

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDAÇÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA POR Mariana  
Motisque E APROVADA  
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 22/02/2010  
Leutia Ab. Zavaglia  
ORIENTADOR

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA**  
**COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA**

Mariana Motisque

**Síntese de Cimento Ósseo a base de  $\alpha$ -TCP e**  
**Estudo da Influência do Mg e do Si em suas**  
**Propriedades Finais.**

Campinas, 2010

Mariana Motisuke

# **Síntese de Cimento Ósseo a base de $\alpha$ -TCP e Estudo da Influência do Mg e do Si em suas Propriedades Finais**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado da  
Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade  
Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do  
título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Orientador: Cecília A. C. Zavaglia

Co-orientador: Raúl García Carrodegua

Campinas  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -  
UNICAMP

M857s	<p>Motisuke, Mariana</p> <p>Síntese de cimento ósseo a base de <math>\alpha</math>-TCP e estudo da influência do Mg e do Si em suas propriedades finais / Mariana Motisuke. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Raúl García Carrodegua.</p> <p>Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.</p> <p>1. Fosfato de cálcio. 2. Troca iônica. 3. Cinética química. 4. Biomateriais. 5. Biocompatibilidade. I. Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho. II. Carrodegua, Raúl García. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.</p>
-------	--

Título em Inglês:  $\alpha$ -TCP calcium phosphate cement and the influence of Mg and Si substitution on its final properties

Palavras-chave em Inglês: Calcium phosphate, Ion exchange, Chemical kinetics, Biomaterials, Biocompatibility

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Doutor em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Célia Marina Alvarenga Freire, Celso Aparecido Bertran, José Carlos Bressiani, Carlos Alberto Fortulan

Data da defesa: 22/02/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA  
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**TESE DE DOUTORADO**

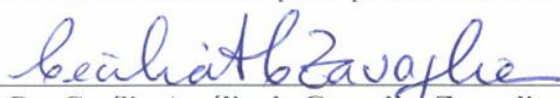
**Síntese de Cimento Ósseo a base de  $\alpha$ -TCP e  
Estudo da Influência do Mg e do Si em suas  
Propriedades Finais**

Autor: Mariana Motisuke

Orientador: Cecília A. C. Zavaglia

Co-orientador: Raúl García Carrodegua

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:



Prof. Dr. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente  
Universidade Estadual de Campinas, DEMa-FEM



Prof. Dr. Célia Marina Alvarenga Freire  
Universidade Estadual de Campinas, DEMa-FEM



Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran  
Universidade Estadual de Campinas, DFQ-IQ



Prof. Dr. José Carlos Bressiani  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CCTM



Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan  
Universidade de São Paulo, EESC

Campinas, 22 de fevereiro de 2010



Dedico este trabalho àqueles para os quais este trabalho foi escrito: A comunidade científica que se dedica ao desenvolvimento e ao aprimoramento de biomateriais.

## Agradecimentos

À minha orientadora **Cecília Zavaglia** que proporcionou todas as oportunidades necessárias para meu crescimento e formação profissional e pessoal e, principalmente, por ser a pessoa quem acreditou em mim desde o princípio. E ao meu co-orientador **Raúl García Carrodegua**s pela confiança e paciência e por sempre estar de braços abertos para me ajudar e me ensinar;

Ao **Rafael Tiba** que sempre esteve disposto a me ajudar a clarear as idéias quando eu já não sabia que caminho seguir. E ainda, por todo seu carinho, amor e dedicação;

Aos meus pais e irmã, **Paulo, Maria José e Daniela**, por terem me apoiado em todas as decisões que tive que tomar para chegar até aqui;

À professora **Eliana Rigo** pelo seu carinho e por ter contribuído para minha formação técnica e profissional desde o início de meus projetos de iniciação científica;

Aos professores **Carlos Alberto Fortulan e Elíria Pallone** e à **Adelino Coelho** por todo o apoio na síntese e processamento de meus materiais nos momentos em que tudo parecia perdido;

À **Dra. Emilia Uzumaki** e à **Carlos Sales Lambert** por todo o apoio e ajuda durante o desenvolvimento de meu projeto e de minha formação profissional;

Aos professores **Celso Aparecido Bertran, José Carlos Bressiani, Carlos Alberto Fortulan e Célia Marina Alvarenga Freire e Marisa Beppu** que participaram da banca examinadora do exame de qualificação e da defesa de doutorado pela paciência, correções e comentários que em muito contribuíram para a conclusão deste trabalho;

À professora **Ana Maria Minarelli Gaspar** e à **Sybele Saska** pela realização do ensaio “in vivo”;

Ao professor **Arnaldo Rodrigues Jr.**, à professora **Olga Higa** e à **Dr Andrea Rodas** pela realização dos ensaios de citotoxicidade indireta;

Aos **colegas do Labiomec** sem os quais as exaustivas horas no laboratório não seriam tão produtivas e enriquecedoras. Em especial à **Guínea**, ao **Hugo**, à **Maria**, ao **Leonardo**, ao **Sérgio**, à **Lonetá**, ao **Alexandre** e ao **Carmo**;

Aos colegas do **DEMA** que contribuíram de maneira imensurável para a realização deste trabalho. Em especial à **Rita Jacon**, à **Claudente Leal**, ao **José Luis Lisboa**, ao **Claudio Roberto Silveira**, ao **Edmilton Gusken** e à **Claudia Nunes** (me perdoem se esqueci alguém). À **Kelly Roberta de Palma** e a todos os **funcionários do LRAC** pelas caracterizações realizadas;

Aos professores, **Salvador de Aza**, **Antonio de Aza**, **Pilar Peña**, **Francisco José Valle** e **Pío Callejas** do ICV (Instituto de Cerâmica e Vidro, Madri, Espanha) e à professora **Maria Pau Ginebra** da UPC (Universidade Politécnica da Catalunha, Barcelona, Espanha), por terem me recebido de braços abertos em seus grupos de pesquisa e terem me ensinado muito;

Aos colegas e amigos que fiz durante o tempo que estive na UPC, em especial à **Gemma** e à **Edgar**;

Ao **Laboratório de Microscopia Eletrônica** do **Laboratório Nacional de Luz Síncrotron** por ter permitido a utilização de seus microscópios;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** por ter acreditado em meu projeto e concedido a mim minha bolsa de doutorado-direto (Processo Fapesp nº 2005/04746-0);

Ao Programa **Erasmus Mundus-Euro Brazilian Window** por ter me concedido a oportunidade de terminar os experimentos de minha tese no BIBITE, UPC, Barcelona, Espanha;

À **Rede CYTED-Biofab** e ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia BIOFABRIS** pelo apoio durante o desenvolvimento deste projeto; e

Às minhas amigas **Jax**, **Marininha**, **Tonoli**, **Sorô**, **Grínia** e **Aline** por terem participado de todo este processo sempre me apoiando e entendendo quando eu não podia estar presente porque tinha que escrever um artigo ou terminar um experimento.

“O único lugar no qual o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”

Albert Einstein

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charles Chaplin

## Resumo

A necessidade de novos biomateriais que permitem considerável melhora na qualidade de vida de pessoas que sofrem de doenças relacionadas à velhice ou que apresentam algum tipo de lesão no tecido ósseo advindas de acidentes ou doenças como a obesidade e o câncer tem despertado o interesse dos pesquisadores. Neste contexto, o desenvolvimento de novos biomateriais para a ortopedia baseados nos fosfatos de cálcio é relevante uma vez que estes apresentam excelente biocompatibilidade e bioatividade devido à sua composição química semelhante à fase mineral de ossos e dentes.

A substituição por silicato de alguns grupos fosfatos é, hoje em dia, uma área muito promissora no desenvolvimento de fosfatos de cálcio uma vez que a presença deste elemento pode aumentar a bioatividade e estimular a diferenciação das células aderidas à superfície dos substitutos ósseos. Dentre estes materiais, o que recebe grande destaque é o Si- $\alpha$ -TCP, que se utilizado como cimento ósseo promete resultados interessantes. Além disso, o silício atua como um elemento estabilizante da fase  $\alpha$ , tornando possível a sua formação em temperaturas mais baixas que as normalmente empregadas e, por isso, reduzindo os custos de sua síntese. Assim, o principal objetivo deste trabalho é investigar a influência do Si nas propriedades químicas, físicas, mecânicas, de biocompatibilidade e de bioatividade do cimento de  $\alpha$ -TCP.

No entanto, a síntese do  $\alpha$ -TCP puro não é uma tarefa simples, uma vez que muitas condições de processo podem alterar suas propriedades finais ou, ainda, inibir a sua formação. O fator de maior influência é a qualidade dos reagentes de partida, que pode impossibilitar a formação de  $\alpha$ -TCP em temperaturas tão altas como 1600°C, comprometendo a reprodutibilidade de seu processamento. Portanto, em conjunto com o desenvolvimento do Si- $\alpha$ -TCP, foram sintetizados reagentes com elevado teor de pureza, ou seja, livres da principal impureza que interfere na síntese do  $\alpha$ -TCP, o magnésio. Este elemento é um famoso estabilizante da fase  $\beta$  e eleva a temperatura de transição de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  para até 1500°C. Verificou-se que a padronização das propriedades dos reagentes de partida garantiu a reprodutibilidade do processo de fabricação do  $\alpha$ -TCP. Porém, observou-se que o Si reduz em quase quatro vezes a reatividade do  $\alpha$ -TCP uma vez que por estabilizar a fase  $\alpha$ , torna o material menos solúvel. Além disso, devido a esta

baixa reatividade do pó com silício a resistência mecânica do cimento ósseo nos primeiros instantes de cura foi extremamente baixa ( $0,81 \pm 0,25$  MPa). Mesmo assim, alcançou valores similares ao cimento sem silício (18 MPa para o  $\alpha$ -TCP e 15 MPa para o Si- $\alpha$ -TCP) após 168 horas de cura. Por outro lado, a biocompatibilidade e a formação de uma camada de *apatita* na superfície dos cimentos após ensaio em Fluido Corpóreo Simulado demonstram que o silício interfere positivamente nos processos de regeneração óssea.

Foi possível desenvolver um novo cimento ósseo baseado no Si- $\alpha$ -TCP obtido a partir de reagentes sintetizados em laboratório que garantiram uma considerável redução de custos de síntese e um elevado teor de pureza. A produção dos precursores  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{CaSiO}_3$  em laboratório foi a etapa mais significativa para a redução de custos uma vez que a baixa quantidade de impurezas presentes é responsável pela menor temperatura de síntese necessária ( $1200^\circ\text{C}$  para o Si- $\alpha$ -TCP e  $1300^\circ\text{C}$  para o  $\alpha$ -TCP) e o consequente aumento na facilidade de processamento (moagem) e na bioatividade em FCS do cimento ósseo. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que foi desenvolvida tecnologia nacional para a produção de um cimento ósseo com potencial de aplicação clínica e que será mais acessível à população brasileira.

#### *Palavras Chave*

Fosfato de cálcio, Troca iônica, Cinética química, Biomateriais, Biocompatibilidade.

## Abstract

The need for new biomaterials which could improve life quality of people who suffer from oldness diseases or who have any bone tissue injury due to accidents and diseases like obesity and cancer are resulting in a growing number of researches. In this context, the development of new orthopedics biomaterials based on calcium phosphates compounds is relevant once they present excellent bioactivity and biocompatibility due to its chemical composition similar to the mineral part of bone and teeth.

Silicon substitution into some phosphorous sites of calcium phosphate bioceramics is a promising field on the development of new biomaterials for orthopedics applications due to the increased bioactivity and cell differentiation on the material's surface which could be promoted by the presence of this element. In this manner, Si- $\alpha$ -TCP is receiving huge efforts since its employment as bone cement could be of great interest. Moreover, silicon is known to stabilize the  $\alpha$ -TCP structure and to promote its formation at lower temperatures leading to a cost reduction of its processing. Thus, the major objective of this study is to investigate the influence of Si on the chemical, physical, mechanical, biocompatible and bioactive properties of the calcium phosphate cement once there is a lack of publication regarding this material. On the other hand, the synthesis of a pure  $\alpha$ -tricalcium phosphate is not an easy task since all process conditions can change its final properties, or even inhibit its formation. The most limiting factor is the quality of the starting reagents which may preclude the formation of  $\alpha$ -TCP at temperatures as high as 1600° C. Therefore, the reproducibility of  $\alpha$ -TCP synthesis becomes very difficult and, in some cases, impossible. In this context, and together with the development of Si- $\alpha$ -TCP, high purity reagents were synthesized to eliminate the most important impurity which is an established stabilizer element of  $\beta$ -TCP, magnesium. It has been discovered that the standardization of the reagents properties guaranteed the reproducibility of  $\alpha$ -TCP manufacturing process. Nevertheless, it was also observed that Si has a strong influence on the setting reaction of the cement by reducing by almost four times the TCP reactivity once this element stabilizes the  $\alpha$ -TCP structure and the final material is less soluble. As a result, the mechanical strength of the cement at initial times was extremely low ( $0,81 \pm 0,25$  MPa) even though it has achieved similar values to the cement without silicon after 168 hours of setting (18 MPa for  $\alpha$ -TCP e 15 MPa for Si- $\alpha$ -TCP).

Nonetheless, the biocompatibility after in vivo study and the precipitation of an apatite layer after SBF immersion lead to the conclusion that Si has a positive interference on the bone regeneration process.

It was possible to develop a new calcium phosphate cement based on Si- $\alpha$ -TCP obtained from laboratory synthesized reagents which lead to a considerable reduction on the production costs and in a high purity level of the final material. The synthesis of  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaHPO}_4$  and  $\text{CaSiO}_3$  with low contents of impurities was the most significant step to cost reduction due to the lower temperatures needed to synthesize Si- $\alpha$ -TCP ( $1200^\circ\text{C}$ ) and  $\alpha$ -TCP ( $1300^\circ\text{C}$ ), the enhanced facility on milling and the improved bone cement bioactivity in Simulated Body Fluid. National technology was developed in order to guarantee the production of a bone cement which has a huge potential to clinical application and, certainly, it will be more accessible to Brazilian people.

#### *Key Words*

Calcium phosphate, Ion exchange, Chemical kinetics, Biomaterials, Biocompatibility



## Lista de Figuras

FIGURA 2.1 - APLICAÇÕES DOS BIOMATERIAIS (MONTEIRO, ET AL., 2004).....	5
FIGURA 2.2 - ESTRUTURA CRISTALINA HEXAGONAL DA HA ESTEQUIOMÉTRICA OU FLUORETADA (MATHEW, ET AL., 2001). ....	15
FIGURA 2.3 - ESQUEMA DA ESTRUTURA DO A-TCP NO PLANO (001) (MATHEW, ET AL., 2001). ....	17
FIGURA 2.4 - DIAGRAMA DE FASES DO SISTEMA $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ (WELCH, ET AL., 2002). ....	29
FIGURA 3.1 - FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS DESTE TRABALHO. ....	33
FIGURA 3.2 - DIAGRAMA DO SISTEMA $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (CARRODEGUAS, ET AL., 2008).....	36
FIGURA 3.3 - DIAGRAMA DE FASE DO SISTEMA $(\text{CaSiO}_3\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ (DE AZA, ET AL., 1995).....	37
FIGURA 3.4 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SÍNTESE DO CARBONATO DE CÁLCIO.....	39
FIGURA 3.5 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SÍNTESE DA <i>MONETITA</i> . ....	40
FIGURA 3.6 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SÍNTESE DE <i>WOLLASTONITA</i> . ....	41
FIGURA 3.7 - FLUXOGRAMA DO ESTUDO DA CINÉTICA DE REAÇÃO.....	45
FIGURA 3.8 - (A) MOLDE DE TEFLON UTILIZADO PARA A CONFORMAÇÃO DOS CIMENTOS; (B) SISTEMA DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE RINGER; (C) E (D) APARATO PARA DESMOLDAR CILINDROS. ....	46
FIGURA 3.9 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO B-TCP PARA ANÁLISE QUANTITATIVA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X. ....	51
FIGURA 4.1 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X EM VÁRIAS TEMPERATURAS PARA O TCP-I. OBSERVA-SE A TRANSFORMAÇÃO DE FASE $B \rightarrow A$ CONFORME SE AUMENTA A TEMPERATURA DE TRATAMENTO TÉRMICO. LEGENDA: A = A-TCP E B = B-TCP.....	58
FIGURA 4.2 – DIFRATOGRAMA DE RAIOS X EM VÁRIAS TEMPERATURAS PARA O A-TCP OBTIDO COM REAGENTES SÉRIE RC E SEM ADIÇÃO DE SILÍCIO (RAMOS, ET AL., 2008). A TRANSFORMAÇÃO DE FASE $B \rightarrow A$ INICIA-SE APENAS A 1300°C. LEGENDA: A = A-TCP E B = B- TCP.....	59
FIGURA 4.3 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DO FOSFATO DE CÁLCIO OBTIDO APÓS MOAGEM DURANTE 168 HORAS. LEGENDA A = A-TCP E B = B-TCP. ....	60
FIGURA 4.4 - DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO TCP-I. MATERIAL APRESENTA DISTRIBUIÇÃO HETEROGÊNEA E COM TAMANHO DE PARTÍCULA MÉDIO IGUAL A 15,47 $\mu\text{m}$ . ....	61
FIGURA 4.5 - MORFOLOGIA DO TCP-I APÓS 7 DIAS DE MOAGEM. DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA NÃO HOMOGÊNEA, RESULTADO DA ELEVADA TEMPERATURA DE TRATAMENTO TÉRMICO E PROCESSO DE MOAGEM EMPREGADO. ....	62
FIGURA 4.6 - CITOTOXICIDADE INDIRETA DO PÓ DE TCP-I. MATERIAL APRESENTA CITOTOXICIDADE EM NÍVEIS CONSIDERÁVEIS, MAS QUE É RESULTADO DA ALTERAÇÃO DE PH DECORRENTE DA DISSOLUÇÃO DO A-TCP EM MEIOS AQUOSOS.....	63
FIGURA 4.7 - EVOLUÇÃO DA REAÇÃO DE CURA DO CIMENTO C-TCP-I APÓS VÁRIOS TEMPOS DE IMERSÃO EM FCS. A = A-TCP; B = B-TCP E A = APATITA. OCORRE A TRANSFORMAÇÃO $A\text{-TCP} \rightarrow \text{APATITA}$ COM O TEMPO DE IMERSÃO. A REAÇÃO DE CURA NÃO É COMPLETA APÓS 7 DIAS. ....	65

FIGURA 4.8 – RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO DO C-TCP-I ANTES E APÓS SETE DIAS DE IMERSÃO EM FCS: (A) AXIAL E (B) RADIAL). AMOSTRAS DE 0 E 7 DIAS APRESENTARAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ( $P < 0,05$ ) COM NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%.	66
FIGURA 4.9 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE DE FRATURA DO CIMENTO ÓSSEO: (A) SEM IMERSÃO EM FCS E (B) APÓS 7 DIAS DE IMERSÃO EM FCS. OBSERVA-SE QUE A REAÇÃO DE CURA DO CIMENTO ÓSSEO OCORRE NA SUPERFÍCIE DA PARTÍCULA DE A-TCP. AS SETAS BRANCAS INDICAM SUPERFÍCIE DA PARTÍCULA DE A-TCP QUE TEVE PARTE DA CAMADA DE APATITA ARRANCADA DEVIDO À FRATURA DO CIMENTO DURANTE ENSAIO DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO.	67
FIGURA 4.10 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DE VARREDURA DA AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DO CIMENTO C-TCP-I: (A) E (B) 0 DIAS, (C) E (D) 7 DIAS. OCORRE A PRECIPITAÇÃO DE UMA CAPA DE APATITA NA SUPERFÍCIE DO CIMENTO ÓSSEO. AS SETAS BRANCAS INDICAM BURACOS QUE FORAM FORMADOS PELA CONTINUAÇÃO DA REAÇÃO DE CURA DURANTE A AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADE EM FCS.	68
FIGURA 4.11 - DETALHE DA SUPERFÍCIE DE UM BURACO FORMADO NA SUPERFÍCIE DO CIMENTO C-TCP-I DA FIGURA 4.10 C. OCORREU A PRECIPITAÇÃO DA CAMADA DE APATITA NA SUPERFÍCIE DESTES BURACOS.	68
FIGURA 4.12 - CITOTOXICIDADE INDIRETA DO C-TCP-I. (A) NÚMERO DE CÉLULAS; (C) C-TCP-I; (B) CONTROLE NEGATIVO; E (D) CONTROLE POSITIVO. O CIMENTO ÓSSEO APRESENTOU CITOTOXICIDADE LEVE, NO ENTANTO, A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS MOSTRAM QUE O EXTRATO NÃO APRESENTA AS CONDIÇÕES NECESSÁRIAS PARA A FIXAÇÃO E O CRESCIMENTO CELULAR.	69
FIGURA 4.13 - ENSAIO "IN VIVO" DO C-TCP-I: PERÍODOS DE 7 DIAS. LEGENDA: C = MATERIAL SENDO DEGRADADO; O = TECIDO ÓSSEO SENDO FORMADO; V = VASOS SANGUÍNEOS; E * = TECIDO FIBROSO.	72
FIGURA 4.14 -- ENSAIO "IN VIVO" DO C-TCP-I: PERÍODOS DE 15 DIAS. LEGENDA: C – MATERIAL IMPLANTADO, O – TECIDO ÓSSEO DA CALOTA ENLOBANDO O DEFEITO E O MATERIAL, * - TECIDO OSTEOÍDE E → CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.	72
FIGURA 4.15 - ENSAIO "IN VIVO" DO C-TCP-I: PERÍODOS DE 30 E 60 DIAS. LEGENDA: C = MATERIAL SENDO DEGRADADO; O = TECIDO ÓSSEO SENDO FORMADO; E → = CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.	73
FIGURA 4.16 - ENSAIO "IN VIVO" DO C-TCP-I: PERÍODO DE 120 DIAS. LEGENDA: O = TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO; V = VASOS SANGUÍNEOS; * = TECIDO FIBROSO E C = MATERIAL SENDO DEGRADADO.	73
FIGURA 4.17 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DO $\text{CaHPO}_4$ COMERCIAL E OBTIDO EM LABORATÓRIO. M-RL APRESENTA ALGUNS PICOS REFERENTES À BRUSHITA. LEGENDA: M = MONETITA ( $\text{CaHPO}_4$ ) E B = BRUSHITA ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).	74
FIGURA 4.18 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DO $\text{CaCO}_3$ COMERCIAL E OBTIDO EM LABORATÓRIO. O CC-RL APRESENTA TODOS OS PICOS REFERENTES À CALCITA (JCPDS 05-0586). LEGENDA: C = $\text{CaCO}_3$ .	75
FIGURA 4.19 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DO $\text{CaSiO}_3$ COMERCIAL E OBTIDO EM LABORATÓRIO. LEGENDA: O = $\text{CaSiO}_3$ E CS = $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$	75
FIGURA 4.20 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA FORMAÇÃO DOS TCP-II EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.	78
FIGURA 4.21 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA FORMAÇÃO DO TCP-III EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.	78
FIGURA 4.22 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DOS TCPs OBTIDOS COM REAGENTES LIVRES DE MG. TCP-II DOPADO E TCP-III NÃO DOPADO COM SILÍCIO. LEGENDA: A = A-TCP.	82
FIGURA 4.23 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHOS DO TCP-II E TCP-III. * REPRESENTA A REGIÃO QUE DEMONSTRA A PRESENÇA DE BANDAS DE ABSORÇÃO REFERENTES A LIGAÇÃO O-Si-O. REGIÃO EM DETALHE NA FIGURA 4.24.	83

FIGURA 4.24 - BANDAS CARACTERÍSTICAS DA SUBSTITUIÇÃO POR SILÍCIO (DUNFIELD, ET AL., 2005). .....	83
FIGURA 4.25 - DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO TCP-II (PRETO) E TCP-III (CINZA) .....	85
FIGURA 4.26 - MORFOLOGIA DO TCP-II E TCP-III APÓS 48 HORAS DE MOAGEM. SETAS BRANCAS INDICAM PARTÍCULAS MAIORES EM RELAÇÃO AO TCP-II. A DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA É MENOS HOMOGÊNEA DEVIDO À MAIOR TEMPERATURA DE TRATAMENTO TÉRMICO. ....	86
FIGURA 4.27 - CITOTOXICIDADE INDIRETA DO TCP-II E TCP-III. A DOPAGEM COM SILÍCIO INDUZ UM AUMENTO NA CITOTOXICIDADE DO TCP. ....	87
FIGURA 4.28-ESPECTROS DE FTIR DOS CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO APÓS 7 DIAS DE REAÇÃO. A APATITA FORMADA É DEFICIENTE EM CÁLCIO E CARBONATADA. OS “*” MARCAM AS REGIÕES QUE APRESENTAM BANDAS REFERENTES AO GRUPO $\text{CO}_3^{2-}$ . ....	89
FIGURA 4.29 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE POROS DOS CIMENTOS BASEADOS NO TCP-II E NO TCP-III. CIMENTO PREPARADO A PARTIR DO TCP-II APRESENTA UM VOLUME MAIOR DE POROS ENTRE 0,3 E 3 $\mu\text{m}$ . ....	90
FIGURA 4.30 - DIAGRAMA "BOXPLOT" DOS RESULTADOS DO ENSAIO DE COMPRESSÃO AXIAL ANTES E APÓS SETE DIAS DE IMERSÃO EM FCS. IMERSÃO EM FCS FAZ MELHORA A RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS CIMENTOS, PORÉM, AUMENTA A VARIABILIDADE DE VALORES. APÓS 7 DIAS DE IMERSÃO AMBOS OS CIMENTOS APRESENTAM VALORES DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO AXIAL NÃO DIFERENTES ESTATISTICAMENTE. ....	91
FIGURA 4.31 - DIAGRAMA "BOXPLOT" DOS RESULTADOS DO ENSAIO DE COMPRESSÃO RADIAL ANTES E APÓS SETE DIAS DE IMERSÃO EM FCS. A IMERSÃO EM FCS TAMBÉM É RESPONSÁVEL PELO AUMENTO DA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO RADIAL. NO ENTANTO, NÃO EXISTE DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE AS AMOSTRAS APÓS 7 DIAS DE IMERSÃO. ....	92
FIGURA 4.32 - COMPRESSÃO AXIAL E RADIAL DOS CIMENTOS SEM IMERSÃO EM FCS. O CIMENTO C-TCP-II APRESENTA VALORES INICIAIS DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO AXIAL E RADIAL EXTREMAMENTE BAIXOS. RESULTADOS INDICAM TAXA DE REATIVIDADE MENOR DO TCP- II. ....	93
FIGURA 4.33 - COMPRESSÃO AXIAL E RADIAL APÓS SETE DIAS DE IMERSÃO EM FCS. APÓS 168H DE IMERSÃO EM FCS AMBOS OS CIMENTOS ATINGEM VALORES DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO AXIAL E RADIAL QUE NÃO SÃO ESTATISTICAMENTE DIFERENTES. ....	93
FIGURA 4.34 - DIFRAÇÃO DE RAIOS X ANTES E APÓS IMERSÃO EM FCS DO CIMENTO C-TCP-II. MESMO APÓS 7 DIAS DE IMERSÃO EM FCS, A CONVERSÃO A-TCP→APATITA NÃO FOI COMPLETA. LEGENDA: A = A-TCP E C = APATITA .....	94
FIGURA 4.35 - DIFRAÇÃO DE RAIOS X ANTES E APÓS IMERSÃO EM FCS DO CIMENTO C-TCP-III. DIFERENTEMENTE DO TCP-II A CONVERSÃO A-TCP→APATITA FOI COMPLETA APÓS 7 DIAS DE IMERSÃO EM FCS. LEGENDA: A = A-TCP, C = APATITA E B = B-TCP. ....	95
FIGURA 4.36 - CITOTOXICIDADE INDIRETA DOS CIMENTOS C-TCP-II E C-TCP-III. APESAR DO PÓ DE TCP-II TER APRESENTADO MAIOR CITOTOXICIDADE, O CIMENTO C-TCP-II É MENOS CITOTÓXICO QUE O C-TCP-III. ....	96
FIGURA 4.37 - EVOLUÇÃO DO PH EM SOLUÇÃO TAMPÃO 0,2M Tris/ $\text{HNO}_3$ . ESTIMATIVA DA EVOLUÇÃO DO PH DURANTE A PEGA DOS CIMENTOS. O SILÍCIO ALTERA O COMPORTAMENTO DO PH DURANTE A PEGA DO CIMENTO NOS PRIMEIROS DOIS DIAS OCORRE UMA BASIFICAÇÃO INICIAL ENQUANTO QUE PARA O TCP-III OS VALORES DE PH APENAS DIMINUEM COM O PASSAR DO TEMPO. ....	97
FIGURA 4.38 - DETALHE DOS CRISTAIS DO CIMENTO C-TCP-II APÓS 7 DIAS DE IMERSÃO EM FCS. SUPERFÍCIE DE FRATURA.....	99
FIGURA 4.39 - IMERSÃO EM FCS DA SUPERFÍCIE DOS CIMENTOS C-TCP-II E C-TCP-III. A MORFOLOGIA DA APATITA FORMADA NA SUPERFÍCIE DO C-TCP-II APRESENTA MORFOLOGIA MAIS PRÓXIMA DA APATITA BIOLÓGICA.....	99

FIGURA 4.40 - EVOLUÇÃO DA REAÇÃO DE CURA (A) TCP-II E (B) TCP-III. OBSERVA-SE A MENOR TAXA DE CONVERSÃO A-TCP→ APATITA QUE OCORRE PARA O TCP-II. NAS PRIMEIRAS 72 HORAS NÃO SE EVIDENCIA A PRECIPITAÇÃO DE APATITA PARA O TCP-II ENQUANTO QUE PARA O TCP-III LOGO APÓS 2H JÁ É POSSÍVEL EVIDENCIAR PICOS DE APATITA. ....	101
FIGURA 4.41 - EVOLUÇÃO COM O TEMPO DE REAÇÃO DE CURA DA INTENSIDADE DO PICO (1 0 7) DO A-TCP. ....	102
FIGURA 4.42 - COMPARATIVO DA TAXA DE CONVERSÃO DO A-TCP EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O TCP-II E O TCP-III. APESAR DO SILÍCIO REDUZIR A VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CURA DO CIMENTO ÓSSEO AMBOS OS CIMENTOS ATINGIRAM 100% DE CONVERSÃO A-TCP→APATITA. ....	103
FIGURA 4.43 - EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA MECÂNICA EM FUNÇÃO DO TEMPO. O TCP-II APRESENTA TAXA DE EVOLUÇÃO DE RESISTÊNCIA MECÂNICA MENOR QUE O TCP-III, PORÉM APÓS 168H ATINGE UM VALOR DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO AXIAL MAIOR QUE O ATINGIDO PARA O TCP-III. ....	104
FIGURA 4.44 - COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO DOS DOIS MATERIAIS (A) 120 HORAS E (B) 168 HORAS. AMOSTRAS SÃO ESTATISTICAMENTE DIFERENTES ( $p < 0,05$ ) COM 95% DE CONFIANÇA. ....	105
FIGURA 4.45 – MICROGRAFIAS DO TCP-II E TCP-III APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO. SETAS BRANCAS INDICAM GRÃOS DE TCP SEM REAGIR. APESAR DE NÃO SE OBSERVAR PICOS REFERENTES A APATITA NO DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DO TCP-II APÓS 24H DE REAÇÃO, A TRANSFORMAÇÃO A-TCP→APATITA JÁ SE INICIOU, PORÉM OS CRISTAIS DE APATITA SÃO DEMASIADOS PEQUENOS EM RELAÇÃO ÀS PARTÍCULAS DE A-TCP E POR ISSO NÃO SÃO IDENTIFICADOS NA DRX. ....	106
FIGURA 4.46 - MICROGRAFIAS DO TCP-II E TCP-III APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO. PARA O TCP-II AINDA É POSSÍVEL OBSERVAR PARTÍCULAS DE A-TCP SEM REAGIR. ....	106
FIGURA 4.47 - MICROGRAFIAS DO TCP-II E TCP-III APÓS 168 HORAS DE REAÇÃO. SETAS BRANCAS INDICAM “OCOS” FORMADOS DEVIDO AO FATO DA TRANSFORMAÇÃO A-TCP→APATITA OCORRER NA SUPERFÍCIE DAS PARTÍCULAS DE TCP. ....	106
FIGURA 4.48 - DETALHES DOS CRISTAIS DE APATITA DOS CIMENTOS CURADOS DURANTE 168 H. CRISTAIS DO TCP-II SÃO MENORES QUE OS CRISTAIS DO TCP-III. CONFIRMAÇÃO DO INDÍCIO DE QUE O SILÍCIO INIBE O CRESCIMENTO DE CRISTAIS. ....	107
FIGURA 4.49 - EVOLUÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL BET EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CURA DOS TCPs. ALÉM DE APRESENTAR TAXA DE CRESCIMENTO DE ÁREA SUPERFICIAL MENOR O TCP-II ATINGIU UM MAIOR VALOR DE ÁREA SUPERFICIAL QUE É JUSTIFICADO PELO MENOR TAMANHO DOS CRISTAIS DE APATITA FORMADOS E A MAIOR POROSIDADE FINAL DO CIMENTO. ....	108
FIGURA 4.50 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE POROS DO TCP-II E TCP-III AO FINAL DO ENSAIO CINÉTICO. O TCP-II RESULTOU EM UM CIMENTO LIGEIRAMENTE MAIS POROSO QUE O TCP-III. ....	109
FIGURA 4.51 - COMPARATIVOS DAS TAXAS DE CONVERSÃO DE A-TCP EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA OS TRÊS TCPs. SEM NORMALIZAÇÃO PELA ÁREA SUPERFICIAL, OBSERVA-SE QUE O TCP-I-2 APRESENTA CINÉTICA SEMELHANTE AO TCP-III. ....	111
FIGURA 4.52 - EVOLUÇÃO DA CINÉTICA DA REAÇÃO DE CURA: (A) TCP-I-2; (B) TCP-II; E (C) TCP-III. ....	112
FIGURA 4.53 - EVOLUÇÃO DA INTENSIDADE DO PICO (107) DO A-TCP EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA OS TRÊS TCPs. ....	113
FIGURA 4.54 - EVOLUÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL BET DURANTE A CURA DO CIMENTO PARA OS TRÊS TCPs. ....	114
FIGURA 4.55 - MICROGRAFIAS DO CIMENTO DE TCP-I-2 APÓS 168 HORAS DE CURA EM VÁRIOS AUMENTOS. VERIFICA-SE QUE A MORFOLOGIA DO TCP-I-2 É HETEROGÊNEA E APRESENTA CRISTAIS DE APATITA PEQUENOS E GRANDES. ....	115
FIGURA 4.56 - POROSIDADE DOS TRÊS TCPs APÓS 168 HORAS DE REAÇÃO DE CURA. ....	115

FIGURA 4.57 – COMPARAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO PH PARA OS TRÊS TCPs.....	117
<b>FIGURA A.1 – DIAGRAMA DE FASES DO SISTEMA <math>\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5</math> DESENVOLVIDO POR (BARRETT, ET AL., 1942).</b> .....	138
FIGURA A.2 - DIAGRAMA DO SISTEMA TCP- $\text{SiO}_2$ (PIERRE, 1956).....	139
FIGURA A.3 – MICROGRAFIAS ÓPTICAS DAS AMOSTRAS DO SISTEMA W-TCP. (A) 1312°C; (B) 1359°C; (C) 1400°C; (D) 1457°C; (E) 1504°C; E (F) 1553°C. ....	143
FIGURA A.4 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DO SISTEMA W-TCP. ....	144
FIGURA A.5 - DADOS EXPERIMENTAIS E SOLUBILIDADE DO SILÍCIO NO TCP PARA O SISTEMA W-TCP. ....	145
FIGURA A.6 - EM DETALHE A SOLUBILIDADE DO SILÍCIO NA ESTRUTURA DO TCP. ....	145
FIGURA A.7 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DO SISTEMA $\text{SiO}_2$ -TCP. ....	146
FIGURA A.8 - MICROGRAFIAS ÓPTICAS DO SISTEMA TCP- $\text{SiO}_2$ . (A) 1482°C (B) 1533°C (C) 1571°C (D) 1598°C.....	147
FIGURA A.9 - PONTOS EXPERIMENTAIS E QUE DELIMITAM A SOLUBILIDADE DO SI NA ESTRUTURA DO TCP. ....	148
FIGURA B.1 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DO “SCAFFOLD” S-TCP-I E DO CIMENTO C-TCP-I APÓS 24H DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE RINGER.....	152
FIGURA B.2 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DO “SCAFFOLD” S-TCP-III E DO CIMENTO C-TCP-III APÓS 24H DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE RINGER.....	152
FIGURA B.3 - POROSIMETRIA DE MERCÚRIO DO C-TCP-I E S-TCP-I. ....	153
FIGURA B.4 - POROSIMETRIA DE MERCÚRIO DO S-TCP-III E C-TCP-III. ....	154
FIGURA B.5 - MICROGRAFIAS DOS "SCAFFOLDS" APÓS 24H DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE RINGER: (A) E (B) S-TCP-I; (C) E (D) S-TCP-III .....	155
FIGURA B.6 - MICROGRAFIAS DOS CIMENTOS: (A) C-TCP-I; E (B) C-TCP-III.....	155
FIGURA B.7 - DIAGRAMAS "BOXPLOT" DA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO DOS "SCAFFOLD" APÓS 1 E 7 DIAS DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE RINGER: (A) AXIAL S-TCP-I; (B) RADIAL S-TCP-I; (C) AXIAL S-TCP-III; E (D) RADIAL S-TCP-III.....	157

## Lista de Tabelas

TABELA 2.1 - CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS (DUBOK, 2000).....	8
TABELA 2.2 - PRINCIPAIS FUNÇÕES DAS BIOCERÂMICAS (HENCH, ET AL., 1993).....	9
TABELA 2.3 - PROPRIEDADES DA ALUMINA EM COMPARAÇÃO COM AS PROPRIEDADES DO TECIDO ÓSSEO (DUBOK, 2000). ....	9
TABELA 2.4 - CLASSIFICAÇÃO DAS BIOCERÂMICAS (KAWACHI, ET AL., 2000). ....	11
TABELA 2.5 - ALGUNS ADITIVOS UTILIZADOS NOS CFC. ....	22
TABELA 2.6 - ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DA REAÇÃO DE CURA DE CFC (BOHNER, 2007). ....	22
TABELA 2.7 - ALGUNS CIMENTOS DE FOSFATOS DE CÁLCIO ENCONTRADOS NO MERCADO (DOROZHKIN, 2009). ....	24
TABELA 2.8 - PRINCIPAIS PROPRIEDADES DA PRECIPITAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO A 25°C (DOROZHKIN, 2010). SOL = SOLUBILIDADE .	28
TABELA 2.9 – ALGUNS MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO (LEGEROS, 1991). ....	30
TABELA 3.1 - DESCRIÇÃO DA SIMBOLOGIA UTILIZADA NO CAPÍTULO. ....	33
TABELA 3.2 – RESULTADOS DA ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE FRX. ELEMENTOS MINORITÁRIOS (IMPUREZAS) PRESENTES NOS REAGENTES UTILIZADOS NA SÍNTESE DO TCP-I. VALORES EM % EM MASSA. ....	36
TABELA 3.3 –FRX SEMI-QUANTITATIVA DOS ELEMENTOS MINORITÁRIOS DOS REAGENTES DA SÉRIE RL. VALORES EM % MÁSSICA. ....	42
TABELA 3.4 - RESUMO DAS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO UTILIZADAS NESTE TRABALHO.....	43
TABELA 3.5 - COMPOSIÇÃO IÔNICA DO FCS EM COMPARAÇÃO COM A DO PLASMA SANGÜÍNEO (KOKUBO, ET AL., 2006). ....	46
TABELA 4.1 - QUANTIDADES DE B-TCP NAS AMOSTRAS TCP-I EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA. VALORES DETERMINADOS POR DRX UTILIZANDO-SE O MÉTODO DO PADRÃO INTERNO. ....	58
TABELA 4.2 – RESULTADO DA FRX QUANTITATIVA PARA ELEMENTOS MAJORITÁRIOS. DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO $Ca/(P+Si)$ E $(Ca+Mg)/(P+Si)$ .....	60
TABELA 4.3 – DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA E DENSIDADE ABSOLUTA DO TCP-I. ....	61
TABELA 4.4 - RESULTADOS DO ENSAIO MECÂNICO PARA O CIMENTO C-TCP-I. A RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO AXIAL E DIAMETRAL AUMENTAM COM O TEMPO DE IMERSÃO EM FCS, NO ENTANTO, DEVIDO AO ELEVADO TAMANHO DE PARTÍCULA E À ELEVADA RELAÇÃO LÍQUIDO-PÓ UTILIZADA OS VALORES OBTIDOS FORAM BAIXOS.....	66
TABELA 4.5 –FRX SEMI-QUANTITATIVA DOS ELEMENTOS MINORITÁRIOS DOS REAGENTES. VALORES EM % MÁSSICA. ....	76
TABELA 4.6 - QUANTIDADES DE B-TCP NAS AMOSTRAS TCP-II E TCP-III EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.....	79
TABELA 4.7 - ELEMENTOS ESTABILIZADORES DAS FASES A E B DO TCP. ....	81
TABELA 4.8 - RELAÇÃO $Ca/P$ E $Ca/P+Si$ CALCULADAS A PARTIR DE ANÁLISE QUANTITATIVA DE FRX. ....	82
TABELA 4.9 - ABSORÇÕES NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DOS GRUPOS FOSFATOS DO TCP.....	84
TABELA 4.10 - DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA, DENSIDADE ABSOLUTA E ÁREA SUPERFICIAL BET DO TCP-II E TCP-III.....	85
TABELA 4.11 - TEMPOS DE CURA DOS CIMENTOS ÓSSEOS C-TCP-II E C-TCP-III. ....	88
TABELA 4.12 - VIBRAÇÕES NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA CDHA.....	89

TABELA 4.13 – DENSIDADE ABSOLUTA OBTIDA POR POROSIMETRIA DE MERCÚRIO E PICNOMETRIA DE HÉLIO. OS POROS PRESENTES NOS CIMENTOS ESTUDADOS ESTÃO FECHADOS À SUPERFÍCIE E NÃO APRESENTAM INTERCONECTIVIDADE. ....	91
TABELA 4.14 - RESUMO DOS VALORES DA RESISTÊNCIA MECÂNICA À COMPRESSÃO AXIAL E RADIAL. ....	92
TABELA 4.15 - COMPARAÇÃO ENTRE PH DOS EXTRATOS DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE E EM SOLUÇÃO TAMPÃO EM PERÍODOS DE TEMPOS EQUIVALENTES. VALORES DE PH JUSTIFICAM A MAIOR CITOTOXICIDADE DO C-TCP-II. ....	96
TABELA 4.16 - TAXA DE REAÇÃO DOS DOIS CIMENTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO. ....	103
TABELA 4.17 – CONSTANTE DO TEMPO APÓS AJUSTE EXPONENCIAL DOS PONTOS EXPERIMENTAIS E NORMALIZAÇÃO DOS VALORES PELA ÁREA SUPERFICIAL DE CADA PÓ. VERIFICA-SE QUE DE FATO O TCP-II APRESENTA VELOCIDADE DE REAÇÃO 4 VEZES MENOR QUE O TCP-III. ....	103
TABELA 4.18 - EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA MECÂNICA DURANTE A REAÇÃO DE CURA DOS CIMENTOS. ....	104
TABELA 4.19 - PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO E PROPRIEDADES DO TCP-I-2. ....	110
TABELA 4.20 - CONSTANTE DE TEMPO APÓS AJUSTE EXPONENCIAL E NORMALIZAÇÃO PELA ÁREA SUPERFICIAL BET PARA OS TRÊS TCPs. A ÁREA SUPERFICIAL TEM GRANDE INFLUÊNCIA NA CINÉTICA DA REAÇÃO DE CURA DO CIMENTO DE A-TCP. ....	110
TABELA 4.21 - EVOLUÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA OS TRÊS TCPs. ....	113
TABELA A.1 - NOMENCLATURA DAS AMOSTRAS E A TEMPERATURA REAL ( $T_R$ ) DE TRATAMENTO TÉRMICO EMPREGADA. ....	140
TABELA A.2 - ESTEQUIOMETRIA DA MISTURA 90%TCP 10% W DETERMINADA POR FRX. ....	142
TABELA A.3 - QUANTIDADE DE WOLLASTONITA PRESENTE E RELAÇÃO $Ca/(P+Si)$ DE CADA AMOSTRA. ....	144
TABELA A.4 - ESTEQUIOMETRIA DA MISTURA DE REAGENTES DO SISTEMA TCP-SiO <sub>2</sub> OBTIDA POR FRX. ....	147
TABELA A.5 - RESULTADOS DA MICROANÁLISE PARA O SISTEMA TCP-SiO <sub>2</sub> . ....	148
TABELA B.1 - RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS “SCAFFOLDS” OBTIDOS. VALORES COMPARADOS COM CIMENTO SEM AGENTE POROGÊNICO, MAS FABRICADOS NAS MESMAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E TEMPO. ....	156

## Lista de Abreviaturas e Siglas

### Abreviações

<b>Símbolo</b>	<b>Descrição</b>
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
CC	Carbonato de cálcio, $\text{CaCO}_3$
CDHA	Hidroxiapatita deficiente em cálcio, $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$
CFC	Cimento(s) de fosfato de cálcio
DCPA	Hidrogeno fosfato de cálcio, $\text{CaHPO}_4$
DCPA	Hidrogeno fosfato de cálcio anidro, monetita
DCPD	Hidrogeno fosfato de cálcio diidratado, Brushita
DRX	Difração de raios X
FA	Fluorapatita
FCa	Fosfato(s) de cálcio
FCS	Fluído corpóreo simulado
FRX	Fluorescência de raios X
HA	Hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
IC50%	Índice de Toxicidade
IR	Espectroscopia de infravermelho
JCPDS	Joint Comitee for Powder Diffraction Studies
MCPA	Fosfato monocálcico anidro
MCPM	Fosfato monocálcico monoidratado
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NMR	ressonância magnética nuclear
OCP	Fosfato Octacálcico
RC	Reagentes de origem comercial
RL	Reagentes sintetizados em laboratório
Si- $\alpha$ -TCP	$\alpha$ -Fosfato tricálcico substituído com silício, Si- $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
SBF	“Simulated Body Fluid”
TCP	fosfato tricálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
TCP	Fosfato tricálcico
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TGA	termogravimetria
TTCP	Fosfato tetracálcico
UHMWPE	Polietileno de ultra alto peso molecular
W	Wollastonita (silicato de cálcio), $\text{CaSiO}_3$
$\alpha$ -TCP	$\alpha$ -Fosfato Tricálcico
$\beta$ -TCP	$\beta$ -Fosfato Tricálcico



## Simbologia

### Letras romanas

<b>Símbolo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Unidade</b>
A	Área transversal do de raios X feixe incidente	m <sup>2</sup>
D	Diâmetro do poro	μm
d <sub>hkl</sub>	Distância entre dois planos cristalinos de índice hkl	M
e	Carga do elétron	C
F	Fator de estrutura	
F <sub>maxaxial</sub>	Carga máxima no ensaio de compressão axial	N
F <sub>maxradial</sub>	Carga máxima no ensaio de compressão radial	N
h <sub>radial</sub>	Altura do cilindro utilizado no ensaio de compressão radial	M
I	Intensidade integrada da linha de DRX	J.s <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup>
I <sub>0</sub>	Intensidade do feixe de raios X incidente	J.s <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup>
I <sub>Al2O3</sub>	Intensidade integrada da linha de DRX da Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	J.s <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup>
I <sub>β-TCP</sub>	Intensidade integrada da linha de DRX do β-TCP	J.s <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup>
m <sub>β</sub>	Fração mássica de β-TCP	
m <sub>β</sub> <sup>0</sup>	Fração mássica de β presente na amostra	
m <sub>β</sub> <sup>1</sup>	Fração mássica de β adicionada na amostra	
n	Ordem de difração	
p	Fator de multiplicidade	
P	Pressão	Pa
P <sub>0</sub>	Pressão de saturação do nitrogênio	Pa
r	Raio do círculo do difratometro	M
r <sub>axial</sub>	Raio do cilindro utilizado no ensaio de compressão axial	M
r <sub>radial</sub>	Raio do cilindro utilizado no ensaio de compressão radial	M
v	Volume da cela unitária	m <sup>3</sup>
V <sub>a</sub>	Quantidade de nitrogênio adsorvido a uma pressão P	m <sup>3</sup>
V <sub>m</sub>	Quantidade de nitrogênio adsorvido em monocamada	m <sup>3</sup>

### Letras gregas

<b>Símbolo</b>	<b>Descrição</b>	<b>unidade</b>
λ	Comprimento de onda	m
θ <sub>hkl</sub>	Ângulo de Bragg	
μ <sub>0</sub>	Permissividade do vácuo, μ <sub>0</sub> = 4π.10 <sup>-7</sup>	m.kg.C <sup>2</sup>
μ	Coeficiente de absorção linear da amostra	m <sup>-1</sup>
γ	Tensão superficial do mercúrio	J/m <sup>2</sup> ou N/m

$\delta$	Ângulo de contato do mercúrio com a superfície do poro	
$\sigma_{\text{axial}}$	Resistência à compressão axial	MPa
$\sigma_{\text{radial}}$	Resistência à compressão radial	MPa

# Índice

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 BIOMATERIAIS.....	4
2.2 BIOCERÂMICAS.....	8
2.3 BIOCERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO.....	12
2.3.1 <i>Estrutura Cristalina</i> .....	14
2.4 APATITAS .....	17
2.4.1 <i>Aplicações</i> .....	17
2.5 FOSFATO TRICÁLCICO .....	18
2.5.1 <i>Evolução da Transformação de Fases <math>\beta \rightarrow \alpha</math> no Fosfato Tricálcico</i> .....	18
2.5.2 <i>Aplicações</i> .....	19
2.6 CIMENTOS DE FOSFATOS DE CÁLCIO .....	20
2.6.1 <i>Sistema <math>\alpha</math>-TCP: Propriedades e Cinética da Reação de Pega</i> .....	24
2.7 FOSFATOS DE CÁLCIO SUBSTITUÍDOS .....	25
2.7.1 <i>Silício</i> .....	26
2.8 PROCESSAMENTO DE FOSFATOS DE CÁLCIO.....	27
2.8.1 <i>Precipitação em soluções aquosas</i> .....	28
2.8.2 <i>Reações em Estado Sólido</i> .....	28
2.9 CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO.....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
3.1 MATERIAIS UTILIZADOS .....	34
3.2 [ALFA]-FOSFATO TRICÁLCICO DOPADO COM SILÍCIO .....	35
3.2.1 <i>Determinação da Temperatura de Tratamento Térmico, Processamento e Caracterização</i> .....	35
3.2.2 <i>Obtenção e Caracterização do Cimento de Fosfato de Cálcio Baseado no TCP-I (c-TCP-I)</i> .....	38
3.3 REAGENTES LIVRES DE MAGNÉSIO I: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO .....	38
3.3.1 <i>Carbonato de Cálcio (<math>\text{CaCO}_3</math>, CC-RL)</i> .....	38
3.3.2 <i>Hidrogenofosfato de Cálcio (<math>\text{CaHPO}_4</math>, M-RL)</i> .....	39
3.3.3 <i>Silicato de Cálcio (<math>\text{CaSiO}_3</math>, W-RL)</i> .....	40
3.4 REAGENTES LIVRES DE MAGNÉSIO II: A-TCP DOPADO E NÃO DOPADO COM SILÍCIO .....	41

3.4.1 Determinação da Temperatura de Tratamento Térmico, Processamento e Caracterização.....	41
3.4.2 Obtenção e Caracterização do Cimento de Fosfato de Cálcio .....	42
3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	44
3.5.1 Protocolos de Moagem.....	44
3.5.2 Evolução do pH dos Pós de TCP.....	44
3.5.3 Estudo da Cinética da Reação de Cura de Cimentos de Fosfatos de Cálcio. ....	44
3.5.4 Imersão em Fluido Corpóreo Simulado (FCS) .....	46
3.5.5 Citotoxicidade Indireta dos Pós e dos Cimentos de Fosfato de cálcio: Método dos Extratos .....	47
3.5.6 Ensaio In Vivo do Cimento c-TCP-I.....	49
3.5.7 Difração de raios X Qualitativa .....	50
3.5.8 Difração de Raios X Quantitativa: Método do Padrão Interno .....	50
3.5.9 Difração de Raios X: Método do Padrão Externo.....	52
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>57</b>
4.1 [ALFA]-FOSFATO TRICÁLCICO DOPADO COM SILÍCIO .....	57
4.1.1 Determinação da Temperatura de Tratamento Térmico, Processamento e Caracterização do Pó.....	57
4.1.2 Desenvolvimento e Caracterização do Cimento Ósseo .....	63
4.1.3 Ensaio In Vivo do Cimento.....	70
4.2 REAGENTES LIVRES DE MAGNÉSIO I: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO .....	74
4.3 REAGENTES LIVRES DE MAGNÉSIO II: A-TCP DOPADO E NÃO DOPADO COM SILÍCIO .....	77
4.3.1 Determinação da Temperatura de Tratamento Térmico.....	77
4.3.2 Caracterização dos Pós .....	81
4.4 REAGENTES LIVRES DE MAGNÉSIO III: CIMENTO ÓSSEO .....	87
4.4.1 Determinação e Caracterização.....	87
4.4.2 Cinética da Reação de Cura: Influência do Silício.....	100
4.4.3 Estudo Comparativo entre a cinética do TCP-I, TCP-II e TCP-III.....	109
<b>5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....</b>	<b>118</b>
5.1 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	119
5.1.1 Reagentes Livres de Impurezas para a Síntese de TCP.....	119
5.1.2 Fosfato Tricálcico Dopado com Silício .....	119
5.1.3 “Scaffolds” (ANEXO B).....	120
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO A SOLUBILIDADE DO SILÍCIO NA ESTRUTURA CRISTALINA DO TCP .....</b>	<b>134</b>
A.1 INTRODUÇÃO .....	134

A.1.1	<i>Diagrama de Fases</i> .....	134
A.1.2	<i>Determinação de Diagramas de Fases</i> .....	135
A.1.3	<i>Contextualização e Justificativas deste Estudo</i> .....	135
A.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	139
A.2.1	<i>Solução Sólida do Fosfato Tricálcico</i> .....	139
A.2.2	<i>Caracterizações</i> .....	141
A.2.2.1	Fluorescência de Raios X .....	141
A.2.2.2	Difração de Raios X .....	141
A.2.2.3	Microestrutura e Microanálise.....	141
A.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	142
A.3.1	<i>Sistema <math>Ca_3(PO_4)_2</math>-<math>CaSiO_3</math></i> .....	142
A.3.2	<i>Sistema <math>Ca_3(PO_4)_2</math>-<math>SiO_2</math></i> .....	146
A.4	CONCLUSÕES .....	148
<b>ANEXO B</b>	<b>FABRICAÇÃO DE “SCAFFOLDS” A PARTIR DA HIDRÓLISE DO A-TCP: ANÁLISES PRELIMINARES.....</b>	<b>150</b>
B.1	INTRODUÇÃO .....	150
B.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	151
B.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	151
B.4	CONCLUSÕES .....	157
<b>ANEXO C</b>	<b>TRABALHOS PUBLICADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESTE TRABALHO .....</b>	<b>159</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os fosfatos de cálcio (FCa) tem sido estudados como materiais para o reparo de tecidos ósseos nos últimos 90 anos. A primeira utilização “in vivo” dos FCa foi em 1920 quando amostras de fosfato tricálcico foram implantadas em animais para testar a sua eficácia como substituto ósseo (Albee, et al., 1920). No entanto, foi somente nos anos 70 que outros FCa foram sintetizados, caracterizados e testados na medicina (Getter, et al., 1972; Jarcho, 1981; LeGeros, 1991; Peelen, et al., 1977; Dorozhkin, 2009). A idéia de se utilizar estes materiais em ambiente fisiológico através de processos de cimentação foi introduzida por Brown e colaboradores (1983; 1985; 1986), LeGeros e colaboradores (1982) e Gruninger e colaboradores (1984) e denominada de **cimentos de fosfatos de cálcio**.

Os cimentos ósseos de fosfato de cálcio (CFC) são biocerâmicas muito interessantes para utilização como preenchimento ósseo, pois apresentam toda a biocompatibilidade e bioatividade dos fosfatos de cálcio com a vantagem de serem moldáveis e endurecerem “in vivo”; e, por serem reabsorvíveis, eliminam a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica após o período de regeneração óssea. Estes materiais também podem ser injetáveis, ou seja, a vantagem torna-se ainda maior já que as grandes intervenções cirúrgicas para a reconstituição de pequenos defeitos ósseos podem ser totalmente eliminadas.

Dentre os CFCs mais estudados está o baseado no  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP), que produz como resultado da reação de cura uma fase de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), muito similar a *apatita* biológica. A pureza do  $\alpha$ -TCP utilizado, bem como a sua reatividade são fatores que influenciam para se obter um tempo de cura curto e adequado para a aplicação clínica. A síntese do fosfato tricálcico em sua forma  $\alpha$  não é uma tarefa simples, uma vez que todas as condições de processo podem alterar suas propriedades finais ou ainda, inibir a sua formação.

Um dos fatores mais limitantes é a qualidade dos reagentes de partida, que podem impossibilitar a formação de  $\alpha$ -TCP mesmo em temperaturas tão altas como 1600°C. As impurezas comumente encontradas nos reagentes disponíveis no mercado podem alterar consideravelmente as etapas de síntese. Dentre estas, as grandes quantidades de magnésio (aproximadamente 4000 ppm) impossibilitam a obtenção de  $\alpha$ -TCP puro, já que este elemento é

um famoso estabilizante da fase de baixa temperatura do TCP, a fase  $\beta$ . Portanto, dependendo da quantidade de Mg presente, a temperatura de transição  $\beta \rightarrow \alpha$  se torna tão alta quanto 1500°C tornando o processo ineficiente e mais caro. Além disso, estas impurezas impossibilitam a posterior aplicação do produto como biomaterial implantável tornando-o tóxico.

Por outro lado, sabe-se que certas quantidades de silício dissolvidas na rede do TCP na forma de íons silicato ( $\text{SiO}_4^{2-}$ ) estabilizam a fase  $\alpha$ , que normalmente é estável em temperaturas acima de 1250°C, em temperaturas mais baixas (de 700 a 1200°C dependendo das rotinas de síntese empregadas) contribuindo então, para a obtenção de um produto puro através de um método simples e barato (Groot, et al., 1983; Hench, et al., 1993). Além disso, existem trabalhos publicados na literatura (Camiré, et al., 2006; Pietak, et al., 2007) que afirmam que os fosfatos de cálcio dopados com silício aumentam a bioatividade e a diferenciação celular na superfície destes materiais, uma vez que o silício é o elemento responsável pelos processos fisiológicos de crescimento de ossos e cartilagens (Carlisle, 1980).

Ainda não existem muitos estudos sobre a influência desta adição sobre as propriedades físicas, químicas (principalmente de reatividade) e mecânicas do cimento ósseo baseado no  $\alpha$ -TCP estabilizado com Si. As únicas evidências são de que, quando implantado “in vivo”, o cimento que contém silício apresenta maior adesão de células ósseas, porém não foram realizadas medidas quantitativas conclusivas (Camiré, et al., 2006).

Apesar de ser sabido que o Si pode garantir a obtenção de uma fase  $\alpha$  mais pura, as grandes quantidades de Mg presentes nos reagentes comerciais (normalmente encontrados no mercado brasileiro) comprometem a reprodutibilidade do processo e não garantem a redução da temperatura de transição de fase  $\beta \rightarrow \alpha$ . Sendo assim, o sucesso da síntese do  $\alpha$ -TCP estabilizado com silício passa a ser determinado pela qualidade dos reagentes empregados.

Com o contexto descrito acima, o principal objetivo deste trabalho é **desenvolver um novo sistema de cimento ósseo baseado no  $\alpha$ -TCP estabilizado com silício**. Para tanto, os seguintes objetivos secundários são propostos:

- (i) Sintetizar  $\alpha$ -TCP estabilizado com silício de maneira a reduzir a sua temperatura de síntese tornando o processo mais barato e simples;
- (ii) Aumentar a bioatividade do material devido à presença do silício;
- (iii) Determinar as propriedades do cimento ósseo obtido a partir deste fosfato de cálcio e submeter o material a estudos “in vitro” e “in vivo”;

- (iv) Sintetizar carbonato de cálcio, monetita e wollastonita livres de impurezas, principalmente de magnésio, para aperfeiçoar a síntese do  $\alpha$ -TCP e do  $\alpha$ -TCP estabilizado com silício;
- (v) Sintetizar e caracterizar  $\alpha$ -TCP estabilizado e não estabilizado com silício a partir dos reagentes desenvolvidos;
- (vi) Estabelecer as propriedades químicas, físicas, mecânicas e de bioatividade dos cimentos de fosfato de cálcio obtido a partir dos materiais obtidos no item anterior; e
- (vii) Determinar a influência que a adição do silício tem sobre a cinética da reação de cura do cimento ósseo.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Biomateriais

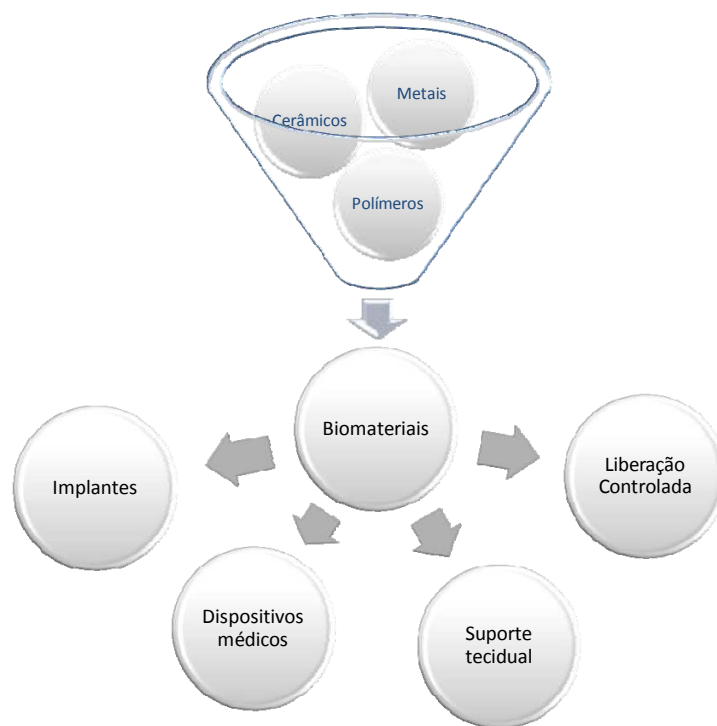
Durante séculos, quando uma pessoa se acidentava e tinha um tecido ou órgão gravemente danificado, os médicos dispunham de poucas alternativas e muitas vezes recorriam à amputação. Esta prática garantia a sobrevivência do paciente, porém sua qualidade de vida posterior ficava totalmente comprometida. A partir da segunda metade do século passado, com a evolução dos processos cirúrgicos; com a padronização de normas de higiene hospitalar e domésticas; com o desenvolvimento de novas drogas e vacinas; e com o aprimoramento dos biomateriais já é possível garantir uma expectativa de vida média de 80 anos com qualidade de vida considerada de boa a excelente (Monteiro, et al., 2004; Ratner, et al., 2004). O emprego de materiais adaptados para a medicina sem a provocação de grandes complicações é relatado somente nos tratados médicos mais recentes. Entretanto, existem descrições bem detalhadas, que datam de mais de 2500 anos, de aplicações de materiais na medicina pelos egípcios, romanos, gregos, incas e astecas para, na grande maioria das vezes, promover a distinção social.

O grande impulso para o desenvolvimento da **Ciência dos Biomateriais** ocorreu após meados do século XX, principalmente na segunda guerra mundial quando surgiu a necessidade de tratamentos paliativos para um grande número de afecções e acidentes traumáticos. (Monteiro, et al., 2004). O crescimento deste campo multidisciplinar ocorreu paralelamente ao desenvolvimento de materiais avançados que foram desenhados, em um primeiro momento, para aplicações que tinham pouca ou nenhuma relação com o organismo humano.

Atualmente o estudo dos biomateriais é uma área multidisciplinar na qual são necessários conhecimentos de química, física, engenharia, biologia, medicina e odontologia. Há apenas 50 anos os biomateriais como se pensa e se conhece hoje não existiam, tampouco a palavra biomaterial era utilizada. Não existiam muitas empresas produtoras, nem diretrizes formalizadas para a regulamentação da sua fabricação e do seu uso clínico e pouco se entendia sobre

biocompatibilidade. Ainda hoje, utilizam-se alguns materiais grosseiros e mal acabados e que, geralmente, apresentam resultados não satisfatórios (Ratner, et al., 2004).

Hoje em dia, o desenvolvimento do campo dos biomateriais é mais acentuado devido ao grande avanço que a ciência dos materiais tem experimentado. A disponibilidade de novos dispositivos poliméricos, metálicos, cerâmicos e compósitos é cada vez maior permitindo: (i) a criação de novos implantes (que substituam tecidos duros e moles) que sejam bioestáveis ou biodreabsorvíveis; (ii) o desenvolvimento de dispositivos médicos (biossensores, marcapassos, etc.); (iii) a construção de suportes celulares que guiem a regeneração óssea e; (iv) o desenvolvimento de dispositivos que tenham sua reabsorção “in vivo” controlada e que permitam a liberação gradativa de drogas e compostos bioativos (Monteiro, et al., 2004). A Figura 2.1 representa de maneira esquemática as principais aplicações dos biomateriais.



**Figura 2.1 - Aplicações dos biomateriais (Monteiro, et al., 2004).**

O número de pacientes que necessitam e recebem implantes biomédicos para corrigir defeitos ósseos e curar doenças vem crescendo de maneira acelerada como resultado do desgaste e rompimento das articulações, como quadris e joelhos, durante a vida de um ser humano. A solicitação mecânica que as articulações recebem é de aproximadamente uma vez a massa do

corpo quando em repouso, duas a três vezes quando em movimento de caminhada, até cinco vezes quando em movimento de corrida e até oito vezes durante um pulo. Este fato é agravado pela maior expectativa de vida do homem, pelo aumento do número de pessoas obesas e do sedentarismo resultando, em muitos casos, na perda do tecido que reveste e protege estas articulações e no aumento do atrito, levando à inflações, dores agudas e à perda dos movimentos. Nestes casos, a utilização de uma prótese total de quadril passa a ser a única alternativa para que a pessoa apresente uma qualidade de vida aceitável durante a velhice.

No entanto, com as tendências do mundo moderno, cada vez mais existem pessoas jovens que necessitam destas próteses e, conseqüentemente, necessitarão de mais de uma intervenção cirúrgica uma vez que, provavelmente, viverão mais tempo que a vida útil de uma prótese de quadril atual. Outro agravante é a osteoporose, doença que normalmente acomete pessoas idosas, mais precisamente devido à alimentação rica em proteínas e carboidratos que leva a uma acidificação do organismo fazendo com que o cálcio (normalmente utilizado para a manutenção dos ossos) seja utilizado para equilibrar o pH do sangue. Até 2002, mais de 80 mil artroplastias eram realizadas nos Estados Unidos e Europa anualmente (Heimann, 2002).

Os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo, ou ainda como um material não implantável utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos (Williams, 1987). O estudo de biomateriais envolve o entendimento das propriedades, funções e estruturas dos materiais biológicos, dos materiais sintéticos e da interação entre eles. Para que um material possa ser classificado como biomaterial devem ser satisfeitas algumas características fundamentais (Zavaglia, 1993):

- Biocompatibilidade, ou seja, o material implantado e seus produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar disfunções no organismo, ao longo do tempo (Williams, 1987);
- O material deve manter sua integridade estrutural durante o período necessário;
- Biofuncionalidade, ou seja, o material deve atender às características mecânicas necessárias para cumprir a função desejada, pelo tempo que for necessário (Williams, 1987); e
- O material deve ser de fácil esterilização.

Para a regeneração óssea existem outras propriedades, além das citadas acima, que garantem o sucesso clínico de um novo biomaterial. Estas características estão listadas a seguir (Williams, 1987):

- Bioatividade: Um material é considerado bioativo quando induz de maneira espontânea sua ligação com órgãos e tecidos pertencentes ao meio no qual foi implantado;
- Bioreabsorção: É o processo de remoção de um material em um meio biológico por meio de sua dissolução;
- Osteointegração: É o processo no qual ocorre a unificação do tecido ósseo com o material implantado; e
- Osteocondução: É o processo pelo qual o tecido ósseo é conduzido em um material seja através de poros ou canais. Ou ainda, pode ser a habilidade que um material apresenta em ligar-se ao tecido ósseo.

Qualquer material incorporado ao organismo deve apresentar certas propriedades que irão assegurar que nenhum dano ocorrerá ao tecido vivo (Heimann, 2002). Nenhum biomaterial é totalmente inerte, cada um estimula uma reação nos tecidos adjacentes quando implantado. A seleção do melhor biomaterial é baseada nos quatro tipos básicos de interação que podem existir entre o material e o tecido com o qual este está em contato, ou seja, a partir do comportamento fisiológico que este material irá despertar no organismo os biomateriais são classificados em tóxicos, inertes, bioativos e bioreabsorvíveis de acordo com a Tabela 2.1 (Dubok, 2000).

**Tabela 2.1 - Classificação dos biomateriais (Dubok, 2000).**

<b>Tipo de biomaterial</b>	<b>Reação do organismo</b>	<b>Exemplo</b>
Tóxicos	Atrofia, mudanças patológicas ou rejeição pelo tecido adjacente como consequência de processos químicos ou galvânicos.	Ligas que contenha Cd, carbetos, PMMA
Inertes	Coexistência com o material sem mudanças notáveis, separação do material e do tecido adjacente através da formação de tecido fibroso de espessura variável.	Ta, Ti, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , ZrO <sub>2</sub>
Bioativos	Formam ligações bioquímicas diretamente na superfície com o tecido que pode crescer livremente	HA densa, $\beta$ -TCP e alguns biovidros
Bioreabsorvíveis	Dissolução gradual do material sem toxicidade ou rejeição	$\alpha$ -TCP, HA porosa, alguns polímeros e biovidros

## **2.2 Biocerâmicas**

As biocerâmicas são materiais cerâmicos de engenharia que tem sua aplicação no campo da medicina (de Aza, et al., 2005). Durante as últimas décadas ocorreu um grande avanço no desenvolvimento de materiais biomédicos que incluíam, entre outros, vários materiais cerâmicos para a reconstrução e reparo de defeitos do esqueleto. As grandes mudanças que ocorreram no ritmo de vida moderno acarretando em um grande aumento da expectativa de vida e das obrigações sociais tornou a melhora da qualidade de vida um fator crucial para o desenvolvimento de novos materiais ortopédicos. Esta grande expansão na aplicação clínica das biocerâmicas tem resultado em um grande aumento no número de publicações e patentes. Os materiais cerâmicos utilizados normalmente incluem materiais policristalinos, vidros, vitrocerâmicas e compósitos que podem ser manufaturados em forma porosa ou densa; na forma de pó e grânulos ou ainda na forma de recobrimentos (Doremus, 1992; Vallet-Regí, 2001; Best, et al., 2008; Dorozhkin, 2010).

A década de 70 marcou o início do uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que possibilitaram a sua classificação como biocerâmicas (Kawachi, et al., 2000). Inicialmente, esperava-se que as biocerâmicas provocassem pouca ou nenhuma reação no tecido, características destes materiais em meios agressivos. Mas, o desenvolvimento do conhecimento

na área dos biomateriais gerou uma nova proposta: as biocerâmicas deveriam provocar reações de formação de tecido e, se possível, com a formação de uma ligação íntima entre estas e os tecidos adjacentes (Zavaglia, 1993).

As biocerâmicas apresentam uma infinidade de aplicações que vão desde dispositivos de diagnóstico e cirúrgicos até próteses estruturais, passando também pela odontologia. A Tabela 2.2 demonstra as principais funções e aplicações dos materiais cerâmicos na medicina.

**Tabela 2.2 - Principais funções das biocerâmicas (Hench, et al., 1993).**

<b>Forma</b>	<b>Fase</b>	<b>Função</b>
Pó	Policristalinos e vidros	Preenchimento e regeneração de tecidos
Recobrimento	Policristalinos, vidros e vitrocerâmicas	Ligação com o tecido ósseo e proteção contra corrosão
Sólidos (densos ou porosos)	Monocristal, policristalino, vidros, vitrocerâmicas e compósitos	Substituição de tecidos e partes funcionais

A alumina densa ( $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) tem o seu uso como biocerâmica muito difundido uma vez que este material é quimicamente inerte, apresenta boa biocompatibilidade e elevada resistência mecânica. Por isso, foi muito utilizada em próteses ortopédicas que substituem ossos ou parte deles que são submetidos a esforços elevados (Groot, et al., 1983; Hench, et al., 1993; Kawachi, et al., 2000; Dubok, 2000; Vallet-Regí, et al., 2004), algumas propriedades da alumina em comparação com as do tecido ósseo estão descritas na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3 - Propriedades da Alumina em comparação com as propriedades do tecido ósseo (Dubok, 2000).**

<b>Propriedade</b>	<b>Alumina (de Aza, et al., 2005)</b>	<b>Osso</b>	
		<b>Cortical</b>	<b>Esponjoso</b>
Densidade, g/cm <sup>3</sup>	>3,90	--	--
Microdureza, HV	≈ 2300	--	--
Rugosidade Ra, μm	0,02	--	--
Resistência, MPa			
Compressão	≈ 4000	100-230	2-12
Flexão	≥ 400	50-150	0,05-0,5
Módulo de Young, GPa	≈ 380	--	--
Resistência ao Impacto, J/m <sup>2</sup>	≥ 4000	--	--
Taxa de atrito média, mm <sup>3</sup> /h	< 0,01	--	--
Resistência à corrosão (Ringer), mg/mm <sup>2</sup> .dia	< 0,1	--	--
Tenacidade à Fratura K <sub>IC</sub> , MPa.m <sup>1/2</sup>	--	2-12	
Ruptura, K <sub>I0</sub> , MPa.m <sup>1/2</sup>	≈ 2,5	--	--

Por outro lado, as vitrocerâmicas, que por essência são materiais formados por uma matriz vítrea reforçada com cristais cerâmicos obtidos a partir de processos de cristalização controlados e, os biovidros, que como regra contém ou dão origem, após tratamento térmico, a uma fase cristalina, são materiais cerâmicos que recentemente tem recebido grande atenção dos pesquisadores uma vez que alguns deles são reabsorvíveis e apresentam boas propriedades mecânicas (Dubok, 2000).

A grande desvantagem de todas as biocerâmicas são a baixa resistência à propagação de trincas, a ausência de ductilidade e a dificuldade de ajuste de forma durante os processos cirúrgicos, principalmente para as cerâmicas densas e de alta dureza. Assim, uma alternativa, durante muitos anos, foi a utilização de próteses metálicas recobertas com biocerâmicas para que fosse possível reunir as excelentes propriedades mecânicas dos metais com as excelentes propriedades biológicas das cerâmicas. Sabe-se, no entanto, que os métodos convencionais de recobrimento resultam em camadas de baixa aderência e que acabam gerando a liberação de partículas no meio fisiológico e o consequente processo inflamatório e falha do implante são inevitáveis. Atualmente existem novos processos de recobrimento e de modificação superficial que tornam as próteses metálicas menos suscetíveis à falhas mecânicas.

Os biomateriais cerâmicos podem ser classificados de várias maneiras: (i) de acordo com o tipo de resposta do organismo hospedeiro (Hench, 1991; Hulbert, et al., 1983); (ii) de acordo com a aplicação (Hench, 1975); e (iii) de acordo com as características do material (Groot, et al., 1983). No entanto, a classificação tida como mais relevante e aceita pelos pesquisadores é aquela que leva em consideração a resposta desenvolvida na interface tecido vivo / implante, de acordo com a Tabela 2.4 (Kawachi, et al., 2000; de Aza, et al., 2005).

**Tabela 2.4 - Classificação das biocerâmicas (Kawachi, et al., 2000).**

<b>Tipo de Biocerâmica</b>	<b>Interações com os Tecidos</b>	<b>Exemplos</b>
Inertes	Não há interações químicas nem biológicas	Alumina, zircônia
Bioativas	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, hidroxiapatita, fosfato tricálcico e vitrocerâmicas
Reabsorvíveis	São degradadas e substituídas pelos tecidos	Gesso e $\alpha$ -fosfato tricálcico

Dentre as biocerâmicas bioativas estão em lugar de destaque os fosfatos de cálcio (que também podem ser reabsorvíveis) e os silicatos como a *wollastonita* ( $\text{CaSiO}_3$ ). Os fosfatos de cálcio serão discutidos mais amplamente no item 2.3. Os silicatos, em especial a *wollastonita*, são materiais de grande interesse uma vez que estudos publicados na literatura (Ohura, et al., 1992; Nonami, 1995; de Aza, et al., 1994) demonstraram a bioatividade de vitrocerâmicas compostas por  $\text{CaO}$  e  $\text{SiO}_2$  e com baixas ou nenhuma quantidade de  $\text{P}_2\text{O}_5$  pela evidência da formação de uma capa de *apatita* tanto em FCS como “in vivo”. Estes resultados foram de encontro à crença da época de que para uma biocerâmica induzir a precipitação de uma capa de *apatita* era necessário que sua composição tivesse  $\text{CaO}$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$  (Pernot, et al., 1979).

O mecanismo envolvido na formação da capa de *apatita* na superfície de amostras de *wollastonita* imersas em FCS foi descrita por de Aza e colaboradores (1996): em um pH igual a 7,25 o mecanismo de reação começa com a troca iônica de íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  do FCS com íons cálcio instáveis levando a formação de uma camada de hidrogel de sílica amorfo e um repentino aumento do pH de 9,0 para 10,5 na interface *wollastonita* / FCS. Esta condição permite uma dissolução parcial da sílica amorfa e a subsequente precipitação de *apatita*. De acordo com este trabalho, o mecanismo é o mesmo tanto para materiais cristalinos como amorfos baseados em sílica ( $\text{SiO}_2$ ).



### 2.3 Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio

No passado, muitos implantes falhavam devido à infecções ou à falta de conhecimento sobre a toxicidade dos materiais selecionados para tal aplicação. Neste âmbito, o uso dos fosfatos de cálcio (FCa) torna-se lógico devido a sua grande similaridade à parte mineral dos ossos e dentes (Lowenstam, et al., 1989; Weiner, et al., 1998; LeGeros, 1991). Estes materiais podem participar ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica apresentando grande habilidade para formar ligações com o tecido hospedeiro sem, no entanto, apresentar toxicidade local ou sistêmica, nem resposta inflamatória ao implante e nem a formação de um tecido fibroso envoltório (Groot, et al., 1983; Hench, 1991; Kawachi, et al., 2000). Sendo assim, os FCa conseguem fornecer um grau de integridade estrutural ao implante a fim de mantê-lo no lugar e intacto até que o novo osso cresça. Além disso, estimulam o crescimento de um novo osso e alguns são solúveis, de maneira que podem ser reabsorvidos pelo organismo permitindo que o novo osso substitua o implante (Vanderschoot, 2002).

A primeira evidência do uso de fosfatos de cálcio como material para reparar defeitos ósseos em coelhos foi publicada em 1920 (Albee, et al., 1920). Mais de 50 anos depois, as primeiras aplicações na odontologia de FCa em defeitos periodontais e para substituir a raiz de dentes foram relatados por Berry e colaboradores (1975) e Denissen e colaboradores (1979).

A baixa resistência mecânica dos fosfatos de cálcio não permite a sua utilização como substitutos de ossos e dentes que sejam submetidos à elevados carregamentos mecânicos (Dorozhkin, 2010). Por exemplo, a tenacidade à fratura da hidroxiapatita não ultrapassa o valor de  $1 \text{ MPa.m}^{1/2}$  enquanto que o osso humano apresenta valores que podem ser até dez vezes maiores (2 a  $12 \text{ MPa.m}^{1/2}$ ). Este valor pode aumentar quase que linearmente conforme o tamanho de grão diminui (Suchanek, et al., 1998). No entanto, para materiais que não apresentam estrutura cúbica, a tenacidade à fratura atinge um limite máximo e depois cai rapidamente com a diminuição do tamanho de grão. Halouani e colaboradores (1994) relataram a tenacidade à fratura da hidroxiapatita em função do tamanho de grão e verificaram que até  $0,4 \text{ }\mu\text{m}$  ocorre um aumento da tenacidade à fratura que atinge o valor máximo de  $1,20 \pm 0,05 \text{ MPa.m}^{1/2}$  e a partir deste ponto, o valor decresce rapidamente conforme se diminui o tamanho de grão.

A resistência à flexão, à compressão e à tração da hidroxiapatita densa está entre 28-250 MPa, 120-900 MPa e 28-300 MPa, respectivamente. As variações são devido à presença de microporosidades e impurezas, à temperatura de sinterização, à metodologia de compactação e ao tamanho de partícula. Sabe-se que a resistência mecânica dos fosfatos de cálcio tende a aumentar para relações Ca/P maiores alcançando o valor máximo em Ca/P = 1,67 (HA estequiométrica) caindo drasticamente para valores Ca/P > 1,67 (Suchanek, et al., 1998). Além disso, a porosidade é um fator limitante na resistência mecânica destes materiais. Sendo assim, tanto o tamanho de grão como a porosidade são propriedades que tem grande influência sobre a propagação de trincas e a tenacidade à fratura dos fosfatos de cálcio (Dorozhkin, 2010).

O módulo de elasticidade da HA densa (35-120 GPa) é uma das propriedade próxima aos valores encontrados para o tecido ósseo humano (74 GPa esmalte, 21 GPa dentina, 18-22 GPa osso compacto). No entanto, a elevada fragilidade dos compostos de fosfato de cálcio limita a sua aplicação clínica a lugares que não recebam grandes solicitações mecânicas como peças para recuperação do ouvido médio, preenchimento de defeitos maxilo-faciais e recobrimento de implantes odontológicos e ortopédicos (Vallet-Regí, et al., 2004; Burger, et al., 2007; Rodriguex-Lorenzo, et al., 2002).

Apesar de limitar a resistência mecânica, macroporos (maiores que 100  $\mu\text{m}$ ) interconectados são importantes para o desempenho biológico dos fosfatos de cálcio uma vez que estes determinam como ocorrem os processos de regeneração do tecido ósseo, pois permitem a fixação e a distribuição de células ósseas e de vasos sanguíneos (Hing, et al., 1999; Jones, et al., 2007; V., et al., 2005). Além disso, microporos (menores que 10  $\mu\text{m}$ ) são também interessantes, pois garantem a distribuição dos fluidos fisiológicos dentro do material e, consequentemente, melhoram a adsorção de proteínas e aumentam a sua solubilidade iônica (Dorozhkin, 2010). O controle da macro e microporosidades pode ser obtido adicionando-se agentes porogênicos (normalmente voláteis) e variando-se a temperatura de sinterização.

Apesar das propriedades mecânicas limitarem as aplicações clínicas dos fosfatos de cálcio, sua interação com o organismo quando implantado “in vivo” traz inúmeras vantagens à estes compostos uma vez que são um dos poucos materiais que podem apresentar bioatividade, osteointegração, osteocondução e, ainda, serem reabsorvíveis. Sabe-se que nenhum implante é totalmente inerte, ou seja, todos induzem uma determinada resposta fisiológica, seja através da formação de uma capa fibrosa envoltória, seja pela ativa participação nos processos fisiológicos

(Dorozhkin, 2009; Hench, et al., 1993). Basicamente, as respostas que o organismo tem para com os implantes de FCa em muito dependem de sua composição e estrutura. Por exemplo, um implante de HA densa é considerada inerte, pois permanece intacto por aproximadamente cinco ou sete anos dependendo do local de implantação e das solicitações sofridas pelo material “in vivo”. No entanto, um implante poroso de mesma composição seria reabsorvido pelo organismo em no máximo um ano.

### 2.3.1 Estrutura Cristalina

A estrutura cristalina dos fosfatos de cálcio hoje conhecidos são classificados em três grandes grupos: grupo das *apatitas*  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$  que incluem os derivados da hidroxiapatita ( $\text{X}=\text{OH}^-$ ), *fluorapatita* ( $\text{X}=\text{F}^-$ ) e os relacionados como o fosfato octacálcico ( $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e o fosfato tetracálcico ( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ); o grupo das *glaseritas* que incluem todos os polimorfos dos fosfatos tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ); e o grupo dos  $\text{Ca-PO}_4$  que incluem a *brushita* ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), a *monetita* ( $\text{CaHPO}_4$ ) e o fosfato monocálcico ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (Mathew, et al., 2001). A seguir algumas das estruturas cristalinas são ilustradas.

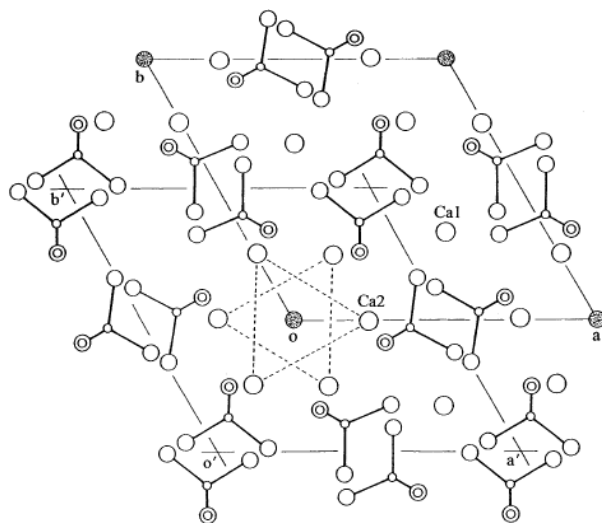
#### *Apatitas: Hidroxiapatita*

As *apatitas* são materiais com fórmula geral do tipo  $\text{M}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$  que, normalmente, são conhecidas pela capacidade de permitir uma infinidade de combinações, alterações e substituições em seu retículo. Porém, o nome *apatita* está sendo exaustivamente utilizado para designar fosfatos de cálcio com fórmula geral  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$  em que  $\text{X} = \text{F}^-$ ,  $\text{OH}^-$  ou  $\text{Cl}^-$ . Termodinamicamente, as *apatitas* são as fases mais estáveis dos fosfatos de cálcio e, por isso, são consideradas como provável produto final da maioria das reações.

A hidroxiapatita (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) é utilizada como constituinte inorgânico de modelos de ossos e dentes. Quando estão em meio biológico (tanto as sintéticas como as biológicas) podem incorporar uma série de impurezas e dificilmente serão encontradas em sua forma pura e estequiométrica (Vallet-Regí, et al., 2004).

A estrutura cristalina mais comum deste material é a descrita pelo grupo espacial  $P6_3/m$  com parâmetros de rede  $a=b=9,432\text{\AA}$  e  $c=6,881\text{\AA}$  e  $Z=1$  (Elliot, 1994; Kay, et al., 1964). A Figura 2.2 mostra esquematicamente a estrutura da HA: os 10 íons  $\text{Ca}^{2+}$  ocupam dois sítios cristalográficos de simetria diferentes,  $4f$  e  $6h$ . Os quatro  $\text{Ca}^{2+}$  que estão em  $4f$  (designados Ca1) apresentam-se em colunas ao longo de um eixo C3 a  $1/3$ ,  $2/3$  e  $0$  e estão separados aproximadamente por meio eixo  $c$ . Estes estão coordenados com nove átomos de oxigênio formando prismas aproximadamente trigonais. O poliedro Ca-O<sub>9</sub> compartilha suas faces trigonais para formar cadeias paralelas ao eixo  $c$ . Os  $\text{Ca}^{2+}$  restantes (simetria  $6h$ , designados Ca2) formam dois triângulos em  $z=1/4$  e  $3/4$  no plano de simetria. Estes íons cálcio estão coordenados com seis átomos de oxigênio e um íon  $\text{OH}^-$ . Os seis  $\text{PO}_3^{4-}$  ocupam posições  $6h$  similares ao Ca2 em formas triangulares. Poliedros adjacentes de Ca1 e Ca2 estão ligados através de átomos de O do tetraedro do  $\text{PO}_3^{4-}$ .

Por causa do grupo de simetria, existe um plano de simetria que impõe que os íons hidroxila se posicionem em posições estatisticamente desordenadas ( $4e$ ) ambos acima e abaixo deste plano a  $z=1/4$  e  $3/4$ , respectivamente. Devido a esta desordem, esta estrutura dificilmente será estequiométrica, uma vez que substituições e formações de vazios são frequentes (Mathew, et al., 2001).



**Figura 2.2 - Estrutura cristalina hexagonal da HA estequiométrica ou fluoretada (Mathew, et al., 2001).**

Portanto, a hidroxiapatita estequiométrica é descrita como sendo monoclinica com grupo espacial  $P2_1/b$  com parâmetros de rede  $a=9,4214(8)\text{\AA}$ ,  $b=2^a$ ,  $c=6,8814(7)\text{\AA}$ ,  $\gamma=120^\circ$  e  $Z=2$  (Elliot,

et al., 1973). A estrutura é parecida com a HA hexagonal, entretanto, sem a restrição feita pelo plano de simetria. Esta só se forma sob condições térmicas favoráveis (Mathew, et al., 2001).

#### *As Glaseritas: Fosfato Tricálcico*

Existem quatro formas estáveis do fosfato tricálcico anidro em diferentes intervalos de temperatura: o  $\alpha$ -TCP estável entre 1120°C e 1470°C; o  $\alpha'$ -TCP estável apenas acima de 1470°C; o  $\beta$ -TCP estável abaixo de 1120°C e o  $\beta'$ -TCP estável apenas com elevadas pressões (Nurse, et al., 1959; Welch, et al., 1961). Sabe-se que estes compostos dificilmente são encontrados em sistemas biológicos, porém a relevância destes está no fato de que o  $\alpha$ -TCP é facilmente hidrolisado a apatita e que a *whitlockite*, material facilmente encontrado em mineralizações biológicas, apresenta estrutura muito similar ao  $\beta$ -TCP (Calvo, et al., 1975).

A estrutura cristalina do  $\alpha$ - e  $\beta$ -TCP foram determinadas como derivadas da *glaserita*, uma vez que suas estruturas são baseadas neste mineral,  $K_3Na(SO_4)_2$ . Neste composto os cátions e ânions estão arranjados em duas colunas em um empacotamento hexagonal. Uma coluna é composta apenas de cátions,  $Na^+$  e  $K^+$ , (tipo I) e cátions e ânions,  $K^+$  e  $SO_4^{2-}$  (tipo II). Existem duas vezes mais colunas do tipo II que do tipo I. A *glaserita* tem uma fração cátion/ ânion de 2:1. Apesar da maioria dos compostos com estrutura similares não respeitarem esta fração, a discrepância pode ser corrigida através de vacâncias ao longo das colunas (Mathew, et al., 2001).

O  $\alpha$ -TCP tem estrutura cristalina na forma monoclinica (P21/a com  $a = 12,887(2)\text{\AA}$ ,  $b = 27,280(4)\text{\AA}$ ,  $c = 15,219(2)\text{\AA}$ ,  $\beta = 126,20^\circ$ ,  $Z = 34$ ) com os íons  $Ca^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$  empacotados em dois tipos de colunas ao longo do eixo c, um delas contendo apenas íons  $Ca^{2+}$  e a outra contendo tanto  $Ca^{2+}$  quanto  $PO_4^{3-}$ . Todas as colunas estão distorcidas da linearidade e este arranjo pode ser chamado de pseudo-hexagonal (Mathew, et al., 1977).

Já o  $\beta$ -TCP cristaliza na forma romboédrica (R3c,  $a = 10,439(1)\text{\AA}$ ,  $c = 37,375\text{\AA}$  e  $Z = 21$ ) (Dickens, et al., 1974). A estrutura foi descrita como sendo uma distorção da estrutura do  $Ba_3(PO_4)_2$  que apresenta colunas idênticas de  $PO_4$ -Ba-Ba-Ba- $PO_4$  em um arranjo hexagonal. Porém, como os íons  $Ca^{2+}$  são pequenos demais para garantir essa similaridade, vacâncias ocorrem nos sítios de cátions e de ânions. Neste composto, dois tipos de colunas se formam: uma para garantir a similaridade com o  $Ba_3(PO_4)_2$  e outra contendo cátions, ânions e os vazios. A principal diferença entre as estruturas do  $\alpha$ -TCP e do  $\beta$ -TCP está no fato que este último não apresenta colunas do tipo cátion-cátion (Dickens, et al., 1974; Mathew, et al., 2001).

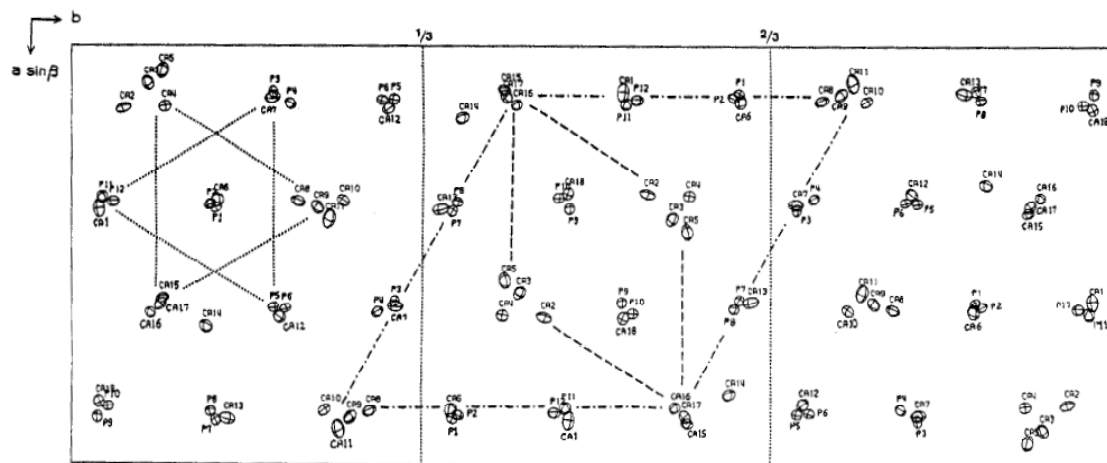


Figura 2.3 - Esquema da estrutura do  $\alpha$ -TCP no plano (001) (Mathew, et al., 2001).

## 2.4 Apatitas

A hidroxiapatita estequiométrica ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$ , HA) dificilmente é encontrada em meios biológicos (Groot, et al., 1983; Hench, et al., 1993). Sua relevância é alta uma vez que é o fosfato de cálcio sintético mais próximo da fase mineral óssea. Além disso, sabe-se que é possível obter a HA com várias substituições iônicas como carbonatos, magnésio, silício e flúor, o que faz com que este material seja ainda mais interessante devido ao aumento de similaridade com as *apatitas* biológicas. A *apatita* que é encontrada em meios biológicos é deficiente em cálcio ( $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ , CDHA) e é facilmente obtida por reações de precipitação em solução aquosa mantendo-se a  $\text{Ca/P} = 1,50$ .

### 2.4.1 Aplicações

A hidroxiapatita estequiométrica é muito utilizada para o recobrimento de superfícies para o aumento da biocompatibilidade de implantes metálicos, pois aumentam a adesão celular e diminui a formação do tecido fibroso envoltório. Muitos métodos são utilizados como deposição por plasma, imersão em plasma, biomimetização, entre outros.

Ainda, a HA é muito utilizada com substituto ósseo na forma de pó ou de corpos porosos ou como resultado de reações de cura de cimentos de fosfato de cálcio. Estas aplicações são muito atrativas uma vez que os fosfatos de cálcio induzem o crescimento de um novo tecido ósseo. Porém, existe a necessidade de se melhorar suas propriedades mecânicas uma vez que, por tratar-se de materiais cerâmicos, são altamente frágeis e não podem ser utilizados para substituir tecidos que sofram grandes solicitações mecânicas.

## 2.5 Fosfato Tricálcico

O polimorfo do fosfato tricálcico mais conhecido e mais fácil de ser obtido é o  $\beta$ -TCP, que apresenta propriedades muito semelhantes às calcificações encontradas em cálculos patológicos (LeGeros, 1991). Este é facilmente hidrolisado a fosfato octacálcico ou a hidroxiapatita. Outra forma comum do  $\beta$ -TCP é a que apresenta substituições de alguns cátions de cálcio por magnésio. Este elemento é capaz de aumentar a temperatura de transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  (discutida na seção 2.5.1) para temperaturas acima de 1400°C. Assim, muitos pesquisadores vêm utilizando este elemento para melhorar as propriedades mecânicas do  $\beta$ -TCP através da utilização de maiores temperaturas de sinterização (Sader, et al., 2008).

Em contrapartida, o magnésio pode tornar-se um problema quando se necessita sintetizar o polimorfo  $\alpha$ -TCP, pois este elemento inibe a formação de uma fase pura quase sempre formando uma mistura  $\beta + \alpha$ . É claro que a formação de  $\beta$ -TCP ocorre de acordo com a concentração de magnésio presente, porém estudos mostram que quantidades acima de 250 ppm já são suficientes para atrapalhar a síntese do  $\alpha$ -TCP puro (Enderle, et al., 2005; Reid, et al., 2007; Motisuke, et al., 2008; Carrodeguas, et al., 2008).

### 2.5.1 Evolução da Transformação de Fases $\beta \rightarrow \alpha$ no Fosfato Tricálcico

Entender a evolução de fases durante a formação do TCP em elevadas temperaturas é extremamente importante. Uma vez que este é um fator determinante para se aperfeiçoar o

processo e conseguir um produto final com o menor nível de impurezas possível garantindo, assim, a qualidade do TCP e seu sucesso em aplicações biomédicas.

Existem muitos métodos para se obter o TCP por reação no estado sólido, mas a utilização de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ , CC) e monetita ( $\text{CaHPO}_4$ , M) é o método mais simples e econômico para se formar  $\beta$ -TCP ou  $\alpha$ -TCP. Dessa maneira, sabe-se que essa reação ocorre somente com uma relação Ca/P dos reagentes de 3/2 e é um processo de alta complexidade, conforme descrito a seguir (Jinlong, et al., 2001).

Entre 450 e 500°C, a monetita desidrata para formar pirofosfato ( $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , PP). A 800°C ocorre a transformação do CC a CaO, que é o fator limitante desse processo, ou seja é o mais lento. Em seguida e por volta da mesma temperatura, inicia-se a reação do CaO com o PP formando  $\beta$ -TCP. Essa reação completa-se por volta de 1100°C. A transformação  $\beta$ -TCP  $\leftrightarrow$   $\alpha$ -TCP tem lugar em temperaturas mais elevadas que 1200°C e, finalmente, tem-se  $\alpha$ -TCP puro a partir de 1300°C.

As temperaturas de formação e transformação de fase já determinadas em diversos estudos (Tehuisen, et al., 1999; Jinlong, et al., 2001) não são totalmente exatas e variam de acordo com as características dos processos e da quantidade de impureza dos reagentes utilizados. Assim, para cada novo estudo de obtenção do fosfato tricálcico, pequenas variações de temperaturas serão determinadas, dependendo da particularidade de cada processo.

Apesar da pureza das fases do TCP serem determinadas pela rotina de calcinação, o excesso de temperatura durante a queima pode levar a perda do material, resultando em produtos pouco reativos ou que necessitem tamanho de partícula muito pequeno, podendo gerar contaminações devido ao excesso de moagem (Tehuisen, et al., 1999).

### 2.5.2 Aplicações

O fosfato tricálcico quando na forma de  $\beta$ -TCP pode ser utilizado como substituto ósseo na forma de pó ou de blocos porosos. Porém, a maior aplicação dos TCPs é como cimento ósseo seja na forma de  $\alpha$  como de  $\beta$ , sendo que suas propriedades variam de acordo com as condições da reação de pega. Hoje em dia, muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de se melhorar as propriedades mecânicas e biológicas destes cimentos.



## 2.6 Cimentos de Fosfatos de Cálcio

A possibilidade de se obter um implante de fosfato de cálcio a temperatura ambiente ou corpórea por meio de uma reação de cimentação (mistura de um pó e um líquido que endurece espontaneamente) foi introduzida por Brown e colaboradores (1983; 1985; 1986), LeGeros e colaboradores (1982) e Gruninger e colaboradores (1984) e denominada de **cimentos de fosfatos de cálcio** (CFC). No entanto, existem relatos na literatura de que o primeiro registro de um cimento de fosfato de cálcio ocorreu no início dos anos 70 (Tas, 2007; Driskell, et al., 1975). Além disso, muitos anos antes (Kingery, 1950) misturas de CaO e ácido ortofosfórico foram utilizados com o mesmo propósito.

Os cimentos de fosfatos de cálcio são blendas de pós cristalinos ou amorfos de fosfatos de cálcio com soluções aquosas que podem ser água destilada, PBS, soluções de fosfato de sódio, ácido ortofosfórico, ácido cítrico (Sarda, et al., 2002; Gbureck, et al., 2004) e até FCS (Tagaya, et al., 2005). Depois de misturados o pó e o líquido, uma pasta viscosa e moldável é formada e esta endurece espontaneamente em alguns minutos. A proporção de líquido-pó utilizada é um fator muito importante, pois determina a reabsorbilidade, as propriedades reológicas e as propriedades mecânicas. Além disso, os CFC podem ser injetados diretamente em fraturas e defeitos ósseos adaptando-se facilmente a forma da cavidade. Estes materiais são osteocondutivos, não citotóxicos, se ligam facilmente aos ossos e, principalmente, são reabsorvíveis, ou seja, depois de implantados são substituídos por um novo tecido ósseo (Driessens, et al., 2000; Driessens, et al., 1998; Frankenburg, et al., 1998; Frayssinet, et al., 1998). O objetivo do desenvolvimento destes materiais é que durante sua permanência no organismo as funções do tecido ósseo não sofram praticamente nenhuma alteração, ou seja, os cimentos devem conseguir reproduzir a composição, a estrutura, a morfologia e a cristalinidade dos cristais da fase mineral do tecido ósseo (Dorozhkin, 2009).

Para que um CFC possa ter aplicação clínica são necessárias algumas propriedades importantes, tais como: ausência de toxicidade, perfeita adesão ao tecido duro, ausência de propriedades alogênicas ou carcinogênicas, fácil manipulação, curar e endurecer “in vivo” dentro

de um período de tempo razoável, resistência mecânica apropriada e permanente, ser reabsorvível, condutor e estimulador da formação de um novo tecido ósseo.

Existem muitos sistemas de CFC, no entanto, todos eles tem como resultado da reação de cura uma fase de *apatita* ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e suas variantes) ou *brushita* ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Vanderschoot, 2002; Dorozhkin, 2009). De maneira geral, a dissolução dos fosfatos de cálcio iniciais e o transporte de massa são os processos que tem lugar logo no início da cura dos cimentos. Através desta dissolução ocorre a formação de um meio supersaturado (distante do equilíbrio químico) para o material que irá precipitar durante o processo de endurecimento (Lacout, et al., 1996; Song, et al., 2007). A estabilidade e solubilidade dos fosfatos de cálcio é, então, um fator determinante para se controlar as reações de cura dos CFC.

Durante a precipitação da nova fase de *apatita* ou *brushita* os cristais recém formados crescem e o seu entrelaçamento confere rigidez ao material. A cura dos CFC é um processo contínuo que sempre se inicia com a dissolução superficial dos componentes iniciais. Este processo fornece à solução íons cálcio e fosfatos que interagem quimicamente entre si e precipitam na superfície deste pó inicial. Este precipitado pode ser um gel ou um conglomerado de cristais. Em seguida, o processo de endurecimento ocorre através de uma transição sol-gel de uma fase amorfa ou através do entrelaçamento de cristais de *apatita* ou de *brushita* (Driessens, et al., 1996; Fernández, et al., 1999; Brown, et al., 1986; Hatim, et al., 1998; Liu, et al., 2004).

O controle da reação de cura bem como a redução da quantidade de líquido necessária pode ser feito através da adição de vários aditivos que interfiram nos processos de dissolução e precipitação durante a cura de um CFC (Dorozhkin, 2009). Os aditivos podem melhorar a fluidez, a resistência mecânica, aumentar a macroporosidade e controlar os tempos de cura. As Tabela 2.5 e Tabela 2.6 demonstram alguns aditivos relatados na literatura e as estratégias possíveis na sua utilização.

**Tabela 2.5 - Alguns aditivos utilizados nos CFC.**

Aditivo	Ação	CFC utilizado	Referência
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Acelera a taxa de dissolução/precipitação	$\alpha$ -TCP	(Ginebra, et al., 1998)
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Fluidificante, aumenta a resistência mecânica	$\alpha$ e $\beta$ -TCP	(Bohner, et al., 2000; Sarda, et al., 2002)
CH <sub>2</sub> OH(CHOH) <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> OH	Agente porogênico	qualquer um	(Markovic, et al., 2001)
NaHCO <sub>3</sub>	Agente porogênico	qualquer um	(Takagi, et al., 2001)
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Agente porogênico	qualquer um	(Takagi, et al., 2001)
CaSO <sub>4</sub>	Agente porogênico	qualquer um	(Nilsson, et al., 2002)
NaCl	Agente porogênico	qualquer um	(Tas, 2008)
Microesferas de gelatina	Agente porogênico	qualquer um	(Tas, 2006)
C <sub>76</sub> H <sub>52</sub> O <sub>46</sub>	Ação antiséptica, ação na cinética de cura	$\alpha$ -TCP, TTCP	(Yoshikawa, et al., 2000)

**Tabela 2.6 - Estratégias para o controle da reação de cura de CFC (Bohner, 2007).**

Estratégia	Abordagens	Sub-abordagens
Taxa de dissolução	Área de contato entre o pó e o líquido	Alterar protocolo de moagem Utilizar nanopartículas
	Solubilidade do pó no líquido	Utilizar uma fase mais ou menos solúvel Alterar o pH do líquido
	Alterar a saturação do líquido	
	Utilização de inibidores de dissolução	
	Modificação da superfície do pó	Alteração química (pré-reação) Alteração física (
Taxa de Nucleação	Utilizar sementes favorecedoras de nucleação	
	Modificação da saturação do produto no líquido	Mudança da saturação Mudança da solubilidade do produto final
	Utilização de inibidores de nucleação	
Taxa de crescimento	Modificação da saturação do produto no líquido	Mudança da saturação Mudança da solubilidade do produto final
	Utilização de inibidores do crescimento de grão	

Finalmente, as principais vantagens e desvantagens dos CFC estão resumidas a seguir (Ginebra, et al., 2006a; Ginebra, et al., 2006b; Ambard, et al., 2006; Dorozhkin, 2009):

#### *Vantagens*

- (i) Habilidade de curar espontaneamente “in vivo”;
- (ii) Injetabilidade que permitem intervenções cirúrgicas não invasivas;
- (iii) Boa osteocondução e, ocasionalmente, osteoindutividade;
- (iv) Podem ser substituídos pelo novo tecido ósseo formado após um determinado período de tempo (reabsorbilidade);
- (v) São moldáveis, o que garante ótimo contato na superfície osso/implante mesmo em defeitos com geometria complexa;
- (vi) Excelente biocompatibilidade e bioatividade;
- (vii) Não tóxicos;
- (viii) Baixo custo de produção e aplicação;
- (ix) Fácil preparação e aplicação;
- (x) A cura ocorre à temperatura corpórea;
- (xi) Formam ligações químicas com o tecido ósseo; e
- (xii) Podem ser utilizados para a liberação controlada de drogas, fatores de crescimento e proteínas morfogênicas. Neste caso, estudos mais profundos são necessários.

#### *Desvantagens*

- (i) Baixa resistência mecânica, fato que limita a aplicação destes materiais a regiões que não recebam grandes solicitações mecânicas;
- (ii) Podem sofrer lixiviação depois de implantados caso exista um excesso de fluídos e sangue;
- (iii) Ausência de macroporosidade interconectada o que dificulta um rápido crescimento do novo tecido e a degradação do material de dentro para fora; e
- (iv) A taxa de reabsorção é, na maioria dos casos, maior que a taxa de crescimento de um novo tecido.

Existem muitos cimentos de fosfatos de cálcio comercializados nos Estados Unidos e na Europa (Dorozhkin, 2009). Alguns deles estão descritos na Tabela 2.7. A lista de outros cimentos ósseos injetáveis disponíveis no mercado pode ser encontrada em vários artigos publicados na literatura (Driessens, et al., 1995; Weiss, et al., 2003; Ambard, et al., 2006; Böhner, et al., 2005; Lewis, 2006).

**Tabela 2.7 - Alguns cimentos de fosfatos de cálcio encontrados no mercado (Dorozhkin, 2009).**

<b>Produto</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Aplicações</b>
BoneSource <sup>TM</sup>	Striker Howmedica Osteonics	Crânio-facial
$\alpha$ -Bone Substitute Material ( $\alpha$ -BSM <sup>®</sup> )	Etex Corporation	Preenchimento de defeitos e espaços, odontologia, crânio-facial
Skeletal Repair Systems (SRS <sup>®</sup> )	Norian Corporation	Crânio-facial

#### 2.6.1 Sistema $\alpha$ -TCP: Propriedades e Cinética da Reação de Pega

A evidência da formação de hidroxiapatita deficiente em cálcio a partir da hidratação do  $\alpha$ -TCP foi citada pela primeira vez por Monma e colaboradores (1976). Em seguida, em outro trabalho Monma e colaboradores (1984) estudaram a influência de vários aditivos nesta reação e verificou-se que a fase formada ao final da reação de hidratação do  $\alpha$ -TCP é totalmente dependente do pH. Com valores de pH menores que 5,5 forma-se *brushita*, entre 5,5 e 7,5 forma-se OCP e acima de 7,5 hidroxiapatita. Ainda verificou-se que a hidratação do  $\alpha$ -TCP torna-se extremamente lenta em pHs muito elevados, acima da faixa de 7 a 7,5, tornando difícil a formação de CDHA em temperaturas fisiológicas.

A cura do cimento baseado no  $\alpha$ -TCP foi exhaustivamente estudada e determinou-se que é um processo de dissolução dos grãos de TCP e precipitação de placas de *apatita* (CDHA) que ocorre de maneira simultânea (Ginebra, et al., 1995a; Yubao, et al., 1997; Ginebra, et al., 1997; TenHuisen, et al., 1998). Em um primeiro momento ocorre a dissolução superficial do  $\alpha$ -TCP e, depois de atingido a saturação da solução, a precipitação de placas de *apatitas* ocorre na superfície destes mesmos grãos. A espessura da capa de *apatita* formada aumenta conforme os grãos de  $\alpha$ -TCP vão se dissolvendo. A cura do cimento termina quando todo  $\alpha$ -TCP é convertido em CDHA.

Como este processo ocorre sempre na superfície do grão de TCP, após sua total dissolução pode ocorrer o aparecimento de vazios dentro de cascas de *apatitas* como descrito por Ginebra e colaboradores (1997). Em outro trabalho, Ginebra e colaboradores (1999) propuseram um modelo cinético para o processo de cura do cimento de  $\alpha$ -TCP que é baseado na espessura da capa de *apatita* formada na superfície dos grãos. Nos primeiros momentos de reação a sua cinética é determinada pela superfície de  $\alpha$ -TCP em contato com o líquido, ou seja, o processo é basicamente determinado por sua taxa de dissolução. Este processo é predominante até o momento em que toda a superfície do pó estiver coberta por uma capa de *apatita* de espessura suficientemente grande para que o processo de difusão passe a ser mais lento que a taxa de dissolução do  $\alpha$ -TCP. O momento no qual ocorre a mudança de processo predominante é dependente basicamente da área superficial do pó de partida, quanto maior a área superficial mais rápido ocorrerá a mudança de processo predominante (Ginebra, et al., 2004; Camiré, et al., 2005; Bohner, et al., 2006).

Muitos trabalhos foram publicados com o intuito de se estudar e controlar a cinética da cura deste cimento seja pela alteração dos protocolos de síntese e / ou moagem do  $\alpha$ -TCP, seja pela adição de aditivos que alteram a taxa de dissolução e / ou precipitação das fases participantes do processo (Ginebra, et al., 1995; Ginebra, et al., 1998; Driessens, et al., 2000; Sarda, et al., 2002; Bohner, et al., 2009). No entanto, todos estes trabalhos encontram o mesmo tipo de mecanismo de reação com diferenças somente na velocidade com a qual cada processo ocorre.

## **2.7 Fosfatos de Cálcio Substituídos**

O tecido ósseo humano é demasiadamente complexo, sendo formado por um compósito de células envoltas em uma matriz orgânica mineralizada que apresenta composição química muito parecida a hidroxiapatita estequiométrica ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HA), porém com alguns defeitos em sua estrutura cristalina. Muitos estudos mostraram que estes defeitos são derivados de substituições por traços de alguns íons que atuam diretamente nos processos fisiológicos dos tecidos humanos, pois influenciam na solubilidade, na química de superfície e na morfologia. Os principais íons são carbonatos, Na, Mg, K, Sr, Zn, Ba, Cu, Al, Fe, F, Cl e Si. Este último, o Si, é

o elemento responsável pelo crescimento normal de ossos e cartilagens (Groot, et al., 1983; Hench, et al., 1993; Camiré, et al., 2004; Reid, et al., 2006; Pietak, et al., 2007; Dorozhkin, 2009).

### 2.7.1 Silício

O silício quando presente em traços na formulação do fosfato tricálcico além de melhorar sua biocompatibilidade e bioatividade (Pietak, et al., 2007) é responsável pela estabilização a temperaturas mais baixas da fase  $\alpha$ , estável somente em temperaturas acima de 1300°C (Groot, et al., 1983; Reid, et al., 2005; Reid, et al., 2006; Pietak, et al., 2007). O Si- $\alpha$ -fosfato tricálcico (Si- $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Si- $\alpha$ -TCP) apresenta estrutura cristalina idêntica ao  $\alpha$ -TCP diferenciando-se apenas nos parâmetros do cristal e no fato de que um a cada dez átomos de fósforo é substituído pelo silício (Reid, et al., 2005). A faixa de solubilidade do silício na estrutura do TCP ainda não é bem definida e muitos estudos tentam determiná-la. Estudos mais recentes (Reid, et al., 2006; Pietak, et al., 2007) mostram que é possível obter Si- $\alpha$ -TCP puro em uma faixa de 0,6 a 0,9% em massa de Si. Valores abaixo resultam em uma mistura de  $\beta$  e  $\alpha$ -TCP e acima, uma mistura de HA e  $\alpha$ -TCP.

Além disso, a qualidade dos reagentes precursores do TCP é extremamente importante, uma vez que algumas impurezas podem estabilizar fases indesejadas (Groot, et al., 1983; Reid, et al., 2007). No caso do Si- $\alpha$ -TCP, a impureza que mais influencia na estabilização de fases indesejadas é o magnésio, que estando presente em concentrações maiores que 250 ppm, estabiliza o  $\beta$ -TCP elevando a temperatura de transição  $\beta \rightarrow \alpha$  para acima de 1400°C e inviabilizando a obtenção de Si- $\alpha$ -TCP puro em temperaturas mais baixas (Enderle, et al., 2005; Reid, et al., 2007; Motisuke, et al., 2008; Ramos, et al., 2008; Carrodegua, et al., 2008).

Quando se tem uma quantidade de Si ideal e reagentes livres de magnésio, é possível obter Si- $\alpha$ -TCP a temperaturas tão baixas quanto 700°C (Pietak, et al., 2007) e 1150°C (Motisuke, et al., 2008), porém conforme a quantidade de Mg aumenta, a temperatura para se conseguir uma fase pura pode chegar a 1400°C ou mais (Carrodegua, et al., 2008). Outro fator que pode ser determinante para a obtenção de uma fase pura é a relação Ca/(P+Si) que deve ser mantida sempre igual a 1,50, pois qualquer desvio pode levar a formação de uma segunda fase, como a HA, que tem sua relação Ca/P igual a 1,67.

A inclusão de silício ocorre pela substituição de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  por grupos  $\text{SiO}_4^{4-}$ . A compensação eletrônica acontece (dependendo das condições termodinâmicas do processo) através da formação de vacâncias de oxigênio ou excesso de Ca, sendo que neste caso, cada um compensa a substituição por dois silícios (Yin, et al., 2005; Pietak, et al., 2007).

Ainda, o silício tende a inibir o crescimento de grão, resultando em materiais de microestrutura mais fina e, conseqüentemente, necessitando menores tempos de moagem. Quando se está trabalhando no sistema bifásico Si- $\alpha$ -TCP/ HA, o silício tende a inibir mais o crescimento de grão do  $\alpha$ -TCP que da HA (Pietak, et al., 2007).

## **2.8 Processamento de Fosfatos de Cálcio**

Os fosfatos de cálcio podem ser obtidos principalmente a partir de dois tipos de processamentos: (i) os pós reagentes são misturados com água ou uma solução aquosa, na qual ocorre uma precipitação. Em seguida, a solução é levada a secar resultando no FCa desejado. (ii) reação no estado sólido através da sinterização (líquida ou sólida) dos pós iniciais até a estabilização da fase desejada (Hench, et al., 1993).

As temperaturas elevadas constituem um importante fator no processamento de produtos cerâmicos. Elas são usadas: (i) para a secagem prévia dos produtos já conformados; (ii) para produzir aglomeração e reduzir a porosidade; (iii) para modificar as tensões residuais e; (iv) para produzir cristalização. Os tratamentos térmicos implicam em alterações de peso e volume, promovem movimentação dos átomos, aumentam as velocidades de difusão, reduzem a porosidade e a área específica e modificam as propriedades (Van Vlack, 1973). Portanto, as propriedades do produto final dependem da composição das matérias primas, das fases estabilizadas durante o tratamento térmico, da microestrutura, do tamanho e da homogeneidade das partículas e da área superficial específica.



### 2.8.1 Precipitação em soluções aquosas

Fosfatos de cálcio policristalinos podem ser obtidos na forma de pó por meio da precipitação em soluções aquosas. Os precipitados resultantes podem conter diferentes quantidades de íons  $H^+$  e  $OH^-$  bem como moléculas de água dependendo das condições experimentais. A temperatura de precipitação está compreendida entre 25 e 1000°C e também podem ocorrer na presença de íons estranhos a sua estequiometria original, como flúor, carbonato, sódio, potássio e magnésio. Estes elementos se incorporam no cristal do FCa modificando suas propriedades finais (Groot, et al., 1983; Dorozhkin, 2010). A Tabela 2.8 resume as propriedades e características dos principais fosfatos de cálcio a 25°C.

**Tabela 2.8 - Principais propriedades da precipitação de fosfatos de cálcio a 25°C (Dorozhkin, 2010). Sol = solubilidade**

Ca/P	Nome, símbolo	Formula	Sol. (g/L)	pH
0,5	Fosfato monocálcico monoidratado, MCPM	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	18	0 – 2,0
0,5	Fosfato monocálcico anidro, MCPA	$Ca(H_2PO_4)_2$	17	a
1,0	Hidrogeno fosfato de cálcio diidratado, Brushita, DCPD	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	0,088	2,0 – 6,0
1,0	Hidrogeno fosfato de cálcio anidro, monetita, DCPA	$CaHPO_4$	0,048	a
1,33	Fosfato Octacálcico, OCP	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	0,0081	5,5 – 7,0
1,5	$\alpha$ -Fosfato Tricálcico, $\alpha$ -TCP	$\alpha-Ca_3(PO_4)_2$	0,0025	b
1,5	$\beta$ -Fosfato Tricálcico, $\beta$ -TCP	$\beta-Ca_3(PO_4)_2$	0,0005	b
1,2- 2,2	Fosfato de cálcio amorfo, ACP	$Ca_xH_y(PO_4)_z \cdot nH_2O$ $n = 3-4,5; 15-20\%H_2O$	--	5 – 12
1,5- 1,67	Hidroxiapatita deficiente em cálcio, CDHA	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ $0 < x < 1$	0,0094	6,5-9,5
1,67	Hidroxiapatita, HÁ	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	0,0003	9,5-12
1,67	Fluorapatita, FA ou FAp	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	0,0002	7-12
2,0	Fosfato tetracálcico, TTCP	$Ca_4(PO_4)_2O$	0,0007	b

a Estável acima de 100°C

b Não pode ser obtido por precipitação

### 2.8.2 Reações em Estado Sólido

A reação por meio da queima ou da sinterização tem como finalidade aglomerar as partículas formando uma massa coesa, trazendo inúmeras modificações para os produtos cerâmicos, como a redução da área específica total, redução do volume aparente total e aumento na resistência mecânica. Muitas vezes pode-se verificar mudança de fase, ou seja, durante a

queima pode ocorrer a formação de um líquido (sinterização líquida) ou a transformação de fases cristalinas.

Durante a sinterização, as partículas se unem em um contato mais íntimo reduzindo a porosidade. A força motriz necessária é conseguida pela diminuição da energia superficial total, devida ao contato e ao crescimento dos grãos. Os átomos das partículas pequenas são transferidos para as maiores, e os poros são substituídos por material sólido (Van Vlack, 1973).

No caso dos FCa, reações em estado sólido a temperaturas mais elevadas que 700°C normalmente resultam em um ou uma mistura de fosfatos de cálcio sendo a sua composição dependente da composição dos componentes não voláteis, da pressão parcial dos voláteis, da temperatura e da pressão total (Groot, et al., 1983). Estas reações ocorrem de acordo com os diagramas de fases de cada sistema, principalmente do sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> demonstrado na Figura 2.4. A estequiometria dos materiais de partida deve ser exata para que não ocorra a formação de fases indesejáveis.

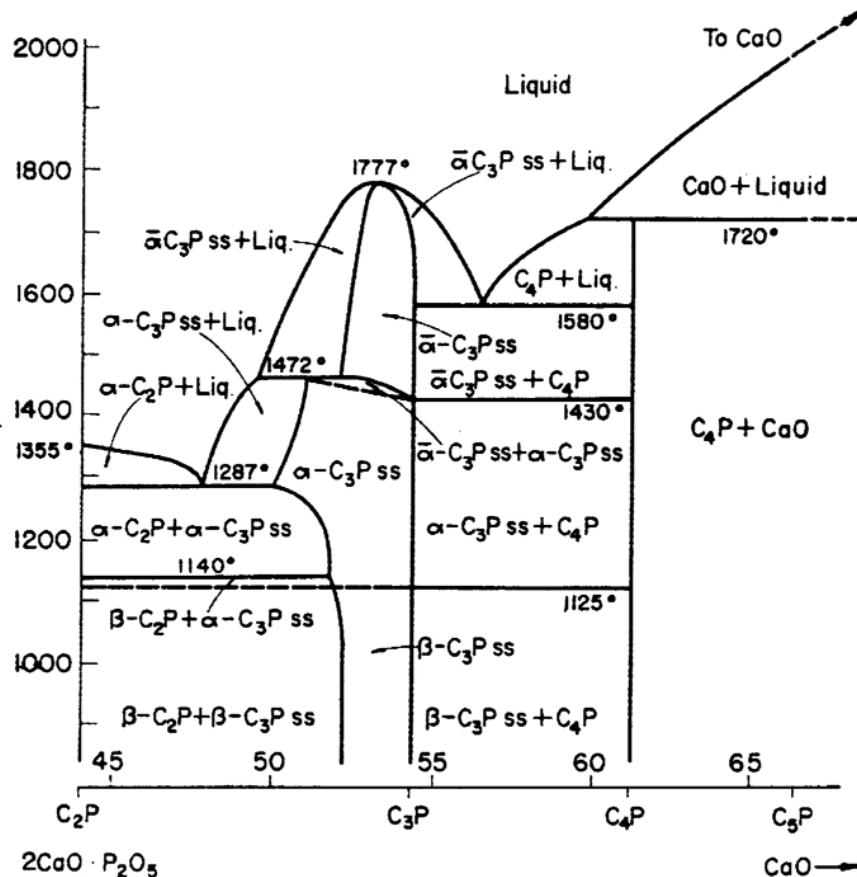


Figura 2.4 - Diagrama de fases do sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Welch, et al., 2002).

A formação de FCa a partir de reações no estado sólido assim como em precipitações em soluções aquosas pode ocorrer com a incorporação de íons estranhos à sua estequiometria usual (Mg, F, Cl, silicatos, sulfatos e carbonatos) substituindo os íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{OH}^-$ . Estas substituições podem diminuir a cristalinidade do material, podem estabilizar fases cristalinas a temperatura ambiente ou em contato com soluções aquosas e podem alterar sua solubilidade e reatividade.

## 2.9 Caracterização de Fosfatos de Cálcio

Os métodos mais utilizados para a caracterização dos fosfatos de cálcio para uso como biomateriais são: difração de raios X (DRX), difração de elétrons e de nêutrons, fluorescência de raios X (FRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), ressonância magnética nuclear (NMR), espectroscopia de infravermelho (IR) e Raman e termogravimetria (TGA). As principais informações que podem ser obtidas a partir de cada técnica de caracterização estão descritas na Tabela 2.9.

**Tabela 2.9 – Alguns métodos de caracterização de fosfatos de cálcio (LeGeros, 1991).**

<b>Método Analítico</b>	<b>Informação</b>
Difração de Raios X (DRX)	Identificação, pureza e mistura de fases, cristalinidade (tamanho de cristalito e/ ou tensão residuais), parâmetros de rede, determinação quantitativa de substituições iônicas
Espectroscopia de Infravermelho (IR)	Presença de grupos funcionais, determinação de $\text{CO}_3^{2-}$ , pureza e cristalinidade (grau de perfeição)
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Morfologia do cristal (forma e tamanho)
Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	Propriedades ultra-estruturais: defeitos de rede, tamanho e morfologia de cristalito e orientação
Energia Dispersiva (EDS), microsonda, Espectroscopia Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)	Distribuição qualitativa de elementos, frações Ca/P, Ca/Mg entre outras
Ressonância Magnética Nuclear (MNR)	Ligações de Hidrogênio, efeito do F
Termogravimetria (TGA)	Estabilidade térmica
Colorimetria	Determinação da quantidade de fósforo
Absorção atômica	Análise Elemental de cátions

Normalmente, apenas com DRX já se consegue ótimas informações a respeito de um fosfato de cálcio, pois é possível obter dados sobre pureza e mistura de fases, cristalinidade, tamanho de cristalito e alterações na estrutura cristalina. Ainda, pode-se determinar a quantidade de substituição ( $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{SiO}_4^{2-}$ ) ocorrida durante uma síntese. Outras técnicas de análise de fase cristalina, relação Ca/P, por exemplo, não podem ser empregadas separadamente, pois estas não dão resultados corretos quando se tem uma mistura de fases (LeGeros, 1991).

Na caracterização de fosfatos de cálcio deve-se ter o cuidado para não gerar resultados errôneos advindos da má preparação de amostras. Por exemplo, pode-se gerar inversão de intensidade de picos ou desvio de posição ou má qualidade de sinal em uma análise de difração de raios X pelo simples fato de não se manter a amostra no mesmo plano que o porta amostras. Assim, qualquer método de caracterização é confiável desde que sejam seguidos os protocolos de preparação e de análise de amostras para evitar conclusões errôneas a respeito de um dado material. Os itens a seguir descrevem de maneira resumida as principais técnicas de caracterização empregadas para fosfatos de cálcio.

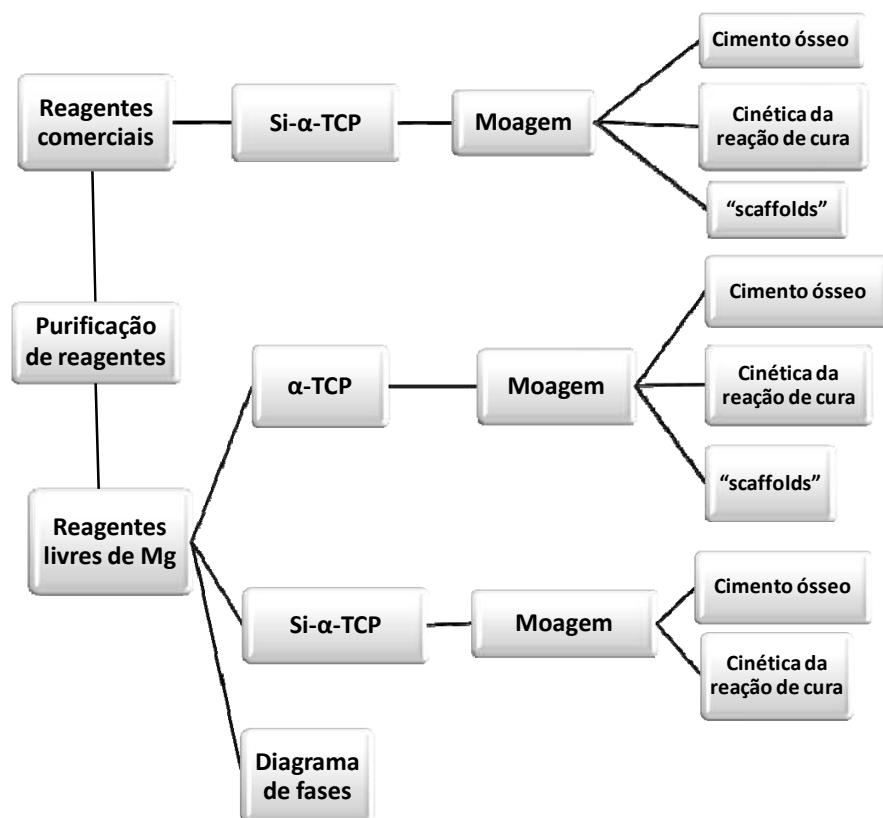
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para atingir o objetivo proposto a parte experimental deste trabalho está dividida em duas grandes etapas listadas a seguir e resumidas no fluxograma da Figura 3.1:

Parte 1: Síntese e Caracterização de Cimento Ósseo a base do  $\alpha$ -Fosfato Tricálcico Dopado com Silício: o Si- $\alpha$ -TCP foi sintetizado a partir de reagentes comerciais de baixo custo, processado e caracterizado. Em seguida, determinou-se as propriedades de seu cimento ósseo e, finalmente, determinou-se a sua biocompatibilidade “in vitro” e “in vivo”.

Parte 2: Reagentes livres de Mg:  $\alpha$ -TCP vs. Si- $\alpha$ -TCP: rotinas de síntese de reagentes livres de impurezas, principalmente de magnésio, foram determinadas para permitir a análise da influência da dopagem por silício nas propriedades químicas, físicas, mecânicas e de toxicidade no cimento ósseo. Esta etapa está subdividida em outras três: (i) síntese e caracterização de reagentes; (ii) síntese e caracterização do  $\alpha$ -TCP dopado e não dopado com silício; e (iii) caracterização e avaliação dos cimentos ósseos correspondentes.

O estudo de diagramas de fases e da fabricação de “scaffolds” citados no fluxograma da Figura 3.1 estão apresentados nos ANEXO A e ANEXO B, respectivamente. A Tabela 3.1 resume as descrições das siglas referentes as amostras citadas neste capítulo. Os demais símbolos já estão descritos na tabela de Nomenclatura e Simbologia da página xix.



**Figura 3.1 - Fluxograma esquemático das etapas experimentais deste trabalho.**

**Tabela 3.1 - Descrição da simbologia utilizada no capítulo.**

<b>Símbolo</b>	<b>Descrição</b>
TCP-I	$\alpha$ -Fosfato tricálcico dopado com silício e obtido com reagentes de origem comercial
c-TCP-I	Cimento de fosfato de cálcio obtido a partir do TCP-I
M-RC	Hidrogeno fosfato de cálcio ou monetita, $\text{CaHPO}_4$ de origem comercial (Synth, Brasil)
M-RL	Hidrogeno fosfato de cálcio ou monetita, $\text{CaHPO}_4$ sintetizado em laboratório
CC-RC	Carbonato de Cálcio, $\text{CaCO}_3$ de origem comercial (Synth, Brasil)
CC-RL	Carbonato de Cálcio, $\text{CaCO}_3$ sintetizado em laboratório
W-RC	Silicato de cálcio ou wollastonita, $\text{CaSiO}_3$ de origem comercial (Vetec, Brasil)
W-RL	Silicato de cálcio ou wollastonita, $\text{CaSiO}_3$ sintetizado em laboratório
Série RC	Reagentes comerciais
Série RL	Reagentes sintetizados em laboratório
TCP-II	$\alpha$ -Fosfato tricálcico dopado com silício e obtido com reagentes sintetizados em laboratório
TCP-III	$\alpha$ -Fosfato tricálcico obtido com reagentes sintetizados em laboratório
c-TCP-II	Cimento de fosfato de cálcio obtido a partir do TCP-II
c-TCP-III	Cimento de fosfato de cálcio obtido a partir do TCP-III

### 3.1 Materiais Utilizados

- $\text{CaCO}_3$ , Carbonato de Cálcio, Synth
- $\text{CaHPO}_4$ , Hidrogeno Fosfato de Cálcio Anidro, Synth
- $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ , Silicato de Cálcio, Vetec
- $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Acetato de Cálcio Monoidratado, Synth
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , Carbonato de Amônio, Synth
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , EDTA sal dissódico, Synth
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , Fosfato de Amônio Monobásico, Synth
- $\text{NH}_4\text{OH}$ , Hidróxido de Amônio, Synth
- $\text{SiO}_2$ , Dióxido de Silício, LPQC- Unicamp
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Fosfato de Sódio Bibásico Anidro, Synth
- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , Ácido Cítrico, Synth
- $\text{H}_2\text{O}_2$ , Peróxido de Hidrogênio 35%, Synth
- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , Álcool Etílico Absoluto (99,8%), Synth
- $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Alumina, BioLab - DEMa -Ufscar
- $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\beta$ -Fosfato Tricálcico, Labiomec-Unicamp
- $\text{NaCl}$ , Cloreto de Sódio, Synth
- $\text{NaHCO}_3$ , Bicarbonato de Sódio, Synth
- $\text{KCl}$ , Cloreto de Potássio, Nuclear
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , Fosfato de Potássio Bi-básico Triidratado, Merck
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Cloreto de Magnésio hexaidratado, Synth
- $\text{HCl}$ , Ácido Clorídrico, Synth
- $\text{CaCl}_2$ , Cloreto de Cálcio Anidro, Synth
- $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Sulfato de Sódio, Synth
- $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ , Tris, Synth
- $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ , Acetona, Synth
- Solução de Ringer, Oxoid

### 3.2 [alfa]-Fosfato Tricálcico Dopado com Silício

#### 3.2.1 Determinação da Temperatura de Tratamento Térmico, Processamento e Caracterização

O [alfa]-fosfato tricálcico dopado com silício (TCP-I) foi obtido pela reação no estado sólido de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ , CC-RC, Synth) e monetita ( $\text{CaHPO}_4$ , M-RC, Synth) segundo a reação da Equação 3.1. Para realizar a dopagem com silício foi adicionado à mistura de reagentes 5% em massa de silicato de cálcio ( $\text{CaSiO}_3$ , W-RC, Vetec).



**Equação 3.1**

Antes da queima, foi determinada a quantidade de impureza dos reagentes por FRX semi-quantitativa (Tabela 3.2). Em seguida, calculou-se uma **estimativa** das quantidades de Mg e Si presentes na mistura reacional e determinou-se um intervalo de temperatura de tratamento térmico de acordo com os diagramas de fase dos sistemas  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Carrodegua, et al., 2008) e  $\text{CaSiO}_3$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (de Aza, et al., 1995) que estão representados nas Figura 3.2 e Figura 3.3, respectivamente. Estes dois elementos exercem grande influência sobre a temperatura de transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  do fosfato tricálcico. Enquanto o magnésio estabiliza o polimorfo de baixa temperatura,  $\beta$  (Carrodegua, et al., 2008; Ramos, et al., 2008; Reid, et al., 2007), o silício estabiliza a fase de alta temperatura,  $\alpha$  (Reid, et al., 2006; Pietak, et al., 2007; Motisuke, et al., 2008).



Tabela 3.2 – Resultados da análise semi-quantitativa de FRX. Elementos minoritários (impurezas) presentes nos reagentes utilizados na síntese do TCP-I. Valores em % em massa.

Elemento	CC-RC	M-RC	W-RC
Pureza	99,37	99,37	99,18
Al	0,0094	0,0117	0,0254
Cl	0,1015	a.l.d.	0,0090
Fe	0,0318	0,0178	0,5278
K	0,0151	a.l.d.	0,0027
Mg	0,1407	0,5173	0,0459
Mn	0,0054	0,0102	0,1579
Na	0,0060	0,0423	0,0162
Ni	a.l.d.	0,0032	0,0034
P	0,0496	n.m.	0,0171
S	0,0120	0,0098	0,0090
Si	0,0412	0,0050	n.m.

a.l.d. = abaixo do limite de detecção

n.m = não é elemento minoritário

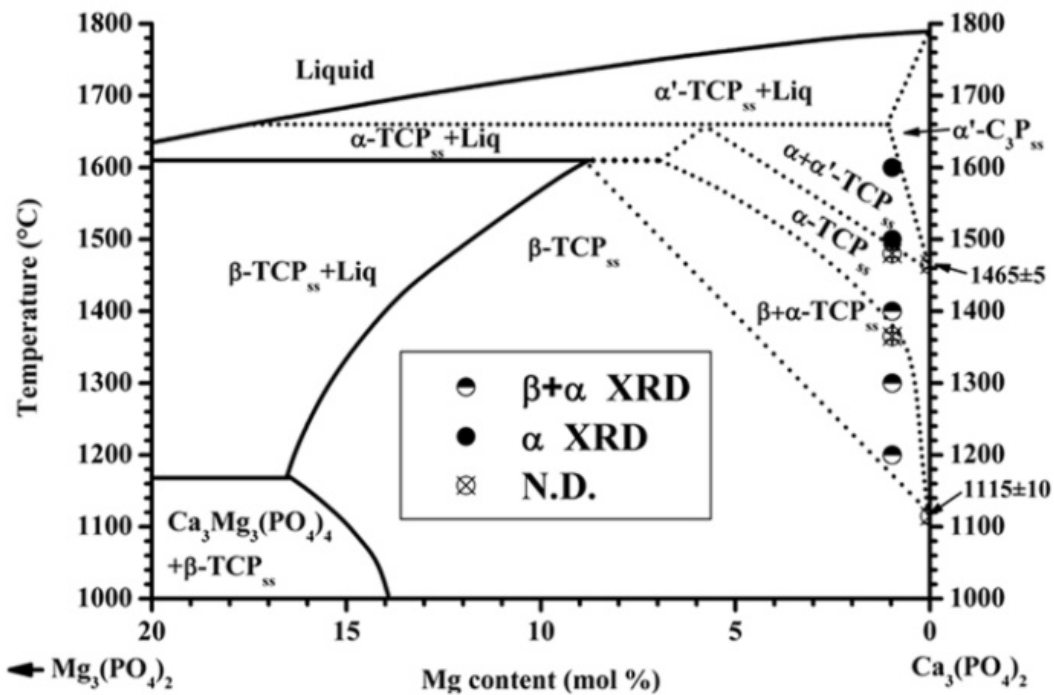


Figura 3.2 - Diagrama do sistema  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Carrodegua, et al., 2008).

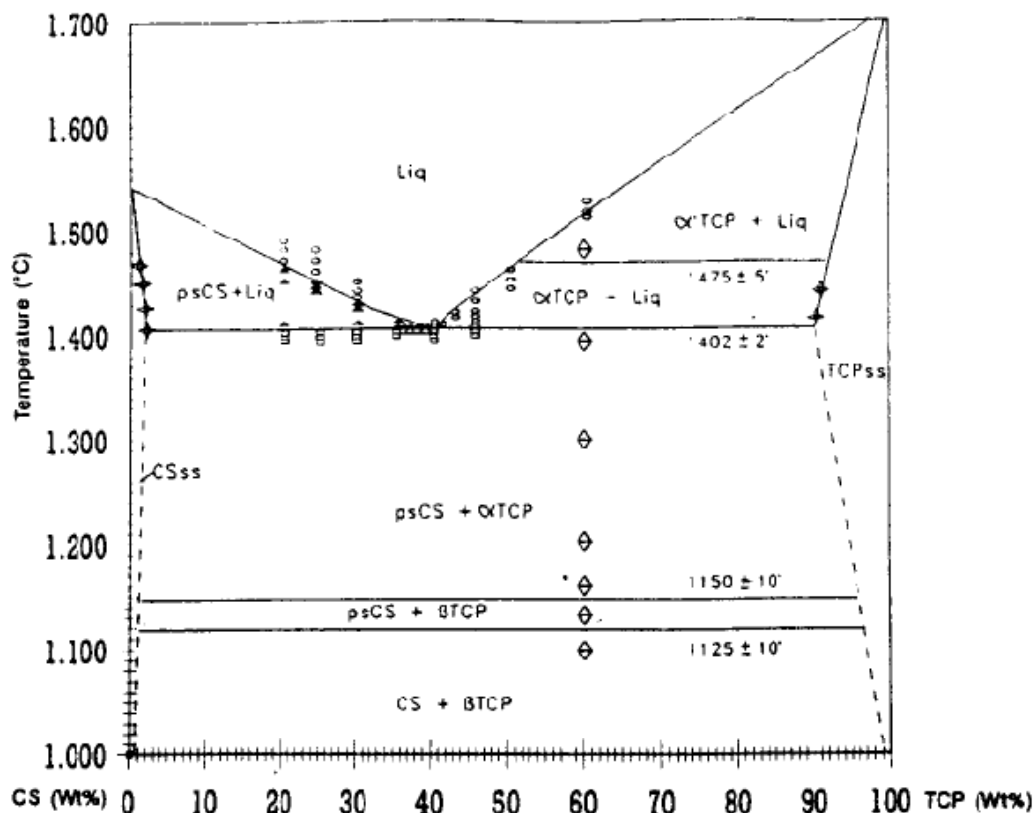


Figura 3.3 - Diagrama de fase do sistema  $(\text{CaSiO}_3\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$  (de Aza, et al., 1995).

Para determinar a temperatura de síntese do TCP-I foram preparados lotes de 3g de mistura reacional e cada um deles foi tratado em diferentes temperaturas no intervalo de 1150 e 1400 $^{\circ}\text{C}$  com um tempo de patamar de 2h. Os pós obtidos foram moídos e a quantidade de  $\beta$ -TCP foi determinada por difração de raios X (método do padrão interno). Após escolhida a temperatura de tratamento térmico, o TCP-I foi sintetizado e moído em moinho de bolas durante sete dias e, finalmente, caracterizado por análises e experimentos que determinaram sua pureza de fase cristalina, a sua relação  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$ , sua distribuição granulométrica, sua densidade absoluta, sua citotoxicidade indireta e a evolução do pH em função do tempo.

### 3.2.2 Obtenção e Caracterização do Cimento de Fosfato de Cálcio Baseado no TCP-I (c-TCP-I)

Para a determinação do cimento ósseo foi utilizada como fase líquida uma solução aquosa (pH = 5,7) contendo 2,5% em massa de fosfato de sódio bibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e 1,5% em massa de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) (Sarda, et al., 2002; Ginebra, et al., 1998). O tempo de mistura da pasta foi de aproximadamente 1 minuto e o tempo de cura foi determinado pelo método das agulhas de Gillmore (ASTM-C266-04). O cimento foi curado durante 24 horas em ambiente com 100% de umidade relativa (dessecador com água) e depois caracterizado antes e após imersão durante 7 dias em FCS para determinar as fases cristalinas presentes, a resistência mecânica e a evolução de sua morfologia.

Além disso, para avaliar a biocompatibilidade do cimento, foram realizados ensaios de citotoxicidade indireta, imersão em FCS para verificar a deposição de capa de *apatita* na superfície e, finalmente, ensaio “in vivo”.

## 3.3 Reagentes Livres de Magnésio I: Síntese e Caracterização

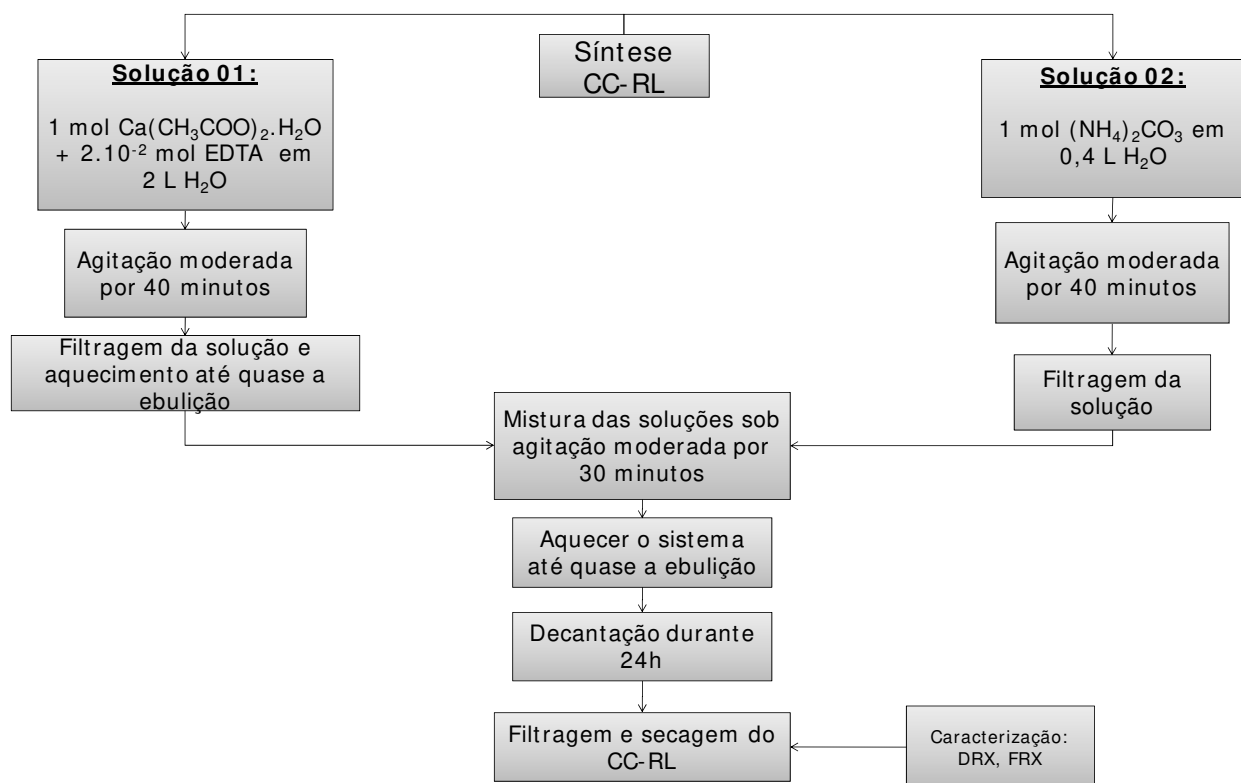
Para eliminar a influência que o magnésio tem sobre a temperatura de formação do  $\alpha$ -TCP desenvolveram-se rotinas de síntese de reagentes livres deste elemento já que os reagentes comerciais de baixo custo não apresentam confiabilidade de composição e pureza química.

### 3.3.1 Carbonato de Cálcio ( $\text{CaCO}_3$ , CC-RL)

O carbonato de cálcio foi obtido por meio de uma reação de precipitação em solução aquosa utilizando-se EDTA sal dissódico como agente sequestrante de Mg (Motisuke, et al., 2008) de acordo com a reação descrita na Equação 3.2. O fluxograma do processo se encontra na Figura 3.4.



**Equação 3.2**



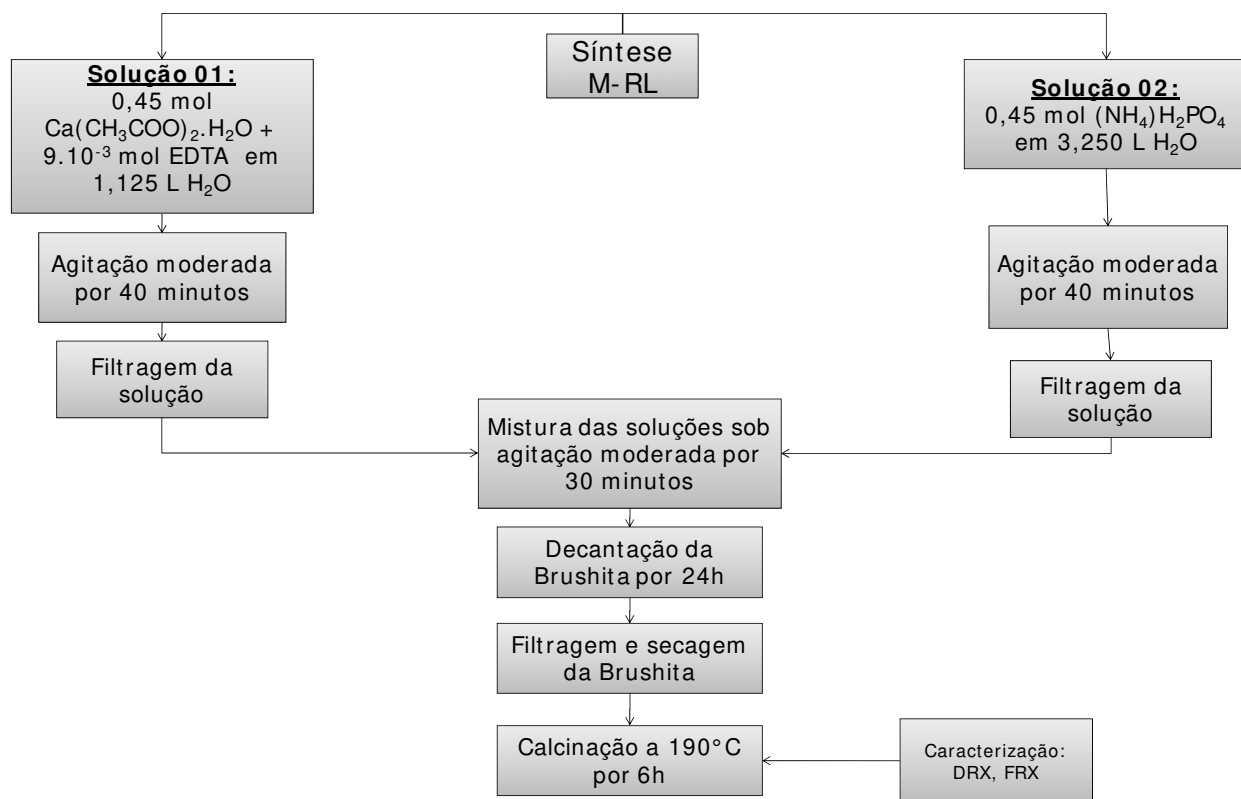
**Figura 3.4 - Fluxograma do processo de síntese do carbonato de cálcio.**

### 3.3.2 Hidrogenofosfato de Cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ , M-RL)

O hidrogeno fosfato de cálcio ou *monetita* foi obtida pela precipitação de hidrogeno fosfato de cálcio diidratado ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , *brushita*) em solução aquosa seguido de calcinação a  $200^\circ\text{C}$  para garantir a sua transformação em *monetita*. Neste processo também se utilizou o EDTA sal dissódico para retirar o Mg do meio (Motisuke, et al., 2008). A reação de precipitação da *brushita* está descrita na Equação 3.3. O fluxograma da síntese encontra-se a Figura 3.5.



**Equação 3.3**

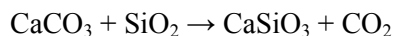


**Figura 3.5 - Fluxograma do processo de síntese da *monetita*.**

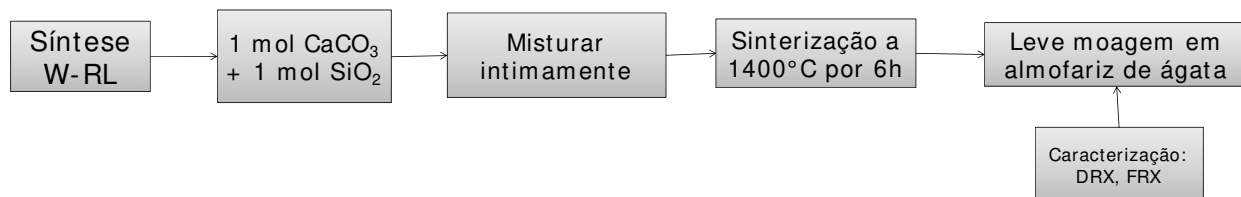
Tanto para o carbonato de cálcio como para a *monetita* a precipitação ocorreu na presença de EDTA sal dissódico que forma complexos solúveis com o Mg evitando a sua co-precipitação com os sais de cálcio formados (Flaschka, 1959), deixando os materiais com baixos níveis deste contaminante.

### 3.3.3 Silicato de Cálcio (CaSiO<sub>3</sub>, W-RL)

O silicato de cálcio ou *wollastonita* foi obtido sinterizando-se o carbonato de cálcio obtido no item 3.3.1 com dióxido de silício (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Carlos Kenichi Suzuki do Laboratório Ciclo Integrado de Quartzo – LIQC) em proporção estequiométrica (Equação 3.4) a 1400°C por 6 horas. O fluxograma do processo de obtenção da *wollastonita* está descrito na Figura 3.6.



**Equação 3.4**



**Figura 3.6 - Fluxograma do processo de síntese de wollastonita.**

Os reagentes obtidos foram analisados de maneira a determinar sua pureza de fase cristalina e a presença de impurezas sendo posteriormente comparados com as propriedades e características dos reagentes comerciais utilizados no preparo do TCP-I.

### 3.4 Reagentes Livres de Magnésio II: $\alpha$ -TCP Dopado e Não Dopado com Silício

#### 3.4.1 Determinação da Temperatura de Tratamento Térmico, Processamento e Caracterização

Os fosfatos de cálcio estudados nesta etapa do trabalho (TCP-II e TCP-III) foram obtidos pela mesma reação descrita na Equação 3.1, porém foram utilizados os reagentes sintetizados no item 3.3. (série RL) no lugar de reagentes comerciais (série RC). Igualmente ao TCP-I, à amostra dopada com silício (TCP-II) foram adicionados 5% em massa de silicato de cálcio (W-RL) à mistura reacional antes do tratamento térmico.

Uma **estimativa** das quantidades de magnésio e silício presentes em cada mistura reacional foi calculada a partir de uma análise semi-quantitativa de FRX das impurezas de cada reagente (Tabela 3.3) e da quantidade de silício adicionada à mistura reacional. Em seguida, da mesma maneira que para o TCP-I tratou-se as amostras em temperaturas em um intervalo entre 1150 e 1300°C durante 2h. Os materiais obtidos foram moídos e através da quantidade de  $\beta$ -TCP presente em cada temperatura determinou-se a temperatura de tratamento térmico para cada um dos materiais.

**Tabela 3.3 –FRX semi-quantitativa dos elementos minoritários dos reagentes da série RL. Valores em % mássica.**

Elemento	CC-RL	M-RL	W-RL
<b>Pureza</b>	99,86	99,96	99,89
<b>Al</b>	a.l.d.	a.l.d.	0,0149
<b>Cl</b>	a.l.d.	a.l.d.	0,0159
<b>Fe</b>	0,0035	0,0041	0,0067
<b>K</b>	a.l.d.	a.l.d.	0,0016
<b>Mg</b>	0,0220	a.l.d.	a.l.d.
<b>Na</b>	0,0952	0,0143	0,0124
<b>Ni</b>	0,0022	a.l.d.	a.l.d.
<b>P</b>	0,0013	n.m.	0,0444
<b>S</b>	0,0076	0,0087	a.l.d.
<b>Si</b>	0,0015	a.l.d.	n.m.

a.l.d.- abaixo do limite de detecção do equipamento

n.m. – não é elemento maioritário

As amostras TCP-II e TCP-III foram então moídas em moinho de bolas, em seguida, caracterizadas quanto a sua pureza de fase cristalina, a sua relação Ca/P e Ca/(P+Si), a sua distribuição granulométrica, a sua área superficial específica, a sua densidade absoluta, a sua citotoxicidade indireta, a evolução do pH em função do tempo.

### 3.4.2 Obtenção e Caracterização do Cimento de Fosfato de Cálcio

Para se manter um parâmetro de comparação entre os cimentos desenvolvidos neste item com o desenvolvido no item 3.2.2, foi utilizada como fase líquida a mesma solução aquosa contendo 2,5% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 1,5% em massa de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (pH= 5,7). O processo para a obtenção dos corpos de prova dos cimentos c-TCP-II e c-TCP-III foram os mesmos utilizados para o c-TCP-I: mistura do líquido com o pó durante 1 minuto, moldagem em moldes de teflon e cura durante 24 horas em ambiente com 100% de umidade relativa (dessecador com água). Em seguida, os materiais obtidos foram analisados, antes e após imersão em fluido corpóreo simulado durante 7 dias, quanto as fases cristalinas presentes, a resistência mecânica, a densidade absoluta, a porosidade total e a distribuição do tamanho de poros, a citotoxicidade indireta e a precipitação de capa de *apatita*.

Finalmente, como maneira de se determinar a influência do silício na reação de cura do cimento ósseo, um estudo detalhado da cinética destes dois cimentos foi realizado e em seguida comparado com o cimento baseado no TCP-I-2 que foi obtido utilizando-se os mesmos protocolos de síntese e processamento do TCP-I, porém a partir de reagentes de diferentes lotes. Todos os protocolos e parâmetros serão abordados no item de protocolos e técnicas de caracterização (3.5) e estão resumidos na Tabela 3.4, a seguir.

**Tabela 3.4 - Resumo das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho.**

<b>Técnica</b>	<b>Métodos / condições</b>	<b>Propriedades analisadas</b>	<b>Amostras analisadas</b>
FRX	Semi-quantitativo	Elementos minoritários (impurezas)	Reagentes das séries RC e RL
	Quantitativo (material fundido com LiB <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	Elementos majoritários para determinação Ca/P e Ca/P+Si	TCP-I, TCP-II e TCP-III M1 e M2 (Anexo A)
DRX	Qualitativo	Fases cristalinas presentes	Reagentes da série RL e RC; TCP-I, TCP-II e TCP-III; c-TCP-I, c-TCP-II e c-TCP-III; s-TCP-I e s-TCP-III (Anexo B)
	Quantitativo: método do padrão interno (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Quantificação de $\beta$ -TCP presente em cada temperatura de tratamento térmico	TCP-I, TCP-II e TCP-III
	Quantitativo: método do padrão externo	Quantificação de $\alpha$ -TCP na cinética da reação de cura	TCP-I, TCP-II e TCP-III
MEV	Recobrimento com Au	Análise morfológica	TCP-I, TCP-II e TCP-III c-TCP-I, c-TCP-II e c-TCP-III s-TCP-I e s-TCP-III
	Microanálise por microsonda: embutimento em resina epóxi e recobrimento com carbono	Determinação da quantidade de Si no grão de TCP	Amostras dos diagramas de fase (Anexo A)
FTIR	Pastilhas de KBr	Avaliação da pureza dos materiais e substituições nos fosfatos de cálcio e cimentos	TCP-II e TCP-III c-TCP-II e c-TCP-III
Espalhamento de Luz	Laser, dispersão álcool	Distribuição granulométrica	TCP-I, TCP-II, TCP-III e TCP-I-2
Picnometria de He	Amostra na forma de pó, porta amostra de 0,1 cm <sup>3</sup>	Determinação da densidade absoluta	TCP-I-2, TCP-II, TCP-III c-TCP-II e c-TCP-III
Porosimetria de Hg	Cilindros de 6x12mm	Determinação da distribuição e do tamanho de poros	TCP-I-2, TCP-II e TCP-III s-TCP-I e s-TCP-III (Anexo B)
Área superficial	Método BET	Determinação da área superficial específica de pós de TCP e dos cimentos durante a cura	TCP-I-2, TCP-II e TCP-III
Resis. à Comp.	Compressão até a fratura, célula de 10kN, 1mm/min	Carga máxima até a fratura	TCP-I-2, TCP-II e TCP-III (cinética) c-TCP-I, c-TCP-II e c-TCP-III s-TCP-I e s-TCP-III (Anexo B)
MO	Embutimento em resina epóxi e polimento	Morfologia de grão após tratamento térmico	Amostras dos diagramas de fases (Anexo A)



### 3.5 Protocolos Experimentais

#### 3.5.1 Protocolos de Moagem

A moagem dos pós de TCP foi realizada utilizando-se um moinho de bolas. Para todos os pós foi utilizado um jarro de polipropileno de 1L e 500 mL e meio de moagem composto por bolas de alumina de 13 e 23 mm de diâmetro. A escolha do jarro era baseada no volume de amostra disponível para o processamento e no fato de que o conjunto pó + meio de moagem ocupasse sempre por volta de 50% do volume do jarro. Em todas as moagens foi utilizado aproximadamente 70% em volume de pó e 30% em volume de meio de moagem. O tempo de moagem foi de 168 horas para o TCP-I e o TCP-I-2 e 48 horas para o TCP-II e o TCP-III.

#### 3.5.2 Evolução do pH dos Pós de TCP

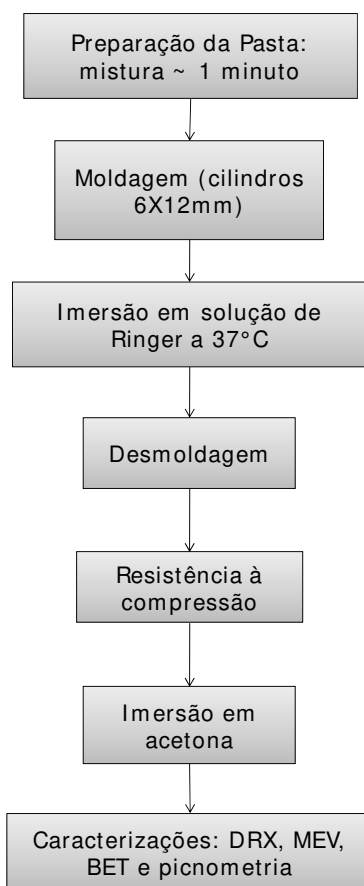
A evolução do pH do TCP-I-2, TCP-II e TCP-III em função do tempo foi determinada a partir de um ensaio no qual se preparou uma alíquota de 0,5g de cada pó em 5 mL (100 mg/mL) de solução tampão Tris/HNO<sub>3</sub> de concentração 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e se mediu o pH durante um período de sete dias (168 horas).

#### 3.5.3 Estudo da Cinética da Reação de Cura de Cimentos de Fosfatos de Cálcio.

A influência da dopagem com silício e da presença de impurezas na cinética da reação de cura dos cimentos ósseos foi estudada por meio das etapas descritas no fluxograma da Figura 3.7.

A reação de cura dos fosfatos tricalcicos obtidos com os reagentes da série RL e RC foi analisada para verificar a evolução da transformação do  $\alpha$ -TCP em *apatita* pela caracterização das fases cristalinas presentes (relações entre as intensidades da fase formada e da fase

dissolvida) em diferentes tempos da reação de cura (2, 8, 24, 72, 120, 168 e 360 horas) de acordo com o método desenvolvido por Ginebra e colaboradores (1997).



**Figura 3.7 - Fluxograma do estudo da cinética de reação.**

Para cada tempo, foram preparados cilindros de 6 mm de diâmetro por 12 mm de altura que foram moldados em moldes de Teflon<sup>®</sup> de acordo com a Figura 3.8.a Em seguida, após aproximadamente 20 minutos, o molde contendo a pasta de cimento ósseo foi imersa em solução de Ringer (Figura 3.8.b) e mantida a 37°C pelo tempo necessário. Depois, o molde foi retirado da solução e os cilindros de cimento desmoldados (Figura 3.8.c e Figura 3.8 d) e lavados durante 2h em acetona para que a reação de pega cessasse e, em seguida, seco a 100°C por uma noite. As técnicas de caracterizações realizadas para cada tempo foram difração de raios X (item 3.5.9), área superficial BET, porosimetria de mercúrio, resistência à compressão axial e MEV.

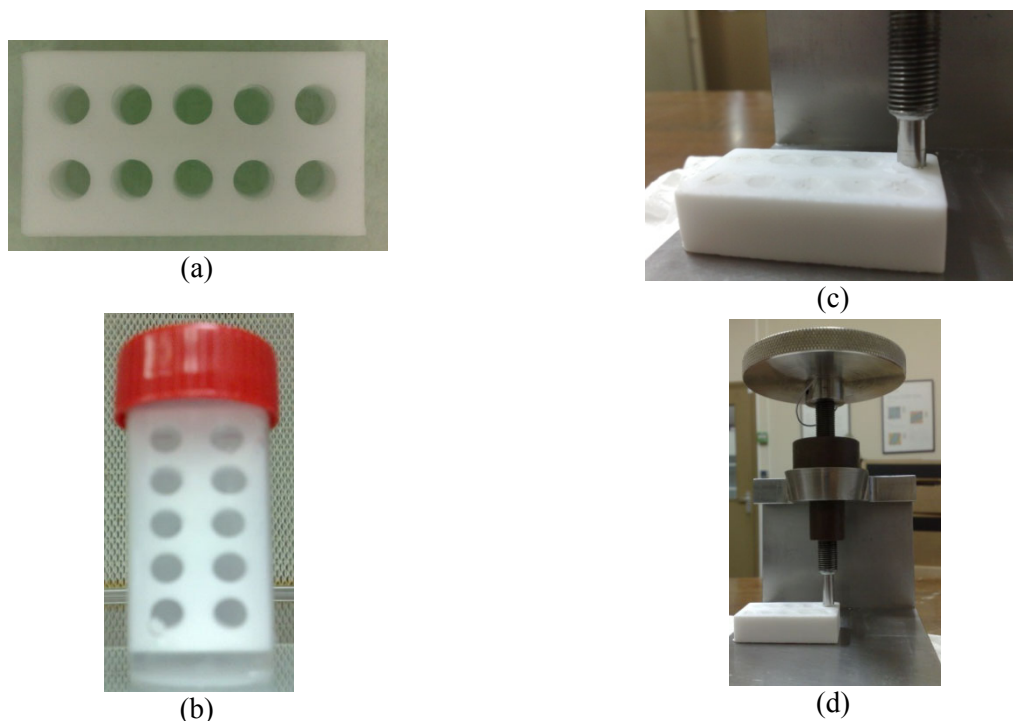


Figura 3.8 - (a) molde de teflon utilizado para a conformação dos cimentos; (b) sistema de imersão em solução de Ringer; (c) e (d) aparato para desmoldar cilindros.

#### 3.5.4 Imersão em Fluido Corpóreo Simulado (FCS)

Os cimentos ósseos estudados foram submetidos à imersão em FCS durante sete dias para verificar a incidência ou não da precipitação de *apatita* na superfície dos mesmos. O FCS foi preparado de acordo com a metodologia apresentada por Kokubo e colaboradores (2006) e a sua composição iônica está descrita na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Composição Iônica do FCS em comparação com a do plasma sanguíneo (Kokubo, et al., 2006).

Composição (mMol/L)	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	pH
FCS	142,0	5,0	2,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	7,40
Plasma Sanguíneo	142,0	5,0	2,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	7,20-7,40

As amostras de cimento foram conformadas em pastilhas de 12 mm de diâmetro por 6 mm de altura e após 168 horas em ambiente com 100% de umidade relativa (dessecador com água) foram desmoldadas e imersas em FCS a 37°C por mais 168 horas. Durante o experimento,

tomou-se o cuidado de deixar as amostras sempre na mesma posição (com a face de maior dimensão paralela a superfície do líquido).

Finalmente, as amostras foram cuidadosamente retiradas do FCS e gentilmente lavadas com água destilada. Depois de secas em estufa a 100° C durante 24h, a superfície das amostras foi metalizada com ouro e estas foram analisadas por MEV.

### 3.5.5 Citotoxicidade Indireta dos Pós e dos Cimentos de Fosfato de cálcio: Método dos Extratos

Todas as amostras foram esterilizadas por radiação gama 25 kGy. A citotoxicidade medida por meio do método dos extratos é um processo no qual se preparam extratos do material (material em contato com meio de cultivo) que são posteriormente diluídos (com exceção do c-TCP-I) e estas diluições colocadas em contato com células. Depois de um determinado tempo, verifica-se a viabilidade celular por espectrofotometria. Ambos os ensaios foram realizados seguindo a norma ISO 10993-5 (1999). As células utilizadas para a realização do teste foram células de ovário de Hamster (CHO-k1) para os pós de TCP e células SAOS-2 para os cimentos ósseos c-TCP-II e c-TCP-II e células VERO para o cimento c-TCP-I. Os protocolos de cada ensaio estão resumidos a seguir:

*Manutenção das células:* as células CHO-k1, VERO e SAOS-2 foram incubadas com meio de cultura celular (RPMI 1640, DMEM, e McCoys, respectivamente) suplementado com antibiótico e antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina 0,025 µg/mL), 2mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino em incubadora úmida a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% da área da placa de cultivo coberta por células). Em seguida, as células foram descoladas da placa por meio da ação de uma solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% em solução tampão fosfato pH 7,4.

*Preparação dos extratos:* os extratos foram preparados na proporção de 0,2g/ mL de meio de cultura RPMI e 3cm<sup>2</sup>/mL de meio de cultura McCoys e DMEM. Como controle negativo foi preparado um extrato de alumina para a cultura com células CHO-k1, um extrato apenas com meio McCoys para as células SAOS-2 e um extrato de poliestireno para as células VERO.

Como controle positivo foi utilizado uma solução de fenol 0,3% (CHO-k1 e VERO) e de detergente SDS 0,2% (SAOS-2). Os extratos foram então incubados a 37°C por 48 horas (meio RPMI e DMEM) e 72 horas (meio Mccoy's). Finalmente, preparam-se diluições em meio de cultura para realização do teste de viabilidade celular.

*Viabilidade das células: células CHO-k1:* em uma placa de cultura de 96 poços foram colocados 50µL da suspensão de células CHO-k1, na concentração final de 3000 células por poço, sobre 50µL do extrato em suas diluições, em quadruplicata. A placa foi colocada na incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas a 37°C. A viabilidade celular foi determinada pela adição de 20 µL de solução de MTS/PMS (20:1) e incubado por mais 2 horas. A placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 495 nm. Este ensaio foi realizado no Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) sob supervisão da Dr<sup>a</sup>. Andrea Rodas.

*Células SAOS-2:* em uma placa de cultura de 24 poços foram colocadas 80000 células em cada poço e depois de 24h as diluições dos extratos foram colocadas em contato com as células, em triplicata. A placa foi colocada na incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas a 37°C. A viabilidade celular neste caso foi determinada adicionando-se 100 µL de AlamarBlue<sup>®</sup> e incubados mais uma vez por 12 horas. Finalmente a placa foi levada a um espectrofotômetro para medir a viabilidade celular. Este experimento foi realizado no Parque Científico de Barcelona do qual é integrante o Departamento de Ciência dos Materiais e Engenharia Metalúrgica da Universidade Politécnica da Catalunha, Barcelona, Espanha.

*Células Vero:* Em uma placa de cultura de 96 poços foram cultivadas por 24h e em seguida o meio de cultivo foi retirado e trocado pelo meio no qual os materiais e os controles permaneceram por 48 horas. As células foram cultivadas por mais 24 horas a 37°C e após este período foram obtidas imagens das células em contraste de fase utilizando Microscópio Invertido (Leica, DMIL LED). Foi feito o método de contagem direta de células, onde 6 campos de cada poço foram escolhidos aleatoriamente e as células foram contadas com auxílio de contador. Também foram obtidas imagens destes campos para documentação fotográfica. Este experimento foi realizado no Laboratório de Biomateriais em Ortopedia – LABIMO, Faculdade de Ciências

Médicas da Unicamp sob supervisão do Dr. Arnaldo Rodrigues Júnior e Dr. William Dias Belangero.

### 3.5.6 Ensaio *In Vivo* do Cimento c-TCP-I

A amostra de animais foi composta de 25 coelhos *Oryctolagus cuniculus*, adultos e machos os quais receberam anestesia geral através de administração intramuscular de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e de cloridrato de xilazina (5mg/kg). Esta dosagem é suficiente para 30 minutos de anestesia. Após a tricotomia da região fronto-parietal e assepsia da região da calota craniana com álcool 70°, foi realizada uma incisão sagital de aproximadamente 20 mm sobre a sutura inter-parietal, seguida de deslocamento e rebatimento dos tecidos contendo epiderme, tecido muscular e periósteo, até a exposição dos ossos parietais.

Com o auxílio de uma trefina de 6 mm de diâmetro para baixa rotação (3 I Innovation Implants), realizou-se duas osteotomias parietais bilaterais (lado direito, grupo Controle e lado esquerdo, grupo Tratado) em espessura total sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9%. Os segmentos ósseos foram então delicadamente removidos com deslocador de Freer (Schobell Industrial Ltda.), mantendo-se a integridade da dura-máter e do encéfalo.

No grupo tratado (GT) foi colocado o cimento a base de TCP-I e sobre este cimento, uma membrana de colágeno com efeito hemostático (Johnson & Johnson); no grupo controle (GC) foi colocado somente a mesma membrana de colágeno. Posteriormente, as incisões foram aproximadas e fixadas com fio de seda 4-0 (Ethicon – Johnson & Johnson).

No pós-operatório imediato, os animais receberam administração subcutânea de 0,5 ml de Optacilin (Ampicilina Benzatina e Ampicilina sódica 30 mg/kg) e 0,1 ml de Dipirona sódica de 6 em 6 horas durante 3 dias via intramuscular. Os animais foram transferidos para gaiolas isoladas e sua recuperação foi acompanhada diariamente com as devidas condições de alimentação, água e higiene.

A eutanásia dos animais ocorreu nos períodos de 7, 15, 30, 60 e 120 dias de pós-operatório, com 5 animais para cada período. Os crânios foram removidos e fixados em solução de Bouin por 48 horas e posteriormente, as peças foram reduzidas de forma que a calota craniana fosse removida, preservando-se os tecidos moles supra-periostais, bem como a dura-máter e parte do

encéfalo. Estes foram processadas segundo técnica rotineira para inclusão em parafina, onde foram realizados os cortes semi-seriados de 6µm no sentido longitudinal do osso e posteriormente corados em H.E..

Os cortes foram analisados e fotografados utilizando-se um microscópio acoplado a uma câmera digital. Este estudo foi realizado no Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP sob supervisão da Prof.<sup>a</sup> Ana Maria Minarelli Gaspar.

### 3.5.7 Difração de raios X Qualitativa

A difração de raios X foi utilizada na caracterização qualitativa dos fosfatos de cálcio e dos reagentes verificando-se a pureza das fases cristalinas estudadas. Foi utilizado o equipamento da marca Rigaku, modelo DMAX 2200, com radiação de  $\text{CuK}\alpha$ , filtro de Ni, 20kV, 40mA. Com passo de varredura de 0,05° e tempo de integração de 2s.

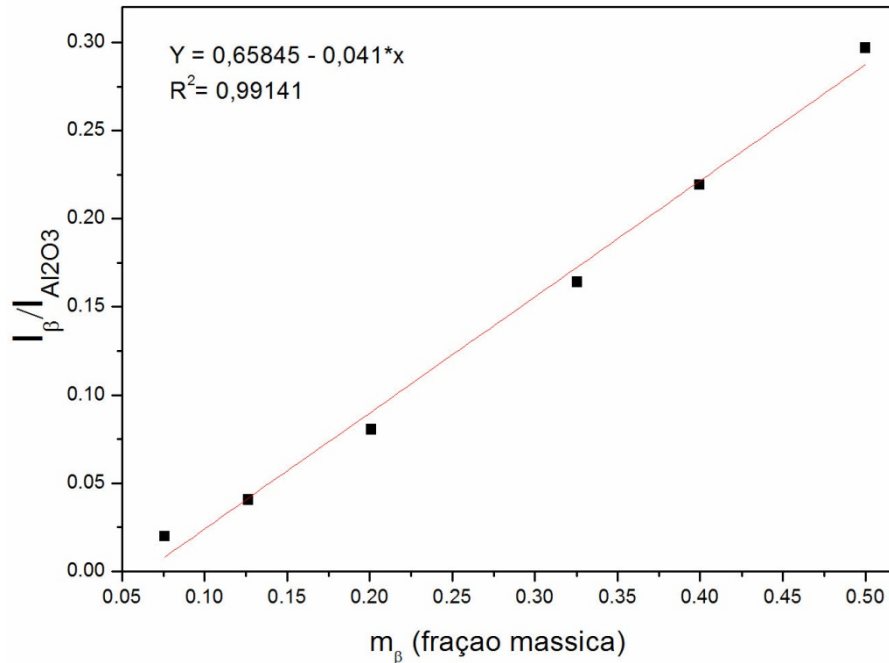
No estudo da cinética da reação de pega dos cimentos as medidas foram realizadas em um equipamento da marca Bruker D8 Advance, com detector Lynx-eye. As medidas foram realizadas em um intervalo 2 theta de 10 a 80°, 40kV e 40mA. O passo de medida foi de 0,02°.

Os padrões utilizados para a determinação das fases formadas foram: carbonato de cálcio (JCPDS 05-0586), monetita (JCPDS 09-0080), brushita (09-0077), silicato de cálcio (JCPDS 31-0300 e 43-1460),  $\beta$ -TCP (JCPDS 09-0169),  $\alpha$ -TCP (JCPDS 09-0348), hidroxiapatita (JCPDS 09-0432) e hidroxiapatita deficiente de cálcio (JCPDS 46-0905).

### 3.5.8 Difração de Raios X Quantitativa: Método do Padrão Interno

O método do padrão interno é baseado no fato de que a porcentagem em massa de fases presentes em uma dada amostra é diretamente proporcional à relação entre as intensidades dos picos de seu difratograma de difração de raios X (Cullity, 1977). Assim, utiliza-se a relação entre as intensidades do  $\beta$ -TCP e a de um padrão, neste caso a alumina,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Para isso, prepara-se uma curva de calibração a partir de amostras de composição conhecida de  $\beta$ -TCP e de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e

realiza-se medidas a fim de se construir uma curva que relacione  $I_{\beta-TCP}/I_{Al_2O_3}$  vs fração mássica de  $\beta$ -TCP ( $m_{\beta}$ ) (Figura 3.9).



**Figura 3.9 - Curva de calibração do  $\beta$ -TCP para análise quantitativa por difração de raios X.**

Em seguida, para se determinar a porcentagem de  $\beta$ -TCP em uma dada amostra, mistura-se esta amostra com quantidades conhecidas de padrão e  $\beta$ -TCP, e após medida de difração de raios X utiliza-se a Equação 3.5 para se determinar a quantidade de  $\beta$ -TCP presente.

$$I_{\beta-TCP} / I_{Al_2O_3} = A(m_{\beta-TCP}^o + m_{\beta-TCP}^1) \quad \text{Equação 3.5}$$

Em que:

$I_{\beta-TCP}$  - área sob o pico específico do  $\beta$ -TCP,

$I_{Al_2O_3}$  - área sob o pico específico do padrão,

$m_{\beta}^o$  - fração mássica de  $\beta$  presente na amostra

$m_{\beta}^1$  - fração mássica de  $\beta$  adicionada à amostra

A – é uma constante



Assim, aplicando-se os dados da curva de calibração obtida tem-se:

$$m_{\beta-TCP}^0 + m_{\beta-TCP}^1 = \frac{I_{\beta-TCP} / I_{Al_2O_3} + 0,041}{0,6584} \quad \text{Equação 3.6}$$

### 3.5.9 Difração de Raios X: Método do Padrão Externo

O estudo da evolução de fases cristalinas durante a cura do cimento ósseo foi realizado através de medidas de difração de raios X dos pós de cimento para cada tempo de reação. Foram realizados tanto análises qualitativas como quantitativas para se calcular o grau da reação de cura e assim avaliar se existe alguma influência da dopagem com silício na cinética de pega do cimento.

Assim, calculou-se para cada tempo as quantidades relativas de cada fase presente por meio do método do padrão externo (Cullity, 1977). A intensidade dos picos de difração de raios X de um determinado material pode ser expressa de acordo com a expressão mostrada na Equação 3.7:

$$I = \left( \frac{I_0 A \lambda^3}{32 \pi r} \right) \left[ \left( \frac{\mu_0}{4 \pi} \frac{e^4}{m^2} \right) \right] \left( \frac{1}{v^2} \right) \left[ |F|^2 p \left( \frac{1 + \cos^2 2\theta}{\sin^2 \theta \cos \theta} \right) \right] \left( \frac{e^{(-2M)}}{2\mu} \right) \quad \text{Equação 3.7}$$

Em que “I” é a intensidade integrada por unidade de comprimento de uma linha de difração, “I<sub>0</sub>” é a intensidade do feixe incidente, “A” é a área da seção transversal do feixe incidente, “λ” é o comprimento de onda do feixe incidente, “r” é o raio do círculo do difratometro, “μ<sub>0</sub> = 4π.10<sup>-7</sup> m.kg.C<sup>2</sup>” é a permeabilidade do vácuo, “e” é a carga do elétron, “m” a massa do elétron, “v” é o volume da célula unitária, “F” é o fator de estrutura, “p” é o fator de multiplicidade, “2(1+cos<sup>2</sup>2θ/sen<sup>2</sup>θcosθ)” é o fator de polarização de Lorentz, “θ” é o ângulo de Bragg, “e<sup>(-2M)</sup>” é o fator da temperatura, “(1/2μ)” é o fator de absorção e “μ” é o coeficiente de absorção linear da amostra.

Quando se analisa uma amostra formada por uma mistura fases cristalinas, a Equação 3.7 pode ser reescrita para a intensidade de um pico correspondente a uma fase j, “I<sub>j</sub>” seguindo a mesma expressão multiplicada pela fração volumétrica de j, “c<sub>j</sub>”, já que, por se tratar de uma

mistura de fases, as intensidades se veem influenciadas por este fator. Também seria necessário substituir  $\mu$  por “ $\mu_m$ ” que é o coeficiente de absorção linear da mistura. Nesta nova equação, todos os outros valores são constantes:

$$I_j = \frac{Kc_j}{\mu_m} \quad \text{Equação 3.8}$$

Em que “K” é desconhecido, pois depende de  $I_0$ , que não se sabe por se tratar de uma mistura. Quando se está trabalhando com uma mistura bifásica se mede a relação de “ $I_j$ ” com a intensidade da mesma linha de difração, mas em uma amostra de fase j pura medida sobre as mesmas condições. Assim, a constante K será eliminada e poder-se-á encontrar a concentração da fase j a partir de esta relação.

Deve-se levar em conta que o coeficiente de absorção “ $\mu_m$ ” que aparece na Equação 3.8 não é independente da concentração das distintas fases que coexistem na mistura. Assim, se define o coeficiente de absorção mássica, “M”, como sendo o coeficiente de absorção linear, “ $\mu$ ”, pela densidade do material, “ $\rho$ ”. Este novo coeficiente é uma constante do material que depende apenas do comprimento de onda da radiação incidente. Este fator é calculado tendo-se em conta uma média ponderada dos coeficientes de absorção mássica de cada elemento químico que compõe cada substância. Assim, considerando-se uma mistura formada por apenas duas fases tem-se:

$$\frac{\mu_m}{\rho_m} = w_1 \frac{\mu_1}{\rho_1} + w_2 \frac{\mu_2}{\rho_2} \quad \text{Equação 3.9}$$

Tendo uma unidade de volume da mistura, o peso dela será  $\rho_m$  e o peso da fase 1  $w_1\rho_m$ . O volume da fase 1 será finalmente  $w_1\rho_m/\rho_1=c_1$ , e analogamente para a fase 2. Portanto é possível reescrever a Equação 3.9 da seguinte forma:

$$\mu_m = c_1\mu_1 + c_2\mu_2 \quad \text{Equação 3.10}$$

Para uma mistura de duas fases:

$$c_1 + c_2 = 1 \rightarrow c_1 = 1 - c_2 \quad \text{Equação 3.11}$$

Portanto,

$$\mu_m = c_1(\mu_1 + \mu_2) + \mu_2 \quad \text{Equação 3.12}$$

Substituindo a Equação 3.12 em Equação 3.8:

$$I_1 = \frac{Kc_1}{c_1(\mu_1 + \mu_2) + \mu_2} \quad \text{Equação 3.13}$$

Porém, considerando-se ao invés da fração volumétrica uma fração mássica, tem-se:

$$c_1 = \frac{w_1 / \rho_1}{w_1 / \rho_1 + w_2 / \rho_2} \quad \text{Equação 3.14}$$

Como  $w_1 + w_2 = 1$  pode-se substituir  $w_2$  por  $1 - w_1$ , obtendo-se:

$$c_1 = \frac{w_1 / \rho_1}{w_1(1 / \rho_1 - 1 / \rho_2) + 1 / \rho_2} \quad \text{Equação 3.15}$$

Assim, substituindo-se a Equação 3.15 na Equação 3.13 tem-se:

$$I_1 = \frac{K(w_1 / \rho_1)}{w_1(\mu_1 / \rho_1 + \mu_2 / \rho_2) + \mu_2 / \rho_2} \quad \text{Equação 3.16}$$

Assim, partindo-se de uma fase 1 pura,  $w_1 = 1$  e o valor de  $I_{1,0}$  fica:

$$I_{1,0} = \frac{K / \rho_1}{\mu_1 / \rho_1} = \frac{K}{\mu_1} \quad \text{Equação 3.17}$$

Portanto a relação de  $I_1$  entre  $I_{1,0}$  será:

$$\frac{I}{I_{1,0}} = \frac{w_1(\mu_1 / \rho_1)}{w_1(\mu_1 / \rho_1 - \mu_2 / \rho_2) + \mu_2 / \rho_2} \quad \text{Equação 3.18}$$

Como  $\mu / \rho = M$ , tem-se:

$$\frac{I}{I_{1,0}} = \frac{w_1 M_1}{w_1(M_1 - M_2) + M_2} \quad \text{Equação 3.19}$$

Esta expressão permite o cálculo quantitativo de uma mistura de duas fases quando se conhece o coeficiente de absorção mássico. Em todo caso, é necessário ter uma fase pura para se medir  $I_1$  e  $I_{1,0}$  em condições idênticas.

É possível observar na Equação 3.19 que em geral a variação do quociente de intensidades  $I_1/I_{1,0}$  não é linear em relação a  $w_1$ , mas sim depende também do coeficiente de absorção que tem a outra fase que está presente na mistura. Esta equação somente se transforma em uma reta quando se trata de uma mistura de fases que apresentam o mesmo coeficiente de absorção, que é o caso do  $\alpha$  e do  $\beta$ -TCP. Assim, a Equação 3.19 fica:

$$\frac{I}{I_{1,0}} = w_1 \quad \text{Equação 3.20}$$

No caso deste estudo, as fases envolvidas seriam o  $\alpha$ -TCP, o  $\beta$ -TCP e a CDHA, ou seja, seriam necessárias algumas outras manipulações matemáticas para se obter esta mesma relação da Equação 3.19 para uma mistura trifásica. Estes cálculos foram feitos por Ginebra e colaboradores (Ginebra, et al., 1997) e a expressão está descrita na Equação 3.21. Esta expressão levou em consideração que os coeficientes de absorção tanto do  $\alpha$  como do  $\beta$ -TCP são idênticos e que o padrão externo é a própria amostra inicial, uma mistura de  $\alpha$ -TCP+ $\beta$ -TCP.

$$\frac{I}{I_{1,initial}} = \frac{w_1 M_1}{w_{1,initial}[(M_1 - M_3)(w_1 + w_2) + M_3]} \quad \text{Equação 3.21}$$

Neste trabalho, a quantidade de  $\beta$ -TCP presente nos pós de partida foi determinada pelo método do padrão interno como descrito no item 3.5.8 e serão utilizados para substituir o valor

$w_2$  nesta equação uma vez que esta fase não participa da cura do cimento e sua quantidade permanecerá constante durante toda a reação.

Para se determinar a fração mássica de  $\alpha$ -TCP durante a reação basta isolar  $w_1$  da Equação 3.21. A taxa de reação,  $R_t$  é dada por:

$$R_t = \frac{(w_{inicial} - w_{\infty}) - (w_t - w_{\infty})}{(w_{inicial} - w_{\infty})} \quad \text{Equação 3.22}$$

Em que “ $w_{inicial}$ ” é a fração mássica de  $\alpha$ -TCP ao início da reação “ $w_t$ ” é a fração mássica de  $\alpha$ -TCP em um dado tempo “ $t$ ” e “ $w_{\infty}$ ” é a fração mássica de  $\alpha$ -TCP para um tempo tão longo que não se percebiam mais mudanças nos picos de difração.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 [alfa]-Fosfato Tricálcico Dopado com Silício

#### 4.1.1 Determinação da Temperatura de Tratamento Térmico, Processamento e Caracterização do Pó

Os reagentes empregados para a síntese do TCP-I apresentaram grande variabilidade de características e propriedades e por isso tornou a reprodutibilidade do processo impossível. As propriedades discutidas neste item são uma média de todos os lotes obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho. Após análise semi-quantitativa de FRX dos reagentes (Tabela 3.2), verificou-se que todos apresentaram grande quantidade de impurezas que influenciam os parâmetros de síntese e as propriedades finais do material como será discutido mais detalhadamente nos itens 4.2 e 4.3.

Com base nas quantidades de  $\beta$ -TCP encontradas em cada temperatura de tratamento térmico, descritas na Tabela 4.1 e nos difratogramas da Figura 4.1, verificou-se que a temperatura para a obtenção do  $\alpha$ -TCP com grau de pureza satisfatório foi 1400°C. Esta temperatura é extremamente elevada para o TCP dopado com silício (Reid, et al., 2006), mas está dentro da faixa de temperatura normalmente empregada para a síntese do  $\alpha$ -TCP puro (Ginebra, et al., 1997).

Tabela 4.1 - Quantidades de  $\beta$ -TCP nas amostras TCP-I em função da temperatura. Valores determinados por DRX utilizando-se o método do padrão interno.

T(°C)	% em massa de $\beta$	
	TCP-I	$\alpha$ -TCP (Ramos, et al., 2008)
1150	100	100
1200	73	100
1250	38	100
1300	29	97
1400	19	78
1500	n.d.	50

n.d. = não determinado

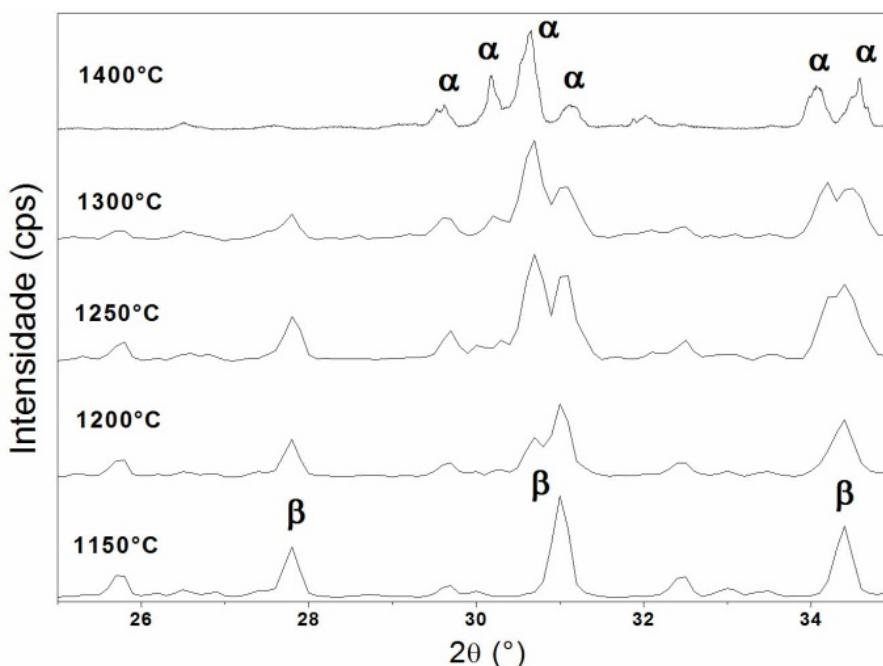
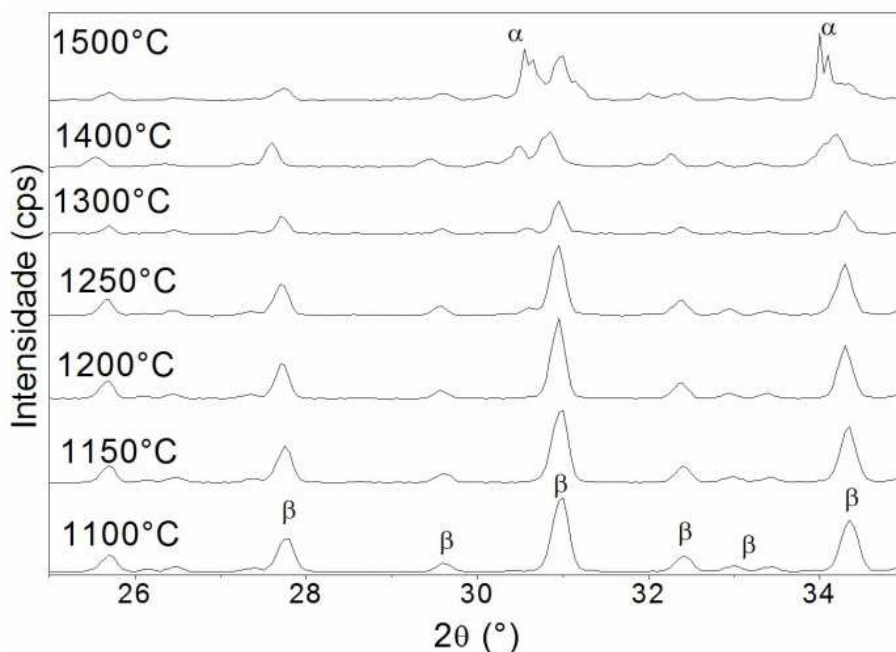


Figura 4.1 - Difratoograma de raios X em várias temperaturas para o TCP-I. Observa-se a transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  conforme se aumenta a temperatura de tratamento térmico. Legenda:  $\alpha$  =  $\alpha$ -TCP e  $\beta$  =  $\beta$ -TCP.

O aumento na temperatura de tratamento térmico do TCP-I era esperado. Pelo diagrama de fases da Figura 3.2 proposto por Carrodegua e colaboradores (2008) é possível observar que para uma porcentagem atômica de magnésio de **aproximadamente** 0,02% (valor calculado a partir da Tabela 3.2) a transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  se inicia entre 1150 e 1200°C e entre 1300 e 1350°C se inicia uma região de estabilidade do  $\alpha$ -TCP puro que se estende até 1500°C.

A ação do silício como estabilizante da fase  $\alpha$  (Pietak, et al., 2007) pode ser evidenciada comparando-se as amostras TCP-I e  $\alpha$ -TCP sem dopagem com silício. Observa-se que para um mesmo protocolo de queima a 1400°C (taxas de aquecimento e resfriamento de 10°C/minuto e 2

horas de patamar) e **aproximadamente** 0,02% atômica de Mg a pureza do  $\alpha$ -TCP não chega a 50% para a amostra não dopada conforme mostra a Figura 4.2. Além disso, verifica-se que para o TCP-I a transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  se inicia a 1200°C. Provavelmente para se conseguir maior pureza para o  $\alpha$ -TCP sem dopagem com silício seria necessário utilizar um tempo de patamar mais elevado para garantir a total transformação  $\beta \rightarrow \alpha$  antes de iniciar o resfriamento da amostra.



**Figura 4.2 – Difratoograma de raios X em várias temperaturas para o  $\alpha$ -TCP obtido com reagentes série RC e sem adição de silício (Ramos, et al., 2008). A transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  inicia-se apenas a 1300°C. Legenda:  $\alpha$  =  $\alpha$ -TCP e  $\beta$  =  $\beta$ -TCP.**

A Figura 4.3 mostra o difratograma de raios X do TCP-I que foi utilizado para o desenvolvimento do cimento ósseo (4.1.2 e 4.1.3) e do “scaffold” (ANEXO B), é possível observar que a amostra é composta majoritariamente de  $\alpha$ -TCP, porém em aproximadamente 27° existe um pico característico do plano cristalográfico (2 1 4) do  $\beta$ -TCP que corresponde a 19% deste material.

Em conjunto com a difração de raios X, a FRX quantitativa mostra que a única fase cristalina presente no TCP-I é o fosfato tricálcico uma vez que a relação  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$  obtida foi igual a 1,49 valor muito próximo ao teórico (1,50). Esta pequena discrepância é devido à presença do magnésio um elemento que pode substituir alguns átomos de Ca na estrutura cristalina do TCP (Enderle, et al., 2005). Considerando a quantidade de magnésio e calculando a



relação  $(Ca+Mg)/(P+Si)$  verifica-se que o novo valor é 1,50. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 4.2.

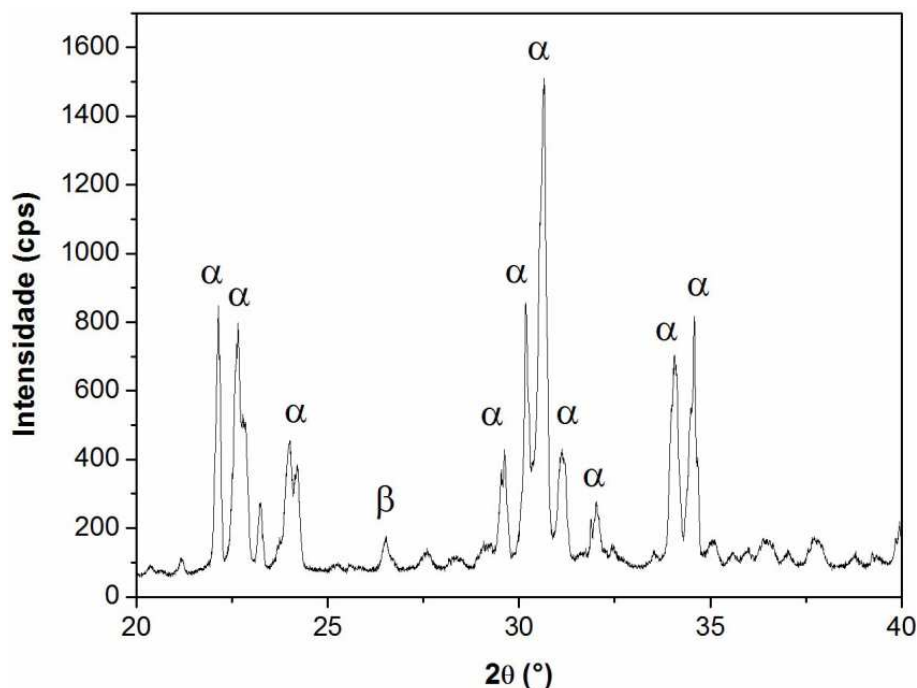


Figura 4.3 - Difratoograma de raios X do fosfato de cálcio obtido após moagem durante 168 horas. Legenda  $\alpha$  =  $\alpha$ -TCP e  $\beta$  =  $\beta$ -TCP.

Tabela 4.2 – Resultado da FRX quantitativa para elementos majoritários. Determinação da relação  $Ca/(P+Si)$  e  $(Ca+Mg)/(P+Si)$ .

Ca (% em massa)	P (% em massa)	Si (% em massa)	Mg (% em massa)	$Ca/(P+Si)$	$(Ca+Mg)/(P+Si)$
38,70	18,68	1,27	0,18	1,49	1,50

Devido à alta temperatura de síntese necessária o TCP-I teve um processo de moagem de difícil realização. O tamanho de partícula médio obtido após uma semana de moagem em moinho de bolas foi de aproximadamente 15,47  $\mu m$ . A faixa de distribuição do tamanho de partícula está entre 0,84 e 39,66  $\mu m$  (Figura 4.4). Um resumo destas propriedades (densidade absoluta e distribuição granulométrica) está descrito na Tabela 4.3.

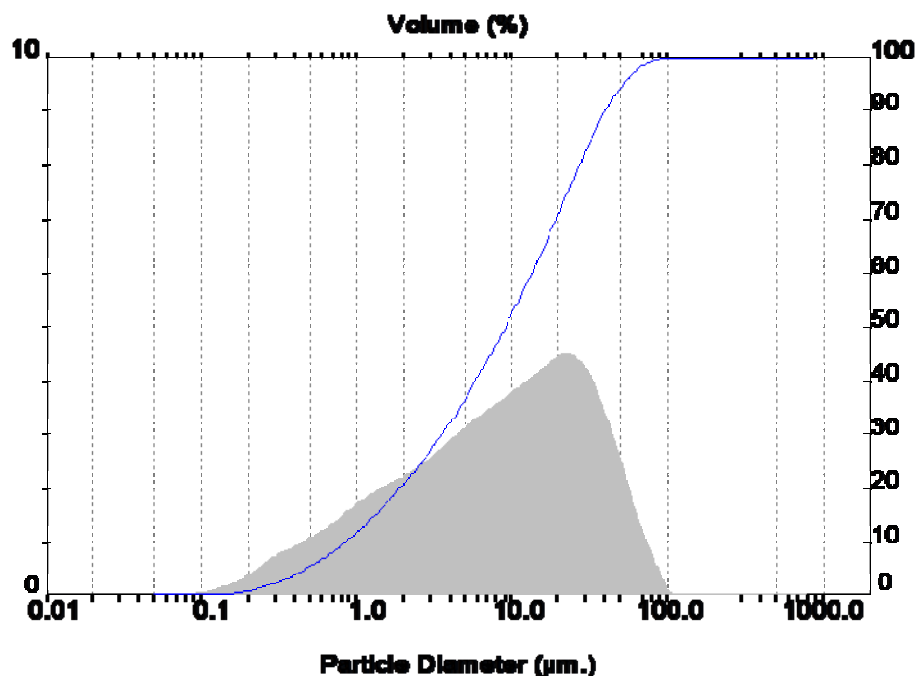
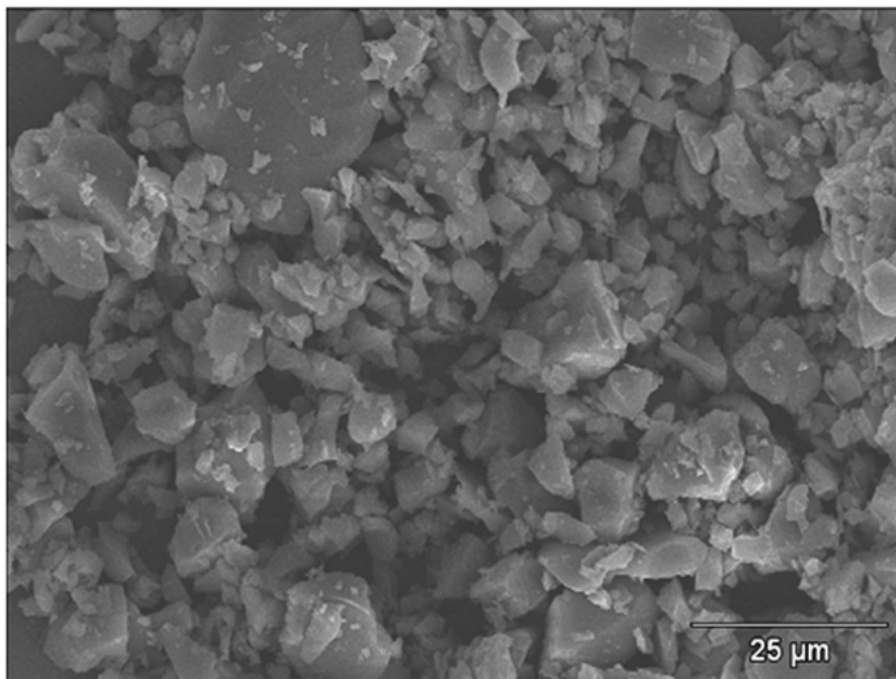


Figura 4.4 - Distribuição granulométrica do TCP-I. Material apresenta distribuição heterogênea e com tamanho de partícula médio igual a 15,47  $\mu\text{m}$ .

Tabela 4.3 – Distribuição granulométrica e densidade absoluta do TCP-I.

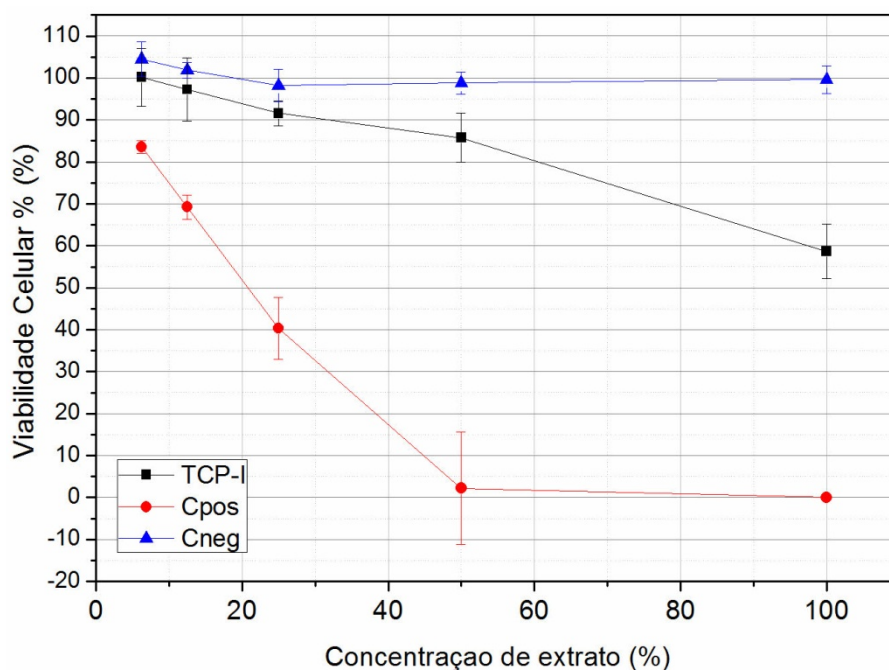
$D_m$ ( $\mu\text{m}$ )	10%<D<90% ( $\mu\text{m}$ )	Densidade Absoluta ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
15,47	0,84-39,66	$2,883 \pm 0,007$

A morfologia das partículas do TCP-I está demonstrada na micrografia da Figura 4.5. Observa-se que a distribuição de tamanhos de partículas está de acordo com o ensaio de granulometria. Verifica-se também que devido ao método e ao longo período de moagem (7 dias) empregados a amostra não está homogênea fato que com certeza influi nas propriedades finais do cimento ósseo.



**Figura 4.5 - Morfologia do TCP-I após 7 dias de moagem. Distribuição granulométrica não homogênea, resultado da elevada temperatura de tratamento térmico e processo de moagem empregado.**

Finalmente, após o ensaio de citotoxicidade indireta, o TCP-I apresentou citotoxicidade moderada uma vez que a viabilidade celular após o 48 horas de contato das células com o extrato foi igual a  $68,675 \pm 6,56 \%$ . Apesar da amostra não ter apresentado o índice IC50% (concentração de extrato que mata 50% da população de células), não é possível afirmar que após este ensaio o material é não citotóxico uma vez que para isto a viabilidade celular deveria ser maior que 80%. Verifica-se que conforme a concentração do extrato diminui, a viabilidade celular aumenta, como mostra o gráfico da Figura 4.6. É importante ressaltar que este ensaio não pode ser considerado taxativo uma vez que a baixa viabilidade celular é decorrente da liberação de íons que provavelmente ocorre devido à dissolução do  $\alpha$ -TCP durante o tempo de incubação em meio de cultivo. Este processo eleva o pH do meio (discussão mais adiante, item 4.4.3) resultando na morte celular. Porém, este material quando “in vivo” terá este efeito amenizado uma vez que existe uma constante circulação de fluidos e a mudança de pH não será tão pronunciada.



**Figura 4.6 - Citotoxicidade indireta do pó de TCP-I. Material apresenta citotoxicidade em níveis consideráveis, mas que é resultado da alteração de pH decorrente da dissolução do  $\alpha$ -TCP em meios aquosos.**

#### 4.1.2 Desenvolvimento e Caracterização do Cimento Ósseo

Devido à heterogeneidade da distribuição granulométrica e do elevado tamanho de partícula, a preparação do cimento ósseo apenas foi possível com uma relação líquido/pó extremamente alta, 0,60 mL/g, bem acima da encontrada para o  $\alpha$ -TCP convencional, 0,32 mL/g (Sarda, et al., 2002; Ginebra, et al., 1997). Como consequência, o tempo de cura inicial e final determinado pelo método das agulhas de Gilmore (ASTM-C266-04) também foi maior que o reportado na literatura (Ginebra, et al., 1997). Os valores encontrados foram de aproximadamente 10 minutos para o tempo de cura inicial e aproximadamente 45 minutos para o tempo de cura final.

Um fator que pode ter contribuído para a baixa velocidade da reação de cura (elevados tempos de cura) é a adição de ácido cítrico na fase líquida do cimento. A principal função do ácido cítrico é envolver as partículas de  $\alpha$ -TCP dando-lhes cargas altamente negativas, gerando repulsão e criando uma defloculação. Consequentemente, a molhabilidade das partículas e a fluidez da pasta do cimento são aumentadas. Por causa de todo esse processo, o ácido cítrico

interfere na cinética da reação de cura, retardando a formação de *apatita* (Sarda, et al., 2002). A adição deste componente se fez necessária para tentar reduzir a elevada quantidade de líquido necessária para se obter uma pasta de cimento com fluidez suficiente para permitir a moldagem dos corpos de prova do cimento. Sem a adição do ácido cítrico era necessária uma relação líquido/pó de 2,0 mL/g.

Era de se esperar que quantidades de ácido cítrico até 1,5% em massa fossem suficientes para aumentar a molhabilidade do pó e aumentar a resistência mecânica do cimento, apesar de ocorrer uma redução de sua taxa de reação. A melhora da resistência mecânica está associada ao fato que a precipitação da *apatita* ocorreria de maneira mais homogênea devido ao processo descrito acima, porém tal fato ainda não foi comprovado quantitativa e estatisticamente (Sarda, et al., 2002).

No entanto, devido à presença do silício, as relações de solubilidade e saturação no sistema do cimento ósseo provavelmente foram alteradas e a adição de ácido cítrico pode ter levado, em um primeiro momento, a precipitação de complexos de citrato de cálcio, possivelmente  $\text{Ca}_3(\text{citrato})_2$  (Misra, 1996). Este processo compete com a transformação do  $\alpha$ -TCP em *apatita*, retardando ainda mais a reação e reduzindo a sua resistência mecânica (Dai, et al., 2001).

A evolução da reação de cura do cimento pode ser evidenciada pelas difrações de raios X (Figura 4.7) após cada tempo de imersão em FCS. Verifica-se que após o preparo e o endurecimento do cimento (24 horas em ambiente com 100% de umidade relativa), a reação não é completa. A conversão total do TCP-I para *apatita* não pode ser observada nem mesmo após sete dias de imersão. Além do acompanhamento da cura do cimento é possível verificar nos difratogramas o evidenciamento dos picos de  $\beta$ -TCP correspondentes a 19% em massa desta fase e que antes estavam sobrepostos aos de  $\alpha$ -TCP.

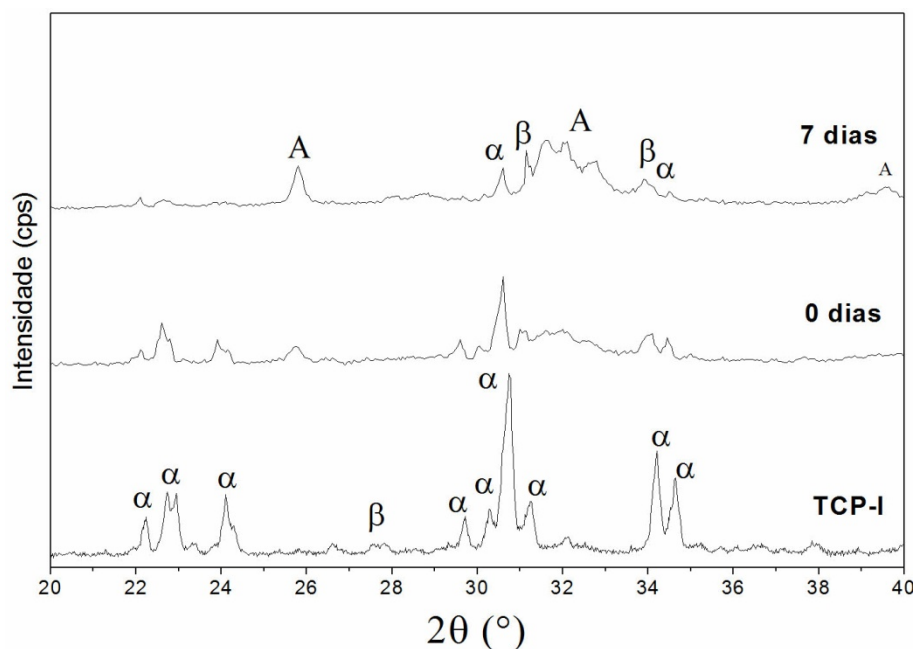


Figura 4.7 - Evolução da reação de cura do cimento c-TCP-I após vários tempos de imersão em FCS.  $\alpha$  =  $\alpha$ -TCP;  $\beta$  =  $\beta$ -TCP e A = *apatita*. Ocorre a transformação  $\alpha$ -TCP  $\rightarrow$  *apatita* com o tempo de imersão. A reação de cura não é completa após 7 dias.

A reação de cura deste cimento se dá por meio da dissolução das partículas de  $\alpha$ -TCP e da precipitação de agulhas de *apatita* uma vez que estas são as únicas fases cristalinas presentes durante todo o processo. A microestrutura do cimento ósseo antes e após a imersão em FCS é mostrada nas micrografias da Figura 4.9. Tanto o ácido cítrico como o silício podem ter interferido na evolução da morfologia da *apatita* formada (Cristóbal-González, 2006; Sarda, et al., 2002).

No início da reação de cura a dissolução do TCP e a precipitação dos cristais de *apatita* se inicia na superfície das partículas de TCP, conforme mostram as setas brancas da Figura 4.9 a. Conforme a reação de pega evolui, a quantidade das agulhas de *apatita* formadas bem como o seu entrelaçamento aumentam o que explica a evolução da resistência mecânica (Tabela 4.4) após sete dias de imersão em FCS. Apesar do relativo aumento de resistência mecânica, os valores obtidos são muito baixos quando comparados aos valores reportados na literatura para o  $\alpha$ -TCP convencional e dopado com silício (Ginebra, et al., 1997; dos Santos, 2002; Camiré, et al., 2006).

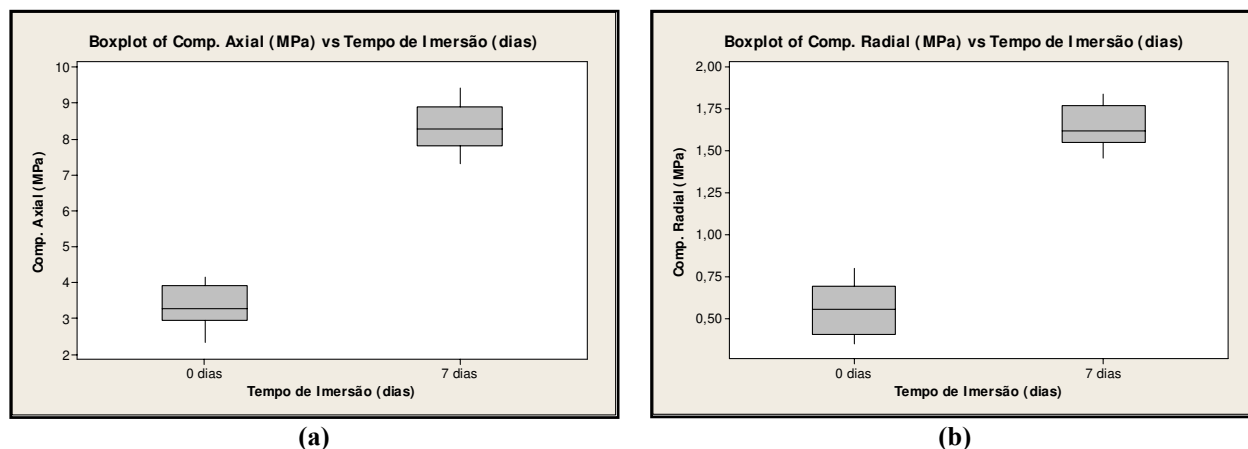
De fato, Camiré e colaboradores (2006) verificaram que a dopagem com silício em níveis até 1% molar reduz em aproximadamente 25% a resistência mecânica do cimento. Esta redução pode chegar a 80% se a substituição ocorrer em níveis maiores que 5% molar. No TCP-I foi

determinado 1,27% em massa de silício (4% molar) e os baixos valores de resistência mecânica obtidos para o c-TCP-I podem também ser justificados pelos seguintes fatos além da presença do silício: (i) o elevado tamanho de partícula e a heterogeneidade da distribuição granulométrica; e (ii) a elevada relação líquido-pó empregada.

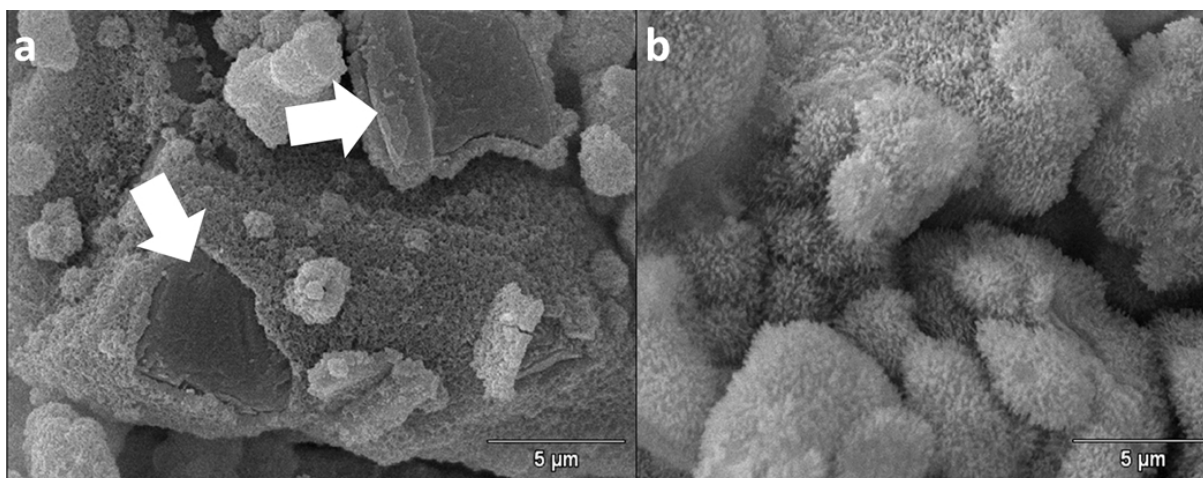
**Tabela 4.4 - Resultados do ensaio mecânico para o cimento c-TCP-I. A resistência à compressão axial e diametral aumentam com o tempo de imersão em FCS, no entanto, devido ao elevado tamanho de partícula e à elevada relação líquido-pó utilizada os valores obtidos foram baixos.**

Tempo (dias)	Compressão Axial (Mpa)	Compressão Radial (Mpa)
0	3,360 ±0,585	0,556±0,162
7	8,321± 0,672	1,645±0,132

A imersão em FCS fez com que a resistência mecânica à compressão axial e radial do c-TCP-I aumentasse. Isto pode ser evidenciado nos diagramas “boxplot” da Figura 4.8 e pelo teste estatístico “2-sample-t” o qual mostrou valor  $p = 0,000$ , comprovando que as amostras analisadas são estatisticamente diferentes com 95% de confiança. Resumindo, os baixos valores da resistência mecânica podem ser atribuídos à adição de silício, ao elevado tamanho de partícula, à distribuição granulométrica bem heterogênea e à elevada relação líquido/pó empregada.



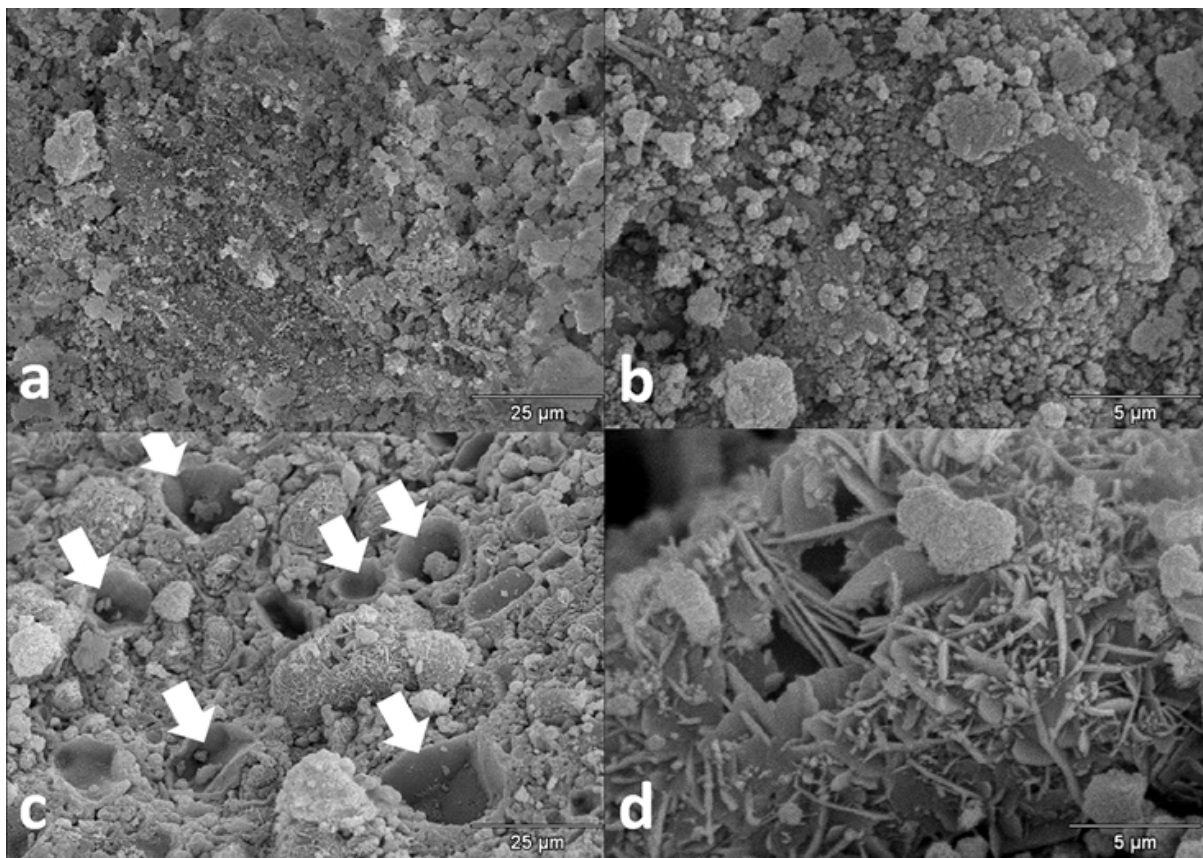
**Figura 4.8 – Resistência à compressão do c-TCP-I antes e após sete dias de imersão em FCS: (a) axial e (b) radial). Amostras de 0 e 7 dias apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com nível de confiança de 95%.**



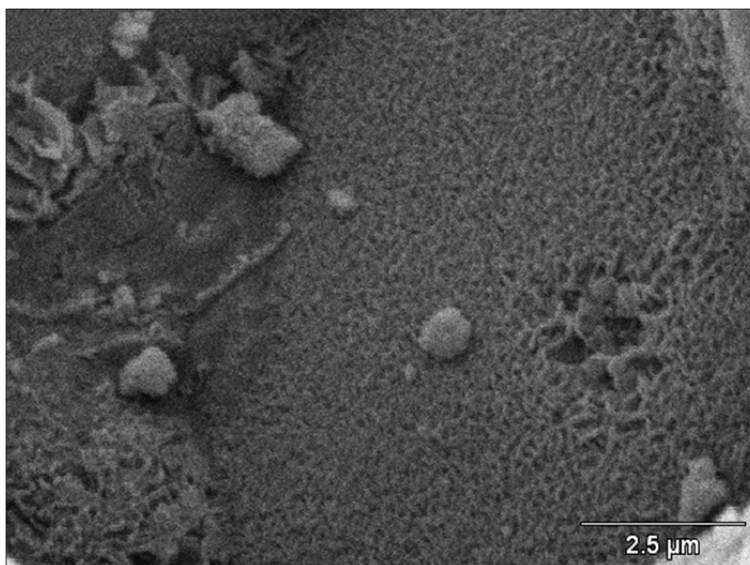
**Figura 4.9 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície de fratura do cimento ósseo: (a) sem imersão em FCS e (b) após 7 dias de imersão em FCS. Observa-se que a reação de cura do cimento ósseo ocorre na superfície da partícula de  $\alpha$ -TCP. As setas brancas indicam superfície da partícula de  $\alpha$ -TCP que teve parte da camada de apatita arrancada devido à fratura do cimento durante ensaio de resistência à compressão.**

A morfologia da *apatita* formada após a pega do cimento (Figura 4.9 b) é muito semelhante à da *apatita* biológica, com formas mais arredondadas e cristais menores o que traz uma grande vantagem a este cimento. A partir da análise da superfície do cimento após sete dias de imersão em FCS, pode-se perceber que ocorreu a precipitação de uma camada de *apatita* em toda a superfície do cimento (Figura 4.10) mostrando um indício de sua biocompatibilidade (Kokubo, et al., 2006). Os buracos (setas brancas) que apareceram na superfície do cimento (Figura 4.10 c) podem ter sido formados pela dissolução de partículas de  $\alpha$ -TCP que ainda não haviam se transformado em *apatita* após 168 horas de imersão em água destilada. Verifica-se que a superfície destes buracos também está recoberta por uma camada de *apatita* como mostra a Figura 4.11.



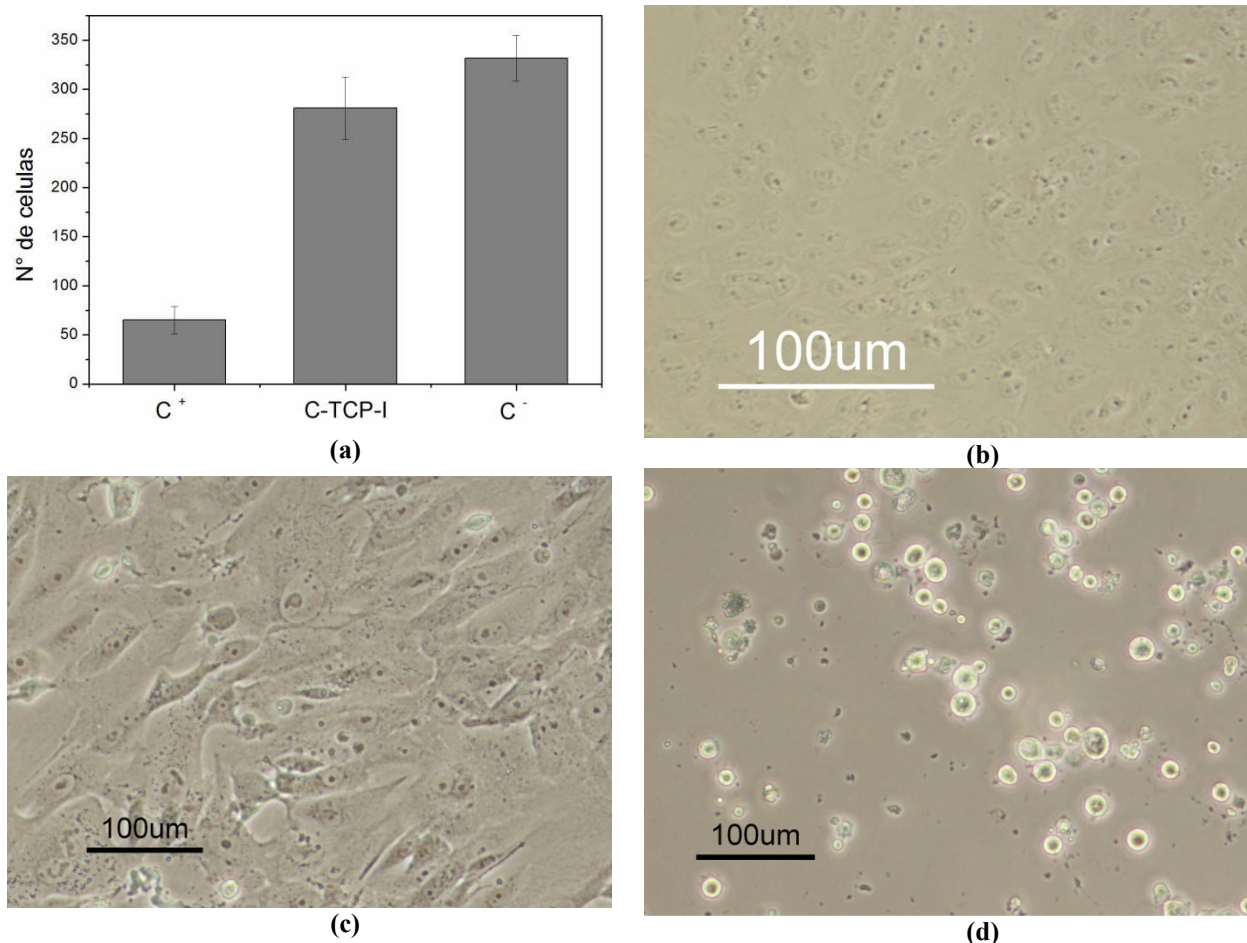


**Figura 4.10 – Micrografias eletrônica de varredura da avaliação de bioatividade *in vitro* do cimento c-TCP-I: (a) e (b) 0 dias, (c) e (d) 7 dias. Ocorre a precipitação de uma capa de apatita na superfície do cimento ósseo. As setas brancas indicam buracos que foram formados pela continuação da reação de cura durante a avaliação de bioatividade em FCS.**



**Figura 4.11 - Detalhe da superfície de um buraco formado na superfície do cimento c-TCP-I da Figura 4.10 c. Ocorreu a precipitação da camada de apatita na superfície destes buracos.**

Após ensaio de citotoxicidade indireto verificou-se que o cimento produz uma leve resposta citotóxica uma vez que o número de células viáveis é menor que o apresentado pelo controle negativo (Figura 4.12) sugerindo um possível efeito citotóxico do extrato. Mesmo assim este não é muito pronunciado e pode ser considerado como resultado da liberação de íons decorrente da continuação da reação de cura do cimento (dissolução do  $\alpha$ -TCP e precipitação de *apatita*) durante a preparação dos extratos. Esta liberação de íons induz uma alteração no pH do meio influenciando na viabilidade celular.



**Figura 4.12 - Citotoxicidade indireta do c-TCP-I. (a) número de células; (c) c-TCP-I; (b) controle negativo; e (d) controle positivo. O cimento ósseo apresentou citotoxicidade leve, no entanto, a morfologia das células mostram que o extrato não apresenta as condições necessárias para a fixação e o crescimento celular.**

Como já discutido anteriormente, é provável que este material quando implantado não provoque efeitos adversos, pois “in vivo” ocorre a constante circulação de fluídos e, conseqüentemente, uma possível alteração no pH do meio seria amenizada. No entanto, é interessante observar que a morfologia das células que estiveram em contato com o extrato do

cimento c-TCP-I (Figura 4.12 b) é ligeiramente diferente da apresentada pelo controle negativo (Figura 4.12 c). Percebe-se que além de um número menor de células, elas apresentam formas mais arredondadas indicando que não estão totalmente aderidas ao substrato. Ou seja, o meio não está fornecendo condições favoráveis para a manutenção celular.

#### 4.1.3 Ensaio *In Vivo* do Cimento

Após sete dias (Figura 4.13), o grupo que teve o cimento implantado já iniciou a degradação do material (C) no interior do tecido conjuntivo apresentando discreta resposta inflamatória com predomínio de neutrófilos e alguns macrófagos. Verificou-se também a presença de tecido ósseo (O), fibroblastos e fibras colágenas. Já no grupo controle verificou-se a presença de um tecido ósseo rico em osteócitos e vasos sanguíneos (v) sem a presença de resposta inflamatória. Em ambos os grupos verificou-se um tecido fibroso recobrindo o defeito ósseo sendo que a sua espessura é menor para o grupo com o material implantado.

Após 15 dias o material continua se degradando e já é possível observar uma profusa formação óssea em contato com o material e algumas células inflamatórias ainda estão presentes. Próximo ao material verificou-se também a presença de vasos sanguíneos e tecido osteóide. No interior e na periferia óssea observou-se a presença de osteócitos, osteoblastos fibroblastos e fibras colágenas. Neste momento, o tecido fibroso recobre parcialmente o defeito crítico. Já para o grupo de controle, ocorreu uma intensa formação óssea sem a presença de resposta inflamatória. No entanto, um denso tecido fibroso recobriu o defeito crítico em ambas as extremidades.

Nos períodos de 30 e 60 dias (Figura 4.15) observa-se a continua degradação do material, a presença de algumas células inflamatórias (macrófagos, linfócitos e células gigantes) e uma formação óssea cada vez mais intensa. A presença do tecido fibroso é observada, porém com espessura menor que para o grupo controle que também apresenta um processo de formação óssea na periferia do defeito crítico.

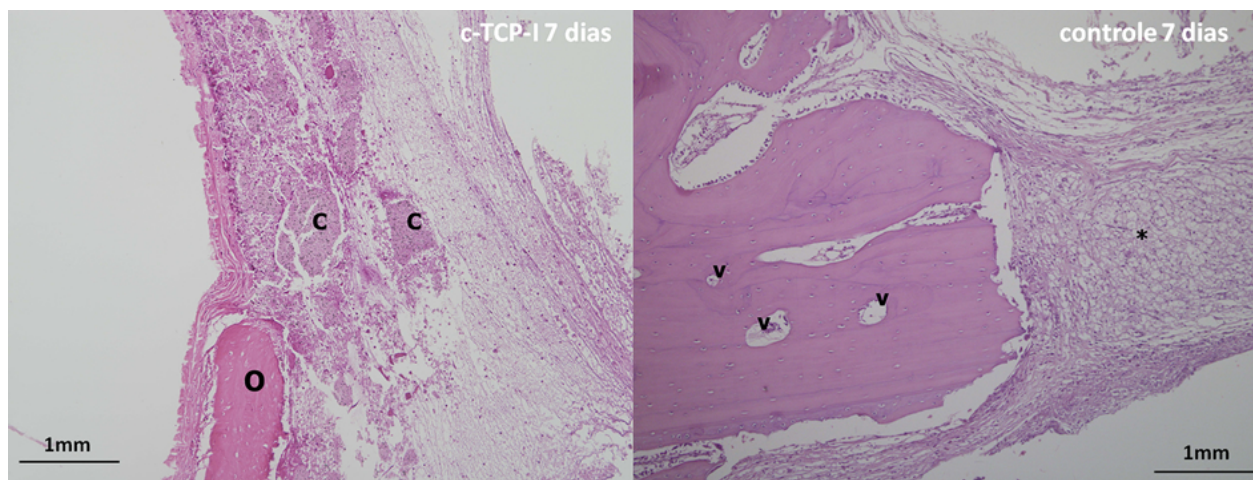
Após 120 dias (Figura 4.16) verifica-se que o material está quase todo degradado e a formação óssea é ainda mais intensa com a presença bem definida de tecido ósseo neoformado apesar de ainda existir uma fina camada de tecido fibroso. No grupo controle o defeito crítico está

quase todo fechado, no entanto, existe um espesso tecido conjuntivo fibroso envolvendo a periferia da calota craniana.

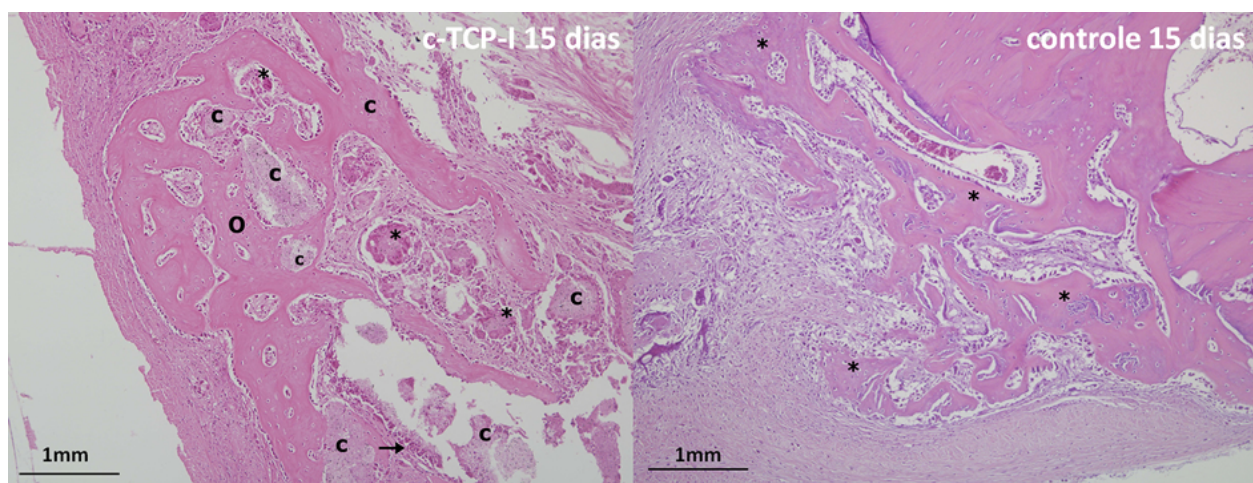
Com base nas observações descritas acima o cimento ósseo c-TCP-I apresentou uma resposta inflamatória considerada insignificante (ou discreta) durante o ensaio “in vivo”. Apesar do controle utilizado (defeito ósseo vazio) não ter desenvolvido nenhuma resposta inflamatória, para o tempo de 120 dias o cimento manteve o espaço favorável para neoformação óssea. Pelos resultados obtidos o material é considerado biocompatível apesar de ter apresentado uma taxa de reabsorção lenta.

A resposta inflamatória encontrada pode ser efeito da baixa reatividade do material decorrente do elevado teor de silício adicionado, ou seja, como a pasta do cimento foi implantada diretamente, toda a liberação de íons e mudanças de pH (discutidos no item 4.4.3) ocorreram dentro do próprio organismo. Além disso, a baixa velocidade de transformação  $\alpha$ -TCP  $\rightarrow$  *apatita* é responsável também pela lenta reabsorção do material.



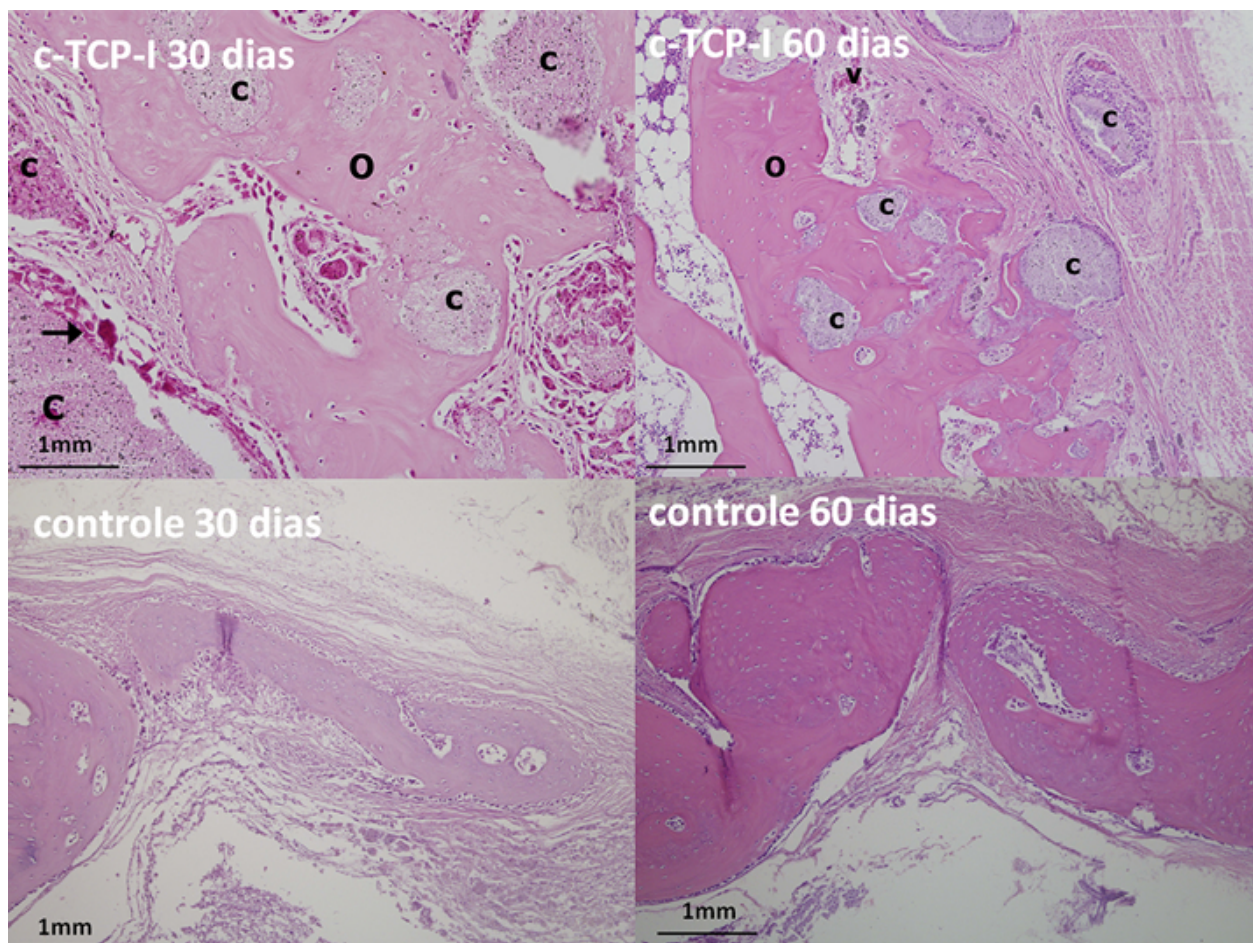


**Figura 4.13 - Ensaio "in vivo" do c-TCP-I: períodos de 7 dias. Legenda: C = material sendo degradado; O = tecido ósseo sendo formado; v = vasos sanguíneos; e \* = tecido fibroso.**

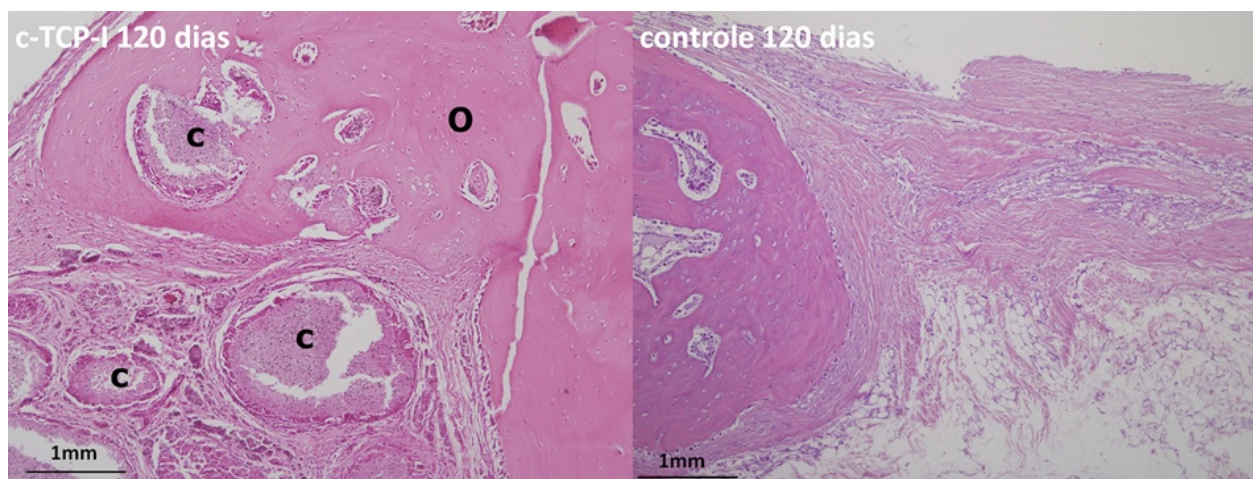


**Figura 4.14 – - Ensaio "in vivo" do c-TCP-I: períodos de 15 dias. Legenda: C – material implantado, O – tecido ósseo da calota englobando o defeito e o material, \* - tecido osteóide e → células inflamatórias**





**Figura 4.15 - Ensaio "in vivo" do c-TCP-I: períodos de 30 e 60 dias. Legenda: C = material sendo degradado; O = tecido ósseo sendo formado; e → = células inflamatórias.**



**Figura 4.16 - Ensaio "in vivo" do c-TCP-I: período de 120 dias. Legenda: O = tecido ósseo neoformado; v = vasos sanguíneos; \* = tecido fibroso e C = material sendo degradado.**

## 4.2 Reagentes Livres de Magnésio I: Síntese e Caracterização

Todos os reagentes sintetizados em laboratório e os reagentes comerciais utilizados para a obtenção do TCP-I (item 4.1), com exceção do W-RC, são compostos majoritariamente das fases cristalinas de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{CaSiO}_3$  assim como pode ser observado nos difratogramas de raios X das Figura 4.17 a Figura 4.19. O W-RC é, composto de  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  e não  $\text{CaSiO}_3$  como se esperava pela estequiometria presente no laudo da empresa fornecedora.

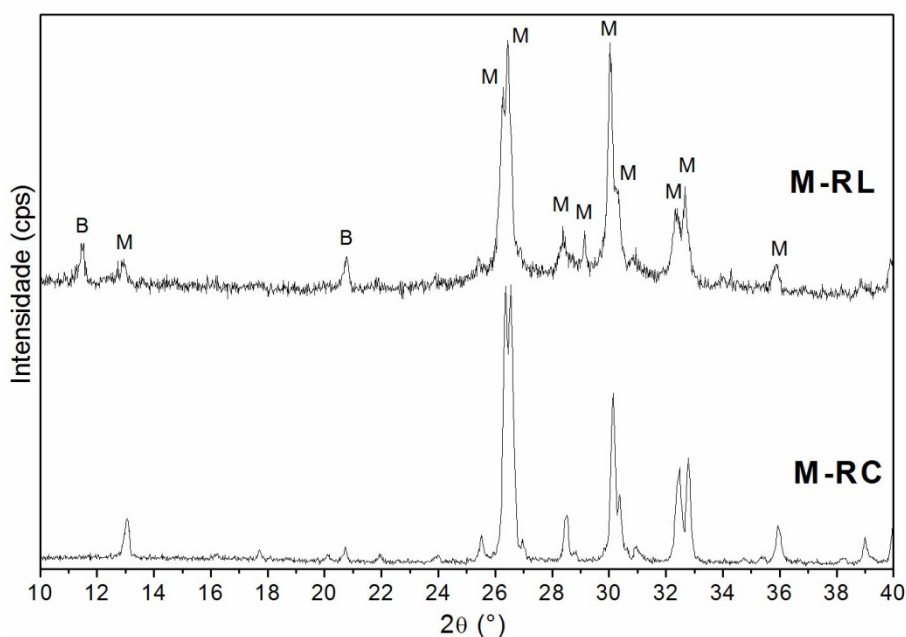


Figura 4.17 - Difratograma de raios-X do  $\text{CaHPO}_4$  comercial e obtido em laboratório. M-RL apresenta alguns picos referentes à brushita. Legenda: M = monetita ( $\text{CaHPO}_4$ ) e B = brushita ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

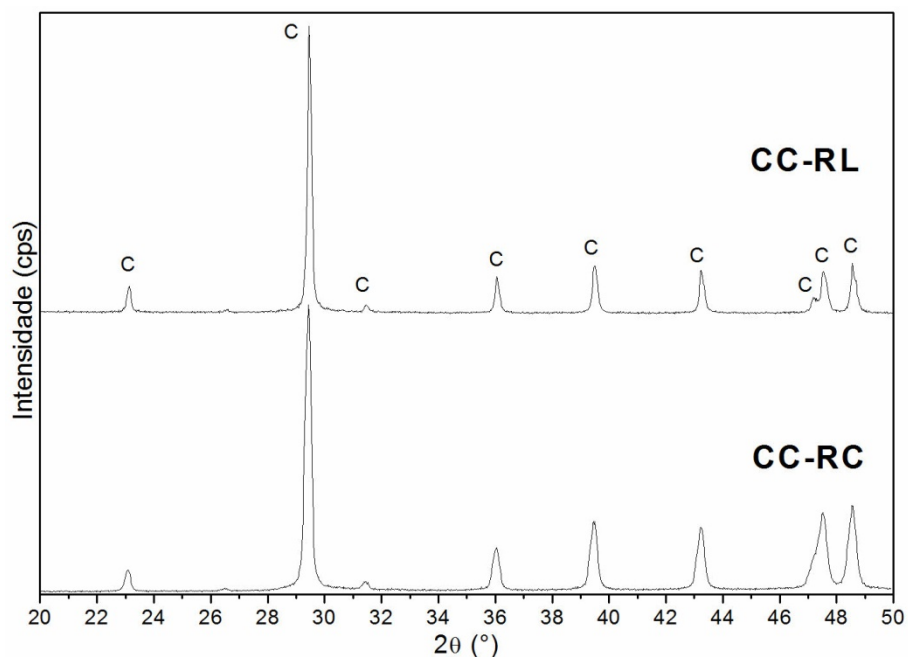


Figura 4.18 - Difratoograma de raios-X do  $\text{CaCO}_3$  comercial e obtido em laboratório. O CC-RL apresenta todos os picos referentes à calcita (JCPDS 05-0586). Legenda: C =  $\text{CaCO}_3$ .

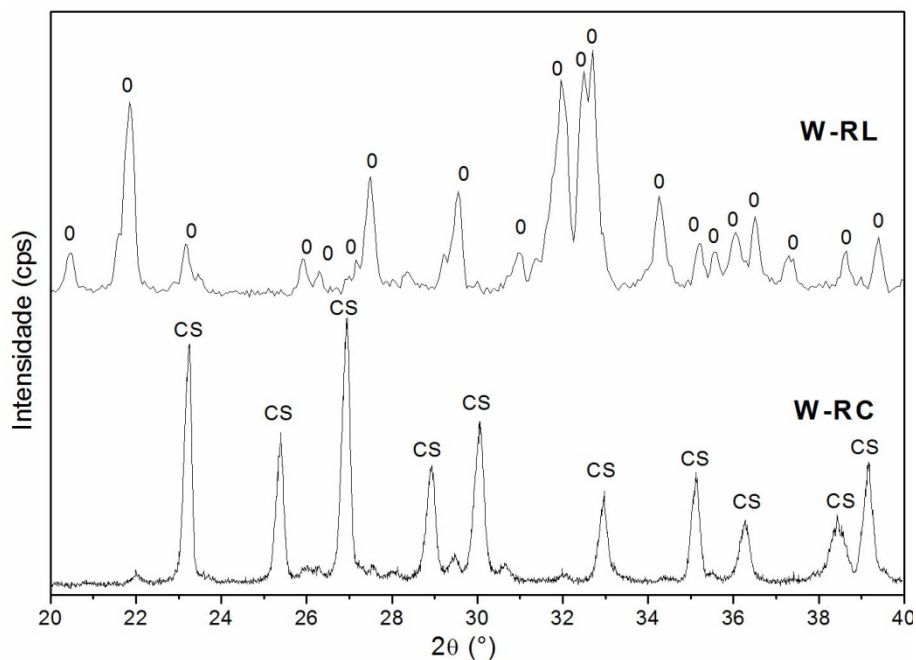


Figura 4.19 - Difratoograma de raios-X do  $\text{CaSiO}_3$  comercial e obtido em laboratório. Legenda: O =  $\text{CaSiO}_3$  e CS =  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ .

Além disso, todos os reagentes comerciais apresentam uma significativa quantidade de impurezas em comparação com os reagentes sintetizados em laboratório, de acordo com os



resultados da análise semi-quantitativa de fluorescência de raios X que foram apresentados nas Tabela 3.2 e Tabela 3.3 e estão resumidos na Tabela 4.5. Verifica-se que a pureza dos reagentes sintetizados em laboratório está por volta de 99,9% enquanto que para os reagentes comerciais este valor cai para 99,2%.

**Tabela 4.5 –FRX semi-quantitativa dos elementos minoritários dos reagentes. Valores em % mássica.**

Elemento	CC-RC	CC-RL	M-RC	M-RL	W-RC	W-RL
<b>Pureza</b>	99,37	99,86	99,37	99,96	99,18	99,89
<b>Al</b>	0,0094	a.l.d.	0,0117	a.l.d.	0,0254	0,0149
<b>Cl</b>	0,1015	a.l.d.	a.l.d.	a.l.d.	0,0090	0,0159
<b>Fe</b>	0,0318	0,0035	0,0178	0,0041	0,5278	0,0067
<b>K</b>	0,0151	a.l.d.	a.l.d.	a.l.d.	0,0027	0,0016
<b>Mg</b>	0,1407	0,0220	0,5173	a.l.d.	0,0459	a.l.d.
<b>Mn</b>	0,0054	a.l.d.	0,0102	a.l.d.	0,1579	a.l.d.
<b>Na</b>	0,0060	0,0952	0,0423	0,0143	0,0162	0,0124
<b>Ni</b>	a.l.d.	0,0022	0,0032	a.l.d.	0,0034	a.l.d.
<b>P</b>	0,0496	0,0013	n.m.	n.m.	0,0171	0,0444
<b>S</b>	0,0120	0,0076	0,0098	0,0087	0,0090	a.l.d.
<b>Si</b>	0,0412	0,0015	0,0050	a.l.d.	n.m.	n.m.

a.l.d. = abaixo do limite de detecção do equipamento.

n.m. = não é elemento minoritário.

Dentre as impurezas presentes o elemento que mais influencia na obtenção do  $\alpha$ -TCP puro é o magnésio um conhecido agente estabilizante da fase de baixa temperatura do TCP, a fase  $\beta$  (Enderle, et al., 2005; Reid, et al., 2007; Marchi, et al., 2007; Motisuke, et al., 2008; Carrodegua, et al., 2008; Ramos, et al., 2008). Este elemento é capaz de elevar a temperatura de transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  para valores tão altos quanto 1400°C. Observa-se que dentre os reagentes obtidos em laboratório o CC-RL é o único que apresenta este elemento (0,0188 % em massa, 0,001 % atômica), porém em níveis menores que o relatado como limite (250 ppm) para interferir significativamente na temperatura de transição  $\beta \rightarrow \alpha$  (Enderle, et al., 2005).

Um fato muito interessante de se observar é que muitos pesquisadores constataram que durante a calcinação do  $\alpha$ -TCP, após o tempo de patamar, independente da temperatura, é necessário a realização de um choque térmico (“quenching”) para tornar a fase  $\alpha$  estável à temperatura ambiente. A justificativa atribuída é que a transformação  $\beta \rightarrow \alpha$  seria um processo reversível e tomaria lugar durante um resfriamento mais lento resultando em uma mistura  $\beta + \alpha$  a temperatura ambiente.

Porém, é sabido que esta transformação é um processo reconstutivo e necessita de uma quantidade considerável de energia e tempo que não são fornecidos quando o material é deixado esfriar lentamente no forno (Enderle, et al., 2005). A partir dos resultados obtidos neste trabalho e em outros publicados recentemente, conclui-se que para se obter  $\alpha$ -TCP puro é necessário em primeiro lugar determinar as impurezas presentes nos precursores, principalmente o Mg, e a partir daí determinar uma temperatura e um tempo de tratamento ideais para garantir a total transformação  $\beta \rightarrow \alpha$  sem a necessidade de choque térmico (Carrodegua, et al., 2008; Ramos, et al., 2008).

Além do Mg existem outros elementos químicos que também são considerados como favorecedores da estabilização do  $\beta$ -TCP, porém ainda não existem estudos suficientes para tal comprovação. Em um dos trabalhos disponíveis na literatura, Matsumoto e colaboradores (2009) verificaram que concentrações elevadas de sódio (1,15% em massa), de lítio (0,35% em massa) e de potássio (1,95% em massa) podem aumentar a estabilidade térmica do  $\beta$ -TCP até 1250~1300°C. Estes elementos estão presentes na maioria dos reagentes disponíveis no mercado.

#### **4.3 Reagentes Livres de Magnésio II: $\alpha$ -TCP Dopado e Não Dopado com Silício**

##### **4.3.1 Determinação da Temperatura de Tratamento Térmico**

Baseado nos resultados de DRX apresentados nas Figura 4.20 e Figura 4.21 comprova-se novamente que tanto o magnésio como o silício interferem na temperatura de transição  $\beta \rightarrow \alpha$  conforme reportado na literatura (Enderle, et al., 2005; Pietak, et al., 2007).

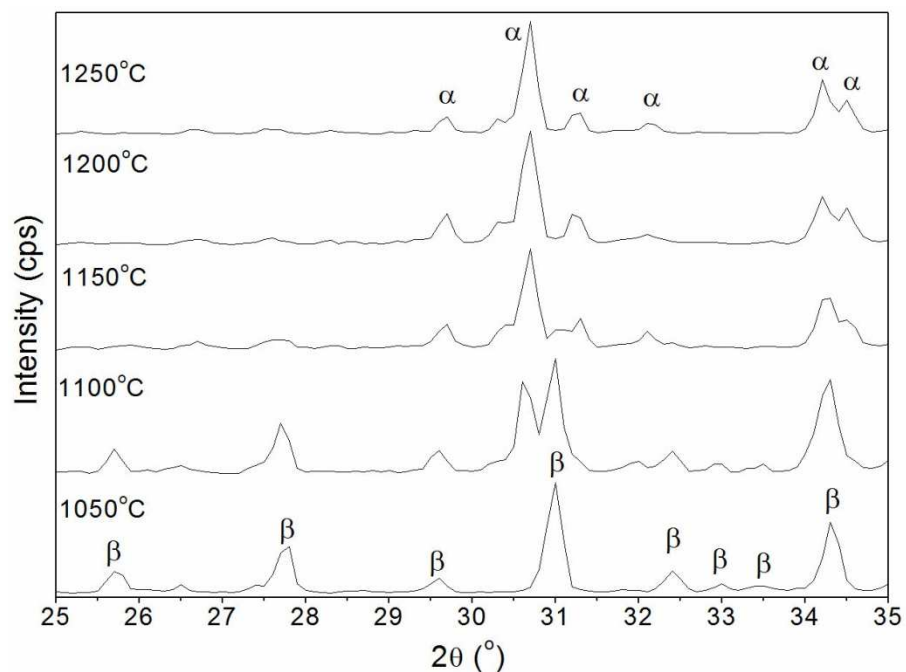


Figura 4.20 - Difratoograma de raios X da formação dos TCP-II em função da temperatura.

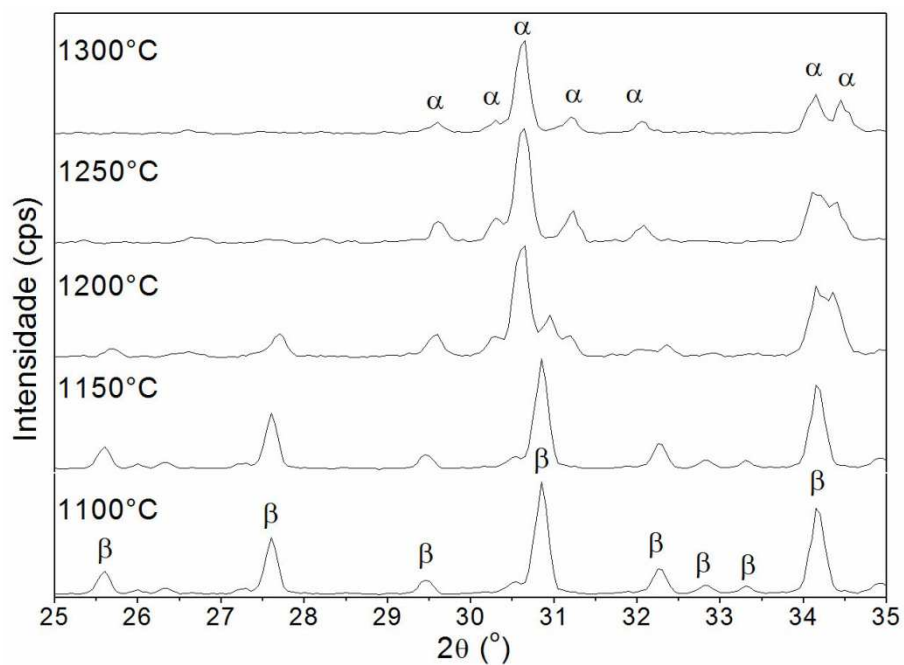


Figura 4.21 - Difratoograma de raios X da formação do TCP-III em função da temperatura.

Nas amostras TCP-II e TCP-III é possível verificar que para uma mesma quantidade de Mg (entre 0,0056 e 0,0059% em massa, calculadas a partir da Tabela 4.5) a amostra dopada com Si já forma a fase  $\alpha$ -TCP a 1200°C, porém para a amostra que não tem silício, esta temperatura sobe

para 1300°C. Com base nas quantidades de  $\beta$ -TCP calculadas (Tabela 4.6) determinou-se que as temperaturas ideais de sinterização para as amostras TCP-II e TCP-III são, respectivamente, 1200 e 1300°C, sendo que as quantidades de fase  $\beta$  presentes em cada amostra é 4% em massa para o TCP-II e 8% em massa para o TCP-III.

**Tabela 4.6 - Quantidades de  $\beta$ -TCP nas amostras TCP-II e TCP-III em função da temperatura.**

T(°C)	% em massa de $\beta$	
	TCP-II	TCP-III
1050	100	n.d.
1100	n.q.	100
1150	12	100
1200	4	29
1250	5	14
1300	n.d.	8

n.d. = não determinado

n.q. = não quantificado

Um fato interessante de se observar é que nos reagentes obtidos em laboratório (série RL), existe uma quantidade considerável de sódio. Apesar de estas quantidades estarem abaixo do limite proposto por Matsumoto e colaboradores (2009), é possível que na hipótese de se utilizar reagentes livres deste elemento poder-se-ia obter uma temperatura mais baixa para a obtenção do  $\alpha$ -TCP puro.

Pela análise do diagrama de fases do sistema  $\text{Ca}_3\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_4\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  da Figura 3.3 verifica-se que sem a adição de silício e dependendo da concentração de Mg presente a temperatura de transição  $\beta \rightarrow \alpha$  é consideravelmente aumentada e a obtenção da fase  $\alpha$  em temperaturas tão altas quanto 1500°C não seria completa (Enderle, et al., 2005; Carrodegua, et al., 2008; Motisuke, et al., 2008). Por isso que para a amostra TCP-I foi necessária uma temperatura de calcinação mais elevada, 1400°C e mesmo assim a quantidade de  $\beta$ -TCP resultante foi relativamente maior, 19%.

É importante ressaltar que para a síntese do  $\alpha$ -TCP com um elevado grau de pureza e propriedades (tamanho de partícula e reatividade) satisfatórias para sua aplicação como cimento ósseo a utilização de reagentes com estequiometria acurada e com presença e quantidades de impurezas controladas passa a ser um fator determinante devido aos seguintes fatores:

1) Impurezas que são favorecedoras da estabilização da fase  $\beta$ :

- a. **Elevam** a temperatura de transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  resultando na necessidade de uma maior temperatura de sinterização;
- b. Resultam em tamanhos de partículas **maiores** e, conseqüentemente, necessitarão de um protocolo de moagem mais longo podendo aumentar as contaminações advindas deste processo;
- c. **Reduzem** a solubilidade do material devido a uma **maior** quantidade de  $\beta$ -TCP (fase menos solúvel) após a síntese; e
- d. **Diminuem** a reatividade final do material: **maior** temperatura de tratamento, **menor** reatividade.

2) Impurezas que são favorecedoras da estabilização da fase  $\alpha$ :

- a. **Abaixam** a temperatura de transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  resultando na possibilidade de se utilizar uma temperatura de tratamento térmico menor;
- b. Resultam em tamanhos de partículas **menores** reduzindo o tempo de moagem e evitando maiores contaminações;
- c. **Aumentam** a solubilidade do material devido a uma **menor** quantidade de  $\beta$ -TCP após o tratamento térmico; e
- d. **Aumentam** a reatividade do material: **menor** temperatura, **maior** reatividade.

As impurezas que mais influenciam o processo de obtenção do  $\alpha$ -TCP são o magnésio, favorecedor da fase  $\beta$  (Enderle, et al., 2005; Reid, et al., 2007; Marchi, et al., 2007; Carrodegua, et al., 2008; Motisuke, et al., 2008; Ramos, et al., 2008), e o silício, favorecedor da fase  $\alpha$ , (Reid, et al., 2006; Pietak, et al., 2007), entretanto, como citado no item 4.2 existem alguns outros elementos como o sódio, o lítio, o potássio e o estrôncio que também são considerados como estabilizadores de um dos dois polimorfos do TCP, um resumo dos principais elementos que está descrito na Tabela 4.7.

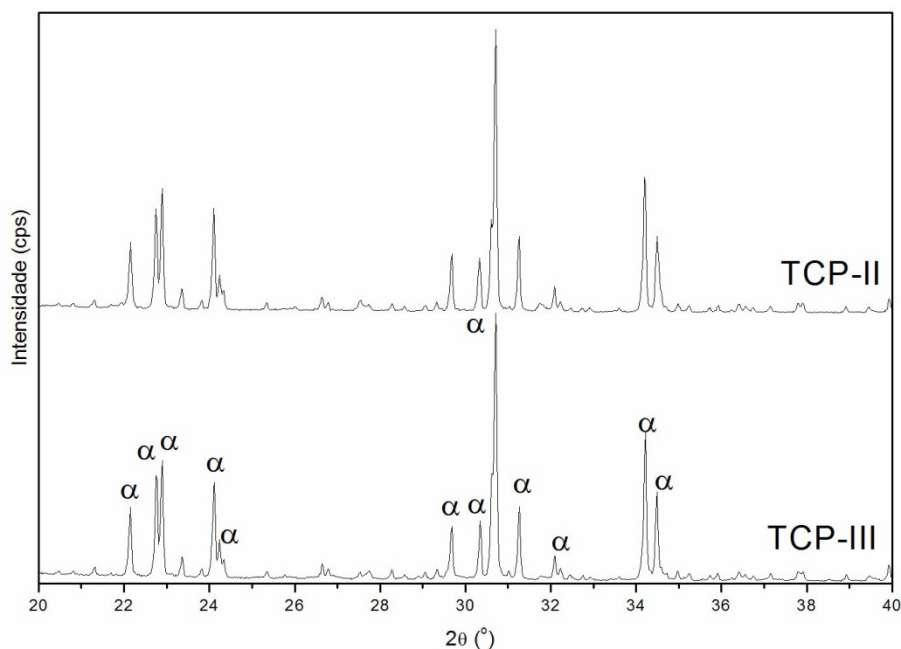
**Tabela 4.7 - Elementos estabilizadores das fases  $\alpha$  e  $\beta$  do TCP.**

Elemento	Fase	Intervalos analisados (% em massa)	Referências
<b>Mg</b>	$\beta$	$> 0,0250$	(Enderle, et al., 2005; Marchi, et al., 2007; Reid, et al., 2007; Carrodegua, et al., 2008)
<b>Si</b>	$\alpha$	$0,59 < x < 1,14$	(Reid, et al., 2006; Motisuke, et al., 2008; Pietak, et al., 2007; Wei, et al., 2009)
<b>Na</b>	$\beta$	$1,15 < x < 4,60$	(Matsumoto, et al., 2009; Kannan, et al., 2008)
<b>K</b>	$\beta$	$1,95 < x < 7,81$	(Matsumoto, et al., 2009; Kannan, et al., 2008)
<b>Li</b>	$\beta$	$0,35 < x < 1,39$	(Matsumoto, et al., 2009)
<b>Sr</b>	$\beta$ ou $\alpha$	-----	(Kannan, et al., 2006; Pina, et al., 2009)
<b>Zn</b>	$\alpha$	-----	(Wei, et al., 2009)

#### 4.3.2 Caracterização dos Pós

Nos difratogramas de raios X da Figura 4.22 observa-se que tanto a amostra dopada com silício como a amostra não dopada apresentam grande similaridade de fase cristalina, ou seja, ambas são majoritariamente compostas de  $\alpha$ -TCP e apresentam apenas as quantidades de  $\beta$ -TCP (4% em massa para o TCP-II e 8% em massa para o TCP-III) determinadas no item 4.3.1. Estes valores estão bem abaixo dos apresentados nos trabalhos nos quais se sintetiza o  $\alpha$ -TCP por reação no estado sólido (Bermudez, et al., 1994; Ginebra, et al., 1997). A cristalinidade dos dois materiais é qualitativamente muito semelhante uma vez que o valor da largura a meia altura do pico (1 7 0), é 0,05773 e 0,05907, para o TCP-II e TCP-III, respectivamente.

Outro fator que junto com a DRX reafirma a pureza dos pós de TCP estudados é o valor da relação Ca/P e Ca/(P+Si) apresentados na Tabela 4.8. Ambos os valores são próximos a 1,50 revelando que o único material presente nas amostras é o fosfato tricálcico.



**Figura 4.22 - Difratoograma de Raios X dos TCPs obtidos com reagentes livres de Mg. TCP-II dopado e TCP-III não dopado com silício. Legenda:  $\alpha$  =  $\alpha$ -TCP.**

**Tabela 4.8 - Relação Ca/P e Ca/P+Si calculadas a partir de análise quantitativa de FRX.**

Amostra	Ca (% em massa)	P (% em massa)	Si (% em massa)	Ca/P ou Ca/(P+Si)
TCP-II	38,51	18,98	1,22	1,46
TCP-III	38,77	19,97	a.l.d.	1,50

a.l.d. = abaixo do limite de detecção do equipamento

A pureza dos materiais obtidos pode também ser evidenciada nos espectros de infravermelho da Figura 4.23. Todas as bandas de absorção do  $\alpha$ -TCP (Ginebra, et al., 1997) estão presentes em ambas as amostras sendo as mais características aquelas referentes aos grupos fosfatos presentes entre 462 e 1120  $\text{cm}^{-1}$  de acordo com a Tabela 4.9. A substituição de alguns grupos fosfatos por silicato é observada através da banda de absorção a 800  $\text{cm}^{-1}$  que é referente ao estiramento da ligação Si-O (Dunfield, et al., 2005). A região referente às vibrações das ligações dos grupos silicatos está indicada com \* na Figura 4.23. Entretanto, a quantidade de silicatos presente é baixa e a observação de suas bandas de absorção se torna difícil, mas na Figura 4.24 é possível verificar que o TCP-II apresenta estas bandas.

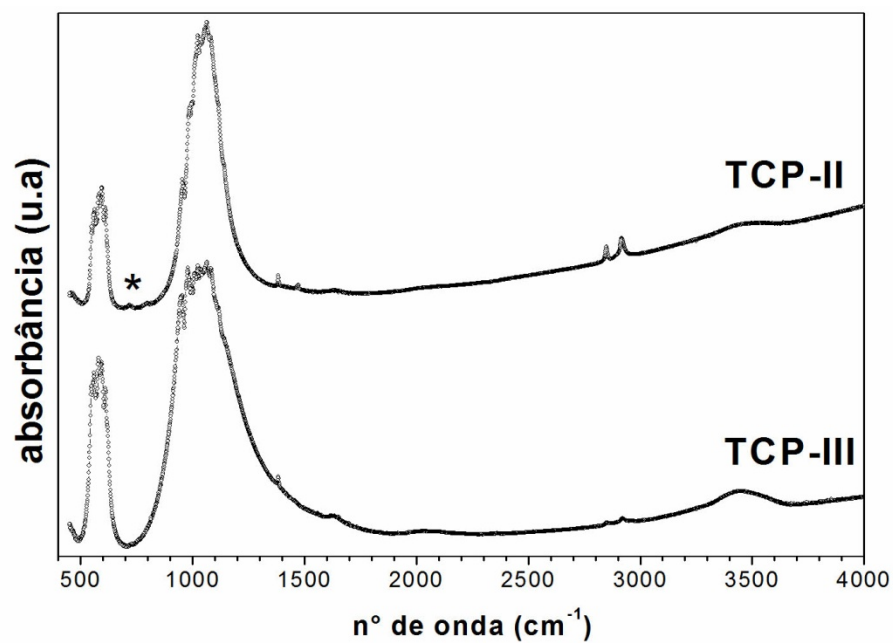


Figura 4.23 - Espectros de infravermelhos do TCP-II e TCP-III. \* representa a região que demonstra a presença de bandas de absorção referentes a ligação O-Si-O. Região em detalhe na Figura 4.24.

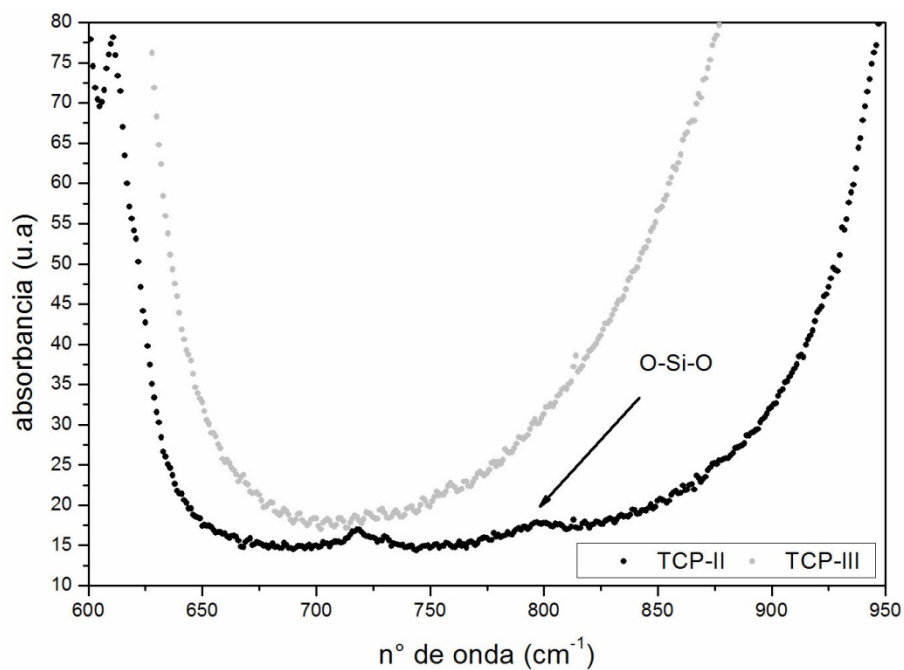


Figura 4.24 - Bandas características da substituição por silício (Dunfield, et al., 2005).



**Tabela 4.9 - Absorções na região do infravermelho dos grupos fosfatos do TCP.**

Absorção	Ligação	Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )
$\nu_1$ (extensões ou vibrações simétricas)	P-O	963
$\nu_2$ (flexões duplamente degeneradas)	OPO	462
		1120
		1100
$\nu_3$ (extensões triplamente degeneradas)	P-O	1084
		1025
		990
		597
$\nu_4$ (flexões triplamente degeneradas)	OPO	583
		572
		559

Diferentemente do observado para o TCP-I, o processo de moagem do TCP-II e TCP-III foi mais simples, sendo que após 48 horas em moinho de bolas foi possível obter uma distribuição granulométrica dentro da faixa desejável de 2 a 20  $\mu\text{m}$  (dos Santos, 2002) para os dois materiais. O tamanho de partícula médio foi 6,71 e 8,32  $\mu\text{m}$  para o TCP-II e o TCP-III, respectivamente. A distribuição granulométrica do TCP sem silício ficou entre 0,60 e 17,25  $\mu\text{m}$  e para o dopado com silício, 0,78 e 14,67  $\mu\text{m}$ . A medida da área superficial foi de  $0,6202 \pm 0,0062 \text{ m}^2/\text{g}$  para o TCP-II e  $0,5322 \pm 0,0042 \text{ m}^2/\text{g}$  para o TCP-III. A diferença apresentada entre os valores da distribuição granulométrica e área superficial está diretamente relacionada às temperaturas de tratamento térmico empregadas uma vez que quanto maior a temperatura maior é o tamanho da partícula e menor é a sua área superficial.

Comparando-se as áreas superficiais dos pós de TCP e levando-se em conta apenas este parâmetro esperava-se que a reatividade dos mesmos fosse muito semelhante ou que o TCP-II tivesse uma velocidade de reação de cura ligeiramente maior, porém como será discutido no item 4.4.2 o TCP-II apresentou uma cinética de reação mais lenta, sendo isto um indício de que a presença do silício na estrutura cristalina do TCP influencia de alguma maneira a reatividade do pó seja diminuindo a sua solubilidade, seja diminuindo a taxa com a qual a *apatita* precipita durante a cura do cimento. As curvas da distribuição granulométrica bem como um resumo da distribuição granulométrica, da densidade absoluta e da área específica está demonstrado na Figura 4.25 e Tabela 4.10, respectivamente.

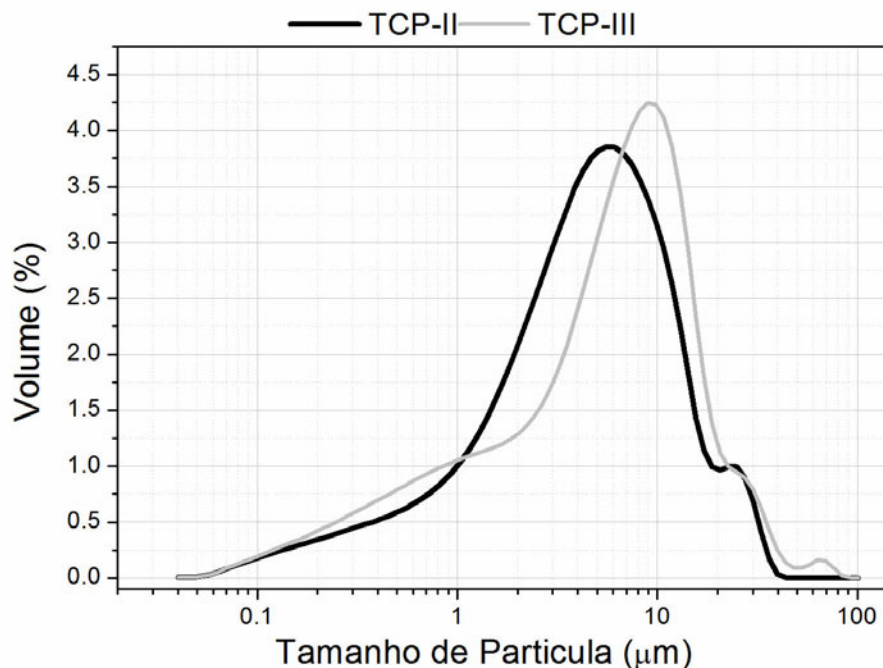
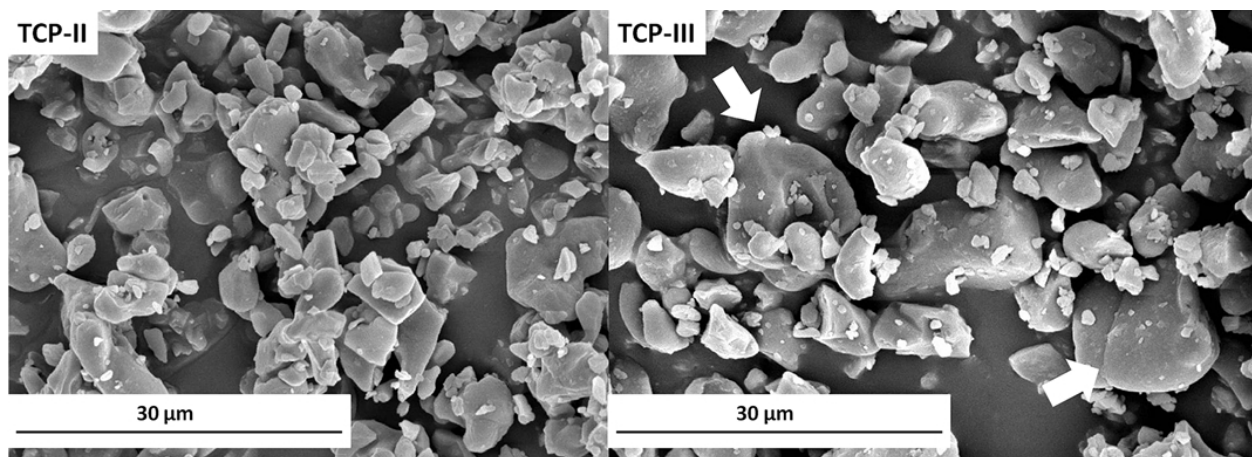


Figura 4.25 - Distribuição granulométrica do TCP-II (preto) e TCP-III (cinza)

Tabela 4.10 - Distribuição granulométrica, densidade absoluta e área Superficial BET do TCP-II e TCP-III.

Amostra	$D_m$ ( $\mu\text{m}$ )	10%<D<90% ( $\mu\text{m}$ )	Área BET ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Densidade Absoluta ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
TCP-II	6,710	0,78-14,67	$0,6202 \pm 0,0062$	$2.899 \pm 0,001$
TCP-III	8,317	0,60-17,25	$0,5322 \pm 0,0042$	$2.872 \pm 0.002$

A morfologia dos dois pós de TCP está mostrada na Figura 4.26. Verifica-se realmente que a distribuição granulométrica dos dois materiais é bem semelhante, porém o TCP-III apresenta algumas partículas maiores como as indicadas por brancas na Figura 4.26. Estas micrografias estão de acordo com as curvas de distribuição granulométrica (Figura 4.25), a curva referente ao TCP-III (curva cinza) apresenta o maior volume de partículas na região entre 10 e 15  $\mu\text{m}$  enquanto que o TCP-II (curva preta) entre 6 e 10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente.



**Figura 4.26 - Morfologia do TCP-II e TCP-III após 48 horas de moagem. Setas brancas indicam partículas maiores em relação ao TCP-II. A distribuição granulométrica é menos homogênea devido à maior temperatura de tratamento térmico.**

Finalmente, com base nos resultados da citotoxicidade indireta (Figura 4.27) verifica-se que a dopagem com silício induz um leve aumento no efeito citotóxico do TCP. Apesar de ambas as amostras não terem apresentado o índice IC50%, não se pode afirmar que elas não sejam citotóxicas, uma vez que os valores de viabilidade celular para o extrato a 100% foram mais baixos que 80%. Provavelmente, como já discutido no item 4.1.1, este nível de citotoxicidade é resultado do processo de dissolução do  $\alpha$ -TCP que tem lugar durante a imersão das amostras em meio de cultivo, resultando em uma liberação de íons e, conseqüentemente, a uma alteração no pH. Este fato provavelmente será amenizado quando o material estiver implantado “in vivo” uma vez nestas condições ocorre a constante circulação de fluidos e esta mudança de pH não será tão pronunciada.

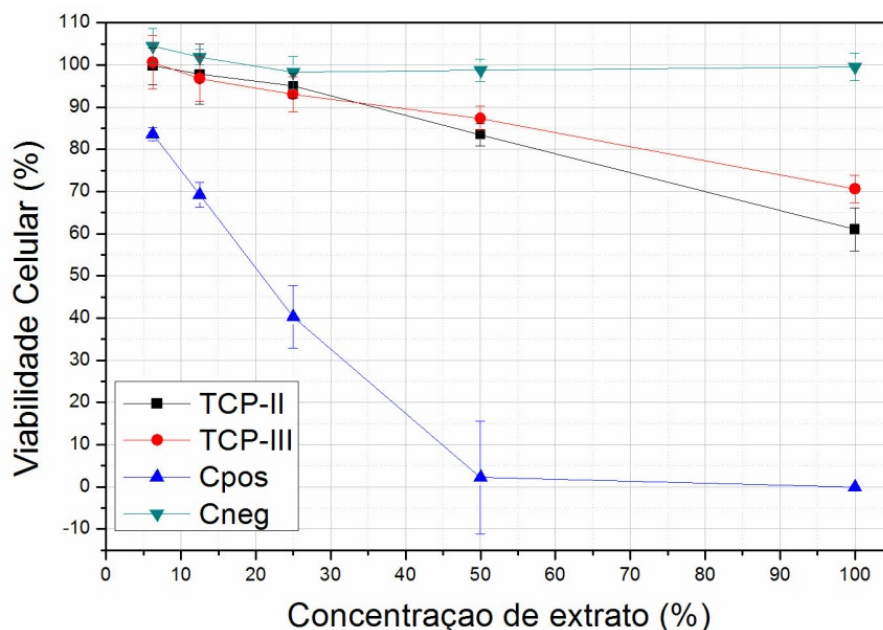


Figura 4.27 - Citotoxicidade indireta do TCP-II e TCP-III. A dopagem com silício induz um aumento na citotoxicidade do TCP.

#### 4.4 Reagentes Livres de Magnésio III: Cimento Ósseo

##### 4.4.1 Determinação e Caracterização

A relação líquido/pó utilizada foi a mesma empregada para o cimento baseado no TCP-I para que se possa manter um parâmetro de comparação entre todos os materiais desenvolvidos neste trabalho. Como decorrência o tempo de cura inicial e final determinados pelo método das agulhas de Gilmore (ASTM-C266-04) também foi maior que o publicado na literatura (dos Santos, 2002; Bermudez, et al., 1994; Ginebra, et al., 1995a). Os valores encontrados para o tempo de cura inicial ( $T_i$ ) e tempo de cura final ( $T_f$ ) estão descritos na Tabela 4.11. Verifica-se que para o material sem silício, os tempos de cura foram semelhantes aos obtidos para o cimento do item 4.1.2, porém para o TCP dopado com silício os tempos de pega foram extremamente mais longos, 30 e 120 para  $T_i$  e  $T_f$ , respectivamente.

**Tabela 4.11 - Tempos de cura dos cimentos ósseos c-TCP-II e c-TCP-III.**

Amostra	T <sub>i</sub> (min)	T <sub>f</sub> (min)
c-TCP-II	30	120
c-TCP-III	15	43
$\alpha$ -TCP (Ginebra, et al., 1995a)	9	19

Outro fator além da elevada relação líquido/pó, que pode ter contribuído para os elevados valores de tempo de cura é a adição de ácido cítrico na fase líquida do cimento como já discutido no 4.1.2. Apesar dos tempos de cura elevados, os dois cimentos (c-TCP-II e c-TCP-III) curaram já que pela análise dos espectros de infravermelho antes (Figura 4.23) e após a cura (Figura 4.28) verifica-se que a transformação  $\alpha$ -TCP $\rightarrow$ CDHA ocorreu uma vez que apareceram bandas características do grupo hidroxila na região de  $3500\text{ cm}^{-1}$  e, de acordo com a Tabela 4.12, as bandas de absorção da CDHA estão presentes em ambos espectros (Berry, 1967; Fowler, 1974; Fowler, et al., 1966), concluindo-se que a cura do cimento leva a formação de DCHA uma vez que existe a presença de bandas referentes ao grupo  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Além disso, as bandas presentes na região entre  $850\text{ e }900\text{ cm}^{-1}$  e  $1350\text{ a }1600\text{ cm}^{-1}$ , marcadas com \* nos espectros, são referentes a íons carbonato indicando que a *apatita* formada além de ser deficiente em cálcio é carbonatada (Cheng, et al., 1998; Cheng, et al., 1998).

A presença dos grupos silicatos não pode ser evidenciada nos espectros de infravermelho dos cimentos. No entanto, não é possível concluir se a precipitação de CDHA durante a cura do cimento ocorre com substituições de grupos fosfatos por silicatos ou se os silicatos formam algum composto amorfo na superfície do cimento.

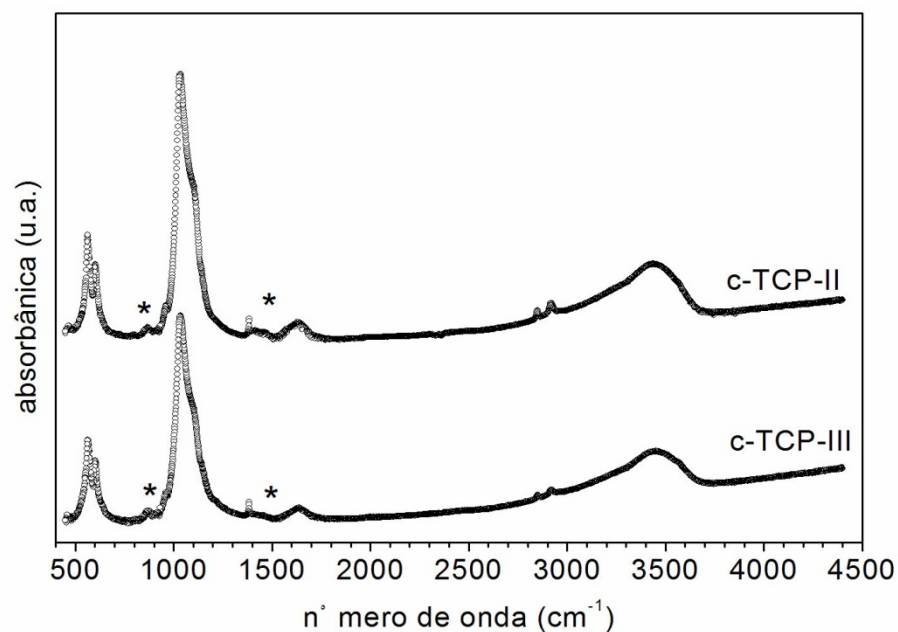


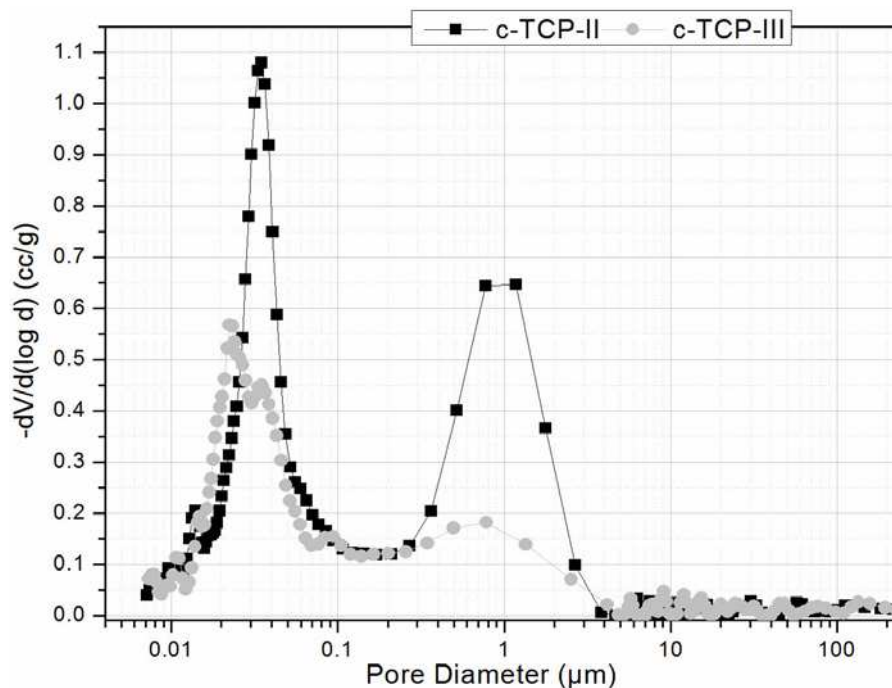
Figura 4.28-Espectros de FTIR dos cimentos de fosfato de cálcio após 7 dias de reação. A apatita formada é deficiente em cálcio e carbonatada. Os “\*” marcam as regiões que apresentam bandas referentes ao grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ .

Tabela 4.12 - Vibrações na região do infravermelho da CDHA.

Absorção	Comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )
Extensão -OH	3572
$\nu_3 (\text{HPO}_4)$	1133
$\delta \text{ OH}$ deformação	1210
	1087
$\nu_3 (\text{PO}_4)$	1072
	1046
	1032
$\nu_1 (\text{PO}_4)$	962
$\nu_5 (\text{HPO}_4)$	870
Oscilação -OH	630
$\nu_4 (\text{PO}_4)$	474
	462

Apesar de ambos os cimentos terem sido obtidos com a mesma relação líquido/pó e a partir de materiais com granulometrias e área superficial semelhantes verificou-se que o c-TCP-II apresenta maior porosidade total que o c-TCP-III como pode ser observado nas curvas resultantes da porosimetria de mercúrio da Figura 4.29. O tamanho de poros é ligeiramente maior para o c-TCP-II.

É sabido que a porosidade de um cimento ósseo está diretamente ligada à relação líquido/pó empregada, ao tamanho de partícula e, principalmente, ao processo com o qual o pó é misturado ao líquido. Os valores obtidos para a porosidade total são bem elevados como se esperava já que a quantidade de líquido adicionada foi o dobro da normalmente empregada para cimentos de  $\alpha$ -TCP. A maior porosidade do c-TCP-II pode ser atribuída também à uma possível camada de sílica gel que pode ter se formado na superfície dos primeiros cristais de *apatita* inibindo o seu crescimento e entrelaçamento (Camiré, et al., 2006; Tanizawa, et al., 1995).



**Figura 4.29 - Distribuição do tamanho de poros dos cimentos baseados no TCP-II e no TCP-III. Cimento preparado a partir do TCP-II apresenta um volume maior de poros entre 0,3 e 3 µm.**

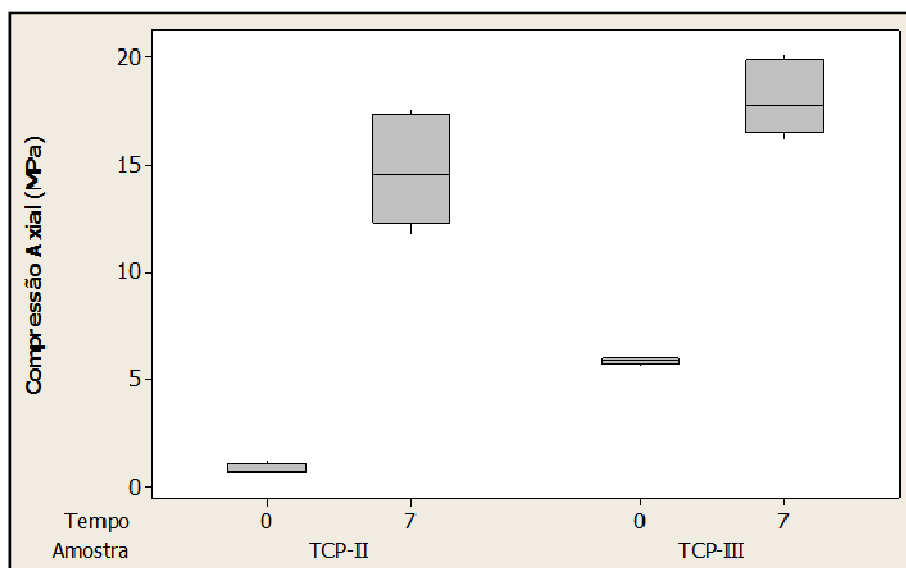
Após a comparação dos valores das densidades absoluta obtidas por porosimetria e por picnometria de hélio (Tabela 4.13) é possível concluir que existem alguns poros em ambos os cimentos que não estão abertos a superfície, uma vez que existe diferença entre estes dois valores. Esta diferença é devido ao fato de que como estes poros estão fechados a superfície o mercúrio utilizado na análise de porosimetria não consegue adentrar totalmente pela estrutura do material e os poros passam a ser considerados como matéria resultando em valores de densidade absoluta menores. Porém, estes erros são totalmente eliminados na picnometria de hélio uma vez que o material pode ser moído e analisado na forma de pó.

**Tabela 4.13 – Densidade absoluta obtida por porosimetria de mercúrio e picnometria de hélio. Os poros presentes nos cimentos estudados estão fechados à superfície e não apresentam interconectividade.**

Amostra	Densidade Absoluta (Porosimetria) (g/cm <sup>3</sup> )	Densidade Absoluta (Picnometria) (g/cm <sup>3</sup> )
TCP-II	2.7172	2.9080 ± 0.0058
TCP-III	2.4940	2.8141 ± 0.0012

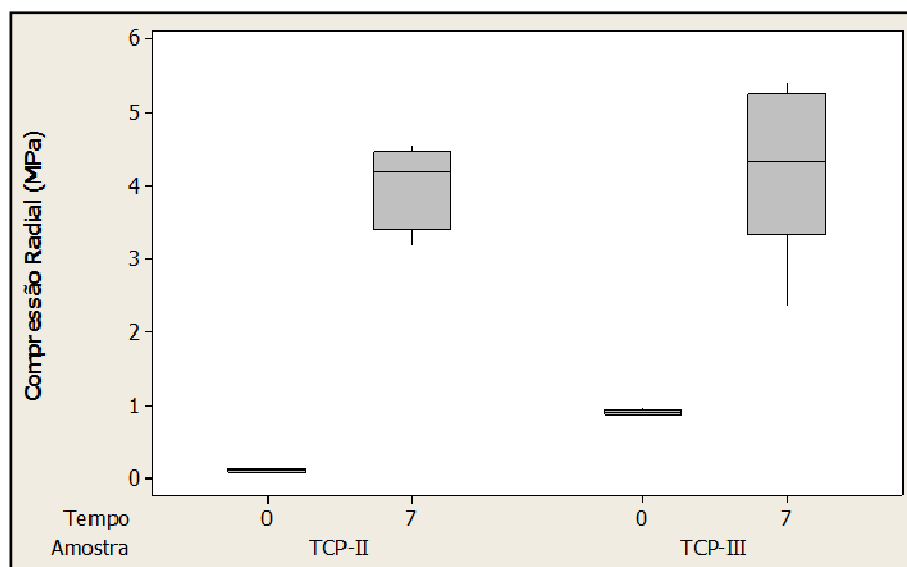
Nos diagramas “boxplot” da Figura 4.31 fica visível a influência da elevada relação líquido-pó na redução da resistência mecânica dos cimentos ósseos estudados quando os valores da resistência à compressão axial são comparados aos valores relatados na literatura (Ginebra, et al., 1997; Sarda, et al., 2002; Camiré, et al., 2006).

É possível observar que a imersão em FCS é responsável pela melhora da resistência mecânica uma vez que permite a evolução da reação de cura, ou seja, a transformação do  $\alpha$ -TCP em placas de *apatita*. O entrelaçamento destas placas é que confere a resistência mecânica do material. A Tabela 4.14 resume os valores encontrados para a resistência mecânica antes e após sete dias de imersão em FCS.



**Figura 4.30 - Diagrama "Boxplot" dos resultados do ensaio de compressão axial antes e após sete dias de imersão em FCS. Imersão em FCS faz melhora a resistência mecânica dos cimentos, porém, aumenta a variabilidade de valores. Após 7 dias de imersão ambos os cimentos apresentam valores de resistência à compressão axial não diferentes estatisticamente.**



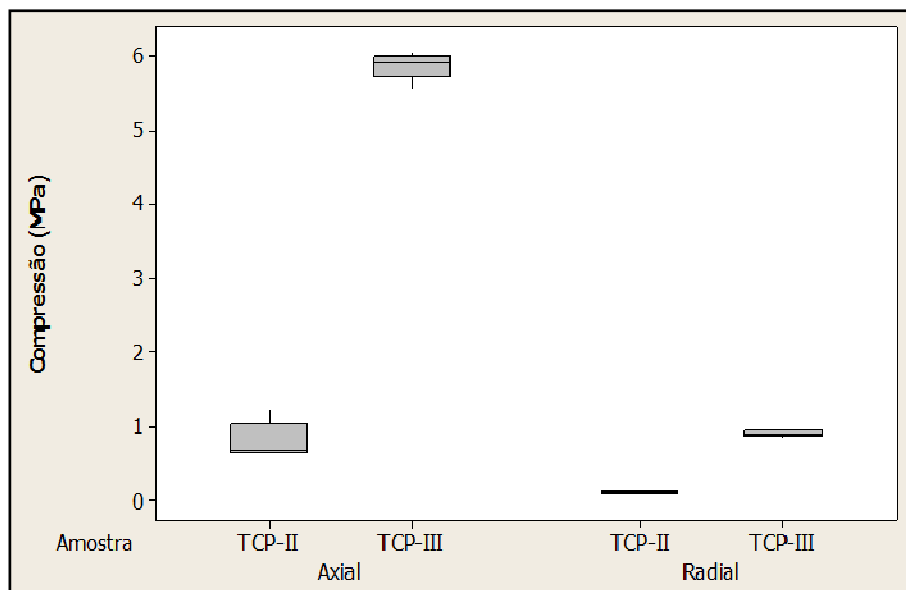


**Figura 4.31 - Diagrama "Boxplot" dos resultados do ensaio de compressão radial antes e após sete dias de imersão em FCS. A imersão em FCS também é responsável pelo aumento da resistência à compressão radial. No entanto, não existe diferença estatística entre as amostras após 7 dias de imersão.**

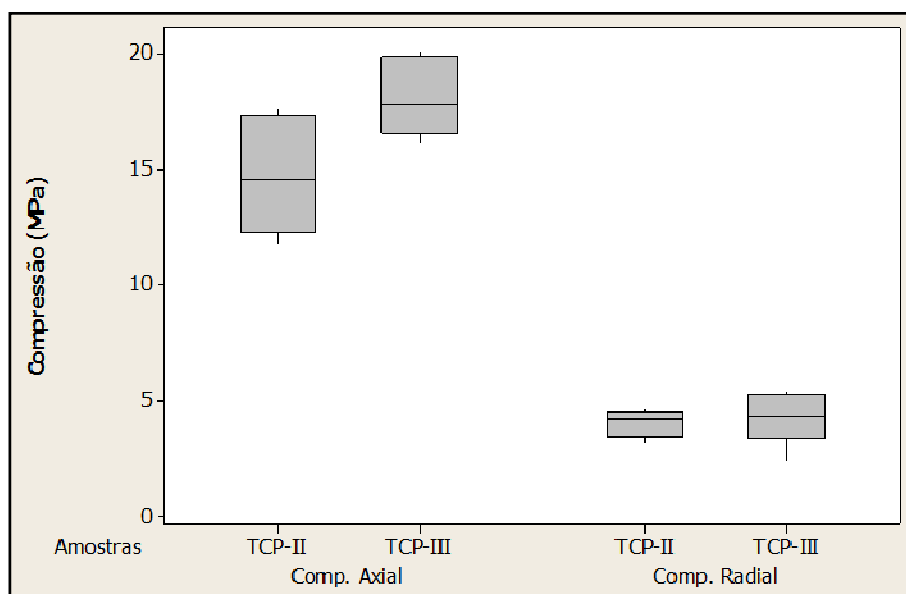
**Tabela 4.14 - Resumo dos valores da resistência mecânica à compressão axial e radial.**

Amostra	Tempo (dias)	Compressão Axial (MPa)	Compressão Radial (MPa)
c-TCP-II	0	$0,81 \pm 0,25$	$0,11 \pm 0,02$
c-TCP-III	0	$5,88 \pm 0,18$	$0,91 \pm 0,04$
c-TCP-II	7	$14,75 \pm 2,56$	$3,98 \pm 0,56$
c-TCP-III	7	$18,12 \pm 1,71$	$4,32 \pm 1,18$

Antes da imersão em FCS o cimento que contém silício (c-TCP-II) obteve valores de resistência à compressão menores que os obtidos para o c-TCP-III, entretanto, após sete dias de imersão os valores alcançados por ambos os cimentos não são estatisticamente diferentes levando a conclusão de que o silício de alguma maneira retarda o início da reação de transformação do  $\alpha$ -TCP em *apatita*, mas após a cura o silício já não exerce nenhuma influência nas propriedades mecânicas do cimento como pode ser observado nas Figura 4.32 e Figura 4.33.



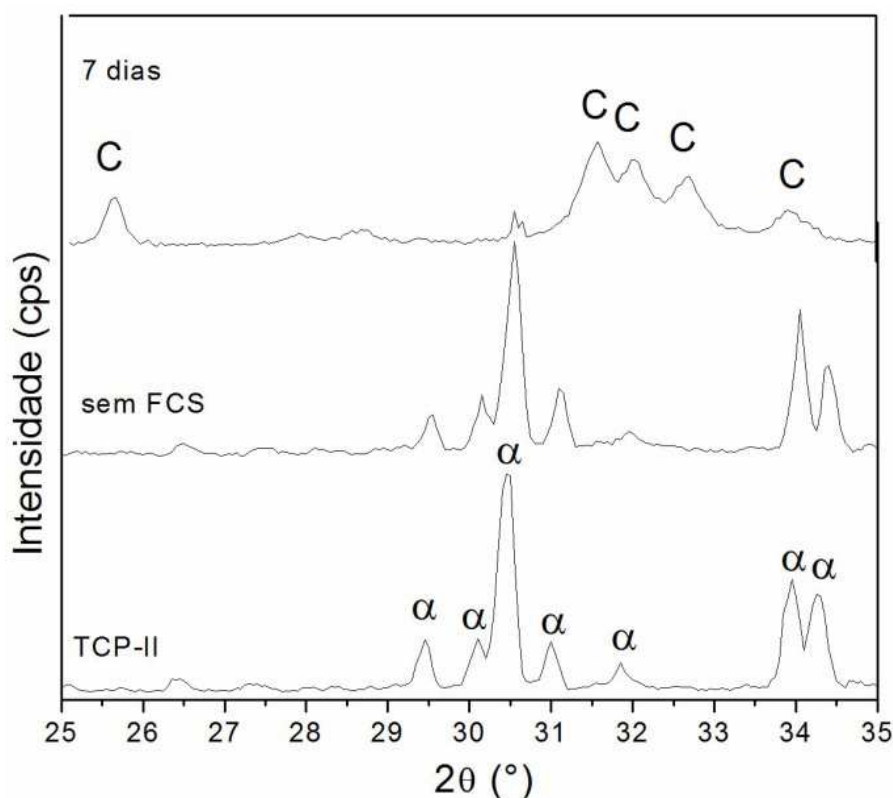
**Figura 4.32 - Compressão axial e radial dos cimentos sem imersão em FCS. O cimento c-TCP-II apresenta valores iniciais de resistência à compressão axial e radial extremamente baixos. Resultados indicam taxa de reatividade menor do TCP-II.**



**Figura 4.33 - Compressão axial e radial após sete dias de imersão em FCS. Após 168h de imersão em FCS ambos os cimentos atingem valores de resistência à compressão axial e radial que não são estatisticamente diferentes.**

Nos difratogramas de raios X das Figura 4.34 e Figura 4.35 observa-se que a reação de cura do c-TCP-II ocorre de maneira mais lenta quando comparado ao c-TCP-III explicando a baixa resistência mecânica do material nos primeiros instantes da cura e, mais uma vez, evidenciando

que a presença do silício retarda a taxa de reação do  $\alpha$ -TCP. Na Figura 4.34 após 24 horas em ambiente com 100% de umidade relativa (sem FCS) ocorreu apenas uma diminuição da intensidade dos picos do  $\alpha$ -TCP indicando que este está se dissolvendo, porém não se observa nenhum pico referente à precipitação de *apatita*. Por outro lado, na Figura 4.35 após o mesmo período de tempo, os picos de *apatita* já estão evidentes. Após sete dias de imersão em FCS o cimento c-TCP-II ainda não completou a reação de cura. Este fato explicaria a relativa diferença dos valores de resistência mecânica. Além disso, é interessante ressaltar que o c-TCP-III após sete dias de imersão em FCS apresenta alguns picos que evidenciam a presença do  $\beta$ -TCP.



**Figura 4.34 - Difração de raios X antes e após imersão em FCS do cimento c-TCP-II. Mesmo após 7 dias de imersão em FCS, a conversão  $\alpha$ -TCP  $\rightarrow$  apatita não foi completa. Legenda:  $\alpha$  =  $\alpha$ -TCP e C = apatita**

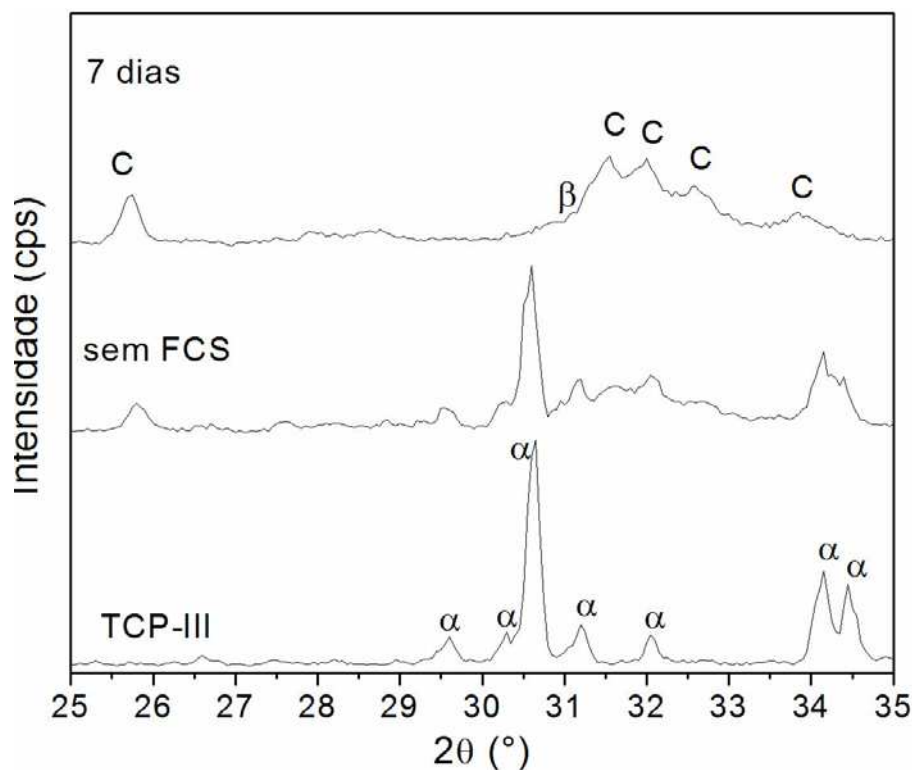
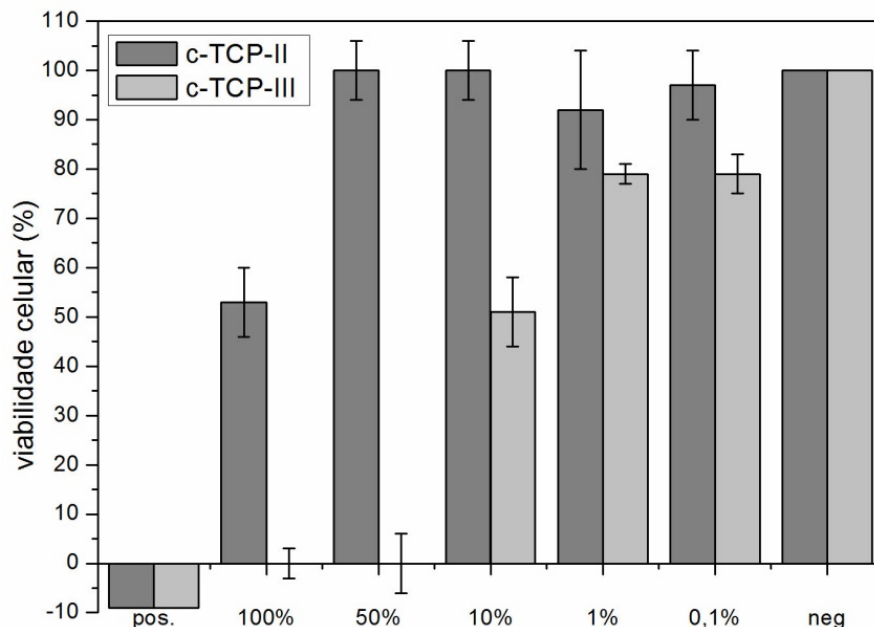


Figura 4.35 - Difração de raios X antes e após imersão em FCS do cimento c-TCP-III. Diferentemente do TCP-II a conversão  $\alpha$ -TCP  $\rightarrow$  apatita foi completa após 7 dias de imersão em FCS. Legenda:  $\alpha$  =  $\alpha$ -TCP, C = apatita e  $\beta$  =  $\beta$ -TCP.

Ao contrário do que se esperava após o ensaio de citotoxicidade dos pós de TCP Figura 4.27), o cimento c-TCP-II apresentou uma menor resposta citotóxica que o cimento c-TCP-III, que é totalmente citotóxico, conforme pode ser observado no gráfico de barras da Figura 4.36. No entanto, a citotoxicidade apresentada pelos cimentos é visivelmente justificável quando se observa a evolução do pH dos dois TCPs em solução tampão 0,2 M Tris/HNO<sub>3</sub> após um período de tempo equivalente ao ensaio de citotoxicidade (11 dias). Conforme os valores apresentados na Tabela 4.15 o pH para o TCP-II é igual a 7,60 e para o TCP-III 6,86. Os valores do pH dos extratos após o período de incubação também demonstram a maior citotoxicidade do cimento sem adição do silício já que seu valor é extremamente baixo, 5,56.



**Figura 4.36 - Citotoxicidade indireta dos cimentos c-TCP-II e c-TCP-III. Apesar do pó de TCP-II ter apresentado maior citotoxicidade, o cimento c-TCP-II é menos citotóxico que o c-TCP-III.**

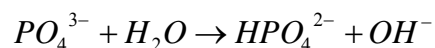
**Tabela 4.15 - Comparação entre pH dos extratos do ensaio de citotoxicidade e em solução tampão em períodos de tempos equivalentes. Valores de pH justificam a maior citotoxicidade do c-TCP-II.**

Amostra	pH Extrato	pH TCP
Controle	8,20	7,56
TCP-II	6,60	7,60
TCP-III	5,56	6,86

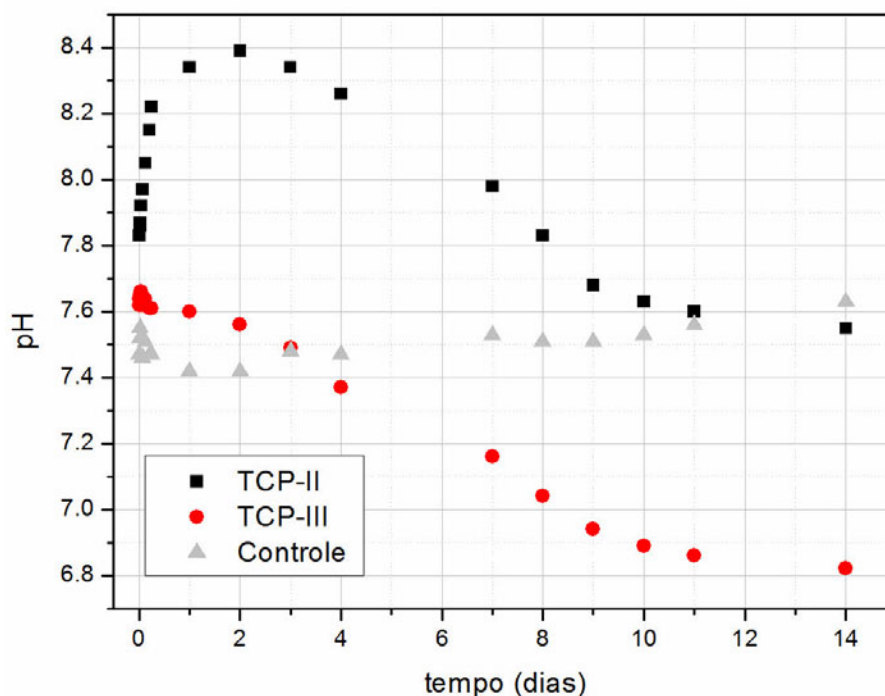
Quando se observa a evolução do pH dos fosfatos de cálcio em um período de 14 dias, verifica-se que de fato a adição do silício induz um comportamento diferente na solubilidade do TCP. Enquanto que nos dois primeiros dias, o TCP-III praticamente não induz uma alteração no pH (Figura 4.37), o TCP-II parte de um pH inicial de aproximadamente 7,8 e atinge o valor de 8,4.

Estes resultados induzem a conclusão de que o silício reduz a taxa de solubilidade do TCP e consequentemente retarda a precipitação da *apatita*. Ou seja, enquanto o TCP-III provavelmente atinge o limite de saturação que permite a precipitação da *apatita* nos primeiros instantes do ensaio, o TCP-II demora um tempo maior. Para este material o pH primeiramente aumenta devido à liberação de íons  $\text{OH}^-$  (Equação 4.1) resultante do processo de dissolução do TCP e quando o limite de saturação é atingido, provavelmente após dois dias, o pH começa a diminuir

como decorrência da precipitação da *apatita*. De fato, segundo Wei e colaboradores (2009), a adição de silício diminui a solubilidade do TCP uma vez que torna a fase  $\alpha$  mais estável reduzindo as distorções de sua estrutura cristalina. Uma discussão mais detalhada sobre a cinética da transformação  $\alpha$ -TCP  $\rightarrow$  *apatita* para o TCP dopado com silício será abordado no item 4.4.2.



**Equação 4.1**



**Figura 4.37** - Evolução do pH em solução tampão 0,2M Tris/HNO<sub>3</sub>. Estimativa da evolução do pH durante a pega dos cimentos. O silício altera o comportamento do pH durante a pega do cimento nos primeiros dois dias ocorre uma basificação inicial enquanto que para o TCP-III os valores de pH apenas diminuem com o passar do tempo.

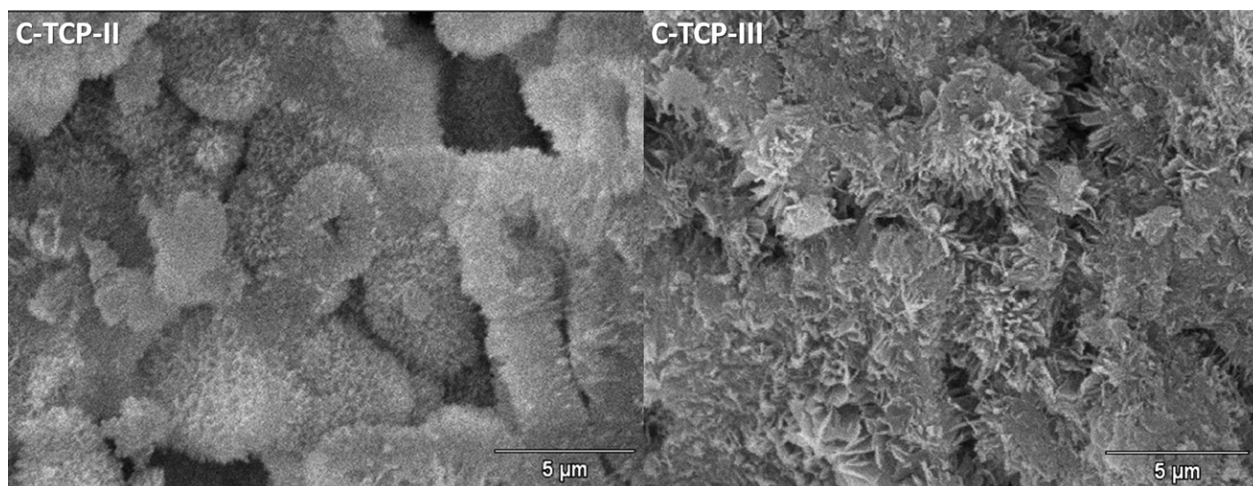
Outra possível conclusão é que devido a adição de CaSiO<sub>3</sub>, para a realização da dopagem do  $\alpha$ -TCP, exista um excesso de Ca na estequiometria do TCP-II e, consequentemente, durante a queima a 1200°C ocorreu a formação de óxido de cálcio (CaO) que em contato com soluções aquosas forma uma base extremamente forte, o hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) que teria sido responsável pelo aumento do pH nos primeiros instantes do ensaio. No entanto, não se observou excesso de Ca nos valores das relações Ca/P e Ca/P+Si e nem se verificou a presença de picos desta fase cristalina nos difratogramas de raios X indicando que a formação de CaO devido a um

excesso de Ca é mínima, abaixo de 4% em massa, porém suficiente para elevar o pH do TCP durante a sua imersão em soluções aquosas.

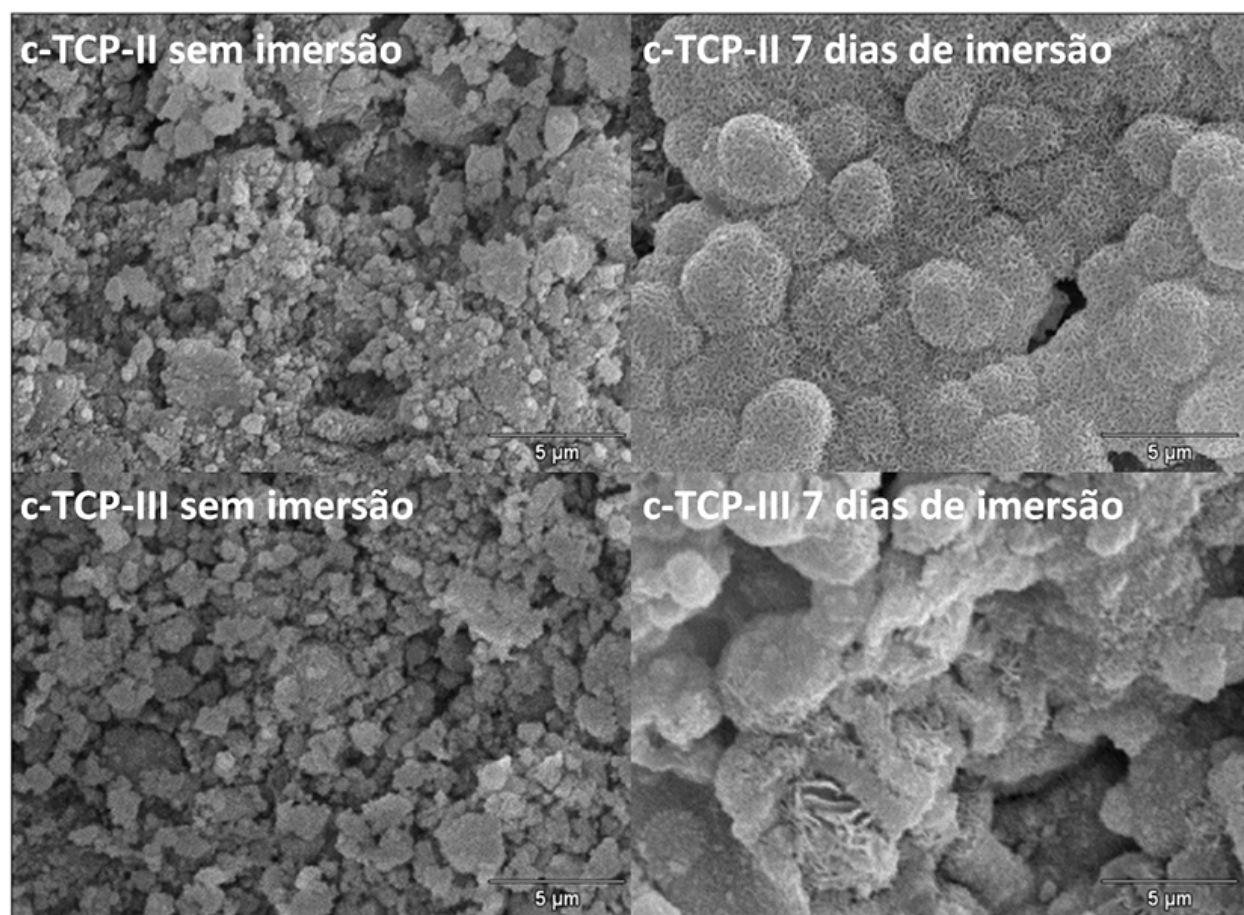
A influência do silício nas propriedades do cimento ósseo pode ser mais uma vez observada na Figura 4.38 na qual está demonstrada a micrografia da superfície de fratura dos cimentos c-TCP-II e c-TCP-III após 7 dias de imersão em FCS. Os cristais de *apatita* precipitados a partir do TCP-II são menores que aqueles formados pelo TCP-III, confirmando que de fato o silício inibe o crescimento de grão da *apatita* (Tanizawa, et al., 1995). Além disso, os cristais formados se agrupam em formas globulares muito semelhantes à *apatita* biológica.

De fato, nas micrografias da superfície dos cimentos antes e após sete dias de imersão em FCS (Figura 4.39) observa-se que em ambos os cimentos ocorreu a precipitação de uma camada de *apatita* na superfície após sete dias de imersão, entretanto, para o c-TCP-II este fenômeno foi verificado com uma maior incidência. Além disso, a morfologia da *apatita* precipitada neste último cimento é globular e composta de pequenas agulhas como na *apatita* biológica (Kokubo, et al., 2006). Confirmando que o silício altera a morfologia do cimento ósseo que por sua vez induz a precipitação de cristais de *apatita* na forma de glóbulos. Este fato pode ser um indício de que o silício aumenta a bioatividade do cimento ósseo.

No entanto, para que seja comprovada a maior bioatividade do c-TCP-II é necessário verificar a presença íons de silício em solução durante a precipitação da *apatita* na superfície da amostra uma vez que este elemento seria o responsável pela melhora da bioatividade. Fato que somente seria possível se a amostra liberasse íons silício quando em contato com fluidos fisiológicos (Carlisle, 1980; Bohner, 2009a). Além disso, este tipo de ensaio somente é conclusivo se analisado em conjunto com ensaios de adesão e diferenciação celular e “in vivo” dos materiais uma vez que segundo Bohner (2009b) o ensaio de imersão em FCS como proposto por Kokubo e colaboradores (2006) não reproduz fielmente as condições fisiológicas do corpo humano podendo trazer conclusões errôneas a respeito do comportamento biológico dos biomateriais.



**Figura 4.38 - Detalhe dos cristais do cimento c-TCP-II após 7 dias de imersão em FCS. Superfície de fratura.**



**Figura 4.39 - Imersão em FCS da superfície dos cimentos c-TCP-II e c-TCP-III. A morfologia da apatita formada na superfície do c-TCP-II apresenta morfologia mais próxima da apatita biológica.**

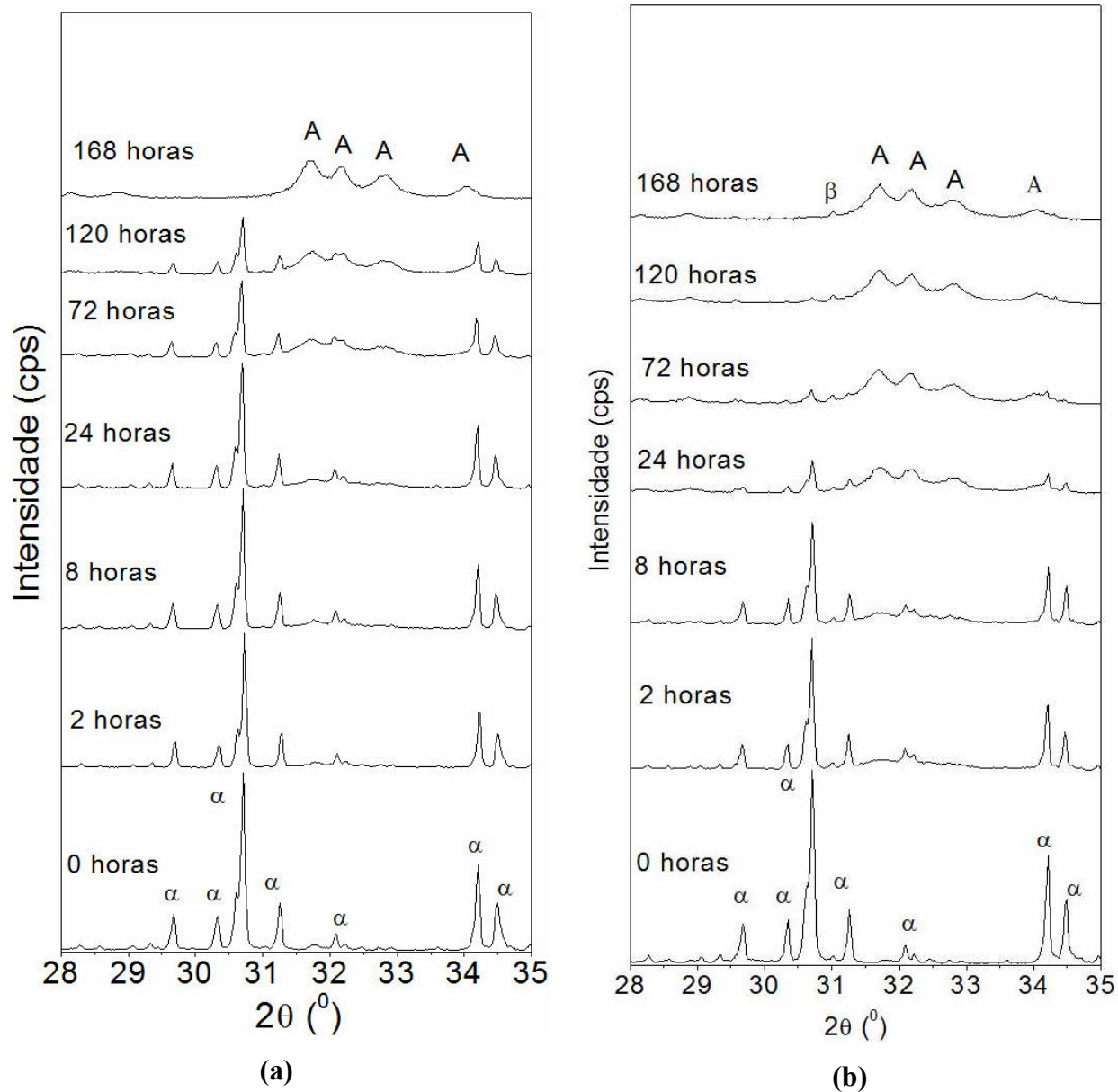


#### 4.4.2 Cinética da Reação de Cura: Influência do Silício

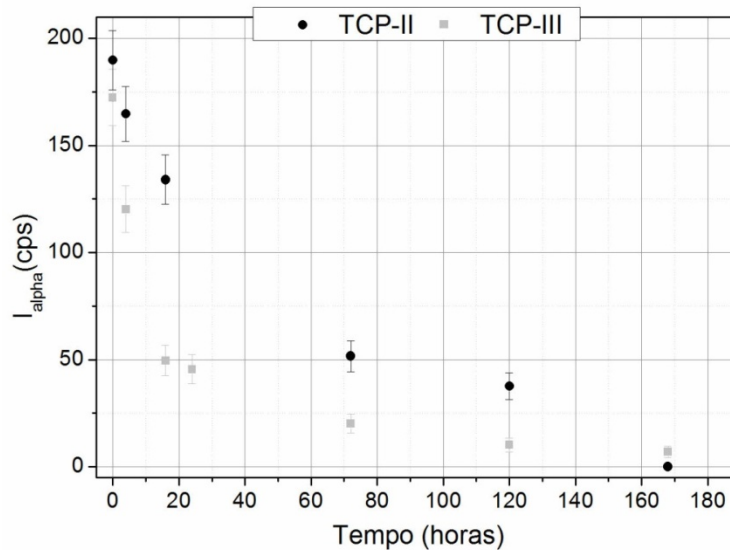
Os difratogramas de raios X da Figura 4.40 confirmam os indícios já discutidos de que o silício induz uma redução na reatividade do  $\alpha$ -TCP. Observa-se claramente que a cura do cimento é um processo no qual ocorre a dissolução do TCP e a precipitação de *apatita* uma vez que estas são as únicas fases cristalinas observadas durante toda a cura. No entanto, para o TCP-II verifica-se que nas primeiras 24 horas ocorre somente a dissolução do  $\alpha$ -TCP, pois a intensidade dos picos de  $\alpha$ -TCP diminui com o passar do tempo e os picos de *apatita* apenas se tornam visíveis após 72 horas de reação.

Por outro lado, para o TCP-III após 24 horas de ensaio os picos de *apatita* já estão presentes e os de  $\alpha$ -TCP já tiveram sua intensidade reduzida a quase 80%. Estes resultados estão de acordo com o ensaio da evolução do pH descrito na Figura 4.37; ou seja o processo de dissolução do TCP e precipitação da *apatita* ocorrem de maneira mais rápida para o TCP-III que para o TCP-II.

A taxa com a qual a intensidade do pico de DRX referente ao plano cristalográfico (1 0 7) do  $\alpha$ -TCP decresce é diferente nas duas amostras. Após 4 horas de reação, a intensidade decresceu 30% para o TCP-III e 13% para o TCP-II. Esta discrepância é observada durante todo o processo de cura dos cimentos conforme ilustra a Figura 4.41. Um fato interessante é que mesmo tendo uma cinética de reação mais lenta o cimento dopado com silício termina a reação cura no mesmo tempo que o cimento sem silício, após sete dias de reação. Este fato entraria em discordância com os resultados apresentados na Figura 4.35, no entanto, é importante ressaltar que a preparação dos dois cimentos ocorreu de maneiras diferentes. Os cimentos c-TCP-II e c-TCP-III foram moldados e mantidos em um ambiente com aproximadamente 100% de umidade relativa (dessecador com água) durante 24h (amostras “sem FCS” da Figura 4.35). Por outro lado, as amostras do estudo cinético foram imersas em solução de Ringer logo após serem moldas levando, com certeza, a uma maior conversão  $\alpha$ -TCP  $\rightarrow$  *apatita* como foi de fato observado. Assim como nos difratogramas de raios X da Figura 4.35, na Figura 4.40 é possível observar no TCP-III após 168 horas de reação a presença de picos de  $\beta$ -TCP referentes a 8% em massa da amostra.



**Figura 4.40 - Evolução da reação de cura (a) TCP-II e (b) TCP-III. Observa-se a menor taxa de conversão  $\alpha$ -TCP  $\rightarrow$  apatita que ocorre para o TCP-II. Nas primeiras 72 horas não se evidencia a precipitação de apatita para o TCP-II enquanto que para o TCP-III logo após 2h já é possível evidenciar picos de apatita.**



**Figura 4.41 - Evolução com o tempo de reação de cura da intensidade do pico (1 0 7) do  $\alpha$ -TCP.**

A taxa de conversão do  $\alpha$ -TCP em função do tempo,  $\alpha(t)$ , está demonstrada para o TCP-II e TCP-III na Figura 4.42. Os dados experimentais de ambos os cimentos (Tabela 4.17) foram ajustados segundo o modelo proposto por Ginebra e colaboradores (1997) para o cimento de  $\alpha$ -TCP (Equação 4.2). Para o TCP-II verifica-se que a constante de tempo,  $k$ , é quase quatro vezes menor que para o TCP-III ( $0,014 \text{ h}^{-1}$  e  $0,048 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente) mesmo após normalização dos valores pela área superficial de cada pó (Tabela 4.17). Estes resultados confirmam a evidência de que o silício reduz a velocidade da reação de cura do cimento ósseo.

$$\alpha(t) = 1 - e^{-k \cdot t}$$

**Equação 4.2**

É interessante ressaltar que o ajuste obtido por Ginebra e colaboradores (1997) retornou uma constante de tempo normalizada pela área superficial do pó igual a  $0,078 \text{ g/m}^2\text{h}$  enquanto que o valor obtido para o TCP-III foi de  $0,090 \text{ g/m}^2\text{h}$ . Apesar de ambos os materiais serem compostos majoritariamente de  $\alpha$ -TCP, o material estudado no trabalho de Ginebra apresenta uma quantidade de  $\beta$ -TCP aproximadamente duas vezes maior que a quantidade presente no TCP-III (17% contra 8%). Este fato pode ser uma justificativa para a maior reatividade do TCP-III já que o  $\beta$ -TCP é uma fase insolúvel em soluções aquosas e sua presença interfere nos processos de dissolução do TCP e precipitação de *apatita* bem como alteram as relações de intensidade dos picos de difração de raios X.

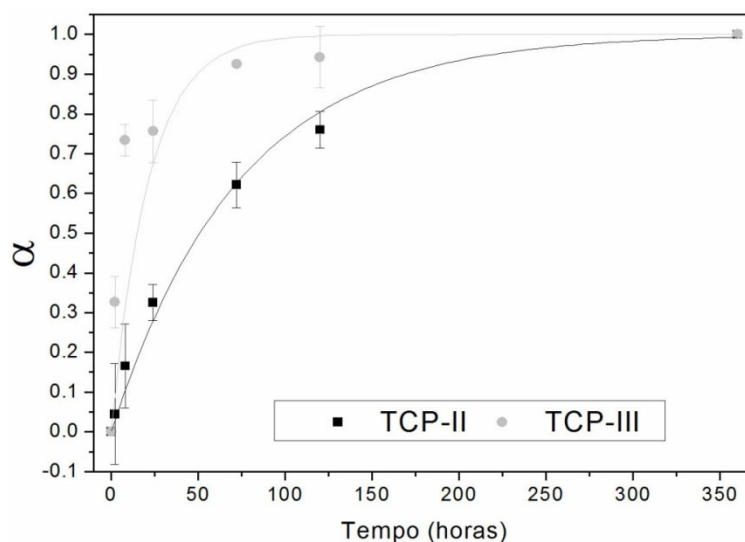


Figura 4.42 - Comparativo da taxa de conversão do  $\alpha$ -TCP em função do tempo para o TCP-II e o TCP-III. Apesar do silício reduzir a velocidade da reação de cura do cimento ósseo ambos os cimentos atingiram 100% de conversão  $\alpha$ -TCP $\rightarrow$ apatita.

Tabela 4.16 - Taxa de reação dos dois cimentos em função do tempo.

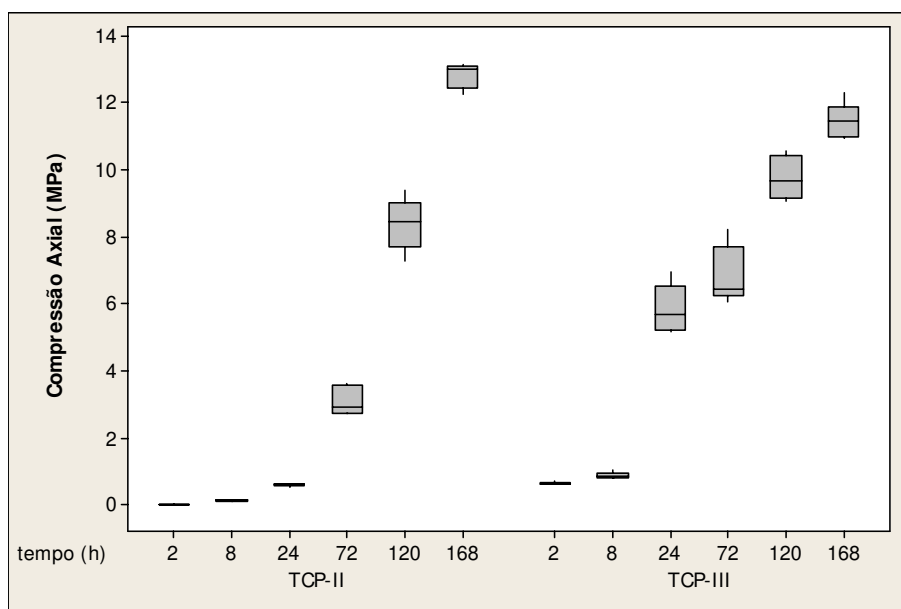
Tempo (horas)	TCP-II	TCP-III
0	0,00	0,00
2	0,04 $\pm$ 0,127	0,33 $\pm$ 0,064
8	0,17 $\pm$ 0,106	0,73 $\pm$ 0,039
24	0,32 $\pm$ 0,045	0,76 $\pm$ 0,078
72	0,62 $\pm$ 0,057	0,93 $\pm$ 0,006
120	0,76 $\pm$ 0,046	0,94 $\pm$ 0,077
168	0,99 $\pm$ 0,001	0,99 $\pm$ 0,009
360	1,00	1,00

Tabela 4.17 – Constante do tempo após ajuste exponencial dos pontos experimentais e normalização dos valores pela área superficial de cada pó. Verifica-se que de fato o TCP-II apresenta velocidade de reação 4 vezes menor que o TCP-III.

Amostra	k (h <sup>-1</sup> )	Área BET (m <sup>2</sup> /g)	K <sub>norm.</sub> (g/m <sup>2</sup> h)
TCP-II	0,014 $\pm$ 1.10 <sup>-3</sup>	0,6202 $\pm$ 6.10 <sup>-3</sup>	0,023
TCP-III	0,048 $\pm$ 6.10 <sup>-3</sup>	0,5322 $\pm$ 4.10 <sup>-3</sup>	0,090
$\alpha$ -TCP (Ginebra, et al., 1997)	0,078 $\pm$ 3.10 <sup>-2</sup>	1,0000 $\pm$ 3.10 <sup>-3</sup>	0,078

A menor reatividade do TCP-II pode também ser observada na evolução da resistência mecânica em função do tempo conforme ilustrado na Figura 4.43. Os dados obtidos estão de acordo com o observado na análise de difração de raios X. Até 72 horas quase não ocorre a precipitação de *apatita* no cimento baseado no TCP-II ou, então os cristais precipitados são tão

pequenos que este cimento não tem um valor significativo de resistência mecânica. Com o passar do tempo, conforme a precipitação de *apatita* torna-se mais pronunciada, verifica-se que o valor da resistência mecânica aumenta rapidamente e atinge um valor final maior que o obtido para o TCP-III que por sua vez incrementa a sua resistência mecânica logo nas primeiras horas de cura, como era de se esperar tendo em vista que sua taxa de conversão após 8 horas é aproximadamente 70%. Os valores obtidos para a resistência à compressão axial estão resumidos no Tabela 4.18.



**Figura 4.43 - Evolução da resistência mecânica em função do tempo. O TCP-II apresenta taxa de evolução de resistência mecânica menor que o TCP-III, porém após 168h atinge um valor de resistência à compressão axial maior que o atingido para o TCP-III.**

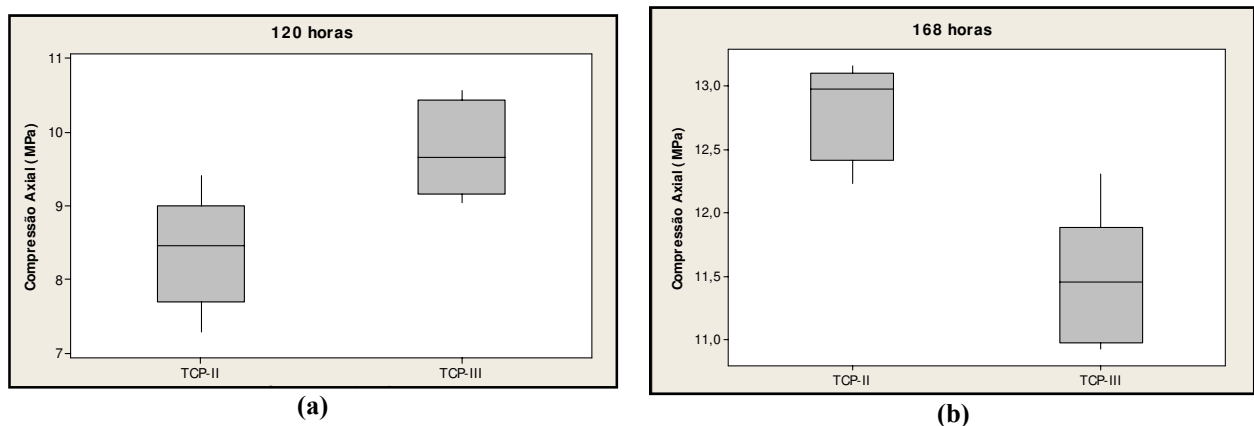
**Tabela 4.18 - Evolução da resistência mecânica durante a reação de cura dos cimentos.**

Tempo (h)	TCP-II (MPa)	TCP-III (MPa)
2	n.d.	0,64 ± 0,04
8	0,12 ± 0,02	0,88 ± 0,09
24	0,58 ± 0,03	5,84 ± 0,73
72	3,10 ± 0,43	6,85 ± 0,85
120	8,37 ± 0,77	9,77 ± 0,65
168	12,80 ± 0,38	11,44 ± 0,54

n.d. = não determinado

De maneira semelhante ao ocorrido no item 4.4.1, o TCP-II teve valores de resistência à compressão menores nos primeiros momentos do estudo cinético. Este fato é consequência da menor conversão  $\alpha$ -TCP  $\rightarrow$  *apatita* que ocorre devido à presença do silício e do ácido cítrico. No

entanto, verifica-se que para tempos mais longos, a partir de 120 horas, a resistência mecânica do TCP-II praticamente se iguala a do TCP-III, Figura 4.44 a, e atinge um valor maior após 168 horas, Figura 4.44 b. Todas as comparações de valores foram realizadas utilizando o teste “2sample-t” com nível de confiança de 95%. A discrepância dos valores de resistência mecânica para 24 e 168 horas obtidos neste item e no item 4.4.1 é devido ao procedimento empregado. No estudo da cinética da reação a resistência mecânica foi medida com os corpos de prova ainda úmidos e no item 4.4.1 os corpos de provas já estavam secos fato que provavelmente resulta em maiores valores de resistência à compressão.



**Figura 4.44 - Comparação da resistência à compressão dos dois materiais (a) 120 horas e (b) 168 horas. Amostras são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) com 95% de confiança.**

As micrografias das amostras a 24, 72 e 168 horas de reação (Figura 4.45 a Figura 4.47) confirmam os resultados obtidos para a cinética da reação de cura do TCP-II e do TCP-III. Apesar de nos difratogramas de raios X (Figura 4.40) a presença de picos de *apatita* para o TCP-II não ser observada até 72 horas de reação, nas micrografias eletrônicas de varredura verifica-se que após 24 horas (Figura 4.45) já é possível observar alguns cristais precipitados. No entanto, estes cristais estão presentes em quantidades e em tamanhos muito pequenos para poderem conferir qualquer resistência mecânica ao material como, de fato, foi observado no ensaio mecânico para as amostras de TCP-II até 72 horas.

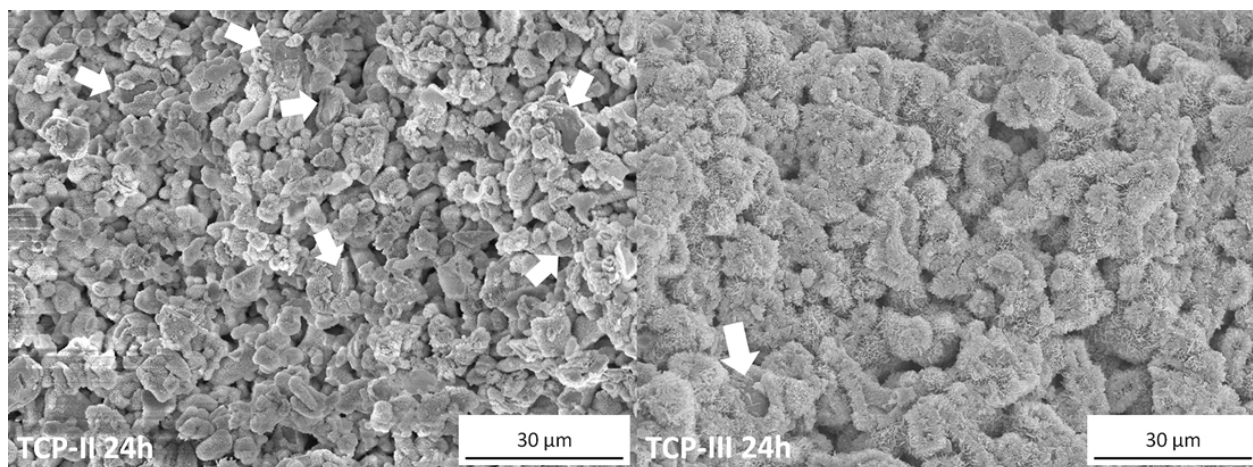


Figura 4.45 – Micrografias do TCP-II e TCP-III após 24 horas de reação. Setas brancas indicam grãos de TCP sem reagir. Apesar de não se observar picos referentes a apatita no difratograma de raios X do TCP-II após 24h de reação, a transformação  $\alpha$ -TCP $\rightarrow$ apatita já se iniciou, porém os cristais de apatita são demasiados pequenos em relação às partículas de  $\alpha$ -TCP e por isso não são identificados na DRX.

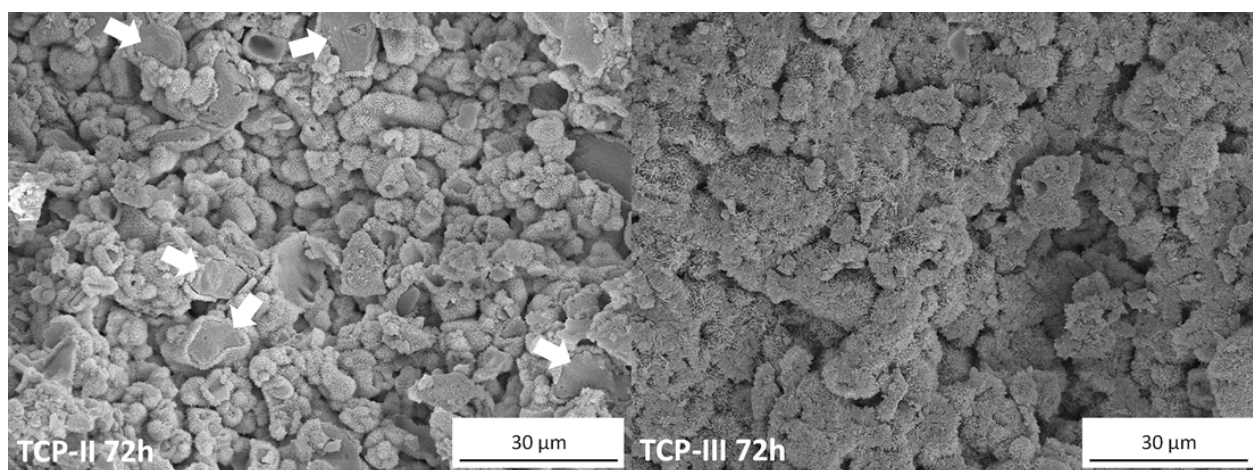


Figura 4.46 - Micrografias do TCP-II e TCP-III após 72 horas de reação. Para o TCP-II ainda é possível observar partículas de  $\alpha$ -TCP sem reagir.

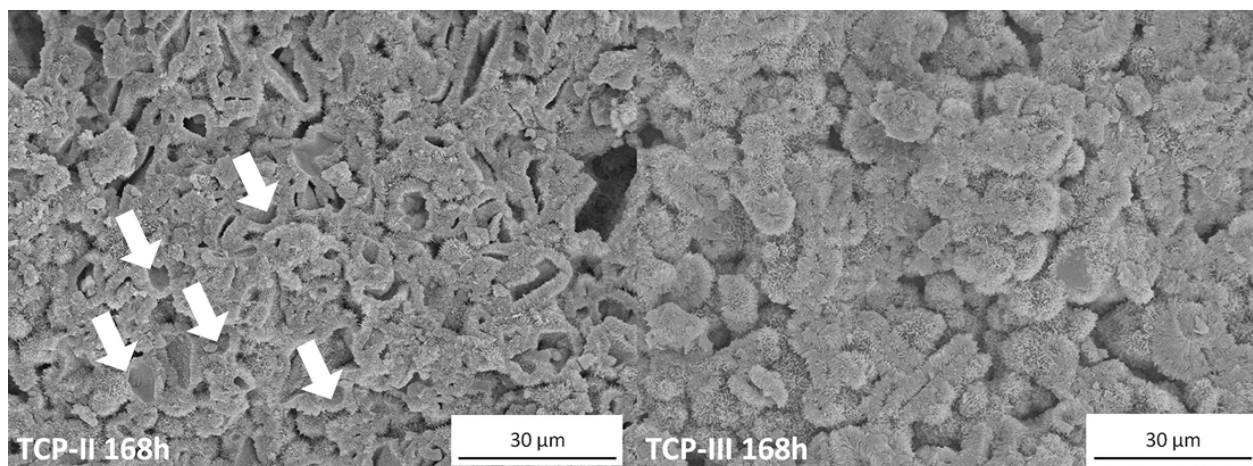
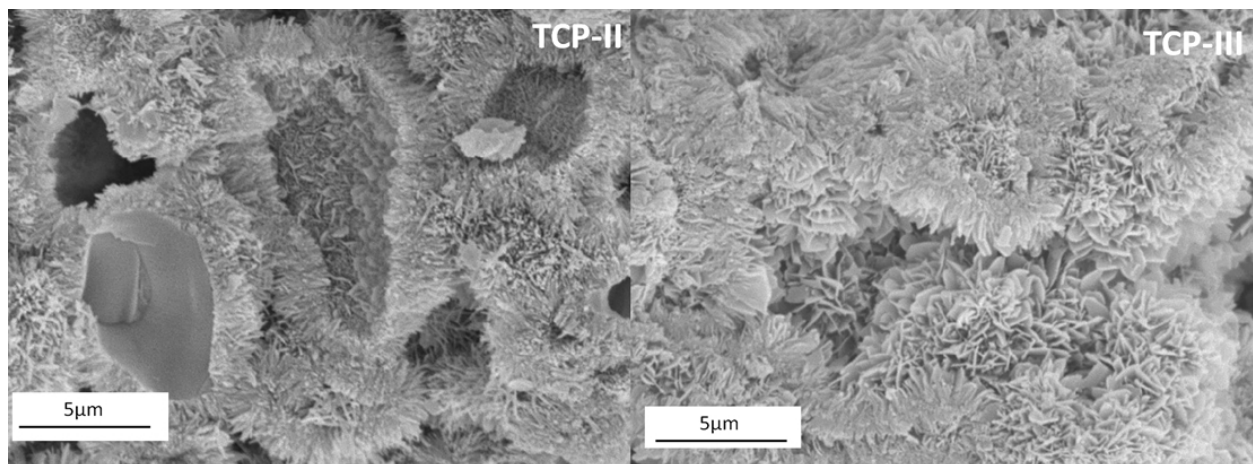


Figura 4.47 - Micrografias do TCP-II e TCP-III após 168 horas de reação. Setas brancas indicam “occos” formados devido ao fato da transformação  $\alpha$ -TCP $\rightarrow$ apatita ocorrer na superfície das partículas de TCP.

No caso do TCP-III verifica-se que após 24 horas de reação quase não se observa grãos de  $\alpha$ -TCP sem reagir significando que toda superfície do pó já foi coberta com uma camada de *apatita* e o material já apresenta resistência mecânica advinda do entrelaçamento destas agulhas.

Conforme a reação de cura evolui, as agulhas de *apatita* aumentam de tamanho tanto para o TCP-II como para o TCP-III. No entanto, para o TCP-II ainda se observa partículas de TCP sem reagir conforme indicam as setas brancas da Figura 4.46. Após 168 horas os dois materiais já completaram a reação de cura e somente agulhas de *apatita* podem ser observados (Figura 4.47). Como a dissolução do  $\alpha$ -TCP e a precipitação de *apatita* ocorrem na superfície da partícula de TCP, após o termino da reação de cura é possível observar que no interior da capa de *apatita* precipitada formaram-se regiões “ocas” como indicam as setas brancas da Figura 4.47

Como observado na Figura 4.38 existe uma clara diferença entre os tamanhos de cristais de *apatita* entre o TCP-II e o TCP-III (Figura 4.48) reforçando a idéia de o silício inibe o crescimento de cristais de *apatita* durante o processo de precipitação conforme publicado em um trabalho de Tanizawa e colaboradores (1995).

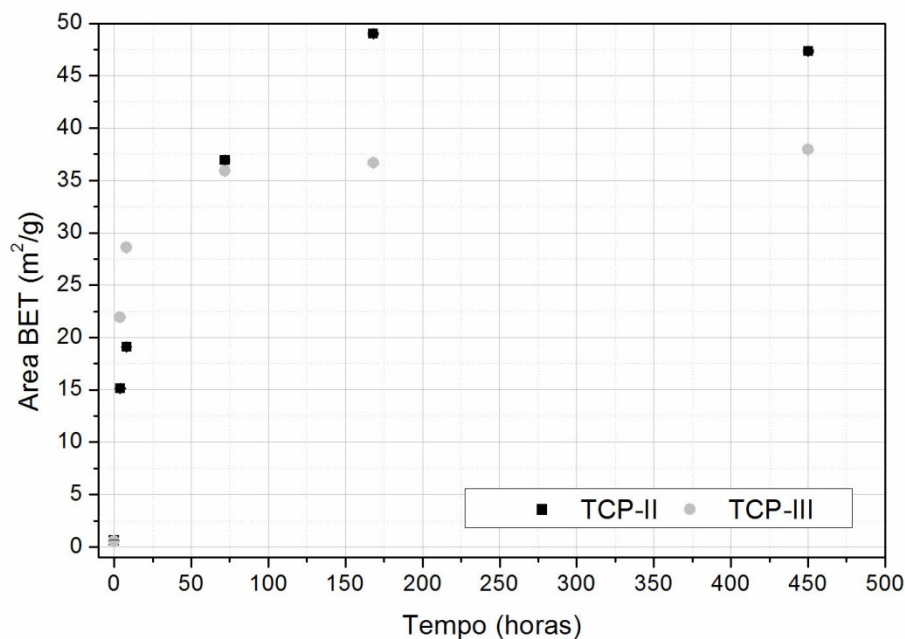


**Figura 4.48 - Detalhes dos cristais de *apatita* dos cimentos curados durante 168 h. Cristais do TCP-II são menores que os cristais do TCP-III. Confirmação do indício de que o silício inibe o crescimento de cristais.**

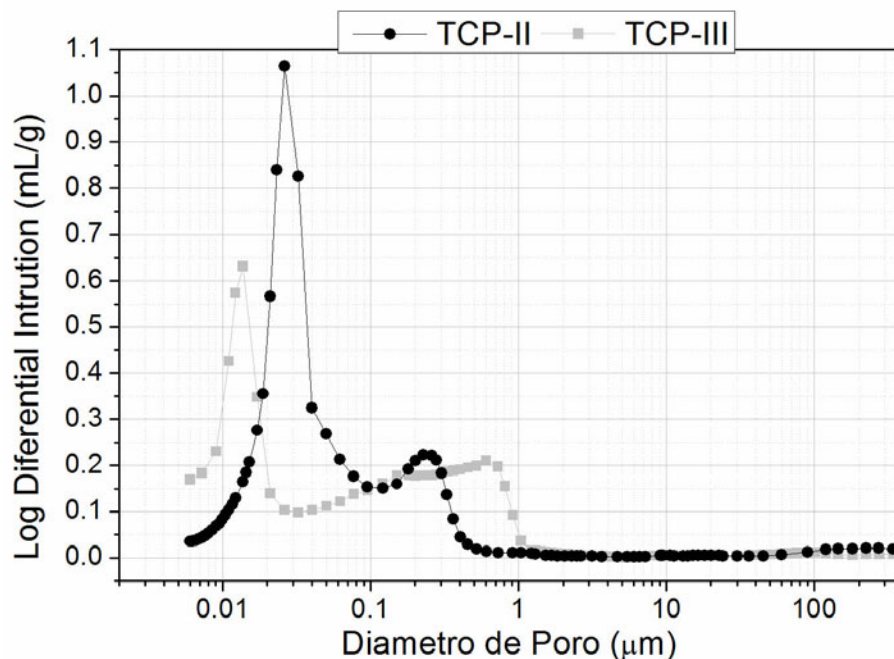
A diferença no tamanho de cristais também é evidenciada no gráfico da Figura 4.49 que mostra a evolução da área superficial em função do tempo de reação. Esta propriedade é inversamente proporcional ao tamanho de cristais presentes em uma amostra; ou seja, quanto menor o cristal maior a sua área superficial e vice e versa. Verifica-se que nos primeiros momentos, até aproximadamente 24 horas, como o TCP-III apresenta uma reação de cura mais



veloz, sua área superficial cresce mais rapidamente atingindo o valor de  $28,5887 \pm 0,1032 \text{ m}^2/\text{g}$  após 8 horas de reação, enquanto que o TCP-II atingiu apenas o valor de  $19,0974 \pm 0,0474 \text{ m}^2/\text{g}$ . No entanto, depois de 72 horas, o TCP-II passa a ter um maior crescimento de área superficial atingindo um valor final de  $49,0131 \pm 0,1095 \text{ m}^2/\text{g}$  contra  $36,6767 \pm 0,1099 \text{ m}^2/\text{g}$  para o TCP-III. Os baixos valores de área superficial obtidos para o TCP-II nos primeiros momentos de reação são justificados pela baixa taxa de conversão  $\alpha\text{-TCP} \rightarrow \text{apatita}$  resultando na interferência dos grãos de TCP no valor da área superficial, porém ao final da reação, como os cristais de *apatita* são menores para o TCP-II, sua área superficial é maior. Outro fator que também pode ter contribuído para a maior área superficial do TCP-II é a sua maior porosidade total 58,7% contra 53,2% para o TCP-III conforme demonstra a Figura 4.50.



**Figura 4.49 - Evolução da área superficial BET em função do tempo de cura dos TCPs. Além de apresentar taxa de crescimento de área superficial menor o TCP-II atingiu um maior valor de área superficial que é justificado pelo menor tamanho dos cristais de apatita formados e a maior porosidade final do cimento.**



**Figura 4.50 - Distribuição do tamanho de poros do TCP-II e TCP-III ao final do ensaio cinético. O TCP-II resultou em um cimento ligeiramente mais poroso que o TCP-III.**

#### 4.4.3 Estudo Comparativo entre a cinética do TCP-I, TCP-II e TCP-III

Neste item foram comparados os resultados obtidos para a cinética da reação de cura dos cimentos baseados no TCP-II e no TCP-III com o material obtido pelos mesmos protocolos que o TCP-I, porém com distribuição granulométrica e área superficial diferentes. Esta variabilidade de propriedades é justificada pela variação que existe entre os lotes dos reagentes comerciais empregados como discutido no item 4.1. Este material será denominado TCP-I-2 e suas propriedades e parâmetros de síntese e processamento estão resumidas na Tabela 4.19. A relação líquido pó utilizada foi a mesma que a do TCP-II e do TCP-III bem como todo o processo de obtenção e caracterização das amostras que foi descrito no item 3.5.3.

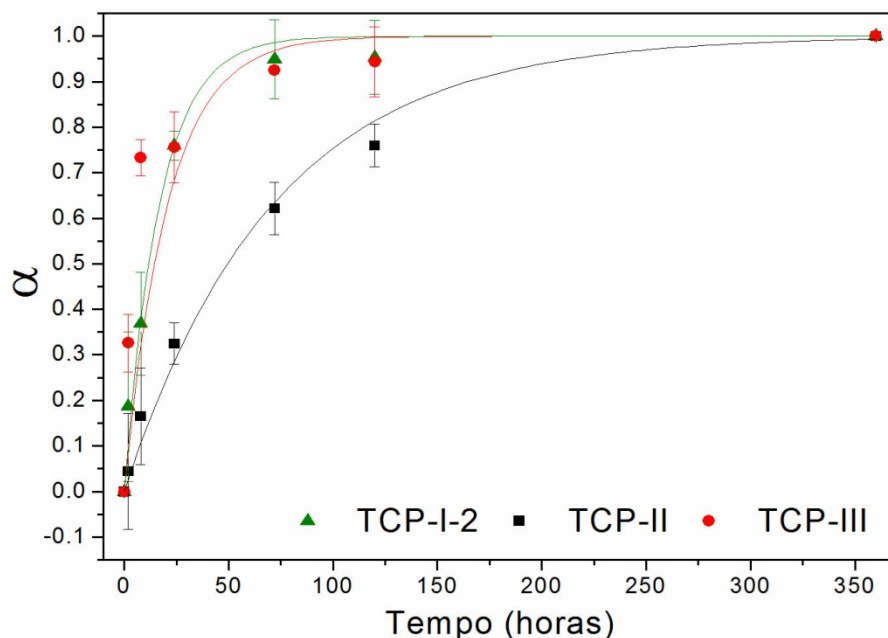
**Tabela 4.19 - Parâmetros de processamento e propriedades do TCP-I-2.**

Propriedades	Valor
Quantidade de Mg na mistura reacional	0,4% em massa
Quantidade de Si na mistura reacional	1,27% em massa
Temperatura de sinterização	1400 °C
Tempo de moagem	168 horas
Relação (Ca+Mg)/(P+Si)	1,51
Diamêtro médio de partícula	$D_{med} = 4,125 \mu m$
Distribuição granulometria 10% < d < 90%	0,695 – 10,32 $\mu m$
Área Superficial BET	$1,7265 \pm 0,0148 \text{ m}^2/\text{g}$
Densidade absoluta	$2,8832 \pm 0,007 \text{ g/cm}^3$

Pelo fato do TCP-I-2 apresentar área superficial quase três vezes maior que o TCP-II e o TCP-III a sua reação de cura aconteceu de maneira mais acelerada, como demonstra a Tabela 4.20 que apresenta os valores de velocidade de reação,  $k \text{ (h}^{-1}\text{)}$  e o gráfico da Figura 4.51 que mostra a taxa de reação para as três amostras. Após a normalização dos valores das constantes de tempo,  $k_{norm.} \text{ (g/m}^2\text{h)}$ , pela área superficial de cada pó verifica-se que a velocidade de reação é, em ordem crescente, TCP-II < TCP-II-2 < TCP-III conforme os valores da Tabela 4.20.

**Tabela 4.20 - Constante de tempo após ajuste exponencial e normalização pela área superficial BET para os três TCPs. A área superficial tem grande influência na cinética da reação de cura do cimento de  $\alpha$ -TCP.**

Amostra	$k \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Área BET $\text{(m}^2\text{/g)}$	$k_{norm.} \text{ (g/m}^2\text{.h)}$
TCP-I-2	$0,059 \pm 2.10^{-3}$	$1,7265 \pm 0,0148$	0,034
TCP-II	$0,014 \pm 1.10^{-3}$	$0,6202 \pm 0,0062$	0,023
TCP-III	$0,048 \pm 4.10^{-3}$	$0,5322 \pm 0,0042$	0,090



**Figura 4.51 - Comparativos das taxas de conversão de  $\alpha$ -TCP em função do tempo para os três TCPs. Sem normalização pela área superficial, observa-se que o TCP-I-2 apresenta cinética semelhante ao TCP-III.**

A diferença que existe entre os valores da constante de tempo normalizada para o TCP-II e o TCP-I-2 é explicada pelo fato de que estes materiais foram obtidos utilizando-se reagentes e protocolos de processamento diferentes apesar de ambos apresentarem a mesma quantidade de silício em sua estrutura. A maior reatividade do TCP-I-2 também é observada nos difratogramas de raios X da Figura 4.52. Observa-se que para o TCP-I-2 o aparecimento dos picos de *apatita* iniciam-se logo no início da reação de cura (4h) enquanto que para os outros dois materiais estes picos ficam somente visíveis após 72h no caso do TCP-II e 16h no caso do TCP-III. Além disso, a taxa com a qual o pico a aproximadamente  $30,7^\circ$  ( $2\theta$ ) referente ao plano cristalino (107) do  $\alpha$ -TCP tem sua intensidade diminuída também é maior que quando comparada com os outros dois materiais (Figura 4.53).

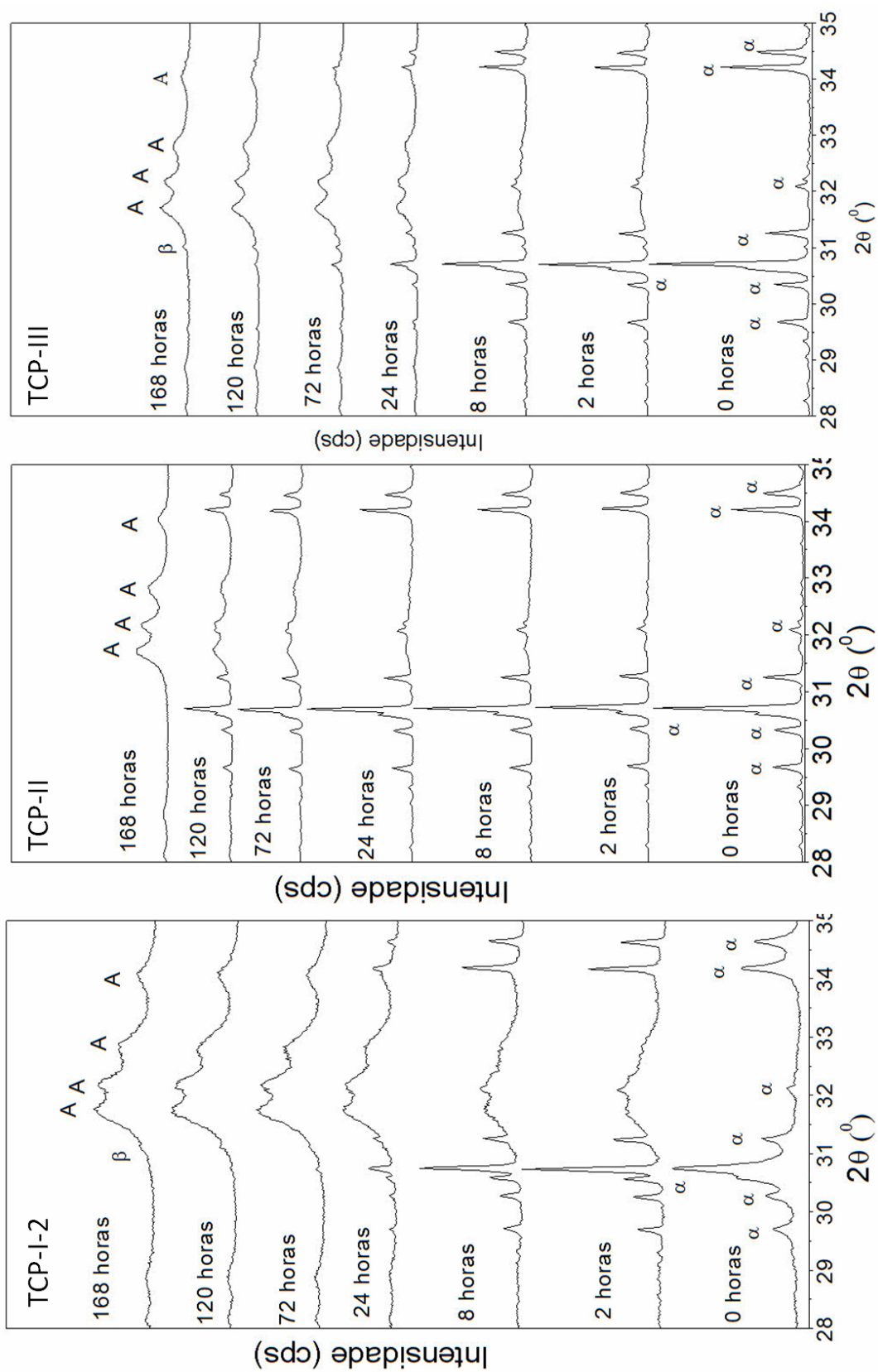
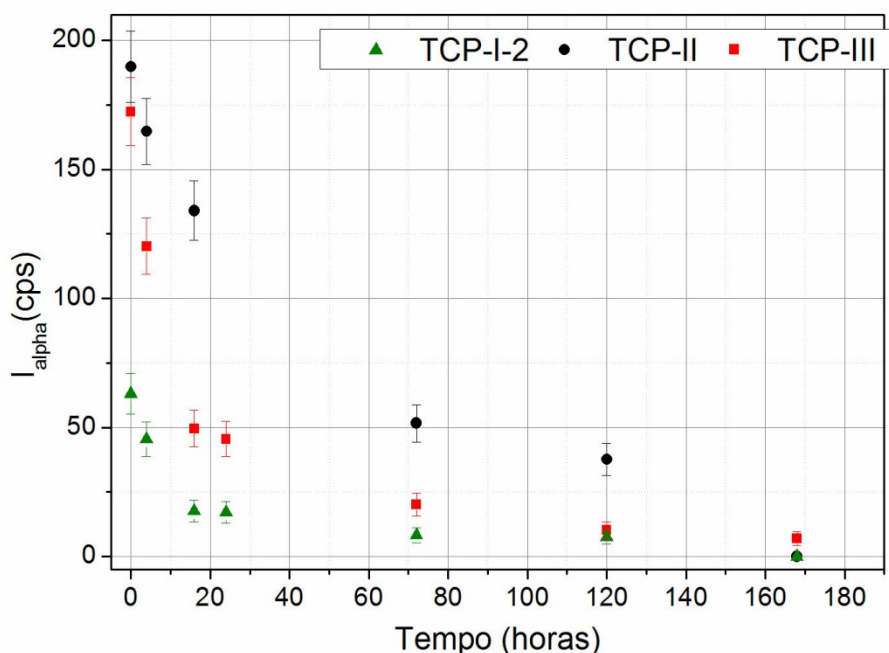


Figura 4.52 - Evolução da cinética da reação de cura: (a) TCP-I-2; (b) TCP-II; e (c) TCP-III.

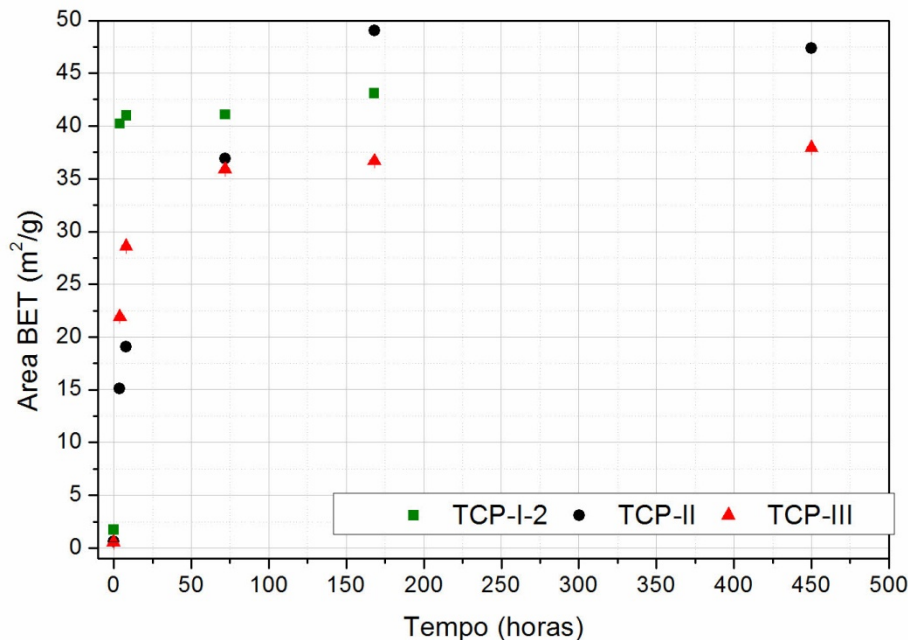


**Figura 4.53 - Evolução da intensidade do pico (107) do  $\alpha$ -TCP em função do tempo para os três TCPs.**

A cinética mais acelerada da reação de cura do TCP-I-2 está também visível quando se observa a evolução da área superficial em função do tempo de reação. Para este material a área superficial de partida é igual a 1,7 m<sup>2</sup>/g e aumenta rapidamente para 40,2 m<sup>2</sup>/g nas quatro primeiras horas de reação e permanece ao redor deste valor até o final do período de observação, 168 horas. É possível verificar que os dois materiais dopados com silício resultaram em áreas superficiais maiores que o material não dopado, adicionando mais um indício que o silício pode inibir o crescimento dos cristais de *apatita*. Os valores das áreas superficiais das amostras em função do tempo estão resumidos na Tabela 4.21 e no gráfico da Figura 4.54.

**Tabela 4.21 - Evolução da área superficial em função do tempo para os três TCPs.**

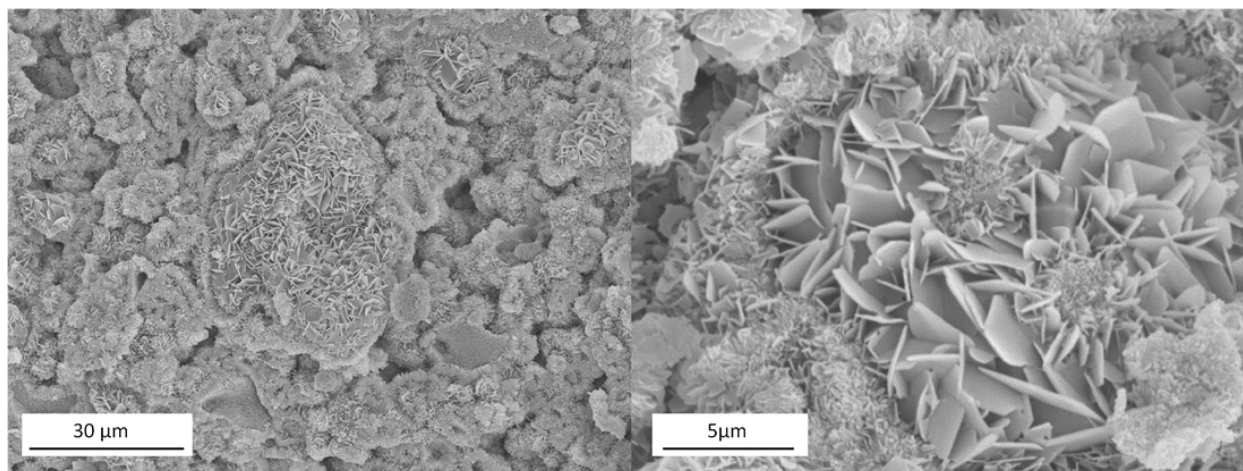
Tempo (horas)	Área Superficial BET (m <sup>2</sup> /g)		
	TCP-I-2	TCP-II	TCP-III
0	1,7265 ± 0,0148	0,6202 ± 0,0062	0,5322 ± 0,0042
4	40,2248 ± 0,0892	15,1303 ± 0,0394	21,9338 ± 0,0841
8	41,0076 ± 0,0636	19,097 ± 0,0474	28,588 ± 0,1032
24	41,0874 ± 0,074	36,917 ± 0,0973	35,898 ± 0,1090
72	43,0924 ± 0,075	49,0131 ± 0,1095	36,6767 ± 0,1099
168	Não determinado	47,347 ± 0,1107	37,924 ± 0,1095



**Figura 4.54 - Evolução da área superficial BET durante a cura do cimento para os três TCPs.**

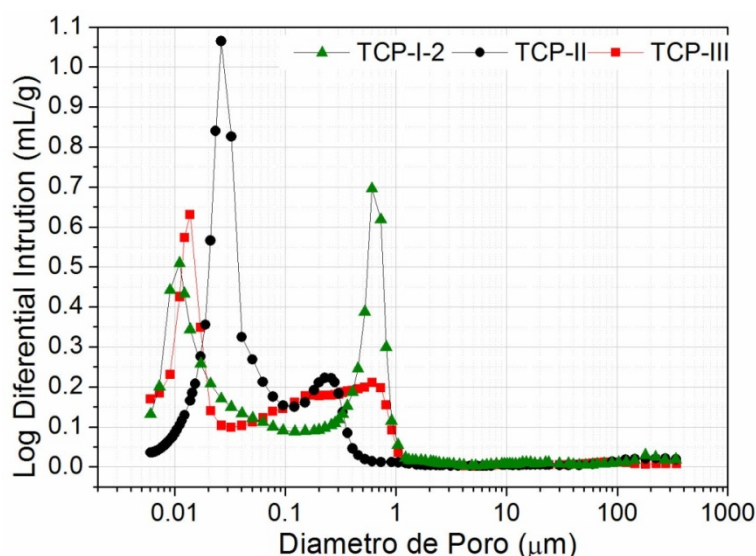
Quando se observa a micrografia dos cristais do TCP-I-2 após 168 horas de cura (Figura 4.55), verifica-se que a sua estrutura não é homogênea. Existem cristais pequenos e cristais grandes. Isto pode ser devido ao fato de que como a reação ocorre muito rapidamente os cristais de *apatita* tiveram tempo suficiente para iniciar o processo de crescimento. Esta observação seria contraditória ao fato de que o silício inibe o crescimento de grãos de *apatita* durante a cura do cimento, porém na micrografia da Figura 4.55 (a) verifica-se também que existem cristais de *apatita* pequenos e similares aos formados no TCP-II, o que leva a outro tipo de discussão: se o silício está distribuído de maneira uniforme durante a precipitação da *apatita*. Ou se este elemento está de fato precipitando junto com a fase de *apatita*.





**Figura 4.55 - Micrografias do cimento de TCP-I-2 após 168 horas de cura em vários aumentos. Verifica-se que a morfologia do TCP-I-2 é heterogênea e apresenta cristais de apatita pequenos e grandes.**

Comparando-se com as micrografias que foram explicitadas na Figura 4.48, verifica-se que alguns dos cristais são maiores que os apresentados para o TCP-II e para o TCP-III, no entanto, a sua área superficial está em um valor intermediário, ou seja, é maior que o valor do TCP-III e menor que o valor do TCP-II. Esta observação é explicada primeiramente pelo fato da estrutura não ser homogênea e apresentar tantos cristais grandes como cristais pequenos e também pela sua maior porosidade, o que faz com que o volume de gás adsorvido na superfície do cimento seja maior, elevando o valor de sua área superficial. Na Figura 4.56, verifica-se que o TCP-I-2 apresenta poros com maior diâmetro e também em maior quantidade.



**Figura 4.56 - Porosidade dos três TCPs após 168 horas de reação de cura.**



Baseado nos resultados obtidos neste estudo comparativo de cinética, nas propriedades e nos protocolos de síntese e processamento de cada um dos pós de TCP pode-se inferir algumas conclusões:

1) O silício não está distribuído de maneira homogênea na estrutura do TCP-I uma vez que durante a síntese a temperatura utilizada é demasiadamente elevada. Como o sistema utilizado apresenta muitas impurezas, principalmente Mg, as relações entre as fases, bem como as temperaturas de transformação são totalmente alteradas podendo levar a formação de uma fase líquida durante o processo de queima. Esta fase líquida poderia influenciar de alguma maneira a substituição por silício alterando completamente a estequiometria e a homogeneidade do TCP formando cristais com silício e cristais sem silício. Isto explicaria a grande heterogeneidade de tamanhos de cristais na amostra após 168 horas de cura e a alta velocidade de reação. Como a área superficial é elevada os grãos que não contem silício reagiriam rapidamente elevando a taxa de conversão, enquanto que os que estão dopados com silício limitariam a reação. Esta heterogeneidade não pode ser determinada pela FRX quantitativa uma vez que este método não distingue as fases cristalinas, mas sim determina a quantidade total de Ca, P e Si presente no sistema;

2) O TCP-II é sintetizado em uma temperatura mais baixa, 1200°C. Nesta temperatura, pelo diagrama de fases do sistema wollastonita-TCP (Figura 3.3), não ocorre a formação de fase líquida, conseqüentemente a substituição por silício ocorre de maneira mais homogênea e na forma de solução sólida. O grão de TCP estabilizado com silício é menos solúvel e este fato explicaria a menor velocidade de conversão do TCP-II e a maior homogeneidade dos tamanhos de cristais após a cura;

3) Por meio da análise da evolução do pH com o tempo (o comparativo das três amostras está na Figura 4.57, a seguir) verifica-se que o silício altera a solubilidade do TCP e este comportamento é observado tanto no TCP-II como no TCP-I-2. No entanto, observando-se os valores de pH logo nos primeiros momentos do ensaio, verifica-se que o valor inicial para o TCP-I-2 é muito próximo ao do TCP-III (7,68 e 7,62, respectivamente) e somente após 1 hora se inicia uma subida um pouco mais acelerada até alcançar o valor máximo de 8,39 após 48 horas. Valor este que é

igual ao atingido pelo TCP-II. É interessante observar que o TCP-II atinge o seu valor máximo no mesmo intervalo de tempo que o TCP-I-2, porém com uma taxa de elevação maior. Isto acontece provavelmente pelo o que foi explicitado anteriormente em relação à heterogeneidade do TCP-I-2. Ou seja, a subida do pH para TCP-I-2 é mais lenta porque provavelmente é um processo influenciado tanto pelo TCP dopado com silício como pelo TCP sem dopagem.

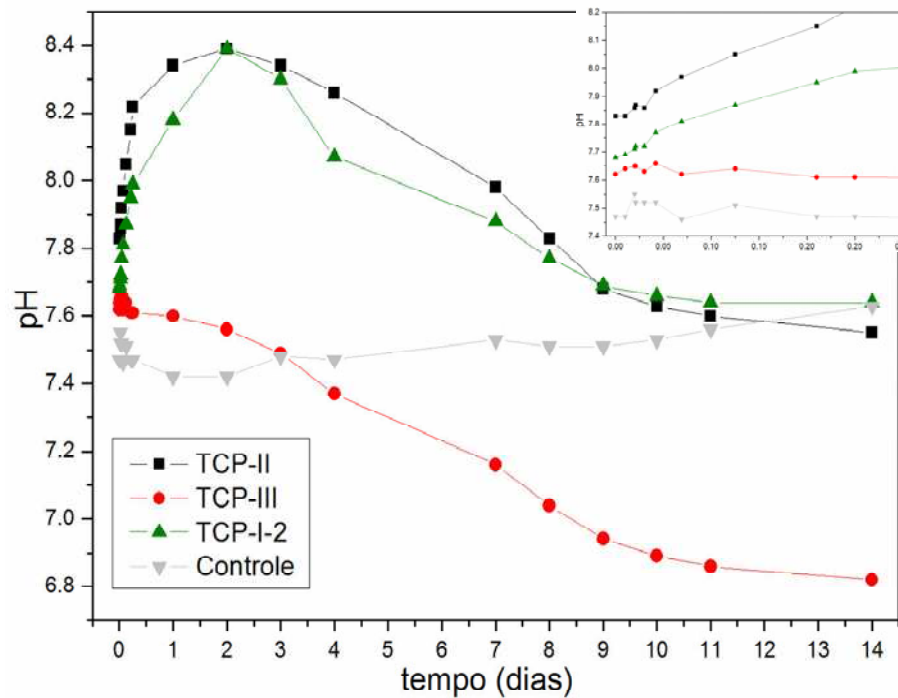


Figura 4.57 - Comparação da evolução do pH para os três TCPs.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Os objetivos propostos para este trabalho foram atingidos. Foi possível desenvolver um novo cimento ósseo baseado no Si- $\alpha$ -TCP que apresentou biocompatibilidade “in vivo” e bioatividade em FCS mostrando o grande potencial deste material para futuras aplicações clínicas. No entanto, ainda é necessário um aprimoramento em suas propriedades mecânicas que é mais baixa que o valor normalmente relatado na literatura. Isto será possível por meio da utilização de uma menor relação líquido-pó que será alcançada após a alteração do tempo de moagem para se conseguir um pó de Si- $\alpha$ -TCP com maior área superficial que resultará em uma maior velocidade de reação de cura e, conseqüentemente, diminuirá a quantidade de líquido necessária.

Além disso, é importante ressaltar que a utilização de reagentes sintetizados em laboratório com elevado teor de pureza permitiu a reprodutibilidade do processo de obtenção de um Si- $\alpha$ -TCP e um  $\alpha$ -TCP com quantidades de  $\beta$ -TCP reduzidas (4 e 8% em massa, respectivamente) e com o emprego de temperaturas de tratamento térmico mais baixas.

Neste trabalho foram desenvolvidas técnicas simples e eficientes para a síntese de fosfatos de cálcio que futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de novos produtos para a ortopedia que apresentam baixo custo e sejam mais acessíveis à população brasileira.

## 5.1 Sugestões para Próximos Trabalhos

### 5.1.1 Reagentes Livres de Impurezas para a Síntese de TCP

- Verificar a possível influência de outras impurezas na temperatura de transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$ ; e
- Investigar se o silício também inibe o crescimento de grão durante a síntese do TCP.

### 5.1.2 Fosfato Tricálcico Dopado com Silício

- Determinar a quantidade ideal de silício para maximizar a relação entre as propriedades de reatividade do TCP, biocompatibilidade e resistência mecânica do cimento;
- Investigar de maneira quantitativa a solubilidade do  $\alpha$ -TCP dopado com silício e as alterações químicas que o silício provoca na reação de cura do cimento de  $\alpha$ -TCP;
- Padronizar a melhor combinação de distribuição granulométrica, área superficial e relação líquido-pó a fim de se reduzir a influência do silício na reatividade do  $\alpha$ -TCP;
- Estudar o cimento com silício com outros aditivos para tentar inibir a menor reatividade do pó;
- Investigar algum aditivo que aumente a resistência mecânica do cimento;
- Ensaios “in vivo” dos cimentos obtidos com reagentes livres de Mg; e
- Investigar se de fato o silício continua incorporado à *apatita* após a cura do cimento.

### 5.1.3 “Scaffolds” (ANEXO B)

- Testar outras combinações de porcentagem de agente porogênico e temperatura de cura do cimento a fim de se conseguir a maior porosidade possível e com tamanhos adequados para a engenharia de tecidos;
- Quantificar a real influência do peróxido de hidrogênio na reatividade dos pós de TCP;
- Buscar alternativas para melhorar a resistência mecânica final do material; e
- Realizar ensaios “in vitro” e “in vivo” dos “scaffolds”.

## REFERÊNCIAS

**10993-5, ISO. 1999.** Avaliação Biológica de Produtos Sanitários: Ensaio de Citotoxicidade "In Vitro". 1999.

**ABC, Associação Brasileira de Cerâmica. 2002.** Informações Técnicas - Definição e Classificação. *ABC - Associação Brasileira de Cerâmica*. [Online] 2002. [Citado em: 28 de Janeiro de 2010.] [http://www.abceram.org.br/asp/abc\\_51.asp](http://www.abceram.org.br/asp/abc_51.asp).

**Albee, F. e Morrison, H. 1920.** Studies in Bone Growth. *Ann. Surg.* 1920, Vol. 71.

**Almirall, A., et al. 2004.** Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an  $\alpha$ -TCP paste. *Biomaterials*. 2004, Vol. 25.

**Ambard, A.J. e Mueninghoff, L. 2006.** Calcium phosphate cement, review of mechanical and biological properties. *J. Prosthodont.* 2006, Vol. 15.

**Arcos, D., et al. 2006.** Crystallochemistry, textural properties, and in vitro biocompatibility of different silicon-doped calcium phosphates. *Journal of Biomedical Material Research Part A*. 2006, Vol. 78A.

**ASTM-C266-04.** Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore Needles.

**Azároff, V. L. 1968.** *Elements of X ray Crystallography*. s.l.: Mc Graw-Hill Book Company, 1968.

**Barrett, R. L. e McCaughey, W. L. 1942.** The System  $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ . *Am. Mineral.* 10, 1942, Vol. 27, pp. 680-695.

**Barsoum, Michel W. 2003.** *Series in Materials Science and Engineering: Fundamentals of Ceramics*. Philadelphia : Institute of Physics Publishing Ltd., 2003. pp. 1-87, 110-135, 242-264. 0750309024.

**Bermudez, O, et al. 1994.** Development of Some Calcium Phosphate Cements from Combinations of  $\alpha$ -TCP, MCPM and CaO. *Journal of Materials in Medicine*. 1994, Vol. 5.

**Berry, E. E. 1967.** The Structure and Composition of some Calcium Deficient Apatites. *Journal of Inorganic Chemistry*. 1967, Vol. 29.

**Best, S. M., et al. 2008.** Bioceramics: Past, Present and for the Future. *Journal of the European Ceramic Society*. 2008, Vol. 28.

**Bohner, M. e Lemaitre, J. 2009b.** Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials*. 2009b, Vol. 30.

**Bohner, M. 2007.** Reactivity of calcium phosphate cements. *J. Mater. Chem.* 2007, Vol. 38.

—. **2009a.** Silicon-substituted calcium phosphate - A critical view. *Biomaterials*. 2009a, Vol. 30.

**Bohner, M., et al. 2009.** A physical approach to modify the hydraulic reactivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate powder. *Acta Biomaterialia*. 2009, Vol. 5.

**Bohner, M., et al. 2006.** Combining Particle Size Distribution and Isothermal Calorimetry Data to Determine the Reaction Kinetics of  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate-Water Mixtures. *Acta Biomaterialia*. 2006, Vol. 2.

**Bohner, M., et al. 2000.** Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*. 2000, Vol. 11.

**Bohner, M., Gbureck, U. e Barralet, J.E. 2005.** Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26.

**Brown, W. E. e Chow, L. C. 1983.** A New Calcium Phosphate Setting Cement. *J. Dent. Res.* 1983, Vol. 62.

**Brown, W. E. e Chow, L. C.. 1986.** A New Calcium Phosphate Water Setting Cement. [A. do livro] P. W. Brown. *Cement Research Progress*. Westerville, Estados Unidos : American Ceramic Society, 1986.

**Brown, W. E. e Chow, L.C. 1985.** *Dental Restorative Cement Pastes*. 4.518.430 Estados Unidos, 21 de Maio de 1985.

**Brundle, C. R. e Jr., C. A. E. e Wilson, S. 1992.** *Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films*. Greenwich : Butterworth-Heinemann, 1992.

**Burger, L., E. e Patel, V. 2007.** Calcium Phosphates as Bone Graft Extenders. *Orthopedics*. 2007, Vol. 30.

**Calister, W. D. 2002.** *Introdução, Ciência de Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. s.l. : LTC, 2002. 8521612885.

**Calvo, C. e Gopal, R. 1975.** The crystal structure of whitlockite from the palermo quarry. *Amer. Mineral.* 1975, Vol. 60, pp. 120-133. em: Mathew, Mathai e Takagi, Shozo. 2001. Structures of Biological Minerals in Dental Research. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology. 2001, Vol. 106, pp. 1035-1044.

**Camiré, C. L., et al. 2005.** Correlating Crystallinity and Reactivity in an  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26.

**Camiré, C. L., et al. 2006.** Material Characterization and In Vivo Behavior of Silicon Substituted  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate Cement. *Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials*. 2006, Vol. 76B.

**Camiré, C. L., Jegou Saint-Jean, S., et al. 2004.** Production Methodology and Reactivity of Silica Substituted  $\alpha$  phase Tricalcium Phosphate. *Congresso Mundial de Biomateriais*. 2004.

**Caram, R. 2006.** Apostila da Disciplina IM220 - Estrutura dos Materiais. Campinas : Departamento de Engenharia de Materiais, Faculdade de Engenharia Mecânica, Unicamp, 2006.

**Carlise, E. 1970.** Si: a possible factor in bone calcification. *Science*. 1970, Vol. 167.

**Carlisle, E. M. 1980.** A Silicon Requirement for Normal Skull Formation in Chicks. *The Journal of Nutrition*. 1980, Vol. 110, 2.

**Carrodeguas, R. G., et al. 2008.** New Approach to the b-a Polymorphic Transformation in Magnesium-Substituted Tricalcium Phosphate and its Practical Implications. *Journal of the American Ceramic Society*. 4, 2008, Vol. 91.

**Carter, C. B. e Norton, M. G. 2007.** *Ceramic Materials - Science and Engineering*. Nova Iorque : Springer Science + Business Media, LLC, 2007. 0-387-46270-8.

**Cheng, Z. H., et al. 1998.** FTIR Study of Adsorption of CO<sub>2</sub> on Nonstoichiometric Calcium Hydroxyapatite. *Langmuir*. 1998, Vol. 14.

**Cheng, Z. H., et al. 1998.** FTIR Study on incorporation of CO<sub>2</sub> into calcium hydroxyapatite. *J. Chem. Soc. Faraday T rans.* 10, 1998, Vol. 94.

**Coleman, P. B. 1993.** *Practical Sampling Techniques fo Infrared Analysis*. Boca Raton : CRC Press LLC, 1993. 0-8493-4203-1.



**Cristóbal-González, A. 2006.** *Síntesis de fosfato tricálcico alfa (Alfa-TCP) sustituido con silicio para aplicaciones biomédicas.* Barcelona, Espanha : Universidade Politécnica da Catalunia, 2006.

**Cullity, B. D. 1977.** *Elements of X-Ray Diffraction.* Indiana : Addison-Wesley Publishing Company, INC., 1977. ISBN 0-201-01174-3.

**Dai, H., et al. 2001.** Properties of the Cement Materials in  $\alpha$ -TCP-TTCP-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>-H<sub>2</sub>O. *Key Engineering Materials.* 2001, Vols. 191-195.

**de Aza, P. N., de Aza, A. H. e S., de Aza. 2005.** Crystalline Bioceramic Materials. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio.* 3, 2005, Vol. 44.

**de Aza, P. N., et al. 1996.** Bioceramics-simulated body fluid interfaces: pH and its influence of hydroxyapatite formation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 7, 1996, Vol. 7.

**de Aza, P. N., Guitán, F. e de Aza, S. 1995.** Phase Diagram of Wollastonite-Tricalcium Phosphate. *Journal of The American Ceramic Society.* 6, 1995, Vol. 78, pp. 1653-1656.

**de Aza, P. N., Guitén, F. e de Aza, S. 1994.** Bioactivity of wollastonite bioceramics: in vitro evaluation. *Scripta Metall. et Mat.* 8, 1994, Vol. 31.

**Denissen, H. W. e de Groot, K. 1979.** Immediate Dental Root Implants from Synthetic Dense Calcium Hydroxyapatite. *J. Prosthet. Dent.* 1979, Vol. 42.

**Dickens, B., Schroeder, W. e Brown, W. E. 1974.** Crystallographic Studies of the Role of Mg as a Stabilizing Impurity in [beta]-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. I. The crystal Structure of Pure [beta]-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. *Journal of Solid State Chemistry.* 1974, Vol. 10.

**Doremus, R. H. 1992.** Bioceramics. *Journal of Material Science.* 1992, Vol. 27.

**Dorozhkin, S. V. 2010.** Bioceramics of Calcium Orthophosphates. *Biomaterials.* 7, 2010, Vol. 31.

—. **2009.** Calcium Orthophosphate Cements and Concretes. *Materials.* 2009, Vol. 2.

**dos Santos, L. A. 2002.** *Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado com Fibras para Uso na Área Médico-Odontológica.* FEM, Unicamp. Campinas : s.n., 2002. Tese de Doutorado.

**Driessens, F. C. M., et al. 2000.** Effect of Temperature and Immersion on the Setting of Some Calcium Phosphate Cements. *Journal of Material Science: Materials in Medicine.* 2000, Vol. 11.

**Driessens, F.C.M., et al. 1996.** Amorphous calcium phosphate cements and their transformation into calcium deficient hydroxyapatite. *Bioceramics*. 1996.

**Driessens, F.C.M., et al. 2000.** Applied aspects of calcium phosphate bone cement. [A. do livro] D.L. Wise, et al. *Biomaterials Engineering and Devices: Human Applications*. Totowa : Humana Press, 2000, Vol. 2.

**Driessens, F.C.M., et al. 1998.** Osteotransductive Bone Cements. *Proc. Inst. Mech. Eng. H: J. Eng. Med.* 1998.

**Driessens, F.C.M., Planell, J.A. e Gil, F.J. 1995.** Applications. [A. do livro] D.L., Trantolo, D.J., Altobelli, D.E., Yaszemski, M.J., Gresser, J.D., Schwarz, E.R. Wise. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. Nova Iorque : Marcel Dekker, 1995.

**Driskell, T.D., Heller, A.L. e Koenigs, J.F. 1975.** *Dental treatments*. 3.913.229 Estados Unidos, 21 de Outubro de 1975.

**Dubok, V. A. 2000.** Bioceramics - Yesterday, Today, Tomorrow. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*. 7-8, 2000, Vol. 39.

**Dunfield, D., Sayer, M. e Shurvell, H. F. 2005.** Total Attenuated Reflection Infrared Analysis of Silicon-Stabilized Tri-Calcium Phosphate. *J. Phys. Chem B*. 2005, Vol. 109.

**Elliot, J. C. 1994.** *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Amsterdam : Elsevier, 1994. 0-444-81582-1.

**Elliot, J. C., Mackie, P. E. e Young, R. A. 1973.** Monoclinic hydroxyapatite. *Science*. 1973, Vol. 180, pp. 1055-1057. em: Mathew, Mathai e Takagi, Shozo. 2001. Structures of Biological Minerals in Dental Research. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology. 2001, Vol. 106, pp. 1035-1044.

**Enderle, R., et al. 2005.** Influence of Magnesium Doping on the Phase Transformation Temperature of  $\beta$ -TCP Ceramics Examined by Rietveld Refinement. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26.

**Fernández, E., et al. 1999.** Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*. 1999, Vol. 10.

**Fix, W., Heymann, H. e Heinke, R. 1969.** Subsolvus Reactions in the System  $2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2 - 3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ . *Journal of the American Ceramic Society*. 6, 1969, Vol. 52.

**Flaschka, H. A. 1959.** *EDTA titrations: An introduction to theory and practice*. Nova Iorque : Pergamon Press, 1959.

**Fowler, B. O. 1974.** Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium and barium hydroxyapatite. *Inorganic Chemistry*. 1974, Vol. 13.

**Fowler, B. O., Moreno, E. C. e Brown, W. E. 1966.** Infrared spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate. *Arch. Oral Biol.* 11, 1966.

**Frankenburg, E.P., et al. 1998.** Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *J. Bone Joint Surg. Am. A*, 1998, Vol. 80.

**Frayssinet, P., et al. 1998.** Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. *Biomaterials*. 1998, Vol. 19.

**Garvie, R. C., et al. 1984.** Biocompatibility of Magnesium Partially Stabilized Zirconia (Mg-PSZ Ceramics). *Journal of Materials Science*. 1984, Vol. 19.

**Gbureck, U., et al. 2004.** Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: Hypodermic injection and strength improvement of apatite cement. *Biomaterials*. 2004, Vol. 25.

**Getter, L., et al. 1972.** Three Biodegradable Calcium Orthophosphate Slurry Implants in Bone. *J. Oral Surg.* 1972, Vol. 30.

**Giacovazzo, C., et al. 1992.** *Fundamentals of Crystallography*. Nova Iorque : Oxford University Press, 1992. 1-9855-5784.

**Ginebra, M. P., Driessens, F. C. M. e Planell, J. A. 2004.** Effect of Particle Size on the Micro and Nanostructural Features of a Calcium Phosphate Cement: a Kinetics Analysis. *Biomaterials*. 2004, Vol. 25.

—. **1998.** The effect of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> addition on the setting reaction kinetics of an  $\alpha$ -TCP cement. *Bioceramics*. 1998.

**Ginebra, M. P., et al. 1999.** Modeling the Hydrolysis of  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate. *Journal of the American Ceramic Society*. 1999, Vol. 82, 10.

**Ginebra, M. P., et al. 1997.** Setting Reaction and Hardening of an Apatitic Calcium Phosphate Cement. *J. Des. Res.* 4, 1997, Vol. 76.

**Ginebra, M. P., et al. 1997.** Setting Reaction and Hardening of an Apatitic Calcium Phosphate Cement. *J. Dent. Res.* 4, 1997, Vol. 76.

**Ginebra, M. P., et al. 1995a.** The Effects of Temperature on the Behavior of an Apatitic Calcium Phosphate Cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1995a, Vol. 6.

**Ginebra, M. P., Fernandez, E. e Planell, J. A., Driessens, F. C. M. 1995.** Effect of Various Additives and Temperature on some Properties of an Apatitic Calcium Phosphate Cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1995, Vol. 6.

**Ginebra, M.P., Traykova, T. e Planell, J.A. 2006b.** Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J. Control. Rel.* 2006b, Vol. 113.

—, **2006a.** Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system. *Biomaterials*. 2006a, Vol. 27.

**Griffith, L. G. e Naughton, G. 2002.** Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science*. 2002, Vol. 295.

**Groot, K., et al. 1983.** *Bioceramics of Calcium Phosphate*. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1983.

**Gruninger, S. E., et al. 1984.** Evaluation of the Biocompatibility of a New Calcium Phosphate Setting Cement. *J. Dent. Res.* 1984, Vol. 63.

**Halouani, R., et al. 1994.** Microstructure and Related Mechanical Properties of Hot Pressed Hydroxyapatite Ceramics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1994, Vol. 5.

**Hatim, Z., et al. 1998.** The setting mechanism of a phosphocalcium biological cement. *Ann. Chim. Sci. Mat.* 1998, Vol. 23.

**Heimann. 2002.** Materials Science of Crystalline Bioceramics: A Review of Basic Properties and Applications. *CMU Journal*. 1, 2002, Vol. 1.

**Hench, L. L. 1991.** Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal do The American Ceramic Society*. 7, 1991, Vol. 74.

**Hench, L. L. e Wilson, J. 1993.** *An Introduction to Bioceramics*. s.l. : World Scientific Publishing Co, 1993.

**Hench, L. L. 1975.** Prosthetic Implant Materials. *Ann. Rev. Mater. Sci.* 1975, Vol. 5.

**Hing, K. A., Best, S. M. e Bonfield, W. 1999.** Characterization of Porous Hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1999, Vol. 10.

**Hulbert, S. F., et al. 1983.** History of Bioceramics. [A. do livro] P. Vincenzini. *Ceramics in Surgery*. Amsterdam : Elsevier, 1983.

**Hummel, F. A. 1984.** *Introduction to Phase Equilibria in Ceramics Systems*. Nova Iorque : Marcel Dekker, Inc., 1984. ISBN 0-8247-7152-4.

**Jarcho, M. 1981.** Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics. *Clin. Orthop.* 1981, Vol. 157.

**Jinlong, N., Zhenxi, Z. e Dazong, J. 2001.** Investigation of Phase Evolution During the Thermochemical Synthesis of Tricalcium Phosphate. *Journal of Materials Synthesis and Processing.* 5, 2001, Vol. 9.

**Jones, A. C., et al. 2007.** Assessment of Bone Ingrowth into Porous Biomaterials Using Micro-CT. *Biomaterials.* 2007, Vol. 28.

**Jones, J.R. e Hench, L. L. 2003.** Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Cur. Opin. Solid. State. Mater. Sci.* 2003, Vol. 7.

**Kannan, S., et al. 2008.** Ionic Substitutions in Biphasic Hydroxyapatite and [beta]-Tricalcium Phosphate Mixtures: Structural Analysis by Rietveld Refinement. *Journal of the American Ceramic Society.* 11, 2008, Vol. 91.

**Kannan, S., Pina, S. e Ferreira, J.M.F. 2006.** Formation of Strontium-Stabilized [beta]-Tricalcium Phosphate from Calcium Deficient Apatite. *Journal of the American Ceramic Society.* 10, 2006, Vol. 89.

**Kawachi, E. Y., et al. 2000.** Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. *Química Nova.* 2000, Vol. 23 (4), pp. 518-522.

**Kay, M. I., Young, R. A. e Posner, A. S. 1964.** Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature.* 1964, Vol. 204, pp. 1050-1052. em: Mathew, Mathai e Takagi, Shozo. 2001. Structures of Biological Minerals in Dental Research. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology.* 2001, Vol. 106, pp. 1035-1044.

**Kingery, W.D. 1950.** Cold setting properties. *Journal of the American Ceramic Society.* 1950, Vol. 33.

**Kittel, C. 1971.** *Introduction to Solid State Physics.* Nova Iorque : s.n., 1971.

**Kokubo, T. e Takadama, H. 2006.** How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials.* 2006, Vol. 27.

**Lacout, J., Mejdoubi, E. e Hamad, M. 1996.** Crystallization mechanisms of calcium orthophosphate cement for biological uses. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 1996, Vol. 7.

**Langer, R. e Vacant, J. P. 1993.** Tissue engineering. *Science.* 1993, Vol. 260.

**Langstaff, S., et al. 1999.** Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization. *Biomaterials*. 1999, Vol. 20.

**LeGeros, R. Z. 1991.** *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. Nova Iorque : Karger, 1991. 3-8055-5236-X.

**LeGeros, R.Z., Chohayeb, A. e Shulman, A. 1982.** Apatitic calcium phosphates: possible dental restorative materials. *J. Dent. Res.* 1982, Vol. 61.

**Lewis, G. 2006.** Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty, state-of-the-art review. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials*. 2006, Vol. 76.

**Liu, C., Huang, Y. e Chen, J. 2004.** The physicochemical properties of the solidification of calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Material Research B: Applied Biomaterials*. 2004, Vol. 69.

**Lowenstam, H. A. e Weiner, S. 1989.** *On Biomineralization*. Oxford : Oxford University Press, 1989. ISBN13 9780195049770.

**Marchi, J., et al. 2007.** Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders. *Materials Research Bulletin*. 6, 2007, Vol. 42.

**Markovic, M., Takagi, S. e Chow, L.C. 2001.** Formation of macropores in calcium phosphate cements through the use of mannitol crystals. *Key Engineering Materials*. 2001, Vols. 192-195.

**Mathew, M., et al. 1977.** The crystal structure of  $[\alpha]\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . *Acta Crystallogr.* 1977, Vol. B33, pp. 1325-1333.

**Mathew, Mathai e Takagi, Shozo. 2001.** Structures of Biological Minerals in Dental Research. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*. 2001, Vol. 106, pp. 1035-1044.

**Matsumoto, N., et al. 2009.** Thermal Stability of  $[\beta]\text{-Tricalcium Phosphate}$  Doped with Monovalent Metal Ions. *Materials Research Bulletin*. 2009, Vol. 44.

**Misra, D. N. 1996.** Interaction of Citric Acid with Hydroxyapatite: Surface Exchange of Ions and Precipitation of Calcium Citrate. *Dent. Res.* 1996, Vol. 75.

**Monma, H. e Kanazawa, T. 1976.** The hydration of  $\alpha\text{-Tricalcium Phosphate}$ . *Yogyokai-shi*. 1976, Vol. 84.

**Monma, H., Goto, M. e Konmura, T. 1984.** Effect of additives on hydration and hardening of tricalcium phosphate. *Gypsum and Lime*. 1984, Vol. 188.

**Monteiro, F. J. e San Román, J. 2004.** Introducción y Desarrollo Histórico. [A. do livro] R. Sastre, S. de Aza e J. San Román. *Biomateriales*. Faenza : Faenza Editrice Iberica s.l., 2004.

**Motisuke, M., Carrodegua, R. G. e Zavaglia, C. A. C. 2008.** Mg-free precursors for the synthesis of pure phase Si-doped  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. *Key Engineering Materials*. 2008. 2008, Vols. 361-363.

**Nery, E. B., et al. 1975.** Bioceramic Implant in Surgically Produced Infrabony Defects. *J. Periodontol*. 1975, Vol. 46.

**Nilsson, M., et al. 2002.** Characterization of a novel calcium phosphate/sulphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002, Vol. 61.

**Nonami, T. 1995.** In vivo and in vitro testing of diopside for biomaterials. *Journal Society Materials Engineering for Resources of Japan*. 2, 1995, Vol. 8.

**Nurse, R. W., Welch, J. H. e Gutt, W. 1959.** High temperature equilibria in the system dicalcium silicate-tricalcium phosphate. *J. Chem. Soc*. 1959, pp. 1077-1083.

**Ohura, K., et al. 1992.** Bioactivity of CaO-SiO<sub>2</sub> glasses added with various ions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1992, Vol. 3.

**Pascual, C. e Duran, P. 1983.** The System ZrO<sub>2</sub>-Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Journal of the American Ceramic Society*. 1, 1983, Vol. 66.

**Peelen, J., et al. 1977.** Sintered Tri-calcium Orthophosphate as Bioceramic. *Sci. Ceram*. 1977, Vol. 9.

**Pernot, F., et al. 1979.** New glass-ceramic materials for prosthetic applications. *Journal of Materials Science*. 1979, Vol. 14.

**Pierre, P. D. S. St. 1956.** *Journal of the American Ceramic Society*. 4, 1956, Vol. 39.

**Pietak, A. P., et al. 2007.** Silicon Substitution in the Calcium Phosphate Bioceramics. *Biomaterials*. 2007, Vol. 28.

**Pina, S., et al. 2009.** Newly developed Sr-substituted [alpha]-TCP bone cement. *Acta Biomaterialia*. 2009. article in press, doi: 10.1016/j.actbio.2009.09.001.

**Ramos, S. L. F., Motisuke, M. e Zavaglia, C. A. C. 2008.** Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Influência de Traços de Magnésio na Obtenção de alfa-TCP no Sistema. *V Congresso Latino Americano de Órgão Artificiais e Biomateriais*. [CD]. Ouro Preto, MG, Brasil : s.n., 2008.

**Ratner, B. D., et al. 2004.** *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. s.l. : Academic Press, 2004. 0125824637.

**Ray, R., et al. 1952.** Bone Regeneration. *J. Bone Joint Surg. Am. A*, 1952, Vol. 34.

**Reid, J. W., et al. 2006.** Synthesis and Characterization of Single-Phase Silicon-Substituted  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate. *Biomaterials*. 2006, Vol. 27.

**Reid, J. W., et al. 2007.** The Influence of Trace Magnesium Content on the Phase Composition of Silicon-Stabilized Calcium Phosphate Powders. *Materials Letters*. 18, 2007, Vol. 61.

**Reid, J.W., et al. 2005.** Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26.

**Rodriguex-Lorenzo, L. M., et al. 2002.** A Hydroxyapatite Ceramic Bodies with Tailored Mechanical Properties for Different Applications. *Journal of Biomedical Material Research*. 2002, Vol. 60.

**Roy, D. e Linnehan, S. 1974.** Hydroxyapatite Formed From Coral Skeletal Carbonate By Hydrothermal Exchange. *Nature*. 1974, Vol. 247.

**Sader, M. S., LeGeros, R. Z. e Soares, G. A. 2008.** Human Osteoblast Adhesion and Proliferation on Magnesium-substituted tricalcium phosphate. *V Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*. 2008.

**Sarda, S., et al. 2002.** Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent. *Journal of Biomedical Material Research*. 2002, Vol. 61.

**Song, Y., Feng, Z. e Wang, T. 2007.** In situ study on the curing process of calcium phosphate bone cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007, Vol. 18.

**Suchanek, W. L. e Yoshimura, M. 1998.** Processing and Properties of Hydroxyapatite based Biomaterials for Use as Hard Tissue Replacement Implants. *Journal of Materials Research*. 1998, Vol. 13.

**Tagaya, M., et al. 2005.** Development of self-setting Te-Cp/ $\alpha$ -TCP cement for pulpotomy. *Dent. Mater. J*. 2005, Vol. 24.

**Takagi, S. e Chow, L.C. 2001.** Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*. 2001, Vol. 12.



**Tanizawa, Y. e Suzuki, T. 1995.** Effect of Silicate Ions on the Formation and Transformation of Calcium Phosphates in Neutral Aqueous Solutions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1995, Vol. 91.

**Tas, A.C. 2007.** Porous, biphasic CaCO<sub>3</sub>-calcium phosphate biomedical cement scaffolds from calcite (CaCO<sub>3</sub>) powder. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 2007, Vol. 4.

—, **2008.** Preparation of porous apatite granules from calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science Materials in Medicine.* 2008, Vol. 19.

—, **2006.** Preparation of self-setting cement-based micro- and macroporous granules of carbonated apatitic calcium phosphate. *Ceram. Eng. Sci. Proc.* 2006, Vol. 27.

**Tehuisen, K. S. e Brown, P. W. 1999.** Phase Evolution During the Formation of  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate. *Journal of the American Ceramic Society.* 10, 1999, Vol. 82.

**TenHuisen, K. S. e Brown, P. W. 1998.** Formation of Calcium-deficient Hydroxyapatite from  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate. *Biomaterials.* 1998, Vol. 19.

**V., Karageorgiou. e D., Kaplan. 2005.** Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005, Vol. 26.

**Vallet-Regí, M. 2001.** Ceramics for Medical Applications. *J. Chem. Dalton Trans.* 2001.

**Vallet-Regí, M. e González-Calbet, J. M. 2004.** Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry.* 2004, Vol. 32.

**Van Vlack, L. H. 1973.** *Propriedades dos Materiais Cerâmicos.* [trad.] C. Silveira e S. Oniki. São Paulo : Ed. da USP, 1973.

**Vanderschoot, P. 2002.** Treatment Options and Development of a Vertebral Replacement Implant, Tese de Doutorado. Holanda : Universidade Católica de Leuven, 2002.

**Webb, P. A. e Orr, C. 1997.** *Analytical Methods in Fine Particle Technology.* Norcross : Micrometics Intrument Corporation, 1997. 0-9656783-0-X.

**Wei, X., et al. 2009.** Dissolution behavior of Si, Zn-codoped tricalcium phosphates. *Materials Science and Engineering C.* 2009, Vol. 29.

**Weiner, S. e Wagner, H. D. 1998.** Material Bone: Structure mechanical Function Relations. *Ann. Rev. Mater. Sci.* 1998, Vol. 28.

**Weiss, D.D., Sachs, M.A. e Woodard, C.R. 2003.** Calcium phosphate bone cements: A comprehensive review. *J. Long Term Eff. Med. Implants.* 2003, Vol. 13.

**Welch, J. H. e Gutt, W. 1961.** High temperature studies of the system calcium oxide-phosphorus pentoxide. *J. Chem. Soc.* 1961, pp. 4442-4444.

—. **2002.** High-temperature studies of the system calcium oxide-phosphorus pentoxide. [A. do livro] L. A. dos Santos. *Desenvolvimento de Cimentos de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para Uso na Área Médico Odontológica*. Campinas : Tese de Doutorado, Unicamp, 2002.

**Williams, D.F. 1987.** Definitions in Biomaterials. *Progress in Biomedical Engineering*. 1987, Vol. 4.

**Yin, X. e Stott, M. J. 2005.** Theoretical Insights Into Bone Grafting Silicon-Stabilized  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate. *The Journal of Chemical Physics*. 2005, Vol. 122.

**Yoshikawa, M. e Toda, T. 2000.** Reconstruction of alveolar bone defect by calcium phosphate compounds. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials*. 2000, Vol. 53, 4.

**Yubao, L., Xingdong, Z. e de Groot, K. 1997.** Hydrolysis and Phase Transition of  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate. *Biomaterials*. 1997, Vol. 18.

**Zavaglia, C. A. C. 1993.** *Aplicações de Biocerâmicas em Próteses Ortopédicas*. Campinas : Unicamp, 1993. Tese de Livre Docência.

## **ANEXO A SOLUBILIDADE DO SILÍCIO NA ESTRUTURA CRISTALINA DO TCP**

### **A.1 Introdução**

#### **A.1.1 Diagrama de Fases**

Os materiais cerâmicos têm suas reações de processamento mais claramente entendidas se as fases existentes no equilíbrio químico e termodinâmico são conhecidas. Um diagrama de fases é, então, um instrumento que pode ser utilizado como um mapa a partir do qual se podem determinar as fases presentes, para quaisquer temperaturas e composições, desde que o sistema esteja em equilíbrio (Van Vlack, 1973; Hummel, 1984; Barsoum, 2003)

As cerâmicas têm suas propriedades químicas e físicas estritamente relacionadas com o número, composição e distribuição (microestrutura) das fases presentes em um determinado tempo de um determinado sistema. Temperatura, pressão e concentração são as principais variáveis utilizadas para se determinar os tipos e quantidades de fases presentes (Cullity, 1977; Hummel, 1984).

A construção de um diagrama de fases é baseada na hipótese de que o sistema em estudo encontra-se em equilíbrio. Porém, esta circunstância dificilmente é atingida. Por isso, a fim de se obter dados com boa confiabilidade é esperado que o sistema esteja se aproximando da condição de equilíbrio.

### A.1.2 Determinação de Diagramas de Fases

A determinação de diagramas de fases é um procedimento demasiado longo e envolve o estudo das fases pertencentes ao sistema. A difração de raios X pode ser utilizada para determinar as linhas de solubilidade dos diagramas através de dois métodos distintos: desaparecimento de fases e método paramétrico. Ambos envolvem o estudo de amostras em vários “pontos” do diagrama. Várias amostras que reproduzem determinadas condições do sistema são preparadas e analisadas por difração de raios X para se verificar a composição de fases deste dado ponto. Assim, quanto maior o número de pontos, maior a acuidade dos resultados (Cullity, 1977; Hummel, 1984).

A difração de raios X não pode ser utilizada sozinha na determinação do equilíbrio de fases e construção de diagramas. Outras metodologias muito populares e que normalmente são usadas em conjunto são as análises térmicas e a microscopia. A análise térmica é o melhor método para se determinar linhas de *solidus* e *liquidus*, incluindo horizontais *eutéticas* e *peritéticas*, entretanto dificilmente a determinação de horizontais *eutetóides* e *peritetóides* será correta, uma vez que estas transformações envolvem pequenos efeitos relacionados a energia. Por conseguinte, a difração de raios-X e a microscopia são mais bem aceitas (Cullity, 1977).

### A.1.3 Contextualização e Justificativas deste Estudo

O aumento da demanda por biomateriais sintéticos que induzam uma recuperação mais rápida e tenham taxas de degradação controladas faz com que o desenvolvimento de novos materiais focados na melhora das propriedades biológicas passa a ser um fator chave no campo das biocerâmicas de fosfatos de cálcio.

É importante saber que o tecido ósseo humano é um compósito no qual células estão embebidas em uma matriz orgânica mineralizada que apresenta composição muito semelhante à hidroxiapatita estequiométrica ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HA) com alguns defeitos em sua estrutura cristalina. A maioria destes defeitos vem da substituição por íons metálicos que podem atuar diretamente nos processos fisiológicos do tecido uma vez que influenciam na sua solubilidade, na

sua química de superfície e na sua morfologia. Os íons mais comuns que estão presentes na *apatita* biológica são: os carbonatos,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Si}^{4+}$ . Este último é o elemento responsável pelo crescimento e desenvolvimento normal de ossos e cartilagens (Carlise, 1970).

Neste contexto, o  $\alpha$ -TCP dopado com silício ( $\text{Si-}\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Si-}\alpha\text{-TCP}$ ) tem recebido grande atenção dos pesquisadores devido à um provável aumento em sua bioatividade como resultado da substituição parcial dos grupos fósforo tetraédricos por silicatos (Pietak, et al., 2007). Além disso, o silício é também responsável por várias outras mudanças nas propriedades dos materiais não dopados como a estabilização de fases em temperaturas mais baixas, a inibição do crescimento de grãos e a alteração da solubilidade. A estrutura do cristal do  $\text{Si-}\alpha\text{-TCP}$  continua a mesma que a do material não dopado, entretanto existem alguns desvios nos parâmetros de rede. Normalmente, um a cada dez átomos de fósforo é substituído pelo silício (Reid, et al., 2006; Arcos, et al., 2006).

A estequiometria do sistema durante e após a síntese do  $\text{Si-}\alpha\text{-TCP}$  é totalmente dependente da relação  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$  e  $\text{Ca}/\text{P}$  dos materiais de partida, da quantidade e da rotina pela qual o silício é adicionado e da temperatura e rotina de tratamento térmico (Reid, et al., 2005; Reid, et al., 2006; Langstaff, et al., 1999). É possível obter  $\text{Si-}\alpha\text{-TCP}$  puro através da fixação da relação  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$  em 1,50 e limitando a quantidade de silício entre 0,6 e 0,9 % em massa (Reid, et al., 2006). Porém, os níveis de substituição por silício parecem ser altamente dependentes da fonte de silício utilizada.

Ainda, a pureza dos reagentes empregados na síntese é outro fator chave uma vez que traços de magnésio acima de 250 ppm, podem estabilizar a forma de baixa temperatura do TCP, a fase  $\beta$ , e inibir a total conversão para  $\alpha$ -TCP em temperaturas tão altas como 1500°C (Reid, et al., 2007; Motisuke, et al., 2008; Carrodegua, et al., 2008). Se a quantidade ideal de silício for adicionada e os reagentes não apresentarem quantidades significativas de magnésio é possível obter  $\text{Si-}\alpha\text{-TCP}$  puro em temperaturas que variam de 700°C (Reid, et al., 2006) a 1150°C (Motisuke, et al., 2008). Ao contrário, com níveis de Mg mais elevados a temperatura de transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  aumenta de aproximadamente 1125°C para valores acima de 1400°C (Carrodegua, et al., 2008).

O valor exato da solubilidade do silício na estrutura do TCP ainda não está bem definido uma vez que todos os estudos relacionados ao  $\text{Si-}\alpha\text{-TCP}$  não utilizam a análise de diagramas de

equilíbrio de fases. Apesar disso, muitos pesquisadores como discutido anteriormente, determinaram limites máximos e mínimos de silício para se obter Si- $\alpha$ -TCP puro (Reid, et al., 2006). Quantidades de silício entre 0,6 a 0,9% em massa são suficientes para se obter um material com elevado grau de pureza sem a presença de traços de HA ou  $\beta$ -TCP. No entanto, como as fontes de silício empregadas normalmente são materiais não cristalinos, a comprovação de que todo o silício foi incorporado ao TCP e não está presente como outra fase cristalina torna-se de grande dificuldade. Por outro lado, uma vez que a substituição por silício ocorre como uma solução sólida, o estudo do diagrama de equilíbrio de fases correto pode revelar a real solubilidade do Si.

A primeira publicação sobre o sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> é datada de 1942. Pesquisadores de metalurgia estavam interessados nas interações entre as fases pertencentes a este sistema para o desenvolvimento de novas composições de aços e, mais recentemente novas composições de fertilizantes (Barrett, et al., 1942). Em um primeiro momento, pensava-se que apenas o Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> era capaz de formar uma solução sólida com o TCP (Fix, et al., 1969); porém, estudos mais recentes provaram que este composto não é compatível com o  $\alpha$ -TCP, mas sim com o  $\alpha'$ -TCP uma fase estável somente em temperaturas muito elevadas e que não resiste ao resfriamento até a temperatura ambiente. A Figura A.1 mostra o diagrama do sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>. Neste diagrama existem duas linhas que representam sistemas binários e que ligam o TCP com dois compostos que são normalmente empregados como fonte de silício na síntese do Si- $\alpha$ -TCP: a wollastonita (CaSiO<sub>3</sub>, W) e o SiO<sub>2</sub>. Esses diagramas de equilíbrio de fases binários já foram amplamente discutidos na literatura, porém o foco dos trabalhos não era a solução sólida do TCP e em muitos casos a linha de solubilidade está delimitada de maneira empírica. As Figura A.2 e Figura 3.3 mostram os diagramas dos sistemas TCP-SiO<sub>2</sub> (Pierre, 1956) e CaSiO<sub>3</sub>-TCP (de Aza, et al., 1995), respectivamente.

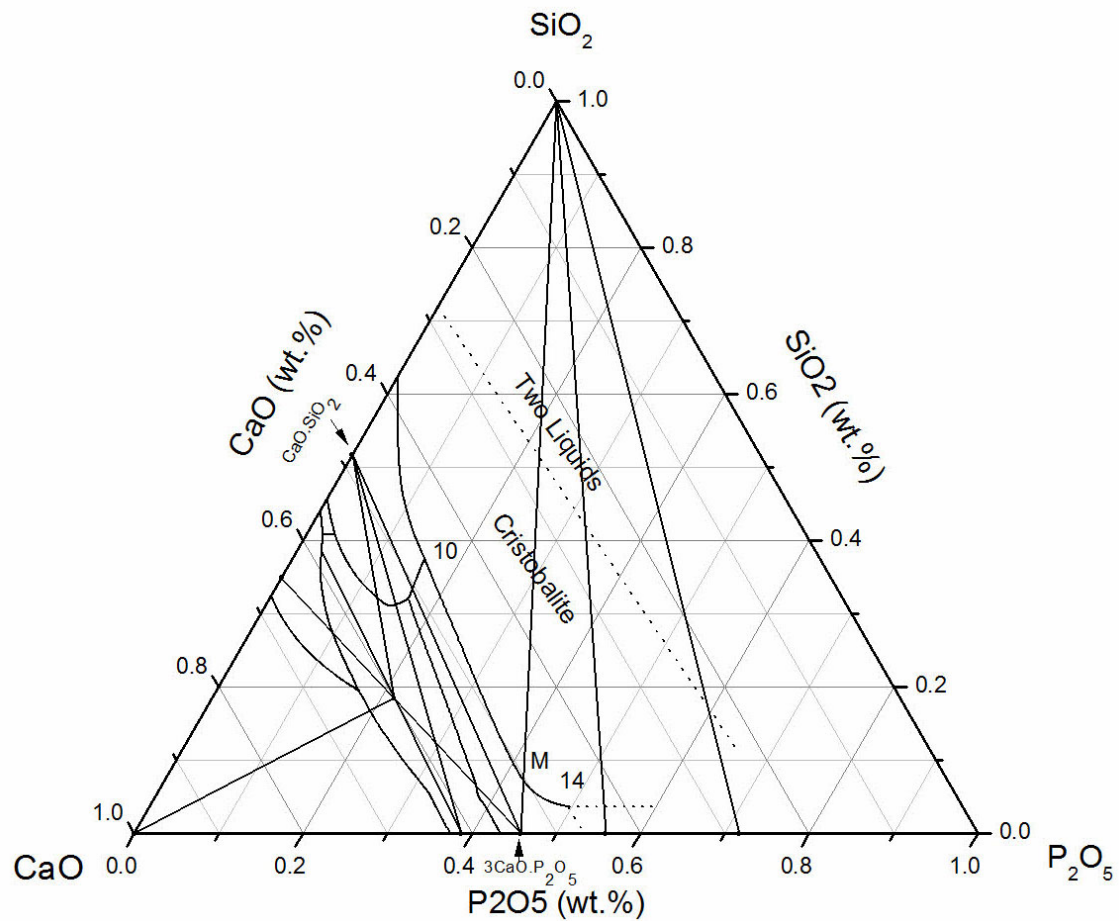


Figura A.1 – Diagrama de Fases do Sistema  $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$  desenvolvido por (Barrett, et al., 1942).

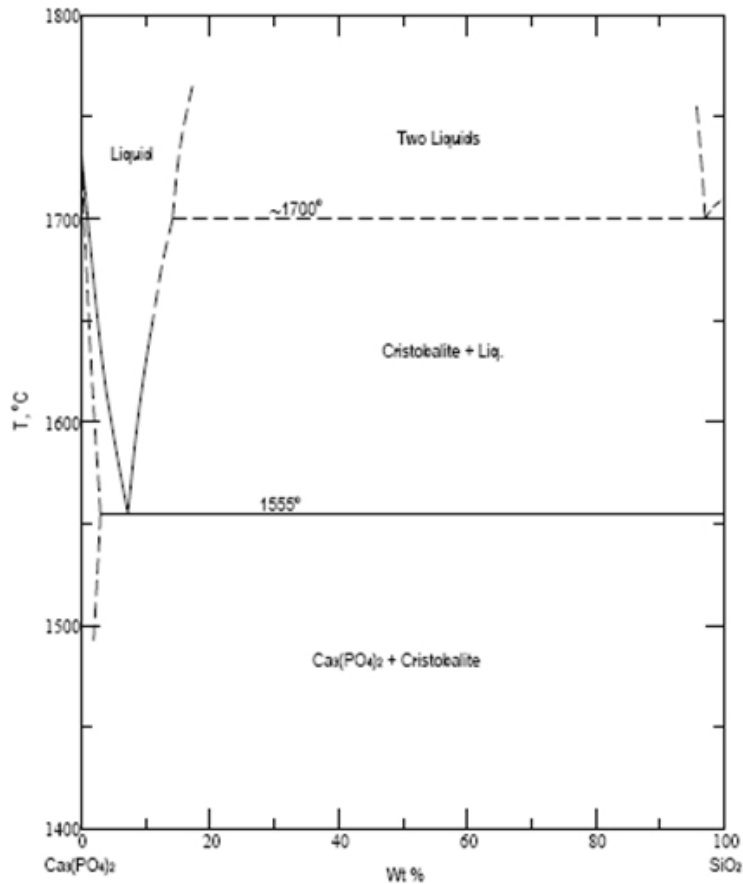


Figura A.2 - Diagrama do sistema TCP-SiO<sub>2</sub> (Pierre, 1956).

## A.2 Materiais e Métodos

### A.2.1 Solução Sólida do Fosfato Tricálcico

A solução sólida do silício no fosfato tricálcico foi estudada em dois sistemas binários diferentes CaSiO<sub>3</sub>-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>. Ambos já foram amplamente discutidos na literature (de Aza, et al., 1995; Pierre, 1956), no entanto, a solubilidade do silício na estrutura do TCP ainda não está bem definida e em alguns casos está desenhada apenas de maneira empírica. Nos sistemas estudados neste anexo foram empregados os reagentes da série RL desenvolvidos no 4.2 deste trabalho.



*Sistema  $\text{CaSiO}_3\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ :*  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{CaSiO}_3$  foram misturados intimamente em almofariz de ágata com acetona de maneira que a % em massa desta mistura fosse exatamente 10% de  $\text{CaSiO}_3$  e 90% TCP. Em seguida cilindros de 5mm de diâmetro foram preparados através da prensagem da mistura de reagentes a 75 MPa. Finalmente, estes cilindros foram queimados em cadinhos de platina em temperaturas variando de 1350 a 1550°C (Tabela A.1) por 2 horas seguidas de resfriamento brusco (“quenching”) utilizando uma pistola de ar. Cada tratamento térmico foi realizado duas vezes para garantir que as amostras tivessem alcançado o equilíbrio.

*Sistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-SiO}_2$  System:* Similarmente, para se conseguir uma composição de 95% em massa de TCP e 5% em massa de  $\text{SiO}_2$ , os mesmo reagentes ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaHPO}_4$  and  $\text{CaSiO}_3$ ) foram misturados em um almofariz de ágata com acetona. Cilindros de 5 mm de diâmetro foram confeccionados e finalmente queimados em cadinhos de platina em um intervalo de temperatura de 1450 a 1600°C (Tabela A.1) seguido de resfriamento brusco. Da mesma forma, para se atingir o equilíbrio de todas as amostras, todos os tratamentos térmicos foram realizados duas vezes.

Todas as amostras tiveram suas temperaturas de tratamento corrigidas utilizando-se um termopar adicional. Os novos valores estão descritos na Tabela A.1.

**Tabela A.1 - Nomenclatura das amostras e a temperatura real ( $T_R$ ) de tratamento térmico empregada**

Amostra	Composição	T (°C)	$T_R$ (°C)
M1-01	90% TCP – 10% W	1300	1312
M1-02	90% TCP – 10% W	1350	1359
M1-03	90% TCP – 10% W	1390	1400
M1-04	90% TCP – 10% W	1450	1457
M1-05	90% TCP – 10% W	1500	1504
M1-06	90% TCP – 10% W	1550	1553
M2-01	95% TCP – 5% $\text{SiO}_2$	1480	1482
M2-02	95% TCP – 5% $\text{SiO}_2$	1530	1533
M2-03	95% TCP – 5% $\text{SiO}_2$	1570	1571
M2-04	95% TCP – 5% $\text{SiO}_2$	1600	1598

## A.2.2 Caracterizações

### A.2.2.1 Fluorescência de Raios X

As misturas de reagentes utilizadas para o estudos dos dois sistemas tiveram sua estequiometria confirmada utilizando-se um espectrômetro de fluorescência de raios X MagiX Super Q Versão 3.0 (Philips, Holanda) provido de um tubo de raios X de Rh e 2,4kW. Para cada análise 0,3000 g de pó foram pesados e misturados com 5,5 g de  $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$  de grau espectral, fundidos em um cadinho de Pt/Au e moldados em discos. Curvas de calibração foram preparadas utilizando-se padrões naturais e sintéticos de fosfatos de cálcio e silicato de cálcio de composição certificada.

### A.2.2.2 Difração de Raios X

A análise qualitativa das fases cristalinas foi realizada utilizando-se um difratometro de raios X Kristalloflex D500 (Siemens, Alemanha). A voltagem e corrente anodica foram 40 kV e 30 mA, respectivamente. As analises foram feitas em um intervalo  $2\theta$  entre 2 e 70 ° com um passo de 0,05° e uma relação tempo/passo de 1,5 segundos. As cartas JCPDS (“Joint Committee on Powder Diffraction Standards”) utilizadas para a identificação de fases foram 09-0348 para o  $\alpha$ -TCP, 09-0169 para o  $\beta$ -TCP e 31-0300 ou 43-1460 para o  $\text{CaSiO}_3$ .

### A.2.2.3 Microestrutura e Microanálise

Depois de cada tratamento térmico, as amostras foram embutidas em resina epóxi e depois polidas com pastas de diamante (30, 6 and 1  $\mu\text{m}$ ) e analisadas em um microscópio óptico (Karl Zeiss, Oberkochen & Jena, Alemanha).

A composição química dos grãos de cada amostra foi determinada utilizando-se um sistema de espectrometria por Energia Disperssiva (EDS) acoplado a um microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL SUPERPROBE – JXA-8900M WD/ED (JEOL, Japão).

### A.3 Resultados e Discussões

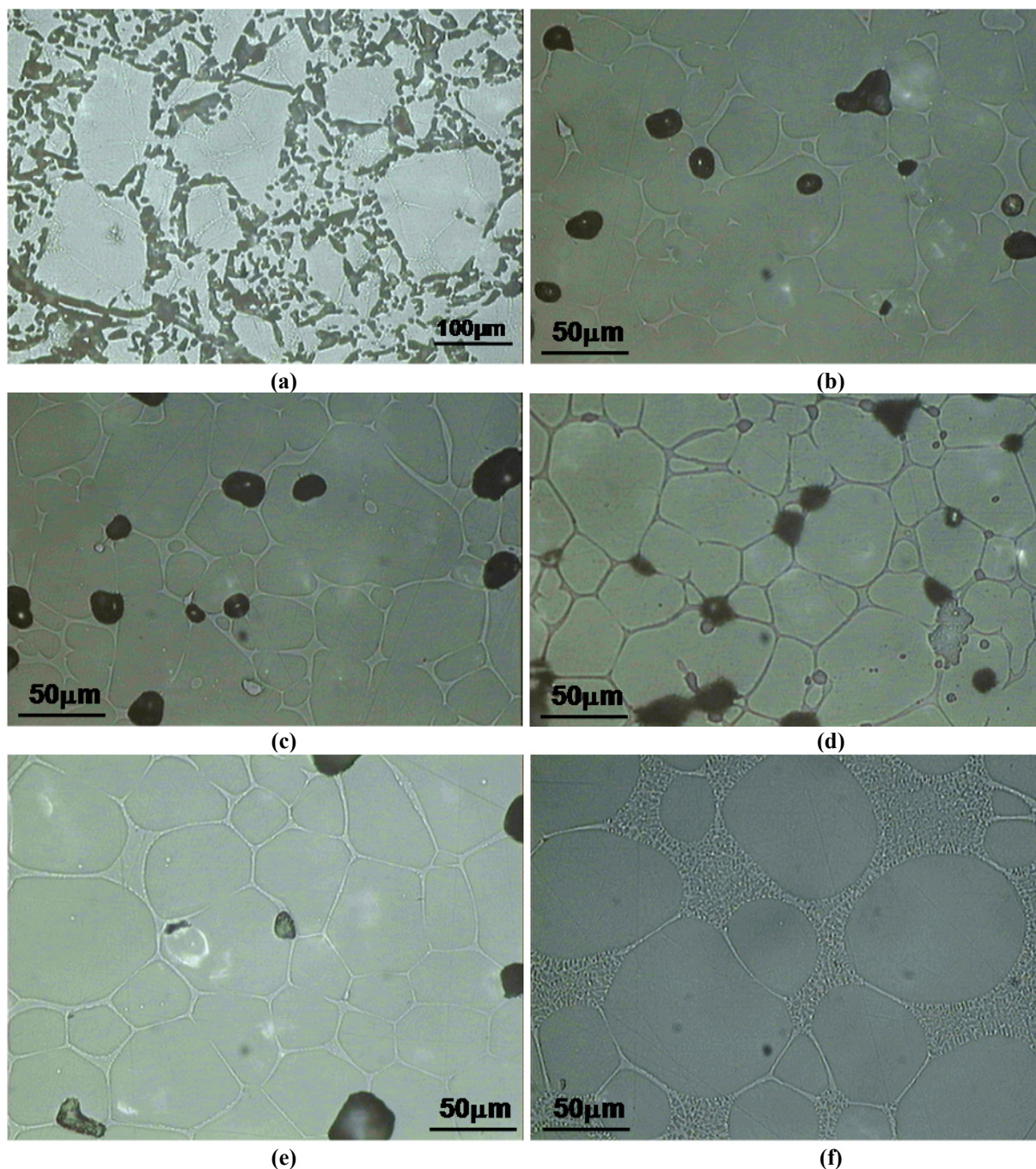
#### A.3.1 Sistema $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{CaSiO}_3$

A Tabela A.2 mostra a estequiometria das misturas reacionais determinada por FRX. Os valores encontrados são muito similares com os teóricos calculados para este sistema a 10% em massa de  $\text{CaSiO}_3$  e 90% em massa de TCP (54.6% de  $\text{CaO}$ , 41.2% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  e 5.17% de  $\text{SiO}_2$ ), no entanto, as pequenas discrepâncias presentes (um pequeno excesso de cálcio) podem mudar sutilmente o diagrama de equilíbrio de fases devido a um pequeno deslocamento para a direita da linha de compatibilidade da wollastonita-TCP do sistema de três componentes ( $\text{CaO}$ - $\text{P}_2\text{O}_5$ - $\text{SiO}_2$ ) da Figura A.1.

**Tabela A.2 - Estequiometria da mistura 90%TCP 10% W determinada por FRX.**

Óxidos	(% em massa)
$\text{SiO}_2$	5.28 (3)
$\text{CaO}$	53.4 (3)
$\text{P}_2\text{O}_5$	41.7 (3)
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	0.002 (1)
$\text{Na}_2\text{O}$	0.053 (6)
$\text{TiO}_2$	0.009 (2)

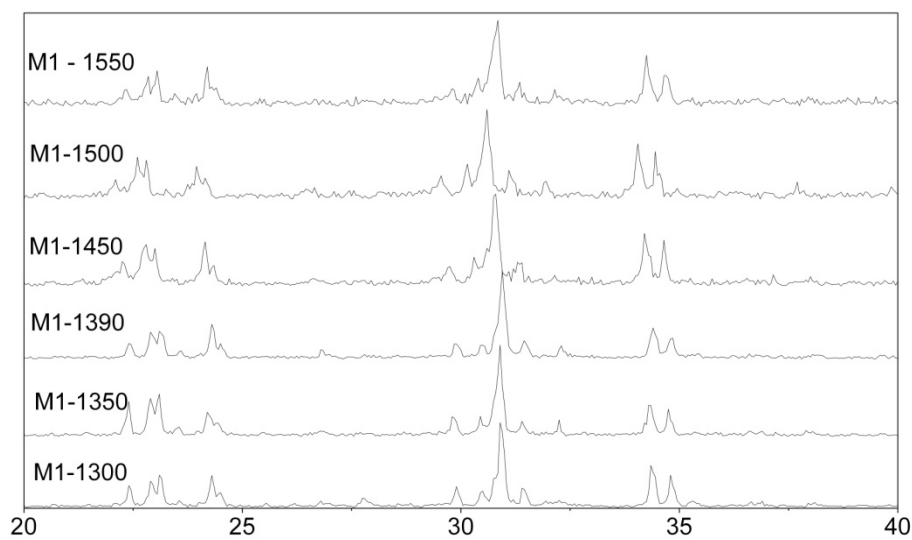
De fato, nas micrografias ópticas (Figura A.3) é claramente visível que o ponto eutético, neste estudo, está entre 1300 e 1350°C que estaria em desacordo com o valor obtido por de Aza e colaboradores (de Aza, et al., 1995). Por outro lado, considerando este pequeno deslocamento da linha de compatibilidade W-TCP verifica-se que os pontos experimentais estão em algum lugar próximo ao sub-sistema TCP-W- $\text{SiO}_2$  no qual o ponto eutético é, aproximadamente, 1350°C.



**Figura A.3 – Micrografias ópticas das amostras do sistema W-TCP. (a) 1312°C; (b) 1359°C; (c) 1400°C; (d) 1457°C; (e) 1504°C; e (f) 1553°C.**

Os difratogramas de raios X das amostras estão demonstrados na Figura A.4. A 1312°C as fases cristalinas presentes são o  $\alpha$ -TCP e a wollastonita. A partir de 1359°C até 1153°C a única fase cristalina observada é a solução sólida de silício ( $\alpha$ -TCP<sub>ss</sub>) com quantidade de silício variando de 0,54 a 1,45 % em massa como demonstrado na Tabela A.3. Nesta análise foi

verificado que a relação  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$  foi mantida em valores aproximadamente constantes e iguais a 1,50. Além disso, a quantidade de silício na estrutura do TCP varia de 0,13 % em massa a 1399°C a 0,35% em massa a 1450°C. Estes resultados estão em desacordo com os valores publicados na literatura como o limite no qual o silício consegue formar solução sólida com o TCP, entre 0,6 e 0,9% em massa (Pietak, et al., 2007).



**Figura A.4 - Difractogramas de raios X do sistema W-TCP.**

**Tabela A.3 - Quantidade de wollastonita presente e relação  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$  de cada amostra.**

Amostra	$\text{CaSiO}_3$ (% em massa)	Si (% em massa)	$\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$
<b>M1-01</b>	0,97±0,39	0,23±0,09	1,50
<b>M1-02</b>	0,75±0,17	0,18±0,04	1,50
<b>M1-03</b>	0,54±0,14	0,13±0,03	1,51
<b>M1-04</b>	1,45±0,08	0,35±0,02	1,53
<b>M1-05</b>	0,93±0,06	0,22±0,01	1,51
<b>M1-06</b>	1,14±0,10	0,28±0,02	1,50

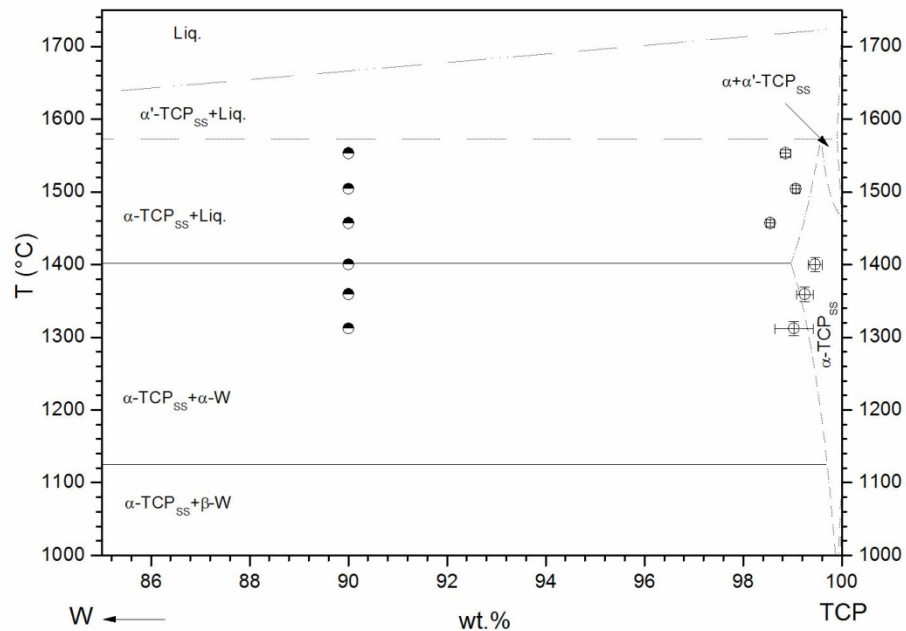


Figura A.5 - Dados experimentais e solubilidade do silício no TCP para o sistema W-TCP.

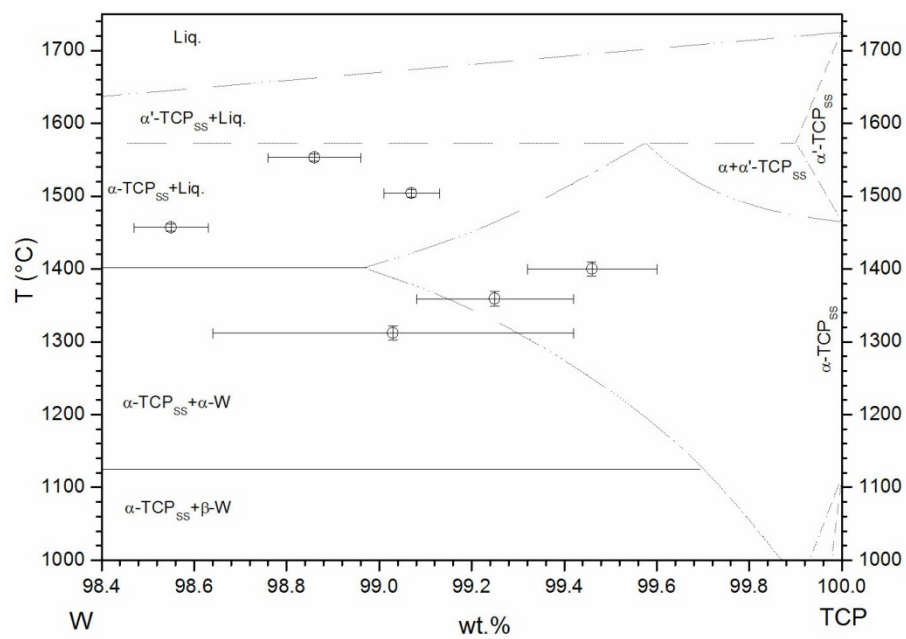
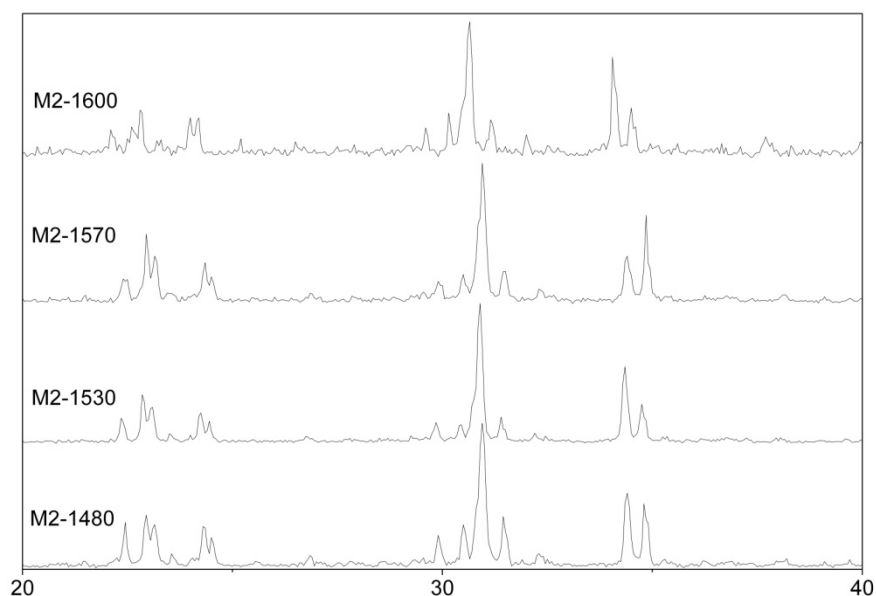


Figura A.6 - Em detalhe a solubilidade do silício na estrutura do TCP.

### A.3.2 Sistema $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-SiO}_2$

A estequiometria da mistura reacional está resumida na Tabela A.4. Similarmente com o que aconteceu com o sistema do item A.3.1, os valores obtidos não apresentam grandes diferenças dos valores teóricos calculados para 95% de TCP e 5% de  $\text{SiO}_2$  (51.53% of  $\text{CaO}$ , 43.47% of  $\text{P}_2\text{O}_5$  and 5.00% of  $\text{SiO}_2$ ), no entanto, existe uma pequena deficiência de cálcio que também resulta em um desvio do diagrama de equilíbrio de fases. Analisando o diagrama do sistema ternário  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$  da figura Figura A.1 as amostras obtidas neste item estão na região próxima ao subsistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-SiO}_2\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  no qual o ponto eutético é aproximadamente  $1250^\circ\text{C}$  (ponto 14 do diagrama). Esta é a razão pela qual existe grande quantidade de fase líquida nas micrografias da Figura A.8 e a presença de  $\alpha\text{-TCP}$  puro nos difratogramas de raios X da Figura A.7.



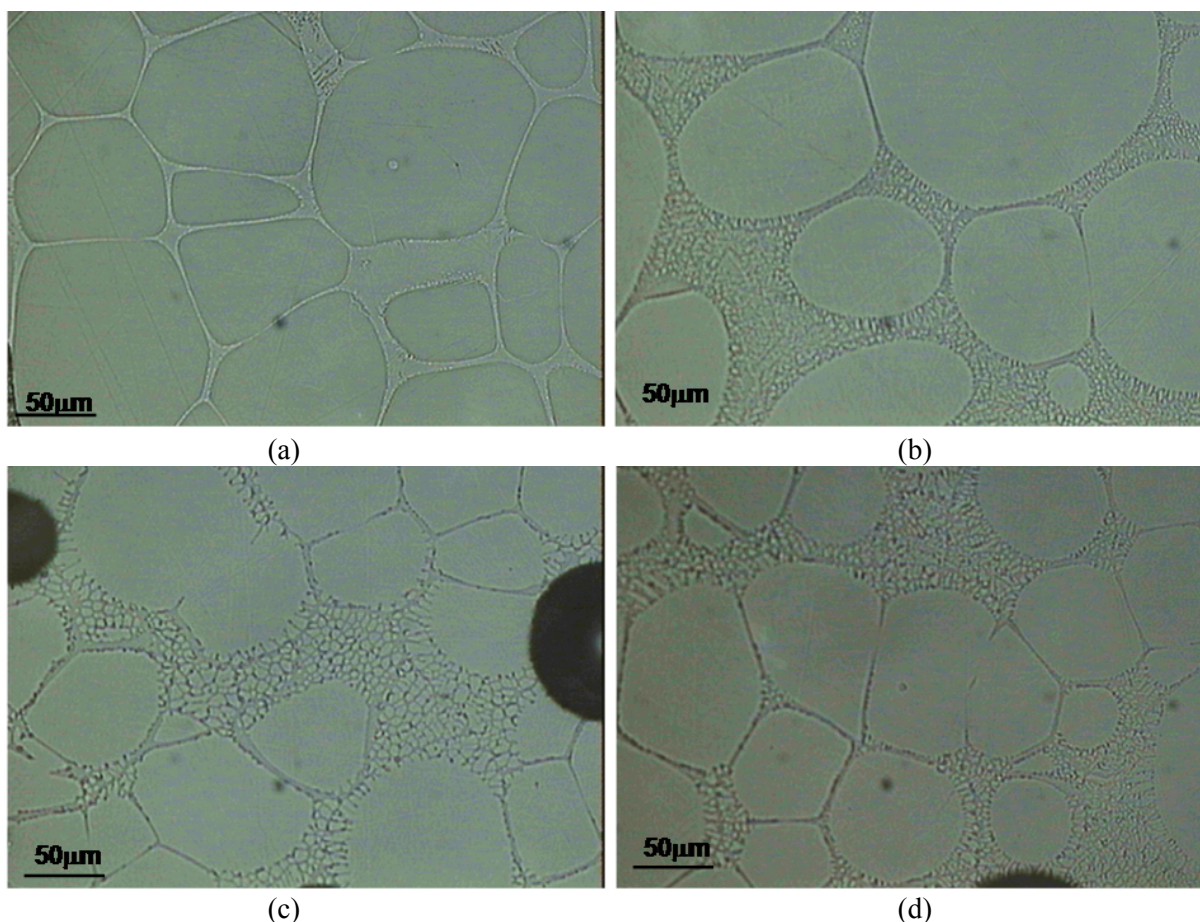
**Figura A.7 - Difratogramas de raios X do sistema  $\text{SiO}_2\text{-TCP}$**



**Tabela A.4 - Estequiometria da mistura de reagentes do sistema TCP-SiO<sub>2</sub> obtida por FRX.**

Óxidos	(% em massa)
CaO	51.4 (3)
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	43.7 (3)
SiO <sub>2</sub>	5.00 (3)
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.003 (1)
MnO	0.001 (1)
Na <sub>2</sub> O	0.045 (6)

Da mesma maneira, apesar da discrepância de estequiometria ter deslocado o equilíbrio de fases para outro sistema, a solubilidade do silício na estrutura do TCP não é alterada e, por isso, a linha que delimita a região de solução sólida do  $\alpha$ -TCP pode ser desenhada a partir dos resultados de microanálise resumidos na Tabela A.5. Os pontos experimentais demonstram que a região de solução sólida está delimitada por uma linha reta em aproximadamente 0,60% em massa de SiO<sub>2</sub>, conforme o diagrama da Figura A.9. Além disso, a relação Ca/(P+Si) manteve-se constante em todas as temperaturas.



**Figura A.8 - Micrografias ópticas do sistema TCP-SiO<sub>2</sub>. (a) 1482°C (b) 1533°C (c) 1571°C (d) 1598°C.**



Tabela A.5 - Resultados da microanálise para o sistema TCP-SiO<sub>2</sub>

Amostra	SiO <sub>2</sub> (% em massa)	Si (% em massa)	Ca/(P+Si)
M2-04	0.64±0.10	0.30±0.05	1.51
M2-03	0.67±0.05	0.31±0.02	1.50
M2-02	0.69±0.04	0.32±0.02	1.50
M2-01	0.63±0.05	0.30±0.03	1.52

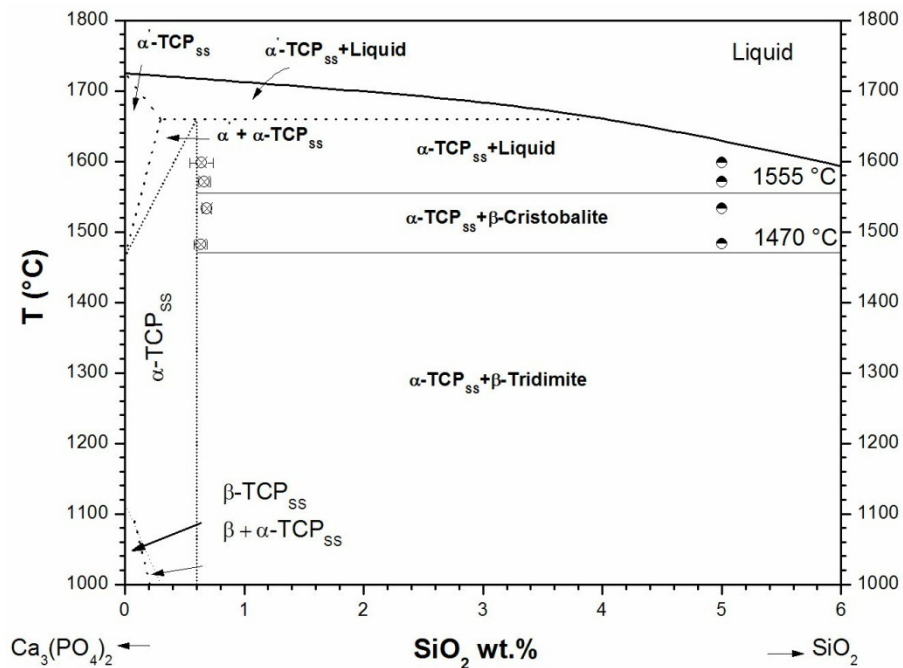


Figura A.9 - Pontos experimentais e que delimitam a solubilidade do Si na estrutura do TCP.

#### A.4 Conclusões

Apesar de se ter obtido desvios na estequiometria de ambos os sistemas estudados foi possível determinar a solução sólida do TCP. Os resultados de microanálise mostraram que no sistema W-TCP a solubilidade do silício é dependente da temperatura enquanto que no sistema TCP-SiO<sub>2</sub> esta propriedades parece não ser influenciada pela temperatura. No entanto, é importante ressaltar que a solubilidade máxima encontrada foi, aproximadamente, 0,35 e 0,32 % em massa de Si para o sistema W-TCP e TCP-SiO<sub>2</sub>, respectivamente. Estes resultados estão em desacordo com os valores publicados na literatura e os obtidos neste trabalho, porém, a fonte de

silício e as rotinas de síntese empregadas foram diferentes das normalmente utilizadas ( $\text{SiO}_2$  nanoparticulada, TEOS e rotinas de precipitação).

Por isso, é possível induzir que a solubilidade do silício na estrutura do TCP é dependente de como este elemento é fornecido e de qual rotina de síntese é seguida. No entanto, a discordância encontrada entre os valores obtidos neste anexo e os valores obtidos nas análises de FRX dos pós de TCP pode ser devido à formação de alguma fase de silício, provavelmente a própria wollastonita em excesso, durante a síntese e esta não chega a ser detectada por DRX.

## **ANEXO B FABRICAÇÃO DE “SCAFFOLDS” A PARTIR DA HIDRÓLISE DO A-TCP: ANÁLISES PRELIMINARES**

### **B.1 Introdução**

Um implante ortopédico ideal deveria ter as três características principais dos tecidos vivos: (i) auto-regeneração; (ii) manutenção do suprimento sanguíneo; e (iii) auto modificação de sua estrutura a partir de estímulos externos (p. ex. solicitações mecânicas) (Jones, et al., 2003). No caso do tecido ósseo é importante ressaltar que, além das propriedades citadas, um substituto ideal deveria ser reabsorvível e induzir a formação de um novo tecido ósseo (Vallet-Regí, et al., 2004). Neste contexto, a engenharia de tecidos surge como uma nova área no desenvolvimento de biomateriais e pode ser definida como um campo multidisciplinar que reúne os novos materiais de engenharia, com células e fatores bioquímicos que permitam o cultivo, o crescimento, o reparo e / ou a substituição de tecidos vivos e órgãos (Griffith, et al., 2002).

Hoje em dia, a engenharia de tecido é uma ciência bem estabelecida e apresenta os seguintes fatores como chave para o seu crescimento: (i) as soluções propostas são para o longo prazo, muito mais seguras e com excelente custo-benefício; (ii) a necessidade de um doador de tecido é praticamente nula o que evita respostas imunológicas adversas; e (iii) a presença de material residual ao final do tratamento é eliminada (Langer, et al., 1993).

Na engenharia de tecidos, o desenvolvimento de estruturas tridimensionais capazes de guiar o crescimento, organização e diferenciação de células no processo de formação de novos tecidos é de extrema importância. Esta estrutura, chamada de “scaffolds”, é primeiramente cultivada “in vitro” para depois ser implantado.

As principais características dos “scaffolds” dentre elas a interconectividade e o tamanho de poro (micro e macro-porosidade) e a rugosidade da superfície em muito influenciam a resposta celular, mas também controlam a taxa de entrega de nutriente e de remoção de produtos metabólicos. É também muito importante, garantir um meio rico em nutrientes para que seja possível a manutenção celular e o crescimento do novo tecido.

Muitas técnicas empregadas para a fabricação de “scaffolds” resultam em poros distribuídos de forma não homogênea o que prejudica o crescimento do novo tecido ósseo, pois estruturas com micro poros não uniformes formam regiões com concentrações de nutrientes insuficientes inibindo, assim, a atividade celular e resultando em um tecido ósseo de má qualidade.

O desenvolvimento de técnicas mais avançadas como a prototipagem rápida está garantindo uma distribuição geométrica mais homogênea do “scaffold”. Porém, ainda existem limitações sendo que a pesquisa nessa área torna-se muito importante.

## **B.2 Materiais e Métodos**

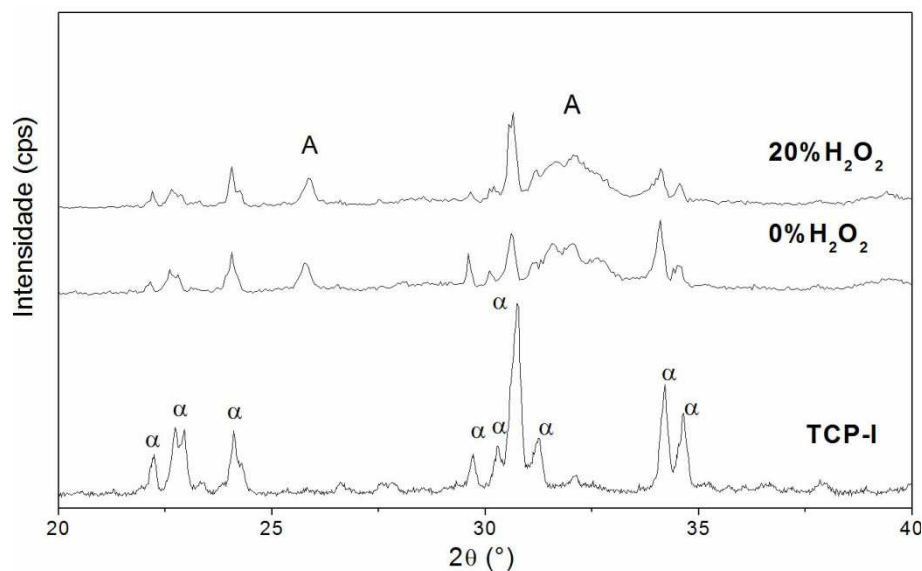
Os “scaffolds” foram fabricados de acordo com o método proposto por Almirall e colaboradores (2004). À fase líquida do cimento foram adicionados 20% em volume de peróxido de hidrogênio 35% ( $H_2O_2$ ). Depois de misturada a pasta foi vertida em moldes de Teflon<sup>®</sup> (cilindros de 6 x 12mm e 12 x 6mm) e levada à estufa para secar a 60°C durante 24h para garantir a total decomposição da  $H_2O_2$  e, conseqüentemente, a formação dos poros.

Depois de desmoldados os “scaffolds” foram lavados em solução de Ringer durante 1 dia e 7 dias. Depois de secas as amostras foram caracterizadas por DRX qualitativa, porosimetria de mercúrio, compressão axial e radial e MEV (Laboratório de Microscopia Eletrônica – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) da superfície de fratura.

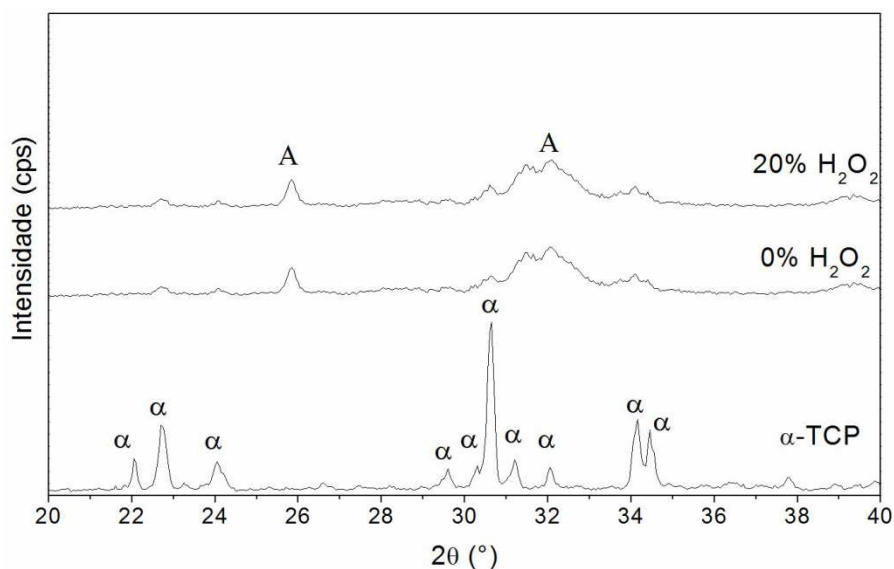
## **B.3 Resultados e Discussões**

Qualitativamente, a adição do agente porogênico influenciou a reatividade dos TCPs através da diminuição da conversão  $\alpha$ -TCP  $\rightarrow$  *apatita* uma vez que os picos de  $\alpha$ -TCP após 24 horas de imersão em solução de Ringer apresentaram maior definição e intensidade nas amostras que tiveram 20% de peróxido de hidrogênio adicionados, conforme demonstrado nos difratogramas de raios X das Figura B.1 e Figura B.2. Estes resultados adicionam evidências à

menor reatividade do  $\alpha$ -TCP dopado com silício discutido ao longo deste trabalho e é possível inferir que o agente porogênico empregado também contribui para uma redução da velocidade da reação de cura.



**Figura B.1 - Difratogramas de raios X do “scaffold” s-TCP-I e do cimento c-TCP-I após 24h de imersão em solução de Ringer.**

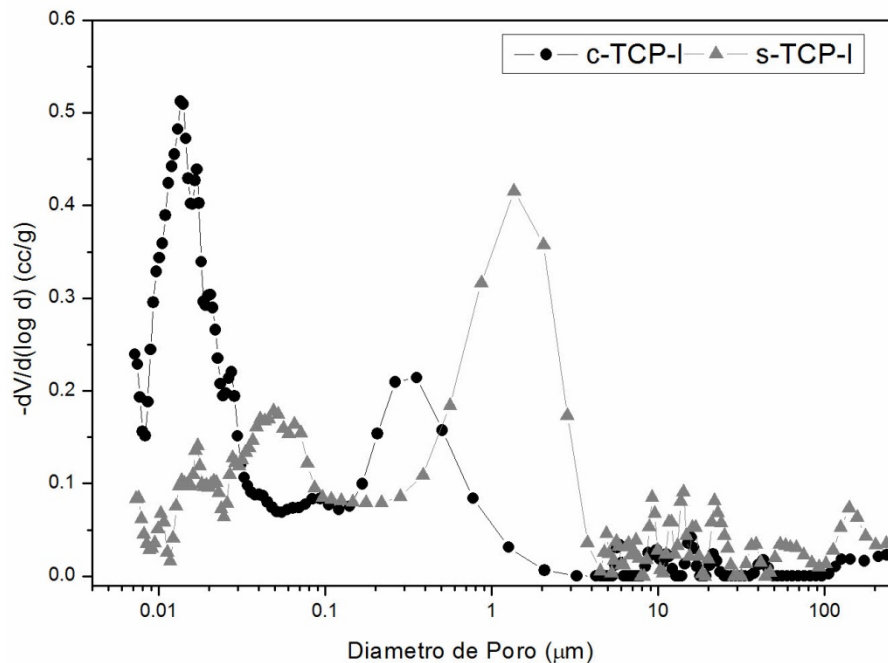


**Figura B.2 - Difratogramas de raios X do “scaffold” s-TCP-III e do cimento c-TCP-III após 24h de imersão em solução de Ringer.**

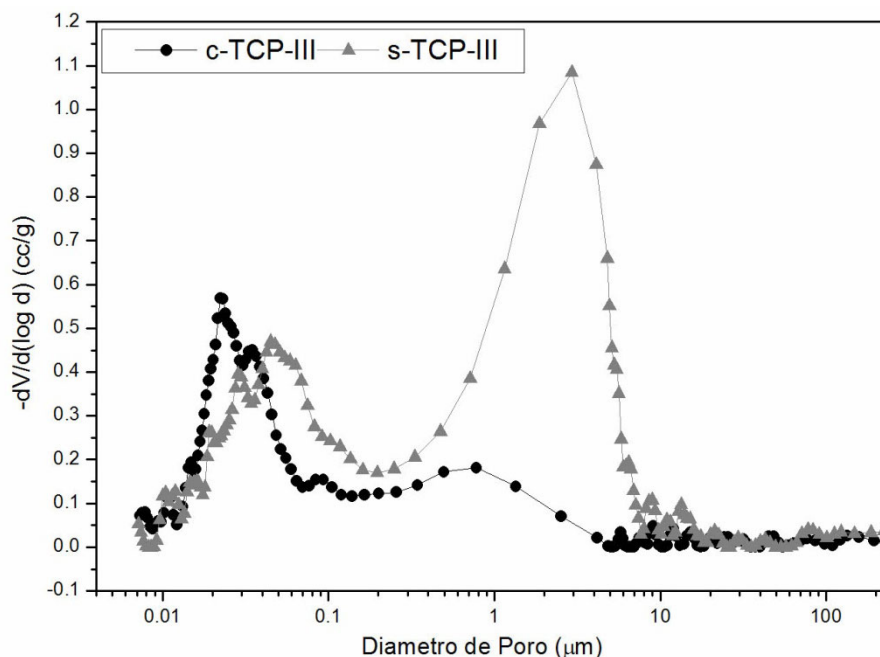
Apesar desta redução na taxa de conversão do  $\alpha$ -TCP, verifica-se que a porosidade de ambos os materiais foi aumentada. Nos dois casos, a porosidade dos cimentos, Figura B.3 e

Figura B.4, está concentrada na faixa entre 0,01 e 0,1 micrometro; enquanto que os “scaffolds” passaram a ter uma porosidade entre 1 e 10 micrometros. Além disso, o material não dopado com silício apresenta poros ligeiramente maiores para o “scaffold” e ligeiramente menores para o cimento quando comparados com os resultados da porosimetria para o “scaffold” e o cimento obtido a partir do TCP-I.

Porém, o pequeno aumento que ocorreu no tamanho e na quantidade de poros dos “scaffolds” não é suficiente para que estes materiais possam ser empregados como suportes para o crescimento de tecido ósseo já que seriam necessários poros da ordem de 100 micrometros (Dorozhkin, 2010).

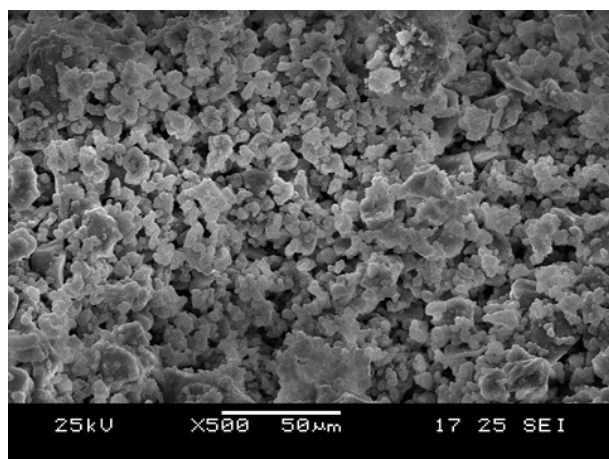


**Figura B.3 - Porosimetria de mercúrio do c-TCP-I e s-TCP-I.**

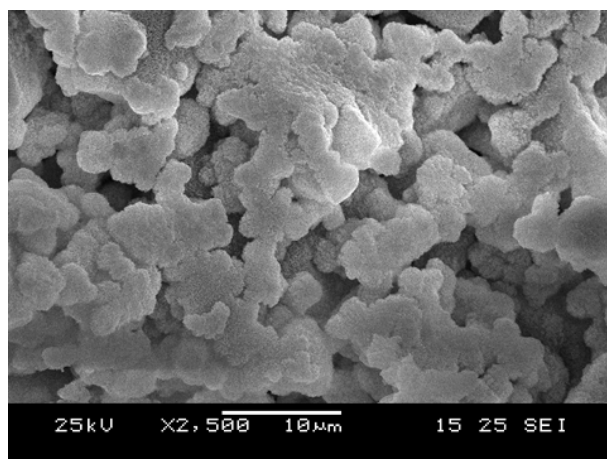


**Figura B.4 - Porosimetria de mercúrio do s-TCP-III e c-TCP-III.**

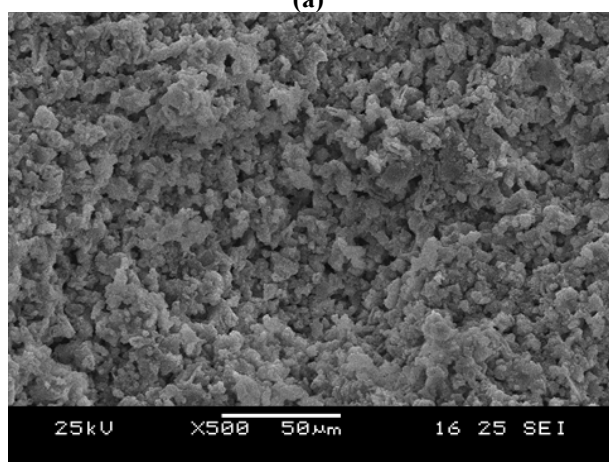
De fato, pelas micrografias da Figura B.5 verifica-se um aumento da porosidade do material quando se compara com as micrografias dos cimentos c-TCP-I e c-TCP-III da Figura B.6, entretanto não é possível distinguir qual material apresenta a maior porosidade. Além disso, o agente porogênico não parece interferir na morfologia das placas de *apatita* precipitadas durante a cura do material uma vez que nas micrografias das Figura B.5 (a), (c) e Figura B.6 (a) e (b) não se observa outras mudanças morfológicas que não o aumento da porosidade.



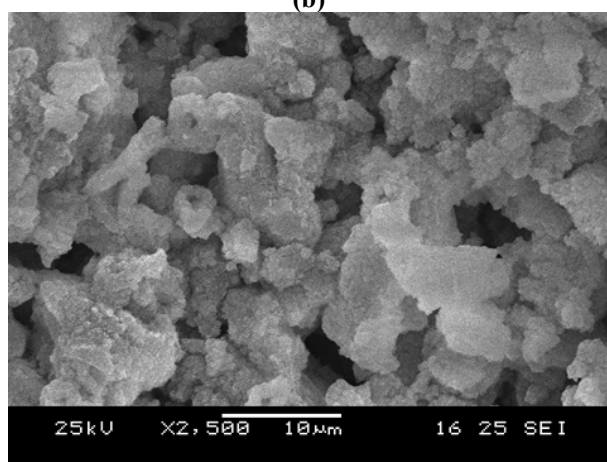
(a)



(b)

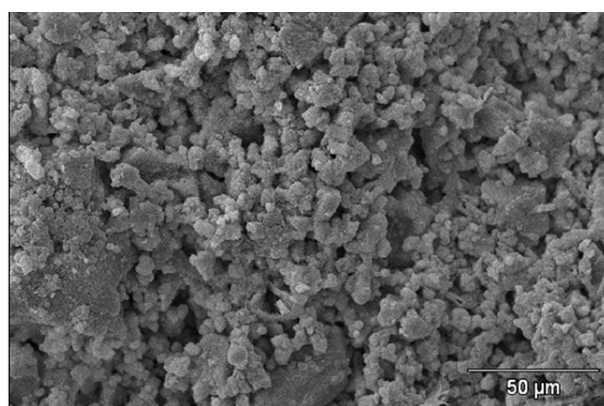


(c)

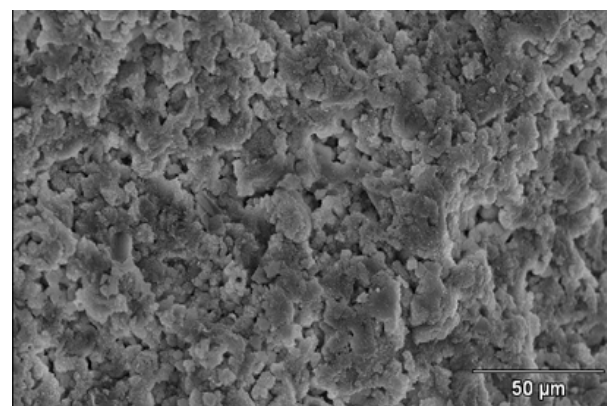


(d)

**Figura B.5 - Micrografias dos "scaffolds" após 24h de imersão em solução de Ringer: (a) e (b) s-TCP-I; (c) e (d) s-TCP-III**



(a)



(b)

**Figura B.6 - Micrografias dos cimentos: (a) c-TCP-I; e (b) c-TCP-III.**

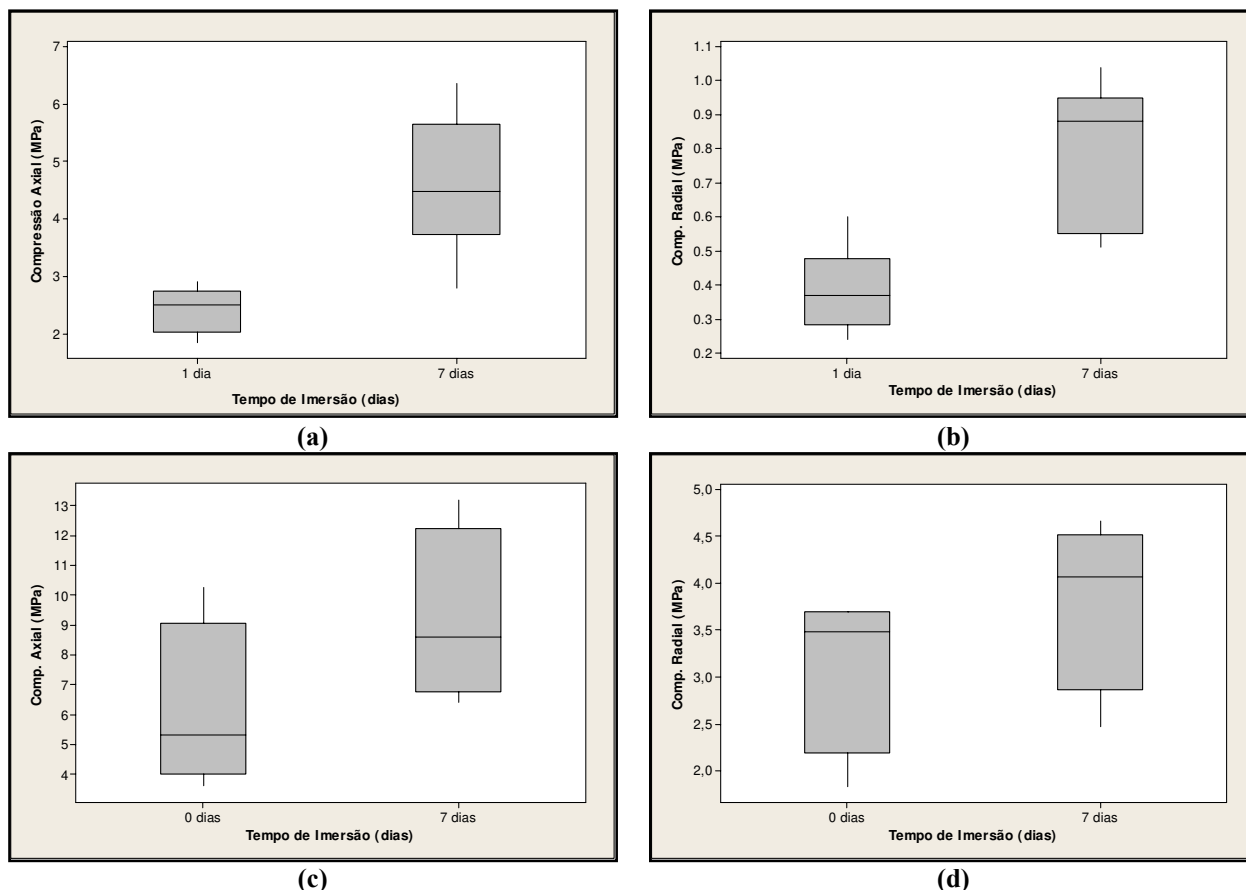


Um fato que traz certa desvantagem ao aumento da porosidade dos materiais estudados é a redução da resistência mecânica após sete dias de imersão em solução de Ringer. De fato, para o s-TCP-I ocorre uma queda de 45% da resistência à compressão axial e 53% da compressão radial enquanto que para o s-TCP-III esta diminuição foi ainda mais pronunciada 59% para a compressão axial, porém para a compressão radial a redução foi menor, de apenas 12%. Os dados da resistência mecânica para as amostras analisadas neste anexo estão resumidos na Tabela B.1.

**Tabela B.1 - Resistência mecânica dos “scaffolds” obtidos. Valores comparados com cimento sem agente porogênico, mas fabricados nas mesmas condições de temperatura e tempo.**

Amostra	Tempo (dias)	Compressão Axial (Mpa)	Compressão Radial (Mpa)
s-TCP-I	1	2,435±0,370	0,393±0,126
c-TCP-I	1	3,360 ±0,585	0,556±0,162
s-TCP-I	7	4,58±1,13	0,776±0,213
c-TCP-I	7	8,321± 0,672	1,645±0,132
s-TCP-III	1	5,610 ±0,936	1,468±0,361
c-TCP-III	1	6,14±2,87	3,123±0,885
s-TCP-III	7	9,20±2,94	3,818±0,940
c-TCP-III	7	22,03± 1,49	4,32±1,18

Apesar de se observar um aumento na variabilidade nos resultados do ensaio de resistência à compressão das amostras uma vez que os diagramas “boxplot” apresentam formas mais alongadas do que os que são normalmente obtidos para cimentos comuns (Figura 4.43), observa-se que existe diferença estatística entre os dois tempos de imersão estudados para os dois “scaffolds” desenvolvidos (valor  $p = 0,000$  tanto para compressão axial como radial) e assim, confirma-se que ocorre aumento na resistência mecânica à compressão do material após imersão em solução de Ringer. Mesmo assim, para sete dias de imersão os valores obtidos são significativamente inferiores aos encontrados para o cimento ósseo sem adição de agente porogênico, como já discutido anteriormente (Tabela B.1).



**Figura B.7 - Diagramas "boxplot" da resistência à compressão dos "scaffold" após 1 e 7 dias de imersão em solução de Ringer: (a) axial s-TCP-I; (b) radial s-TCP-I; (c) axial s-TCP-III; e (d) radial s-TCP-III.**

## B.4 Conclusões

O método proposto por Amirall e colaboradores (2004) mostrou-se eficiente para aumentar a porosidade dos cimentos ósseos. No entanto, não foi possível conseguir uma distribuição homogênea e nem um tamanho de poros suficientemente grandes para tornar o material aplicável no cultivo de células ósseas para a engenharia de tecidos. Outro fato importante de se observar é que o controle do tamanho e da quantidade dos poros é praticamente nulo quando se emprega este método.

Quando se deseja fabricar um "scaffold" para ser utilizado na engenharia de tecidos é necessário ter um controle restrito da quantidade e do tamanho de poros bem como de sua interconectividade. Estas propriedades são de difícil controle e com o método utilizado torna-se

praticamente impossível. No entanto, este método é extremamente simples e barato e pode ser vantajoso caso se consiga controlar de maneira satisfatória as propriedades supracitadas. É possível que com um controle mais detalhado dos possíveis volumes de peróxido de hidrogênio a ser adicionado e das temperaturas de secagem do cimento se consiga obter uma combinação de tamanho e distribuição de poros maximizada de maneira a tornar possível a sua aplicação como suporte celular na engenharia de tecidos.

## **ANEXO C TRABALHOS PUBLICADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESTE TRABALHO**

Motisuke, M.; Cardoso, H. A. I.; Carrodegua, R. G.; Zavaglia, C. A. C.; Synthesis and Characterization of Silicon Doped and Non-Doped Tricalcium Phosphate; 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne, Switzerland; Proceedings of the 22nd European Conference on Biomaterials, 2009.

Motisuke, M.; Cardoso, H. A. I.; Carrodegua, R. G.; Zavaglia, C. A. C.; Characterization of Calcium Phosphates Cement Based on Silicon Doped and Non-Doped Tricalcium Phosphate; 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne, Switzerland; Proceedings of the 22nd European Conference on Biomaterials, 2009.

Motisuke, M.; Carrodegua, R. G.; Zavaglia, C. A. C.; A Comparative Study Between  $\alpha$ -TCP and Si- $\alpha$ -TCP Calcium Phosphate Cement, Key Engineering Materials, v. 396-98, p. 201-204, 2009.

Motisuke, M.; Carrodegua, R. G.; Zavaglia, C. A. C.; Mg-Free Precursors for the Synthesis of Pure Phase Si-doped  $[\alpha]$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Key Engineering Materials, V 361-363, 2008.

Motisuke, M.; Rodas, A. C. D.; Higa, O. Z.; Carrodegua, R. G.; Zavaglia, C. A. C.; Avaliação de Citotoxicidade de Cimentos de Fosfato de Cálcio. In: 53 Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2009, Guarujá, SP. Anais do 53 Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2009.

Cardoso, H. A. I. ; Motisuke, M.; Zavaglia, C. A. C.; Desenvolvimento e Caracterização de Cimento Ósseo de  $[\alpha]$ -Fosfato Tricálcico com diferentes tempos de imersão em Fluido Corpóreo Simulado. In: 53 Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2009, Guarujá, SP. Anais do 53 Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2009.

Ramos, S. L. F.; Motisuke, M.; Zavaglia, C. A. C; Trace Magnesium Influence on the TCP obtaining on the  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  System. V Latin Conference of Artificial Organs and Biomaterials, Ouro Preto, Brazil, 2008.

Motisuke, M.; Carrodegua, R. G.; Zavaglia, C. A. C.; Calcium Phosphate Cement based on Si-TCP. V Latin Conference of Artificial Organs and Biomaterials, Ouro Preto, Brazil, 2008.

Motisuke, M. ; Carrodegua, R. G. ; Zavaglia, C. A. C. . Reactivity Study of  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate Stabilized with  $\text{CaSiO}_3$ .. In: IV Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2006, Caxambú - MG. IV Congresso Latino Americano de Órgão Artificiais e Biomateriais, 2006.