 (4)	0,3253 (4)	0,2500	1,0	0,25 (5)
O2	6f	0,4655 (4)	0,5879 (4)	0,2500	1,0	1,19 (5)
O3	12i	0,2558 (3)	0,3422 (3)	0,0683 (3)	1,0	1,61 (5)
O4	4e	0,0	0,0	0,1956 (1)	0,5	2,46 (2)
H	4e	0,0	0,0	0,2123 (5)	0,5	2,46 (2)
$R_{wp} = 10,1\%$ $R_p = 7,8\%$ $R_B = 2,8\%$ $Dwd = 1,34\%$						

A formação da fase adicional de CaO devido ao excesso de CO_3^{2-} presente na amostra é evidenciada no gráfico de Rietveld apresentado. Excesso qual, é devido à amostra ter sido sintetizada em sistema aberto.

Na sequência é dado o difratograma da amostra GEL1 sinterizada após 1 dia de envelhecimento.

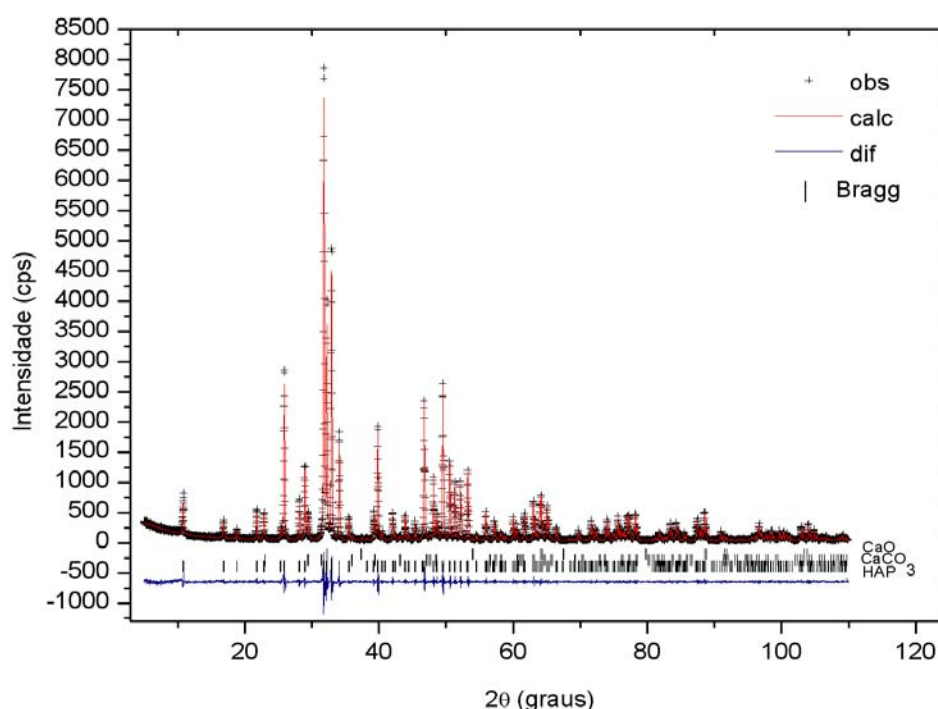


Figura 19- Gráfico de Rietveld da amostra GEL1 sinterizada após 1 dia de envelhecimento.

Tabela 17- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL1 sinterizada com 1 dia de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $P 6_3/m$ – hexagonal						
$a = b = 9.4212 (4) \text{ \AA}$ e $c = 6.8823 (5) \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 529.040 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	0,0012 (3)	1,0	1,53 (4)
Ca2	6f	0,2535 (2)	0,0068 (2)	0,2500	1,0	1,42 (3)
P	6f	0,3669 (2)	0,3982 (2)	0,2500	1,0	1,30 (4)
O1	6f	0,4859 (4)	0,3257 (4)	0,2500	1,0	0,65 (2)
O2	6f	0,4658 (4)	0,5881 (4)	0,2500	1,0	0,32 (2)
O3	12i	0,2549 (3)	0,3413 (3)	0,0689 (4)	1,0	0,95 (1)
O4	4e	0,0	0,0	0,1949 (1)	0,5	2,99 (3)
H	4e	0,0	0,0	0,2168 (1)	0,5	2,99 (3)
$R_{wp} = 10,5\%$ $R_p = 8,0\%$ $R_B = 2,7\%$ $Dwd = 1,32\%$						

O gráfico de Rietveld para a amostra GEL2 e os dados estruturais da mesma, são dados na Figura 20 e Tabela 18, respectivamente.

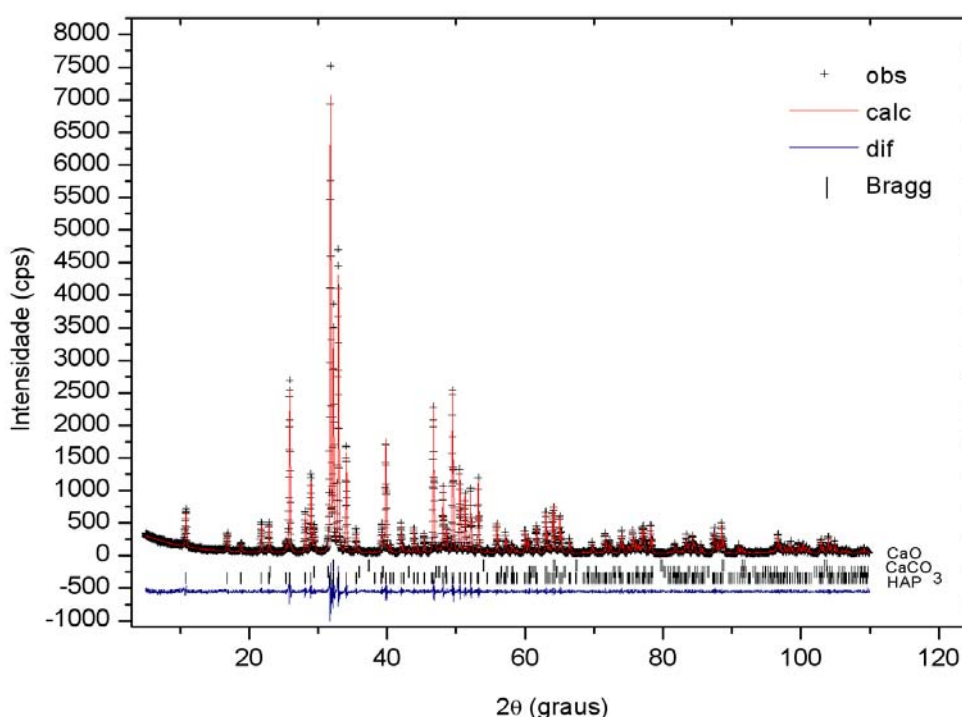


Figura 20- Gráfico de Rietveld da amostra GEL2 sinterizada após 1 dia de envelhecimento.

Tabela 18- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL2 sinterizada com 1 dia de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $P 6_3/m$ – hexagonal						
$a = b = 9.4221 (4) \text{ \AA}$ e $c = 6.8827 (5) \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 529.162 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	0,0017 (3)	1,0	1,44 (2)
Ca2	6f	0,2537 (1)	0,0068 (2)	0,2500	1,0	1,47 (2)
P	6f	0,3666 (2)	0,3977 (2)	0,2500	1,0	1,30 (4)
O1	6f	0,4857 (4)	0,3241 (4)	0,2500	1,0	1,09 (6)
O2	6f	0,4644 (4)	0,5855 (4)	0,2500	1,0	1,09 (6)
O3	12i	0,2557 (3)	0,3412 (3)	0,0680 (4)	1,0	1,09 (6)
O4	4e	0,0	0,0	0,1980 (1)	0,5	3,43 (3)
H	4e	0,0	0,0	0,2147 (1)	0,5	3,43 (3)
$R_{wp} = 10,5\%$ $R_p = 8,1\%$ $R_B = 2,4\%$ $Dwd = 1,45\%$						

Observou-se, a partir da análise dos difratogramas das amostras sinterizadas, que houve um estreitamento dos picos de difração, em relação aos difratogramas das amostras não tratadas termicamente. Após a sinterização, foi detectada a formação de uma segunda fase (CaCO_3) assim como as amostras não sinterizadas;

além disso, observou-se a presença de uma terceira fase, de CaO, como pode ser observado na Figura 21 .

A perda do íon carbonato em uma carbonato apatita inicia-se a 500°C e termina em 900°C, dependendo do tempo e do teor de carbonato. Após a sinterização ocorre formação de hidroxiapatita e se possível óxido de cálcio, CaO. ³⁴ A presença de carbonato na estrutura da apatita influencia, dentre outros fatores, a estabilidade do material, diminuindo esta propriedade, se decompondo em outras fases. A presença de CaO como produto de decomposição é explicado pelo alto teor de carbonato na amostra. ^{30, 46, 90} A presença de CaCO_3 e CaO pode ser indesejável, pois, dependendo de suas concentrações, estas espécies serão contaminantes para a célula, prejudicando assim sua função.

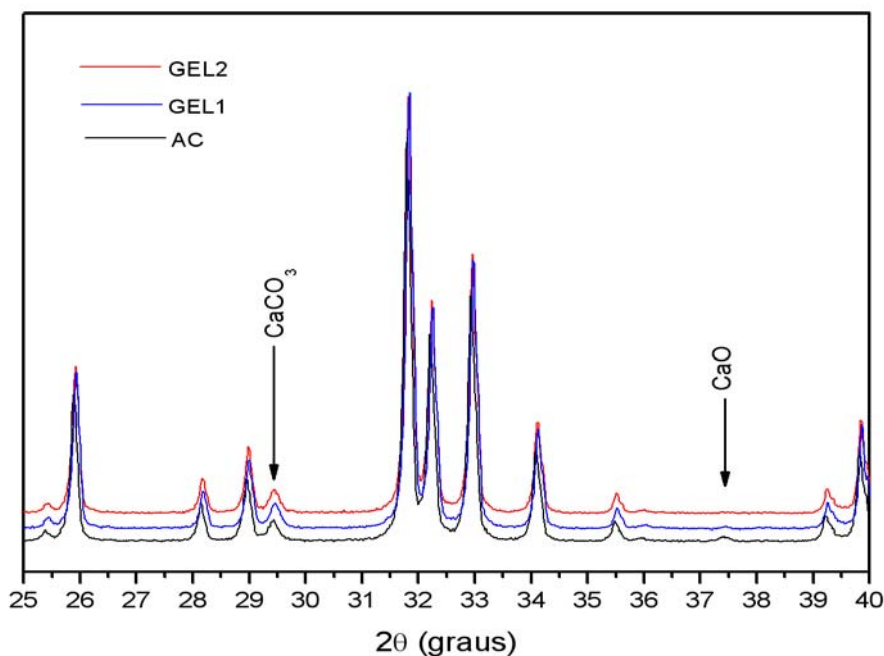


Figura 21- Fases presentes nas amostras AC, GEL1 e GEL2 sinterizadas, após 1 dia de envelhecimento.

A seguir na Figura 22 é dado o gráfico de comparação dos volumes de cela unitária da AC, GEL1 e GEL2 após 1 dia de envelhecimento.

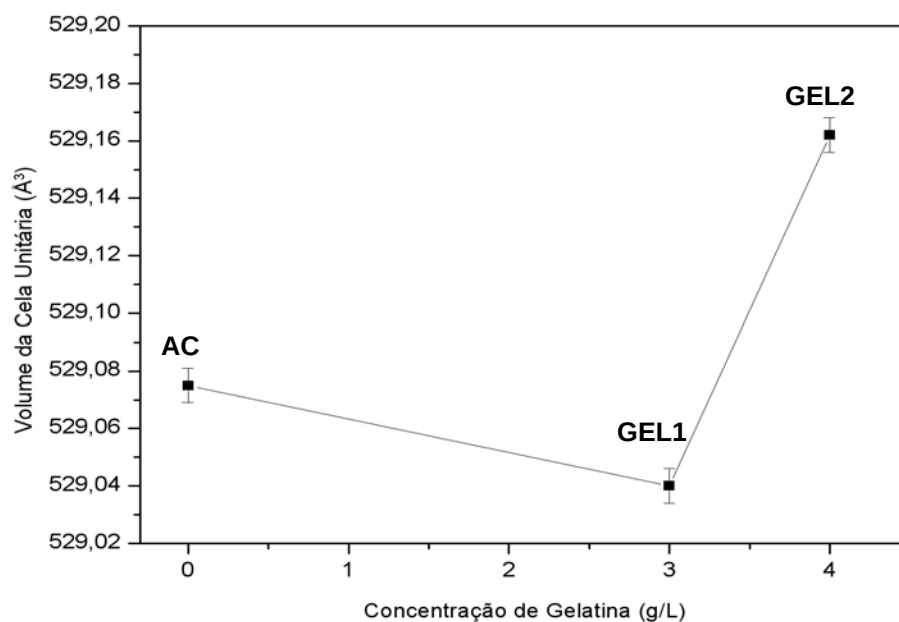


Figura 22- Variação do volume da célula unitária para a AC, GEL1 e GEL2 sinterizadas, após 1 dia de envelhecimento.

Em relação à amostra controle, verificou-se que a aplicação do tratamento térmico aumentou o volume da célula unitária ($529,075 \text{ \AA}^3$) quando comparada com AC não sinterizada ($528,683 \text{ \AA}^3$). O carbonato contido na AC não sinterizada contribuiu para a formação de CaO após a sinterização das amostras.

A amostra GEL1 mostrou o mesmo comportamento que a amostra controle após o processo de sinterização. Quando comparamos os volumes de célula unitária das amostras GEL1 ($V = 528,991 \text{ \AA}^3$) observou-se que o volume da célula unitária aumenta após a sinterização ($V = 529,040 \text{ \AA}^3$).

Observou-se que à medida que a concentração de gelatina aumenta, o volume da célula unitária aumenta da mesma forma que as demais amostras após o processo de sinterização. A amostra GEL2 apresentou um volume de $529,162 \text{ \AA}^3$ quando sinterizada, enquanto, antes de ser submetida a este processo, a amostra apresentava um volume de $528,869 \text{ \AA}^3$.

IV.2.2 Amostras com 21 dias de envelhecimento

As amostras avaliadas após 21 dias de envelhecimento e subsequente tratamento térmico também apresentaram, após os cálculos realizados a partir dos refinamentos de Rietveld a HAP como fase principal, bem como verificou-se a existência de fases secundárias como CaCO_3 e CaO .

Seqüencialmente são apresentados os gráficos de Rietveld e os parâmetros estruturais obtidos após os refinamentos.

Na Figura 23, é dado o difratograma obtido a partir da AC sinterizada após 21 dias de envelhecimento.

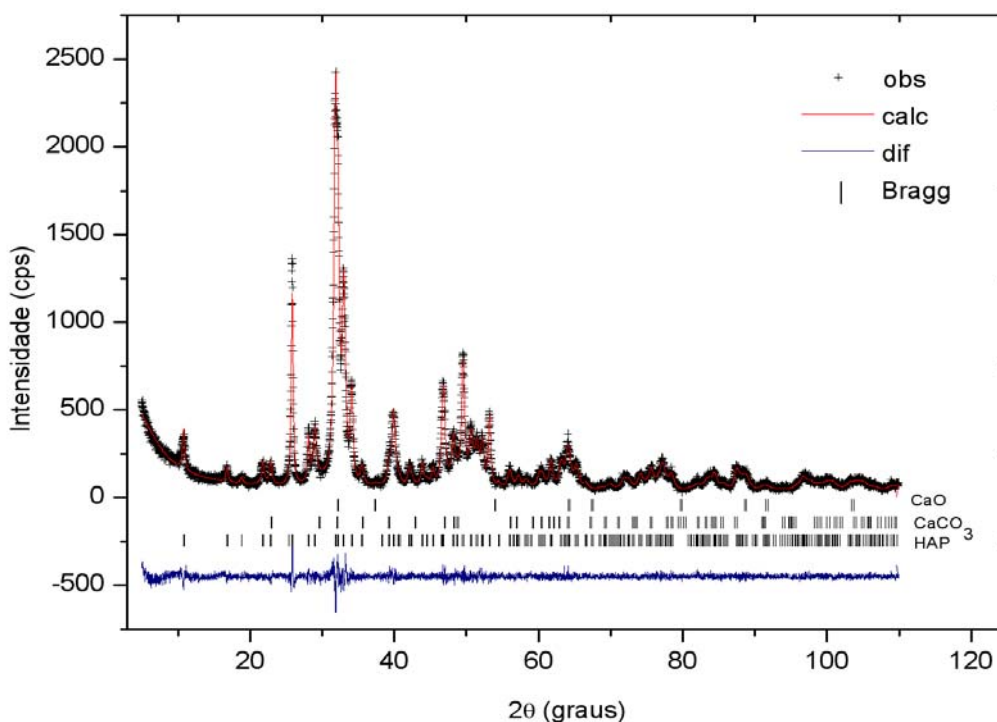


Figura 23- Gráfico de Rietveld da AC sinterizada após 21 dias de envelhecimento.

Os dados estruturais obtidos para a AC são dados na Tabela 19.

Tabela 19- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da AC sinterizada com 21 dias de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $P 6_3/m$ – hexagonal						
$a = b = 9.4012 (3) \text{ \AA}$ e $c = 6.8865 (2) \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 527.122 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	- 0,0003 (3)	1,0	1,05 (2)
Ca2	6f	0,2552 (2)	0,0095 (2)	0,2500	1,0	1,08 (2)
P	6f	0,3724 (3)	0,3986 (3)	0,2500	1,0	2,58 (6)
O1	6f	0,4812 (5)	0,3222 (5)	0,2500	1,0	1,42 (6)
O2	6f	0,4703 (5)	0,5895 (5)	0,2500	1,0	2,59 (6)
O3	12i	0,2503 (4)	0,3350 (4)	0,0687 (4)	1,0	3,01 (6)
O4	4e	0,0	0,0	0,1899 (2)	0,5	4,12
H	4e	0,0	0,0	0,2067 (2)	0,5	4,12
$R_{wp} = 8,7\%$ $R_p = 6,6\%$ $R_B = 1,4\%$ $Dwd = 1,61\%$						

O gráfico de Rietveld obtido para a amostra GEL1 após o processo de sinterização é dado na Figura 24.

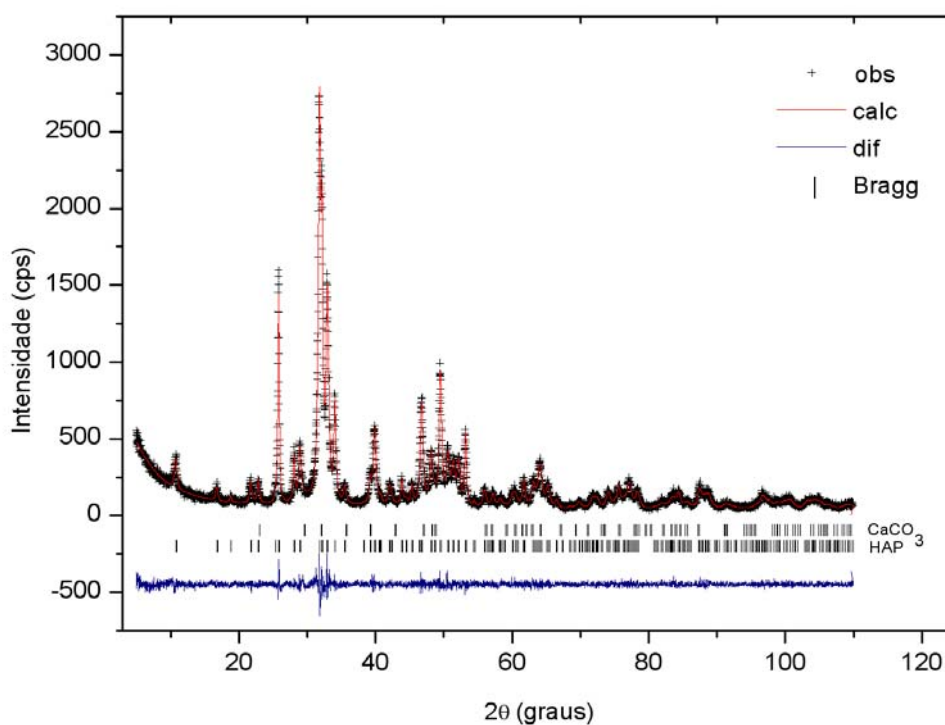


Figura 24- Gráfico de Rietveld da amostra GEL1 sinterizada após 21 dias de envelhecimento.

Observou-se que a amostra GEL1 não apresentou a fase de CaO como as demais amostras sinterizadas.

Os parâmetros estruturais obtidos para a amostra GEL1 são dados na Tabela 20.

Tabela 20- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL1 sinterizada com 21 dias de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $P 6_3/m$ – hexagonal						
$a = b = 9.4049 (2) \text{ \AA}$ e $c = 6.8878 (2) \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 527.621 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	- 0,0046 (3)	1,0	0,90 (2)
Ca2	6f	0,2570 (2)	0,0110 (2)	0,2500	1,0	0,93 (2)
P	6f	0,3702 (3)	0,3982 (3)	0,2500	1,0	2,48 (5)
O1	6f	0,4843 (4)	0,3272 (4)	0,2500	1,0	0,72 (6)
O2	6f	0,4777 (5)	0,5895 (4)	0,2500	1,0	1,89 (6)
O3	12i	0,2487 (4)	0,3325 (3)	0,0722 (4)	1,0	2,30 (6)
O4	4e	0,0	0,0	0,1794 (1)	0,5	3,50
H	4e	0,0	0,0	0,1961 (1)	0,5	3,50
$R_{wp} = 8,6\%$ $R_p = 6,5\%$ $R_B = 1,6\%$ $Dwd = 1,69\%$						

Na Figura 25 é dado o gráfico de Rietveld para a amostra GEL2 submetida ao processo de sinterização.

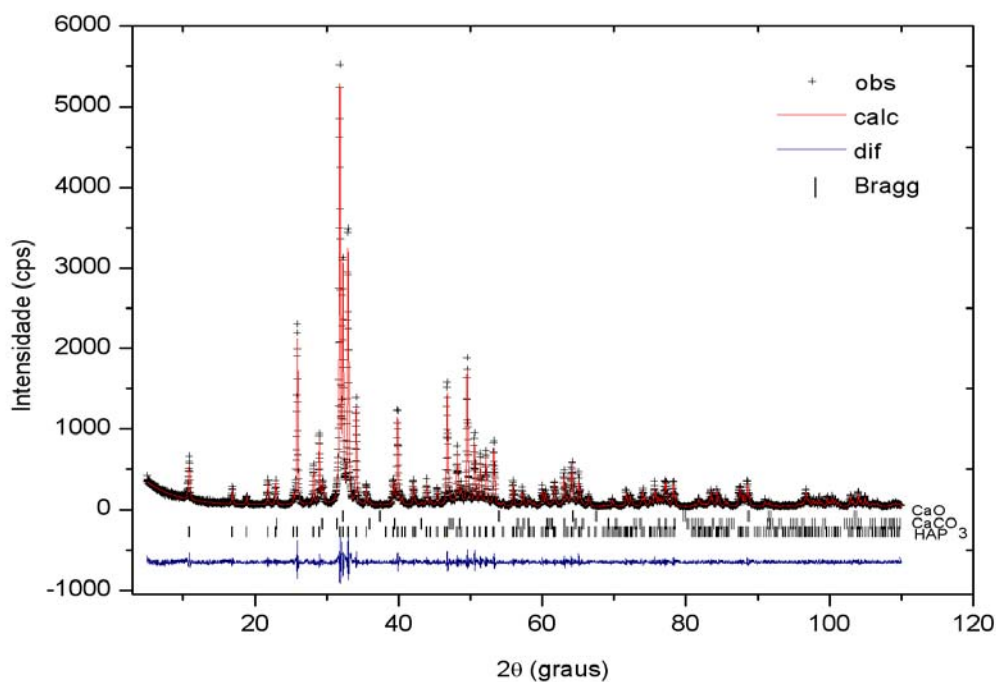


Figura 25- Gráfico de Rietveld da amostra GEL2 sinterizada após 21 dias de envelhecimento.

Na Tabela 21 são dados os parâmetros estruturais obtidos após o refinamento.

Tabela 21- Parâmetros estruturais obtidos após o término do refinamento de Rietveld da amostra GEL2 sinterizada com 21 dias de envelhecimento.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – $P 6_3/m$ – hexagonal						
$a = b = 9.4221 (1) \text{ \AA}$ e $c = 6.8833 (1) \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; $V = 529.212 \text{ \AA}^3$						
Átomos	Wyckoff	x	y	z	sof	uiso ($\text{\AA}^2$)
Ca1	4f	0,6667	0,3333	0,0022 (4)	1,0	1,46
Ca2	6f	0,2535 (2)	0,0071 (2)	0,2500	1,0	1,68
P	6f	0,3671 (2)	0,3984 (2)	0,2500	1,0	1,47
O1	6f	0,4892 (4)	0,3257 (5)	0,2500	1,0	0,63
O2	6f	0,4646 (5)	0,5868 (4)	0,2500	1,0	0,08
O3	12i	0,2559 (4)	0,3413 (3)	0,0713 (4)	1,0	1,31
O4	4e	0,0	0,0	0,2025 (1)	0,5	2,47
H	4e	0,0	0,0	0,2192 (1)	0,5	2,47
$R_{wp} = 10,5\%$ $R_p = 8,0\%$ $R_B = 2,9\%$ $Dwd = 1,38\%$						

O gráfico comparando a variação de volume das amostras após 21 dias de envelhecimento é dado na Figura 26.

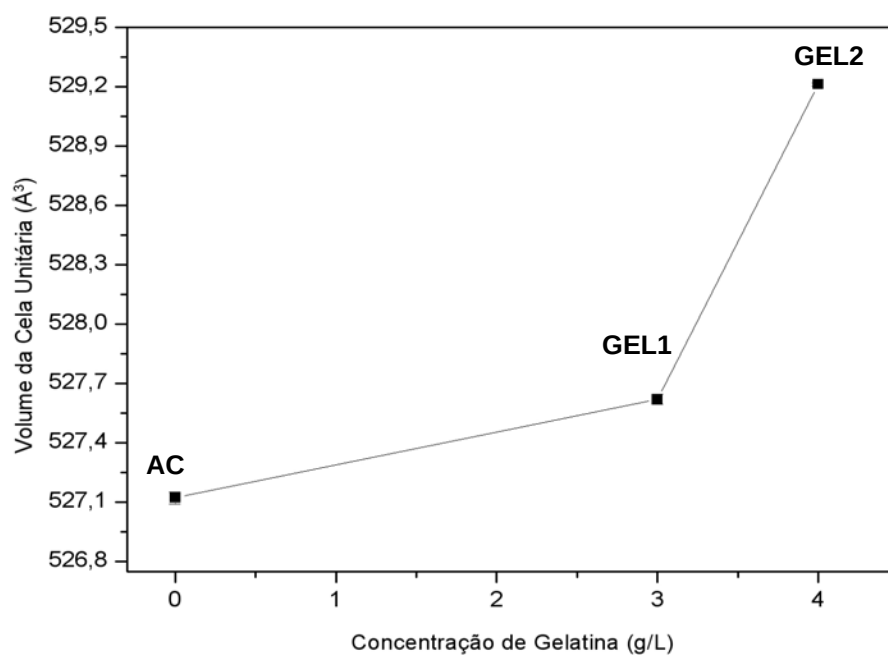


Figura 26- Variação do volume da cela unitária para a AC, GEL1 e GEL2 sinterizadas após 21 dias de envelhecimento.

Comparando-se os resultados das amostras após um dia de envelhecimento com as amostras após 21 dias de envelhecimento, verificou-se que o volume da cela unitária das amostras com maior tempo de envelhecimento diminuiu. Entretanto, quando comparado a amostra GEL2 nos dois tempos de envelhecimento, verificou-se um comportamento diferente das demais amostras, uma vez que o volume da cela unitária aumenta com o aumento do tempo de envelhecimento.

As amostras com 21 dias de envelhecimento, após a sinterização também apresentaram a fase de CaO como fase secundária. Porém, verificou-se que com o aumento do tempo de envelhecimento, as amostras apresentaram picos menos evidentes desta fase, quando relacionadas com as amostras com um único dia de envelhecimento, principalmente, quando comparamos as amostras controle nos dois períodos de envelhecimento, como pode ser visto nas Figuras 21 e 27.

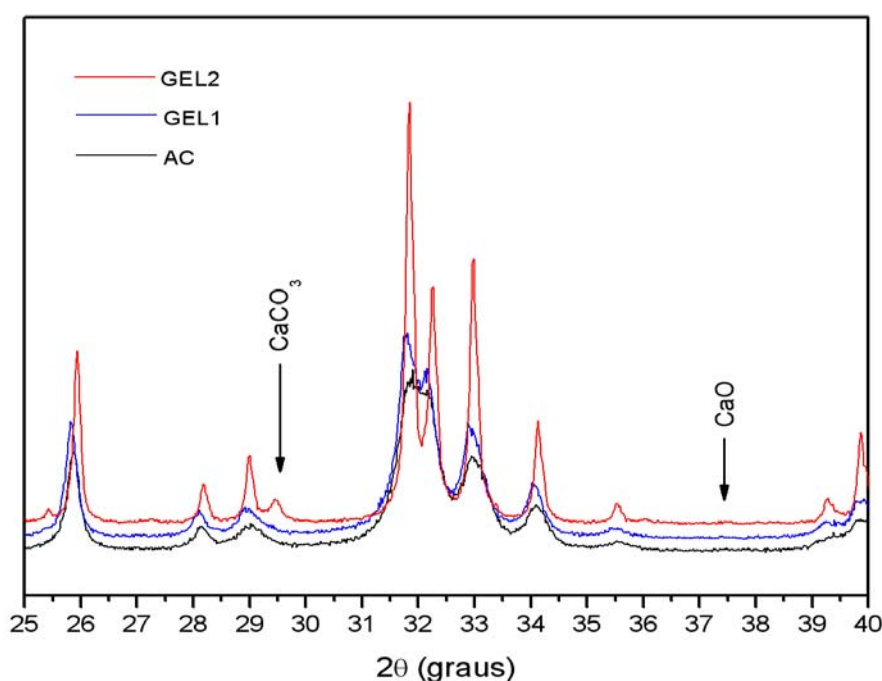


Figura 27- Fases presentes nas amostras AC, GEL1 e GEL2 sinterizadas, após 21 dias de envelhecimento.

IV.2.3 Estudo Comparativo

Verificou-se que as amostras controle sinterizadas após 21 dias apresentaram valores menores para os volumes de cela unitária (Figura 28). Isso pode ser devido a maior decomposição do carbonato em CaO.

A análise dos resultados quantitativos do refinamento de Rietveld indica que com o aumento do tempo de envelhecimento, a quantidade de HAP como fase majoritária é diminuída, de cerca de 95% a 87%. Dessa forma, acredita-se que a formação de fases secundárias contribui para a redução do volume da cela unitária, uma vez que, com a formação da calcita, íons cálcio são retirados da estrutura da HAP.

Com relação às amostras controle tratadas termicamente nos dois períodos de envelhecimento, pôde-se verificar que o volume da cela unitária também diminuiu. Com o aumento do tempo de envelhecimento, a formação de fases secundárias decorrentes da decomposição dos íons carbonatos antes aderidos à estrutura da HAP é responsável por esta redução de volume da cela unitária.

O mesmo comportamento pode ser observado para as amostras GEL1, o volume da cela unitária é reduzido de $529,040 \text{ \AA}^3$ para $527,621 \text{ \AA}^3$.

Entretanto, quando comparamos a amostra GEL2 nos dois tempos de envelhecimento, verificou-se um comportamento diferente das demais amostras, uma vez que, o volume da cela unitária aumenta com o aumento do tempo de envelhecimento.

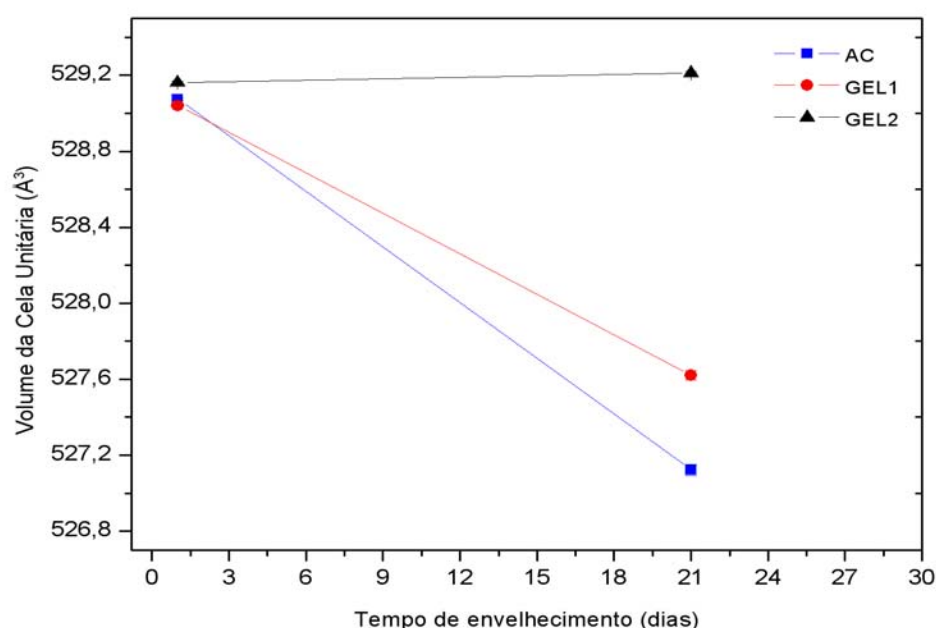


Figura 28- Variação do volume da célula unitária das amostras sinterizadas após os tempos de envelhecimento estudados.

Os parâmetros de rede de todas as amostras tratadas termicamente, indicam uma substituição no sítio de fosfato, PO_4^{3-} , observado pelo ligeiro decréscimo do parâmetro a e aumento do parâmetro c ^{29, 30, 36} quando comparamos as amostras tratadas termicamente com 1 e 21 de envelhecimento.

IV.3 Análise de tamanho de cristalito e microdeformação da rede cristalina

De acordo com Stokes e Wilson (1944) microdeformação significa a deformação média entre duas células unitárias, separadas por n células, em uma coluna de células perpendiculares aos planos de difração. A região que inclui a variação no espaçamento de rede é considerada como uma região que difrata incoerentemente.

Desde a segunda metade da década de 1980, o método de Rietveld vem se desenvolvendo de forma a permitir a determinação de tamanho de cristalitos e

microdeformações, simultaneamente às análises da proporção e da estrutura cristalina de cada fase presente no material estudado.^{80, 93}

Um modelo bastante eficiente para o tratamento da anisotropia é o proposto por Peter W. Stephens (1999). Neste modelo, o alargamento de deformação é considerado como manifestação da distribuição dos parâmetros métricos da rede recíproca. Cada grão individual é imaginado com seu próprio conjunto de parâmetros. Stephens considerou o caso de distribuição de microdeformação, na qual a largura do pico de difração aumenta em proporção à ordem de difração. Poucos parâmetros, deduzidos para cada sistema cristalino, são necessários para se alcançar o melhor ajuste dos perfis de linha. Este modelo é denominado fenomenológico porque relaciona uma explicação em escala microscópica para as deformações de rede aos perfis de difração observados. Este modelo foi incorporado aos programas de método de Rietveld GSAS, Maud e recentemente no FullProf.

Desta forma, o modelo de Peter W. Stephens foi adotado para resolver o problema de anisotropia das amostras.

A seguir são dados os gráficos de microdeformação de rede obtidos após o término do refinamento de Rietveld para as amostras controle, nos dois diferentes períodos de envelhecimento estudados (Figura 29).

Verificou-se que com o aumento do tempo de envelhecimento, as microdeformações de rede das amostras controle tornaram-se menos intensas.

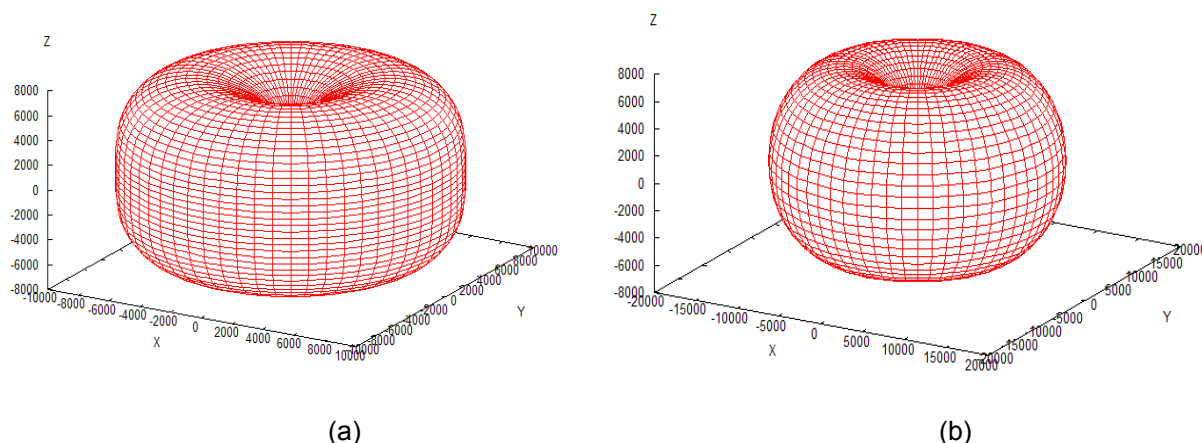


Figura 29- Gráfico de distribuições de microdeformação de rede das amostras controle. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) Após 21 dias de envelhecimento.

Cálculos foram realizados para se obter uma representação do cristalito da fase HAP evidenciando suas dimensões nas direções paralela (menor) e perpendicular (maior) ao plano (002). Observou-se que o cristalito da amostra controle com 1 dia de envelhecimento tem 160 Å na direção z e 75 Å na direção x, e a amostra com 21 dias de envelhecimento apresentou 173 Å na direção z e 70 Å na direção x (Figura 30).

Observou-se que o tamanho de cristalito aumenta com a conseqüente diminuição da microdeformação da rede cristalina. Isto pode ser explicado pela diminuição das tensões internas no cristal na medida em que ele cresce.

Verificou-se que o tamanho do cristalito para estas amostras aumenta na direção do eixo z com o aumento do tempo de envelhecimento, acompanhado da diminuição da microdeformação como pode ser visto nas Figuras 29 e 30.

As microdeformações indicam que, na direção em que o cristalito é maior, a deformação é menor.

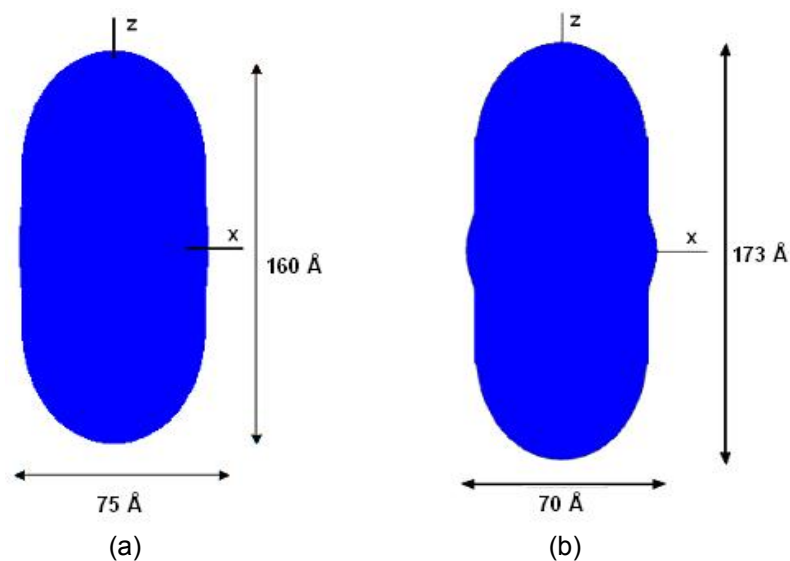


Figura 30- Representação do tamanho de cristalito das amostras controle. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) AC com 21 dias de envelhecimento.

Na Figura 31, são dados os gráficos de microdeformação de rede das amostras GEL1, com 1 e 21 dias de envelhecimento.

Sequencialmente, na Figura 32 é dada a representação do tamanho de cristalito para as amostras GEL1 nos dois períodos de envelhecimento estudados.

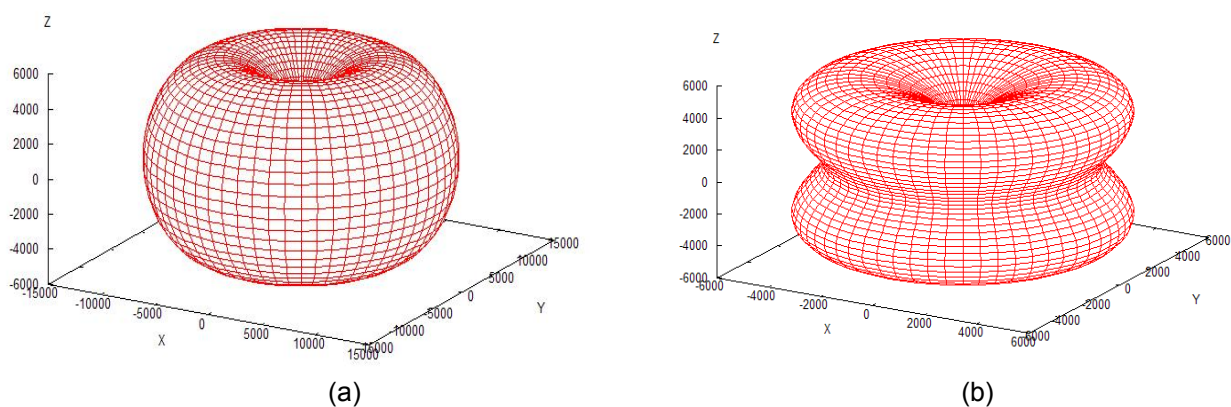


Figura 31- Gráfico de distribuições de microdeformação de rede das amostras GEL1. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) Após 21 dias de envelhecimento.

As amostras com adição de gelatina não tiveram o mesmo comportamento das amostras controle, de modo que o tamanho do cristalito diminuiu nas duas direções, com o aumento do tempo de envelhecimento (Figura 32).

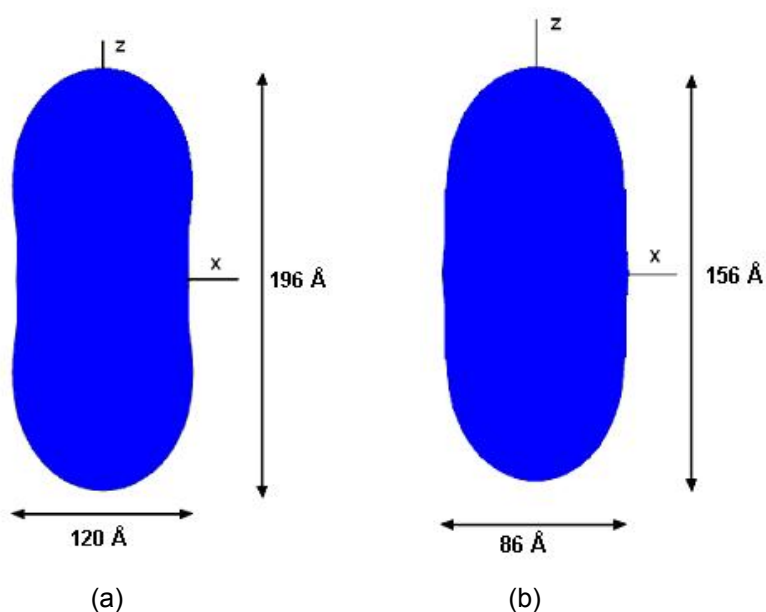


Figura 32- Representação do tamanho de cristalito das amostras GEL1. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) Após 21 dias de envelhecimento.

As microdeformações de rede tornaram-se mais intensas à medida que o cristalito diminuiu. Observou-se a formação de uma curvatura na representação das microdeformações de rede gerada pelo programa GSAS, para a amostra com adição de gelatina, após 21 dias de envelhecimento. Esta redução no tamanho de cristalito, junto à formação dessa curvatura, pode estar relacionada à formação de carbonato apatita e também com as interações entre os íons Ca^{2+} da HAP e os íons $\text{R}-\text{COO}^-$ da gelatina como discutido anteriormente.

Os gráficos de microdeformação de rede, nos dois períodos de envelhecimento estudados das amostras GEL2, são dados na Figura 33.

Observou-se que a amostra GEL2 com um único dia de envelhecimento apresentou o mesmo comportamento da amostra GEL1 com 21 dias de envelhecimento. Porém, estas amostras apresentaram microdeformações de rede maiores na direção x, quando o tempo de envelhecimento é menor.

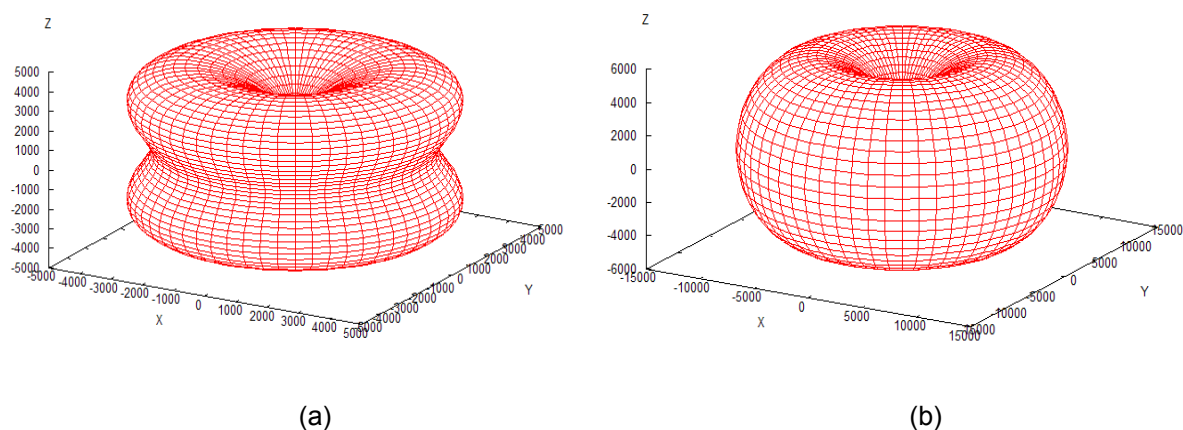


Figura 33- Gráfico de distribuições de microdeformação de rede das amostras GEL2. (a) Após 1 dia de envelhecimento e (b) Após 21 dias de envelhecimento.

As representações de tamanho de cristalito da fase HAP evidenciando suas dimensões nas direções paralela e perpendicular ao plano (002) para as amostras GEL2 nos dois diferentes períodos de tempo estudados são dadas na Figura 34.

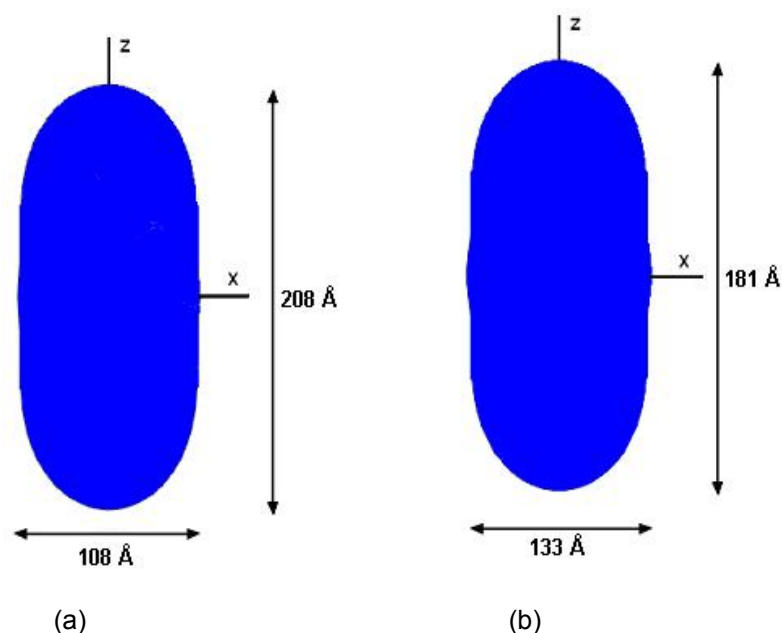


Figura 34- Representação do tamanho de cristalito. (a) GEL2 com 1 de envelhecimento e (b) GEL2 com 21 dias de envelhecimento.

Como nas demais amostras com adição de gelatina, a amostra GEL2 apresentou uma diminuição no tamanho de cristalito na direção z, com o aumento do tempo de envelhecimento.

A diminuição do tamanho de cristalito com o aumento do tempo de envelhecimento pode ser causada pelas diferentes intensidades das interações entre os íons Ca^{2+} e os íons $\text{R}-\text{COO}^-$. Com o aumento da concentração de gelatina, a fonte de íons $\text{R}-\text{COO}^-$ disponíveis para a complexação com os íons Ca^{2+} conduz a um grande número de núcleos para o crescimento da HAP cristalina, de modo que este cristal não possa crescer significativamente.⁸⁹

Outra razão para esta diminuição do tamanho de cristalito quando o tempo de envelhecimento é maior pode estar associada à formação da fase calcita (CaCO_3).

De modo geral, as microdeformações são menores na direção z em que o cristalito é maior.

IV.4 Caracterização estrutural das apatitas nanoestruturadas por espectroscopia de absorção no Infravermelho

As absorções características no IV dos grupos funcionais estudados são apresentadas na Tabela 22. A posição dos modos vibracionais dos grupos funcionais presentes nas apatitas sintetizadas podem ser observadas na Figura 35.

Os espectros exibem bandas características de vibrações de estiramento do grupo CO_3^{2-} , indicando a formação de uma carbonato apatita do tipo B, uma vez que não há presença de absorção em 1515 cm^{-1} , característica da carbonato apatita do tipo A.⁴⁶

Tabela 22 – Absorções características no IV dos grupos funcionais estudados.

Grupo funcional	Tipo de vibração	Valor esperado (cm ⁻¹)	Valor observado (cm ⁻¹)	Amostra(s)	Região
Íon fosfato (PO ₄ ²⁻)	ν P=O	1.500-1.200	1410	AC, GEL1 e GEL2	A
	ν P-O	1.200-850	1.200-900	AC, GEL1 e GEL2	B
	δ O-P-O	650-300	498	AC, GEL1 e GEL2	C
Íon carbonato (CO ₃ ²⁻)	ν C=O	~1.607	1.650	AC	D
	ν_{sim} C-O; ν C-O e δ O-C=O	~1.292-1.080	1.300-1.000	AC	B
	ν_{assim} C-O	~1.504-1492	1460	AC, GEL1 e GEL2	E
	δ_{oop} O-C=O	~868	870	AC, GEL1 e GEL2	F
Íon hidróxido (OH ⁻)	ν O-H	3.700-3.500	3625-3475	AC, GEL1 e GEL2	G
	ν O-H (H ₂ O)	3.200-2.800	Sobreposta com OH e NH	AC, GEL1 e GEL2	H
Amida ^a –(C=O)NH–	ν N-H	3.330-3.060	Sobreposta com OH	GEL1 e GEL2	H
	ν C=O (amida I)	1.640	1640	GEL1 e GEL2	J
	δ N-H (amida II)	1.570-1.515	1550-1500	GEL1 e GEL2	K
Ânion carboxilato (R-COO ⁻)	ν_{assim} O-C=O	1.650-1.550	1640-1550	GEL1 e GEL2	K
	ν_{sim} O-C=O	1.400	1400	GEL1 e GEL2	N
Ácido carboxílico ^b (R-COOH)	ν O-H	3.300-2.500	Sobreposta com NH	GEL1 e GEL2	H
	ν C=O	1.720-1.706	1710	GEL1 e GEL2	K
	ν C-O	1.320-1.210 (1.315-1.280)	1310	GEL1 e GEL2	B
	δ O-H	1.440-1.395	1420	GEL1 e GEL2	A
	δ_{oop} O-H	920	898	GEL1 e GEL2	F

^a Amostra no estado sólido; ^b Dímero

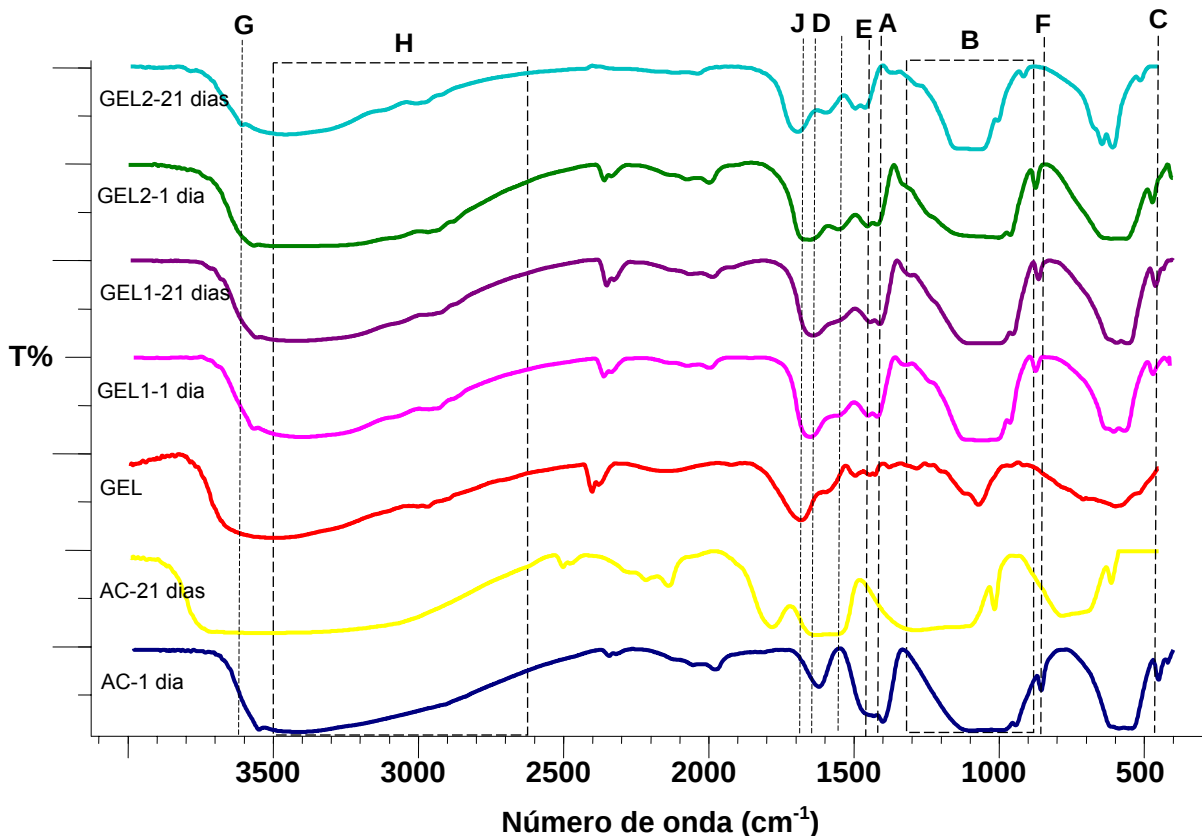


Figura 35 – Espectros de IVTF das apatitas sintetizadas após os dois períodos de envelhecimento estudados.

No espectro da amostra controle (AC) com 1 dia de envelhecimento, há presença da deformação axial de O–H em 3410 cm^{-1} , e do íon OH^- em 3625 cm^{-1} e a deformação angular em 630 cm^{-1} . Ainda pôde-se observar a deformação axial de C=O do íon CO_3^{2-} em 1650 cm^{-1} e de C–O em 1460 cm^{-1} e deformação angular fora do plano em 870 cm^{-1} e de deformação angular no plano em 655 cm^{-1} .

Quanto à presença de bandas característica de fosfato, PO_4^{3-} , observou-se à deformação axial de P=O em 1420 cm^{-1} e múltiplas bandas de deformação axial de P–O entre $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ e de deformação angular de O–P–O em 498 cm^{-1} .

Na amostra controle (AC) com 21 dias de envelhecimento, observou-se as mesmas bandas presentes na amostra controle com um único dia de envelhecimento. No entanto, houve um aumento na intensidade das bandas

características do íon carbonato, CO_3^{2-} , como pode ser visto nas absorções em 1650 cm^{-1} e entre $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ e em 870 cm^{-1} .

O espectro da amostra controle com 21 dias de envelhecimento não apresentou mudanças significativas nas intensidades das bandas características do íon fosfato, PO_4^{3-} .

Observou-se a partir dos espectros das amostras controle que houve a formação de carbonato apatita do tipo B nos dois tempos de envelhecimento estudados, ou seja, houve a incorporação do íon CO_3^{2-} na estrutura da hidroxiapatita, devido, principalmente, ao fato da síntese ter sido realizada em sistema aberto. Isso explica o fato do volume da cela unitária aumentar com o aumento do tempo de envelhecimento ($V_{1\text{dia}} = 528,683\text{ \AA}^3$; $V_{21\text{dias}} = 529,084\text{ \AA}^3$).

Analisou-se por TFIV a gelatina utilizada para a síntese dos compósitos, com objetivo de se obter uma referência, assim como foi feito para as amostras controle, para comparação entre os compósitos sintetizados.

No espectro da gelatina (GEL), que pode ser observado na Figura 36, observou-se a presença da deformação axial de O-H em 3475 cm^{-1} do grupo carboxila e de C-H em 2930 cm^{-1} , a absorção de N-H está encoberta pela banda de O-H. A deformação axial de C=O da amida aparece em 1640 cm^{-1} e C=O dos grupos carboxila em 1550 cm^{-1} . Ainda há a presença de deformação axial de C-N da amida em 1425 cm^{-1} e deformação axial do grupo C-C-O em 1093 cm^{-1} .

Nos espectros dos compósitos HAP/GEL, (amostras GEL1 e GEL2), verificou-se a presença das absorções características dos grupos funcionais da HAP e também da gelatina, no entanto, as intensidades referentes às absorções da gelatina são maiores. As intensidades dos íons fosfato e carbonato são equivalentes às observadas nas amostras controle.

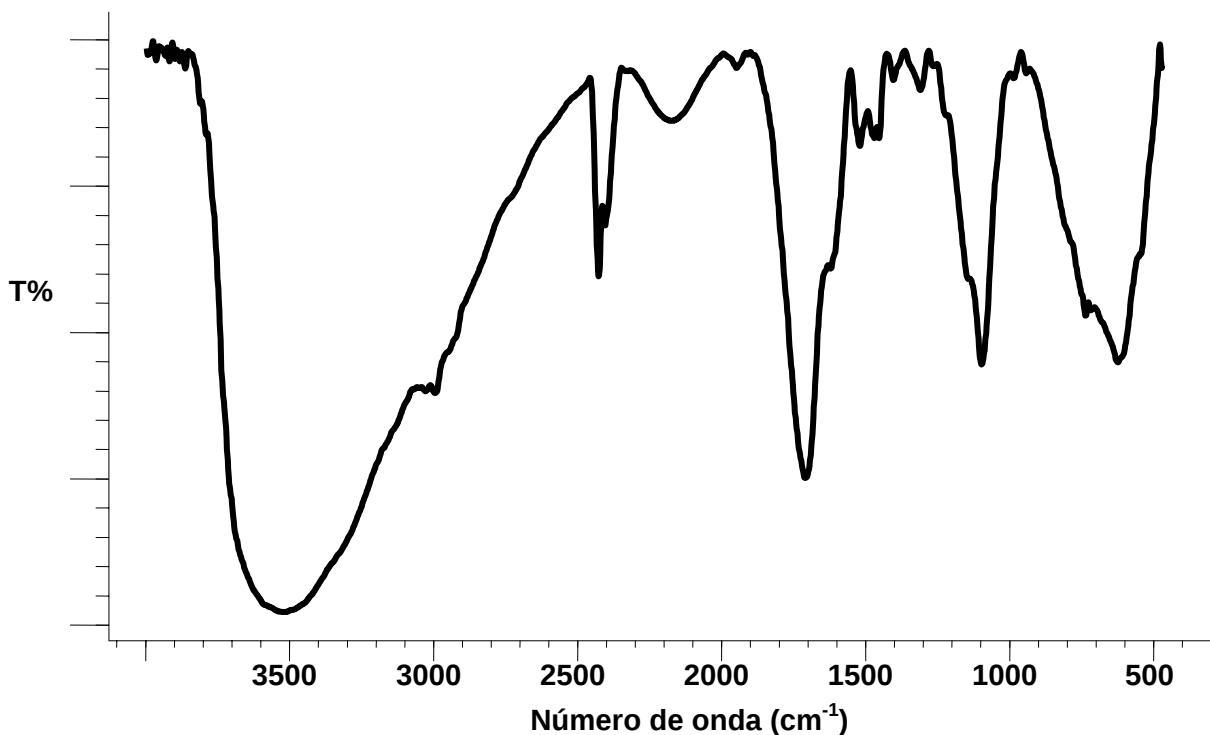


Figura 36- Espectro de IVTF da gelatina utilizada para a síntese dos compósitos HAP/GEL.

Com o aumento do tempo de envelhecimento houve a intensificação das absorções dos íons fosfato e carbonato, com encobrimento das bandas características da gelatina. As bandas de carbonato tornaram-se mais intensas, indicando a formação de carbonato apatita.

As intensidades nos mostram que há maior presença de íons fosfato do que íons carbonato. Também se pôde observar a presença dos íons OH^- livres e hidratados, e de grupos N—H .

IV.4.1 Estudo Comparativo

Em relação às amostras controle, observou-se que as amostras com 21 dias de envelhecimento apresentaram bandas de carbonato mais intensas, como pode ser visto na comparação apresentada na Figura 37.

A existência de duas bandas em aproximadamente $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ e uma banda em 870 cm^{-1} indica a presença do grupo CO_3^{2-} . Estas duas regiões contribuem para a identificação do sítio em que o íon CO_3^{2-} está inserido, principalmente a deformação angular fora do plano (δ_{oop}), ν_2 . Rey *et al.*, (1989) mostraram que a banda em 879 cm^{-1} pode ser associada ao carbonato no sítio A, a banda em 873 cm^{-1} refere-se ao carbonato no sítio B, as duas bandas em 879 e 870 cm^{-1} , carbonato apatita do tipo AB, a banda localizada em 866 cm^{-1} pode ser atribuída a carbonatos em ambientes amorfos ou a carbonatos instáveis.

A existência de uma banda em 873 cm^{-1} e de duas bandas em 1425 e 1452 cm^{-1} deve-se a presença do grupo CO_3^{2-} substituindo o sítio dos grupos PO_4^{3-} característicos da hidroxiapatita carbonatada do tipo B, como pode ser verificado na figura 84.³⁰

O alargamento das bandas que se localizam nas regiões $590\text{-}610\text{ cm}^{-1}$ indica materiais pouco cristalinos. O aumento do teor de carbonato contribuiu para a diminuição da cristalinidade. Além disso, a presença de carbonato na estrutura abaixa a estabilidade térmica da HAP, tendo como resultado sua decomposição em CaO como fase secundária.^{45, 91}

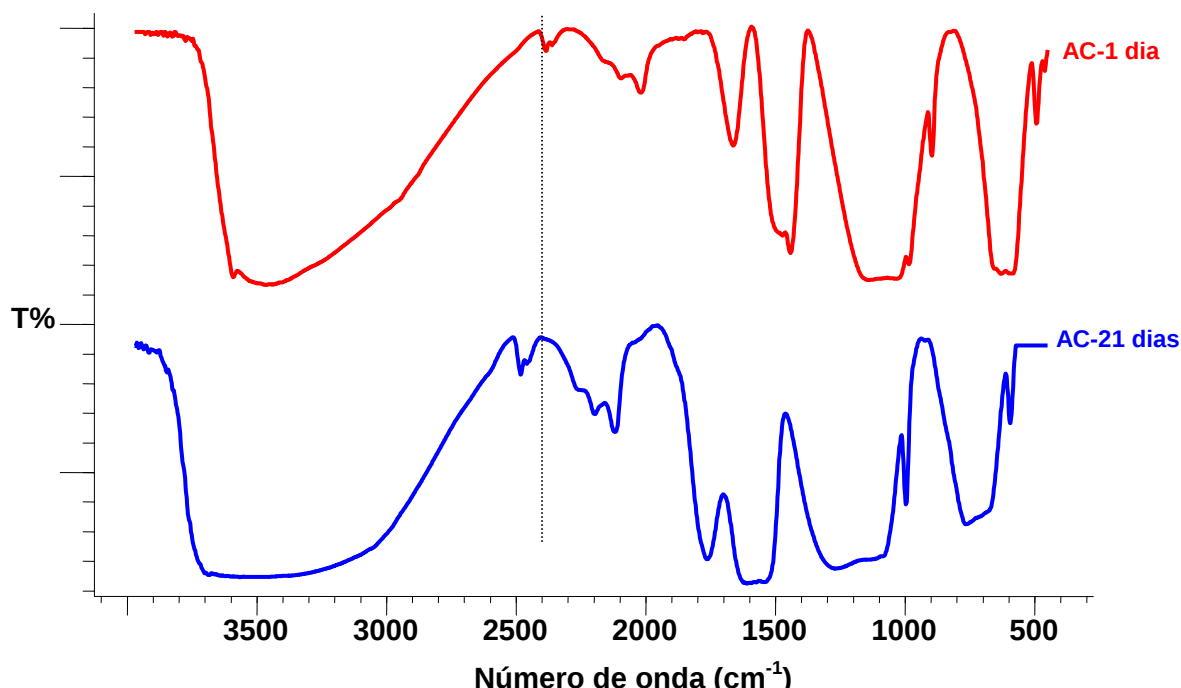


Figura 37- Espectros de IVTF das amostras controle após os dois períodos de envelhecimento estudados.

Os compósitos HAP/GEL apresentaram bandas adicionais em relação às amostras controle, quando o tempo de envelhecimento foi de um único dia para estas mesmas amostras. Além das bandas características da hidroxiapatita estas amostras apresentaram bandas características da gelatina, com bandas de carbonato e fosfato com intensidades equivalentes. A Figura 38 mostra a comparação de todos os compósitos sintetizados após os períodos de envelhecimento estudados.

Verificou-se que com o aumento do tempo de envelhecimento as absorções de fosfato e carbonato tornaram-se mais intensas, com encobrimento das bandas características da gelatina.

Comparando-se os espectros da amostra GEL1 com 21 dias de envelhecimento e da amostra controle com o mesmo tempo de envelhecimento, observou-se um aumento significativo na intensidade das bandas características do íon carbonato na amostra GEL1. Podemos dizer que a formação de carbonato

apatita do tipo B é mais evidente na amostra com adição de 3 g/L de gelatina (GEL1), com 21 dias de envelhecimento.

Com o aumento da concentração de gelatina (GEL2) e também com o aumento do tempo de envelhecimento, as bandas de fosfato tornaram-se mais intensas. As intensidades das bandas de carbonato e hidróxido diminuíram quando o tempo de envelhecimento foi de 21 dias, mas ainda apresentavam bandas características de N—H da gelatina.

Os fortes picos de R—COO^- em 1640 cm^{-1} característicos da gelatina e os picos com número de onda mais elevado em $1655\text{--}1651\text{ cm}^{-1}$, presentes na amostra GEL2 com 21 dias de envelhecimento, são devidos aos íons de Ca^{2+} acoplados com o R—COO^- com a interação eletrostática e o aumento da intensidade de refletância com o aumento da concentração de gelatina.⁸⁹ Sabe-se que os grupos R—COO^- da gelatina em $\text{pH} \geq 7$ estão na maioria na forma iônica e oferecem sítios de ligação para os íons Ca^{2+} por causa da atração iônica entre estes íons.⁹⁰

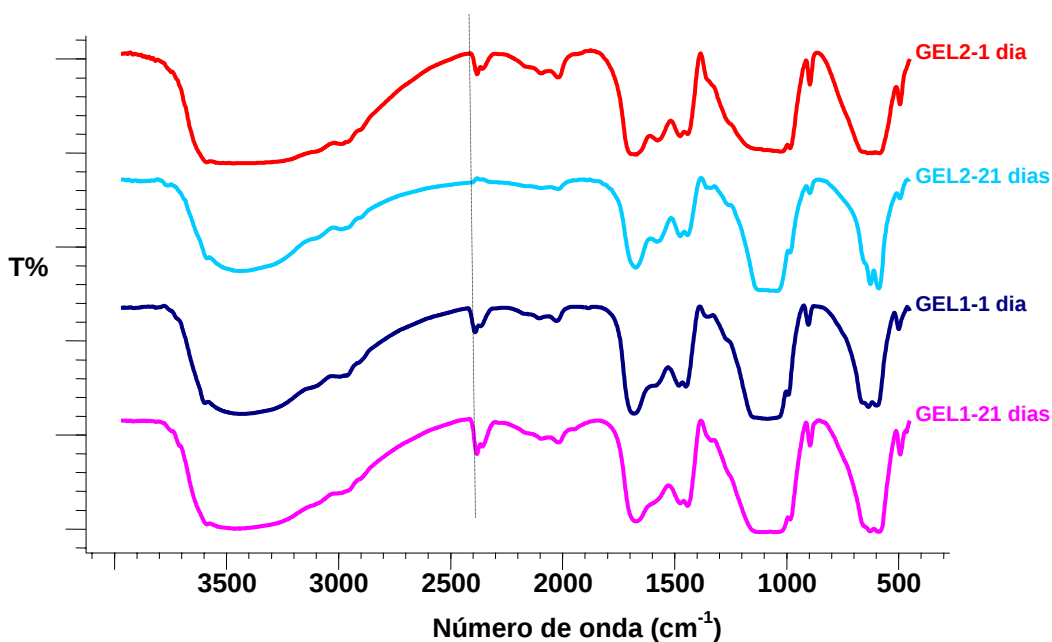


Figura 38- Espectros de IVTF dos compósitos HAP/GEL após os dois períodos de envelhecimento estudados.

Pode-se observar, a partir dos cálculos de tamanho de cristalito, que com o aumento da concentração de gelatina e também com o aumento do tempo de envelhecimento, ocorre a diminuição do tamanho de cristalito. Isso pode ter sido causado pelas diferentes intensidades das interações entre os íons.

Com o aumento da concentração de gelatina, a fonte de íons $R-COO^-$ disponíveis para a complexação com os íons Ca^{2+} conduz a um grande número de núcleos para o crescimento da HAP cristalina, de modo que o cristal não cresce grandemente.⁸⁹

Conseqüentemente, podemos dizer que nas amostras controle houve a incorporação de íons CO_3^{2-} na estrutura da HAP, formando uma carbonato apatita do tipo B. Ainda pôde-se observar a formação de carbonato apatita tipo B, nas amostras GEL1, com formação mais significativa na amostra com 21 dias de envelhecimento. Entretanto, as amostras GEL2 mostraram diferente comportamento quanto à formação da HAP. Nas amostras com maior concentração de gelatina, houve a maior interação entre os íons Ca^{2+} da HAP e os íons $R-COO^-$ da gelatina em solução, levando a formação de um complexo Ca/GEL, reduzindo a intensidade das absorções características dos grupos carbonato, CO_3^{2-} .

IV.5 Caracterização morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura

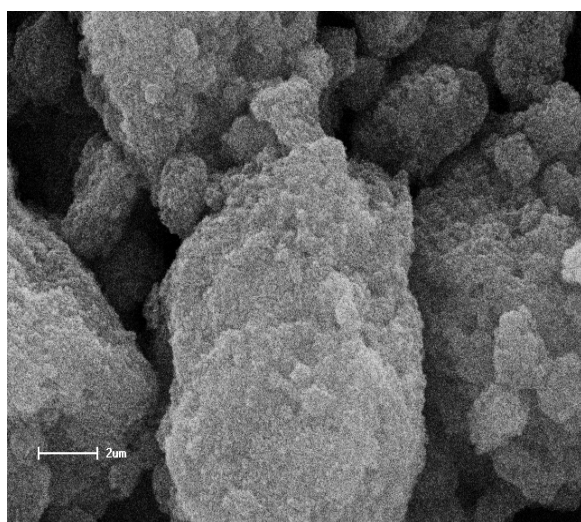
Cristais de hidroxiapatita estequiométrica normalmente apresentam-se na forma de agulhas e sua morfologia está diretamente relacionada com os parâmetros de síntese, principalmente temperatura, tempo de digestão e tipo de substituinte.⁹⁵

De acordo com Legeros (1991), a incorporação do CO_3^{2-} promove o crescimento ao longo das dimensões radiais. O pH também influencia na morfologia

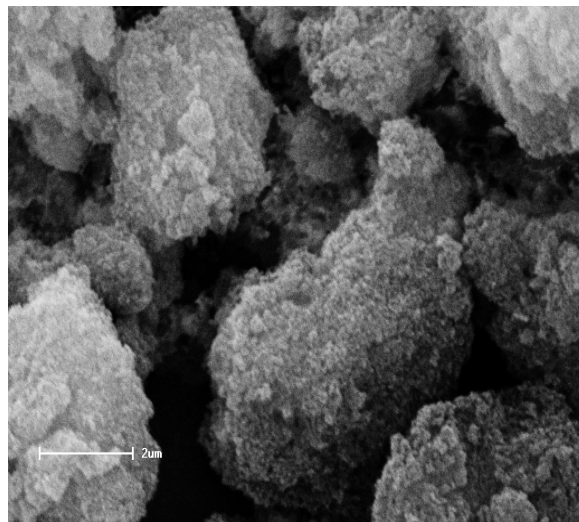
do material, pois amostras sintetizadas em pH elevado tendem a formar cristais esféricos.⁹⁶

O exame das microscopias das amostras sintetizadas (Figura 39) revelou que há formação de aglomerados e que os cristais são nanoestruturados. Uma análise mais próxima indica que a superfície destas partículas consiste em muitas partículas ultrafinas, com uma tendência a se aglomerar deixando nanoporos no meio do aglomerado. As formações dos poros são benéficas, pois permitem a circulação do fluido fisiológico quando é usado na superfície de um biomaterial.⁹⁷

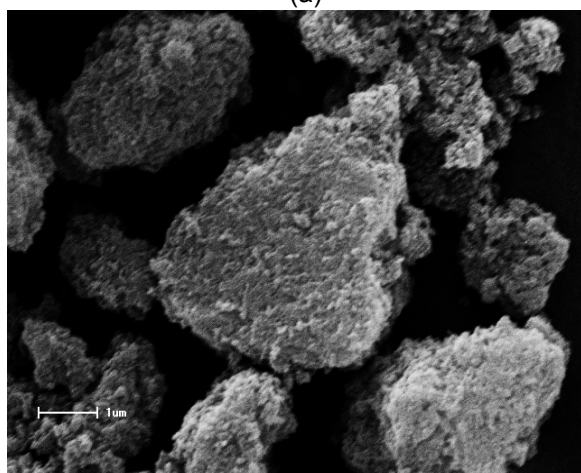
O aumento do tamanho de partícula conduz a uma diminuição na área de superfície específica dos pós da HAP.⁹⁸



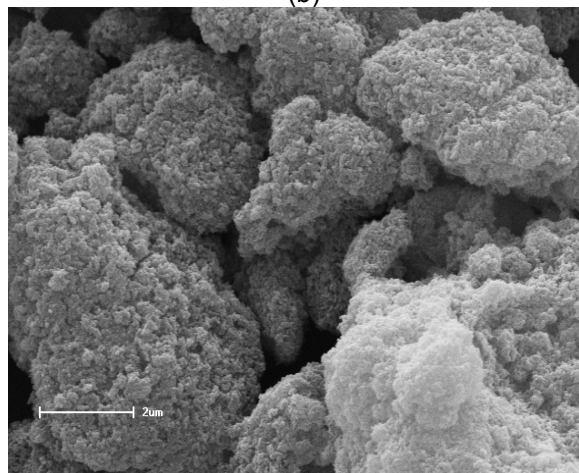
(a)



(b)



(c)



(d)

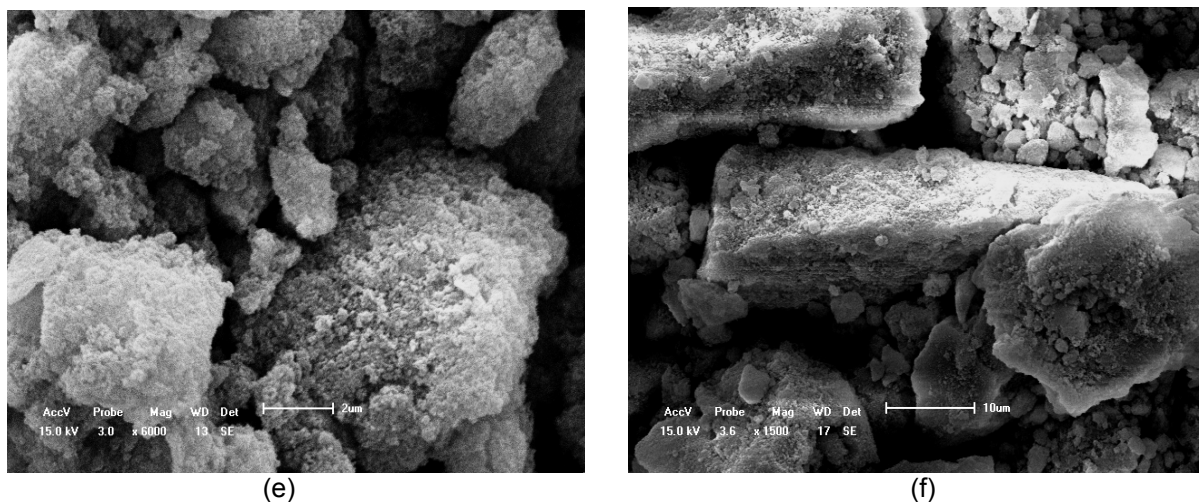


Figura 39- Microscopias dos pós das apatitas sintetizadas (a) Amostra Controle com 1 dia de envelhecimento (b) Amostra Controle com 21 dias de envelhecimento (c) GEL1 com um dia de envelhecimento (d) GEL1 com 21 dias de envelhecimento (e) GEL2 com 1 dia de envelhecimento (f) GEL2 com 21 dias de envelhecimento.

A morfologia do cristal sofre alterações quando ocorre substituição do PO_4^{3-} e OH^- pelo grupo CO_3^{2-} . Os cristais que apresentam forma acicular passam a ter morfologia mais esférica com o aumento do teor de carbonato.^{29, 36}

Acredita-se que o tamanho do cristalito e a morfologia das partículas precipitadas são os fatores mais importantes que governam suas áreas de superfície. Esses fatores variam de acordo com o método de precipitação, temperatura e tempo.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo a produção e caracterização da HAP obtida por reação de precipitação junto à adição de gelatina comercial. A análise dos resultados obtidos permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

1- O método de precipitação por titulação, utilizando como reagentes soluções de Ca(OH)_2 e H_3PO_4 , mostrou-se eficiente para a produção de compósitos HAP/GEL. Verificou-se que a utilização de gelatina na forma de solução proporciona uma interação efetiva entre a molécula de gelatina e a fase mineral formada. O método de síntese empregado proporcionou a produção de carbonato apatitas com cristais de dimensões nanométricas e similares estruturalmente à apatita biológica.

2- A incorporação do íon carbonato provocou alterações nas características estruturais das apatitas nanoestruturadas que foram observadas pelas diferentes técnicas adotadas.

3- Análises dos difratogramas de DRX indicaram que o aumento do teor de carbonato provoca uma diminuição da cristalinidade e da estabilidade térmica dos materiais produzidos. O tratamento térmico a $1000^\circ\text{C}/1\text{h}$ acarretou a decomposição das amostras com alto teor de carbonato em três fases secundárias: HAP, CaCO_3 e CaO .

4- A utilização do Método de Rietveld nos refinamentos dos difratogramas indicou que a fase majoritária é de uma hidroxiapatita. O refinamento forneceu informações sobre tamanho do cristalito, indicando que são da ordem de nanômetros. Os cálculos para determinar a microdeformação dos cristais mostraram que as microdeformações são menores na direção em que o cristalito é maior, e que há uma anisotropia no tamanho dos cristais na direção [002].

5- Análises de TFIV mostraram que ocorre grande incorporação do íon CO_3^{2-} na estrutura das amostras sem adição de gelatina, e também nas amostras com a menor concentração de gelatina (GEL1), com formação ainda mais significativa na amostra com 21 dias de envelhecimento, sendo que o íon CO_3^{2-} é inserido no sítio B, substituindo o grupo PO_4^{3-} , formando uma carbonato apatita do tipo B. Entretanto, as amostras GEL2 mostraram maior uma interação entre os íons Ca^{2+} da HAP e os íons $\text{R}-\text{COO}^-$ da gelatina em solução, levando a formação de um complexo Ca/GEL, uma vez que as intensidades das absorções características dos grupos CO_3^{2-} são menos intensas.

6- Os resultados de MEV mostraram que os cristais das apatitas sintetizadas são nanoestruturados e que há formação de aglomerados.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- 1- Caracterização estrutural mais detalhada das apatitas nanoestruturadas através de técnicas como XPS e EXAFS.
- 2- Estudo da dissolução das apatitas nanoestruturadas em pó e em pastilhas densas utilizando meio aquoso e fluído corpóreo simulado (SBF).
- 3- Estudo da formação do compósito variando outros parâmetros de síntese, tais como concentração de gelatina, pH, tempo de envelhecimento, precursores de cálcio e fósforo.
- 4- Comportamento "*in vitro*" e "*in vivo*" das apatitas nanoestruturadas.
- 5- Verificar as propriedades mecânicas dos compósitos.

REFERÊNCIAS

- 1 CONSTANTINO, P. D.; FRIEDMAN, C. D.; JONES, K.; CHOW, L. C.; PELZER, H. J.; SISSON, G. A. Hydroxyapatite cement: I. Basic chemistry and histologic properties. ***Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery***, v. 117, p. 379 - 384, 1991.

- 2 MUNTING, E.; MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J. Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. ***Journal of Materials Science: Materials in Medicine***, v. 4, p. 337 - 344, 1993.

- 3 WILLIAMS, D. F. ***Definitions in Biomaterials, Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials***.v.4, Chester, England, New York: Elsevier, 1986. p. 66-71

- 4 SAÚDE. Programa Saúde do Idoso. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 14 de julho de 2007.

- 5 BIOMET. Advanced science for real living. Annual Report. Disponível em: <www.biomet.com/corporate/investors/annuals/2005.pdf>. Acesso em 17 de agosto de 2007.

- 6 KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R.; ALVES, O. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma área interdisciplinar. ***Química Nova***, v. 23, p. 518-522, 2000.

- 7 MOREIRA, A. P. D. ***Síntese e caracterização de carbonato apatitas nanoestruturadas***. 2006, 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

- 8 LEGEROS, R. Z., Biodegradation and Bioresorption of Calcium Phosphate Ceramics. ***Clinical Materials***, v. 14, p. 65-88, 1993.

- 9 DOROZHKIN, S. V.; EPPLE, M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphate. ***Chemical International Education***, v. 41, p. 3130-3146, 2002.

- 10 KRAJEWSKI, A. *et al.* Synthesis of Carbonated Hydroxyapatites: Efficiency of the Substitution and Critical Evaluation of Analytical Methods. ***Journal of Molecular Structure***, v. 744, p. 221-228, 2005.

- 11 RODRÍGUES-LORENZO, L. M.; VALLET-REGI, M. Controlled Crystallization of Calcium Phosphate Apatites. **Chemistry of Materials**, v. 12, p. 2460-2465, 2000.
- 12 PANG, Y. X.; BAO, X. Influence of Temperature, Ripening Time and Calcination on the Morphology and Crystallinity of Hydroxyapatite nanoparticles. **Journal of European Ceramic Society**, v. 23, p. 1697-1704, 2003.
- 13 BAKOS, D.; SOLDÁN, M.; HERNÁNDEZ-FUENTES, I. Hydroxyapatite-Collagen-Hyaluronic Acid Composite. **Biomaterials**, v. 20, p. 191-195, 1999.
- 14 HSU, F. Y.; CHUEH, S. C.; WANG, Y. J. Microspheres of Hydroxyapatite/Reconstituted Collagen as Supports for Osteoblast Cell Growth. **Biomaterials**, v. 20, p. 1931-1936, 1999.
- 15 DU, C.; CUI, F. Z.; ZANG, W.; FENG, Q. I.; ZHU, X. D; GROOT, K. Formation of Calcium Phosphate/Collagen Composites Through Mineralization of Collagen Matrix. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 50, p. 518-527, 2000.
- 16 SIVAKUMAR, M.; RAO, K. P. Preparation, Characterization and In Vitro Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Gelatin Composite Microspheres. **Biomaterials**, v. 23, p. 3175-3181, 2002.
- 17 SIKAVITSAS, V. I.; TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Biomaterials and Bone Mechanotransduction. **Biomaterials**, v. 22, p. 2581-2593, 2001.
- 18 DOROZHUKIN, S. V.; EPPLE, M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphate. **Chemical International Education**, v. 41, p. 3130-3146, 2002.
- 19 BOSKEY, A. L. Musculoskeletal Disorders and Orthopedic Conditions. **Journal of American Medical Association**, v. 285, p. 619-623, 2001.
- 20 GUIMARÃES, M. **Bioativos: Quando os Implantes Interagem com o Corpo**. Revista Minas faz Ciência, n. 3, junho a agosto, 2000. Disponível em: <<http://revista.fapemig.br/materia.php?id=121>>. Acesso em: 21 de outubro de 2007.
- 21 HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, p. 1014-1017, 2002.

22 SANTOS, L. A. dos,. **Biomateriais e Biocerâmicas**. Tema do mês de setembro, 2003. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Metalurgia, Minas e Materiais, Departamento de Materiais. Disponível em: http://sbquadril.org.br/temames_link.htm. Acesso em 28 de outubro de 2007.

23 SHIRTLIFF, V. J.; HENCH, L. L. Bioactive Materials for Tissue Engineering, Regeneration and Repair. **Journal of Materials Science**, v. 38, p. 4697-4707, 2003.

24 HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v. 19, p. 1419-1423, 1998.

25 RATNER, B. D.; HENCH, L. Perspectives on Biomaterials. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 4, p. 379-380, 1999.

26 LEVITT, S. R.; CRAYTON, P. H.; MONROE, E. A.; CONDRATE, R. A. Forming methods for apatites prosthesis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 3, p. 683-684, 2004.

27 MONROE, E. A.; VOTAVA, W.; BASS, D. B.; McMULLEN, J. New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. **Journal of Dental Research**, v. 50, p. 860-862, 1971.

28 NERY, E. B LYNCH, K.L.; HIRTHER, W.M.; MUELLER, K.H. Bioceramics implants in surgically produced infrabony defects. **Journal of Periodontology**, v.46, p. 328-339, 1975.

29 HENCH, L. L.; WILSON, J. An Introduction to Bioceramics. **World Scientific**, v.1, p. 139-180, 1993.

30 ELLIOTT, J. C. **Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates**. v. 18. Amsterdam: Elsevier, 1994. 404 p

31 NARASARAJU, T. S. B.; PHEBE, D. E. Review – Some Physico-Chemical Aspects of Hydroxylapatite. **Journal of Materials Science**, v. 31, p. 1-21, 1996.

32 GALOIS, L. et al. Comblement des pertes de substance osseuse par le phosphate tricalcique β en traumatologie. **Annales de Chirurgie**, v. 125, p. 972-981, 2000.

- 33 EL SHAFEI, G. M. S.; PHILIP, C. A.; MOUSSA, N. A. Fractal analysis of hydroxyapatite from nitrogen isotherms. ***Journal of Colloid and Interface Science***, v. 277, p. 410-416, 2004.

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

- 35 EL FEKI, H. *et al.* Sodium and Carbonate Distribution in Substituted Calcium Hydroxyapatite. ***Solid State Sciences***, v. 2, p. 577-586, 2000.

- 36 LEGEROS, R. Z. ***Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine***. Monographs in oral science. v. 15. Basel: Karger, 1991.

- 37 BOHNER, M. Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphate Cements. ***Journal of the Care of the Injury***, v. 31, p. 37-47, 2000.

- 38 ASTALA, R.; STOTT, M. J. First Principles Investigation of Mineral Component of Bone: CO_3^{2-} Substitution in Hydroxyapatite. ***Chemistry of Materials***, v. 17, p. 4125-4133, 2005.

- 39 DOWKER, S. E. P.; ELLIOTT, J. C. Infrared Study of Trapped Carbon Dioxide in Thermally Treated Apatites. ***Journal of Solid State Chemistry***, v. 47, p. 164-173, 1983.

- 40 SUETSUGU, Y. *et al.* 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.

- 41 IVANOVA, T. I. *et al.* Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition. ***Journal of Solid State Chemistry***, v. 160, p. 340-349, 2001.

- 42 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.

- 43 _____. 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.

- 44 WILSON, R. M. *et al.* Rietveld Structure Refinement of Precipitated Carbonate Apatite Using Neutron Diffraction Data. **Biomaterials**, v. 25, p. 2205-2213, 2004.
- 45 TADIC, D.; PETERS, F.; EPLLE, M. Continuous Synthesis of Amorphous Carbonated Apatites. **Biomaterials**, v. 23, p. 2553-2559, 2002.
- 46 SLÓSARCZYK, A.; PASZKIEWICZ, Z.; PALUSZKIEWICZ, C. FTIR and XRD Evaluation of Carbonated Hydroxyapatite Powders Synthesized by Wet Methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 744, p. 657-661, 2005.
- 47 LANDI, E. *et al.* Carbonated Hydroxyapatite as Bone Substitute. **Journal of European Ceramic Society**, v. 23, p. 2931-2937, 2003.
- 48 LANDI, E. *et al.* Influence of Synthesis and Sintering Parameters on the Characteristics of Carbonate Apatite. **Biomaterials**, v. 25, p. 1763-1770, 2004.
- 49 KRAJEWSKI, A. *et al.* Synthesis of Carbonated Hydroxyapatites: Efficiency of the Substitution and Critical Evaluation of Analytical Methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 744, p. 221-228, 2005.
- 50 SUCHANEK, W. L. *et al.* Mechanochemical-hydrothermal Synthesis of Carbonated Apatite Powders at Room Temperature. **Biomaterials**, v. 23, p. 699-710, 2002.
- 51 PORTER, A. *et al.* Effect of Carbonate Substitution on the Ultrastructural Characteristics of Hydroxyapatite Implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, p.899-907, 2005.
- 52 FRIESS, W. Collagen – Biomaterial for Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 113-136, 1998.
- 53 PARRY, D. A. The Molecular and Fibrillar Structure of Collagen and its Relationship to the Mechanical Properties of Connective Tissue. **Biophysical Chemistry**, v. 29, p. 195-209, 1988.
- 54 SENA, L. A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas**. 2004, 107f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

55 ZANABONI, G.; ROSSI, A.; ONANA, A. M. T.; TENNI, R. Stability and Networks of Hydrogen Bonds of the Collagen Triple Helical Structure: Influence of pH and Chaotropic Nature of Three Anions. **Matrix Biology**, v. 19, p. 511-520, 2000.

56 SIVAKUMAR, M.; RAO, K. P. "Preparation, Characterization and In Vitro Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Gelatin Composite Microspheres. **Biomaterials**, v. 23, p. 3175-3181, 2002.

57 KUKUROVA, E.; BAKOS, D.; KOLLER, J. Use of Membranes on the Basis of Collagen in Substitutional Medicine. **Bratisl Lek Listy**, v. 100, p. 560-566, 1999.

58 BADYLAK, S. F. The Extracellular Matrix as a Scaffold for Tissue Reconstruction. **Cell & Developmental Biology**, v. 13, p. 377-383, 2002.

59 FIBROGEN. Collagens and Gelatins. Disponível em <http://www.fibrogen.com/collagen/>. Acesso em 15 de agosto de 2007.

60 LEHNNINGER, A. L. Funções das proteínas. In _____. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1998. p.118-142.

61 BAKOS, D.; SOLDÁN, M.; HERNÁNDEZ-FUENTES, I. Hydroxyapatite-Collagen-Hyaluronic Acid Composite. **Biomaterials**, v. 20, p. 191-195, 1999.

62 HSU, F. Y.; CHUEH, S. C.; WANG, Y. J. Microspheres of Hydroxyapatite/Reconstituted Collagen as Supports for Osteoblast Cell Growth. **Biomaterials**, v. 20, p. 1931-1936, 1999.

63 DU, C.; *et al.* Formation of Calcium Phosphate/Collagen Composites Through Mineralization of Collagen Matrix. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 50, p. 518-527, 2000.

64 LAWSON, A. C.; CZERNUSZKA, J. T. Collagen-Calcium Phosphate Composites. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H. **Journal of Engineering in Medicine**, v. 212, p. 413-425, 1998.

65 KANNAN, S.; BALAMURUGAN, A.; RAJESWARI, S. Bio-Composites: A Review of Literature. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, v. 14, p. 30-36, 2001.

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. **Chemical Materials**, v. 11, p. 2694-2701, 1999.

68 KIKUCHI, M.; *et al.* The Biomimetic Synthesis and Biocompatibility of Self-Organized Hydroxyapatite/Collagen Composites. **Bioceramics**, v. 12, p. 393-396, 1999.

69 KIKUCHI, M.; ITOH, S.; ICHINOSE, S; SHINOMIYA K.; TANAKA, J. Selforganization Mechanism in a Bone-like Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Synthesized in Vitro and its Biological Reaction in Vivo. **Biomaterials**, v. 22, p. 1705-1711, 2001.

70 CHANG, M. C.; TANAKA, J. FT-IR Study for Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Cross-Linked by Glutaraldehyde. **Biomaterials**, v. 23, p. 4811-4818, 2002.

71 CHANG, M. C.; TANAKA, J. XPS Study for the Microstructure Development of Hydroxyapatite-Collagen Nanocomposites Cross-Linked Using Glutaraldehyde. **Biomaterials**, v. 23, p. 3879-3885, 2002.

72 ROVERI, N.; FALINI, G.; SIDOTI, M.C.; TAMPIERI, A.; LANDI, E.; SANDRI, M.; PARMA, B. Biologically Inspired Growth of Hydroxyapatite Nanocrystals Inside Self-Assembled Collagens Fibers. **Materials Science & Engineering**, v. 1065, p. 1-6, 2003.

73 BIGI, A.; BRACCI, B.; PANZAVOLTA, S. Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement. **Biomaterials**, v. 25, p. 2893–2899, 2004.

74 SHU, C.; *et al.* Synthesis and sintering of nanocrystalline hydroxyapatite powders by gelatin-based precipitation method. **Ceramics International**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2005.

75 TENG, S.; SHI, J.; PENG, B.; CHEN, L. The effect of alginate addition on the structure and morphology of hydroxyapatite/gelatin nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 66, p. 1532–1538, 2006.

76 JHS. JHS Laboratório Químico LTDA. Disponível em: <http://www.biominas.org.br/empresas/jhs.htm>. Acesso em 10 de agosto de 2007.

77 CAPES. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Disponível em: www.capes.gov.br/. Acesso em 11 de outubro de 2007.

78 LARSON, A.C.; VON DREELE, R. B. **General Structure Analysis System (GSAS)**. Los Alamos National Laboratory Report – LAUR, p. 86-748, 2000.

79 TOBY, B. H. *EXPGUI*, a graphical user interface for GSAS. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, p. 210-213, 2001.

80 STEPHENS, P. W. Phenomenological model of anisotropic peak broadening in powder diffraction. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, p. 281-289, 1999.

81 KLUG, H. P.; ALEXANDER, L. E. **X-ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials**. 2. ed. New York: John Wiley, 1974. 966 p.

82 THOMPSON, P.; COX, D. E.; HASTINGS, J. B. Rietveld refinement of Debye-Scherrer synchrotron x-ray data from Al_2O_3 . **Journal of Applied Crystallography**, v. 20, p.79-83, 1987.

83 HOWARD, C. J.; HILL, R. J.; SUFI, M. A. M. Quantitative phase analysis from neutron powder diffraction data using the Rietveld method. **Journal of Applied Crystallography**, v. 20, p. 467-474, 1987.

84 ANDRADE, A. V. C. **Análises estrutural, nanoestrutural, e quantitativa de fases em materiais cerâmicos de interesse tecnológico, utilizando difração de raios x pelo método do pó**. 2003, 177 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, 2003.

85 DE KEIJSER, T. H.; LANGFORD, J. I.; MITTEMEIJER, E. J.; VOGELS, B. P. Use of the Voigt function in a single-line method for the analysis of x-ray diffraction line broadening. **Journal of Applied Crystallography**, v. 15, p. 308-314, 1982.

86 _____.; T. H.; MITTEMEIJER, E. J., ROZENDAAL, H. C. F. The determination of crystallite-size and lattice-strain parameters in conjunction with the profile-refinement

method for the determination of crystal structures. ***Journal of Applied Crystallography***, v. 16, p. 309-316, 1983.

87 BALZAR, D.; LEDBETTER, H. Microstrains and domain sizes in Bi-Cu-O superconductors: an X-ray diffraction peak-broadening study. ***Journal of Materials. Science Letters***, v. 11, p. 1419-1420, 1992.

88 _____.; LEDBETTER, H. Voigt-function modeling in Fourier analysis of size- and strain-broadened X-ray diffraction peaks. ***Journal of Applied Crystallography.***, v. 26, p. 97-103, 1993.

89 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.

90 CHANG, M. C.; KO, C. C.; DOUGLAS, W. H. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. ***Biomaterials***, v. 24, p. 2853–2862, 2003.

91 MILLER, L. M. *et al.* In Situ Análisis 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 STOKES, A. R.; WILSON, A. J. C. The diffraction of x-rays by distorted crystal aggregates. ***Published for the Cambridge Philosophical Society***, v. 40, p. 197, 1944.

93 PAIVA-SANTOS, C. O.; GOUVEIA, H.; LAS, W. C.; VARELA, J. A. Gauss-Lorentz size-strain broadening and cell parameters analysis of Mn doped SnO_2 prepared by organic route. ***Materials Structure***, v. 6, p. 111-114, 1999

94 REY, C.; COLLINS. B.; GOEHL,T.; DICKSON, I. R.; GLIMCHER, M. J. The Carbonate Environment in Bone Mineral: A Resolutio-Enhanced Fourier transform Infrared Spectroscopy Study. ***Calcified Tissue International.***, v. 45, p. 157-164, 1989.

95 PANG, Y. X.; BAO, X. Influence of Temperature, Ripening Time and Calcination on the Morphology and Crystallinity of Hydroxyapatite nanoparticles. ***Journal of European Ceramic Society***, v. 23, p. 1697-1704, 2003.

96 JINGBING, L. J.; XIAOYUE Y.; HAO W.; MANKANG Z.; BO W.; HUI Y. The Influence of pH and Temperature on the Morphology of Hydroxyapatite Synthesized by Hydrothermal Method. ***Ceramics International***, v. 29, p. 629-633, 2003.

97 SANTOS, M. L.; FLORENTINO, A. O.; SAEKI, M. J.; APARECIDA, A. H.; FOOK. L. M. V.; GUASTALDI, A. C. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. ***Eclética Química***, v. 30, p. 29-35, 2005

98 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.