



**Universidade Federal de Sergipe
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais**

Dissertação de Mestrado

**Produção de Hidroxiapatita Enriquecida
com Metais Biofuncionais para Aplicação em
Engenharia Tecidual**

Mirna Pereira Moreira

São Cristóvão

Março / 2011

PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITA ENRIQUECIDA COM METAIS
BIOFUNCIONAIS PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL

Mirna Pereira Moreira

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Prof. Euler Araujo dos Santos, DSc.

Prof^a. Lidia Ágata de Sena, DSc.

Prof. Luis Eduardo Almeida, DSc.

SÃO CRISTÓVÃO, SE - BRASIL

MARÇO DE 2011

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me incentivaram e me deram tudo que precisei para minha formação pessoal e educacional, sempre confiantes no meu sucesso, dando muito amor e carinho.

A minha irmã, que sempre me deu forças para derrubar as dificuldades.

A meu marido, este sim me inspirou a seguir com carreira científica e sempre me amparou nas minhas dificuldades ao longo do meu mestrado.

O meu orientador, Euler pela orientação, confiança, incentivo e apoio no decorrer da realização deste trabalho.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório e de pós- graduação pelo auxílio prestado ao referente trabalho.

Aos técnicos do pólo de Física/UFS, da PEQ-PEMM/COPPE/UFRJ e do IS2M-IPCMS/CNRS (França) pela atenção com que realizaram algumas das análises apresentadas neste trabalho;

À CAPES pela bolsa concedida.

Resumo da Dissertação apresentada ao P²CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais (M.Sc.)

PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITA ENRIQUECIDA COM METAIS
BIOFUNCIONAIS PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL

Mirna Pereira Moreira

Março/2011

Orientador: Euler Araujo dos Santos

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

O objetivo principal desse trabalho foi estudar o efeito da incorporação individual e simultânea dos íons Sr^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} sobre as características físico-químicas da hidroxiapatita visando sua utilização na engenharia de tecido ósseo. As análises de raio X das cerâmicas produzidas indicaram que a introdução de metais à rede da hidroxiapatita (HA), após a síntese, causou uma diminuição significativa no nível de cristalinidade das amostras em relação à HA padrão. Os parâmetros de rede calculados revelaram que a substituição do cálcio por Mg^{2+} e Mn^{2+} levou a uma leve contração da célula unitária, comparando-se à HA pura. Após calcinação, o Mn^{2+} muda de estado de oxidação entrando na rede cristalina da HA também sob a forma MnO_4^{3-} nos sítios do PO_4^{3-} . A calcinação favoreceu o crescimento dos cristalitos em todas as amostras, e promoveu a mudança de cristais antes alongados para cristais mais esféricos. A introdução dos três íons simultaneamente parece criar uma situação mais favorável à ordenação do cristal, uma vez que o índice de cristalinidade medido foi o mais alto entre as amostras não calcinadas e os parâmetros de rede foram muito próximos àqueles observados para a HA pura. As amostras contendo Sr^{2+} foram as mais compactas, e as amostras contendo Mg^{2+} e Mn^{2+} , as mais porosas. No entanto, a HA-Sr foi a mais solúvel das amostras enquanto que a HA-Mn foi a menos solúvel. Assim, a introdução dos três íons à rede da HA possibilitou a criação de um material de elevada estabilidade térmica com potencial para aplicação como uma biocerâmica.

Palavras-chave: biomateriais, hidroxiapatita, íons metálicos.

Abstract of Thesis presented to P²CEM/UFS as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Materials Science and Engineering (M.Sc.)

PRODUCTION OF HYDROXYAPATITE ENRICHED WITH BIOFUNCTIONAL METALS FOR USING IN TISSUE ENGINEERING

Mirna Pereira Moreira

March/2011

Advisor: Euler Araujo dos Santos

Department: Materials Science and Engineering

The main objective of this work was investigating the physic-chemical effects of the individual and simultaneous replacement of Ca^{2+} ions for Mg^{2+} , Sr^{2+} and Mn^{2+} onto the crystalline structure of hydroxyapatite (HA). The X-ray analyses indicated that the substitution of Ca^{2+} for other ions after synthesis caused a remarkable decreasing of the crystallinity index comparatively to the pure HA. The lattice parameters revealed that the addition of Mg^{2+} and Mn^{2+} lead to a slight reduction of the cell unit volume. After calcination, Mn^{2+} changed its oxidation state being introduced at the PO_4^{3-} sites as MnO_4^{3-} groups. The thermal treatment strongly increased the crystallite growth for all samples, and also promoted the change from elongated crystals before calcination to spherical ones after calcination. The simultaneous insertion of three ions in the HA lattice seemed generate a favorable situation for organizing the apatite crystal once the crystallinity index was the highest among the samples and the measured lattice parameters were quite close to those calculated to the pure HA. The samples containing Sr^{2+} ((HA-Sr e HA-Mn/Sr/Mg) were denser than those containing Mg^{2+} (HA-Mg) and Mn^{2+} (HA-Mn). However, the HA-Sr was more soluble than HA-Mn or HA-Mg. The use of three elements with different ionic radii in substitution to the Ca^{2+} allowed the creation of a new HA ceramic with a high level of crystallinity and a satisfactory thermal stability for applying in the production of bioceramic devices.

Keywords: *biomaterials, hydroxyapatite, metal ions.*

ÍNDICE

RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. TECIDO ÓSSEO	15
2.2. ENXERTOS ÓSSEOS.....	16
2.3. HIDROXIAPATITA	17
2.3.1. <i>Métodos de obtenção da hidroxiapatita</i>	20
2.4. INCORPORAÇÃO DE METAIS À HIDROXIAPATITA.....	21
3. OBJETIVOS	25
3.1. OBJETIVO GERAL:	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA	28
4.1.1. <i>Produção de HA pura</i>	28
4.1.2. <i>Incorporação de metais à HA</i>	29
4.2. ESTABILIDADE TÉRMICA APÓS SÍNTESE	30
4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS HIDROXIAPATITAS OBTIDAS	30
4.3.1. <i>Composição das amostras</i>	30
4.3.2. <i>Estrutura da HA</i>	31
4.3.3. <i>Morfologia dos cristais</i>	32
4.3.4. <i>Análise do potencial Zeta das partículas</i>	32
4.4. PRODUÇÃO DE PASTILHAS DE HA	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1. ESCOLHA DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DA HA.....	35
5.2. INCORPORAÇÃO DE METAIS À HA	38
5.2.1. <i>Composição</i>	38
5.2.2. <i>Estrutura dos cristais</i>	42
5.2.3. <i>Morfologia dos cristais</i>	50
5.3. PASTILHAS DE HA	52
6. CONCLUSÕES.....	62
7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Vizinhança do Ca I e do Ca II em relação aos grupamentos fosfatos e hidroxila (Ca: verde; O: vermelho; P: roxo; H: branco). Esquema modificado de Laurencin <i>et. al.</i> (2011) [32].....	19
Figura 2. Esquema utilizado na síntese da HA.....	29
Figura 4. Efeitos das variáveis sobre o índice de cristalinidade da hidroxiapatita após síntese.	36
Figura 5. Difractogramas de raios-X das amostras de hidroxiapatita após calcinação.	37
Figura 6. Efeitos das variáveis sobre o índice de cristalinidade da hidroxiapatita após calcinação.	37
Figura 7. Quantidade dos elementos presentes (em mol) nas amostras de HA após síntese. O valor percentual indica a quantidade relativa em mol de cada elemento na amostra de acordo o total de elementos quantificados por amostra.	39
Figura 8. Espectros obtidos por DRIFT para as amostras após calcinação a 1000°C/2h.	41
Figura 9. Difractogramas de raios-X das amostras de hidroxiapatita contendo metais logo após síntese e secagem a 100°C/24h. O diagrama indica a região contendo os três picos mais intensos para uma HA padrão e seus planos correspondentes.	44
Figura 10. Difractogramas de raios-X das amostras de hidroxiapatita contendo metais após calcinação a 1000°C/2h.....	45
Figura 11. Índice de cristalinidade das amostras antes e após calcinação.....	46
Figura 12. Razão de aspecto calculada para os cristais antes e após calcinação.....	51
Figura 13. Variação do tamanho de cristalito antes e após calcinação das amostras contendo metais.	51
Figura 14. Imagens obtidas por TEM para as amostras antes (quadro maior) e após calcinação (quadro menor).	55
Figura 15. Imagem SEM (elétrons retroespalhados) e mapeamentos elementares para Ca, Mg e P obtidos sobre da superfície da pastilha de HA-Mg.....	57
Figura 16. Imagem SEM (elétrons retroespalhados) e mapeamentos elementares para Ca, Sr e P obtidos sobre da superfície da pastilha de HA-Sr.....	58
Figura 17. Imagem SEM (elétrons retroespalhados) e mapeamentos elementares para Ca, Mn e P obtidos sobre da superfície da pastilha de HA-Mn.....	58

Figura 18. Imagem SEM (elétrons retroespalhados) e mapeamentos elementares para Ca, Mg, Sr, Mn e P obtidos sobre da superfície da pastilha de HA-Mg/Mn/Sr.	59
Figura 19. Variação do potencial Zeta das partículas de HA ao longo do tempo de imersão em água, a temperatura ambiente.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tipos, fórmula química e relação Ca/P das apatitas [31].	19
Tabela 2. Níveis dos fatores para o planejamento fatorial do tipo 2 ²	28
Tabela 3. Reagentes utilizados na preparação das soluções.	30
Tabela 4. Fórmulas empíricas obtidas a partir das quantidades molares calculadas para cada elemento nas amostras usando fluorescência de raios-X (XRF).	42
Tabela 5. Parâmetros de rede calculados a partir dos difratogramas de raios-X para as amostras antes e após calcinação.	47
Tabela 6. Valores de densidades geométricas e relativas obtidas para as pastilhas após calcinação a 1000°C por 2h.	55

1. Introdução

Dentre os materiais utilizados atualmente na área de saúde, os biomateriais têm sido a classe de maior destaque. Baseados em dados estatísticos, a ANVISA (2010) [1] afirma que hoje em dia, mais de 300.000 produtos na área de saúde fazem parte da classe dos biomateriais e devido ao envelhecimento gradual da população mundial, o uso de biomateriais tende a aumentar exponencialmente nos próximos anos.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2010) [2], com base no Censo 2000, os idosos eram 14,5 milhões de pessoas, ou seja, 8,6% da população brasileira. A estimativa para 2010 é, em média, 10% da população. Hoje no mundo uma em cada dez pessoas tem 60 anos ou mais. As estimativas são de que daqui a 30 anos a proporção será de um para cada cinco pessoas, sendo que nos países ricos será um para cada três pessoas. A Itália (23,1%), o Japão (22,3%), a Alemanha (21,8%) e o Reino Unido (20,4%) estão entre os países com maior índice de pessoas com 60 anos ou mais [3].

Esta correlação entre o envelhecimento da população mundial e uso de materiais biomédicos existe porque esta classe de materiais é fundamental para a confecção de produtos e equipamentos utilizados em vários tipos de tratamentos em diversas áreas da medicina. Podemos citar como exemplo a área cardiovascular, com o uso de biomateriais para a confecção de equipamentos do tipo: cardioversores, cardiodesfibriladores e marcapassos, produtos tipo próteses endovasculares (*stents*) e válvulas cardíacas. Outra área onde os biomateriais são fundamentais é a ortopedia. Nesta área os biomateriais são fundamentais para a confecção dos mais variados tipos de próteses. A maior parte dos problemas de saúde na terceira idade envolve essas duas vertentes de biomateriais.

Do ponto de vista financeiro, o mercado mundial envolvendo produtos e equipamentos biomédicos no início dessa década foi estimado em 13 bilhões de dólares, além disso, havia uma taxa de crescimento estimada em 12% ao ano [4]. A participação dos EUA se situa entre 35-45% do mercado mundial, enquanto o mercado europeu é responsável por aproximadamente 25% [5].

Todos estes bilhões de dólares associados ao mercado mundial de biomateriais estimulam fortemente o aumento de pesquisas envolvendo o estudo e desenvolvimento de novos biomateriais e suas aplicações. Na década passada o número de publicações envolvendo biomateriais aumentou de 1.332 em 2000 para 8.426 artigos em 2010, ou

seja, um crescimento de aproximadamente 632% (pesquisa realizada na base de dados *Web of Science* utilizando a palavra-chave “*biomaterials*”).

No Brasil, muitos grupos de pesquisa vêm investindo muito em estudos objetivando desenvolvimento de novos biomateriais. Dentre os materiais cerâmicos, a hidroxiapatita (HA) apresenta destaque na área de ortopedia e odontologia, pois a fase mineral que compõe os ossos e dentes é rica em fosfato de cálcio (principal constituinte da hidroxiapatita em ocorrência natural), justificando sua alta biocompatibilidade quando empregados como implantes ou próteses [6].

A HA é um fosfato de cálcio hidroxilado $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ que, na natureza, raramente é encontrado puro. As formas cristalinas de HA formadas em condições ambientais possuem, geralmente, várias substituições catiônicas e aniônicas. No osso, o carbonato é o seu maior substituinte aniônico enquanto que vários outros metais, tais como, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} , são responsáveis pelas substituições catiônicas, em quantidades variadas. Cada uma dessas substituições desempenha uma função biológica específica no organismo vivo, o que caracteriza o osso como um grande reservatório de nutrientes. Esses íons substituintes podem controlar desde eventos celulares de adesão e diferenciação até eventos físico-químicos menos diretos como, por exemplo, o aumento da solubilidade da apatita em certas regiões, facilitando sua liberação sempre que necessário para o organismo.

Nesse sentido, o efeito do enriquecimento da HA por outros ânions e cátions tem despertado grande interesse devido às mudanças que eles podem induzir nas propriedades físico-químicas e biológicas da HA. Substituições desse tipo são acompanhadas por mudanças nos parâmetros de rede e volume da célula unitária, que geralmente estão relacionadas ao tamanho e carga do substituinte relativamente ao sítio original da HA. Particularmente, a incorporação de íons metálicos à HA, tais como Mg^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} e Ag^+ , tem se mostrado uma alternativa adequada quando se deseja o aumento da biocompatibilidade da HA original, reduzindo o tempo de resposta do organismo para reparação de defeitos e melhorando problemas de perdas sépticas de implantes [7]-[9]. Vários estudos sobre a biofuncionalidade de cada um desses metais quando individualmente incorporados a fosfatos de cálcio são realizados atualmente. [10],[11]. No entanto, pouco foi feito até hoje no sentido de se compreender os efeitos de uma substituição simultânea, onde vários cátions e ânions são adicionados ao mesmo tempo à rede original da HA, como o que ocorre na formação das apatitas minerais e

biológicas. Dessa forma, o objetivo original desse trabalho é estudar os efeitos de uma incorporação individual e simultânea de três cátions (Mg^{2+} , Sr^{2+} e Mn^{2+}), com propriedades biológicas conhecidas, sobre as propriedades físico-químicas da HA resultante.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. TECIDO ÓSSEO

O osso é considerado um compósito formado por nanocristais minerais dispersos numa matriz protéica. A fase mineral óssea é constituída basicamente de apatitas dos tipos hidroxiapatita, fluorapatita e carbonato-apatita.

A organização estrutural do osso pode ser classificada de acordo com a sua macroestrutura (osso cortical e esponjoso), microestrutura (sistema Harvesiano, ósteons, trabéculas individuais), sub-microestrutura (lamelas), nanoestrutura (colágeno fibrilar com nanocristais de apatita) e sub-nanoestrutura (estrutura molecular e elementar). Essa estrutura hierarquicamente organizada possui um arranjo e orientação característico, produzindo um material heterogêneo e anisotrópico [12].

Os cristais de apatita crescem em espaços discretos, dentro das fibrilas de colágeno, numa orientação específica, com o eixo dos cristais paralelos ao eixo das fibrilas de colágeno. Essa organização estrutural fundamental é a grande responsável pelas propriedades mecânicas exibidas pelo osso [12].

Cerca de 70% em peso do tecido ósseo seco é composto por cálcio e fosfato, e de pequena quantidade de carbonato, citratos, magnésio, sódio e potássio. A parte orgânica é constituída de fibras colágenas (95%) e outras proteínas não colagênicas [12],[13]. O osso é altamente especializado sendo caracterizado por sua rigidez e resistência a compressão, e além de servir como suporte, ele se constitui num grande reservatório de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , e outros nutrientes necessários em uma ampla variedade de funções metabólicas do corpo [14].

O tecido ósseo é um sistema complexo, altamente organizado, constituído de células ósseas dispersas numa matriz mineralizada permeada por tecidos conjuntivos, hematopoéticos e cartilagens. As principais células do tecido ósseo são os osteoblastos, osteoclastos e os osteócitos. Osteoblastos são originários de células osteoprogenitoras que se desenvolvem no próprio tecido, enquanto os osteoclastos são provenientes da fusão de células hematopoéticas da medula óssea [15],[16].

Os osteoblastos são encontrados, geralmente, formando uma monocamada aderente sob o perióstio ou nas superfícies endósteas do osso [17]. Uma das principais funções do osteoblasto é produzir proteínas da matriz extracelular (osteóide) como

colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas. Como consequência, osteoblastos ativos possuem complexo de Golgi proeminente e uma grande quantidade de cisternas de retículo endoplasmático rugoso. Além disso, são células polarizadas em que a secreção do osteóide se dá perpendicularmente à base da célula. Logo, a direção do crescimento ósseo é sempre perpendicular à base dos osteoblastos [18].

Os osteócitos são osteoblastos que ficam aprisionados na matriz mineralizada e são responsáveis pela manutenção dessa matriz e pela transdução de sinais mecânicos sentidos pelo osso. Os osteoclastos são células grandes, multinucleadas originárias da fusão de precursores hematopoéticos mononucleares, bastante móveis que absorvem matriz mineralizada, participando dos processos de reabsorção e, portanto, da remodelação óssea.

2.2. ENXERTOS ÓSSEOS

O tecido ósseo perdido ou lesado pode ser substituído por enxertos que podem ser classificados em: autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos [19]. Enxertos autógenos ocorrem quando o osso é transferido de um lugar para outro, no mesmo indivíduo. Seu emprego, porém, traz alguns problemas como a limitação de sítios para extração e indução de uma cirurgia adicional a pacientes já debilitados [20]. No entanto, esse enxerto induz uma baixa resposta imunológica obtendo uma alta eficiência de reparação.

Os enxertos alógenos são obtidos de outros pacientes e, por isso, apresentam em geral certos níveis de rejeição e respostas imunológicas contrárias. Os xenógenos provêm de uma matriz mineral óssea purificada de origem bovina, sendo semelhante ao osso humano no que concerne a sua superfície interna, porosidade, tamanho do cristal e relação cálcio-fósforo, porém também apresentam níveis consideráveis de respostas imunológicas contrárias. Por fim, os enxertos aloplásticos são materiais sintéticos produzidos em laboratório para mimetizar o tecido a ser reparado, apresentando em geral alta biocompatibilidade e baixos níveis de resposta imunológica contrária [19]. Os estudos em biomateriais hoje são fundamentados na produção de materiais cada vez mais próximos (físico-quimicamente) do tecido original, ou seja, autógeno.

Particularmente, a mimetização do tecido ósseo em laboratório deve levar conta, não somente a produção de materiais com propriedades mecânicas semelhantes ao tecido ósseo, mas também quimicamente e estruturalmente similares. Metais e cerâmicas, principalmente as cerâmicas de fosfatos de cálcio, têm sido muito utilizadas nesse sentido, pois exibem propriedades mecânicas e químicas semelhantes ao osso original. Além disso, esses materiais não apresentam riscos de transmissão de patologias infecto-contagiosas nem de degradação protéica, em razão de suas características sintéticas, e por apresentarem alta pureza em decorrência de seu processo de obtenção com controle rígido e sistemático, sistemático. De acordo com os padrões exigidos pelas agências de vigilância sanitária [21].

2.3. HIDROXIAPATITA

A fórmula química da hidroxiapatita (HA) estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 sendo o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel. Porém fosfatos de cálcio estáveis e também importantes podem apresentar razões Ca/P variando de 0,5 até 2,0 [22]. As possíveis relações Ca/P das apatitas, seus nomes e fórmulas estão apresentados na Tabela 1.

A HA mineral ocorre raramente na natureza, porém a fluorapatita [23] (com o grupo F^- ocupando os sítios do OH^-) é normalmente de fácil observação em várias rochas ígneas e metamórficas, principalmente em calcários cristalinos [24]. Essas rochas contendo fosfato são de suma importância para fontes no fornecimento de fósforo para indústrias químicas e de fertilizantes [25]. O fosfato de cálcio na rocha ígnea e sedimentar é exclusivamente de apatita [26].

Os esqueletos de espécies marinhas são ricos em carbonato de cálcio, entretanto, alguns podem ser totalmente formados por fosfatos de cálcio. Todavia, depósitos de carbonatos de cálcio podem ser convertidos em apatita pela reação direta com fosfato dissolvido no ambiente marino [25].

A HA pura cristaliza-se sob a forma monoclínica; entretanto, em temperaturas acima de 250°C , existe a transição alotrópica, ou seja, mudança da forma monoclínica para hexagonal [27],[28]. Algumas impurezas, ou substituições parciais da hidroxila por íons cloreto ou fluoreto, estabilizam a sua forma hexagonal a uma temperatura

ambiente. Por isso, monocristais naturais de HA exibem uma conformação hexagonal. Sua densidade é de $3,16 \text{ Kg.m}^{-3}$ e os parâmetros de rede são $a = b = 0,94059 \text{ nm}$ e $c = 0,68654 \text{ nm}$ [29].

A HA possui célula unitária hexagonal e é formada por 10 íons cálcio (Ca^{2+}), 6 íons de fosfato (PO_4^{3-}) e 2 íons de hidroxila (OH), como apresentado na Figura 1. Os íons de cálcio encontram-se em dois sítios, sendo quatro íons no sítio I, tetraédricos (Ca I) e seis íons no sítio II, octaédricos (Ca II). Os íons cálcio no sítio I estão alinhados em colunas e os íons cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura: um no plano $z = \frac{1}{4}$ e outro em $z = \frac{3}{4}$ de maneira que sua projeção no plano ab forma um hexágono. Os triângulos de cálcio tem $0,408 \text{ nm}$ de lado, formando um canal ao longo do eixo c . Os íons OH^- ocupam o centro do canal dos cálcios logo abaixo do plano dos Ca^{2+} . Os íons Ca^{2+} do sítio I estão coordenados a 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4^{3-} e também a 3 átomos de oxigênio relativamente distantes. Já o Ca^{2+} sítio II estão coordenados a outros seis oxigênios e a uma hidroxila, esta por sua vez situa-se no centro do canal do cálcio. Cada um dos 6 átomos de fósforo está cercado por 4 átomos de oxigênio, denominados de O(I), O(II) e O(III) dando origem a 6 tetraedros de PO_4 formam a base estrutural unitária da HA. Os tetraedros de fosfatos PO_4 estão ligados a dois ou três átomos de Ca de acordo com o número de coordenação do oxigênio.

A existência de dois sítios de íons cálcio traz consequências para as hidroxiapatitas que contém impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sítio ocupado [29],[30]. Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria (eixo c). Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons óxidos (O^{2-}) e de íons cálcio (Ca^{2+}) estão ligados entre si por íons fosfato. Os átomos de oxigênio dos íons hidroxila estão situados a $0,9 \text{ \AA}$ abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio e a ligação O-H forma um ângulo de aproximadamente 30° com a direção c .

Tabela 1. Tipos, fórmula química e relação Ca/P das apatitas [31].

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico (α , α' , β , γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (α , β , γ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Dos quatro átomos de oxigênio que constituem os grupos fosfatos, dois estão situados em planos perpendiculares à direção c e os outros dois são paralelos a esta direção.

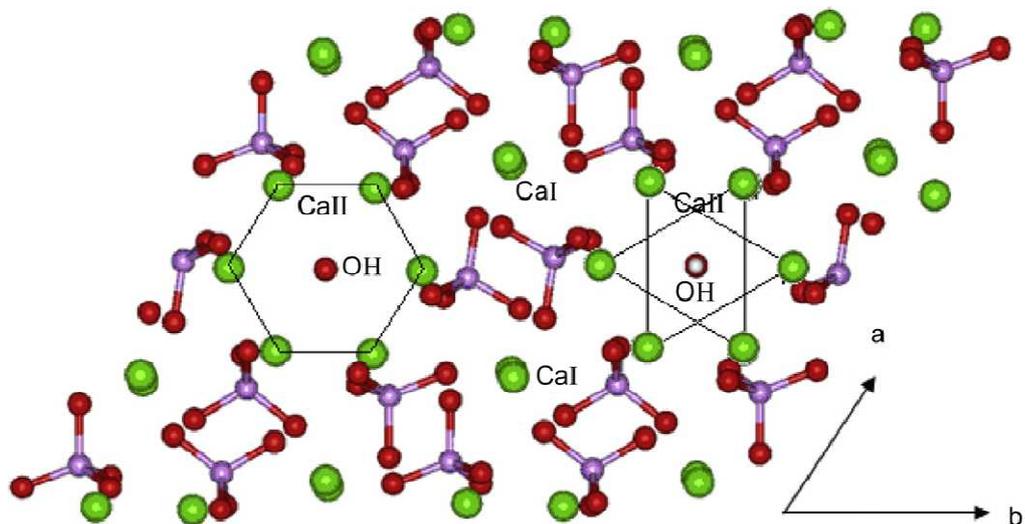


Figura 1 - Vizinhança do Ca I e do Ca II em relação aos grupamentos fosfatos e hidroxila (Ca: verde; O: vermelho; P: roxo; H: branco). Esquema modificado de Laurencin *et. al.*(2011) [32].

Os tetraedros dos grupos PO_4^{3-} estão arranados de tal forma que possibilitam a formação de dois tipos de canais perpendiculares ao plano basal. O primeiro canal com diâmetro de 2 Å é paralelo aos eixos ternários e são ocupados por átomos de Ca I. Em cada célula unitária, encontram-se 2 canais ocupados por íons Ca I que estão localizados em $z = 0$ e $z = \frac{1}{2}$ do parâmetro de rede cristalino. O segundo canal que tem diâmetro de 3,0 a 3,5 Å, é constituído por íons Ca II No interior desses canais dá-se a distinção entre a forma hexagonal e a monoclinica. [25]. Deformações na rede causadas pelo deslocamento das hidroxilas tornam a estrutura monoclinica, um arranjo mais fechado. Exceto a posição do grupo OH, todas as outras posições atômicas na $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, são essencialmente iguais as da fluorapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ [25].

2.3.1. Métodos de obtenção da hidroxiapatita

Pode-se obter hidroxiapatita através de inúmeras técnicas [29]. Um dos métodos mais utilizados consiste na técnica de precipitação, que envolve reações em via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH da solução. O precipitado é geralmente calcinado em temperaturas elevadas a fim de se aumentar sua resistência mecânica (na fabricação de enxertos) ou aumento de cristalinidade. A precipitação rápida durante a titulação da solução de fosfato em solução de cálcio pode levar a falta de homogeneidade química no produto final. A titulação lenta e as soluções diluídas devem ser utilizadas, pois melhoram a homogeneidade química e a estequiometria da HA no final da síntese. Deve-se ter muito cuidado durante a realização da síntese, pois o controle das condições de reação é crítico na precipitação por via úmida. Uma diminuição do pH da solução abaixo de 9, por exemplo, pode levar à formação de uma HA deficiente em íons de Ca [29].

O processo sol-gel é um método, o qual dispensa a utilização de temperaturas elevadas, sendo considerada uma técnica mais flexível e promissora. Devido a possibilidade de um controle cuidadoso dos parâmetros do processo, é possível a obtenção de cristais de HA de tamanhos variados [29]. A escolha dos precursores e solventes comuns para a obtenção do sol-gel deve sempre utilizar reagentes mais reativos que são os alcóxidos dos respectivos cátions e ânions que devem compor a fase

inorgânica final desejada. Estes normalmente são solúveis em álcoois e sofrem hidrólise e condensação formando um sol homogêneo [29]. Como material de implante a HA pode ser obtida por desproteinização de tecido ósseo [33], ou por tratamento hidrotérmico de corais [34] ou reações no estado sólido [35].

O método de síntese adotado para a obtenção de hidroxiapatita e/ou o seu tratamento térmico posterior pode levar ao aparecimento de outras fases de fosfato de cálcio, detectadas por difratometria de raios X. Cuidados devem ser tomados para controlar a quantidade destes subprodutos, uma vez que estes possuem propriedades diferentes da HA original, podendo comprometer a sua osteocondução (como no caso do surgimento de pirofosfato de cálcio, carbonato de cálcio ou óxido de cálcio), sua integridade química e eficiência mecânica [36].

2.4. INCORPORAÇÃO DE METAIS À HIDROXIAPATITA

Uma maneira de se modificar as propriedades estruturais e de biocompatibilidade da HA é a incorporação de cátions bivalentes e trivalentes à rede cristalina original da HA [10]. No entanto, essa incorporação de íons pode levar a um aumento da instabilidade térmica da HA.

A estrutura da hidroxiapatita permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande facilidade [37]. O Ca^{2+} pode ser substituído por metais tais como o chumbo (Pb^{2+}), cádmio (Cd^{2+}), cobre (Cu^{2+}), zinco (Zn^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}), cobalto (Co^{2+}), ferro (Fe^{2+}), manganês (Mn^{2+}), prata (Ag^+) e etc. Os grupos fosfatos e hidroxilas, negativos, podem ser substituídos por carbonatos (CO_3^{2-}), silicatos (SiO_4^{2-}), flúor (F^-), cloro (Cl^-), etc. Essas substituições normalmente alteram a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da hidroxiapatita [25].

O crescimento da hidroxiapatita em meio natural ocorre na presença de vários íons diferentes dos íons cálcio e fosfato [7]. Como nos minerais, a hidroxiapatita do osso é multiplamente substituída por vários dos íons metálicos vistos nas apatitas minerais. Os níveis de substituição variam com a idade e região do osso, e esses substituintes podem estar presentes em diferentes níveis de concentrações. As substituições mais

grosseiras ficam por conta do CO_3^{2-} (5,0%), Na^+ (0,9%) e Mg^{2+} (0,5%-0,7%). Outros substituintes, tais como SiO_4^{2-} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} , são observados em pequenas quantidades [27].

O efeito da substituição do Ca^{2+} por outros metais tem despertado grande interesse devido a mudanças que eles podem induzir nas propriedades físico-químicas e biológicas da HA. Vários estudos sobre a biofuncionalidade de cada um desses metais quando individualmente incorporados a fosfatos de cálcio são realizados atualmente.

O estrôncio é, comprovadamente, um redutor de problemas de reabsorção óssea (como a osteoporose) atuando pela inibição da atividade dos osteoclastos [9],[38]. Em baixas concentrações ele pode inibir a reabsorção do osso e ativar os mecanismos de sua formação. O estrôncio é incorporado pela substituição do cálcio na estrutura da HA e esta substituição induz importantes mudanças nas propriedades físico-químicas da fase mineral dos tecidos calcificados.

Um trabalho sobre as características estruturais de uma HA dopada com estrôncio foi realizado por Bigi *et. al.* (1998) utilizando amostras de HA contendo 5%, 20% e 60% em mol de Sr^{2+} [39]. Nesse estudo, os autores sintetizaram amostras a partir de uma mistura de pós de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{OH})_2$ e de $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ em proporções pré-determinadas. A mistura era então levada ao forno e aquecida em temperatura de 1200°C produzindo-se uma hidroxiapatita dopada com estrôncio por difusão iônica na fase sólida. Este método de síntese produz um material com altíssima cristalinidade e com grandes partículas devido a altas temperaturas de preparação. Os refinamentos feitos por Rietveld das amostras de HA contendo Sr^{2+} realizados por eles mostraram a preferência do Sr^{2+} pelo sítio do Ca^{2+} . Os autores levantaram a hipótese que a preferência pelo sítio (II) está relacionado à distância média da ligação entre o metal com o oxigênio que é maior no sítio (II) que no sítio (I).

O magnésio é um dos mais importantes íons bivalentes associados às apatitas biológicas [40],[41]. Verificou-se que a quantidade de Mg^{2+} associada à fase apatita é maior no início do processo de calcificação *in vivo* e diminui com o passar do tempo. Além disso, há evidências crescentes de que Mg^{2+} pode ser um fator importante para as mudanças de resistência mecânica da HA após tratamento térmico. A introdução de íons Mg^{2+} leva a uma transformação gradual da HA em fosfato tricálcio em baixas temperaturas [42]. No entanto, a adição do magnésio na HA tem atraído estudos recentes devido ao seu significativo impacto no processo de mineralização do tecido

ósseo pelos osteoblastos e também sua influência na formação e crescimento de cristais da HA *in vivo*. A incorporação de Mg^{2+} na HA é limitada ao máximo de 0,4% em massa sendo que a incorporação de outros íons, concomitantemente, pode induzir efeitos sinérgicos ou antagônicos nas propriedades da apatita; sabe-se que a incorporação de Mg^{2+} e CO_3^{2-} tem efeito sinérgico na cristalinidade e na dissolução das apatitas sintetizadas. Já o Mg^{2+} e o F^- apresentam efeito antagônico sob as mesmas propriedades [43].

O manganês é um dos mediadores da adesão de osteoblastos e parece aumentar consideravelmente a proliferação e diferenciação *in vitro* [44]. A adição de íons Mn^{2+} à HA está associada a ativação de integrinas, que são proteínas de adesão presentes na parede celular estas proteínas mediam interações celulares com ligantes extracelulares. Na presença de íons Mn^{2+} a afinidade do ligante pelas integrinas aumentam e a adesão celular é promovida. Bigi et al. demonstraram através de testes biológicos que o cultivo de osteoblastos humanos em filmes finos de HA dopados com Mn^{2+} favoreceram a proliferação dos osteoblastos através da ativação do seu metabolismo [45].

O maior problema na incorporação de metais à HA reside no fato de que os tratamentos térmicos normalmente empregados, para a produção de enxertos para preenchimento e recobrimentos cerâmicos em implantes induzem transformações de fase consideráveis nessas cerâmicas [46]. A alta instabilidade térmica da HA contendo metais é causada pelas distorções de rede provocadas pela entrada desses íons nos sítios do cálcio. Subprodutos indesejados, tais como outros fosfatos de cálcio menos biocompatíveis, segregação dos metais em regiões específicas sob forma de óxidos e mesmo a decomposição da HA em óxido de cálcio (conhecido por sua extrema toxidez frente às células) podem ser gerados durante tratamento térmico [47]. Essa é uma das razões porque a incorporação simultânea de vários íons metálicos diferentes à estrutura da HA, como acontece normalmente no osso, ainda é pouco explorada.

Como uma tendência natural na ciência, sistemas cerâmicos simplificados contendo apenas um metal incorporado foram inicialmente usados para se entender o efeito específico de cada um deles na regeneração óssea. Hoje, estudos mais complexos se mostram necessários para dar seguimento àqueles preliminares e apontam uma nova direção na produção de cerâmicas bioativas. A mimetização do tecido ósseo, com sua matriz orgânica constituída basicamente de colágeno reforçado por nanocristais de HA [48], já foi em grande parte estudada no que diz respeito a associação *in vitro* de

proteínas à HA [49]-[54]. No entanto, a natureza química da HA como de fato é observada no tecido ósseo não teve quase atenção até 2005. A partir de então, um crescente número de trabalhos sobre incorporação de metais à HA começou a tomar espaço [55]-[57], criando essa nova perspectiva de aumento da biocompatibilidade pela mimetização *in vitro* da composição química da HA óssea.

3. Objetivos

3.1. OBJETIVO GERAL:

O objetivo principal desse projeto foi estudar o efeito da incorporação individual e simultânea dos íons Sr^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} sobre as características físico-químicas da hidroxiapatita (HA) visando sua utilização na engenharia de tecido ósseo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar uma condição adequada de produção de HA pura via precipitação em meio aquoso;
- Introduzir individualmente e simultaneamente os íons Sr^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} na rede cristalina original da HA;
- Caracterizar físico-quimicamente o produto obtido para confirmar a entrada dos íons na rede da HA;
- Produzir pastilhas e caracterizar a superfície das pastilhas produzidas;
- Estudar o efeito das substituições na incorporação de carbonato pelas redes cristalinas formadas;
- Determinar a estabilidade térmica das pastilhas.

4. Materiais e Métodos

4.1. SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

4.1.1. Produção de HA pura

Para se definir as condições ideais de síntese de uma hidroxiapatita (HA) pura, um planejamento fatorial 2^2 foi realizado de acordo com as variáveis e níveis mostrados na Tabela 2. A síntese se deu pelo método de precipitação em meio aquoso, numa reação ácido-base entre o ácido fosfórico H_3PO_4 0,110 mol/L, e o hidróxido de cálcio $Ca(OH)_2$ 0,167 mol/L. O pH do plasma sanguíneo no corpo humano é em média 7,4 e a temperatura média $37^\circ C$. Nesse sentido, um dos níveis foi escolhido com o objetivo de se mimetizar as condições biológicas do corpo. No entanto, sabe-se que em geral as condições ideais para precipitação de apatitas cristalinas em meio aquoso são pH alcalinos e temperaturas elevadas [27]. O planejamento fatorial serviu para apontar condições de síntese intermediárias entre os dois níveis mais extremos.

Tabela 2. Níveis dos fatores para o planejamento fatorial do tipo 2^2 .

FATORES	NÍVEIS	
	-	+
Temperatura ($^\circ C$)	37	60
pH	7,4	10

A solução de H_3PO_4 foi adicionada lentamente (2,0mL/min) à solução de $Ca(OH)_2$ sob agitação constante na temperatura determinada. O pH da suspensão foi monitorado ao longo de toda a reação com a adição de KOH 0,1mol/L para correção. A aparelhagem utilizada está ilustrada na Figura 2.

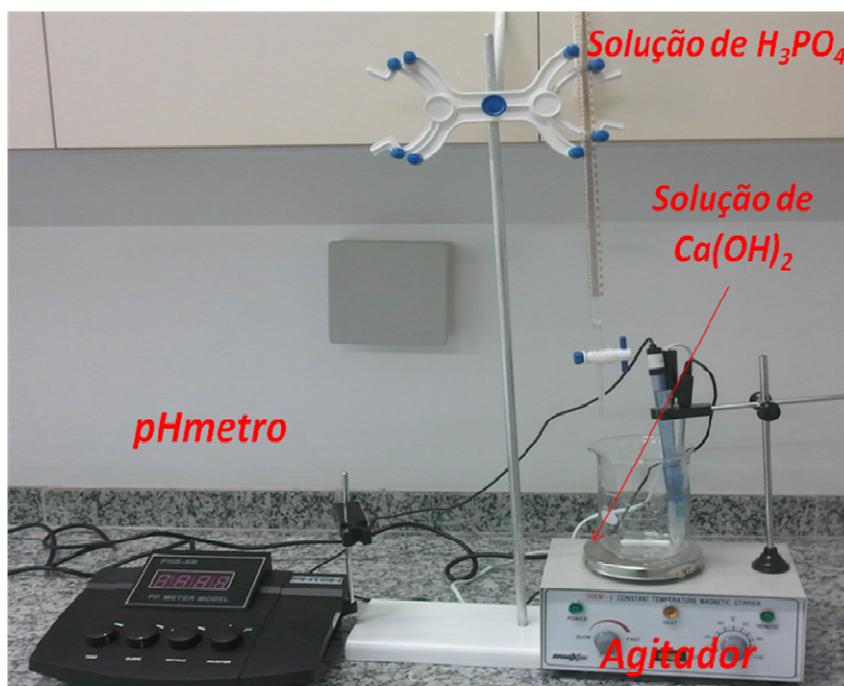


Figura 2. Esquema utilizado na síntese da HA.

Após a total adição do ácido, o precipitado foi envelhecido ainda na temperatura e pH de síntese por 24 horas para favorecer o crescimento dos cristais. As amostras foram então filtradas em funil de Buchner, lavadas com água destilada até que o líquido remanescente exibisse o pH inicial da água destilada usada, e secas a 120 °C/24h em estufa. O material seco foi triturado em grau de ágata, peneirado (peneira de Mesh 140, partículas < 106µm) e armazenado em ambiente livre de umidade.

4.1.2. Incorporação de metais à HA

A partir das condições ótimas para precipitação da HA definidas pelo planejamento fatorial, os íons metálicos Sr^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} foram adicionadas ao vaso de reação segundo a descrição da Tabela 3. As concentrações escolhidas foram definidas para se ter um excesso de íons metálicos em relação ao valor normalmente observado no osso, de modo a forçar a entrada do íon. Os íons Sr^{2+} e Mg^{2+} foram adicionados à solução de hidróxido de cálcio antes do início da síntese. No entanto, o Mn^{2+} foi adicionado ao ácido, uma vez que em ambientes básicos sua oxidação é favorecida [45].

Tabela 3. Reagentes utilizados na preparação das soluções.

Reagentes	Formula molecular	Razão M^{2+}/Ca^{2+} (mol/mol)
Cloreto de magnésio	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,01
Nitrato de estrôncio	$Sr(NO_3)_2$	0,01
Cloreto de manganês	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,001

Após a síntese, o precipitado foi envelhecido, filtrado, devidamente lavado, seco, triturado, peneirado e armazenado em ambiente seco, como citado anteriormente para a HA pura.

4.2. ESTABILIDADE TÉRMICA APÓS SÍNTESE

Os pós de HA obtidos foram submetidos a um tratamento térmico (calcinação) para se verificar a estabilidade da hidroxiapatita e sua tendência de transformação de fase durante calcinação. Para isso, os pós foram postos individualmente em cadinhos limpos e aquecidos num forno Mufla numa taxa de $2,8^\circ C/min$ até $1000^\circ C/2h$. O pó calcinado foi armazenado em ambiente seco.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS HIDROXIAPATITAS OBTIDAS

4.3.1. Composição das amostras

As amostras foram submetidas a análise química por fluorescência de raios-X (XRF), onde os elementos Ca, P, Mg, Sr e Mn foram monitorados. A técnica de XRF baseia-se na absorção de raios-X por parte do material que induz a excitação dos átomos que emitem radiação quando retornam ao estado original sendo denominada de fluorescência de raios-X. Essa técnica permite não somente a identificação dos elementos presentes na amostra quanto a sua quantificação. As análises foram feitas sob os pós das HA calcinadas num espectrômetro de fluorescência de raios-X no Núcleo de Catálise (NUCAT) do PEQ/COPPE/UFRJ.

Análises de infravermelho por refletância difusa com transformada de Fourier (DRIFT, *diffuse reflectance infrared spectroscopy*) foram executadas sob o pó das amostras calcinadas, no modo transmitância, varrendo o espectro de 4000 a $500cm^{-1}$ e usando um espectrômetro Bruker IFS66 no IS2M/CNRS - França.

4.3.2. Estrutura da HA

A estrutura das hidroxiapatitas obtidas e a presença de outras fases após síntese/calцинаção foram investigadas por meio de difração de raios-X (XRD, *X-ray diffraction*). Os espectros de XRD foram obtidos variando 2θ de 3° a 60° , com uma velocidade de dois pontos por segundo e passo de $0,05^\circ$ em um difratômetro RIGAKU (Pólo de Novos Materiais - UFS). As análises dos difratogramas obtidos foram realizadas com auxílio dos cartões contidos no JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) (HA nº 9-432, α -TCP nº 29-0359 e β -TCP nº 9-169). O cálculo dos parâmetros de rede a e c foi feito levando-se em conta os planos perpendiculares (0 0 2) e (3 0 0) da HA, respectivamente, usando a relação padrão entre as distâncias interplanares para uma célula unitária de um sistema hexagonal segundo a equação (1) [61].

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (1)$$

onde d é a distância entre planos adjacentes definidos pelos índices de Miller ($h k l$). O volume das células unitárias foi calculado usando a equação (2):

$$V = 0,866a^2c \quad (2)$$

O índice de cristalinidade relativa (IC) desenvolvido por Landi *et. al.* (2000) [58] foi calculado a partir dos difratogramas segundo a equação (3).

$$IC = \left(1 - \left[\frac{I_{d(112)(300)} - I_b}{I_{(300)}} \right] \right) \times 100\% \quad (3)$$

onde $I_{d(112)(300)}$ é definido pela intensidade mais baixa medida entre os picos correspondentes aos planos (1 1 2) e (3 0 0), I_b , a intensidade média da linha de base entre os picos correspondentes aos planos (1 1 2) e (3 0 0) e $I_{(300)}$, a intensidade máxima do pico correspondente ao plano (3 0 0) da HA.

4.3.3. Morfologia dos cristais

O tamanho de cristalito (L) para as amostras foi calculado pelo método de Scherrer [59] levando em conta os planos (0 0 2) da HA, de acordo com a equação (4).

$$L = \frac{0,89\lambda}{B_{hkl} \cos \theta} \quad (4)$$

onde λ é o comprimento de onda do raio-X usado (1,54056Å), B_{hkl} é a largura a meia altura corrigida pela subtração da largura a meia altura do pico principal do cristal padrão de hexaborreto de lantânio (LaB_6) obtido nas mesmas condições das amostras e θ é o ângulo de difração para o plano (0 0 2). As razões de aspecto dos cristais foram calculadas pela razão entre as intensidades máximas obtidas para o pico correspondente ao plano (0 0 2) e aquela obtida para o plano (3 0 0).

A morfologia das partículas das amostras de HA foi estudada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM, *transmission electron microscopy*) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do PEMM/COPPE/UFRJ e no IPCMS/CNRS (França).

4.3.4. Análise do potencial Zeta das partículas

No intuito de se saber sobre a natureza das cargas de superfície das amostras, os pós calcinados foram imersos em água e imediatamente após, as medições foram feitas. As variações de potencial foram acompanhadas durante 72h. O equipamento utilizado foi um Zetasizer, da Malvern Instruments (Pólo de Novos Materiais da UFS), sob as seguintes condições: absorção média da HA de 0,01; índice de refração de 1,62; e constantes para água a 25°C.

4.4. PRODUÇÃO DE PASTILHAS DE HA

O pó original de cada HA produzida foi prensado de forma uniaxial numa matriz de aço inox de 13,25mm de diâmetro sob uma carga de 1,5 toneladas. Após a prensagem, as pastilhas foram calcinadas a 1000°C por 2h sob uma taxa de aquecimento de 2,8°C/min, com o intuito de se aumentar a resistência das amostras e alcançar uma boa densificação do material, além de aumentar a cristalinidade da HA.

Após calcinação, as pastilhas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM, *scanning electron microscopy*) para avaliar o crescimento de grão em superfície e o grau de densificação das amostras. Além disso, a utilização de espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDS, *energy dispersive spectroscopy*) associado ao SEM possibilitou um estudo cartográfico elementar sobre a homogeneidade na distribuição dos metais ao longo do material.

5. Resultados e Discussões

5.1. ESCOLHA DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DA HA

As análises de XRD para cada amostra sintetizada indicaram que em todos os casos uma hidroxiapatita (HA) foi obtida (Figura 3). As três linhas mais intensas correspondentes aos planos (2 1 1), (1 1 2) e (3 0 0) foram identificadas em ângulos de difração 2θ de $31,8^\circ$; $32,2^\circ$ e $32,9^\circ$, respectivamente. No entanto, o grau de cristalinidade de cada amostra variou consideravelmente. O pH teve uma fraca influência sobre suas cristalinidades após síntese enquanto que a temperatura foi determinante nesse sentido.

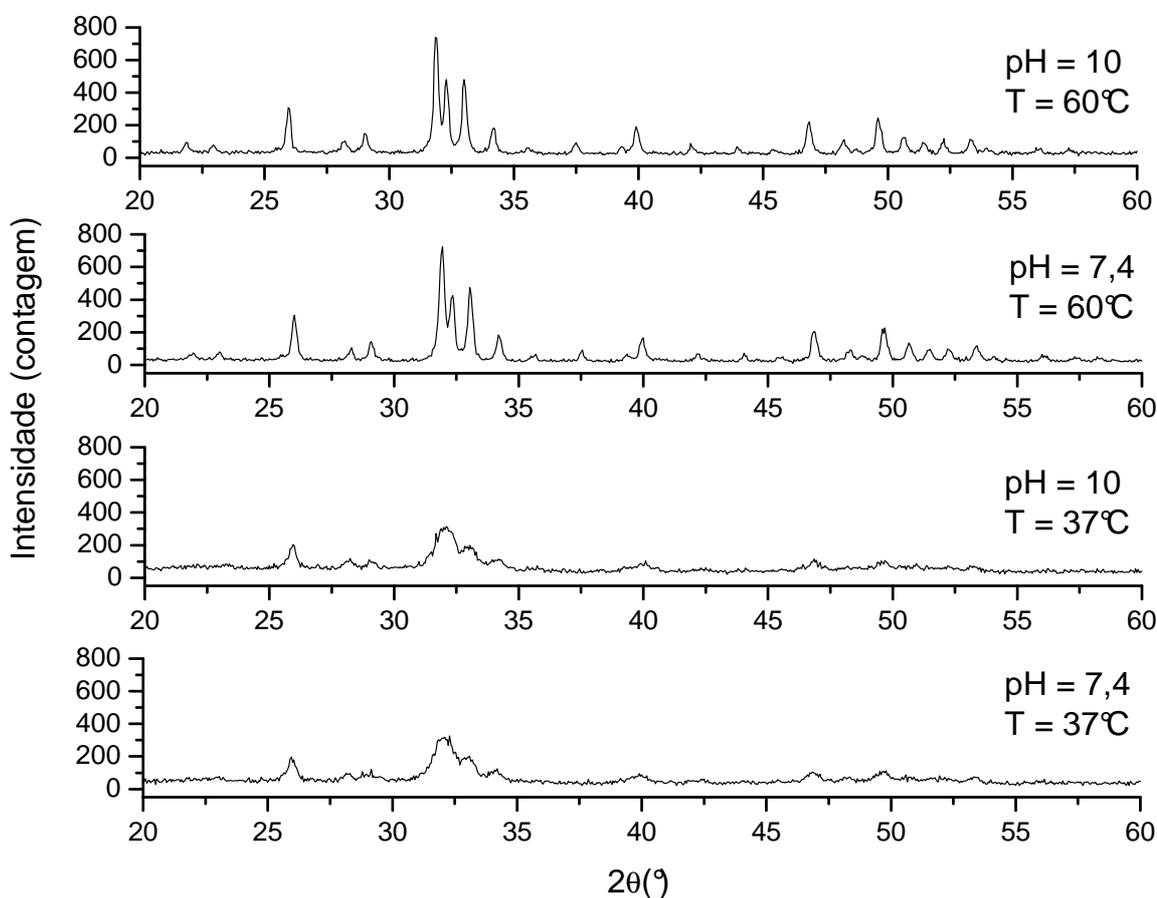


Figura 3. Difratoformas de raios-X das amostras de hidroxiapatita após síntese.

Numa temperatura de 37°C , as amostras apresentaram um índice de cristalinidade muito baixo quando comparados aquelas obtidas a 60°C (Figura 4).

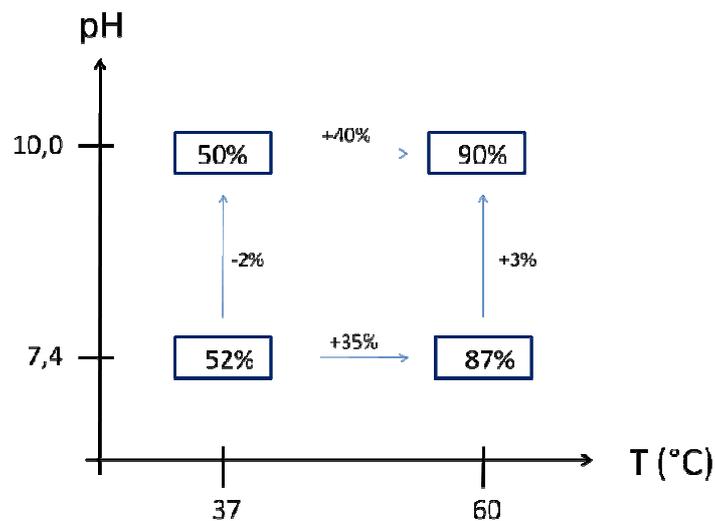


Figura 4. Efeitos das variáveis sobre o índice de cristalinidade da hidroxiapatita após síntese.

Foi sugerido por Elliot (1994) que o equilíbrio do sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ é extremamente dependente da temperatura [24]. Isso implica dizer que, uma vez alcançada a condição de meio alcalino para a formação da HA, a temperatura irá influenciar significativamente o nível de organização dos átomos na estrutura do sólido obtido. Isso justifica o fato da baixa influência do pH na cristalinidade das amostras para as condições estudadas.

Após a calcinação das amostras, existiu em geral uma tendência de aumento da cristalinidade para as amostras obtidas a baixa temperatura (Figura 5). No entanto, aquelas obtidas a pH 7,4 sofreram algumas modificações importantes. Na temperatura mais baixa, uma leve transformação de fase foi observada, onde os picos característicos correspondentes aos planos de difração da HA (2 1 1) e do fosfato β -tricalcico β -TCP (0 2 10) foram identificados em ângulos de difração 2θ de $31,8^\circ$ e $31,0^\circ$, respectivamente (Figura 5). Na temperatura mais alta de síntese, uma diminuição por igual das intensidades dos picos foi observada. Os índices de cristalinidades das quatro amostras calcinadas foram muito próximos (Figura 6), indicando que apesar da transformação de fase ocorrida para uma das amostras, a HA remanescente exibiu ainda um caráter cristalino elevado.

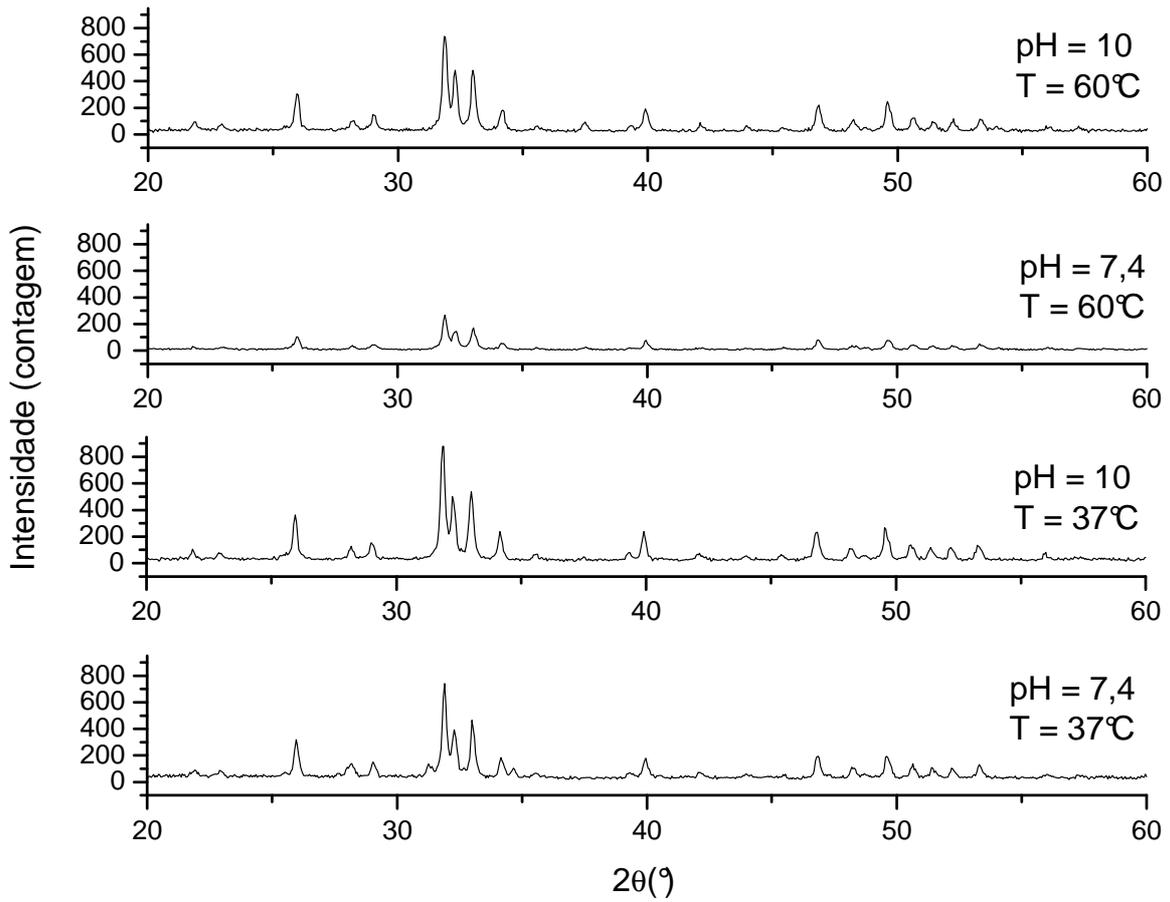


Figura 5. Difratomogramas de raios-X das amostras de hidroxiapatita após calcinação.

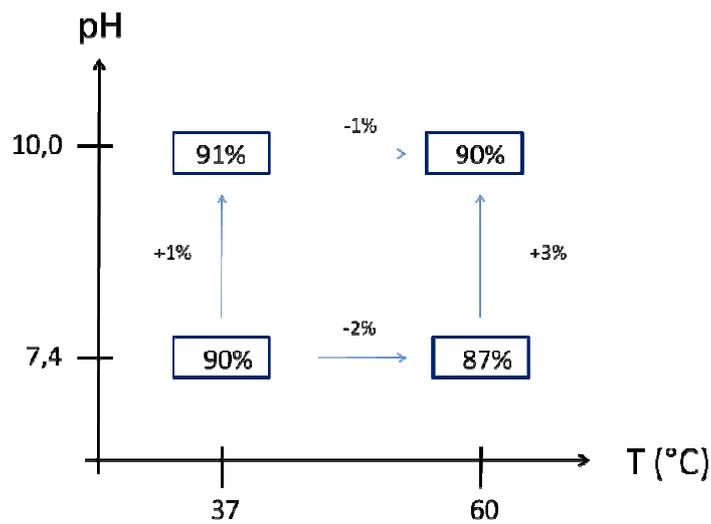


Figura 6. Efeitos das variáveis sobre o índice de cristalinidade da hidroxiapatita após calcinação.

Temperaturas acima de 800°C são suficientes para transformar HA deficientes em cálcio ($\text{Ca/P} < 1,67$) em β -TCP. Acima de 1125°C, a forma alotrópica β se torna instável, sendo transformada na forma α . Apenas os tratamentos térmicos de HA deficientes acima dessa temperatura produzem predominantemente α -TCP [30],[60] o que justifica a ausência dessa fase nas amostras calcinadas até 1000°C.

A transformação de fase ocorrida na HA produzida em baixo pH e temperatura após calcinação indica sua baixa organização cristalina, o que pode ser confirmado pelo halo amorfo observado nas amostras. Próximo a uma condição de pH no meio neutro, o teor de HPO_4^{2-} é muito elevado em detrimento ao teor de PO_4^{3-} . Este último se constitui no grupamento aniônico principal que define a formação da rede da HA juntamente com os arranjos atômicos dos cálcios e hidroxilas. A formação cristalina mediada pelos ânions HPO_4^{2-} é conhecida por definir a instabilidade térmica da maioria dos fosfatos ácidos, ou mesmo de hidroxiapatitas deficientes em Ca^{2+} [27],[30]. Dependendo do nível de organização inicial dos cristais, a calcinação pode levar a transformação dos grupamentos HPO_4^{2-} em PO_4^{3-} via formação de piro fosfatos adicionais, podendo induzir transformações de fase significativas.

Nesse sentido, as sínteses conduzidas a pH 10 foram as que renderam os melhores resultados no que se refere a ausência de transformações de fase após calcinação. Assim, pH 10 e temperatura 37°C foram as condições padrões escolhidas para os estudos posteriores de incorporação de metais.

5.2. INCORPORAÇÃO DE METAIS À HA

5.2.1. Composição

A presença dos metais nas amostras foi estudada por fluorescência de raios X (XRF). A identificação e quantificação das espécies elementares Ca, P, Mg, Sr e Mn foi feita para cada uma das amostras (Figura 7). A HA pura apresentou uma razão Ca/P igual a 1,80. A adição de metais (M) à estrutura original da HA fez as razões $(\text{Ca}+\text{M})/\text{P}$ variarem entre 1,61 e 1,84. A quantidade em mol dos grupamentos fosfatos foi semelhante entre as amostras estudadas, enquanto a quantidade de cálcio variou significativamente entre elas.

O valor elevado de razão Ca/P observado para a HA pura calculado por XRF parece, num primeiro momento, indicar a formação de outros fosfatos de cálcio mais básicos. De fato, é possível a produção de hidroxiapatitas com razões Ca/P variando de 1,5 a 2,0 [27]. Aoki (1994) definiu o pH de 9 como o ideal para a formação de uma HA estequiométrica[25]. Abaixo desse valor, hidroxiapatitas de caráter mais ácido (Ca/P < 1,67) tendem a ser formadas, enquanto que acima desse valor de pH, aquelas de caráter mais básico (Ca/P > 1,67) são encontradas. Em condições ácidas, a entrada do CO_3^{2-} nos sítios de PO_4^{3-} é bastante reduzida. No entanto, em condições alcalinas e sem controle de atmosfera, como a empregada por nós (pH = 10), a facilidade de entrada de carbonato é extremamente aumentada. Isso significa dizer que, uma vez substituindo preferencialmente os sítios fosfato durante precipitação em meio aquoso, a inclusão de carbonato tende a elevar os valores de razões Ca/P acima do valor padrão 1,67. Resultado semelhante aos nossos foi observado no trabalho de produção de HA sob as mesmas condições de pH [61].

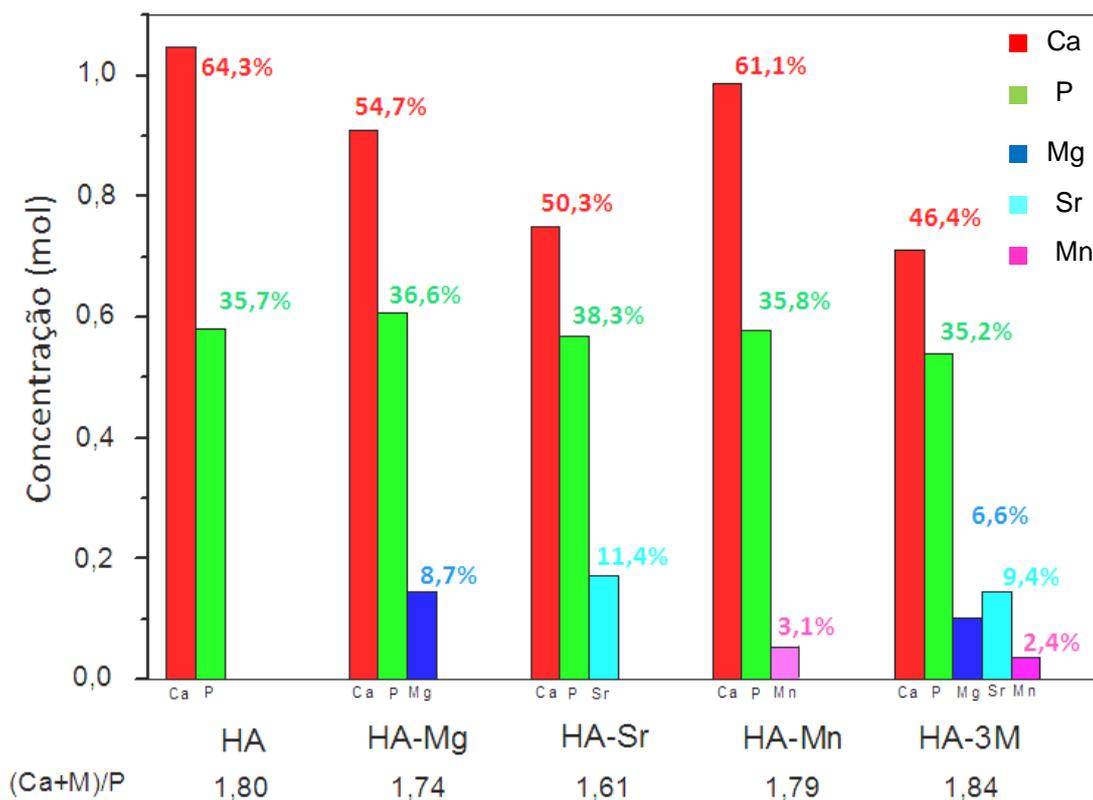


Figura 7. Quantidade dos elementos presentes (em mol) nas amostras de HA após síntese. O valor percentual indica a quantidade relativa em mol de cada elemento na amostra de acordo o total de elementos quantificados por amostra.

Fazendo-se um estudo comparativo entre os valores percentuais para os elementos presentes nas amostras e aqueles medidos para a HA pura, podemos fazer considerações importantes. A adição dos elementos Mg^{2+} e Mn^{2+} não pareceu afetar de maneira importante a razão $(Ca+M)/P$ (Figura 7). No entanto, a entrada do Sr^{2+} parece ter levado a uma situação de excesso de íons PO_4^{3-} e escassez de cátions uma vez que somando-se as quantidades molares de Ca^{2+} e Sr^{2+} obtemos um valor (61,7%) consideravelmente menor que o percentual em mol total do Ca^{2+} (64,3%) para o caso da HA pura (Figura 7). Ao mesmo tempo, o PO_4^{3-} aumenta ligeiramente de 35,7% na HA pura para 38,3% na HA-Sr.

Em uma substituição aos íons Ca^{2+} da rede da HA (considerando número de coordenação igual a 6), os raios atômicos dos elementos substituintes adquirem a seguinte ordem de tamanho em relação ao cálcio: Mg^{2+} (0,72Å) < Mn^{2+} (0,83Å) < Ca^{2+} (1,00Å) < Sr^{2+} (1,18Å) [24],[27],[62]. Está estabelecido que a substituição de átomos menores por átomos maiores em redes cristalinas cerâmicas induzem acomodações muito mais energéticas que a situação inversa [63]. Isso parece justificar de maneira adequada o não preenchimento de todos os sítios catiônicos de rede e ao mesmo tempo o excesso de fosfatos na HA-Sr.

Analisando os espectros de DRIFT obtidos para as amostras após calcinação, podemos verificar que todas as amostras apresentaram a banda característica da hidroxila proveniente de apatitas em 3572 cm^{-1} (Figura 8). A ausência de outros picos nessa região aliado a ausência de cloro nos espectros XRF e EDS indicam que, mesmo na presença de íons cloreto (provenientes dos sais de cloretos usados), as hidroxilas não sofreram substituições importantes por Cl^- . Por outro lado, além de identificar todas as bandas correspondentes aos estiramentos (ν_1 ν_3 ν_4) dos grupamentos PO_4^{3-} ($1000-1150\text{cm}^{-1}$ e $570-605\text{cm}^{-1}$), bandas nas regiões de 1521 e 1427cm^{-1} (ν_3 C-O), e 875cm^{-1} (ν_2 C-O) confirmam a entrada de carbonato não somente nos sítios B (PO_4^{3-}) mas também nos sítios A (OH^-) da HA [64].

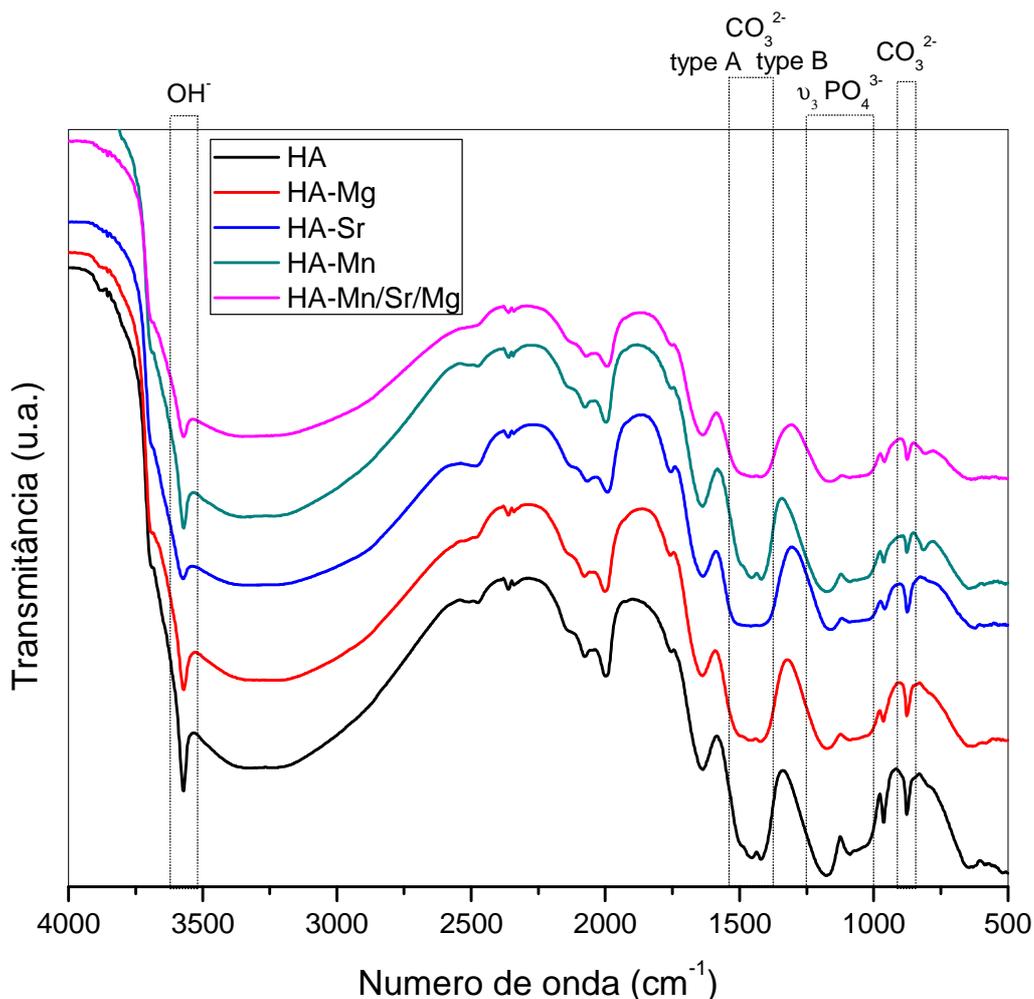


Figura 8. Espectros obtidos por DRIFT para as amostras após calcinação a $1000^\circ\text{C}/2\text{h}$.

Para entender melhor esse tipo de substituição aniônica pelos carbonatos mediante a entrada concomitante de outros metais, podemos assumir aqui algumas hipóteses. A partir das quantidades molares medidas para os íons metálicos e o fósforo nas amostras, e levando-se em conta a fórmula estequiométrica padrão da HA, podemos estimar a quantidade de carbonato incorporada durante a síntese, estabelecendo fórmulas empíricas para cada amostra (Tabela 4). Nesse caso, os valores foram normalizados pela quantidade de cátions presentes (numero de átomos de Ca^{2+} somado ao numero de átomos de metais M^{2+} deveria ser igual a 10 átomos, como na fórmula molecular da HA padrão). Assumimos também que a quantidade de hidroxilas na fórmula seria invariável. Fica claro que tais condições não são ideais, uma vez que a entrada do carbonato não se deu apenas nos sítios aniônicos do fosfato (tipo B), mas também naqueles da hidroxila (tipo A). De qualquer modo, eles nos ajudam a entender o

papel do carbonato sobre os altos valores medidos de razão Ca/P, por exemplo. A partir dessas condições de cálculo, confirmamos mais claramente o que já havia sido discutido anteriormente: o teor de fosfato na HA-Sr esteve levemente acima daquele previsto para uma HA. Além disso, as bandas de fosfato no DRIFT também são menos definidas que para as outras amostras (Figura 8), sugerindo uma desorganização maior na vizinhança dos fosfatos.

Tabela 4. Fórmulas empíricas obtidas a partir das quantidades molares calculadas para cada elemento nas amostras usando fluorescência de raios-X (XRF).

Amostra	Fórmula Prevista
HA padrão	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,5}(\text{CO}_3)_{0,5}(\text{OH})_2$
HA-Mg	$\text{Ca}_{8,6}\text{Mg}_{1,4}(\text{PO}_4)_{5,7}(\text{CO}_3)_{0,3}(\text{OH})_2$
HA-Sr	$\text{Ca}_{8,2}\text{Sr}_{1,8}(\text{PO}_4)_{6,2}(\text{OH})_2$
HA-Mn	$\text{Ca}_{9,5}\text{Mn}_{0,5}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{CO}_3)_{0,4}(\text{OH})_2$
HA-Mn/Sr/Mg	$\text{Ca}_{7,1}\text{Mg}_1\text{Sr}_{1,4}\text{Mn}_{0,5}(\text{PO}_4)_{5,4}(\text{CO}_3)_{0,6}(\text{OH})_2$

Ainda, particularmente para o caso da HA-Sr, a ausência de carbonato na fórmula empírica calculada, associado ao fato de haver uma pequena variação na intensidade das bandas de carbonato nos espectros DRIFT, parece indicar uma situação onde a entrada do Sr^{2+} leva a uma perturbação acentuada da região dos canais de hidroxila da rede da HA. Essa perturbação explicaria, por exemplo, a diminuição da intensidade da banda referente as hidroxilas na HA-Sr verificada por DRIFT (Figura 8) e a menor definição das bandas de absorção de fosfato. Nesse caso, parece coerente dizer que a entrada do Sr^{2+} acontece de uma forma muito mais complexa do que aquela inferida por nós quando calculamos sua fórmula empírica teórica.

5.2.2. Estrutura dos cristais

A adição de metais causou uma diminuição significativa na cristalinidade das amostras em relação à HA padrão (Figura 9), o que pode ser observado nos difratogramas pela diminuição das intensidades dos halos na região dos picos mais intensos da HA (2 1 1), (1 1 2) e (3 0 0). Isso pode ser melhor observado comparando-se

esses difratogramas àqueles obtidos das amostras calcinadas (Figura 10). Após calcinação, as intensidades obtidas foram notavelmente maiores, o que é confirmado quando comparamos o índice de cristalinidade relativa (IC) medido para as amostras calcinadas e não calcinadas (Figura 11). Para as amostras não calcinadas, o aumento da cristalinidade seguiu a ordem: HA-Mg < HA-Sr < HA-Mn < HA < HA-Mg/Sr/Mn. Após calcinação, nenhuma variação importante foi observada entre as amostras (IC mínimo igual a 80% e máximo igual a 87%).

Nenhuma transformação de fase foi observada para as amostras depois da calcinação, indicando uma boa estabilidade térmica das amostras, exceto para o caso da amostra HA-Mg (Figura 10). Nesse caso, uma leve transformação foi observada pela presença do pico correspondente ao plano (0 2 10) do fosfato β -tricálcico ($2\theta = 31^\circ$). Não foi observado nenhum pico correspondente aos planos mais densos do CaO (2 0 0) ($2\theta = 37^\circ$) em nenhuma das amostras, o qual sinalizaria a decomposição térmica da HA.

Os parâmetros de rede calculados revelaram que a substituição do cálcio por Mg e Mn (HA-Mg e HA-Mn) levou a uma leve contração da célula unitária, comparativamente a HA pura (Tabela 5).

Contrariamente, a entrada do Sr (HA-Sr e HA-Mn/Sr/Mg) aumentou a célula unitária em algumas dezenas de angstroms cúbicos. Esse comportamento foi igualmente observado após a calcinação das amostras.

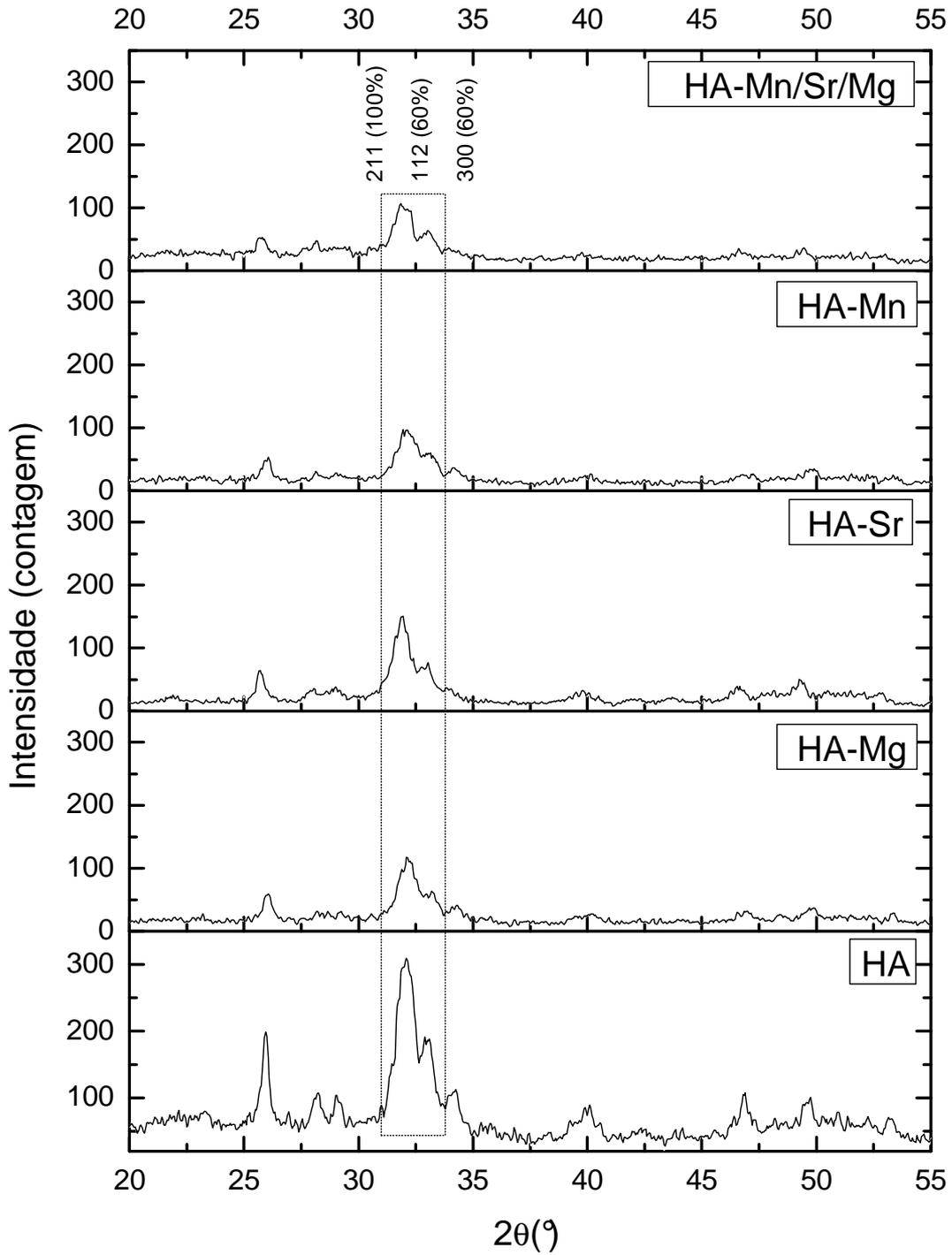


Figura 9. Difratoogramas de raios-X das amostras de hidroxiapatita contendo metais logo após síntese e secagem a 100°C/24h. O diagrama indica a região contendo os três picos mais intensos para uma HA padrão e seus planos correspondentes.

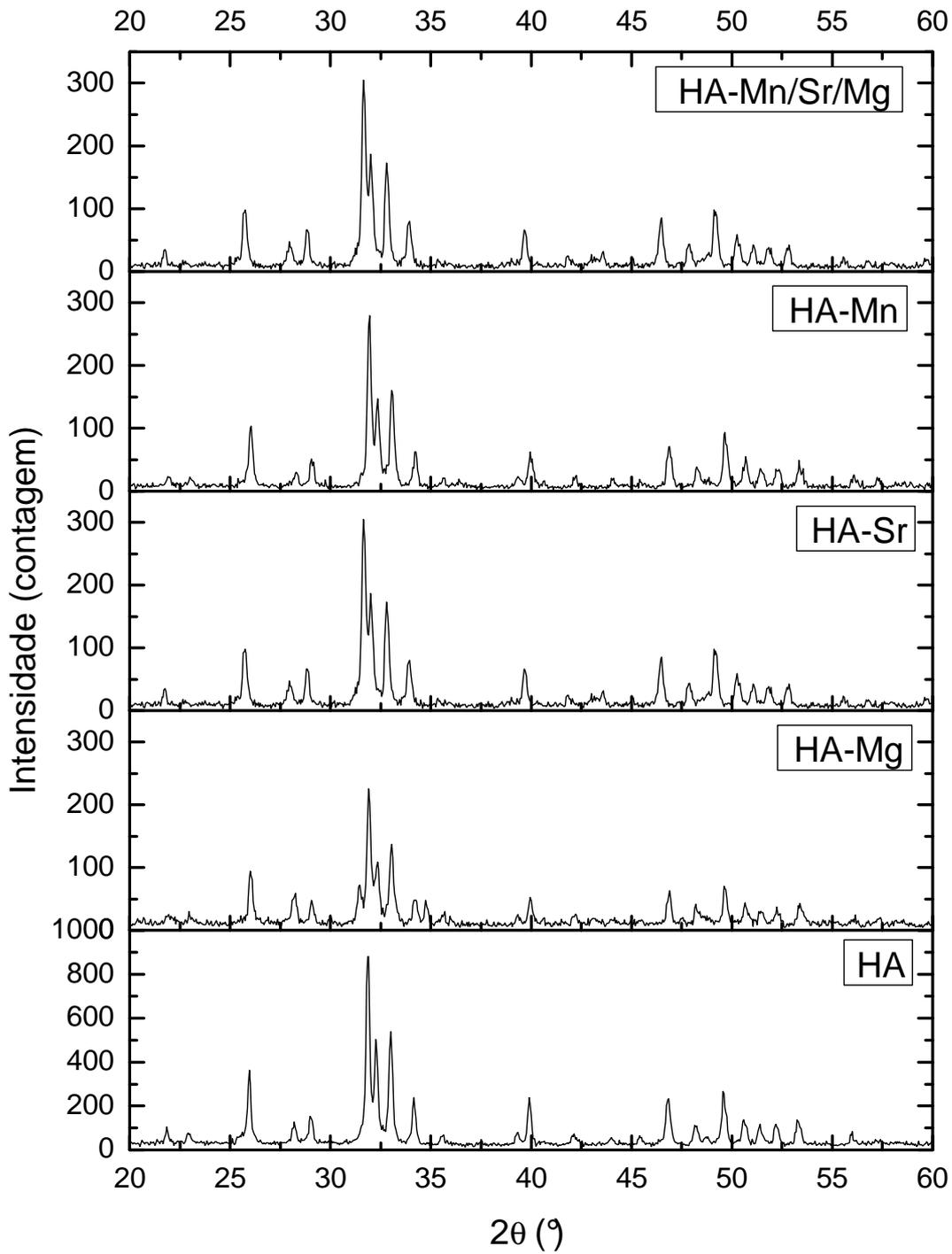


Figura 10. Difratomogramas de raios-X das amostras de hidroxiapatita contendo metais após calcinação a $1000^\circ\text{C}/2\text{h}$.

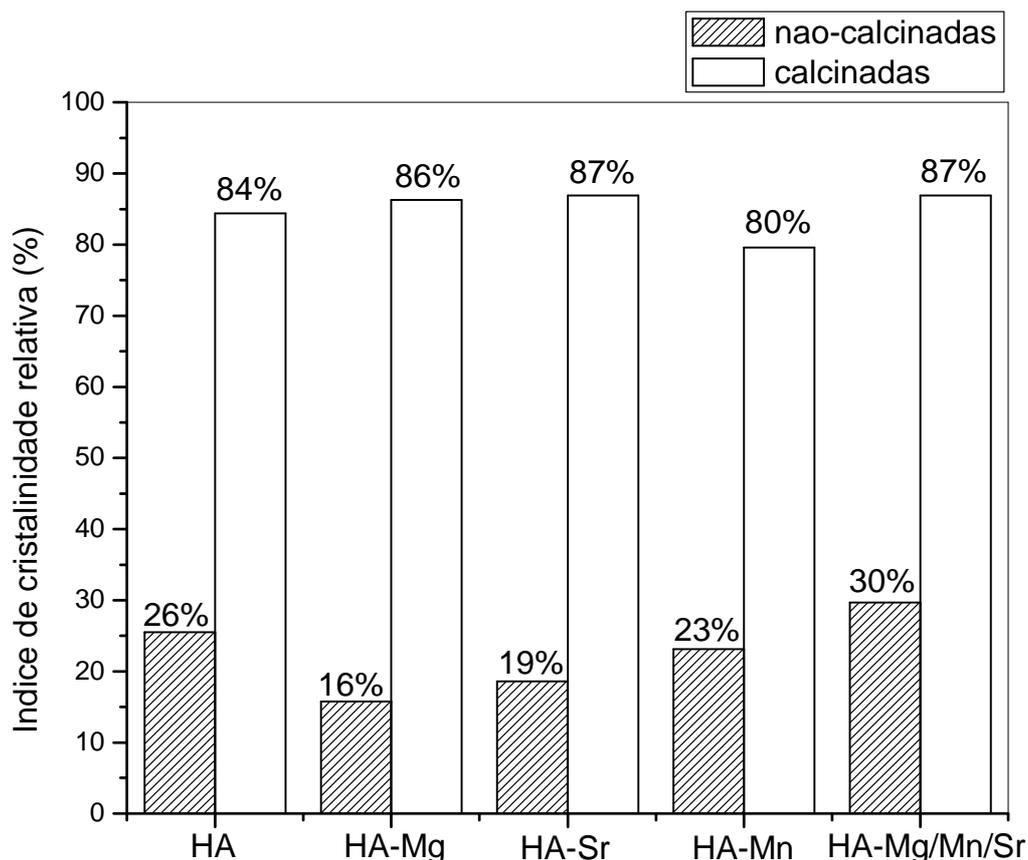


Figura 11. Índice de cristalinidade das amostras antes e após calcinação.

Segundo Renaudin *et. al.* (2009) [65], a inserção de Sr^{2+} na rede da HA se dá preferencialmente nos sítios de Ca II. Nesses sítios, o cálcio está rodeado de 7 átomos de oxigênio, sendo um deles pertencente a hidroxila. Esse sítio é o único em que o cálcio não se encontra totalmente ligado aos tetraedros rígidos de fosfato. Nesse caso, a entrada de um elemento maior do que o Ca^{2+} como é o caso do Sr^{2+} irá sempre ser favorecida pela alta mobilidade da ligação Ca-OH. A inserção do Sr^{2+} leva a uma situação de expansão da célula unitária, o que pode ser observado pelo ligeiro aumento nos parâmetros de rede medidos para HA-Sr. Isso está de acordo com as nossas observações prévias de que a entrada do Sr^{2+} parece acontecer de forma complexa, induzindo acomodações diferenciadas para os grupamentos fosfatos, hidroxilas e carbonatos vizinhos, como visto nas análises por DRIFT.

Tabela 5. Parâmetros de rede calculados a partir dos difratogramas de raios-X para as amostras antes e após calcinação.

	Amostras	Parâmetros de rede (Å)			Unidade de volume da célula (Å ³)
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	
Antes da calcinação	HA	9,4059	9,4059	6,8654	526,0
	HA-Mg	9,3713	9,3713	6,8398	520,2
	HA-Sr	9,4368	9,4368	6,9205	533,7
	HA-Mn	9,3880	9,3880	6,8510	522,9
	HA-Mn/Sr/Mg	9,4075	9,4075	6,9093	529,5
Depois da calcinação	HA	9,3948	9,3948	6,8613	524,4
	HA-Mg	9,3835	9,3835	6,8428	521,8
	HA-Sr	9,4474	9,4474	6,9190	534,8
	HA-Mn	9,3761	9,3761	6,8416	520,9
	HA-Mn/Sr/Mg	9,4474	9,4474	6,9188	534,8

Para o caso da inserção de Mg²⁺, Ren *et. al.*(2010) [66] sugeriram, após análises de XRD e modelagens usando Rietveld (2007) [32], que os sítios do Ca I são preferencialmente ocupados, uma vez que eles são menores que os sítios do Ca II e acomodam melhor o pequeno átomo de magnésio. No entanto essa afirmação é controversa. Vários trabalhos indicam também a ocupação dos sítios do Ca II como mais favoráveis a entrada do magnésio. Nesse sentido, num estudo recente aliando técnicas precisas de análise de vizinhanças atômicas (RMN e EXAFS) a cálculos computacionais tipo *ab initio*, Laurencin *et. al.* (2011) comprovaram de fato a maior afinidade do Mg²⁺ pelos sítios do Ca II da HA [67]. Eles mostraram que as perturbações de rede são muito mais pronunciadas quando o Mg²⁺ entra no sítio do Ca I, confinado entre os fosfatos. Sendo o sítio do Ca I menor que o sítio do Ca II, a entrada preferencial do Mg²⁺ nesse último gera tensões expansivas na sua vizinhança, suficientes para facilitar a entrada alternada, ao longo do canal da hidroxila, de outros íons Mg²⁺, estabilizando localmente essas tensões. O aumento da quantidade de Mg²⁺ na célula unitária não induz, em princípio, a ocupação dos sítios do Ca I, mas o seu empilhamento ao longo do canal de OH nos sítios alternados do Ca II. Isso significa que existirá sempre uma tendência de criação de domínios de magnésio dentro das células unitárias de HA na medida em que a quantidade desses íons aumenta. Essa organização estrutural do magnésio justifica não somente a contração dos parâmetros de rede observados no

nosso trabalho, e diminuição de cristalinidade, como também a própria instabilidade térmica da amostra de HA-Mg.

A adição de Mg^{2+} à HA leva a uma diminuição significativa da temperatura de transformação de fase da HA em β -TCP [68]. Isso pode ser confirmado no nosso trabalho uma vez que apenas a amostra HA-Mg sofreu transformação a $1000^{\circ}C$ (Figura 10). Além disso, essa foi a amostra que apresentou o menor índice de cristalinidade logo após síntese (Figura 11).

Poucos estudos se dedicaram a estudar detalhadamente a inserção do Mn^{2+} na rede da HA, apesar dos vários trabalhos existentes que indicam o seu poder de aumento da biocompatibilidade de fosfatos de cálcio. De qualquer modo, é consenso que por possuir raio próximo ao do Ca^{2+} , sua entrada na rede se dá preferencialmente nos sítios do Ca I, induzindo uma ligeira rotação do grupamento fosfato adjacente [69]-[71]. Por ser ligeiramente menor que o cálcio, uma contração pouco significativa já era esperada para os parâmetros de rede medidos. Igualmente, a cristalinidade medida para a amostra HA-Mn foi muito próxima aquela medida para a HA pura.

A introdução dos três íons simultaneamente à rede da HA parece criar uma situação mais favorável à ordenação do cristal, uma vez que o índice de cristalinidade medido foi o mais alto entre as amostras não calcinadas (Figura 11), e os parâmetros de rede foram muito próximos àqueles observados para a HA pura (Tabela 5). Nesse caso, a entrada do Sr^{2+} parece não ter induzido um aumento significativo do volume da célula unitária da HA-Mn/Sr/Mg, como no caso da HA-Sr. Kannan *et. al.* (2010), demonstraram que a inclusão simultânea de Sr e Mg na rede do fosfato β -tricálcico levou a uma diminuição de volume da célula unitária [72]. Essa diminuição foi justificada, pois o raio médio entre esses dois íons é menor que o raio do cálcio, numa substituição de iguais quantidades de Sr e Mg. Se calcularmos o raio médio entre os íons Mg^{2+} , Sr^{2+} e Mn^{2+} levando em conta a quantidade de cada um deles por amostra, obtemos o valor de $0,98 \text{ \AA}$. Esse valor é muito próximo ao raio do Ca^{2+} ($1,00 \text{ \AA}$), o que justificaria o volume da célula unitária medido para a HA-Mn/Sr/Mg ser muito próximo ao da HA pura.

Possivelmente, as situações de tensões expansivas e compressivas causadas pela entrada de um íon particular na rede sejam estabilizadas pela entrada de outro íon de tamanho diferente nos sítios adjacentes da HA-Mn/Sr/Mg. De fato, a incorporação de vários grupamentos iônicos à rede da HA na natureza determina a formação dos mais

variados tipo de apatitas minerais, a maioria exibindo alta cristalinidade [73]. O próprio osso exibe um alto nível de substituição dos cálcios por outros cátions nas situações naturais onde são formados.

De qualquer modo, após calcinação, a HA-Mn/Sr/Mg exibiu uma mudança de coloração importante de marrom claro para cinza escuro, além de uma expansão acentuada no volume da sua célula unitária. A oxidação fácil dos íons Mn^{2+} e a mudança de coloração de branco leitoso (HA pura) para marrom claro antes da calcinação e cinza escuro após calcinação, observadas para as nossas amostras, sugerem que apesar dos cuidados para a inclusão do manganês (II), outros estados de oxidação do manganês estão presentes nas amostras. Alguns trabalhos recentes começam a considerar a possibilidade de incorporação de manganês sobre outras formas na HA que não somente o Mn (II). Mayer *et. al.* (2010) [74] tentaram observar o estado de oxidação do manganês em suas amostras de HA usando espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS, *X ray photon electron spectroscopy*), mas concluíram apenas que a maior parte dos átomos de manganês nas amostras estava na forma Mn^{2+} sem descartar a possibilidade e outros estados de oxidação. Em outro trabalho recente, Paluszkievicz *et. al.* (2010), demonstraram, usando FTIR e Raman, que a entrada do manganês na HA pode se dar na forma isomórfica MnO_4^{3-} em substituição aos tetraedros de fosfato, e que essa entrada pode ser concomitantemente com a entrada de Mn^{2+} nos sítios do cálcio [75]. Em substituição aos fosfatos, o manganês adquire a forma Mn^{5+} justificando as mudanças de coloração observadas pelos autores do trabalho.

De fato, analisando mais detalhadamente os espectros DRIFT obtidos para as amostras contendo manganês (Figura 8), pudemos observar uma pequena banda de absorção na região de 813 cm^{-1} , característica dos estiramentos ν_1 e ν_3 dos grupamentos MnO_4^{3-} . Apenas as duas amostras contendo manganês (HA-Mn e HA-Mn/Sr/Mg) apresentaram essas bandas. De qualquer modo, segundo Paluszkievicz *et. al.* (2010), a predominância da substituição dos PO_4^{3-} pelos grupamentos MnO_4^{3-} deveria induzir um aumento significativo do volume da célula unitária [75], o que não ocorreu para o caso das nossas amostras antes da calcinação. No entanto, após calcinação, a amostra HA-Mn/Sr/Mg apresentou um aumento de volume que não poderia se justificar pelo raio médio entre os três íons como descrito anteriormente. Isso parece indicar que nesse caso, o tratamento térmico levou a uma situação de transformação onde os grupamentos MnO_4^{3-} tendem a ser formados em substituição aos fosfatos, levando ao aumento do

volume da célula unitária para o caso da HA-Mn/Sr/Mg. Isso significa que além do CO_3^{2-} , o MnO_4^{3-} presente na amostra também contribuiu significativamente para o alto valor medido de razão Ca/P (1,84) naquela amostra. No entanto, apesar da presença da banda de absorção referente ao grupamento MnO_4^{3-} na amostra HA-Mn após calcinação, o volume da célula unitária permaneceu invariável. Para essa amostra a mudança de coloração verificada foi de marrom escuro para marrom claro após calcinação, ao invés do cinza escuro observado para a HA-Mn/Sr/Mg. Em seu trabalho, Paluszkiwicz *et. al.* (2010) observaram que, sob certas condições de síntese, o manganês podia ser segregado da fase apatita produzindo o Mn_2O_3 na forma provável de espinélio, induzindo uma coloração marrom das amostras. A existência desse composto deveria ser observada por infravermelho (ν_7 Mn-O em 658 cm^{-1}). No entanto, apenas uma larga banda foi observada nessa região, sendo impossível separar aquelas correspondentes aos fosfatos daquela correspondente ao Mn-O. De qualquer modo, a segregação de fase poderia explicar não somente a coloração observada para as amostras como também a pouca variação nos parâmetros de rede da HA-Mn.

5.2.3. Morfologia dos cristais

Para as amostras não calcinadas, o tamanho de cristalito cresceu na seguinte ordem: HA-Mn/Sr/Mg < HA-Mg ~ HA-Sr ~ HA-Mn < HA (Figura 12). Após calcinação a ordem se alterou ligeiramente: HA-Mn/Sr/Mg < HA-Sr < HA-Mg ~ HA-Mn < HA. A calcinação favoreceu fortemente o crescimento dos cristalitos em todas as amostras, uma vez que a menor variação observada foi de 13nm (Figura 13). Se considerarmos a baixa solubilidade do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ (geralmente menor que 0,02 mol/L até 100°C), a reação ácido-base para formação da HA não deve ser considerada meramente uma reação iônica simples. A gradual dissolução do hidróxido de cálcio durante a síntese induz a formação de cristais extremamente pequenos de HA, em geral variando entre 30 e 50 nanômetros [76]. Se considerarmos as condições adotadas nesse trabalho, os valores obtidos para os tamanhos de cristalito estão coerentes com o que seria esperando. Além disso, a diminuição de tamanho de cristalito pela entrada de metais é algo bem relatado na literatura [9],[30],[77].

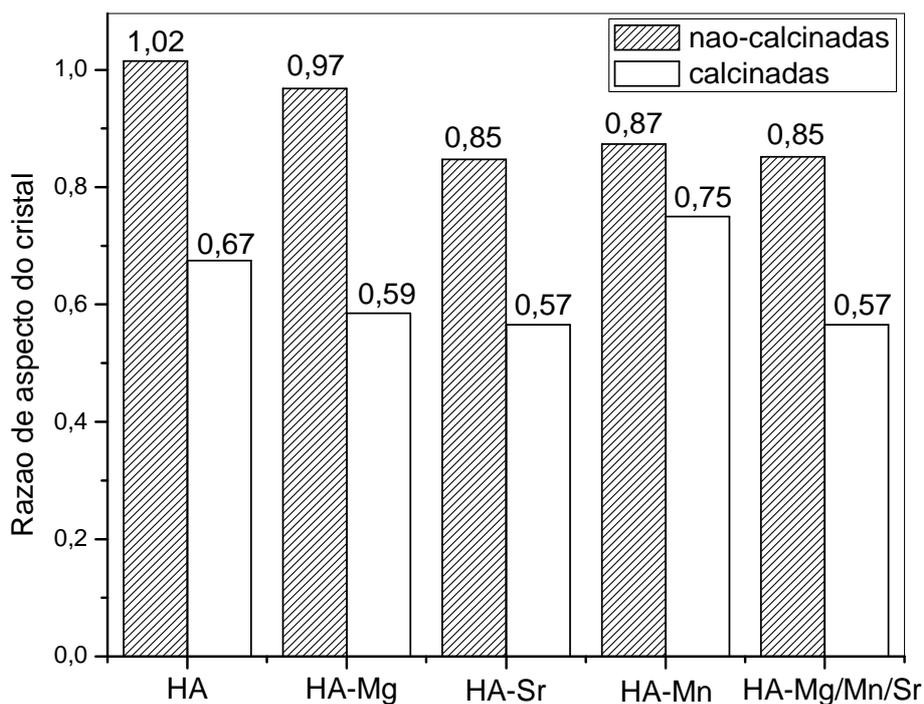


Figura 12. Razão de aspecto calculada para os cristais antes e após calcinação.

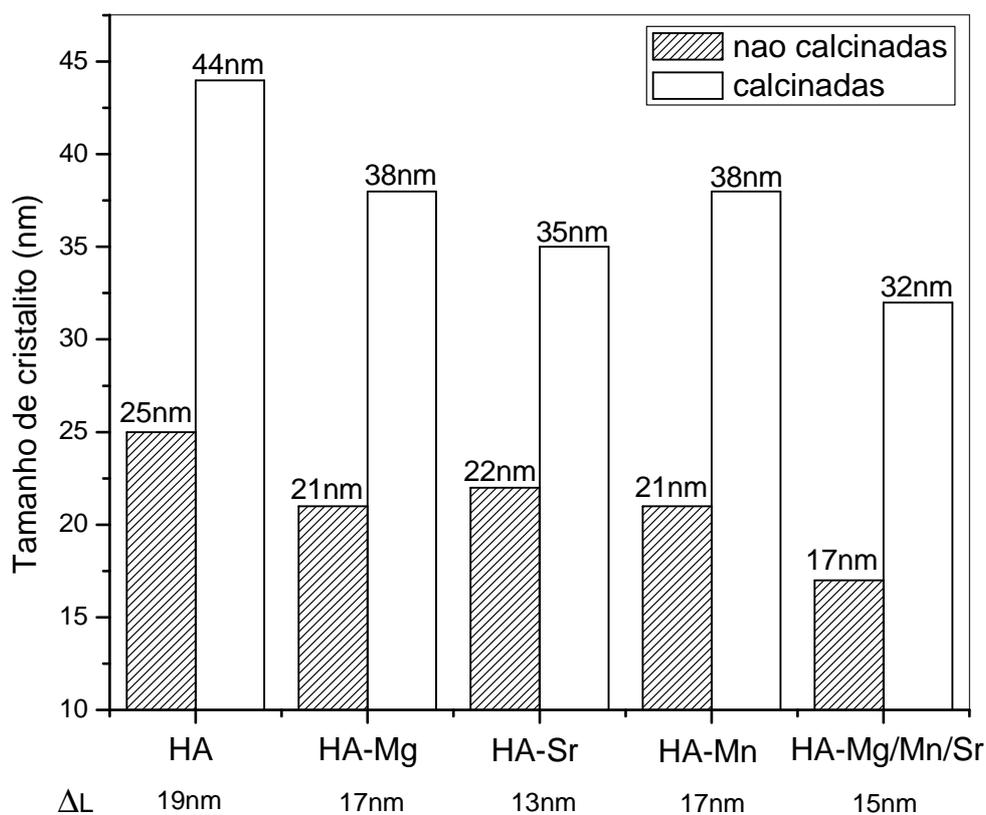


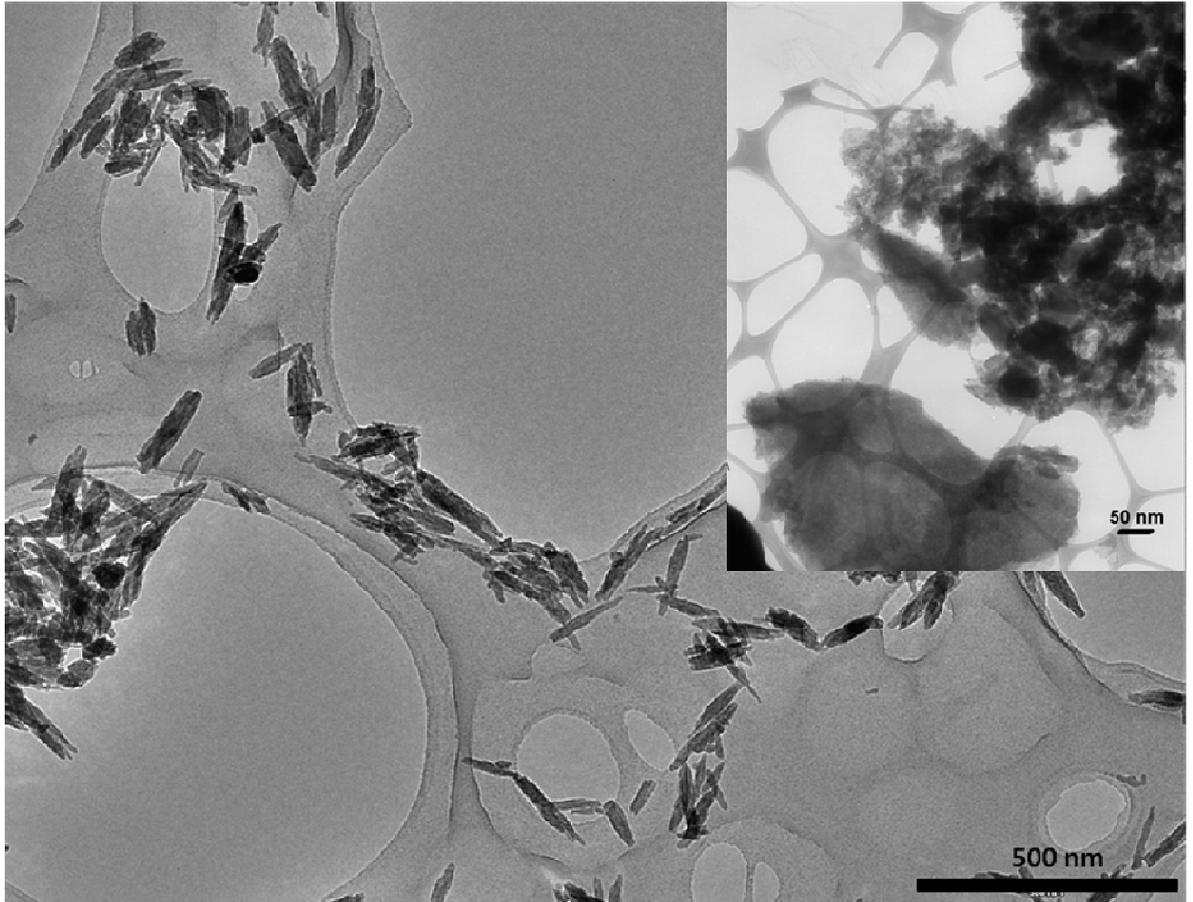
Figura 13. Variação do tamanho de cristalito antes e após calcinação das amostras contendo metais.

A inclusão de metais pode levar a uma alteração na elongação dos cristais em determinadas direções cristalográficas comparativamente à HA pura. Tratando-se de uma estrutura hexagonal, as mudanças podem ser observadas seja por variações na direção a [1 0 0], seja na direção c [0 0 1] do cristal. Dessa forma, para se analisar o nível de elongação dos cristais em cada uma dessas direções, a razão de aspecto dos cristais foi calculada pela divisão entre as intensidades máximas obtidas referentes aos planos perpendiculares (0 0 2) e (3 0 0) da HA. Para uma HA padrão, as intensidades dos picos correspondentes aos planos (0 0 2) e (3 0 0) são 40% e 60%, respectivamente. Isso significa que os cristais de uma HA pura padrão possuem uma razão de aspecto igual a 0,67. Qualquer variação para valores mais altos devem corresponder a um aumento do número de planos ao longo da direção c . Enquanto uma diminuição em relação a esse valor corresponderia a uma diminuição de planos ao longo desse eixo cristalográfico [78]. Assim, pode-se dizer que antes da calcinação os cristais têm, em geral, uma tendência a serem mais alongados ao longo do eixo c (Figura 13). Após calcinação, os cristais deixam as formas aciculares evidentes e passam a apresentar uma morfologia esférica mais acentuada, se remetendo a situação de cristais padrões de uma HA pura. Isso foi de fato confirmado pelas imagens obtidas para as amostras antes e após calcinação (Figura 14).

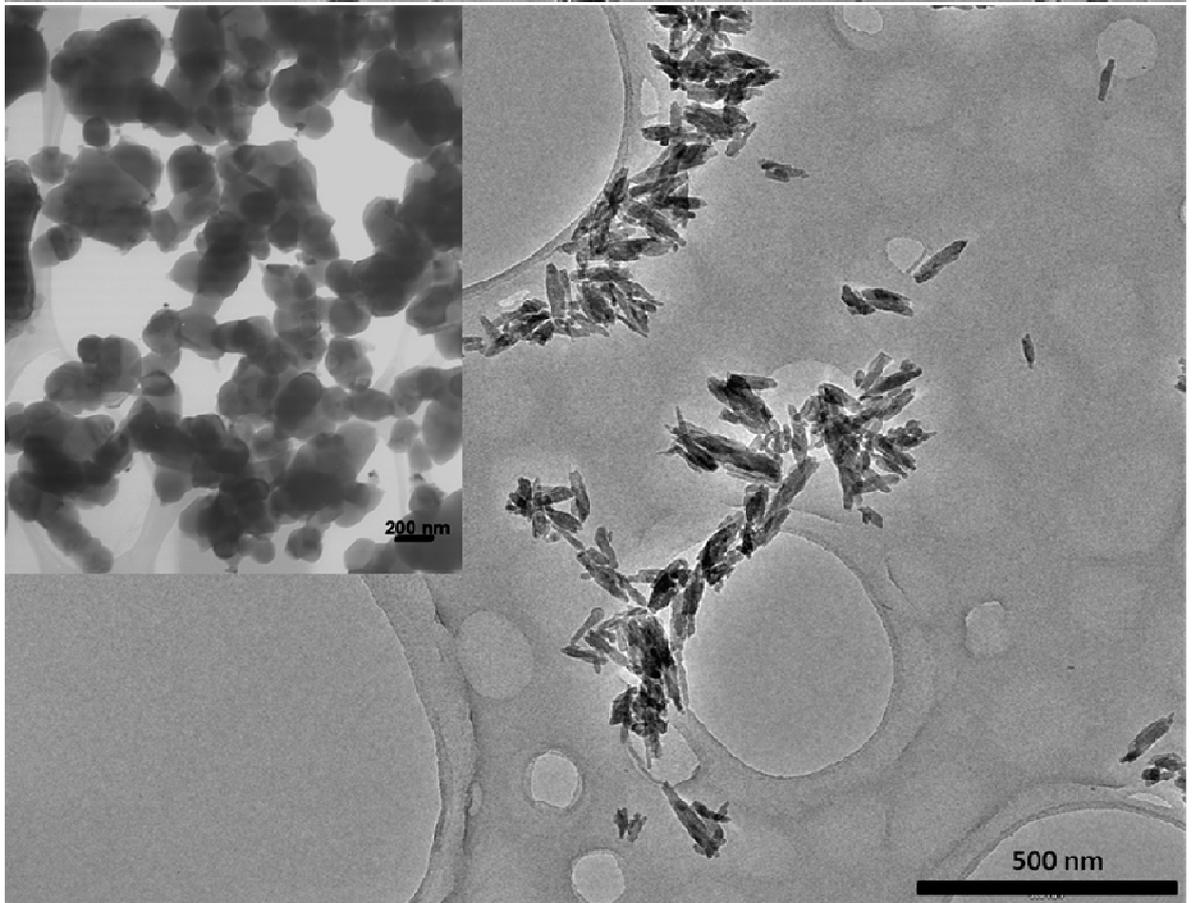
5.3. PASTILHAS DE HA

Após prensagem e calcinação, a densidade geométrica das pastilhas foi calculada pela divisão entre a massa da pastilha e seu volume ($V = 2\pi r^2 \cdot h$), onde r é o raio da pastilha e h , sua altura. Os valores de densidade relativa média estiveram muito abaixo da densidade teórica da HA padrão indicando que as condições de prensagem e calcinação não garantiram uma boa sinterização do material (Tabela 6). Ainda, a inclusão de metais pareceu afetar fortemente o nível de compactação das amostras. As amostras contendo estrôncio (HA-Sr e HA-Mn/Sr/Mg) foram as mais compactas, sendo que as amostras HA-Mg e HA-Mn foram as mais porosas.

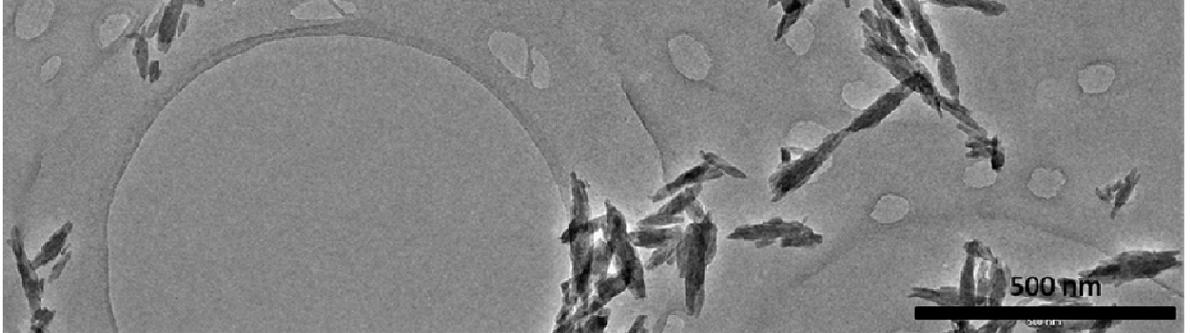
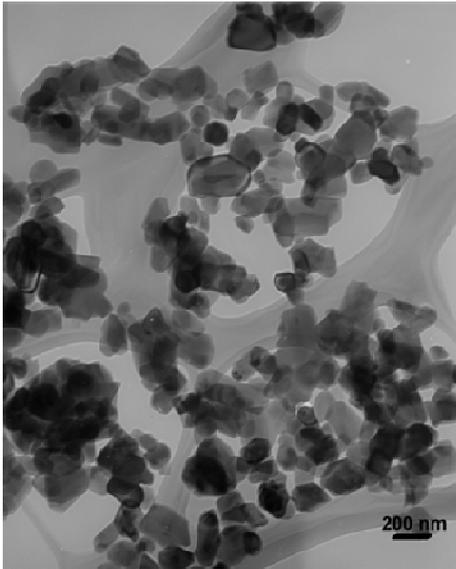
HA



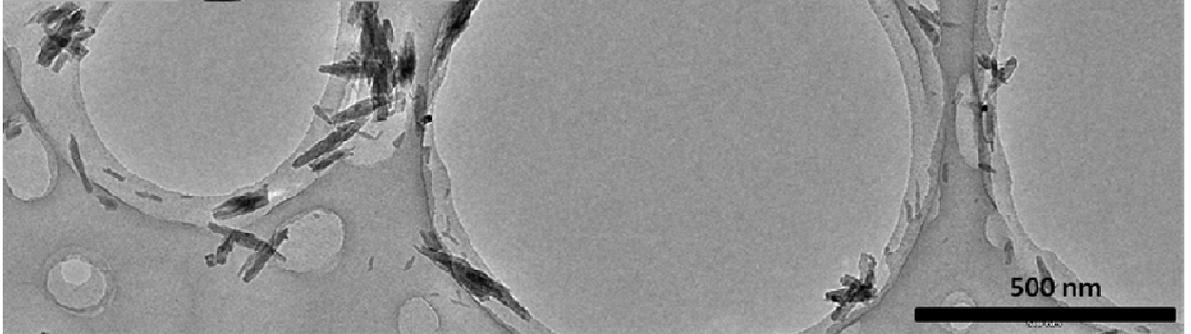
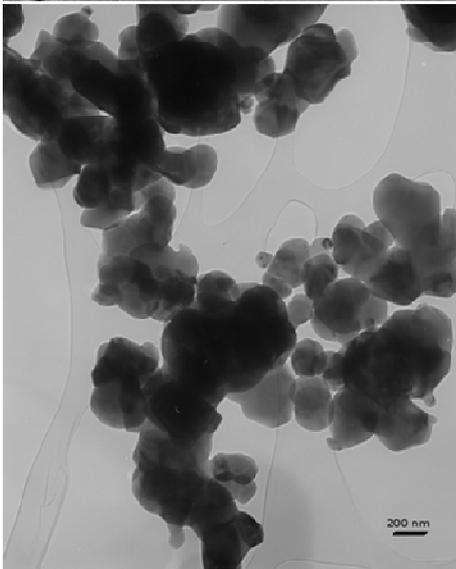
HA-Mg



HA-Sr



HA-Mn



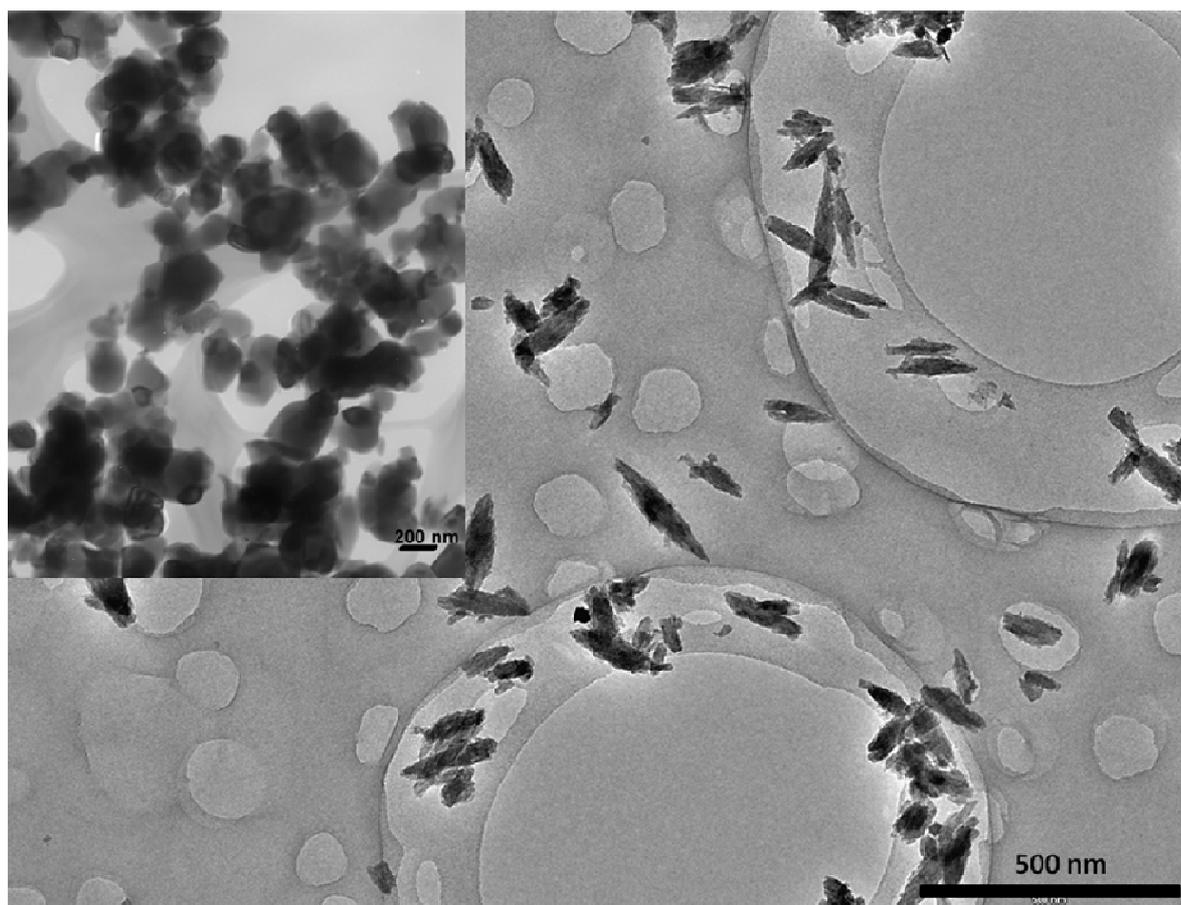


Figura 14. Imagens obtidas por TEM para as amostras antes (quadro maior) e após calcinação (quadro menor).

Tabela 6. Valores de densidades geométricas e relativas obtidas para as pastilhas após calcinação a 1000°C por 2h.

Amostras	Densidade (g cm ⁻³)	Densidade Relativa (%)
HA (teórica)	3,16	100
HA	1,73±0,05	55
HA-Mg	1,48±0,03	47
HA-Sr	2,29±0,13	72
HA-Mn	1,51±0,02	48
HA-Mn/Sr/Mg	2,17±0,05	69

De fato, o nível de sinterização das amostras se relaciona diretamente às variações de tamanho de cristalito observadas nas amostras após calcinação (Figura 12). As amostras HA-Sr e HA-Mn/Sr/Mg apresentaram os menores tamanho de cristalito após calcinação. Isso significa que a diminuição de tamanho de cristalito durante a

calcinação acontece ao mesmo tempo em que a compactação da amostra aumenta. As imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas da superfície das amostras revelaram um nível de porosidade superficial elevado das amostras, confirmando a baixa sinterização nas condições empregadas (dados não mostrados). O grau de coalescência das partículas (crescimento de grão) pareceu mais acentuado nas amostras HA-Mn/Sr/Mg e menos acentuado na amostra HA-Mn, o que está de acordo com os valores de densidade relativa. Assim, as microscopias, os tamanhos de cristalito e a densidade relativa das amostras foram coerentes, apontando a entrada do Sr^{2+} como um agente sinterizante forte em relação ao Mn^{2+} , por exemplo, ou mesmo em relação ao Mg^{2+} que é conhecido pela sua ação sinterizante. [79]. Não se pode descartar a possibilidade da transformação de fase ocorrida na amostra HA-Mg ter mascarado o seu efeito sinterizante, uma vez que a formação da fase β -TCP induz uma contração diferente entre essa nova fase e a fase remanescente de HA podendo gerar porosidade e trincas de superfície.

Os mapas elementares para as amostras contendo metais mostraram que cada um deles encontrou-se homogeneamente distribuído ao longo de toda a superfície das pastilhas após calcinação (Figura 15 a 18). Nenhum agregado ou zonas de sinais mais intensos foram observados nessas condições, sugerindo a ausência de fases micrométricas segregadas ou mais ricas nos metais em questão. Isso está de acordo com as análises de XRD que também confirmaram a presença de uma única fase, exceto no caso da HA-Mg calcinada. No entanto, mesmo para a HA-Mg, não foi possível verificar zonas preferenciais de acúmulo de Mg. Num trabalho recente, Kannan *et. al.* (2010) mostraram que a transformação da fase apatita para a fase β -TCP durante aquecimento não promove a segregação dos metais dopantes e sim a sua entrada na nova rede da nova fase formada. Isso pode explicar porque mesmo havendo transformação de fase na HA-Mg, não foi possível notar a presença de regiões livres de magnésio [72].

Todas as amostras apresentaram potencial Zeta negativo de superfície no início da imersão em água a temperatura ambiente, sendo que as superfícies mais negativas foram as da HA-Mn e HA-Mg e a mais positiva, a da HA-Sr (Figura 19). Com o tempo, houve um aumento gradual do potencial para cada amostra. Após 72 horas observou-se a seguinte ordem: HA-Mn < HA-Mg/Mn/Sr < HA-Mg < HA < HA-Sr. As amostras contendo Mn não alcançaram valores positivos de carga de superfície ao longo do período analisado.

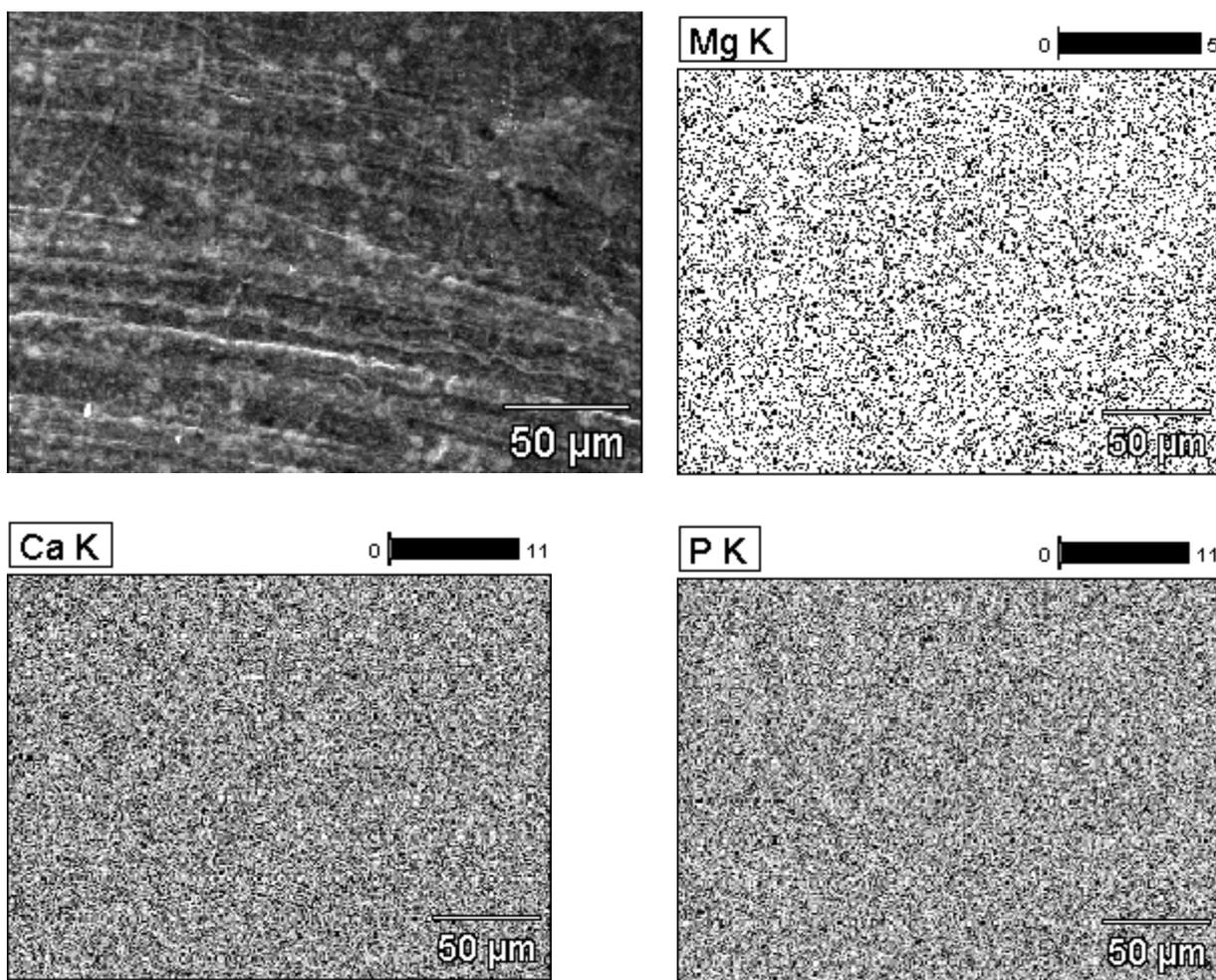
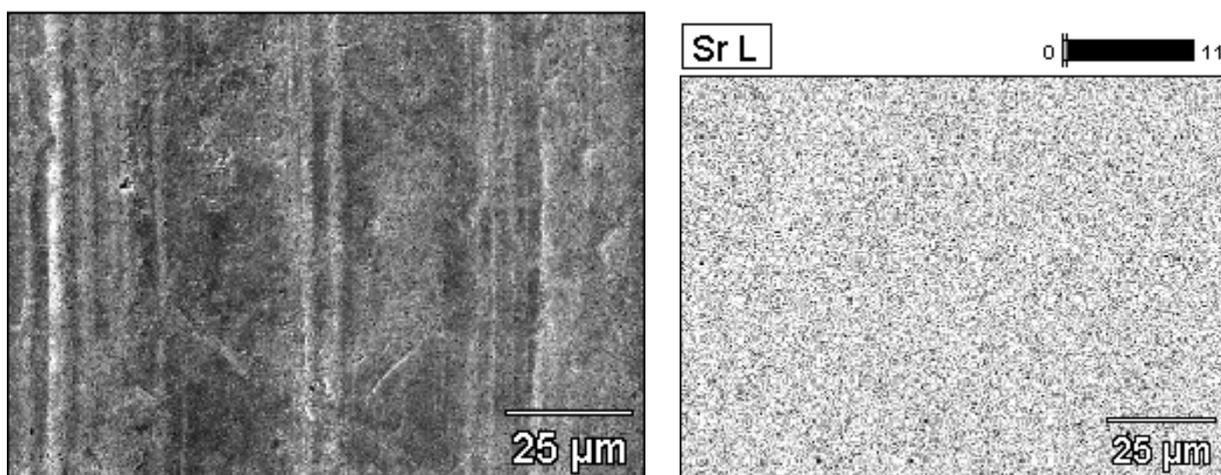


Figura 15. Imagem SEM (elétrons retroespalhados) e mapeamentos elementares para Ca, Mg e P obtidos sobre da superfície da pastilha de HA-Mg.



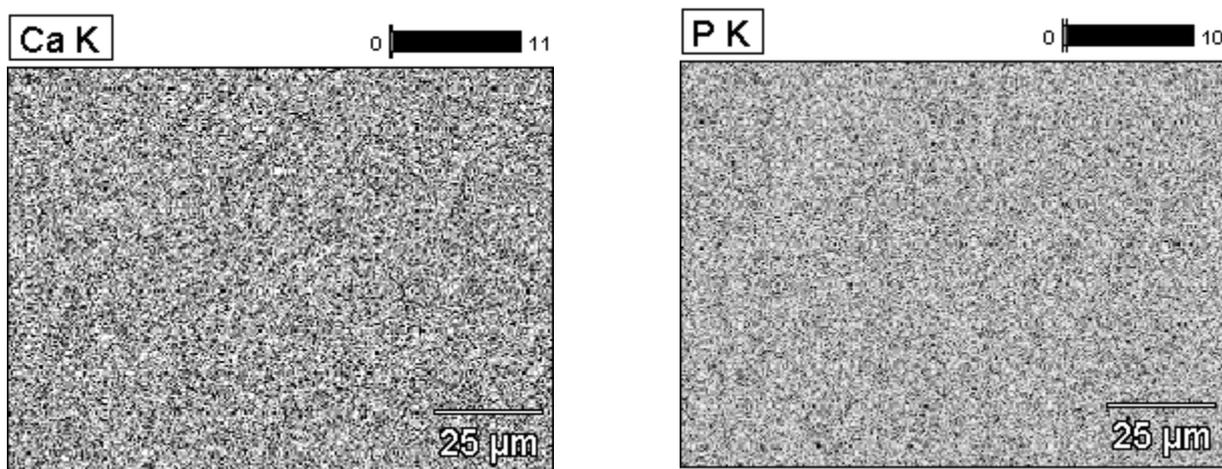


Figura 16. Imagem SEM (elétrons retroespalhados) e mapeamentos elementares para Ca, Sr e P obtidos sobre da superfície da pastilha de HA-Sr.

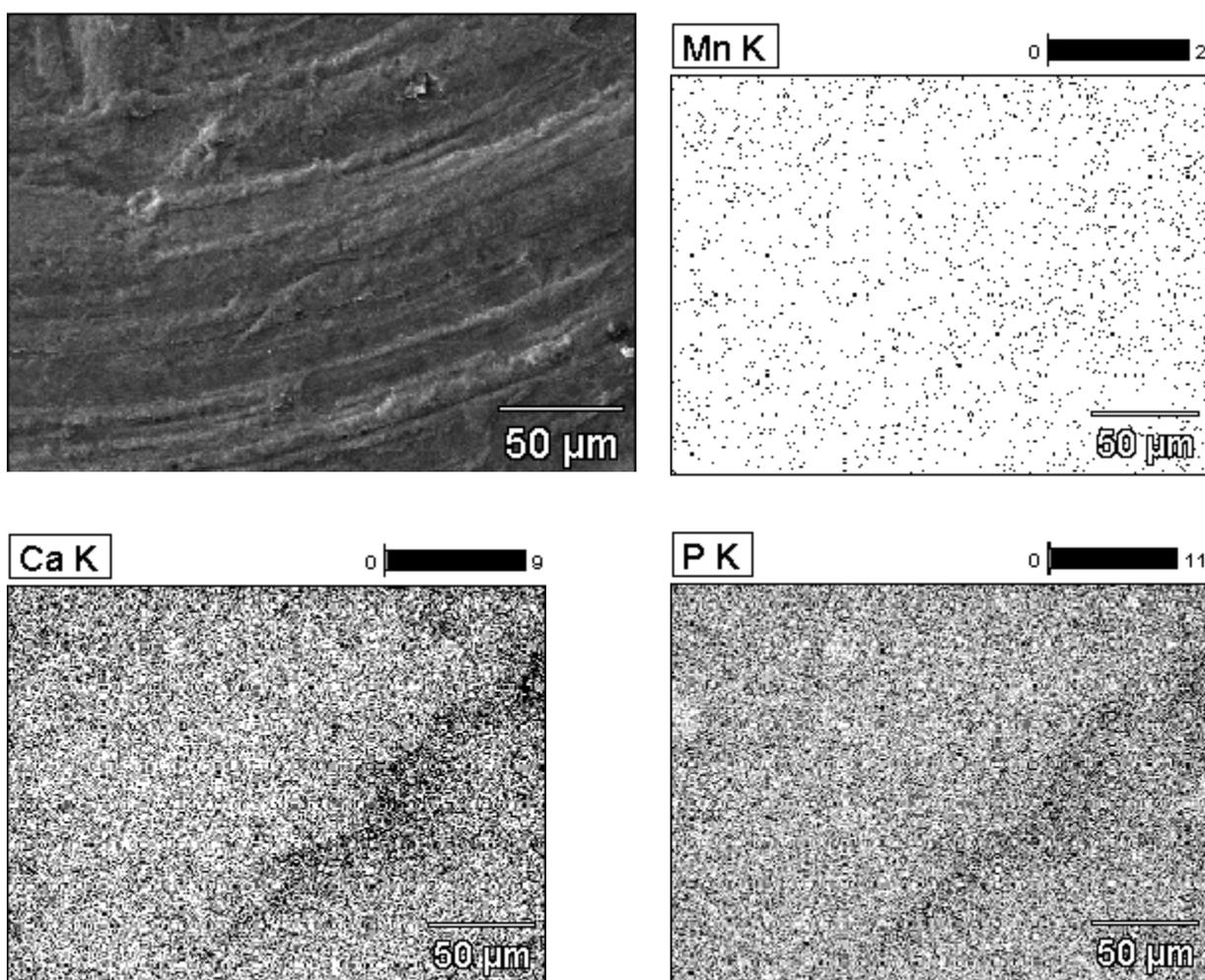


Figura 17. Imagem SEM (elétrons retroespalhados) e mapeamentos elementares para Ca, Mn e P obtidos sobre da superfície da pastilha de HA-Mn.

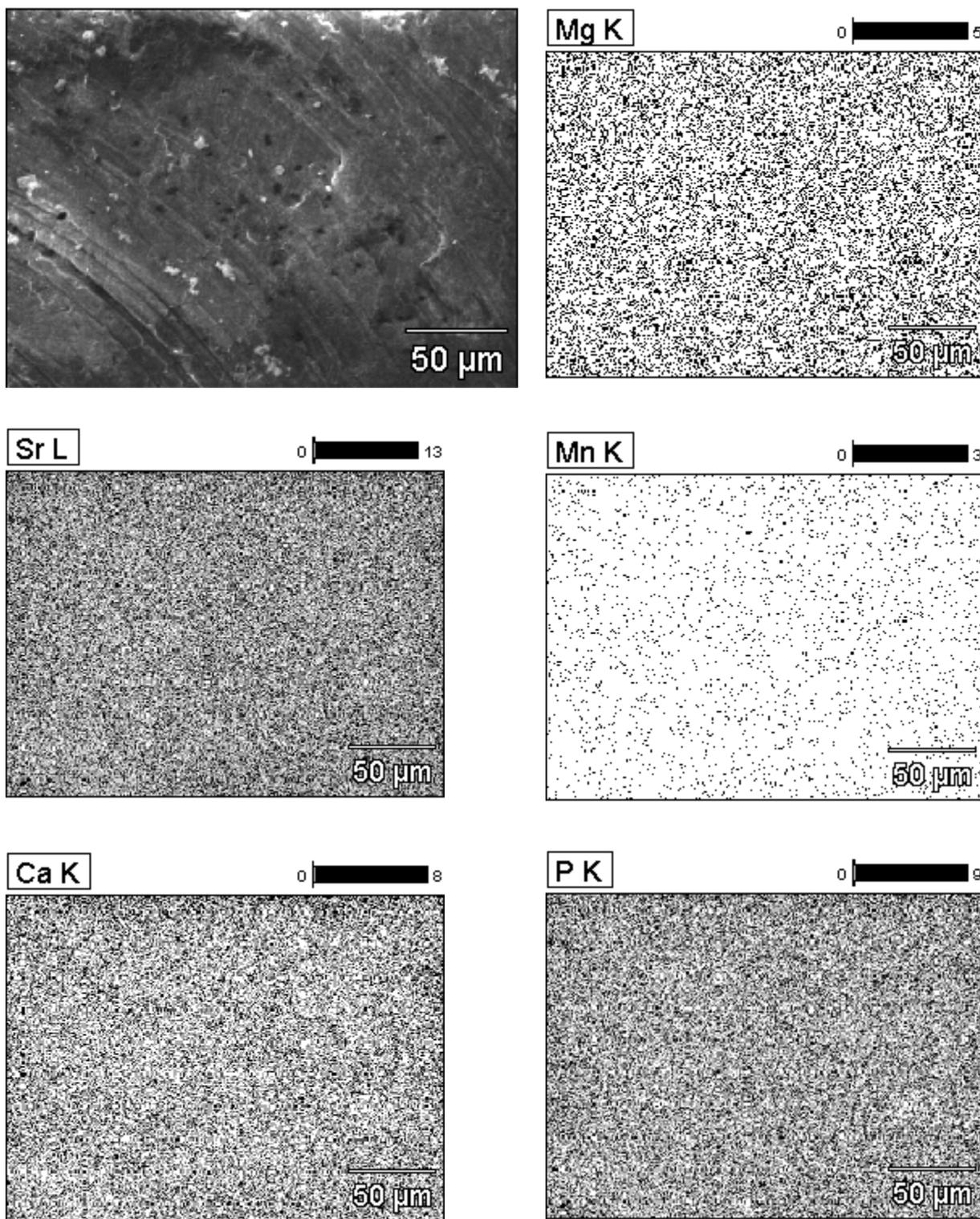


Figura 18. Imagem SEM (elétrons retroespalhados) e mapeamentos elementares para Ca, Mg, Sr, Mn e P obtidos sobre da superfície da pastilha de HA-Mg/Mn/Sr.

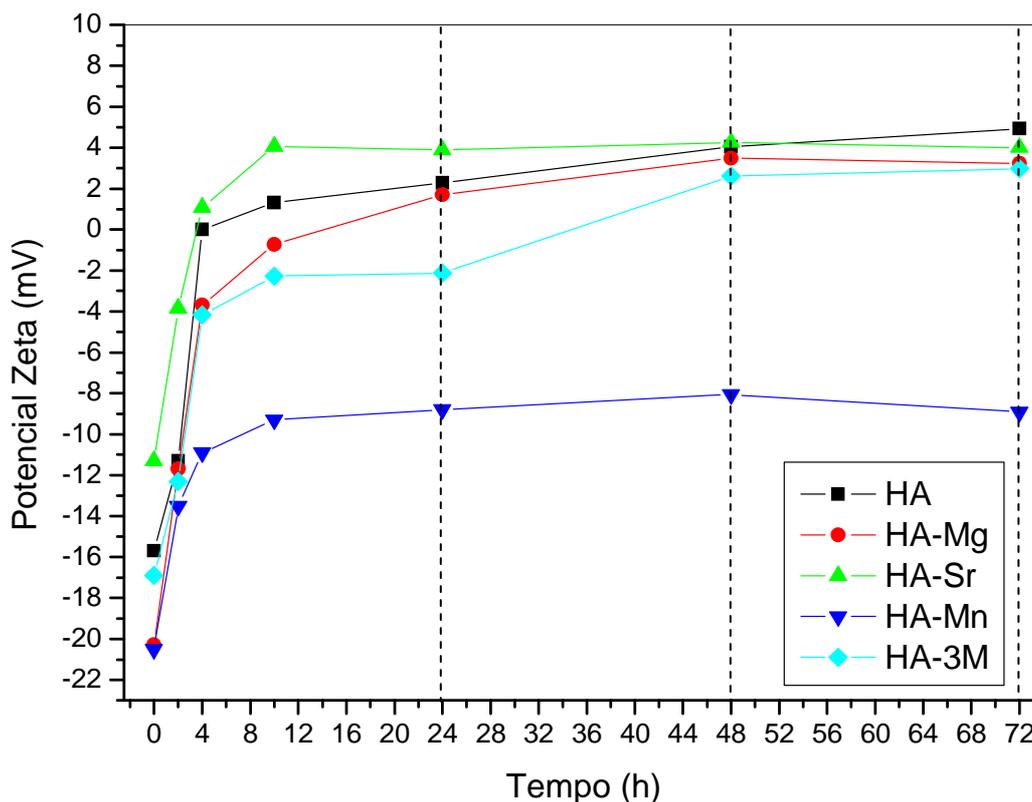


Figura 19. Variação do potencial Zeta das partículas de HA ao longo do tempo de imersão em água, a temperatura ambiente.

Kim *et.al.* (2005) [51] conseguiram comprovar adequadamente o mecanismo de formação de apatita sobre partículas de HA imersas em SBF, proposto anteriormente por Hench e Kokubo. A razão Ca/P e o potencial Zeta na superfície de partículas de HA, calcinadas a 800 e 1200°C, foram monitoradas ao longo do tempo de incubação em SBF. No instante inicial, a razão Ca/P das partículas foi semelhante à razão estequiométrica de uma HA (1,67), e o potencial Zeta da superfície negativo, uma vez que a superfície da HA exhibe predominantemente grupamentos negativos, tais como PO_4^{3-} e OH^- . Ao longo da incubação, a razão Ca/P tende a aumentar até um ponto máximo, sugerindo a formação inicial de uma camada de fosfato de cálcio amorfo (ACP). Essa transformação é acompanhada pelo aumento do potencial Zeta até um valor máximo positivo, comprovando a incorporação de íons Ca^{2+} na superfície. A formação de uma camada parcialmente positiva possibilita a incorporação de grupamentos negativos como PO_4^{3-} , diminuindo sobremaneira a razão Ca/P e, conseqüentemente, o potencial Zeta. Novamente a razão Ca/P começa a aumentar até

um valor próximo ao de uma HA estequiométrica, enquanto o potencial Zeta de superfície tende ao valor inicial negativo.

No nosso caso, as amostras de HA em pó foram imersas em água destilada a temperatura ambiente e o potencial Zeta, medido ao longo do tempo. Ao contrário do SBF, a ausência de íons na água destilada deve induzir inicialmente a dissolução da HA, com liberação de íons Ca^{2+} ou PO_4^{3-} . De acordo com o modelo de Kim, todas as amostras apresentaram valores negativos de potencial Zeta. Ao longo do tempo, houve uma tendência de alcance de valores positivos de carga. Isso parece indicar que a dissolução das amostras acontece num primeiro momento e logo em seguida os Ca^{2+} liberados de superfície começam a serem retidos em superfície, aumentando o potencial das partículas. Podemos então acompanhar dessa forma, indiretamente, a capacidade de dissolução das amostras em água. Nesse caso, podemos dizer que a amostra HA-Sr foi a mais solúvel enquanto que a HA-Mn foi a menos favorável a dissolução. A alta solubilidade induzida pela incorporação de estrôncio à HA vem sendo relatada pelo grupo do Boanini *et. al.* (2010) estando de acordo com as nossas observações [70].

6. Conclusões

- As análises após a síntese indicaram que a variável temperatura exibiu um forte efeito sobre a cristalinidade das amostras obtidas. No entanto, o pH teve pouca influência nesse sentido.
- A condição de síntese em baixa temperatura e pH diminui a estabilidade térmica da HA.
- A síntese de HA dopada com metais causou uma diminuição significativa no nível de cristalinidade das amostras em relação à HA padrão.
- Apenas a síntese da HA dopada com Mg sofreu uma leve transformação de fase gerando a fase do fosfato β -tricálcio após calcinação.
- Os parâmetros de rede calculados revelaram que a substituição do cálcio por Mg e Mn (HA-Mg e HA-Mn) levou a uma leve contração da célula unitária, comparando a HA pura.
- Após calcinação o Mn^{2+} muda de estado de oxidação entrando na rede cristalina da HA também sob a forma MnO_4^{3-} nos sítios do fosfato.
- A introdução dos três íons simultaneamente à rede da HA parece criar uma situação mais favorável à ordenação do cristal, uma vez que o índice de cristalinidade medido foi o mais alto entre as amostras não calcinadas e os parâmetros de rede foram muito próximos àqueles observados para a HA pura.
- A calcinação favoreceu fortemente o crescimento dos cristalitos em todas as amostras.
- Com relação a razão de aspecto, antes da calcinação os cristais têm, em geral, uma tendência a serem mais alongados ao longo do eixo c . Após calcinação, os cristais deixam as formas aciculares evidentes e passam a apresentar uma morfologia esférica mais acentuada, se remetendo a situação de cristais padrões de uma HA padrão.
- Na produção das pastilhas de HA observou-se que com a inclusão de metais as amostras contendo estrôncio (HA-Sr e HA-Mn/Sr/Mg) foram as mais compactas, sendo que as amostras HA-Mg e HA-Mn foram as mais porosas.
- Todas as amostras apresentaram potencial Zeta negativo de superfície variando ao longo do tempo para valores mais positivos indicando uma medida relativa de solubilidade das amostras. Assim, a amostra HA-Sr foi a mais solúvel enquanto que a HA-Mn foi a menos favorável a dissolução.

7. Perspectivas para Trabalhos Futuros

- ✓ Estudar teoricamente como ocorre a entrada dos íons numa inclusão simultânea comparativamente à entrada de um único tipo de íon;
- ✓ Estudar a entrada dos metais em ambiente livre de CO₂;
- ✓ Propor uma rota de sinterização para cada uma das amostras onde a criação de uma superfície isenta de poros seria o objetivo comum;
- ✓ Realizar estudos de liberação desses íons em ambiente biológico;
- ✓ Estudar o comportamento de células ósseas sobre essas cerâmicas.

8. Referências Bibliográficas

- [1] Agência Nacional de Vigilância Sanitária <http://portal.anvisa.gov.br> acessado em 07/07/2010.
- [2] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000> acessado em 07/07/2010.
- [3] Jornal Vale Paraibano <http://jornal.valeparaibano.com.br/2002/07/26/geral/idoso.html> acessado em 07/07/2010.
- [4] The A to Z of Materials <http://www.azom.com/Details.asp?ArticleID=2630> acessado em 07/07/2010.
- [5] Centro de Gestão e Estudos Estratégicos <http://www.strategicbusinessinsights.com/explorer/bm.shtml> acessado em 07/07/2010.
- [6] HENCH, L.L. "Bioceramics: From Concept to Clinic", *Journal of the American Ceramic Society* v.74, n.7, pp.1487-510,1991.
- [7] APARECIDA, A. H; FOOK, M. V. L; DOS SANTOS, M. L., GUASTALDI, A.C., "Influência dos íons K^+ e Mg^{2+} na obtenção de apatitas biomiméticas", *Eclética Química [online]*, v. 30, n. 4, pp. 13-18, 2005.
- [8] LANDI, E., "Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour.", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* v. 19, n.1, pp. 239-247, 2008.
- [9] LANDI, E., "Sr- substituted hydroxyapatite for osteoporotic bone replacement.", *Acta Biomaterialia*, v. 3, n. 6, pp. 961-969, 2007.
- [10] WEBSTER, T. J., MASSA-SCHLUETER, E. A., SMITH, J. L., SLAMOVICH, E. B., "Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations", *Biomaterials*, v. 23, n. 11, pp. 4285-4294, 2004.
- [11] BRACCI, B.; TORRICELLI, P.; PANZAVOLTA, S.; BOANINI, E.; GIARDINO, R.; BIGI, A., "Effect of Mg^{2+} , Sr^{2+} , and Mn^{2+} on the chemico-physical and in vitro biological properties of calcium phosphate biomimetic coatings". *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 103, n.12, pp. 1666-1674, 2009.
- [12] RHO, J-Y; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P., "Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone", *Medical Engineering & Physics* v. 20, n.2, pp. 92-102, 1998.
- [13] JUNQUEIRA, L.C; CARCEIRO J., *Histologia Básica*. 9 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.
- [14] DOROZHKIN, S.V.; EPPLE, M., "Biological and Medical Significance of Calcium Phosphate", *Chemical International Education*, v. 41, n.17, pp. 3130-3146, 2002.
- [15] GREEN, J., "The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements", *Miner Electrolyte Metabolism*, v. 20, n. 1-2, pp. 7-15, 1994.
- [16] HERMEY, D. C., MARKS, S. C.; 1996, "The structure and development of bone", *In: Principles of Bone Biology*, Chapter 1, pp. 3-14, San Diego, CA, USA, Academic Press.
- [17] MARKS, S. C.; ODGREN, P. R., 2002, "Structure and development of the skeleton", *In: P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan, (eds.) Principles of bone biology*, pp. 3-15, San Diego, CA, USA, Academic Press.
- [18] PRELE, C. M.; HORTON, M. A.; CATERINA, P.; STENBECK, G., "Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts", *Experimental Cell Research*, v. 282, n. 1, pp. 24-34, 2003.

- [19] CORREIRA, L.F.; ALVES, G., *Auto e Xenotransplantes na Prática Clínica Implantológica*, 1 ed. Portugal Implantologia, 2002.
- [20] ROSSI, J.D.M.B.A.; *et. al.*, "Avaliação mecânica de compósitos de hidroxiapatita-polimetilmetacrilato". *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 28, n. 3, pp. 167-171, 1993.
- [21] GROSS, K.A.; BERNDT, C. C.; GOLDSCHILAG, D.D.; IACONO, V. , "In vitro changes of hydroxyapatite coatings". *Quintessence*, v.12, n. 5, pp. 589-597, 1997.
- [22] FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W., "Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 3, n. 4, pp. 299-305, 1992.
- [23] MA Q.Y.; LOGAN T. J.; TRAINA S.J. " Lead Immobilization from Aqueous Solutions and Contaminated Soils Using Phosphate Rocks", *Environmental Science & Technology*, v. 29, n. 4, pp. 1118-1126, 1995.
- [24] ELLIOT, J. C., 1994, "Structure and chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates." *In: Studies in inorganic chemistry.*, v. 18, pp.186-190, Amsterdam, Netherlands, Elsevier Science B.V.
- [25] MAVROPOULOS, E., *A hidroxiapatita como removedora de chumbo*. Dissertação de M.Sc, Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia, Rio de Janeiro, Rj, Brasil, 1999.
- [26] POSNER, A. S., "Crystal Chemistry of Bone Mineral", *Physiological Reviews*, v. 49, n. 4., pp.760-& , 1969.
- [27] AOKI, H. *Medical Application of Hydroxyapatite*. 1st ed. Tokyo, Ishiyaku EuroAmerica, 1994.
- [28] ROSSI, A. M.; TERRA, J.; MAVROPOULOS, E.; MOREIRA, E. L. "A ciência e tecnologia das biocerâmicas." *Revista do CBPF*. Disponível em: <http://www.cbpf.br/RevistaCBPF/pdf/BioMat.pdf>. Acesso: maio de 2008.
- [29] SANTOS, M. L.; FLORENTINO, A. O.; SAEKI, M. J.; APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; GUASTALDI, A. C., "Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico", *Eclética Química*, v.30, n.3, pp. 29-35, 2005.
- [30] DOROZHKIN, S.V., EPPLÉ, M., 2002, "Biological and medical significance of calcium phosphates", *Angewandte Chemie International Edition*, v. 41, pp. 3130-3146.
- [31] APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; SANTOS, M. L.; GUASTALDI, A. C., "Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP)", *Química Nova*, v. 30, n. 4, pp. 892-896, 2007.
- [32] LAURENCIN, D.; ALMORA-BARRIOS, N.; LEEUW, N.H.; GERVAIS, C.; BONHOMME, C.; MAURI, F.; CHRZANOWSKI, W.; KNOWLES, J.C.; NEWPORT, R.J.; WONG, A.; GAN, Z.; SMITH, M.E. "Magnesium incorporation into hydroxyapatite" *Biomaterials* v.32, n.7, pp. 1826-1837, 2011.
- [33] COSTA, A.C.F.M; LIMA, M. G.; LIMA, L.H.M.A.; CORDEIRO, V.V.; VIANA K.M.S.; SOUZA C.V.; LIRA H.L. "Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações", *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.4, n. 3, pp. 29-38, 2009.
- [34] WHITE, R.A.; SHORS, E. C., "Biomaterial aspects interporo-200® porous hydroxyapatite", *Dental Clinics of North American*, v. 30, n.1, pp. 49-67, 1986.

- [35] VIDEAU, J. J.; DUPUIS, V., "Phosphate and biomaterials". *European Journal of Solid State and Inorganic Chemistry*, v. 18, n. 1, pp. 303- 343, 1991.
- [36] SALEH, J.; WILLKE, L. W.; BASSANI, I. A.; KRAETHER, L.; MOLZ, R. F.; SANTOS, L. A., "Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo" In: *XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*. Porto Alegre, 2004,
- [37] AFSHAR A. ;GHORBANI M. ; SAERI M. R. ; SORELL C. C., "Some import factors in the precipitation process of hydroxyapatite". *Materials and Design* v.24, n.3, pp. 197-202, 2003.
- [38] HILL, R. G. et al., "The influence of stroncium substitution in fluorapatite glasses and glass-ceramics", *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 336, n. 3, pp. 223-229, 2004.
- [39] BIGI, A. et al., "Structural refinements of strontium substituted hydroxyapatites" *Materials Science Forum*, v. 278-281, n. 2, pp. 814-819, 1998.
- [40] KIM, S. R., LEE, J. H., HIU, D. H., JUNG, S. J., LEE, Y. J., CHUNG, S.C.; KIM, Y. H., "Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatite and their sintering behaviors", *Biomaterials*, v.24, n. 8, pp. 1389 - 1398, 2003.
- [41] BERTONI, E., BIGI, A., COJAZZI, G., GANDOLFI M., PANZAVOLTA S.; ROVERI, N., J. "Nanocrystals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite", *Inorganic Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, pp. 29 - 35, 1998.
- [42] FADEEV, I. V., SHVOMEVA, L. I.; BARINOV, S. M., "Synthesis and structure of magnetium-substituted hydroxyapatite", *Inorganic Materials*, v. 39, n. 9, pp. 947-950, 2003.
- [43] HENCH, L. L.; WILSON, J., *An Introduction to Bioceramics*. 1 ed. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 1993.
- [44] MAYER, I., "TEM study of morphology of Mn²⁺ doped calcium hydroxyapatite and -tricalcium phosphate." *Journal of Inorganic Biochemistry* v. 102, n. 2, pp. 311-317, 2008.
- [45] BIGI, A.; BRACCI, B.; CUSINIER, F.; ELKAIM, R.; FINI, M.; MAYER, I.; MIHAILESCU, I.N.; SOCOL, G.; STRUBA, L.; TORICELLI, P., "Human osteoblast response to pulsed laser deposited calcium phosphate coating", *Biomaterials*, v.26, n. 15, pp. 2381–2389, 2005.
- [46] VALLET-REGI, M.; GONZALES-CALBERT, J. M., "Calcium phosphates as substitution of bone tissues." *Progress in Solid State Chemistry*, v. 32, n. 1-2, pp. 1-31, 2004.
- [47] FILIAGGI, M. J., PILLIAR, R. M.; COOMBS, N. A., "Post-Plasma-Spraying Heat-Treatment of the Ha Coating/Ti-6Al-4V Implant System." *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 27, n.2, pp. 191-198, 1993.
- [48] LANDIS, W. J.; SILVER, F. H., "Structure and function of normally mineralizing avian tendons." *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 41, n. 6, pp. 1501-1501, 2001.
- [49] RODRIGUES, C. V. M. et al., "Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering." *Biomaterials*, v. 24, n.27, pp. 4987-4997, 2003.
- [50] ZHAO, F. et al., "Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds." *Biomaterials*, v. 23, n. 15, pp. 3227-3234, 2002.

- [51] KIM, H. W., KIM, H. E.; SALIH, V., "Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds." *Biomaterials*, v. 26, n.25, pp. 5221-5230, 2005.
- [52] NGIAM, M. et al., "The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering." *Bone*, v. 45, n. 1, pp. 4-16, 2009.
- [53] WEI, G.; MA, P. X., "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering." *Biomaterials*, v. 25, n. 19, pp. 4749-4757, 2004.
- [54] WANG, H. et al., "Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering." *Biomaterials*, v. 28, n. 22, pp. 3338-3348, 2007.
- [55] BAI, X., MORE, K., ROULEAU, C. M.; RABIEI, A. "Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components." *Acta Biomaterialia*, v. 6, n. 6, pp.22264-2273, 2010.
- [56] ZHU, K., YANAGISAWA, K., SHIMANOUCI, R., ONDA, A., KAJIYOSHI, K., "Preferential occupancy of metal ions in the hydroxyapatite solid solutions synthesized by hydrothermal method." *Journal of the European Ceramic Society*, v. 26, n. 4-5, pp. 509-513, 2006.
- [57] CAPUCCINI, C. et al., "Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response." *Acta Biomaterialia*, v.4, n.6, pp. 1885-1893, 2008.
- [58] LANDI, E. et al. "Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites" *Journal of the European Ceramic Society*, v.20, n. 14-15, 2377 - 2387, 2000.
- [59] STAN, G.E., MARCOV, V.A., PASUK, I., MICULESCU, F., PINA, S., TULYAGANOV, D.U., FERREIRA, J.M. "Bioactive glass thin films deposited by magnetron sputtering technique: The role of working pressure.", *Thin Solid Films*, v. 515, n. 17, pp. 6773–6780, 2007.
- [60] ELLIOT, J. C., 1994, "Structure and chemistry of the apatites and other Calcium Orthophosphates." *In: Studies in inorganic chemistry.*, v. 18, pp.12-22, Amsterdam, Netherlands, Elsevier Science B.V.
- [61] WEBSTER, T. J.; MASSA-SCHLUETER, E. A.; SMITH, J. L; SLAMOVICH, E. B. "Osteoblast "Response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations." *Biomaterials*, v. 25, n.11 , pp. 2111-2121, 2004.
- [62] CHIANG, Y.M.; BIRNIE, D. P.; KINGERY, W.D.; 1997, *Physical Ceramics: Principles for Ceramic Science and Engineering*, 1 ed., New York, John Wiley & Sons.
- [63] LEGEROS, R. Z.; LEGEROS, J. P. 1984 "Phosphate minerals in human tissues." *In: J.O Niagru and P.B. Moore. (eds), Phosphate Minerals*, 1 ed., chapter 12, pp. 351-385, Berlin, Germany, Springer-Verlag.
- [64] FLEET, M. E.; LIU, X. "Coupled substitution of type A and B carbonate in sodium-bearing apatite" *Biomaterials*, v. 28, n. 6, pp. 916-926,2007.
- [65] RENAUDIN, G.; JALLOT, E.; NEDELEC, J. M. "Effect of strontium substitution on the composition and microstructure of sol-gel derived calcium phosphates". *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. v. 51, n. 3, pp.287–294, 2009.

- [66] REN, F.; LENG, Y.; XIN, R.; et al. "Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxiapatite." *Acta Biomaterialia*, v.6, n.7, pp. 2787-2796,2010.
- [67] ARAÚJO, J.C., SENA, L., BASTOS, I.N., SOARES, D.A.S., "Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios-x." *Química Nova*, v. 30, n. 8, pp. 1853-1859, 2007.
- [68] HANIFI, A; FATHI, M. H.; SADEGHI, H. M. M.; VARSHOSAZ, J. J. "Mg²⁺ substituted calcium phosphate nano particles synthesis for non viral gene delivery application" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, n. 8, pp.2393–2401, 2010.
- [69] SUITCH, P.R.; LACOUT, J.L.; HEWAT, A et. "The structural location and role of Mn²⁺ partially substituted for Ca²⁺ in fluorapatite." *Acta Crystallographica Section B - Structural Science*, v. 41, n. 1, pp. 173-179, 1985.
- [70] BOANINI, E.; GAZZANO, M.; BIGI, A. "Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature." *Acta Biomaterialia*, v. 6, n.6, pp. 1882–1894, 2010.
- [71] PON-ON, W.; MEEJOO, S.; TANG, I.-M. "Substitution of manganese and iron into hydroxyapatite:Core/shell nanoparticles." *Materials Research Bulletin*, V. 43, n. 8-9, pp. 2137–2144, 2008.
- [72] KANNAN, .S; GOETZ-NEUNHOEFFER, F.; NEUBAUER, J, et. al. " Synthesis and structural characterization of strontium- and magnesium-co-substituted beta-tricalcium phosphate" *Acta Biomaterialia*, V.6, n 2, pp. 571-576, 2010.
- [73] BELOUSOVA, E. A., WALTERS, S., GRIFFIN, W. L., O'REILLY, S. Y. & FISHER, N.I., "Apatite trace-element composition: relationship to source rock type." *Journal of Geochemical Exploration*, v.76, n.1 , pp. 45-69, 2002.
- [74] MAYER, , I.; KARACS, A.; MOLNÁR, G.; POPOV, I. 2010, " Divalent Mn in calcium hydroxyapatite by pulse laser deposition" *Journal of Inorganic Biochemistry* v. 104, n. 10, pp. 1107–1111.
- [75] PALUSZKIEWICZ, C.; ŚLÓSARCZYK, A.; PIJOCHA, D.; SITARZ, M.; BUĆKO, M.; ZIMA, A.; CHRÓŚCICKA, A.; LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ, M., 2010, "Synthesis, structural properties and thermal stability of Mn-doped hydroxyapatite" *Journal of Molecular Structure*, v. 976, n. 1-3, pp. 301-309.
- [76] BYRAPPA, K.; OHACHI, T 2002, "Crystal growth technology" *In: Growth of Hydroxyapatite Crystals.*, Chapter 16, pp. 525-548, New York, USA, Springer.
- [77] ARAÚJO, J.C.; BASTOS, I.N. ; SOARES, G.A. "Determinação Estrutural da Hidroxiapatita por Sínteses de Fourier e Método de Rietveld." *Engevista (UFF)*, v. 12, p. 41-48, 2010.
- [78] DOS SANTOS, E.A., MOLDOVAN, M.S., JACOMINE, L., MATEESCU, M.WERCKMANN, J.J., ANSELME, K., MILLE, P., PELLETIER, H., "Oriented hydroxyapatite single crystals produced by the electrodeposition method.", *Materials Science and Engineering: B*, v. 169, n 1-3, pp. 138-144, 2010.
- [79] LEGEROS, R. Z.; GATTI, A. M.; KIJKOWSKA, R.; MIJARES, D. Q.; LEGEROS, J. P. "Magnesium tricalcium phosphate: formation and properties". *Key Engineering Materials*. v. 254–256, n. 16, pp.127–130, 2004.