



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCIANA NATÁLIA CIVIDATTI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO FOSFATO  
DE CÁLCIO-COLÁGENO E ESTUDO DE SUA REABSORÇÃO  
PARA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**

---

Londrina  
2014

LUCIANA NATÁLIA CIVIDATTI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO FOSFATO  
DE CÁLCIO-COLÁGENO E ESTUDO DE SUA REABSORÇÃO  
PARA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Química – Curso de Doutorado em Química –  
Associação Ampla (UEL/UEPG/UNICENTRO),  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Dall’Antonia  
Co-Orientadora: Prof. Dra. Adriana Fernandes da  
Silva

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C582s Cividatti, Luciana Natália.

Síntese e caracterização do compósito fosfato de cálcio-colágeno e estudo de sua reabsorção para aplicação como biomaterial / Luciana Natália Cividatti. – Londrina, 2014.  
72 f. : il.

Orientador: Luiz Henrique Dall'Antonia.

Coorientador: Adriana Fernandes da Silva.

Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Físico-química – Teses. 2. Materiais biomédicos – Teses. 3. Solução (Química) – Teses. 4. Química – Síntese – Teses. 5. Fosfato de cálcio – Teses. 6. Hidroxiapatita – Teses. I. Dall'Antonia, Luiz Henrique. II. Silva, Adriana Fernandes da. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Universidade Estadual de Ponta Grossa. V. Universidade Estadual do Centro-Oeste. VI. Título.

CDU 541.1

LUCIANA NATÁLIA CIVIDATTI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO FOSFATO DE  
CÁLCIO-COLÁGENO E ESTUDO DE SUA REABSORÇÃO PARA  
APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Química – Curso de Doutorado em Química –  
Associação Ampla (UEL/UEPG/UNICENTRO),  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Dall’Antonia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Marcos Malta dos Santos  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

---

Prof. Dr. Pablo A. Fiorito  
Universidade Federal do ABC –UFABC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Christiana Andrade Pessoa  
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariana Gava Segatelli  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 11 de abril de 2014.

*“Se amanhã o que eu sonhei não for bem aquilo, eu tiro um arco-íris da cartola. E refaço. Colo. Pinto e bordo. Porque a força de dentro é maior. Maior que todo mal que existe no mundo. Maior que todos os ventos contrários. É maior porque é do bem. E nisso, sim, acredito até o fim”*

*Caio Fernando Abreu*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e a Sua Mãe, Maria, por me darem força nos momentos difíceis e a certeza de que tudo terminaria bem.

Aos meus admiráveis pais, Zurael e Alzira, e irmãos, Luiz Paulo e João Marcos, pela confiança que depositaram em mim, pelo incentivo e pelo apoio em todas as situações. Também ao Rafael, companheiro e incentivador de todas as horas, em especial nas mais difíceis. Sem a presença de vocês, talvez eu não atingisse meus objetivos.

Ao meu professor e orientador Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia pela confiança em mim depositada, pelo apoio, pelos conhecimentos a mim transferidos e pela contribuição na elaboração do presente trabalho.

À minha professora e co-orientadora Dra. Adriana Fernandes da Silva por acreditar em mim e no meu trabalho e por me auxiliar sempre que precisei, estando longe ou perto.

A todos os meus amigos, especialmente aos que acompanharam de perto os bons e maus momentos, simplesmente por existirem e me presentarem com o dom da amizade sincera e gratuita.

Aos companheiros de pesquisa pelos ensinamentos, auxílios, companheirismo, cuidado e dedicação em todos os momentos, e especialmente pela amizade a mim dedicada estando perto ou longe e a toda equipe do LEMA (Laboratório de Eletroquímica e Materiais) pelo apoio, amizade, por toda convivência e companheirismo.

Ào CNPq RHAE, pela concessão da bolsa de estudos.

À Angelus Indústria de Produtos Odontológicos e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Campus Londrina, pelo apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos laboratórios de Microscopia Eletrônica; Microanálise e de Difração de Raios X e Laboratório de Espectroscopia da UEL onde foram realizadas as análises de caracterização.

CIVIDATTI, L. N. **Síntese e caracterização do compósito fosfato de cálcio-Colágeno e estudo de sua reabsorção para aplicação como biomaterial.** 2014. 72 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina-PR.

## RESUMO

Atualmente, a obtenção de novos materiais para substituição de partes do corpo humano tem despertado grande interesse científico na busca de biomateriais que se assimilem ao funcionamento e às propriedades fisiológicas naturais. No que se refere às reparações ósseas, a hidroxiapatita (HAp) tem grande destaque por possuir propriedades físicas e químicas muito semelhantes ao mineral que constitui os ossos e dentes humanos. Este trabalho tem por objetivo propor a síntese do compósito fosfato de cálcio-colágeno visando obter um material semelhante à estrutura óssea natural onde o colágeno tem função de orientação estrutural da neoformação óssea. Foram sintetizados diferentes tipos de fosfatos de cálcio a partir de diferentes rotas sintéticas (em chapa aquecedora, em sistema hidrotermal e sistema hidrotermal assistido por micro-ondas), os quais foram caracterizados como sendo HAp, fosfato octacálcico (OCP) e mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD) a partir das análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia por infravermelho (FTIR) e difração de raio-X (DRX). Os espectros de FTIR mostraram que todas as amostras apresentaram bandas de absorção no infravermelho relativas à presença de grupos fosfato. Por DRX constatou-se que a HAp foi obtida em todas as rotas sintéticas avaliadas. O OCP e o DCPD foram obtidos a partir dos mesmos precursores, com a diferença de que o OCP foi sintetizado a 80°C e o DCPD em temperatura ambiente. As micrografias mostraram que a HAp apresentou morfologia globular. Entretanto, o DCPD e OCP apresentaram morfologia laminar, diferenciando-se no tamanho e espessura. Os tamanhos de cristalitos, estimados, para a HAp, o DCPD e o OCP foram de 78, 58 e 29 nm, respectivamente, a partir dos planos de difração 002, 020 e 002, e determinados de acordo com a equação de Scherrer. Os diferentes fosfatos foram utilizados na preparação de compósitos com colágeno hidrolisado. As caracterizações físico-químicas dos compósitos mostraram poucas modificações nos fosfatos, no que se refere à morfologia e organização estrutural dos materiais. Quanto à citotoxicidade dos materiais, conclui-se que todos os materiais não são citotóxicos. Considerando a solubilidade, obteve-se que a HAp é o fosfato de cálcio mais solúvel entre os fosfatos testados e que a adição de colágeno no processo de formação do compósito aumenta a solubilidade dos fosfatos. A análise térmica evidenciou que, os compósitos perdem maior quantidade de massa que os fosfatos puros, uma vez que o colágeno possui baixa estabilidade térmica. As curvas de DSC para o colágeno puro e os compósitos avaliados indicaram que a presença de OCP e DCPD no compósito aumenta a estabilidade do colágeno.

**Palavras-chaves:** Fosfatos de cálcio; Viabilidade celular; Solubilidade em meio fisiológico.

CIVIDATTI, L. N. **Synthesis and characterization of calcium phosphate-Collagen composite and study of resorption for application as a biomaterial.** 2014. 72 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina-PR.

### ABSTRACT

Nowadays, obtaining new materials for human body parts replacement has stimulated great scientific interest in the search of biomaterials that resemble the behavior and natural physiological properties. Regarding bone repair hydroxyapatite (HAp) stands out due to by having physical and chemical properties very similar to the mineral which forms the human bones and teeth. This study aims to propose the synthesis of calcium phosphate-collagen composite in order to obtain a material similar to natural bone structure where collagen function is structural orientation of bone neoformation. Different types of calcium phosphates were obtained from different synthetic routes (in heating plate, in hydrothermal system and hydrothermal microwave system), which were characterized as HAp, octacalcium phosphate (OCP) and dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) from the analysis by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FTIR). FTIR spectra showed that all samples had infrared absorption bands related to the presence of phosphate groups. XRD analysis demonstrated that the HAp was obtained in all synthetic routes evaluated. The DCPD and OCP were obtained from the same precursors, with the difference that the OCP was synthesized at 80°C and the DCPD at room temperature. The micrographs revealed that the HAp had globular morphology. However, DCPD and OCP had laminar morphology, differing in size and thickness. The crystallite size estimated for HAp, DCPD and OCP were 78, 58 and 29 nm respectively from the diffraction planes 002, 020 and 002 by the Scherrer equation. The various phosphates were used in the composite preparation with hydrolyzed collagen. The physico-chemical characterization of composites showed little changes in the phosphates, with respect to structural organization and morphology of the materials. In relation of the materials cytotoxicity, it is concluded that all materials are not cytotoxic. Concerning solubility, it was found that the HAp is the more soluble calcium phosphate of the phosphates tested here and that the addition of collagen in the process of composite forming increases the solubility of the phosphates. Thermal analysis evidenced that the composite mass loss is larger than pure phosphates, since the collagen has low thermal stability. DSC curves for pure collagen and evaluated composites indicated that the presence of DCPD and OCP in the composite increases the collagen's stability.

**Keywords:** Calcium phosphates; Cell viability; Solubility in physiological environment.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura cristalina da hidroxiapatita. Projeção a partir do plano (001) (IVANOVA et al., 2001).....	4
<b>Figura 2.</b> Representação, segundo a direção do eixo b, de uma das camadas distorcidas, compostas por unidades de $\text{CaHPO}_4$ características da estrutura cristalina apresentada pelo DCPD. Existem quatro cadeias do tipo $\text{CaPO}_4\text{CaPO}_4\text{CaPO}_4\text{CaPO}_4$ , orientadas na direção assinalada pela setas, e estão também representadas (a tracejado) as ligações entre as unidades de $\text{CaHPO}_4$ . As camadas são todas paralelas ao plano (100) e estão ligadas entre si por moléculas de água. Para simplificar a interpretação deste tipo de estrutura não estão representadas as moléculas de água nem os hidrogênios dos grupos fosfato (ELLIOTT, 1994). .....	5
<b>Figura 3.</b> Projeção para o plano (001) da estrutura do OCP mostrando a sua relação com a estrutura de apatita. O eixo c está fora do plano do diagrama para o OCP. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Os átomos de oxigênio das moléculas de água foram sombreados, de modo que a camada de água, em paralelo com os eixos b e c, passa por $x \approx 0,5$ da célula unitária de OCP (inferior esquerdo da célula), pode ser facilmente vista. As camadas de apatita, também em paralelo com os eixos b e c, estão em $x \approx 0$ e $1,0$ . A célula unitária correspondente à OHAp hexagonal foi demarcada para a camada de apatita em $x \approx 0$ no canto superior direito (ELLIOTT, 1994).....	6
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do colágeno do tipo I. Sequência primária de aminoácidos (cadeia peptídica).....	9
<b>Figura 5.</b> Difrátogramas de raio X para a HAp sintetizada em temperatura ambiente (—), a $80^\circ\text{C}$ em chapa aquecedora (—) e sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) e a $120^\circ\text{C}$ em chapa aquecedora (—), em sistema hidrotermal (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—). .....	26
<b>Figura 6.</b> Difrátogramas de raio X para o DCPD sintetizado em temperatura ambiente (—) e para o OCP sintetizado a $80^\circ\text{C}$ em chapa aquecedora (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) e $120^\circ\text{C}$ em chapa aquecedora (—), em sistema hidrotermal (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—).....	29
<b>Figura 7.</b> Espectros de IV para a HAp sintetizada em temperatura ambiente (—) a $80^\circ\text{C}$ em chapa aquecedora (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) e a $120^\circ\text{C}$ em chapa aquecedora (—), em sistema hidrotermal (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—). .....	31

<b>Figura 8.</b> Espectros de IV para o DCPD sintetizado em temperatura ambiente (—) e para o OCP sintetizado a 80°C em chapa aquecedora (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) e a 120°C em chapa aquecedora (—), em sistema hidrotermal (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—).....	32
<b>Figura 9.</b> Imagens de MEV para a HAp obtida a (a) temperatura ambiente, em chapa aquecedora a (b) 120° e (c) 80°C, (d) 120°C em sistema hidrotermal e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas a (e) 120°C e (f) 80°C.....	34
<b>Figura 10.</b> Imagens de MEV para o (a) DCPD, para as misturas de fases obtidas a 120°C (b) em chapa aquecedora, (c) em sistema hidrotermal e (d) em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas e para o OCP obtido a 80°C em (e) chapa aquecedora e (f) sistema hidrotermal assistido por micro-ondas. ....	35
<b>Figura 11.</b> Espectros de IV para a HAp sintetizada em temperatura ambiente (—) , a 80°C em chapa aquecedora (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) e a 120°C em chapa aquecedora (—), em sistema hidrotermal (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) após o teste de adsorção de piridina.....	36
<b>Figura 12.</b> Espectros de IV para o DCPD sintetizado em temperatura ambiente (—) e para o OCP sintetizado a 80°C em chapa aquecedora (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) após o teste de adsorção de piridina.....	37
<b>Figura 13.</b> Difratomogramas para a HAp (—), para o compósito HAp-Colágeno (—) e para o colágeno (—). ....	38
<b>Figura 14.</b> Difratomogramas para o DCPD (—), para o compósito DCPD-Colágeno (—) e para o colágeno (—). ....	39
<b>Figura 15.</b> Difratomogramas para o OCP (—), para o compósito OCP-Colágeno (—) e para o colágeno (—). ....	39
<b>Figura 16.</b> Espectros de IV para a HAp (—), para o compósito HAp-Colágeno (—) e para o colágeno (—). ....	40
<b>Figura 17.</b> Espectros de IV para o DCPD (—), para o compósito DCPD-Colágeno (—) e para o colágeno (—). ....	40
<b>Figura 18.</b> Espectros de IV para o OCP (—), para o compósito OCP-Colágeno (—) e para o colágeno (—). ....	40
<b>Figura 19.</b> Imagem de MEV para os compósitos de (a) HAp-Col, (b) DCPD-Col e (c) OCP-Col e (d) colágeno.....	42
<b>Figura 20.</b> Curva de calibração para a determinação de fósforo. ....	43
<b>Figura 21.</b> Curva de calibração para a determinação de cálcio. ....	44

<b>Figura 22.</b> Curvas de TG/DTG obtidas para o colágeno.....	46
<b>Figura 23.</b> Curva de DSC obtida para o colágeno.....	46
<b>Figura 24.</b> Curvas de TG/DTG obtidas para a (a) HAp, para a (b) mistura HAp-Colágeno e (c) e curvas de DSC para os mesmos. ....	47
<b>Figura 25.</b> Curvas de TG/DTG obtidas para o (a) OCP, para a (b) mistura OCP-Colágeno e (c) e curvas de DSC para os mesmos. ....	50
<b>Figura 26.</b> Curvas de TG/DTG obtidas para o (a) DCPD, para a (b) mistura DCPD-Colágeno e (c) e curvas de DSC para os mesmos.....	51
<b>Figura 27.</b> Curvas de DSC obtida para o colágeno puro e na forma de mistura com HAp, OCP e DCPD.....	52
<b>Figura 28.</b> Média de sobrevida celular com adição de diferentes materiais: (a) HAp, (b) OCP e (c) DCPD. ....	54
<b>Figura 29.</b> Curvas de dissolução do cálcio em FFS em função do tempo para (a) a HAp e sua mistura com colágeno, (b) OCP e sua mistura com colágeno e (c) DCPD e sua mistura com colágeno.....	55
<b>Figura 30.</b> Curvas de dissolução do cálcio em função do tempo para (a) HAp, OCP e DCPD e (b) suas respectivas misturas com colágeno. ....	57
<b>Figura 31.</b> Gráfico da concentração em função do tempo (ordem zero). ....	71
<b>Figura 32.</b> Gráfico do logaritmo neperiano da concentração em função do tempo (1ª ordem). ....	72
<b>Figura 33.</b> Gráfico do inverso da concentração em função do tempo (2ª ordem). ....	72

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Proporções utilizadas na síntese dos compósitos.....	20
<b>Tabela 2.</b> Composição do fluido corporal simulado (FFS) .....	25
<b>Tabela 3.</b> Tamanhos médios dos cristalitos, calculados a partir da equação de Scherrer, com base no plano 002 dos difratogramas das amostras de HAp. ....	28
<b>Tabela 4.</b> Tamanhos médios dos cristalitos, calculados a partir da equação de Scherrer, com base no plano 002 para as amostras sintetizadas à 80 e 120°C e 020 para a amostra sintetizada em temperatura ambiente.....	30
<b>Tabela 5.</b> Razão molar Ca/P para a HAp, o DCPD e o OCP.....	44
<b>Tabela 6.</b> Temperatura de desnaturação do colágeno puro e suas misturas com HAp, OCP e DCPD. ....	52
<b>Tabela 7.</b> Constante de velocidade para a dissolução do cálcio em FFS a partir dos diferentes fosfatos de cálcio e suas respectivas misturas. ....	57

## SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ACP – Fosfato de cálcio amorfo  
Ca/P – Cálcio/Fósforo  
Col – Colágeno  
CN – Controle negativo  
DCPA – Mono-hidrogênio fosfato de cálcio anidro  
DCPD – Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado  
DCPD-Col – Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado com colágeno  
DMEM – Meio mínimo essencial Eagle  
DMSO – Dimetil sulfóxido  
DRX – Difração de raios X  
DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial  
DTG – Derivada da curva de análise termogravimétrica  
ED – Eletrodeposição  
FFS – Fluido fisiológico simulado  
FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier  
GA – Glutaraldeído  
H – Sistema hidrotermal  
HAp – Hidroxiapatita  
HAp-Col – Hidroxiapatita com colágeno  
HM – Sistema hidrotermal assistido por micro-ondas  
ICSD – Inorganic Crystal Structure Database  
ICTAC – Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria  
IV – Infravermelho  
MEV – Microscopia eletrônica de varredura  
MTT - 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2-5-difenil-2H-tetrazolato de bromo  
OCP – Fosfato octacálcico  
OCP-Col – Fosfato octacálcico com colágeno  
 $T_d$  – Temperatura de desnaturação  
TGA – Análise termogravimétrica  
 $\tau$  – Tamanho médio dos cristalitos

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1.1. TECIDO ÓSSEO.....	1
1.2. BIOMATERIAIS .....	2
1.3. HIDROXIAPATITA (HAp) E OUTROS FOSFATOS DE CÁLCIO .....	4
1.4. O COLÁGENO .....	8
1.5. SÍNTESE E APLICAÇÃO DE BIOMATERIAIS.....	9
1.6. OBJETIVO GERAL.....	12
1.6.1. Objetivos Específicos .....	12
2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	14
2.1. SÍNTESE DOS FOSFATOS DE CÁLCIO .....	14
2.1.1. Síntese da hidroxiapatita.....	14
2.1.2. Síntese do fosfato octacálcico e do mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado .....	14
2.2. PROCESSOS DE SÍNTESE .....	15
2.2.1. Síntese em temperatura ambiente.....	16
2.2.2. Síntese em chapa aquecedora .....	16
2.2.3. Síntese pelo método hidrotermal (H).....	17
2.2.4. Síntese pelo método hidrotermal micro-ondas (HM) .....	17
2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FOSFATOS PUROS .....	18
2.3.1. Difração de Raios X (DRX) .....	18
2.3.2. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	18
2.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	18
2.4. TESTE DE ADSORÇÃO DE PIRIDINA .....	18
2.5. SÍNTESE DOS COMPÓSITOS FOSFATO DE CÁLCIO-ColÁGENO.....	19
2.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPÓSITOS .....	20
2.6.1. Difração de Raios X (DRX) .....	20
2.6.2. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) .....	20
2.6.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	20
2.7. DETERMINAÇÃO DA RAZÃO MOLAR CÁLCIO/FÓSFORO (Ca/P).....	21
2.7.1. Determinação de fósforo .....	21
2.7.2. Determinação de cálcio .....	22
2.8. ESTUDO DA ESTABILIDADE TÉRMICA.....	22

2.8.1. Análise termogravimétrica (TGA).....	23
2.8.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	23
2.9. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO DO MTT.....	23
2.10. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE SOLUBILIZAÇÃO EM FLUIDO FISIOLÓGICO SIMULADO.....	24
3. DISCUSSÃO E RESULTADOS.....	26
3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FOSFATOS PUROS.....	26
3.1.1. Difração de Raios X (DRX).....	26
3.1.2. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	31
3.1.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	33
3.2. TESTE DE ADSORÇÃO DE PIRIDINA.....	35
3.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPÓSITOS.....	38
3.3.1. Difração de Raios X (DRX).....	38
3.3.2. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	39
3.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	41
3.4. DETERMINAÇÃO DA RAZÃO MOLAR CÁLCIO/FÓSFORO (Ca/P).....	43
3.4.1. Cálculo da razão molar cálcio/fósforo (Ca/P).....	43
3.5. ESTUDO DA ESTABILIDADE TÉRMICA.....	45
3.6. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO DO MTT.....	53
3.7. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE SOLUBILIZAÇÃO EM FLUIDO FISIOLÓGICO SIMULADO.....	55
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
5. CONCLUSÃO.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXO 1.....	71
DETERMINAÇÃO DA ORDEM DA REAÇÃO DE SOLUBILIZAÇÃO A PARTIR DO MÉTODO GRÁFICO.....	71

## **INTRODUÇÃO**

Com a evolução do mundo e conseqüente evolução das espécies, cada vez mais a natureza tem se especializado em produzir materiais muito específicos, o que torna a produção de materiais sintéticos similares a estes uma tarefa muito árdua e difícil de ser alcançada. Na natureza estes materiais desempenham desde funções mais simples até funções muito específicas, possuindo muitas vezes capacidade de adaptação às perturbações externas, como é o caso do tecido ósseo (MARTINS e GOISSES, 1996).

Quando a estrutura óssea é perdida, independente da razão, os defeitos são, em geral, preenchidos com osso natural. No entanto este tipo de procedimento não suprime a possibilidade de infecções, por se tratar de um processo lento. Sendo assim, estudos recentes têm sido direcionados para o desenvolvimento de um material artificial que tenha propriedades semelhantes às do tecido ósseo natural e que possa ser utilizado em substituições ósseas (BEZZI, et al., 2003). A aplicação de materiais cerâmicos de fosfatos de cálcio como substitutos ósseos tem recebido considerável atenção visto que estes são conhecidos por sua alta biocompatibilidade com organismos vivos quando usados em reposições de tecidos duros, além de possuírem propriedades bioativas (MANJUBALA e SIVAKUMAR, 2001).

Há algum tempo um grande número de pesquisadores tem trabalhado com materiais que possam ser utilizados em enxertos ósseos, mas até agora não se encontrou um substituto ideal, pois não foi ainda descoberto um material que seja mecânica e biologicamente tão bom quanto o osso humano (BOHNER et al., 2012).

### **1.1. TECIDO ÓSSEO**

O osso, ou tecido ósseo, contém grande quantidade de matriz circundando as células. Essa matriz consiste de um componente inorgânico (sais minerais), que torna o osso rígido, e um componente orgânico (principalmente fibra de colágeno), que dá resistência ao osso. Os osteoclastos (clastos = romper), um dos quatro tipos de célula presentes no tecido ósseo, estão presentes na superfície do osso e agem na reabsorção óssea (destruição da matriz), que é importante no desenvolvimento, no crescimento, na manutenção e no reparo do osso (TORTORA, 2000). A matriz óssea contém ainda sais minerais abundantes, principalmente fosfato de cálcio e carbonato de cálcio. À medida que esses sais são depositados pelos

osteoblastos (células que formam o osso) em torno das fibras de colágeno da matriz, o tecido se torna rígido. Esse processo é denominado calcificação (TORTORA, 2000).

A partir do nível macroscópico estrutural, os ossos podem ser de diversas formas dependendo de sua respectiva função. Os ossos longos, como o fêmur e a tíbia, são encontrados em extremidades do corpo e proporcionam estabilidade à inclinação e torção, sendo conhecidos como ossos corticais. Em outros casos, por exemplo a vértebra ou a cabeça do fêmur, a carga aplicada é principalmente compressiva. Em tais casos, o revestimento ósseo pode ser de característica “esponjosa”, chamado trabecular (FRATZL e WEINKAMER, 2007).

O processo pelo qual o osso se forma é denominado ossificação. Esse processo inicia-se em torno da sexta ou sétima semana de vida embrionária e continua ao longo da vida adulta. No entanto, em algumas situações faz-se necessário o uso de enxertos ósseos. O mecanismo exato de incorporação do enxerto ósseo não é completamente compreendido, embora vários mecanismos distintos da formação óssea sejam conhecidos. Provavelmente, o mais importante é o fornecimento de estruturas que permitam a deposição de células ósseas e integração posterior com o osso circundante. Materiais que possuam tal característica são classificados como osteocondutivos. Outra propriedade do osso enxertado é que a matriz extracelular contém fatores que podem induzir as células circundantes (que não ósseas) a diferenciarem-se em osteoblastos. Esta capacidade é chamada osteoindução. Finalmente, embora a grande maioria das células osteogênicas não sobreviva após o procedimento de enxerto, algumas podem contribuir para a formação óssea quando o enxerto é suficientemente vascularizado, sendo este processo chamado de osteogênese (GAALLEN et al., 2008).

## **1.2. BIOMATERIAIS**

A ciência dos biomateriais é considerada como um dos modelos mais característicos dos campos de investigação e desenvolvimento totalmente interdisciplinar, cujo maior crescimento se deu, predominantemente, durante as últimas décadas. Nesse sentido, a área de biomateriais ocupa uma posição importante e conectiva entre a medicina, a biologia, a física, a química e a engenharia, de tal forma que, desde um ponto de vista acadêmico, se consideram interconectadas a biotecnologia e a bioengenharia, uma vez que os biomateriais são utilizados para reparar, restaurar ou substituir tecidos ou órgãos humanos que sofreram danos irreversíveis (SABINO et al., 2003).

Materiais que sejam utilizados em procedimentos de regeneração da estrutura óssea são categorizados como biomateriais. Tais materiais, assim classificados, devem apresentar uma série de propriedades físicas, químicas e biológicas que possibilitem a performance desejada e, em alguns casos, ainda incitar o desempenho dos tecidos vivos (KAWACHI et al., 2000), podendo ser classificados como bioinertes ou bioativos de acordo com sua atuação no organismo vivo. Em geral, a resposta induzida pelos materiais bioinertes é o seu revestimento por uma camada de tecido fibroso, evitando a interação direta com o tecido vivo. Os bioativos, por sua vez, são capazes de interagir diretamente com o tecido vivo, sem interferência do tecido fibroso (DUBOK, 2000).

Visto que o grande objetivo da utilização de biomateriais nos últimos tempos tem sido melhorar as condições de saúde humana através da restauração das funções naturais de tecidos vivos e órgãos, torna-se de extrema importância o conhecimento das propriedades, funções e estruturas tanto do órgão/tecido que receberá a restauração, quanto do material a ser utilizado no procedimento e a interação entre ambos. O material a ser utilizado deverá ser qualificado de acordo com a resposta induzida ao meio biológico, devendo apresentar algumas características específicas, tais como: ser biocompatível (capaz de interagir intimamente com o tecido vivo sem a intervenção de tecido fibroso), farmacologicamente plausível (não tóxico, não alergênico, não mutagênico, etc), quimicamente inerte e estável e possuir adequada força mecânica (de acordo com as necessidades da reparação a ser realizada), além de ser relativamente acessível, de fácil reprodutibilidade e fabricação (PARK e LAKES, 2007).

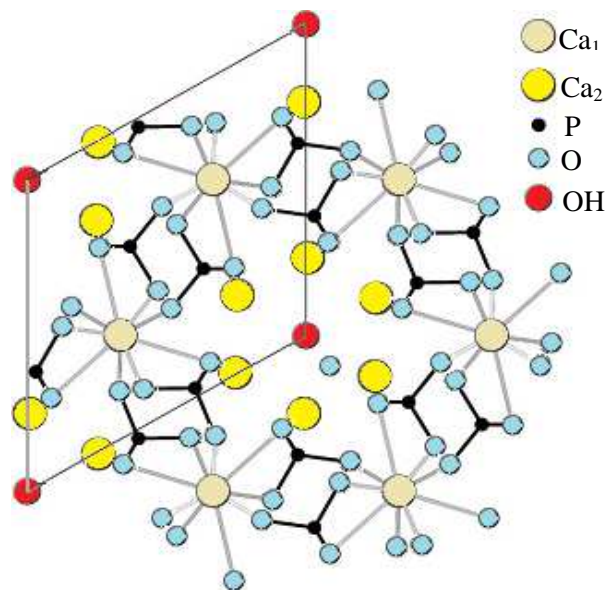
Os fosfatos de cálcio têm recebido uma posição de destaque dentre as denominadas biocerâmicas, pois apresentam ausência de toxicidade e uma possível capacidade de interagir com o tecido receptor, características estas que podem ser explicadas pela natureza química desses materiais, formados essencialmente por íons cálcio e fósforo, conhecidos por participarem funcionalmente do equilíbrio iônico que acontece entre o material implantado e o sistema biológico (KAWACHI et al., 2000).

As biocerâmicas atualmente utilizadas na reconstrução ou substituição de matrizes ósseas e/ou dentárias possuem grande aceitação, em especial no que se refere ao uso de fosfatos de cálcio, visto que apresentam alta biocompatibilidade, provavelmente devido a sua similaridade com as matrizes encontradas em tecidos ósseos e dentários. Por outro lado, a maioria dos biomateriais utilizados atualmente nestes processos serve apenas como suporte

para o crescimento ósseo, que embora seja efetivo, é um processo muito lento (EICHERT et al., 2007).

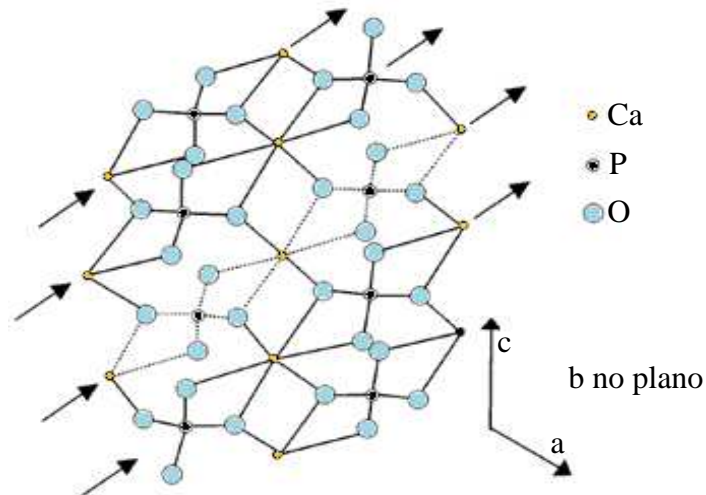
### 1.3. HIDROXIAPATITA (HAp) E OUTROS FOSFATOS DE CÁLCIO

A HAp, por ser o maior constituinte inorgânico dos tecidos mineralizados em vertebrados, é o fosfato de cálcio mais utilizado como biomaterial, seja como recobrimento ou material denso (EICHERT et al., 2007), sendo uma característica importante sua bioatividade e sua desenvoltura para formar ligações químicas com os tecidos duros vizinhos após sua inserção no organismo vivo (JARCHO, 1981). Contudo, além da HAp, outros fosfatos de cálcio também incidem em calcificações naturais ou não, o tem gerado um grande interesse no emprego destes outros fosfatos como biomateriais (KAWACHI et al., 2000), visto que apresentam características compatíveis para serem empregados para reposição e regeneração de tecido ósseo e dentina. A HAp (Figura 1) pode ser descrita como uma rede tridimensional de tetraedros de fosfato ( $\text{PO}_4$ ), que estão ligados entre si por colunas de átomos de cálcio ( $\text{Ca}_1$ ). As colunas que passam pela rede, por sua vez, têm os eixos coincidentes com os eixos das hélices formadas pelos átomos de cálcio ( $\text{Ca}_2$ ) e hidroxilas (OH) (IVANOVA et al., 2001).



**Figura 1.** Estrutura cristalina da hidroxiapatita. Projeção a partir do plano (001) (IVANOVA et al., 2001).

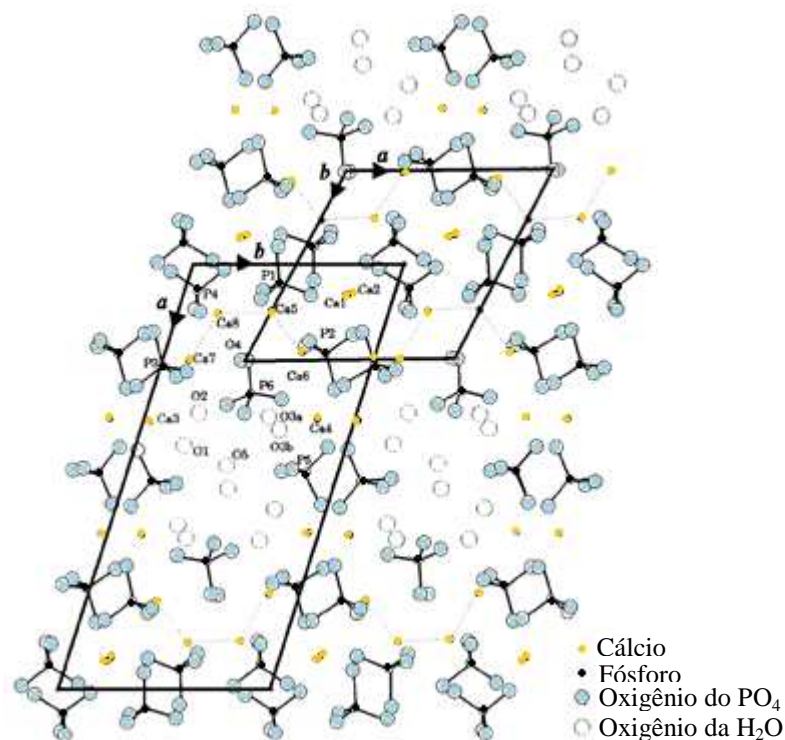
A HAp é amplamente considerada como a fase mineral dos ossos naturais, no entanto, a precipitação de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  não pode ser absolutamente relacionada com a formação de HAp, seja *in vitro* ou *in vivo* (CRANE et al., 2006). ZHANG e seus colaboradores (2014) demonstraram, inclusive, a ocorrência de mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD) e fosfato octacálcico (OCP) como precursores, juntamente com a HAp, durante o processo de mineralização *in vitro* de osteoblastos.



**Figura 2.** Representação, segundo a direção do eixo b, de uma das camadas distorcidas, compostas por unidades de  $\text{CaHPO}_4$  características da estrutura cristalina apresentada pelo DCPD. Existem quatro cadeias do tipo  $\text{CaPO}_4$ , orientadas na direção assinalada pelas setas, e estão também representadas (a tracejado) as ligações entre as unidades de  $\text{CaHPO}_4$ . As camadas são todas paralelas ao plano (100) e estão ligadas entre si por moléculas de água. Para simplificar a interpretação deste tipo de estrutura não estão representadas as moléculas de água nem os hidrogênios dos grupos fosfato (ELLIOTT, 1994).

A formação de DCPD (Figura 2), diferentemente da HAp, é raramente observada sob condições fisiológicas (ZHANG et al., 2014). Estudos realizados por ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido em amostras ósseas indicaram a presença de íons  $\text{HPO}_4^{2-}$ , o qual exibiu deslocamento químico similar ao do OCP, porém com características anisotrópicas semelhantes ao DCPD (WU et al., 1994). Embora o DCPD seja, geralmente, considerado estável apenas em condições ácidas de pH, é possível detectar-se DCPD em pH  $\sim 7,4$  (ZHANG et al., 2014). Os estudos levam a crer que uma razão molar Ca/P elevada é o fator-chave para a formação de DCPD, pois a precipitação desse material é termodinamicamente impossível em fluido corpóreo simulado a menos que as concentrações de íons cálcio e fosfato sejam aumentadas (ZHANG et al., 2014; LU e LENG, 2005).

O OCP (Figura 3) também tem sido proposto como precursor na formação da apatita biológica. O envolvimento do OCP na formação inicial da estrutura óssea foi demonstrado, inclusive, através de análises espectroscópicas (CRANE et al., 2006). Estudos recentes mostraram que o OCP está presente como fase efêmera durante a formação de apatita biológica em dentina humana, em esmalte dentário de porcos e em ossos de camundongo (SUZUKI et al., 2008). A presença de maior quantidade de  $\text{HPO}_4^{2-}$  encontrada em tecidos duros jovens é consistente com a função do OCP como suporte para o crescimento de apatita biológica (SIEW et al., 1992). Sob condições fisiológicas, a alta taxa de nucleação de OCP, em relação à HAp, pode ser a razão da ocorrência de uma fase mineral tipo OCP na mineralização óssea (LU e LENG, 2005). Além disso, a modificação do DCPD pode contribuir na formação de OCP, tendo sido reportado, inclusive a coexistência de OCP e DCPD em formações ósseas (ZHANG et al., 2014).



**Figura 3.** Projeção para o plano (001) da estrutura do OCP mostrando a sua relação com a estrutura de apatita. O eixo c está fora do plano do diagrama para o OCP. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Os átomos de oxigênio das moléculas de água foram sombreados, de modo que a camada de água, em paralelo com os eixos b e c, passa por  $x \approx 0,5$  da célula unitária de OCP (inferior esquerdo da célula), pode ser facilmente vista. As camadas de apatita, também em paralelo com os eixos b e c, estão em  $x \approx 0$  e 1,0. A célula unitária correspondente à OHAp hexagonal foi demarcada para a camada de apatita em  $x \approx 0$  no canto superior direito (ELLIOTT, 1994).

Recentemente utilizou-se o DCPD como incremento em cimentos de fosfato de cálcio, visando a sua utilização em enxertos ósseos, concluindo-se que o aumento da quantidade de DCPD no cimento eleva o tempo de presa do material, o que favorece a interação do colágeno com o crescimento dos cristais no processo de endurecimento, que por sua vez melhora as propriedades mecânicas do material (PANZAVOLTA et al., 2011).

No que se refere ao OCP, é sabido que este possui certa fragilidade quando utilizado em formações estruturais (*scaffolds*), o que torna difícil manter sua forma original em regiões sob pressão (KAMAKURA et al., 1996), impossibilitando sua utilização em áreas onde há suporte de carga ou grandes defeitos ósseos, fazendo com que seja necessário incorporar ao OCP outros compostos que possam conferir maior plasticidade ao material, tais como os polímeros (KAMAKURA et al., 2005). Estudos clínicos demonstraram, também, que *scaffolds* formados por OCP e colágeno podem ser substitutos eficazes, quando implantados em arcadas caninas, uma vez que o OCP é de fácil manipulação e pode aumentar a regeneração óssea (IIBUCHI et al.; 2010).

Estudos realizados *in vitro* sugerem, ainda, que durante a formação óssea existe uma transformação do fosfato de cálcio amorfo (ACP) a OCP e DCPD, que, como fases intermediárias, se convertem a um fosfato de cálcio com composição semelhante à HAp (KARAMPAS e KONTOYANNIS, 2013; ZHAO et al., 2012; VALLET-REGI e GONZÁLEZ-CALBET, 2004), o que leva a crer que a HAp pode não ser a única alternativa quando se fala de reparações e substituições ósseas.

A HAp possui razão molar Ca/P de 1,67, o que faz deste fosfato um dos mais estáveis e menos solúveis (FULMER et al., 1992). Um modo apropriado de classificar os fosfatos de cálcio é fazê-lo de acordo com a razão molar entre os átomos cálcio e fósforo (Ca/P) presentes na amostra, podendo esta razão variar entre 0,5 e 2,0. Esta razão permite caracterizar o quão solúvel um fosfato de cálcio pode ser sendo esta uma das propriedades mais importantes de um material visto que influenciará diretamente em suas características, podendo ser relacionada, por exemplo, com o comportamento *in vivo* do material, pois quanto maior a razão molar Ca/P, menor a sua solubilidade (GUASTALDI e APARECIDA, 2010). O DCPD e o OCP possuem razão molar Ca/P de, respectivamente, 1,0 e 1,33 (GUASTALDI e APARECIDA, 2010; APARECIDA et al., 2007) e sendo assim possuem maior solubilidade que a HAp, o que torna estes materiais interessantes para serem utilizados como biomaterial, uma vez que a HAp pode levar anos e até décadas para ser reabsorvida pelo organismo, o que pode levar à instabilidades mecânicas e até fraturas ósseas (LINHART et al., 2004 *apud*

BOHNER et al., 2012). É difícil prever qual fosfato, em sua forma pura, composta por mais de uma fase ou na forma de compósitos, poderá gerar exatamente as características necessárias para ser empregado como substituinte ósseo e dentário. Porém, tendo-se a HAp como composto modelo, por ser aquela que os estudos apontam como sendo a que mais se aproxima da composição inorgânica óssea e dentária, e com os avanços que vem ocorrendo nas áreas de design de materiais, síntese de materiais com composição controlada e *scaffolds* espera-se que nos próximos anos possam ser desenvolvidos substituintes mais eficientes para o tecido duro humano.

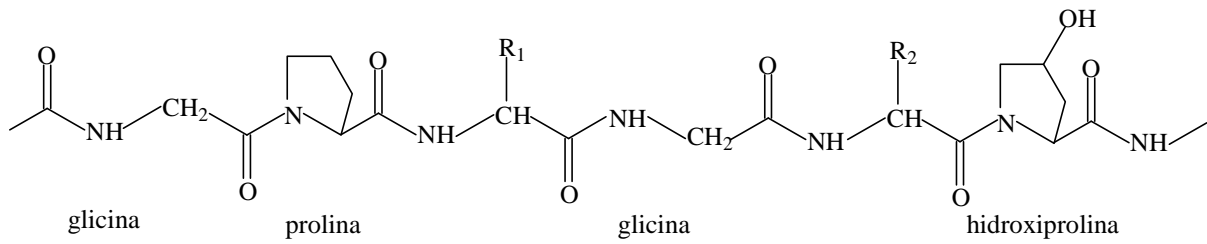
#### 1.4. O COLÁGENO

Enquanto a estrutura hierárquica da formação óssea é extremamente variável e complexa, sua estrutura básica de formação, a fibrila colagênica mineralizada, é bastante conhecida (FRATZL et al., 2004). O colágeno constitui cerca de 90% da parte orgânica do osso, sendo a proteína mais comum do corpo humano. Suas moléculas se entrelaçam de maneira a formar fibras flexíveis e levemente elásticas. Essas fibras, por sua vez, são reforçadas por uma densa camada inorgânica de HAp. No osso, os cristais desse fosfato de cálcio impregnam a matriz colagênica, gerando uma estrutura de propriedades muito características, sendo rígida e flexível ao mesmo tempo (WHITE e FOLKENS, 2005).

O colágeno constitui a classe de proteínas mais amplamente distribuída pelo corpo humano. O uso de biomateriais com colágeno tem crescido muito nas últimas décadas devido às múltiplas possibilidades de reticulação e de diferentes tipos de combinação, além de ser biodegradável, biocompatível e altamente versátil (PARENTEAU-BAREIL et al., 2010).

O colágeno tipo I (Figura 4) é uma proteína estrutural largamente encontrada no reino animal, que está diretamente envolvida no processo de biomineralização e que dá origem ao tecido ósseo e à dentina (DESHPAND e BENIASH, 2008). O termo “colágeno” é genericamente utilizado para designar proteínas que formam uma característica trílice hélice de cadeias polipeptídicas, de estruturas supramoleculares, sendo que o colágeno tipo I, representando mais de 90% da estrutura orgânica do osso, é formado por 3 cadeias polipeptídicas, com massas molares aproximadas, que se organizam na forma de uma hélice tripla, formando uma molécula na forma de um bastão com cerca de 300 nm de comprimento (GELSE et al., 2003). Nos tecidos as hélices se organizam pela sobreposição de cinco

moléculas organizadas de forma concêntrica e alternada originando a microfibrila (MARTINS e GOISSES, 1996).



**Figura 4.** Estrutura química do colágeno do tipo I. Sequência primária de aminoácidos (cadeia peptídica).

A HAp, assim como outros fosfatos de cálcio, é um material rígido e deste modo não é capaz de dissipar muita energia, o que confere ao colágeno um papel muito importante na formação óssea, uma vez que a deformação plástica do osso (deformação irreversível) é essencialmente regulada pela parte mineral, enquanto que a deformação elástica (deformação reversível) por uma combinação de comportamentos elásticos perfeitamente plásticos do mineral e do comportamento puramente elástico da matriz de colágeno (REILLY e BURSTEIN, 1974).

Quando se trata de implantes dentários a utilização de HAp pode causar dispersão para tecidos moles, o que pode trazer ao paciente, além de outros problemas, muito desconforto, podendo ser necessário fazer uma nova cirurgia. Tais situações fazem com que o uso de materiais na forma pastosa seja uma boa opção, para evitar estes problemas. Também nesse sentido, a combinação de HAp e colágeno tem sido sugerida, pois o colágeno, além de ser um bom suporte para crescimento celular, ele pode atuar de forma favorável na reparação da polpa dentária, mantendo a normalidade fisiológica dos tecidos restantes (E'GUES et al., 2008; BET et al., 1997).

## 1.5. SÍNTESE E APLICAÇÃO DE BIOMATERIAIS

Inúmeras metodologias são utilizadas para a síntese da HAp, tais como precipitação (BEHERI et al., 2013; KWEH et al., 1999), síntese no estado sólido (BOSKEY e POSNER, 1973), sistema hidrotermal (BINGÖL e DURUCAN, 2011; CHAUDHRY et al., 2006) e sol gel (BEHERI et al., 2013; BEZZI et al., 2003), síntese em emulsão e microemulsão (LIM et al., 1996) e sob influência de micro-ondas (KUMAR et al., 2000). Além destas existem outras possibilidades tais como a formação de *scaffolds* de quitina e HAp (CHANG et al., 2013),

síntese de HAp em nanoescala, utilizando triton X-100 como modificador orgânico (IYYAPPAN e WILSON, 2013) e *scaffolds* compostos de alginato, quitosana, colágeno e HAp para aplicação em engenharia de tecidos ósseos (YU et al., 2013). Entretanto, estes métodos são, normalmente, lentos e complexos quando se deseja obter HAp de morfologia controlada e alto grau de cristalinidade (WANG e FU, 2011).

Os compósitos artificiais recentes, indicados para substituição óssea ou dentária, buscam uma combinação entre uma matriz polimérica flexível reforçada por partículas mais resistentes, almejando uma maior similaridade possível com matrizes ósseas/dentárias naturais (FANTNER et al., 2006), sendo que o compósito hidroxiapatita-colágeno tem apresentado bons resultados para aplicações médicas e endodônticas (PARENTEAU-BAREIL et al., 2010; E'GUES et al., 2008; WAHL e CZERNUSZKA, 2006; LIN et al., 2004; SENA, 2004; YAMAUCHI et al., 2004; LICKORISH et al., 2003), pois o próprio osso humano é um típico nanocompósito de substâncias orgânicas e inorgânicas, formado, principalmente, por HAp e colágeno (KIKUCHI et al., 2001).

Um estudo recente comparou a restituição óssea, por via cirúrgica, utilizando um substituto natural (osso bovino desproteinizado) e um fosfato sintético e ambos os substitutos promoveram a regeneração óssea e a restituição dos defeitos. No entanto, verificou-se também que o substituto natural é osteocondutor e diminui a reabsorção óssea enquanto que o sintético induziu uma osteogênese precoce e atividade osteoclástica, resultando em uma maior formação óssea em comparação com o substituto natural (ELGALI et al., 2014).

A pulverização por plasma tem sido o processo mais comum para a aplicação de revestimentos de HAp. Embora a eletrodeposição (ED) apresente muitas vantagens potenciais, pouco tem sido estudado sobre ED de HAp em condições quase-fisiológicas. A observação ao microscópio revela que um revestimento formado por um compósito HAp-OCP aplicado por ED em condições quase-fisiológicas é semelhante ao formado por deposição química, e melhor se assemelha à hidroxiapatita biológica em termos de estrutura e composição da fase do que os revestimentos atualmente utilizados em ortopedia (METOKI et al., 2014).

É sabido que o OCP apresenta um efeito estimulador sobre a atividade dos osteoblastos durante a conversão do OCP em HAp em ambientes fisiológicos. No entanto, a propriedade de osteocondução dos cristais de OCP varia muito, dependendo da preparação deste, pois é dependente da estequiometria e das características morfológicas do cristal (SUZUKI, 2013). Recentemente avaliou-se o desempenho do OCP sintético na formulação de

um compósito com ácido hialurônico, matriz extracelular presente na maioria dos tecidos conectivos do corpo humano. O compósito foi qualificado como possuindo alta injetabilidade e superior osteocondutividade, particularmente nas fases iniciais de implantação, quando comparado com o OCP puro. Devido à sua natureza injetável os compósitos testados neste estudo podem ser usados numa ampla variedade de defeitos ósseos, incluindo defeitos grandes ou com formas complexas como frequentemente ocorre em cirurgias ortopédicas e orais (SUZUKI et al., 2014).

A fim de evitar o envelhecimento e melhorar a bioatividade da zircônia em implantes cerâmicos dentários, compósitos de zircônia revestida com Si dopado com OCP foram preparados. Os estudos sobre os efeitos preventivos sobre o envelhecimento do material e a morfologia de superfície mostraram que o revestimento inibiu o contato direto do vapor de água com a superfície da amostra e, portanto, impedindo a degradação dos substratos de zircônia. Verificou-se também que a composição principal do revestimento era de OCP, com superfície uniforme e contínua, sem fissuras visíveis (BAO et al., 2014).

Outras possibilidades de aplicação para os fosfatos de cálcio também tem sido avaliadas nos últimos tempos. A recuperação de fósforo de esgotos como fosfato de cálcio, por exemplo, pode diminuir a necessidade de extração de recursos de rocha fosfática. Existem relatos, também, de que é possível realizar a recuperação do fósforo por precipitação de grânulos de fosfato de cálcio no tratamento anaeróbico de águas residuais. Três fases de fosfato de cálcio foram identificadas nos grânulos: HAp, fosfato de cálcio hidratado e hidroxiapatita carbonatada (TERVAHAUTA et al., 2014). A utilização de fosfatos de cálcio para descontaminação de águas proporcionou uma redução na concentração de metais pesados (MINH et al., 2014; TERVAHAUTA et al., 2014; LEYVA et al., 2001; FREITAS et al., 2000). O DCPD foi utilizado também, após tratamento hidrotermal, como recobrimento de ligas de magnésio, aumentando à resistência da liga em especial em casos de corrosão por pite (CHANG et al., 2014).

Diante de todos estes fatos este trabalho visa comparar diferentes fosfatos de cálcio (OCP e DCPD) com a HAp, estabelecida no mercado de biomateriais por ser o fosfato de cálcio que mais se assemelha com a fase mineral do tecido ósseo humano. É sabido, porém, que uma vez implantada, a HAp pode levar muito tempo para ser reabsorvida pelo organismo humano, podendo haver sobreposição de células ósseas novas (neoformação óssea) e a HAp utilizada na reposição óssea. Visto que a HAp é um dos fosfatos de cálcio de menor solubilidade, pois possui razão molar Ca/P muito elevada (1,67), é válido testar a utilização de

outros fosfatos que sejam mais solúveis, ou seja, que possuam menor razão molar Ca/P como o OCP (1,33) e o DCPD (1,0) para verificar quais vantagens estes materiais podem gerar no campo dos biomateriais para substituição óssea e dentária. Destaca-se ainda o uso do colágeno, conhecido por orientar a neoformação óssea após o implante do biomaterial. Dessa forma, a utilização de um compósito de fosfato e colágeno pode melhorar ainda mais o desempenho do material. O presente trabalho visa testar o colágeno hidrolisado, comprado em casas de suplementos, para verificar se ele confere ao compósito algum tipo de toxicidade e, mais ainda, se ele é capaz de desempenhar as funções que são conhecidas para o colágeno natural.

Apesar de existirem muitos estudos sobre biomateriais que podem ser utilizados em reparações ósseas, esses estudos geralmente trabalham com os materiais de forma isolada e encontram-se ainda em fase inicial. Muito ainda precisa ser avaliado para cada um dos materiais que são sugeridos hoje para uso nesses tipos de aplicações. Vale ressaltar ainda que os estudos realizados anteriormente, geralmente, não abordam análises comparativas entre esses materiais. Outro ponto muito importante a ser considerado sobre o comportamento desses materiais quando implantados no organismo humano e a avaliação da solubilidade desses materiais no meio fisiológico posto que o material utilizado na restauração óssea ou dentária deverá participar do processo habitual de renovação celular, em que o material ósseo (natural e implantado) vai sendo solubilizado por ação dos osteoclastos e conseqüentemente substituído pelo processo de neoformação óssea. Dessa forma, se faz necessário conhecer o comportamento do material a ser inserido no meio fisiológico para que o processo de solubilização do mesmo seja compatível com o processo de neoformação óssea.

## **1.6. OBJETIVO GERAL**

Investigar o compósito fosfato de cálcio-Colágeno para utilização como biomaterial em reconstruções e/ou implantes médicos e odontológicos.

### **1.6.1. Objetivos Específicos**

- Propor diferentes rotas de síntese para a hidroxiapatita (HAp), para o mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD) e para o fosfato octacálcico (OCP);
- Caracterizar os fosfatos de cálcio sintetizados a partir de suas propriedades físico-químicas;

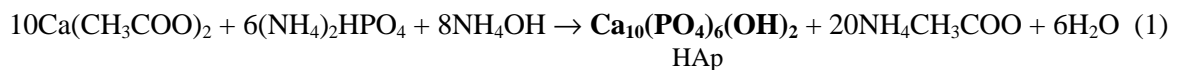
- Sintetizar o compósito fosfato de cálcio-Colágeno a partir dos fosfatos produzidos (HAp, DCPD e OCP);
- Investigar os compósitos formados de acordo com suas propriedades físico-químicas e bioquímicas para aplicação como biomaterial;
- Avaliar a citotoxicidade dos fosfatos estudados e seus respectivos compósitos;
- Estudar a cinética de reabsorção dos compósitos formados;
- Comparar as caracterizações e o comportamento do DCPD e do OCP, e seus respectivos compósitos com colágeno, em relação à HAp e seu compósito com colágeno, bem estabelecida no campo de reposições e substituições ósseas e dentárias, a fim de poder indicá-los ou não como substituintes ósseos.

## 2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 2.1. SÍNTESE DOS FOSFATOS DE CÁLCIO

#### 2.1.1. Síntese da hidroxiapatita

A síntese por precipitação foi realizada com adição controlada e simultânea das soluções de acetato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) e hidrogenofosfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) sobre uma solução de acetato de amônio ( $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ), sob agitação constante, de forma a se obter uma razão molar Ca/P de 1,67. O pH foi conservado em 8,5 pela adição controlada de hidróxido de amônio concentrado ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). O precipitado obtido foi filtrado e lavado com água destilada. Posteriormente, o material foi seco a  $80^\circ\text{C}$  (VALENTE, 1999). A síntese da HAp se dá conforme a equação:

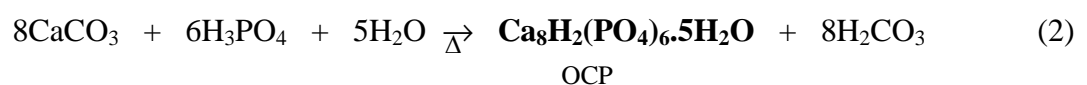


sendo que a HAp formada precipita, podendo então ser separada do restante da solução.

#### 2.1.2. Síntese do fosfato octacálcico e do mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado

Foram misturadas as soluções de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), obtendo-se uma razão molar Ca/P de 1,33 (ISHIHARA ET AL., 2009), sendo o pH do meio reacional aproximadamente 4. O precipitado foi filtrado e seco. Neste procedimento, como será discutido posteriormente, há formação de DCPD e OCP.

Tanto a síntese do fosfato octacálcico (OCP), quanto a síntese do mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado em água (DCPD) são obtidos a partir da reação entre o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) com o ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), sendo que a diferença entre as duas sínteses é a temperatura, tendo em vista que quando há maior adição de calor se dá a síntese do OCP e em temperatura ambiente tem-se a síntese do DCPD:

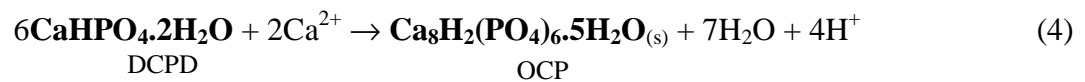


e

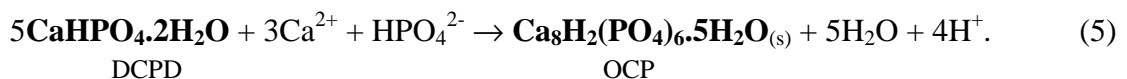


Desta forma tem-se que a quantidade de calor foi fator determinante para a síntese dos fosfatos de cálcio, sendo que o OCP possui uma razão molar Ca/P de 1,33 e esta foi a proporção dos reagentes utilizadas em ambas as sínteses, mas a ausência de temperatura induziu a formação do DCPD, com razão molar Ca/P de 1,0. Em ambos os casos houve a formação de um precipitado branco, que foi separado da solução e seco para a realização das caracterizações físico-químicas.

Cabe ressaltar que uma mesma síntese levou à formação de dois diferentes tipos de fosfatos de cálcio, com diferentes razões molares Ca/P. Sabe-se, porém, que o DCPD pode ser convertido em OCP de acordo com as reações (TAS, 2011):



ou



Em ambos os casos os íons cálcio presentes no meio reagem com o DCPD, levando a formação do OCP. Pode-se considerar então que a reação entre ácido fosfórico e carbonato de cálcio leva à formação de DCPD. Por outro lado, quando há aquecimento do meio reacional, há maior solubilização do carbonato de cálcio, o que disponibiliza mais íons cálcio na solução, possibilitando a formação do OCP a partir do DCPD.

## 2.2. PROCESSOS DE SÍNTESE

Diferentes tipos de sínteses são citados na literatura no que se refere à síntese de fosfatos de cálcio, desde as mais simples até as mais complexas. O sistema hidrotermal visa simular as condições naturais de formação de minerais utilizando-se de temperatura e pressão em presença de água, permitindo a preparação de HAp cristalina, de composição homogênea e uniforme graças ao efeito da temperatura, da pressão e da solução aquosa (BYRAPPA e YOSHIMURA, 2001). O método hidrotermal permite a formação de materiais com alto grau de cristalinidade e de fácil dispersão em meio aquoso (LEE et al., 2001). Por outro lado, a

principal desvantagem desta técnica é a sua baixa cinética de reação, independente da temperatura de processamento a ser utilizada (SREEJA e JOY, 2007).

Tal método, quando assistido por micro-ondas, acrescenta às características do método hidrotermal o rápido aquecimento e excelente reprodutibilidade, o aumento na cinética de reação, devido à maior interação entre os reagentes, além do aquecimento homogêneo da superfície e do núcleo dos materiais (HAN et al., 2006). No sistema hidrotermal assistido por micro-ondas a frequência da radiação eletromagnética interage com os dipolos permanentes da fase líquida resultando em um rápido aquecimento das partículas (aquecimento dielétrico), favorecendo o aumento da velocidade da reação (WILSON et al., 2006). Durante o aquecimento dielétrico, a radiação transpõe o material de forma que a transferência de calor acontece do interior do material até a superfície. Este tipo de transferência causa o aquecimento do material e um rápido aumento da temperatura (SIMÕES et al., 2012).

Desta forma escolheu-se para o desenvolvimento deste trabalho realizar sínteses em temperatura ambiente, com aquecimento simples (em chapa aquecedora), em sistema hidrotermal (H), visando simular condições naturais de formação dos minerais e sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (HM), que acumula às vantagens do sistema hidrotermal a possibilidade de acelerar a velocidade de formação do material.

### **2.2.1. Síntese em temperatura ambiente**

Cada um dos procedimentos acima citados foi realizado em temperatura ambiente (entre 20 e 25°C) sob agitação constante. O procedimento foi realizado em frasco de laboratório “Schott” de borossilicato, com tampa de rosca de politereftalato de etileno, com resistência até 180°C.

### **2.2.2. Síntese em chapa aquecedora**

Os respectivos processos de síntese foram realizados com auxílio de uma chapa aquecedora (Fisatom, modelo 752A), mantendo-se a temperatura constante em 80 e 120°C por 32 min, sob agitação. O procedimento foi realizado em frasco de laboratório “Schott” de borossilicato, com tampa de rosca de politereftalato de etileno, com resistência até 180°C.

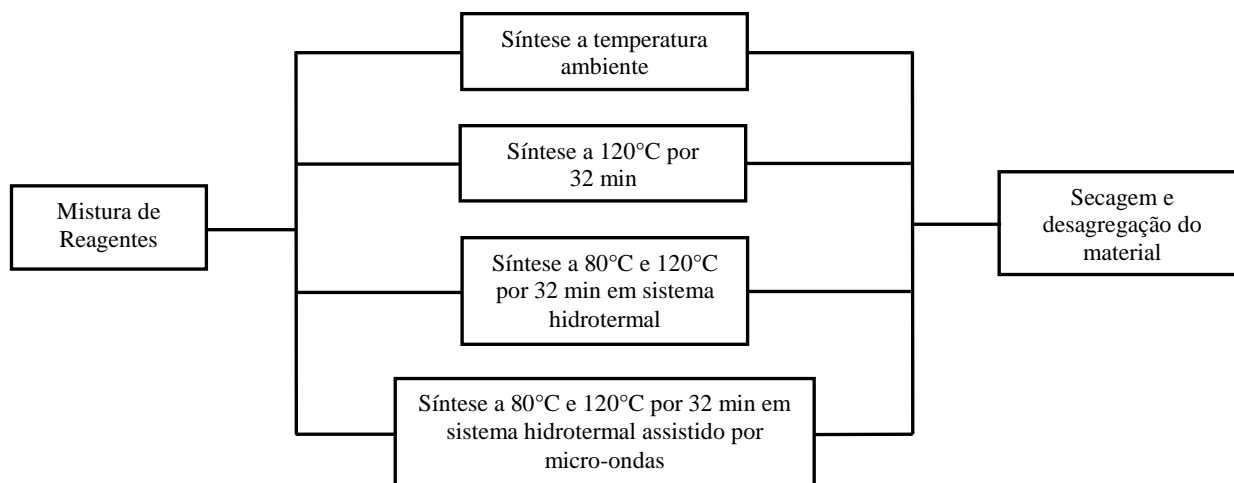
### 2.2.3. Síntese pelo método hidrotermal (H)

Para os processos de síntese pelo método hidrotermal os reagentes foram adicionados em frascos de vidro de 100 mL que por sua vez foram mantidos em estufa (Odontobrás, modelo EL-1.6) à 120°C durante 32 min. O procedimento foi realizado em frasco de laboratório “Schott” de borossilicato, com tampa de rosca de politereftalato de etileno, com resistência até 180°C.

### 2.2.4. Síntese pelo método hidrotermal micro-ondas (HM)

As misturas propostas para cada uma das sínteses foram adicionadas em um copo de teflon e então seladas em um reator de aço inox que foi submetido ao processo hidrotermal micro-ondas (Liec, modelo HMO-100) por 32 min à 80 e 120°C.

Os diferentes procedimentos de preparação dos fosfatos foram realizados em solução aquosa, conforme Esquema 1. Após os procedimentos de síntese os fosfatos foram secos à 80°C por cerca de 1 h com auxílio de uma chapa aquecedora (Fisatom, modelo 752A) e em seguida desagregados em graal de porcelana.



**Esquema 1.** Diagrama esquemático para a preparação dos fosfatos de cálcio.

## **2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FOSFATOS PUROS**

### **2.3.1. Difração de Raios X (DRX)**

As análises por difração de raios X foram realizadas em difratômetro Panalytical X'Pert Pro MPD, com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,54060 \text{ \AA}$ ) com passo de 0,04 e tempo de 1 s, com variação de  $2\theta$  na faixa entre 5 e  $60^\circ$ .

### **2.3.2. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)**

As análises por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu modelo FTIR 8300, na região de número de onda entre 400 e  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , usando a técnica com pastilhas de KBr.

### **2.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A morfologia das partículas das amostras obtidas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo que a obtenção das imagens foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Philips modelo Quanta 200 FEI, com feixe de 30 keV.

## **2.4. TESTE DE ADSORÇÃO DE PIRIDINA**

Buscando caracterizar os sítios ácidos das amostras sintetizadas e até mesmo diferenciá-las entre si, quando possível, foi feito o teste de adsorção de piridina. O método de adsorção de piridina é muito usado na caracterização da acidez de sólidos com a vantagem de permitir a identificação do tipo de centros ácidos presentes no material (PIRES Et al., 1998).

Para tanto os fosfatos (35 mg de cada amostra) foram colocadas em um recipiente ( $2760 \text{ cm}^3$ ) contendo um béquer com 5 mL de piridina e então o recipiente foi lacrado e mantido em repouso por 60 h. Após este período as amostras foram retiradas do recipiente e mantidas em ambiente aberto. Então estas amostras foram analisadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier por reflectância total atenuada (ATR) em equipamento FTIR-ATR RFS100 da Bruker. As amostras caracterizadas por DRX como sendo formadas por misturas de fases não foram avaliadas.

## 2.5. SÍNTESE DOS COMPÓSITOS FOSFATO DE CÁLCIO-COLÁGENO

Para a preparação dos compósitos utilizou-se apenas uma amostra de cada tipo de fosfato (HAp, DCPD e OCP), tendo sido elegida, para cada fosfato, apenas uma rota de síntese, como sendo a que apresenta melhores resultados, tanto no que se refere às características físicas e químicas dos fosfatos produzidos quanto ao método utilizado no que se refere à aplicabilidade do método, facilidade de manuseio e custo. Desta forma, para a síntese dos compósitos foram escolhidas as seguintes metodologias: síntese à 80°C em chapa aquecedora para a HAp e para o OCP e em temperatura ambiente para o DCPD.

Os compósitos, para todos os fosfatos, foram preparados respeitando-se a proporção fosfato:colágeno de 2:1 (m/m), visto que a composição natural de ossos humanos está entre 65 e 70% mineral e entre 25 e 30% orgânico (SOMMERFELDT e RUBIN, 2011). Adicionou-se também à síntese dos compósitos o glutaraldeído (GA) por ser o reagente mais extensivamente utilizado para formar ligações cruzadas (reticulações) via base de Schiff entre os grupos  $\epsilon$ -amino das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos lisina e hidroxilisina presentes na estrutura primária das fibras de colágeno (SHEU et al. 2001; DAMINK et al., 1995). Para a síntese dos compósitos foi utilizado o colágeno hidrolisado encontrado em casas de produtos naturais.

O colágeno hidrolisado é obtido por hidrólise química e enzimática sob condições controladas do colágeno tipo I. As cadeias de proteínas do colágeno são clivadas por processos térmicos, químicos ou bioquímicos, ou ainda, uma combinação destes. As frações de baixo peso molecular, assim obtidas, possuem propriedades específicas, como o fato de serem solúveis em água fria e de não formam géis mesmo em soluções altamente concentradas. A principal característica do colágeno hidrolisado é o seu peso molecular (que é dependente das matérias-primas utilizadas e do processo de fabricação) que varia entre 2000 e 20000  $\text{g.mol}^{-1}$  (SCHRIEBER e GAREIS, 2007). O colágeno hidrolisado vendido comercialmente geralmente possui granulometria fina (aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ ) e é seco por processo de *spray dried*.

A preparação dos compósitos foi feita a partir da adição do fosfato de cálcio em um hidrossol de colágeno (colágeno hidrolisado puro – Sanibrás), onde a quantidade de água necessária foi diferente para cada tipo de fosfato, uma vez que os materiais são diferentes, e visou-se obter em todos os casos uma consistência viscosa semelhante. Em seguida

adicionou-se uma solução de GA 1% (v/v). As proporções utilizadas em cada caso são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Proporções utilizadas na síntese dos compósitos.

	<i>Fosfato</i>	<i>Colágeno</i>	<i>Glutaraldeído</i>	<i>Água</i>
HAp	2	1	1	1
DCPD	2	1	1	3
OCP	2	1	1	4

Após homogeneização mecânica os compósitos foram acondicionados em freezer por 48h e em seguida liofilizados (Liofilizador Edwards, modelo Modulyo) em pressão de  $10^{-1}$  atm e temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Em seguida, os compósitos foram desagregados e armazenados.

## 2.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPÓSITOS

### 2.6.1. Difração de Raios X (DRX)

As análises por difração de raios X foram realizadas em difratômetro Panalytical X'Pert Pro MPD, com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,54060 \text{ \AA}$ ) com passo de 0,04 e tempo de 1 s, com variação de  $2\theta$  na faixa entre 5 e  $60^{\circ}$ .

### 2.6.2. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

As análises por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu modelo FTIR 8300, na região de número de onda entre 400 e  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , usando a técnica com pastilhas de KBr.

### 2.6.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das partículas das amostras obtidas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo que a obtenção das imagens foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Philips modelo Quanta 200 FEI, com feixe de 30 keV.

## 2.7. DETERMINAÇÃO DA RAZÃO MOLAR CÁLCIO/FÓSFORO (Ca/P)

As propriedades dos fosfatos de cálcio estão diretamente relacionadas à razão molar Ca/P que apresentam, sendo que, quanto maior esta razão, menor a solubilidade do fosfato. Para tanto é preciso calcular as quantidades molares de cálcio e fósforo, para que se possa determinar tal razão e determinar as possíveis propriedades do fosfato estudado.

### 2.7.1. Determinação de fósforo

Para a determinação do fósforo presente nas amostras utilizou-se o método do azul de molibdênio, segundo Murphy e Riley (1962). A determinação de fósforo foi feita por espectrofotometria, em espectrofotômetro Femto (modelo 800XI) e para tanto se iniciou o procedimento preparando-se o reagente misto, que deve ser preparado no dia da análise para obtenção de melhores resultados.

O reagente misto foi preparado seguindo-se a proporção: 50% solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Isofar)  $2,5 \text{ mol.l}^{-1}$ , 15% de solução de molibdato de amônio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Synth)  $0,03 \text{ mol.l}^{-1}$  (que deve ser estocada em frasco de vidro âmbar), 30% de solução de ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , Fmaia)  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  (preparada no dia da análise) e 5% de solução de tartarato de antimônio e potássio ( $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , Vetec) com concentração de 1 mg de Sb/ml.

Após a preparação do reagente misto obteve-se uma curva de calibração entre 100 e 400  $\mu\text{g}$  de fósforo/l a partir de uma solução estoque de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fmaia), contendo 40 mg de fósforo/l. Prepararam-se, em seguida, as amostras da curva de calibração para a leitura da absorção fazendo-se adição de 1 ml do reagente misto em 10 ml da amostra a ser lida e após agitação esperou-se por 10 min para a manifestação da cor (azul). As absorvâncias foram determinadas a 882 nm.

Cada um dos materiais a ser analisado quanto a sua respectiva quantidade de fósforo presente foi dissolvido (0,0150 g de HAp; 0,0156 g de DCPD e 0,0148 g de OCP) em 10 ml de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $2,5 \text{ mol.l}^{-1}$  (solução estoque) e, então, cada uma destas soluções foi diluída 10000 vezes em água destilada. A análise por espectrofotometria destas amostras foi feita seguindo o mesmo procedimento utilizado na curva de calibração. As análises foram feitas em triplicatas.

### 2.7.2. Determinação de cálcio

Esta determinação consiste na extração do cálcio contido na amostra, por digestão ácida, e medição de sua concentração através da técnica de absorção atômica, sendo este o método mais indicado para materiais com baixos teores de cálcio.

A determinação de cálcio foi feita por espectrometria de absorção em chama, em espectrômetro Shimadzu, e para tanto se iniciou o procedimento preparando-se uma curva de calibração entre 0,05 e 2,0 mg.l<sup>-1</sup> de cálcio a partir de uma solução padrão de 1000 mg.l<sup>-1</sup> de cálcio (Merck), sendo que em todas as amostras da curva adicionou-se 10% de solução de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Merck) 0,1% m/v (agente sequestrante) que deve ser adicionado porque o fosfato de cálcio forma um composto estável ao ser aquecido, o que dificulta sua determinação, e assim sendo o lantânio, estando presente, forma um composto termicamente estável com o fosfato, disponibilizando o cálcio em seu estado atômico, consentindo assim que ele seja detectado com adequada sensibilidade (SKOOG et al., 2002; WILLIS, 1960). Todas as soluções a serem usadas devem ter sido recém-preparadas.

Para a análise dos materiais quanto a sua relativa quantidade de cálcio, foram pesados para a HAp, o DCPD e o OCP, respectivamente, 0,0200 g, 0,0250g e 0,0340g que foram colocados, separadamente, em balão de 10 mL e então adicionou-se HNO<sub>3</sub> concentrado (Synth) até completa dissolução do material e completou-se o volume com água ultrapura (solução estoque). As amostras foram, então, diluídas 1000 vezes com adição da solução 0,1% de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, como na curva de calibração.

## 2.8. ESTUDO DA ESTABILIDADE TÉRMICA

Segundo a Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC), a análise térmica compreende um grupo de técnicas em que uma propriedade física de uma substância é medida em função da temperatura. Por esta definição, para que uma técnica térmica seja considerada como termoanalítica devem ser atendidos três critérios: 1) uma propriedade física deve ser medida, 2) a medida deve ser expressa em função da temperatura e 3) a medida deve ser feita em um sistema de temperatura controlada (IONASHIRO, 2004).

### **2.8.1. Análise termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica (TG, TGA50 Shimadzu) avalia a redução de massa de uma amostra em função da temperatura em atmosfera controlada. O início e o fim do processo de perda de massa são obtidos através da derivada da curva termogravimétrica (DTG) (IONASHIRO e GIOLITO, 1980). As análises de TG foram realizadas com de aquecimento de 30°C/min em uma faixa de temperatura entre 20 e 800°C em atmosfera controlada de nitrogênio.

### **2.8.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica na qual é medida a diferença de energia fornecida à substância em relação a um material de referência, em função da temperatura (IONASHIRO e GIOLITO, 1980). As curvas de DSC foram obtidas (DSC60 Shimadzu) com razão de aquecimento de 10°C/min, na faixa entre 30 e 500°C. Foi utilizado vazão de gás de 30 mL/min em atmosfera de nitrogênio. Foram utilizados para as análises suportes herméticos de alumínio.

## **2.9. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO DO MTT**

O teste de viabilidade celular é baseado na medida da viabilidade das células via atividade metabólica (SCUDIERO et al., 1988). O MTT [3-(4,5 dimetiliazol-2-ilo)-2-5-difenil-2H-tetrazolato de bromo], uma substância amarela e solúvel em água, é metabolicamente reduzido por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succinica nas células viáveis a um composto violeta insolúvel em água, o formazam, que se acumula no citoplasma celular. O número de células viáveis é proporcional à intensidade da cor violeta, determinada a partir de medidas fotométricas após dissolução do formazam em dimetil sulfóxido (DMSO).

Células L929 ( $10^4$  células/100 µl DMEM (meio mínimo essencial Eagle) tamponado com bicarbonato de sódio e suplementado com soro fetal bovino (10%)) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por aproximadamente 24 h (37 °C / 5 % CO<sub>2</sub>) para formação de uma monocamada semi-confluenta. As células L929 pertencem a uma linhagem de fibroblastos muito utilizada para testes de citotoxicidade (SERRANO et al., 2004). A linhagem

L é derivada do tecido areolar subcutâneo e adiposo de um camundongo macho C3H/An de 100 dias (dados do produto). Os fibroblastos são, predominantemente, encontrados em tecidos conectivos perdidos ou danificados, sendo muito importantes nos mecanismos de reparação e no remodelamento tecidual (PAN et al., 2006) o que justifica sua grande utilização como composto modelo em testes de citotoxicidade.

Para cada tipo de fosfato estudado e seus respectivos compósitos (HAp, HAp-Col, DCPD, DCPD-Col, OCP e OCP-Col) foram testadas diferentes concentrações ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 e 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Além dos grupos experimentais foi preparado também um controle negativo sem adição de interferentes (CN). Após os tratamentos, as células foram mantidas incubadas por 24 h ( $37^\circ\text{C}$  / 5%  $\text{CO}_2$ ).

Após esse período, o meio foi removido e adicionou-se 180  $\mu\text{l}$  de DMEM e 20  $\mu\text{l}$  de solução de MTT (5  $\text{mg/ml}$  em DMEM) em cada poço teste. As placas foram incubadas novamente por 4 h ( $37^\circ\text{C}$  / 5%  $\text{CO}_2$ ) de forma a permitir o metabolismo do MTT. Passado esse período o meio foi sugado e a placa foi invertida para secagem do remanescente de MTT. Os cristais de formazan foram então ressuspensos em 200  $\mu\text{l}$  de DMSO com auxílio de um agitador (Lab Rotator Thermo Scientific) a 150 rpm por 5 min.

A absorção de cada um dos poços foi então determinada em espectrofotômetro (TP-READER Thermoplate) com comprimento de onda de 540 nm, onde foram considerados os valores de absorbância como indicadores de viabilidade celular. Os dados foram então submetidos ao teste ANOVA (análise de variância) e teste de Tukey ( $p \leq 5$ ). O número de repetições de cada grupo foi de 8, sendo que o experimento foi repetido três vezes.

## **2.10. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE SOLUBILIZAÇÃO EM FLUIDO FISIOLÓGICO SIMULADO**

Uma característica muito importante para biomateriais é a solubilidade desse tipo de composto em ambiente de fluido fisiológico normal (pH 7,4) e, ainda, se ele é reabsorvido sob condições ácidas, produzida pelos osteoclastos. Para algumas aplicações dos biomateriais utilizados em reposições ósseas, como a cranioplastia, uma reabsorção relativamente lenta é aceitável. Porém, em outras aplicações, como em reparos periodontais, a possibilidade do material implantado ser rapidamente reabsorvido é fundamental (CHOW et al., 2003).

O menor valor de pH reportado para fluidos extracelulares de osteoclastos é em torno de 3, enquanto que o pH do fluido fisiológico em contato direto com o biomaterial que está

sendo reabsorvido é maior, em torno de 5 (SILVER et al., 1988). Desta forma, a utilização de fluidos fisiológicos simulados (FFS) com pH na faixa entre 3 e 5 pode ser muito relevante para se avaliar o processo de reabsorção *in vivo*. A composição da FFS é apresentada na Tabela 2 (CHOW et al., 2003). No presente estudo, o FFS foi preparado em condições ácidas porque as amostras testadas são relativamente insolúveis em meio alcalino ou neutro e solúveis em soluções ácidas. Vale destacar o pH final 3 torna o processo de dissolução mais ativo.

**Tabela 2.** Composição do fluido corporal simulado (FFS).

	[ ] / $mmol.l^{-1}$
Ca(OH) <sub>2</sub>	1,15
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
KCl	134,2
HCl	2,55
pH	3

Foram preparadas pastilhas das amostras (13 mm de diâmetro x 1 mm de altura) em prensa (Shimadzu SSP 10A) sob pressão de 80 kgf por 10 minutos. Essas pastilhas foram então imersas em 40 ml de FFS e mantidas a 37°C em banho-maria (Novatecnica, NT 268) por 60 min. Após 60 min a pastilha era retirada do FFS e imersa em uma nova solução de FFS (40 ml) a 37°C e mantida imersa por mais 60 min. O procedimento foi realizado em triplicata e repetido até obter-se 5h de experimento. Destaca-se que a pastilha era imersa em uma nova porção de FFS para que se pudesse garantir que não haveria saturação da solução com íons cálcio ou fósforo. Os recipientes com FFS que haviam permanecido por 60 min com a amostra submersa foram mantidos em geladeira até o momento da análise de quantificação de cálcio por absorção atômica, sendo retirados da geladeira em tempo suficiente para atingirem a temperatura ambiente no momento da análise.

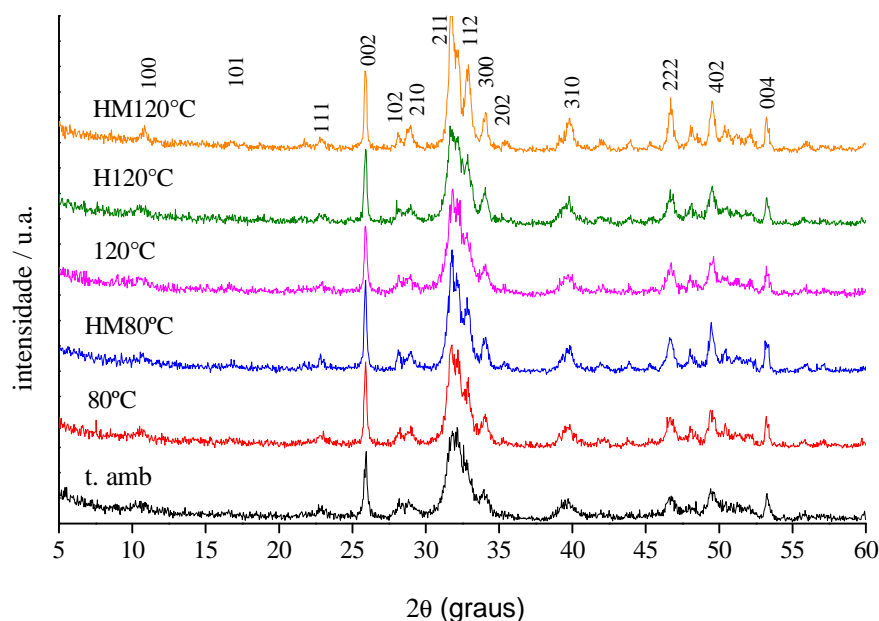
A determinação de cálcio foi feita por espectrometria de absorção atômica em chama, em espectrômetro Thermo (S Series). O procedimento foi realizado utilizando-se a combinação oxidante/combustível ar-acetileno. As amostras e a curva de calibração foram preparadas utilizando-se uma solução 0,1% de solução de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Merck) como diluente. Todas as soluções usadas foram preparadas no momento da análise e as leituras foram realizadas em triplicata.

### 3. DISCUSSÃO E RESULTADOS

#### 3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FOSFATOS PUROS

##### 3.1.1. Difração de Raios X (DRX)

A difração de raios X (DRX) representa o fenômeno de interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material, consistindo na incidência da radiação em uma amostra e na detecção dos fótons difratados. Os difratogramas obtidos a partir da análise por DRX dos materiais sintetizados nas diferentes rotas sintéticas estão dispostos na Figura 5. A partir desta análise foi possível confirmar a fase cristalina, o grau de cristalinidade e o tamanho médio dos cristalitos presentes em cada uma das amostras, sintetizadas pelos diferentes métodos.



**Figura 5.** Difratogramas de raio X para a HAp sintetizada em temperatura ambiente (—), a 80°C em chapa aquecedora (—) e sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) e a 120°C em chapa aquecedora (—), em sistema hidrotermal (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—).

Os picos de difração apresentados pelas amostras obtidas nas diferentes rotas sintéticas foram indexados com sendo a fase hexagonal da HAp (grupo espacial  $P6_3/m$ , ICSD - Inorganic Crystal Structure Database - 016742). A análise dos difratogramas caracterizou ainda os diferentes materiais como sendo puros, exceto quando a síntese foi realizada em

temperatura ambiente, que apresentou um perfil de difração com grande quantidade de sobreposição de picos, indicando que possivelmente há uma mistura de fases, composta por HAp e outros fosfatos de cálcio (com menor razão molar Ca/P) que podem estar sendo formados durante o processo de síntese em temperatura ambiente, como por exemplo o DCPA (mono-hidrogênio fosfato de cálcio anidro) e o DCPD.

A análise dos difratogramas mostra uma melhor definição dos picos quando a síntese é realizada em sistema HM, podendo-se dizer que há uma melhor organização estrutural do sistema neste tipo de síntese (BINGÖL e DURUCAN, 2011; CHAUDHRY et al., 2006; HAN et al., 2006; FANG et al., 1994). Por outro lado o perfil dos difratogramas permanece o mesmo em todos os casos, sendo que, mesmo a HAp sintetizada em sistema HM tendo apresentado uma ligeira melhora nos resultados (picos mais intensos e mais bem definidos), não foram encontradas diferenças significativas quanto à caracterização das amostras.

Em um material onde os átomos estejam arranjados periodicamente no espaço, característica das estruturas cristalinas, o fenômeno da difração de raios X ocorre nas direções de espalhamento que satisfazem a Lei de Bragg. A relação de Bragg permite relacionar os ângulos de incidência do feixe de raios X, com os espaçamentos interplanares, considerando que os planos cristalinos agem como uma rede de difração óptica. O cálculo do tamanho médio dos cristalitos ( $\tau$ ) é dado pela equação de Scherrer (SURYANARAYANA e NORTON, 1998):

$$\tau = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (6)$$

sendo que:

$$\beta^2 = (B)^2 - (b_p)^2 \quad (7)$$

onde B é a largura a meia altura do pico de difração observado para o material em questão, b é a mesma medida referente à um padrão externo, analisado nas mesmas condições da amostra e K é uma constante que dependerá da forma do ponto quando o feixe toca a esfera de Ewald e esta forma está relacionado com a morfologia do cristal. O valor mais utilizado para K é 0,9, que se aplica quando o cristalito apresenta forma globular. No entanto, como a HAp aqui obtida apresentou sistema hexagonal, esse valor de 0,9 não pode ser usado e então pode-se utilizar um tratamento mais geral para o tamanho do cristalito, proposto por Stokes e Wilson, que é independente da forma do cristalito e de sua simetria. Nesta proposta se considera a

grandeza efetiva do cristalito, em uma equação igual à proposta por Scherrer, em que o valor de K é variável e sendo o valor de K considerando como sendo 1 o erro na estimativa do tamanho do cristalito é da ordem de  $\pm 10\%$  (AZAROFF e BUERGER, 1958).

A Tabela 3 apresenta uma estimativa do tamanho médio de cristalito calculado para cada uma das amostras sintetizadas, a partir da equação de Scherrer, utilizando como referência o plano de difração (002) contido nos difratogramas obtidos para as amostras de HAp.

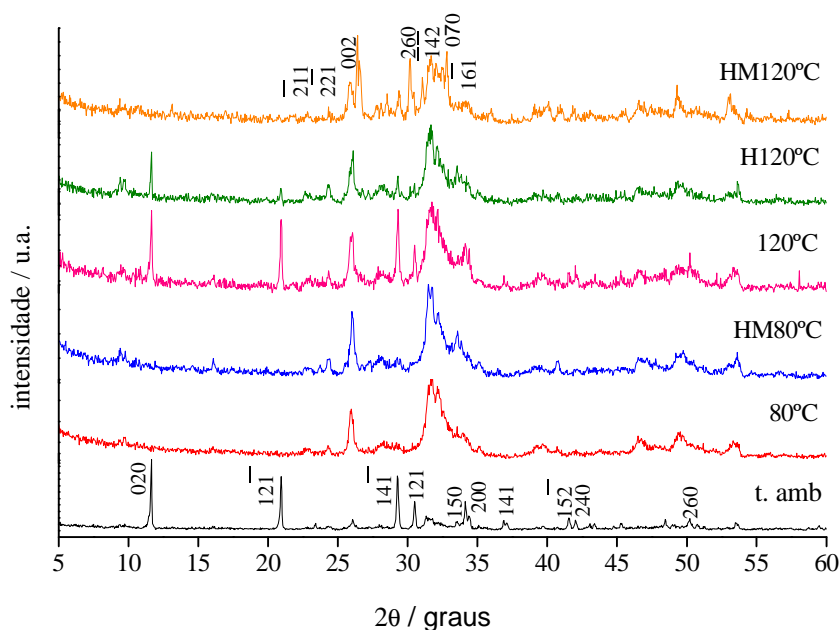
**Tabela 3.** Tamanhos médios dos cristalitos, calculados a partir da equação de Scherrer, com base no plano 002 dos difratogramas das amostras de HAp.

<i>Amostra</i>	<i>Síntese</i>	$\tau$ (nm)
HAp	t. amb.	46,2
	80°C	78,1
	HM80°C	111,6
	120°C	79,3
	H120°C	73,2
	HM120°C	132,1

A partir da análise dos tamanhos médios dos cristalitos percebe-se que o aumento da temperatura gera cristalitos maiores, visto que os picos de difração tendem a ser mais intensos e mais estreitos para amostras sintetizadas em temperaturas mais elevadas. Tal característica pode ser atribuída ao fato de que o aumento de temperatura, a pressão constante, aumenta a mobilidade dos átomos, resultando em um crescimento mais rápido dos grãos. Por outro lado, embora o aumento da pressão, à temperatura constante, geralmente reduza a mobilidade dos átomos há um aumento de elasticidade na superfície dos grãos, o que pode induzir o crescimento do grão. A pressão pode, ainda, induzir a ordenação da fase não cristalina, ou parcialmente desordenada, levando a maiores tamanhos de cristalito. (GUBICZA et al., 2007).

Os parâmetros de rede apresentados para o sistema aqui caracterizado (ICDS 016742) indicaram:  $a$  e  $b = 9,4320 \text{ \AA}$  e  $c = 6,8810 \text{ \AA}$ , valores estes que vão de encontro aos valores calculados por Wang e Fu (2011), assim como o volume de cela, que é de  $530,14 \text{ \AA}^3$ .

A Figura 6 apresenta os difratogramas obtidos para as amostras de OCP obtidas à 80 e 120°C, e para o DCPD, sintetizado em temperatura ambiente.



**Figura 6.** Difratogramas de raio X para o DCPD sintetizado em temperatura ambiente (—) e para o OCP sintetizado a 80°C em chapa aquecedora (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) e 120°C em chapa aquecedora (—), em sistema hidrotermal (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—).

A análise dos difratogramas de raios X caracterizou as amostras com elevada organização na estrutura cristalina, porém nos casos de síntese a 120°C há formação de mistura de fases. A análise por difração de raios X das amostras sintetizadas em temperatura ambiente identificou alta cristalinidade, com formação de uma fase pura, a Brushita, ou mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), o DCPD. As amostras sintetizadas em sistema hidrotermal e hidrotermal assistido por micro-ondas a 120°C levaram à formação do OCP, porém as amostras sintetizadas em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas indicaram a presença de DCPA e a síntese em sistema hidrotermal, a presença de DCPD, misturado ao OCP. Estes outros fosfatos foram, provavelmente, formados por rotas sintéticas alternativas, sendo que no caso da amostra sintetizada em chapa aquecedora, esta nem apresentou o OCP como uma de suas fases, apresentando apenas a presença de HAp e DCPD em sua composição. Tais resultados mostram que as rotas de síntese a 120°C não são úteis na síntese de OCP, e que a síntese à temperatura ambiente leva a formação do DCPD em sua fase pura.

No que se refere às amostras obtidas por rota de síntese a 80°C, a análise dos difratogramas de raios X caracterizou as amostras com boa organização na estrutura cristalina, caracterizadas como sendo compostas por OCP em ambos os casos, indicando que a

temperatura de 80°C permite a formação do OCP no processo de síntese em fase aquosa. Tais análises mostram, então, que a rota de síntese em meio aquoso a 80°C pode gerar o OCP em sua forma pura, mas que em temperatura ambiente a mesma rota sintética leva à formação de DCPD.

A análise dos difratogramas mostra uma melhor definição dos picos quando da síntese em sistema HM a 80°C, podendo-se dizer que há uma melhor organização estrutural do sistema neste tipo de síntese. Por outro lado, o perfil dos difratogramas permanece o mesmo nos dois casos de síntese a 80°C, não sendo encontradas diferenças significativas quanto à caracterização das amostras

A análise dos picos de difração das amostras caracterizadas como OCP foram indexados, ainda, como sendo de sistema triclinico (grupo espacial P-1, ICSD - Inorganic Crystal Structure Database - 065347) e para o DCPD caracterizou-se a amostra como sendo de sistema monoclinico (grupo espacial Ia, ICSD - Inorganic Crystal Structure Database - 16132).

A Tabela 4 apresenta uma estimativa do tamanho médio de cristalito calculado para cada uma das amostras sintetizadas, a partir da equação de Scherrer. Compete ressaltar também que para as amostras sintetizadas à 80°C (OCP) utilizou-se como referência o plano de difração 002 e para a amostra sintetizada em temperatura ambiente (DCPD) utilizou-se como referência o plano de difração 020, visto que tais amostras foram caracterizadas como sendo diferentes entre si, apresentando, inclusive, padrões de difração bem diferentes.

**Tabela 4.** Tamanhos médios dos cristalitos, calculados a partir da equação de Scherrer, com base no plano 002 para as amostras sintetizadas à 80 e 120°C e 020 para a amostra sintetizada em temperatura ambiente.

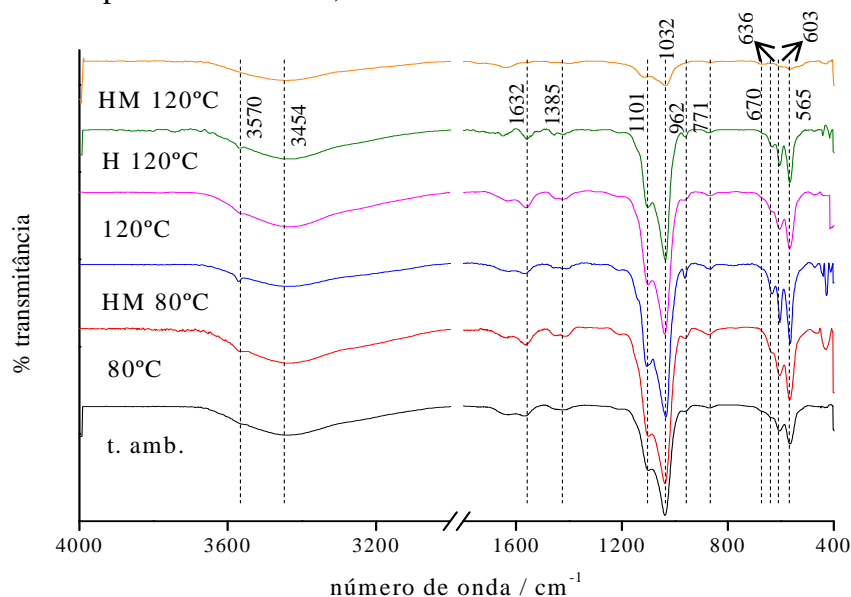
<i>Amostra</i>	<i>Síntese</i>	$\tau$ (nm)
DCPD	t. amb.	58,4
OCP	80°C	28,6
	HM80°C	33,5

De acordo com a relação de Bragg e a equação de Scherrer, como citado anteriormente, calculou-se o tamanho dos cristalitos tanto para o OCP quanto para o DCPD, onde se obteve para o DCPD um valor aproximado de 58 nm e para o OCP, 29 nm quando a síntese foi realizada em chapa aquecedora e 34 nm quando realizada em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas, mostrando mais uma vez que ambas as rotas de síntese não

apresentam diferenças significativas. Pode-se destacar, então que os cristallitos de DCPD são consideravelmente maiores, quando comparados aos do OCP, que por sua vez não apresentou muita diferença entre uma rota sintética e outra. Os valores encontrados para as amostras sintetizadas à 120°C não foram apresentados uma vez que estas amostras foram caracterizadas como sendo constituídas por misturas de fases, o que torna este valor irrelevante. Os parâmetros de rede apresentados para os sistemas aqui caracterizados (ICDS 065347 e 16132 para OCP e DCPD, respectivamente) indicaram  $a = 19,6920 \text{ \AA}$ ,  $b = 9,5230 \text{ \AA}$  e  $c = 6,8350 \text{ \AA}$  com volume de cela de  $1213,06 \text{ \AA}^3$  para o OCP e  $a = 5,8120 \text{ \AA}$ ,  $b = 15,1800 \text{ \AA}$  e  $c = 6,2390 \text{ \AA}$  com volume de cela de  $492,91 \text{ \AA}^3$  para o DCPD.

### 3.1.2. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A Figura 7 apresenta os espectros de infravermelho obtidos para as amostras de HAp sintetizadas em temperatura ambiente, 80 e 120°C.



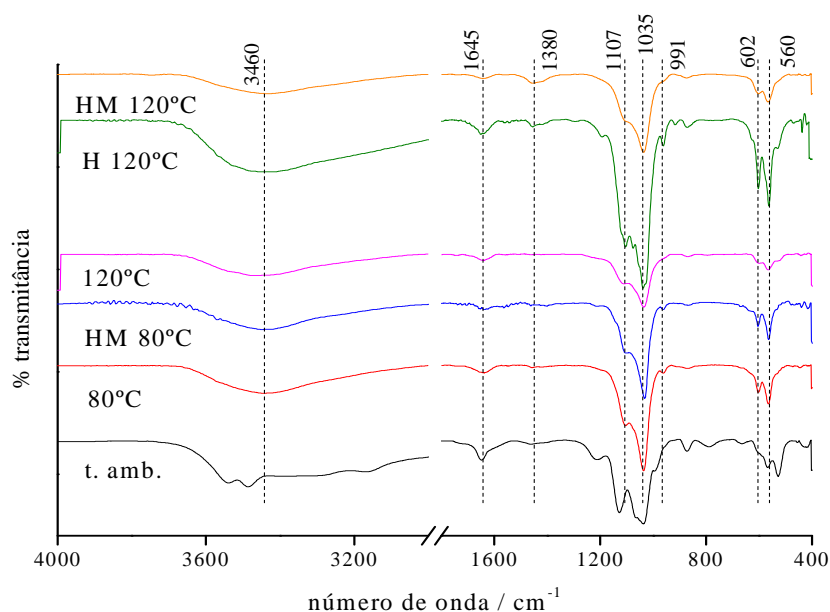
**Figura 7.** Espectros de IV para a HAp sintetizada em temperatura ambiente (—) a 80°C em chapa aquecedora (—) e em sistema hidrotérmal assistido por micro-ondas (—) e a 120°C em chapa aquecedora (—), em sistema hidrotérmal (—) e em sistema hidrotérmal assistido por micro-ondas (—).

A análise dos espectros de infravermelho das amostras de HAp, mostrou que, independente da rota sintética e da temperatura utilizada no processo de síntese, as amostras possuem perfis de infravermelho similares, sendo que para todas as amostras verificou-se a presença das bandas características da HAp. Nota-se em  $3570 \text{ cm}^{-1}$  a presença da banda

referente à presença de OH<sup>-</sup> estrutural, bem como em 636 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{OH}$ ), bandas estas que são típicas de OH da HAp (HAN et al., 2006). Também foram encontradas as bandas características de fosfato ((PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup>) em 565, 603, 962 e 1032-1101 cm<sup>-1</sup> ( $\delta_{PO_4^{3-}}$ ) e água residual em 1632 ( $\delta_{OH(H_2O)}$ ) e 3454 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{O-H(H_2O)}$ ). Nota-se ainda, em especial no material obtido em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas a 120°C, a presença de bandas pouco intensas de acetato em 670 ( $\delta_{COO^-(CH_3COO^-)}$ ) e de carbonato 771 ( $\nu_{3OCO}$ ) e 1385 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{asCO}$ ) (NAKAMOTO, 2009; VAIDYA et al., 1997), precursores na síntese. Vale ressaltar, no entanto que, proporcionalmente, considerando-se as intensidades das bandas, a presença de fosfato é muito maior que a presença de acetato em todos os casos, indicando que a reação foi efetiva.

Para a caracterização da HAp, em específico, destaca-se a presença de duas bandas, uma em 3572 cm<sup>-1</sup> e outra em 632 cm<sup>-1</sup> (HAN et al., 2006), bandas estas que são características da presença de hidroxila (OH) de HAp, sendo que ambas foram identificadas nos espectros de todas as amostras.

A Figura 8 apresenta os espectros de infravermelho obtidos para as amostras de OCP obtidas a 120 e 80°C, sendo que o espectro da amostra sintetizada em temperatura ambiente é referente ao DCPD.



**Figura 8.** Espectros de IV para o DCPD sintetizado em temperatura ambiente (—) e para o OCP sintetizado a 80°C em chapa aquecedora (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) e a 120°C em chapa aquecedora (—), em sistema hidrotermal (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—).

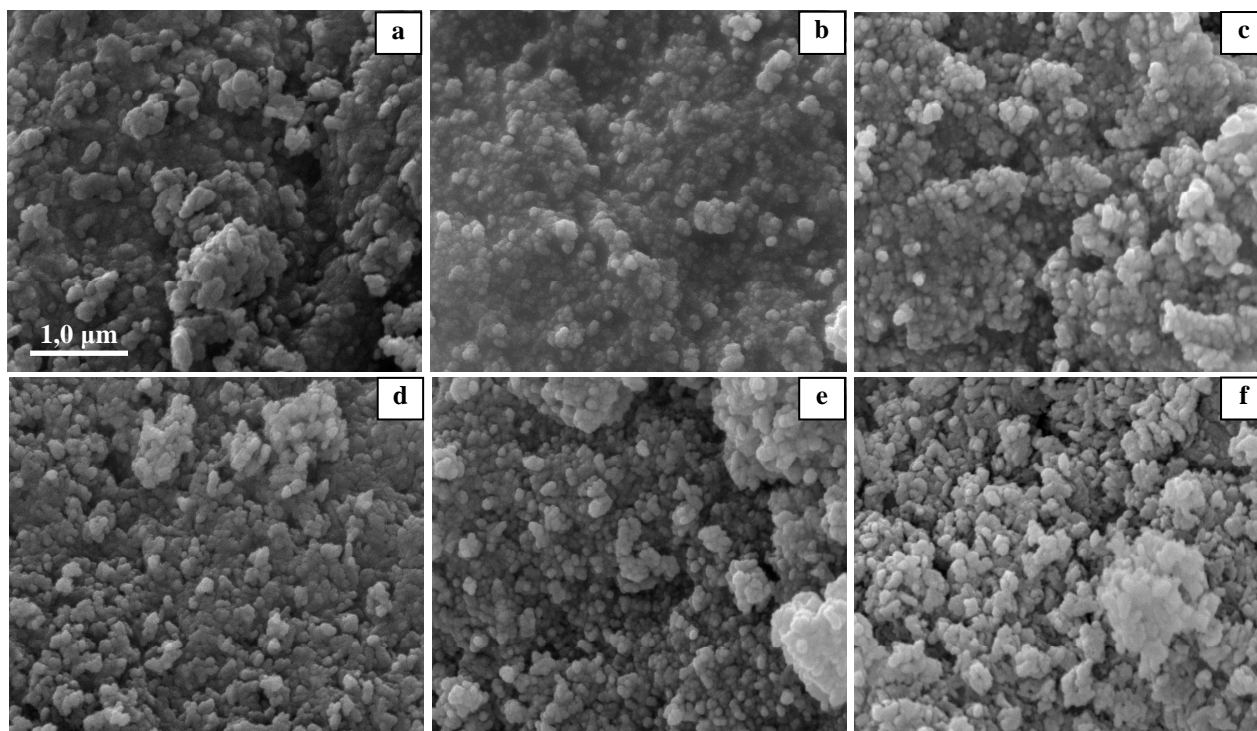
A análise dos espectros de infravermelho das amostras sintetizadas à 120°C, 80°C e em temperatura ambiente mostrou que em todos os espectros estão presentes as bandas características de fosfato em 1075-980, 600 e 560  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{PO}_4^{3-}}$ ) (NAKAMOTO, 2009), porém estas são menos intensas na amostra sintetizada em temperatura ambiente. A análise dos espectros também mostra bandas referentes ao carbonato ( $\text{CO}_3$ ) em 1380  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{CO}}$ ) (NAKAMOTO, 2009; BESSLER e RODRIGUES, 2008), precursor na síntese, porém de forma muito discreta, quando comparadas proporcionalmente com as bandas de fosfato. Pode-se verificar também, no espectro de infravermelho da amostra sintetizada em temperatura ambiente a presença de bandas em 873 e 985  $\text{cm}^{-1}$ , características do estiramento P-(OH) ( $\nu_{\text{P-(OH)}}$ ) de DCPD (KARAMPAS e KONTOYANNIS, 2013) e em 1218  $\text{cm}^{-1}$  a deformação O-H no plano ( $\delta_{\text{O-H}}$ ), também característica de DCPD (XU et al., 1999). Verifica-se ainda as bandas características de água residual em 1645 ( $\delta_{\text{OH(H}_2\text{O)}}$ ) e 3460  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{O-H(H}_2\text{O)}}$ ).

As análises por infravermelho indicam, então, a presença de fosfatos em todas as amostras analisadas e que a amostra sintetizada em temperatura ambiente apresenta bandas características de DCPD, sugerindo a presença deste fosfato em específico. Esta análise isolada, porém, não permite a caracterização do tipo de fosfato presente na amostra, fazendo necessária a complementação da caracterização com outras análises.

### 3.1.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise das imagens de MEV mostra que as sínteses em temperatura ambiente e em chapa aquecedora a 120°C apresentam certa quantidade de aglomerados, mas ainda assim é possível verificar a tendência em formar partículas globulares, que pode ser observada em todas as amostras sintetizadas, sendo que o diâmetro de partícula parece não ser influenciado pela rota de síntese, pois as imagens mostram partículas com certa homogeneidade tanto em forma quanto em diâmetro. Segundo Welzel e colaboradores (2004), é possível se conseguir hidroxiapatita globular com tamanho entre 60 e 90 nm, com cristalinidade variável a partir de reações de precipitação em temperatura ambiente, podendo-se notar tais características nos materiais obtidos no presente trabalho.

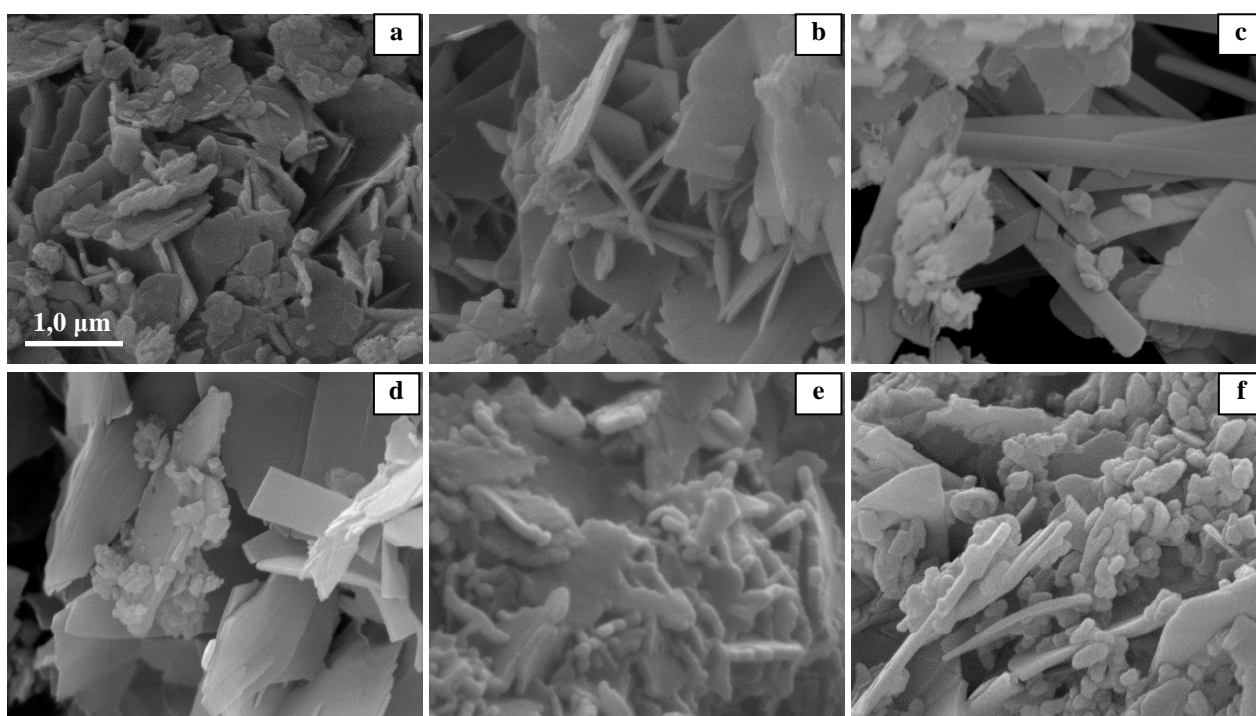
A Figura 9 apresenta as imagens de MEV para a hidroxiapatita obtida em temperatura ambiente, 80 e 120°C em chapa aquecedora, em processo hidrotermal e hidrotermal assistido por micro-ondas.



**Figura 9.** Imagens de MEV para a HAp obtida a (a) temperatura ambiente, em chapa aquecedora a (b) 120° e (c) 80°C, (d) 120°C em sistema hidrotermal e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas a (e) 120°C e (f) 80°C.

Muitos estudos (WANG e FU, 2011; WILSON et al., 2006; DESHPANDE et al., 2005; YANG et al., 2005; LIU et al., 2004; XU et al., 2004; KHOLLAM et al., 2001; KOMARNENI et al., 1999) mostraram que a síntese em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas pode ser utilizada no processamento de uma variedade de materiais (em especial para aqueles que são difíceis de se obter por métodos convencionais), com possibilidade de economia de tempo e energia. Alguns estudos, ainda, utilizaram o sistema hidrotermal micro-ondas na síntese da própria HAp (WANG e FU, 2011; HAN et al., 2006) com obtenção de partículas nanométricas, porém os dados aqui apresentados mostram que as diferentes rotas sintéticas não geraram diferenças significativas no material formado. Vale ressaltar que Wang e Fu (2011) e Han e seus colaboradores (2006) trabalharam com precursores diferentes em suas rotas sintéticas e temperaturas mais altas (140 e 300°C, respectivamente), o que pode justificar o fato de terem conseguido sintetizar partículas nanométricas, além de terem trabalhando apenas com a síntese em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas, com variação de temperatura, tempo e energia utilizada na síntese, não tendo comparado, então seus resultados com rotas de síntese diferentes.

A Figura 10 apresenta as imagens de MEV para as sínteses de OCP a 120°C e 80°C e para o DCPD sintetizado em temperatura ambiente. A análise por microscopia eletrônica de varredura indicou que as amostras aqui sintetizadas apresentaram formas que se assemelham a placas, sem morfologia regular (tamanhos polidispersos), sendo que em cada caso notam-se particularidades, como placas mais largas e mais espessas, como na síntese em temperatura ambiente, e mais compactas quando há aumento de temperatura (120°C ou 80°C). O sistema hidrotermal possibilitou a formação de placas mais estreitas e com menores dimensões misturadas a aglomerados. O sistema hidrotermal assistido por micro-ondas que gerou a formação de placas menos espessas, mas pode-se notar também a presença de aglomerados.



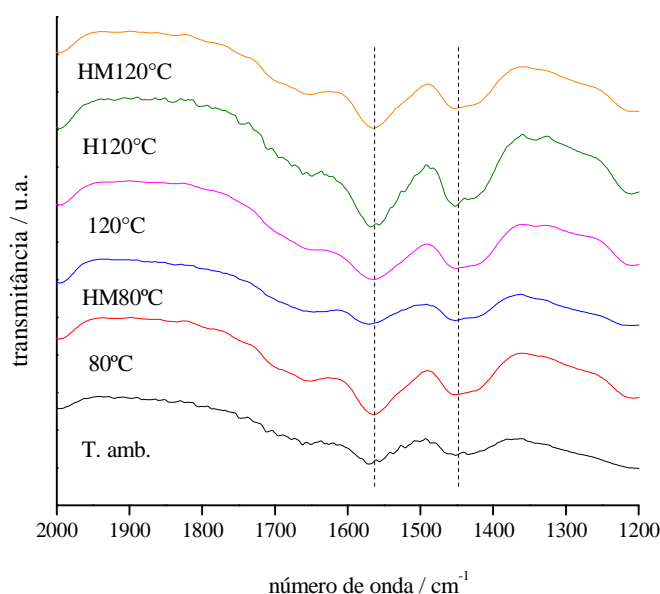
**Figura 10.** Imagens de MEV para o (a) DCPD, para as misturas de fases obtidas a 120°C (b) em chapa aquecedora, (c) em sistema hidrotermal e (d) em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas e para o OCP obtido a 80°C em (e) chapa aquecedora e (f) sistema hidrotermal assistido por micro-ondas.

### 3.2. TESTE DE ADSORÇÃO DE PIRIDINA

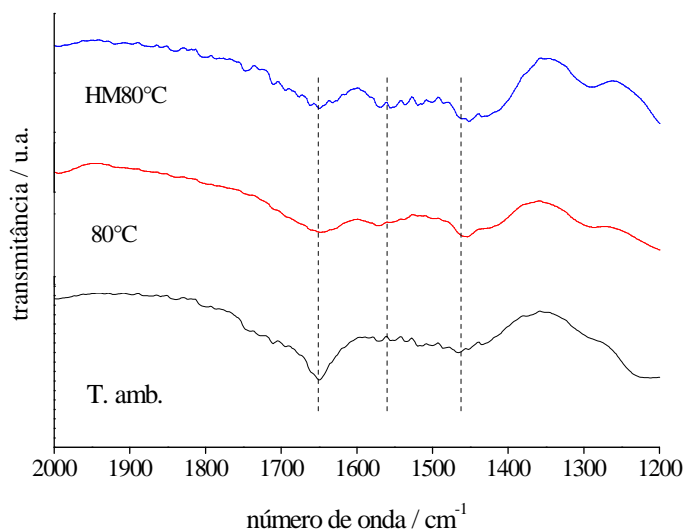
Para verificar o tipo de sítios ácidos (Brønsted e Lewis) presentes nas amostras preparadas foram realizadas análises no infravermelho antes e após a adsorção de piridina. A piridina tem sido a molécula mais estudada para estes tipos de interação, sendo capaz de reagir com os sítios ácidos de Brønsted bem como os de Lewis, que absorvem em diferentes

bandas de frequência no infravermelho, na região compreendida entre 1400-1600  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas em 1545-1555 e 1445-1455  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas à interação da piridina com sítios de Brönsted e de Lewis, respectivamente. A banda na região de 1490  $\text{cm}^{-1}$  é característica da interação da piridina com ambos os sítios (Lewis e de Brönsted) (PIRES et al., 1998).

Pela definição de Brönsted-Lowry o ácido será qualquer substância que atue como um doador do cátion hidrogênio (próton,  $\text{H}^+$ ), e a base qualquer substância que receba o próton, independente da natureza do solvente. Segundo Lewis, o ácido é qualquer substância que atue como receptora de um par de elétrons, e a base, por sua vez, como doadora de um par de elétrons (ATKINS e JONES, 2012). Assim sendo, quando ocorre a interação com os sítios de Brönsted, a piridina atua doando um par de elétrons ao fosfato. Por outro lado, quando há interação da piridina com os sítios ácidos de Lewis, isto se torna possível porque o fósforo, ao hibridizar seus orbitais 3d, sendo estabilizado por forças eletrostáticas (COTTON e WILKINSON, 1930), pode receber elétrons da piridina. As Figuras 11 e 12 apresentam os espectros de IV obtidos para as amostras após o teste de adsorção de piridina.



**Figura 11.** Espectros de IV para a HAp sintetizada em temperatura ambiente (—), a 80°C em chapa aquecedora (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) e a 120°C em chapa aquecedora (—), em sistema hidrotermal (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) após o teste de adsorção de piridina.



**Figura 12.** Espectros de IV para o DCPD sintetizado em temperatura ambiente (—) e para o OCP sintetizado a 80°C em chapa aquecedora (—) e em sistema hidrotermal assistido por micro-ondas (—) após o teste de adsorção de piridina.

A presença de sítios ácidos, quando do teste de adsorção com piridina, é caracterizada pela presença de duas bandas de absorção. A primeira banda corresponde à adsorção de piridina em centros ácidos de Brønsted, a partir da formação do íon piridínio e a segunda banda é atribuída à adsorção de piridina em centros ácidos de Lewis, correspondendo à coordenação da molécula de piridina com tais centros, por doação de um par eletrônico (PIRES et al., 1998). A análise dos espectros de infravermelho permite caracterizar a presença de ambos os sítios ácidos em todas as amostras sintetizadas, tanto de HAp, quanto de OCP e DCPD, o que mostra que a rota de síntese não interfere nas características químicas de superfície dos materiais formados. A presença dos sítios ácidos indica, ainda, que os materiais sintetizados possuem capacidade de se ligar a moléculas que possuam pares de elétrons livres, como é o caso do colágeno, que apresenta bases nitrogenadas em sua estrutura.

Tanto no que se refere às características estruturais (cristalinidade) e morfológicas quanto às características químicas de superfície indicam que estes fosfatos podem ser utilizados na formação de compósitos com colágeno, material que vem sendo muito estudado como uma grande oportunidade para reparação e substituição em procedimentos ortopédicos e odontológicos.

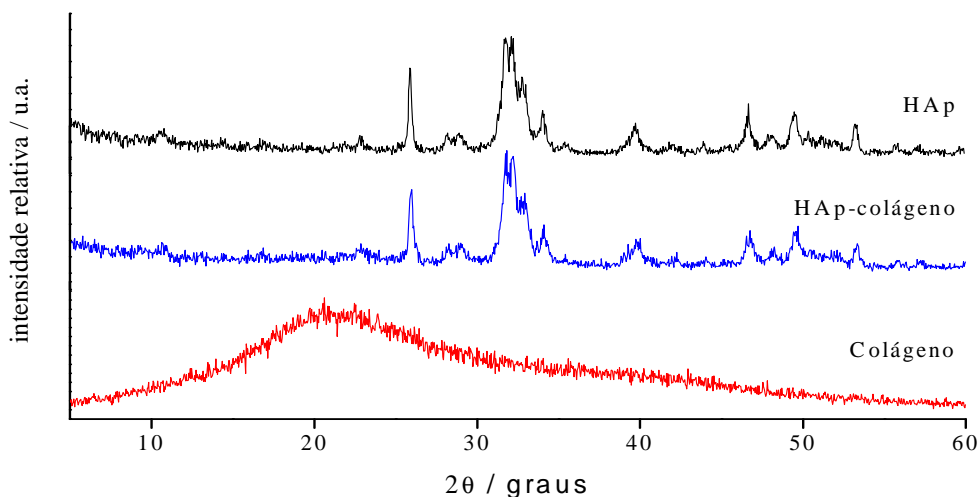
### 3.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPÓSITOS

#### 3.3.1. Difração de Raios X (DRX)

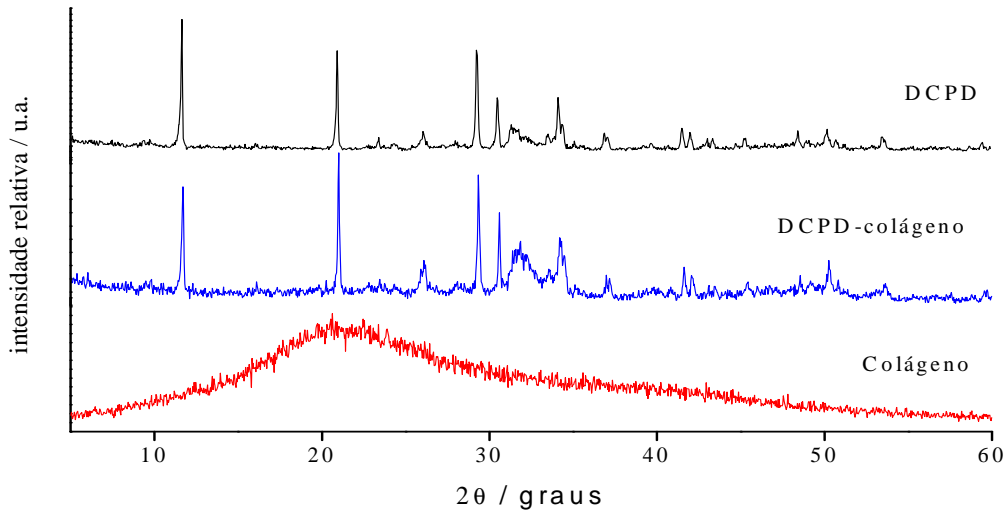
As análises por difração de raios X foram realizadas para os compósitos com intuito de verificar possíveis alterações no padrão de difração dos fosfatos quando puros. No que se refere ao difratograma do colágeno (liofilizado), por este ser uma estrutura orgânica complexa, o resultado apresentou-se dentro do esperado, com ausência de picos, caracterizando uma estrutura não cristalina.

Os difratogramas dos compósitos não foram significativamente diferentes dos difratogramas dos fosfatos puros, indicando que do ponto de vista da fase mineral, esta é estruturalmente semelhante àquela do material obtido na ausência de colágeno, não sendo possível detectar um padrão de difração da presença do colágeno quando foi realizada a análise do compósito. Isto pode ser justificado pelo fato de o colágeno não apresentar difratograma característico por não ser uma amostra cristalina e por se encontrar em menor proporção na composição do compósito.

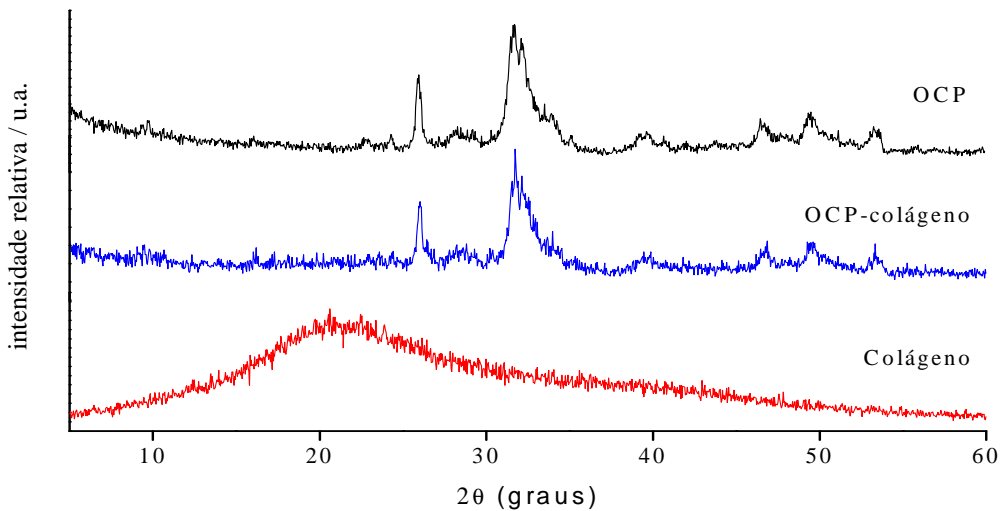
As figuras 13 a 15 apresentam os difratogramas de raios X dos compósitos sintetizados.



**Figura 13.** Difratogramas para a HAp (—), para o compósito HAp-Colágeno (—) e para o colágeno (—).



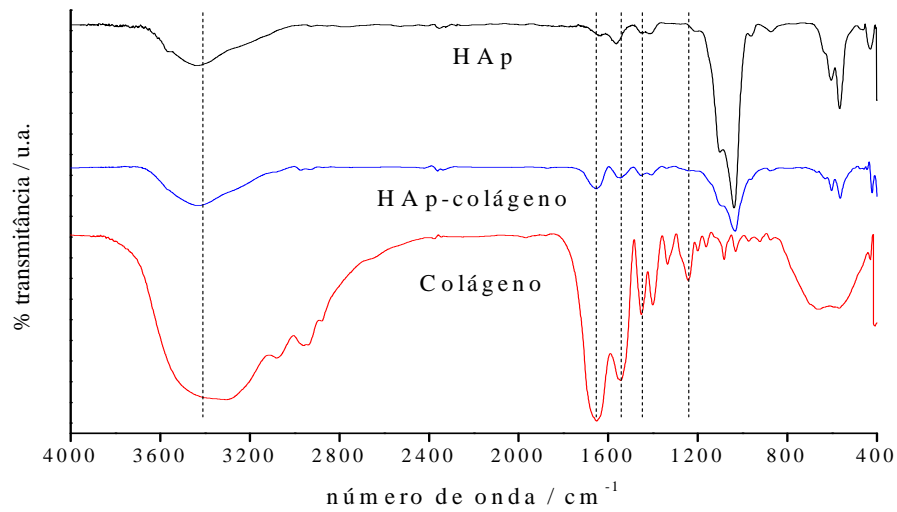
**Figura 14.** Difrátogramas para o DCPD (—), para o compósito DCPD-Colágeno (—) e para o colágeno (—).



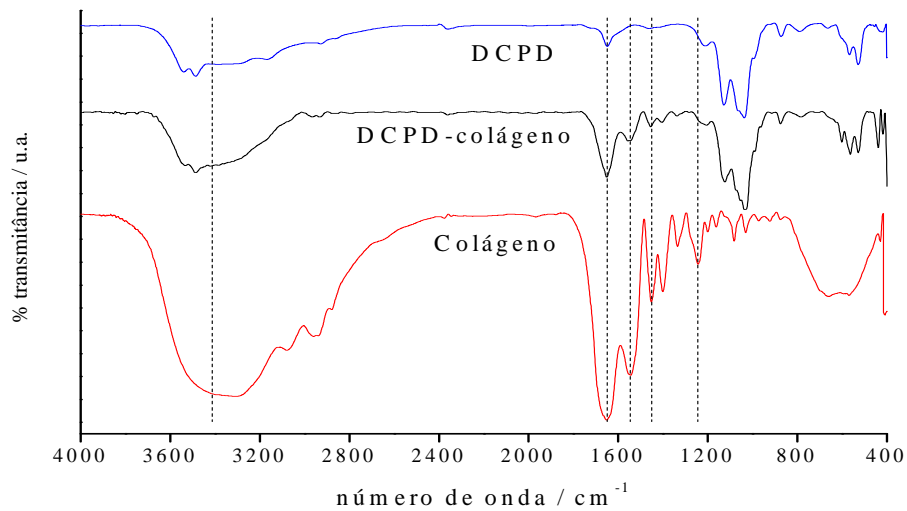
**Figura 15.** Difrátogramas para o OCP (—), para o compósito OCP-Colágeno (—) e para o colágeno (—).

### 3.3.2. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

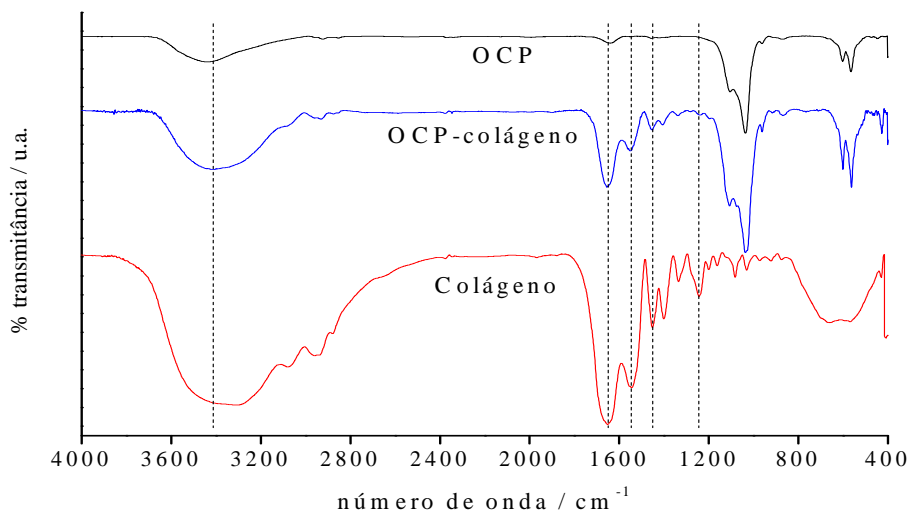
Realizou-se a espectroscopia de infravermelho com cada um dos compósitos para verificar possíveis alterações nos perfis desses espectros quando comparados com perfis das amostras de fosfato puro. As Figuras 16 a 18 apresentam os espectros de infravermelho obtidos para os compósitos sintetizados.



**Figura 16.** Espectros de IV para a HAp (—), para o composto HAp-Colágeno (—) e para o colágeno (—).



**Figura 17.** Espectros de IV para o DCPD (—), para o composto DCPD-Colágeno (—) e para o colágeno (—).



**Figura 18.** Espectros de IV para o OCP (—), para o composto OCP-Colágeno (—) e para o colágeno (—).

O espectro do colágeno (Figuras 16 a 18) apresenta suas bandas principais em  $1650\text{ cm}^{-1}$ , típica de amida I, devido ao estiramento da carbonila ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), em  $1560\text{ cm}^{-1}$ , relacionado à amida II, devido as vibrações no plano da ligação N-H ( $\nu_{\text{N-H}}$ ) e ao estiramento C-N ( $\nu_{\text{C-N}}$ ), em  $1235\text{ cm}^{-1}$ , correspondente às vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N ( $\nu_{\text{C-N}}$ ) e à deformação N-H ( $\delta_{\text{N-H}}$ ), em  $1450\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à estereoquímica dos anéis pirrolidínicos e próximo a  $3450\text{ cm}^{-1}$ , devido ao estiramento O-H ( $\nu_{\text{O-H}}$ ) (TONHI e PLEPIS, 2002; RENUGOPALAKRISHNAN et al., 1989).

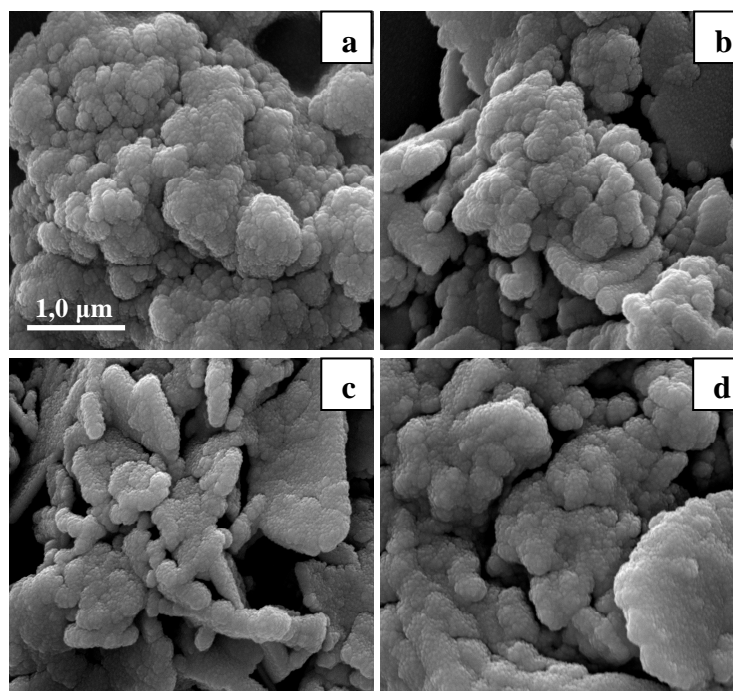
A razão entre as absorvância relativa das bandas  $1235$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  ( $A_{1235}/A_{1450}$ ), bandas estas que correspondem, respectivamente, ao estiramento das ligações C-N (amida III), sensível a variações estruturais do colágeno e ao empacotamento do anel pirrolidínico da prolina e hidroxiprolina que não são sensíveis a variações da estrutura secundária da proteína (RENUGOPALAKRISHNAN et al., 1989), próxima a 1 (GORDON et al., 1974) é indicativa da preservação da estrutura secundária em tripla hélice da molécula de colágeno, sugerindo que o procedimento de síntese do compósito não desnatura o colágeno. O colágeno utilizado apresentou, inicialmente, razão de 1,22. Os compósitos com HAp, DCPD e OCP, por sua vez, apresentaram, respectivamente, os valores 1,04; 1,01 e 1,05, indicando a preservação da estrutura. Vale ressaltar que a presença de GA nas amostras também colaborou na redução a intensidade relativa das bandas visto que ele atuará na formação de ligações intercruzadas com o colágeno.

Em todos os casos nota-se que os espectros de infravermelho dos compósitos seguem apresentando as bandas características de fosfato, citadas anteriormente, complementados pelas bandas de IV características do espectro do colágeno, em especial as bandas a  $1650$ ,  $1560$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ , o que sugere que o material analisado contém ambos os compostos (fosfato e colágeno) coexistindo, sem alterar suas respectivas estruturas.

### 3.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com relação às análises das micrografias dos compósitos, percebe-se a mesma morfologia verificada para os fosfatos puros (globular para a HAp e em placas para o DCPD e o OCP), mas que estas encontram-se ligadas, ou até mesmo encapsuladas pela estrutura colagênica, que aqui apresentou-se também como sendo formada por pequenas esferas que se unem em forma de aglomerados. A estrutura do colágeno não se apresentou aqui em forma de fibras pelo fato de o colágeno utilizado ser um colágeno hidrolisado, que passa por processos

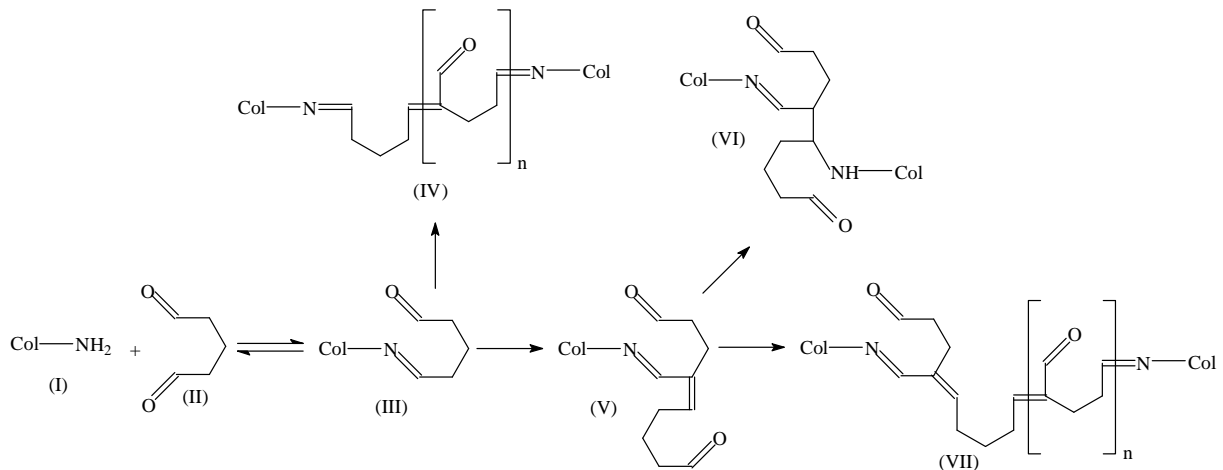
de beneficiamento até chegar ao consumidor, o que altera suas características morfológicas. A Figura 19 apresenta as imagens de MEV para o colágeno e os compósitos obtidos.



**Figura 19.** Imagem de MEV para os compósitos de (a) HAp-Col, (b) DCPD-Col e (c) OCP-Col e (d) colágeno.

Geralmente assume-se que a reticulação de colágeno com o GA (Esquema 2) realiza-se através da reação dos grupos aldeído de GA (II) com os grupos  $\epsilon$ -amina da lisina ou resíduos de hidroxilisina (I). Esta reação resulta na formação de uma base de Schiff intermediária (III). Sugere-se que as bases de Schiff são estáveis sob as condições de reticulação e que a reticulação envolve a formação de polímeros de GA (IV) devido a reações de condensação de aldólica. Além disso, a formação de um  $\alpha$ - $\beta$  base de Schiff insaturada intermediária (V) seguido de adição de Michael de um grupo amina de colágeno com o grupo insaturado de V para dar VI resulta na formação de uma reticulação. Também, a formação de uma ligação transversal é possível por meio da reação dos grupos de amina com os grupos aldeídos livres de V para dar VII ( $n = 0$ ), ou um grupo aldeído livre restante após a polimerização aldólica de V para dar VII ( $n > 0$ ) (DAMINK et al., 1995).

As reticulações são estabilizadas por reações posteriores com outras moléculas de GA, durante a formação de ligações cruzadas (DAMINK et al., 1995). Estas condições sugerem que no processo de reticulação há a formação de estruturas tridimensionais do colágeno e que o fosfato deve estar sendo aprisionado nos interstícios do retículo de colágeno.



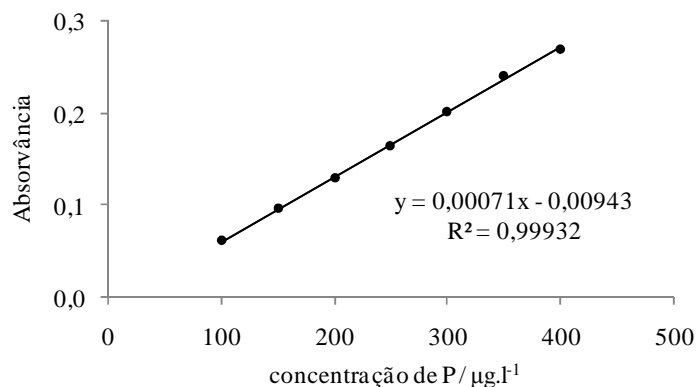
**Esquema 2.** Reticulação entre colágeno e glutaraldeído (DAMINK et al., 1995).

Diante de tais considerações avalia-se então que o material formado na verdade deve ser caracterizado como sendo uma mistura (blenda), pois estas se constituem na mistura (física ou mecânica) de pelo menos dois materiais, de forma que só exista interação intermolecular secundária, sem que haja reação química entre os mesmos. Através da formação de blendas é possível obter uma sinergia das propriedades individuais de cada material, além da possibilidade de melhorar ou controlar suas propriedades mecânicas finais devido à interação entre as estruturas químicas (CALLISTER, 2002).

### 3.4. DETERMINAÇÃO DA RAZÃO MOLAR CÁLCIO/FÓSFORO (Ca/P)

#### 3.4.1. Cálculo da razão molar cálcio/fósforo (Ca/P)

A Figura 20 apresenta a curva de calibração obtida a partir da determinação espectrofotométrica de P.

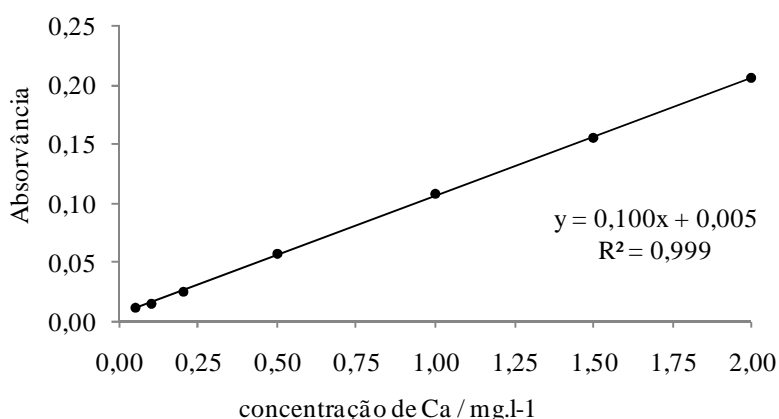


**Figura 20.** Curva de calibração para a determinação de fósforo.

A partir da análise das amostras e sua correlação com a curva de calibração obtida determinou-se a concentração para as soluções preparadas para a HAp, o DCPD e o OCP como sendo, respectivamente, de 268, 21  $\mu\text{g/l}$ , 251,78  $\mu\text{g/l}$  e 271,03  $\mu\text{g/l}$ .

Considerando-se a diluição feita e a quantidade de amostra utilizada na preparação da solução estoque obteve-se que a quantidade de mols de fósforo em 1 g de amostra para a HAp, o DCPD e o OCP de, respectivamente, de 0,0045; 0,0040 e 0,0046 mols.

A Figura 21 apresenta a curva de calibração obtida a partir da determinação via absorção atômica de Ca.



**Figura 21.** Curva de calibração para a determinação de cálcio.

A partir da análise das amostras e sua correlação com a curva de calibração obtida determinou-se a concentração para as soluções preparadas para a HAp, o DCPD e o OCP como sendo, respectivamente, de 0,674 mg/l, 0,933 mg/l e 0,840 mg/l.

Considerando-se a diluição feita e a quantidade de material utilizado na preparação da solução estoque obteve-se que a quantidade de mols de cálcio em 1 g de amostra para a HAp, o DCPD e o OCP de, respectivamente, de 0,0084; 0,0068 e 0,0084 mols.

A partir do número de mols de cálcio e fósforo obtidos para cada um dos fosfatos, pode-se calcular a razão molar Ca/P, como é apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Razão molar Ca/P para a HAp, o DCPD e o OCP.

	$n(\text{P})/1\text{g de amostra}$	$n(\text{Ca})/1\text{g de amostra}$	Razão molar Ca/P
HAp	0,0045	0,0084	1,87
DCPD	0,0040	0,0068	1,7
OCP	0,0046	0,0084	1,83

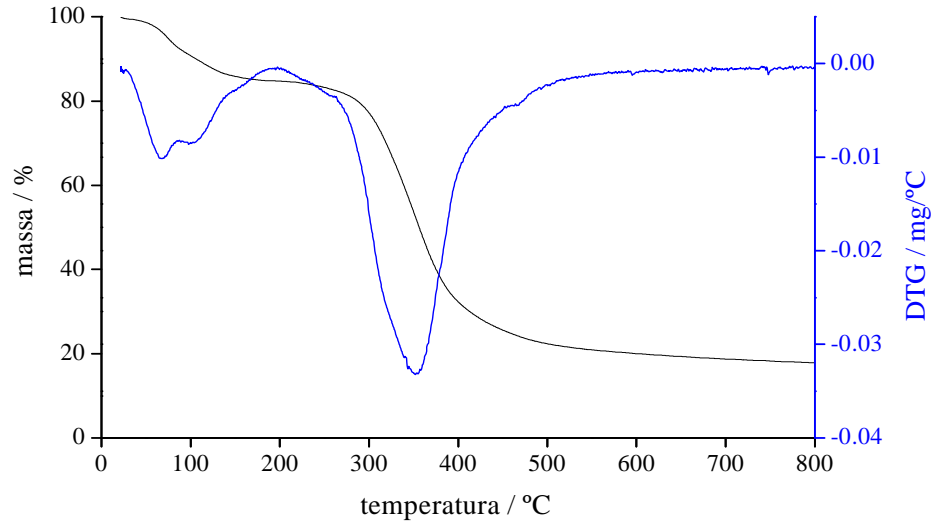
Os valores obtidos para as razões molares Ca/P, em especial para o DCPD e o OCP, apresentaram-se muito elevados em relação ao valor estabelecido como referência, 1,0 e 1,33, respectivamente. No caso da HAp, o valor é de 1,67. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que as reações não estão tendo rendimento de 100%, o que faz com que parte do cálcio quantificado seja proveniente dos precursores de reação ( $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , no caso da HAp e  $\text{CaCO}_3$  no caso do DCPD e OCP), fato este que havia sido identificado na interpretação dos espectros de infravermelho das amostras.

No caso do DCPD e OCP, que partem dos mesmos precursores de síntese pode-se perceber que para o DCPD, que é sintetizado em temperatura ambiente, a razão molar é, proporcionalmente, a mais elevada em relação ao seu valor de referência (70%), o que pode ser justificado pela baixa solubilidade do  $\text{CaCO}_3$  em temperatura ambiente, solubilidade esta que aumenta com o aumento da temperatura, e conseqüentemente, devendo aumentar o rendimento da reação, justificando uma menor alteração da razão molar Ca/P encontrada para o OCP e seu valor de referência (28%). No caso da HAp, notou-se apenas uma pequena variação no valor da razão molar Ca/P em relação ao seu valor de referência (12%), o que leva a crer que há um maior rendimento para esta reação, o que é facilitado pela solubilidade do acetato de cálcio em água.

### 3.5. ESTUDO DA ESTABILIDADE TÉRMICA

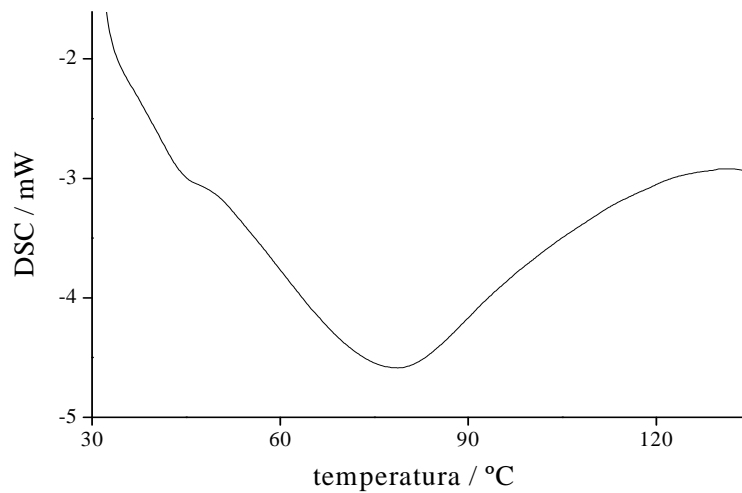
As curvas de DSC permitem identificar eventos de desnaturação térmica do colágeno, quando esse é aquecido. Quando o colágeno é submetido a altas temperaturas acontece a quebra das ligações intermoleculares e a proteína, uma estrutura cristalina e altamente organizada, passa a ser formada por um estado com distribuição aleatória (BADEA et al., 2008; ARNO CZKY e AKSAN, 2000). As curvas de DSC relacionam a transição térmica do material com a temperatura de desnaturação ( $T_d$ ) do mesmo.

A Figura 22 mostra as curvas de TG/DTG obtidas para o colágeno. As curvas apresentam dois episódios. O primeiro, entre 25 e 190°C, relativo à perda de água estrutural, com perda de massa de aproximadamente 13%. O segundo, na faixa entre 190 e 500°C, referente à degradação térmica das cadeias poliméricas do colágeno (HORN, 2008), com perda de massa de aproximadamente 65%. A parte mineral inorgânica, que corresponde ao resíduo encontrado a 950°C (BATISTA et al., 2009), foi de 17%.



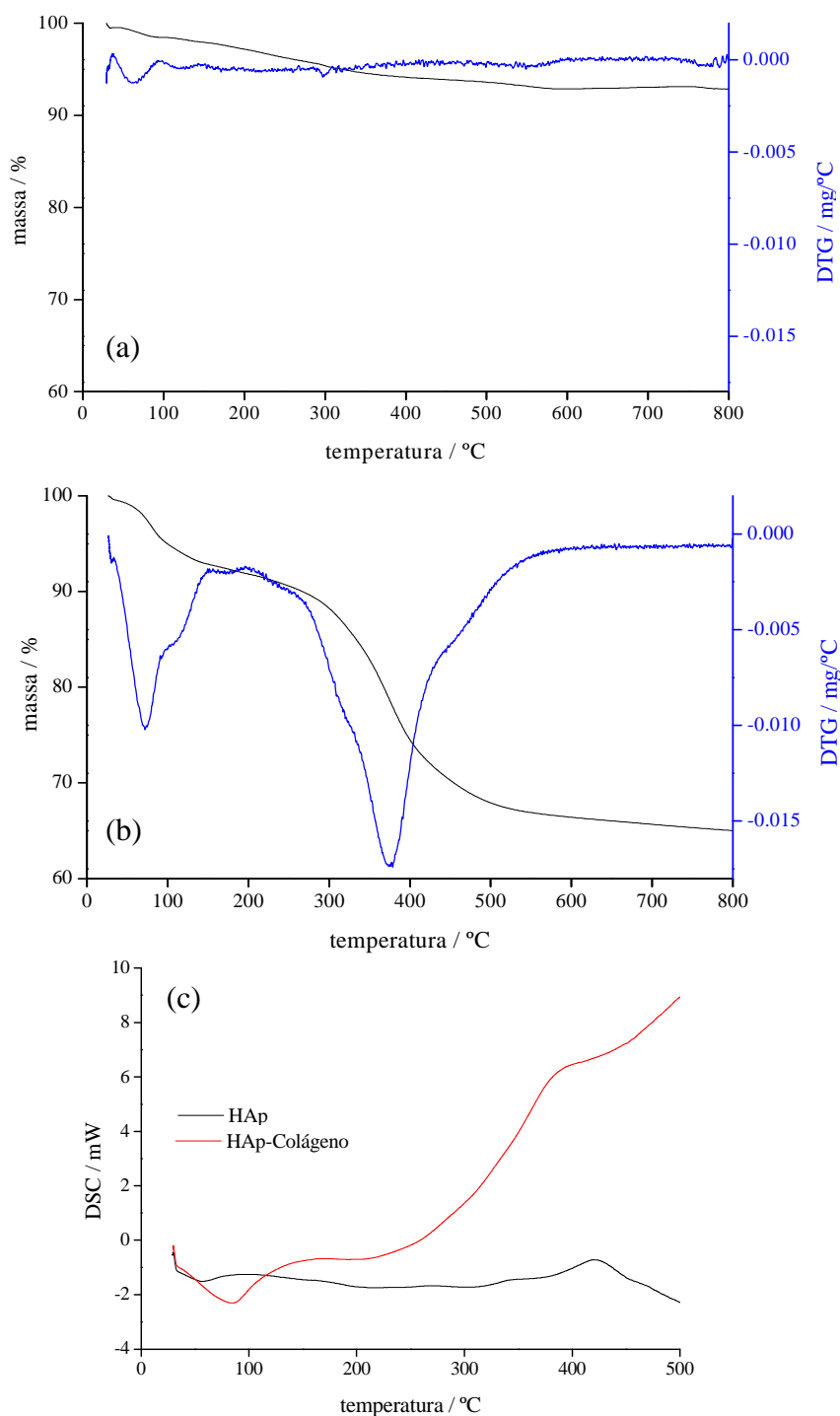
**Figura 22.** Curvas de TG/DTG obtidas para o colágeno.

A curva de DSC para o colágeno (Figura 23) permitiu a determinação da temperatura de desnaturação ( $T_d$ ) do colágeno utilizado para a preparação das misturas, obtida a partir do ponto médio de inflexão da curva de DSC (LOCILENTO, 2012), como sendo de 60,1°C.



**Figura 23.** Curva de DSC obtida para o colágeno.

As Figuras 24 a 26 apresentam, respectivamente as curvas de TG e DTG para a HAp, para o OCP, para o DCPD e suas misturas com colágeno, juntamente com suas respectivas curvas de DSC.



**Figura 24.** Curvas de TG/DTG obtidas para a (a) HAp, para a (b) mistura HAp-Colágeno e (c) e curvas de DSC para os mesmos.

Como pode ser visto na Figura 24a a HAp pura apresentou duas etapas de perda de massa. A primeira, entre 40 e 589°C, atribuída à evaporação de água adsorvida na superfície e nos poros do material, cuja porcentagem da perda de massa foi de aproximadamente 5,2%. A segunda, entre 750 e 800 °C, atribuída à liberação de grupamentos H<sub>2</sub>O dos cristais de

hidroxiapatita, com uma perda de massa de aproximadamente 0,2%. A decomposição da HAp, termicamente estável até 800°C, pode ser dividida em duas etapas, de acordo com as reações (ADOLFSSON et al., 1999):



e



Nota-se ainda, na faixa de temperatura entre 400 e 750°C um perda de massa de aproximadamente 1,4% que pode ser atribuída à perda de carbonatos (TADIC e EPPLE, 2004), o que pode indicar que a HAp encontra-se na forma de HAp carbonatada.

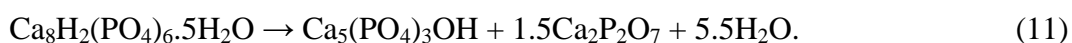
O resíduo (T=800°C) para a HAp pura foi de 93%. No entanto, quando se considera a mistura HAp-Colágeno (Figura 24b), esse resíduo diminui para 65%, indicando que 28% da perda de massa sofrida pela mistura é referente à degradação térmica e carbonização do colágeno.

A figura 24c ilustra a curva de DSC da HAp pura e na forma de mistura com colágeno. Observa-se para a HAp pura um pico endotérmico em aproximadamente 57°C que corresponde à perda de água fisicamente adsorvida na molécula. Observa-se, ainda, uma banda exotérmica, com maior intensidade em aproximadamente 420°C indicativa da desidroxilação do material com alteração da estrutura cristalina (OLIVEIRA, 2010). Para a mistura de HAp, verificou-se duas bandas endotérmicas, uma à 85°C característica da desnaturação do colágeno e outra em 250°C, referente à degradação térmica do colágeno. A banda exotérmica em aproximadamente 390°C é atribuída à carbonização do polímero.

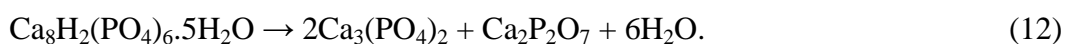
Na análise térmica do OCP (Figura 25) verifica-se que o aquecimento até aproximadamente 100°C (Figura 25a) leva à perda da água de hidratação que se encontra adsorvida ao material, com redução de massa de 1,2%. Em torno de 150°C há uma nova redução de massa, dessa vez de 1,3% referente à perda da água de cristalização do OCP, de acordo com a equação (FOWLER et al., 1966):



Uma terceira perda de massa (0,8%) é verificada entre 300 e 400°C, sendo essa perda característica da formação de  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , (FOWLER et al., 1966), de acordo com a reação:



Acima de 700°C forma-se  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , com uma perda de massa de 0,4%, de acordo com a seguinte equação geral (FOWLER et al., 1966):



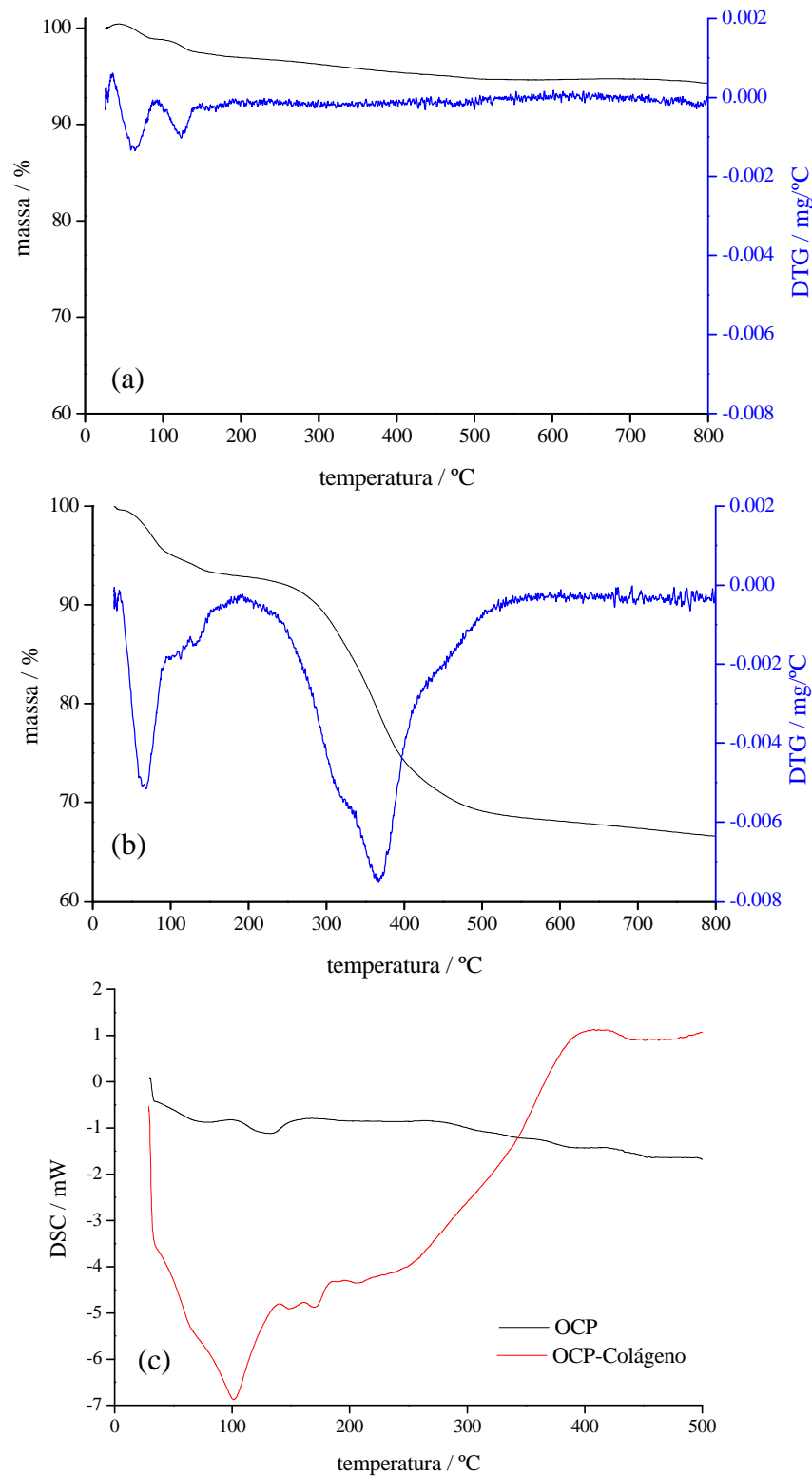
O resíduo obtido para a o OCP puro foi de 94% (à 800°C), enquanto que para a mistura OCP-Col, à mesma temperatura, o resíduo foi de 67%, indicando que 27% da massa perdida pela mistura é referente à degradação térmica e carbonização do colágeno.

As curvas de DSC para o OCP (Figura 25c) indicaram, para o fosfato, duas bandas endotérmicas, uma em aproximadamente 79°C e outra em 130°C que representam, respectivamente, a perda de água fisicamente adsorvida e a perda da água de cristalização. Para a mistura, verificou-se uma banda endotérmica em 100°C referente à desnaturação do colágeno, outra endotérmica em 250°C referente à degradação térmica do colágeno e por fim, uma banda exotérmica em 404°C, característica da carbonização do colágeno.

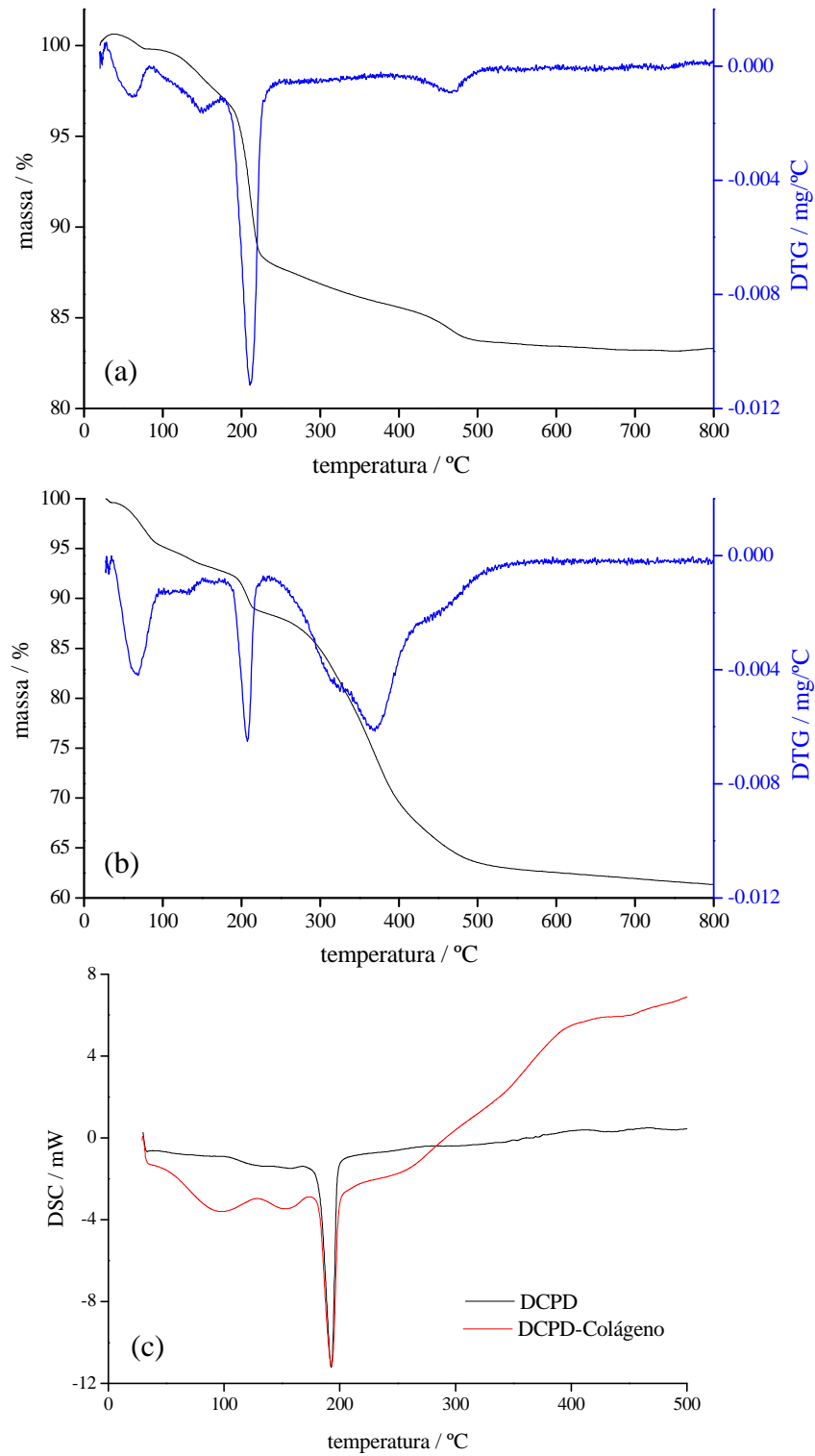
Na Figura 26, encontram-se as análises térmicas realizadas para o DCPD. A perda de massa é iniciada em 100°C (1%) devido à perda de água fisicamente adsorvida. Em, aproximadamente 200°C, acontece a perda da água de cristalização, com perda de 12% da massa. Entre 230 e 490°C há uma perda de massa de 4,2% referente à formação de  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (JOSHI e JOSHI, 2003) (Figura 26a).

Na curva de DSC para o DCPD (Figura 26c) puro verifica-se a presença de dois picos endotérmicos. O primeiro, em 160°C, é característico da perda de água fisicamente adsorvida. O segundo, em 192°C, é referente à perda da água de cristalização do DCPD, levando à formação do mono-hidrogênio fosfato de cálcio anidro (DCPA,  $\text{CaHPO}_4$ ). Após a saída da água de cristalização, ocorre um rearranjo estrutural mediante o qual se obtém uma nova fase cristalina, também chamada de monetita, de acordo com a equação (JOSHI e JOSHI, 2003):





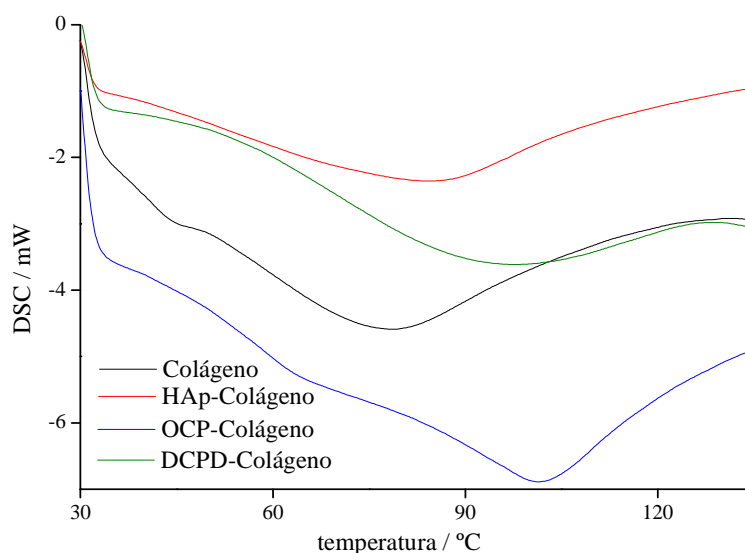
**Figura 25.** Curvas de TG/DTG obtidas para o (a) OCP, para a (b) mistura OCP-Colágeno e (c) e curvas de DSC para os mesmos.



**Figura 26.** Curvas de TG/DTG obtidas para o (a) DCPD, para a (b) mistura DCPD-Colágeno e (c) e curvas de DSC para os mesmos.

A curva de DSC para a mistura DCPD-Col (Figura 26c) apresenta, além dos picos citados para o DCPD puro, um pico endotérmico em 248°C, referente à degradação térmica do colágeno e, um outro pico, exotérmico, em 405°C, referente à carbonização polimérica do colágeno.

A Figura 27 apresenta as curvas de DSC obtidas para o colágeno puro e para as misturas formados com o colágeno e os fosfatos de cálcio avaliados.



**Figura 27.** Curvas de DSC obtida para o colágeno puro e na forma de mistura com HAp, OCP e DCPD.

Como considerado anteriormente, as curvas de DSC permitem calcular a temperatura de desnaturação do colágeno a partir da inflexão da curva, esteja ele puro ou em presença de outros materiais. A Tabela 6 apresenta os valores de  $T_d$  determinadas a partir das curvas de DSC apresentadas na Figura 27.

**Tabela 6.** Temperatura de desnaturação do colágeno puro e suas misturas com HAp, OCP e DCPD.

<i>Material</i>	<i>Temperatura de desnaturação (<math>T_d</math>) / °C</i>
Colágeno	60,1
HAp-Colágeno	58,9
OCP-Colágeno	83,2
DCPD-Colágeno	80,1

Os resultados da Tabela 4 mostram que a mistura com HAp não gerou alteração significativa na  $T_d$  encontrada para o colágeno puro. No entanto, as misturas com OCP e

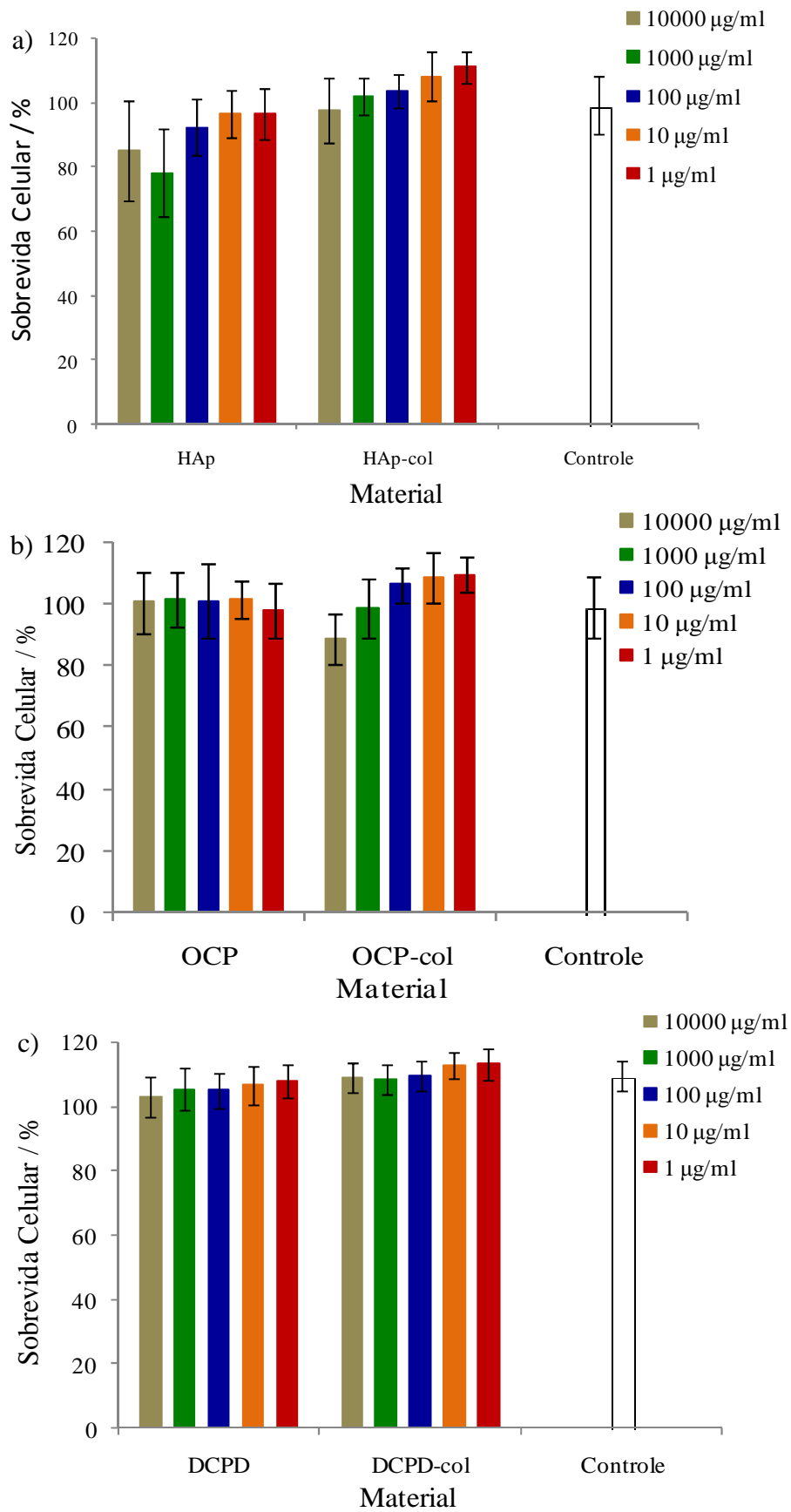
DCPD geraram um aumento na  $T_d$  de 38,4 e 33,3% respectivamente. Um aumento da  $T_d$  significa um aumento da estabilidade das moléculas do colágeno ou da resistência da molécula da proteína em se desdobrar devido ao tratamento térmico. O aumento da estabilidade das fibras é representado pela presença de um pico alargado e/ou de “ombros” na curva (GELINSKY et al., 2008).

### **3.6. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO DO MTT**

O ensaio colorimétrico de MTT é baseado na capacidade que a mitocôndria celular tem de reduzir o MTT, causando alteração de cor, o que pode ser quantificado por espectrofotometria. Como esse tipo de redução só ocorre em células metabolicamente ativas, pode-se determinar o nível de atividade celular comparando-se a quantidade de células viáveis após incubação com os materiais testados em relação à incubação de células em condições idênticas, sem adição de interferentes, podendo-se definir, desta forma, se o composto avaliado tem efeito citotóxico ou não sobre a célula.

Todos os grupos experimentais aqui testados não demonstraram diferença significativa em relação ao grupo controle (branco) ( $p > 0,05$ ). Apesar de algumas diferenças significativas entre os grupos analisados, destaca-se que todos os compostos testados, com colágeno ou não, não apresentaram diferenças significativas com o grupo controle (com adição apenas de DMSO) indicando que todos os materiais foram caracterizados como não sendo citotóxicos, ainda que alguns possuam maior ou menor efeito sobre as células cultivadas.

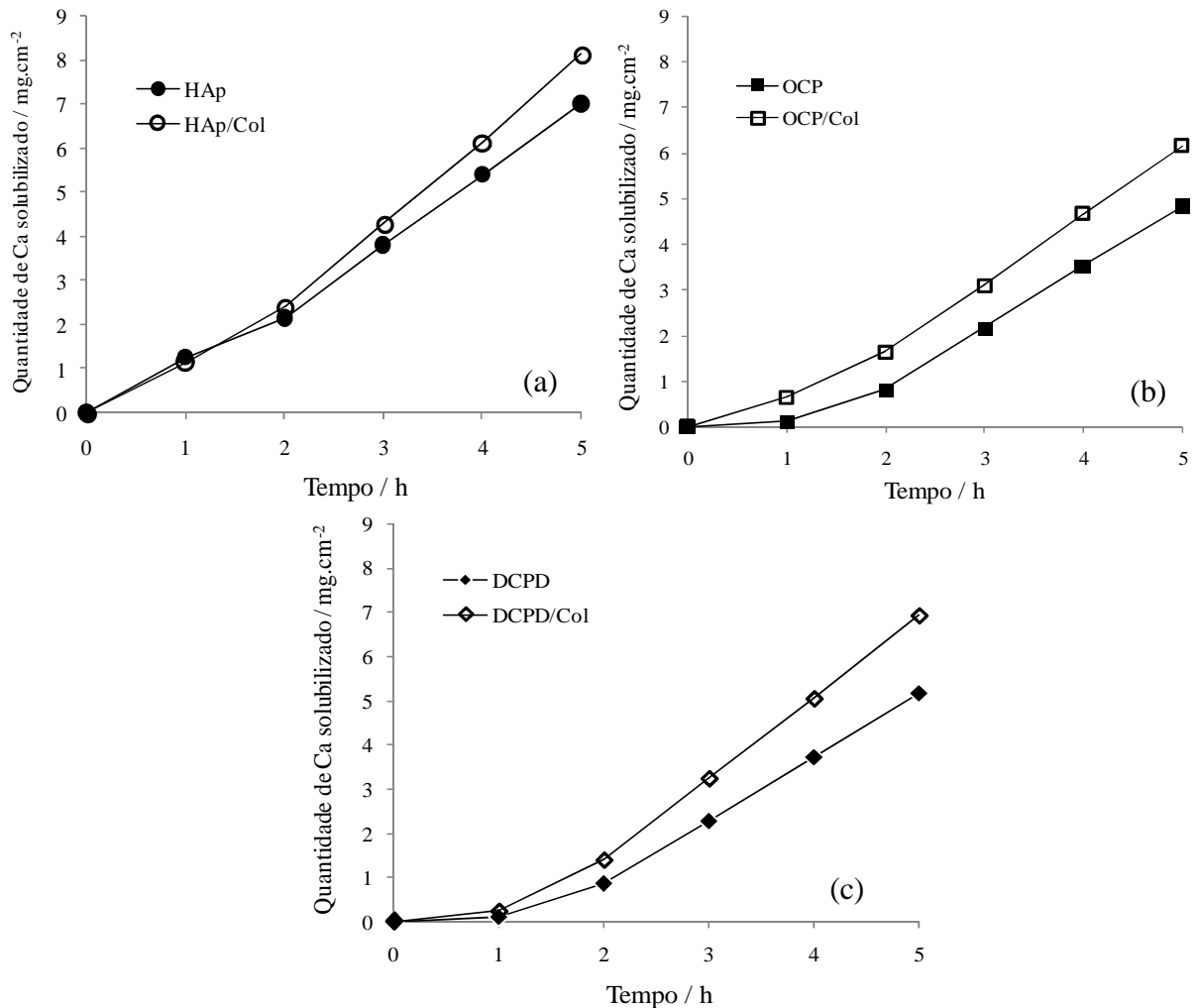
No que se refere à HAp, vemos que o sua mistura com colágeno apresentou melhor desempenho que o fosfato puro, sendo que em algumas concentrações (1000 e 100000  $\mu\text{g/ml}$ ) houve uma maior redução na porcentagem de sobrevivência celular, sendo visível também que, tanto para o fosfato puro, quanto para a mistura, a redução na concentração do material durante o cultivo celular aumenta a porcentagem de sobrevivência das células. No caso do OCP, nota-se que tanto o fosfato puro quanto sua mistura apresentaram comportamento semelhante, havendo uma maior diminuição na sobrevivência celular apenas quando do cultivo em presença da mistura OCP-colágeno 10000  $\mu\text{g/ml}$ . Quanto ao DCPD os resultados não indicaram redução na porcentagem de sobrevivência celular (fosfato puro e mistura com colágeno). Estes resultados mostram que os fosfatos aqui estudados não apresentam citotoxicidade, podendo assim ser indicados para tratamento de reposição óssea. Os valores médios da porcentagem de sobrevivência celular são apresentados na Figura 28.



**Figura 28.** Média de sobrevida celular com adição de diferentes materiais: (a) HAp, (b) OCP e (c) DCPD.

### 3.7. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE SOLUBILIZAÇÃO EM FLUIDO FISIOLÓGICO SIMULADO

Os dados mostram que a formação da mistura com o colágeno, em todos os casos, aumentou a solubilidade do biomaterial em FFS. Para HAp nota-se que a mistura com colágeno só passa a ser mais solúvel que a HAp pura a partir de 2h em contato com o FFS, porém, a partir daí segue sendo mais solúvel. Após 5h de testes notou-se que as misturas dos materiais com colágeno aumentaram a solubilidade da HAp, do OCP e do DCPD em, respectivamente, 16, 27 e 34% . Isso mostra que o colágeno afeta de forma mais efetiva a solubilidade do DCPD, fosfato de cálcio aqui apresentado com menor razão molar Ca/P. A Figura 29 apresenta os dados de dissolução para a HAp e sua mistura com colágeno, o OCP e sua mistura com colágeno e o DCPD e sua mistura com colágeno.

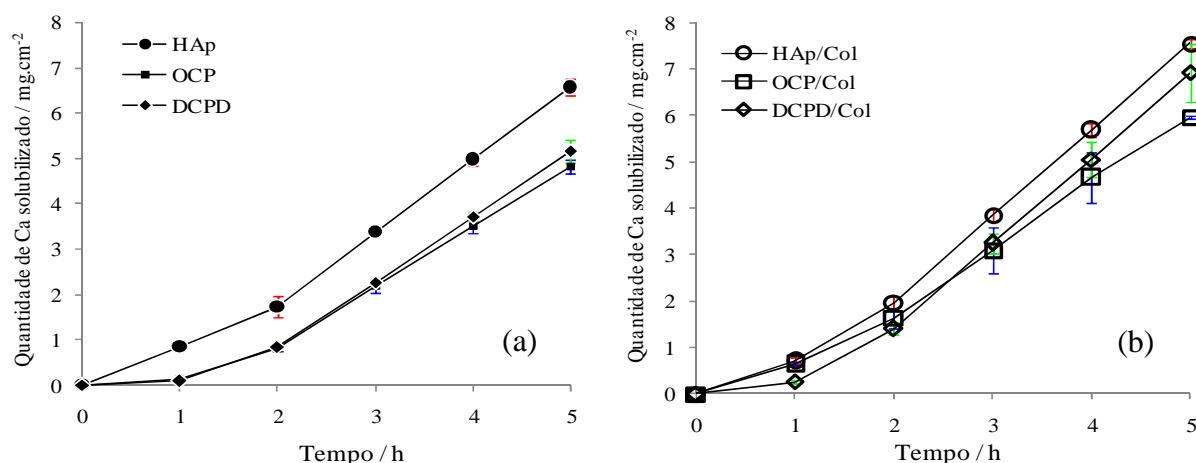


**Figura 29.** Curvas de dissolução do cálcio em FFS em função do tempo para (a) a HAp e sua mistura com colágeno, (b) OCP e sua mistura com colágeno e (c) DCPD e sua mistura com colágeno.

Quando comparadas as curvas de solubilidade do OCP e do DCPD, puros e na forma de mistura como colágeno, essas se apresentaram muito similares. Considerando-se os fosfatos puros, o DCPD apresenta um aumento de solubilidade quase desprezível a partir de 4h de imersão, sendo que após as 5h esse aumento é de apenas 6%. Ao se considerar as misturas, nas duas primeiras horas o OCP-Col é ligeiramente mais solúvel, mas, após 3h de imersão, as solubilidades praticamente se igualam. A partir de 4h, o DCPD-Col tem sua solubilidade aumentada em relação ao OCP-Col, sendo que ao final das 5h o DCPD-Col foi 11% mais solúvel que o OCP-Col. Apesar do OCP e o DCPD apresentarem morfologia e caracterização cristalográfica distintas acredita-se que o fato de estes materiais terem sido sintetizados a partir dos mesmos precursores, com variação apenas da temperatura de síntese confere a estes materiais comportamento semelhante diante do FFS.

A Figura 30 apresenta as curvas de solubilidade para os fosfatos puros e para suas misturas separadamente. A análise da Figura 30 nos mostra que a HAp é o material mais solúvel quando comparado aos outros materiais aqui estudados, tanto quando puro, quanto quando em forma de mistura. Tal fato não era esperado, posto que a HAp é um dos fosfatos de cálcio com maior razão molar Ca/P (1,67), o que deveria conferir à este material uma menor solubilidade, em especial quando comparado ao OCP e ao DCPD que possuem razão molar Ca/P menores (1,33 e 1,0 respectivamente). Quando se compara as curvas de solubilidade para o fosfato puro, a HAp apresentou-se como sendo 31% mais solúvel que o OCP e 26% mais solúvel que o DCPD. No que se refere às misturas com colágeno, essa diferença foi um pouco menor, sendo que a HAp-Col foi 24% mais solúvel que o OCP-Col e 15% mais solúvel que o DCPD-Col.

Apesar de neste teste a HAp ter sido mais solúvel que o esperado, é fato que a HAp sintetizada neste trabalho apresenta, em sua composição, a presença de seus precursores de reação. Os espectros de IV da HAp (Figura 7) identificaram, em todas as rotas de síntese utilizadas para a HAp, além das bandas de fosfatos e de hidroxilas características de HAp, bandas de C-O, presentes na forma de carbonatos. O íon carbonato se associa a apatita gerando a carbonatohidroxiapatita. Esses íons podem ser gerados a partir do gás carbônico, presente no ar, e pela utilização de soluções que contenham o íon. A presença do íon carbonato na apatita causa maior solubilidade em meio aquoso, sendo que a máxima assimilação de carbonato pela HAp está limitada em 22% em peso (LEGEROS, 1991 *apud* VALENTE, 1999).



**Figura 30.** Curvas de dissolução do cálcio em função do tempo para (a) HAp, OCP e DCPD e (b) suas respectivas misturas com colágeno.

A ordem da reação foi determinada pelo método gráfico (Anexo 1). Para todos os materiais analisados, puros ou em mistura como colágeno, a ordem de reação do processo de solubilização é zero, ou seja, a velocidade da solubilização do cálcio não depende da concentração do meio e acontecerá enquanto houver cálcio a ser dissolvido (ATKINS e JONES, 2012). A partir dos gráficos foi possível calcular, também, a constante de velocidade para cada um dos materiais testados (Tabela 7).

**Tabela 7.** Constante de velocidade para a dissolução do cálcio em FFS a partir dos diferentes fosfatos de cálcio e suas respectivas misturas.

<i>Material</i>	<i>k<sub>obs</sub> (mg.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)</i>
HAp	3,89 x 10 <sup>-4</sup>
OCP	2,68 x 10 <sup>-4</sup>
DCPD	2,87 x 10 <sup>-4</sup>
HAp-Col	4,52 x 10 <sup>-4</sup>
OCP-Col	3,42 x 10 <sup>-4</sup>
DCPD-Col	3,85 x 10 <sup>-4</sup>

A análise da Tabela 7 mostra, então, que dos fosfatos sintetizados a HAp é a que apresenta maior constante de velocidade e portanto é o material que apresentará maior velocidade de solubilização em FFS. O OCP e o DCPD por suas vezes apresentaram constantes muito parecidas e devem possuir velocidade de solubilização similar. Verificou-se também que as misturas obtidas pela adição do colágeno são mais solúveis quando comparadas aos fosfatos puros em todos os casos, indicando que o colágeno hidrolisado aumenta a velocidade de solubilização dos materiais em FFS.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das caracterizações físico-químicas realizadas pode-se concluir que todas as amostras apresentaram bandas de absorção no infravermelho relativas à presença de fosfato, sendo que as misturas apresentaram também bandas características de colágeno, confirmando sua presença nas misturas. As análises por DRX mostraram que a HAp foi obtida em todas as rotas sintéticas avaliadas e o OCP e o DCPD foram obtidos a partir dos mesmos precursores, com a diferença de que o OCP foi sintetizado a 80°C e o DCPD em temperatura ambiente. Quanto às análises das misturas, não foi possível identificar a presença do colágeno nos mesmos por DRX visto que o colágeno não apresenta um padrão de difração característico por não ser uma amostra cristalina.

Os testes de adsorção de piridina demonstraram que todas as amostras testadas apresentam sítios ácidos (tanto de Brönsted, tanto quanto de Lewis), fator este que proporciona ao material a capacidade de se ligar a moléculas que possuam pares de elétrons livres, o que possibilita a utilização destes materiais na formação de misturas com o colágeno. Sendo assim, como não há diferença relevante entre as amostras sintetizadas de HAp (exceto quando a síntese é realizada em temperatura ambiente) nem entre as amostras de OCP obtidas a 80°C, foram escolhidos para a síntese das misturas a HAp e o OCP sintetizados a 80°C em chapa aquecedora, considerando-se que estas rotas são as mais acessíveis e com menor custo de síntese.

A análise térmica dos materiais caracterizou os fosfatos de cálcio de acordo com suas perdas de massa e evidenciou que, as misturas perdem maior quantidade de massa, em razão de o colágeno possuir baixa estabilidade térmica. As curvas de DSC para o colágeno puro e para as misturas avaliados indicaram que a presença de OCP e DCPD no compósito aumenta a estabilidade do colágeno e, conseqüentemente, há uma maior resistência da molécula em se desdobrar devido aos tratamentos térmicos.

As razões molares Ca/P encontradas para os fosfatos, em especial para o DCPD e o OCP, apresentaram um valor muito elevado em relação ao estabelecido como referência, 1,0 e 1,33, respectivamente. Para a HAp, o valor esperado era de 1,67. Isso se deve, provavelmente, ao fato de as reações não apresentarem rendimento de 100%, o que faz com que parte do cálcio quantificado seja proveniente dos precursores de reação ( $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , no caso da HAp e  $\text{CaCO}_3$  no caso do DCPD e OCP).

Os testes de viabilidade celular mostraram que os materiais aqui avaliados não são citotóxicos, dado que não apresentam diferenças significativas na taxa de sobrevivência celular quando comparados ao teste controle. Foi possível verificar também que esta taxa é maior quando da presença de alguns materiais testados (DCPD e DCPD-Col). Tais resultados indicam, ainda, que estes materiais podem ser utilizados em reparações ósseas, sem danos ao crescimento celular.

Os testes de solubilidade mostraram que os fosfatos quando em forma de misturas com colágeno tem sua solubilidade aumentada em relação a quando estão puros. Verificou-se, também, que apesar da HAp ser o fosfato aqui testado com maior razão molar Ca/P, ela apresentou-se como o fosfato mais solúvel (tanto puro, quanto como em mistura). Este fato deve-se provavelmente à incorporação de carbonatos à estrutura da HAp, formando assim uma carbonatohidroxiapatita.

## 5. CONCLUSÃO

Foram desenvolvidos métodos de síntese para a HAp, o DCPD e o OCP de forma a obter-se as melhores propriedades físico-químicas para os mesmos. Os fosfatos foram utilizados na formação de compósitos com o colágeno hidrolisado, porém verificou-se que há formação de uma mistura entre os materiais e que estas não apresentam citotoxicidade, destacando-se o DCPD e sua mistura que geraram um ligeiro aumento na atividade celular quando testados. Para todos os fosfatos e suas respectivas misturas verificou-se que eles são solúveis em fluido fisiológico simulado apresentando ordem zero para a velocidade de solubilização em todos os casos. Os materiais aqui desenvolvidos podem, então, ser utilizados para reparos e substituições ósseas e dentárias, sendo necessário realizar uma avaliação *in vivo* para verificar qual dos materiais apresenta taxa de reabsorção mais adequada.

Considera-se que o material desenvolvido deve ser avaliado também a partir de implantes e respectivas avaliações *in vivo* para que estas possam ser comparadas aos resultados obtidos *in vitro*. Essa comparação permitirá fazer uma correlação entre o comportamento teórico e o comportamento real dos materiais sintetizados podendo ser possível reduzir a necessidade de avaliações *in vivo* quando do desenvolvimento de novos materiais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLFSSON, E.; NYGREN, M.; HERMANSSON, L. Decomposition Mechanisms in Aluminum Oxide–Apatite Systems. *Journal of American Ceramic Society*, c. 82, n. 10, p. 2009-2912, 1999.

APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; SANTOS, M. L.; GUASTALDI, A. C. Estudo da Influência dos Íons  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $CO_3^{2-}$  na Cristalização Biomimética de Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP) e Conversão a Fosfato Octacálcico (OCP). *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 892-896, 2007.

ARNOCZK, S. P.; AKSAN, A. Thermal Modification of Connective Tissues: Basic Science Considerations and Clinical Implications. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, v.8, n. 5, p. 305-313, 2000.

ATKINS, P.; JONES, L. Princípios de química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5 ed. Posto Alegre: Bookman, 2012.

AZAROFF, L. V.; BUERGER, M. J. *The powder method in x-ray crystallography*. Nova York: McGraw-Hill, 1958.

BADEA, E.; MIL, L.; BUDRUGEAC, P.; GIURGINCA, M.; MAŠIĆ, A.; BADEA, N.; GATTA, G. D. Study of deterioration of historical parchments by various thermal analysis techniques complemented by SEM, FTIR, UV–VIS–NIR and unilateral NMR investigations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 91, n. 1, p. 17-27, 2008.

BAO, L.; LIU, J.; SHI, F.; JIANG, Y.; LIU, G. Preparation and characterization of  $TiO_2$  and Si-doped octacalcium phosphate composite coatings on zirconia ceramics (Y-TZP) for dental implant applications. *Applied Science Surface*, v. 290, p. 48-52, 2014.

BATISTA, T. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Thermal behavior of *in vitro* mineralized anionic collagen matrices. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 95, n. 3, p. 945-949, 2009.

BARRÈRE, F.; NI, M.; HABIBOVIC, P.; DUCHEYNE, P.; GROOT, K. Degradation of bioceramics. In: BLITTERSWIJK, C. (Comp.). *Tissue Engineering*, 1.ed. Canadá: Elsevier, 2008. Cap. 8, p. 223-254.

BEHERI, H. H.; MOHAMED, K. R.; EL-BASSYOUNI, G. T. Mechanical and microstructure of reinforced hydroxyapatite/calcium silicate nano-composites materials. *Materials and Design*, v. 44, p. 461-468, 2013.

BERNAL e STANLEY, 1987 *apud* BATISTA, T. M. *Mineralização In Vitro de matrizes de colágeno aniônico derivadas de tecidos biológicos*, 2008. 115 f. Tese (Doutorado) – Ciências (Química Analítica), Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – USP, 2008.

BESSLER, K. E.; RODRIGUES, L. C. Os Polimorfos de Carbonato de Cálcio - Uma Síntese Fácil de Aragonita. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 178-180, 2008.

BET, M. R.; GOISSES, G.; PLEPIS, A. M. G. Compósitos colágeno aniônico:fosfato de cálcio. Preparação e caracterização. *Química Nova*, v. 20, n. 5, p. 475-477, 1997.

BEZZI, G.; CELOTTI, G.; LANDI, E.; LA TORRETTA, T. M. G.; SOPYAN, I.; TAMPIERI, A. A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation. *Materials Chemistry and Physics*, v. 78, p. 816-824, 2003.

BINGÖL, O. R.; DURUCAN, C. Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite from Calcium Sulfate Hemihydrate. *American Journal of Biomedical Sciences*, v. 4, n. 1, p. 50-59, 2012.

BOHNER, M.; GALEA, L.; DOEBELIN, N. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 32, p. 2663-2671, 2012.

BOSKEY, A. L.; POSNER, A. S. Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite. A pH-dependent, solution-mediated, solid-solid conversion. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 77, n. 19, p. 2313-2317, 1973.

BYRAPPA, K.; YOSHIMURA, M. *Handbook of hydrothermal technology: A technology for crystal growth and materials processing*. Nova Jersey: Noyes Publication, 2001. Cap. 5, p. 287-314.

CALLISTER JR, W. D. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. 5ed. São Paulo: LTC, 2002

CHANG, C.; PENG, N.; HE, M.; TERAMOTO, Y.; NISHIO, Y.; ZHANG, L. Fabrication and properties of chitin/hydroxyapatite hybrid hydrogels as scaffold nano-materials. *Carbohydrate Polymers*, v. 91, p. 7-13, 2013.

CHANG, L.; TIAN, L.; LIU, W.; DUAN, X. Formation of dicalcium phosphate dihydrate on magnesium alloy by micro-arc oxidation coupled with hydrothermal treatment. *Corrosion Science*, v. 72, p. 118-124, 2014.

CHAUDHRY, A. A.; HAQUE, S.; KELLICE, S.; BOLDRIN, P.; REHMAN, I.; KHALID, F. A.; DARR, J. A. Instant nano-hydroxyapatite: a continuous and rapid hydrothermal synthesis. *Chemical Communications*, v. 4, n. 21, p. 2286-2288, 2006.

CHOW, L. C.; MARKOVIC, M.; TAKAGI, S. a dual constant-composition titration system as an *in vitro* resorption model for comparing dissolution rates of calcium phosphate biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 65, n. 2, p. 245-251, 2003.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G. *Advanced Inorganic Chemistry: A Comprehensive Text*. Nova York: Interscience Publishers, 2001.

CRANE, N. J.; POPESCU, V.; MORRIS, M. D.; STEENHUIS, P.; IGNELZI Jr, M. A. Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. *Bone*, v. 39, p. 434-442, 2006.

DAMINK, L. H. H. O.; DIJKA STRA, P. J.; VAN LUYN, M. J. A.; VAN WACHEN, P. B.; NIEUWENHUIS, P.; FEIJEN, J. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 6, p. 460-472, 1995.

DESHPANDE A. S.; BENIASH, A. Bio-inspired synthesis of mineralized collagen fibrils. *Crystal Growth & Design*, v. 8, n. 8, p. 3084-3090, 2008.

DESHPANDE, S. B.; KHOLLAN, Y. B.; BHORASKAR, S. V.; DATE, S. K.; SAINKAR, S. R.; POTDAR, H. S. Synthesis and characterization of microwave-hydrothermally derived  $Ba_{1-x}Sr_xTiO_3$  powders. *Materials Letters*, v. 59, p. 293-296, 2005.

DUBOK, V. A. Bioceramics - yesterday, today, tomorrow. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, v. 39, n. 7-8, p. 381-394, 2000.

E'GUES M. A. M.; PAULA, M.; GOISSES, G. Compósito de colágeno com silicato e hidroxiapatita como material para endodontia: preparação e caracterização. *Revista Odonto Ciência*, v. 23, n. 2, p. 134-140, 2008.

EICHERT, D.; DROUET, C.; SFIHI, H.; REY, C.; COMBES, C. Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization. In: KENDALL, J. B. (Comp.). *Biomaterials Research Advances*. Nova York: Nova Science, 2007. Cap. 5, p. 93-144.

ELGALI, I.; IAGAWA, K.; PALMQUIST, A.; LENNERAS, M.; XIA, W.; CHOI, S.; CHUNG, U.; OMAR, O.; THOMSEN, P. Molecular and structural patterns of bone regeneration in surgically created defects containing bone substitutes. *Biomaterials*, v. 35, p. 3229-3242, 2014.

ELLIOTT, J. C. General chemistry of the calcium orthophosphates. In: ELLIOTT, J. C. *General chemistry of the calcium orthophosphates*. Nova York: Elsevier, 1994. Cap. 1, p. 1-62.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K.L. The Comet Assay: A comprehensive review. *Mutation Research*, v. 339, p. 37-59, 1995.

FANG, Y.; AGRAWAL, D. K.; ROY, D. M.; ROY, R. Microwave sintering of hydroxyapatite ceramics. *Journal of Materials Research*, v. 9, n. 1, p. 180-187, 1994.

FANTNER, G. E.; RABINOVYCH, O.; SCHITTER, G.; THURNER, P.; KINDT, J. H.; FINCH, M. M.; WEAVER, J. C.; GOLDE, L. S.; MORSE, D. E.; LIPMAN, E. A.; RANGELOW, I. W.; HANSMA, P. K. Hierarchical interconnections in the nano-composite material Bone: Fibrillar cross-links resist fracture on several length scales. *Composites Science and Technology*, v. 66, p. 1205-1211, 2006.

FOWLER, E. O.; MORENO, E. C.; BROWN, W. E. Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate. *Archives of Oral Biology*, v. 11, p. 477-492, 1966.

FRATZL, P.; GUPTA, H. S.; PASCHALIS, E. P.; ROSCHGER, P. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *Journal of Materials Chemistry*, v. 14, p. 2115-2123, 2004.

FRATZL, P.; WEINKAMER, R. Nature's hierarchical materials. *Progress in Materials Science*, v. 52, p. 1263-1334, 2007.

FREITAS, J. S.; SALOMÃO, G. C.; GOMES, M. F. T. Remoção de íons metálicos de soluções aquosas, por apatitas sintéticas, usando o método de troca iônica em coluna. *Eclética Química*, v. 25, p. 19-29, 2000.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of calcium deficient hydroxyapatite at near-physiological temperature. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 3, p. 299-305, 1992.

GAALLEN, S.; KRUYT, M.; MEIJER, G.; MISTRY, A.; MIKOS, A.; BEUCKEN, J.; JANSEN, J.; GROOT, K.; CANCEDDA, R.; OLIVO, C.; YASZEMSKI, M.; DHERT, W. Tissue engineering of bone. In: BLITTERSWIJK, C. (Comp.). *Tissue Engineering*, 1.ed. Canadá: Elsevier, 2008. Cap. 19, p. 559-610.

GELINSKY, M.; WELZEL, P. B.; SIMON, P.; BERNHARDT, A.; KÖNIG, U. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone. *Chemical Engineering Journal*, v. 137, p. 84-96, 2008.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, p. 1531-1546, 2003.

GORDON, P. L.; HUANG, C.; LORD, R. C.; YANNAS, I. V. The Far-Infrared Spectrum of Collagen. *Macromolecules*, v. 7, n. 6, p. 954-956, 1974.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de Cálcio de Interesse Biológico: Importância como Biomateriais, Propriedades e Métodos de Obtenção de Recobrimentos. *Química Nova*, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

GUBICZA, J.; NAUYOKS, S.; BALOGH, L.; LABAR, J.; ZERDA, T. W.; UNGÁR, T. Influence of sintering temperature and pressure on crystallite size and lattice defect structure in nanocrystalline SiC. *Journal of Materials Research*, v. 22, n. 5, p. 1314-1321, 2007.

HAN, J.; SONG, H.; SAITO, F.; LEE, B. Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method. *Materials Chemistry and Physics*, v. 99, p. 235-239, 2006.

HORN, M. M. Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências (Química Analítica), Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – USP, 2008.

IIBUCHI, S.; MTSUI, K.; KAWAI, T.; SASAKI, K.; SUZUKI, O.; KAMAKURA, S.; ECHIGO, S. Octacalcium phosphate (OCP) collagen composites enhance bone healing in a dog tooth extraction socket model. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, v. 39, p. 161-168, 2010.

INTERNATIONAL STANDARD 10993-5. *Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. 3.ed. 2009.

IONASHIRO, M. *Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial*. São Paulo: Giz Editorial, 2004, 82 p.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. *Cerâmica*, v. 26, p. 17-24, 1980.

ISHIHARA, S.; MATSUMOTO, T.; ONOKI, T.; SOHMURA, T.; NAKAHIRA, A. New concept bioceramics composed of octacalcium phosphate (OCP) and dicarboxylic acid-intercalated OCP via hydrothermal hot-pressing. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, p. 1885-1888, 2009.

IVANOVA, T. I.; FRANK-KAMENETSKAYA, O. V.; KOL'TSOV, A. B.; UGOLKOV, V. L. Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 160, p. 340-349, 2001.

IYYAPPAN, E.; WILSON, P. Synthesis of nanoscale hydroxyapatite particles using triton X-100 as an organic modifier. *Ceramics International*, v. 39, p. 771-777, 2013.

JARCHO, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical Orthopedics and Related Research*, v. 157, p. 259-278, 1981.

JOSHI, V. S.; JOSHI, M. J. FTIR spectroscopic, thermal and growth morphological studies of calcium hydrogen phosphate dihydrate crystals. *Crystal Research and Technology*, v. 38, n. 9, p. 817-821, 2003.

KAMAKURA, S.; SASANO, Y.; NAKAMURA, M.; SUZUKI, O.; OHKI, H.; KAGAYAMA, M.; MOTEGI, K. Initiation of alveolar ridge augmentation in the rat mandible by subperiosteal implantation of octacalcium phosphate. *Archives of Oral Biology*, v. 41, n. 11, p. 1029-1038, 1996.

KAMAMURA, S.; SASANO, Y.; SUZUKI, O. Synthetic octacalcium phosphate (OCP) is an effective scaffold to regenerate bone. *International Congress Series*, v. 1284, p. 290-295, 2005.

KARAMPAS, I. A.; KONTOYANNIS, C. G. Characterization of calcium phosphates mixtures. *Vibrational Spectroscopy*, v. 64, p. 126-133, 2013.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KIKUCHI, M.; KOYAMA, Y.; EDAMURA, K.; IRIE, A.; SOTOME, S.; ITOH, S.; TAKAKUDA, K.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, S. Synthesis of hydroxyapatite-Collagen bone-like nanocomposite and its biological reactions. In: REDDY, B. (Editor). *Advances in Nanocomposites - Synthesis, Characterization and Industrial Applications*. Croácia: InTech, 2011. Cap. 9, p. 181-194.

KHOLLAN, Y. B.; DESHPANDE, A. S.; PATIL, A. J.; POTDAR, H. S.; DESHPANDE, S. B.; DATE, S. K. Microwave-hydrothermal synthesis of equi-axed and submicron-sized BaTiO<sub>3</sub> powders. *Materials Chemistry and Physics*, v. 71, p. 304-308, 2001.

KOMARNENI, S.; RAJHA, R. K.; KATSUKI, H. Microwave-hydrothermal processing of titanium dioxide. *Materials Chemistry and Physics*, v. 61, p. 50-54, 1999.

KUMAR, T. S. S.; MANJUBALA, I.; GUNASEKARAN, J. Synthesis of carbonated calcium phosphate ceramics using microwave irradiation. *Biomaterials*, v. 21, p. 1623-1629, 2000.

KWEH, S. W. K.; KHOR, K. A.; CHEANG, P. The production and characterization of hydroxyapatite (HA) powders. *Journal of Materials Processing Technology*, v. 89-90, p. 373-377, 1999.

LEE, J.; KIM, C.; KATOH, S.; MURAKAMI, R. Microwave-hydrothermal versus conventional hydrothermal preparation of Ni- and Zn-ferrite powders. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 325, p. 276-280, 2001.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine, 1991 *apud* VALENTE, M. C. *Síntese de hidroxiapatita e sua aplicação como biomaterial*, 1999. 120 f. Tese (Doutorado) – Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo - USP, 1999.

LEYVA, A. G.; MARRERO, J.; SMICHOWSKI, P.; CICERONE, D. Sorption of Antimony onto Hydroxyapatite. *Environmental Science and Technology*, v. 35, p. 3669-3675, 2014.

LICKORISH, D.; RAMSHAW, J. A. M.; WERKMWISTER, J. A.; GLATTAUER, V.; HOWLETT, R. Collagen-hydroxyapatite composite prepared by biomimetic process. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 68, n. 1, p. 19-27, 2003.

LIM, G. K.; WANG, J.; NG, S. C.; GAN, L. M. Processing of fine hydroxyapatite powders via an inverse microemulsion route. *Materials Letters*, v. 28, p. 431-436, 1996.

LIN, X.; LI, X.; FAN, H.; WEN, X.; LU, J.; ZHANG, X. In situ synthesis of bone-like apatite-Collagen nano-composite at low temperature. *Materials Letters*, v. 58, p. 3569-3572, 2004.

LINHART, W.; BRIEM, D.; AMLING, M.; RUEGER, J. M.; WINDOLF, J. Mechanisches Versagen einer porösen Hydroxylapatit keramik 7,5 Jahre nach Implantation an der proximalen Tibia, 2004 *apud* BOHNER, M.; GALEA, L.; DOEBELIN, N. Calcium

phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 32, p. 2663-2671, 2012.

LIU, J.; LI, K.; WANG, H.; ZU, M.; YAN, H. Rapid formation of hydroxyapatite nanostructures by microwave irradiation. *Chemical Physics Letters*, v. 396, p. 429-432, 2004.

LOCILENTO, D. A. Preparo, obtenção e caracterização de esponjas quitosana-Colágeno para liberação controlada de extrato de semente de uva. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências, Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – USP, 2012.

LU, X.; LENG, Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials*, v. 26, p. 1097-1108, 2005.

MANJUBALA, I.; SIVAKUMAR, M. In-situ synthesis of biphasic calcium phosphate ceramics using microwave irradiation. *Materials Chemistry and Physics*, n. 71, p. 272-278, 2001.

MARTINS, V. C. A.; GOISSES, G. Colágeno aniônico como matriz para deposição orientada de minerais de fosfato de cálcio. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Out/Dez., p. 30-37, 1996.

METOKI, N.; LEIFENBERG-KUZNITS, L.; KOPELOVICH, W.; BURSTEIN, L.; GOZIN, M.; ELIAZ, N. Hydroxyapatite coatings electrodeposited at near-physiological conditions. *Materials Letters*, v. 119, p. 24-27, 2014.

MINH, D. P.; TRAN, N. D.; NZIHO, A.; SHARROK, P. Calcium phosphate based materials starting from calcium carbonate and orthophosphoric acid for the removal of lead(II) from an aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, v. 243, p. 280-288, 2014.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural Waters. *Analytica Chimica Acta*, v. 27, p. 31-36, 1962.

NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds – Part A and B*. 6.ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2009.

OLIVEIRA, D. M. P. *Síntese e caracterização de pós de fosfato tricálcio- $\beta$  e de hidroxiapatita: elaboração de bifásicos HA/TCP- $\beta$  para aplicações como substituto ósseo*. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Ciências Tecnológicas – Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, 2010.

PAN, H.; JIANG, H. L.; CHEN, W. L. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide. *Biomaterials*, v. 27, n. 17, p. 3209-3220, 2006.

PANZAVOLTA, S.; BRACCI, B.; RUBINI, K.; BIGI, A. Optimization of a biomimetic bone cement: Role of DCPD. *Inorganic Biochemistry*, v. 105, p. 1060-1065, 2011.

PARANTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*, v. 3, p. 1863-1887, 2010.

PARK, J.; LAKES, R. S. *Biomaterials: an introduction*. 3. ed. Iowa: Springer, 2007. 561p.

PIRES, J.; CARVALHO, A. P.; PEREIRA, P. R.; CARVALHO, M. B. Acidity Studies on Pillared Clays (PILCs) by Pyridine Adsorption and 1-Butanol Dehydration. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, v. 65, n. 1, p. 9-15, 1998.

REILLY, D. T.; BURSTEIN, A. H. The mechanical properties of cortical bone. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 56, p. 1001-1022, 1974.

RENUGOPALAKRISHNAN, V.; CHANDRAKASAN, G.; MOORE, S.; HUTSON, T. B.; BERNEY, C. V.; BHATNAGAR, R. S. Bound Water in Collagen. Evidence from Fourier Transform Infrared and Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopic Study. *Macromolecules*, v. 22, p. 4121-4124, 1989.

SABINO, M.; FEIJOO, J. L.; RONCA, G.; MÜLLER, A. J. Contribución de polímeros biodegradables para el diseño y desarrollo de sistemas con interés biomédico. In: MÜLLER-KARGER, C. M.; CERROLAZA, M. *Bioingeniería en Iberoamérica: Avances y Desarrollos*, 1. ed. Barcelona: Cimne, 2003. Cap. 11, p. 254-284.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Weinheim: Wiley-VCH, 2007.

SCUDIERO, D. A.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T. H.; CURRENS, M. J.; SENIFF, D.; BOYD, M. R. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research*, v. 48, p. 4827-4833, 1988.

SENA, L. D. *Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas*. 2004. 95 f. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, 2004.

SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; VALLET-REGÍ, M.; PEÑA J.; RÁMILA, A.; IZQUIERDO, I.; PORTOLES, M. T. *In vitro* biocompatibility assessment of poly( $\epsilon$ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*, v. 25, n. 25, p. 5603-5611, 2004.

SHEU, M.; HUANG, J.; YEH, G.; HO, H. Characterization of Collagen Gel Solutions and Collagen Matrices for Cell Culture. *Biomaterials*, v. 22, p. 1713-1719, 2001.

SIEW, C.; GRUNINGER, S. E.; CHOW, L. C.; BROWN, W. E. Procedure for the study of acidic calcium phosphate precursor phases in enamel mineral formation. *Calcified Tissue International*, v. 50, p. 144-148, 1992.

SILVER, A.; MURRILLS, R. J.; ETHERINGTON, D. J. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 266-276, 1988.

SIMÕES, A. N.; NEIVA, L. S.; SIMÕES, V. N.; RODRIGUES, M. G.; GAMA, L. Influência da temperatura na síntese hidrotérmica da zeólita Y obtida por micro-ondas. *Cerâmica*, v. 58, p. 444-447, 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. São Paulo: Bookman, 2002.

SOMMERFELDT, D.; RUBIN, C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal*, v. 10, n. 2, p. 86-96, 2001.

SREEJA, V.; JOY, P. A. Microwave-hydrothermal synthesis of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles and their magnetic properties. *Materials Research Bulletin*, v. 42, p. 1570-1576, 2007.

SURYANARAYANA, C.; NORTON, M.G. *X-Ray Diffraction: A Practical Approach*. Plenum Press, 1998. p 21-60, 207-222.

SUZUKI, K.; ANADA, T.; MIYAZAKI, T.; MIYATAKE, N.; HONDA, Y.; KISHIMOTO, K. N.; HOSAKA, M.; IMAIZUMI, H.; ITOI, E.; SUZUKI, O. Effect of addition of hyaluronic acids on the osteoconductivity and biodegradability of synthetic octacalcium phosphate. *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 531-543, 2014.

SUZUKI, O. Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials. *The Japanese Dental Science Review*, v. 49, p. 58-71, 2013.

SUZUKI, O.; IMAIZUMI, H.; KAMAKURA, S.; KATAGIRI, T. Bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate and its role in biological mineralization. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 305-313, 2008.

TADIC, D.; EPPLE, M. A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials*, v. 25, n. 6, p. 987-994, 2004.

TADIC, D.; PETERS, F.; EPPLE, M. Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. *Biomaterials*, v. 23, p.2553-2559, 2002.

TAS, A. C. Granules of Brushite and Octacalcium Phosphate from Marble. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 94, n. 11, p. 3722-3726, 2011.

TERVAHAUTA, T.; VEIJDEN, R. D.; FLEMMING, R. L.; LEAL, L. H.; ZEEMAN, G.; BUISMAN, C., J. N. Calcium phosphate granulation in anaerobic treatment of black water: A new approach to phosphorus recovery. *Water Research*, v. 48, p. 632-642, 2014.

TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. *Química Nova*, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.

TORTORA, G. J. *Corpo Humano: Fundamentos de anatomia e Fisiologia*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2000.

VAIDYA, S. N.; KARUNAKARAN, C.; PANDE, B. M.; GUPTA, N. M. IYER, R. K.; KARWEER, S. B. Pressure-induced crystalline to amorphous transition in hydroxyapatite. *Journal of Materials Science*, v. 32, n. 12, p. 3213-3217, 1997.

VALENTE, M. C. *Síntese de hidroxiapatita e sua aplicação como biomaterial*. 1999. 120 f. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, São Paulo, 1999.

VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry*, v. 32, p. 1-31, 2004.

WAHL, D. A.; CZERNUSZKA, J. T. Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair. *European Cells and Materials*, v. 11, p. 43-56, 2006.

WANG, Y.; FU, Y. Microwave-hydrothermal synthesis and characterization of hydroxyapatite nanocrystallites. *Materials Letters*, v. 65, p. 3388-3390, 2011.

WELZEL, T.; MEYER-ZAIKA, W.; EPPLE, M. Continuous preparation of functionalized calcium phosphate nanoparticles with adjustable crystallinity. *Chemical Communications Articles*, p.1204-1205, 2004.

WHITE, T. D.; FOLKENS, P. A. *The human bone manual*. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2005. 453 p.

WILLIS, J. B. The determination of metals in blood serum by atomic absorption spectroscopy - I: Calcium. *Spectrochimica Acta I*, v. 16, p. 259-272, 1960.

WILSON, G. J.; MATIJASEVICH, A. S.; MITCHELL, D. R. G.; SCHULZ, J. C.; WILL, G, D. Modification of TiO<sub>2</sub> for Enhanced Surface Properties: Finite Ostwald Ripening by a Microwave Hydrothermal Process. *Langmuir*, v. 22, p. 2016-2027, 2006.

WU, I.; GLIMCHER, M. J.; REY, C.; ACKERMAN, J. L. A unique protonated phosphate group in bone mineral not present in synthetic calcium phosphates – Identification by phosphorus-31 solid state NMR Spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, v. 244, p. 423-435, 1994.

XU, J.; BUTLER, I. S.; GILSON, D. F. R. FT-Raman and high-pressure infrared spectroscopic studies of dicalcium phosphate dihydrate (CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) and anhydrous dicalcium phosphate (CaHPO<sub>4</sub>). *Spectrochimica Acta Part A*, v. 55, p. 2801-2809, 1999.

XU, X.; BAO, Y.; SONG, C.; YANG, W.; LIU, J.; LIN, L. Microwave-assisted hydrothermal synthesis of hydroxy-sodalite zeolite membrane. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 75, p. 173-181, 2004.

YAMAUCHI, K.; GODA, T.; TAKEUCHI, N.; EINAGA, H.; TANABE, T. Preparation of collagen/calcium phosphate multilayer sheet using enzymatic mineralization. *Biomaterials*, v. 25, p. 5481-5489, 2004.

YANG, H.; HUANG, C.; LI, X.; SHI, R.; ZHANG, K. Luminescent and photocatalytic properties of cadmium sulfide nanoparticles synthesized via microwave irradiation. *Materials Chemistry and Physics*, v. 90, p. 155-158, 2005.

YU, C.; CHANG, J.; LEE, Y.; LIN, Y.; WU, M.; YANG, M.; CHIEN, C. Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering. *Materials Letters*, v. 93, p. 133-136, 2013.

ZHANG, Z.; CHEN, X.; BIAN, S.; HUANG, J.; ZHANG, T.; WANG, K. Identification of dicalcium phosphate dehydrate deposited during osteoblast mineralization *in vitro*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 131, p. 109-114, 2014.

ZHAO, J.; LIU, Y.; SUN, W.; YANG, X. First detection, characterization, and application of amorphous calcium phosphate in dentistry. *Journal of Dental Science*, v. 7, p. 316-323, 2012.

## ANEXO 1

## DETERMINAÇÃO DA ORDEM DA REAÇÃO DE SOLUBILIZAÇÃO A PARTIR DO MÉTODO GRÁFICO.

As medidas para a determinação da velocidade de uma reação mostram que as taxas de variação dependem da concentração de reagentes (e, algumas vezes, produtos). É possível representar essa dependência em termos de equações diferenciais conhecidas como leis de velocidade. As soluções dessas equações são utilizadas para prever as concentrações de espécies, em qualquer momento após o início da reação. A forma da lei de velocidade também fornece certa compreensão sobre a série de passos elementares através dos quais uma reação ocorre. A tarefa fundamental neste contexto é a construção da lei da velocidade a partir de um mecanismo proposto e sua comparação com a experiência. Segundo Atkins e Jones (2012), etapas elementares simples possuem leis de velocidade simples e essas leis podem ser combinadas em conjunto, utilizando-se uma ou mais aproximações.

A construção de gráficos nos permite constatar qual a ordem de uma determinada reação a partir da linearidade desses gráficos. Deve-se para tanto construir três gráficos: o primeiro com a concentração em função do tempo (reação de ordem zero); o segundo lançando-se o logaritmo neperiano ( $\ln$ ) da concentração em função do tempo (reação de 1ª ordem); e por fim considera-se o inverso da concentração em função do tempo. De acordo com essas considerações, os gráficos plotados são apresentados nas Figuras 31 a 33.

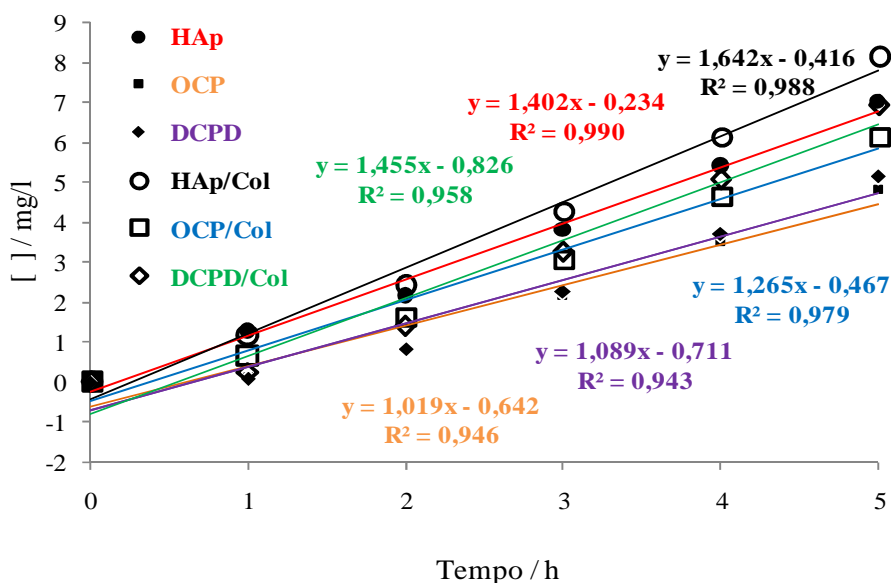
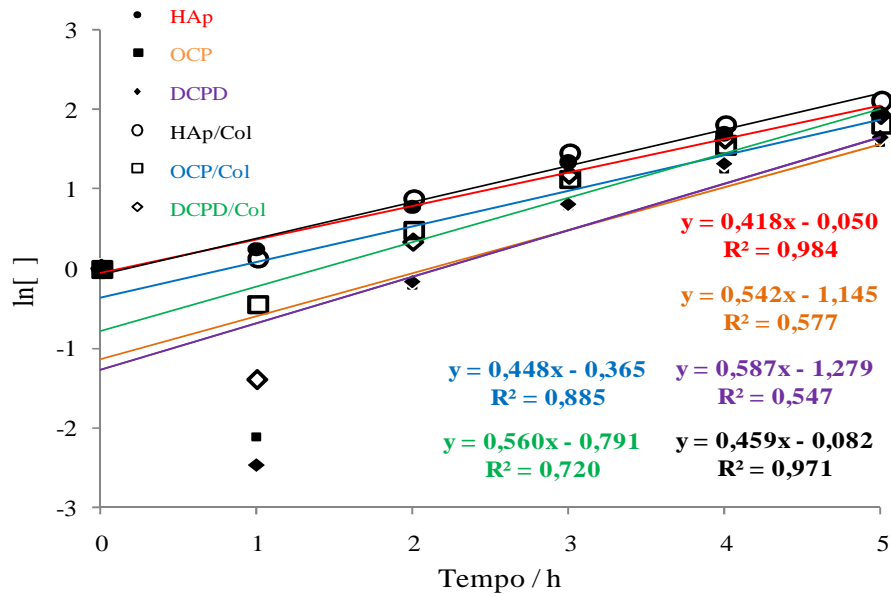
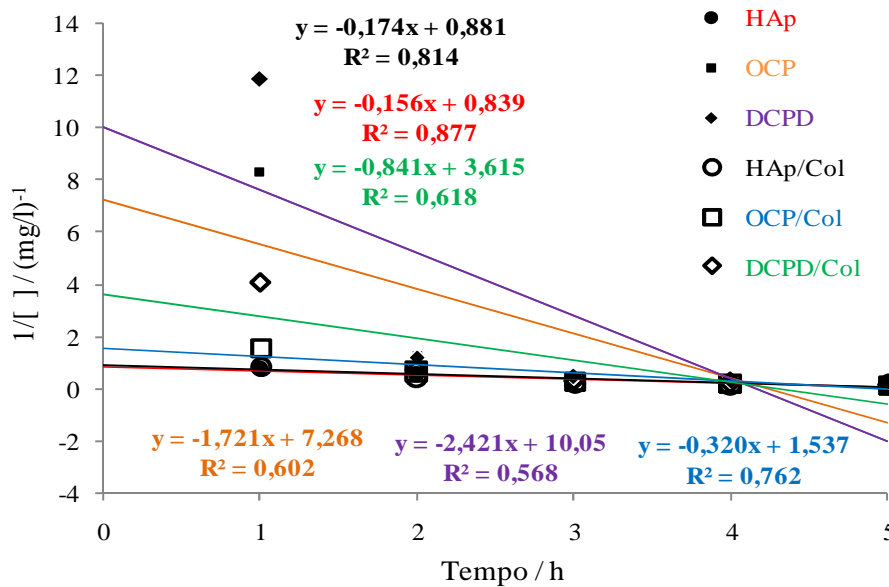


Figura 31. Gráfico da concentração em função do tempo (ordem zero).



**Figura 32.** Gráfico do logaritmo neperiano da concentração em função do tempo (1ª ordem).



**Figura 33.** Gráfico do inverso da concentração em função do tempo (2ª ordem).

A análise das figuras permite verificar que o gráfico construído a partir da concentração em função do tempo alcançou maior linearidade para todas as amostras quando os valores são comparados com os obtidos nos outros dois gráficos. Essa maior linearidade indica então que a lei de velocidade da solubilização do material em FFS é de ordem zero, o que indica que a solubilização do cálcio não depende da concentração do meio e continuará acontecendo enquanto houver cálcio a ser solubilizado.