

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais

TIAGO MORENO VOLKMER

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -FOSFATO TRICÁLCICO POR
SÍNTESE DE COMBUSTÃO E APLICAÇÃO EM CIMENTOS ÓSSEOS E
ARCABOUÇOS DE CRIOGÉIS**

Tese para obtenção do título de Doutor
em Engenharia

Porto Alegre

2011

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais

TIAGO MORENO VOLKMER
Mestre em Engenharia de Materiais

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -FOSFATO TRICÁLCICO POR
SÍNTESE DE COMBUSTÃO E APLICAÇÃO EM CIMENTOS ÓSSEOS E
ARCABOUÇOS DE CRIOGÉIS**

Trabalho realizado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da UFRGS, dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGEM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia.

Área de Concentração: Ciência dos Materiais.

Porto Alegre
2011

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do título de Doutor em Engenharia, área de concentração em Ciência dos Materiais e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto dos Santos

Co-orientador(a): Profa. Dra. Vânia Caldas de Sousa

Banca Examinadora:

Dr. José Ramon Jurado

Dra. Nance Nardi

Dra. Ruth M. Campomanes Santana

Prof. Dr. Telmo Strohaecker

Coordenador do PPGEM

Porto Alegre

2011

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

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ser concluído sem a ajuda de diversas pessoas às quais presto minha sincera homenagem:

Aos Profs. Dr. Luis Alberto dos Santos e Vânia Caldas, pela magnífica orientação nesta tese de doutorado, por todo o aprendizado durante este período e períodos anteriores, além da confiança e apoio para a realização deste trabalho, bem como ao LABIOMAT - Laboratório de Biomateriais - da Escola de Engenharia da UFRGS, pelo auxílio na realização de alguns ensaios;

Aos amigos de LABIOMAT - Laboratório de Biomateriais, Jéferson Luís de Moraes Machado, Marcelo Bastos, Samanta Vearick, Letícia Vasconcellos, Loreley Morejón, Douglas Marques, Diego Tarrago, Wilbur Trajanno, Rafaela Silveira, Roselen Costella pela ajuda e amizade.

Em especial aos bolsistas de iniciação científica, que foram fundamentais para o andamento desse trabalho, Lorenzo Bastos, Camila Mallmann, Oscar Bareiro e Roselen Costella por toda a sua dedicação durante a execução deste trabalho, e também pela grande amizade.

À todo o pessoal do CME – Centro de Microscopia Eletrônica pela ajuda na preparação das amostras de MEV e em especial para a Aline Rosa pelo curso para operar o MET e auxílio nessa análise.

Ao professor Júlio Sán Roman, Raúl Garcia Carrodéguas e Luis Rodriguez pela orientação na Espanha;

À todo pessoal do ICTP do CSIC de Madrid, Espanha pela grande amizade e companheirismo durante a minha estadia no exterior, Raúl Solís, Luiz Garcia, Luiz Rodruiguez, Joana da Silva, Lorena Benito, Sandra, Diego, Paco, Álvaro, Marisa, Belén, Estefânia, Jorge Marinich, Alfonso Redondo, Hazel Peniche, Daniel Correa e em especial às minhas grandes amigas Felisa Reyes e Patricia Suarez.

A todos os amigos que eu fiz durante minha estadia na Espanha, em especial ao brasileiro Pedro Henrique Gomes e ao “Turco Louco”, Yağız Kılıçcioğlu, pelas aventuras durante o “San Fermin”, a “Tomatina” e os “perigos” da vida Madrilenha.

À minha grande amiga Shana Sabbado Flores e todos demais colegas do Clube ROTARACT BOMFIM por todos os momentos de companheirismo e solidariedade.

À direção da UNIFRA pela oportunidade profissional e em especial a todos os meus alunos por terem me “atrapalhado” durante a escrita desta tese de doutorado.

Aos meus pais Jorge e Mirian Volkmer, por além de terem me colocado no mundo terem me dado grande suporte afetivo e psicológico nos momentos difíceis. Tudo o que eu sou hoje eu devo a eles.

Aos meus avós Isolda e Jorge Volkmer (*in memoriam*) por terem me auxiliado durante toda essa longa caminhada desde o início do colégio até ao fim dessa tese.

À Aline Saile pelo carinho, suporte psicológico e compreensão.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – pelo suporte financeiro para a realização desta tese doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche que me permitiu uma estadia na Espanha.

A UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – pelo excelente ensino público, gratuito e de qualidade.

RESUMO

Os cimentos de fosfato de cálcio apresentam uma série de vantagens de utilização em ortopedia e traumatologia, sendo as mais destacadas a sua biocompatibilidade e bioatividade, as quais permitem a osteocondução dos tecidos ósseos e o endurecimento “*in situ*”, permitindo maior facilidade de manipulação. Entretanto; através dos métodos convencionais de reação no estado sólido há uma grande dificuldade em se obter a fase α -fosfato tricálcico pura. Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível sintetizar a fase α -fosfato tricálcico nanoestruturado com elevado grau de pureza, utilizando-se o método de síntese de combustão em solução. Após os estudos da influência do pH, da natureza do combustível (uréia ou glicina) e dos teores estequiométricos de combustível (0,75; 1,0; 1,5 e 2,0) foi possível definir os melhores parâmetros de síntese (pH 1,5 e combustível uréia em teor duas vezes maior do que o estequiométrico). Com a definição dos parâmetros ótimos de reação, estudou-se a viabilidade de sua utilização como cimento de fosfato de cálcio. Nesta etapa verificou-se a influência do tamanho de partícula através do tempo de moagem. Para tempo de moagem de 180 minutos foram obtidos valores de resistência mecânica à compressão de até 30,4 MPa. Porém após a imersão em solução de plasma sanguíneo simulado (SBF) em tempos crescentes de até 28 dias, ocorreu a diminuição desta propriedade o que é indicativo da alta solubilidade dos pós de α -fosfato tricálcico obtidos via síntese de combustão em solução. O ensaio de citotoxicidade *In Vitro* demonstrou que o CFC sintetizado neste trabalho não apresentou efeito tóxico para as células. Na sequência do trabalho, investigou-se a viabilidade da aplicação do CFC como substituto ósseo e como carga cerâmica em criogéis poliméricos para utilização em engenharia de tecidos. Inicialmente utilizou-se o sistema dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA) com a adição de 5% de um ácido acrílico (ácido acrílico ou ácido metacrílico), porém tal sistema se mostrou muito instável e apresentou baixa reprodutibilidade. Dessa forma, substituiu-se o ácido acrílico pelo monômero hidroxietil metacrilato (HEMA), pelo fato de o último possuir maior estabilidade química e melhores propriedades mecânicas. Com o uso deste sistema foram obtidos arcabouços porosos através do método de criopolimerização com porosidade de até 75% e poros de até 1 milímetro de diâmetro. A adição de α -fosfato tricálcico às estruturas porosas pouco influenciou nas propriedades físicas da rede polimérica e nas propriedades mecânicas dos arcabouços porosos, porém aumentou significativamente a biocompatibilidade destes, permitindo a adesão e a proliferação de células tronco mesenquimais. A presença de

colágeno do tipo I e de fosfatase alcalina são bons indicativos de que as células tronco mesenquimais estão se diferenciando em tecido ósseo e demonstram o potencial destes materiais para o seu uso como biomaterial e mais especificamente como substitutos ósseos.

Palavras chave: Cimentos de fosfato de cálcico. α -fosfato tricálcico. Síntese de combustão em solução. Criopolimerização. Células tronco mesenquimais.

ABSTRACT

The calcium phosphate cements have a large number of advantages regarding its use in orthopedics and traumatology, being the most prominent its biocompatibility and bioactivity, which allows the osteoconductive of bone tissue and *in situ* hardening, allowing greater ease of handling. However, the use of conventional synthesis methods, e.g. solid state reactions, brings great difficulty to the obtainment of highly pure α -tricalcium phosphate phase. In this thesis, the use of the solution combustion synthesis method allowed to synthesize nanostructured α -tricalcium phosphate with high purity. Further studies on pHs influence, fuel natures (urea or glycine) and fuel ratio (0.75, 1.0, 1.5 and 2.0) allowed to define the best synthesis parameters (pH 1.5 and urea fuel content in two times higher than the stoichiometric). After choosing the best parameters to the obtainment of highly pure α -tricalcium phosphate, we studied the feasibility of their use as calcium phosphate cement (CFC) by studying the influence of particle size by increasing the milling time from 30 to 180 minutes. The better results were found for the milling time of 180 minutes. Compressive strength of up to 30.4 Mpa were obtained for this formulation. However, after soaking the calcium phosphate cements in simulated blood plasma (SBF) in growing times up to 28 days, a decrease in the compressive strength was noticed, which is an indicative of the high solubility of the α -tricalcium phosphate powders obtained by solution combustion synthesis. After the obtainment of the calcium phosphate cements, its application as bone substitute and as ceramic load in polymeric cryogels for use in tissue engineering were studied. Initially, the system dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) with 5% of an acrylic acid (acrylic acid or methacrylic acid) was used, but due its great instability and lack of reproductibility this system was abandoned. Since it has greater chemical stability and good mechanical properties, the monomer hydroxyethyl methacrylate (HEMA) was chosen as pair to the DMAEMA monomer. With the use of this polymeric system, porous scaffolds with porosity of up to 75% and pores up to 1 mm in diameter were obtained by the method of cryopolymerization. The addition of α -tricalcium phosphate to the porous scaffolds did not showed a significant influence on physical properties of the polymer network nether on mechanical properties of porous structures. However, it increased significantly the biocompatibility of the scaffolds, allowing the adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells. The presence of type I collagen and alkaline phosphatase are good indicators that mesenchymal stem cells are differentiating

into bone tissue and demonstrate the potential application of these materials as biomaterials, more specifically as bone substitutes.

Keywords: Calcium phosphate cements. α -Tricalcium phosphate. Solution combustion synthesis. Cryopolymerization. Mesenchimal stem cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Aplicação dos biomateriais (ROZIAK et al., 1999).....	10
Figura 3.2. Espectro da bioatividade de vários implantes biocerâmicos: (A) Taxa relativa de bioatividade, (B) Tempo de formação de ligação óssea na superfície do implante. (RATNER et al., 2004).	14
Figura 3.3. Modelo da estrutura do fosfato de cálcio amorfo (ACP), (POSNER, 1980). ...	17
Figura 3.4. Estrutura cristalina da hidroxiapatita (AOKI, 1991).....	19
Figura 3.5. Padrão de difração da hidroxiapatita (AOKI, 1991).	20
Figura 3.6. Representação do diagrama de fases do sistema $2Ca.P_2O_5$ e CaO (Phase diagrams for ceramists, 1984).	22
Figura 3.7. (A) Rede macromolecular ideal de um hidrogel, (B) Rede com junções multifuncionais, (C) Entrelaçamentos físicos em um hidrogel, (D) Grupo funcional não reagido e (E) <i>loops</i> na cadeia do hidrogel (PEPPAS, 2004).	35
Figura 3.8. Esquema das etapas da criopolimerização.	37
Figura 4.1. Fluxograma para preparação de pós de α -TCP.....	42
Figura 5.1. Padrões de difração de raios X do produto da reação de combustão como sintetizado. O valor dos pHs das reações é mostrado à esquerda.	68
Figura 5.2. Micrografias de Microscopia Eletrônica de Varredura e o mapeamento elementar por EDX para os elementos oxigênio, cálcio e fósforo para a amostra pH1,5 sem tratamento térmico.	69
Figura 5.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier do material obtido pela reação de combustão.....	71
Figura 5.4. Difratoograma dos pós obtidos por reação de combustão após serem submetidas ao tratamento térmico 1200°C por 4 horas.....	72
Figura 5.5. Micrografias de Microscopia Eletrônica de Varredura e o mapeamento elementar por EDX para os elementos oxigênio, cálcio e fósforo para a amostra pH1,5 após o tratamento térmico.	73
Figura 5.6. Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra pH1,5 sem tratamento térmico.....	77
Figura 5.7. Distribuição de tamanho de cristalitos a partir da Micrografia da amostra pH1,5 sem tratamento térmico, mostrada na Figura 5.6.....	78
Figura 5.8. Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra pH1,9 sem tratamento térmico.....	79

Figura 5.9. Distribuição de tamanho de cristalitos a partir da Micrografia da amostra pH1,9 sem tratamento térmico, mostrada na Figura 5.8.....	80
Figura 5.10. Padrões de difração de raios X do produto da reação de combustão como sintetizado ao utilizar-se uréia como combustível.....	83
Figura 5.11. Padrões de difração de raios X do produto da reação de combustão como sintetizado ao utilizar-se glicina como combustível.	84
Figura 5.12. Padrões de difração de raios X do produto da reação de combustão como sintetizado ao utilizar-se uréia como combustível, após o tratamento térmico.....	85
Figura 5.13. Padrões de difração de raios X do produto da reação de combustão como sintetizado ao utilizar-se glicina como combustível, após o tratamento térmico.	86
Figura 5.14. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier do material obtido pela reação de combustão das reações que utilizaram uréia como combustível nas proporções de 0,75, 1,0, 1,5 e duas vezes o valor estequiométrico. E a reação 1Ut após o tratamento térmico.	87
Figura 5.15. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier do material obtido pela reação de combustão das reações que utilizaram glicina como combustível nas proporções de 0,75, 1,0, 1,5 e duas vezes o valor estequiométrico. E a reação 1Gt após o tratamento térmico.	88
Figura 5.16. Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 1,0U sem tratamento térmico.	91
Figura 5.17. Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 1,0G sem tratamento térmico.	91
Figura 5.18. Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 2,0U sem tratamento térmico.	92
Figura 5.19. Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 2,0G sem tratamento térmico.	92
Figura 5.20. Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 2,0U após tratamento térmico.....	93
Figura 5.21. Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 2,0G após tratamento térmico.....	93
Figura 5.22. Padrões de difração de raios X dos pós de α -TCP como obtidos e após 30, 60 e 180 minutos de moagem.....	95
Figura 5.23. Micrografias obtidas por MEV da microestrutura dos cimentos de α -TCP moídos por (a) 30 minutos e (b) 180 minutos.	100

Figura 5.24. Micrografias eletrônicas de varreduras da superfície externa do cimento de α -fosfato tricálcico, após tempos de imersão em SBF de (a) 24h, (b) 3 dias, (c) 1 semana, (d) 2 semanas, (e) 3 semanas e (f) 4 semanas.	102
Figura 5.25. Micrografias obtidas por MEV mostrando em detalhe a microestrutura dos cimentos de α -TCP após 28 dias de imersão em SBF.	104
Figura 5.26. Micrografias obtidas por MEV mostrando a camada de HA formada nos cimentos de α -TCP após 28 dias de imersão em SBF	104
Figura 5.27. Difratomogramas de DRX do cimento de α -fosfato tricálcico, com tempos crescentes de imersão em SBF de até 4 semanas.	105
Figura 5.28. Influência do tempo de imersão em SBF na porosidade dos cimentos de α -TCP.	106
Figura 5.29. Influência do tempo de imersão em SBF na resistência mecânica a compressão dos cimentos de α -TCP.	106
Figura 5.30. Influência do tempo de imersão em SBF no valor de pH dos cimentos de α -TCP.	107
Figura 5.31. Evolução da temperatura em função do tempo após a imersão no criostato a -20°C.	111
Figura 5.32. Espectros de espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada das composições estudadas com a extração do gelo por liofilização.	113
Figura 5.33. Espectros de espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada das composições estudadas com a extração do gelo por derretimento.	113
Figura 5.34. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido das amostras MM.	115
Figura 5.35. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido da amostra AT.	115
Figura 5.36. Massa perdida por cada composição para cada tratamento utilizado para a extração do gelo após a lavagem sob agitação em água destilada por 24 horas.	116
Figura 5.37. Densidade aparente das composições estudadas para cada tratamento de extração de gelo utilizado.	117
Figura 5.38. Porosidade das composições estudadas para cada tratamento de extração de gelo utilizado.	118
Figura 5.39. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição MT (MA/TEGMA) (a) MEV da	

amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.....	119
Figura 5.40. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição MM (MA/MBAM) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.....	120
Figura 5.41. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição DT (DMAEMA/TEGMA) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.....	120
Figura 5.42. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição DM (DMAEMA/MBAM) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.....	121
Figura 5.43. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição AT (AA/TEGMA) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.....	121
Figura 5.44. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição AM (AA/MBAM) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.....	122
Figura 5.45. ESR das amostras liofilizadas e descongeladas após 24 horas de imersão em PBS à 37°C.....	124
Figura 5.46. Espectros de Espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada das amostras contendo 25, 50 e 75% de HEMA em sua composição.....	126
Figura 5.47. Espectros de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier das amostras contendo 75% de HEMA com e sem a adição de 5% de α -TCP.....	127
Figura 5.48. Percentual de massa perdida após limpeza dos criogéis sintetizados variando-se o teor de HEMA utilizado e com e sem a adição da fase cerâmica α -TCP.	128
Figura 5.49. Densidade aparente após limpeza dos criogéis sintetizados variando-se o teor de HEMA utilizado e com e sem a adição da fase cerâmica α -TCP.	129
Figura 5.50. Porosidade aparente dos criogéis sintetizados variando-se o teor de HEMA utilizado e com e sem a adição da fase cerâmica α -TCP.....	124

Figura 5.51. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para os criogéis sintetizados de composição 25%HEMA com e sem a adição da carga cerâmica (a) MEV da amostra 25%HEMA, (b) MEV da amostra 25%HEMA + TCP, (c) DTP da amostra 25%HEMA, (d) DTP da amostra 25%HEMA + TCP.....	131
Figura 5.52. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para os criogéis sintetizados de composição 50%HEMA com e sem a adição da carga cerâmica (a) MEV da amostra 50%HEMA, (b) MEV da amostra 50%HEMA + TCP, (c) DTP da amostra 50%HEMA, (d) DTP da amostra 50%HEMA + TCP.....	132
Figura 5.53. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para os criogéis sintetizados de composição 75%HEMA com e sem a adição da carga cerâmica (a) MEV da amostra 75%HEMA, (b) MEV da amostra 75%HEMA + TCP, (c) DTP da amostra 75%HEMA, (d) DTP da amostra 75%HEMA + TCP.....	133
Figura 5.54. Micrografias obtidas por MEV dos criogéis de composição (a) 75%HEMA e (b) 75%HEMA + TCP.	137
Figura 5.55. Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDX) da amostra 75%HEMA + TCP.....	137
Figura 5.56. Difratoograma obtido pela técnica de Difração de Raios X do criogel de composição 50HEMA+TCP.....	139
Figura 5.57. Análise termogravimétrica dos criogéis sintetizados.	140
Figura 5.58. Quociente de Equilíbrio de Inchamento (ESR) dos criogéis sintetizados em função do teor de HEMA sem e com a adição de gelatina e da fase cerâmica α -TCP solução de PBS com pH 7,4 a 37°C.....	142
Figura 5.59. Influência da adição de gelatina e de α -TCP no Quociente de Equilíbrio de Inchamento (ESR) em função do tempo de imersão em solução de PBS com pH 7,4 a 37°C nas amostras de composição (a) 25%HEMA, (b) 50%HEMA, (c) 75%HEMA.....	144
Figura 5.60. Variação do Quociente de Equilíbrio de Inchamento (ESR) após 28 dias de imersão em solução de PBS com pH 7,4 a 37°C para as amostras sem α -TCP em suas composições.	149
Figura 5.61. Variação do Quociente de Equilíbrio de Inchamento (ESR) após 28 dias de imersão em solução de PBS com pH 7,4 a 37°C para as amostras com α -TCP em suas composições.	149
Figura 5.62. Inchamento das amostras em diferentes pHs após 12 horas de imersão.	150
Figura 5.63. Fotografia do criogéis de composição 75%HEMA imersos em solução tampão de pH 2, 7 e 10.....	152

Figura 5.64. Módulo Elástico (G') e módulo viscoso (G'') medidos por reologia.	153
Figura 5.65. Porcentagem de Alamar Blue reduzido para culturas de osteoblastos e células tronco mesenquimais humanas (CTM) na presença de criogéis de composição 75%HEMA e 75%HEMA + TCP (n=3).....	155
Figura 5.66. Micrografias obtidas por microscopia ótica da análise histomorfológica <i>in vitro</i> das amostras (a) e (b) 75%HEMA e (c) e (d) 75%HEMA + TCP do ensaio histoquímico Hematoxilina-Eosina.....	157
Figura 5.67. Micrografias obtidas por microscopia ótica da análise histomorfológica <i>in vitro</i> da amostra 75%HEMA para os ensaios de (a) Colágeno I e (b) Fosfatase Alcalina e da amostra 75%HEMA + TCP (c) Colágeno I e (d) Fosfatase Alcalina.	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Tipos de biocerâmicas e seus tipos de ligação.	13
Tabela 3.2. Compostos de fosfato de cálcio avaliados biologicamente (RATNER et al., 2004).	16
Tabela 3.3. Vantagens e desvantagens dos cimentos de fosfato de cálcio (DOROZHKIN, 2009).	26
Tabela 3.4. Polímeros sintéticos utilizados em biomedicina e cirurgia: propriedades e aplicações (SAN ROMÁN et al., 2004).	33
Tabela 3.5. Concentração de Íons dos SBF e do Sangue Humano.	40
Tabela 4.1. Dados termodinâmicos relevantes (PERRY; CHILTON, 1973; DEAN, 1979)	44
Tabela 4.3. Proporção entre os reagentes utilizados no estudo da influência do combustível na síntese de combustão.	46
Tabela 4.4. Reagentes utilizados para a síntese dos criogéis.	47
Tabela 4.5. Proporção entre os reagentes utilizados na síntese dos criogéis do sistema monômero/comonômero e agente entrecruzante.	48
Tabela 4.7. Composição iônica do SBF.	61
Tabela 4.8. Critérios de avaliação do índice de zona.	62
Tabela 5.1. Informações termodinâmicas da reação de síntese de combustão.	66
Tabela 5.2. Concentração atômica medida por EDX e razão Ca/P para a amostra pH 1,5 antes do tratamento térmico.	69
Tabela 5.3 Concentração atômica medida por EDX e razão Ca/P para a amostra pH 1,5 após o tratamento térmico.	74
Tabela 5.4. Resultados da análise granulométrica mostrando a distribuição e o tamanho médio de partícula (TMP).	74
Tabela 5.5 Área superficial específica, tamanho de partículas por BET e tamanho de cristalito calculado utilizando-se a formula de Scherrer.	76
Tabela 5.6. Informações termodinâmicas da reação de síntese de combustão para cada combustível utilizado.	82
Tabela 5.7. Área superficial específica, tamanho de partículas por BET e tamanho de cristalito calculado utilizando-se a formula de Scherrer dos pós sintetizados em função do tipo e do teor de combustível utilizado.	89

Tabela 5.8. Área superficial específica, tamanho de partículas por BET e tamanho de cristalito calculado utilizando-se a formula de Scherrer dos pós obtidos após o tratamento térmico utilizando-se glicina ou uréia em função do teor de combustível utilizado.	90
Tabela 5.9. Tamanho de partícula médio obtido por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	93
Tabela 5.10. Influência do tempo de moagem nas propriedades físicas do pó após o tratamento térmico.	96
Tabela 5.11. Influência do tempo de moagem no tempo de pega dos cimentos de fosfato de cálcio obtidos via síntese de combustão em solução, utilizando-se uma solução aquosa contendo 2,5% de hidrogeno fosfato de sódio.....	97
Tabela 5.12. Influência do tempo de moagem nas na porosidade aparente, absorção de água e densidade aparente medidas pelo método de Arquimedes.	99
Tabela 5.13. Influência do tempo de moagem nas propriedades mecânicas dos cimentos de fosfato de cálcio obtidos por combustão.....	99
Tabela 5.14. Índice de zona obtido após a leitura das placas de culturas celulares para as amostras de α -fosfato tricálcico.....	108
Tabela 5.15. Dados extraídos da curva de resfriamento.	112
Tabela 5.16. Tamanho médio de poros para cada tratamento utilizado para a extração do gelo.....	123
Tabela 5.17. Tamanho médio de poros e tamanho modal para cada composição estudada.	135
Tabela 5.18. Resumo dos dados obtidos por TGA.	141
Tabela 5.19. Parâmetros da rede polimérica determinados através do estudo do inchamento dos criogéis.....	145

LISTA DE ABREVIACÕES

- ℓ - comprimento da ligação C-C;
- densidade do fluido;
¹³C-RMN - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13;
A - área da seção reta dos corpos-de-prova ;
A/W vitrocerâmicas – cerâmica vítrea com apatita e wolastonita na composição;
AA – Absorção de Água;
AAc – Ácido Acrílico;
AAm/AGE - Acrilamida/Alil Glicidil Éter;
AM – Ácido Metacrílico;
APS - persulfato de amônia;
A_{sBET} - área superficial específica;
ATG - Análise Termogravimétrica;
Biovidro 45S5 – vidro biocompatível com 45% de sílica em sua composição;
CDHA - hidroxiapatita deficiente em cálcio;
CFC – Cimento de Fosfato de Cálcio;
CMP - metafosfato de cálcio;
C_n - razão característica dos monômeros;
C_p - capacidade calorífica dos produtos à pressão constante;
CPP - pirofosfato de cálcio;
c-SBF - SBF corrigido;
CTM - células tronco mesenquimais;
DP - desvio padrão;
DA – Densidade Aparente;
DCP - fosfato dicálcico anidro;
DCPD - fosfato dicálcico dihidratado;
DMAEMA – Dimetilaminoetil Metacrilato;
DNA - ácido desoxiribonucleico;
DRX - difração de raios X;
DRX-FF - difração de raios X de filme fino;
DTP - distribuição do tamanho de poros;
EDX - Espectroscopia de fluorescência de raios X por energia dispersa;
ESR – *Equilibrium Swelling Rate* ou Quociente de Inchamento no Equilíbrio;

ET – Engenharia de Tecidos;
F - força necessária para a fratura;
FTIR–ATR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier –
Reflectância total atenuada;
G' - módulo elástico;
G'' – módulo viscoso;
GAG – glicosaminoglicanos;
HA - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – hidroxiapatita;
HAC - Hidroxiapatita carbonatada;
HAP - hidroxiapatita porosa;
HCNO - ácido ciânico;
HEMA - hidroxietil metacrilato;
HEMA-co-AA-co-NaAc - copolímeros de hidroxietil metacrilato com ácido acrílico e
acrilato de sódio;
ICDD - *International Center for Diffraction Data*;
IR – índice de Resposta;
 I_{sp} - impulso específico;
IV - Espectroscopia de Infravermelho;
IV-FT - Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier;
IZ – Índice de Zona;
 k - constante de proporcionalidade que depende da forma das partículas;
kg - quilograma;
L - espessura do meio poroso;
LR - linha basófila de reversão;
 m^2/g – metro quadrado por grama;
MATrp - N-Metacriol-L-triptofano;
MBAM - N,N' metilenobisacrilamida difuncional;
 m_e - massa do criogel no equilíbrio de inchamento;
MET - microscopia eletrônica de transmissão;
MEV - microscopia eletrônica de varredura;
MIST – *minimally invasive surgery techniques*;
mL - mililitro;
 mL/g – mililitro por grama;
mm - milímetro;

mm² – milímetros quadrados;
MPa – Mega Pascal;
m_s - massa do criogel seco;
N - Newton;
n - número de moles;
N- Newton;
N_A - número de Avogrado;
n-SBF – SBF novo;
Ø - funcionalidade do agente entrecruzante;
Ø_{BET} - tamanho de partículas medido por BET;
OCP - Fosfato octacálcico;
OHA - Oxiapatita;
Ø_{Laser} - tamanho de aglomerados;
Pa - Pascal;
PA – Porosidade Aparente;
PAN - Poli Acrilonitrila;
PDF - *Powder Diffraction File*;
PDMAEMA - poli(dimietilamino etil metacrilato);
PE – polietileno;
PEG - polietileno glicol;
PEGDA - Poli Etileno Glicol Diacrilato;
PEGDMA - Poli(etileno glicol) dimetacrilato;
PET - politereftalato de etileno;
PEUAM - polietileno de ultra alto peso molecular;
HEMA - poli (hidroxietil metacrilato);
PLGA - copoli(ácido) láctico-glicólico;
PMMA - poli(metilmetacrilato);
PP – polipropileno;
PVC - cloreto de polivinila;
Q - quociente de equilíbrio de inchamento;
RAFT - *Reversible addition-fragmentation chain Transfer*;
RPM - rotações por minuto;
r-SBF - SBF revisado;
S_{BET} - área superficial específica;

SBF - simulated body fluid (solução simulada de fluidos corpóreos);
SCS – síntese de combustão em solução;
SUTW - *super ultra thin window*;
T - temperatura de chama adiabática;
 T_0 – temperatura ambiente;
 T_c - temperatura inicial de cristalização do solvente;
 t_c - tempo para o início da cristalização;
TCP - fosfato tricálcico;
TCP- α - fase alfa do fosfato tricálcico;
TCP- β - fase beta do fosfato tricálcico;
 T_{cs} - temperatura de congelamento do sistema;
TeCP - Fosfato tetracálcico;
Teflon – politetrafluoretileno;
TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina;
TMP – Tamanho médio de partícula;
TMP - tamanho médio de poros;
V – Volume de gás adsorvido;
 V_1 - volume molar da água;
 V_{2r} - fração volumétrica do polímero no estado relaxado, porém antes do inchamento;
 W_d - massa do polímero depois do inchamento;
 W_s - massa do polímero antes do inchamento;
 β - largura à meia altura do pico;
 ΔH° - entalpia de combustão;
 ΔH_p° - entalpia de formação dos produtos;
 ΔH_r° - entalpia de formação dos reagentes;
 Δt_{cs} – variação do tempo de cristalização;
 λ - comprimento de onda da radiação do Cu;
 μm - micrômetro;
 v - volume específico do polímero;
 ρ_{ap} – densidade aparente;
 ρ_L – densidade do meio líquido;
 ρ_p – densidade do polímero;
 ρ_r – densidade real;
 ρ_s – densidade do solvente;

σ - tensão de ruptura ;

σ_c - tensão máxima de compressão (MPa);

χ - Flory-Huggins de interação polímero/solvente;

\emptyset_e – razão oxidante/combustível

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE ABREVIACÕES	IX
2 OBJETIVO	6
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 Biomateriais.....	7
3.2. Classificação dos Biomateriais.....	8
3.3 Aplicações dos Biomateriais.....	9
3.4. Biocerâmicas.....	11
3.4.1. Tipos de Ligação de Tecidos com Biocerâmicas	13
3.4.2. Ortofosfatos de Cálcio	15
3.4.3. Fosfato de Calcio Amorfo.....	16
3.4.4. Hidroxiapatita.....	18
3.4.4. β -Fosfato Tricálcico.....	21
3.4.5 α -Fosfato Tricálcico.....	21
3.5. Materiais Cimentícios.....	23
3.5.1. Cimento Hidráulico Convencional	23
3.5.2 Cimento Portland.....	24
3.5.3. Cimentos de Fosfatos de Cálcio	24
3.5.4. Sistema α -TCP	27
3.5.5. Reação de Cura.....	29
3.6. Síntese de Combustão em Solução.....	29
3.6.1. Fosfatos de Cálcio Obtidos Via Síntese de Combustão.....	32
3.7. Biopolímeros.....	32
3.7.1 Hidrogéis.....	33
3.7.2 Criopolímeros.....	36
3.8 Ensaio <i>in vitro</i> - Comportamento em SBF	37
3.8.1 História do SBF.....	38
3.8.2 Correlação Qualitativa da Formação de Apatita em SBF com Bioatividade <i>in vivo</i>	40
3.9 Células Tronco Mesenquimais	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Reações de Combustão.....	42
4.1.1 Cálculo Termodinâmico das Reações de Combustão em Solução	43
4.1.2 Estudo do pH.....	45
4.1.3 Estudo do Combustível.....	46
4.2. Obtenção dos Cimentos de Fosfato de Cálcio.....	47
4.3. Obtenção dos Criogéis Reforçados com Fosfato de Cálcio.....	47
4.3.1 Criogéis do sistema Ácido Acrílico ou Ácido Metacrílico/Dimetilamino Etil Metacrilato (AA ou MA/DMAEMA)	48
4.3.2 Criogéis do sistema Hidroxietil Metacrilato/Dimetilamino Etil Metacrilato (HEMA/DMAEMA)	49
4.4. Caracterização dos Pós Obtidos Via Síntese de Combustão.....	50
4.4.1. Difração de Raios X	50
4.4.2. Espectroscopia de Infravermelho	51

4.4.3. Difração de Laser (Granulometria)	51
4.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	51
4.4.5. Espectroscopia de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersa (EDX).....	52
4.4.6. Adsorção de Nitrogênio (BET)	52
4.5. Caracterização dos Cimentos de Fosfato de Cálcio	52
4.5.1. Tempo de Pega	52
4.5.2. Absorção de água, Densidade e Porosidade Aparente	53
4.5.3 Resistência Mecânica à Compressão	54
4.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	54
4.5.5 Determinação do pH.....	55
4.6 Caracterização dos Criogéis.....	55
4.6.1 Densidade Aparente.....	55
4.6.2 Densidade Real.....	56
4.6.3 Porosidade Total.....	56
4.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	56
4.6.5 Espectroscopia de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersa (EDX).....	56
4.6.6. Distribuição de Tamanho de Poros.....	57
4.6.7. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (¹³ C-RMN).....	57
4.6.8. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	57
4.6.9. Análise Termogravimétrica (ATG)	58
4.6.10. Inchamento.....	58
4.6.11. Reologia	60
4.7. Ensaio <i>In Vitro</i> dos Cimentos de Fosfato de Cálcio.....	61
4.8. Ensaios Celulares.....	61
4.8.1. Difusão em Agar	61
4.8.2 Isolamento das Células Tronco Mesenquimais.....	62
4.8.3. Culturas Celulares	63
4.8.4. Alamar Blue™	63
4.8.5 Análise Histoquímica de Hematoxilina-Eosina	63
4.8.6 Imunodeteção de Colágeno do Tipo I.....	64
4.8.7 Detecção de Fosfatase Alcalina.....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1 Reações de Combustão em Solução	66
5.1.1 Estudo da Influência do pH.....	66
5.1.2 Estudo da Influência do Combustível.....	80
5.2 Cimentos de Fosfato de Cálcio.....	95
5.2.1 Tempo de Moagem.....	95
5.2.2 Análise <i>in vitro</i>	101
5.3 Criopolimerização	110
5.3.1 Estudo do Comonômero e Agente Entrecruzante	110
5.3.2 Sistema HEMA/DMAEMA	125
6. CONCLUSÕES	160
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	165
REFERÊNCIAS	166
ANEXO I.....	182

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biomateriais mostra-se fundamentalmente importante, no sentido que desse desenvolvimento prescreve-se uma melhoria no nível de vida das pessoas, representada por um aumento na expectativa de vida, na saúde em geral e no bem estar da população. Dessa forma, observa-se nos últimos anos um enorme esforço no intuito de se produzir novas tecnologias nessa área.

O tecido ósseo tem a capacidade de regeneração com a produção de novo tecido com a mesma alta organização estrutural original. No entanto, esta capacidade regenerativa é limitada pelo tamanho da lesão. Assim, defeitos ósseos extensos, provocados por traumas, infecções, neoplasias e anomalias de desenvolvimento não se regeneram espontaneamente, representando um problema atual na medicina e odontologia. O preenchimento de defeitos ósseos com osso autógeno (do mesmo indivíduo) é uma opção de tratamento regenerativo. Entretanto, o osso autógeno tem uma disponibilidade limitada para enxertos. Substitutos apropriados e biocompatíveis para enxertos são, portanto requeridos. Outra opção é a utilização de osso alógeno (de outro indivíduo), o que geralmente não é desejável por constituir um possível vetor de doenças. Alguns biomateriais podem ser usados com sucesso para o preenchimento de cavidades óssea na reposição de osso perdido após a remoção de um tumor ou trauma.

Os biomateriais sintéticos mais empregados como substitutos ósseos são as biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, em particular a hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e os cimentos de fosfato de cálcio - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. A hidroxiapatita sob a forma sintética vem sendo bastante utilizada por ser um material bioativo, o que a torna um excelente biomaterial para implantes de longa permanência. Por causa da sua similaridade química com a fase mineral dos tecidos ósseos, ela favorece o crescimento ósseo nos locais onde ela se encontra, fenômeno chamado de osteocondução, estabelecendo ligações de natureza química com o tecido ósseo, sendo que as células não distinguem entre a hidroxiapatita e a superfície óssea.

Dentre as principais vantagens dos cimentos de fosfato de cálcio (CFC) estão o fato de que ele possui a capacidade de endurecer *in vivo*, o que permite a utilização deste material em cirurgias minimamente invasivas, de maneira que estes materiais são injetados no local do implante, causando menos dano, a boa osteocondutividade e osteoindutividade dos CFC e a pega à temperatura corpórea, o que evita a necrose dos tecidos adjacentes ao implante, como

pode ocorrer com os cimentos poliméricos à base de Poli Metil Metacrilato (PMMA), cuja temperatura de pega pode atingir até 90°C.

O uso de pós nanométricos e nanoestruturados vem trazendo grandes vantagens em diversos campos da ciência, principalmente no campo dos materiais, no qual o uso de nanopartículas vem permitindo a obtenção de materiais com novas e melhores propriedades do que materiais sintetizados com o uso de partículas de tamanho maior.

O método de síntese de combustão em solução permite a obtenção de pós nanométricos com elevado grau de pureza de maneira rápida e com baixo custo de produção. Tal método vem sendo utilizado para a síntese de pós nanométricos de diversos óxidos complexo com aplicação em catálise, células de combustível e biomateriais.

Com objetivos similares aos biomateriais, a Engenharia de Tecidos (ET) consiste no desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos, ou órgãos crescidos em laboratório para substituir ou apoiar a função de partes de corpo defeituosas ou danificadas. Ela é um campo interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e ciências biológicas para desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter e melhorar as funções dos tecidos. Embora células tenham sido cultivadas, ou crescidas, fora do corpo por muitos anos, a possibilidade de crescer tecidos tridimensionais complexos, literalmente reproduzindo a forma e função do tecido humano, é um desenvolvimento recente. A engenharia de tecidos tem a intenção de cultivar virtualmente todo tipo de tecido humano - fígado, osso, músculo, cartilagem, vasos sanguíneos, músculos do coração, nervos, pâncreas, e outros.

Um componente chave na engenharia do tecido para a regeneração de tecidos é o arcabouço que serve como um molde para interações celulares e a formação da matriz extracelular para fornecer a sustentação estrutural ao novo tecido formado. Os arcabouços para a formação de tecidos devem atender a determinados critérios para servir a esta função, incluindo as propriedades mecânicas adequadas àquelas do local, além de biocompatibilidade e uma biodegradabilidade a uma taxa proporcional com a remodelagem. Os arcabouços servem como estruturas condutivas, desde que o novo tecido seja formado pelo crescimento do tecido vivo adjacente.

Hidrogéis são estruturas poliméricas entrecruzadas e que incham em água e que contém ligações covalentes produzidas pela simples reação de um ou mais monômeros, entrecruzamentos físicos pela formação de entrelaçamentos e pontes de hidrogênio ou fortes interações do tipo van der Waals pela interação de duas ou mais cadeias macromoleculares. Tais materiais possuem grande potencial de aplicação como arcabouços em engenharia de

tecidos, sendo que a adição de fosfatos de cálcio pode aumentar significativamente a biocompatibilidade dos sistemas poliméricos, principalmente para aplicações como substitutos ósseos.

A utilização de hidrogéis poliméricos reforçados com fosfato de cálcio é dessa forma, de fundamental importância no campo de engenharia de tecidos, por apresentar a biodegradabilidade e capacidade de incorporação de fármacos provida pela matriz polimérica e a boa biocompatibilidade e capacidade de osteocondução dos fosfatos de cálcio. Entretanto, a maioria das pesquisas com hidrogéis visa à obtenção de nanopartículas para a liberação controlada de fármacos, sendo pequena a quantidade de trabalhos desenvolvidos visando à produção de arcabouços com aplicação em engenharia de tecidos. Além disso, o desenvolvimento deste tipo de material é de essencial importância para o desenvolvimento técnico e científico do país.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é a síntese da fase α -fosfato tricálcico nanoestruturado através do método de síntese de combustão em solução, ainda não estudado para a sua obtenção, e a sua utilização em cimentos de fosfato de cálcio com aplicações de substituto ósseo e como carga cerâmica em criogéis poliméricos. Pretende-se com o uso do pó nanoestruturado um aumento das propriedades mecânicas do cimento e aumento das propriedades de biocompatibilidade dos criogéis para aplicação como arcabouço em engenharia de tecidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

A primeira definição amplamente aceita de biomateriais é a da Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982, a qual diz que se entende por biomaterial “Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregada como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais” (WILLIAMS, 1987, p.72). Isto significa que no sentido mais amplo são enquadrados nesta categoria todos os materiais empregados na medicina, odontologia, medicina veterinária e farmacologia, além daqueles que entram na forma de implantes em contato direto com o tecido do corpo. Recentemente, o mesmo autor publicou uma nova e mais complexa definição: “Um biomaterial é uma substância que foi projetada para assumir uma forma, a qual sozinha ou como parte de um sistema complexo é usado para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento diagnóstico ou terapêutico, em medicina veterinária ou humana” (WILLIAMS, 1987, p. 72).

Embora os biomateriais sejam primariamente utilizados para aplicações biomédicas, eles também são utilizados para o crescimento de células em cultura, para ensaiar proteínas do sangue em laboratório clínico, em equipamentos para processar biomoléculas visando aplicações de biotecnologia, para implantes que regulem a fertilidade em gado, para seleção de genes, na aqüicultura de ostras, e na pesquisa de biochips de silício (RATNER, 2004).

Inúmeros fatores devem ser examinados antes que um material possa ser utilizado como implante. Uma das primeiras etapas de avaliação do material biomédico é a avaliação biológica *in vitro* e um dos primeiros testes é o da citotoxicidade, onde o biomaterial é colocado em contato com células de mamíferos de uma maneira direta ou indireta. Observa-se o nível de letalidade das células que define se o material é ou não citotóxico. A seguir, testes *in vivo* se fazem necessários, para a avaliação do material em termos de biocompatibilidade, definida como a resposta do meio fisiológico ao corpo implantado. Uma etapa posterior verifica a adequação do material em exercer a função pré-estabelecida à qual o implante foi destinado, determinando sua biofuncionalidade. Testes mais prolongados podem ainda revelar se há chances de respostas carcinogênicas ao longo dos anos (SEPÚLVEDA et al., 1999).

Como característica imprescindível, estes materiais devem ser biocompatíveis, ou seja, devem atender ao requisito de biofuncionabilidade (VALLET-REGÍ et al., 1997) para o qual foram projetados, não estimulando ou provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias. De acordo com os conceitos de biofuncionalidade é importante que o implante permita o desempenho imediato e com êxito da função específica (estática e dinâmica) da parte do corpo que está sendo substituída. Neste conceito estão incorporados também, os problemas associados à degradação química dos materiais, visto que o meio fisiológico pode ser bastante agressivo, mesmo aos materiais considerados extremamente inertes quimicamente, levando a redução da eficiência do implante (HENCH; WILSON, 1999).

Biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar prejuízo ao organismo a curto e longo prazo. Para que um material seja aceito clinicamente como um material de implante, ele precisa atender a alguns requisitos fundamentais:

- O material deve ser biocompatível, ou seja, sua presença não deve causar efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico;
- Os tecidos não devem causar a degradação do material, como, por exemplo, corrosão em metais, ou pelo menos de forma tolerável;
- O material deve ser biofuncional, ou seja, deve ter as características mecânicas adequadas para cumprir a função desejada, pelo tempo desejado;
- O material deve ser esterilizável.

3.2. Classificação dos Biomateriais

Nenhum material de implante é sempre inerte, quando em contato com os fluidos corpóreos, sendo que todos causam um tipo de resposta no tecido hospedeiro. Assim os biomateriais podem ser classificados de acordo com seu comportamento em meio fisiológico em (HENCH; WILSON, 1999):

Biotoleráveis: materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Atinge-se assim, no máximo, a chamada “osteoproximação” a distância, provavelmente induzida pela liberação por parte do material de componentes (p. ex. monômeros, íons, produtos de corrosão) que se alojam no tecido hospedeiro. A espessura desta camada, assim como sua composição, depende do tipo de material empregado. Quanto maior a espessura da camada de tecido

fibroso formado, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos, como o Polietileno de Alta Densidade (PEAD) utilizado na cabeça de próteses femorais, assim como a grande maioria dos metais.

Bioinertes: materiais também tolerados pelo organismo, mas a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou, mais realisticamente, o faz em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima. A resposta fagocitária será passageira e uma fina cápsula tomará lugar após o implante. Em alguns casos, esta camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono.

Bioativos: materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração), em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea. O colágeno e a fase mineral do osso adjacente são depositados diretamente sobre a superfície do material do implante, dando origem a uma ligação resistente à tração entre o material bioativo e o osso. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.

Reabsorvíveis: materiais que após certo período de tempo em contato com os tecidos acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos destes materiais são: o fosfato tricálcico (TCP) e o poli (ácido lático).

Outra classificação dos biomateriais é dada por (VALLET-REGÍ et al., 1997):

Biomédicos: a qual considera todos os materiais, biocompatíveis, de origem artificial.

Biológicos: a qual considera todos os materiais, biocompatíveis, de origem natural.

3.3 Aplicações dos Biomateriais

Metais, cerâmicas, polímeros e compósitos são materiais comumente utilizados em cirurgias reconstrutivas de ossos danificados em várias regiões do corpo. A Figura 3.1 mostra algumas aplicações típicas dos biomateriais.

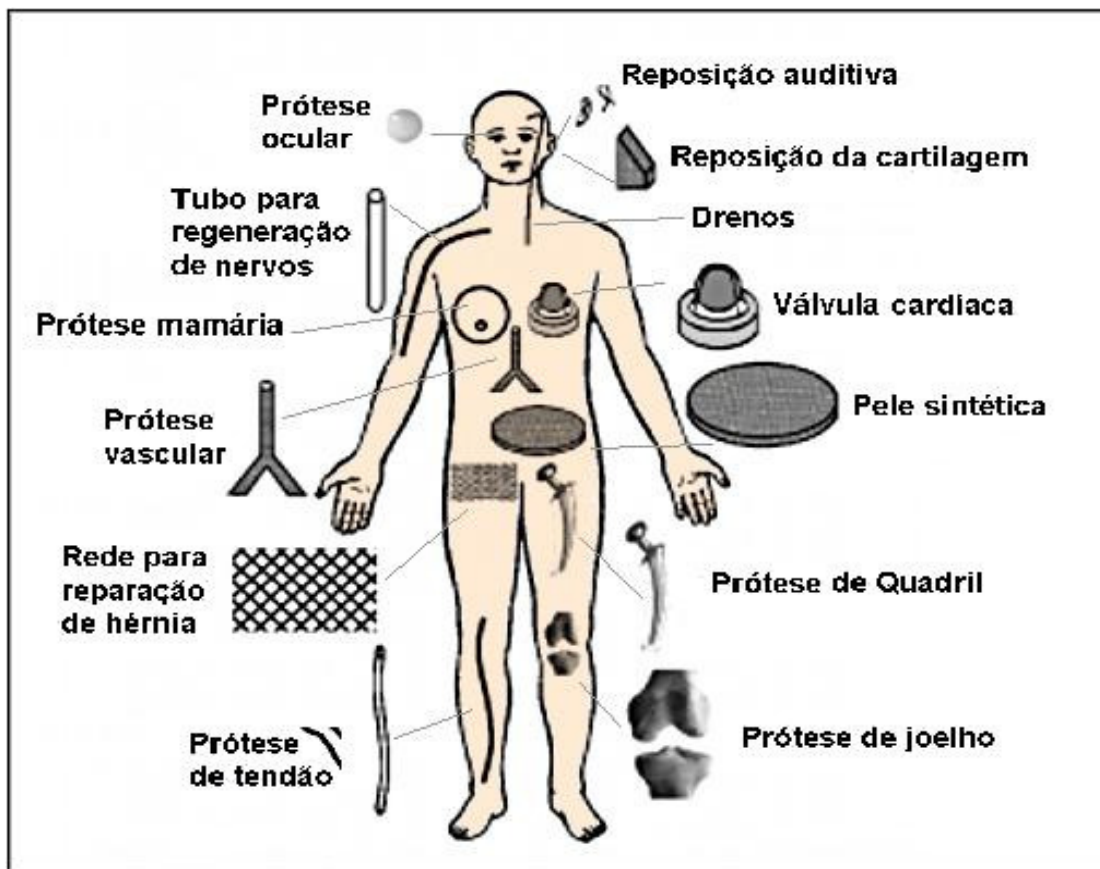


Figura 3.1 – Aplicação dos biomateriais (ROZIAK et al., 1999).

Os metais são muitas vezes preferidos por suas melhores propriedades mecânicas (resistência à fratura, tenacidade) e sua melhor trabalhabilidade, o que os tornam mais adequados para aplicações estruturais como discos, pinos, parafusos, suturas, placas ósseas, próteses de substituição total de quadril e joelho (GIL et al., 2004). Quando colocados em contato com o meio fisiológico, a maioria dos metais sucumbe devido à sua alta reatividade e troca iônica com os fluidos corpóreos, por essa razão os metais mais utilizados são o aço inox, cromo-cobalto e titânio. O sucesso e o tempo de vida e o sucesso de um implante está intimamente ligado com a formação de uma forte ligação com o osso. (LEON; JANSEN, 2009). Muitos esforços vêm sendo tomados para melhorar a atividade superficial do metal, visando para promover a ligação da superfície do metal com biomoléculas. E a textura do implante também é importante para promover reações celulares em sua superfície (RATNER et al., 2004). Visando combinar as boas propriedades mecânicas dos metais com a inegualável capacidade de ligação com os tecidos ósseos inerente aos fosfatos de cálcio, foram desenvolvidos processos de recobrimento de metais, especialmente com hidroxiapatita (LEON; JASEN, 2009).

Cerâmicas bioativas como hidroxiapatita, têm sido largamente empregadas na expansão do suporte alveolar de mandíbulas e maxilares atrofiados e/ou pequenos defeitos de contorno em ossos faciais (CARTER; NORTON, 2007). Os materiais absorvíveis (p.ex. fosfato tricálcico), por outro lado, não podem ser empregados para revestimentos, pois degradam após um curto período de tempo, normalmente antes de serem substituídos por material fisiológico. Adicionalmente à instabilidade mecânica, se usado para evitar o contato metal/meio fisiológico, o problema, obviamente, persistiria (CARTER; NORTON, 2007; HENCH, 1999; RATNER et al., 2004).

A partir do final dos anos 70 tem se utilizado granulados à base de hidroxiapatita e fosfato tricálcico como carga de preenchimento (ao menos, temporárias) para cavidades ósseas ou no tratamento de doenças ósseas de efeito desmineralizante (como p.ex. osteoporose) (CARTER; NORTON, 2007). Ainda na classe dos materiais bioativos, a nova geração de vidros, definidos como biológicos tem mostrado resultados bastante promissores na restauração de defeitos, além de em algumas aplicações específicas como, por exemplo, o recobrimento de substratos metálicos (CARTER; NORTON, 2007; HENCH, 1999; RATNER et al., 2004).

Além disso, colágeno, polímeros (como poliuretanas, borrachas à base de silicone, poli (metil-metacrilato), poli (tetrafluor-etileno), entre outros e compósitos à base de polímeros vêm sendo cada vez mais utilizados em regiões onde atuam esforços mecânicos reduzidos, como nos preenchimento de contornos de ossos. Mais recentemente, o biomaterial colágeno vem despertando grandes expectativas, cujo potencial está sendo investigado, em especial, em combinação com hidroxiapatita ou vidro bioativo para aplicações que visam à restauração de pequenos defeitos em ossos faciais (ABRAHAM, 2004; RATNER et al., 2004; SAN ROMÁN et al., 2004).

3.4. Biocerâmicas

Cerâmicas, vidros e vitro-cerâmicas fazem parte de um largo espectro de materiais de composição inorgânica/não-metálicos. Na indústria médica, esses materiais vêm sendo utilizados essencialmente como óculos, instrumentos de diagnósticos, vidraria de laboratório, termômetros, frascos de culturas tissulares e fibras óticas para endoscopia (RATNER et al., 2004). A grande inércia química das cerâmicas, sua alta resistência à compressão e sua

aparência estética fizeram com que estes materiais fossem utilizados na odontologia, principalmente em coroas dentárias (DE AZA, 2004).

As cerâmicas utilizadas como biomateriais são consideradas biocompatíveis e frágeis. Em alguns casos, são duras, com excelente resistência à compressão, alta resistência ao desgaste e pequeno coeficiente de atrito, o que é interessante para aplicação em articulações - principalmente no caso de próteses de quadril. Este baixo coeficiente de atrito está relacionado ao fato de que cerâmicas à base de óxidos são hidrofílicas e podem ser altamente polidas, o que as permite suportar altos carregamentos, seja em contato consigo mesmo ou com materiais poliméricos em meios fisiológicos (BEN-NISSAN, 2003).

Em termos gerais, as biocerâmicas podem ser classificadas como bioinertes ou bioativas (VALLET-REGÍ et al., 2004). Porém, a Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais não considera o termo bioinerte adequado, pois quando um material é posto em contato com o corpo humano, induz algum tipo de resposta, mesmo que mínima (KAWACHI, 2000). No entanto, o termo ainda é comumente utilizado por diversos autores, e sua definição mais aceita é de um material que apresenta uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, pela formação de uma cápsula fibrosa ao redor do material. Já uma biocerâmica bioativa, termo bem aceito na comunidade científica, é conceituada como aquela que induz uma determinada atividade biológica por parte do tecido hospedeiro frente à presença do material.

A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a 1892, quando Dressman relatou o uso de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$) como um possível substituto para ossos, além de servir para o preenchimento de cavidades ósseas. Como este material possui uma resistência mecânica muito baixa, além de ser completamente reabsorvido pelo organismo, ocorre uma rápida fragmentação e degradação. Devido a estas propriedades pouco atrativas, a utilização do gesso como biocerâmica implantável foi praticamente excluída.

A primeira biocerâmica que teve um uso intenso foi a alumina, a qual é considerada bioinerte. Além da alumina, outras cerâmicas como a zircônia, o dióxido de titânio, os fosfatos de cálcio e as vitrocerâmicas de sílica/fosfato de cálcio, apresentam uso muito difundido atualmente.

As biocerâmicas podem ser produzidas em uma variedade de formas e fases e podem cumprir diferentes papéis na reparação do corpo. Em muitas aplicações as biocerâmicas são utilizadas na forma de materiais densos com um formato específico. Também são utilizadas para preencher espaço enquanto ocorre o processo natural de recuperação do organismo. Em

outras situações as biocerâmicas são utilizadas como revestimento sobre um substrato, ou como segunda fase em um compósito, combinando as características dos dois materiais para a formação de um novo com melhores propriedades mecânicas e químicas.

As biocerâmicas podem ser utilizadas em diferentes estados cristalinos. Elas podem ser monocristais (safira), policristalino (alumina e HA), vidros (Bioglass®), vitrocerâmicas (A/W vitrocerâmicas) ou compósitos (polietileno – HA). A escolha da fase depende da aplicação. Por exemplo, safira monocristalina é usada como implante por causa da sua grande resistência. Os biovidros possuem baixa resistência mecânica, mas se ligam rapidamente ao osso, portanto são utilizados como enxerto para preencher defeitos ósseos.

3.4.1. Tipos de Ligação de Tecidos com Biocerâmicas

O mecanismo de ligação do tecido com o implante é diretamente relacionado com a resposta da interface entre o tecido e o implante. Existem quatro tipos de biocerâmicas, com diferentes tipos de ligação com o tecido, os quais estão resumidos na Tabela 3.1 (RATNER et al., 2004).

Tabela 3.1. Tipos de biocerâmicas e seus tipos de ligação.

Tipo de Implante	Tipo de Ligação	Exemplo
Inerte	Bloqueio mecânico (fixação morfológica)	Alumina e Zircônia
Poroso	O tecido penetra nos poros (fixação biológica)	Alumina, HA e recobrimento de HA sobre metais porosos
Bioativo	Ligação química com os tecidos (fixação bioativa)	Biovidros, vitrocerâmicas e HA
Reabsorvível	Substituída por tecido	Fosfato tricálcio e biovidros

Uma comparação da atividade química relativa entre diferentes biocerâmicas é mostrada na Figura 3.2.

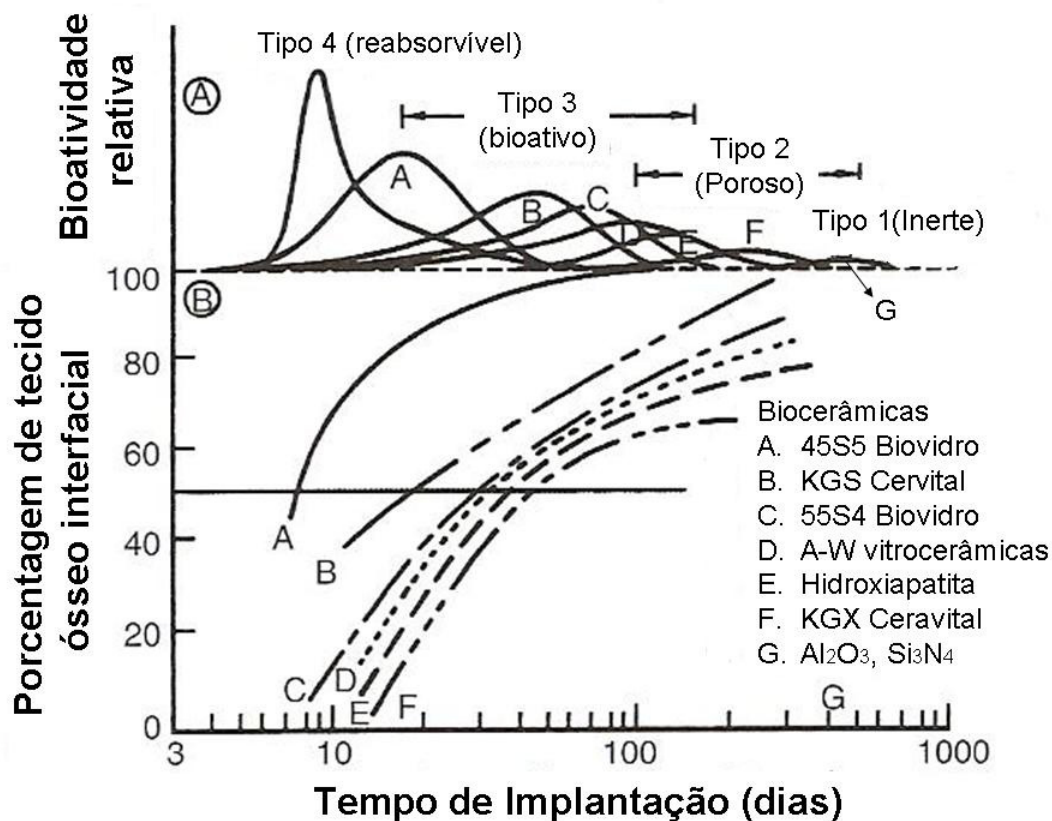


Figura 3.2. Espectro da bioatividade de vários implantes biocerâmicos: (A) Taxa relativa de bioatividade, (B) Tempo de formação de ligação óssea na superfície do implante. (RATNER et al., 2004).

Implantes inertes formam uma camada fibrosa superficial não aderente na interface. Estes tipos de implantes só são bem sucedidos quando são bem firmados, não permitindo que ocorram movimentos na interface. Quando isto não ocorre, a cápsula fibrosa pode ter centenas de micrômetros de espessura e o implante afrouxa rapidamente. O afrouxamento leva invariavelmente à falha clínica ou pela fratura do implante ou pela fratura do osso adjacente (RATNER et al., 2004).

Os implantes porosos foram desenvolvidos para prevenir o afrouxamento. O crescimento de tecido ósseo para dentro dos poros provê uma grande área superficial entre o implante e o seu hospedeiro. Este método de fixação é conhecido como “fixação biológica”, que é capaz de suportar cargas bem maiores do que implantes fixados morfologicamente.

Os implantes porosos precisam de um tamanho de poros mínimo de pelo menos 100 µm para que ocorra a vascularização que permitirá o crescimento dos tecidos conectivos. Sem irrigação sanguínea e nutrição o osso irá morrer. Se ocorrerem micro movimentos na

superfície do implante poroso, os vasos podem ser rompidos levando a morte do tecido, inflamação e destruição da estabilidade superficial (RATNER et al., 2004).

Implantes reabsorvíveis são projetados para se degradar gradativamente com o tempo, sendo substituídos por tecidos naturais. Uma camada muito fina ou praticamente inexistente é necessária para resolver os problemas de estabilidade superficial. O cumprimento de tais condições pode levar à regeneração dos tecidos ao invés da sua substituição. A taxa de reabsorção deve ser combinada com a taxa de reparação dos tecidos. Alguns materiais dissolvem muito rápido, enquanto outros muito devagar. Alguns exemplos de implantes reabsorvíveis são as cerâmicas de fosfato tricálcico (TCP) que se degradam em cálcio e sais de fosfatos e podem ser utilizados para preencher espaços do osso.

Implantes bioativos apresentam outro tipo de fixação superficial. O conceito de fixação bioativa é intermediária entre o comportamento reabsorvível e o bioinerte. Um material bioativo leva a reações químicas no corpo, mas somente na superfície. As reações superficiais são a ligação dos tecidos com a interface. Então, um material bioativo pode ser definido como: “um material que permite uma resposta biológica específica na interface do material que resulta na formação de ligações químicas entre os tecidos e o material.” Entre eles estão os biovidros, vitro-cerâmicas e hidroxiapatita. A dependência do tempo de formação da ligação com o osso, o mecanismo de ligação, a espessura da camada de ligação e a resistência da ligação varia de acordo com o material (RATNER et al., 2004).

Uma característica em comum de todos os implantes bioativos é a formação de uma camada de hidroxicarbonato apatita (HCA) na superfície quando implantado. A fase HCA é equivalente em composição e em estrutura à fase mineral do osso. As camadas de HCA crescem como aglomerados policristalinos na superfície do implante. Fibrilas de colágeno são incorporadas aos aglomerados ligando o implante inorgânico com a matriz orgânica dos tecidos. Então, a interface entre o osso e o implante bioativo é praticamente idêntica à ligação natural entre ossos e tendões e ligamentos (RATNER et al., 2004).

3.4.2. Ortofosfatos de Cálcio

Representam a parte inorgânica dos dentes e tecidos ósseos. Devido a sua grande semelhança química com o tecido ósseo, vários ortofosfatos de cálcio possuem ótima biocompatibilidade e bioatividade, o que possibilita seu emprego na produção de implantes

monolíticos, porosos ou no revestimento superficial de outros materiais, como metais (DOROZHKIN, 2009).

Pode-se notar por meio da Tabela 3.2. que o fosfato tricálcico é o composto que apresenta relação Ca/P mais similar à hidroxiapatita, demonstrando-se como constituinte mais provável de aceitação na resposta biológica.

O fosfato tricálcico é solúvel em soluções ácidas, enquanto que em soluções alcalinas ele se apresenta insolúvel. Além disso, a solubilidade do fosfato tricálcico modifica-se na presença de aminoácidos, proteínas, enzimas e outros compostos orgânicos. Contudo, sua taxa de solubilidade depende diretamente da forma, porosidade, cristalinidade, etc.

Tabela 3.2. Compostos de fosfato de cálcio avaliados biologicamente (RATNER et al., 2004).

Composto	Sigla	Fórmula Química	Ca/P	Resposta Biológica
Metafosfato de cálcio	CMP	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5	Forte atividade macrofágica
Pirofosfato de cálcio	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0	Forte atividade macrofágica
Fosfato dicálcico anidro	DCP	CaHPO_4	1,0	Fraca atividade macrofágica
Fosfato dicálcico dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	Fraca atividade macrofágica
Fosfato tricálcico	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	Reabsorvível
Fosfato tetracálcico	TeCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$	2,0	Sem relevância clínica
Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	Reabsorvível
Oxiapatita	OHA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6$	1,67	Reabsorvível
Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	Ativo biologicamente

3.4.3. Fosfato de Calcio Amorfo

ACP (fosfato de cálcio amorfo, $[\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}]$, $n = 3-4.5$; 15-20% H_2O) é frequentemente encontrado como uma fase de transição na formação de ortofosfatos de cálcio em sistemas aquosos. Usualmente, o ACP é a primeira fase a precipitar da solução supersaturada preparada pela rápida mistura de soluções contendo íons de cálcio e ortofosfato.

Acredita-se que o ACP seja formado no início da precipitação, devido a sua menor energia superficial, quando comparado com OCP (fosfato octocálcico) e apatitas. O percentual da fase amorfa do ACP aumenta com o aumento da concentração na solução de Ca^+ e PO_4^{-3} , assim como com o pH da solução para uma menor temperatura de cristalização (DOROZHKIN, 2009).

Como todos os compostos amorfos são caracterizados pela falta de ordem a longo alcance, a discussão sobre a estrutura cristalina do ACP torna-se problemática. Com relação à ordem a curto alcance, é também uma incerteza, pois depende das condições de preparação, armazenamento, etc. É bem conhecido que o ACP contém de 10 a 20 % em massa de água presente com uma ligação forte, a qual é removida com secagem a vácuo a temperaturas elevadas. Por outro lado, foi proposto que a unidade estrutural básica do ACP é um *cluster* de íons com a composição $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, de formato esférico apresentando um diâmetro de 9.5 Å (Figura 3.3). Estes *clusters* foram encontrados experimentalmente como os primeiros núcleos durante a precipitação de HA e um modelo foi desenvolvido para descrever a cristalização de HA, que acontece pela união destes clusters (DOROZHKIN, 2009).

Biologicamente, o ACP (frequentemente contendo íons de Na^+ , Mg^+ , carbonato e pirofosfato) é encontrado em calcificações patogênicas em tecidos moles (e.g., calcificações de válvulas do coração em pacientes). Na medicina, o ACP puro é usado em cimentos de ortofosfato de cálcio e como material de enchimento na odontologia. Compósitos bioativos de ACP com polímeros têm propriedades desejadas para o uso em odontologia e cirurgia, devido a sua razoável solubilidade e pH fisiológico em soluções aquosas (DOROZHKIN, 2009).

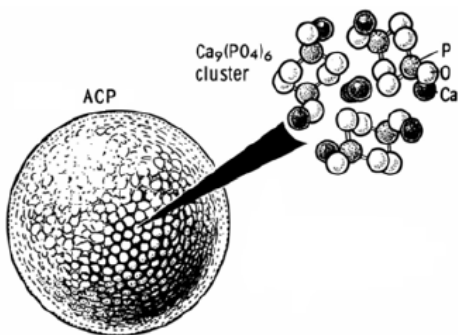


Figura 3.3. Modelo da estrutura do fosfato de cálcio amorfo (ACP) (POSNER, 1980).

3.4.4. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, componente majoritário (cerca de 95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos, sua razão Ca/P é 1,67. A hidroxiapatita é o material utilizado pelos vertebrados para compor o esqueleto, devido à sua capacidade de atuar como reserva de cálcio e fósforo. A palavra hidroxiapatita é formada pela junção das palavras *hidroxi* e *apatita*. Hidroxi refere-se ao grupo hidroxila (OH) e apatita ao nome do mineral de fosfato de cálcio (AOKI, 1991).

“Apatita” é um termo geral para minerais cristalinos com a composição de $A_{10}(BO_4)_6X_2$. Muitos elementos ocupam as posições A, B e X. Abaixo são apresentados alguns exemplos (CARTER et al., 2007).

A = Ca, Sr, Ba, Cd, Pb;

B = P, V, As, S, Si, Ge, CO₃;

X = F, Cl, OH, O, Br, CO₃;

Minerais naturais de compostos de apatita são encontrados em rochas ígneas (especialmente pegmatitas) e em rochas de cálcio metamórfico, já as apatitas biológicas são encontradas em ossos e dentes de vertebrados (AOKI, 1991). As apatitas biológicas, que são denominadas de hidroxiapatita-cálcio, diferem da hidroxiapatita pura na estequiometria, composição e outras propriedades físicas e mecânicas. As hidroxiapatitas puras ou estequiométricas não estão presentes em sistemas biológicos. As hidroxiapatitas biológicas têm sido descritas como apatitas deficientes de cálcio, não estequiométricas, impuras, ou apatitas contendo carbonatos. Apatitas deficientes de cálcio sintéticas não são encontradas em sistemas biológicos.

A estrutura da hidroxiapatita pertence ao sistema hexagonal, grupo espacial $P6_3/m$ (caracterizado por um eixo C de 6 unidades perpendiculares a 3 eixos equivalentes mantendo um triângulo de 120°), com dimensões de célula cristalina de $a = 9,423$ e $c = 6,875 \text{ \AA}$. Esses valores das dimensões de célula unitária valem para hidroxiapatita mineral ou hidroxiapatita pura preparada por reação em estado sólido ou precipitação e sinterização a 1100°C. A célula unitária de hidroxiapatita tem seis grupos PO_4^{-3} , cinco grupos Ca^{+2} e dois grupos OH^- (LE GEROS, 1991; CARTER et al., 2007). A estrutura cristalina da hidroxiapatita é mostrada na Figura 3.4.

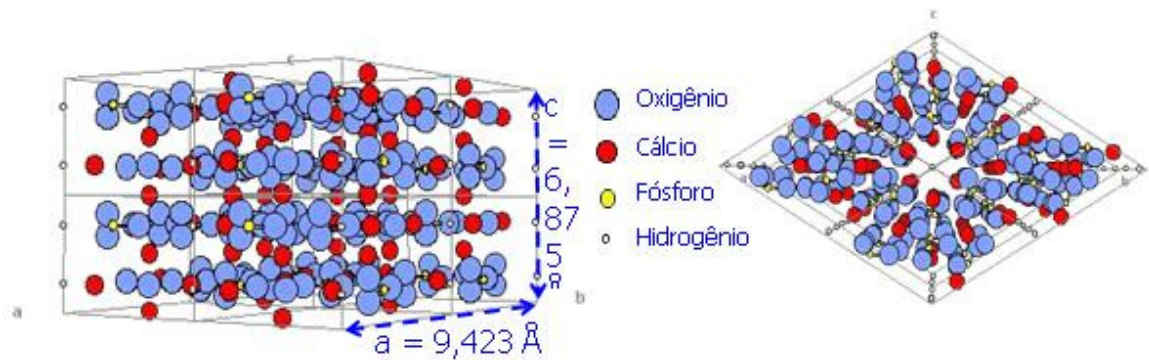


Figura 3.4. Estrutura cristalina da hidroxiapatita (AOKI, 1991).

A hidroxiapatita é solúvel em soluções ácidas, enquanto que em soluções alcalinas ela se apresenta insolúvel, e fracamente solúvel em água destilada. Porém, a solubilidade da hidroxiapatita em água destilada aumenta com a adição de eletrólitos. Além disso, a solubilidade da hidroxiapatita modifica-se na presença de aminoácidos, proteínas, enzimas e outros compostos orgânicos. A solubilidade da hidroxiapatita sintética é extremamente baixa, sendo que para hidroxiapatita sinterizada a taxa de solubilidade em tecido subcutâneo é cerca de 0,1 mg/ano. Contudo, a taxa de solubilidade depende diretamente da forma, porosidade, cristalinidade. Através dos diferentes métodos de preparo, pode-se obter hidroxiapatita desde praticamente absorvível até não absorvível em meios fisiológicos (AOKI, 1991). É importante ressaltar que a solubilidade da hidroxiapatita não cristalina – deficiente de cálcio - é menor que a hidroxiapatita pura – estequiométrica.

A hidroxiapatita pura nunca ocorre em sistemas biológicos, entretanto devido à similaridade química da hidroxiapatita com a fase mineral dos tecidos ósseos, a hidroxiapatita é um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos, favorecendo o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondutor), estabelecendo ligações de natureza química com o tecido ósseo, permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, sendo que as células não distinguem entre a hidroxiapatita e a superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial. (AOKI, 1991; DOROZHKIN, 2007). Na Figura 3.5., são mostrados os padrões de difração da hidroxiapatita e vários outros tipos de apatita incluindo, o osso humano e esmalte.

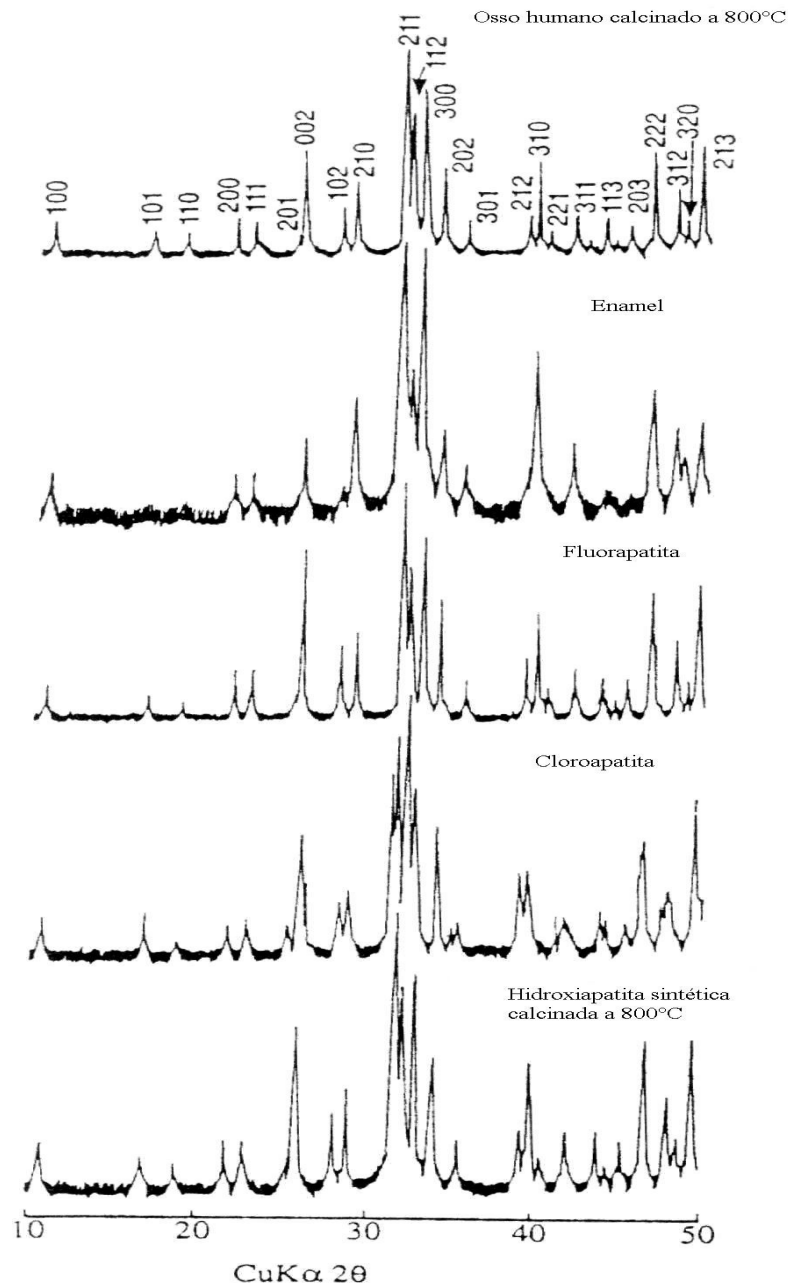


Figura 3.5. Padrão de difração da hidroxiapatita (AOKI, 1991).

A superfície da hidroxiapatita permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo que moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície induzindo, assim, a regeneração tecidual. As principais aplicações da hidroxiapatita são reparos de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas, aumento de rebordo alveolar, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução bucomaxilofacial, equipamentos percutâneos, reparo e substituição de paredes orbitais, substituição do globo ocular e extensivamente no

recobrimento de implantes metálicos (AOKI, 1991; DOROZHKIN, 2007).

3.4.4. β -Fosfato Tricálcico

O β -TCP (β -fosfato tricálcico, $[\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$); o nome quimicamente correto é beta-fosfato de cálcio tribásico) não pode ser precipitado de soluções aquosas. É uma fase de alta temperatura, que só pode ser preparada a temperaturas superiores a 800°C pela decomposição térmica de CDHA (hidroxiapatita deficiente em cálcio) ou pela reação em estado sólido de ortofosfatos de cálcio ácidos, e.g., DCPA (fosfato dicálcico não hidratado), com uma base, e.g., CaO. Além das rotas de preparação química, β -TCP substituído ionicamente pode ser preparado pela calcinação de ossos: este tipo de β -TCP é ocasionalmente chamado de "cinza de osso". No β -TCP existem três grupos PO_4^{3-} cristalograficamente não equivalentes localizados em pontos do cristal, cada tipo com diferente comprimento de ligação intratetraedral e ângulo (DOROZHKIN, 2009).

A temperaturas superiores a 1125°C, o β -TCP se transforma na fase de alta temperatura α -TCP. Sendo a fase estável a temperatura ambiente, o β -TCP é menos solúvel em água que o α -TCP. Assim, a estrutura ideal de β -TCP contém vacâncias estruturais de cálcio que são pequenas demais para acomodar íons de cálcio, mas possibilitam a inclusão de íons magnésio, que desta maneira estabilizam a estrutura. O β -TCP puro nunca ocorre em calcificações biológicas. Só a forma com substituições de Mg, (β -TCMP – β -fosfato tricálcico de magnésio, $\beta\text{-(Ca,Mg)}_3(\text{PO}_4)_2$), é encontrada em pedras urinárias, caries dentais, cartilagem artrítica, assim como em alguns depósitos de tecidos moles. Porém, não foi observado em esmalte, dentina ou osso (DOROZHKIN, 2009).

Na biomedicina, o β -TCP é usado em cimentos de ortofosfatos de cálcio. Em combinação com HA, o β -TCP forma um fosfato de cálcio bifásico (BCP). Ambos BCP e β -TCP são amplamente utilizados como biocerâmicas para substituição óssea (DOROZHKIN, 2009).

3.4.5 α -Fosfato Tricálcico

α -TCP (α -fosfato tricálcico, $(\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$); o nome quimicamente correto é alfa-fosfato tricálcico tribásico). Conforme o diagrama de fases da Figura 3.6, no cimento de fosfato tricálcico a fase estável a baixa temperatura é o β -TCP, que, a 1125°C, se transforma

em α -TCP. Esta última fase é estável até 1430°C, quando se transforma em α' -TCP, estável até a temperatura de fusão. A transformação β -TCP em α -TCP é lenta e reversível, o que exige, para a obtenção do α -TCP de maior pureza, a utilização de tempos de patamar elevados a temperaturas superiores a 1200°C, visando assegurar a máxima conversão, e resfriamento brusco para preservar a fase α -TCP à temperatura ambiente.

Embora o β -TCP e o α -TCP tenham exatamente a mesma composição química, eles diferem na estrutura cristalina e solubilidade. A fase β -TCP é mais estável que a fase α -TCP. Assim, o α -TCP é mais reativo em sistemas aquosos, tem maior energia específica e pode ser hidrolisado a uma mistura de outros fosfatos de cálcio (DOROZHKIN, 2009). O α -TCP nunca ocorre em calcificações biológicas, mas é utilizado, na medicina, em cimentos de fosfato de cálcio (CFC). A desvantagem da utilização do α -TCP é a sua rápida velocidade de reabsorção, a qual limita a sua aplicação em esta área. (DOROZHKIN, 2009).

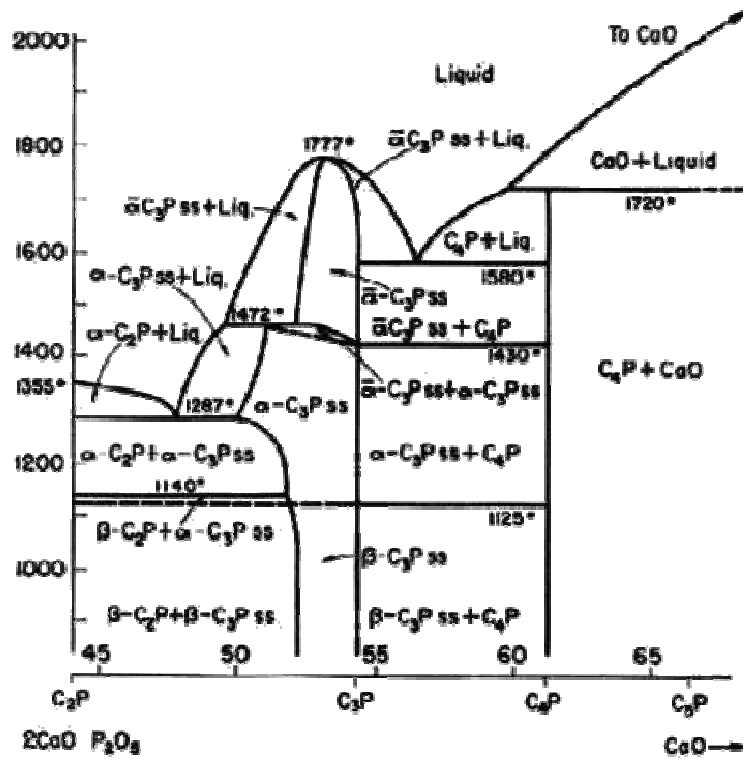


Figura 3.6. Representação do diagrama de fases do sistema $2\text{CaO.P}_2\text{O}_5$ e CaO (Phase diagrams for ceramists, 1984).

3.5. Materiais Cimentícios

3.5.1. Cimento Hidráulico Convencional

Um cimento hidráulico pode ser definido como um material que tem o seguinte comportamento: o componente sólido pode formar uma pasta plástica quando misturado com água ou uma solução aquosa, e ao mesmo tempo resiste a esses líquidos. A pasta perde a sua plasticidade após um tempo, sua resistência mecânica aumenta progressivamente, alcançando seu valor máximo depois de um período de tempo que pode ser de horas a dias. O cimento Portland é um exemplo típico desta classe. O gesso, mesmo endurecendo quando misturado com água, não pertence a essa classe devido à sua não-resistência à ação prolongada nesse líquido, no qual é solúvel.

A pega e endurecimento são resultados de uma reação química que pode ser de dissolução, precipitação ou hidrólise (NEVILLE, 1997). A pega é identificada como certo estágio coloidal durante o desenvolvimento de uma rede cristalina, inicialmente fraca e tixotrópica, enquanto o processo de endurecimento denota o desenvolvimento de uma estrutura cristalina mais forte e irreversível. Esta teoria geral segue ao princípio postulado por Le Chatelier (RUSSELL, 1981) que atribui o endurecimento à cristalização, mas a introdução do conceito de um estágio coloidal inicial tem o mérito de proporcionar explicações de uma variedade de fenômenos associados à medição e pega de cimentos. O tempo durante o qual a pasta de cimento se comporta eminentemente em forma tixotrópica, denominado tempo de pega, está estritamente relacionado ao tempo de trabalho, isto é, ao tempo disponível para se preparar a fazer a colocação definitiva do cimento. O método utilizado para se medir esse tempo de pega, considerado como o tempo a partir do qual a agulha do aparelho usado não penetra completamente a massa do cimento, é realizado por um aparelho denominado Vicat (NEVILLE, 1997).

Os fatores que afetam as propriedades dos cimentos, tais como sua plasticidade inicial, tempo de pega ou resistência mecânica, são (NEVILLE, 1997):

- composição;
- tamanho de partícula;
- relação pó/líquido;
- temperatura.

3.5.2 Cimento Portland

Basicamente, o cimento Portland é formado por determinados componentes anidros que ao entrarem em contato com a água, reagem com a mesma, formando produtos hidratados cujas reações são a origem do processo de endurecimento (PETRUCCI, 1987). Desta forma, a pasta endurecida é formada pelos produtos hidratados dos diversos componentes, geralmente cristais de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), alguns compostos menores, cimento não-hidratado e por espaços residuais cheios de água na pasta fresca.

Os vazios são conhecidos como poros capilares, mas no interior do gel existem vazios intersticiais, denominados poros de gel. Genericamente, o diâmetro nominal dos poros de gel tem ordem de grandeza de milímetros, enquanto que os poros capilares são uma ou duas ordens de grandeza menores.

O cimento Portland anidro resulta da moagem do clínquer com uma pequena quantidade de sulfato de cálcio. O clínquer é uma mistura heterogênea de vários minerais produzidos em reações a altas temperaturas, entre óxido de cálcio e sílica, alumina e óxido de ferro (MEHTA; MONTEIRO, 1994).

Quando o cimento é disperso em água, o sulfato de cálcio e os compostos de cálcio formados a altas temperaturas tendem a entrar em solução, e a fase líquida torna-se rapidamente saturada em várias espécies iônicas. Após alguns minutos de hidratação do cimento Portland, as reações entre o cálcio, o sulfato, o aluminado e os íons hidroxila resultam no aparecimento dos primeiros cristais aciculares de sulfoaluminato de cálcio hidratado chamado etringita. Após algumas horas, aparecem cristais prismáticos grandes de hidróxido de cálcio e pequenos cristais fibrilares de silicato de cálcio hidratado que preenchem os espaços vazios inicialmente ocupados pela água e pelas partículas de cimento em solução (MEHTA; MONTEIRO, 1994).

3.5.3. Cimentos de Fosfatos de Cálcio

O material mais utilizado como cimento para enxerto ósseo é o poli (metil-metacrilato) (PMMA), aplicado principalmente na fixação de próteses articulares. Conceitualmente, esta resina não deveria ser chamada de cimento, visto que sua reação de cura não envolve reações de hidratação. O PMMA apresenta ainda uma série de inconveniências. Sua reação de polimerização pode causar necrose do tecido ósseo ao redor da região do implante devido à

reação fortemente exotérmica que ocorre, além da resposta inflamatória, que traz como resultado a formação de células gigantes e a encapsulação fibrosa do implante (SANTOS, 2002).

Outros fatores como monômeros não reagidos e superfícies pontiagudas resultantes podem ocasionar sérias complicações após o implante. Além do mais, o poli (metilmetacrilato), depois de implantado não induz qualquer tipo de remodelação óssea, pois não é um material bioativo. Neste contexto, cimentos ósseos de materiais bioativos tem sido alvo de inúmeros trabalhos de pesquisa recentes no mundo inteiro, devido a sua menor probabilidade de causarem reações negativas por parte do tecido vivo (GROOT, 1983). Favoravelmente, cimentos a base de fosfatos de cálcio tem sido utilizados como enxerto ósseo com um percentual de sucesso muito grande nesta última década.

O termo “cimento de fosfato de cálcio” (CFC) foi introduzido por Gruninger et al. (1984). Segundo eles, um cimento desse tipo pode ser preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir em temperatura ambiente ou corporal dando lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfato de cálcio e ocorrendo a cura pelo intercruzamento dos cristais deste precipitado.

Os cimentos de fosfato de cálcio, como o fosfato tricálcico, por exemplo, tipicamente desenvolvem a reação de cura expressa pela Equação (3.1).



Assim sendo, é promissora a sua utilização nas áreas de odontologia, cirurgia bucomaxilofacial e ortopedia como substituinte da sua antecessora, a HA, em função de sua característica de cura que torna desnecessária a utilização de barreiras para impedir a migração do material. No entanto, deve-se ter em mente que as melhorias impostas às propriedades dos materiais devem favorecer ao cirurgião a utilização de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas (MIST – *Minimally Invasive Surgery Techniques*).

Esses cimentos reúnem uma série de vantagens que permitem seu uso como preenchimento e substituto de partes danificadas do sistema ósseo. A Tabela 3.3 mostra as vantagens e desvantagens dos CFC.

Tabela 3.3. Vantagens e desvantagens dos cimentos de fosfato de cálcio (DOROZHKIN, 2009).

Vantagens	Desvantagens
<ol style="list-style-type: none"> 1. Habilidade de endurecer <i>in vivo</i> 2. Boa injetabilidade, permitindo implantação por técnicas minimamente invasivas, as quais causam menos danos que as convencionais. 3. Boa osteocondutividade e eventual osteoindutividade. 4. Podem ser substituídos por osso recém formado após um certo período de tempo (osteotransdutividade). 5. Moldabilidade: se encaixa perfeitamente no local do implante, assegurando bom contato entre o osso e o material, mesmo em defeitos com geometria complexa. 6. Excelente biocompatibilidade e bioatividade. 7. Não é tóxico. 8. Baixo custo. 9. Fácil de preparar e manusear. 10. Pega à temperatura corporal. 11. Forma ligações químicas com o osso hospedeiro. 12. O componente sólido é clinicamente seguro. 13. Pode ser utilizado como sistema deliberador controlado de drogas. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Baixas propriedades mecânicas. Limitam o uso devido a colapso do implante, seguida pela formação de tecido mole ao invés de neoformações ósseas. A maioria dos reparos feitos em fraturas complexas necessita de um suporte metálico. 2. Pode ser “lavado” do local do implante se houver excesso de sangue. 3. Falta de macroporosidades (especialmente poros interconectados), o que impede o rápido crescimento ósseo dentro do implante e que o cimento degrade de fora para dentro e camada por camada. 4. A taxa de degradação <i>in vivo</i> da maioria das formulações é mais lenta que a taxa de crescimento do osso neoformado.

A principal desvantagem dos CFC conhecidos é sua baixa resistência mecânica, que no melhor dos casos consegue alcançar à do osso trabecular que varia entre 2 a 12MPa (DOROZHKIN, 2009; HENCH, 1999).

Composições mais resistentes de CFC são aplicados em ortopedia e neurocirurgia, como alternativa para a consolidação de fraturas múltiplas de ossos longos, fixação de próteses articulares cimentadas e substituição de discos intervertebrais e corpos vertebrais.

Cimentos comerciais, não injetáveis, apresentam uma fração líquido/pó média de 0,35. Esta fração compreende a quantidade mínima de líquido necessária para se obter trabalhabilidade do cimento. Formulações comerciais de CFC, geralmente, contém adições de cerca de 2% de hidroxiapatita precipitada (HAP), podendo conter também cerca de 26% de CaHPO_4 e até 9% de CaCO_3 .

Embora numerosos estudos demonstrem a resposta favorável dos CFC's, deve ser notado que um material de enxerto estará em contato não somente com os ossos, mas também com os outros tecidos, como o tecido conectivo e os músculos. Estes tecidos, geralmente, tendem a apresentar uma resposta inflamatória mais severa. Outros estudos mostram que CFC's com prolongado tempo de cura tendem a incitar uma resposta inflamatória por parte do tecido vivo (OOMS et al., 2003).

Segundo Ooms et al. (2003), o desprendimento de pequenos fragmentos de cimento, tem maior tendência de provocar uma intensa resposta inflamatória localizada, caracterizada pela presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas. Desta forma os CFC's não atuam como substitutos permanentes do osso, apenas temporários, sendo lentamente substituídos por tecido ósseo de nova formação. Este comportamento típico tem sido denominado de osteotransdutividade. A velocidade em que esse fenômeno ocorre depende fortemente do tipo de CFC, do sítio de implantação e da idade do indivíduo receptor, entre outros fatores (DRIESSENS et al., 1998). Conforme relatado por Ooms et al. (2003), a absorção dos CFC's podem ocorrer de duas maneiras distintas. A primeira seria mediada pelo processo de solução no qual o implante é dissolvido no meio fisiológico. A segunda maneira seria mediada por células gigantes (osteoclastos) que absorveriam o cimento através de fagocitose. No entanto, os mecanismos exatos e fatores que causam a calcificação no local de implante de CFC's necessitam de maiores investigações.

3.5.4. Sistema α -TCP

Dos sistemas de CFC estudados, somente aquele baseado no α -TCP cumpre com o requisito referente ao pH (entre 6,5 e 8,5) (DRIESSENS et al., 1997). Poucos estudos têm sido realizados para otimizar o desempenho mecânico dos CFC baseados no α -TCP. A adição

de hidroxiapatita precipitada a esses cimentos em níveis de até 4% tem sido relatada como favorável à resistência à compressão do material, ao mesmo tempo que adições de CaO de até 3% tem um efeito prejudicial sobre a resistência (BERMUDEZ et al.,1994). Ginebra et al. (1995) estudaram o efeito da temperatura e diferentes aditivos sobre diversas propriedades do cimento de α -TCP. Na temperatura do corpo, há um aumento da resistência mecânica durante a pega, comparada à obtida na temperatura ambiente, o que foi explicado pelo aumento da velocidade da reação de pega. As adições de carbonatos solúveis, pirofosfatos e, sobretudo de sais de magnésio retardam a pega e pioram a resistência do cimento. A presença de $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, α -TCP ou hidroxiapatita sinterizada, em quantidade de até 10%, não teve efeito sobre a resistência. Adições de ágar, ácido algínico, caseína, polivinilpirrolidona, dodecilsulfato de sódio, cloreto de hexadeciltrimetilamônio, gelatina e glutaldialdeído foram prejudiciais para as propriedades do cimento. Resumindo-se as características do cimento de α -TCP desenvolvido e avaliado por Driessens et al. (1997) e Ginebra et al. (1995), pode-se dizer que (JANSEN et al., 1995):

- O pó consiste em 98% de α -TCP (com aproximadamente 15% de β -TCP como impureza) e 2 % de hidroxiapatita precipitada (PHA);
- O líquido é uma solução aquosa de Na_2HPO_4 a 2,5%;
- A relação líquido/pó é de 0,32 mL/g;
- O tempo de mistura é de 1 min;
- O tempo de moldagem, durante o qual se deve colocar o material no local de implante, é de até 4 min;
- O tempo de pega à temperatura do corpo é em torno 6 min; depois disso, pode-se fechar a ferida;
- O cimento não incha nem desintegra quando exposto a fluidos corporais depois de 3 ou 4 min do início da mistura;
- Não apresenta retração nem expansão durante a pega;
- Não há liberação de calor durante a pega;
- A resistência à compressão final é de 40 MPa, alcançando-se 60 % deste valor em 6hs à temperatura do corpo, em solução de Ringer;
- O pH da massa de cimento permanece quase neutro durante e depois da pega;
- O cimento não é citotóxico;
- O cimento é biocompatível e estimula a neoformação óssea em cavidades ósseas experimentais.

3.5.5. Reação de Cura

A utilização de aceleradores de cura em CFC ocorre por meio do favorecimento da solubilização dos cristais de fosfato de cálcio, permitindo a saturação do líquido em Ca e P e a precipitação de compostos mais estáveis. Isso ocorre, pois na faixa de pH de aproximadamente 4,2 e acima, a HA é o composto de fosfato de cálcio mais estável (menos solúvel) (CHOW et al., 1997). Existe uma diferença entre a solubilidade da fase α -TCP e da fase β -TCP. A fase α -TCP é bastante solúvel no organismo vivo enquanto a fase β -TCP possui um tempo de degradação maior devido a sua maior estabilidade química. No entanto comparadas com a HA ambas às fases do fosfato tricálcico apresentam solubilidade muito maior.

As características do pó também são de suma importância e influenciam fortemente na reação de cura. Partículas pequenas possuem grandes áreas superficiais e frequentemente aglomeram formando partículas secundárias, a fim de minimizar a superfície total ou a energia interfacial do sistema. A aglomeração refere-se à adesão de partículas que ocorrem devido às forças de atração de Van Der Waals. Normalmente, uma massa aglomerada pode ser desaglomerada por meio de uma dispersão em meio líquido. Já a agregação, por outro lado, refere-se a partículas que interagem fortemente, tornando difícil a quebra da massa agregada em partículas primárias (TONIOLO, 2004).

Quando o α -TCP é misturado com a água, forma-se uma suspensão fluida e manipulável que se dissolve até formar uma solução saturada pela presença de cristais. Este tempo é conhecido como período de indução. Esse período é acompanhado por um aumento na consistência da massa que ainda permite a sua manipulação e devida compactação em uma determinada cavidade minutos antes da cura final. O tempo que vai do início da mistura do α -TCP com a água até que o material endureça é conhecido como tempo de cura.

3.6. Síntese de Combustão em Solução

A síntese de combustão em solução (SCS) foi descoberta sem querer durante uma reação entre nitrato de alumínio e uréia. A mistura de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e uma solução de uréia quando aquecida a aproximadamente em uma mufla, começa a espumar e igniciona, formando um produto branco que foi identificado como α - Al_2O_3 (PATIL et al., 2008).

Tal método, também conhecida como síntese auto-propagante e auto-sustentável (ARUNA; PATIL, 1996), tem sido usada para preparar vários materiais óxidos e não óxidos (LIMA et al., 2006; SOUSA et al., 2002; TONIOLO et al., 2005 a; TONIOLO et al., 2005b; TONIOLO et al., 2007). O processo de reação por combustão vem sendo utilizado para obtenção de pós com partículas finas e com elevada área superficial. As pesquisas sobre este processo foram inicialmente realizadas a partir da combustão do precursor metálico carboxilato de hidrazina. Este precursor apresenta elevado teor de combustível em atmosfera de oxigênio, fazendo com que a reação ocorra rapidamente. Entretanto, por necessitar de uma preparação complexa, sua utilização para preparação de óxidos a partir da combustão do precursor caiu em desuso.

Dessa forma, foram desenvolvidos métodos alternativos para uso desta técnica para síntese de pós. Foram utilizados reagentes de fácil oxidação (como nitratos) e combustíveis que atuam como agentes redutores (como a uréia). Através de diversas pesquisas que utilizaram estes precursores, vários pós foram desenvolvidos, entre eles a α -alumina (TONIOLO et al., 2005b), α -Fe₂O₃ e Fe₃O₄ (TONIOLO et al., 2007), Cr₂O₃ nanocristalino e CrO₃ amorfo (LIMA et al., 2005) e NiO (TONIOLO et al., 2005a). Outros óxidos complexos também podem ser sintetizados por este método, como SrTiO₃ (ISHIKAWA et al., 2008), BaMgAl₁₀O₁₇:Eu²⁺ (CHENA et al., 2008) e varistores à base de ZnO (SOUSA et al., 1999, 2000 e 2002).

Após o início da reação, este método é auto-sustentável e atinge altas temperaturas, que garantem a cristalização e formação de óxidos em um período de tempo curto, liberando uma grande quantidade de gases, o que evita a aglomeração das partículas que se formam. Este método é considerado simples, não envolve muitas etapas e produz pós com a composição e estrutura cristalina desejada. Contudo, as propriedades dos pós preparados pela combustão de misturas redutoras vão depender do combustível usado. A temperatura da chama produzida pela combustão depende da força redutora disponível e da quantidade de gases formada, tais condições influenciam as características do pó produzido. Altas temperaturas favorecem a cristalização e sinterização do pó e grandes quantidades de gás gerado dissipam mais energia, ou seja, reduzem a quantidade de energia disponível para sinterização e cristalização (FUMO, 1996).

Para entender a natureza altamente exotérmica dessa técnica, conceitos utilizados na química dos propelentes são empregados. Um propelente sólido contém um oxidante como perclorato de amônio e um combustível como polibutadieno, junto com pó de alumínio e

outros aditivos. O impulso específico (I_{sp}) de um propelente, que é a energia liberada durante a combustão é dada pela razão do empuxo produzido pela massa molar do propelente. Pode ser expresso pela equação 3.2:

$$I_{sp} = k \cdot \sqrt{\frac{T_c}{M_w \text{ gases}}} \quad (\text{Equação 3.2})$$

Onde k é uma constante de proporcionalidade, T_c é a Temperatura de chama e M_w é o peso molecular dos gases liberadas. A temperatura mais alta dentro da câmara de combustão é produzida quando a razão de equivalência ($\Phi_e = \text{razão oxidante/combustível}$) é igual a 1.

A razão de equivalência do oxidante e combustível é expressa em função do coeficiente estequiométrico de cada elemento envolvido na reação e mostrado na equação 3.3.

$$\Phi_e = \frac{\sum (\text{Coeficiente dos elementos oxidantes}) \times (\text{valência})}{(-1) \sum (\text{Coeficiente dos elementos redutores}) \times (\text{valência})} \quad (\text{Equação 3.3})$$

Uma mistura é considerada estequiométrica quando $\Phi_e = 1$, pobre em combustível quando $\Phi_e > 1$ e rica em combustível quando $\Phi_e < 1$. Misturas estequiométricas produzem o máximo de energia (PATIL et al., 2008).

A razão molar oxidante/combustível necessária para se obter uma reação estequiométrica é calculada somando o total das valências dos elementos oxidantes e redutores do composto oxidante e dividindo pela soma das valências dos elementos oxidantes e redutores do combustível (PATIL et al., 2008).

O oxigênio é o único elemento oxidante que é considerado. Carbono, hidrogênio e cátions metálicos são redutores e o nitrogênio é neutro. Elementos oxidantes possuem valência positiva e elementos redutores possuem valência negativa. (PATIL et al., 2008).

A reação de combustão permite a obtenção de pós finos e homogêneos, principalmente quando se processam multicomponentes, garantindo uma excelente homogeneidade química. Outra vantagem importante deste método esta na praticidade e também no custo envolvido.

3.6.1. Fosfatos de Cálcio Obtidos Via Síntese de Combustão

Na literatura foram encontrados apenas alguns trabalhos versando sobre a síntese de combustão para obtenção de fosfatos de cálcio, sendo que a grande maioria visou a obtenção de hidroxiapatita. Tas (2000) sintetizou pós de fosfato de cálcio via síntese de combustão em solução usando plasma sanguíneo simulado (SBF) como solvente. Han et al. (2004) sintetizaram pós nanocristalinos através do método de combustão por sol-gel, utilizando ácido cítrico como combustível. Pratihari et al. (2006) preparam hidroxiapatita por síntese de combustão em solução, usando ácido cítrico como combustível e estudou o comportamento e cinética de sinterização dos pós obtidos. Recentemente, Sasikumar et al. (2008) usaram diferentes quantidades de ácido succínico e ácido cítrico para obter pós de fosfatos de cálcio. Entretanto, não se encontrou nenhum trabalho visando à obtenção de alfa fosfato tricálcio utilizando-se este método.

3.7. Biopolímeros

Vários tipos de polímeros são usados em aparelhos biomédicos nas áreas de ortopedia, dentária, tecidos moles, indústria farmacêutica e implantes cardiovasculares. Os materiais poliméricos apresentam a maior variedade dentre os biomateriais. A grande variedade de polímeros naturais relevantes no campo dos biomateriais incluem celulose, alginato de sódio e borracha natural, derivados de animais como colágeno, glicosaminoglicanos (GAG's), heparina, ácido hialurônico e outros como ácido desoxiribonucleico (DNA). Mesmo que esses materiais sejam de grande importância e sejam usados em várias aplicações, eles são muitas vezes eclipsados pela infindável variedade de polímeros sintéticos disponíveis. Os polímeros sintéticos podem ser hidrofóbicos, que não absorvem água, como borracha de silicone, polietileno (PE), polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAM), polipropileno (PP), politereftalato de etileno (PET), politetrafluoretileno (Teflon) e poli(metilmetacrilato) (PMMA), assim como podem ser mais polares, como cloreto de polivinila (PVC) e os nylons, e também podem inchar quando em contato com a água como poli(hidroxietil metacrilato) (PHEMA) e poli(dimetilamino etil metacrilato) (PDMAEMA) e podem ser solúveis em água como o polietileno glicol (PEG). Também podem ser hidroliticamente instáveis e degradar no corpo como o copoli(ácido) láctico-glicólico (PLGA) (RATNER et al., 2004; SAN ROMÁN et

al., 2004). A Tabela 3.4 mostra as aplicações mais comuns dos polímeros sintéticos utilizados como biomateriais.

Tabela 3.4. Polímeros sintéticos utilizados em biomedicina e cirurgia: propriedades e aplicações (SAN ROMÁN et al., 2004).

Propriedades	Polímeros	Aplicações
Moles, borrachosos - Baixa absorção de água - Alta absorção	Silicone, Poliuretanas (PU) PVC PHEMA	- Tubos, diafragmas e recobrimentos, implantes, marca-passos e adesivos. - Lentes de contato, emplastos para tratamento de queimaduras e recobrimentos.
Amorfo, duros	PMMA	Lentes de contato, lentes intraoculares, cimentos dentais, cimentos ósseos, aparatos ortopédicos.
Semicristalino - Baixa absorção de água - Alta absorção	PET, PP, PTFE, náilon, PGA, PE e acetato de celulose. Celulose	Suturas, enxertos cardiovasculares, suturas biodegradáveis, articulações, cateteres, diálise e lentes de contato. Diálise.

Visto que os dispositivos protéticos devem reunir uma série de características específicas para cada tipo de aplicação de acordo com a função para a qual tenha sido projetado, normalmente não é possível encontrar um polímero que reúna todas as propriedades maximizadas para uma determinada aplicação. Assim, o desenvolvimento de novas formulações através de compósitos, copolímeros aleatórios, em bloco ou enxerto e sistemas multicomponentes oferecem uma grande gama de possibilidades (SAN ROMÁN et al., 2004).

3.7.1 Hidrogéis

Hidrogéis são estruturas poliméricas entrecruzadas e que incham em água e que contém ligações covalentes produzidas pela simples reação de um ou mais monômeros,

entrecruzamentos físicos pela formação de entrelaçamentos e pontes de hidrogênio ou fortes interações do tipo van der Waals pela interação de duas ou mais cadeias macromoleculares (PEPPAS, 2004). Hidrogéis são matérias versáteis que podem ter uma ampla gama de aplicações como implantes artificiais, sistemas liberadores de fármacos, peles artificial, curativos e sensores de umidade (BAJPAI; SAINI, 2005, TOMME et al, 2008).

Dependendo do modo de preparação, carga iônica ou características da estrutura física, os hidrogéis podem ser classificados em diversas categorias (PEPPAS; PEPPAS, 2004):

- Homopolímeros: Apenas um monômero hidrofílico formando uma rede entrecruzada;
- Copolímeros: Rede entrecruzada formada por dois monômeros, sendo pelo menos um hidrofílico;
- Multipolímeros: Rede entrecruzada formada por três ou mais monômeros, sendo pelo menos um hidrofílico;
- Redes interpenetrantes: São compostos de uma primeira rede que incha no monômero e depois reage formando uma segunda estrutura em forma de malha.

Baseado em seu caráter iônico os hidrogéis podem ser classificados como (PEPPAS; PEPPAS, 2004):

- Neutros: São redes poliméricas que possuem carga nula;
- Aniônicos: São redes poliméricas que possuem cargas negativas;
- Catiônicos: São redes poliméricas que possuem cargas positivas;
- Anfóliticos: São redes poliméricas que possuem cargas positivas e negativas. A rede de cargas no hidrogel pode ser ajustada mudando a concentração de monômeros e a solução de preparação dos hidrogéis ou mudando o pH da solução (ZHAI et al., 2004).

Baseado em suas características físicas do sistema, os hidrogéis podem ser classificados como (PEPPAS; PEPPAS, 2004):

- Amorfos: Cadeias macromoleculares organizadas aleatoriamente;
- Semicristalinos: Regiões densas e organizadas (cristalitos);
- Pontes de hidrogênio ou estruturas complexadas: Responsáveis pela formação da estrutura tridimensional.

Uma avaliação estrutural mostra que uma rede ideal é raramente observada. A Figura 3.7A mostra uma rede macromolecular ideal (hidrogel), indicando entrecruzamentos tetrafuncionais produzidas por ligações covalentes. Entretanto, em redes reais é possível encontrar junções multifuncionais (Fig. 3.7B) ou emaranhamentos físicos (Fig. 3.7C) atuando

como junções semipermanentes. Hidrogéis com defeitos moleculares são sempre possíveis. Figuras 3.7D e 3.7E mostram dois defeitos possíveis: grupos funcionais não reagidos com emaranhamento parcial e *loops* na cadeia, respectivamente. Tais efeitos não contribuem com as propriedades mecânicas ou físicas da rede polimérica (PEPPAS; PEPPAS, 2004).

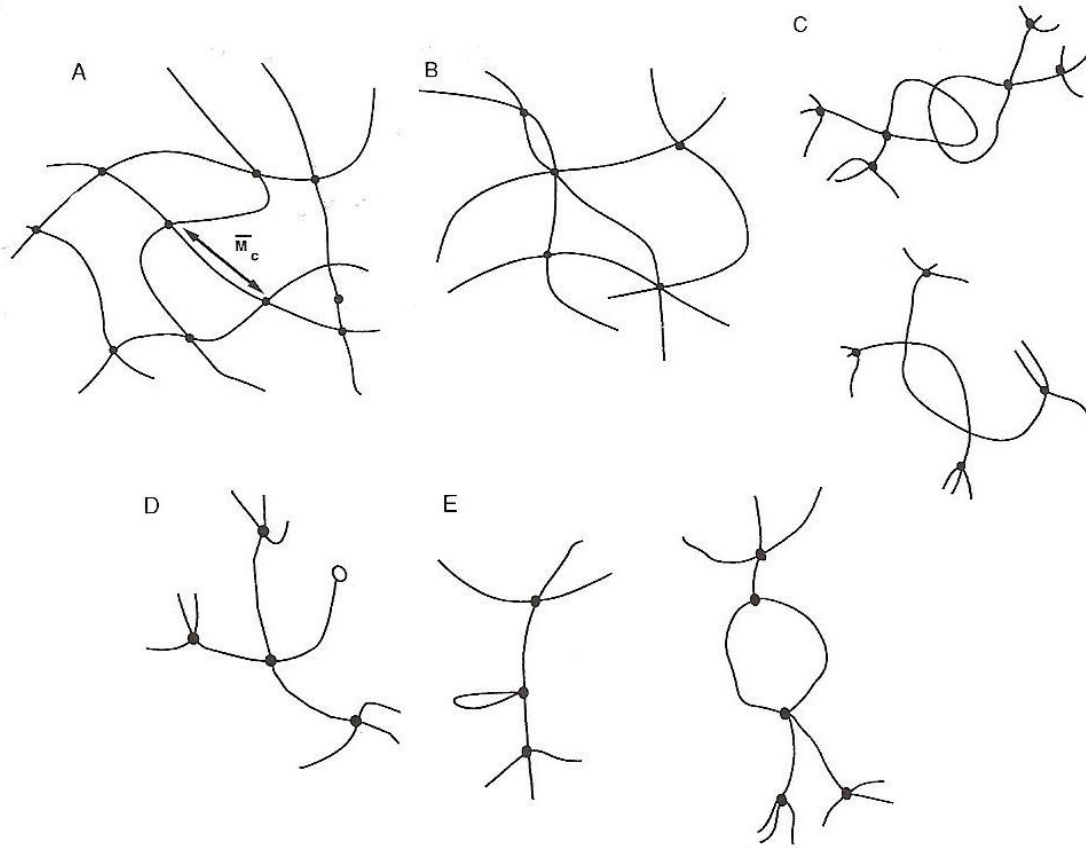


Figura 3.7. (A) Rede macromolecular ideal de um hidrogel, (B) Rede com junções multifuncionais, (C) Entrelaçamentos físicos em um hidrogel, (D) Grupo funcional não reagido e (E) *loops* na cadeia do hidrogel (PEPPAS, 2004).

Dos polímeros utilizados para a confecção de hidrogéis podem se destacar dois: o hidróxietil metacrilato (HEMA) e o dimetil(amino)etil metacrilato (DMAEMA). O Poli(HEMA) é um material adequado para implantação por não ser tóxico e possuir alta estabilidade química e hidrolítica, propriedades que o fazem resistente à degradação (BRAHIM et al., 2003a). Já o Poli(DMAEMA) pode prover ao sistema sensibilidade ao pH (BRAHIM et al., 2003a; BRAHIM et al., 2003b). O PHEMA é muito utilizado na área médica como lentes de contato e córneas artificiais (SAVINA et al., 2009).

Já o DMAEMA possui excelente biocompatibilidade, é hidrofílico e é sensível a

temperatura e pH (MUÑOZ-BONILLA et al., 2007). Além disso, ele possui baixa densidade de cargas e é solúvel em meios básicos e neutros, devido à formação de pontes de hidrogênio. Sua temperatura crítica de solução é dependente do seu peso molecular (MUÑOZ-BONILLA et al., 2007). O PDMAEMA destaca-se em utilizações como agente de transferência de genes, ligando-se com o DNA via interações eletroestáticas (VAN DE WETERING et al., 1998), formação de membranas para imobilização de células vivas (GUAN et al., 2000), membranas para ultrafiltração carregadas positivamente para separação de solutos macromoleculares (YAMADA et al., 2001), troca de prótons em células combustíveis (KUMAR; SINGH; SHAHI, 2010) e na forma de microesferas como agente antibactericida (CHENG et al., 2005).

3.7.2 Criopolímeros

Materiais macroporosos com poros interconectados possuem um grande potencial para aplicações como *scaffolds* para engenharia de tecidos (KIRSEBOM et al., 2008), desde que eles providenciem o suporte necessário para a proliferação celular e manter as suas funções diferenciais. A gelação criotópica é um tipo específico de congelamento que ocorre durante o tratamento criogênico de sistemas potencialmente capazes de formar géis (LOZINSKY et al., 2002). A estrutura de um criogel é principalmente controlada pelas condições de resfriamento (YAO et al., 2006), por que os cristais do solvente que são formados atuam como fatores porogênicos. Depois da extração dos cristais de solvente é formado um sistema com poros altamente interconectados no intervalo entre 1-100 μm . As interconexões ocorrem quando os cristais de gelo crescem o suficiente para conectar-se com a face de outro cristal de gelo (KIRSEBOM et al., 2009). Devido ao efeito de crioconcentração as paredes dos poros são formadas pelo polímero na forma densa, o que torna os criogéis mecanicamente fortes, elásticos e esponjosos (KIRSEBOM et al., 2008). A Figura 3.8 resume esquematicamente as etapas de formação de um criogel através do processo de criopolimerização.

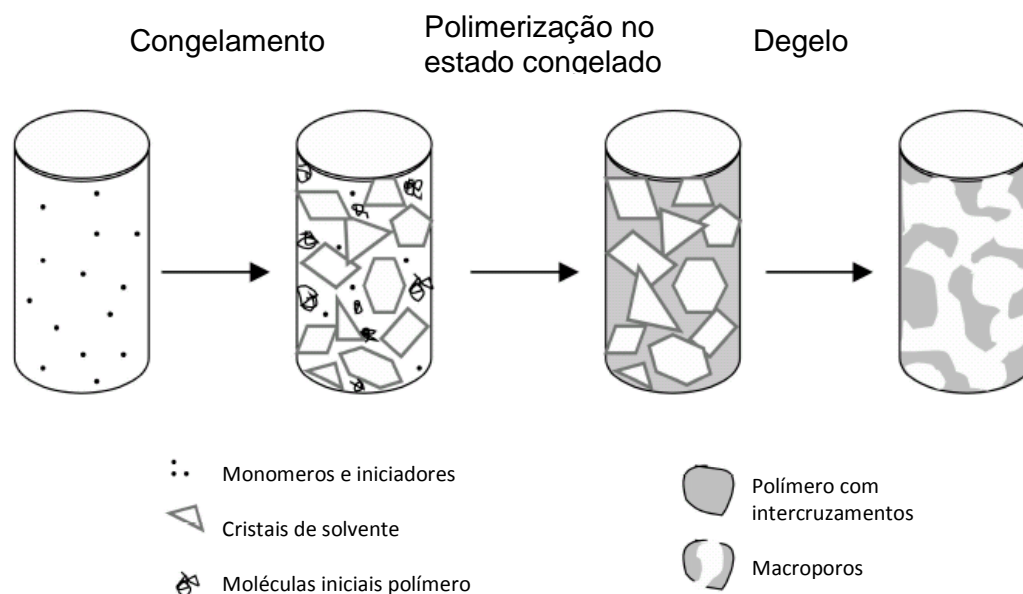


Figura 3.8. Esquema das etapas da criopolimerização.

Materiais obtidos via criopolimerização possuem elevada estabilidade química e mecânica. A técnica vem sendo largamente utilizada para a criação de sistemas porosos para aplicações como colunas de cromatografia para captura de enzimas (ARVIDSSON et al., 2003), bioreatores (KUMAR et al., 2006), engenharia de tecidos (BOELGEN et al., 2007) e purificação de água (LE NOIR et al., 2007). Entretanto, na literatura não foram encontrados pesquisas sobre seu uso como *scaffolds* para implantes ósseos.

3.8 Ensaios *in vitro* - Comportamento em SBF

Materiais artificiais implantados em defeitos ósseos são geralmente encapsulados por tecido fibroso, levando ao seu isolamento do osso que o cerca. Kokubo (2006), contudo, afirma que em 1972, Hench et al. mostraram que alguns vidros compostos de $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ se ligaram espontaneamente ao tecido ósseo sem a formação de tecido fibroso adjacente. Tais compostos são chamados de biovidros. Desde então muitos tipos de cerâmicas, como hidroxiapatita, fosfato tricálcico β (β -TCP) sinterizado, cerâmica bifásica HA/ β -TCP e vitrocerâmicas A-W, contendo apatita cristalina e wollastonita, também mostraram formar ligações com osso vivo e foram usados clinicamente como importantes substitutos ósseos. Porém é desejado o desenvolvimento de novos materiais que se liguem ao tecido ósseo.

No intuito de descobrir maneiras alternativas para testar a bioatividade de um material, não utilizando experimentos em animais, Kokubo propôs em 1991, que o principal requisito para que um material artificial se ligue com o tecido ósseo vivo é a formação de uma camada de hidroxiapatita na sua superfície quando implantado em organismos vivos e, também, propôs que a formação de apatita *in vivo* pode ser reproduzida em uma solução simulada de fluidos corpóreos (SBF) cuja concentração é quase a mesma do sangue humano (KOKUBO, 2006).

3.8.1 História do SBF

Em recente artigo publicado na revista *Biomaterials*, Kokubo e Takadama (2006) fazem uma revisão sobre a história e o desenvolvimento do *simulated body fluid* (SBF), além de citarem vários trabalhos que utilizaram SBF para prever o comportamento de determinado material quando implantado.

Em 1980, Hench et al. (1972) mostraram que a formação de um filme com uma camada rica em sílica e fosfato de cálcio que ocorre nos materiais biocompatíveis quando implantados pode ser reproduzida em uma solução tampão consistente de Tris hidroximetilamino metano e ácido clorídrico, com pH = 7,4 (OGINO, 1980).

Por outro lado, Kitsugi et al. (1987) mostraram que não há a formação de uma camada de SiO₂ em vitrocerâmicas A-W, mas sim a formação de uma camada de fosfato de cálcio na sua superfície, que permitiria a ligação com o tecido ósseo. Na seqüência, Kokubo, Ito et al. (1990), usando difração de raios X, identificaram esta camada de fosfato de cálcio como sendo apatita cristalina. Somando a isso, em 1990, os autores mostraram que a formação *in vivo* da apatita na superfície da vitrocerâmica A-W pode ser reproduzida em SBF, com concentrações de íons quase iguais às do plasma sanguíneo humano, mas sem a solução tampão Tris (KOKUBO; KUSHITANI et al., 1990). Kokubo, Kushitani et al. (1990) e Filgueiras et al. (1993), também independentemente confirmaram a formação de apatita na superfície do Biovidro 45S5 em SBF.

Uma análise detalhada por difração de raios X de filme fino (DRX-FF), infravermelho com transformada de Fourier (IV-FT), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transição (MET) da apatita superficial formada em SBF mostrou que ela é similar ao osso mineral em composição e estrutura (KOKUBO; ITO et al., 1990; KOKUBO; KUSHITANI et al., 1990; OHTSUKI et al., 1995). Como resultado, se especulou

que os osteoblastos poderiam preferencialmente se proliferar e se diferenciar para produzir apatita e colágeno na sua superfície. Então, a apatita formada pode se ligar com a superfície da apatita, assim como, ao osso próximo. Conseqüentemente, é formada uma forte ligação química entre o material e o tecido ósseo através da camada de apatita. Em contraste, a vitrocerâmica A-W (Al), que contém apatita e wollastonita, mas em uma matriz vítrea contendo alumina (Al_2O_3), porém não houve a formação da camada de apatita nos ensaios *in vivo* e *in vitro* e, por conseguinte, não houve ligação do implante com o tecido ósseo (KOKUBO; ITO et al., 1990; KOKUBO; KUSHITANI et al., 1990; KITSUGI, 1989).

Baseado nesses resultados, em 1991, foi proposto que o requisito principal para a formação de ligação entre o material e o tecido ósseo é a formação de uma apatita na superfície em SBF (KOKUBO, 1991).

De acordo com a Tabela 3.4, pode-se perceber que o SBF original usado por Kokubo et al. em 1990 e por Hench em 1993 não possuía o íon SO_4^{2-} presente no plasma sanguíneo. Isso foi corrigido em artigos (KOKUBO, 1991; OHTSUKI et al., 1991) publicados por Kokubo em 1991. Desde então, o c-SBF corrigido tem sido utilizado ao invés do SBF original.

Também se pode perceber que o SBF é uma solução altamente supersaturada. E é difícil de ser preparada sem precipitação. Em 1995, Cho et al. descreveu a preparação do SBF detalhadamente.

Entretanto, na Tabela 3.5, pode-se ver que o SBF corrigido é mais rico em Cl^- e mais pobre em HCO_3^- do que o plasma sanguíneo humano. Em 2003, Oyane et al. (2003) tentaram corrigir esta diferença preparando o SBF revisado (r-SBF), no qual as concentrações dos íons Cl^- e HCO_3^- foram igualados aos níveis do sangue humano. Porém o carbonato de cálcio utilizado no trabalho possui uma forte tendência a precipitar. Em 2004, Takadama et al. propuseram um novo SBF (n-SBF) no qual ele diminuiu somente a concentração do íon Cl^- ao nível do plasma sanguíneo, deixando a concentração de HCO_3^- igual à do c-SBF. Comparou-se o n-SBF com o c-SBF em sua estabilidade e reprodutibilidade. Nessa mesma pesquisa aprimorou-se os procedimentos para a preparação do SBF.

Em 2003, o método de preparação refinado do c-SBF foi proposto ao comitê Técnico ISO/TC150 como uma solução para as medidas *in vitro*.

Tabela 3.5. Concentração de Íons dos SBF e do Sangue Humano.

	Concentração de íons (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma sanguíneo humano	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF original	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0,5
SBF corrigido (c-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
SBF revisado (r-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF novo (n-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5

3.8.2 Correlação Qualitativa da Formação de Apatita em SBF com Bioatividade *in vivo*

Há a formação de uma fina camada de fosfato de cálcio na superfície da hidroxiapatita sinterizada quando imersa em SBF (KOKUBO, 1988; KIM, 2004). O que foi confirmada com a formação de ligações entre a HA e o tecido ósseo através da camada de apatita formada *in vivo*. Tal comportamento também foi verificado para os Biovidros 45S5 e do sistema Na₂O – CaO – B₂O₃ – Al₂O₃ – SiO₂ – P₂O₅, assim como para as vitrocerâmicas A-W, para as cerâmicas bifásicas HA/ β-TCP e para o sulfato de cálcio e para o compósito polietileno/vitrocaramica A-W.

A vitrocerâmica A-W(Al) não formou a camada de apatita em sua superfície quando mergulhada em SBF, mas também não houve a formação de tal camada quando implantado *in vivo*. Todos os trabalhos acima mostram que para todos esses materiais, a formação de apatita em suas superfícies em SBF é perfeitamente correlacionada com a sua bioatividade *in vivo*.

A calcita natural e o β-TCP não apresentaram a formação da camada de apatita em sua superfície, porém se ligam ao tecido ósseo quando implantados. Uma possível explicação para isso é a rápida taxa de absorção desses materiais *in vivo* de maneira que quando eles estão implantados, o processo de absorção é mais rápido do que o de crescimento de tecido ósseo.

A partir desses resultados, pode-se dizer que em um material no qual ocorra a formação de HA em sua superfície, pode se ligar ao tecido ósseo quando implantado. Tal afirmação é amplamente aceita e respaldada pela norma ISO 23317, de 2007 “Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials”, que utiliza estes mesmos critérios para considerar um material biocompatível em tecido ósseo.

3.9 Células Tronco Mesenquimais

Células tronco são células não especializadas que possuem duas propriedades bem definidas: a habilidade de se diferenciar em outros tipos de células e a habilidade de se auto regenerar (SELL, 2004).

A habilidade de se diferenciar é o potencial de se desenvolver em outro tipo de célula, como células ósseas, cardíacas ou musculares. Uma célula tronco totipotente pode se diferenciar em qualquer tipo de célula, incluindo a membrana de embriões. Uma célula tronco pluripotente pode se desenvolver em todos tipos de células, com a exceção da membrana embriônica. Outras células tronco podem ser multipotente, oligopotente, quadripotente, bipotente ou unipotente, dependendo da sua habilidade em se diferenciar em alguns, dois ou um outro tipo de célula (SELL, 2004).

Auto regeneração é a habilidade da célula tronco em se dividir e produzir mais células tronco. Durante o início do desenvolvimento da célula, a divisão celular é simétrica, por exemplo, cada célula se divide em dando “nascimento” a células filhas com o mesmo potencial. Mais tarde do desenvolvimento, as células se dividem assimetricamente, se dividindo em um tipo de célula mais especializado (SELL, 2004).

Células tronco mesenquimais adultas (CTM) podem ser isoladas a partir do osso esponjoso e por serem aderentes à pratos de culturas, podem ser multiplicadas, mantendo a sua multipotencialidade (CAPLAN, 2007). As CTM vêm sendo utilizadas em modelos preclínicos para engenharia de tecidos com aplicações biomédicas como substitutos ósseos, de cartilagem, muscular, tendão, gorduras e outros tecidos conectivos. Estes materiais de engenharia de tecidos mostram um grande potencial para reconstruir tecidos mesenquimais danificados ou doentes. Uma das características mais surpreendentes das CTM é que elas secretam um largo espectro de moléculas bioativas. Essas moléculas são imunossupressivas, especialmente para células T, então, CTM's alogênicas podem ser consideradas para uso terapêutico (CAPLAN, 2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em três etapas principais. Primeiramente sintetizou-se a fase alfa do fosfato tricálcico via síntese de combustão em solução. Após à síntese, pesquisou-se as melhores condições para o uso dos pós de fosfato tricálcico como cimento ósseo. E na etapa final, avaliou-se a influência da inserção das partículas de α -TCP em polímeros sintetizados via criopolimerização.

4.1 Reações de Combustão

Nitrato de cálcio tetra-hidratado, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (Cromoline, 99%), e fosfato de amônio dibásico, (VETEC, 98%) foram utilizados como materiais iniciais para a obtenção dos pós de fosfato de cálcio. Uréia, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, (VETEC, 98,5%) ou glicina, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (VETEC, 98%) foram utilizadas como combustível nas reações de combustão. Para todas as sínteses a razão molar cálcio/fósforo foi ajustada em 1,5, razão da fase fosfato tricálcico.

O fluxograma abaixo demonstra as etapas utilizadas no processo de obtenção do pó da fase alfa do fosfato tricálcico e é mostrado na Figura 4.1.

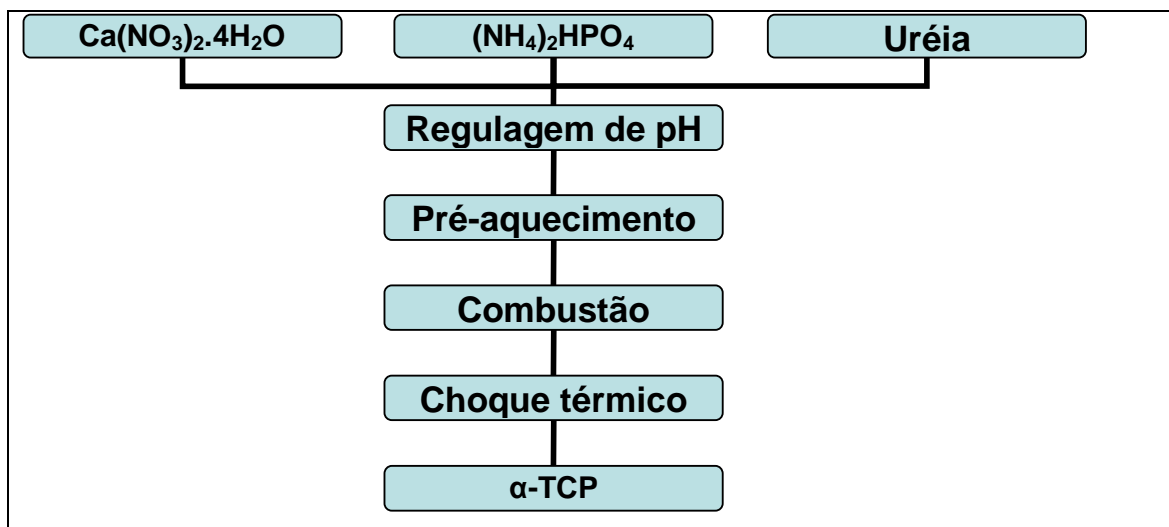


Figura 4.1. Fluxograma para preparação de pós de α -TCP.

Sais de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ foram adicionados nas quantidades descritas na Tabela 4.1. O controle de pH se deu pela adição de ácido nítrico concentrado (0,5M), para a obtenção de um pH mais ácido, ou hidróxido de potássio concentrado (0,5M), para a elevação deste. Após misturar todos os reagentes à temperatura ambiente, o cadinho de sílica vítrea

contendo a solução foi colocado em uma chapa aquecida a $300\pm 20^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos para retirada do excesso de gases. O cadinho em seguida foi levado a uma mufla (SANCHIS N-1110) pré-aquecida a $550\pm 5^{\circ}\text{C}$ onde permaneceu por 15 minutos. O produto da combustão em forma de espuma quebradiça foi facilmente desaglomerado utilizando um almofariz até formar um pó fino. O pó resultante foi submetido à calcinação em um cadinho de α -alumina em uma atmosfera de ar ambiente, numa temperatura de 1200°C , durante 4 horas, seguida de choque térmico para estabilização da fase α -TCP.

O material obtido, após resfriamento, foi desagregado manualmente com almofariz e pistilo para obter um tamanho de partícula suficientemente pequeno, passante em malha de náilon especificação 20 ABNT (abertura de $850\mu\text{m}$), adequado para a próxima etapa. A moagem a úmido foi realizada utilizando álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) por 30, 60 e 180 minutos e alumina, como meio de moagem. Utilizando-se a proporção α -TCP:Álcool: meios de moagem igual a 1:1:3. A solução resultante (cimento moído + álcool) foi então peneirada apenas para se separar os meios de moagem e permaneceu 72h em estufa a 70°C para promover a evaporação total do álcool, restando apenas o pó obtido.

4.1.1 Cálculo Termodinâmico das Reações de Combustão em Solução

Genericamente, uma reação de combustão pode ser caracterizada por seus aspectos cinéticos e termodinâmicos. Os cinéticos indicam a taxa com a qual a energia é liberada durante a reação, isto é, uma elevada taxa de liberação resulta em uma chama autosustentável que é característica da síntese por combustão. Os aspectos cinéticos estão em função da ocorrência de interações químicas entre o oxidante e o combustível. O aspecto termodinâmico, por outro lado, relaciona-se com a quantidade de energia disponível do combustível e é expressa pelo calor de combustão.

O cálculo termodinâmico das reações envolvidas na síntese por combustão partiu das seguintes considerações:

- As reações redox são, em geral, de natureza exotérmica e frequentemente levam à explosão se não controladas devidamente. A combustão de mistura de nitrato-uréia e nitrato-glicina parecem sofrer uma autopropagação, sendo a reação exotérmica gerada não explosiva;

- A mistura estequiométrica do combustível e do oxidante é tal que a quantidade de oxidante presente é teoricamente ajustada para a ocorrência da oxidação completa (PUROHIT et al., 2001);

- A composição inicial da solução contendo o nitrato metálico e o combustível foi derivado do total das valências usando os conceitos da química propelente cujo resultado do produto das valências é zero. O conceito total das valências oxidante e redutora simplifica o procedimento de cálculo da composição estequiométrica de misturas de combustível-oxidante (JAIN et al., 1981); Estes conceitos foram estendidos para a síntese de materiais cerâmicos por combustão em solução (KINGSLEY; PEDERSON 1993); O carbono, o hidrogênio, o cálcio e o fósforo são considerados elementos redutores, os quais apresentam as valências de +4, +1, +2 e +5. O oxigênio foi considerado como um elemento oxidante com valência -2 e o nitrogênio foi considerado com valência igual a zero. O total das valências de oxidação foi de -10 para o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, +6 para o $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, +6 para a uréia e de +9 para a glicina;

Se a quantidade de oxigênio estiver em excesso na mistura, em maior quantidade do que a requerida para a completa reação do combustível, a porção de oxigênio não reage e parece esgotar-se (PUROHIT et al., 2001).

Os dados termodinâmicos considerados obtidos em literatura (DEAN, 1979; PERRY; CHILTON, 1973) para os reagentes e produtos são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Dados termodinâmicos relevantes (PERRY; CHILTON, 1973; DEAN, 1979)

Composto ^a	ΔH_f (kcal/mol)	C_p (Cal/mol.K)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (c)	- 509,37	-
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (c)	- 374,50	-
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (c)	- 79,71	-
$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (c)	-126,22	
$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (c)	- 988,2	56.4
O_2 (g)	0	29,154 + 0,0015 T ^b
N_2 (g)	0	30,418 + 0,0025 T ^b
CO_2 (g)	94,051	10,34 + 0,0027 T ^b
H_2O (g)	- 57.796	7,20 + 0,0036 T ^b

A entalpia de combustão (ΔH°) é dada pela Equação 4.1 e a temperatura de chama adiabática pode ser expressa pela Equação 4.2.

$$\Delta H^0 = \left(\sum n\Delta H_p^0 \right) - \left(\sum n\Delta H_r^0 \right) \quad \text{(Equação 4.1)}$$

$$T = T_0 + \frac{\Delta H_r^0 - \Delta H_p^0}{C_p}$$

(Equação 4.2)

Onde n é o número de moles, ΔH_p^0 e ΔH_r^0 são as entalpias de formação dos produtos e dos reagentes, respectivamente, T é a temperatura de chama adiabática e T_0 é 298K, e C_p é a capacidade calorífica dos produtos à pressão constante.

Assim, empregando-se os dados da Tabela 4.1, podem ser calculadas a entalpia de combustão e a temperatura de chama adiabática em função da razão molar de combustível em relação ao valor estequiométrico da reação. Para todos os casos foi obtido um comportamento linear de aumento da temperatura de chama adiabática à medida que se aumenta o teor de combustível.

A temperatura adiabática, T , da reação, por sua vez, é influenciada pelo tipo de combustível, razão combustível-oxidante, e pela quantidade de água remanescente na solução precursora no momento da temperatura de ignição (TONIOLO et al., 2005). A temperatura de chama pode ser aumentada com a adição de excesso de oxidante, tal como nitrato de amônio (KINGSLEY; PEDERSON 1993), ou pelo aumento da razão molar combustível/oxidante. Sousa et al. (1999), calcularam as temperaturas de chama adiabática, no caso da síntese por combustão via uréia-nitrato, para a obtenção de ZnO. Purohit et al. (2001) também calcularam as temperaturas de chama adiabática, envolvendo a síntese por combustão de CeO_2 para a razão molar glicina-nitrato.

4.1.2 Estudo do pH

Nesta fase estudou-se a influencia do pH nas fases obtidas e nas propriedades do pó obtido. Nele a quantidade de combustível, uréia, foi mantida fixa e variou-se o pH da solução variando-se as quantidade de ácido nítrico ou de hidróxido de potássio adicionados. A Tabela 4.2 mostra as proporções molares entre os reagentes utilizados.

Tabela 4.2. Proporção entre os reagentes utilizados no estudo da influência do pH na síntese de combustão em solução.

pH da Amostra	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Uréia	HNO ₃	KOH
	(mol)	(mol)	(mol)	(M)	(M)
6,4	3	2	24	-	1
5,0	3	2	24	-	-
2,8	3	2	24	0,5	-
1,9	3	2	24	1	-
1,5	3	2	24	2	-

4.1.3 Estudo do Combustível

Nesta etapa estudou-se a influência do tipo e teor de combustível utilizado nas propriedades do pó obtido. Para obter-se um maior controle estequiométrico da reação de combustão, visto que o Ca(NO₃)₂·4H₂O é altamente higroscópico e hidrata ou desidrata muito facilmente com mudanças de temperatura ou umidade, foram preparadas soluções aquosas de nitrato de cálcio tetra-hidratado (2,17M) e de fosfato de amônio bibásico (1,74M). Nestas reações a quantidade de ácido nítrico foi mantida fixa e variou-se a quantidade e o tipo de combustível. Os combustíveis utilizados foram uréia e glicina. A Tabela 4.3 mostra as proporções molares entre os reagentes utilizados.

Tabela 4.3. Proporção entre os reagentes utilizados no estudo da influência do combustível na síntese de combustão.

Razão Estequiométrica	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O (mol)		(NH ₄) ₂ HPO ₄ (mol)		Combustível (mol)	
	Uréia	Glicina	Uréia	Glicina	Uréia	Glicina
0,75	3	3	2	2	2,25	1,5
1,0	3	3	2	2	3	2
1,5	3	3	2	2	4,5	3
2,0	3	3	2	2	6	4

4.2. Obtenção dos Cimentos de Fosfato de Cálcio

Para a obtenção dos cimentos de fosfato de cálcio (CFC) os pós obtidos via reação de combustão foram misturados com uma solução 2,5% de Na_2HPO_4 em água destilada e deionizada. A razão líquido/sólido utilizada foi de 0,40 mL/g.

Foram preparados 10 corpos de prova para cada tempo de moagem estudado (30, 60 e 180 minutos) e mediram-se as propriedades físicas e mecânicas destes. Os corpos de prova foram conformados no formato cilíndrico nas dimensões de 12 mm de altura e 6 mm de diâmetro. Os CFCs também foram avaliados *in vitro* com imersão em plasma sanguíneo simulado (SBF) por até 28 dias.

4.3. Obtenção dos Criogéis Reforçados com Fosfato de Cálcio

Os reagentes utilizados para a síntese dos criogéis, assim como a sua pureza e seu fabricante são colocados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Reagentes utilizados para a síntese dos criogéis.

Nome do Reagente	Abreviação	Pureza (%)	Fabricante, País
2-(Dimetilamino) etil Metacrilato	DMAEMA	98	Aldrich, Alemanha
Hidroxiethyl Metacrilato	HEMA	99	Aldrich, Alemanha
Ácido Acrílico	AA	98,5	Aldrich, Alemanha
Ácido Metacrílico	MA	98,5	Aldrich, Alemanha
N,N'-Metileno Bisacrilamida	MBAM	99	Aldrich, Alemanha
Trietilen Glicol Dimetacrilato	TEGMA	90	Fluka, Alemanha
Persulfato de Sódio	SPS	99	Fluka, Alemanha
N,N,N',N'-Tetrametilenodiamina	TEMED	99	Acros, Bélgica

O α -fosfato tricalcico (α -TCP) utilizado neste trabalho foi sintetizado em laboratório via síntese de combustão em solução e o método de síntese é descrito previamente nessa tese. Sendo que para a síntese se utilizou uréia como combustível com razão estequiométrica igual a 2 e adicionou-se uma determinada quantidade de ácido nítrico visando obter pH igual a 1,5.

O volume total de cada reação foi de 15 mL. Os reagentes foram misturados e agitados por 5 minutos em banho de gelo sob atmosfera de nitrogênio antes de serem vazados em moldes plásticos com 13 mm de diâmetro, os quais foram imediatamente introduzidos em um banho à -20°C. Após 20 horas de imersão eles foram retirados e liofilizados. Os criogéis obtidos foram, então, mergulhados sob agitação em água destilada por 24 horas visando à retirada de monômero residual e depois foram secos sob vácuo e preparados para posterior caracterização.

4.3.1 Criogéis do sistema Ácido Acrílico ou Ácido Metacrílico/Dimetilamino Etil Metacrilato (AA ou MA/DMAEMA)

O teor total de monômero foi mantido em 15%, na proporção de 1 parte de comonômero para 20 partes de monômero. Para avaliar a influencia do comonomero foram feitas reações com Ácido Acrílico (AA), Ácido Metacrílico (MA) e sem nenhum destes. Também foram testados dois entrecruzantes: N,N'-Metileno Bisacrilamida (MBAM) e Trietileno Glicol Dimetacrilato (TEGMA) na razão de 1:300 em relação ao teor total de monômero, também foram feitas reações sem a adição de entrecruzante. No sistema catalítico, utilizou-se o acelerador, TEMED, e o iniciador, SPS, nas razões de 1:30 e 1:300 em relação ao teor total de monômero, respectivamente. A Tabela 4.5 mostra os teores de cada reagente utilizado nas reações de síntese dos criogéis do sistema AA ou MA/DMAEMA.

Tabela 4.5. Proporção entre os reagentes utilizados na síntese dos criogéis do sistema monômero/comonômero e agente entrecruzante.

Reagente/ Amostra	MT	MM	DT	DM	AT	AM
DMAEMA	14,25	14,25	15	15	14,25	14,25
MA	0,75	0,75	-	-	-	-
AA	-	-	-	-	0,75	0,75
TEGMA	0,05	-	0,05	-	0,05	-
MBAM	-	0,05	-	0,05	-	0,05
SPS	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Água	84,85	84,85	84,85	84,85	84,85	84,85

O nome de cada amostra foi designado de acordo com o comonômero e agente entrecruzante utilizados, sendo que a amostra MT é composta pelo comonômero MA e pelo

agente entrecruzante TEGMA, já a amostra MM é composta pelo comonômero MA e pelo agente entrecruzante MBAM. As amostras DT e DM não apresentam comonômero em sua composição (designado por D devido ao nome do monômero utilizado, o DMAEMA) e foram utilizados TEGMA e MBAM como agente entrecruzante, respectivamente. Enquanto que as amostras AT e AM têm como comonômero o Ácido Acrílico (AA) e como agente entrecruzante TEGMA e MBAM, respectivamente.

A extração do gelo é um fator importante na síntese dos criogéis e pode alterar as propriedades físicas destes. Utilizou-se 2 métodos para estudar este processo:

1) Liofilização: Ao serem retiradas do banho termostático a -20°C , os criogéis foram colocados diretamente no liofilizador por 20 horas para que ocorresse a sublimação dos cristais de gelo.

2) Descongelamento: A solução ainda congelada era retirada do banho termostático a -20°C e colocada na geladeira a -4°C por 24 horas, até o derretimento total do gelo.

4.3.2 Criogéis do sistema Hidroxietil Metacrilato/Dimetilamino Etil Metacrilato (HEMA/DMAEMA)

Neste estudo o teor total de monômero foi mantido em 10%. Seis composições foram sintetizadas variando as proporções de HEMA e DMAEMA em 75:25, 50:50 e 25:75 com e sem a adição de 5% em massa de α -fosfato tricalcico. A viscosidade do meio foi aumentada pela adição de uma solução de 1% de gelatina. O entrecruzante usado neste trabalho foi o Trietileno Glicol Dimetacrilato (TEGDMA, 90%) e a sua razão para o monômero foi de 1:300 de acordo com estudo o anterior. O sistema catalítico foi composto pelo acelerador, TEMED e pelo iniciador SPS, com as razões de 1:30 e 1:300 em relação ao total de monômero, respectivamente. As composições estudadas são mostradas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Proporção entre os reagentes utilizados na síntese dos criogéis do sistema HEMA/DMAEMA.

	25%	25% HEMA	50%	50% HEMA	75%	75% HEMA
Reagente	HEMA	+ 5%TCP	HEMA	+ 5%TCP	HEMA	+ 5%TCP
DMAEMA	7,5	7,5	5	5	2,5	2,5
HEMA	2,5	2,5	5	5	7,5	7,5
TEGMA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
SPS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Água	89,6	89,6	89,6	89,6	89,6	89,6
Gelatina	-	1	-	1	-	1
α-TCP	-	5	-	5	-	5

4.4. Caracterização dos Pós Obtidos Via Síntese de Combustão

As seguintes técnicas foram utilizadas para caracterizar os pós obtidos via reação de combustão antes e após o tratamento térmico tanto no estudo do pH, quanto no estudo do combustível utilizado.

4.4.1. Difração de Raios X

Por meio desta técnica foi possível analisar as fases cristalinas obtidas. Foi utilizado para esta análise o Difratorômetro Phillips X'Pert MPD com tubo de cobre (radiação K_{α} = 1,5418 Å). A tensão e a corrente utilizadas no tubo foram 40 KV e 40 mA, respectivamente, para a obtenção dos difratogramas. O difratômetro utilizado possui geometria $\theta - \theta$. A velocidade de varredura do goniômetro foi de 0,05°/s, sendo o intervalo de varredura de 10° a 75°. Para a realização deste ensaio os pós foram compactados em um porta-amostras utilizando-se de um peso padrão (o conjunto acompanha o difratômetro da Phillips).

Através dos difratogramas de raios-X foi possível determinar ainda o tamanho de partícula empregando-se a Equação de Scherrer (Equação 4.3).

$$d_{Scherrer} = \frac{k}{\lambda \cdot \cos \theta} \quad (\text{Equação 4.3})$$

em que $d_{scherrer}$ é o diâmetro médio de cristalito; k é a constante de proporcionalidade que depende da forma das partículas, assumida como sendo esférica (0,9); λ é o comprimento de onda da radiação do Cu (1,5406 Å) e β é a largura à meia altura do pico.

4.4.2. Espectroscopia de Infravermelho

Esta técnica é utilizada como complemento à técnica de difração de raios X, sendo que esta detecta as frequências de vibração das ligações químicas no sólido. Nesta técnica, as amostras foram caracterizadas num intervalo de 500 a 4000 cm^{-1} em um espectrômetro *Spectrum 1000* do Laboratório de Polímeros - Escola de Engenharia - UFRGS. Para tanto, fez-se necessária a confecção de uma pastilha envolvendo o pó em questão e uma porcentagem de KBr de grau espectroscópico na proporção de 0,3 mg de pó para 300 mg de KBr.

4.4.3. Difração de Laser (Granulometria)

A análise da distribuição de tamanho de partículas utilizado no trabalho foi feita utilizando-se difração de laser. Tal técnica analisa a maneira como o laser difrata quando uma partícula o atravessa, calculando assim, o tamanho da partícula. Para uma medição correta as partículas devem estar bem dispersas, sendo a escolha do fluido para a análise muito importante. A faixa de detecção do aparelho é de 0,04 a 2500 μm .

As medidas foram feitas em um difratômetro de laser *Cilas 1180*. O fluido escolhido para a análise foi etanol. Para uma melhor dispersão, se utilizou baixa concentração de amostra e foi usado ultra-som por 60 segundos para dispersão.

4.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão da marca *Jeol* Modelo *JEM 2010*. Para a preparação da amostra a ser analisada, colocou-se uma ponta de espátula do pó de α -fosfato tricálcico em 1mL de álcool isopropílico, dentro de um tubo do tipo *eppendorf*, então colocou-se em ultra-som por 10 minutos para que ocorresse a dispersão das partículas. Após o ultra-som pingou-se uma gota da suspensão na grade metálica (porta amostra) a ser analisada.

4.4.5. Espectroscopia de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersa (EDX)

O espectrômetro de fluorescência de raios-X é um instrumento que determina quantitativamente os elementos presentes em uma determinada amostra. Isto é possível através da aplicação de raios X na superfície da amostra e a posterior análise dos fluorescentes raios X emitidos. Tal análise teve como objetivo calcular a razão cálcio/fósforo nos pós obtidos e após o tratamento térmico. Os materiais analisados foram prensados e recobertos com uma camada fina grafite via *sputtering*.

4.4.6. Adsorção de Nitrogênio (BET)

A área superficial específica dos pós sintetizados foi determinada pelo modelo de Braunauer, Emmet e Teller (BET) a partir de isotermas de adsorção. O equipamento utilizado foi o Autosorb Quantachrome (Modelo Nova 1200). Este instrumento calcula a área da superfície total da amostra através do nitrogênio adsorvido (em m²), a partir do volume de gás adsorvido (V) em função da pressão relativa (P/P₀) da amostra. A área superficial específica é medida e então dividida pelo peso total da amostra testada (g), obtendo-se um resultado em (m²/g). O diâmetro aproximado de tamanho de partículas foi calculado pela área específica, utilizando-se a área superficial específica, usando-se a Equação 4.4:

$$d_{BET} = \frac{6}{S_{BET}} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Onde, S_{BET} é a área superficial específica (m²/g) e ρ é a densidade teórica do pó. Essa equação assume que as partículas são esféricas.

4.5. Caracterização dos Cimentos de Fosfato de Cálcio

4.5.1. Tempo de Pega

Para a obtenção das medidas de tempo de pega dos cimentos hidráulicos à base de fosfato de cálcio construiu-se um aparato com as dimensões e pesos propostos pela norma

ASTM C266 – 89 – *Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic – Cement Paste by Gillmore Needles*. Para as medidas de tempo de pega preparou-se uma pasta com razão líquido/sólido de 0,4 mL/g para as amostras moídas por 30 e 60 minutos e 0,35 mL/g para as amostras moídas por 180 minutos. O tempo inicial de pega é o tempo necessário para que a primeira agulha de Gillmore, com massa de 113,4 gramas, penetre na amostra sem deixar marca considerável. Já o tempo final de pega é o tempo necessário para que a segunda agulha de Gillmore, com massa de 453,6 gramas, penetre na amostra sem deixar marca considerável.

4.5.2. Absorção de água, Densidade e Porosidade Aparente

O procedimento para o cálculo da absorção de água, porosidade e densidade aparentes baseou-se na norma internacional ASTM C 20 (*Standard test methods for apparent porosity, water absorption, apparent specific gravity, and bulk density of burned refractory brick and shapes by boiling water*) através da determinação da massa da amostra seca e das massas úmida e imersa. Este método é baseado no princípio de Arquimedes.

Para a realização da pesagem das amostras imersas e úmidas, foi necessário que os corpos-de-prova permanecessem imersos em água um período de tempo de 24h. Para a realização do peso imerso, utilizou-se o princípio de Arquimedes, de deslocamento de um fluido determinando-se o mesmo. Mediu-se o peso seco (P_s), peso úmido (P_u) e o peso imerso em água (P_i) e aplicando as Equações 4.5 a 4.7, calculou-se a Absorção de Água (AA), a Porosidade Aparente (PA) e a Densidade Aparente (DA), respectivamente.

$$A.A = \frac{P_u - P_s}{P_s} \quad \text{(Equação 4.5)}$$

$$P.A = \frac{P_u - P_s}{P_u - P_i} \times 100 \quad \text{(Equação 4.6)}$$

$$D.A = \frac{P_s}{P_u - P_i} \times \rho_L \quad \text{(Equação 4.7)}$$

onde, ρ_L é a densidade do meio líquido. Para o cálculo da porosidade e densidades aparente foram utilizados 10 corpos-de-prova conformados. A massa seca foi determinada

após secagem dos corpos-de-prova por um período de tempo não inferior a 24h em estufa a 100°C, imediatamente após sua desmoldagem.

4.5.3 Resistência Mecânica à Compressão

Para a determinação da resistência mecânica à compressão, os corpos-de-prova foram previamente submetidos a uma análise visual direta, com o intuito de verificar a sua integridade e acabamento superficial após sua extração dos moldes. Por critério de exclusão, foram descartados os corpos-de-prova que apresentassem defeitos visíveis como quebras, bolhas ou falta de preenchimento. Foram selecionados 6 corpos-de-prova sem defeitos superficiais visíveis.

Para a avaliação da resistência mecânica à compressão, foi utilizada uma máquina universal de ensaios ATS, modelo 1105 C a uma velocidade da travessa de 0,1mm/min, colocando-se pedaços de papel de filtro umedecidos nas interfaces das superfícies de contato (superior e inferior) dos corpos-de-prova com as travessas da máquina de ensaios para obter-se uma melhor acomodação dos mesmos.

Com o ensaio de resistência mecânica pôde-se determinar a carga máxima necessária para o cálculo da resistência mecânica dos corpos-de-prova. A resistência mecânica a compressão é dada pela tensão de ruptura última do corpo-de-prova, que é dependente da força atuante na área efetiva da seção reta do corpo-de-prova.

A resistência mecânica à compressão foi calculada de acordo com a Equação 4.8, mostrada abaixo.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (\text{Equação 4.8})$$

onde σ é a tensão de ruptura (MPa), F é a força (N) necessária para a fratura e A é a área da seção reta dos corpos-de-prova (mm²).

4.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise por microscopia teve como objetivo auxiliar as investigações das características microestruturais dos materiais investigados. A microestrutura pode ser considerada uma ponte entre o processamento cerâmico e as propriedades tecnológicas de

interesse presentes no corpo cerâmico. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um equipamento marca *JEOL*[®], modelo JSM-6060. As amostras analisadas sofreram a aplicação de uma camada fina de ouro via *sputtering*.

4.5.5 Determinação do pH

As medidas de pH foram realizadas com um medidor de pH digital marca comercial DIGIMED®, modelo DM-20, a temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O pH é um dos principais fatores de influência nas propriedades reológicas de massas plásticas cerâmicas. Um cimento ósseo requer um rígido controle do pH, pois sua variação pode desencadear uma série de problemas ao local de enxerto, e ao corpo humano como um todo.

Entre os principais parâmetros que afetam a variação de pH durante a cura do cimento, pode-se citar a composição química do cimento, o tamanho relativo das partículas do cimento, o uso de aceleradores ou retardadores e sua concentração relativa, a razão líquido/pó e a temperatura. No entanto, o pH do cimento é o principal fator controlador das concentrações de Ca e P na solução de cimento, afetando as taxas da reação de cura.

4.6 Caracterização dos Criogéis

A síntese e caracterização dos criogéis foi realizada durante estágio de doutorado sanduíche realizado no *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC) em Madrid, Espanha. Por essa razão algumas análises foram feitas em equipamentos diferentes das análises anteriores.

4.6.1 Densidade Aparente

Para o cálculo da densidade aparente utilizou-se a Equação 4.4. Assim como para os cimentos de fosfato de cálcio, utilizou-se o método de Arquimedes para medir a densidade aparente dos criogéis, porém ao invés de utilizar água como meio líquido, utilizou-se etanol. Para cada cálculo foram utilizados 6 corpos-de-prova. A massa seca foi determinada antes da imersão.

4.6.2 Densidade Real

O cálculo da densidade real foi realizado utilizando-se a técnica de pícnometria de hélio, utilizando-se um equipamento Micromeritics Accupyc 1330. Para tal, os criogéis foram triturados na forma de pó para possibilitar a medida.

4.6.3 Porosidade Total

Para a medição dos valores de porosidade total dos criogéis sintetizados utilizou-se o valor da densidade aparente, ρ_{aparente} , e dividiu-se pelo valor da densidade real, ρ_{real} , (medido por picnometria de hélio), como mostrado na Equação 4.9.

$$P = \left(\frac{\rho_{\text{aparente}}}{\rho_{\text{real}}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 4.9})$$

4.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise por microscopia teve como objetivo analisar a microestrutura dos criogéis obtidos, permitindo a medição do tamanho de poros e a verificação da morfologia destes. Também foi possível verificar a incorporação dos cimentos de fosfato de cálcio nos criogéis reforçados com a fase cerâmica. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um equipamento marca *Philips* modelo XL30ESEM. Este equipamento permitiu a análise dos materiais sem a necessidade de um revestimento com um metal condutor.

4.6.5 Espectroscopia de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersa (EDX)

O espectrômetro de fluorescência de raios X foi utilizado para confirmar a incorporação do α -fosfato tricálcico na matriz polimérica dos criogéis. Para essa análise utilizou-se um equipamento da marca EDAX com janela SUTW (*super ultra thin window*) equipado com o *software* Genesis.

Este equipamento determina quantitativamente os elementos presentes em uma determinada amostra. Isto é possível através da aplicação de raios X na superfície da amostra

e a posterior análise dos fluorescentes raios X emitidos. Tal análise teve como objetivo calcular a razão cálcio/fósforo nos pós obtidos e após o tratamento térmico. Os materiais analisados foram prensados e recobertos com uma camada fina grafite via *sputtering*.

4.6.6. Distribuição de Tamanho de Poros

A distribuição de tamanho de poros foi medida utilizando o *software* analisador de imagens *Image Tool*[®]. Tal *software* mede o tamanho dos poros utilizando como referência uma barra de comprimento conhecido em imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para se efetuar a distribuição de tamanho de poros mediu-se pelo menos 50 poros para cada amostra.

4.6.7. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (¹³C-RMN)

É uma técnica de caracterização que investiga a nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria. Ela permitiu ver a estrutura e a taticidade dos copolímeros obtidos. Os criogéis foram dissolvidos em clorofórmio deuterado (CHCl₃) e enviados para análise em um equipamento da marca Bruker 300MHz.

4.6.8. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Visando caracterizar os grupos funcionais presentes nos criogéis, utilizou-se a técnica de FTIR-ATR. Esta técnica se utiliza de ondas eletromagnéticas com comprimento de onda na região do infravermelho que interagem com os sólidos e permitem a detecção das frequências de vibração das ligações químicas no sólido. A diferença da técnica de refletância total atenuada é que ao contrário da técnica de FTIR, onde as ondas têm que atravessar uma pastilha quase transparente de KBr, ela analisa as ondas refletidas, o que permite a análise de sólidos ou líquidos e retira a necessidade de preparação de amostras, podendo-se utilizar a amostra na maneira como ela estiver.

Utilizou-se um equipamento *Spectrum 100 – PerkinElmer* com o acessório *Universal ATR Sampling Accessory* da *Perkin Elmer*.

4.6.9. Análise Termogravimétrica (ATG)

Com o objetivo de avaliar as propriedades térmicas dos polímeros e dos compósitos utilizou-se a técnica de ATG. O programa de execução da análise seguiu uma taxa de aquecimento de 10°C/min até a temperatura de 500°C em atmosfera de nitrogênio. A termobalança usada foi da marca comercial *TA Instrument*, modelo: TGA-Q-500.

4.6.10. Inchamento

Criogéis secos foram incubados em uma solução tampão fosfato salino, ou *phosphate buffered saline* (PBS) com pH controlado de 7,4 à temperatura de 37°C por até 21 dias para medir o inchamento máximo das composições assim como testá-los quanto a degradação *in vitro*. Para isso comparou-se o peso seco das amostras com o peso após um determinado período de tempo. Esse peso corresponde à água absorvida pelo criogel. Os experimentos de inchamento também foram realizados em soluções tampões de pH básico, neutro e ácido. Os pH medidos foram 2, 7 e 10. O objetivo foi medir a sensibilidade ao pH do sistema HEMA/DMAEMA.

A partir dos resultados de inchamento, foi possível calcular diversos parâmetros de rede estruturais dos criogéis como o quociente de equilíbrio de inchamento (ESR – *Equilibrium Swelling Rate*), mostrado na Equação 4.10.

$$Q = \frac{m_e}{m_s} \quad (\text{Equação 4.10})$$

Onde, Q é o quociente de equilíbrio de inchamento, m_e é a massa do criogel no equilíbrio de inchamento e m_s é a massa do criogel seco.

Outro parâmetro de rede que pode ser calculado a partir das medidas de inchamento é o valor médio de peso molecular entre ligações entrecruzadas (M_c), o qual pode ser expresso pela equação de Flory – Rehner, mostrada na Equação 4.11.

$$M_c = - \frac{(1 - 2 /) V_1 (V_{2s})^{\frac{2}{3}} (v_{2r})^{\frac{1}{3}}}{v (\ln(1 - V_{2s}) + V_{2s} + V_{2s}^2)} \quad (\text{Equação 4.11})$$

Já a fração volumétrica do polímero inchado foi calculada a partir da Equação 4.12.

$$V_{2s} = \frac{1}{\left[1 + \frac{\rho}{s} \left(\frac{W_s}{W_d} - 1 \right) \right]} \quad (\text{Equação 4.12})$$

Nas Equações 4.11 e 4.12, ρ_p e ρ_s são as densidades dos polímeros e do solvente, respectivamente. A densidade dos polímeros foi determinada por picnometria de hélio e a densidade do solvente foi utilizada a densidade da água (1,0 g/ml). W_s e W_d são as massas do polímero antes e depois do inchamento. V_1 é o volume molar do solvente (18,0 ml/mol) e v é o volume específico do polímero e V_{2r} é a fração volumétrica do polímero no estado relaxado, porém antes do inchamento. \emptyset corresponde a funcionalidade do agente entrecruzante, o TEGMA possui quatro grupos funcionais que permitem a formação de ligações entrecruzadas (PENICHE et al., 1996). χ é o parâmetro Flory-Huggins de interação polímero/solvente, cuja equação utilizada para o cálculo é mostrada na Equação 4.13.

$$\chi = \frac{1}{2} + \frac{V_{2s}}{3} \quad (\text{Equação 4.13})$$

Mais um parâmetro a ser considerado é o M_r , massa molar da unidade repetitiva, o qual é definido pela Equação 4.14 (UZUN et al., 2003).

$$M_r = \frac{m_{HEMA} M_{HEMA} + m_{DMAEMA} M_{DMAEMA}}{m_{HEMA} + m_{DMAEMA}} \quad (\text{Equação 4.14})$$

Aqui, m_{HEMA} e m_{DMAEMA} são as massas dos monômeros, enquanto que M_{HEMA} e M_{DMAEMA} correspondem à massa molar dos monômeros utilizados.

Outro parâmetro significativa para a caracterização de polímeros entrecruzados é a densidade de ligações entrecruzadas, V_x , que pode ser calculada relacionando-se o peso molecular entre ligações entrecruzadas com a densidade do polímero, através da Equação 4.15 (GARLAND et al., 2011).

$$v_x = \frac{\rho_p N_A}{M_c} \quad (\text{Equação 4.15})$$

Onde ρ_p é a densidade do polímero, N_A é o número de Avogrado ($6,023 \times 10^{23}$) e M_c é o peso molecular entre ligações entrecruzadas.

O Tamanho da rede, ξ , o qual é um termo que descreve o espaço disponível para o transporte de soluto entre a rede polimérica, também é um parâmetro importante para a análise de polímeros entrecruzados e é calculado de acordo com a Equação 4.16 (UZUN et al., 2003), a qual é descrita em mais detalhes por Canal e Peppas (1989).

$$= v_{2s}^{-1/3} \left(\frac{2M_c}{M_r} \right)^{1/2} C_n^{1/2} \ell \quad (\text{Equação 4.16})$$

Onde C_n é a razão característica dos monômeros e corresponde a 7,0 para o DMAEMA e 6,9 para o HEMA (UZUN et al., 2003), já ℓ corresponde ao comprimento da ligação C-C, 1,54Å.

É possível relacionar o valor calculado de peso molecular entre ligações entrecruzadas com o módulo elástico do hidrogel em seu estado de equilíbrio, G' , através da Equação 4.17.

$$G' = \frac{(1 - 2/\nu) RT V_{2r}^{2/3} V_{2s}^{1/3}}{M_c} \quad (\text{Equação 4.17})$$

4.6.11. Reologia

As propriedades reológicas foram estudadas utilizando um reômetro de pratos paralelos da marca *Thermal Analysis*, modelo TA AR2000. Os pratos eram de aço inox e possuíam 20 mm de diâmetro. Foram feitas varreduras de deformação e a frequência foi fixada em 0,5 Hz, a distância entre os pratos foi ajustada pela força normal aplicada à amostra e essa era ajustada para 1 N. As amostras eram medidas inchadas e foram imersas em água destilada 24 horas antes de cada medida para que atingissem o equilíbrio.

4.7. Ensaio *In Vitro* dos Cimentos de Fosfato de Cálcio

Os ensaios *in vitro* foram feitos por imersão em SBF. Foram produzidos 36 blocos, os quais foram divididos em grupos de 6 e imersos em SBF por tempos crescentes de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A troca da solução de SBF se deu a cada 3 dias. A composição do SBF se encontra na Tabela 4.7.

Antes da imersão dos blocos na solução de SBF, eles foram pesados e tiveram as suas dimensões avaliadas para calcular a porosidade aparente pelo método de Arquimedes. Também foi medido o pH da solução de SBF após cada tempo de imersão. As fases cristalinas também foram avaliados para cada tempo de imersão, por difração de raios x.

Tabela 4.7. Composição iônica do SBF.

	Concentração de íons (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5

4.8. Ensaio Celulares

4.8.1. Difusão em Agar

Para os ensaios de citotoxicidade pelo método de difusão em agar foram utilizados como referência os métodos ASTM F895-84 – “Standard Test Method for Ágar Diffusion Cell Culture Screening for Citotoxicity”, ISO 10993-5 “Biological Evaluation of Medical Devices – Tests for Cytotoxicity: *In Vitro* Methods” e US Pharmacopeia XXII – “Biological Reactivity Tests *In Vitro*”. A linhagem celular utilizada para a avaliação do potencial de citotoxicidade foi a NCTC Clone 929 de tecido conjuntivo de camundongo (CCL1-ATCC-USA). As células foram semeadas em placa de Petri e incubadas por 48 horas. O meio de cultura líquido foi, então, substituído pelo meio de cobertura sólido, que é composto de partes iguais de meio concentrado (2 vezes) e ágar acrescidas de vermelho neutro. As amostras de cimento de fosfato de cálcio no formato de cilindros de 0,5 cm de diâmetro por 0,5 cm de altura e esterilizados a 120°C em estufa a seco foram, então, colocadas sobre o meio de cultura sólido, e as placas, incubadas por 24 horas.

O controle positivo utilizado foram fragmentos de 0,5cm x 0,5 cm de látex tóxico e o controle negativo, discos de papel de filtro atóxico com 0,5 cm de diâmetro. Observou-se o índice de zona (IZ), que é a área não corada pelo corante vital. O índice permite o cálculo do índice de resposta (IR). As amostras foram testadas em quadruplicatas em placas separadas. Para a determinação do índice de zona (IZ) foram utilizados os critérios apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Critérios de avaliação do índice de zona.

Índice de Zona (IZ)	Descrição	Classificação
0	Nenhuma Zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
1	Zona limitada sob a amostra	Leve
2	Zona menor que 0,5 cm ao redor da amostra	Suave
3	Zona entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona maior que 1,0 cm sem envolver toda a placa	Moderada - Grave
5	Zona que envolve toda a placa	Grave

4.8.2 Isolamento das Células Tronco Mesenquimais

As células tronco mesenquimais foram obtidas da bacia ilíaca de pacientes com a autorização de cada paciente, de acordo com as normas do comitê de ética local. O extrato de células tronco mesenquimais (CTM) derivadas de osso poroso foram obtidos lavando o osso proveniente da bacia ilíaca com uma solução de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) obtido da empresa Gibco BRL, Life Technologies, Barcelona, Espanha, contendo 5% (v/v) de soro de feto bovino (FBS), utilizando-se uma seringa de 20mL com uma agulha de gauge 19. Depois se filtrou a suspensão celular utilizando-se filtros de náilon e se filtrou a suspensão a 1500 rpm por 8 minutos. Então, colocou-se 1×10^5 células em um frasco de cultura celular e suplementou-se a cultura celular com 20% (v/v) de FBS e penicilina e estreptomicina, em ambiente com atmosfera controlada contendo 5% de gás carbônico a 37°C. Finalmente, após 48 horas removeram-se as células não aderentes e se tratou as células tronco mesenquimais com uma solução de tripsina-EDTA.

4.8.3. Culturas Celulares

Para a realização dos ensaios com culturas celulares, se esterelizou os criogéis selecionados para esta etapa com irradiação ultravioleta de um dia para o outro. Posteriormente, as amostras foram hidratadas utilizando o meio de cultura e se cortou as amostras em discos com 6 mm de diâmetro e se colocou os discos individualmente em placas de cultivo celular contendo 24 poços. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo utilizadas amostras de controle, na qual o meio celular foi colocado em contato com os poços vazios. Cada disco foi completamente coberto por 1mL do meio de proliferação celular, sendo que foram inseridas 2×10^5 células por poço. Posteriormente, as placas de cultura foram incubadas a 37°C com atmosfera controlada contendo composição de 95% de ar e 5% de gás carbônico e umidade de 95%.

4.8.4. Alamar Blue™

Após de 96 horas nos meios de cultura, a viabilidade celular foi testada utilizando o ensaio de Alamar Blue™, utilizando-se osteoblastos e células tronco mesenquimais, ambas de origem humana, para a verificação da viabilidade e proliferação celular. Para este ensaio primeiramente se retirou o meio de proliferação das células que estava em contato com os criogéis e dos poços de controle e se substituiu por uma solução diluída a 10% de Alamar Blue™ e as amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C protegidas da luz direta. Então, leu-se a absorbância no comprimento de onda de 570 nm, se utilizando o comprimento de onda de 600 nm como referência, para finalmente determinar-se o percentual de corante reduzido, parâmetro que indica a proliferação e viabilidade celular dos criogéis.

4.8.5 Análise Histoquímica de Hematoxilina-Eosina

Primeiramente se fixou os criogéis secos contendo as culturas celulares em parafina e foram feitos cortes de 4 µm com auxílio de um micrótomo. Removeu-se a parafina com aplicação de calor por 30 minutos a 60°C em uma estufa, então se colocou a amostra em xilol por 10 minutos e se passou as amostras por um processo de hidratação em álcool etílico de diversas concentrações decrescentes até a utilização de água destilada e deionizada para a

hidratação completa da amostra. Na próxima etapa se tratou as amostras com Hematoxilina de Harris (Merck, Alemanha) por 5 minutos e se lavou as amostras com uma solução de álcool ácido, seguido de água corrente. Então se aplicou a Eosina por 5 minutos, seguido de lavagem com etanol até completa desidratação (em estufa) e se tratou com Xilol (Merck, Alemanha) até a amostra ficar totalmente clara. Finalmente se observou as amostras em um microscópio ótico.

4.8.6 Imunodeteção de Colágeno do Tipo I

O procedimento inicial de preparação das amostras é igual ao utilizado para a análise histoquímica de hematoxilina-eosina. Primeiramente se fixou os criogéis secos contendo as culturas celulares em parafina e foram feitos cortes de 4 μm com auxílio de um micrótomo. Removeu-se a parafina com aplicação de calor por 30 minutos a 60°C em uma estufa, então se colocou a amostra em xilol por 10 minutos e se passou as amostras por um processo de hidratação em álcool etílico de diversas concentrações decrescentes até a utilização de água destilada e ionizada para a hidratação completa da amostra. Então se lavou as amostras com solução salina de fosfato (PBS) e se fez o pré-tratamento enzimático com 10 μL de proteinase K (DAKO, Espanha) e se incubou as amostras por 10 minutos. Lavou-se novamente as amostras com PBS e se utilizou 100 μL de solução bloqueadora de peroxidase por 10 minutos e em seguida lavou-se as amostras por 10 minutos em PBS. Então, as amostras foram incubadas com 100 μL de anticorpo primário anticolágeno tipo I, proveniente de ratos (Abcam, Espanha) e lavou-se as amostras 3 vezes com PBS. Logo, as amostras foram incubadas por 1 hora com 100 μL de anticorpo secundário anticolágeno tipo I, proveniente de ratos (Abcam, Espanha) e lavou-se as amostras 3 vezes com PBS. Durante a última lavagem preparou-se a solução cromófora contendo uma solução tampão de pH 7,5, contendo peróxido de Hidrogênio (Merck, Alemanha) e diaminobenzidina (DAKO, Espanha) na proporção de 1:50. seguido de lavagem com etanol até completa desidratação (em estufa) e se tratou com Xilol (Merck, Alemanha) até a amostra ficar totalmente clara. Finalmente se observou as amostras em um microscópio ótico.

4.8.7 Detecção de Fosfatase Alcalina

Primeiramente fixou-se os criogéis secos contendo as culturas celulares em parafina e foram feitos cortes de 4 μm com auxílio de um micrótomo. Removeu-se a parafina com aplicação de calor por 30 minutos a 60°C em uma estufa, então se colocou a amostra em xilol por 10 minutos e se passou as amostras por um processo de hidratação em álcool etílico de diversas concentrações decrescentes até a utilização de água destilada e ionizada para a hidratação completa da amostra. Posteriormente, se fixou as células à temperatura ambiente em uma solução ácida contendo 2% de ácido acético e lavou-se as amostras diversas vezes com etanol e foram secas em estufa. No próximo passo, os criogéis foram expostos por 5 minutos a uma solução contendo fosfato de naftol AS-MX (Sigma-Aldrich, Alemanha) como substrato e o sal *Fast Violet B* (Sigma-Aldrich, Alemanha) como agente acoplante. Após novos processos de lavagem e tratamento com xilol para o clareamento as amostras foram observadas no Microscópio Ótico.

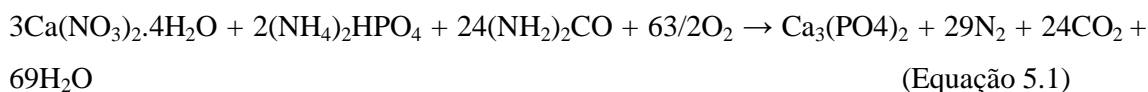
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reações de Combustão em Solução

Utilizou-se a técnica de reação de combustão em solução para a síntese de α -fosfato tricálcico. Foram realizados dois estudos fundamentais: a influência do pH e a influência do teor e tipo de combustível tanto na formação das fases, quanto na morfologia e tamanho de partículas.

5.1.1 Estudo da Influência do pH

As reações foram realizadas contando com excesso de combustível de oito vezes o valor estequiométrico. Nesse estudo variou-se a quantidade de ácido ou base adicionado à reação, porém eles não foram levados em conta na reação química nem nos cálculos termodinâmicos.



Utilizando-se as Equações 4.1 e 4.2, calculou-se entalpia de formação, a temperatura adiabática de chama, o número total de gases liberados e a razão molar entre gases e reagentes. Esses dados são mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Informações termodinâmicas da reação de síntese de combustão.

Entalpia de Formação (kcal/mol)	Temperatura adiabática de chama (°C)	Número total de gases liberados (mol)	Razão molar de gases por reagentes (mol/mol)
-3037.20	2837.65	122	4.21

As reações de combustão são geralmente altamente exotérmicas, então a entalpia de combustão é fortemente negativa. A temperatura de chama adiabática das reações, por sua vez, é influenciada pelo tipo de combustível, razão combustível-oxidante, e pela quantidade de água remanescente na solução precursora no momento da temperatura de ignição (TONIOLO, BONADIMANN et al., 2005). Entretanto, as temperaturas medidas são muito

menores do que os valores teóricos devido à perdas por radiação, aquecimento do ar e combustão incompleta (TONIOLO; BONADIMANN et al., 2005).

Devido ao excesso de combustível nas reações do estudo do pH (oito vezes o valor estequiométrico) uma grande quantidade de gases são liberados, sendo o valor calculado de 122 mols. Já a razão molar de gases liberados por mol reagentes é de 4,21.

Quando se mistura o nitrato de cálcio tetra-hidratado e o fosfato de amônio bibásico, ocorre a formação de um precipitado branco. Visto que a razão cálcio fósforo dos reagentes iniciais é ajustada para 1,5 (valor estequiométrico do α -fosfato tricálcico) espera-se que a fase precipitada seja fosfato de cálcio amorfo (FCA) de fórmula $\text{Ca}_x(\text{HPO}_4)_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, onde n é um número entre 3,0 e 4,5 (DOROZHKIN, 2009). Quando se adicionou hidróxido de potássio, a solução ganhou um aspecto leitoso, devido ao aumento do pH e conseqüente decréscimo da solubilidade. Por outro lado, a adição de um valor predeterminado de ácido nítrico levou à diminuição do pH, aumentando a transparência da solução. Quanto maior a concentração de ácido nítrico, maior a transparência da reação. Possivelmente, as mudanças no pH levam à conversão do fosfato de cálcio amorfo em bruxita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), que é a fase mais estável em pHs abaixo de 4,2 (DOROZHKIN, 2009).

A Figura 5.1 mostra difratogramas de raios X dos produtos da reação de combustão como obtidos. Nota-se a presença de produto amorfo no pó sintetizado antes do tratamento térmico. Com o decréscimo do valor do pH, ocorreu um aumento na intensidade dos picos obtidos, indicando o aumento da cristalinidade dos pós obtidos. Apesar da natureza altamente amorfa das reações é possível indicar alguns picos correspondentes à algumas fases. Nos difratogramas das amostras pH 6,4 e pH5,0 é possível identificar a presença de hidroxiapatita (ICDD 01-084-1998) e de carbonato de cálcio (ICDD 01-081-2027). Nas amostras pH 2,8, pH1,9 e pH1,5 exibem as mesmas fases com a adição da fase alfa do pirofosfato de cálcio (α - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (ICDD 01-073-0440), sendo que a intensidade dos picos dessa fase aumentou com a diminuição do pH.

A presença o carbonato de cálcio pode ser explicada pela reação de combustão incompleta da uréia devido ao excesso de combustível utilizado nas reações e a conseqüente falta de agentes oxidantes. Além disso, o grande volume de gases liberados reduz a temperatura de chama e faz com que a chama seja fraca.

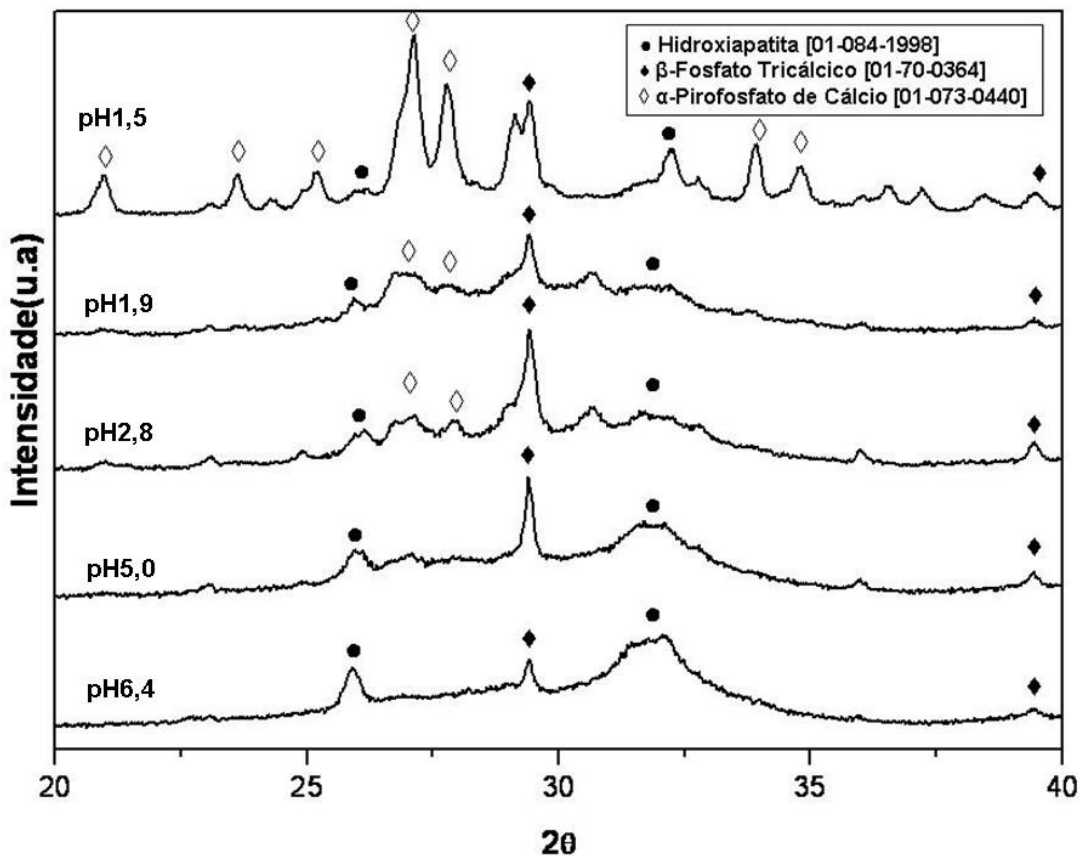


Figura 5.1. Padrões de difração de raios X do produto da reação de combustão como sintetizado. O valor dos pHs das reações é mostrado à esquerda.

Visando auxiliar na identificação das fases obtidas na síntese de combustão, mediu-se a razão Cálcio/Fósforo dos pós obtidos utilizando-se a técnica de Espectroscopia de fluorescência de energia dispersiva de raios X. Sabe-se que a técnica possui um erro razoavelmente grande para as medidas, porém no caso de diferenças muito grandes nos valores calculados da razão cálcio/fósforo é possível afirmar a presença de um composto ou outro.

A Figura 5.2 mostra o espectro de mapeamento da amostra pH 1,5, como sintetizada para os elementos cálcio, fósforo e oxigênio. As regiões mais claras indicam maior concentração de um elemento, enquanto regiões mais escuras indicam regiões com pouca quantidade deste elemento. Percebe-se uma grande heterogeneidade na intensidade dos elementos, o que indica a presença de diferentes concentrações do determinado elemento e conseqüentemente permite aferir a presença de mais de uma fase no pó obtido. A Tabela 5.2 mostra a concentração de cada elemento, em átomos, nos pontos indicados na micrografia obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da Figura 5.2. Os pontos 1 e 2 estão

localizados em regiões no mapa onde a concentração de Ca é relativamente alta, quando comparada com ele mesmo, e a de P é baixa. Os valores calculados da razão Ca/P foram de 1,71 e 1,67, o que indica que a fase predominante nestas regiões é a hidroxiapatita. Já os pontos 3 e 4 estão localizados em regiões no mapa onde a concentração de Ca é relativamente mais baixa e a de P é mais alta. Os valores correspondentes a cada ponto são de 1,01 e 0,98, respectivamente, indicando que nessas regiões a fase predominante é pirofosfato de cálcio.

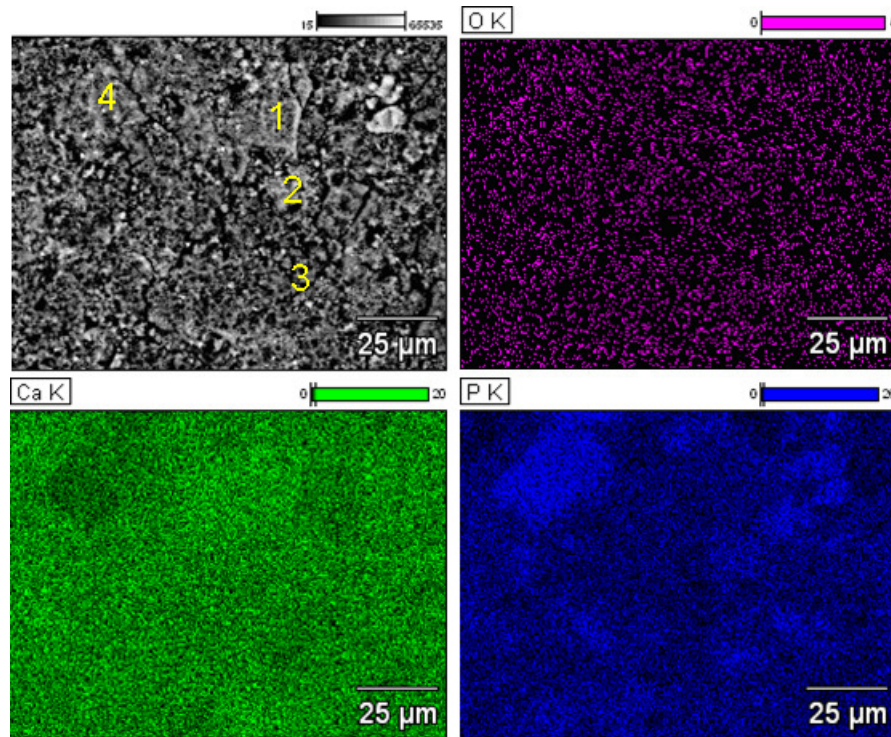


Figura 5.2. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura e o mapeamento elementar por EDX para os elementos oxigênio, cálcio e fósforo para a amostra pH1,5 sem tratamento térmico.

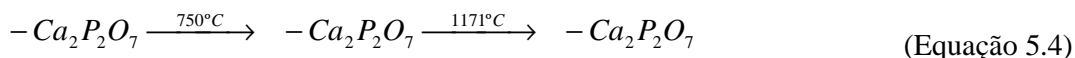
Tabela 5.2. Concentração atômica medida por EDX e razão Ca/P para a amostra pH 1,5 antes do tratamento térmico.

Ponto	Concentração Atômica		
	Cálcio(%)	Fósforo (%)	Ca/P
1	29,89	17,48	1,71
2	26,47	15,89	1,67
3	22,08	21,84	1,01
4	23,42	23,79	0,98

Hidroxiapatita é o fosfato de cálcio mais estável em pHs ao redor de 4,2 (DOROZHKIN, 2009). De acordo com Ferreira et al. (2003) em experimentos realizados em valores de pH maiores do que 4,2 (no caso do nosso estudo valores de pH6,4 e pH5,0), é esperado que a fase precipitada seja hidroxiapatita. Entretanto, para valores de pH abaixo de 4,2, a tendência é que haja a formação de bruxita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a qual tende a se desidratar com o aumento da temperatura e se transformar em monetita (DCPA) a 170°C (BIAN et al., 2003), conforme mostrado na Equação 5.4.



A reação entre duas moléculas de DCPA pode levar à formação de pirofosfato de cálcio (BIAN et al., 2003), como mostrado na Equação 5.3. O pirofosfato de cálcio existe em 3 formas diferentes em função da temperatura (SANTOS et al, 2005), como mostrado na equação 5.4. A presença de $\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ indica que a reação de combustão atingiu temperatura superior a 1171°C , mesmo com o grande volume de gases desprendido durante a reação de combustão que tende a diminuir a temperatura de chama.



A Figura 5.3 mostra os espectrogramas obtidos por Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier dos pós obtidos sem o tratamento térmico.

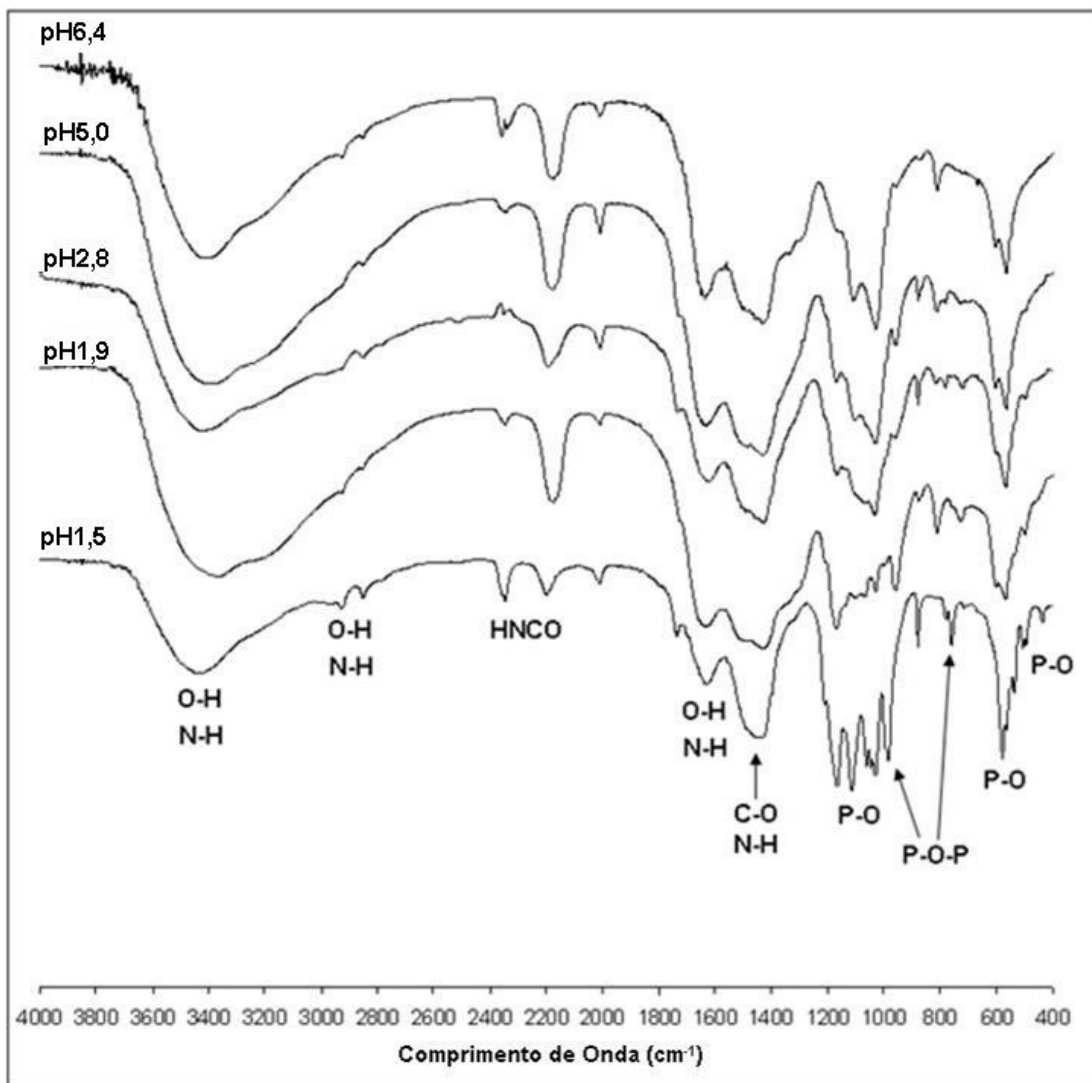


Figura 5.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier do material obtido pela reação de combustão.

Em todas as amostras é possível verificar a presença de uma banda larga na região entre 3700 a 3000 cm^{-1} devido ao estiramento do grupo OH das moléculas de água provenientes da umidade, além dos grupos NH_3 residuais derivados da combustão incompleta da uréia. Os ombros que podem ser vistos ao redor de 2950 e 2850 cm^{-1} podem ser atribuídos ao modo de estiramento das ligações O-H e N-H, respectivamente. H_2O e NH_3 aparecem novamente nos picos pequenos na região ente 1700 e 1550 cm^{-1} . Os picos entre 2300 e 2100 cm^{-1} podem indicar a presença de ácido cianico (HCNO) residual como outro produto da combustão incompleta da uréia (SCHABER et al., 2004). O pico intenso na região entre 1600 e 1400 cm^{-1} pertence à banda CO_3 do carbonato de cálcio. Picos médios e fracos na região ente 600 e 470 cm^{-1} correspondem às ligações do grupo P – O em modo de vibração de

flexão. Enquanto que os picos entre 1150 e 950 cm^{-1} correspondem às vibrações simétricas e assimétricas do grupo PO_4 . Na amostra pH1,5, a presença de picos na região de 790 a 740 cm^{-1} correspondem à vibração de estiramento do modo $\text{P} - \text{O} - \text{P}$, indicando a conformação de uma ponte flexional correspondente ao grupo difosfato (P_2O_7) (BARAN, 1999).

A Figura 5.4. mostra o difratograma dos pós obtidos pela reação de combustão após o tratamento térmico (calcinação a 1200°C por 4 horas seguida de choque térmico). Ela indica que após da calcinação e do choque térmico, a única fase presente é o α -TCP. Todos os picos correspondem à ficha 01-70-0364 do ICDD (*International Center for Diffraction Data*).

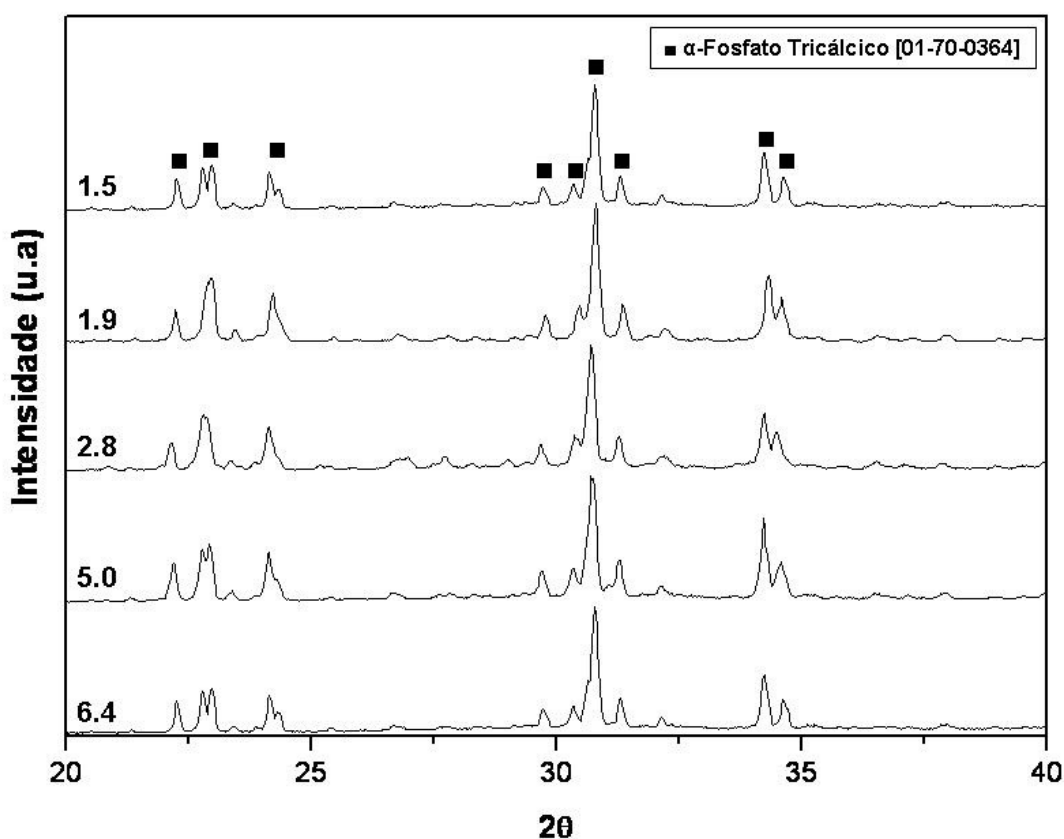
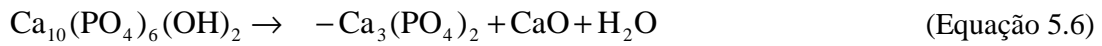
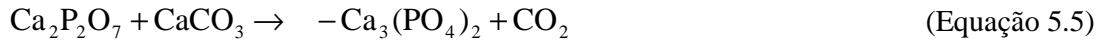


Figura 5.4. Difratograma dos pós obtidos por reação de combustão após serem submetidas ao tratamento térmico 1200°C por 4 horas.

Como o pó obtido através da reação de combustão sem tratamento térmico não possui a presença da fase β -TCP em sua composição, a formação do α -TCP pode ocorrer de duas maneiras: i) Reação entre pirofosfato de cálcio e o carbonato de cálcio, conforme mostrado na Equação 5.5 (SANTOS et al., 2002) e ii) Decomposição térmica da hidroxiapatita em β -TCP

(Eq. 5.6), seguida da sua transformação em α -TCP com a evolução da temperatura e com o choque térmico seqüencial.



O mapeamento atômico por espectroscopia de fluorescência de energia dispersiva de raios X. da amostra pH1,5 após o tratamento térmico é mostrada na Figura 5.5. Ao contrário da Figura 5.2, que mostra regiões com intensidade de cor heterogêneas, a Figura 5.5 mostra regiões com cores homogêneas, indicando que há a presença de apenas uma fase no pó obtido após o tratamento térmico.

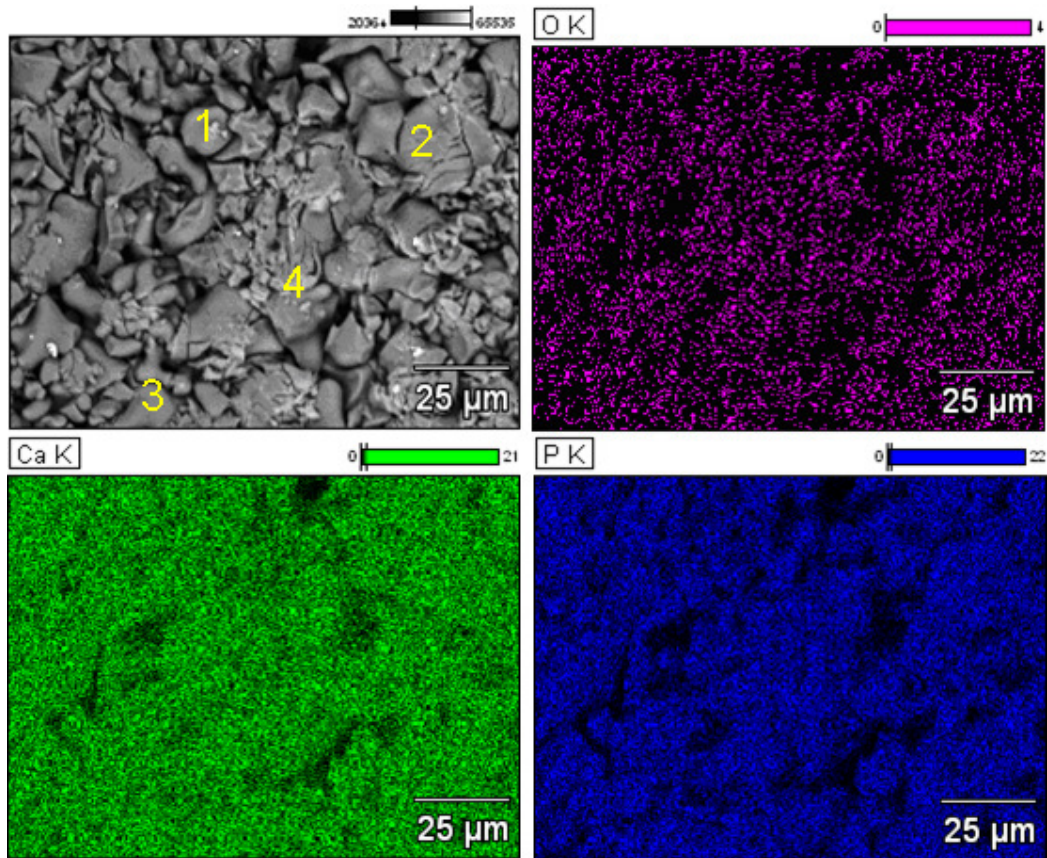


Figura 5.5. Micrografias de Microscopia Eletrônica de Varredura e o mapeamento elementar por EDX para os elementos oxigênio, cálcio e fósforo para a amostra pH1,5 após o tratamento térmico.

A Tabela 5.3 mostra a concentração de cada elemento em átomos, nos pontos indicados na micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da Figura 5.2. O valor médio da razão Ca/P da amostra é de 1,46, um valor próximo ao valor teórico do α -fosfato tricálcico, que é de 1,50.

Tabela 5.3 Concentração atômica medida por EDX e razão Ca/P para a amostra pH 1,5 após o tratamento térmico.

Percentual Atômico			
Ponto	Calcio(%)	Fósforo(%)	Ca/P
1	18,95	12,96	1,46
2	20,49	14,42	1,42
3	23,64	16,62	1,42
4	28,54	18,59	1,54

A análise de difração a laser foi utilizada para verificar o tamanho de partícula do pó obtido após a reação de combustão. Os resultados obtidos pela análise granulométrica das diferentes amostras são apresentados na Tabela 5.4:

Tabela 5.4. Resultados da análise granulométrica mostrando a distribuição e o tamanho médio de partícula (TMP).

Diâmetro (μm)					
Menor que	pH6,4	pH5,0	pH2,8	pH1,9	pH1,5
10% vol	1,35	1,5	1,45	1,12	1,11
50% vol	11,68	14,22	11,62	9,65	10,03
90% vol	35,51	35,49	33,59	25,2	27,91
TMP	15,35	16,61	14,92	11,66	12,54

Houve uma variação pequena no tamanho de partículas, pois por tal técnica mede-se o tamanho dos aglomerados, que tendem a ser formados por as partículas possuem pequeno volume, resultando em área superficial maior e sendo mais estável para o particulado se aglomerar.

A área superficial específica (A_s) e o diâmetro de partículas do material obtido por reação de combustão foram calculados por BET e são mostrados na Tabela 5.5. Os resultados mostram que quanto menor o pH, maior a área superficial. O valor de área superficial de 38,7 m²/g obtido pela amostra sintetizada com o pH mais baixo (pH1,5) foi o valor mais elevado, enquanto que a amostra sintetizada com o pH mais alto (pH6,4) obteve o menor valor de área superficial (21,8 m²/g). O diâmetro de partículas (D_{BET}) foi medido utilizando-se a Equação 4.4. e é inversamente proporcional à área superficial, assim, quanto maior a área superficial menor o valor de tamanho de partícula e vice-versa.

Mediu-se o tamanho médio de partículas, utilizando-se a Equação de Scherrer (Eq. 4.3.) apenas para as amostras sem tratamento térmico e de pH inicial abaixo de 2,0 (amostras pH 1,5 e pH 1,9) Já para os pós obtidos com pH acima de 2,0, não se pode medir o tamanho médio de cristalitos a partir da equação de Scherrer (Eq. 4.3), pois esta se utiliza do pico mais intenso para realizar a medição e devido ao alto caráter amorfo destas amostras era muito difícil distinguir o pico mais intenso das amostras. Nas amostras pH1,5 e pH 1,9 a fase predominante era o pirofosfato de cálcio (α -Ca₂P₂O₇) e o tamanho de cristalito medido através da Equação de Scherrer foi de 35 e 41 nanômetros amostras pH1,5 e pH 1,9, respectivamente, como mostrado na Tabela 5.5.

A área superficial das partículas sofreu uma redução brusca após o tratamento térmico. No intuito de obter-se a fase meta-estável α -TCP foi necessário manter a temperatura alta de 1200°C pelo tempo de 4 horas. Este procedimento favoreceu ao crescimento de partículas e à formação de agregados, levando ao crescimento no tamanho de partícula e à redução drástica da área superficial para um valor médio em torno de 1,6 m²/g. O tamanho de cristalito sofreu a mesma tendência do pó sem tratamento térmico as amostras sintetizadas com pH mais elevado, sofreram um aumento maior no tamanho de cristalito após o tratamento térmico.

Tabela 5.5 Área superficial específica, tamanho de partículas por BET e tamanho de cristalito calculado utilizando-se a formula de Scherrer.

Sample	Como-obtido			Após tratamento térmico		
	A _S BET (m ² /g)	D _{BET} (nm)	Tamanho de Cristalito (nm)	A _S BET (m ² /g)	D _{BET} (µm)	Tamanho de Cristalito (nm)
pH1,5	38,7	54,2	35	1,6	1,3	59
pH1,9	29,4	71,3	41	1,8	1,2	92
pH2,8	24,3	86,3	-	1,7	1,2	107
pH5,0	23,7	88,6	-	1,6	1,3	107
pH6,4	21,8	96,4	-	1,9	1,1	129

Microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para confirmar os valores de tamanho de cristalito obtidos pela fórmula de Scherrer e para examinar a morfologia dos pós obtidos via síntese de combustão. O tamanho médio de partículas e a distribuição de tamanho de partículas foram calculados a partir das micrografias de MET usando-se o *software Image Tool*. Mediu-se o diâmetro de no mínimo 50 partículas utilizando-se diferentes fotos obtidas para a mesma amostra.

Através da micrografia da Figura 5.6, que mostra a morfologia da amostra pH1,5 é possível ver a presença de agregados fortemente ligados e com partículas com formato hexagonal. A Figura 5.7 mostra um gráfico com a distribuição de tamanho de cristalito da Figura 5.6, sendo que esta varia amplamente ente 10 e 80 nanômetros, sendo que o tamanho mais freqüente está entre 30 e 40 nanômetros, o que confirma os valores medidos utilizando-se a fórmula de Scherrer (Tabela 5.5) e o tamanho médio de cristalito foi de $36,1 \pm 12,9$ nanômetros.

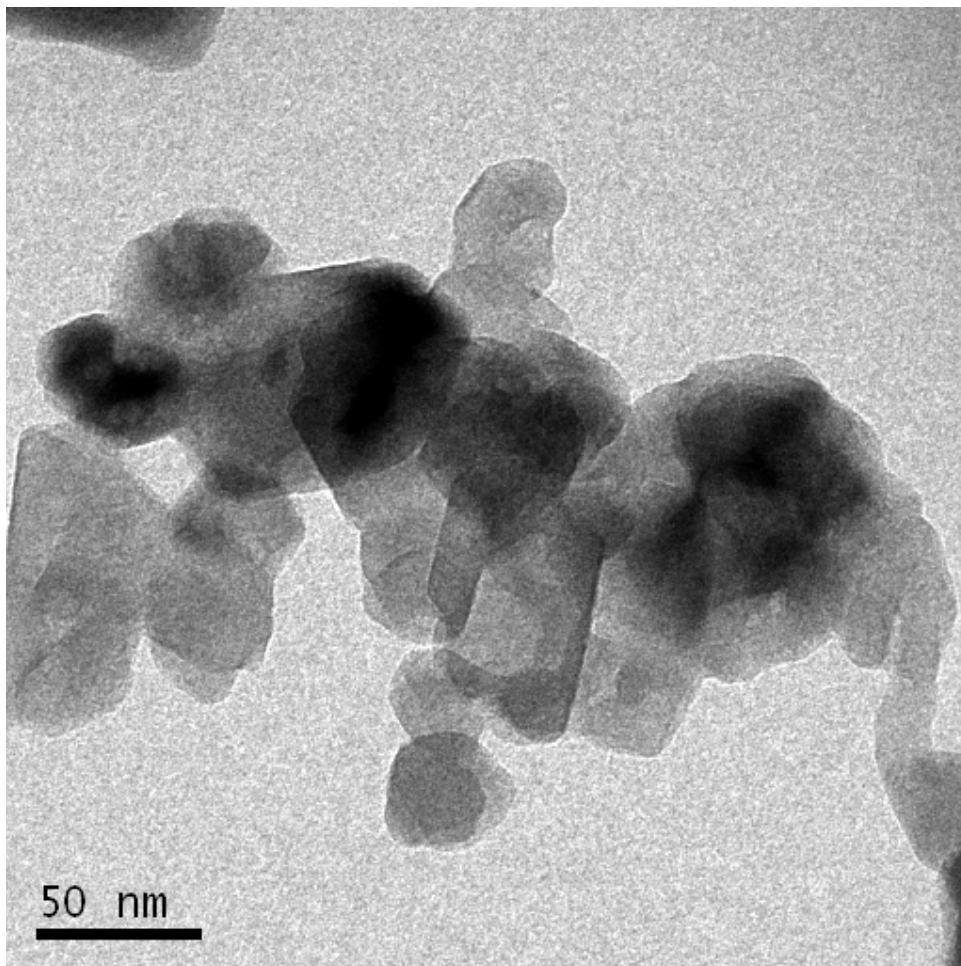


Figura 5.6 Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra pH1,5 sem tratamento térmico.

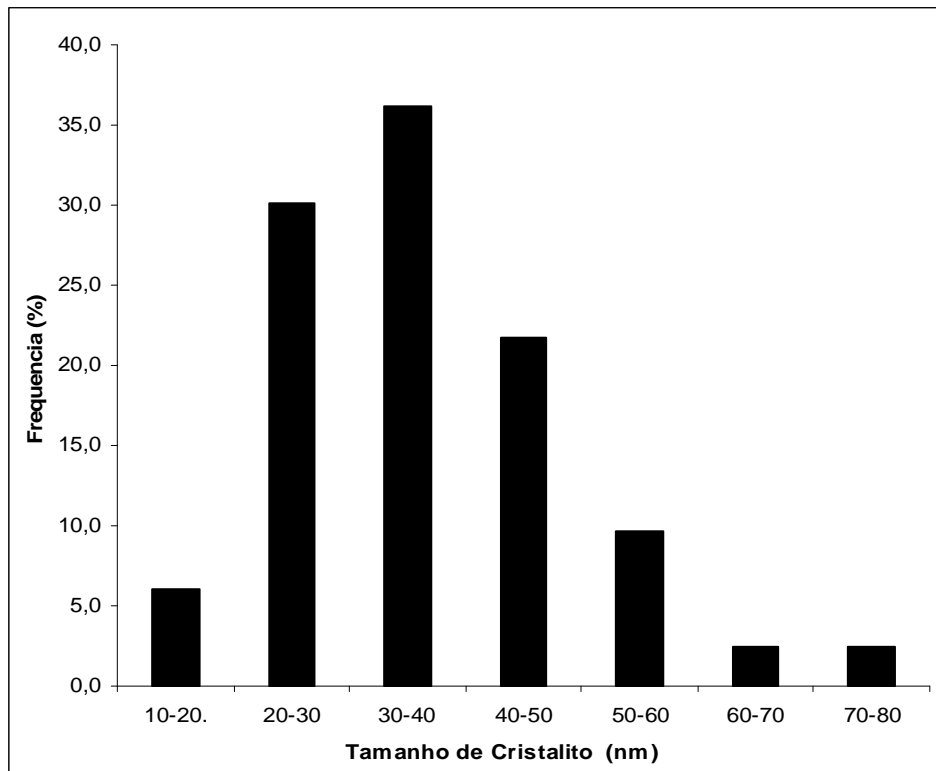


Figura 5.7. Distribuição de tamanho de cristalitos a partir da Micrografia da amostra pH1,5 sem tratamento térmico, mostrada na Figura 5.6.

A micrografia da amostra pH 1.9, representada na Figura 5.8 também mostra a presença de agregados fortemente ligados e com partículas com formato hexagonal. A Figura 5.9 mostra um gráfico com a distribuição de tamanho de cristalito da Figura 5.8, sendo que esta varia amplamente ente 10 e 80 nanômetros, sendo que o tamanho mais freqüente entre 30 e 40 nanômetros, o que confirma os valores medidos utilizando-se a fórmula de Scherrer (Tabela 5.6) e o tamanho médio de cristalito foi de $44,6 \pm 11,4$ nanômetros.

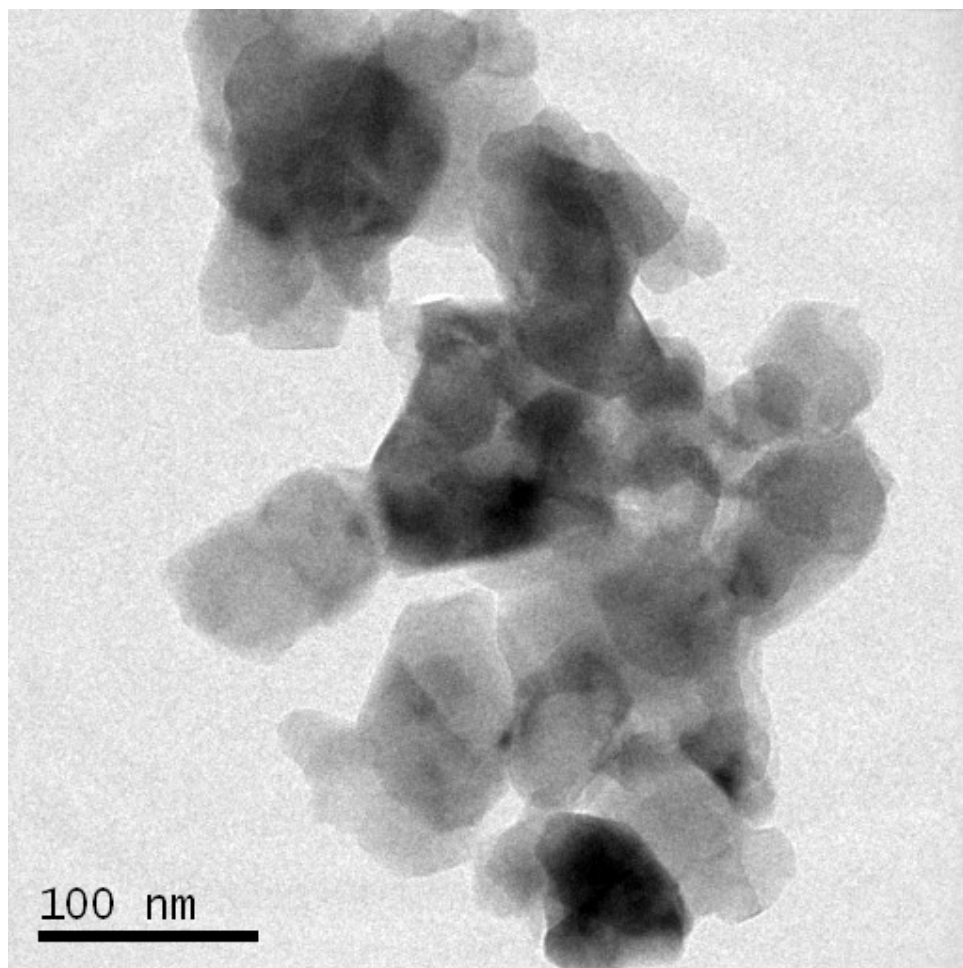


Figura 5.8. Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra pH1,9 sem tratamento térmico.

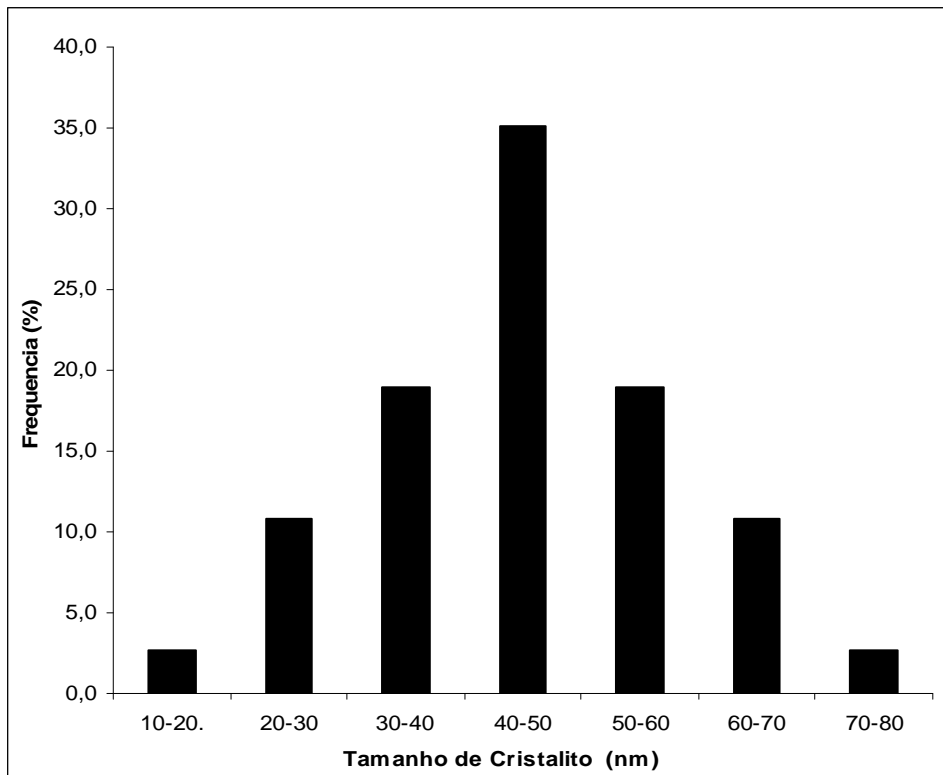


Figura 5.9. Distribuição de tamanho de cristalitos a partir da Micrografia da amostra pH1,9 sem tratamento térmico, mostrada na Figura 5.8.

Percebe-se que para todas as composições se obteve a fase α -TCP com elevadíssimo grau de pureza de fases para todos os valores estudados de pH, sendo que os menores tamanhos de partícula e cristalito foram obtidos para a amostra com pH mais baixo (pH 1,5). Uma possível explicação para este fenômeno está no fato de que os reagentes utilizados inicialmente estão melhores dissolvidos a pH's mais ácidos, o que poderia influir fortemente na redução do tamanho de partículas.

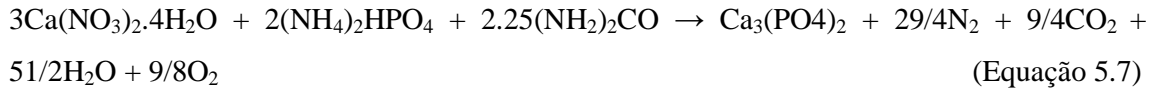
Para o prosseguimento do trabalho se elegeu o pH mais ácido estudado, pois ele permitiu a obtenção de pós com menor tamanho de cristalito antes do tratamento térmico.

5.1.2 Estudo da Influência do Combustível

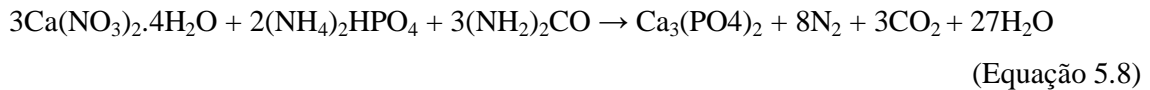
Foram realizadas reações de combustão com os teores de 0,75, 1,0, 1,5 e 2,0 vezes o valor estequiométrico das reações, utilizando uréia ou glicina como combustível. Novamente, o teor de ácido nítrico adicionado à reação para o controle do pH não foi levado em

consideração na expressão da reação química e nem nos cálculos termodinâmicos. As Equações 5.7 a 5.14 mostram a estequiometria das reações de combustão.

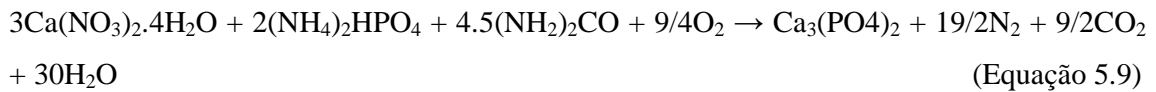
0,75U (-25% da reação estequiométrica da uréia)



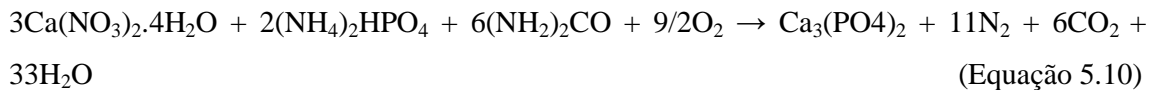
1U (reação estequiométrica da uréia)



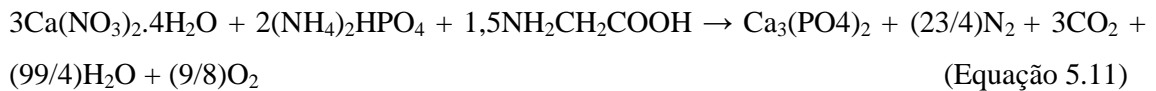
1,5U (+50% da reação estequiométrica da uréia)



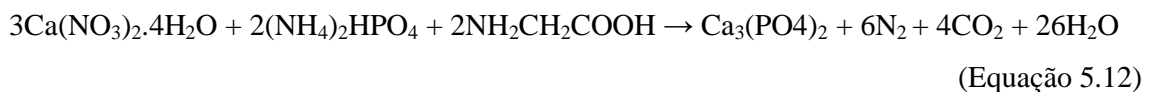
2U (+100% da reação estequiométrica da uréia)



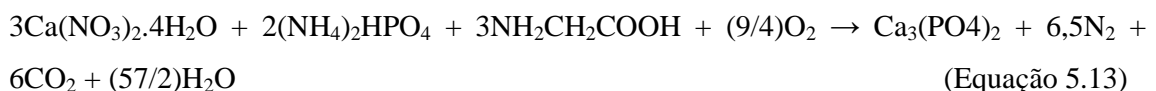
0,75G (-25% da reação estequiométrica da glicina)



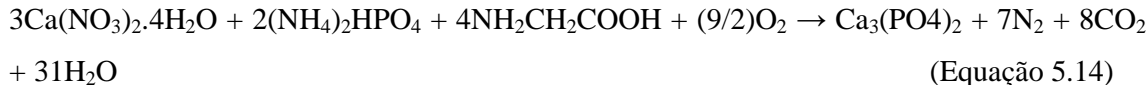
1G (reação estequiométrica da glicina)



1,5G (+50% da reação estequiométrica da glicina)



2G (+100% da reação estequiométrica da glicina)



Utilizando-se as Equações 4.1 e 4.2, calculou-se entalpia de formação, a temperatura adiabática de chama, o número total de gases liberados e a razão molar entre gases e reagentes. Esses dados são mostrados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Informações termodinâmicas da reação de síntese de combustão para cada combustível utilizado.

Razão Estequiométrica	Entalpia de Combustão (kcal/mol)		Temperatura de Chama Adiabática (°C)		Moles de gases Liberados		Razão molar de gás liberado por mol de reagente	
	Uréia	Glicina	Uréia	Glicina	Uréia	Glicina	Uréia	Glicina
0,75	-211,16	-228,4	652	932	35	33,5	4,83	5,15
1,0	-308,6	-331,6	877	1220	38	36	4,75	5,14
1,5	-503,5	-537,9	1243	1670	44	41	4,63	5,13
2,0	-698,4	-744,3	1528	1993	50	46	4,55	5,11

As reações envolvendo a glicina como combustível possuem maior entalpia de formação, isso ocorre por que durante a reação a glicina libera mais calor do que a uréia. (PATIL et al., 2008). Nesse experimento, os cálculos teóricos comparando a temperatura adiabática de chama mostram que o uso de glicina como combustível permite alcançar maiores temperaturas de chama. Outro fator que atua de maneira a aumentar a temperatura de chama é o aumento do teor de combustível (SOUSA et al., 1999).

A razão estequiométrica também é um fator muito importante para determinar o volume de gases que serão liberados durante a reação de combustão, maiores teores de combustível levam a maiores quantidades de gases liberados. Por possuir maior peso molecular, quando usado como combustível, a glicina libera maior volume de gases do que a uréia. Além disso, a glicina possui uma razão molar de gases liberados por mol de reagente de 5,14 para a reação estequiométrica contra 4,75 obtidos pela reação estequiométrica da uréia. Entretanto, este valor diminui com o aumento do teor de combustível e a taxa de diminuição da glicina é menor que a da uréia.

A Figura 5.10 mostra difratogramas de raios X dos produtos da reação de combustão como obtidos utilizando-se uréia como combustível, enquanto que a Figura 5.11 mostra os difratogramas de raios X dos produtos da reação de combustão como obtidos utilizando-se glicina como combustível.

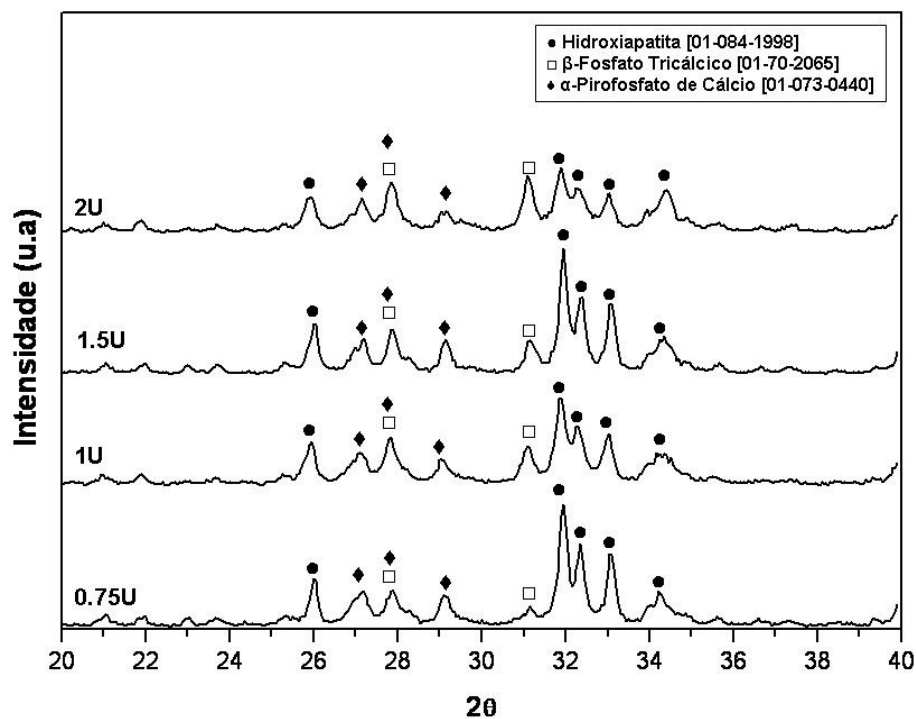


Figura 5.10. Padrões de difração de raios X do produto da reação de combustão como sintetizado ao utilizar-se uréia como combustível.

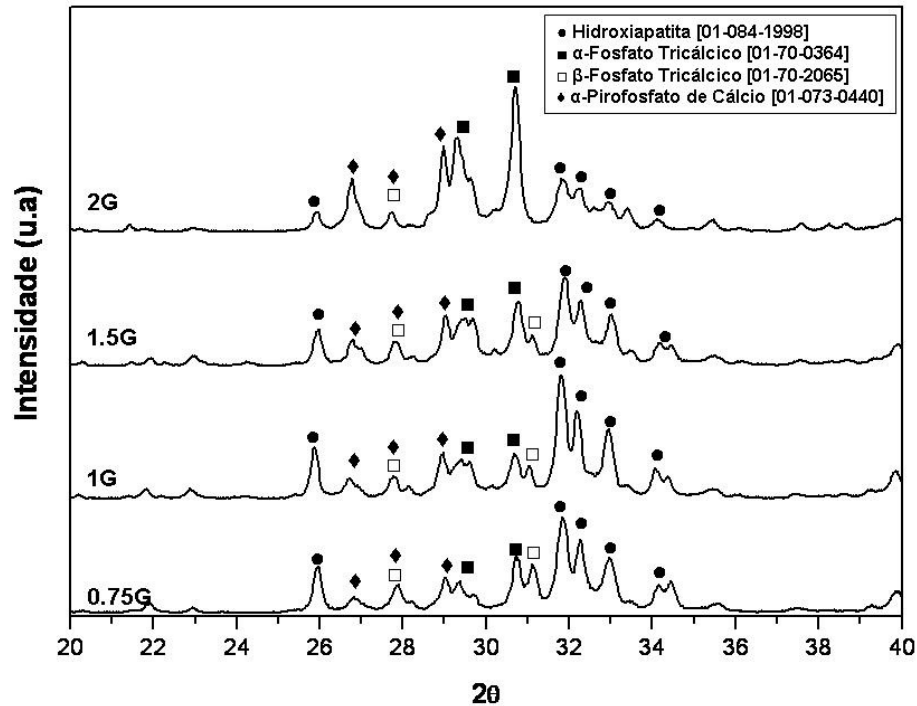


Figura 5.11. Padrões de difração de raios X do produto da reação de combustão como sintetizado ao utilizar-se glicina como combustível.

Nos difratogramas obtidos por DRX mostrados nas Figuras 5.10 e 5.11, percebe-se que apesar de a razão cálcio/fósforo dos reagentes precursores estar ajustada para 1,5, razão Ca/P teórica das fases fosfato tricálcico, a reação de combustão levou à formação de outras fases inesperadas. Tais fases como a fase alfa do pirofosfato de cálcio ($\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$; Ca/P=1,0) e hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$; Ca/P=1,67), possuem razão Ca/P diferentes da razão inicial. Uma das maiores dificuldades em se sintetizar apatitas não estequiométricas é alta variabilidade da composição, mesmo para pequenas variações da razão molar cálcio/fósforo do precipitado inicial (RAYNAUD et al., 2002).

Para razões Ca/P maiores do que 1,50 é formada hidroxiapatita como segunda fase. E uma pequena variação de 1% na razão molar Ca/P induz à formação de 10% em peso de HA. Para valores Ca/P menores do que 1,50 aparece pirofosfato de cálcio como segunda fase (DESTAINVILLE et al., 2003). Como neste trabalho as duas fases surgem simultaneamente, pode-se inferir que o aquecimento desigual durante a combustão pode levar à mudanças no pH, que por sua vez podem levar à pequenas mudanças na razão Ca/P, levando à produção das duas fases secundárias como majoritárias ao invés da fase desejada que é o fosfato tricálcico.

O tipo de combustível influenciou diferentemente nas fases formadas. Por atingir maior temperatura durante o processo de síntese, as reações que utilizaram glicina como combustível permitiram a obtenção das fases α -TCP e β -TCP com adição de pirofosfato de cálcio e HA, enquanto que as reações onde a uréia foi utilizada como combustível levaram à obtenção das mesmas fases com a exceção do α -TCP, pois, como se sabe, esta é uma fase metaestável e só pode ser obtido por rápido resfriamento após atingir temperaturas superiores a 1200°C (DOROZHKIN, 2009).

As Figuras 5.12 e 5.13 mostram os difratogramas de raios x dos produtos da reação de combustão como obtidos utilizando-se como combustível uréia e glicina, respectivamente, após o tratamento térmico de 1200°C por 4 horas, seguido de choque térmico.

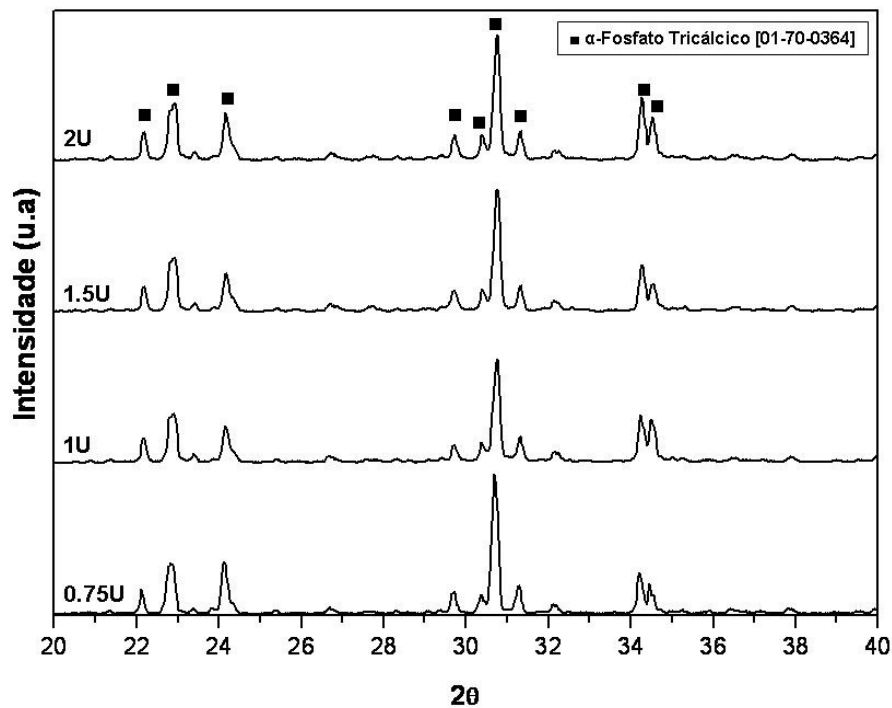


Figura 5.12. Padrões de difração de raios X do produto da reação de combustão como sintetizado ao utilizar-se uréia como combustível, após o tratamento térmico.

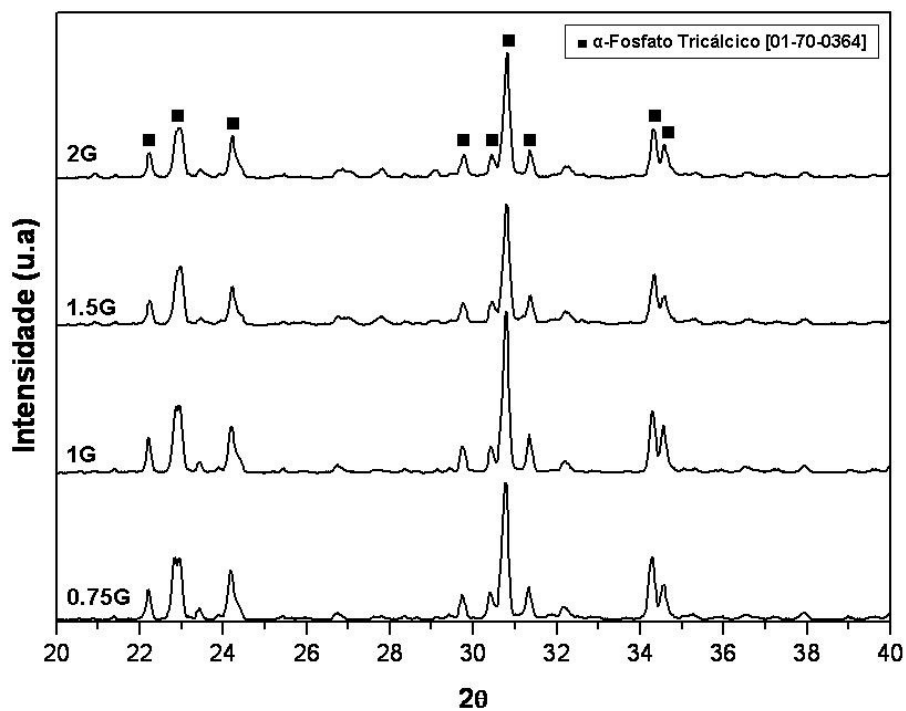


Figura 5.13. Padrões de difração de raios X do produto da reação de combustão como sintetizado ao utilizar-se glicina como combustível, após o tratamento térmico.

Após o tratamento térmico obteve-se o mesmo padrão de difração foi obtida para todas as composições estudadas em ambos combustíveis. Os picos foram identificados com padrão do ICDD (*International Center for Diffraction Data*) e corresponderam com o PDF (Powder Diffraction File) n° 01-70-0364 correspondente ao α -fosfato tricálcico.

As Figuras 5.14 e 5.15 mostram os espectrogramas obtidos por Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier dos pós obtidos sem o tratamento térmico das reações que utilizaram uréia e glicina, respectivamente.

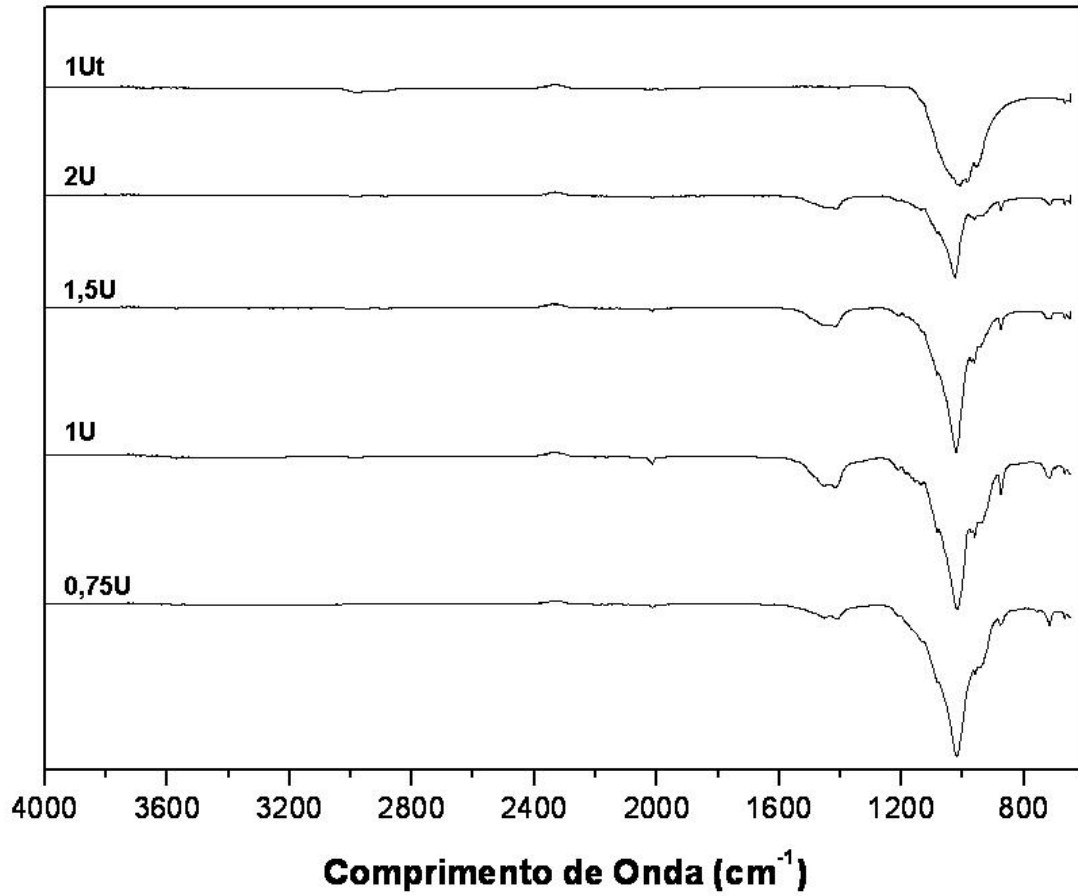


Figura 5.14 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier do material obtido pela reação de combustão das reações que utilizaram uréia como combustível nas proporções de 0,75, 1,0, 1,5 e duas vezes o valor estequiométrico. E a reação 1Ut após o tratamento térmico.

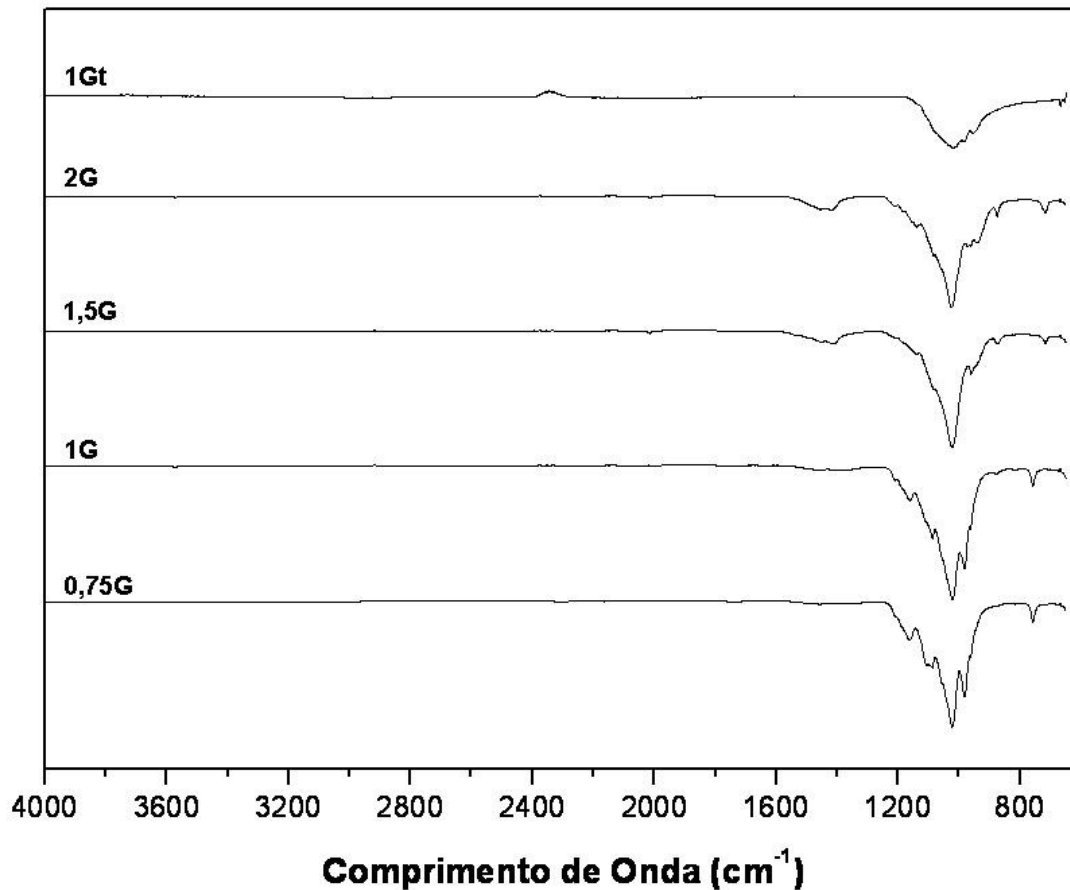


Figura 5.15 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier do material obtido pela reação de combustão das reações que utilizaram glicina como combustível nas proporções de 0,75, 1,0, 1,5 e duas vezes o valor estequiométrico. E a reação 1Gt após o tratamento térmico.

Os picos largos entre 1100 e 950 cm^{-1} pertencem às vibrações simétricas e assimétricas do PO_4^{3-} . Já os picos entre 790 - 740 e 980 - 950 cm^{-1} correspondem às vibrações *stretch*, indicando a conformação de uma ponte flexional correspondente ao grupo difosfato (P_2O_7) (BARAN, 1999). Os pequenos picos localizados entre 1100 e 1300 cm^{-1} , correspondem às vibrações flexionais dos grupos HPO_4 , indicando a presença de hidroxiapatita no pó como obtido. (LE GEROS, 1991). O pico intenso na região entre 1600 e 1400 cm^{-1} , assim como o pico ao redor de 870 cm^{-1} , correspondem a grupos carbonato, oriundos da combustão incompleta do combustível. Para os dois combustíveis utilizados, a intensidade desse pico aumenta com o aumento do teor de combustível utilizado. Quando a glicina foi utilizada como combustível, a intensidade do pico foi maior. Após o tratamento térmico, ocorre o desaparecimento do pico de carbonato, mostrando que o α -fosfato tricálcico obtido é livre de grupos carbonato contaminante. Além disso, após o tratamento térmico há apenas um pico visível entre 900 e 1100 cm^{-1} , correspondendo às ligações simétricas e

assimétricas de estiramento do grupo PO_4 (LE GEROS, 1991). Isso indica a presença da fase fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Na literatura, poucos trabalhos apresentam a fase α -fosfato tricálcico devido à grande dificuldade de síntese. O que mostra o grande avanço apresentado pela síntese de combustão em solução para a síntese desta fase.

A Tabela 5.7 mostra a Área superficial específica, tamanho de partículas por BET e tamanho de cristalito calculado utilizando-se a fórmula de Scherrer dos pós obtidos utilizando-se glicina ou uréia para os teores de 0,75, 1,0, 1,5 e 2,0 o valor estequiométrico para ambos combustíveis.

Tabela 5.7. Área superficial específica, tamanho de partículas por BET e tamanho de cristalito calculado utilizando-se a fórmula de Scherrer dos pós sintetizados em função do tipo e do teor de combustível utilizado.

Razão Estequiométrica	Área Superficial Específica (m^2/g)		Diâmetro de Partícula BET (nm)		Tamanho de Cristalito Scherrer (nm)	
	Uréia	Glicina	Uréia	Glicina	Uréia	Glicina
0,75	8,2	7,6	232	250	92	92
1,0	9,6	9,5	198	200	77	81
1,5	11,8	10,1	161	188	70	77
2,0	14,3	12,3	133	154	62	77

Obteve-se maior área superficial específica e menor tamanho de partícula calculado por BET e menor tamanho de cristalito pela equação de Scherrer nas reações que utilizaram uréia como combustível. Comportamento semelhante é encontrado na literatura em trabalhos realizados por Costa et al. (2010) e Lenka et al. (2008) para a síntese de Ferritas Mn-Zn e de Óxido de Gadolínio dopado com Céria, respectivamente. Em ambos os trabalhos, as reações que utilizaram uréia permitiram a obtenção de pós com menor tamanho de cristalito. Tal fato pode ser atribuído ao fato de as reações que utilizaram glicina como combustível atingirem maior temperatura de chama adiabática (LENKA et al., 2008).

Após o tratamento térmico a área superficial dos pós obtidos reduziu-se e variou ao redor de 0,8 a 3,3 m^2/g para as composições que utilizaram glicina como combustível e de 1,0 a 4,0 m^2/g para as reações que utilizaram uréia como combustível, sendo que quanto maior o teor de combustível utilizado, maior a área superficial específica e conseqüentemente, menor o tamanho de partícula calculado por BET, como mostra a Tabela 5.8. O tamanho de cristalito calculado utilizando-se a equação de Scherrer apresentou a mesma tendência de diminuir com o aumento do teor de combustível, porém independente do tipo de combustível utilizado, o

valor obtido foi o mesmo. Ele variou de 103 nm para as reações com 0,75 vezes o valor estequiométrico de combustível para 80 nm nas reações com duas vezes o valor estequiométrico de combustível.

Tabela 5.8. Área superficial específica, tamanho de partículas por BET e tamanho de cristalito calculado utilizando-se a fórmula de Scherrer dos pós obtidos após o tratamento térmico utilizando-se glicina ou uréia em função do teor de combustível utilizado.

Razão Estequiométrica	A_{sBET} (m ² /g)		\varnothing_{BET} (nm)		$D_{Scherrer}$ (nm)	
	Uréia	Glicina	Uréia	Glicina	Uréia	Glicina
0,75	1,0	0,8	2,1	2,6	103	103
1,0	1,8	1,2	1,2	1,7	92	92
1,5	1,9	1,6	1,1	1,3	92	92
2,0	4,0	3,3	0,5	0,6	80	80

Comparando-se as Tabelas 5.8 e 5.9, percebe-se que o tratamento térmico de calcinação a 1200°C por 4 horas, seguido de choque térmico exerceu grande influência nas propriedades dos pós obtidos via síntese de combustão. Os valores de área superficial específica diminuíram significativamente, assim como o tamanho de partículas calculado por BET aumentou significativamente. Já o tamanho de cristalito aumentou pouco.

As Figuras 5.16 e 5.17 mostram micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das amostras obtidas utilizando-se a razão estequiométrica de uréia e glicina, respectivamente. Por questões técnicas as micrografias que estão sendo comparadas foram obtidas em microscópios eletrônicos de transmissão diferentes, sendo a da Figura 5.16 obtida no Centro de Microscopia (CME) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil, enquanto que a imagem da Figura 5.17 foi obtida no *Instituto de Cerâmica y Vidrio* (ICV) na Espanha. Assim mesmo, a comparação é válida.

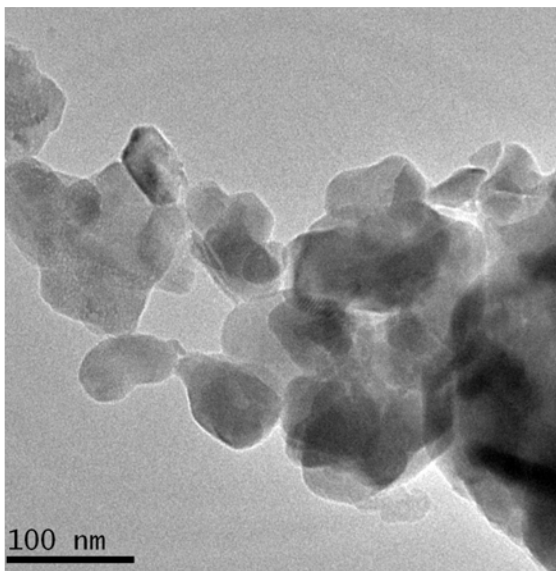


Figura 5.16 - Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 1,0U sem tratamento térmico.

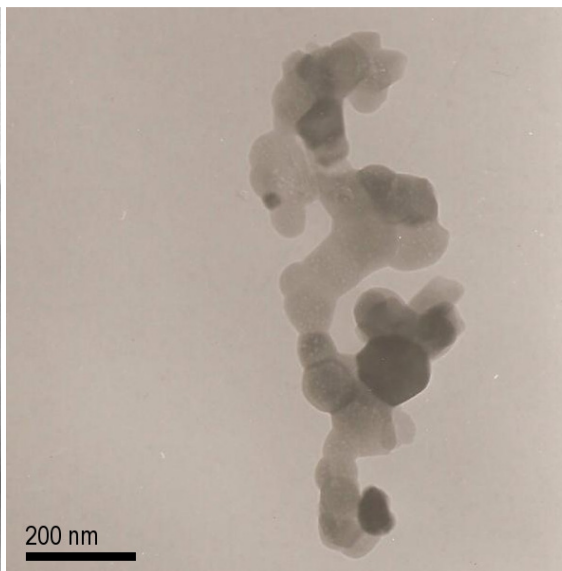


Figura 5.17 - Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 1,0G sem tratamento térmico.

Apesar de as amostras estarem em escalas de aumento diferente, pode-se perceber que a amostra da Figura 5.17, obtida utilizando-se o valor estequiométrico de glicina como combustível, apresenta partículas de formato hexagonal, porém percebe-se claramente os “pescoços” formados pelo processo de pré-sinterização das partículas devido à alta temperatura obtida durante a síntese. Na reação onde se utilizou o valor estequiométrico de uréia não se percebe tão claramente a formação desses “pescoços” de pré-sinterização, indicando que o pó obtido está menos agregado. As Figuras 5.18 e 5.19 mostram as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das amostras obtidas utilizando-se duas vezes o valor estequiométrico de reação da uréia e glicina, respectivamente.

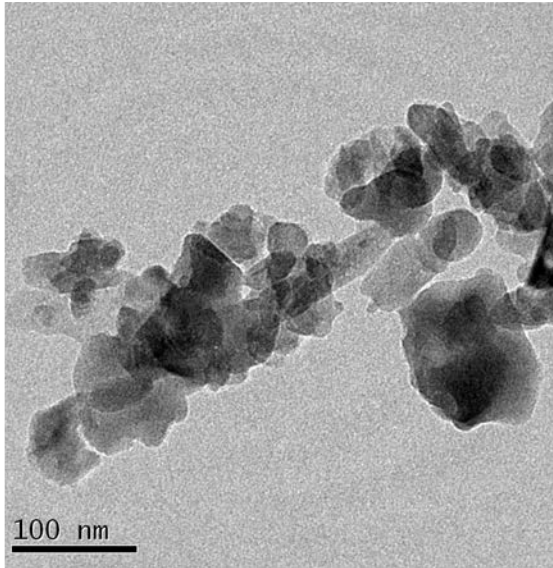


Figura 5.18 - Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 2,0U sem tratamento térmico.

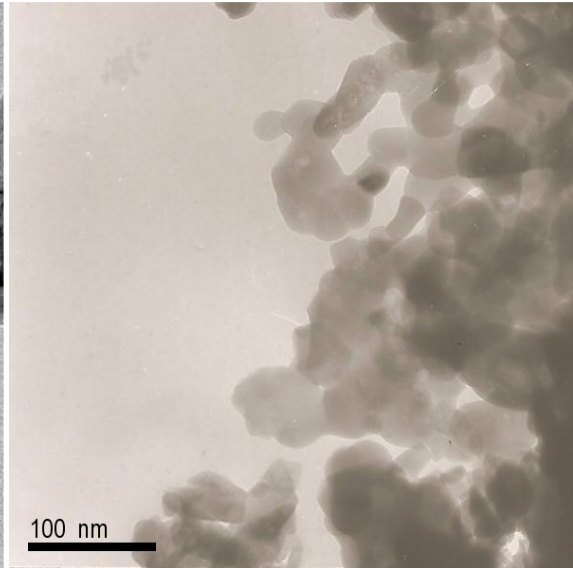


Figura 5.19 - Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 2,0G sem tratamento térmico.

As Figuras 5.20 e 5.21 mostram as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das amostras obtidas utilizando-se duas vezes o valor estequiométrico de reação da uréia e glicina, respectivamente após o tratamento térmico a 1200°C por 4 horas seguido de choque térmico. Ocorre a sinterização das partículas, levando ao crescimento destas. Tal fato é mais visível na micrografia da Figura 5.21, onde há apenas uma partícula de tamanho ao redor de 250 nanômetros. Na Tabela 5.9 há uma comparação entre o tamanho de partículas obtido analisando-se as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

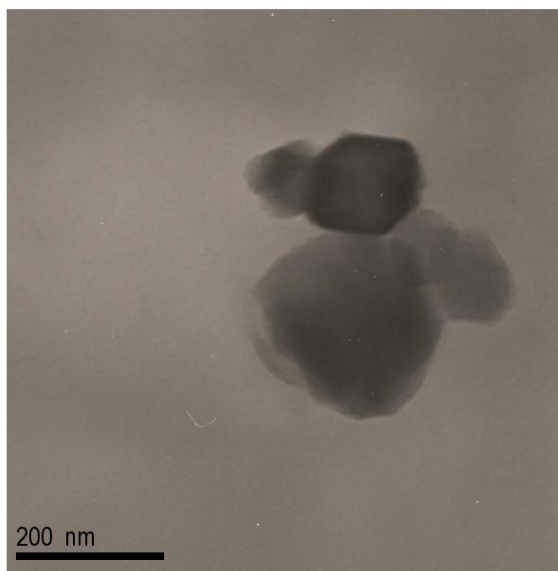


Figura 5.20 - Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 2,0U após tratamento térmico.

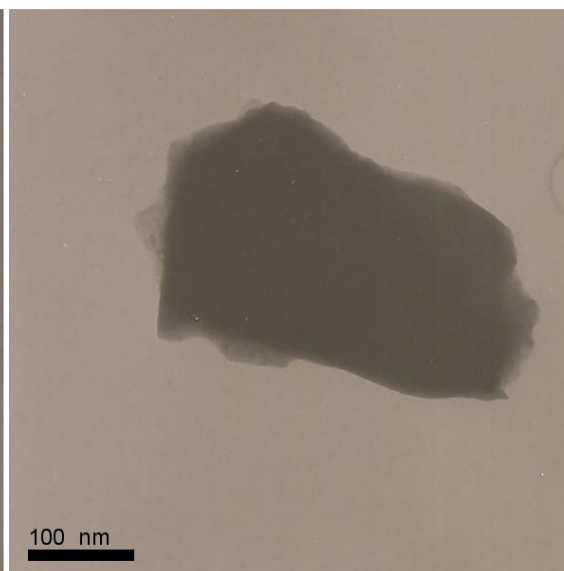


Figura 5.21 - Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra 2,0G após tratamento térmico.

Tabela 5.9. Tamanho de partícula médio obtido por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Amostra	Tamanho médio de Partícula (nm)	
	Uréia	Glicina
1,0 obtida	79,6	84,7
2,0 obtida	58,6	71,8
2,0 tratamento térmico	150,1	260,8

O tamanho de partículas obtidos por MET são semelhantes aos resultados obtidos pela equação de Scherrer para as reações sem tratamento térmico, porém são maiores do que os calculados para as reações após o tratamento térmico. Isso pode ocorrer por que a equação de Scherrer só é válida para tamanhos de partícula pequenos. Com o tratamento térmico, ocorre a sinterização das partículas que antes estavam agregada, formando apenas uma grande partícula com tamanho na ordem de 0,15 micron para os pós obtidos nas reações que utilizaram uréia como combustível e 0,26 micron para os pós obtidos nas reações que utilizaram glicina como combustível.

Dois fatores são fundamentais na obtenção de partículas com menor tamanho: i) o aumento do teor de combustível para duas vezes o valor estequiométrico e ii) a utilização de uréia ao invés de glicina como combustível. O primeiro fator pode ser explicado pelo maior volume de gases liberados ao aumentar-se o teor de combustível, como mostrado na Tabela

5.6. O maior volume de gases pode levar ao resfriamento local das partículas, impedindo o crescimento destas. Já o segundo fator, já foi citado anteriormente e pode explicar-se pelo fato de que a glicina atinge uma maior temperatura de chama (LENKA et al., 2008), o que pode levar mais facilmente ao coalescimento das partículas, fazendo com eles cresçam mais, se tornando maiores do que as partículas das reações que utilizaram uréia como combustível. Por tais motivos elegeu-se a uréia como combustível e a razão estequiométrica de 2,0 para serem utilizadas nas seguintes etapas deste trabalho.

Os resultados encontrados nesta tese de doutorado para a síntese de pós nanoestruturados de α -fosfato tricálcico demonstram que a técnica de síntese de combustão em solução permite a obtenção de pós de fosfatos de cálcio com tamanho de partícula inferior aos encontrados comumente na literatura para os métodos de solução sólida (SANTOS et al., 2002).

5.2 Cimentos de Fosfato de Cálcio

Nesta etapa utilizou-se os cimentos de fosfato de cálcio obtidos via reação de combustão em solução obtidos em laboratório, utilizando-se duas vezes o valor estequiométrico de uréia como combustível e pH regulado para 1,5, devido a sua maior área superficial e menor tamanho de partícula do que os pós obtidos utilizando glicina como combustível, conforme discutido na seção anterior.

5.2.1 Tempo de Moagem

A síntese de combustão em solução, utilizando uréia como combustível, permitiu a obtenção de α -TCP com alta pureza de fases, como já discutido no item anterior. Nesse estudo o pó obtido foi moído em três tempos diferentes e as suas propriedades foram medidas e avaliadas. A análise por difração de raios X, mostrada na Figura 5.22, permitiu identificar os picos com padrão do ICDD (*International Center for Diffraction Data*) e corresponderam com o PDF (Powder Diffraction File) n° 01-70-0364 correspondente ao α -fosfato tricálcico, mostrando que o processo de moagem não alterou a fase presente no material, assim como não há variação significativa na cristalinidade do pó.

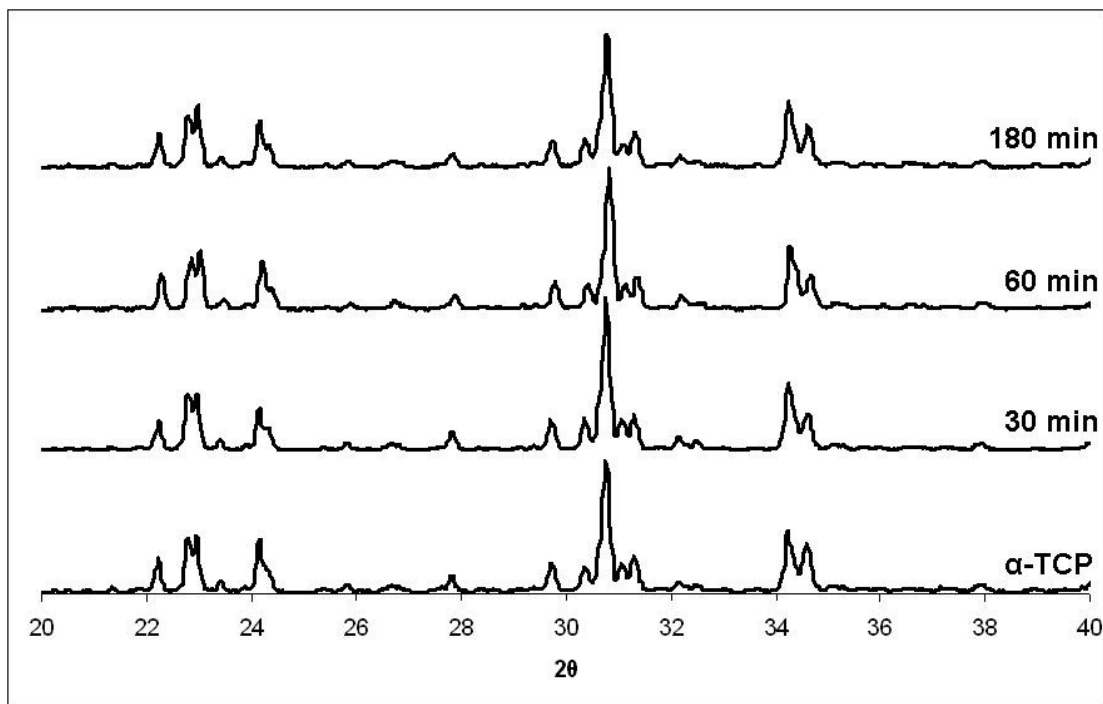


Figura 5.22 - Padrões de difração de raios X dos pós de α -TCP como obtidos e após 30, 60 e 180 minutos de moagem.

A Tabela 5.10 mostra a influência do tempo de moagem na área superficial específica, tamanho de partículas por BET e tamanho de cristalito calculado utilizando-se a fórmula de Scherrer e tamanho de aglomerados medido por difração a laser nos pós obtidos pela reação de combustão em solução utilizando 2 vezes o teor estequiométrico de uréia como combustível, após o tratamento térmico e após 30, 60 e 180 minutos de moagem.

Tabela 5.10. Influência do tempo de moagem nas propriedades físicas do pó após o tratamento térmico.

Tempo de Moagem (min)	A_{sBET} (m ² /g)	\varnothing_{BET} (μm)	\varnothing_{Laser} (μm)	$D_{scherrer}$ (nm)
0 (sem tratamento térmico)	14,3	0,15	9,9	62
0 (após tratamento térmico)	4,0	0,52	13,7	80
30	4,6	0,46	13,4	80
60	5,1	0,41	13,9	80
180	6,0	0,35	7,8	80

O tratamento térmico a 1200°C por 4 horas, seguido de tempera é crucial para a estabilização da fase metaestável α -TCP, entretanto é responsável pelo aumento do tamanho médio de partículas, como é mostrado na Tabela 5.11. A área superficial das partículas reduz drasticamente em 72% do valor original após o tratamento térmico. Tal fato leva a um aumento de cerca de 247% no tamanho de partículas, medido pela Equação 4.4. O tamanho de aglomerados (\varnothing_{Laser}) obtido por difração a laser aumenta cerca de 38% após o tratamento térmico. Após moagem por 30 e 60 minutos ocorre um pequeno aumento na área superficial das partículas em relação ao pó após o tratamento térmico, indo de 4,0 m²/g para 4,6 m²/g e posteriormente 5,1 m²/g, representando um aumento de 27,5% na área superficial específica (A_{sBET}). Conseqüentemente, o tamanho de partículas medido por BET (\varnothing_{BET}) diminui de 0,52 μm para 0,46 μm e posteriormente 0,41 μm, representando uma diminuição de 21%. A técnica de difração a laser não é capaz de medir o tamanho de partículas, mas apenas o tamanho de aglomerados. Dessa forma pode-se afirmar que a mudança no tamanho de partículas não foi suficientemente grande para alterar o tamanho dos aglomerados. O tamanho dos cristalitos medidos através da equação de Scherrer (Eq. 4.3) também não é alterado.

Após 180 minutos de moagem, a área superficial aumenta para 6,0 m²/g, representando um aumento de 50% em relação ao pó não moído e de 18% em relação ao material moído por 60 minutos. Na literatura, Camiré et al. (2005) detectou o mesmo

comportamento registrando um aumento na área superficial específica de 0,66 m²/g para 2,6 m²/g após 4 horas de moagem.

Já o tamanho de partículas calculado por BET diminuiu 0,52 μm do pó não moído para 0,35 μm, representando uma diminuição de cerca de 33%, levando à uma diminuição no tamanho de aglomerados de 13,7 μm para 7,8 μm para o pó moído por 180 minutos.

A moagem a úmido do α-fosfato tricálcico em etanol pelo tempo de 180 minutos permitiu a quebra dos agregados com a conseqüente diminuição do tamanho médio de partículas. Este valor obtido encontra-se no intervalo descrito como desejado para a obtenção de cimentos de fosfatos de cálcio (≤ 10 μm) (CHOW et al., 1998). Na literatura, Gbureck et al. (2004) reportou que o tamanho de partículas do material de partida diminuiu de 17,5 μm para 7 μm após uma hora de moagem e para 5,4 μm após 4 horas de moagem. Enquanto que Santos et al. (2002) obtiveram um tamanho médio de 8 μm após 5 horas de moagem. Ambos trabalhos obtiveram o cimento a partir de reação em estado sólidos dos reagentes. Não existem trabalhos publicados de cimento de fosfato de cálcio a partir de pós obtidos por síntese de combustão. O tamanho de cristalito não se alterou em função do tempo de moagem.

As aplicações clínicas dos cimentos de fosfato de cálcio são limitadas por que demoram cerca de 30 minutos para ocorrer a reação de pega *in vitro* (MIYAMOTO et al., 1995). Após o processo de moagem o α-TCP foi misturado com o menor volume de líquido possível para formar uma pasta trabalhável com uma solução aquosa de hidrogeno fosfato de sódio a 2,5% na razão sólido para líquido de 0,4 mL/g, para os tempos de moagem de 30 e 60 minutos e 0,35 mL/g para o tempo de moagem de 180 minutos. A Tabela 5.11 mostra a influência do tempo de moagem no tempo de pega dos cimentos de fosfato de cálcio obtidos via síntese de combustão em solução.

Tabela 5.11. Influência do tempo de moagem no tempo de pega dos cimentos de fosfato de cálcio obtidos via síntese de combustão em solução, utilizando-se uma solução aquosa contendo 2,5% de hidrogeno fosfato de sódio.

Tempo de Moagem (min)	Tempo de pega inicial (min)	Tempo de pega final (min)
30	44 ± 3	101 ± 5
60	39 ± 2	94 ± 3
180	23 ± 4	61 ± 5

O tempo de pega foi altamente influenciado pelo tempo de moagem. O aumento do tempo de moagem reduziu significativamente o tempo inicial de pega, com a redução média de 21 minutos com o aumento de 30 para 180 minutos de moagem. Tais resultados vão de acordo com os obtidos na literatura, e é bem conhecido que o tempo de pega de um cimento pode ser modificado mudando-se o tamanho de partícula, pois quanto menor o tamanho de partícula, menor o tempo de pega (BOHNER et al., 2005; DOROZHKIN, 2009; GINEBRA et al., 2004; OTSUKA et al., 1995).

O melhor tempo inicial de pega obtido neste trabalho (23 minutos) é similar ao tempo médio de pega dos cimentos obtidos por Oda et al. (2008) que obteve tempo médio de pega de $19,4 \pm 0,55$ minutos, utilizando o cimento comercial da marca Biopex®, quando utilizado com o mesmo aditivo de pega (hidrogeno fosfato de sódio). Entretanto foi maior que o tempo de pega obtido por Ishikawa et al. (2008), que conseguiram produzir os cimentos de fosfato de cálcio de pega rápida utilizando uma solução neutra de fosfato, reduzindo o tempo de pega do cimento tradicional de 30 minutos para 5 minutos (MIYAMOTO et al., 1995). Porém o cimento utilizado no trabalho supracitado é composto por uma mistura equimolar de Fosfato Tetracálcico e DCPA.

Outra maneira de se controlar o tempo de pega dos cimentos de fosfato de cálcio é variando-se o teor sólido/líquido, menores teores de água diminuem o tempo de pega (BOHNER et al., 2005; DOROZHKIN, 2009). Este parâmetro, entretanto, não pode ser otimizado neste trabalho, pois a menor razão sólido/líquido possível foi utilizada para cada tempo de moagem estudado.

Outro parâmetro que influencia o tempo de pega é a adição de cristais nucleantes (GINEBRA et al., 2006; BOHNER, 2007; BOHNER et al., 2008). A adição de nanocristais de hidroxiapatita em teores de até 2% diminui o tempo de pega. Tal parâmetro poderá ser estudado em trabalhos futuros.

A Tabela 5.12 mostra os valores de porosidade aparente, absorção de água e densidade aparente medidas pelo método de Arquimedes para cada tempo de moagem estudado.

Tabela 5.12. Influência do tempo de moagem nas na porosidade aparente, absorção de água e densidade aparente medidas pelo método de Arquimedes.

Tempo de Moagem (min)	Porosidade Aparente (%)	Absorção de Água (%)	Densidade Aparente (g/cm³)
30	40,2 ± 2,2	22,3 ± 0,8	1,40 ± 0,03
60	39,3 ± 1,9	21,7 ± 1,0	1,42 ± 0,03
180	28,2 ± 1,3	14,9 ± 0,6	1,61 ± 0,04

Pode-se perceber um aumento na densidade aparente dos cimentos com o aumento do tempo de moagem. Por outro lado, a porosidade aparente e a absorção de água diminuem com o aumento do tempo de moagem. Comparando com dados da literatura, Gbureck et al. (2004) obtiveram o α -TCP pelo método convencional, aquecendo monetita e carbonato de cálcio e obtiveram blocos de cimento com pós moídos por 60 e 240 minutos com densidade aparente de 1,47 e 1,44 g/cm³, respectivamente e com porosidade de 46,5 e 48,2%, respectivamente. Miño-Fariña et al. (2009) também obtiveram valores de 1,64 ± 0,05 de densidade aparente e porosidade de 47,57% ± 1,66. Entretanto, o α -TCP obtido via síntese de combustão permitiu a obtenção de corpos de prova com menor porosidade (28,2% ± 1,3). A Tabela 5.14 mostra a influência do tempo de moagem nas propriedades mecânicas dos cimentos de fosfato de cálcio.

Tabela 5.13. Influência do tempo de moagem nas propriedades mecânicas dos cimentos de fosfato de cálcio obtidos por combustão.

Tempo de Moagem (min)	Resistência Mecânica (MPa)
30	4,6 ± 1,6
60	9,5 ± 1,8
180	30,4 ± 9,0

Como esperado, a resistência mecânica no ensaio de compressão aumenta com o aumento dos tempos de moagem como consequência da diminuição do tamanho de partículas, resultando em um cimento menos poroso e conseqüentemente com maior resistência à compressão. Outro fato que influencia a diferença da resistência mecânica entre a amostra

moída por 3 horas e as outras amostras é que esta utilizou um menor teor de líquido para a conformação dos corpos de prova.

O valor mais alto de resistência mecânica obtido neste trabalho foi de 30,4 MPa para o tempo de moagem de 180 minutos. Este valor é maior do que o encontrado por Oda et al. (2008), que utilizando o cimento comercial Biopex® obteve valores de resistência mecânica entre 8 e 10 MPa empregando uma razão líquido/pó de 0,33mL por grama. Os valores de resistência mecânica encontrados neste trabalho também são superiores aos encontrados por Santos (2002) para o cimento de fosfato tricálcico obtido via reação no estado sólido. Em sua tese a resistência mecânica a compressão ficou ao redor de 11 MPa, valor similar ao encontrado por Oda et al. (2008) em seu trabalho utilizando o cimento comercial Biopex®. Contudo, o valor é menor do que o encontrado por Gbureck et al. (2004), que após moagem por 240 minutos conseguiu 63,3 MPa para o α -TCP moído em etanol e de 82,0 MPa para o pó moído à seco. Neste trabalho foi utilizada a mesma razão líquido/pó. Um grande número de fatores pode influenciar a resistência mecânica dos cimentos de α -TCP, como a cristalinidade do pó, o projeto do molde e a técnica de mistura (Gbureck et al., 2004).

A Figura 5.23 mostra a microestrutura do cimento de α -fosfato tricálcico obtido com o pó moído por 30 e 180 minutos. É possível ver a formação das agulhas em rosáceas de hidroxiapatita deficiente em cálcio na superfície externa de ambas as amostras, porém a microestrutura da amostra moída por 180 minutos parece possuir uma maior quantidade de agulhas, além de elas parecerem possuir maior tamanho em relação às agulhas da amostra moída por 30 minutos.

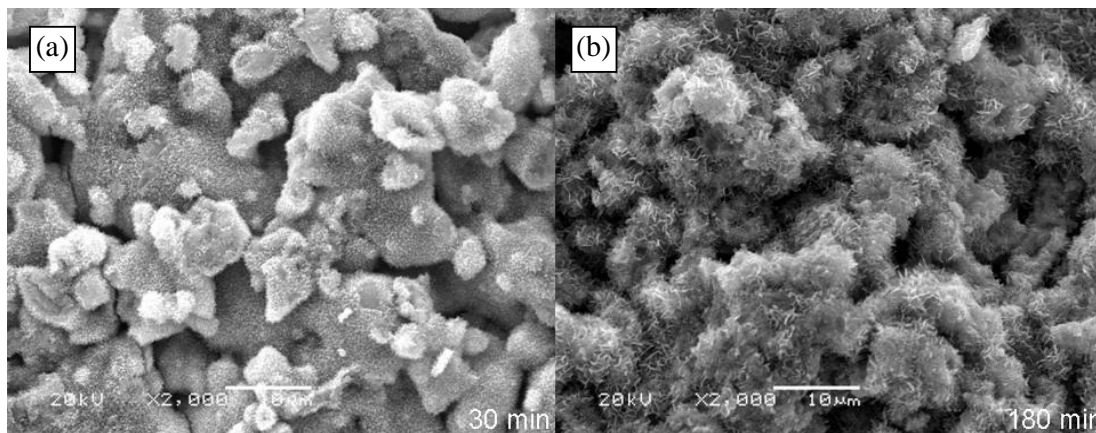


Figura 5.23. Micrografias obtidas por MEV da microestutura dos cimentos de α -TCP moídos por (a) 30 minutos e (b) 180 minutos.

Santos (2002) sintetizou o α -TCP via síntese de reação em estado sólido e verificou que após 24 horas de cura não se pode observar o aparecimento de estruturas de hidroxiapatita deficiente em cálcio. O aparecimento das agulhas na microestrutura é característico dos pós de cimento de α -fosfato tricálcico e a velocidade de formação das agulhas de CDHA está relacionada com a reatividade do pó, dessa forma pode-se afirmar que os cimentos de fosfato de cálcio obtidos via síntese por combustão são mais reativos do que os obtidos pela reação em estado sólido. O processo de aumento da resistência mecânica ocorre pelo intercruzamento dos cristais de CDHA que se precipitam na superfície do cimento (GRUNINGER et al., 1984).

5.2.2 Análise *in vitro*

Por ter apresentado melhores resultados em termos de porosidade e de propriedades mecânicas, para o prosseguimento do trabalho, elegeu-se o α -TCP moído por 180 minutos. Visando avaliar o comportamento *in vitro* dos cimentos de fosfato de cálcio obtidos via síntese de combustão em solução, o material foi imerso em solução de plasma sanguíneo simulado por tempos crescentes de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias e avaliou-se sua microestrutura e propriedades físico-químicas. Foram preparados 6 corpos de prova para cada tempo de imersão. A Figura 5.24 apresenta as micrografias obtidas por MEV da superfície externa do cimento de α -TCP, para períodos crescentes de até 4 semanas.

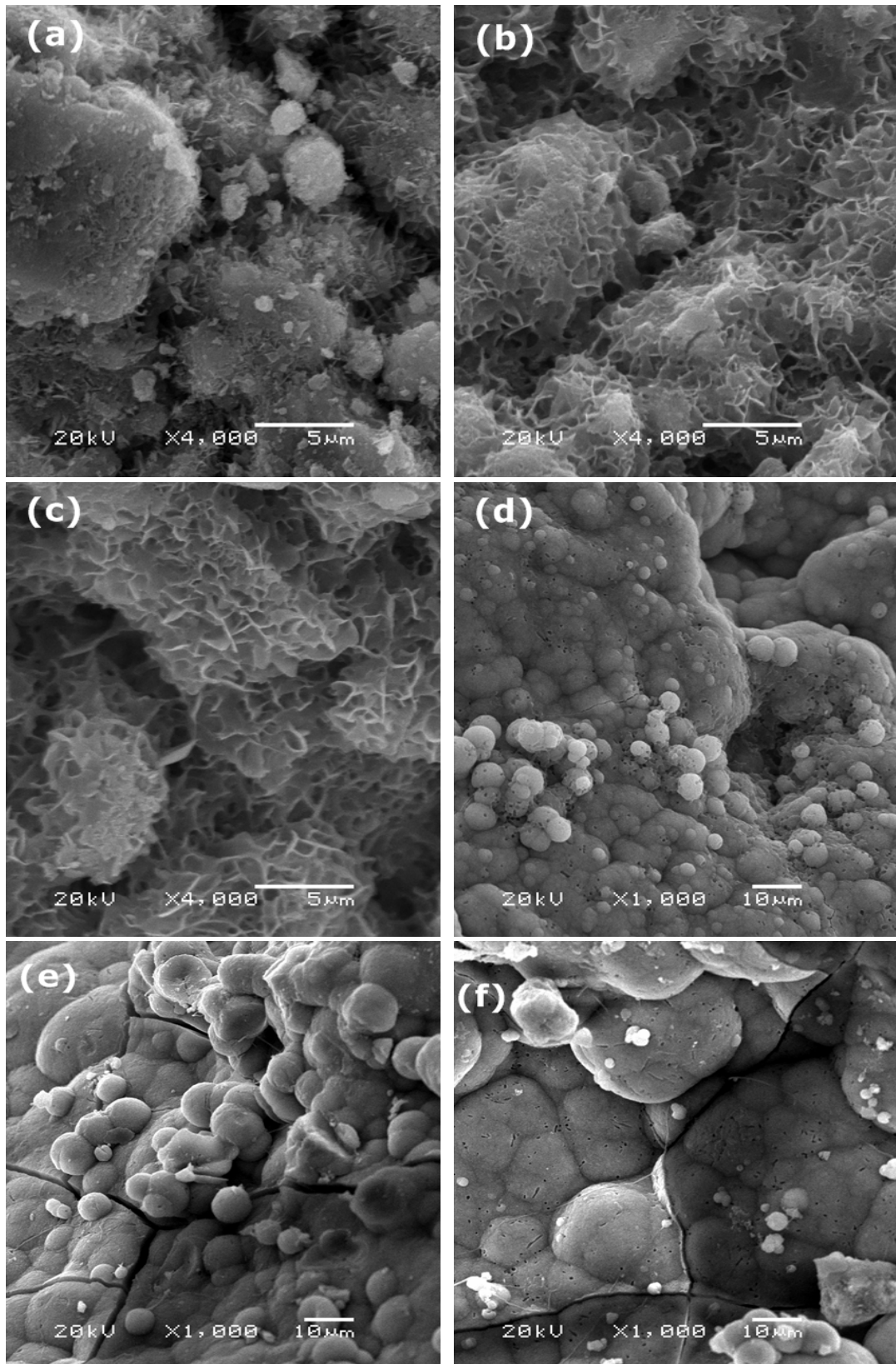


Figura 5.24. Micrografias eletrônicas de varreduras da superfície externa do cimento de α -fosfato tricálcico, após tempos de imersão em SBF de (a) 24h, (b) 3 dias, (c) 1 semana, (d) 2 semanas, (e) 3 semanas e (f) 4 semanas.

Pode-se observar uma considerável diminuição da quantidade de precipitados em forma de agulhas de HA na superfície externa do cimento, para 24h de imersão em SBF (Figura 5.24(a)), com relação ao cimento com 24h de cura (Figura 5.23(a)), possivelmente provocada pela solubilização inicial do α -TCP durante a transformação α -TCP/HA, isto terá influência na resistência mecânica à compressão, como será mostrado em resultados apresentados posteriormente.

Com o aumento do tempo de imersão para 3 dias em SBF (Figura 5.24(b)), observa-se o aumento na quantidade de agulhas de HA precipitadas. Para o tempo de 1 semana de imersão em SBF (Figura 5.24(c)), o cimento apresenta uma camada homogênea de agulhas de HA.

A partir de tempos superiores a 2 semanas de imersão em SBF (Figuras 5.24(d, e, f)), o cimento passa a apresentar uma camada homogênea e espessa de HA. As agulhas de HA passam a organizar-se na forma de esferas, que vão crescendo em diâmetro com o aumento dos tempos de imersão através do processo de coalescimento de esferas menores, que se juntam para formar uma esfera maior. Após 14 dias de imersão as esferas apresentam tamanho médio entre 5 e 10 μm , já para 21 dias de imersão o tamanho cresce para o intervalo entre 10 e 15 μm até que finalmente, para o tempo de imersão de 28 dias as esferas crescem para diâmetros entre 25 e 25 μm . Nas micrografias é possível observar a presença de fraturas que podem ser causadas pelo processo de secagem das amostras para a análise de MEV.

A Figura 5.25 apresenta uma micrografia obtida por MEV com alto aumento, mostrando, em detalhe, que as esferas formadas em tempos superiores a 14 dias de imersão são formadas por agulhas de HA, conforme demonstrado na literatura (WEI et al., 2008). Após 28 dias de imersão, a camada formada de hidroxiapatita deficiente em cálcio chega a aproximadamente 10 μm de espessura, como mostra a Figura 5.26.

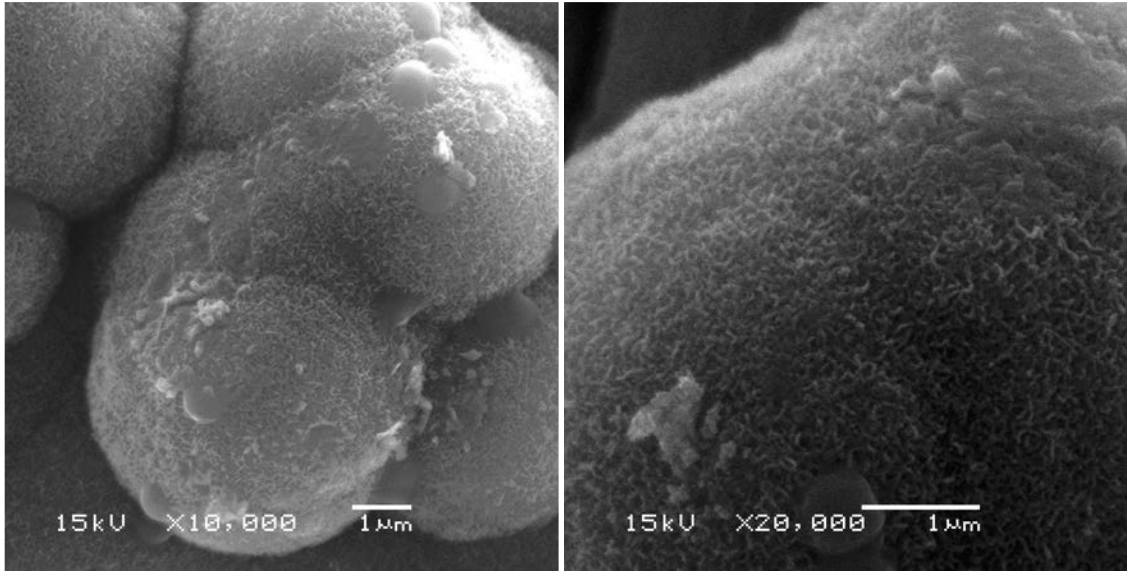


Figura 5.25. Micrografias obtidas por MEV mostrando em detalhe a microestrutura dos cimentos de α -TCP após 28 dias de imersão em SBF.

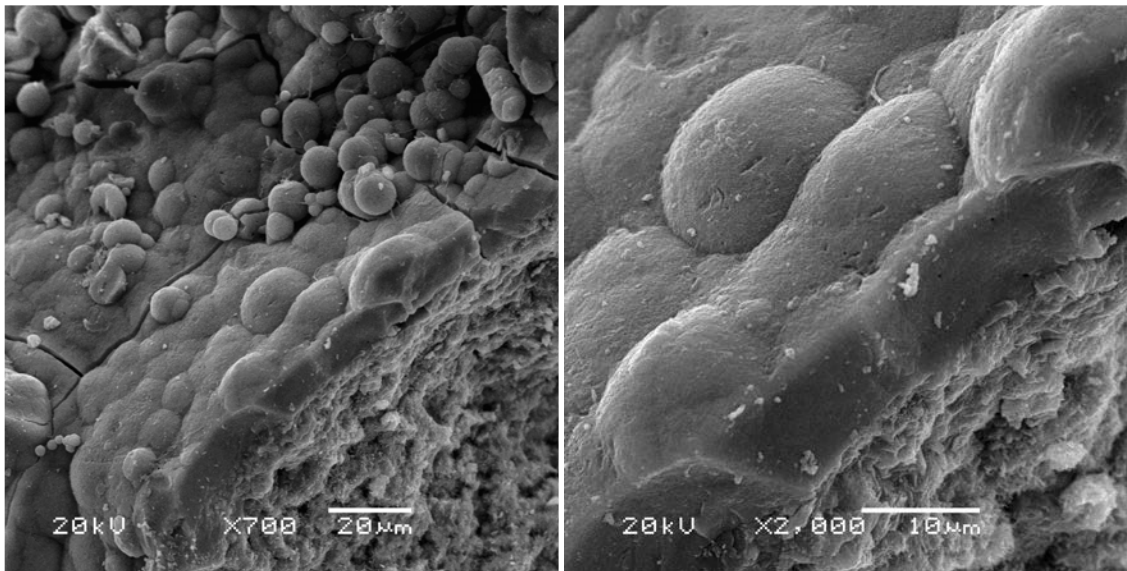


Figura 5.26. Micrografias obtidas por MEV mostrando a camada de HA formada nos cimentos de α -TCP após 28 dias de imersão em SBF.

A Figura 5.27 mostra difratogramas de raios X do cimento de α -TCP para tempos crescentes de imersão em SBF de até 4 semanas.

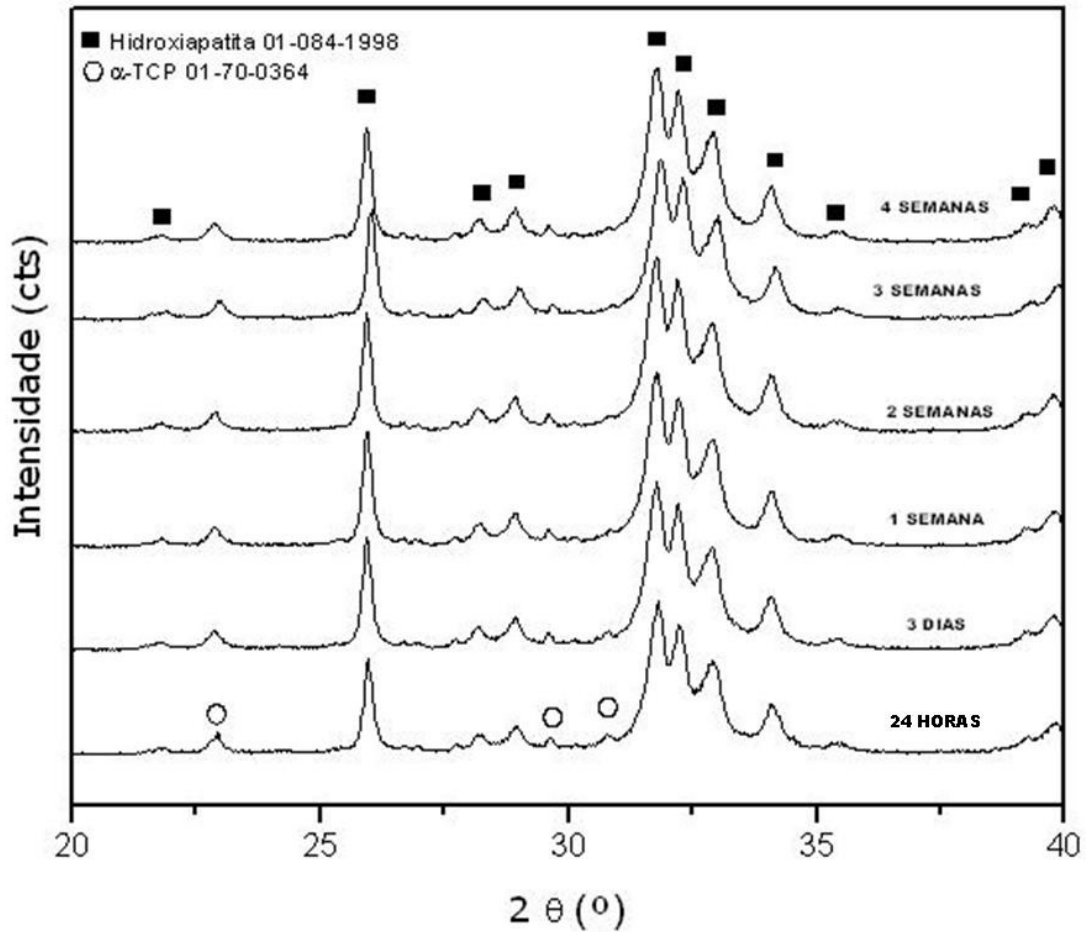


Figura 5.27. Difratogramas de DRX do cimento de α -fosfato tricálcico, com tempos crescentes de imersão em SBF de até 4 semanas.

Na Figura 5.27 é possível observar, já para 24h de imersão em SBF, a formação de uma alta porcentagem de hidroxiapatita em fase amorfa, o que pode ser identificado pela largura dos picos. Esta alta velocidade de precipitação de hidroxiapatita encontrada no α -TCP obtido via reação por combustão é consequência de sua elevada pureza e estrutura nanométrica.

A Figura 5.28 mostra a porosidade dos cimentos de fosfato de cálcio para cada tempo de imersão em SBF. Pode-se perceber que há um aumento no valor da porosidade

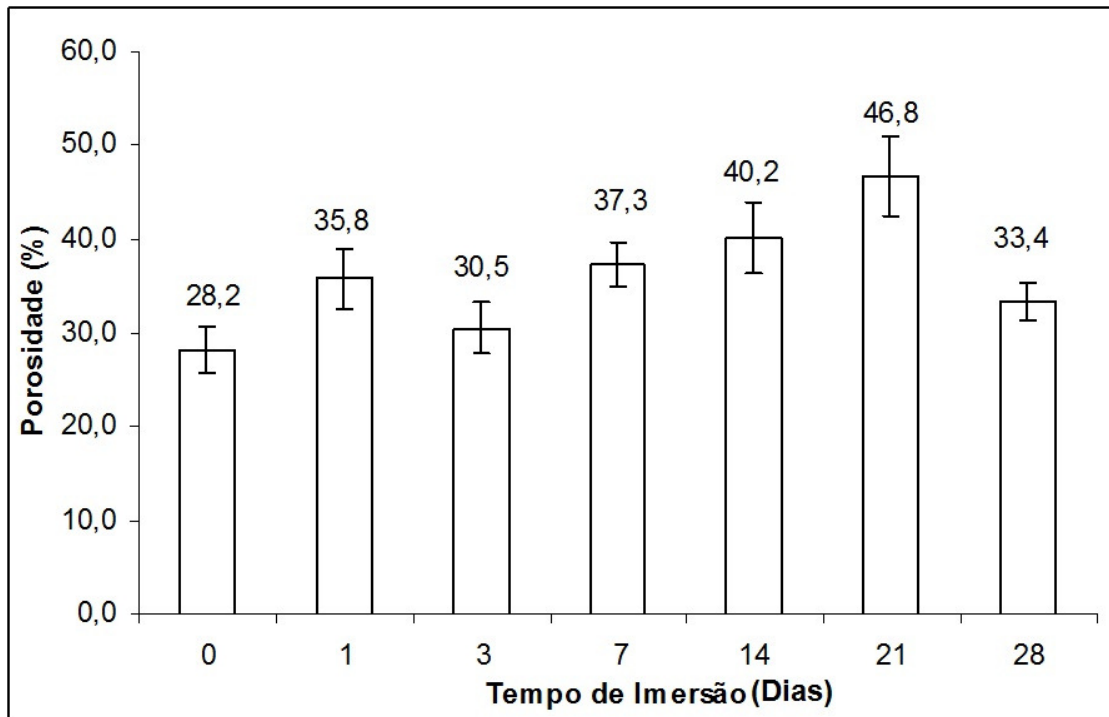


Figura 5.28. Influencia do tempo de imersão em SBF na porosidade dos cimentos de α -TCP.

A Figura 5.29 apresenta os valores da resistência mecânica à compressão obtidos para os cimentos de α -TCP em função do tempo de imersão em SBF.

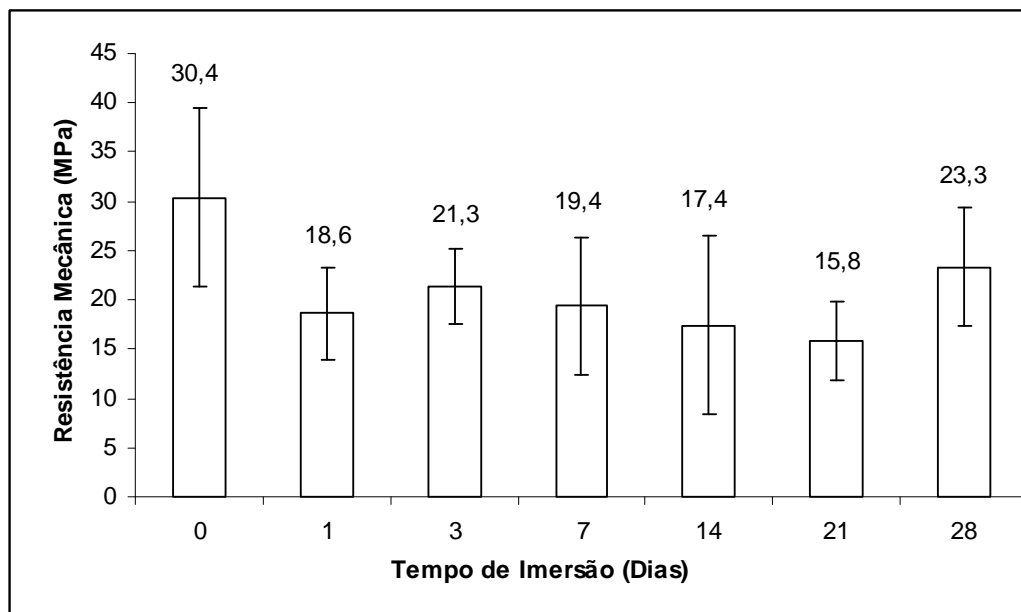


Figura 5.29. Influencia do tempo de imersão em SBF na resistência mecânica a compressão dos cimentos de α -TCP.

No primeiro estágio da imersão, após apenas 1 dia, é possível observar uma queda na resistência mecânica à compressão do cimento de 30,4 MPa para 18,6 MPa, representando uma diminuição de 39% do valor inicial, que está associado com uma forte redução na porosidade, como mostrado na Figura 5.28. Esta perda inicial da resistência mecânica possivelmente é causada pela solubilização do α -TCP, processo necessário para a precipitação da HA (CARDENAS et al., 2008). O fosfato tricálcico reage com a água do meio e se transforma em hidroxiapatita. Sabe-se que os precipitados de CDHA na forma de agulhas ou glóbulos são responsáveis pelo aumento das propriedades mecânicas, porém a solubilização do α -fosfato tricálcico, responsável pelo aumento da porosidade, pode explicar o fato de os cimentos obtidos por combustão não conseguirem melhores valores de resistência mecânica após a imersão em solução de plasma sanguíneo simulado, como esperado.

Após 3 dias de imersão, com o aumento da quantidade de agulhas de hidroxiapatita precipitadas e o aumento da espessura da camada formada, ocorre uma estabilização estatística no valor de resistência mecânica que chega ao valor de 23 MPa para tempos de imersão de 4 semanas.

A Figura 5.30 mostra os valores de pH dos cimentos de α -TCP em função do tempo de imersão em SBF.

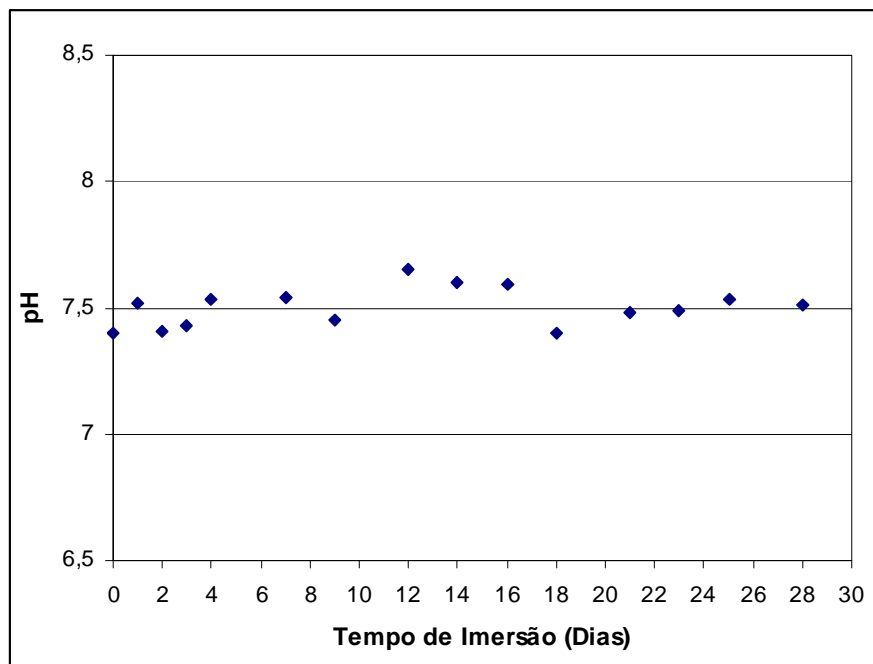


Figura 5.30. Influência do tempo de imersão em SBF no valor de pH dos cimentos de α -TCP.

O cimento de fosfato de cálcio obtido apresenta valores de pH no intervalo de neutralidade para uso clínico (6,5-8,5), o que evita efeitos citotóxicos que poderiam comprometer as suas características de biocompatibilidade (DRIESSENS et al., 1997), o que reduziria o tempo de vida do implante e diminui a probabilidade de falha do implante evitando, assim, a necessidade de uma segunda cirurgia para trocar o implante.

A Tabela 5.14 mostra os resultados obtidos através do ensaio de avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro* dos cimentos de α -fosfato tricálcico obtidos via reação de combustão, pelo método de difusão em Agar, seguindo as normas ASTM F895-84:1984 e ISO 10993.5:2009. Os ensaios foram realizados pelo Instituto Adolfo Lutz (SP) e o laudo se encontra no Anexo I.

Tabela 5.14. Índice de zona obtido após a leitura das placas de culturas celulares para as amostras de α -fosfato tricálcico.

Amostra	Índice de zona obtido após a leitura das placas de culturas celulares			
	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4
	IZ	IZ	IZ	IZ
Fosfato Tricálcico - $(Ca_3PO_4)_2$	0	0	0	0
Controle Negativo	0	0	0	0
Controle Positivo	4	4	4	4

Onde IZ, representa o índice de zona, sendo que o valor zero corresponde à nenhuma zona de citotoxicidade e o valor 4 corresponde à uma zona severamente citotóxica. O índice de zona corresponde à área que é corada pelo ágar com corante vermelho neutro. As células coradas correspondem às células mortas. Como se pode ver na Tabela 5.14, o cimento de fosfato tricálcico apresentou a graduação de índice de zona igual a zero, o que indica que a quantidade de células que foram coradas pelo corante vital foi praticamente nula.

De acordo com o laudo, o cimento de fosfato tricálcico obtido via síntese de combustão, não apresentou nenhum sinal de citotoxicidade para a linhagem celular utilizada neste estudo (NCTC Clone 929, que são células de tecido conjuntivo de camundongo), o que permitiria levar os materiais sintetizados nesta tese para etapas de avaliação *in vivo*.

De acordo com Santos (SANTOS, 2002) o método de citotoxicidade *in vitro* por contato (Difusão de Agar, método utilizado neste trabalho) é o mais adequado para avaliar a citotoxicidade de cimentos de fosfatos de cálcio. O mesmo autor utilizou este método para

avaliar a citotoxicidade de cimentos de fosfato de cálcio sintetizados por solução sólida e obteve respostas similares aos do controle negativo, sendo que ambos apresentaram Índice de Zona igual a zero.

Tal resultado permite inferir que além de ser mais rápido que os métodos de síntese convencionais, o método de síntese de combustão em solução permitiu a obtenção de pós com baixa citotoxicidade.

Após a síntese por combustão e análise das propriedades físico-químicas, mecânicas e citotóxicas dos pós de alfa fosfato tricálcico, seguiu-se para a próxima etapa do trabalho que foi a confecção de arcabouços poliméricos reforçados com o α -TCP, visando aplicação em engenharia de tecidos.

5.3 Criopolimerização

Esta etapa foi realizada no *Instituto de Ciencia y Tecnologia de Polímeros (ICTP)* do *Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC)*, localizado em Madri, na Espanha com bolsa de doutorado do tipo sanduíche fornecida pelo CNPq. Definiu-se a utilização de dimetilamino etil metacrilato (DMAEMA) como polímero devido a suas excelentes propriedades como liberador controlado de fármacos e biocompatibilidade. Juntando as propriedades do α -TCP obtido via síntese de combustão com as já citadas do DMAEMA, julgou-se possível sintetizar um novo material com excelente possibilidade para uso em engenharia de tecidos, mais especificamente para o uso como implante ósseo.

5.3.1 Estudo do Comonômero e Agente Entrecruzante

Esta etapa do trabalho teve como objetivo eleger as melhores condições para a preparação de polímeros porosos através da técnica de criopolimerização utilizando como base monômero o Dimetil Aminoetil Metacrilato (DMAEMA), cujo polímero se destaca por ser sensível à temperatura e ao pH (MUÑOZ-BONILLA et al., 2007), o que o torna muito interessante para a utilização como liberador de fármacos (DENG et al., 2009). Nesta etapa do estudo variou-se o co-monômero utilizado, Ácido Acrílico (AA) ou Ácido Metacrílico (MA), tais ácidos têm como característica alterar as propriedades de inchamento dos hidrogéis (ZHAI et al., 2004).

Visando determinar mudanças estruturais e de fase no sistema durante o resfriamento, mediram-se as curvas de resfriamento da solução monomérica contendo baixo teor de catalisador (PEREZ et al., 2008). Monitorou-se a reação no momento da imersão da solução monomérica no criostato a -20°C com um termopar, acompanhando-se a evolução da temperatura em função do tempo, como mostra o gráfico abaixo da Figura 5.31.

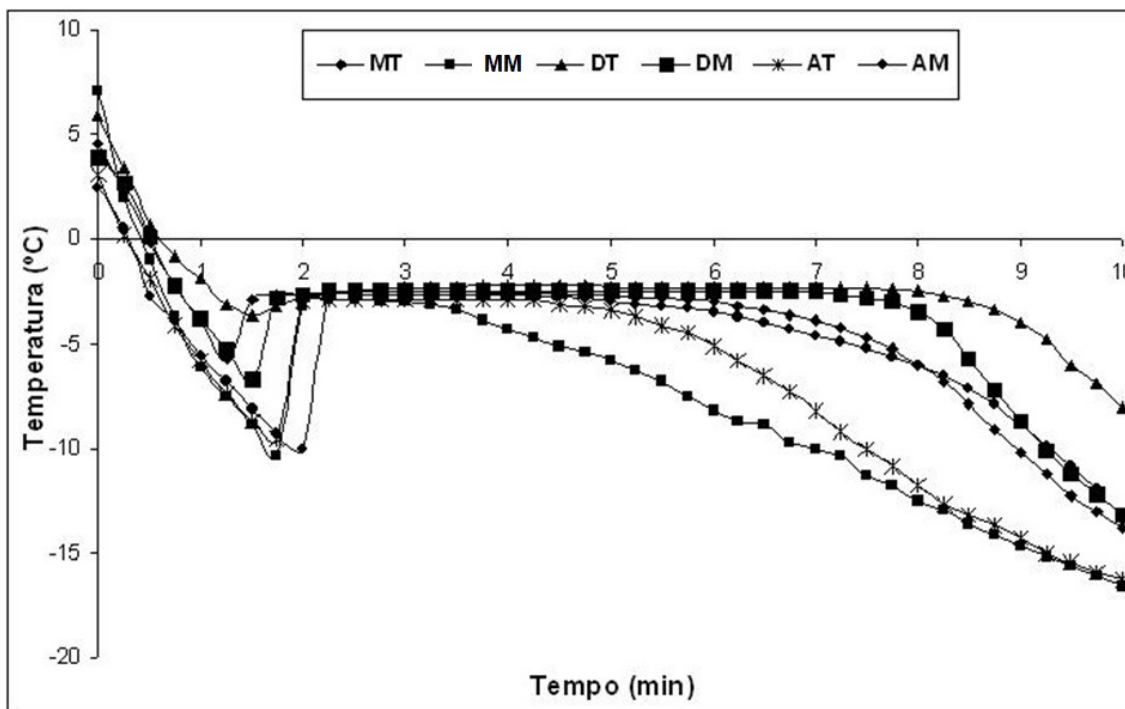


Figura 5.31. Evolução da temperatura em função do tempo após a imersão no criostato a -20°C .

De acordo com Ivanov et al. (2006) as reações de criopolimerização em sistemas moderadamente congelados apresentam três etapas: 1) Super resfriamento, 2) Platô de cristalização e 3) Resfriamento convencional. A duração dos efeitos do super resfriamento dependem da temperatura na qual a câmara de reação do criostato se encontrar. Então, o congelamento do solvente dá lugar a um platô de cristalização, no qual ocorre a reação de gelificação dos monômeros, até que o sistema é resfriado à temperatura de trabalho, -20°C no caso dessa pesquisa. Pode-se ver claramente as 3 etapas citadas por Ivanov nas curvas de resfriamento obtidas por todas as amostras, como mostra a Figura 5.31.

A temperatura inicial de cristalização do solvente (T_c), corresponde ao início da formação dos cristais (He et al., 2007). O calor latente de fusão do gelo recém formado leva a um aumento rápido da temperatura do sistema, até que esta atinja a temperatura de congelamento do sistema (T_{cs}) (He et al., 2007). A temperatura final de congelamento foi atingida após 12 a 15 minutos de congelamento. A Tabela 5.15. mostra a T_c e T_{cs} , assim como o tempo para o início da cristalização, t_c , e o tempo em que o sistema se manteve na temperatura de congelamento do sistema, Δt_{cs} .

Tabela 5.15. Dados extraídos da curva de resfriamento.

Reação	T_c (°C)	t_c (min)	T_{cs} (°C)	Δt_{cs} (min)
MT	-5,7	1,25	-2,9	6,75
MM	-10,4	1,75	-2,9	5,50
DT	-6,7	1,50	-2,8	7,25
DM	-3,6	1,50	-2,7	7,50
AT	-9,5	1,75	-2,9	5,75
AM	-10,0	2,25	-2,7	7,25

Após aproximadamente 15 minutos o sistema atingiu a temperatura de -20°C, indicando o fim do resfriamento para todas as amostras analisadas. Maiores tempos de cristalização levam à formação de um maior volume de cristais de gelo antes do início do processo de crioconcentração que leva à polimerização dos monômeros, assim pode-se esperar que as amostras com AAc (ácido acrílico) apresentem uma maior porosidade. Percebe-se que a formação dos cristais de gelo é retardada nas reações contendo um dos dois co-monômeros utilizados (AA e MA), entretanto tal fenômeno não ocorreu nas amostras sem a adição de co-monômero.

A temperatura de congelamento do sistema monomérico não variou significativamente com a alteração dos reagentes utilizados, ficando no intervalo entre - 2,7 e - 2,9°C. As reações sem co-monômero apresentaram um maior tempo de patamar na temperatura de congelamento, o que pode indicar que os criopolímeros obtidos nessas reações apresentarão paredes mais espessas. Nas Figuras 5.32 e 5.33 pode-se ver os espectros obtidos por Espectroscopia de Infravermelho por Refletância Total Atenuada para as amostras em que o gelo foi extraído através do processo de liofilização (Fig. 5.32) e pelo processo de derretimento (Fig. 5.33).

Analisando-se as Figuras 5.32 e 5.33, percebeu-se que tanto o uso de ácido acrílico ou de ácido metacrílico, quanto o uso dos entrecruzantes, MBAM ou TEGMA, não influenciaram na estrutura química do polímero, sendo que os picos identificados são assinalados aos grupos do DMAEMA.

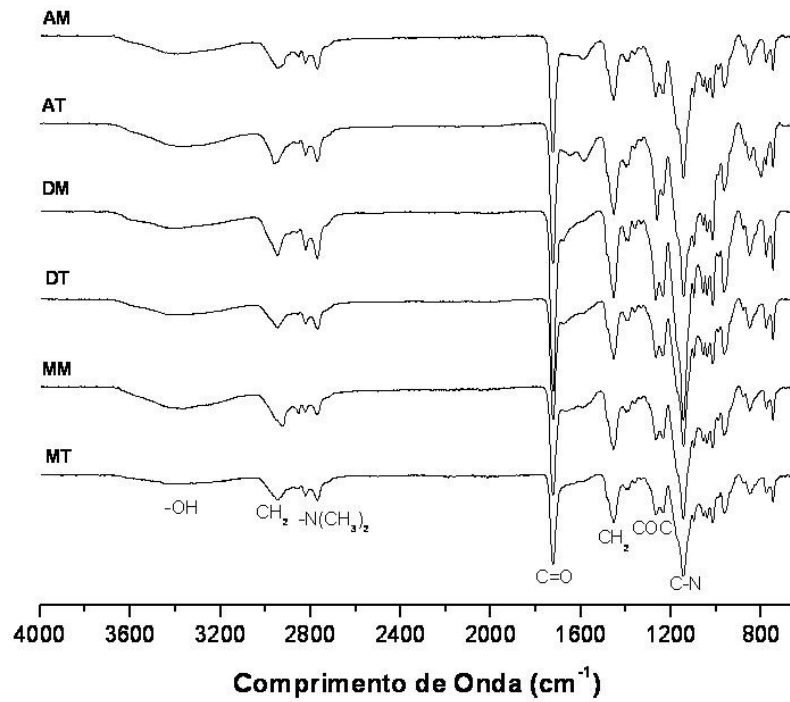


Figura 5.32. Espectros de espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada das composições estudadas com a extração do gelo por liofilização.

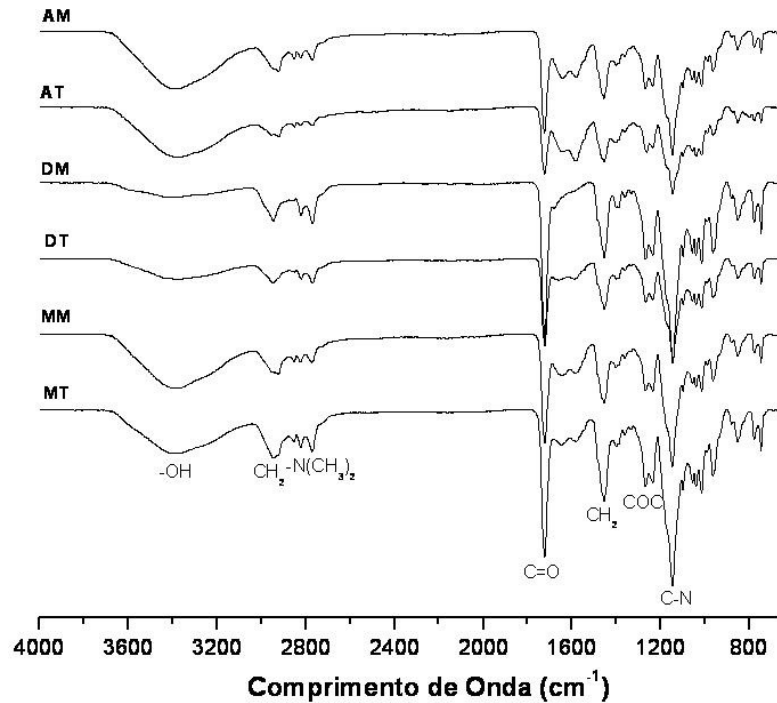


Figura 5.33. Espectros de espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada das composições estudadas com a extração do gelo por derretimento.

O pico largo e intenso entre 3000 cm^{-1} e 3700 cm^{-1} pode ser atribuído às ligações OH resultantes da água adsorvida pela rede do polímero. O pico ao redor de 1643 cm^{-1} , também corresponde às ligações O – H da água. Já os picos que aparecem ao redor de 2940 cm^{-1} estão relacionados com as vibrações de estiramento do grupo metil e os picos em 2819 e 2767 cm^{-1} correspondem às ligações N – C – H do grupo dimetilamino do DMAEMA ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) (ROY et al., 2008). Enquanto que os picos em 1454 cm^{-1} correspondem à vibração de dobramento da ligação C-H do CH_2 e a 1144 cm^{-1} à vibração de estiramento da ligação C – N (ROY et al., 2008). Já o pico forte em 1723 cm^{-1} corresponde ao grupo éster (C = O) (GÜRDAG et al., 2006; ROY et al., 2008; SANJUAN et al., 2008). As bandas em 1237 e 1227 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento das ligações C-O-C (GÜRDAG et al., 2006), enquanto que a banda em 1397 cm^{-1} corresponde ao dobramento das ligações C – H (GÜRDAG et al., 2006).

Visto que não foi possível solubilizar o polímero em nenhum dos solventes deuterados disponíveis, como água deuterada e clorofórmio, utilizou-se a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido para analisar-se a estrutura dos criogéis. As Figuras 5.34 e 5.35 mostram os gráficos de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido das amostras MA/MBAM e AA/TEGMA, respectivamente.

Nas Figuras 5.34 e 5.35, correspondentes às amostras MM (MA/MBAM) e AT (AA/TEGMA), respectivamente, além do espectro de ressonância magnética nuclear de Carbono 13, pode-se encontrar representadas as moléculas do DMAEMA e do AA ou do MA, de acordo com a sua presença e a cada carbono é designado um número de acordo com sua posição, e são assinalados no espectro de acordo com a sua distância prevista, em PPM, utilizando-se o *software Chemdraw* e de acordo com dados da literatura (BOYER et al., 2004). Analisando-se estas figuras percebe-se que as naturezas do entrecruzante e do comonomero pouco afetam a estrutura do criogel sintetizado. O mesmo resultado interpretado foi obtido através da análise de espectroscopia de infravermelho.

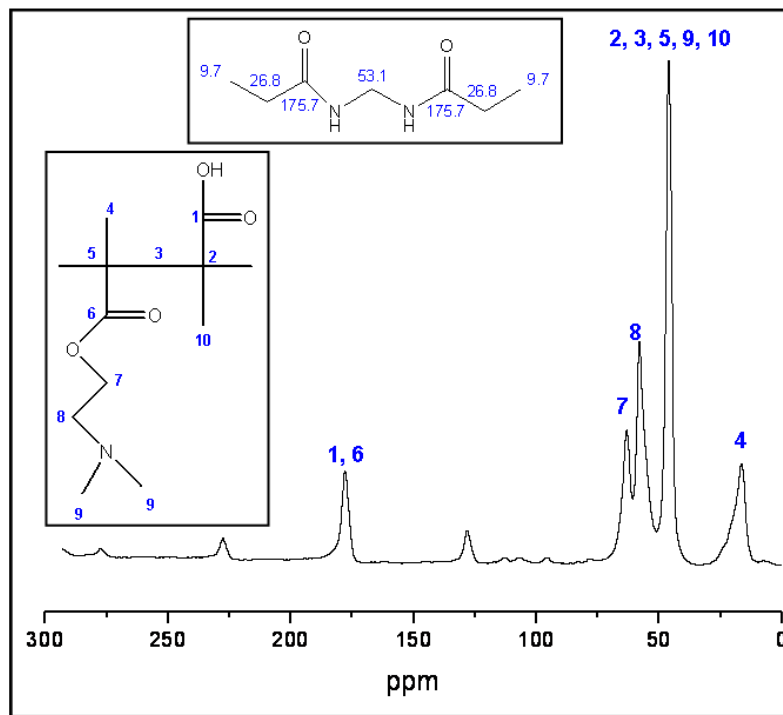


Figura 5.34. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido das amostras MM.

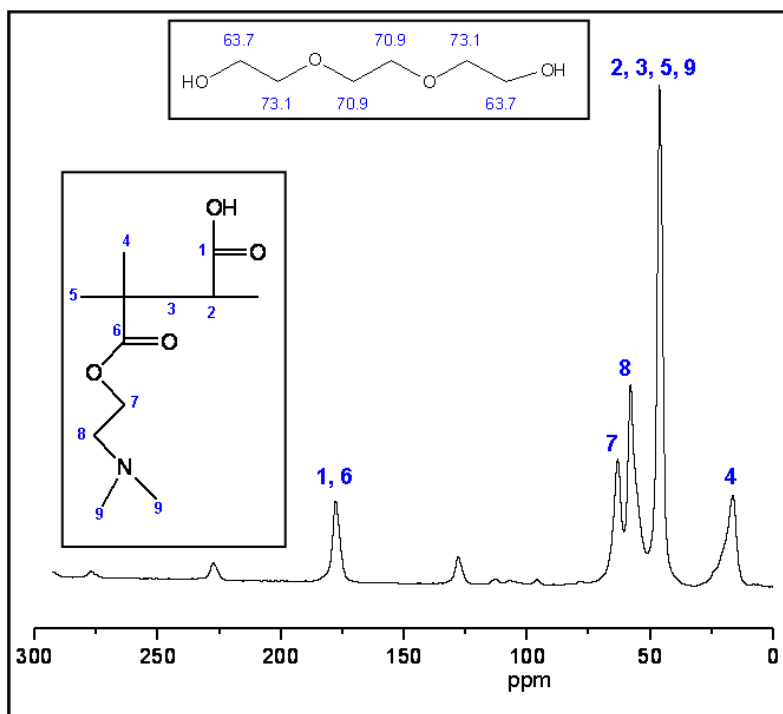


Figura 5.35. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido da amostra AT.

Uma das desvantagens da técnica de RMN no estado sólido é a dificuldade em distinguir picos muito próximos pelo fato de que quando no estado sólido os elétrons possuem pouca mobilidade, assim o processo de excitação e relaxamento do spin magnético do núcleo se torna mais demorado e a resolução da medida se torna menor.

Os picos não identificados possivelmente representam as interações do carbono da cadeia principal com elétrons provenientes de carbonos de outras cadeias. Tais interações podem afetar o tempo de relaxação do spin nuclear, afetando o espectro de ressonância magnética nuclear para o carbono 13.

Após a síntese dos criogéis, estes foram limpos em água destilada por 24 horas, sob agitação lenta. A Figura 5.36 mostra o percentual de massa perdida após a lavagem para cada composição e tipo de extração de gelo.

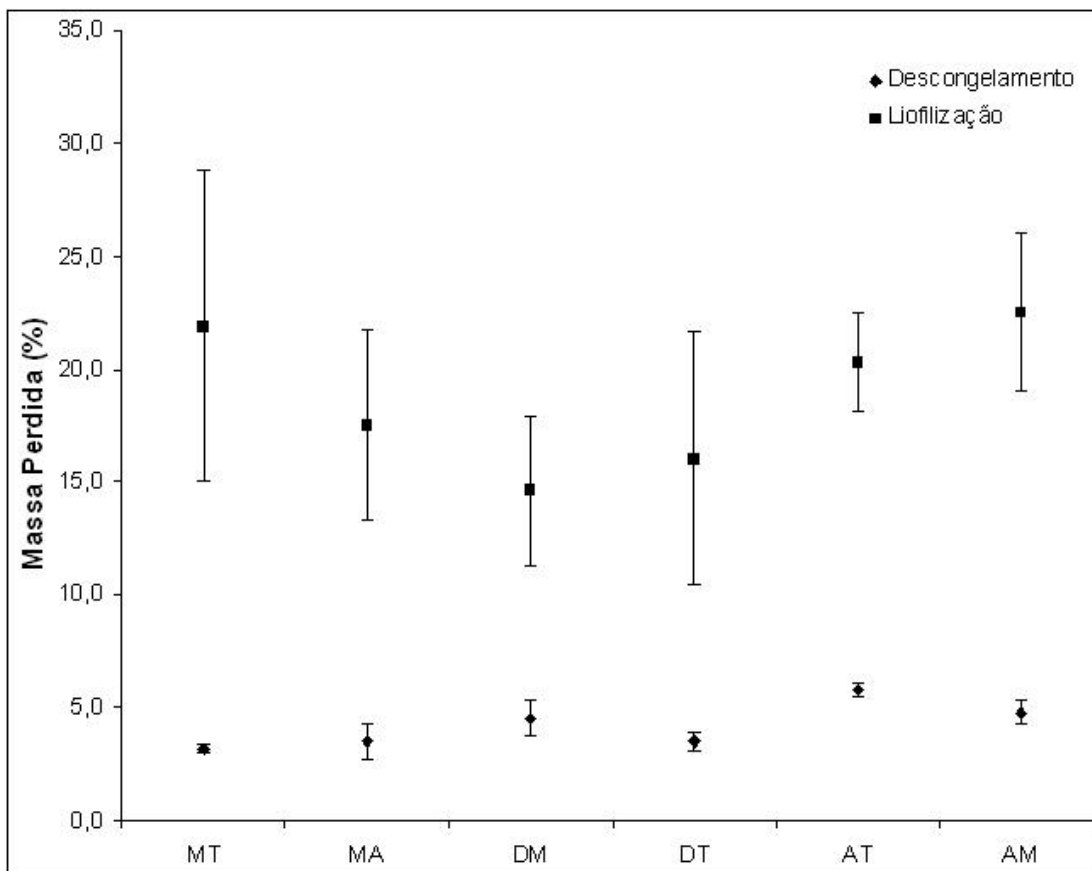


Figura 5.36. Massa perdida por cada composição para cada tratamento utilizado para a extração do gelo após a lavagem sob agitação em água destilada por 24 horas.

No processo de lavagem ocorre a retirada do monômero residual não polimerizado e a dissolução das cadeias poliméricas lineares não entrecruzadas. Nota-se que não houve uma

variação significativa para cada composição, sendo o fator que exerceu a maior influência o tipo de tratamento utilizado para a extração do gelo. Para o método do descongelamento a perda de massa variou entre 3,2 e 5,8% para as composições estudadas, indicando que tal tratamento leva à obtenção de amostras mais densas. Enquanto que para as amostras nas quais foram empregadas o método de liofilização, tal valor ficou entre 14,6 e 22,5%, levando à obtenção de amostras mais leves e menos densas, como mostra a Figura 5.37 mostra o gráfico com a densidade aparente das composições estudadas calculadas pelo método de Arquimedes.

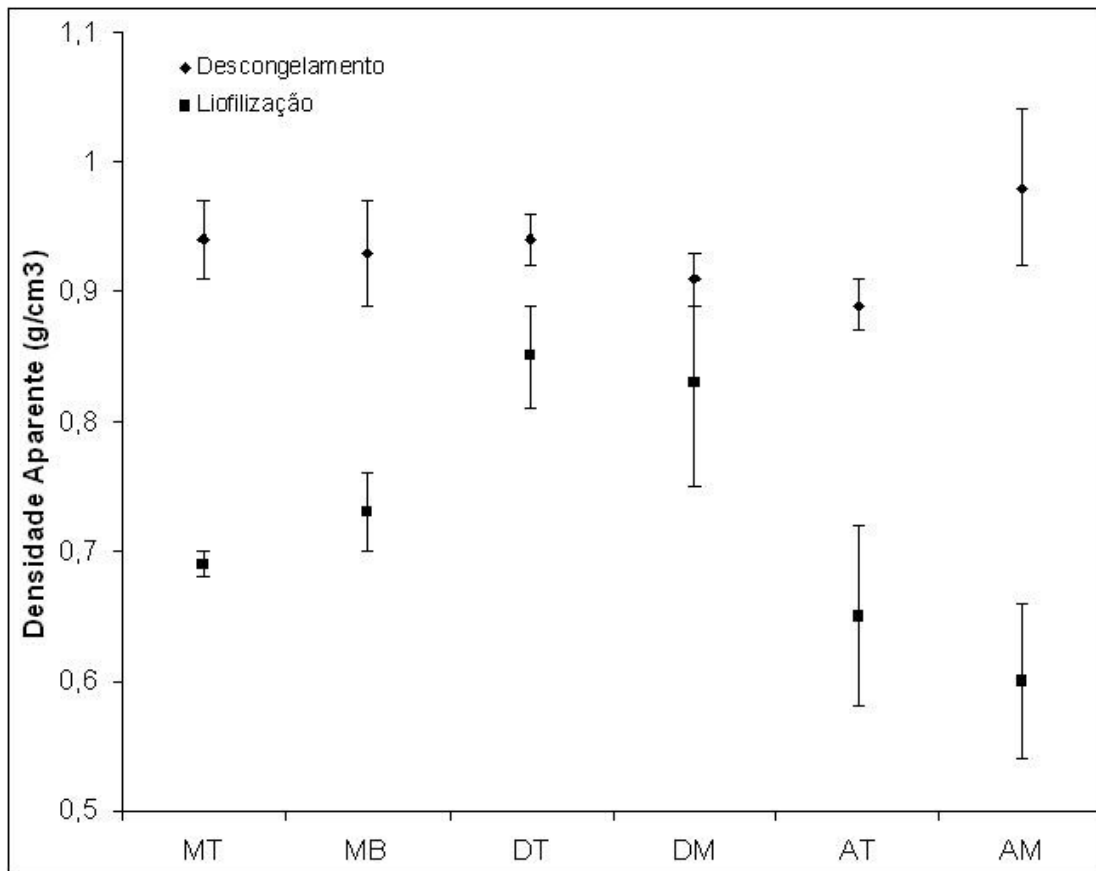


Figura 5.37. Densidade aparente das composições estudadas para cada tratamento de extração de gelo utilizado.

Novamente, o fator mais importante no controle das propriedades dos criogéis sintetizados foi o tratamento utilizado para a extração do gelo. Tal fato vai de encontro aos resultados mostrados no gráfico da figura 5.36, os quais mostram que uma maior perda de massa resultou em corpos menos densos, sendo que a densidade aparente flutuou entre 0,89 e 0,98 g/cm³ para as amostras descongeladas e entre 0,6 e 0,85 g/cm³ para as amostras liofilizadas. Nas amostras descongeladas a composição teve pouca influência sobre a

densidade aparente obtida. No entanto, no caso das amostras liofilizadas a ausência de um comonômero, como o AA ou o MA, resultou em amostras mais densas. As amostras que utilizaram AA como comonômero obtiveram valores de densidade mais baixos. O tipo de entrecruzante utilizado teve pouco influenciou as propriedades obtidas. A Figura 5.38 mostra a porosidade dos criogéis sintetizados.

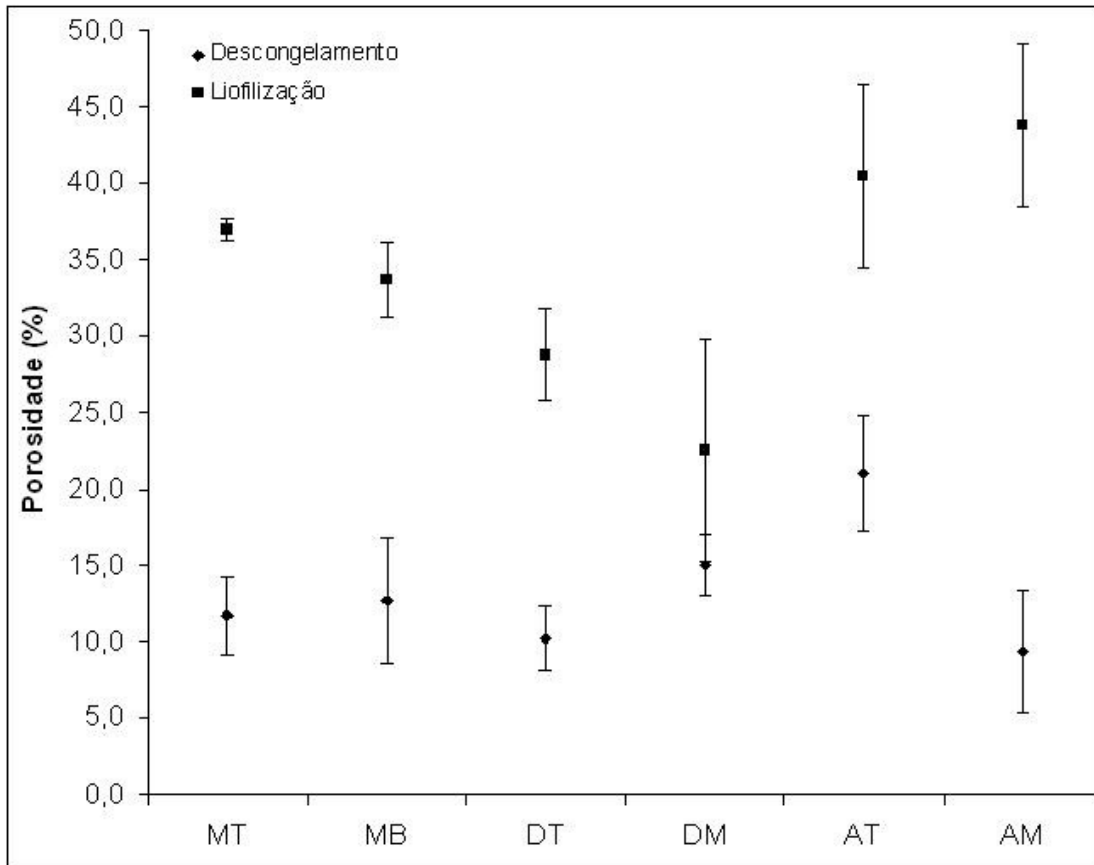


Figura 5.38. Porosidade das composições estudadas para cada tratamento de extração de gelo utilizado.

Dois fatores apresentaram influência significativa sobre as características dos criogéis obtidos: O tratamento utilizado para a extração do gelo e a utilização do comonômero acrílico na composição. O tipo de entrecruzante utilizado pouco afetou as propriedades dos polímeros sintetizados. As amostras liofilizadas obtiveram maior porosidade, de maneira que os valores mais altos foram obtidos para as composições formadas por DMAEMA e Ácido Acrílico liofilizadas, que atingiram valores de até 43%, enquanto que os menores valores foram obtidos para as amostras em que o gelo foi extraído via descongelamento, nas quais a porosidade variou entre 9,4 e 21%. Em geral, as amostras preparadas sem a adição do

comonomero acrílico apresentaram menor porosidade quando liofilizadas (22,5% para a amostra composta apenas por DMAEMA e o entrecruzante TEGMA).

A rápida extração do gelo pode ser o fator que explica a grande diferença de porosidade entre as amostras liofilizadas e as descongeladas, pois durante o processo de congelamento da suspensão monomérica, também ocorre o congelamento de uma parcela do monômero e comonômero, junto com parcelas de entrecruzante e dos iniciadores catalíticos da reação (LOZINSKI, 2002). Assim, no processo de descongelamento, o derretimento dos cristais de gelo podem iniciar um novo processo de polimerização via radical, que seria responsável por um novo aumento na densidade do material, pois as novas cadeias poliméricas formadas ocupariam o lugar dos poros previamente formadas. Dessa forma pode-se afirmar que o método do descongelamento seria mais eficaz para a preparação de criogéis via física, como é o caso dos criogéis preparados a partir de poli álcool vinílico (PVA) (KUESENG et al., 2010; DUBOEUF et al., 2009; EL FRAY et al., 2007).

A morfologia dos criogéis sintetizados e cujos cristais de gelo foram extraídos via descongelamento e liofilização é mostrada nas micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das Figuras 5.39 a 5.44. Abaixo de cada micrografia se encontra um gráfico contendo a distribuição de tamanho de poros, calculada utilizando-se o *software Image Tool*.

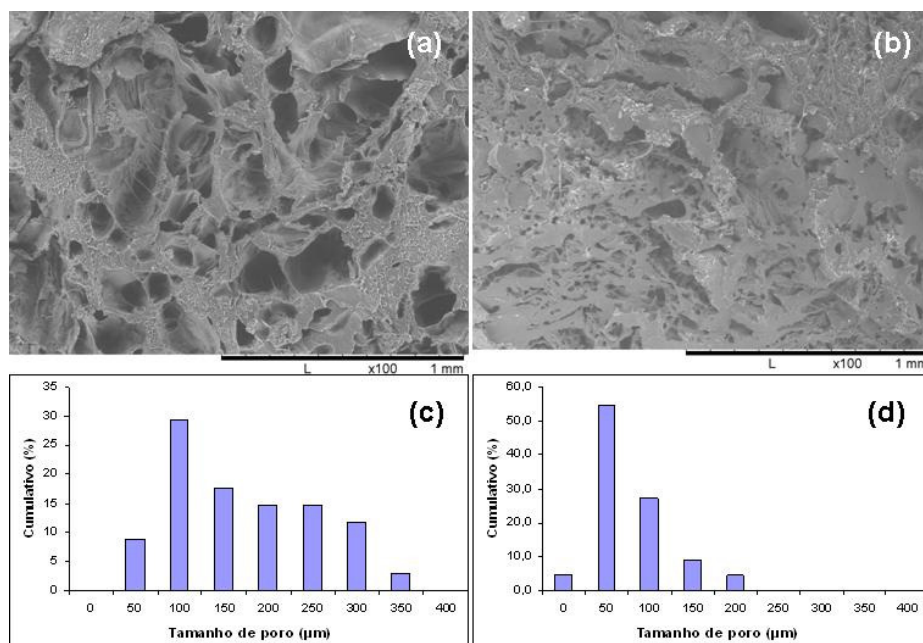


Figura 5.39. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição MT (MA/TEGMA) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.

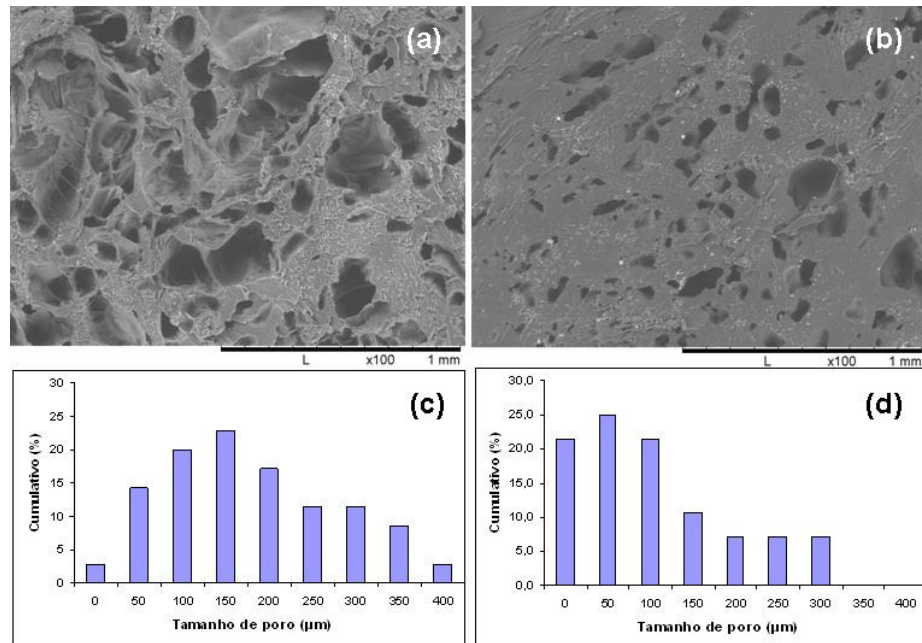


Figura 5.40. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição MM (MA/MBAM) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.

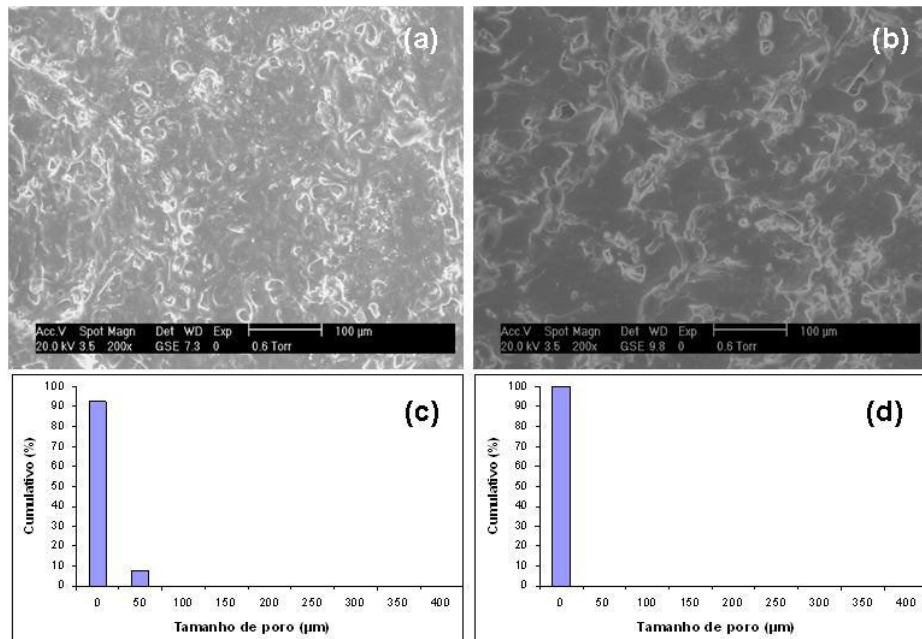


Figura 5.41. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição DT (DMAEMA/TEGMA) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.

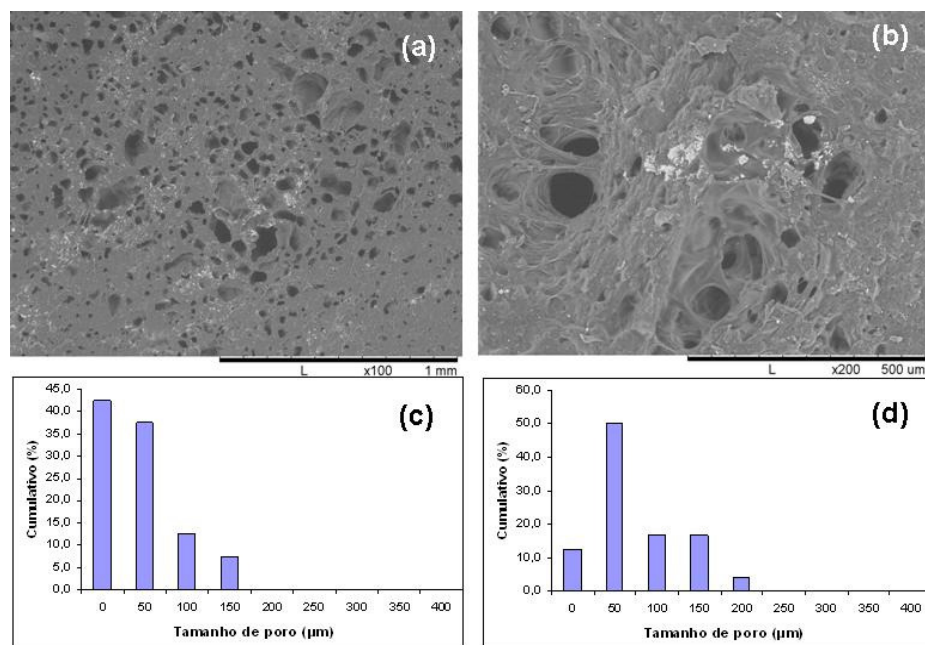


Figura 5.42. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição DM (DMAEMA/MBAM) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.

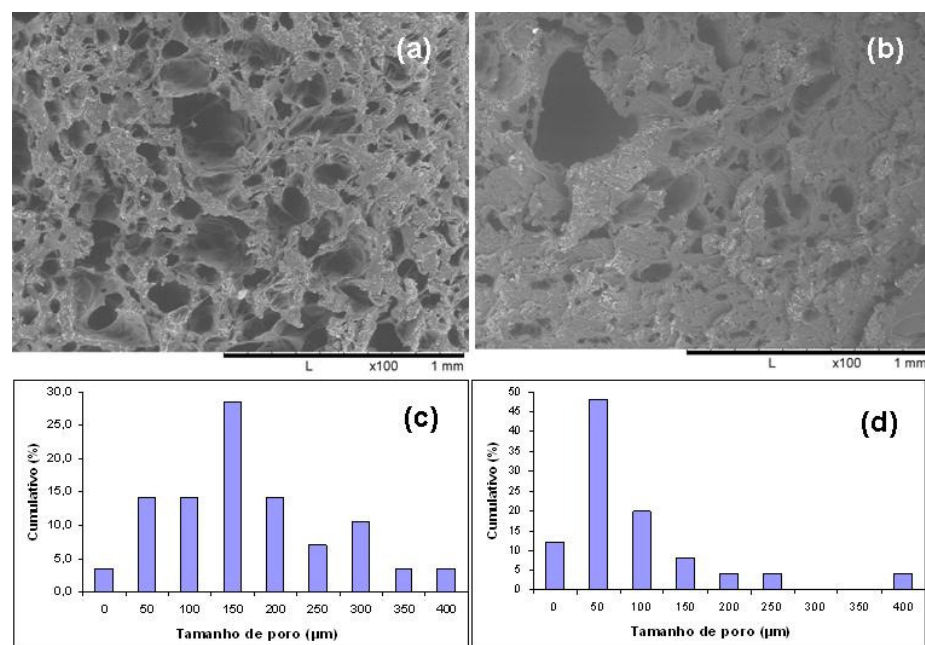


Figura 5.43. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição AT (AA/TEGMA) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.

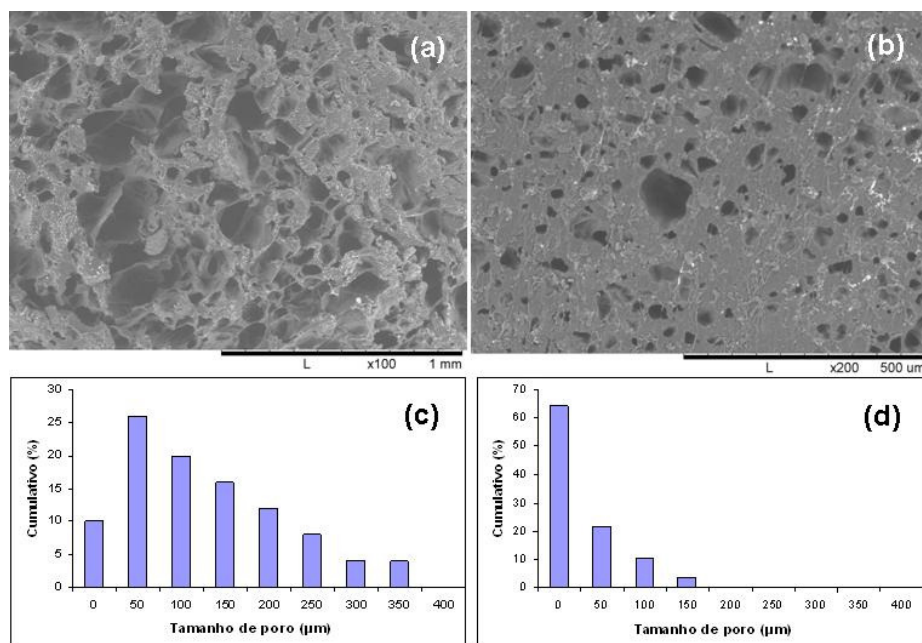


Figura 5.44. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para cada tratamento de extração de gelo dos criogéis sintetizados de composição AM (AA/MBAM) (a) MEV da amostra liofilizada, (b) MEV da amostra descongelada, (c) DTP da amostra liofilizada, (d) DTP da amostra descongelada.

Analisando-se as Figuras 5.39 a 5.44, percebe-se que as amostras em que o gelo foi extraído pelo método de liofilização apresentam poros maiores (em quase todas formulações) e em maior quantidade do que os encontrados nas amostras em que o gelo foi extraído por descongelamento. Tais resultados confirmam com os dados de porosidade mostrados no gráfico da Figura 5.38. No que tange à distribuição de tamanho de poros, o método de liofilização resultou em uma DTP mais larga, indicando a presença de poros de diferentes tamanhos. A ausência do comonômero influenciou negativamente na formação de poros nos criogéis, indicando que a presença de um acrílico na estrutura do polímero afetou a interação entre o monômero e os cristais de gelo. Em tais amostras os poros estão mais isolados, indicando falta de interconectividade, fator necessário para a utilização dos criogéis como biomaterial, especialmente na área de engenharia de tecidos. Já as amostras contendo AA ou MA em sua estrutura, pode-se notar que os poros estão mais próximos entre si, de maneira que as paredes entre os poros são mais finas.

O tamanho médio dos poros também foi uma informação extraída da análise com o programa *Image Tool* e é mostrado na Tabela 5.16. Em todos os casos o tamanho médio de poros foi maior para as amostras cujo gelo foi extraído através do processo de liofilização, sendo que o valor de 198 μm para a amostra MT (MA/TEGMA) foi o maior obtido dentre as composições estudadas. Novamente as amostras contendo o comonômero acrílico em sua estrutura apresentaram maiores valores de tamanho médio de poros, variando entre 198 e 153

μm para as amostras liofilizadas e entre 121 e 71 μm para as amostras descongeladas. Já as amostras nas quais não houve a inclusão de um comonomero em sua composição o tamanho médio de poros foi de 42 e 62 μm para as composições DT e DM, respectivamente, para as amostras que sofreram tratamento de liofilização e de 30 e 46 μm as composições DT e DM, respectivamente, para as amostras que sofreram tratamento de descongelamento.

Tabela 5.16. Tamanho médio de poros para cada tratamento utilizado para a extração do gelo.

Amostra	Liofilização		Descongelamento	
	Tamanho médio de poro (μm)	Desvio Padrão (μm)	Tamanho médio de poro (μm)	Desvio Padrão (μm)
MT	198	82	104	48
MM	182	78	121	61
DT	42	15	30	8
DM	68	40	46	27
AT	184	93	110	78
AM	153	93	71	39

O Inchamento dos criogéis em meio fisiológico também foi um parâmetro estudado neste trabalho. Uma amostra seca do criogel foi imersa em solução salina de fosfato, cuja sigla em inglês é PBS (*Phosphate Buffer Solution*) de pH 7,4 à temperatura de 37°C por 24 horas. Após este tempo a amostra já atingiu o ponto máximo de inchamento, chamado de razão de inchamento no equilíbrio ou ESR (Abreviatura do nome em inglês *Equilibrium Swelling Ratio*). A Figura 5.45 mostra o ESR das composições estudadas para os dois métodos de extração de gelo estudados. Percebe-se que o tratamento utilizado para a extração do gelo não afetou significativamente a razão de inchamento no equilíbrio das amostras, assim como o entrecruzante utilizado que não apresentou uma influência muito grande nas características de inchamento dos criogéis. Neste caso, o fator mais importante foi a composição química do criogel. A presença do comonomero acrílico na estrutura permitiu a obtenção de um ESR maior nas condições estudadas quando comparada com as amostras sem comonomero acrílico. Não há diferença significativa entre os valores obtidos para as amostras com MA ou AA em sua composição, sendo que o valor de ESR variou entre 8 e 10 para estes. Já para os homopolímeros de DMAEMA (Amostras DT e DM, que não contam com o comonomero acrílico em sua composição) apresentaram valores de ESR na faixa de 4,4 a 6.

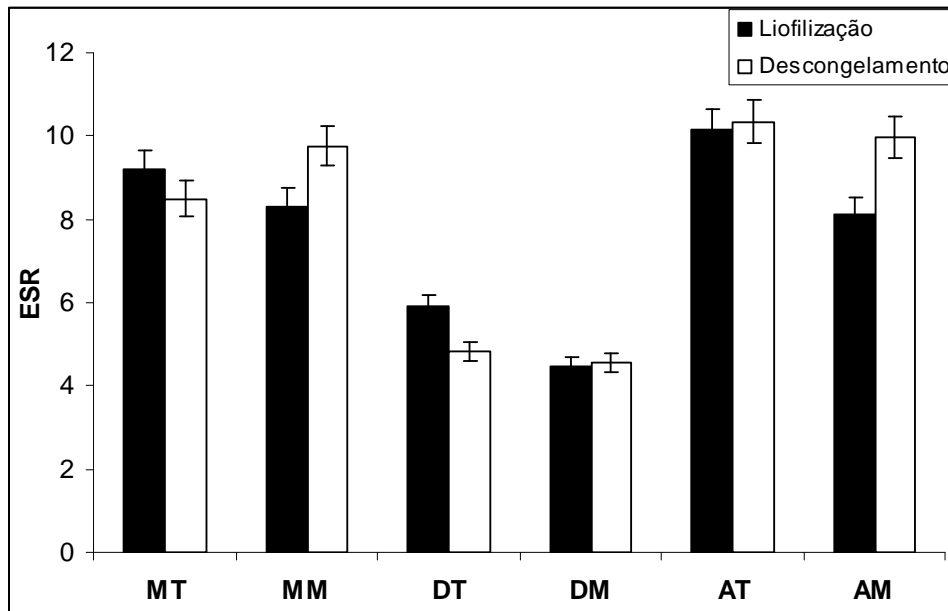


Figura 5.45. ESR das amostras liofilizadas e descongeladas após 24 horas de imersão em PBS à 37°C.

Zhai et al. (2004) sintetizou hidrogéis compostos por DMAEMA e AA em diversas proporções e obteve valores de ESR ao redor de 6 para amostras com razão 50/50 DMAEMA/AA e a redor de 12 para a amostra com razão 70/30 DMAEMA/AA. Vale ressaltar que tais valores foram obtidos para pH 7,4 e temperatura de 25°C, ao invés de 37°C como os obtidos nesta tese. Ainda assim, pode-se inferir que os valores obtidos neste trabalho são similares com os encontrados na literatura.

Apesar de toda a caracterização e de todos os resultados obtidos neste estudo, o sistema foi abandonado devido à falta de reprodutibilidade dos resultados encontrados. O sistema composto por AA ou MA e DMAEMA é muito instável e não foi possível preparar novas amostras para estudo.

5.3.2 Sistema HEMA/DMAEMA

Nesta etapa do trabalho optou-se pelo uso de um novo sistema polimérico, visto que o sistema utilizado anteriormente (DMAEMA e um ácido acrílico) se mostrava pouco reprodutível. O novo sistema é composto pelo polímero base do sistema anterior, o DMAEMA e o Hidroxietil Metacrilato (HEMA). O HEMA é um polímero muito utilizado na indústria de biomateriais e é dotado de uma grande estabilidade química, além disso, copolímeros HEMA/DMAEMA já foram extensivamente estudados na literatura (BRAHIM et al., 2003a; BRAHIM et al., 2003b; KROUPOVA et al., 2006; YOU; AUGUSTE, 2010; WEN; STEVENSON, 1993) sendo esta a razão para a escolha deste novo sistema polimérico. Por ter permitido a obtenção de criogéis mais porosos e com bons valores de taxa de inchamento no equilíbrio, escolheu-se o TEGMA como agente entrecruzante. As proporções de agente entrecruzante, catalisador e iniciante foram mantidas iguais às do estudo anterior, no entanto a concentração de monômeros foi reduzida de 15 para 10%, visando gerar criogéis com maior porosidade e estruturas altamente interconectadas. O tratamento escolhido para a extração de gelo nesta etapa do trabalho foi a liofilização, devido aos melhores resultados obtidos em termos de microestrutura e de porosidade.

Além disso, no intuito de melhorar as propriedades mecânicas e a viabilidade celular dos criogéis, adicionou-se a fase cerâmica α -fosfato tricálcio no teor de 5% em relação à quantidade de monômero utilizada. O α -TCP utilizado nesta etapa do trabalho foi sintetizado conforme descrito nos capítulos anteriores deste trabalho.

Visando-se avaliar as características estruturais dos criogéis sintetizados a partir do sistema HEMA/DMAEMA utilizou-se a técnica de espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada. Os gráficos obtidos para as amostras contendo 25, 50 e 75% de HEMA em sua composição são mostrados abaixo na Figura 5.46.

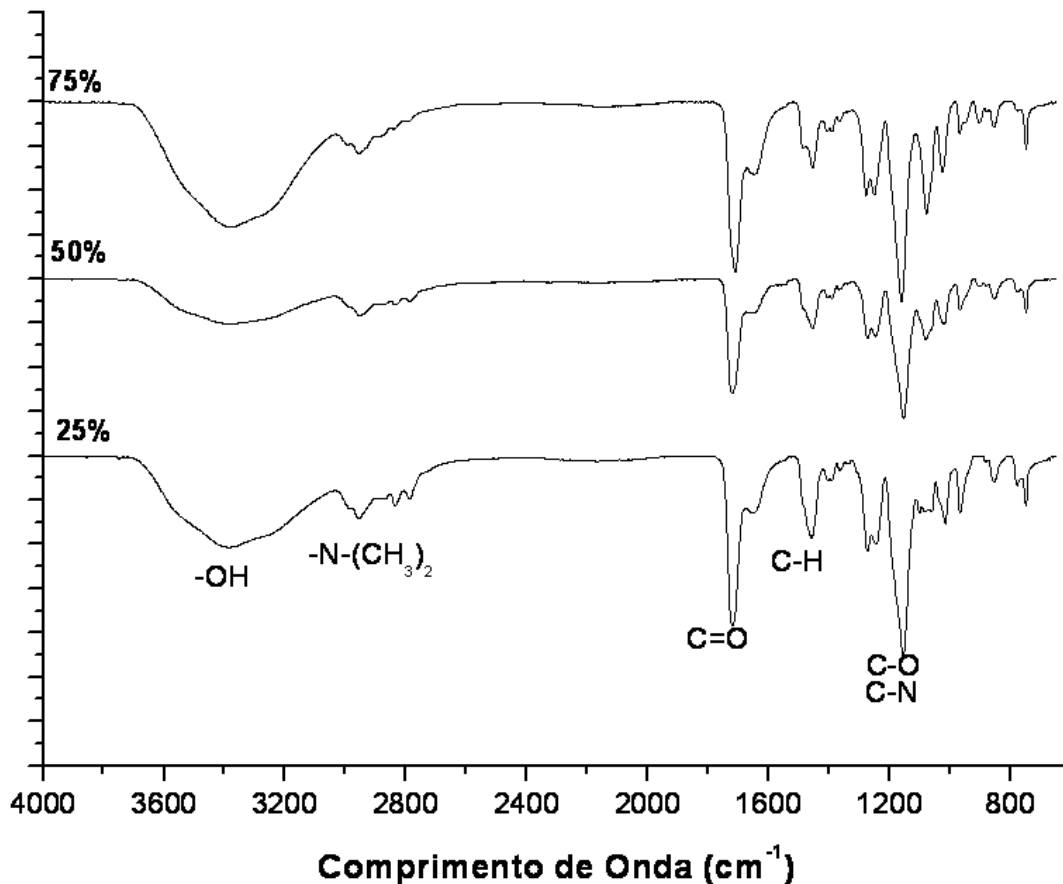


Figura 5.46. Espectros de Espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada das amostras contendo 25, 50 e 75% de HEMA em sua composição.

Nota-se uma grande similaridade entre os espectros das diferentes composições, entretanto, amostras com maior teor de DMAEMA em sua composição (por exemplo, a amostra 25%HEMA possui 75% de DMAEMA) mostram um aumento na intensidade dos picos relacionados à vibração de estiramento do grupo metil ao redor de 2940 cm^{-1} e nos picos correspondentes às ligações N – C – H do grupo dimetilamino presente no DMAEMA ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) em 2819 e 2767 cm^{-1} (ROY et al., 2008). Visto que a única diferença estrutural entre o HEMA e o DMAEMA é a presença do grupo dimetilamino ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) os outros picos presentes nos espectrogramas são iguais aos correspondentes ao DMAEMA indicados nos gráficos das figuras 5.32 e 5.33 e já foram discutidos no capítulo anterior.

A fim de se verificar a interação entre a fase cerâmica e a polimérica dos polímeros sintetizados, se utilizou a técnica de Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier, já que os espectros obtidos pela técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada não apresentaram resolução suficiente para diferenciar a

influência da adição da fase cerâmica na estrutura dos criogéis sintetizados. Os espectros obtidos por Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier da amostra contendo 75% de HEMA com e sem a adição de 5% de α -TCP são mostrados no gráfico da Figura 5.47.

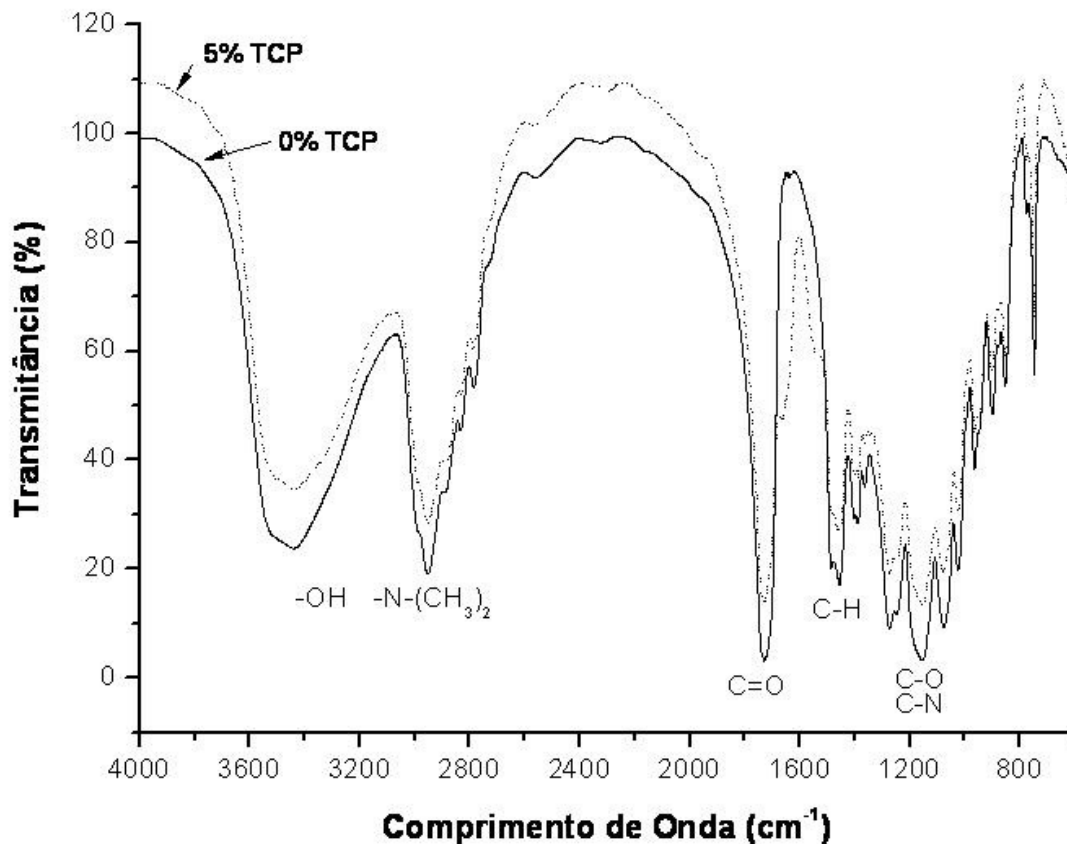


Figura 5.47. Espectros de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier das amostras contendo 75% de HEMA com e sem a adição de 5% de α -TCP.

A presença da fase cerâmica promoveu a presença de um pico ao redor de 1664 cm^{-1} e outro ao redor de 1524 cm^{-1} , assim como um aumento na intensidade da banda entre estes dois picos. Estes picos podem corresponder à interações de ordem eletroestática do fosfato tricálcico com os elétrons livres presentes na carbonila (ligação C=O) do DMAEMA. A presença de tal banda permite inferir que há alguma interação entre a fase cerâmica e a fase polimérica.

Após o processo de liofilização dos criogéis, realizou-se o processo de limpeza dos criogéis para a retirada do monômero residual e de cadeias lineares não entrecruzadas. O

gráfico da Figura 5.48 mostra os resultados de perda de massa após a lavagem dos polímeros sintetizados com o sistema HEMA/DMAEMA.

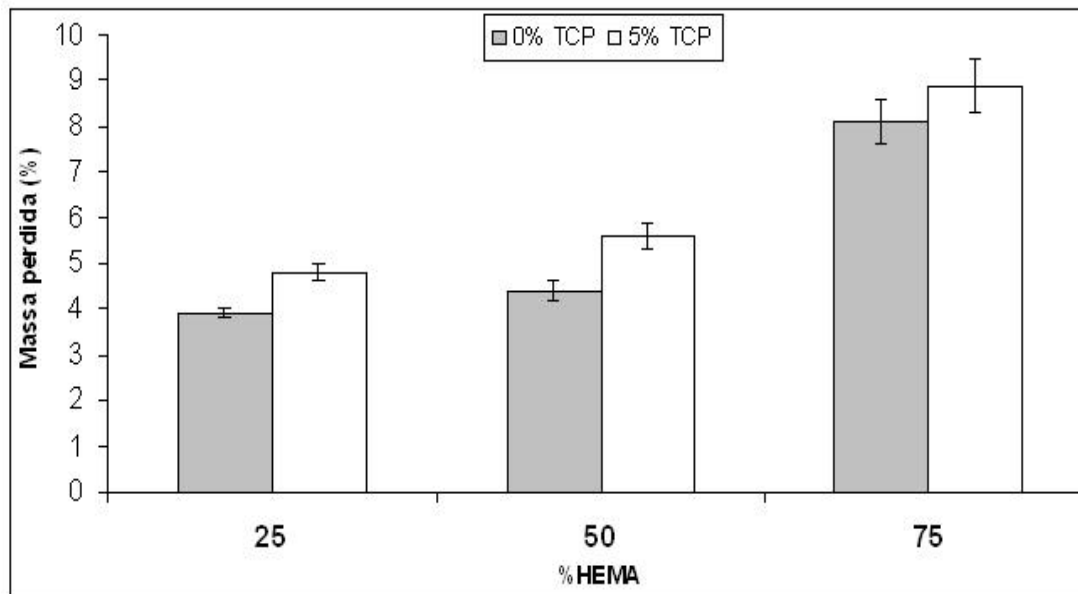


Figura 5.48. Percentual de massa perdida após limpeza dos criogéis sintetizados variando-se o teor de HEMA utilizado e com e sem a adição da fase cerâmica α -TCP.

Os valores de perda de massa mostrados no gráfico da Figura 5.48 para o sistema HEMA/DMAEMA utilizando o processo de liofilização para a extração do gelo (entre 3,9 e 8,9%) quando comparados com os resultados do gráfico da Figura 5.36, que mostra os valores de perda de massa para o sistema polimérico composto por DMAEMA e um ácido acrílico se mostram muito menores do que os obtidos para o mesmo processo de extração do gelo (14,6 e 22,5%) e se mostram em uma faixa um pouco acima da obtida com o processo de derretimento para a extração do gelo (3,2 e 5,8%).

Maiores teores de HEMA levam a maiores valores de perda de massa, o que pode indicar que neste sistema e nestas condições de síntese, o monômero DMAEMA está obtendo uma maior taxa de conversão de polimerização do que o monômero HEMA. Outro fato a ser destacado é que a adição da fase cerâmica α -TCP levou a um aumento do valor de massa perdida em todas as composições, o que pode ser explicado pela utilização de uma solução aquosa contendo 1% de gelatina ao invés de água destilada e deionizada. A gelatina foi adicionada à suspensão visando aumentar a viscosidade do meio e melhorar a dispersão das partículas cerâmicas evitando a decantação destas. A gelatina pode não estar interagindo com os monômeros e estar sendo retirada durante o processo de lavagem dos criogéis. Dessa

forma, pode-se esperar um aumento da porosidade das amostras contendo gelatina e α -fosfato tricálcico, pois esta estaria agindo de agente porogênico, por se fazer presente na estrutura física do polímero recém formado durante o processo de criogeleração e se retirar após o processo de lavagem.

A densidade aparente após a lavagem dos criogéis sintetizados é mostrada na Figura 5.49.

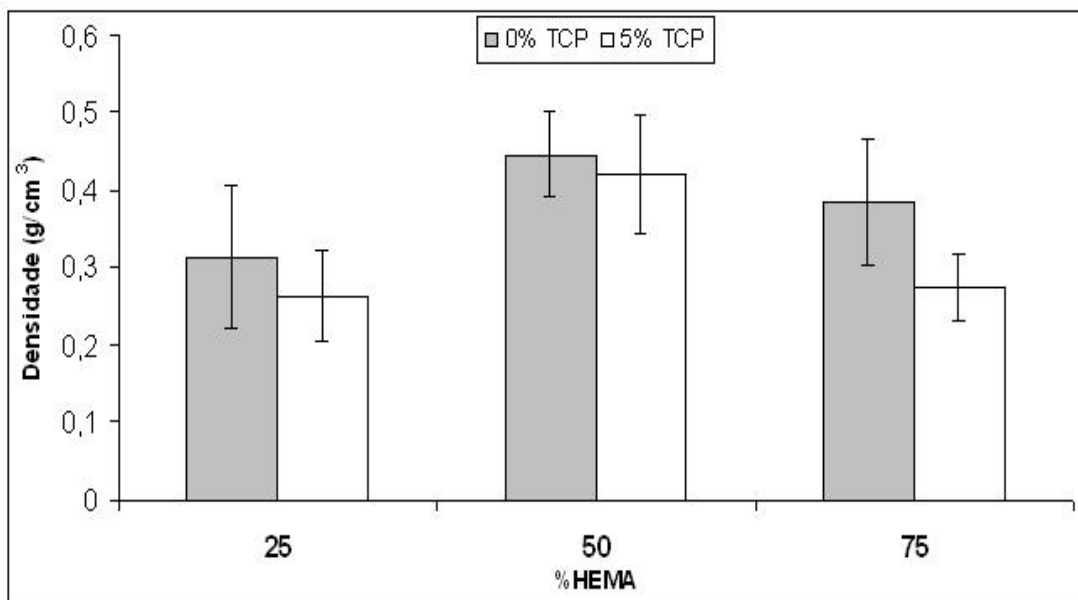


Figura 5.49. Densidade aparente após limpeza dos criogéis sintetizados variando-se o teor de HEMA utilizado e com e sem a adição da fase cerâmica α -TCP.

Os menores valores absolutos de densidade aparente foram obtidos para as amostras contendo 25% de HEMA, 0,31 g/cm³ para as amostras sem a adição da fase cerâmica e 0,26 g/cm³ para as amostras contendo 5% de α -TCP. As amostras contendo 75% de HEMA apresentaram valores de 0,38 g/cm³ sem fase cerâmica e 0,27 g/cm³ com fase cerâmica, valores um pouco maiores do que os obtidos para as amostras contendo 25% de HEMA. As amostras de composição 50/50 HEMA/DMAEMA obtiveram os maiores resultados de densidade (0,45 e 0,42 g/cm³ sem e com a adição da fase cerâmica, respectivamente). Como esperado pelos resultados de perda de massa, a adição de gelatina promoveu uma diminuição na densidade aparente das amostras sintetizadas. O que é resultado da remoção deste componente após o processo de lavagem.

A porosidade das composições sintetizada sem e com a adição de 5% da fase cerâmica α -TCP é mostrada no gráfico da Figura 5.50.

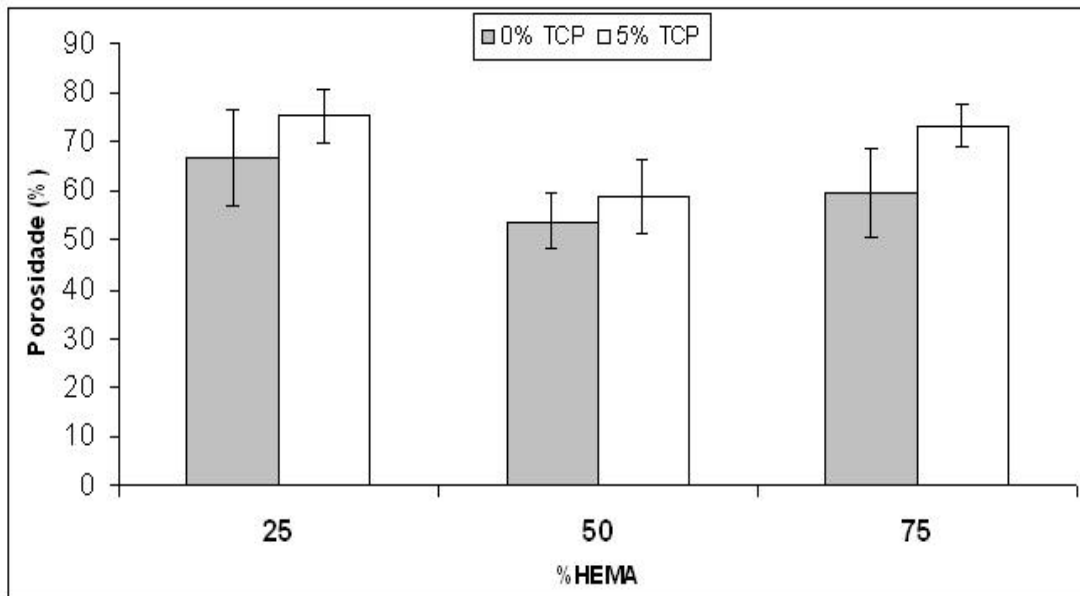


Figura 5.50. Porosidade aparente dos criogéis sintetizados variando-se o teor de HEMA utilizado e com e sem a adição da fase cerâmica α -TCP.

Uma porosidade máxima de 75,2% pode ser observada para a composição 25% HEMA contendo 5% de α -TCP. Este valor não é significativo quando comparado com a porosidade obtido pela amostra 75% de HEMA contendo 5% de α -TCP (73,4%). A adição da fase cerâmica e da gelatina aumentou a porosidade de todas as composições de HEMA/DMAEMA estudadas, conforme os resultados mostrados no gráfico da Figura 5.46 que mostra a densidade aparente dos criogéis sintetizados. O aumento da porosidade, conforme já dito, pode estar relacionado com a adição da gelatina que forma espaços entre as partículas cerâmicas e a matriz polimérica. Jain et al. (2009) sintetizaram criogéis utilizando o sistema PAN (Poli Acrilonitrila) e gelatina em diversas proporções, utilizando dois agentes entrecruzantes: MBAM para promover ligações com o monômero acrilonitrila através de polimerização via radical livre e glutaraldeído um entrecruzante catiônico para promover ligações com as cadeias das moléculas de gelatina. Glutaraldeído também foi utilizado como agente entrecruzante nos criogéis de gelatina com um pequeno teor de fibrogenio sintetizados por Dainiak et al. (2010). Tal informação nos permite inferir que a gelatina presente nos criogéis sintetizados no sistema HEMA/DMAEMA não está entrecruzada, estando assim na forma de cadeias lineares que são retiradas durante o processo de limpeza dos criogéis sintetizados.

Quanto à porosidade aparente, os valores obtidos neste trabalho estão próximos aos 80% de porosidade encontrados por He et al. (2007) para o sistema polimérico Acrilamida/Alil Glicidil Éter (AAM/AGE) e um pouco menores, apesar de ser um valor não

significativo, do que o valor de 84,8% obtido por Yun et al. (2007) em criogéis utilizando o monômero Acrilamida enxertado com DMAEMA. Entretanto, os valores de porosidade obtidos neste trabalho são estatisticamente inferiores aos 89% obtidos com o sistema HEMA e Poli Etileno Glicol Diacrilato (PEGDA) sintetizados por Savina et al. (2009) e aos criogéis de gelatina com pequenos teores de fibrogenio sintetizados por Dainiak et al. (2010). Assim mesmo, a faixa de porosidade obtida neste trabalho pode ser considerada satisfatória para o emprego dos materiais sintetizados como *scaffolds* para aplicações em engenharia de tecidos.

As Figuras 5.51 a 5.53 mostram micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura dos cortes transversais dos criogéis preparados para cada composição com e sem a adição do fosfato tricálcico.

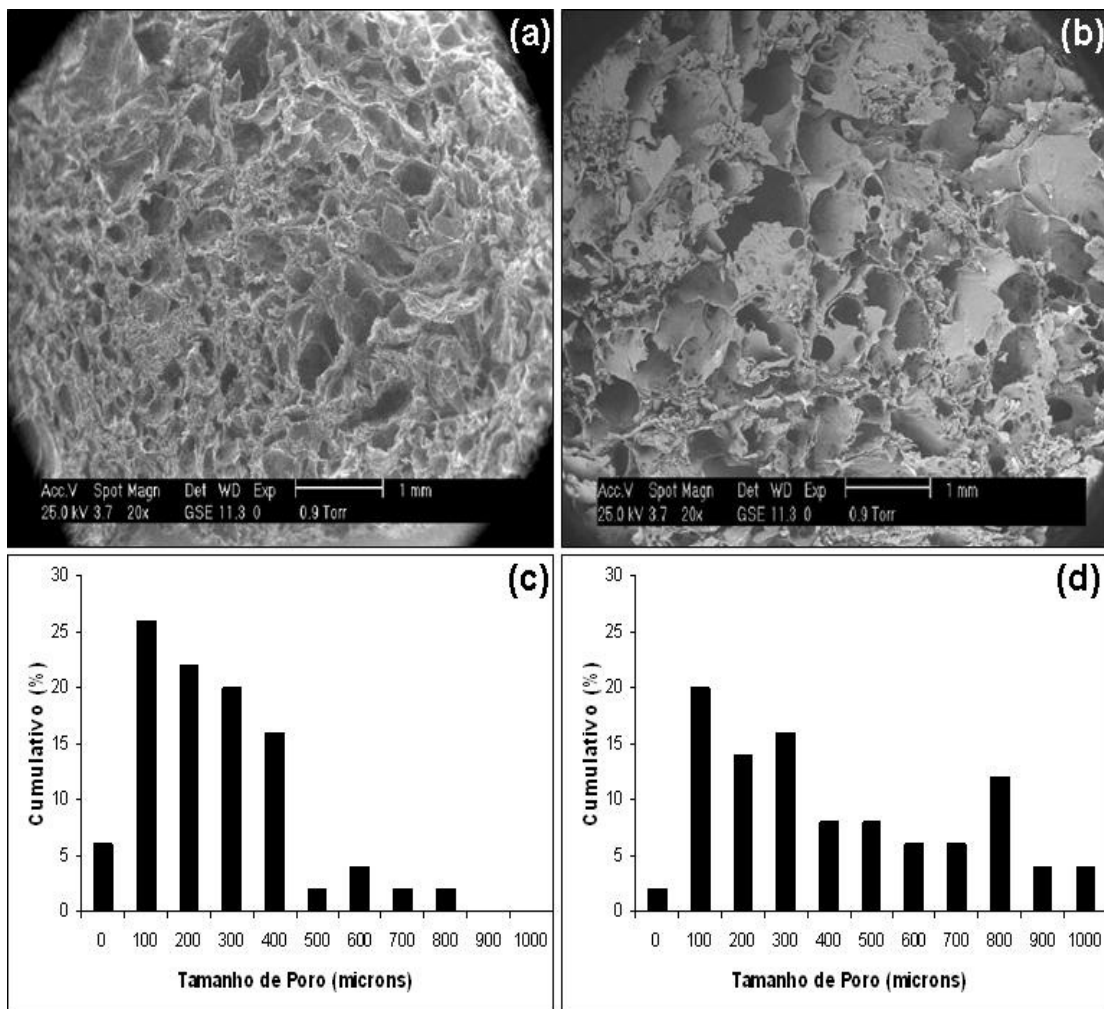


Figura 5.51. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para os criogéis sintetizados de composição 25%HEMA com e sem a adição da carga cerâmica (a) MEV da amostra 25%HEMA, (b) MEV da amostra 25%HEMA + TCP, (c) DTP da amostra 25%HEMA, (d) DTP da amostra 25%HEMA + TCP.

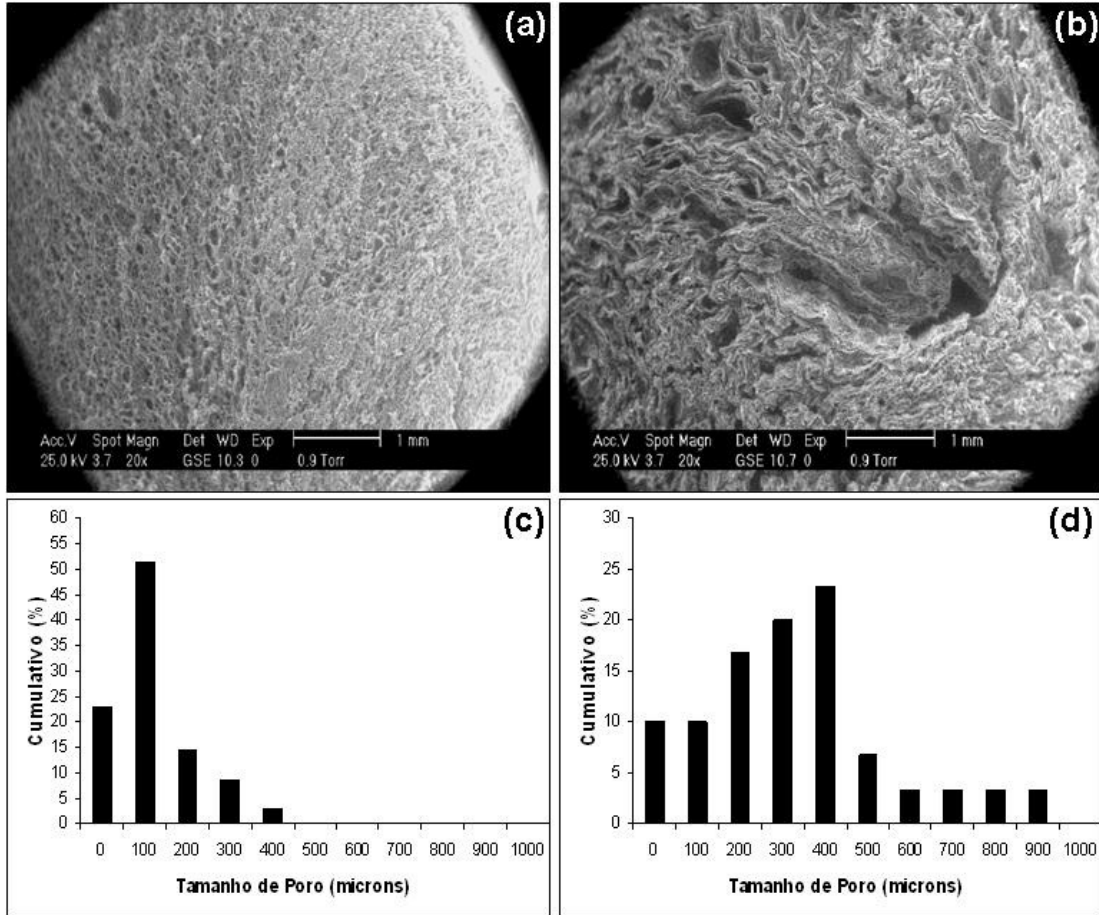


Figura 5.52. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para os criogéis sintetizados de composição 50%HEMA com e sem a adição da carga cerâmica (a) MEV da amostra 50%HEMA, (b) MEV da amostra 50%HEMA + TCP, (c) DTP da amostra 50%HEMA, (d) DTP da amostra 50%HEMA + TCP.

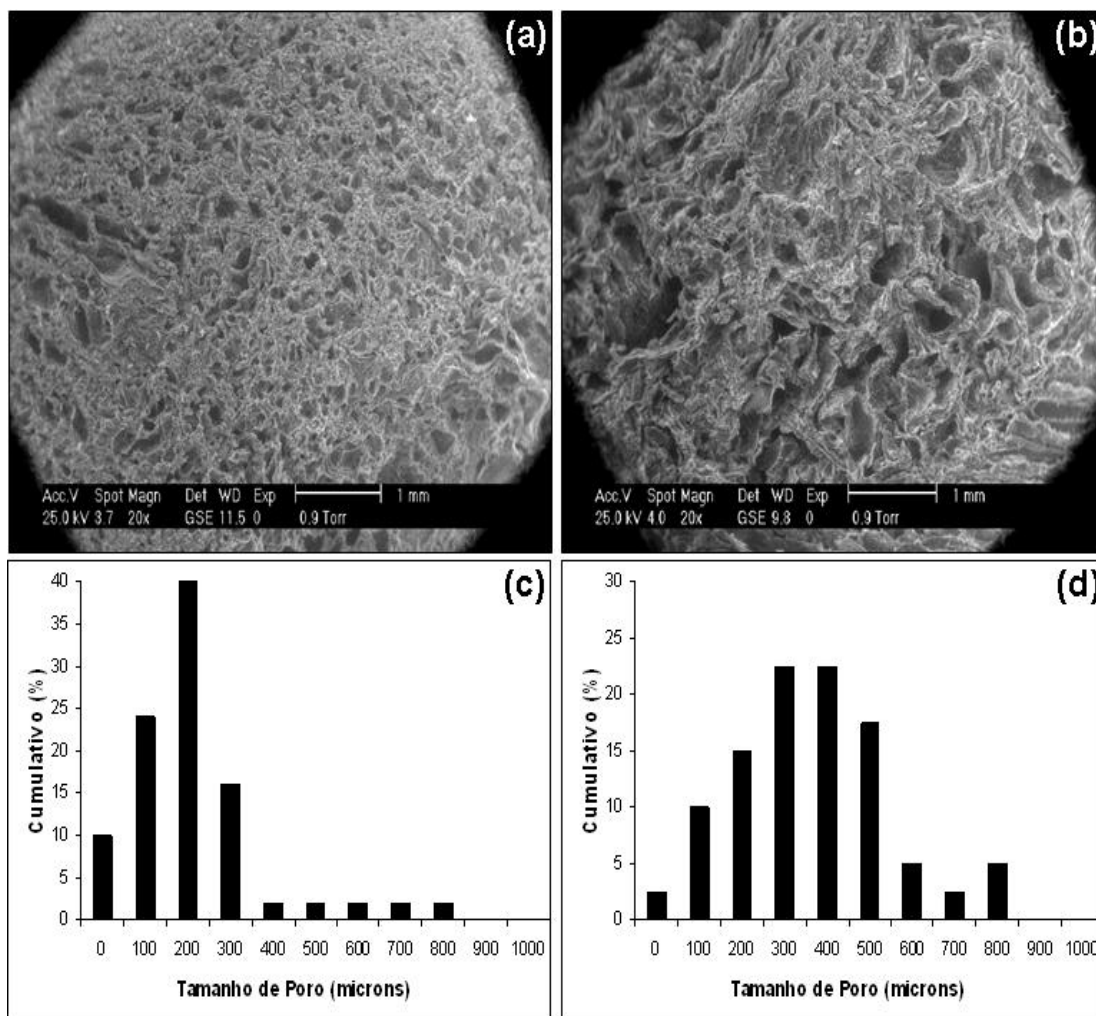


Figura 5.53. Morfologia e distribuição de tamanho de poros (DTP) para os criogéis sintetizados de composição 75%HEMA com e sem a adição da carga cerâmica (a) MEV da amostra 75%HEMA, (b) MEV da amostra 75%HEMA + TCP, (c) DTP da amostra 75%HEMA, (d) DTP da amostra 75%HEMA + TCP.

Analisando-se as micrografias obtidas por MEV, percebe-se que a composição mostrou forte influência sobre a morfologia dos poros. Amostras com menores teores de HEMA e maiores teores de DMAEMA (25%HEMA e 25%HEMA + TCP), mostrados na Figura 5.51 (a) e (b), apresentaram poros de formato esférico, enquanto que as amostras contendo maiores teores de HEMA (75%HEMA e 75%HEMA + TCP), mostrados na Figura 5.53 (a) e (b), apresentaram poros com formato alongado e lamelar. Uma possível explicação para este fato pode estar no fato de o DMAEMA possuir caráter anfifílico, o que significa que ele possui em sua cadeia elementos com cargas positivas (grupo dimetilamino) e cargas negativas (grupo carboxil) (ZHAI et al., 2004). A interação entre as cargas positivas e negativas da cadeia do DMAEMA podem fazer com que durante o processo de criogelamento o

monômero interaja com a água de maneira a formar cristais de gelo de formato esférico, em fenômeno similar à formação das bolhas de sabão, onde ocorreria a formação de micelas. Por outro lado, o HEMA que possui cargas negativas em sua estrutura providas tanto pelo grupo carboxil quanto pelo grupo hidroxil, ou seja, é um monômero de caráter aniônico (ROZENBERG, 2007), logo, pode interagir de maneira diferente com as moléculas de água durante o processo de criogelação, de maneira a formar pequenas camadas de gelo e camadas de monômero, formando cristais de gelo com estrutura alongada e lamelar.

Nas Figuras 5.51 a 5.53 (c) e (d) se mostram os gráficos de distribuição de tamanho de poros, calculados utilizando-se as micrografias mostradas nas Figuras 5.51 a 5.53 (a) e (b), junto com outras micrografias das mesmas amostras para fechar o número mínimo de 50 poros por amostra, utilizando-se o software *Image Tool*.

Percebe-se que independente da composição, a adição de gelatina e de α -TCP, permitiu a obtenção de uma distribuição de tamanho de poros mais larga do que as obtidas para as amostras contendo apenas o sistema monomérico HEMA/DMAEMA. Dentre as composições estudadas, as amostras de composição 25%HEMA com e sem a adição de α -fosfato tricálcico foram as que apresentaram as distribuições de tamanho de poros mais largas (Figura 5.51c e Figura 5.51 d), fato possivelmente explicado pela diferente forma de interação dos monômeros utilizados com a água.

Dentre as amostras sem gelatina e α -fosfato tricálcico em sua composição, as amostras com 25 e 75% de HEMA (Figuras 5.51 (c) e 5.53 (c)) em suas composições mostraram poros de até 900 μm , enquanto que a composição 50%HEMA (Figura 5.52 (c)) apresentou poros de tamanho máximo de até 500 μm . Apesar de no gráfico da Figura 5.51 (c), o qual mostra a distribuição de tamanho de poros da amostra 25%HEMA, o tamanho mais freqüente (tamanho modal) estar na faixa entre 100 e 199 μm , o percentual de poros na faixa entre 100 e 299 μm corresponde a 50% dos poros da amostra, enquanto que para a amostra 75%HEMA, que é mostrada na Figura 5.53 (c) o tamanho modal está na faixa entre 200 e 299 μm , porém 80% dos poros estão na faixa entre 100 e 399 μm de diâmetro, o que indica uma DTP mais estreita para esta amostra.

Para as amostras contendo gelatina e o α -fosfato tricálcico em sua composição, o comportamento da distribuição de tamanho de poros foi semelhante, o que indica que não somente a presença de gelatina influenciou na DTP, mas também a natureza do monômero, que poderia ser anfifílico (DMAEMA) ou aniônico (HEMA). A amostra com 25% de HEMA, Figura 5.51(d), em sua composição obteve poros de até 1100 μm , enquanto que a composição

50%HEMA, Figura 5.52 (d), apresentou poros de tamanho máximo de até 1000 μm , já a composição contendo 75% de HEMA, Figura 5.53 (d), em sua composição mostrou poros de até 900 μm .

A amostra contendo 25%HEMA+TCP, cujo gráfico de DTP é mostrado na Figura 5.51 (d), apesar de apresentar tamanho modal na faixa entre 100 e 199 μm , 66% dos poros se encontram entre 100 e 599 μm de diâmetro. Já para a amostra 75%HEMA + TCP, cujo gráfico de DTP é mostrado na Figura 5.53 (d), o tamanho modal é maior do que o da amostra anterior, estando na faixa entre 300 e 499 μm , porém 87,5% dos poros estão concentrados na faixa entre 100 e 599 μm . Tal valor é superior ao da amostra 25%HEMA+TCP para a mesma faixa de diâmetro.

A Tabela 5.17 mostra o tamanho médio de poros, medido pelo *software* Image Tool.

Tabela 5.17. Tamanho médio de poros e tamanho modal para cada composição estudada.

%HEMA	Tamanho Médio de poros (μm)	Desvio Padrão (μm)	Tamanho Modal (μm)
25	305	168	100-199
25+TCP	481	312	100-199
50	139	68	100-199
50+TCP	393	193	400-499
75	235	129	200-299
75+TCP	432	164	300-199

No que tange ao tamanho de poros, relacionando os gráficos de distribuição de tamanho de poros da Figuras 5.51 a 5.53 (c) e (d) com os resultados da Tabela 5.17, percebe-se que mesmo que o tamanho modal das amostras de composição 25%HEMA e 25%HEMA + TCP seja muito menor do que o das outras, com exceção da amostra 50%HEMA que apresenta o mesmo tamanho modal médio, estas composições obtiveram os maiores tamanhos médios de poros em suas categorias (sem e com a adição de gelatina e α -TCP, respectivamente).

O fato acima pode ser explicado pela maior distribuição de tamanho de poros destas amostras, de maneira que uma quantidade maior de poros de tamanho maior levou a um valor médio de tamanho de poros maior.

Na literatura, Yilmaz et al. (2009) sintetizaram criogéis baseados no sistema de monômeros HEMA e MATrp (N-Metacriol-L-triptofano) e obteve poros na faixa de 60 – 100 μm . Valor muito menor do que os valores obtidos neste trabalho com o sistema HEMA/DMAEMA e HEMA/DMAEMA/Gelatina/ α -TCP. Criogéis a partir de outros sistemas

monoméricos foram sintetizados via criopolimerização, como Dimetilacrilamida e Poli Etileno Glicol Diacrilato (DMAAm/PEGDA) (KIRSEBOM et al., 2009), Poliacrilamida e Alil Glicidil Éter (AAm/AGE) (PLIEVA et al., 2004; YAO et al., 2006; HE et al., 2007), porém também não obtiveram tamanhos médios de poros superiores a 100 μm . Já criogéis sintetizados a partir de PAN e gelatina obtiveram poros de até 200 μm (JAIN et al., 2009), enquanto criogéis de gelatina com pequenos teores de fibronogenio alcançaram poros de até 160 μm (DAINIAK et al., 2010). O tamanho de poros mínimo necessário para promover o crescimento de tecido ósseo é entre 100 e 200 μm (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005), porém em estruturas com macroporos interconectados de tamanho entre 300 e 500 μm há um aumento na taxa de difusão de nutrientes para e desde o centro do arcabouço em peças de maior volume (HUTMACHER, 2000).

Os valores de porosidade obtidos neste trabalho são muito superiores aos obtidos nos trabalhos encontrados na literatura com outros sistemas monoméricos e se aproximam dos valores citados por Hutmacher (2000). O tamanho de poros dos criogéis obtidos neste trabalho os credencia fortemente para sua utilização em engenharia de tecidos, mais especificamente como substitutos ósseos.

A Figura 5.54 destaca a diferença microestrutural das amostras 75% HEMA sem e com a adição de gelatina e α -TCP. Enquanto a amostra 75%HEMA possui as paredes entre os poros finas e densas, a amostra 75HDT possui paredes mais largas e mais porosas, sendo que as paredes são constituídas por poros laminares pequenos. A eleição destas amostras se deu por que nas amostras destas composições se podia ver a diferença mais claramente. Na literatura, Yu e Gu (2009) sintetizaram fibras de blendas de Poliacrilonitrila (PAN) e gelatina em diversas proporções entre os dois reagentes. Os autores perceberam que maiores teores de gelatina levaram à obtenção de fibras mais porosas e com superfície irregular, enquanto que maiores teores de PAN levaram à obtenção de fibras com superfície mais lisa. Além disso, como não se utilizou nenhum tipo de agente entrecruzante para a gelatina, acredita-se que esta foi solubilizada da estrutura do polímero após o processo de limpeza, dando lugar à uma estrutura porosa e agindo como agente porogênico.

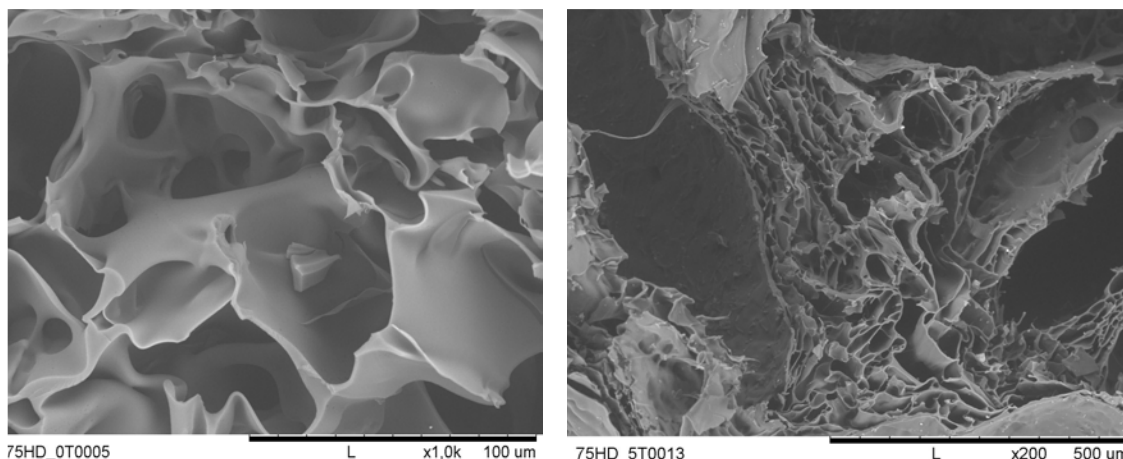


Figura 5.54. Micrografias obtidas por MEV dos criogéis de composição (a) 75%HEMA e (b) 75%HEMA + TCP.

No intuito de se verificar a incorporação da fase cerâmica à matriz polimérica dos criogéis do sistema HEMA/DMAEMA, utilizou-se a análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDX), que é mostrada na Figura 5.55.

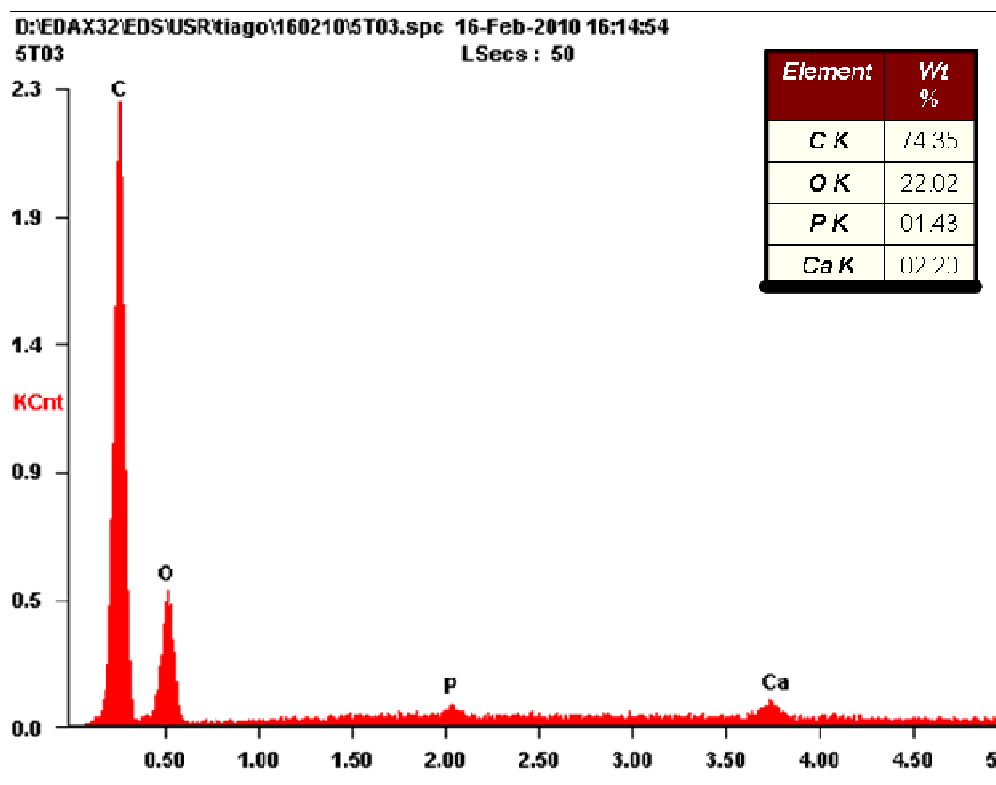


Figura 5.55. Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDX) da amostra 75%HEMA + TCP.

A presença de α -TCP pode ser vista na matriz polimérica de HEMA/DMAEMA, representada pelos picos assinalados em 2,0 e 3,75 eV, energias que correspondem ao fósforo (P) e ao cálcio (Ca), respectivamente. A razão Cálcio/Fósforo calculada por esta técnica é de 1,54, valor próximo ao teórico do α -TCP (1,50). De acordo com esta análise o teor de TCP realmente incorporado no criogel foi de 3,6%, valor próximo as 5% de que TCP foram adicionados à solução monomérica. Isto significa que uma pequena quantidade de partículas cerâmicas não se incorporou aos criogéis, sendo retirados da matriz polimérica durante o processo de lavagem. Outra hipótese é que estas ficaram depositadas no fundo dos criopolímeros. Uma terceira hipótese é que algumas das partículas não foram detectadas por esta técnica devido à grande área superficial dos poros presentes em todas as composições sintetizadas de criogéis.

Difração de raios X (XRD) foi usada para confirmar se o α -fosfato tricálcico, incorporado aos criogéis em algum momento durante a síntese reagiu com a água utilizada como solvente formando hidroxiapatita (HA). O difratograma mostrado na Figura 5.56 mostra um pico largo amorfo, correspondente à parte polimérica do criogel e também mostra picos intensos correspondentes à fase α -TCP. Este fato significa que o fosfato tricálcico não se converte em hidroxiapatita durante a síntese dos criogéis. Provavelmente por que os polímeros DMAEMA e HEMA são mais hidrofílicos que o α -TCP, de tal forma que a água que penetra a rede do hidrogel interage preferencialmente com a matéria orgânica.

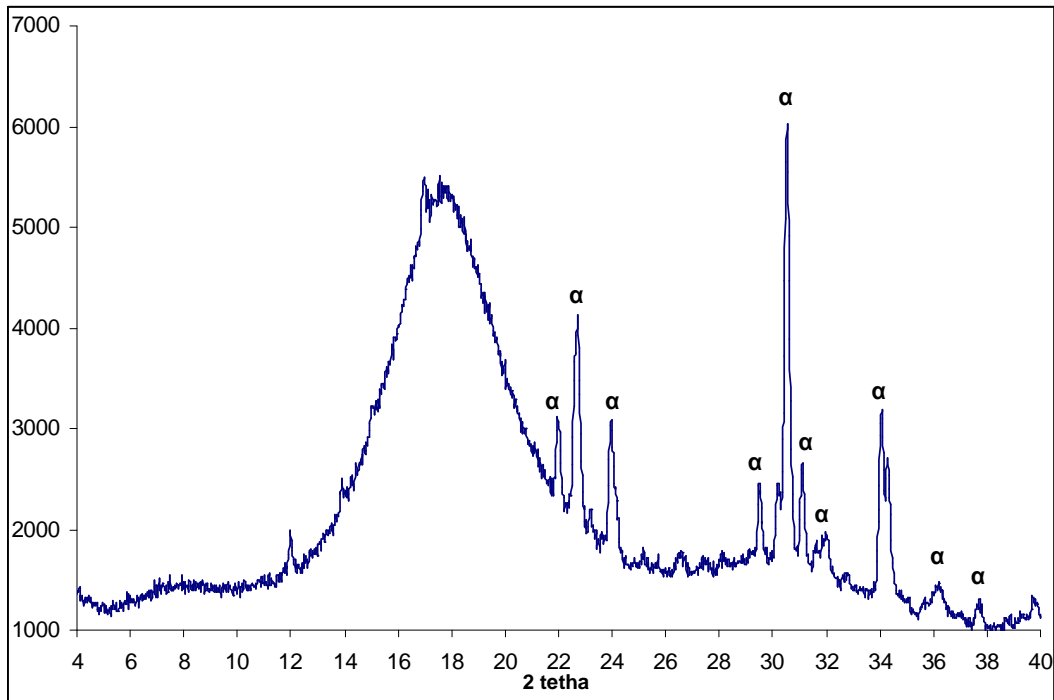


Figura 5.56. Difratoograma obtido pela técnica de Difração de Raios X do criogel de composição 50HEMA+TCP.

A influência da composição e do TCP incorporado ao polímero na estabilidade térmica foi avaliada por Análise Termogravimétrica (TGA) e é mostrado na Figura 5.57. A composição demonstra uma forte influência no comportamento térmico. Com o aumento da quantidade de DMAEMA é possível notar uma perda de massa mais acentuada no primeiro pico, que correspondente às cadeias laterais do copolímero. O que ocorre pelo fato de o DMAEMA possuir em sua estrutura cadeias laterais mais longas que o HEMA (um grupo dimetilamino etil, contra um hidróxi etil).

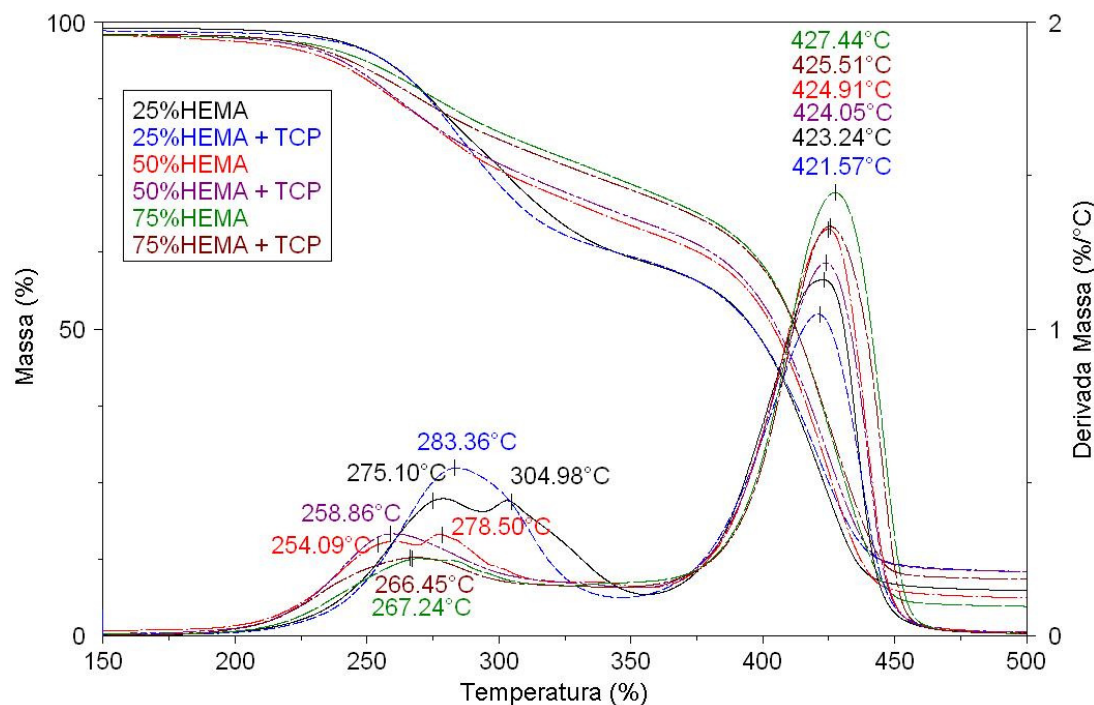


Figura 5.57. Análise termogravimétrica dos criogés sintetizados.

Nas amostras 25%HEMA e 50%HEMA a decomposição térmica do primeiro pico acontece em duas etapas, sendo a primeira correspondente à degradação do grupo amino do DMAEMA (ROY et al., 2007) e a segunda, ao resto da cadeia lateral do DMAEMA e da cadeia lateral do HEMA. O homopolímero do DMAEMA sintetizado por polimerização via RAFT (*Reversible addition-fragmentation chain Transfer* – Transferência de cadeias por adição-fragmentação reversível) apresenta degradação em 3 etapas (ROY et al., 2007), sendo a primeira a $\sim 167^{\circ}\text{C}$, a segunda ao redor de 306°C e a última, que corresponde à cadeia principal, ao redor de 403°C . Já o homopolímero do HEMA se decompõe em duas etapas, sendo a primeira ao redor de 300°C (ZHOU et al., 2009; TOMIC et al., 2010), correspondente à degradação da cadeia lateral deste polímero. Nos copolímeros sintetizados neste trabalho, o primeiro pico de decomposição, que corresponderia ao grupo amino do DMAEMA decompõe a 275°C e 254°C para as amostras 25%HEMA e 50%HEMA, respectivamente, valor muito superior ao citado por Roy et al. (2007) na literatura. Dessa forma pode-se deduzir que as cadeias dos dois monômeros presentes nos criogéis interagem, melhorando as propriedades térmicas finais.

A Tabela 5.18 mostra resumidamente, para cada composição estudada, a temperatura de decomposição apresentadas na derivada da curva termogravimétrica, o percentual de massa

perdida e o percentual da massa residual obtidos pela técnica de análise termogravimétrica diferencial (TGA).

Tabela 5.18. Resumo dos dados obtidos por TGA.

Amostra	DTA		TG		
	Temperatura Região I (°C)	Temperatura Região II (°C)	Perda massa Região I (%)	Perda massa Região II (%)	Resíduo (%)
25%HEMA	275,1 / 304,9	423,3	19,59 / 18,67	53,3	7,3
25%HEMA + TCP	283,1	421,1	36,28	51,7	10,4
50%HEMA	254,1 / 278,5	424,9	12,7 / 19,4	59,4	6,1
50%HEMA + TCP	258,9	424,1	30,8	56,9	10,4
75%HEMA	267,2	427,4	20,48	72,4	4,8
75%HEMA + TCP	266,4	425,5	23,12	65,7	9,2

Para as mesmas proporções e com a adição de 5% de α -TCP (amostras 25%HEMA+TCP e 50%HEMA+TCP), a decomposição dos grupos laterais ocorre em apenas uma etapa e em valor de temperatura intermediário entre os dois picos presentes nas amostras 25%HEMA e 50%HEMA. Esse fato mostra, que o α -TCP incorporado aos criogéis como carga, parece interagir com os grupos laterais das cadeias poliméricas e visto que este fato é mais pronunciado nas amostras contendo maiores teores de DMAEMA pode-se inferir que a interação das cargas cerâmicas se dá mais fortemente com o grupo dimetilamino.

Nas amostras 75%HEMA e 75%HEMA + TCP a decomposição dos grupos laterais ocorre ao redor de 267°C em uma única etapa, indicando interação entre os grupos laterais do HEMA (predominante) com os do DMAEMA (em menor quantidade). Nestas amostras a presença da fase cerâmica não alterou significativamente o comportamento térmico dos criogéis, o que indica que a interação do α -TCP se dá mais fortemente para as amostras com maiores teores de DMAEMA.

No que tange à temperatura, para maiores teores de HEMA a decomposição dos grupos laterais inicia a temperaturas mais baixas. Entretanto, o comportamento oposto é visto na decomposição da cadeia principal.

A diferença de massa entre as amostras de mesma composição carregadas e não carregadas com a fase cerâmica, correspondem ao teor de α -TCP incorporado aos criogéis. Tal resultado ajuda a confirmar a incorporação da fase cerâmica nos compostos poliméricos.

O inchamento pode ser considerado como uma técnica barata e simples para se caracterizar um polímero (YARIMKAYA; BASAN, 2007). O equilíbrio de inchamento da rede interpenetrada de um hidrogel é determinado pelo balanço de três forças primárias: (1) A retração elástica da rede; (2) a pressão osmótica da rede, resultado dos grupos iônicos do meio ao redor dos grupos contendo cargas iônicas da cadeia polimérica; (3) A energia livre de mistura das redes poliméricas com o solvente (ZHAI et al., 2004). Quando estes parâmetros se encontram em estado de equilíbrio, o equilíbrio de inchamento é alcançado. O quociente de inchamento no equilíbrio (ESR – *Equilibrium Swelling Rate*) é calculado a partir da Equação 4.10.

A Figura 5.58 mostra o valor do quociente de equilíbrio de inchamento (ESR – *Equilibrium Swelling Rate*), em uma solução fosfato - salina (PBS – *Phosphate Buffer Saline*) de pH 7,4 e a 37°C, simulando as condições de implante no corpo humano.

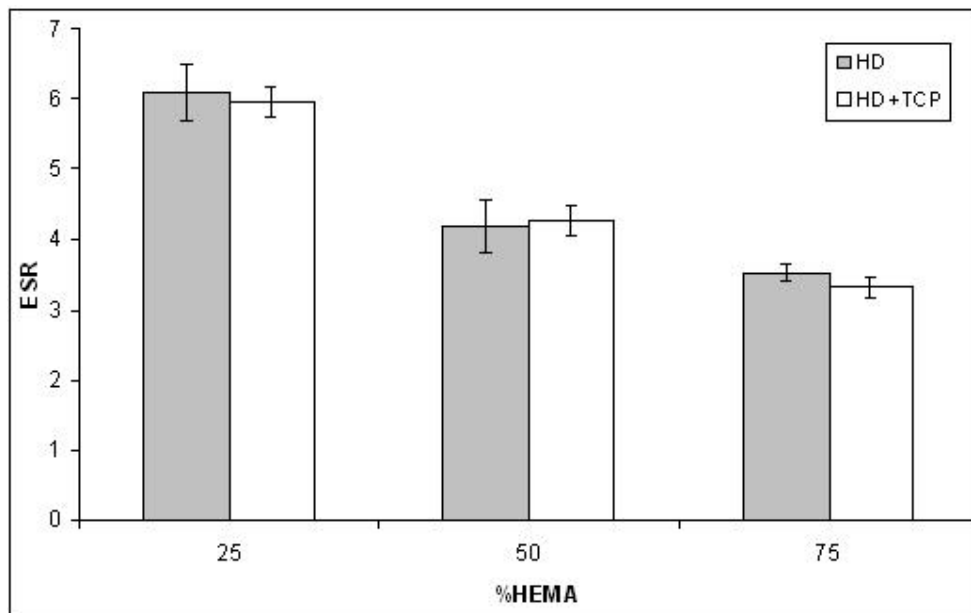


Figura 5.58. Quociente de Equilíbrio de Inchamento (ESR) dos criogéis sintetizados em função do teor de HEMA sem e com a adição de gelatina e da fase cerâmica α -TCP solução de PBS com pH 7,4 a 37°C.

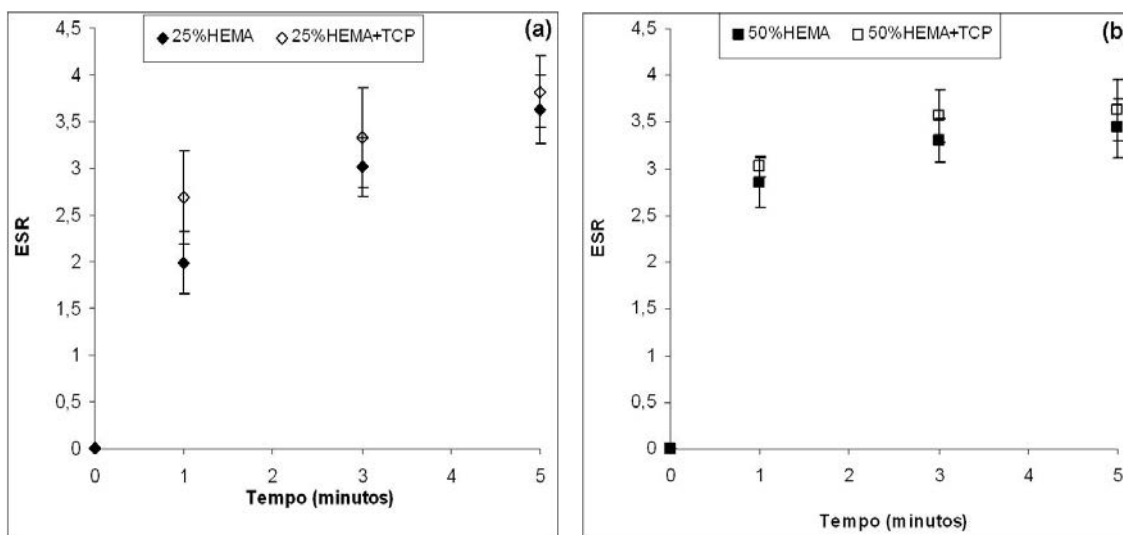
Nota-se que quanto maior a proporção de DMAEMA na composição das amostras sintetizadas, maior o quociente de equilíbrio de inchamento da amostra. As amostras contendo 75% de DMAEMA em sua composição (25%HEMA) obtiveram um ESR ao redor de 6 para as condições simulando o corpo humano, enquanto que as amostras contendo 25% de DMAEMA em sua composição (75%HEMA) obtiveram um ESR ao redor de 3,5 nas mesmas

condições. O ESR das composições contendo 95% de DMAEMA e 5% de Ácido Acrílico ou Ácido Metacrílico, mostrado na Figura 5.45 apresentaram um quociente de equilíbrio de inchamento entre 8 e 10 para as mesmas condições de pH e temperatura. Isso vai de encontro com o fato de que o DMAEMA possui uma maior capacidade de inchamento do que o HEMA. Tal fato se deve à maior quantidade de grupos protonados (grupo amino) presentes nas amostras com maiores teores de DMAEMA.

Resultado similar foi obtido por You e Auguste (2008) em trabalho publicado sobre a síntese de nanopartículas baseadas no sistema HEMA/DMAEMA, no qual os autores perceberam um aumento no diâmetro das nanopartículas quando se aumentou a proporção de DMAEMA na composição de 5% para 10%. A inserção de gelatina e α -fosfato tricálcico não demonstraram nenhuma influência visível no quociente de equilíbrio de inchamento dos criogéis sintetizados.

Apenas como fato ilustrativo, um ESR de 6 corresponde à um aumento de 500% na massa do criogel, o que significa que se um criogel possui massa de 100 gramas é capaz de absorver 500 gramas de água, o que significa que quando atingido o equilíbrio de inchamento o criogel pesará 600 gramas.

A Figura 5.59 mostra a influência da adição de gelatina e α -TCP na cinética de inchamento dos criogéis sintetizados.



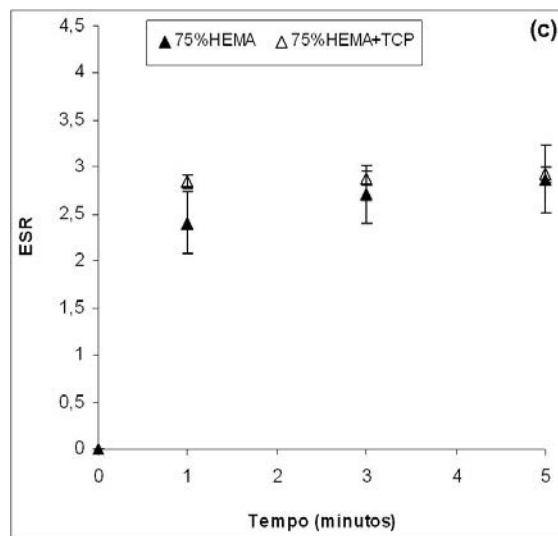


Figura 5.59. Influência da adição de gelatina e de α -TCP no Quociente de Equilíbrio de Inchamento (ESR) em função do tempo de imersão em solução de PBS com pH 7,4 a 37°C nas amostras de composição (a) 25% HEMA, (b) 50% HEMA, (c) 75% HEMA.

Visto que o processo de inchamento de um hidrogel se dá por difusão das moléculas do líquido, alguns fatores como concentração total de monômeros, densidade de entrecruzamentos na cadeia e espessura das paredes dos poros são importantes (JAIN et al., 2009). Assim é de se esperar que a porosidade exerça um papel importante na cinética de difusão dos criogéis visto que estes, por possuírem poros grandes e interconectados, permitem o transporte mais rápido das moléculas do solvente através das paredes finas entre os poros. A cinética também foi influenciada pela composição dos criogéis, pois as amostras contendo maior teor de DMAEMA em sua composição (75% HEMA e 75% HEMA + TCP) apresentaram uma maior taxa de inchamento quando comparadas com as amostras com maior teor de HEMA. Fato que também pode ser explicado pela maior presença de grupos protonados nas amostras contendo maiores teores de DMAEMA (YOU; AUGUSTE, 2008).

Um dos parâmetros mais importantes que caracteriza a estrutura de um hidrogel entrecruzado é o peso molecular entre ligações entrecruzadas, M_c (YARIMKAYA; BASAN, 2007). Tal propriedade determina o quanto as cadeias da rede polimérica podem expandir para acomodar as moléculas do solvente. Um polímero com um alto valor de M_c é capaz de inchar e obter um maior ESR do que um polímero com um valor baixo de M_c (YARIMKAYA; BASAN, 2007). O valor médio de peso molecular entre ligações entrecruzadas pode ser expresso pela equação de Flory – Rehner (PEPPAS; PEPPAS, 1991; UZUN et al.; 2003, LIN; METTERS, 2006, YARIMKAYA; BASAN, 2007). A equação supracitada foi mostrada na Equação 4.11. Já a fração volumétrica do polímero inchado, um

dos parâmetros necessários para a obtenção do peso molecular entre ligações entrecruzadas foi calculada a partir da Equação 4.12.

Outro parâmetro significante para a caracterização de polímeros entrecruzados é a densidade de ligações entrecruzadas, V_x , que pode ser calculada relacionando-se o peso molecular entre ligações entrecruzadas e os utilizando-se a Equação 4.15 (GARLAND et al., 2011).

O Tamanho da rede, ξ , é um termo que descreve o espaço disponível para o transporte de soluto entre a rede polimérica, também é um parâmetro importante para a análise de polímeros entrecruzados e é calculado de acordo com a Equação 4.13 (UZUN et al., 2003).

A Tabela 5.19 mostra em resumo as propriedades estruturais, densidade de entrecruzamento e tamanho da rede, calculados com a utilização nas Equações 4.11 a 4.17, para todas as composições sintetizadas neste estudo.

Tabela 5.19. Parâmetros da rede polimérica determinados através do estudo do inchamento dos criogéis.

HEMA (%)	M_c (g/mol)	M_r (g/mol)	V_x (mol/cm³ x 10²⁰)	ξ (nm)	$G'(s)$ (KPa)
25	6560	150,4	0,87	84,6	46,4
25+TCP	6220	150,4	1,04	77,6	47,2
50	2900	143,7	2,29	31,0	120,0
50+TCP	3150	143,7	2,00	34,4	97,8
75	1530	136,9	3,79	13,7	265,4
75+TCP	1450	136,9	4,32	12,9	267,3

Como visto na Tabela 5.19, os valores de peso molecular entre ligações entrecruzadas, M_c , são maiores para as composições contendo maiores valores de DMAEMA em sua composição. A composição 25%HEMA obteve um M_c de 6560 g/mol, enquanto que a composição 75%HEMA obteve um valor de 1530 g/mol para este parâmetro. Em parte este resultado pode ser explicado pelo fato de que as cadeias com maiores teores de DMAEMA possuem maior valor de M_r , peso molecular da unidade repetitiva, como mostrado na Tabela 5.19 e calculado através da Equação 4.14. Por outro lado, os resultados levam a crer que o agente entrecruzante utilizado forma ligações mais efetivamente com o HEMA do que com o DMAEMA, de forma que as composições contendo maiores teores de HEMA possuam uma maior proporção de entrecruzamentos, o que resultaria em um menor peso molecular entre ligações entrecruzadas.

A adição de gelatina à composição dos criogéis não afetou significativamente a M_c , indicando que nem a gelatina, nem a carga cerâmica, o α -fosfato tricálcico, formam ligações entrecruzadas com os monômeros. O peso molecular entre ligações entrecruzadas pode ser considerado como o peso molecular médio das cadeias entre cada ligação entrecruzada. Dessa forma, quanto maior o valor dessa propriedade, maior será o valor do quociente de equilíbrio de inchamento, pois o hidrogel terá um menor número de pontos de entrecruzamento de ligações para maiores teores de cadeia flexível. Na literatura, Yarimkaya e Basan (2007) estudaram os parâmetros da rede de copolímeros de hidroxietil metacrilato com ácido acrílico e acrilato de sódio (HEMA-co-AA-co-NaAc) e verificaram que para maiores valores de inchamento, maior era o valor do peso molecular entre ligações entrecruzadas. Neste caso, estudou-se a influência do pH, sendo que para pH 2,0 obteve-se um ESR de 1,5 e um M_c de 2667 g/mol, enquanto que para o pH 8,0 obteve-se um ESR de aproximadamente 5 e um M_c de 209 g/mol. A mesma tendência foi seguida por hidrogéis compostos pelo monômero DMAEMA e pequenas quantidades do agente entrecruzante Etileno Glicol Dimetilacrilato (EGDMA), no qual o inchamento de 3380% (ESR de aproximadamente 33,8) levou à um peso molecular entre ligações entrecruzadas de 10000 g/mol, enquanto que um inchamento de 1296% (ESR igual a aproximadamente 14) correspondeu a um M_c de apenas 475 g/mol (UZUN et al., 2003). O que indica que o peso molecular entre ligações entrecruzadas, além de ser afetado pelo pH, também é influenciado pela composição, principalmente pelo teor de agente entrecruzante utilizado na reação de polimerização.

O conhecimento da densidade de ligações entrecruzadas é um fator de grande importância na caracterização de hidrogéis devido à seus efeitos nas propriedades físicas e mecânicas e em sua influência nas aplicações práticas (GARLAND et al., 2011). A densidade de ligações entrecruzadas pode ser definida como a fração molar de unidades monoméricas que são pontos de entrecruzamentos. A densidade de ligações entrecruzadas diminuiu com o aumento do peso molecular entre ligações entrecruzadas, o que pode ser explicado pelo fato de que o M_c é inversamente proporcional à densidade de ligações entrecruzadas como mostra a Equação 4.15. Logo, quanto maior o número de ligações entrecruzadas maior o valor de V_x . Por exemplo, a amostra 25%HEMA apresentou uma densidade de ligações entrecruzadas de $0,87 \times 10^{20}$ mol/cm³; já a amostra 50%HEMA apresentou valor de densidade de ligações entrecruzadas de $2,29 \times 10^{20}$ mol/cm³, enquanto que a amostra 75%HEMA apresentou uma densidade de ligações entrecruzadas de $3,79 \times 10^{20}$ mol/cm³. O mesmo comportamento foi verificado por Garland et al. (2011) para hidrogéis a base de poli(metil vinil éter – co – ácido

maleico) entrecruzado com poli(etileno glicol), o qual obteve V_x de $0,47 \times 10^{20}$ mol/cm³, para composições cujo M_c foi de 146000 g/mol enquanto que amostras cujo M_c foi de 2630 g/mol obteve V_x de $3,99 \times 10^{20}$ mol/cm³. Valores consideravelmente similares aos obtidos neste trabalho para outro sistema polimérico. A adição de gelatina e carga cerâmica não afetou consideravelmente o valor da densidade de entrecruzamentos o que é mais um indício de que a interação entre os grupos funcionais do DMAEMA e a carga dos íons do α -fosfato tricálcico é baixa.

O tamanho de rede é outro fator importante para determinar as propriedades físicas dos hidrogéis como propriedades mecânicas, degradabilidade e a difusividade de moléculas, no caso de portadores de fármacos C. Tal parâmetro foi calculado utilizando-se a Equação 4.16 e os resultados mostram que maiores teores de DMAEMA levam a maiores tamanhos de rede. As amostras 25%HEMA e 25%HEMA + TCP apresentaram tamanho de rede de 84,6 nm e 77,6 nm, respectivamente, já as amostras 50%HEMA e 50%HEMA + TCP apresentaram tamanho de rede de 31 e 34,4 nm, respectivamente, enquanto que as amostras 75%HEMA e 75%HEMA + TCP apresentaram tamanho de rede de 13,7 nm e 12,9 nm, respectivamente. De acordo com Lin et al. (2006), o tamanho de rede é afetado por: (1) grau de entrecruzamento do hidrogel; (2) estrutura química da composição do monômero; e (3) estímulos externos, como temperatura, pH e força iônica. Assim, quanto maior a densidade de ligações entrecruzadas, menor será o comprimento das cadeias livres (menor M_c), e conseqüentemente, menor o tamanho dos espaços vazios que permitem o carregamento de cargas e fármacos pelo polímero.

Para aplicações biomédicas, o tamanho de rede típico varia entre 5 e 100 nm, quando inchadas. Esta faixa de tamanho é muito maior do que o tamanho da maioria dos fármacos e, portanto, a difusão desses fármacos não é afetada em hidrogéis no seu estado inchado. Entretanto, a liberação de macromoléculas como peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos pode ser sustentada por hidrogéis em seu estado inchado devido ao seu significativo raio hidrodinâmico (LIN; METTERS, 2006). No caso do sistema monomérico utilizado nesta etapa do trabalho, as amostras com maiores teores de HEMA possuem maior densidade de ligações entrecruzadas, logo possuem um menor tamanho de rede. No entanto, as amostras com maiores teores de DMAEMA, além de possuírem menor V_x , possuem cadeias laterais de maior tamanho, o que também influencia no fato de tais amostras possuírem maior tamanho de rede. O que nos permite supor que os criogéis contendo maiores teores de DMAEMA seriam mais efetivos no carregamento de fármacos. Entretanto, apresentariam uma menor

estabilidade química, pois por possuir maior espaçamento entre as moléculas, permite que o solvente agrida mais facilmente as ligações químicas da cadeia, o que diminuiria o tempo de degradação do implante.

Utilizando-se a Equação 4.17 calculou-se o módulo de elasticidade dos criogéis a partir do seu estado de inchamento (Tabela 5.18). Assim, como seria de se esperar, cadeias mais livres e menos entrecruzadas, apresentaram menores valores de resistência elástica. As amostras 25%HEMA e 25%HEMA + TCP apresentaram valores de G' de 46,4 e 47,2 KPa, respectivamente, enquanto que as amostras 75%HEMA e 75%HEMA + TCP apresentaram G' de 265,4 e 267,3 KPa, respectivamente.

Apesar de possuir menores propriedades mecânicas, as amostras contendo maiores teores de DMAEMA se mostraram mais interessantes para a utilização do implante junto com o fármaco.

O comportamento de inchamento/degradação das composições estudadas após 28 dias de imersão em PBS, simulando as condições de implantação no corpo humano, é mostrado nas Figuras 5.60 e 5.61.

Após 28 dias de imersão em PBS, as amostras sem α -TCP em sua composição, mostradas na Figura 5.60, não mostram nenhum sinal de degradação. Entretanto, a presença do α -TCP acelerou fortemente o processo de degradação das amostras de composição 25%HEMA+TCP, mostrada na Figura 5.61, de maneira que as amostras perderam totalmente a integridade mecânica após somente 7 dias de imersão. Já a amostra de composição 50%HEMA+TCP começa a demonstrar uma leve diminuição no ESR, além disso, a amostra mostrar sinais de perda de integridade mecânica após 7 dias de imersão em PBS, enquanto que a amostra 75%HEMA+TCP manteve o seu ESR constante e começou a dar sinais de perda de integridade mecânica após 21 dias de imersão. Como já discutido anteriormente, o tamanho de rede também influenciou fortemente a degradação das amostras com maiores teores de DMAEMA.

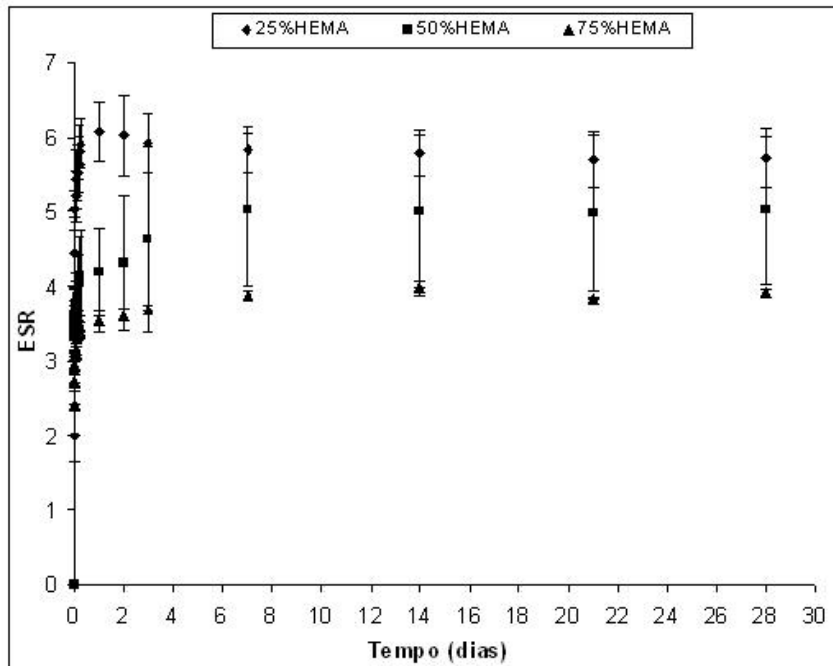


Figura 5.60. Variação do Quociente de Equilíbrio de Inchamento (ESR) após 28 dias de imersão em solução de PBS com pH 7,4 a 37°C para as amostras sem α -TCP em suas composições.

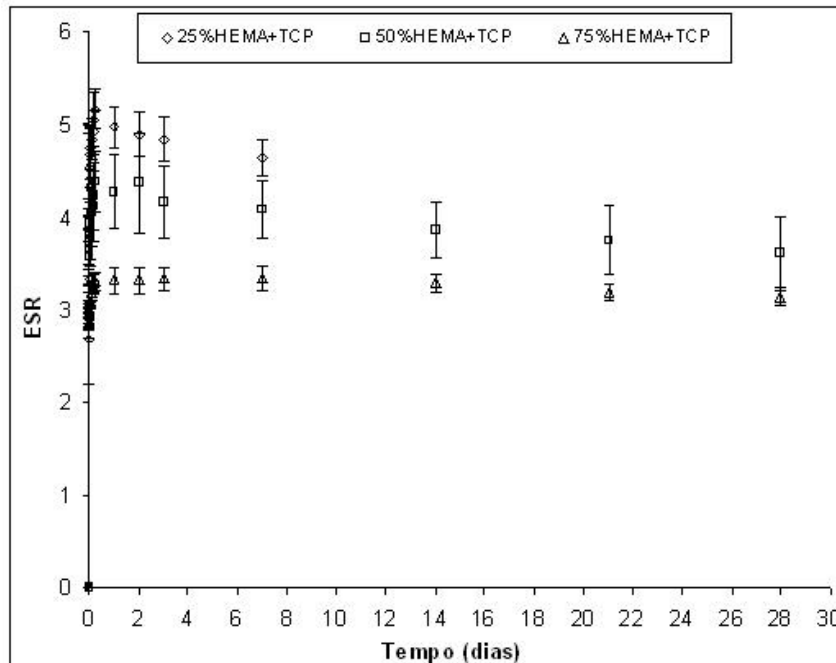


Figura 5.61. Variação do Quociente de Equilíbrio de Inchamento (ESR) após 28 dias de imersão em solução de PBS com pH 7,4 a 37°C para as amostras com α -TCP em suas composições.

As amostras com α -TCP em sua composição além de possuírem maior porosidade, o que por si só é responsável pela diminuição das propriedades mecânicas, também levam como fator responsável pela perda de integridade mecânica das amostras, o alto caráter solúvel do α -TCP. Pois este, ao ser dissolvido pode deixar vazios que aumentariam a porosidade do implante e acelerariam a quebra das cadeias poliméricas dos criogéis, acelerando a falha do material. Outro fator que deve se levar em conta é a alta resistência química do HEMA, o que pode, somado ao tamanho de rede, explicar o fato de as amostras contendo maiores teores deste monômero terem demonstrado um melhor comportamento em termos de degradação, menos degradável, do que as amostras contendo maiores teores de DMAEMA. Ademais, outro ponto positivo dos criogéis contendo maiores teores de HEMA é a maior reprodutibilidade dos resultados, o que dá uma maior confiabilidade às amostras preparadas com esta composição. Tal fator é de fundamental importância para a utilização de um material como implante.

O poli(DMAEMA) é conhecido por ser um polímero com sensibilidade ao pH (MUÑOZ-BONILLA et al., 2007; SUI et al., 2008). A sensibilidade do sistema HEMA/DMAEMA foi um dos temas de estudo desse projeto. Na Figura 5.62 é possível observar o Quociente de Equilíbrio de Inchamento (ESR) dos criogéis sintetizados à diferentes pH.

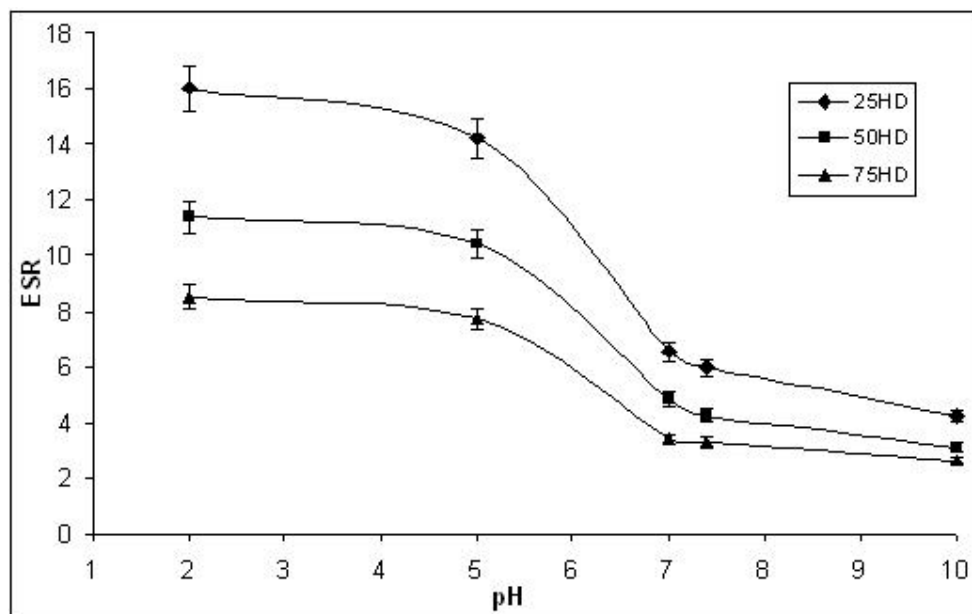


Figura 5.62. Inchamento das amostras em diferentes pHs após 12 horas de imersão.

Percebe-se que o sistema HEMA/DMAEMA mesmo com relativamente pequenas incorporações de DMAEMA mantém a sensibilidade ao pH de uma maneira similar à descrita na literatura em hidrogéis com até 20% de DMAEMA (BRAHIM et al., 2003b).

Yangfeng e Min (2001) estudaram a cinética de inchamento e a resposta a estímulos de hidrogéis contendo como principal monômero o DMAEMA e encontraram que a redução do pH para 3,0 produz um drástico aumento no inchamento. Esta tendência também é encontrada no nosso trabalho. A amostra 25%HEMA atingiu um ESR ao redor de 16, o que corresponde a um inchamento de cerca de 1500% em meio ácido, enquanto a amostra 75%HEMA obteve um quociente de equilíbrio de inchamento de 8,5, o que se aproxima da metade do valor obtido pela amostra anterior. Já em meio básico (pH 10) o valor de ESR caiu aproximadamente 4 vezes indo para 4,2 para a amostra 25%HEMA, enquanto que a amostra 75%HEMA sofreu uma redução de cerca de 3,2 vezes atingindo um ESR de 2,6.

Yamarika e Basan (2007) estudaram o efeito do pH em copolímeros de hidroxietil metacrilato com ácido acrílico e acrilato de sódio (HEMA-co-AA-co-NaAc) e verificaram que houve um aumento no quociente de equilíbrio de inchamento com o aumento de pH de 2,0 para 8,0. Este resultado, apesar de ser contrário aos obtidos para o sistema HEMA/DMAEMA, mostra que modificações na cadeia principal, como a adição de diferentes tipos de grupos laterais, podem influenciar fortemente as características de inchamento em função do pH de um polímero. Segundo os autores, o aumento do pH leva à ionização dos grupos $-\text{COONa}$ e COOH provenientes do acrilato de sódio e do ácido acrílico, respectivamente. Traçando-se um paralelo com este trabalho, o aumento do quociente de equilíbrio de inchamento em pH ácido pode estar relacionado com a ionização dos grupos amino do DMAEMA, que se ionizam em pH ácido, aumentando a repulsão entre as cadeias. A Figura 5.63 mostra uma fotografia da amostra 75%HEMA mergulhada em soluções salinas à base de fosfatos de pH 2, 7 e 10.

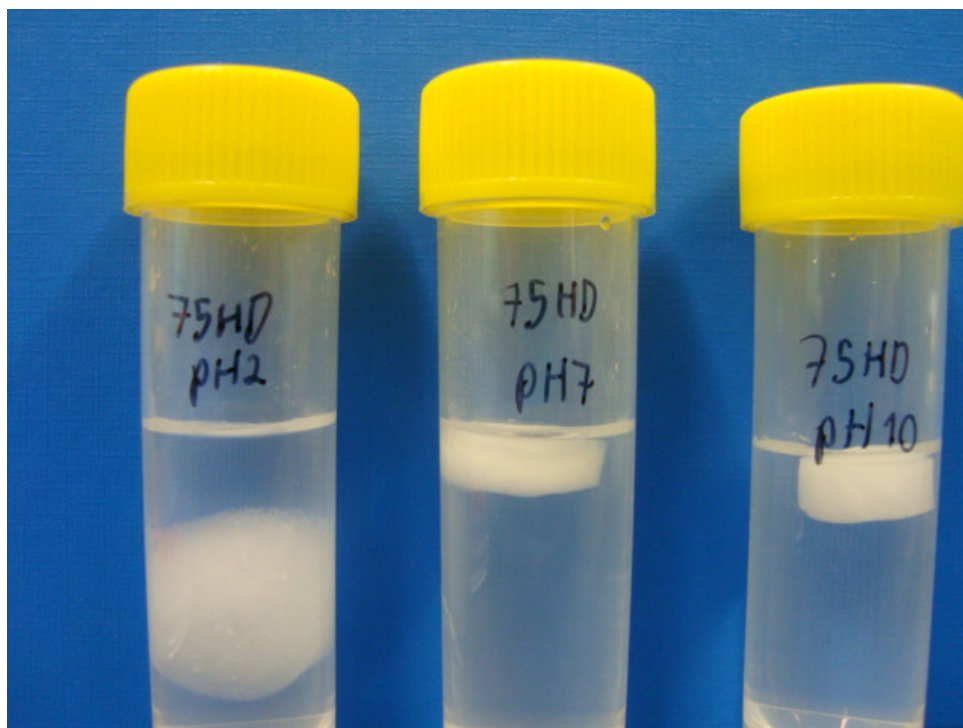


Figura 5.63. Fotografia do criogéis de composição 75%HEMA imersos em solução tampão de pH 2, 7 e 10.

A Figura 5.63 ilustra visualmente o comportamento apresentado no gráfico da Figura 5.62. Na foto discos de mesmo diâmetro da amostra 75%HEMA foram imersas em soluções salinas à base de fosfatos de pH 2, 7 e 10 e percebe-se facilmente que a amostra mergulhada em pH 2 inchou muito mais do que as outras, enquanto que a amostra mergulhada em pH 10 possui diâmetro um pouco menor do que a amostra mergulhada em pH 7.

As propriedades viscoelásticas dos criogéis inchados foram estudadas por reologia. Na Figura 5.64, pode-se ver o módulo elástico e viscoso em função da deformação percentual aplicada sobre as amostras. A linha vermelha representa o armazenamento, ou módulo elástico (G'), que é a habilidade do material em armazenar energia. A linha azul representa o módulo viscoso (G''), que representa a habilidade do material em dissipar energia, geralmente na forma de calor. G' é maior do que G'' . durante toda a região linear viscoelástica para todas as amostras, confirmando o caráter de gel das amostras hidratadas. O valor fixo com variações menores do que 10% em toda a região estudada é indicativo de que todas as composições se tratam de um polímero com ligação interconectadas.

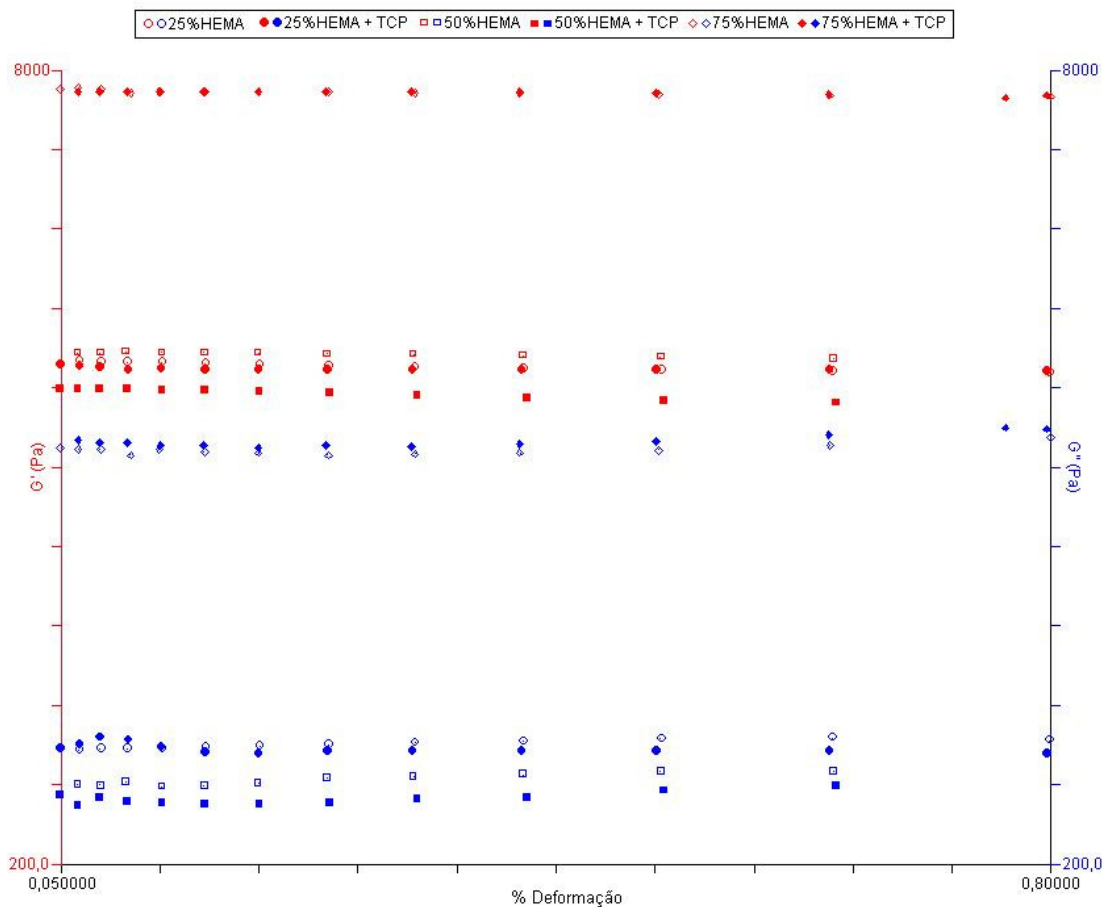


Figura 5.64. Módulo Elástico (G') e módulo viscoso (G'') medidos por reologia.

O valor de G' obtido para as amostras das composições contendo 25%HEMA e 50%HEMA com e sem a adição de gelatina se manteve entre 2000 e 2500 Pa, valor muito menor do que o obtido para as composições 75%HEMA e 75%HEMA + TCP, as quais apresentaram valores de módulo de elasticidade ao redor de 7800 Pa. O que indica que as amostras contendo maiores teores de HEMA possuem melhores propriedades mecânicas do que as amostras contendo maiores teores de DMAEMA.

Ainda assim, tais valores são muito inferiores aos calculados utilizando-se a Equação 4.17, a qual relaciona o módulo elástico com o peso molecular entre ligações entrecruzadas. O que pode ser explicado pelo, esta fórmula não leva em conta a alta porosidade do sistema (atingindo valores de até 75%), o que pode ser considerada como grande responsável por esta grande discrepância encontrada entre os valores reais e os teóricos. Em muitos sistemas poliméricos a adição de cargas cerâmicas atua como reforço das propriedades, contudo, tal fenômeno não foi percebido neste trabalho, visto que a adição de α -fosfato tricálcico não afetou significativamente o módulo elástico das amostras.

Ao longo deste trabalho, pôde-se perceber que a adição de α -TCP pouco afetou as propriedades dos criogéis, o que apesar de não ser benéfico, também demonstra que a adição do fosfato de cálcio agiu de maneira a piorar as propriedades dos criogéis. Espera-se que esta adição faça a diferença melhorando as propriedades *in vivo* do sistema polimérico. Estes ensaios são realizados a seguir.

Para o prosseguimento do trabalho se elegeu as composições 75%HEMA e 75%HEMA + TCP, pois tais sistemas apresentaram melhor comportamento quanto à degradação do que as amostras contendo maiores teores de DMAEMA. Neste caso se optou por uma composição que demonstrasse melhores características para ser utilizada como implante ósseo, deixando para trabalhos futuros as composições que demonstraram melhor comportamento para o carregamento e liberação controlada de fármacos *in situ*.

Visando avaliar a viabilidade e proliferação celular se escolheu o método Alamar Blue™, o qual consiste em um corante aquoso não tóxico que promove uma reação química de redução do corante quando em contato com os produtos provenientes da atividade metabólica das células. O crescimento contínuo irá manter um ambiente redutor para o corante e ele continuará “colorido”, enquanto que a inibição do crescimento irá provocar um ambiente oxidante que irá deixar o corante “transparente”.

O teste de viabilidade foi realizado com osteoblastos humanos e células tronco mesenquimais provenientes da parte esponjosa do osso, durante o período de 4 dias. Os diferentes tipos de célula foram inseridas nos criogéis do sistema HEMA/DMAEMA de composição 75%HEMA e 75%HEMA + TCP ou em poços de cultura celular vazios (controle celular) e incubadas nas mesmas condições por 96 horas. A atividade celular foi verificada através da substituição do meio por uma solução diluída de Alamar Blue™ nos poços, seguida pela incubação pelo período de 2 horas.

O Gráfico mostrado na Figura 5.65 representa a atividade das células apenas nos controles e como a presença dos criogéis de composição HEMA/DMAEMA com e sem a adição da fase cerâmica α -fosfato tricálcico afetou a respiração celular. Outro objetivo do estudo foi ver como diferentes tipos de células respondiam às composições do hidrogel.

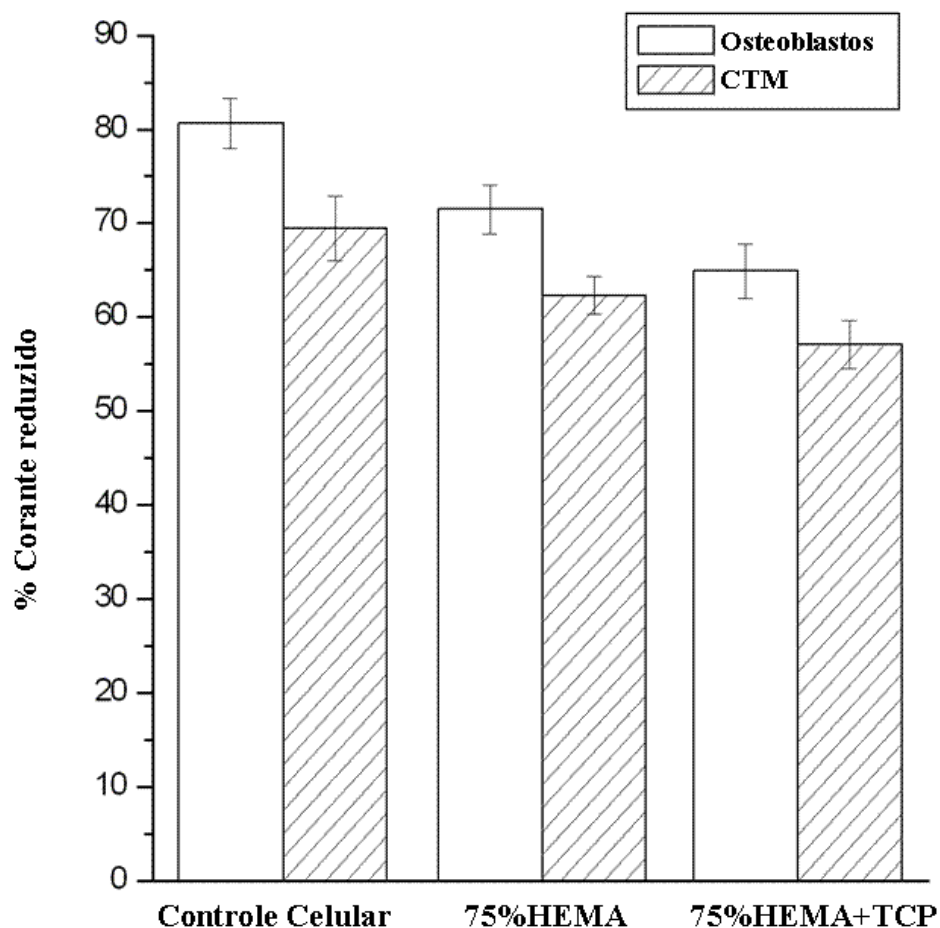


Figura 5.65. Porcentagem de Alamar Blue reduzido para culturas de osteoblastos e células tronco mesenquimais humanas (CTM) na presença de criogéis de composição 75%HEMA e 75%HEMA + TCP (n=3).

Os resultados são representados pelas medidas de absorbância do corante reduzido pelos diferentes tipos de células incubados nos diferentes sistemas poliméricos com e sem a adição de fase cerâmica. A partir da análise do gráfico percebe-se que o percentual de alamar blue reduzido não se alterou significativamente na presença de diferentes materiais em comparação com os poços contendo apenas células e que a composição dos criogéis apresentaram um efeito negativo na proliferação celular. Para ambos os tipos de células o mesmo comportamento foi encontrado: a atividade metabólica diminuiu da célula de controle para a amostra 75%HEMA e diminuiu ainda mais para a amostra 75%HEMA + TCP, resultado diferente do esperado, pois a função do fosfato tricálcico era justamente aumentar a adesão celular. Assim mesmo, ambos os criogéis são não-citotóxicos e permitiram a adesão de diferentes tipos células e permitiram a viabilidade da permanência dessas células após 96 horas de incubação.

You e Auguste (2010) sintetizaram nanopartículas com o sistema HEMA/DMAEMA com composição 95/5 e 90/10 e analisaram a viabilidade celular destes materiais utilizando células do tipo HeLa, proveniente de mamíferos, e verificaram que o percentual de células que permaneceram vivas após 24 horas de incubação foi ao redor de 90% para ambas as composições. As diferenças entre os resultados provenientes da literatura e os encontrados neste estudo podem ser explicadas tanto por ter se usado diferentes células no ensaio quanto pelo menor tempo de incubação utilizado nos experimentos realizados por You e Auguste.

Zhou et al. (2009) estudaram a viabilidade celular de hidrogéis à base de Poli(Etileno Glicol) Dimetilacrilato (PEGDMA) com a adição de hidroxiapatita através da técnica de MTT (ensaio similar ao Alamar Blue) e verificaram que a adição de hidroxiapatita aumentou significativamente a adesão e viabilidade de células mesenquimais humanas. No caso do sistema polimérico utilizado neste trabalho e do fosfato de cálcio utilizado (α -TCP) o resultado obtido foi inverso, ocorreu uma diminuição da adesão celular com a adição da fase fosfato de cálcio tricálcico. Uma possível explicação para este fato é que durante a síntese dos criogéis ocorra uma mudança do pH da fase cerâmica, o que diminuiria a sua compatibilidade celular. Outra possível explicação seria que o fosfato de cálcio utilizado solubiliza, ao menos parcialmente, impedindo que as células permaneçam aderidas nos locais em que ele se encontra.

Hematoxilina é um corante básico que interage preferencialmente com a estrutura basófila dos tecidos. Quando em contato com o núcleo e regiões do citoplasma ricas em RNA, colore elas de azul, enquanto que a Eosina quando entra em contato com o citoplasma das células, o colore de vermelho.

A Figura 5.66 mostra a análise histomorfológica *in vitro* das amostras (a) e (b) 75%HEMA e (c) e (d) 75%HEMA + TCP do ensaio histoquímico Hematoxilina-Eosina. As células se aderiram em uma quantidade muito pequena na periferia dos arcabouços poliméricos do sistema HEMA/DMAEMA. As células são representadas pelos pequenos pontos azulados mostrados na Figura 5.66 (b), que é uma micrografia aumentada da Figura 5.66 (a). Os criogéis com maior teor de α -TCP mostraram um considerável aumento na quantidade de células aderidas à sua superfície. O que indica a adição da fase alfa do fosfato tricálcico ao sistema polimérico aumentou as condições para a adesão e a proliferação das células em sua superfície.

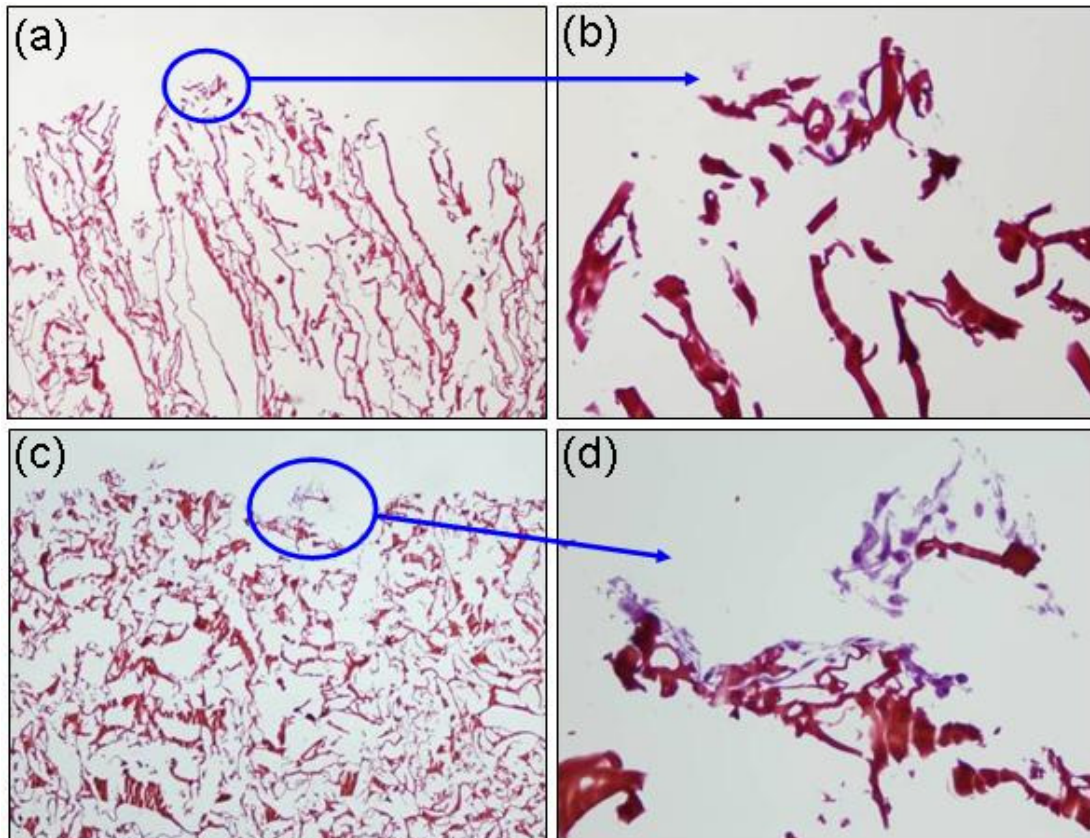


Figura 5.66. Micrografias obtidas por microscopia ótica da análise histomorfológica *in vitro* das amostras (a) e (b) 75%HEMA e (c) e (d) 75%HEMA + TCP do ensaio histoquímico Hematoxilina-Eosina.

O Colágeno é uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas. Dentre os diversos tipos existentes de colágeno, o mais comum é o tipo I que aparece nos tendões, na cartilagem fibrosa, no tecido conjuntivo frouxo comum, no tecido conjuntivo denso (onde é predominante sobre os outros tipos), sempre formando fibras e feixes, ou seja, está presente nos ossos, tendões e pele. A presença de colágeno do tipo I na superfície dos criogéis é um forte indicativo da diferenciação das células tronco mesenquimais humanas em fenótipo osteogênico, o que indicaria que as células tronco mesenquimais (CTM) estariam se diferenciando em tecido ósseo. Para a detecção de Colágeno I nas amostras poliméricas contendo células tronco mesenquimais humanas utilizou-se a técnica de Imuno-histoquímica indireta por peroxidase em parafina.

Já a fosfatase alcalina (FA) é uma fosfohidrolase, isto é, é uma enzima capaz de remover grupos fosfatos de um grande número de moléculas diferentes, incluindo nucleotídeos, proteínas e alcalóides; como o próprio nome sugere, essa enzima é mais ativa

em soluções alcalinas. O processo de remoção desses grupos fosfatos é conhecido como defosforilação. A fosfatase alcalina é sintetizada por osteoblastos e condrócitos e está presente no processo de mineralização de ossos e cartilagens. Ela é a enzima envolvida na formação das células ósseas, é o marcador mais amplamente utilizado na estimativa da taxa de formação óssea (STEPAN et al., 1987). A FA é também um marcador associado com o processo de diferenciação durante o processo de calcificação, visto que esta enzima se faz necessária antes da total mineralização da matriz.

A análise histomorfológica das amostras 75%HEMA e 75%HEMA + TCP é mostrada na Figura 5.67.

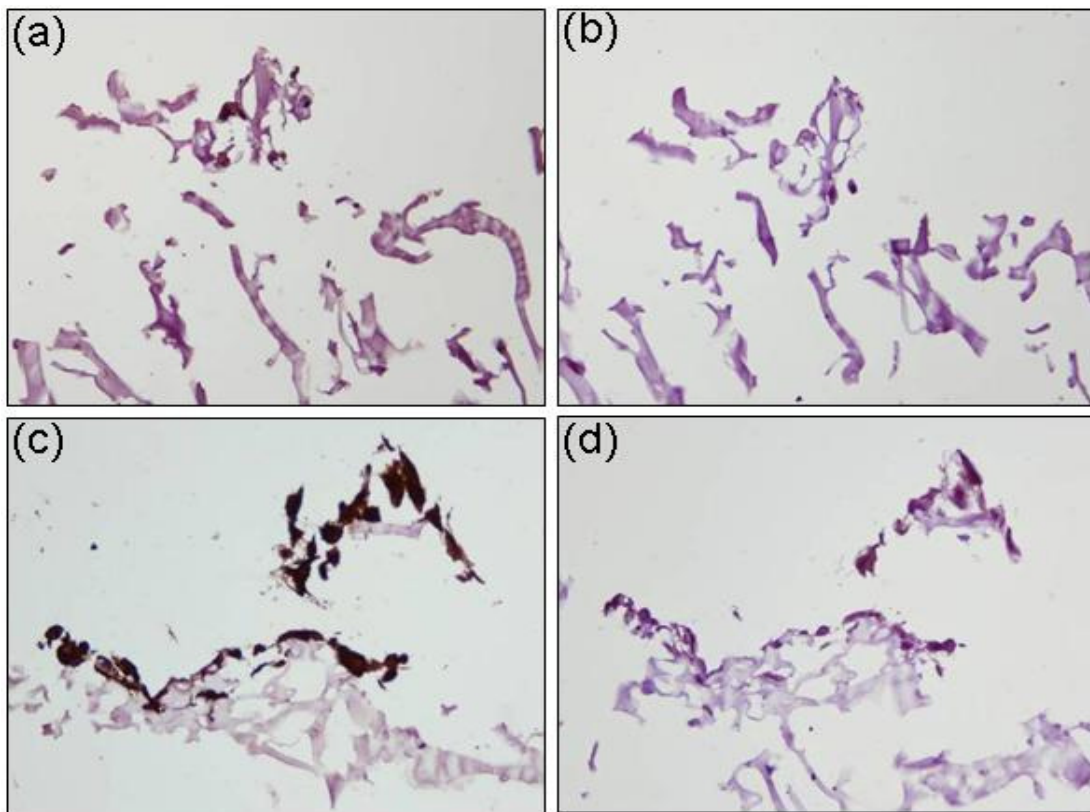


Figura 5.67. Micrografias obtidas por microscopia ótica da análise histomorfológica *in vitro* da amostra 75%HEMA para os ensaios de (a) Colágeno I e (b) Fosfatase Alcalina e da amostra 75%HEMA + TCP (c) Colágeno I e (d) Fosfatase Alcalina.

As Figuras (a) e (b) representam análise do colágeno I e da fosfatase alcalina, respectivamente da amostra 75%HEMA, enquanto que as figuras (c) e (d) representam análise do colágeno I e da fosfatase alcalina, respectivamente da amostra 75%HEMA + TCP. O marcador imuno histoquímico mostra uma forte presença de colágeno do tipo I na região periférica dos criogéis de composição 75%HEMA + TCP, o que pode indicar a diferenciação das CTM em um fenótipo osteogênico, ou seja, as células tronco podem estar se diferenciando

para a formação de tecidos ósseos. Como a presença de colágeno I nas amostras sem a adição de α -TCP é muito baixa, pode-se afirmar que a adição da fase cerâmica é fundamental para a diferenciação das células tronco.

Apesar de não ser detectada nos arcabouços constituídos apenas do sistema polimérico HEMA/DMAEMA, a fosfatase alcalina (FA) pode ser fortemente notada na amostra 75%HEMA + TCP, o que permite inferir que existe uma correlação muito favorável entre a presença de α -TCP com a presença de FA. A presença desta enzima indica que o processo de calcificação está ocorrendo nos criogéis, o que é muito interessante em implantes ósseos. Desta forma, podemos inferir que os arcabouços obtidos 75%HEMA + TCP são osseoindutores, possuindo um forte potencial de uso em engenharia de tecidos.

Estes ensaios provêm uma análise preliminar da relação entre os criogéis do sistema HEMA/DMAEMA e as células tronco mesenquimais. O sistema permitiu a adesão e a proliferação das células, tornando a sua permanência na superfície dos hidrogéis viável. A redução no número de células após 4 dias de ensaio verificada pelo método Alamar Blue, pode indicar que as condições de incubação das células podem ser melhoradas. Também se pode notar que não foi utilizado nenhum fator de crescimento no meio de cultura, visto que a idéia era ter uma primeira impressão do comportamento das células em presença dos criogéis do sistema HEMA/DMAEMA. A presença de colágeno do tipo I e de fosfatase alcalina são bons indicativos do potencial destes materiais para o seu uso como biomateriais e mais especificamente como substitutos ósseos. Em suma, os resultados obtidos indicam que os criogéis testados são biocompatíveis, mostrando que células de vital importância aderiram ao material, se proliferaram e expressaram os marcadores bioquímicos correspondentes ao fenótipo osteogênico.

6. CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível sintetizar a fase α -fosfato tricálcico nanoestruturado usando o método de síntese de combustão em solução e após definir os melhores parâmetros de síntese, verificar a viabilidade de sua utilização como cimento de fosfato de cálcio. Tendo-se obtido o cimento foi investigado e determinado a viabilidade de aplicação do cimento obtido como substituto ósseo e como carga cerâmica em criogéis poliméricos. A seguir serão descritas as principais conclusões após cada estudo.

Obteve-se e caracterizou-se a fase cerâmica α -fosfato tricálcico através do método de síntese de combustão em solução (SCS). A partir do estudo da influência do pH na obtenção do α -TCP, observou-se que:

- O pH exerce uma grande influência sobre a fase obtida após a reação de combustão, sendo que pHs mais ácidos levam à obtenção de um produto com maior cristalinidade como verificado por DRX;
- pHs mais ácidos também levaram à obtenção de pós menor tamanho de cristalito como verificado por BET e por MET;
- Obteve-se a fase α -fosfato tricálcico com elevado grau de pureza após o pó obtido passar por um processo de tratamento térmico de aquecimento a 1200°C por 4 horas, seguida de choque térmico.
- O cálculo termodinâmico das reações de combustão em solução permitiu prever os comportamentos cinético e termodinâmico para a síntese do α -fosfato tricálcico.

Para o estudo da influência do combustível variou-se o combustível utilizado, uréia ou glicina e a razão estequiométrica de combustível utilizada, através deste estudo verificou-se que o tipo de combustível influenciou diferentemente nas fases formadas:

- Obteve-se pós de α -TCP de estrutura nanométrica e puro por DRX;
- as reações que utilizaram glicina como combustível permitiram a obtenção das fases α -TCP e β -TCP com adição de pirofosfato de cálcio e HA, por atingirem temperaturas mais elevadas no processo de síntese;
- por outro lado as reações onde uréia foi utilizada como combustível levou à obtenção das mesmas fases que a glicina, com a exceção do α -TCP;

- mesmo com a formação de fases de estequiometria não desejada, após o tratamento térmico verificou-se que após o tratamento térmico independente do tipo e do teor de combustível utilizado, obteve-se α -fosfato tricálcico com elevado grau de pureza de fases;
- maiores valores estequiométricos de ambos combustíveis levaram à obtenção de partículas com maior área superficial e menor tamanho de partícula, como verificado por BET e com menor tamanho de cristalito, como verificado por TEM e pela fórmula de Scherrer;
- o uso de uréia como combustível com razão estequiométrica 2,0 levou à obtenção de partículas com maior área superficial e menor tamanho de partícula e de cristalito do que a glicina.
- elegeu-se a uréia como combustível e a razão estequiométrica de 2,0 para serem utilizadas nas etapas seguintes deste trabalho.

Utilizou-se o pó de α -fosfato tricálcico elegido para a confecção de corpos densos de cimento de fosfato de cálcio, sendo este processado.

Com relação ao tempo de moagem do pó de α -fosfato tricálcico pecebeu-se que:

- tempos crescentes de moagem até 180 minutos resultam em menores tamanhos de partícula e de cristalito, como verificado pelas técnicas de difração à laser e XRD, respectivamente;
- quanto maior o tempo de moagem, menor o tempo de pega inicial e final dos cimentos de fosfato de cálcio obtidos através da reação do α -TCP com uma solução aquosa contendo 2,5% de hidrogeno fosfato de sódio, sendo que para o tempo de moagem de 180 minutos o tempo de pega inicial foi de 23 minutos;
- os corpos de prova confeccionados com pós de fosfato de cálcio com tempo de moagem de 180 minutos apresentaram menores valores de porosidade aparente e absorção de água, e também maior porosidade do que as amostras sintetizadas com os outros tempos de moagem;
- para o tempo de moagem de 180 minutos apresentaram resistência mecânica de $30,4 \pm 9,0$ MPa,

Para os ensaios *in vitro* em solução de plasma sanguíneo simulado, elegeram-se o tempo de moagem de 180 minutos por ele ter apresentado melhores valores de porosidade, densidade e resistência mecânica. A partir deste ensaio verificou-se que:

- pôde-se observar uma considerável diminuição da quantidade de precipitados em forma de agulhas de HA na superfície externa do cimento, para 24h de imersão em SBF com relação ao cimento após 24 horas de cura;
- com o aumento do tempo de imersão em SBF observou-se um aumento na quantidade de agulhas precipitadas de HA, até após uma semana quando ocorre a formação de uma camada homogênea de HA;
- a taxa de conversão do α -TCP obtido via síntese de combustão em solução é mais rápida do que a dos cimentos convencionais, de maneira que após 24 horas de imersão quase todo o α -TCP já estava convertido em hidroxiapatita;
- após a imersão dos cimentos em SBF ocorre um aumento na porosidade e uma diminuição nas propriedades mecânicas, de maneira que após 4 semanas de imersão a resistência mecânica ficou ao redor de 23MPa;
- durante a imersão em SBF, o pH se manteve na faixa entre 7,3 e 7,7, valores dentro do intervalo citotóxico (6,5 – 8,5)
- o ensaio de citotoxicidade pelo método de difusão em Agar mostra que o α -TCP obtido via síntese de combustão não apresentou nenhum tipo de efeito citotóxico para a linhagem de células NCTC Clone 929;

Após a síntese por combustão e análise das propriedades físico-químicas, mecânicas e citotóxicas dos pós de alfa fosfato tricálcico, seguiu-se para a confecção dos arcabouços poliméricos adicionados com o α -TCP.

Na primeira etapa, elegeram-se o melhor comonômero (Ácido Acrílico ou Ácido Metacrílico) e agente entrecruzante (TEGMA ou MBAM) e o método de extração de gelo, e verificou-se que:

- nem o comonômero, nem o agente entrecruzante alteraram significativamente a estrutura química dos criogéis sintetizados, informação extraída a partir das análises de FTIR e C^{13} -RMN;
- o método de extração do gelo afetou fortemente a densidade e porosidade dos criogéis sintetizados, sendo que as amostras cujo gelo foi extraído por liofilização obtiveram menor densidade e maior porosidade atingindo valores

de até 43% para a composição contendo AA como comonomero e MBAM como agente entrecruzante;

- já as amostras cujo gelo foi extraído por derretimento apresentou valores de porosidade na faixa entre 9,4 e 21%;
- as amostras cujo gelo foi extraído por liofilização apresentaram maior tamanho médio de poros, além de apresentar uma distribuição de tamanho de poros mais larga;
- a amostra com maior tamanho de poros (198 μ m) foi composta de MA e TEGMA e teve o gelo extraído pelo processo de liofilização;
- os homopolímeros de DMAEMA (amostras DT e DM) apresentaram os menores valores de porosidade e tamanho de poros, o que indica que a presença do comonômero é importante para a fabricação dos criogéis;
- a porosidade não apresentou efeito significativo nos valores do quociente de equilíbrio de inchamento (ESR);
- a adição do comonômero na composição dos criogéis aumentou significativamente o valor do quociente de equilíbrio no inchamento (ESR) dos polímeros da faixa entre 4 e 6, para a faixa entre 8 e 11.

Ao sistema HEMA/DMAEMA se adicionou 5% de α -TCP sintetizado via síntese de combustão em solução. E com relação a este sistema pudemos observar que:

- Foram sintetizados criogéis altamente porosos com potencial de aplicação em engenharia de tecidos;
- TEGMA foi eleito como agente entrecruzante por ter levado a resultados um pouco melhores que o MBAM;
- a incorporação do α -TCP ao sistema polimérico se deu com sucesso com a ajuda da adição de gelatina para aumentar a viscosidade da solução monomérica diluída;
- a técnica de EDS permitiu comprovar a incorporação do α -TCP à matriz polimérica;
- Poros de até 1 mm e porosidade de 75% foram observados nas amostras com razão monomérica de 25%HEMA + TCP
- a adição de gelatina e TCP foram fatores importantes para o aumento da porosidade, visto que a gelatina incorporada serviu como agente porogênico;

- As amostras com maior teor de DMAEMA incharam mais do que as com maior teor de HEMA, sendo que as amostras 25%HEMA atingiram um ESR de aproximadamente 6;
- o quociente de equilíbrio de inchamento (ESR) foi afetado apenas pela composição dos monômeros, não sendo afetado pela adição da gelatina ou do fosfato de cálcio;
- as composições contendo maiores teores de DMAEMA (25%HEMA) apresentaram maiores valores de peso molecular entre ligações entrecruzadas e maior tamanho de rede; por outro lado apresentaram menores valores de densidade de ligações entrecruzadas e de módulo de elasticidades;
- maiores teores de DMAEMA e a adição da fase cerâmica resultaram em criogéis com comportamentos de degradação mais rápidos em PBS, sendo que as amostras perderam completamente sua integridade mecânica após 1 semana de imersão;
- a adição de DMAEMA, um monômero sensível ao pH, mesmo que em pequenas quantidades conferiu ao criogel essa propriedade;
- em pHs ácidos (pH 2,0) os criogéis de composição 25%HEMA incharam a um ESR ao redor de 16, enquanto que em pHs básicos (pH 10,0) esse valor se situou ao redor de 5;
- o módulo de elasticidade medido por meio de reologia foram entre 10 e 50 vezes menores do que os calculados através das equações que relacionavam esta propriedade com o peso molecular entre ligações entrecruzadas, fato que pode ser explicado pela alta porosidade do sistema;

Os ensaios de viabilidade e proliferação celular permitiram prever o comportamento preliminar da relação dos criogéis do sistema HEMA/DMAEMA com as células tronco mesenquimais e osteoblastos. A partir destes ensaios verificou-se que:

- Os criogéis testados são biocompatíveis e osteoindutores, permitiram a adesão e a proliferação de osteoblastos e de células tronco mesenquimais, as quais expressaram os marcadores bioquímicos correspondentes ao fenótipo osteogênico.
- A presença de colágeno do tipo I e de fosfatase alcalina são bons indicativos do potencial destes materiais para o seu uso como biomaterial;

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar mais profundamente a síntese do α -TCP via combustão visando obter esta fase em apenas uma etapa;
- Estudar a influência de maiores tempos de moagem nas propriedades dos cimentos de fosfatos de cálcio;
- Estudar as características eletroquímicas das cerâmicas obtidas;
- Analisar métodos de carregamento de fármacos dos criogéis do sistema HEMA/DMAEMA contendo maiores teores de DMAEMA para testá-los como sistema para liberação controlada de drogas em implantes de engenharia de tecidos ósseos;
- Estudar influência da carga cerâmica na capacidade de liberação controlada de fármacos dos criogéis sintetizados;
- Aprofundar os estudos com células tronco mesenquimais para verificar o real potencial em engenharia de tecidos dos criogéis sintetizados neste trabalho;
- Realizar testes *in vivo* em animais com os arcabouços sintetizados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, G. Métodos de Caracterización de Biomateriales. In: SASTRE, R.; de AZA, S.; SAN ROMÁN, J. **Biomateriales**. Faenza, Italia: CYTED, Faenza Editrice Iberica, 2004.

AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. 1.ed. Tokyo: JAAS, 1991.

ARUNA, S. T.; PATIL, K. C. Combustion synthesis and properties of nanostructured ceria-zirconia solid solutions. **Nanostructured Materials**, n.10, p. 955-964, 1998.

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; LOZINSKY, V.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of chromatography A**, n. 986, p. 275-290, 2003.

ASTM C – 20. **Standard test methods for apparent porosity, water absorption, apparent specific gravity, and bulk density of burned refractory brick and shapes by boiling water**, 2010.

ASTM C266 – 89. **Standard test method for time of setting of hydraulic. Cement Paste** by Gillmore Needles, 1989.

ASTM F895 – 84. **Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity**, 2006.

BAJPAI, A. K.; SAINI, R. Preparation and characterization of biocompatible spongy cryogels of poly(vinyl alcohol)-gelatin and study of water sorption behaviour. **Polymer International**, n. 54, p. 1233-1242, 2005.

BARAN, E. J. The infrared spectrum of α -(NH₄)₂(VO)₃(P₂O₇)₂. **Journal of Material Science Letters**, n.18, p. 1779-1780, 1999.

BEN-NISSAN, B. Natural bioceramics: from coral to bone and beyond. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v.7, p.283-288, 2003.

BERMÚDEZ, O.; BOLTONG, M. G.; DRIESSENS; F. C. M.; PLANELL, J. A. Development of some calcium phosphate cements from combinations of alfa-TCP, MCPM e CaO. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n. 5, p. 160-163, 1994.

BIAN, J.; KIM, D. W.; HONG, K. S. Microwave dielectric properties of $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. **Journal of the European Ceramic Society**, n. 23, p. 2589-2592, 2003.

BOELGEN, N.; PLIEVA, F.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B.; PISKIN, E. Cryogelation for preparation of novel biodegradable tissue-engineering scaffolds. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, n. 18, p. 1165-1179, 2007.

BOHNER, M. Reactivity of calcium phosphate cements. **Journal of Materials Chemistry**, n. 38, p.3980-3986, 2007.

BOHNER, M.; BRUNNER, T. J.; STARK, W. J. Controlling the reactivity of calcium phosphate cements. **Journal of Materials Chemistry**, n. 18, p. 5669-5675, 2008.

BOHNER, M.; GBURECK, U.; BARRALET, J. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. **Biomaterials**, n. 26, p. 6423-6429, 2005.

BOYER, C.; BOUTEVIN, G.; ROBIN, J. J.; BOUTEVIN, B. Study of the telomerization of dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) with mercaptoethanol. Application to the synthesis of a new macromonomer. **Polymer**, n. 45, p. 7863-7876, 2004.

BRAHIM, S; NARINESINGH, D.; GUISEPPI-ELIE, A. Release Characteristics of Novel pH-sensitive p(HEMA-DMAEMA) Hydrogels Containing 3-(Trimethoxysilyl) propylMethacrylate. **Biomacromolecules**, n. 4, p. 1224-1231, 2003b.

BRAHIM, S; NARINESINGH, D.; GUISEPPI-ELIE, A. Synthesis and Hydration Properties of pH-Sensitive p(HEMA)-Based Hydrogels Containing 3-(Trimethoxysilyl) propyl Methacrylate. **Biomacromolecules**, n. 4, p. 497-503, 2003a.

CAMIRÉ, C. L.; GBURECKB, U.; HIRSIGERC, W.; BOHNER, M. Correlating crystallinity and reactivity in an a-tricalcium phosphate. **Biomaterials**, n. 26, p. 2787-2794, 2005.

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 341-7, 2007.

CARDENAS, L. J.; TAKEUCHI, A.; MATSUYA S.; ISHIKAWA, K. Effects of tricalcium silicate addition on basic properties of α -tricalcium phosphate cement. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, n. 116, p. 83-87, 2008.

CARTER, C.; NORTON, M. **Ceramic Materials: Science and Engineering**. New York, NY: Springer Science+Business Media, LLC, 2007.

CHENA, Z.; YANC, Y.; LIUB, J. Microwave induced solution combustion synthesis of nano-sized phosphors. **Journal of Alloys and Compounds**, in press, 2008.

CHENG, Z.; ZHU, X.; SHI, L.; NEOH, K. G.; KANG, E. T. Polymer microspheres with permanent antibacterial surface from surface-initiated atom transfer radical polymerization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, n. 44, p. 7098-7104, 2005.

CHO, S.; NAKANISHI, K.; KOKUBO, T.; SOGA, N.; OHTSUKI, C.; NAKAMURA, T. Dependence of apatite formation on silica gel on its structure: effect of heat treatment. **Journal of American Ceramic Society**, n. 78, p. 1769-1974, 1995.

CHOW, L. C.; MARKOVIC, M.; TAKAGI, S.; CHERNG, M. Injectable calcium phosphate cements: effects of cement liquid on the physical properties of the cement. **Innov Tech Med**, n. 18, p. 11-14, 1998.

COSTA, A., SILVA, V. J., XIN, C. C., VIEIRA, D. A., CORNEJO, D. R., KIMINAMI, R. H. Effect of urea and glycine fuels on the combustion reaction synthesis of Mn-Zn ferrites: Evaluation of morphology and magnetic properties **Journal of Alloys and Compounds**, n. 495, p. 503-505, 2010.

DAINIYAK, M.; IAIN, U.; ALLAN, B.; SAVINA, I. N.; CORNELIO, L.; JAMES, E. S.; JAMES, S. L.; MIKHALOVSKY, S. V.; JUNGVID, H.; GALAEV, I. Y. Gelatin-fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: preparation, optimisation and in vitro study. **Biomaterials**, n. 31, p. 67-76, 2010.

De AZA, S. Biocerámicas. In: SASTRE, R.; de AZA, S.; SAN ROMÁN, J. **Biomateriales**. Faenza, Italia: CYTED, Faenza Editrice Iberica, 2004. p. 41-64.

DEAN, J. A. **Lange's handbook of chemistry**. 12th.edn. New York: McGraw-Hill, 1979.

DENG, L.; ZHAI, Y.; GUO, S.; JIN, F.; XIE, Z.; HE, Z.; DONG, A. Investigation on properties of P((MAA-co-DMAEMA)-g-EG) polyampholyte nanogels. **Journal of Nanoparticle Research**, n. 11, p. 365-374, 2009.

DESENTAINVILLE, A.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D.; LABORDE, E. Synthesis, characterization and thermal behaviour of apatitic tricalcium phosphate. **Materials Chemistry and Physics**, n. 80, p. 269-277, 2003.

DOROZHKIN, S. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid Biomaterials. **Journal of Materials Science**, n. 44, p. 2343-2387, 2009.

DOROZHKIN, S. Calcium orthophosphates. **Journal of Materials Science**, n. 42, p. 1061–1095, 2007.

DRIESSENS, F. C. M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. **Anales de Química Internacional Edition**, v. 93, p. S38 - S43, 1997.

DUBOEUF, F.; BASARAB, A.; LIEBGOTT, H.; BRUSSEAU, E.; DELACHARTRE, P.; VRAY, D. Investigation of PVA cryogel Young's modulus stability with time, controlled by a simple reliable technique. **Medical Physics**, v. 36, n. 2, p. 656- 661, 2009.

EL FRAY, M.; PILASZKIEWICZ, A.; SWIESZKOWSKI, W.; KURZYDŁOWSKI, K.; Morphology assessment of chemically modified and cryostructured poly(vinyl alcohol) hydrogel. **European Polymer Journal**, n. 43, p. 2035–2040, 2007.

FERREIRA, A.; OLIVEIRA, C.; ROCHA, F. The different phases in the precipitation of dicalcium phosphate dehydrate. **Journal of Crystal Growth**, n. 252, p. 599-611, 2003.

FILGUEIRAS, M. R.; TORRES, G. L.; HENCHE, L. L. Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. **Journal Biomedicine Materials Research**, v. 27, p. 445-453, 1993.

FUMO D. A.; MORELLI M. R.; SEGADÃES, A. M. Combustion synthesis of calcium aluminates. **Materials Research Bulletin**, n. 31, p. 1243-1255, 1996.

GARLAND, M.; SINGH, T.; WOOLFSON, A.; DONNELLY, R. Electrically enhanced solute permeation across poly(ethylene glycol)–crosslinked poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid) hydrogels: Effect of hydrogel crosslink density and ionic conductivity. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 406, p. 91–98, 2011.

GBURECK, U.; BARRALET, J. E. Amorphous α -tricalcium phosphate: Preparation and aqueous setting reaction. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 87, n. 6, p.1126-1132, 2004.

GIL, J. Biometales. In: SASTRE, R.; de AZA, S.; SAN ROMÁN, J. **Biomateriales**. Faenza, Italia: CYTED, Faenza Editrice Iberica, 2004. p. 27-40.

GINEBRA, M. P.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement, a kinetic analysis. **Biomaterials**, n. 25, p. 3453-3462, 2004.

GINEBRA, M. P.; FERNÁNDEZ, E.; DRIESSENS, F. C. M.; BOLTONG, M. G.; MUNTASELL, J.; FONT, J.; PLANELL, J. A. The effects of temperature on the behaviour of an apatitic calcium phosphate cement. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n. 6, p. 857-860, 1995.

GINEBRA, M. P.; TRAYKOVA, T.; PLANELL, J. A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. **Journal of Controlled Release**, n. 113, p.102-110, 2006.

GROOT, K. D. Ceramics based on calcium phosphates. In: International Symposium on Bioceramics, Lignano Sabbiadoro, 7, 1983. **Proceedings Ceramics in Surgery**: Itália, 1983.

GRUNINGER, S. E.; SIEW, C.; CHOW, L. C.; O'YOUNG, A.; TSAO, N. K.; BROWN, W. E. Evaluation of biocompatibility of a new calcium-phosphate setting cement. **Journal of Dentistry Research**, v. 63, p. 200-210, 1984.

GUAN, J.; GAO, C.; FENG, L.; SHEN, J. Surface modification of polyurethane for promotion of cell adhesion and growth 1: surface photo-grafting with N,N-dimethylaminoethyl methacrylate and cytocompatibility of the modified surface. **Journal of Materials Science**, n.5, p. 447-52, 2000.

GÜRDAG, G.; ÇAVUS, S. Synthesis and swelling behaviour of poly(2-dimethylaminorthyl methacrylate-co-hydroxymethyl acrylamide) hydrogels. **Polymers for Advanced Technologies**, n.17, p. 878-883, 2006.

HAN, Y.; LI, S.; WANG, X.; CHEN, X. Synthesis and sintering of nanocrystalline hydroxyapatite powders by citric acid sol-gel combustion method. **Materials Research Bulletin**, v. 39, n. 1, 25-32, 2004.

HE, X.; YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J. Freezing characteristics of acrylamide-based solution used for the preparation of supermacroporous cryogels via cryo-polymerization. **Chemical Engineering Science**, n. 62, p. 1334-1342, 2007.

HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of American Ceramic Society**, v. 81, n. 7, p. 1705, 1999.

HENCH, L. L.; SPLINTER, R. J.; ALLEN, W. C.; GREENLEE, T. K. Bonding mechanisms at the interface of ceramics prothetic materials. **Journal Biomedicine Materials Research**, v. 2, p. 117-141, 1972.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. Singapore: World Scientific Publish Co. Ptde. Ltd., 1999.

HUTMACHER, D. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, n. 21, p. 2529 - 2543, 2000.

ISHIKAWA, H.; OOHIRA, K.; NAKAJIMA, T.; AKIYAMA, T. Combustion synthesis of SrTiO₃ using different raw materials. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 454, n. 1-2, p. 384-388, 2008.

ISO 10993.5 – 2009. **Biological evaluation of medical devices**. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009.

IVANOV, R.; LOZINSKY, V. Cryopolymerization of Acrylamide: effect of thermal prehistory of a moderately frozen reaction system. **Polymer Science Series A**, v. 48, n. 12, pp. 2092- 2101, 2006.

JAIN, E.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, A. Macroporous interpenetrating cryogel network of poly(acrylonitrile) and gelatin for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n. 20, p. S173–S179, 2009.

JAIN, S. R.; ADGO, K. C.; PAIVERNEKER V. R. A new approach to thermochemical calculations of condensed fuel-oxidizer mixtures. **Combustion and Flame**, n. 40, p.71-79, 1981.

JANSEN, J. A.; DE RUJITER, J. E.; SCHAEKEN, H. G.; VAN DER WAERDEN, J. P. C. M.; PLANELL, J. A.; DRIESSENS, F. C. M. Evaluation of tricalcium phosphate/hidroxyapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n. 6, p. 653-657, 1995.

KAWACHI, E. Y. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, São Paulo, v.3, n.4, p.518-522, 2000.

KIM, H. M.; HIMENO, T.; KAWASHITA, M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 1, p. 17-22, 2004.

KIM, H. M.; HIMENO, T.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Process and kinetics of bonelike apatite formation in a simulated body fluid. **Biomaterials**, v. 26, p. 4366-4373, 2005.

KINGSLEY, J. J.; PEDERSON, L. R. Energetic materials in ceramics synthesis. **J. Mat. Res. Soc. Symp. Proc.**, n. 296, p. 361-366, 1993.

KIRSEBOM, H.; RATA, G.; TOPGAARD, D.; et al. In situ H-1 NMR studies of free radical cryopolymerization. **Polymer**, n. 49, p. 3855-3858, 2008.

KIRSEBOM, H.; RATA, G.; TOPGAARD, D.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Mechanism of Cryopolymerization: Diffusion-Controlled Polymerization in a Nonfrozen Microphase. An NMR Study. **Macromolecules**, n. 42, p. 5208-5214, 2009.

KITSUGI, T.; NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T.; KOKUBO, T.; SHIBUYA, T.; TAKAGI, M. SEM-EPMA observation of tree types types of apatite-contagining glass ceramics implanted in bone: the variance of a Ca, P-rich layer. **Journal Biomedicine Materials Research**, v. 21, p. 1255-1271, 1987.

KITSUGI, T.; YAMAMURO, T.; NAKAMURA, T.; KOKUBO, T. The bonding of glass ceramics to bone. **International Orthopaedics**, v. 13, p. 199-206, 1989.

KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. **Biomaterials**, v. 12, p. 1255-1271, 1991.

KOKUBO, T.; ITO, S.; HUANG, T.; HAYASHI, T.; SAKKA, S.; KITSUGI, T. et al. Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 24, p. 331-343, 1990.

KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; EBISAWA, Y.; KITSUGI, T.; KOTANI, S.; OURA, K. et al. Apatite formation on bioactive ceramics in body environment. In: OONISHI, H.; AOKI, H.; SAWAI, K. (Eds.) **Bioceramics**. Tokyo: Ishiyaku EuroAmerica, 1988. p. 157-162.

KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; KOTANI, S.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. **Journal Biomedicine Materials Research**, v. 24, p. 721-734, 1990.

KOKUBO, T.; OHTSUKI, C.; KOTANI, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Surface structure of bioactive glass ceramics A-W implanted into sheep and human vertebra. In: Heimke, G. (Ed.). **Bioceramics**. Cologne: German Ceramics Society, 1990. v.2, p. 113-121.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, p. 2907-2915, 2006.

KROUPOVA, J.; HORAK, D.; PACHERNIK, J.; DVORAK, P.; SLOUF, M. Functional polymer hydrogels for embryonic stem cell support, **Journal of Biomedical Materials Research: Part B – Applied Biomaterials**, v. 76B, n. 2, p. 315-325, 2006.

KUESENG, P.; THAMMAKHET, C.; THAVARUNGKUL, P.; KANATHARANA, P. Multiwalled carbon nanotubes/cryogel composite, a new sorbent for determination of trace polycyclic aromatic hydrocarbons. **Microchemical Journal**, n. 96, p. 317–323, 2010.

KUMAR, A.; BANSAL, V.; NANDAKUMAR, K. S.; GALAEV, I.; ROYCHOUNDHURY, P. K.; HOLMDAHL, R.; MATTIASSON, B. Integrated Bioprocess for the production and isolation of urokinase from animal cell culture using supermacroporous cryogels. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 93, p. 636-646, 2006.

KUMAR, M.; SINGH, S.; SHAHI, V. K. Cross-Linked Poly(vinyl alcohol)-Poly(acrylonitrile-co-2-dimethylamino ethylmethacrylate) Based Anion-Exchange Membranes in Aqueous Media. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 1, p. 198-206, 2010.

LE GEROS, R. Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. **Monographs in Oral Sciences**. Nova York: Basel, 1991. v.15.

LE NOIR, M.; PLIEVA, F.; F.; HEY, T.; GUIEYSSE, B.; MATTIASSON, B.; J. Macroporous molecularly imprinted polymer/cryogel composite systems for the removal of endocrine disrupting trace contaminants. **The Journal of Chromatography**, v. 1154, p. 158-164, 2007.

LENKA, R. K.; MAHATA, T.; SINHA, P. K.; TYAGI, A. K. Combustion synthesis of gadolinia-doped ceria using glycine and urea fuels. **Journal of Alloys and Compounds**, n. 466, p. 326–329, 2008.

LEON, B.; JANSEN, J. **Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants**. New York, London: Springer, 2009.

LIMA, M. D.; BONADIMANN, R.; DE ANDRADE, M. J.; TONIOLO, J. C.; BERGMANN, C. P. Nanocrystalline Cr₂O₃ and amorphous CrO₃ produced by solution combustion synthesis. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 26, p. 1213–1220, 2006.

LIN, C.; METTERS, A. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 58, p. 1379–1408, 2006.

LOZINSKI, V. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 71, n. 6, p. 489-511, 2002.

MEHTA, P. K.; MONTEIRO, P. M. **Concreto: estrutura, propriedades e materiais**. São Paulo: Pini. Brasil, 1994.

MIÑO-FARIÑA, N.; MUÑOZ-GUZÓN, F. Quantitative Analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle. **The Veterinary Journal**, n. 179, p. 264–272, 2009.

MIYAMOTO, Y.; ISHIKAWA, K.; FUKAO, H.; SAWADA, M.; NAGAYAMA, M.; KON, M.; ASAOKA, K. In vivo setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement. **Biomaterials**, n. 16, p. 855-660, 1995.

MUÑOZ-BONILLA, A.; FÉRNANDEZ-GARCIA, M.; HADDLETON, D. Synthesis and aqueous solution properties of stimuli-responsive triblock copolymers. **Soft Mater**, n. 3, p. 725-731, 2007.

NEVILLE, A. M. **Propriedades do Concreto**. São Paulo: Pini. Brasil, 1997.

ODA, M.; TAKEUCHI, A.; LIN, X.; MATSUYA, S.; ISHIKAWA, K. Effects of liquid phase on basic properties of α -tricalcium phosphate-based apatite cement. **Dental Materials Journal**, v. 27, n. 5, p. 672-677, 2008.

OGINO, M.; OHUCHI, F.; HENCH, L. L. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. **Journal Biomedicine Materials Research**, v. 14, p. 55-64, 1980.

OHTSUKI, C.; AOKI, Y.; KOKUBO, T.; BANDO, Y.; NEO, M.; NAKAMURA, T. Transmission electron microscopic observation of glass-ceramic A-W and apatite layer formed on its surface in a simulated body fluid. **Journal Ceramics Society Japan**, v. 103, p. 449-454, 1995.

OHTSUKI, C.; KUSHITANI, H.; KOKUBO, T.; KOTANI, S.; YAMAMURO, T. Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body. **Journal of Biomedicine Materials Research**, v. 25, p. 1363-1370, 1991.

OOMS, E. M.; EGGLEZOS, E. A.; WOLKE, J. G.; JANSEN, J. A. Soft-tissue response to injectable calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v. 24, p. 749-757, 2003.

OTSUKA, M.; MATSUDA, Y.; SUWA, Y.; FOX, J. L.; HIGUCHI, W.I. Effect of particle size of metastable calcium phosphates on mechanical strength of a novel self-setting bioactive calcium phosphate cement. **The Journal of Biomedical Materials Research**, n. 29, p. 25-32, 1995.

OYANE, A.; KIM, H. M.; FURUYA, T.; KOKUBO, T.; MIYAZAKI, T.; NAKAMURA, T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. **The Journal of Biomedical Materials Research**, v. 65A, p. 188-195, 2003.

PATIL, K. C.; HEGDE, M. S.; RATTAN, T.; ARUNA, S. T. **Chemistry of nanocrystalline oxide materials** - combustion synthesis, properties and applications. New Jersey: World Scientific, 2008.

PENICHE, C.; COHEN, M. E; VÁSQUEZ, B.; SAN ROMÁN, J. Water sorption of flexible networks based on 2-hydroxyethyl methacrylate – triethylenglycol dimethacrylate copolymers. **Polymer**, v. 38, n. 24, p. 5977-5982, 1997.

PEPPAS, L.; PEPPAS, N. Equilibrium swelling behaviour of dilute ionic hydrogels in electrolytic solutions. **Journal of Controlled Release**, n. 16, p. 319-330, 1991.

PEPPAS, N. Hydrogels. In: RATNER, B.; HOFFMAN, A.; SCHOEN, F.; LEMONS, J. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004.

PEREZ, P.; PLIEVA, F., GALLARDO, A., SAN ROMAN, J., AGUILAR, M. R., MORFIN, I., EHRBURGER-DOLLE, F., BLEY, F., MIKHALOVSKY, S., GALAEV, I. Y., MATTIASSON, B. Bioresorbable and nonresorbable macroporous thermosensitive hydrogels prepared by cryopolymerization. Role of the cross-linking agent. **Biomacromolecules**, n. 9, p. 66–74, 2008.

PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. **Chemical engineers handbook**. 5th.ed. New York: McGraw-Hill, 1973.

PETRUCCI, E. G. R. **Concreto de cimento Portland**. 11.ed. Rio de Janeiro. Globo Pini, 1987.

PLIEVA, F.; ANDERSON, J.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, n. 27, p. 828-836, 2004.

POSNER, A.S.; BETTS, F.; BLUMENTHAL, N.C.; Formation and structure of synthetic and bone hydroxyapatite. **Progr. Cryst. Growth Char.**, n. 3, p. 49-64, 1980.

PRATI HAR, S.; GARG, M.; MEHRA, S.; BHATTACHARYYA, M. Phase evolution and sintering kinetics of hydroxyapatite synthesized by solution combustion technique. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n. 17, p. 501–507, 2006.

PUROHIT, R. D.; SHARMA, B. P.; PILLAI, K.T.; TYAGI, A. K. Ultra-fine ceria powders via glycine-nitrate combustion. **Materials Research Bulletin**, n. 36, p. 2711-2721, 2001.

RATNER, B.; HOFFMAN, A.; SCHOEN, F.; LEMONS, J. **Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004.

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D.; THOMAS. P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. **Biomaterials**, n. 23, p. 1065–1072, 2002.

ROY, D.; GUTHRIE, J. T.; PERRIER, S. Synthesis of natural-synthetic hybrid materials from cellulose via the RAFT process. **Soft Matter**, n. 4, p. 145-155, 2008.

ROZENBERG, B. Unusual case of network polymer formation in anionic polymerization of monofunctional vinyl monomer. **Polymer Bulletin**, n. 58, p. 127-138, 2007.

ROZIAK, J. M.; JANIK, I.; KADLUBOWSKI, S.; KOZICKI, M.; KUJAWA, P.; STASICA, P.; ULANSKI, P. **Radiation formation of hydrogels for biomedical applications.**, 1999.

RUSSELL, J. B. **Química Geral**. Tradução D. L. Sanioto et al. São Paulo: McGraw Hill, 1981.

SAN ROMÁN, J. et al. Polímeros Biodegradables. In: SASTRE, R.; de AZA, S.; SAN ROMÁN, J. **Biomateriales**. Faenza, Italia: CYTED, Faenza Editrice Iberica, 2004. p. 219-238.

SANJUAN, S.; TRAN, Y. Synthesis of random polyampholyte brushes by atom transfer radical polymerization. **Journal of polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, n. 10, p. 4305- 4319, 2008.

SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**. 2002. 247p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, SP, 2002.

SANTOS, L. A.; CARRODÉGUAS, R. G.; ROGERO, S. O.; BOSCHI, A. O.; ARRUDA, A. Dual-Setting calcium phosphate cement modified with ammonium polyacrylate, **Artificial Organs** n. 27, p. 412-418, 2005.

SASIKUMAR, S.; VIJAYARAGHAVAN, R. Solution combustion synthesis of bioceramic calcium phosphates by single and mixed fuels: a comparative study. **Ceramics International**, n. 34, p. 1373-1379, 2008.

SAVINA, I. N.; DAINIAK, M.; JUNGVID, H.; MIKHALOVSKY, S. V.; GALAEV, I. Y. Biomimetic macroporous hydrogels: protein ligand distribution and cell response to the ligand architecture in the scaffold. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 20, n. 12, p. 1781-1795, 2009.

SAVINA, I. N.; DAINIAK, M.; JUNGVID, H.; MIKHALOVSKY, S.; GALAEV, I. Biomimetic macroporous hydrogels: protein ligand distribution and cell response to the ligand architecture in the scaffold. **Journal of Biomaterials Science**, p. 1791-1795, 2000.

SAVINA, I.; CNUUDE, V.; D'HOLLANDER, S.; Van HOOREBEKE, L.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y.; PREZ, F. D. C. Cryogel applications in microbiology. **Soft Matter**, n. 3, p. 1176-1184, 2007.

SCHAEBER, P. M.; COLSON, J.; HIGGINS, S.; THIELEN, D.; ANSPACH, B.; BRAUER, J. Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. **Thermochemica Acta**, n. 424, p. 131-137, 2004.

SELL, S. Stem cells. In: SELL, S. (Ed.). **Stem Cell Handbook**. New Jersey: Humana Press, 2004. p. 1-18.

SEPÚLVEDA, P.; PANDOLFELLI, V. C.; ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; BRESSIANI, J. C. Hidroxiapatita porosa produzida através do *gelcasting* de espumas visando aplicações biomédicas. **Cerâmica**, São Paulo, v. 45, n. 296, p. 198-202, 1999.

SOUSA V. C.; MORELLI, M. R.; KIMINAMI, R. H. G. A. Combustion processes in the synthesis of ZnO – Bi₂O₃. **Ceramics International**, v. 26, p. 561-564, 2000.

SOUSA, V. C.; CASTRO, M. S.; MORELLI, KIMINAMI, R. H. G. A. Electrical properties of the ZnO varistors synthesized by combustion process. **Journal of Materials Science. Materials in Electronics**, v. 13, p. 299- 305, 2002.

SOUSA, V. C.; SEGADÃES, A. M.; MORELLI, M. R.; KIMINAMI, R. H. G. A. Combustion Synthesized ZnO powders for varistor ceramics. **International Journal of Inorganic Materials**, v. 1, n. 3/4, p. 235-241, 1999.

STEPAN J.; POSPICHAL, J.; PRESL, J.; PACOVSKÝ, V. Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. **Bone**, v. 8, n. 5, p. 279-284, 1987.

SUI, X.; YUAN J.; ZHOU, M.; ZHANG, J. Synthesis of cellulose-graft-PolyN,Ndimethylamino-2-ethyl methacrylate) copolymers via homogeneous ATRP and their aggregates in aqueous media. **Biomacromolecules**, n. 9, p. 2615-2620, 2008.

TAKADAMA, H.; HASHIMOTO, M.; MIZUNO, M.; KOKUBO, T. Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. **Phosphorus Research Bulletin**, v. 17, p. 119-125, 2004.

TAS, A. C. Combustion synthesis of calcium phosphate bioceramic powders. **Journal of the European Ceramic Society**, n. 20, p. 2389-2394, 2000.

TOMIC, S.; MICIC, M.; DOBIC, S.; FILIPOVIC, J.; SULJOVRUJIC, E. Smart poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) hydrogels for biomedical application. **Radiation Physics and Chemistry**, n. 79, p. 643-649, 2010.

TOMME, S.; VAN NOSTRUM, C. F.; DIJKSTRA, M.; DE SMEDT, S. C. Effect of particle size and chare on the network properties of microsphere-based hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 70, p. 522-530, 2008.

TONIOLO, J. C. **Síntese de pós de alumina nanocristalina por combustão em solução**. 2004. 61p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) -

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2004.

TONIOLO, J. C.; BONADIMANN, R.; OLIVEIRA, L. L.; HOHEMBERGER, J. M.; BERGMANN, C. P. Synthesis of nanocrystalline nickel oxide powders via glycine–nitrate combustion. **Southern Brazilian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 53-61, 2005a.

TONIOLO, J. C.; LIMA, M. D.; TAKIMI, A. S.; BERGMANN, C. P. Synthesis of alumina powders by the glycine-nitrate combustion process. **Materials Research Bulletin**, n. 40, p. 561-571, 2005b.

TONIOLO, J. C.; TAKIMI, A. S.; DE ANDRADE, M. J.; BONADIMANN, R.; BERGMANN, C. P. Synthesis by the solution combustion process and magnetic properties of iron oxide (Fe_3O_4 and $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) particles. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 13, p. 4785-4791, 2007.

UZUN, C.; HASSNISABER, M.; SEN, M.; GÜVEN, O. Enhancement and control of cross-linking of dimethylaminoethyl methacrylate irradiated at low dose rate in the presence of ethylene glycol dimethacrylate. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, n. 208, p. 242-246, 2003.

VALLET-REGÍ, M.; RODRÍGUEZ-LORENZO, L. M.; SALINAS, A. J. Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite. **Solid State Ionics**, v. 101-103, p. 1279-1285, 1997.

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

VAN DE WETERING, P.; CHERNG, J. Y.; TALSMA, H.; CROMMELIN, D. J.; HENNINK, W. E. J. 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. **Controlled release**, n. 53, p.143-153, 1998.

WEI, J.; HEO, S.; KIM, D; KIM, S.; HYUN, T.; SHIN, J. W. Comparison of physical, chemical and cellular responses to nano- and micro-sized calcium silicate/poly (ϵ -caprolactone) biocompatible composites. **Journal of the Royal Society Interface**, n. 5, p. 617-630, 2008.

WEN, S.; STEVENSON, K. Synthetic pH sensitive polyampholyte hydrogels: a preliminary study. **Colloid & Polymer Science**, v. 271, n.1, p. 38-49, 1993.

- WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biocompatibility**. Amsterdam: CRC Press, 1987.
- WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, n. 30, p. 5897-5909, 2009.
- YAMADA, K.; GONDO, T.; HIRATA, M. J. Application of DMAEMA-grafted expanded PTFE films to positively charged ultrafiltration membranes and their electrostatic sieve separation properties. **Journal of Applied Polymer Science**, n. 81, p. 1595-1604, 2001.
- YANFENG, C.; MIN, Y. Swelling kinetics and stimulusresponsiveness of poly(DMAEMA) hydrogels prepared by UV-irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, n. 61, p. 65-68, 2001.
- YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of Polyacrylamide based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, n. 61, p. 6701-6708, 2006.
- YARIMKAYA, S.; BASAN, H.; Synthesis and swelling behaviour of acrylate-based hydrogels. **Journal of Macromolecular Science Part A: Pure and Applied Chemistry**, n. 44, p. 699-706, 2007.
- YILMAZ, F.; BERELI, N.; YAVUZ, H.; DENIZLI, A. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, n. 43, p. 272-279, 2009.
- YOU, J.; AUGUSTE, D. The effect of swelling and cationic character on gene transfection by pH-sensitive nanocarriers. **Biomaterials**, n. 31, p. 6859-6866, 2010.
- YU, L.; GU, L. Effects of microstructure, crosslinking density, temperature and exterior load on dynamic pH-response of hydrolyzed polyacrylonitrile-blend-gelatin hydrogel fibers. **European Polymer Journal**, n. 45, p. 1706-1715, 2009.
- YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F.; YAO, K. One-step isolation of adenosine triphosphate from crude fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by anion-exchange chromatography using supermacroporous cryogel. **Journal of Chromatography B**, n. 860, p. 57-62, 2007.
- ZHAI, M.; CHEN, Y.; YI, M.; HA, H., Swelling behaviour of a new kind of polyampholye hydrogel coposed of dimethylaminoethyl methacrylate and acrylic acid. **Polymer International**, n. 53, p. 33-36, 2004.

ZHOU, Y.; YANG, D.; GAO, X, CHEN, X.; XU, C.; LU, F.; NIE, J. Semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on water-soluble N-carboxylethyl chitosan and photopolymerized poly (2-hydroxyethylmethacrylate). **Carbohydrate Polymers**, n.75, p. 293-298, 2009.

ANEXO I



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
NÚCLEO DE CULTURA DE CÉLULAS
Av. Dr. Arnaldo, 355 - São Paulo - SP - CEP: 01246-902
Fone/Fax: (11) 3068-2910
email cultcel@ial.sp.gov.br

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* (REATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO*) METODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

LINHAGEM CELULAR: NCTC Clone 929, células de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL-1) são semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas para formação da monocamada celular. O meio de cultura líquido é substituído pelo meio de cobertura sólido, que é composto de partes iguais de meio 2x concentrado e ágar com vermelho neutro. As amostras são colocadas sobre esse meio de cobertura e as placas novamente incubadas por 24 horas. Observa-se macro e microscopicamente o índice de zona (IZ) que é a área não corada pelo corante vital. As amostras são testadas em quadruplicatas em placas separadas.

IZ	DESCRIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
0	Nenhuma Zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
1	Alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca
2	Zona limitada sob a amostra	Leve
3	Zona entre 0,5- 1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona maior que 1,0 cm ao redor da amostra	Severa

Amostras sólidas: são colocadas diretamente sobre o meio de cobertura.

Amostras em pó: são colocadas dentro de 1 cilindro fixado sobre o meio de cobertura

Amostras líquidas: disco de papel de filtro atóxico são embebidos com a amostra e colocados sobre o meio de cobertura.

Amostras submetidas à extração: A relação da área de superfície do material e o volume do veículo de extração não deve ser maior que 6cm²/ml e menor do que 0,5cm²/ml. Quando a superfície da amostra for indeterminada pesar de 0,1 - 0,2g/ml. Os veículos de extração utilizados são: solução salina ou óleo de semente de algodão. As condições de extração recomendadas são 37°C-24hs, 50°C-72hs ou 70°C-24hs. Embeber o extrato em discos de papel de filtro e colocar sobre o meio de cobertura.

Controle positivo: fragmento de 0,5cm x 0,5cm de látex tóxico

Controle negativo: discos de papel de filtro atóxico com 0,5cm de diâmetro

Bibliografia: ASTM F895-84:1984-Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity
ISO 10993.5: 2009-Biological evaluation for medical devices Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods
US Pharmacopéia 32, 2009-Biological reactivity tests *in vitro*

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*
(REATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO*)

Requisitante: Laboratório de Biomateriais – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Endereço: Av. Bento Gonçalves, 9500 – Setor 4 - Prédio 74 – Sala 211 – Campos do Vale, Porto Alegre – RS.

A/C: Tiago Moreno Volkmer

Amostra Teste: 4711, livro teste XIII – pág. 138

Descrição da Amostra: Fosfato Tricálcico – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

ANÁLISE DE ORIENTAÇÃO: 3075.00/2010.

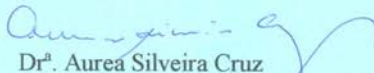
PROCESSO: 11731 (22/07/2010).

AMOSTRA	ÍNDICE DE ZONA OBTIDO APÓS A LEITURA DAS PLACAS DE CULTURAS CELULARES			
	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4
	IZ	IZ	IZ	IZ
Fosfato Tricálcico – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.	0	0	0	0
- Controle Negativo	0	0	0	0
- Controle Positivo	4	4	4	4

Estes resultados têm valor restrito à amostra analisada, sendo vedado seu uso para fins de propaganda

CONCLUSÃO: A amostra nº 4711 não apresentou efeito tóxico para a linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1).

São Paulo, 26 de julho de 2010


Drª. Aurea Silveira Cruz
Núcleo de Cultura de Células - IAL
CRBio00544/84