



**Universidade de  
Aveiro  
2003**

Departamento de Engenharia Cerâmica e do  
Vidro e Departamento de Química

**Paula Alexandrina  
de Aguiar Pereira  
Marques**

**Reacções de Superfície de Cerâmicos de Fosfato de  
Cálcio em Plasma Simulado**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Rui Nunes Correia, Professor Associado com Agregação no Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro e da Doutora Maria Clara Ferreira Magalhães, Professora Auxiliar no Departamento de Química, ambos da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

**Doutor António José Venâncio Ferrer Correia**  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Doutor Adélio Alcino Sampaio Castro Machado**  
Professor Catedrático da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**Doutor Fernando Jorge Monteiro**  
Professor Catedrático da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

**Doutora Maria Vallet-Regi**  
Professora Catedrática da Universidade Complutense de Madrid

**Doutor Rui Nunes Correia**  
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

**Doutor José Domingos da Silva Santos**  
Professor Associado da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

**Doutora Maria Clara Ferreira Magalhães**  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

**Doutor Francisco Manuel Lemos Amado**  
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutora Clara Magalhães e Professor Doutor Rui Correia, desejo agradecer todo o apoio e confiança prestados. Considero que tive o privilégio de trabalhar com duas pessoas de formação científica diferente, que se complementam nesta área de investigação interdisciplinar. Fica aqui expressa a minha amizade e o desejo de continuarmos a trabalhar juntos no futuro.

Desejo ainda agradecer às várias pessoas que me auxiliaram no decurso do trabalho experimental:

Na Universidade de Aveiro ,

- Engenheira Conceição pelos serviços de difracção de raios X;
- Doutor Augusto Luís pelo auxílio no SEM e pelas pertinentes discussões;
- Dr. Eugénio pelas análises químicas por ICP;

No INEB,

- Dr<sup>a</sup>. Cristina Ribeiro e Eng. Manuela Brás que me ensinaram e auxiliaram a operar com o FTIR.
- Doutora Maria José Shuller, Doutora Meriem Lamghari e Engenheira Susana Carrilho, pela ajuda nos ensaios de cultura celular e na interpretação dos resultados obtidos.

Na Universidade Complutense de Madrid,

- Doutores Maria Vallet, Antonio Salinas e Victoria, e todos os restantes membros do departamento de Química Inorgânica, que me ajudaram durante a minha estadia nessa Universidade para realizar sínteses de hidroxiapatite.

A todos e todas as colegas dos departamentos de Eng Cerâmica e do Vidro e de Química, agradeço o companheirismo e o apoio que sempre me demonstraram. Um agradecimento especial à Paula Brandão sempre disposta a ouvir-me e às colegas do laboratório de Biomateriais que mais directamente me “aturaram”, obrigada pela amizade e pelo “chá das 5”.

Aos meus pais, a minha grande base de suporte, sempre disponíveis para tudo o que preciso, eles foram fundamentais em todo este percurso.

Às minhas irmãs, pelo apoio constante à sua Paulinha.

Aos meus filhos, Gonçalo e Manuela, principal causa do atraso na escrita desta tese devido aos apelos constantes, colinhos, noites mal dormidas e o cumprir de horários fundamental nestas idades. Mas os seus sorrisos e abraços tudo compensam, sem eles nada disto faria sentido.

Ao meu marido Augusto, meu Amigo em todas as horas, obrigada pela tua paciência.

Finalmente agradeço o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia, com a bolsa PRAXIS XXI / BD /16157 / 98

## resumo

Os estudos de mineralização em materiais sólidos são correntemente realizados *in vitro*, com o objectivo de testar a capacidade de ligação entre potenciais implantes e o osso ou, simplesmente, obter uma camada de fosfato de cálcio bioactivo em substratos não bioactivos. Este trabalho teve como objectivos a investigação dos mecanismos e dos aspectos cinéticos envolvidos na mineralização de materiais apatíticos em meios simuladores do plasma humano.

Os substratos escolhidos foram uma hidroxiapatite comercial e um material bifásico HAP-14%  $\alpha$ -TCP de elevado grau de pureza, cujo potencial de mineralização é superior ao da HAP pura devido à maior solubilidade da fase minoritária. Ambos os materiais foram estudados em pó e na forma de corpo cerâmico denso. Estes materiais foram imersos em soluções de complexidade crescente, começando com água ultra-pura e terminando num meio de composição inorgânica muito próxima da do electrólito plasmático humano com adição de albumina.

A composição das soluções foi seguida ao longo das experiências de imersão por ICP e medidas de pH. Os materiais resultantes foram caracterizados por DRX, FTIR, SEM/EDS e, ocasionalmente, por XPS. Complementarmente, realizaram-se ensaios preliminares de biocompatibilidade com os corpos cerâmicos imersos em culturas de osteoblastos extraídos da medula óssea de ratos Wistar machos.

No decurso deste projecto foi desenvolvido um electrólito plasmático tamponado com  $\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$ . Os ensaios realizados neste novo electrólito permitiram obter camadas de mineralização cuja composição e morfologia se pensa estarem mais próximas das camadas formadas *in vivo*.

Os resultados obtidos mostraram a influência de um conjunto complexo de parâmetros na cinética e nos mecanismos de mineralização superficial, nomeadamente, a presença e o tipo de tampão, a sobressaturação média da solução mineralizante e a sobressaturação local junto à interface substrato/solução, natureza e quantidade de impurezas presentes no material, repartição da proteína entre a superfície e a solução, relação superfície de material/volume de solução e condições de agitação da solução.

## abstract

Mineralization experiments on solid materials are currently performed *in vitro*, in order to assess the bone bonding ability of potential bone implants, or simply to deposit a bioactive calcium phosphate layer on non-bioactive substrates. The purpose of the present work was to investigate the mechanisms and kinetic aspects involved in the mineralization of apatite-based materials in media simulating human plasma.

The substrates chosen were commercial hydroxyapatite and a high-purity HAP-14%  $\alpha$ -TCP biphasic material, whose mineralization potential is greater than that of HAP alone because of higher solubility of the minor phase. Both materials were used in powder and in dense ceramic form. They were immersed in solutions of increasingly complex composition, starting with pure water and ending up with a medium with the exact composition of the human plasmatic electrolyte with added albumin. The composition of the solutions was monitored along the immersion experiments by ICP and pH-metering and the incubated materials characterised by XRD, FTIR, SEM/EDS and, occasionally, by XPS. Preliminary osteoblast compatibility essays were also performed on dense ceramics with bone marrow cells explanted from Wistar male mice.

In the course of the project a new plasmatic electrolyte physiologically buffered with  $\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$  was developed. Mineralisation experiments in this electrolyte produced mineralisation deposits of a nature that is conceivably nearer that of *in vivo* formed apatite.

The results obtained showed the influence of a complex array of parameters on the kinetics and mechanisms of surface mineralization and on the nature of the deposit, namely, presence and type of buffer, local and bulk supersaturation of the mineralising solution, amount and nature of impurities in the material, partition of adsorbing albumin between the surface and the solution, material surface-to-solution volume ratio and flow conditions of the solution.

*Gostaria de dedicar esta tese  
a todos aqueles que pretendam iniciar estudos na área de BIOMATERIAIS.*

*“I believe the barrier to the more widespread successful use of medical devices, the high ridge obscuring the vision of our utopia, is our poor understanding of **biocompatibility**...  
...What I see as the crucial component of getting down, however, is the ability to use the **understanding** of biocompatibility in order to **achieve** biocompatibility.”*

Williams DF. The Biomaterials horizon.  
*J Mater Sci-Mater Med* (1994) **5**: 303-307

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Enquadramento.....	1
1.2. Objectivos do trabalho.....	9
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>11</b>
2.1. Aspectos gerais sobre saturação de soluções.....	11
2.2. Sobressaturação em soluções de fosfato de cálcio.....	17
2.2.1. Exemplo de cálculo da sobressaturação relativa de uma solução relativamente a hidroxiapatite.....	22
2.3. Fosfatos de cálcio de interesse biológico.....	25
2.3.1. Fosfato dicálcico di-hidratado (DCPD) e fosfato de cálcio anidro (DCPA).....	25
2.3.2. Fosfato de cálcio amorfo (ACP).....	26
2.3.3. Fosfato octacálcico (OCP).....	28
2.3.4. Apatites.....	30
2.4. Estudos sobre o comportamento de fosfatos de cálcio em soluções de electrólito....	34
2.4.1. Ausência de proteínas.....	37
2.4.2. Presença de proteínas.....	42
<b>3. SÍNTESE, PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CERÂMICOS.....</b>	<b>53</b>
3.1. Introdução.....	53
3.2. Síntese da hidroxiapatite S.....	54
3.3. Métodos de preparação dos cerâmicos.....	56
3.4. Caracterização química e estrutural.....	58
3.4.1. Análise química por espectrofotometria de emissão por plasma (ICP).....	58
3.4.2. Análise por difracção de raios X (DRX).....	59
3.4.3. Análise por espectroscopia e infravermelho (FTIR).....	63
3.4.4. Análise por espectroscopia de Raman.....	65
3.4.5. Quantificação da fase $\alpha$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> no cerâmico S.....	68
3.5. Conclusões.....	69
<b>4. ESTUDOS DE MINERALIZAÇÃO.....</b>	<b>71</b>
4.1. Introdução.....	71
4.2. Procedimento experimental.....	73
4.3. Incubações realizadas na ausência de albumina. Resultados experimentais e sua análise.....	78

4.3.1. Incubação de pós em água.....	77
4.3.1.a – Resultados experimentais.....	77
4.3.1.b - Análise de resultados.....	81
4.3.2. Incubação em solução tampão de Tris/HCl.....	84
4.3.2.a - Resultados experimentais.....	84
4.3.2.b - Análise de resultados.....	91
4.3.3. Incubação de pós em SBF sem adição de cálcio e fosfato.....	94
4.3.3.a - Resultados experimentais.....	94
4.3.3.b - Análise de resultados.....	96
4.3.4. Incubação em plasmas sintéticos sem tampão (HBSS e SBF0).....	98
4.3.4.a - Resultados experimentais obtidos em HBSS.....	98
4.3.4.b - Resultados experimentais obtidos em SBF0.....	106
4.3.4.c – Análise de resultados.....	114
4.3.5. Incubação em SBF.....	117
4.3.5.a – Resultados experimentais.....	117
4.3.5.b - Análise de resultados.....	122
4.4. Incubações na presença de albumina dissolvida.....	124
4.4.1. Incubação em HBSS.....	124
4.4.1.a - Resultados experimentais.....	124
4.4.1.b - Análise de resultados.....	129
4.4.2. Incubação em SBF.....	130
4.4.2.a - Resultados experimentais.....	130
4.4.2.b - Análise de resultados.....	134
4.5. Incubações realizados com pré-adsorção de albumina.....	134
4.5.1. Incubação em HBSS .....	136
4.5.1.a - Resultados experimentais.....	136
4.5.1.b - Análise de resultados.....	139
4.5.2. Incubação em SBF.....	140
4.5.2.a - Resultados experimentais.....	140
4.5.2.b - Análise de resultados.....	142
4.6. Discussão.....	143
<b>5. ESTUDO DE UM PLASMA COM TAMPÃO DE CO<sub>2</sub> / HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.....</b>	<b>147</b>
5.1. Introdução.....	147
5.2. Plasma inorgânico carbonatado (PIC).....	150
5.2.1. Considerações gerais.....	150
5.2.2. Método experimental.....	151

5.3. Ensaio de mineralização dos corpos cerâmicos em PIC com e sem albumina dissolvida no meio.....	154
5.3.1. Na ausência de albumina.....	156
5.3.1.1 - Cerâmico S.....	156
5.3.1.2 - Cerâmico C.....	164
5.3.1.3 – Discussão.....	169
5.3.2. Na presença de albumina.....	173
5.3.2.1 - Cerâmico S.....	173
5.3.2.2 - Cerâmico C.....	179
5.3.2.3 – Discussão.....	183
<b>6. CERÂMICOS EM CULTURA CELULAR.....</b>	<b>185</b>
6.1. Introdução.....	185
6.2. Metodologia utilizada.....	187
6.3. Resultados.....	188
6.4. Discussão.....	192
<b>7. SÍNTESE E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO</b>	<b>193</b>

---

## INTRODUÇÃO

### 1.1. Enquadramento

O desenvolvimento de materiais biocompatíveis com o organismo humano mobiliza investigadores em todo o mundo envolvidos na pesquisa e aperfeiçoamento de novos produtos e tecnologias. O imenso campo de aplicação destes materiais em diversas áreas da medicina, e as necessidades da vida moderna têm conduzido a inúmeras inovações tecnológicas e mantido uma necessidade crescente do desenvolvimento de novos biomateriais.

A definição de biomaterial acordada por consenso na conferência da Sociedade Europeia de Biomateriais realizada em Chester em 1986 é a de *um material não vivo usado como instrumento médico, com a finalidade de interagir com sistemas biológicos*<sup>1</sup>. Biomaterial pode ser qualquer substância ou

---

<sup>1</sup> Williams DF. Definitions in Biomaterials. In: Williams DF ed. *Progress in Biomedical Engineering (Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials)* vol 4, Elsevier, Amsterdam (1987).

combinação de substâncias, que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que possa ser usado por tempo indeterminado, aumentando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida<sup>2,3</sup>.

Para a utilização de um material como biomaterial é condição *sine qua non* a sua biocompatibilidade. Isto significa que a coexistência material - hospedeiro não deve desencadear reacções desfavoráveis, nos sistemas biológicos levando à rejeição devido a infecções. Além deste requisito, os materiais devem possuir biofuncionalidade, ou seja, a capacidade de desempenhar apropriadamente as funções para as quais foram projectados<sup>4</sup>. Na tabela 1 podem encontrar-se alguns exemplos de materiais sintéticos usados, suas características e aplicações.

Tabela 1.1 - Exemplos de biomateriais e suas aplicações clínicas<sup>3, 5</sup>

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
<b>Polímeros</b> (Polietileno, Teflon, Poliéster, Poliuretano, Polimetacrilatos, Silicone)	Elasticidade, baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo	Suturas, artéria, veias; maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); tendão artificial; oftalmologia
<b>Metais e ligas</b> (Aço inoxidável, Liga de titânio, Ligas Co-Cr-Mo)	Resistência mecânica elevada, alta resistência a desgaste, energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas em presença de tecidos conjuntivos moles, alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, placas, hastes); implantes dentários
<b>Cerâmicos e vidros</b> (Alumina, zircônia, carbono, fosfatos de cálcio, porcelana, vidros bioativos)	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, quimicamente inertes, alta resistência à compressão	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traqueias artificiais
<b>Compósitos</b> (Fibra de carbono-resina termoendurecível; fibra de carbono-termoplástico; fosfato de cálcio-colagénio)	Boa compatibilidade, quimicamente inertes, resistência à corrosão, alta tensão de rotura		Válvula cardíaca artificial, implante de juntas de joelho

Em geral, os biomateriais utilizados na reposição dos tecidos moles são muito diferentes daqueles usados na substituição de tecidos duros (ossos e dentes). Para os tecidos duros, dependendo do esforço mecânico a que são submetidos,

<sup>2</sup> Vallet-Regi M. Introduction to the world of biomaterials. *An Quim Int Ed* (1997) **93**: S6-S14

<sup>3</sup> Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials. *Science* (1994) **263**: 1715-1720

<sup>4</sup> Hench LL. Theory of bioactivity: the potential for skeletal regeneration. *An Quim Int Ed* (1997) **93**: S44-S48

<sup>5</sup> Park JB ed. *In: Biomaterials: an introduction*. Plenum Press, New York (1980)

alguns materiais podem ser mais apropriados que outros, devido à sua maior ou menor resistência. A escolha dos biomateriais mais adequados para cada aplicação depende das suas propriedades e dos requisitos inerentes à função que irão desempenhar. A caracterização completa dos biomateriais constitui o primeiro passo para o seu desenvolvimento. Os ensaios a realizar deverão contemplar diversas propriedades físicas, químicas e biológicas, nomeadamente o comportamento mecânico, a solubilidade e a toxicidade do material. De acordo com o tipo de material e com a aplicação específica a que se destina, outras características, como a resistência térmica, as propriedades reológicas ou as propriedades eléctricas, poderão ser alvo de atenção especial.

No entanto, e para além da importância das propriedades referidas, são as características da superfície do material (composição química, estrutura, energia superficial e topografia) que determinam a resposta biológica do organismo<sup>6</sup>. Os materiais comunicam com o ambiente envolvente através das suas interfaces. Ambos, o tipo e a intensidade da “comunicação” são determinados pelas propriedades interfaciais do material<sup>7</sup>. De acordo com Hench<sup>8</sup>, o biomaterial “ideal” para implantes será aquele que se comporta como se fosse equivalente ao tecido onde é inserido. Esta afirmação pressupõe dois axiomas por si propostos: (1) o tecido na interface deverá ser o tecido normal do receptor; (2) a resposta do material a um estímulo físico deverá ser idêntica à do tecido que substitui. O mesmo autor<sup>9</sup> classifica os biomateriais em quatro tipos, de acordo com a natureza da ligação implante-tecido: quase quimicamente inertes, porosos, reabsorvíveis e bioactivos.

Os materiais quase quimicamente inertes conduzem à formação de uma cápsula fibrosa não aderente em torno do implante que o isola do tecido hospedeiro. A ausência de qualquer ligação química ou biológica na interface material-tecido resulta numa fixação simplesmente morfológica. São exemplo

---

<sup>6</sup> Smith DC, Pilliar RM, Chernenky R. Dental implant materials. I. Some aspects of preparative procedures on surface topography. *J Biomed Res* (1991) **25**: 1045-1068

<sup>7</sup> Tirrel M, Kokkoli E, Biesalski M. The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science* (2002) **500**: 61-83

<sup>8</sup> Hench LL, Ethridge EC. *In: Biomaterials- An interfacial approach*. Academic Press, NY (1982)

<sup>9</sup> Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* (1991) **74**: 1487-1510

deste tipo de materiais o aço inoxidável, as ligas Co-Cr-Mo, a alumina, a zircónia ou o polietileno.

Nos materiais porosos, o crescimento de tecido hospedeiro novo no interior dos seus poros origina a chamada fixação biológica. Os metais revestidos com filmes porosos podem ser incluídos nesta categoria.

Os materiais reabsorbíveis são concebidos para uma degradação lenta no organismo, sendo progressivamente substituídos pelo tecido hospedeiro. Os produtos de degradação devem ser metabolicamente aceites e a velocidade de degradação *in vivo* deve ser semelhante à velocidade de reparação dos tecidos vivos. O trifosfato de cálcio, o ácido poliláctico ou o sulfato de cálcio constituem exemplos deste tipo de materiais.

Finalmente, quando um material bioactivo é implantado no organismo, várias reacções biofísicas e bioquímicas têm lugar na interface implante-tecido. Do conjunto de reacções desencadeadas resulta a formação de uma ligação entre o material e o tecido, chamada *fixação bioactiva*. O tecido cresce sobre o material verificando-se uma continuidade entre ambos. O mecanismo de ligação, a força e a espessura da zona de ligação variam de material para material. No caso dos implantes ósseos, um material bioactivo induz a formação de uma camada de apatite carbonatada biologicamente activa sobre a sua superfície, criando um ambiente compatível com o crescimento ósseo<sup>10,11,12</sup>. Os materiais bioactivos incluem os chamados biovidros e vidros cerâmicos desenvolvidos primordialmente pelos grupos de investigadores Hench e Kokubo<sup>13</sup>, e a família de cerâmicos de fosfatos de cálcio. Foi esta última que constituiu objecto de estudo no presente trabalho.

Os fosfatos de cálcio são compostos de grande interesse numa área interdisciplinar de ciências envolvendo química, biologia, medicina e geologia. A

---

<sup>10</sup> Fernández E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FCM, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications Part II: precipitate formation during setting reactions. *J Mater Sci- Mater Med* (1999) **10**: 177-183

<sup>11</sup> Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, Nakamura T, Yamamuro T. Process of formation of bone-like apatite layer on silica gel. *J Mater Sci-Mater Med* (1993) **4**: 127-131

<sup>12</sup> Ferraz MP, Monteiro FJ, Santos JD. CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass hydroxyapatite double-layer plasma-sprayed coating: In vitro bioactivity evaluation. *J Biomed Mater Res* (1999) **45**: 376-383

<sup>13</sup> Kokubo T, Kushitani H, Ohtsuki C, Sakka S, Yamamuro T. Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid. *J Mater Sci-Mater Med* (1992) **3**: 29-83

primeira tentativa para determinar a sua composição por análises químicas remonta à primeira metade do século XVIII. Um século mais tarde foi introduzida a ideia da existência de fases cristalinas de fosfato de cálcio diferentes<sup>14</sup>. Desde então são inúmeros os trabalhos publicados nesta área.

Na tabela 1.2 apresentam-se as fases de fosfato de cálcio conhecidas, onde é indicada a sua fórmula empírica e a relação molar Ca/P.

Tabela 1.2 - Fases de fosfato de cálcio

<b>Fosfato de cálcio</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Fórmula empírica</b>	<b>Relação molar Ca/P</b>
Hidrogenofosfato de cálcio di-hidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00
Hidrogenofosfato de cálcio anidro	DCPA	$\text{CaHPO}_4$	1.00
Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Fosfato tricálcio	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
Hidroxiapatite	HAP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Apatites deficientes em cálcio		$\text{Ca}_{10-u}(\text{HPO}_4)_u(\text{PO}_4)_{6-u}(\text{OH})_{2-u}$ $0 \leq u \leq 2$	$(10-u)/6$

A hidroxiapatite (HAP),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , é um composto de grande interesse em catálise, em cromatografia como fase de suporte, na indústria de produtos fertilizantes e farmacêuticos. No campo biomédico, a sua importância deriva de ser o constituinte principal dos tecidos duros (ossos e dentes) dos vertebrados. A HAP forma-se também patologicamente como resultado de irregularidades funcionais resultantes em artrites, formações renais e outras calcificações. Neste contexto, a HAP é considerada um composto modelo no estudo dos fenómenos de biomineralização.

<sup>14</sup> Koutsoukos PG, Spanos N. The formation of sparingly soluble minerals in implants. Solute-substrate interactions. Seminário Biomineralização de materiais de implante IST Lisboa (2000)

Contudo, vários aspectos como a falta de reprodutibilidade dos métodos de síntese dos fosfatos de cálcio, em particular da HAP; a não estequiometria das apatites biológicas e a associação destas com elementos vestigiais; a interferência destes elementos nos processos de mineralização, entre outros, continuam a causar interrogações na comunidade científica.

Outro factor importante que dificulta o estudo dos mecanismos de mineralização relaciona-se com a diversidade de fosfatos de cálcio que se podem formar na interface implante - tecido ósseo, dependendo do ambiente físico-químico do local, nomeadamente da supersaturação. Embora a HAP seja o modelo estrutural das apatites biológicas, outras fases de fosfato de cálcio podem participar nos processos de mineralização *in vivo*<sup>15</sup> e *in vitro*<sup>10,16</sup>.

É de um modo geral aceite, que a cristalização de sais moderadamente solúveis envolve a formação de fases precursoras, que subsequentemente se dissolvem no decurso da reacção de precipitação da fase final<sup>17</sup>. No caso dos fosfatos de cálcio, a sequência é complicada pelo número relativamente elevado de fases que pode participar nas reacções. Deste modo, a formação inicial de fosfato de cálcio amorfo (ACP) a pH elevado pode ser seguida pela sua transformação em HAP, através da formação de fosfato octacálcico (OCP), o qual pode servir de suporte para o crescimento de HAP. Para valores de pH mais ácidos, outros precursores como o DCPD podem participar, de acordo com a regra de estados de Ostwald<sup>16,18</sup>. Esta regra diz que, numa solução supersaturada, a fase que precipita em primeiro lugar não é a fase termodinamicamente mais estável, mas uma fase metaestável. A identificação destas fases pode constituir um problema, devido à sua natureza transiente.

Outro factor interveniente no processo de formação e amadurecimento das fases de fosfato de cálcio é a capacidade de a estrutura apatítica ser hospedeira de uma variedade de substituintes aniónicos e catiónicos. Este factor contribui

---

<sup>15</sup> Sauer GR, Zunic WB, Durig JR, Wuthier RE. Fourier transform raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates. *Calcif Tissue Int* (1994) **54**: 414-420

<sup>16</sup> Brown PW, Martin RL. An analysis of hydroxyapatite surface layer formation. *J Phys Chem* (1999) **103**: 1671-1675

<sup>17</sup> Nancollas GH. In vitro studies of calcium phosphate crystallization. In: Mann S ed. *Biomaterialization: chemical and biochemical perspectives*. VCH, NY (1989) 157-187

<sup>18</sup> Feenstra TP, Bruyn PL. The Ostwald rule of stages in precipitation from highly supersaturated solutions: a model and its application to the formation of the nonstoichiometric amorphous calcium phosphate precursor phase. *J Colloid Interface Sci* (1981) **84**: 66-72

para a heterogeneidade de composições verificada nas apatites biológicas. De facto, a incorporação de iões estranhos à estrutura da HAP pode afectar a sua cristalinidade, morfologia, parâmetros de rede e estabilidade<sup>19</sup>. Por este motivo, a natureza das fases de fosfato de cálcio que se formam em condições fisiológicas permanece controversa.

A simulação do comportamento destes materiais *in vivo* por testes *in vitro* é uma tarefa árdua devido à dificuldade de reproduzir os parâmetros biológicos e ao grau elevado de interdependência de vários factores. Um destes factores é o papel desempenhado pelas proteínas na mineralização, o qual não deriva apenas de interacções simples material – proteína mas pode envolver interacções proteína - célula e célula – material. Uma aproximação possível consiste em decompor o problema global em etapas elementares e considerar um efeito de cada vez.

A ligação de um material de implante bioactivo ao tecido ósseo implica reacções de superfície que resultam na formação de uma camada de apatite carbonatada, presumivelmente por um processo de dissolução/precipitação em que intervêm três componentes: o electrólito plasmático, as proteínas e as células dos tecidos circundantes. Não é claro, contudo, o papel relativo desses componentes na mineralização.

Os ensaios *in vitro* são considerados essenciais para a tentativa de estabelecer mecanismos possíveis de reacções interfaciais entre implante e tecido ósseo. São métodos rápidos e pouco dispendiosos. Podem ser realizados em meios de cultura celular ou em soluções de sais. O primeiro tipo destina-se a testar a biocompatibilidade por observação do comportamento das células na presença do material. Os tipos de resposta que indicam toxicidade são morte celular, adesão celular reduzida, morfologia celular alterada, proliferação celular e actividade biossintética reduzidas<sup>20</sup>. As soluções salinas que tentam duplicar a composição inorgânica do plasma humano são usadas para observar a actividade química superficial dos biomateriais ao longo do tempo de imersão.

---

<sup>19</sup> Bigi A, Foresti E, Gandolfi M, Gazzano M, Roveri N. Inhibiting effect of zinc on hydroxyapatite crystallization. *J. Inorg Biochem* (1995) **58**: 49-58

<sup>20</sup> Gross KA, Bernt CC. In vitro testing of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *J Mater Sci-Mater Med* (1994) **5**: 219-224

Assim, numa primeira fase a maioria dos estudos *in vitro* são realizados em soluções inorgânicas preparadas com concentrações iônicas próximas das do plasma humano. Vários autores<sup>11,21</sup> estabeleceram que a formação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície de um material imerso num fluido inorgânico acelular é um indicador decisivo da sua bioactividade, uma vez que os materiais bioactivos se ligam ao osso *in vivo* através de uma camada semelhante.

Na Tabela 1.3 apresenta-se a composição de algumas destas soluções mais frequentemente referidas, em comparação com a composição inorgânica do plasma humano. A solução designada por SBF (abreviatura de *simulated body fluid*), proposta por Kokubo *et al*<sup>22</sup>, tem a concentração iônica mais próxima da do plasma, com excepção das concentrações dos iões  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{Cl}^-$ . Esta solução é ainda tamponada a pH 7,25 (T=37°) com o tampão tris(hidroximetil)aminometano / ácido clorídrico (Tris/HCl), o que acresce a concentração de cloretos em cerca de 50  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , não contabilizados na composição do SBF normalmente apresentada. As restantes soluções apresentadas na tabela não possuem tampão adicional.

Tabela 1.3 - Composição química de várias soluções usadas em testes *in vitro* em comparação com a composição inorgânica do plasma humano. Os valores das concentrações totais são expressos em  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

	sódio	potássio	cálcio	magnésio	cloro	carbonat	fosfat	sulfat	Outros
Plasma humano	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5	-
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5	Tris/HCl
HBSS	141,7	5,8	1,3	0,9	147,7	4,2	0,78	0,4	Glucose
Neuman <sub>23</sub>	125	25	0,48	0,4	130	24	1,8	-	-

<sup>21</sup> Santos JD, Jha LJ, Monteiro FJ. Surface modifications of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Biomaterials* (1995) **16**: 521-526

<sup>22</sup> Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res* (1990) **24**: 721-734

<sup>23</sup> Kowalchuk RM, Pollack SR, Corcoran TA. Zeta potential of bone from particle electrophoresis: solution composition and kinetic effects. *J Biomed Mater Res* (1995) **29**: 47-57

Ringer	133,5	5,0	2,6	1,0	142, 2	2,4	1,14	-	Glucos e (2gL <sup>-1</sup> )
--------	-------	-----	-----	-----	-----------	-----	------	---	----------------------------------

São muitos os factores que tornam impossível reproduzir *in vitro* os processos *in vivo*; no entanto, tal como referido por Péru e Daculsi<sup>24</sup>, os químicos devem continuar o seu trabalho na modelação de cada um dos passos do processo de mineralização. As fases sintéticas, mesmo que apenas se aproximem das biológicas, constituem bons modelos para a compreensão da mineralização biológica e são boas aproximações para os estudos *in vitro* dos biomateriais.

## 1.2. Objectivos do trabalho

Foi objectivo global deste trabalho estudar os mecanismos e a cinética dos processos de deposição de camadas de mineralização em fosfatos de cálcio, em condições de simulação sequencial *in vitro* em que se pretendeu separar as contribuições do electrólito plasmático, das proteínas e da actividade osteoblástica.

Neste contexto, estudou-se o comportamento *in vitro* de dois cerâmicos, uma HAP comercial e um fosfato de cálcio bifásico (HAP com cerca de 14 % de  $\alpha$ -trifosfato de cálcio), em (1) electrólitos plasmáticos simulados, (2) electrólitos contendo albumina e (3) meio de cultura contendo osteoblastos. Para tal, determinou-se a evolução do pH e das concentrações totais médias de cálcio e fosfato nos meios, ao longo do tempo de incubação, por plasma de acoplamento por indução (ICP). As camadas de mineralização foram caracterizadas por microscopia electrónica de varrimento / espectroscopia por dispersão de energia (SEM/EDS), espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) em modo de reflectância difusa e difracção de raios X (DRX) de ângulo rasante.

<sup>24</sup> Péru L, Daculsi G. Synthetic calcium phosphates: Models for biological crystals? *Clin Mater* (1994) **15**: 267-272

Uma vez que o tampão Tris/HCl, normalmente usado em electrólito simulado, é susceptível de interferir por complexação<sup>25</sup> de  $\text{Ca}^{2+}$ , ensaiou-se complementarmente a simulação do tampão natural  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ , para o que foi elaborada uma montagem de um sistema doseador de  $\text{CO}_2$  a pressão parcial variável. Esta técnica tem ainda a vantagem de permitir alcançar concentrações de  $\text{HCO}_3^-$  próximas das do plasma, impossíveis de obter em atmosfera de ar.

Comparou-se pó e material cerâmico. O comportamento do pó permitiu obter indicações quanto à cinética do processo de mineralização do cerâmico a longo prazo, enquanto que o cerâmico possibilitou um estudo mais adequado da camada depositada.

A organização desta tese reflecte o percurso de investigação desenvolvido. Após uma apresentação dos fundamentos teóricos que permitem a discussão dos resultados em termos cinéticos e químicos, faz-se ainda no Capítulo 2 uma caracterização morfológica das fases sólidas principais de fosfatos de cálcio e por fim uma breve revisão bibliográfica sobre o comportamento de fosfatos de cálcio em soluções de electrólitos. No Capítulo 3 apresentam-se os materiais em estudo, em particular a sua preparação e caracterização prévia aos ensaios de mineralização.

O capítulo 4 versa sobre estudos de mineralização dos pós calcinados e corpos cerâmicos em fluidos de composição variável. Neste capítulo é apresentado o procedimento experimental, resultados e discussão. Na sequência dos resultados obtidos no capítulos 4, surgiu o trabalho apresentado no capítulo 5. Neste, apresenta-se o estudo de um fluido inorgânico simulado com tampão de  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  e os resultados de ensaios de mineralização de corpos cerâmicos neste fluido com e sem adição de albumina.

No Capítulo 6 apresenta-se um estudo breve sobre avaliação da biocompatibilidade dos cerâmicos. Finalmente no Capítulo 7 é feita uma síntese do trabalho realizado.

---

<sup>25</sup> Hlaváč J, Rohanová D, Helebrant A. The effect of the Tris-buffer on the leaching behaviour of bioactive glass-ceramics. *Ceram Silik* (1994) **38**: 119-122

---

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

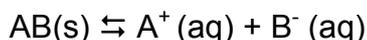
Neste capítulo de índole teórica apresenta-se, num primeiro sub-capítulo, um resumo sobre *saturação* de soluções, sendo feita uma aplicação desta teoria ao estudo de soluções de fosfatos de cálcio. No segundo sub-capítulo são apresentadas as diversas fases de fosfato de cálcio de interesse biológico. Por último é apresentado um resumo bibliográfico sobre o comportamento de fosfatos de cálcio em soluções de electrólito, na ausência e em presença de proteínas.

### 2.1. Aspectos gerais sobre saturação de soluções

Define-se *saturação* de uma solução como a situação que ocorre quando o soluto atinge o máximo de solubilidade no solvente. Nesta situação ambas as fases estão em equilíbrio. Se a quantidade de soluto é inferior à concentração de

saturação, a solução diz-se *subsaturada*. Se a quantidade de soluto excede a sua solubilidade a solução diz-se *sobressaturada*.

O grau de saturação de uma solução é determinado pelo valor da energia de Gibbs de dissolução da fase sólida; ou seja, para a reacção química genérica:



a energia de Gibbs de dissolução é dada pela expressão

$$\Delta G = RT \ln \frac{IP}{K_s} \quad (2.1)$$

Na expressão (2.1)  $IP$  representa o produto de actividades iónico da solução e  $K_s$  a constante de equilíbrio, designada por constante de solubilidade ou produto de solubilidade do sólido iónico.

O produto de actividades iónico,  $IP$ , pode ser comparado com  $K_s$ . O estado de saturação de uma solução em relação a um sólido pode ser definido:

$$IP > K_s \quad (\text{sobressaturada}) \Rightarrow \Delta G > 0$$

$$IP = K_s \quad (\text{equilíbrio, saturada}) \Rightarrow \Delta G = 0$$

$$IP < K_s \quad (\text{subsaturada}) \Rightarrow \Delta G < 0$$

É usual definir-se grau de *sobressaturação relativa* ( $S_r$ ) de uma solução pela expressão:

$$S_r = S - 1 = \left( \frac{IP}{K_s} \right)^{\frac{1}{n}} - 1 \quad (2.2)$$

onde  $n$  é o número de iões na fórmula unitária da fase sólida,  $S$  representa a sobressaturação.

Para a maioria dos sais moderadamente solúveis, as soluções supersaturadas podem manter-se estáveis do ponto de vista cinético, para períodos de tempo praticamente infinitos. Estas soluções são metaestáveis e podem regressar à situação de equilíbrio apenas quando actua uma causa, como

por exemplo a introdução de sementes de cristais do sal correspondente à solução sobressaturada, alterações de temperatura ou pressão, ou mesmo choques mecânicos.

O esquema apresentado na figura 2.1, ilustra um diagrama de solubilidade típico de um sal pouco solúvel em que a solubilidade diminui com o aumento da temperatura (solubilidade inversa), situação que se verifica nos fosfatos de cálcio.

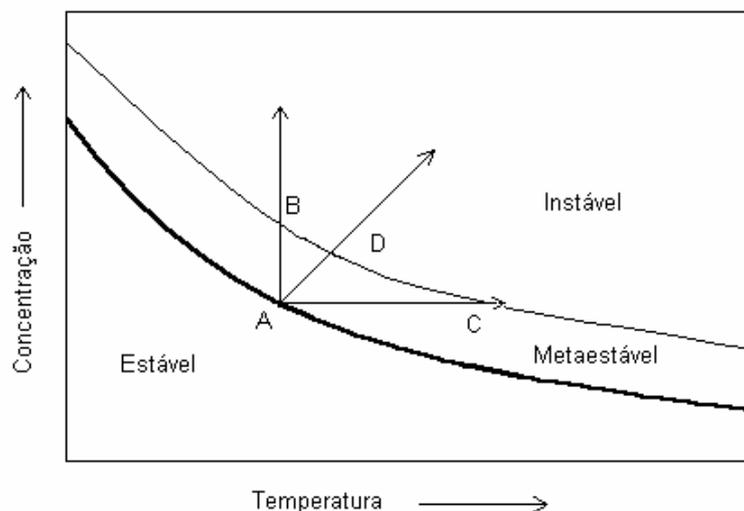


Figura 2.1 – Esquema de um diagrama de solubilidade de um sal pouco solúvel de solubilidade inversa. Adaptado da Figura 2 da referência<sup>1</sup>

Neste diagrama a linha mais espessa representa a situação de equilíbrio. No ponto A o soluto está em equilíbrio com o sólido correspondente. Uma solução que se separa da sua condição de equilíbrio é obrigada a voltar a ela através da precipitação de excesso de soluto.

Todavia existe um limiar do desvio da situação de equilíbrio (marcado pela linha mais fina no diagrama da Figura 2.1) que, se for atingido, provoca a precipitação espontânea. Esta gama superior de sobressaturações define a região instável e a linha mais fina é conhecida por curva de sobressolubilidade. Deve notar-se que esta curva não é bem definida e depende de vários factores tais

<sup>1</sup> Koutsoukos PG, Spanos N. The formation of sparingly soluble minerals in implants, Solute-substrate interactions. Seminário Biomineralização de materiais de implante, IST, Lisboa (2000)

como a presença de partículas estranhas suspensas, agitação, temperatura, pH, etc. A formação e subsequente deposição de sólidos ocorre apenas quando as condições da solução correspondem à região metaestável ou instável.

Abaixo da curva de solubilidade as soluções estão subsaturadas e ocorre dissolução se estiverem presentes cristais de sais contendo iões iguais aos da composição da solução.

Uma vez verificada a sobressaturação crítica pode iniciar-se a *nucleação*. A nucleação pode ser descrita como a formação, no seio de uma solução instável, sobressaturada, das primeiras partículas de precipitado, capazes de crescimento espontâneo. Estas primeiras partículas viáveis chamadas núcleos de cristalização podem ser geradas no seio da própria solução sobressaturada (*nucleação homogénea*), ou formadas sobre partículas sólidas já existentes no sistema (*nucleação heterogénea*).

Se se tomarem precauções de forma a excluir as partículas sólidas estranhas, é possível ter um sistema no qual os núcleos necessários para a precipitação são gerados espontaneamente dentro das soluções sobressaturadas por um processo de nucleação homogénea. No seio da solução os iões interactivam para formar aglomerados de vários tamanhos. Estes aglomerados, em geral, não actuam como núcleos de cristalização mas, em vez disso, dissociam-se em iões. Contudo, se a solução for suficientemente sobressaturada então a tendência para diminuir a sua concentração por deposição de iões em aglomerados sobrepõe-se à tendência de dissociação dos aglomerados. Os aglomerados podem actuar como núcleos de cristalização e crescer em cristais de maior dimensão. Este processo de criação de superfícies requer energia, esta energia é fornecida pelo termo de energia de Gibbs favorável originado pela tendência espontânea da solução sobressaturada precipitar. Deste modo, ocorrerá um balanço de energia como o ilustrado na Figura 2.2. Aglomerados com tamanho superior ao valor crítico terão tendência a crescer uma vez que o termo de energia superficial se torna menos importante com o crescimento. Quando alcançado o tamanho crítico por agregação, a sobressaturação rapidamente diminui e os cristalitos crescerão por processos de crescimento de cristal.

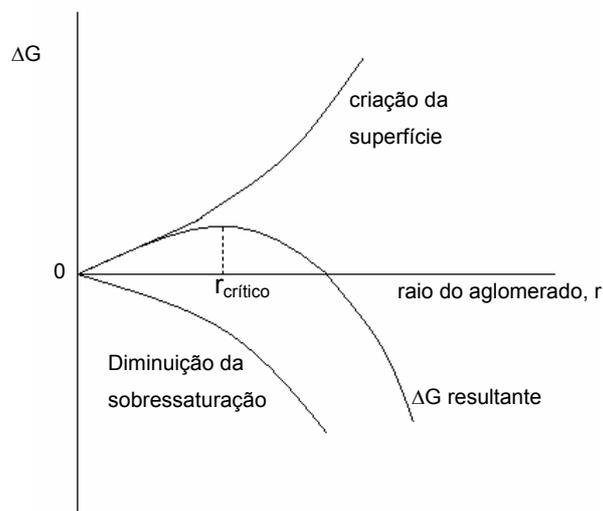


Figura 2.2 – Variação da energia de Gibbs durante a nucleação, representada em função do raio do aglomerado. (Adaptada da Figura 6.2 da referência 2)

A nucleação heterogênea envolve a adsorção de moléculas dissolvidas à superfície de materiais sólidos tais como poeiras, vidro e substâncias iônicas não dissolvidas. A camada adsorvida de moléculas de soluto pode crescer em cristais de maiores dimensões. Uma vez que a rede cristalina de um sólido estranho é em geral diferente da do sólido que precipita, as primeiras camadas são depositadas numa configuração de rede sujeita a tensões, isto é, menos estável do que a rede normal do material a precipitar. O grau de tensão de rede determina o grau de eficiência de um dado agente nucleador heterogêneo. Deste modo, um material cuja estrutura cristalina seja muito diferente da do sólido a precipitar não originará precipitação a não ser que a solução esteja razoavelmente sobressaturada. Se à solução se adicionarem pequenos cristais da própria substância a precipitar, a precipitação pode ocorrer para uma concentração só ligeiramente sobressaturada. A nucleação heterogênea é de grande importância em muitos processos. Em biomineralização, por exemplo, nucleadores potenciais como

---

<sup>2</sup> Nancollas GH. *In vitro* studies of calcium phosphate crystallization. In: Mann S ed. *Biomaterialization: chemical and biochemical perspectives*. VCH, NY (1989)

proteínas, células, materiais de implante, entre outros, estão em contacto com os fluidos e podem promover o crescimento de biominerais nas suas superfícies<sup>3</sup>.

A nucleação heterogénea pode, conseqüentemente, ser um modelo mais apropriado para os processos de biomineralização, visto que ocorrem, em geral, em situações de menor sobressaturação. Embora o mecanismo exacto não seja ainda totalmente compreendido, pensa-se que a nucleação heterogénea resulte de uma ordem local originada por interacções através da interface. Tais interacções são facilitadas se o substrato proporcionar uma boa correspondência de rede cristalina à substância a precipitar. Isto pode levar a cristalização epitaxial, resultando em fases minerais mistas que são frequentemente encontradas *in vivo*.

Nucleação secundária ou a produção de núcleos adicionais na presença de cristais<sup>4</sup> pode, também, ser importante em mineralização biológica. A sobressaturações elevadas, podem desenvolver-se dendrites nas superfícies cristalinas, as quais, podem partir e formar novos centros de cristalização. A nucleação secundária pode ainda ser induzida por contacto ou colisão entre partículas ou com as paredes do vaso.

A velocidade a que se geram na solução os núcleos de cristalização necessários é fortemente dependente do grau de sobressaturação. Por esta razão as soluções que não são muito sobressaturadas podem ser indefinidamente “estáveis”, enquanto que soluções cuja concentração é superior a um dado valor limite (sobressaturação crítica) precipitam imediatamente<sup>4,5</sup>.

Os processos de nucleação e crescimento de cristais podem ser traduzidos por curvas cinéticas, como a representada na Figura 2.3, nas quais há um período de indução no qual as reacções se iniciam em locais específicos dos sólidos formando-se núcleos que irão crescer (período de indução A), este período é determinado pela barreira da energia de activação a ultrapassar pelo grau de sobressaturação da solução. Um período de aceleração (B) em que há

---

<sup>3</sup> Wu W, Nancollas GH. Kinetics of heterogeneous nucleation of calcium phosphates on anatase and rutile surfaces. *J Colloid Interface Sci* (1998) **199**: 206-211

<sup>4</sup> Garside J, Nucleation. In: Nancollas GH ed. *Biological mineralization and demineralisation*. Springer-Verlag, Berlin (1982)

<sup>5</sup> McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology, Vol. 9, McGraw-Hill Book Company Inc (1960)

crescimento dos núcleos por reacção na interface produto-reagente. A reacção em geral acelera até ao ponto em que há diminuição da concentração dos reagentes e uma diminuição da área superficial resultante do aumento das dimensões dos grãos, chegando-se deste modo ao denominado período de decaimento (C) em que a velocidade da reacção diminui até se atingir o equilíbrio

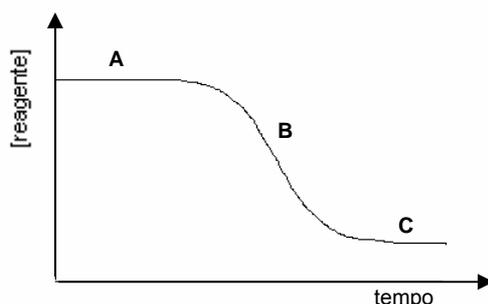


Figura 2.3 – Forma da curva cinética de variação da concentração de um reagente com o tempo no processo de cristalização

## 2.2. Sobressaturação em soluções de fosfato de cálcio

A natureza dos fosfatos de cálcio precipitados é determinada essencialmente pelo grau de sobressaturação do meio de mineralização<sup>6</sup>.

A sobressaturação acontece por aumento das concentrações de cálcio e fosfato e/ou do pH. Além disso, o aumento da temperatura também contribui para o aumento da sobressaturação da solução uma vez que os sais de fosfato de cálcio apresentam solubilidade inversa.

A tendência para uma determinada fase de fosfato de cálcio precipitar pode ser determinada a partir de diagramas de solubilidade de fases como o representado na Figura 2.4.

<sup>6</sup> Aoba T, Komatsu H, Shimazu Y, Yagishita H, Taya Y. Enamel mineralization and an initial crystalline phase. *Connective Tissue Res* (1998) **38**: 129-137

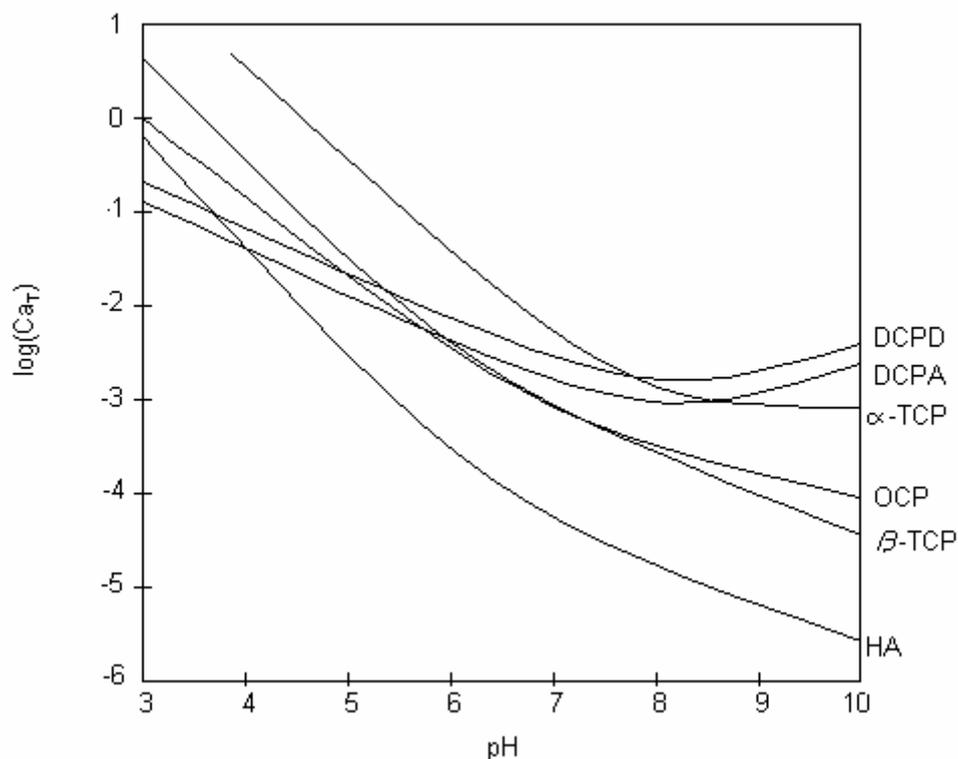


Figura 2.4 - Isotérmicas de solubilidade de vários fosfatos de cálcio em água. A solubilidade foi expressa na quantidade total de íons cálcio em solução. Adaptado das referências de Bohner<sup>7</sup> e Nancollas

Nesta figura, as isotérmicas de solubilidade são expressas pelo logaritmo da concentração molar total de cálcio em solução, em função do pH. O diagrama foi construído com a suposição de que na solução existem concentrações molares totais de cálcio e fosfato iguais ( $Ca_T = \text{fosfato}_T$ ), numa solução de força iônica  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . É importante referir que a posição das curvas varia se a força iônica da solução variar. Neste diagrama estão ainda representadas as curvas de solubilidade das fases  $\alpha$  e  $\beta$ -fosfato tricálcico. No intervalo de pH considerado a precipitação destas fases a partir de soluções aquosas não é termodinamicamente estável; a sua representação foi feita porque será necessário discutir adiante a estabilidade relativa de ambas as fases.

<sup>7</sup> Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. Injury (2000) 31: S-D37-S-D47

Nancollas refere que, embora a HAP seja a fase menos solúvel e por isso referida como a fase sólida preferencialmente precipitante, possui uma velocidade de crescimento que é menor do que qualquer outra das fases de fosfato de cálcio e é também muito mais sensível à presença de iões estranhos na solução. Modificações das camadas superficiais devido a substituições na rede ou adsorção de outros iões presentes na solução podem também alterar o curso das reacções que ocorrem na interface sólido/líquido.

Ostwald<sup>8</sup> foi o primeiro investigador a estudar os processos de precipitação em soluções muito sobressaturadas. As suas investigações levaram-no a formular a sua famosa *regra empírica de estados*. Nesta regra o autor postula que a fase que precipita em primeiro lugar, não é a fase termodinamicamente mais estável, mas antes uma fase metaestável. Por outras palavras, a formação de uma fase termodinamicamente estável é precedida por uma série de estados de energia elevada. Como regra empírica que é, apresentará excepções mas consegue explicar muitos dos processos de nucleação observados sendo uma regra frequentemente referida<sup>2,9,10</sup>. De acordo com esta regra, em soluções muito sobressaturadas de fosfatos de cálcio a  $\text{pH} > 5$ , a primeira fase cristalina que se forma não será a HAP.

Para calcular o grau de sobressaturação de uma solução relativamente a uma dada fase sólida de fosfato de cálcio é necessário conhecer em pormenor a composição da solução para se proceder à escolha correcta das espécies que se podem formar. Os iões fosfato(V) formam complexos e pares iónicos com iões hidrogénio e iões metálicos que alteram efectivamente a distribuição da concentração das várias espécies. É, pois, importante calcular a concentração das espécies iónicas livres de modo a poder calcular a sobressaturação relativa de uma solução. Infelizmente, em muitos casos, a escassez de constantes de estabilidade fiáveis leva muitos autores a ignorarem os efeitos dos pares iónicos e

---

<sup>8</sup> Ostwald WZ. *Phys Chem* (1897) **22**: 289. Referido em Feenstra TP (1981)

<sup>9</sup> Feenstra TP, Bruyn PL. The Ostwald rule of stages in precipitation from highly supersaturated solutions: a model and its application to the formation of the nonstoichiometric amorphous calcium phosphate precursor phase. *J Colloid Interface Sci* (1981) **84**: 66-72

<sup>10</sup> Brown PW, Martin RL. An analysis of hydroxyapatite surface layer formation. *J Phys Chem* (1999) **103**: 1671-1675

das actividades, na tentativa de determinar o grau de sobressaturação de uma solução.

Neste contexto, definir grau de sobressaturação de um fluido biológico em relação a uma determinada fase de fosfato de cálcio é uma tarefa difícil devido a incertezas da natureza e estabilidade dos complexos metálicos que se podem formar nestas soluções. É por isso muito importante ter em conta o número máximo possível de interacções. No decorrer dos processos de precipitação, a sobressaturação varia e podem ocorrer transformações de uma fase noutra. Estas transformações são difíceis de monitorizar se as fases intermediárias tiverem um tempo de vida curto ou se se formarem em concentrações muito baixas<sup>11</sup>.

Tendo este facto em atenção procedeu-se a uma compilação dos dados termodinâmicos para a protonação dos iões fosfato, formação de pares iónicos cálcio-fosfato, e solubilidades para as diversas fases de fosfato de cálcio de acordo com a bibliografia consultada. Na Tabela 2.1 apresentam-se os valores das constantes comumente utilizadas pelos autores que trabalham com estes materiais e que foram usados no presente trabalho, sem nenhuma análise crítica dos mesmos.

Tendo em consideração os equilíbrios desta tabela e sabendo para cada caso a concentração de cálcio e fósforo totais e o valor do pH, é possível construir um sistema de equações que uma vez resolvido, com o auxílio de um programa de computador adequado, fornece as concentrações dos iões livres em solução.

Sabendo as concentrações iónicas livres em solução é possível calcular o produto iónico de actividades para a fase sólida desejada e conseqüentemente o grau de sobressaturação da solução em relação a essa fase sólida. Porém é ainda necessário ter em consideração os coeficientes de actividade para cada espécie iónica, que devem ser calculados para a força iónica da solução.

Neste trabalho o sistema formado pelas equações (1) a (7) da Tabela 2.1 acrescido da equação que relaciona a concentração total de cálcio em solução com o somatório de todas as espécies aquosas envolvendo cálcio e a equação

---

<sup>11</sup> Nancollas GH. Introduction. In: Nancollas GH ed. *Biological mineralization and demineralisation*. Springer-Verlay, Berlin (1982)

que relaciona a concentração total de fosfato em solução com o somatório de todas as espécies aquosas que envolvem fosfato, foi resolvido para cada um dos tempos de incubação dos materiais estudados, com o auxílio do programa *Mathematica Kernel*®.

Tabela 2.1 - Constantes de equilíbrio termodinâmico necessárias para os estudos dos fosfatos de cálcio<sup>2, 12, 13</sup>.

	Equilíbrio	K
1	$\text{H}_3\text{PO}_4(\text{aq}) \rightleftharpoons \text{H}^+(\text{aq}) + \text{H}_2\text{PO}_4^-(\text{aq})$	$6,22 \times 10^{-3}$ (37°)
2	$\text{H}_2\text{PO}_4^-(\text{aq}) \rightleftharpoons \text{H}^+(\text{aq}) + \text{HPO}_4^{2-}(\text{aq})$	$6,58 \times 10^{-8}$ (37°C)
3	$\text{HPO}_4^{2-}(\text{aq}) \rightleftharpoons \text{H}^+(\text{aq}) + \text{PO}_4^{3-}(\text{aq})$	$6,61 \times 10^{-13}$ (37°C)
4	$\text{Ca}^{2+}(\text{aq}) + \text{H}_2\text{PO}_4^-(\text{aq}) \rightleftharpoons \text{CaH}_2\text{PO}_4^+$	31,9 (37°C)
5	$\text{Ca}^{2+}(\text{aq}) + \text{HPO}_4^{2-}(\text{aq}) \rightleftharpoons \text{CaHPO}_4(\text{aq})$	$6,81 \times 10^2$ (37°C)
6	$\text{Ca}^{2+}(\text{aq}) + \text{PO}_4^{3-}(\text{aq}) \rightleftharpoons \text{CaPO}_4^-(\text{aq})$	$3,46 \times 10^6$ (37°C)
7	$2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$	$2,38 \times 10^{-14}$ (37°C)
8	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}(\text{s}) \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+}(\text{aq}) + \text{HPO}_4^{2-}(\text{aq})$	$1,87 \times 10^{-7}$ (37°C)
9	$\text{CaHPO}_4(\text{s}) \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+}(\text{aq}) + \text{HPO}_4^{2-}(\text{aq})$	$9,2 \times 10^{-7}$ (25°C)
10	$\alpha\text{-Ca}_3\text{PO}_4(\text{s}) \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+}(\text{aq}) + \text{PO}_4^{3-}(\text{aq})$	$3,16 \times 10^{-26}$ (25°C)
11	$\beta\text{-Ca}_3\text{PO}_4(\text{s}) \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+}(\text{aq}) + \text{PO}_4^{3-}(\text{aq})$	$1,26 \times 10^{-29}$ (25°C)
12	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}(\text{s}) \rightleftharpoons 8\text{Ca}^{2+}(\text{aq}) + 6\text{PO}_4^{3-}(\text{aq}) + 2\text{H}^+(\text{aq})$	$2,51 \times 10^{-99}$ (37°C)
13	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2(\text{s}) \rightleftharpoons 10\text{Ca}^{2+}(\text{aq}) + 6\text{PO}_4^{3-}(\text{aq}) + 2\text{OH}^-(\text{aq})$	$5,5 \times 10^{-118}$ (37°C)

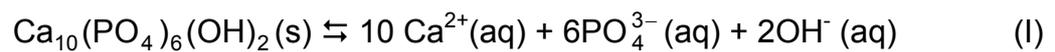
<sup>12</sup> Ohtsuki C, Kokubo T, Yamamuro T. Mechanism of apatite formation on CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glasses in a simulated body fluid. *J Non-Cryst Solids* (1992) **143**: 84-92

<sup>13</sup> Chow LC Solubility of calcium phosphates. In: *Octacalcium Phosphate. Monogr Oral Sci.* vol18. Chow LC, Eanes ED eds. Karger, Basel (2001)

Deste modo, foi possível calcular as concentrações livres de todas as espécies consideradas no sistema, para cada tempo de incubação, tendo por objectivo o cálculo posterior da sobressaturação relativa em relação às fases sólidas de fosfato de cálcio de interesse.

### 2.2.1. Exemplo de cálculo da sobressaturação relativa de uma solução relativamente à hidroxiapatite

A formação de HAP a partir dos seus iões constituintes é dada pela equação:

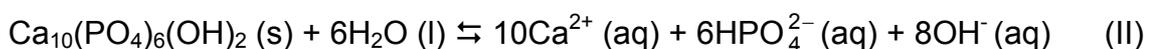


com a constante de equilíbrio  $K_{S1}$  definida como

$$K_{S1} = (a_{\text{Ca}^{2+}})^{10} \times (a_{\text{PO}_4^{3-}})^6 \times (a_{\text{OH}^-})^2 \quad (2.2)$$

onde  $a_{X^n}$  representa a actividade do ião  $X^n$  e  $K_{S1} = 5,5 \times 10^{-118}$ , para 37 °C.

O equilíbrio (I) é o considerado na literatura para os cálculos de sobressaturação; no entanto a espécie aquosa de fosfato predominante para valores de pH em torno de 7,4 é  $\text{HPO}_4^{2-}$ , com uma fracção de ionização claramente superior à das outras espécies. Neste contexto foi considerado mais correcto traduzir o processo de formação ou dissolução da HAP pela expressão (II):



que será admitido nos cálculos subsequentes. Recentemente, Karlsson *et al*<sup>14</sup> consideraram igualmente este equilíbrio pelo motivo de se poder considerar entre pH 6 e 10 a espécie  $\text{HPO}_4^{2-}$  como dominante.

A constante para este equilíbrio passa a ser

$$K_{S2} = (a_{\text{Ca}^{2+}})^{10} \times (a_{\text{HPO}_4^{2-}})^6 \times (a_{\text{OH}^-})^8 \quad (2.3)$$

onde devido à substituição de  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{HPO}_4^{2-}$ :

$$K_{S2} = K_{S1} \times \left( \frac{K_w}{K_{a3}} \right)^6 \quad (2.4)$$

Sendo  $K_w$  a constante de ionização da água, que para 37 °C tem o valor  $2,38 \times 10^{-14}$  calculado de acordo com Stumm *et al*<sup>15</sup> e  $K_{a3}$  é a 3ª constante de ionização do ácido fosfórico com o valor  $6,61 \times 10^{-13}$ , para 37 °C. Assim,  $K_{S2}$  tem o valor  $1,18 \times 10^{-126}$ . Será este o valor usado neste trabalho.

Pode rescrever-se a equação (2.3) em termos de concentrações:

$$K_{S2} = (\gamma_{\text{Ca}^{2+}})^{10} \times (\gamma_{\text{HPO}_4^{2-}})^6 \times (\gamma_{\text{OH}^-})^8 \times [\text{Ca}^{2+}]^{10} \times [\text{HPO}_4^{2-}]^6 \times [\text{OH}^-]^8 \quad (2.5)$$

Os valores dos coeficientes de actividade individuais ( $\gamma$ ) podem ser calculados em função da força iónica ( $I$ ) do meio pela equação de Davies, válida para  $I < 0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ :

<sup>14</sup> Karlsson KH, Backman R, Hupa M. An equilibrium study of phosphate precipitation on bioactive glass. *Key Eng Mater* (2002) **218-220**: 103-108

<sup>15</sup> Stumm W, Morgan JJ. Acids and bases. In: *Aquatic Chemistry, an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. Wiley Interscience 2ª ed, NY (1981)

$$\log \gamma = -Az^2 \left( \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,2I \right) \quad (2.6)$$

onde  $A = 1,82 \times 10^6 (\varepsilon T)^{-\frac{3}{2}}$ , sendo  $\varepsilon$  a permissividade relativa do meio e  $z$  a carga do ião.

Como os valores dos coeficientes de actividade só podem ser considerados iguais à unidade para a condição de solução muito diluída, as correcções da actividade são particularmente importantes em soluções de electrólitos, como é o caso das soluções em estudo.

Assim, para 37°C, a sobressaturação relativa de uma solução em relação à HAP é dada por:

$$S_r (\text{HAP}) = \left( \frac{(\gamma_{\text{Ca}^{2+}})^{10} \times (\gamma_{\text{HPO}_4^{2-}})^6 \times (\gamma_{\text{OH}^-})^8 \times [\text{Ca}^{2+}]^{10} \times [\text{HPO}_4^{2-}]^6 \times [\text{OH}^-]^8}{1,18 \times 10^{-126}} \right)^{\frac{1}{24}} - 1 \quad (2.7)$$

Seguindo um raciocínio análogo, a expressão para o cálculo da sobressaturação relativa de uma solução em relação ao OCP a 37°C, é dada por:

$$S_r (\text{OCP}) = \left( \frac{(\gamma_{\text{Ca}^{2+}})^8 \times (\gamma_{\text{HPO}_4^{2-}})^6 \times (\gamma_{\text{OH}^-})^4 \times [\text{Ca}^{2+}]^8 \times [\text{HPO}_4^{2-}]^6 \times [\text{OH}^-]^4}{9,5 \times 10^{-81}} \right)^{\frac{1}{18}} - 1 \quad (2.8)$$

São estas as expressões que serão usadas nos cálculos de sobressaturação relativa, no capítulo 4.

### 2.3. Fosfatos de cálcio de interesse biológico

Como já se referiu, o DCPD, DCPA, ACP, OCP e HAP são os fosfatos de cálcio mais importantes nos processos biológicos ao nível dos ossos, dentes e algumas patologias<sup>16,17</sup>.

Nos pontos seguintes apresentam-se, de forma resumida, algumas características destas fases de fosfato de cálcio que se podem formar *in vivo*, com especial relevo para OCP e HAP, porque são as fases mais abundantes nas condições do trabalho realizado.

#### 2.3.1. Fosfato dicálcico di-hidratado (DCPD) e fosfato de cálcio anidro (DCPA)

O DCPD,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , existe na natureza como o mineral brushite, forma-se normalmente em soluções de fosfato de cálcio ligeiramente ácidas à temperatura ambiente ou abaixo desta. Esta fase apresenta estrutura monoclinica que consiste em cadeias contínuas de grupos  $\text{CaPO}_4$  paralelas e interligadas num arranjo em camadas com moléculas de água entre elas. Pertence ao sistema monoclinico com parâmetros de rede  $a = 5,812 \pm 0,002$ ,  $b = 15,180 \pm 0,003$ ,  $c = 6,239 \pm 0,002 \text{ \AA}$  e  $\beta = 116^\circ 25 \pm 2'$ <sup>18</sup>.

Cristais monoclinicos de DCPD foram encontrados em ossos jovens e em cálculos renais e dentários. Como biomaterial, o DCPD pode ser usado em revestimento de implantes ortopédicos. Uma vez implantado, este material

---

<sup>16</sup> Elliot JC. Carbonate apatites from aqueous systems. In: Elliot JC ed. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates*. Elsevier, Amsterdam (1994)

<sup>17</sup> LeGeros RZ. Biologically relevant calcium phosphates. In: *Calcium phosphates in oral biology and medicine, Monographs in oral science*. vol 15. Myers HM ed, Karger, Basel (1991)

<sup>18</sup> Elliot JC. General Chemistry of the calcium orthophosphates. In: Elliot JC ed. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates*. Elsevier, Amsterdam (1994)

transforma-se numa fase de fosfato de cálcio mais estável nas condições de composição e temperatura do meio<sup>19</sup>.

O DCPA existe na natureza como o mineral monetite, pode formar-se em calos de fractura e possivelmente no osso. É considerado, tal como o DCPD e o OCP, um precursor na formação de apatite. Após implantação este material promove a formação de apatite na sua superfície e o desenvolvimento dos osteoblastos. Esta fase é usada como componente de cimentos ortopédicos baseados em fosfatos de cálcio<sup>20</sup>.

O DCPA pertence ao sistema triclinico com parâmetros de rede  $a = 6,910(1)$ ,  $b = 6,627(2)$ ,  $c = 6,998(2)$  Å e  $\alpha = 96,34(2)$ ,  $\beta = 103,82(2)$  e  $\gamma = 88,33(2)^\circ$ .

Pode ver-se através das curvas da Figura 2.3 que o DCPA e o DCPD são duas fases termodinamicamente mais estáveis para valores de  $\text{pH} \leq 4$  em solução de força iónica  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

### 2.3.2. Fosfato de cálcio amorfo (ACP)

Vários autores<sup>21,22,23,24</sup> referem que em soluções aquosas sobressaturadas contendo apenas iões cálcio e fosfato, a pH elevado e à temperatura ambiente, a formação de HAP é precedida pela precipitação de um fosfato de cálcio amorfo (ACP). Pensa-se que a transformação de ACP em HAP se processe de forma

---

<sup>19</sup> Kumar M, Dasarathy H, Riley C. Electrodeposition of brushite coatings and their transformation to hydroxyapatite in aqueous solutions. *J Biomed Mater Res* (1999) **45**: 302-310

<sup>20</sup> Lebugle A, Sallek B, Tai A. Surface modification of monetite in water at 37°C: characterisation by XPS. *J Mater Chem* (1999) **9**: 2511-2515

<sup>21</sup> Despotović R, Filipović-Vinceković N, Füredi-Milhofer H. Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions. *Calcif Tissue Res* (1975) **18**: 13-26

<sup>22</sup> Eanes ED, Meyer JL. The maturation of crystalline calcium phosphates in aqueous suspensions at physiologic pH. *Calcif Tissue Res* (1977) **23**:259-269

<sup>23</sup> Meyer JL, Weatherall. Amorphous to crystalline calcium phosphate phase transformation at elevated pH. *J Colloid Interface Sci* (1982) **89**: 257-267

<sup>24</sup> VAN Kemenade MJJM, DE Bruyn PL.. A kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions. *J Colloid Interface Sci* (1987) **118**: 564-585

autocatalítica dependente da composição da solução<sup>25</sup>. Várias hipóteses têm sido formuladas relativamente à natureza química desta fase: Posner *et al*<sup>6</sup> sugerem que o ACP é formado por grupos com a composição traduzida pela fórmula  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  distribuídos aleatoriamente na rede tridimensional, com 15 a 20% de água nos espaços intersticiais dos grupos; Meyer e Weatherall e LeGeros<sup>27</sup> sugerem uma composição traduzida pela fórmula  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_{1,87}(\text{HPO}_4)_{0,2} \cdot n\text{H}_2\text{O}$  para o ACP obtido a partir de soluções de sobressaturação elevada; Feenstra e Bruyn propõem uma composição para o ACP com uma relação cálcio/fosfato limitada à gama  $1,20 \leq \text{Ca/P} \leq 1,50$ , de acordo com composições determinadas experimentalmente. Por outras palavras, as duas composições limite seriam  $\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_4$  e  $\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_5\text{H}_3$ , respectivamente.

LeGeros afirma que o ACP não se forma em condições de sobressaturação alta ou baixa quando o pH inicial da solução é inferior a 9. Contudo esta fase pode ser obtida a pH inferior (mesmo a pH 6) e a temperaturas elevadas (60 a 95°C), quando outras partículas tais como  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  ou  $\text{CO}_3^{2-}$  estiverem presentes em solução simultaneamente com os iões  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfato. A formação de ACP nestas condições leva à incorporação de algumas dessas partículas o que pode tornar as moléculas mais ou menos estáveis relativamente à sua hidrólise.

Do exposto conclui-se que, devido à natureza transiente do ACP e à variedade de composições de soluções em que se pode formar, se torna difícil estudar esta fase. No entanto, a estabilidade na composição do ACP numa gama vasta de composições em solução sugere uma unidade estrutural local bem definida. Embora esta ordem dentro da desordem seja uma característica que serve para distinguir o ACP, a natureza transitória do ACP pela sua transformação em fases cristalinas tais como OCP e apatite pode ser de grande importância biológica. Em particular, o papel iniciador do ACP nos processos de mineralização

---

<sup>25</sup> Feenstra TP, Bruyn PL. Formation of calcium phosphates in moderately supersaturated solutions. *J Phys Chem* (1979) **83**: 475-479

<sup>26</sup> Posner AS, Betts F, Blumenthal NC. Formation and structure of synthetic and bone hydroxyapatites. *Prog Cryst Growth Charact Mater* (1980) **3**: 49-64

<sup>27</sup> LeGeros RZ. Formation of calcium phosphates in vitro. In: *Calcium phosphates in oral biology and medicine, Monographs in oral science*. vol 15. Myers HM ed, Karger, Basel (1991)

eleva a importância desta fase de uma mera curiosidade de laboratório para um possível intermediário na calcificação do esqueleto<sup>28</sup>.

### 2.3.3. Fosfato octacálcico (OCP)

O OCP,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  tem uma rede triclinica com os parâmetros de rede,  $a = 19,692(4)$ ,  $b = 9,523(2)$ ,  $c = 6,835(2)$  Å e  $\alpha = 90,15(2)$ ,  $\beta = 92,54(2)$  e  $\gamma = 108,65(1)^\circ$ .

Chickerur *et al*<sup>29</sup> referem que esta fase é termodinamicamente metaestável em relação à HAP, transformando-se em apatite hexagonal. No processo de transformação de OCP em HAP há pequenas alterações estruturais, mantendo esta última os eixos  $b$  e  $c$  com as dimensões próximas das do OCP e a morfologia de placas original dos cristais OCP.

É referido por Chow *et al*<sup>30</sup> que W.E. Brown foi um dos cientistas pioneiros a propor o OCP como fase participante na formação inicial do esmalte dentário. As semelhanças estruturais entre OCP e HAP, a facilidade com que HAP se forma epitaxialmente sobre o OCP, e a evidência da presença de OCP em ossos e dentes, sugerem vivamente que o OCP desempenhe um papel importante como precursor da HAP na mineralização óssea. Além disso, a hidrólise *in situ* de OCP a HAP proporciona uma oportunidade ampla para que impurezas entrem na estrutura apatítica, e é uma causa para a não estequiometria observada nas apatites ósseas<sup>31,32</sup>.

---

<sup>28</sup> Eanes ED. Amorphous calcium phosphate. *In: Octacalcium Phosphate. Monogr Oral Sci.* vol18. Chow LC, Eanes ED eds. Karger, Basel (2001)

<sup>29</sup> Chickerur NS, Tung MS, Brown WE. A mechanism for incorporation of carbonate into apatite. *Calcif Tissue Int* (1980) **32**: 55-62

<sup>30</sup> Chow LC, Eanes ED. Preface. *In: Octacalcium Phosphate. Monogr Oral Sci.* vol18. Chow LC, Eanes ED eds. Karger, Basel (2001)

<sup>31</sup> Graham S, Brown PW. The low temperature formation of octacalcium phosphate. *J Cryst Growth* (1993) **132**: 215-225

<sup>32</sup> Iijima M, Kamemizu H, Wakamatsu N, Goto T, Doi Y, Moriwaki Y. Transition of octacalcium phosphate to hydroxyapatite in solution at pH 7.4 and 37°C. *J Cryst Growth* (1997) **181**: 70-78

A ocorrência do OCP como uma fase intermediária instável durante a precipitação de fosfatos de cálcio está bem estabelecida<sup>33</sup>. Esta fase foi identificada como um dos fosfatos de cálcio que participa nos estados iniciais de mineralização dos tecidos calcificados<sup>34,35</sup> e em algumas calcificações patológicas, como cálculos dentários e renais, coexistindo com HAP<sup>36</sup>.

Como já referido, em condições fisiológicas o OCP é termodinamicamente uma fase metaestável em relação à HAP. Resultados de vários estudos experimentais mostraram que a transição de OCP em apatite ocorre *in situ* e é afectada por vários factores: concentrações totais de cálcio e fosfato em solução; relação molar Ca/P na solução; presença de proteínas; presença de vários iões inorgânicos em solução como carbonato, magnésio e fluoreto, entre outros.

O OCP reúne, portanto, as características de fase precursora: cresce mais rapidamente que a HAP; é metaestável em relação a HAP, pelo que se pode hidrolisar a um produto mais próximo de HAP; o plano (100) do OCP tem uma identidade estrutural notável com os planos (010) e (100) da HAP.

A estrutura do OCP é semelhante à da HAP consistindo em camadas alternadas de dois tipos: uma com a estrutura semelhante à HAP – a camada apatítica; e a outra formada por iões cálcio e fosfato, amplamente espaçados, com moléculas de água dispersas – a camada hidratada. Esta similaridade estrutural entre OCP e HAP sugere a possibilidade de um mecanismo de crescimento epitaxial de cristais de apatite sobre o OCP. Vários trabalhos experimentais referidos por Eidelman<sup>37</sup> sustentam este mecanismo: foram encontradas inclusões de OCP, tipicamente com a espessura de uma célula unitária, no centro da rede de HAP.

---

<sup>33</sup> Tung MS, Eidelman N, Sieck B, Brown WE. Octacalcium phosphate solubility product from 4 to 37°C. *J Res National Bureau Standards* (1988) **93**: 613-624

<sup>34</sup> Barrère F, Layrolle P, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Biomimetic coatings on titanium: a crystal growth study of octacalcium phosphate. *J Mater Sci- Mater Med* (2001) **12**: 529-534

<sup>35</sup> Iijima M. Formation of octacalcium phosphate in vitro. In: *Octacalcium Phosphate. Monogr Oral Sci*. vol18. Chow LC, Eanes ED eds. Karger, Basel (2001)

<sup>36</sup> Bigli A, Cojazzi G, Gazzano M, Ripamonti A, Roveri N. Thermal conversion of octacalcium phosphate into hydroxyapatite. *J Inorg Biochem* (1990) **40**: 293-299

<sup>37</sup> Eidelman N, Eanes ED. Role of OCP in biological processes. In: *Octacalcium Phosphate. Monogr Oral Sci*. vol18. Chow LC, Eanes ED eds. Karger, Basel (2001)

### 2.3.4. Apatites

As Apatites são um tipo estrutural de compostos de fórmula geral  $M_{10}(XO_4)_6Y_2$ .

Contudo, o termo “apatite” tem sido usado frequentemente como sinónimo de fosfatos de cálcio,  $Ca_{10}(PO_4)_6X_2$ , onde  $X = F^-$ ,  $Cl^-$ , ou  $OH^-$ , respectivamente fluoroapatite, cloroapatite e hidroxiapatite.

A HAP pura possui estrutura monoclinica, no entanto a ocorrência de lacunas ou impurezas na posição ocupada pelo ião  $OH^-$  estabiliza o material na forma hexagonal, sendo muito difícil encontrar HAP na forma monoclinica<sup>38</sup>. Na forma hexagonal os parâmetros de rede são  $a = b = 9,418(2)$  e  $c = 6,884(2)$  Å.

No grupo designado por hidroxiapatites incluem-se, para além da HAP estequiométrica, as HAP's deficientes em cálcio e as HAP's substituídas. As apatites biológicas não são puras, a incorporação de iões estranhos na estrutura da HAP deve-se ao facto de a estrutura poder acomodar facilmente uma variedade grande de substituições aniónicas e catiónicas. Esta incorporação afecta a cristalinidade, a morfologia, os parâmetros de rede e, em consequência disso, a estabilidade da estrutura apatítica<sup>39</sup>.

Algumas características inerentes às apatites biológicas são:

- a) não estequiometria, isto é, relação molar Ca/P diferente de 1,67, podendo ser inferior ou superior, dependendo dos defeitos presentes;
- b) inclusão estrutural ou superficial de outros iões tais como  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ .
- c) coexistência com outras fases de fosfato de cálcio

Todas as apatites biológicas contêm carbonato em quantidade variável como substituinte do fosfato na estrutura apatítica. Diferem no tamanho e forma

---

<sup>38</sup> Marques, PAAP. Síntese e Caracterização de Hidroxiapatite sem e com Substituições Catiónicas pelos Iões Magnésio, Sódio e Potássio. Dissertação apresentada na Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre, 1997

<sup>39</sup> Bigi A, Gandolfi M, Gazzano, Ripamonti A, Roveri N, Thomas SA. Structural modifications of hydroxyapatite induced by lead substitution for calcium. *J Chem Soc, Dalton Trans* (1991) 11: 2883-2886

de cristais e noutras propriedades fisico-químicas, por exemplo na resistência à dissolução ácida e estabilidade térmica. De um modo geral as apatites de tecidos patológicos apresentam maior cristalinidade do que as dos tecidos sãos<sup>40</sup>.

A causa principal para a complexidade da composição das apatites reside na estrutura hexagonal da HAP, construída por colunas de catiões divalentes que formam canais paralelos na rede, tornando-a particularmente propensa a substituições iónicas<sup>41</sup>.

A semelhança estrutural entre OCP e HAP e a possível existência de fases de transição torna difícil a caracterização destas fases. Embora o espectro de FTIR da HAP se possa resumir aos modos vibracionais dos grupos OH e PO<sub>4</sub> às seguintes frequências:

- OH<sup>-</sup>:  $\approx 3570$  e  $633 \text{ cm}^{-1}$ ;
- $\nu_3$  do PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>: entre  $1000\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$  e  $962 \text{ cm}^{-1}$ ;
- $\nu_4$  do PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>:  $\approx 605\text{-}568 \text{ cm}^{-1}$ ;
- $\nu_2$  do PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>:  $\approx 460 \text{ cm}^{-1}$ ,

as condições de síntese, a presença de impurezas, mistura de fases, grau de cristalinidade podem dar origem a deslocamentos destes valores de frequências. Na Tabela 2.3 apresenta-se um resumo de valores de frequências de vibração activas em infravermelho de HAP e OCP encontrados na literatura. Na coluna da direita identificam-se as bandas que pertencem unicamente a um dos sólidos. A ausência de referência ao sólido significa que as bandas têm os mesmos valores de número de onda nos dois sólidos.

---

<sup>40</sup> LeGeros RZ, LeGeros JP. Phosphate minerals in human tissues. Nriagu JO, Moore PB eds. Springer, NY (1984)

<sup>41</sup> Heughebaert JC, Zawacki SJ, Nancollas GH. The growth of nonstoichiometric apatite from aqueous solution at 37°C. *J Colloid Interface Sci.* (1990) **135**: 20-31

Tabela 2.3 – Resumo bibliográfico de valores de frequências de vibração activas em infravermelho da HAP e do OCP.

Bandas (cm <sup>-1</sup> )	Interpretação
(3568-3574); 3550, 3536	OH (v <sub>1</sub> )
(2400-3200)	Vibração PO-H
(1635-1640)	H <sub>2</sub> O
(1534-1548); 1450'	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (v <sub>3</sub> ) sítio A
(1350-1540); (1498-1500); (1470-1471); (1465-1467); (1449-1460); (1414-1430); (1417-1419); (1410-1412); 1321	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> sítio B
(1143-1145)	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (v <sub>3</sub> )
1138; 1126; 1108; 1105; 1075	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (OCP)
(1091-1100); 1096; (1088-1092); 1085; (1077-1081); (1052-1065); 1064; (1057-1061); (1048-1053); (1034-1046); (1041-1045); (1032-1034); (999-1004)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (v <sub>3</sub> )
1038; 1022; 1025; 920	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (OCP)
1020	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (em HAP deficientes em cálcio)
(950-1000); (980-982); (959-966);	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (v <sub>1</sub> )
(878-883)	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (v <sub>2</sub> ) sítio A
(872-877); 870	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (v <sub>2</sub> ) sítio B
(866-870)	Vibração P-OH em HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
(629-635)	OH <sup>-</sup>
(629-633); (614-615); (600-608); (590-592); (580-581)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (v <sub>4</sub> )
(540-550); (520-535)	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
(467-472); (446-450); 431-433)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (v <sub>2</sub> )

Nota: estes valores resultam de uma compilação das referências <sup>42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52</sup>

<sup>42</sup> Rehman I, Bonfield W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *J Mater Sci-Mater Med* (1997) **8**: 1-4

<sup>43</sup> Shimoda S, Aoba T, Moreno EC, Miake Y. Effect of solution composition on morphological and structural features of carbonated calcium apatites. *J Dent Res* (1990) **69**: 1731-1740

<sup>44</sup> Rey C, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age. 2: Investigations in the v<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> domain. *Calcif Tissue Int* (1991) **49**: 383-388

<sup>45</sup> Yubao L, Klein CPAT, de Wijn J, Van de Meer S, de Groot K. Shape change and phase transition of needle-like non-stoichiometric apatite crystals. *J Mater Sci-Mater Med* (1994) **5**: 263-268

Do mesmo modo, os difractogramas de raios X podem apresentar misturas das fases OCP e apatite, nas Figuras 2.4 e 2.5 apresentam-se respectivamente, os difractogramas padrão de raios X da HAP e OCP com indicação dos índices das riscas mais intensas.

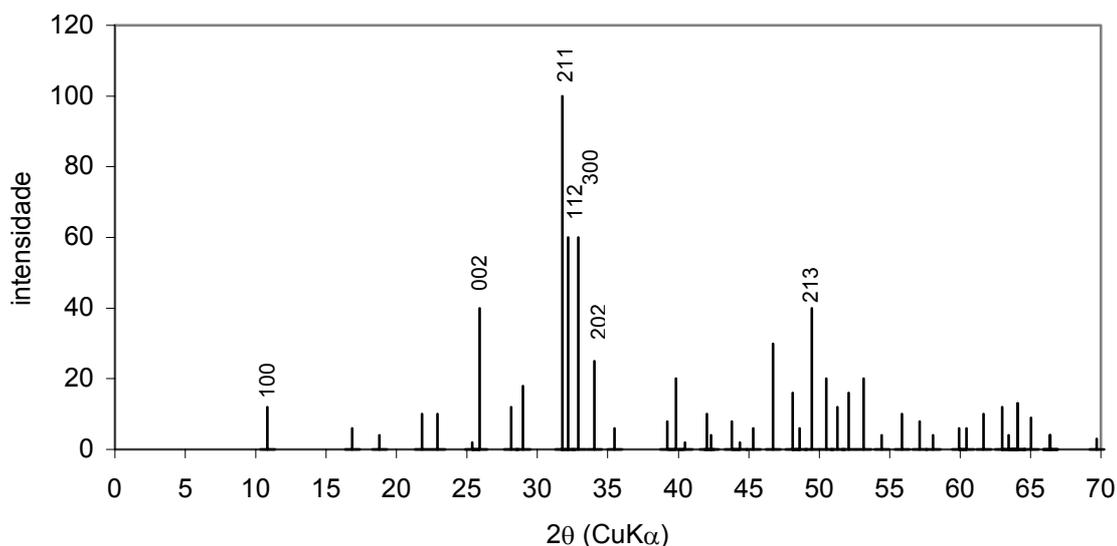


Figura 2.4 - Ficha de difracção da HAP # 9-432

<sup>46</sup> Elliot JC, Holcomb DW, Young RA. Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel. *Calcif Tissue Int* (1985) **37**: 372-375

<sup>47</sup> Gdaleta SJ, Paschalis EP, Betts F, Mendelsohn R, Boskey AL. Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: new correlations between X-ray diffraction and infrared data. *Calcif Tissue Int* (1996) **58**: 9-16

<sup>48</sup> Vilbok H, Knubovets R, Veiderma M. Synthesis and thermal transformations of Ca, Mg-Carbonateapatite. *Proc Estonian Acad Sci Chem* (1992) **41**: 45-51

<sup>49</sup> Ban S, Maruno S. Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in modified body fluid. *Biomaterials* (1998) **19**: 1245-1253

<sup>50</sup> Penel G, Leroy G, Rey C, Sombret B, Huvenne JP, Bres E. Infrared and Raman microspectrometry study of fluor-hydroxy and hydroxy-apatite powders. *J Mater Sci- Mater Med* (1997) **8**: 271-276

<sup>51</sup> Okazaki M. Crystallographic morphology of heterogeneous fluoridated carbonate apatites. *J Dent Res*, (1993) **72**: 1285-1290

<sup>52</sup> Rey C, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age. 1: Investigations in the  $\nu_4$  PO<sub>4</sub> domain. *Calcif Tissue Int* (1990) **46**: 384-394

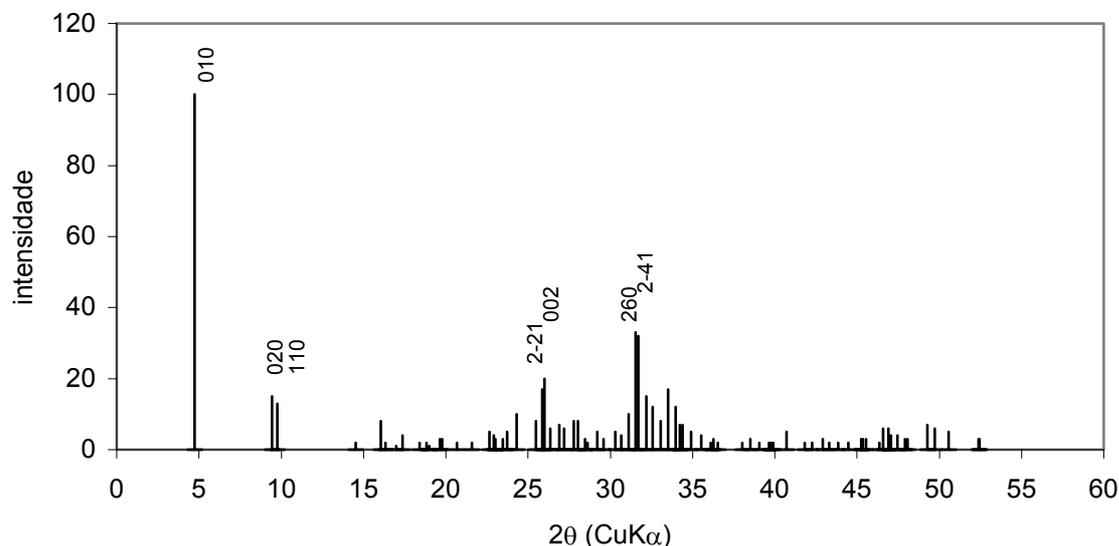


Figura 2.5 - Ficha de difracção do OCP # 26-1056

#### 2.4. Estudos sobre o comportamento de fosfatos de cálcio em soluções de electrólito

Da multiplicidade de trabalhos sobre fosfatos de cálcio existentes na literatura seleccionaram-se aqueles que mais se aproximam do objecto de estudo desta tese e que poderão ajudar na interpretação dos resultados obtidos.

Os mecanismos de formação de uma camada de fosfatos de cálcio entre o implante bioactivo e o tecido ósseo têm sido objecto de estudo de vários investigadores<sup>53,54,55,56,57,58</sup>, mas permanecem, contudo, um pouco no campo da

<sup>53</sup> Bagambisa F B, Joos U, Schilli W. Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* (1993) **27**: 1047-1055

<sup>54</sup> Ohtsuki C, Kokubo T, Yamamuro T. Mechanism of apatite formation on CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glasses in a simulated body fluid. *J Non-Cryst Solids* (1992) **143**: 84-92

<sup>55</sup> Kotani S, Fujita Y, Nakamura T, Yamamuro T, Ohtsuki C, Kokubo T. Bone bonding mechanism of B-tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res* (1991) **25**: 1303-1315

conjectura. Dois modelos complementares e não antagônicos, são actualmente propostos:

1) *Modelo de crescimento epitaxial*<sup>63,59</sup> - este modelo tem em consideração a solubilidade dos fosfatos de cálcio e a sua semelhança estrutural com o osso mineral. A solubilidade pode levar a alterações microestruturais na superfície do implante e a semelhança das redes cristalinas proporcionar crescimento epitaxial. O crescimento epitaxial é um processo controlado termodinamicamente, no qual os cristais hospedeiros (neste caso, os cristais do osso) utilizam uma superfície cristalina, o substrato, (por exemplo, a hidroxiapatite) como local de nucleação e padrão para a deposição e crescimento da sua própria fase. Os cristais hospedeiros crescem em orientações cristalográficas bem definidas, embora possam aparecer conjuntos de cristalitos com orientações cristalográficas diferentes. Quando o cristal hospedeiro e o substrato pertencem ao mesmo material (como é o caso em discussão), o cristal hospedeiro é uma continuação exacta da rede cristalina do substrato. Deste modo, dissolução, reprecipitação e epitaxia serão processos favoráveis ao estabelecimento de uma ligação cerâmico – implante. Contudo nas situações *in vivo* os implantes estão sujeitos a condições biológicas muito complexas e neste caso, o papel da epitaxia não é fácil de definir<sup>60</sup>.

2) *Modelo de dissolução/precipitação*<sup>61,62,63</sup> - este modelo deriva de uma sequência de eventos iniciada por uma descida de pH produzida imediatamente após implantação e resultante de um processo inflamatório. As condições acídicas favorecem a dissolução parcial do cerâmico de fosfato de cálcio provocando uma

---

<sup>56</sup> Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Novel ceramics for biomedical applications. *J.Aust.Ceram.Soc.* (2000) **36**: 37-46

<sup>57</sup> Ylanen H, Karlsson KH, Itala A, Aro HT. Effect of immersion in SBF on porous bioactive bodies made by sintering bioactive glass microspheres. *J.Non-Cryst.Solids* (2000) **275**:107-15.

<sup>58</sup> Kokubo T. Novel bioactive materials. *An Quím Int. Ed* (1997) **93**: 549-555

<sup>59</sup> Mann S. Crystallochemical strategies in biomineralization. In: Mann S ed. *Biomineralization: chemical and biochemical perspectives*. VCH, NY (1989)

<sup>60</sup> Liu Y, Wu W, Sethuraman G, Nancollas GH. Intergrowth of calcium phosphates: an interfacial energy approach. *J Cryst Growth* (1998) **174**: 386-392

<sup>61</sup> LeGeros RZ. Formation of calcium phosphates in vitro. In: *Calcium phosphates in oral biology and medicine, Monographs in oral science*. vol 15. Myers HM ed, Karger, Basel (1991)

<sup>62</sup> Dhert WJA, Thomsen P, Blomgren AK, Esposito M, Ericson LE, Verbout AJ. Integration of press-fit implants in cortical bone: A study on interface kinetics. *J Biomed Res* (1998) **41**: 574-583

<sup>63</sup> Shi D, Jiang G, Bauer J. The effect of structural characteristics on the in vitro bioactivity of hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* (2002) **63**: 71-78

sobressaturação local. Esta sobressaturação acompanhada de uma posterior reposição do pH do meio, origina a formação de uma camada de apatite carbonatada. A composição desta camada, a cinética da sua formação e posterior amadurecimento será dependente da solubilidade do cerâmico e da composição dos fluidos envolventes.

O conhecimento dos mecanismos de biomineralização é de grande importância para o entendimento do processo de crescimento do osso, cuja fracção mineral contém como constituinte maioritário a HAP. A formação de apatite ocorre geralmente através de um ou mais intermediários instáveis, os quais subsequentemente se transformam em fases termodinamicamente mais estáveis, eventualmente em HAP não estequiométrica. A participação destas fases na precipitação da HAP é de interesse considerável, uma vez que a estequiometria do fosfato de cálcio final provavelmente reflecte a extensão da conversão das fases metaestáveis durante a reacção. Os tipos de fosfato de cálcio que se formam são dependentes de várias condições da solução como: pH, temperatura, concentrações iónicas, relação molar Ca/P, e presença de elementos inorgânicos ou orgânicos.

Para além do número elevado de factores que influencia a formação das diversas fases de fosfatos de cálcio na solução de electrólito, há ainda a considerar a natureza da superfície do material em que se pretende testar a mineralização. É importante conhecer em detalhe a sua composição e estado de superfície (rugosidade, filmes adsorvidos).

Devido à complexidade do assunto apresenta-se, de seguida, uma revisão bibliográfica que versa sobre a formação e transformação das várias fases de fosfato de cálcio passíveis de participar nos processos de mineralização em estudo nesta tese.

A maior dificuldade neste tipo de trabalho reside no facto de diferentes investigadores usarem diferentes métodos experimentais, quer de preparação de fosfatos de cálcio, quer de condições de mineralização tornando difícil identificar e relacionar, de forma sistemática, as variáveis intervenientes nos processos.

### 2.4.1. Ausência de proteínas

O estudo do crescimento de fosfatos de cálcio através de métodos de composição constante (CC), pioneiramente desenvolvidos pelo grupo de Nancollas, permite uma aproximação interessante aos processos de mineralização *in vivo*. Nestes métodos a sobressaturação do meio ou a concentração de uma ou mais espécies desejadas podem ser mantidas constantes por intermédio de um sistema de buretas controlado por eléctrodos específicos. A diminuição da concentração dos iões em solução, devida à precipitação, é compensada pela adição de soluções titulantes. São vários os estudos realizados pelo grupo supracitado sobre o crescimento de apatite não estequiométrica em solução aquosa a 37°C. Assinala-se de seguida as conclusões consideradas importantes para o presente trabalho:

i) Estudos realizados a pH 7,4 usando sementes de HAP de relação molar 1,61 e 1,67 permitiram observar uma insensibilidade aparente da composição da apatite precipitada à composição da semente. Este resultado sugere que são as propriedades da solução que influenciam significativamente a estequiometria da fase em crescimento;

ii) Estudos sobre a precipitação de apatites não estequiométricas para valores de pH controlados entre 6,0 e 9,0 permitiram verificar que, nas condições da experiência, a relação molar Ca/P da fase precipitante variou entre 1,49 e 1,65 com a variação de pH referida. Nas condições da experiência, as soluções foram sempre sobressaturadas em relação à HAP. É referido que a desprotonação total dos iões  $\text{HPO}_4^{2-}$  pode não ser possível antes que estes sejam incorporados na rede cristalina. Consequentemente, durante as experiências de crescimento de apatites, a electroneutralidade do sólido é mantida pela exclusão de ambos os iões cálcio e hidróxido quando um ião  $\text{HPO}_4^{2-}$  é incorporado, contribuindo assim para a não estequiometria do produto final. Foi concluído que processos cinéticos

devem ser de importância crítica para o estabelecimento da estequiometria do produto final.

O efeito da composição e estrutura de cerâmicos de fosfato de cálcio no comportamento *in vitro* constituiu objecto de estudo de vários trabalhos publicados por Ducheyne *et al*<sup>64,65,66</sup>. Segundo estes autores as superfícies de cerâmicos de fosfato de cálcio podem ser transformadas em apatite biológica através de uma sequência de reacções que incluem dissolução, troca iónica e precipitação. Em virtude das reacções serem dependentes do material, torna-se importante determinar os efeitos paramétricos. Foram realizados estudos de dissolução de vários cerâmicos de fosfato de cálcio em solução tampão de Tris / HCl a pH fisiológico uma vez que esta solução, segundo os autores, facilita a dissolução inicial dos fosfatos de cálcio. Deste trabalho salientam-se as seguintes conclusões:

i) A variação da estrutura cristalina e da estequiometria dos cerâmicos produz um comportamento de dissolução que varia numa gama vasta;

ii) A velocidade de dissolução dos fosfatos de cálcio monofásicos aumenta na ordem seguinte: HAP < HAP deficiente em cálcio < oxi-hidroxiapatite <  $\beta$ -TCP <  $\alpha$ -TCP < fosfato tetracálcico;

iii) A velocidade de dissolução das misturas bifásicas  $\alpha$ -/ $\beta$ -TCP e fosfato tetracálcico/ $\alpha$ -TCP aumenta com o conteúdo da componente mais solúvel.

É de referir que os materiais usados no trabalho acima referido foram estudados na forma de pó.

Os mesmos autores estudaram o comportamento de várias fases de fosfato de cálcio por imersão numa solução fisiológica simulada com o objectivo de analisar a fase apatítica precipitada. Para tal foram estudados vários pós de HAP com graus de estequiometria e cristalinidade diferentes, oxi-hidroxiapatite,  $\beta$

---

<sup>64</sup> Ducheyne P, Radin, S, King L. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. *J Biomed Mater Res* (1993) **27**: 25-34

<sup>65</sup> Radin SR, Ducheyne P. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation. *J Biomed Mater Res* (1993) **27**: 35-45

<sup>66</sup> S.R. Radin, P. Ducheyne. Effect of bioactive ceramic composition and structure on in vitro behavior. III: Porous versus dense ceramics. *J Biomed Mater Res* (19943) **28**: 1303-1309

e  $\alpha$ -TCP e fosfato tetracálcico. A solução fisiológica simulada usada foi semelhante ao SBF desenvolvido por Kokubo *et al*<sup>67</sup>, com a exceção de que foram dissolvidos  $27 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  ao contrário de  $4,2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Os resultados obtidos permitiram concluir que ocorreu formação de uma fase nova de fosfato de cálcio na superfície de todos os pós em análise. Contudo, a cinética, composição e estrutura das fases novas formadas nas superfícies dos materiais foram significativamente diferentes:

i) nas HAP's deficientes em cálcio e HAP's estequiométricas pouco cristalinas ocorreu a formação imediata de HAP carbonatada por um mecanismo de crescimento de sementes;

ii) nos  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP houve dissolução destas fases seguida de reprecipitação de fases intermediárias (OCP e ou ACP). Subsequentemente, é necessário um largo intervalo de tempo para que se verifique transformação em apatite carbonatada, se existirem condições para que ela ocorra;

iii) por comparação com o comportamento de dissolução em solução tampão de tris/HCl em que a velocidade de dissolução diminuiu na sequência oxi-hidroxiapatite > HAP deficiente em cálcio > HAP estequiométrica, a cinética de deposição de uma nova fase aumentou na sequência HAP deficiente em cálcio > oxi-hidroxiapatite > HAP estequiométrica. Tendo os autores concluído não existir, deste modo e aparentemente, uma correlação entre dissolução e velocidade de formação de novas fases;

iv) no caso das fases de fosfatos de cálcio metaestáveis, a ordem cinética de deposição de novas fases coincidiu com a de dissolução, ou seja, fosfato tetracálcico,  $\alpha$ -TCP >  $\beta$ -TCP. Consequentemente, as cinéticas de dissolução e de formação de novas fases variaram em paralelo. Esta correlação é possível se o mecanismo de deposição de uma fase nova em fosfatos de cálcio metaestáveis for de dissolução e subsequente reprecipitação.

---

<sup>67</sup> Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed Mater Res* (1990) **24**: 721-734

v) O fosfato tetracálcico promove a formação de apatite carbonatada com um teor de carbonato elevado após 1 dia de imersão. O  $\alpha$ -TCP promove a formação de ACP com teor baixo de carbonato e o  $\beta$ -TCP não promoveu a formação de apatite carbonatada num período de 6 dias. Os autores destes trabalhos não apresentaram explicações para os resultados obtidos.

Christoffersen *et al*<sup>68</sup> estudaram a precipitação de fosfatos de cálcio em solução aquosa, a partir de soluções de cloreto de cálcio e hidrogenofosfato de potássio, com relações molares Ca/P de 1,33 e 1,67, a 37°C e pH inicial 7,4. Os resultados obtidos evidenciaram a precipitação inicial de uma fase amorfa, ACP1 formada por partículas esféricas, seguida pela formação e crescimento de outra fase amorfa, ACP2, causando a dissolução da fase inicialmente formada. Do ACP2 resultou crescimento de OCP, o qual finalmente converteu-se em HAP deficiente em cálcio. A distinção entre as duas fases amorfas propostas baseou-se em estudos de microscopia electrónica; a fase inicial formada tem um tempo de vida de cerca de 6 minutos nas condições da experiência. Este estudo está de acordo com a já referida regra de estados de Ostwald.

Rohanizadeh *et al*<sup>69</sup> estudaram processos de dissolução – precipitação de blocos cerâmicos bifásicos de HAP e  $\beta$ -TCP (60 e 40% respectivamente) em SBF por microscopia electrónica de transmissão (TEM). Verificaram a precipitação de cristais em forma de agulha com largura média e espessura de 40 e 6,5 nm, respectivamente. Os cristais do osso têm cerca de 25 nm de largura e 2-3 nm em espessura. A apatite biológica é carbonatada e o carbonato é inibidor do crescimento de cristais apatíticos. Com base nestes argumentos, estes autores concluíram que os cristais formados em SBF têm um conteúdo menor em carbonato. A análise por TEM mostrou que os cristais precipitados se formaram em continuidade com os planos de rede de cristais de HAP, o mesmo não sucedeu na superfície dos cristais de  $\beta$ -TCP. A discussão apresentada baseou-se na teoria de nucleação: para iniciar a nucleação, iões individuais devem ser

---

<sup>68</sup> Christoffersen MR, Christoffersen J, Kibalczyk W. Apparent solubilities of two amorphous calcium phosphates and of octacalcium phosphate in the temperature range 30-42 °C. *J Cryst Growth* (1990) **106**: 349-354

<sup>69</sup> Rohanizadeh R, Padrines M, Bouler JM, Couchourel D, Fortun Y, Daculsi G. Apatite precipitation after incubation of biphasic calcium-phosphate ceramic in various solutions: Influence of seed species and proteins. *J Biomed Mater Sci* (1998) **42**: 530-539

correctamente orientados para formar um núcleo estável que possa crescer pela adição orientada de outros iões. A formação de um núcleo estável requer consumo de energia, a barreira de energia tem de ser ultrapassada para assegurar o crescimento. A concentração de iões e a estabilidade relativa de cada uma das faces cristalinas dos precipitados formados controlam a direcção e a extensão do crescimento. Se já existirem cristais em suspensão, tal como no caso dos cerâmicos bifásicos em estudo, os núcleos desenvolvem-se na superfície dos cristais do cerâmico que actuam como sementes, ou seja, locais de nucleação heterogénea. Uma vez que os precipitados possuem estrutura apatítica ocorre uma correspondência entre a rede de apatite precipitada e a rede de HAP do cerâmico. Deste modo, a formação e crescimento de precipitados de forma orientada a partir dos planos de rede da HAP já existente requer menos energia. Isto pode explicar porque os precipitados foram mais frequentes e mais agregados em torno da HAP do que em torno do  $\beta$ -TCP.

Nos ensaios *in vitro* é desejável manter constante o valor de pH do meio em torno do valor fisiológico. Para tal, pode renovar-se periodicamente a solução em contacto com o material, usar uma técnica de titulação a pH constante ou ainda, usar tampões adequados. Esta última alternativa é a mais simples e menos dispendiosa, daí ser a mais usada. No entanto envolve a possibilidade de afectar as reacções em estudo por participação directa do tampão.

O tampão mais frequentemente usado é o tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Este tampão faz parte do já referido SBF. Soluções simples de Tris/HCl são também frequentemente usadas como meio mineralizante<sup>65,70,71</sup>. Hlaváč *et al*<sup>72</sup> realizaram um estudo sobre o efeito deste tampão na lixiviação de vidros bioactivos. As soluções usadas na lixiviação foram: água destilada, solução de Tris/HCl, SBF preparado sem Tris e SBF com Tris. O pH inicial de todas as soluções, com excepção da água destilada, foi ajustado a 7,45 (temperatura ambiente) ou 7,25 (37 °C). Todas as experiências foram realizadas a 37 °C. Deste

---

<sup>70</sup> Andersson ÖH, Kangasniemi. Calcium phosphate formation at the surface of bioactive glass *in vitro*. *J Biomed Mater Res* (1991) **25**: 1019-1030

<sup>71</sup> Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* (1981) **157**: 259-278

<sup>72</sup> Hlaváč J, Rohanová D, Helebrant A. The effect of the Tris-buffer on the leaching behaviour of bioactive glass-ceramics. *Ceram Silik* (1994) **38**: 119-122

estudo concluiu-se que a presença de Tris na solução aumentava consideravelmente a velocidade de lixiviação dos vidros bioactivos. Segundo estes autores, o efeito do Tris baseia-se na ligação aos iões cálcio através de um complexo solúvel, por uma reacção competitiva com a formação de HAP. Deste modo, o tampão suprime a deposição de um filme secundário protector na superfície lixiviada. Ao mesmo tempo, o tampão mantém o valor de pH da solução a um nível inferior ao verificado na sua ausência o que, dada a dependência elevada da sobressaturação em relação ao pH, resulta na diminuição da tendência da solução para a precipitação de HAP. Os autores afirmam que ambos os efeitos actuam no mesmo sentido, i.e., aumento da intensidade de lixiviação. Contudo este fenómeno pode traduzir-se na diminuição da possibilidade de cristalização de HAP, havendo deste modo um aumento da concentração total dos iões cálcio e fosfato em solução.

#### **2.4.2. Presença de proteínas**

A importância de proteínas na ciência de biomateriais reside em primeiro lugar na sua tendência para serem adsorvidas em superfícies e na presumível influência que estes depósitos proteicos têm nas interacções subsequentes do material com o meio envolvente.

A concentração de proteína adsorvida no sólido é muito mais elevada do que no seio da solução. Outra característica da adsorção proteica é a selectividade, que leva a que, quando existe uma mistura, a superfície do sólido seja mais rica numa proteína do que noutra.

Outro aspecto importante relaciona-se com a irreversibilidade da adsorção proteica em superfícies sólidas, o que leva à imobilização da proteína. Isto significa que quando a concentração em proteína é diminuída, por exemplo, através de imersão da superfície num meio sem proteína, a proteína não sai da maioria das superfícies, mesmo após dias de imersão<sup>73</sup>. A adsorção é irreversível

---

<sup>73</sup> Horbett TA, Ratner BD, Schakenraad IM, Schoen FJ. Some background concepts. *In: Biomaterials science, an introduction to materials in medicine*. Ratner BD Ed, cap. 3 (1996)

a não ser que aconteça alguma alteração drástica no solvente, como por exemplo a introdução de um detergente que se ligue fortemente à proteína assim como ao substrato. O facto de as proteínas serem efectivamente imobilizadas por adsorção altera quaisquer processos que ocorram à superfície do material.

A orientação das proteínas na camada de adsorção também deve ser considerada, uma vez que as proteínas não possuem estrutura e propriedades uniformes. Dependendo das características do substrato e da solução, determinadas sequências de aminoácidos podem adsorver preferencialmente. Uma vez adsorvidas, as proteínas não são livres para rodar devido a interacções de cadeia múltiplas e, deste modo, uma porção da superfície proteica fica exposta para a solução.

*In vivo*, as proteínas desempenham um papel muito importante modificando e determinando as propriedades físico-químicas dos tecidos. Estas macromoléculas contribuem para a resistência dos tecidos mineralizados e estabilização dos conteúdos minerais. As proteínas também interferem nas interacções celulares, as quais desempenham um papel muito importante na regeneração dos tecidos duros.

Do exposto facilmente se conclui que a adsorção de uma camada proteica à superfície dos biomateriais influenciará o processo de biomineralização<sup>74</sup>.

São várias as proteínas presentes no plasma sanguíneo e associadas à matriz óssea. Algumas destas proteínas parecem estar concentradas nos tecidos ósseos devido à capacidade de ligação com a HAP. As proteínas ósseas sintetizadas pelos osteoblastos são importantes, não apenas na formação da matriz orgânica, mas também na formação, crescimento e regulação da dissolução dos cristais de HAP<sup>75</sup>.

Os fluidos biológicos têm concentrações significativas de substâncias de baixo e alto peso molecular que inibem a formação de HAP<sup>76</sup>. Investigações relacionadas com o papel desempenhado por estas substâncias durante a

---

<sup>74</sup> Zeng H, Chittur KK, Lacefield WR. Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials* (1999) **20**: 377-384

<sup>75</sup> Sodek J, Zhang Q, Goldberg HA, Domenicucci C, Kasugai S, Wrana JL, Shapiro H, Chen J. *In: The Bone-Biomaterial Interface*, cap. 7, Davies JE ed. University of Toronto Press (1990)

<sup>76</sup> Martin RI, Brown PW. Formation of hydroxyapatite in serum, *J Mater Sci- Mater Med* (1994) **5**: 96-102

formação da HAP podem ajudar a explicar a inibição da biomineralização natural ou a elucidar os seus efeitos na formação *in vivo* da apatite .

A adsorção de uma camada proteica à superfície dos biomateriais, constitui o primeiro passo de uma série complexa de processos biofísicos e bioquímicos que determinam a resposta biológica do organismo ao material estranho<sup>77</sup>. A diversidade de proteínas presentes nos fluidos biológicos, as diferentes características dos biomateriais e as várias formas de abordagem dos mecanismos de adsorção das proteínas, contribuem para que muito trabalho ainda esteja por realizar neste domínio.

As proteínas adsorvem-se à superfície dos substratos de fosfato de cálcio segundos ou minutos após imersão no fluido biológico<sup>78</sup>. Os factores que determinam quais as proteínas que são adsorvidas ao substrato são complexos; contudo, é aceite que a composição e força iónicas da solução, o pH, a temperatura e a natureza dos grupos funcionais presentes na proteína e no substrato todos eles afectam a cinética de adsorção da proteína.

As proteínas dividem-se em dois grupos: (i) proteínas fibrosas, insolúveis em água e fisicamente resistentes. Estas proteínas são formadas por cadeias polipeptídicas paralelas dispostas em longas fibras ou lâminas. São exemplos de proteínas fibrosas o colagénio (tendões e osso), a queratina (cabelo, pele, unhas) e a elastina (tecido conjuntivo elástico); (ii) proteínas globulares, formadas por cadeias polipeptídicas que se dobram adquirindo a forma esférica ou globular. Estas proteínas na sua maioria são solúveis em água. As proteínas globulares têm uma função dinâmica e incluem a maioria das enzimas, os anticorpos, muitas hormonas e proteínas transportadoras, como a albumina e hemoglobina.

Das várias proteínas presentes no soro sanguíneo, a albumina é a que tem recebido maior atenção, em virtude de ser uma das proteínas globulares mais simples e a mais abundante<sup>79</sup>. Dada a semelhança entre a albumina de origem humana e bovina, esta última é a mais usada por razões de ordem económica.

---

<sup>77</sup> Malmsten M, Lassen B. Competitive adsorption at hydrophobic surfaces from binary protein systems. *J Colloid Interface Sci* (1994) **166**: 490-498

<sup>78</sup> Sharpe JR, Sammons RL, Marquis PM. Effect of pH on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials* (1997) **18**: 471-476

<sup>79</sup> Peters T Jr. Foreword: All about albumin. *In: All about albumin, biochemistry, genetics and medical applications*. Academic Press, San Diego (1992)

Ambas são muito similares na sequência das unidades de aminoácidos. O peso molecular varia entre 68000 e 72000 e possuem 18 aminoácidos em comum, embora distribuídos de modo diferente. Ambas possuem cerca de 100 grupos carboxílicos vindos dos ácidos aspártico e glutâmico e cerca de 100 grupos básicos vindos da arginina, lisina, histidina e tirosina<sup>80</sup>.

Algumas das características mais importantes da albumina são: a sua elevada solubilidade quando comparada com outras proteínas; carga negativa a pH fisiológico, em virtude do seu ponto isoelétrico ser 4,7; tendência para formar ligações fortes com substâncias hidrofóbicas; estabilidade invulgar<sup>81</sup>. A maior parte da albumina presente no organismo encontra-se distribuída por diversos músculos, pele e outros órgãos. No entanto, cerca de 40% circula no plasma sanguíneo, onde apresenta uma concentração que oscila entre 45 e 42 mg·mL<sup>-1</sup>. Além de contribuir significativamente para a pressão osmótica do sangue, esta proteína desempenha ainda uma variedade de funções relacionadas com a manutenção e regulação dos processos vitais. Em virtude da sua elevada solubilidade, e conseqüente mobilidade, a albumina tem um papel fundamental no transporte de metais, lípidos, hormonas e outros componentes do soro.

O estudo da influência da albumina no processo de biomineralização reveste-se de particular importância, uma vez que, além de ser a proteína mais abundante no sangue, é também a principal proteína de ligação ao cálcio presente no plasma, contendo até 19 pontos de ligação a este ião nos seus grupos imidazole<sup>82</sup>.

São vários os estudos realizados sobre a interacção desta proteína com vários materiais e a sua influência nos processos de mineralização. De seguida apresenta-se um resumo bibliográfico sobre este assunto.

Martin *et al* realizaram sínteses de HAP e de HAP carbonatada na presença de soro bovino completo e na presença de albumina. A cinética das reacções foi investigada por calorimetria isotérmica a 38°C. Verificaram que a

---

<sup>80</sup> Krajewski A, Piancastelli A, Malavolti R. Albumin adhesion on ceramics and correlation with their Z-potential. *Biomaterials* (1998) **19**: 637-641

<sup>81</sup> Peters T Jr. Ligand binding by albumin. *In*: All about albumin, biochemistry, genetics and medical applications. Academic Press, San Diego (1992)

<sup>82</sup> Klinger A, Steinberg D, Kohavi D, Sela MN. Mechanism of adsorption of human albumin to titanium *in vitro*. *J Biomed Mater Res* (1997) **36**: 387-392

formação de HAP é fortemente inibida na presença de soro por adsorção dos constituintes do soro à superfície dos reagentes e produtos da reacção. A inibição desta reacção pode ser parcialmente ultrapassada na presença de sementes de HAP ou colagénio. O mecanismo responsável por esta situação permanece por estabelecer. A albumina teve um efeito inibidor semelhante ao do soro, se bem que, quando a reacção foi realizada com concentrações de albumina iguais às presentes no soro, a inibição não foi tão pronunciada. Isto indica que outros constituintes do soro, para além da albumina, possuem um efeito inibidor na formação de HAP. A formação da HAP carbonatada foi cineticamente menos inibida do que a da não carbonatada. Isto parece estar relacionado com o valor de pH mais elevado verificado na reacção de formação da HAP na presença de carbonato. Os autores alegam que este facto pode estar relacionado com alterações conformacionais da albumina a pH superior a 10,3, tornando menor o seu efeito inibidor. (No entanto, este resultado pode não estar relacionado directamente com alterações na molécula de albumina, mas com o facto de a formação de HAP ser favorecida pelo aumento de pH).

Estudos sobre a adsorção isotérmica (a 37°C) da albumina na superfície da HAP foram realizados por Wassel *et al*<sup>83</sup>. Estes autores justificam a adsorção de proteína através da atracção electrostática entre os grupos carboxílicos (-COOH) e os iões cálcio expostos na superfície da HAP e/ou através de troca iónica. Verificaram que quando iões cálcio e fosfato marcados foram adicionados a HAP, apenas os iões fosfato se libertaram por adsorção de proteínas acídicas. Isto sugere que as proteínas acídicas, como é o caso da albumina, trocam com os iões fosfato e são adsorvidas aos iões cálcio. Experimentalmente verificaram que a diminuição do pH do meio provocava um aumento da adsorção e da força da ligação estabelecida entre a proteína e a superfície da HAP. Um aumento da força iónica do meio, por adição de NaCl resultou num ligeiro aumento da adsorção mas com diminuição da força de ligação. A adição de quantidades crescentes de CaCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> resultou, respectivamente, num aumento e numa diminuição da adsorção e da força de ligação.

---

<sup>83</sup> Wassel DTH, Hall RC, Embery G. Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite. *Biomaterials* (1995) **16**: 697-702

As variações de pH causadas pela imersão de alguns cerâmicos de HAP e TCP comerciais em soluções com proteína, são também referidas por Sharpe *et al*<sup>84</sup> como factores que influenciam a adsorção de proteínas, uma vez que estas se ligam aos substratos por combinações de reacções hidrofóbicas e iónicas.

Akazawa e Kobayashi<sup>85</sup> apresentam uma justificação simples para a capacidade de adsorção de proteínas por parte da HAP. No seu modelo estes autores consideraram que na superfície cristalina da HAP ocorrem locais preferencialmente negativos e positivos, respectivamente junto dos iões  $\text{Ca}^{2+}$  e dos iões  $\text{O}^{2-}$  pertencentes ao fosfato. Na adsorção de moléculas de proteína com pesos moleculares elevados, os grupos proteicos carregados negativamente serão adsorvidos nos locais positivos, enquanto que os grupos carregados positivamente serão adsorvidos nos locais negativos. As proteínas acídicas com pontos isoeléctricos inferiores a 7,0 são conhecidas por se adsorverem principalmente nos locais positivos da HAP.

Estudos cinéticos de reacções de superfície de cerâmicos de fosfato de cálcio de composição e cristalinidade variáveis, em soluções com concentrações de electrólito semelhantes às do plasma, na presença e ausência de soro bovino (10% em solução) foram realizados por Radin e Ducheyne<sup>86</sup>. Neste estudo concluíram que a formação de uma camada de apatite carbonatada à superfície de pós de HAP deficiente em cálcio e HAP estequiométrica pouco cristalina, não foi significativamente afectada pela presença das proteínas do soro. Contudo, estudos realizados com cerâmicos de HAP bem cristalizada,  $\beta$ -TCP, oxi-hidroxiapatite, HAP coralina e carbonato de cálcio mostraram um atraso no início da nucleação de novas fases em relação ao ocorrido na ausência de proteína. Não são adiantadas quaisquer explicações sobre possíveis mecanismos envolvidos.

Estudos sobre a influência da adsorção de albumina nos processos de mineralização de substratos de titânio foram realizados em solução de HBSS sem

---

<sup>84</sup> Sharpe JR, Sammons RL, Marquis PM, Hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics can affect the pH of the surrounding medium and consequent protein adsorption. *Fifth world Biomaterials Congress*, Toronto, Canada (1996)

<sup>85</sup> Akazawa T, Kobayashi M. Characterization of differently prepared apatites by adsorption behaviour of albumin. *J Ceram Soc Japan* (1996) **104**: 284-290

<sup>86</sup> Radin S, Ducheyne P. Effect of serum proteins on solution-induced surface transformations of bioactive ceramics. *J Biomed Mater Res* (1996) **30**: 273-279

e com albumina dissolvida<sup>87</sup>. Nos substratos imersos na ausência de proteína verificou-se a formação de uma camada de apatite. Nos substratos imersos na solução com proteína verificou-se a formação de uma camada de fosfato de cálcio muito mais fina do que na ausência de proteína. Deste estudo concluiu-se que a presença de albumina no HBSS inibe o crescimento da camada de fosfato de cálcio nos substratos de titânio, mas não inibe a deposição.

Klinger *et al*, estudaram igualmente mecanismos de adsorção da albumina ao titânio, em particular, a ligação da albumina a partículas de TiO<sub>2</sub> e o efeito da composição iónica do meio e do pH nos processos de adsorção. Os resultados obtidos sugerem que as interacções electrostáticas constituem o mecanismo principal de adsorção da albumina ao titânio. A presença de iões divalentes na superfície do material, como o cálcio e o magnésio afectaram a adsorção de albumina: em condições fisiológicas (pH 7,0) o pré-tratamento dos pós de TiO<sub>2</sub> com iões cálcio ou magnésio resultou num aumento da adsorção da albumina ao titânio. A molécula de albumina liga os iões Ca<sup>2+</sup> aos seus locais por ligação electrostática. Estes iões servem como pontes entre a molécula negativa da proteína e a superfície do TiO<sub>2</sub>.

Zeng *et al*, efectuaram um estudo comparativo sobre a adsorção de albumina nas superfícies de titânio e de cerâmicos de fosfatos de cálcio, tendo concluído que as superfícies dos fosfatos de cálcio adsorvem mais albumina do que a superfície de titânio. A diferença observada pode ser justificada com base nas características electrostáticas das superfícies em análise, visto que o titânio não possui locais de ligação específicos, ao contrário da HAP. Foi ainda verificado que a albumina adsorvida à superfície da HAP perdeu parte da sua estrutura  $\alpha$ -helicoidal. Esta alteração conformacional pode ser também devida às atracções electrostáticas. É possível admitir que as proteínas adsorvidas são mais fortemente ligadas às superfícies de fosfatos de cálcio do que às de titânio devido à diferença entre as forças de atracção e, como resultado, maiores alterações conformacionais podem ocorrer. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de adsorção do ácido poliglutâmico à superfície apatítica. Ocorreram alterações

---

<sup>87</sup> Serro AP, Fernandes AC, Saramago B, Lima J, Barbosa MA. Apatite deposition on titanium surfaces – the role of albumin adsorption. *Biomaterials* (1997) **18**: 963-968

conformacionais desta molécula devido a interacções electrostáticas fortes das cadeias laterais dos grupos funcionais com a superfície<sup>88</sup>.

O trabalho realizado por Krajewski *et al* mostrou que quanto maior for o carácter bioactivo de um material cerâmico, menor é a adsorção de albumina na sua superfície, e quanto menor for a adsorção de albumina mais bioactivo deve ser o material. Este comportamento justifica-se porque uma adsorção forte da albumina (com formação de uma camada proteica compacta e espessa) não permite uma predisposição biológica adequada da superfície do material implantado para a osteointegração.

Combes *et al*<sup>89</sup> estudaram a cristalização heterogénea de OCP na superfície de colagénio desmineralizado tipo I, a partir de soluções supersaturadas metaestáveis, na ausência e na presença de albumina, a 37°C e pH 6,50, usando o método de composição constante. Estudaram a influência da albumina na cinética de nucleação e no crescimento do OCP. Estes autores verificaram dois efeitos distintos em função da concentração de proteína. Em relação à nucleação, os resultados obtidos apontaram para a conclusão de que a ligação das moléculas de albumina à superfície mineral em formação retardava o processo, uma vez que as superfícies dos núcleos em desenvolvimento podiam ser parcialmente inactivadas pela camada proteica. No que diz respeito ao crescimento observou-se um efeito duplo: para concentrações de albumina inferiores a 10 g·dm<sup>-3</sup> o crescimento do OCP foi favorecido, para concentrações superiores foi inibido. A explicação adiantada para o efeito verificado reside no facto de que, na presença de grandes quantidades de albumina, estas moléculas estão disponíveis para bloquear os locais de crescimento activos na superfície dos cristais de OCP em crescimento. Contudo, mesmo nestas condições o crescimento dos cristais nunca pára, apesar de ser retardado, a morfologia em placas, característica do OCP, não é fundamentalmente alterada, o que indica que as moléculas de albumina adsorvidas não constituem uma barreira forte e que as espécies iónicas continuam a ter acesso à superfície mineral. O aumento

---

<sup>88</sup> Poumier F, Schaad PH, Haikel Y, Voegel JC, Gramain PH. Dissolution of synthetic hydroxyapatite in the presence of acidic polypeptides. *J Biomed Mater Res* (1999) **45**: 92-99

<sup>89</sup> Combes C, Rey C, Freche M. In vitro crystallization of octacalcium phosphate on type I collagen: influence of serum albumin. *J Mater Sci-Mater in Med* (1999) **10**: 153-160

da velocidade de crescimento cristalino a concentrações baixas de albumina significa que o número de núcleos estáveis na superfície do colagénio numa solução contendo albumina é maior do que numa solução sem albumina. Várias explicações podem ser propostas: a albumina ligada à superfície do colagénio pode actuar como agente nucleador para o OCP, aumentando o número de núcleos; outra explicação pode residir na diminuição da energia interfacial dos núcleos de fosfato de cálcio devido à adsorção de albumina, e consequentemente, estabilização de núcleos com raios menores. A formação destes núcleos pequenos é facilitada e o seu número pode aumentar rapidamente. Contudo, estes núcleos não são muito activos para crescimento cristalino, uma vez que estão revestidos com albumina, mas podem crescer lentamente durante o período de indução. Para concentrações de albumina baixas, o processo de adsorção não é tão rápido e eficiente para inibir todos os locais potenciais de crescimento. As novas superfícies cristalinas formadas por ambos, desenvolvimento lento de núcleos e processo de multiplicação de núcleos aumentam rapidamente. Consequentemente, como o número de núcleos estáveis é maior, a velocidade de crescimento de cristais é maior do que na ausência de albumina. Para concentrações superiores de albumina, a adsorção de proteína é favorecida sobre a captação de iões. Este mecanismo é suportado, segundo os autores, pela observação de cristais menores, mas mais numerosos, mineralizados nas fibras de colagénio na presença de albumina.

Estudos sobre o efeito da albumina na dissolução de revestimentos de HAP realizados por Bender *et al*<sup>90</sup> mostraram que a libertação de cálcio para a solução foi significativamente maior na presença de albumina, por sua vez, a dissolução do fosfato não foi significativamente alterada. Esta diferença será devida a desigual especificidade da albumina relativamente aos iões cálcio e fosfato.

Os vários estudos aqui apresentados apontam para a complexidade dos processos de mineralização e para a falta de sistematização dos parâmetros

---

<sup>90</sup> Bender SA, Bumgardner JD, Roach MD, Bessho K, Ong JL. Effect of protein on the dissolution of HA coatings. *Biomaterials* (2000) 21: 299-305

intervenientes no processo. Como tal, neste trabalho far-se-á uma tentativa de identificar e sistematizar alguns dos parâmetros químicos intervenientes nos processos de mineralização de fosfatos de cálcio *in vitro*.

---

## SÍNTESE, PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CERÂMICOS

### 3.1. Introdução

Para a concretização dos objectivos deste trabalho foi necessário seleccionar e preparar os materiais de partida para os estudos de mineralização, ou seja, os cerâmicos de fosfato de cálcio.

Para tal, seleccionou-se uma HAP comercial (C) desenvolvida para aplicações em biomateriais. Após uma análise de mercado foi escolhida uma HAP comercializada pela empresa “Plasma Biotal LTD”. As especificações do comerciante indicavam uma HAP de pureza elevada, de granulometria adequada para sinterização e relação molar Ca/P de 1,67, correspondente ao valor estequiométrico.

Pretendeu-se trabalhar também com uma HAP obtida por síntese de via húmida (S), uma vez que, por experiência anterior<sup>1</sup>, se sabia que o grau de pureza das HAP's comerciais normalmente difere das obtidas por síntese laboratorial.

---

<sup>1</sup> Marques, PAAP. Síntese e Caracterização de Hidroxiapatite sem e com Substituições Catiónicas pelos Iões Magnésio, Sódio e Potássio. Dissertação apresentada na Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre, 1997

Para a síntese de HAP em quantidade suficiente para os estudos subsequentes (aproximadamente 1 kg) foi necessário recorrer ao departamento de Química Inorgânica e Bioinorgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade Complutense de Madrid, em virtude de neste departamento existir um dispositivo experimental onde é possível obter quantidades de pó superiores às obtidas no departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Depois de reunidos os dois pós de partida foi fundamental proceder à sua caracterização química e estrutural. Para tal utilizaram-se as técnicas: ICP - espectrofotometria de emissão de plasma de acoplamento por indução realizada num espectrofotómetro Jobin-Yvon70 Plus; FTIR - espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier realizada num espectrofotómetro Mattson 7000; RAMAN – espectroscopia de Raman realizada num Bruker modelo RFS; DRX -difracção de raios X realizada num difractómetro Rigaku PMG-VH com radiação  $\text{CuK}\alpha$ ; SEM/EDS - microscopia electrónica de varrimento com espectroscopia por dispersão de energia realizada num Hitachi 54100.

Após caracterização dos pós de partida, o método de preparação dos corpos cerâmicos foi estudado e optimizado. Procurou obter-se cerâmicos densos, com grau de polimento superficial elevado. Uma vez que o objectivo foi observar alterações superficiais dos materiais, provocadas por reacção em soluções de electrólito, não se pretendeu que parâmetros como porosidade e rugosidade elevada iniciais interferissem no processo.

Depois de optimizado o ciclo de sinterização dos corpos cerâmicos, aplicou-se o mesmo ciclo térmico aos materiais em forma de pó, de modo a uniformizar as condições superficiais e permitir estudar apenas o efeito da granulometria.

### **3.2. Síntese da hidroxiapatite S**

O método de síntese seleccionado foi optimizado por Marques. Os reagentes usados: nitrato de cálcio, hidrogenofosfato de amónio e solução aquosa de amoníaco, de pureza p.a., foram escolhidos por não introduzirem iões estranhos na estrutura da HAP.

Este método consistiu na adição simultânea de  $1,5 \text{ dm}^3$  de solução de nitrato de cálcio  $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  e de  $1,5 \text{ dm}^3$  de solução de hidrogenofosfato de amónio  $0,6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , por intermédio de duas bombas peristálticas, para um vaso reactor com capacidade de  $3 \text{ dm}^3$ , à temperatura de  $90^\circ\text{C}$  e com agitação. Ambas as soluções reagentes foram inicialmente alcalinizadas a pH superior a 9 pela adição de  $100 \text{ cm}^3$  de solução concentrada de amoníaco. O dispositivo usado na síntese está ilustrado na Figura 3.1.

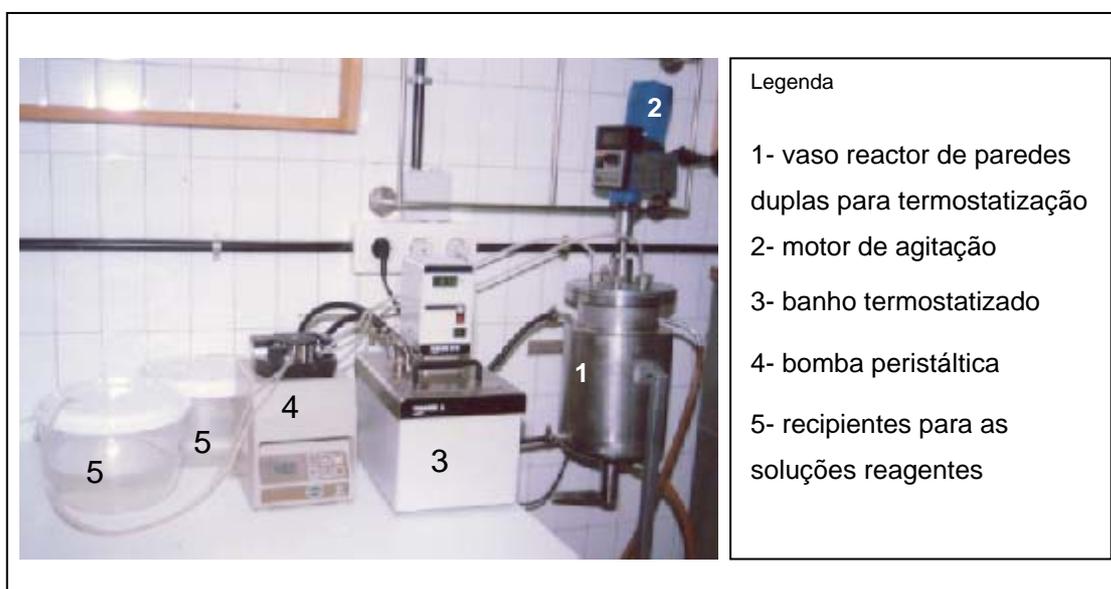


Figura 3.1 - Fotografia do dispositivo experimental usado na síntese da hidroxiapatite S.

O tempo total de reacção (adição de reagentes e envelhecimento do precipitado) foi de 24 horas. No final o produto obtido foi lavado com água destilada e centrifugado sucessivamente até remover restos de amoníaco, sendo depois seco durante 24 horas em estufa a  $100^\circ\text{C}$ . Usando este processo obtém-se cerca de 200 grama de pó por síntese.

Foram realizadas no total 8 sínteses usando reagentes do mesmo lote e realizando todas as operações com os mesmos tempos de execução, de modo a obter o máximo de reprodutibilidade. Os pós obtidos foram caracterizados individualmente por FTIR, DRX e ICP. Após esta caracterização verificou-se não existirem diferenças significativas entre 7 dos pós obtidos tendo-se efectuado a

sua mistura e homogeneização, e rejeitado o outro pó por ter uma relação molar Ca/P de  $1,55 \pm 0,07$ , diferente dos restantes (entre  $1,64 \pm 0,07$  e  $1,66 \pm 0,07$ ). O pó resultante da homogeneização passará a ser designado por S.

De modo a salientar a reprodutibilidade difícil das sínteses de HAP, é curioso referir que cerca de um ano mais tarde foram realizadas mais duas sínteses nas mesmas condições que as anteriores. Os dois pós então obtidos foram considerados semelhantes entre si após análise química e estrutural e misturados, para dar o material daqui em diante designado por *M*. Este material não foi usado nos estudos de mineralização retratados nesta monografia, mas será comparado com *S* na secção dos resultados obtidos por análise química e difracção de raios X e ver-se-á que há diferenças entre *M* e *S*.

### 3.3. Métodos de preparação dos cerâmicos

A HAP C foi fornecida com a granulometria adequada para compactação e sinterização ( $13,41 \text{ m}^2/\text{g}$ ). No caso do pó S testaram-se várias granulometrias obtidas por calcinação do pó inicial a várias temperaturas, tendo-se concluído que a melhor densificação se obtinha após calcinação a  $900 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 hora ao ar.

O pó S calcinado foi peneirado num peneiro de  $33 \text{ }\mu\text{m}$  para uniformizar o tamanho de grão e evitar a formação de zonas com diferente densificação durante a sinterização.

Para a conformação do pó utilizou-se um molde metálico de forma cilíndrica com  $12,5 \text{ mm}$  de diâmetro, lubrificado com dietilftalato para facilitar a prensagem. Após conformação em prensa uniaxial, os discos obtidos foram prensados isostaticamente a  $200 \text{ MPa}$ , sendo de seguida sinterizados.

O ciclo de sinterização foi optimizado de acordo com o objectivo já referido e consistiu de um patamar a  $1300 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 h ao ar, com velocidades de aquecimento e arrefecimento de  $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Durante o aquecimento fez-se um patamar de queima a  $600^\circ\text{C}$  durante 30 minutos com o objectivo de eliminar o dietilftalato usado na lubrificação do molde de prensagem uniaxial.

Os corpos cerâmicos obtidos foram polidos em ambas as faces, sequencialmente em discos de carboneto de silício de 200, 500, 800 e 1200 Grit e em seguida em discos de polímero impregnado com diamante de 3, 1 e 0,5  $\mu\text{m}$ . No final as dimensões dos discos cerâmicos foram de cerca de 9 mm de diâmetro e 1 mm de espessura.

Para a preparação dos pós calcinados utilizou-se o mesmo ciclo térmico, findo o qual os pós foram desagregados em moinho mecânico de ágata.

As características finais dos materiais, rugosidade ( $R_a$ ) dos corpos cerâmicos e área superficial específica dos pós foram determinadas por técnicas de rugosimetria e BET e são apresentadas na tabela 3.1. São ainda apresentados nesta tabela os valores de densidade relativa dos cerâmicos determinados por imersão em dietilftalato segundo o princípio de Arquimedes. O valor de referência usado para a densidade relativa teórica da HAP foi 3,156.

Tabela 3.1 - Valores de rugosimetria ( $R_a$ ) dos cerâmicos polidos e área superficial específica dos pós calcinados e moídos.

Material	Cerâmicos		Pós	
	C	S	C	S
$R_a$ ( $\mu\text{m}$ )	0,01	0,01	---	---
BET ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )	---	---	0,65	0,25
Densidade relativa	97%	96%*	---	---

\*Este valor foi corrigido de acordo com a presença de 14 % de uma segunda fase de  $\alpha$ -TCP de densidade relativa teórica 2,81. A densidade relativa teórica da HAP é de 3,156

É de referir que após calcinação o cerâmico C apresenta cor azul, enquanto que o cerâmico S permanece branco, como se pode observar na Figura 3.2.

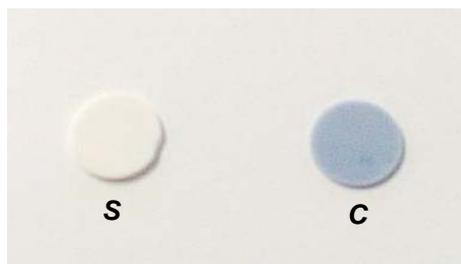


Figura 3.2 - Fotografia dos materiais em forma de corpo cerâmico, C e S.

### 3.4. Caracterização química e estrutural

#### 3.4.1. Análise química por espectrofotometria de emissão por plasma (ICP)

Para determinar a composição química das HAP's por ICP prepararam-se soluções por dissolução ácida ( $\text{HNO}_3$  concentrado) dos pós. Nestas soluções, para além da quantificação do teor de cálcio e fósforo nos pós investigou-se a presença de outros elementos químicos considerados possíveis de estarem presentes como contaminantes.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.2 e mostram que C possui uma relação molar Ca/P estequiométrica, isto é, de 1,67 tal como indicado pelo fabricante. Os pós S e M, com relações inferiores a 1,67, são consideradas sub-estequiométricos. Relativamente ao rastreio de metais presentes nos materiais conclui-se que S tem um grau de pureza superior aos restantes, em particular relativamente a C. Não se poderá ignorar a presença de elementos como o magnésio, ferro, alumínio e manganês na estrutura apatítica de C. A cor azul apresentada por esta HAP após calcinação, será devida a uma alteração do estado de oxidação do manganês<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Saalfeld U, Meenen, NM, Jures TT, Saalfeld H. Solubility behaviour of synthetic hidroxiapatites in aqueous solution: influence of amorphous constituents on pH values. *Biomaterials* (1994) **15**: 905-908

Tabela 3.2 - Composição analítica (ppm) e relação molar Ca/P de C, S e M. (nr significa não realizada)

	Zn	Cr	Ni	Fe	Mn	Mg	Cu	Pb	Ba	Na	Al	Ca/P ±0,07
<b>C</b>	8,8	10	< 5	228	67	1481	6	nr	nr	nr	363	1,67
<b>S</b>	< 1,6	< 5	< 5	1,6	< 1	71	< 2	< 4	< 1	16	< 10	1,65
<b>M</b>	3,2	< 5	< 5	5,3	< 1	995	< 2	< 4	18	67	25	1,63

O pó *M* possui um grau de impurezas superior a *S*. O facto de as sínteses terem sido realizadas com lotes de reagentes diferentes podem estar na origem das diferenças observadas.

### 3.4.2. Análise por difracção de raios X (DRX)

A análise por DRX dos pós não calcinados (*C<sub>0</sub>*, *S<sub>0</sub>* e *M<sub>0</sub>*) mostrou a presença de uma fase cristalina única, HAP, como se pode observar na Figura 3.3.

Após calcinação dos pós a 1300°C, o difractograma de *C<sub>c</sub>* continuou a apresentar apenas HAP, o mesmo não acontecendo com os difractogramas dos outros pós, como se pode observar na Figura 3.4.

No pó *S<sub>c</sub>* detectou-se o aparecimento da fase  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. O pó *M<sub>c</sub>* apresentou uma mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> com predominância da última fase.

O aparecimento de fosfato tricálcico após calcinação dos pós *S* e *M* era esperado, uma vez que as HAP's iniciais são deficientes em cálcio. Esta deficiência, na ausência de outros catiões divalentes na estrutura é compensada pela presença de iões HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

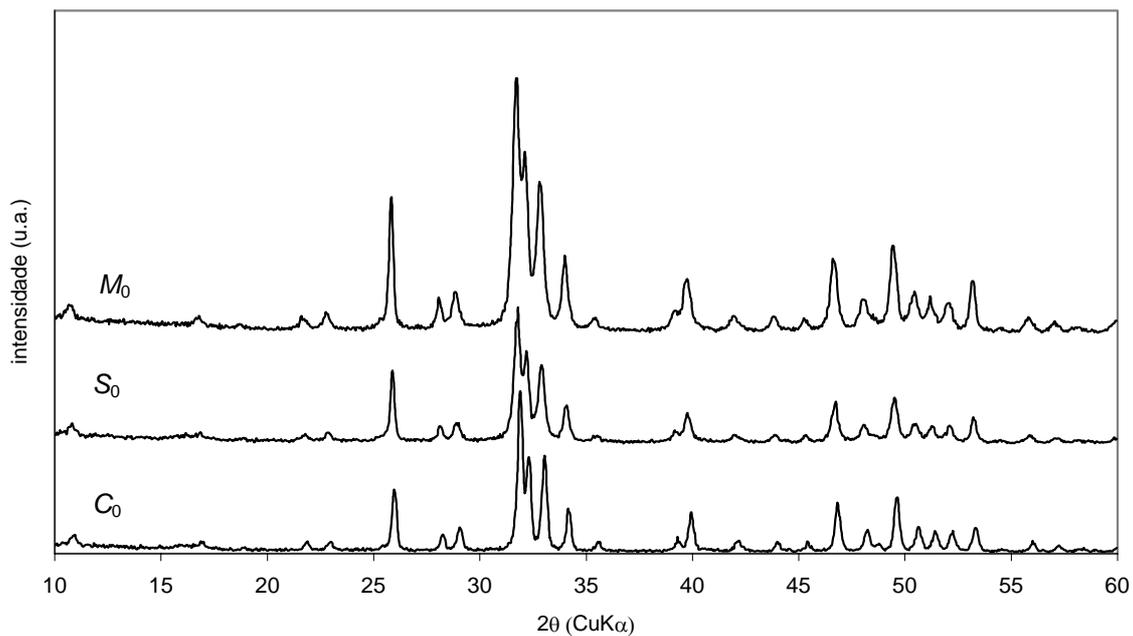


Figura 3.3 - Difractogramas de raios X das HAP não calcinadas  $C_0$ ,  $S_0$ , e  $M_0$ .

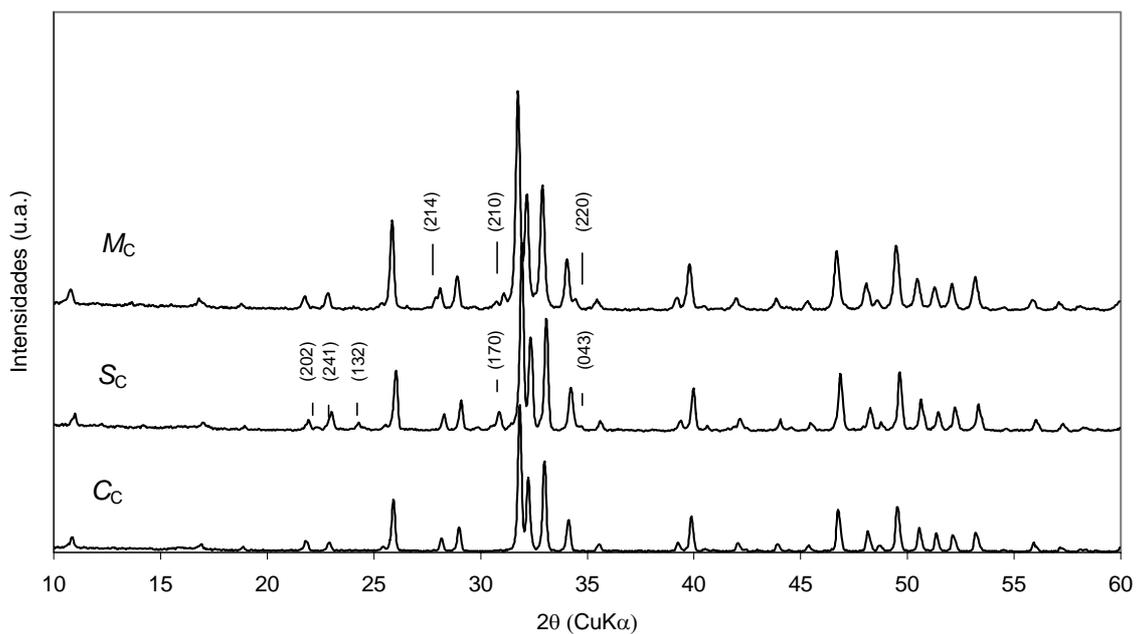
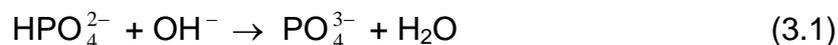


Figura 3.4 - Espectros de difração de raios X dos pós após calcinação a 1300°C,  $C_c$ ,  $S_c$  e  $M_c$ . Estão indicados os índices (hkl) das fases  $\alpha$ -TCP (#29-359) em  $S_c$  e  $\beta$ -TCP (#9-169) em  $M_c$ .

Durante a calcinação, para temperaturas entre 250 e 700°C os iões  $\text{HPO}_4^{2-}$  reagem com os iões  $\text{OH}^-$  apatíticos:



e devido ao consumo de grupos  $\text{OH}^-$  na estrutura apatítica forma-se  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  juntamente com HAP estequiométrica<sup>3,4</sup>.

De acordo com a literatura<sup>5</sup> existem quatro formas polimórficas do trifosfato de cálcio:  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , a fase estável entre 1120 e 1470°C;  $\alpha'$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , estável acima de 1470°C;  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , estável abaixo de 1120°C e  $\beta'$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  estável a pressões elevadas. Admitindo condições de equilíbrio no processamento, seria de esperar que se formasse a fase  $\beta$  e não  $\alpha$ .

Para investigar a temperatura de formação do fosfato tricálcico no pó S realizou-se a aquisição de difractogramas de raios X em câmara de alta temperatura num difractómetro Philips X'Pert com radiação  $\text{CuK}\alpha$ . Nesta técnica a aquisição do espectro é feita a cada uma das temperaturas previamente programadas. O resultado obtido apresenta-se na Figura 3.5. É de assinalar que, neste gráfico, as curvas correspondentes a temperaturas diferentes de 25 °C, se encontram deslocadas para a esquerda do gráfico, devido a expansão da rede cristalina com o aumento da temperatura.

Esta análise permitiu verificar que o aparecimento de  $\alpha$ -TCP ocorre a cerca de 850°C. Como já referido, de acordo com a literatura esta fase formar-se-ia apenas acima de 1120°C.

No entanto alguns investigadores<sup>6,7</sup> referem o aparecimento de ambas as fases ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) quando pós de HAP precipitados a partir de soluções de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  e

---

<sup>3</sup> Rey C, Frèche M, Heughebaert M, Heughebaert JC, Lacout JL, Lebugle A, Szilagy J, Vignoles M. Apatite chemistry in biomaterials preparation, shaping and biological behaviour. In: *Bioceramics 4, Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on ceramics in medicine*. Bonfield W, Hastings GW Tanner KE eds. Oxford, London UK (1991)

<sup>4</sup> Puajindanetr S, Best SM, Bonfield W. Characterization and sintering of precipitated hydroxyapatite. *Br Ceram Trans* (1994) **93**: 96-99

<sup>5</sup> Mathew M, Takagi S. Crystal structures of calcium orthophosphates. In: *Octacalcium phosphate, Monogr Oral Sci*. vol 18. Chow LC, Eanes ED eds. Karger, Basel (2001)

<sup>6</sup> Tas A C, Korkusuz F, Timucin M, Akas N. An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) ceramics. *J Mater Sci- Mater Med* (1997) **8**: 91-96

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> são calcinados acima de 800°C. Sendo estas as soluções usadas nas sínteses de *S* e *M*, os nossos resultados estão de acordo com as referências acima.

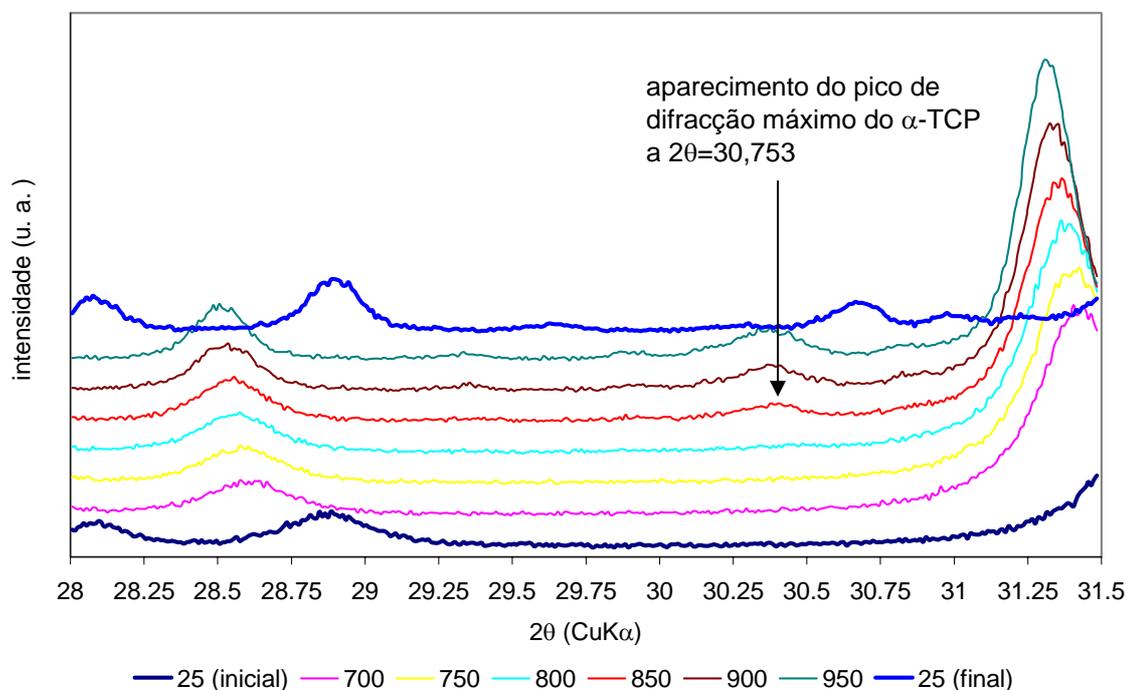


Figura 3.5 - Difractogramas de raios X do pó *S* obtidos em câmara de alta temperatura. A seta indica a posição de aparecimento do pico de difracção da fase alfa-TCP.

É ainda importante discutir de forma breve, uma vez que este assunto não foi objecto de investigação cuidada nesta monografia, a razão do aparecimento da fase  $\alpha$ -TCP no pó *S* e da fase  $\beta$ -TCP no pó *M*. Para tal deve ter-se presente o resultado da análise química de ambos os pós (Tabela 3.2). Uma das desigualdades entre os dois pós reside nos valores da relação molar Ca/P, que no entanto não deverá estar na origem das diferenças observadas uma vez que são próximos. A diferença mais saliente entre os dois materiais reside na concentração de magnésio, podendo ser este elemento o responsável pelo aparecimento de uma fase em detrimento da outra. De acordo com Mathew e

<sup>7</sup> Asada M, Miura Y, Osaka A, Oukami K, Nakamura S. Hydroxyapatite crystal growth on calcium hydroxyapatite ceramics. *J Mater Sci* (1988) **23**: 3202-3205

Takagi uma quantidade pequena de  $Mg^{2+}$  estabiliza a estrutura do  $\beta$ -TCP. Na origem do diferente comportamento durante a calcinação pode estar ainda o grau de cristalinidade dos pós, Sarig *et al*<sup>8</sup> referem que o grau de cristalinidade do material de partida pode influenciar a formação de uma fase em detrimento da outra, sendo a fase  $\alpha$ -TCP favorecida na ausência de cristalinidade.

Em forma de conclusão a formação da fase  $\alpha$ -TCP terá sido favorecida pelo maior grau de pureza do material de partida e eventualmente pelo menor grau de cristalinidade.

Como já foi dito, o pó *M* não foi usado nos estudos de mineralização, tendo sido aqui referido como termo comparativo e auxiliar no estudo do aparecimento da fase  $\alpha$ -TCP. Não se voltará a fazer referência a este pó nesta monografia.

### 3.4.3. Análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Na figura 3.6 apresentam-se os espectros de infravermelho dos pós, antes e após calcinação a 1300°C. Para a aquisição destes espectros prepararam-se pastilhas por prensagem uniaxial após mistura dos pós em brometo de potássio (para uso espectroscópico).

Nestes espectros podem ser identificadas as frequências correspondentes aos modos vibracionais característicos do grupo  $PO_4^{3-}$ , nomeadamente a 1093, 1034, 962, 604, e 565  $cm^{-1}$ <sup>9,10,11,12,13</sup>, bem como frequências características do grupo  $OH^-$  a 3573 e 631  $cm^{-1}$ <sup>9,10,14</sup>. A 1639  $cm^{-1}$  surge uma banda, mais intensa no

---

<sup>8</sup> Sarig S, Apfelbaum F, Kahana F. Upgrading of hydroxyapatite ceramic biocompatibility by incorporation of  $\alpha$ -tricalcium phosphate. *Bioceramics* (1997) **10**: 397-400

<sup>9</sup> Shimoda S, Aoba T, Moreno EC, Miake Y. Effect of solution composition on morphological and structural features of carbonated calcium apatites. *J Dent Res* (1990) **69**: 1731-1740

<sup>10</sup> Rehman I, Bonfield W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *J Mater Sci- Mater Med* (1997) **8**: 1-4

<sup>11</sup> Okazaki M. Crystallographic morphology of heterogeneous fluoridated carbonate apatites. *J Dent Res.* (1993) **72**: 1285-1290

<sup>12</sup> Penel G, Leroy G, Rey C, Sombret B, Huvenne JP, Bres E. Infrared and Raman microspectrometry study of fluor-hydroxy and hydroxy-apatite powders. *J Mater Sci- Mater Med* (1997) **8**: 271-276

<sup>13</sup> Rey C, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age. 1: Investigations in the  $\nu_4$   $PO_4$  domain. *Calcif Tissue Int* (1990) **46**: 384-394

<sup>14</sup> Yubao L, Klein CPAT, de Wijn J, Van de Meer S, de Groot K. Shape change and phase transition of needle-like non-stoichiometric apatite crystals. *J Mater Sci- Mater in Med* (1994) **5**, 263-268

caso dos pós não calcinados, correspondendo possivelmente a água adsorvida<sup>14,15</sup>.

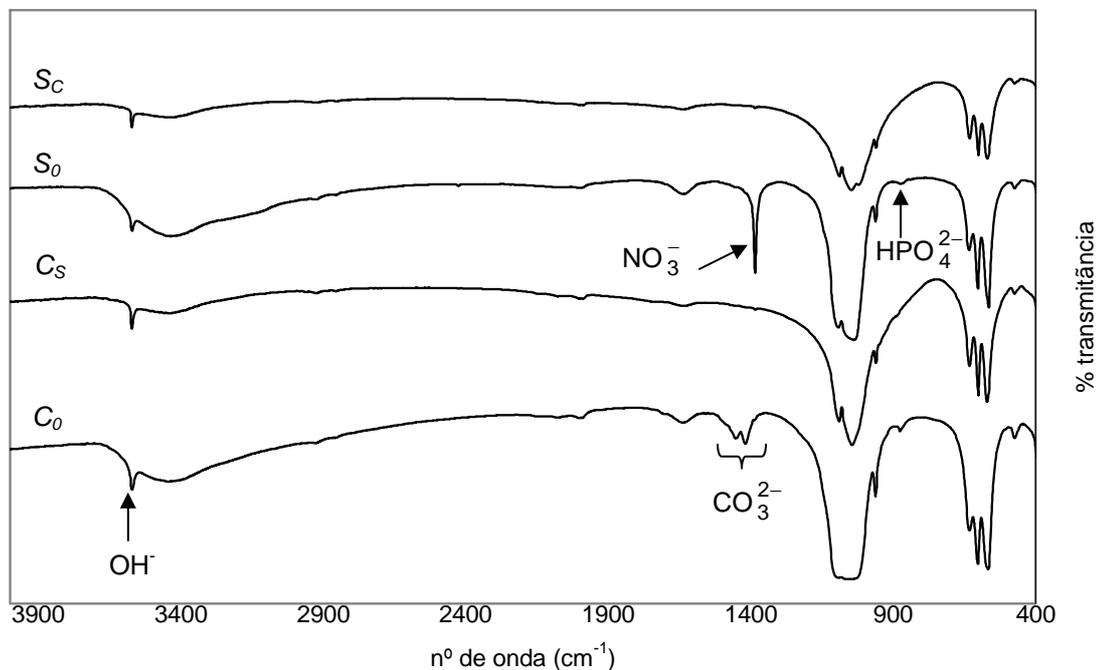


Figura 3.6 - Espectros de infravermelho dos pós antes da calcinação a 1300 °C  $C_0$  e  $S_0$  e após calcinação  $C_C$  e  $S_C$ .

Pode ainda observar-se que os pós não calcinados apresentam bandas extra devidas a impurezas, as quais desaparecem após calcinação. Em  $S_0$  aparece uma banda a  $1385\text{ cm}^{-1}$  devida ao ião  $\text{NO}_3^-$ ; esta impureza decorre do processo de síntese. É possível observar ainda uma banda em torno de  $870\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser devida à presença de grupos  $\text{HPO}_4^{2-}$  ou  $\text{CO}_3^{2-}$ ; no entanto, devido à ausência de outras bandas em torno de  $1400\text{ cm}^{-1}$ , é possível concluir que se trata do ião  $\text{HPO}_4^{2-}$ <sup>16</sup>, o que está de acordo com a relação molar Ca/P deste pó, inferior a 1,67.

<sup>15</sup> Vilbok H, Knubovets R, Veiderma M. Synthesis and thermal transformations of Ca, Mg-Carbonateapatite. *Proc Estonian Acad Sci Chem* (1992) **41**: 45-51

<sup>16</sup> Perdok WG, Christoffersen J, Arends J. The thermal lattice expansion of calcium hydroxyapatite. *J Cryst Growth* (1987) **80**: 149-154

Em  $C_0$  detecta-se a presença de  $CO_3^{2-}$  a 1461, 1425 e 896  $cm^{-1}$  <sup>9,10,17</sup>. Esta contaminação é muito frequente se não forem tidos cuidados em controlar a atmosfera durante o processo de síntese, devido ao  $CO_2$  atmosférico.

Após calcinação apenas se observa a presença de bandas da HAP. A fase  $\alpha$ -TCP não é detectada por esta técnica, uma vez que os modos vibracionais do grupo  $PO_4^{3-}$  do  $\alpha$ -TCP se sobrepõem aos da HAP.

#### 3.4.4. Espectroscopia de Raman

As análises por espectroscopia de Raman dos pós *S* e *C*, antes e após calcinação, estão representados nas Figuras 3.7 e 3.8, respectivamente.

À primeira vista, comparando ambas as figuras, os espectros obtidos parecem ser de materiais distintos. É interessante verificar que apatites com espectros de FTIR muito semelhantes originem espectros de Raman com picos de absorção distintos; no entanto, deverá ter-se em conta que certos modos vibracionais inactivos em infravermelho são activos em Raman. Daí a complementaridade destas duas técnicas.

O apoio bibliográfico relativo a espectroscopia de Raman de fosfatos de cálcio é escasso e de certa forma contraditório. Sauer *et al*<sup>18</sup> apresentam o espectro de Raman de uma HAP padrão, obtida por precipitação em solução aquosa, muito semelhante ao obtido neste trabalho para  $S_0$ . Este espectro é dominado por uma banda forte em torno de 960  $cm^{-1}$  ( $\nu_1$ ) que deriva de um modo de alongamento simétrico do grupo fosfato. Os outros modos vibracionais do fosfato activos em Raman são vistos em torno de 1075 ( $\nu_3$ ), 590 ( $\nu_4$ ) e 453  $cm^{-1}$  ( $\nu_2$ ). Segundo Sauer, a presença de uma pequena banda a 770  $cm^{-1}$  é devida a impurezas originadas pelos reagentes usados na síntese. Esta banda não está presente em  $S_0$ , mas aparece em  $S_C$ .

---

<sup>17</sup> Elliot JC, Holcomb DW, Young RA. Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel. *Calcif Tissue Int* (1985) **37**: 372-375

<sup>18</sup> Sauer GR, Zunic WB, Durig JR, Wuthier RE. Fourier transform raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates. *Calcif Tissue Int* (1994) **54**: 414-420

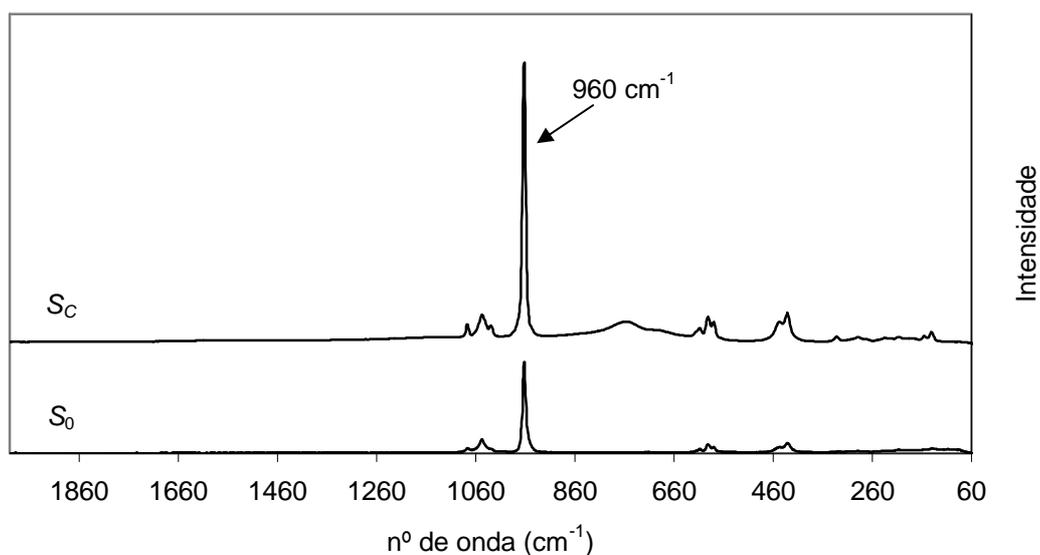


Figura 3.7 - Espectro de Raman do pó S antes ( $S_0$ ) e após calcinação ( $S_C$ ).

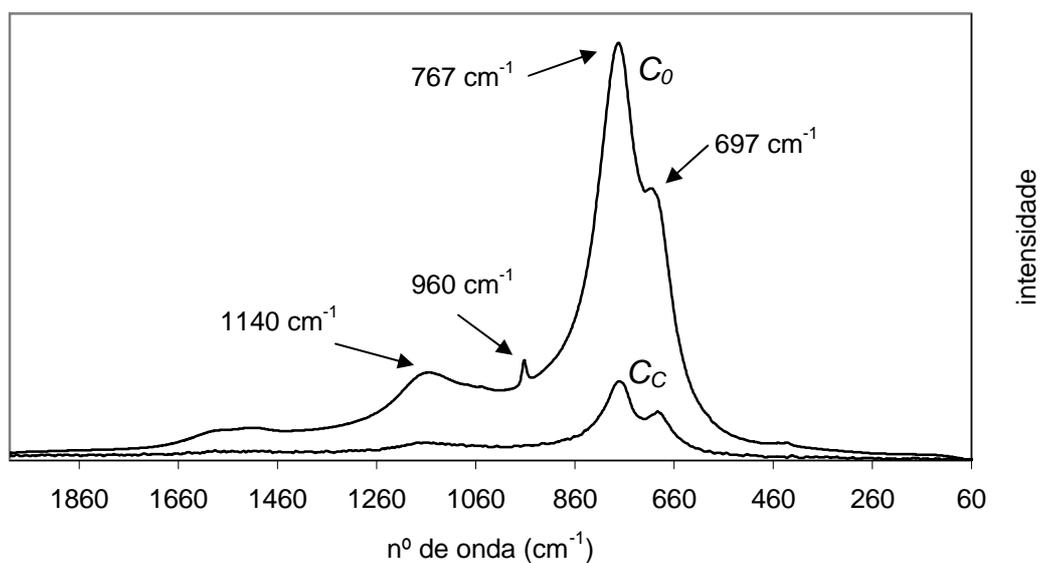


Figura 3.8 - Espectro de Raman do pó C antes ( $C_0$ ) e após calcinação ( $C_C$ ).

Outros trabalhos publicados sobre este assunto<sup>19,20</sup> apresentam, como característico da HAP, um espectro de Raman muito semelhante ao encontrado

<sup>19</sup> Rehman I, Smith R, Hench LL, Bonfield W. Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy *J Biomed Mater Res* (1995) **29**: 1287-1294

<sup>20</sup> Ribeiro CC, Barbosa MA, Machado AASC, Tudor A, Davies MC. Modifications in the molecular structure of hydroxyapatite induced by titanium ions. *J Mater Sci- Mater in Med* (1995) **6**: 829-834

neste trabalho para a HAP C (Figura 3.8). De referir que ambos os espectros publicados são de HAP's comerciais, tal como C. Estes espectros são dominados por bandas em torno de 1114, 774 e 690  $\text{cm}^{-1}$ . No trabalho apresentado por Rehman é feita uma comparação entre os espectros de Raman de HAP sintética e de HAP's obtidas por desproteção de ossos humanos e de ovelha. Os espectros destas últimas são semelhantes aos apresentados na Figura 3.7. A correlação entre os espectros da HAP sintética e natural foi apenas a partilha de um pico a 952  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao alongamento simétrico do fosfato, tendo os autores concluído que o espectro da HAP é dominado por bandas P=O antissimétricas, enquanto que os espectros das amostras ósseas são dominados por bandas P=O simétricas e intensas.

Do exposto, conclui-se que ambos os espectros de Raman obtidos neste trabalho são atribuíveis à HAP, como seria de esperar. Num trabalho realizado por Ferreira<sup>21</sup> sobre síntese e caracterização de fosfatos de cálcio obtiveram-se igualmente os dois tipos de espectros. Observou-se que HAP sintetizada a pH 9 e a 37°C, em presença de dióxido de carbono atmosférico sem adição de iões estranhos apresentava um espectro de Raman semelhante ao da Figura 3.7. As hidroxiapatites obtidas nas mesmas condições de pH e temperatura, em presença de dióxido de carbono atmosférico e dos iões sódio, potássio e cloreto apresentavam espectros idênticos ao da Figura 3.8. A diferença entre espectros, parece, pois, resultar do tipo de iões incorporados na estrutura apatítica.

O facto de a HAP S originar o aparecimento da banda a cerca de 770  $\text{cm}^{-1}$  após calcinação, (aparecimento dos modos vibracionais antissimétricos do fosfato), pode dever-se à incorporação na rede apatítica de alguns iões sódio e magnésio (ver Tabela 3.2) que pudessem estar apenas adsorvidos à superfície dos pós.

O efeito da incorporação de catiões nos locais do ião cálcio poderá ser interpretado, de uma forma muito simples, de acordo com o esquema da Figura 3.9. A presença de um catião de massa e/ou carga diferente, no local de um ião

---

<sup>21</sup> Ferreira BJML. Formação e transformação in vitro da hidroxiapatite e seus precursores. Influência da composição inicial do meio e temperatura, Dissertação apresentada na Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre, 2002

cálcio, provoca diminuição da intensidade dos modos simétricos, com consequente aumento da intensidade dos modos antissimétricos do grupo fosfato.

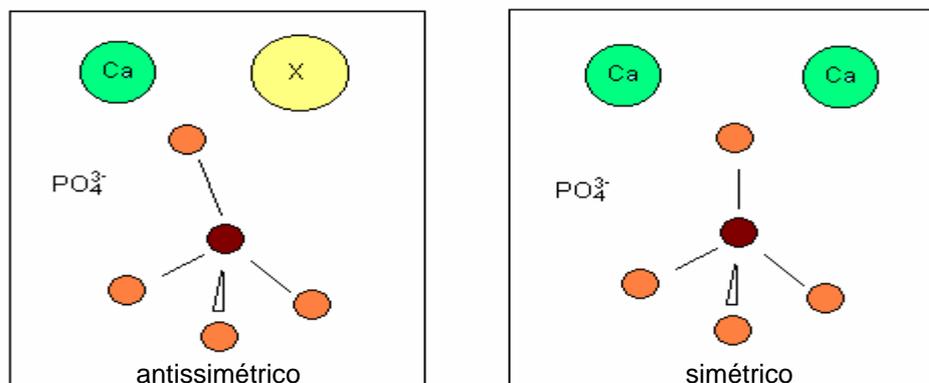


Figura 3.9. Ilustração do efeito de substituições cationicas na geometria do íon fosfato.

Os modos vibracionais antissimétricos do grupo fosfato deverão ser bastante intensos, uma vez que estando em minoria, originam uma intensidade de vibração tão pronunciada.

### 3.4.5. Quantificação da fase $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> no cerâmico S

A quantificação da fase  $\alpha$ -TCP foi efectuada por micrografias após contraste térmico. Para tal os cerâmicos polidos foram inseridos no forno à temperatura de 1300°C durante instantes (aproximadamente 5 segundos). Este tratamento térmico tem como efeito desenvolver as fronteiras de grão. De seguida os cerâmicos foram observados no microscópio electrónico de varrimento tendo sido possível diferenciar os grãos das duas fases uma vez que possuem densidades diferentes. Foram obtidas várias fotografias com a mesma ampliação. Estas fotografias foram sujeitas a um tratamento computadorizado de imagem (programa Quantimet 500) que permitiu quantificar as duas fases por análise de área. Foram observadas no total 7 amostras e o resultado obtido para a percentagem de área de  $\alpha$ -TCP no cerâmico S foi de  $14,24 \pm 1,38$ .

Foi feita uma tentativa de quantificação da fase alfa pelo método de Rietveld multifásico. Para a aplicação deste método, o ponto de partida para os cálculos é o ajuste dos difractogramas teóricos de ambas as fases ao difractograma da amostra. No entanto, tal não foi possível porque o computador usado, embora muito potente, não tem memória suficiente para obter o diagrama teórico da fase alfa, uma vez que se trata de uma estrutura complexa com muitas reflexões.

### 3.5. Conclusões

Após a caracterização efectuada pode concluir-se:

- i) A HAP comercial tem uma relação molar Ca/P estequiométrica, embora o pó original apresente carbonatos. Após calcinação não se verifica o aparecimento de outras fases além da HAP. Esta HAP possui várias impurezas como magnésio, ferro, alumínio e manganês. Esta última confere cor azulada ao material após calcinação. Os cerâmicos apresentam cerca de 97% de densificação;
- ii) O fosfato sintetizado tem uma relação molar Ca/P de 1,65. Por este motivo após calcinação a 1300°C origina cerca de 14% de uma segunda fase,  $\alpha$ -TCP. Esta fase forma-se a cerca de 850°C, temperatura à qual seria de esperar, de acordo com a bibliografia, que se formasse a forma  $\beta$ -TCP. Os resultados obtidos permitem postular que a formação da fase alfa se deva à ausência significativa de impurezas no pó de partida. Os cerâmicos obtidos apresentam cerca de 96% de densificação e cor branca.
- iii) A presença de  $\alpha$ -TCP em S, poderá conferir propriedades interessantes a este material. Yubao *et al*<sup>22</sup> referem a utilização de cerâmicos bifásicos  $\alpha$ -TCP / HAP como sendo biologicamente mais activos do que a HAP

---

<sup>22</sup> Yubao L, Xingdong Z, de Groot K. Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials* (1997) 18: 737-741

como fase única, ou seja, estes cerâmicos bifásicos favorecem a aposição óssea.

---

## ESTUDOS DE MINERALIZAÇÃO

### 4.1. Introdução

Na tentativa de entender os factores intervenientes na mineralização dos materiais em análise estudou-se o comportamento dos pós calcinados e dos corpos cerâmicos em soluções de diferente composição, com complexidade crescente, desde água pura até SBF com albumina. Nestas soluções procurou separar-se os elementos considerados intervenientes principais na mineralização, de modo a tentar discernir qual o seu papel. A composição das soluções usadas é apresentada na Tabela 4.1.

O estudo *in vitro* dos materiais pulverulentos teve por finalidade obter indicações sobre o comportamento cinético dos cerâmicos a longo prazo, tendo presente que a velocidade de qualquer alteração é influenciada pelo estado de divisão do material. Simultaneamente, este estudo teve o intuito de esclarecer o

comportamento de dissolução dos materiais e a influência da composição do meio nesse processo.

Tabela 4.1 - Soluções onde se estudou o comportamento dos pós calcinados (símbolo ✓) e dos corpos cerâmicos (símbolo ☑).

	Água	Água + Tris/HCl	SBF sem cálcio e fosfato	HBSS	SBF sem Tris/HCl	SBF
Sem albumina	✓	✓ ☑	✓	✓ ☑	✓ ☑	✓ ☑
Com 4 mg·cm <sup>-3</sup> albumina				✓ ☑		✓ ☑

Para o estudo do efeito da albumina na mineralização foram realizados dois tipos de teste:

a) dissolução de albumina no meio de mineralização na concentração de 4 mg·cm<sup>-3</sup>;

b) pré-incubação dos cerâmicos numa solução aquosa de albumina de concentração 4 mg·cm<sup>-3</sup> preparada por dissolução da proteína numa solução aquosa 0,9% em NaCl. Os cerâmicos foram imersos nesta solução durante 2 horas, retirados e imediatamente inseridos na solução teste sem albumina.

O teste referido em b) não se aplicou aos pós por ter sido difícil evitar contaminações no manuseamento dos pós depois da pré-incubação.

O estudo da evolução das concentrações iónicas e da sobressaturação das soluções em análise, a identificação das fases de fosfato de cálcio presentes nas camadas de mineralização, e o estudo da influência da composição do meio de mineralização na composição dessas mesmas camadas constituem o objecto deste capítulo.

A caracterização superficial dos cerâmicos por DRX foi realizada em modo de ângulo rasante no difractómetro Rigaku já mencionado no Capítulo 3 e a

análise por FTIR foi realizada em modo ATR (reflectância total atenuada) num espectrofotómetro Perkin Elmer (System 2000) com acessório Split-Pea.

Para auxiliar na análise dos resultados procedeu-se ao cálculo da sobressaturação relativa das soluções em relação a um sólido com a composição da HAP estequiométrica ( $S_{r(\text{HAP})}$ ) e, quando possível, à determinação da sobressaturação relativa da solução em relação ao OCP ( $S_{r(\text{OCP})}$ ) de acordo com a descrição feita em 2.2.1. Calculou-se também (sempre que possível) a relação Ca/P na solução com base nos valores experimentais de concentrações totais destes elementos. Como se verá ao longo deste capítulo e do próximo, a camada superficial resultante da mineralização variou tanto em composição como em cristalinidade, sendo quase amorfa em alguns casos e podendo conter quantidades apreciáveis de carbonato, magnésio e sódio. Assim, a validade dos cálculos de solubilidade relativa efectuados não deverá ser tomada como absoluta; contudo, estes cálculos serviram de orientação para compreender a evolução da composição da solução e comparar os resultados obtidos nos dois materiais.

#### 4.2. Procedimento experimental

Para a realização dos ensaios de mineralização é indispensável trabalhar em condições de assepsia. Para tal, ambos os materiais, pó e corpo cerâmico, foram esterilizados em estufa de esterilização a 150 °C, os recipientes usados nos ensaios foram adquiridos já esterilizados e as soluções foram filtradas através de filtro estéril com 0,22 µm de tamanho de poro. O material restante, usado durante toda a preparação de soluções foi previamente esterilizado por acção de radiação ultravioleta durante 30 minutos.

A preparação da solução de **SBF**, embora simples, requer que a adição dos reagentes que a compõem seja feita segundo a ordem indicada na tabela 4.2. É fundamental que a adição de HCl seja feita previamente à adição dos sais de magnésio e de cálcio, para evitar a precipitação de fosfatos destes catiões. Antes

da adição do ácido o pH da solução encontra-se em torno de 8, após a adição baixa para 1 mantendo-se até adição do Tris, altura em que sobe para valores próximos de 8. O acerto final do pH a 7,4 é feito pela adição do restante HCl (cerca de 10 cm<sup>3</sup>, para 1 dm<sup>3</sup> de solução).

A **água** usada nos ensaios foi ultra-pura com pH inicial  $6,80 \pm 0,05$ .

A solução aquosa **Tris/HCl** foi preparada por dissolução de tris(hidroximetil)-aminometano em água ultra-pura, na concentração usada para preparar o SBF (0,05 mol·dm<sup>-3</sup>), e tamponada a pH 7,4 por adição de solução aquosa de HCl (1 mol·dm<sup>-3</sup>).

Tabela 4.2 - Ordem de adição e quantidade de reagentes usados na preparação de 1 dm<sup>3</sup> de SBF.

ordem	Reagentes	Quantidade
1	NaCl	7,996 g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,350 g
3	KCl	0,224 g
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,228 g
5	HCl (1mol·dm <sup>-3</sup> )	40 cm <sup>3</sup>
6	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,305 g
7	CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,548 g
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071 g
9	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	6,057 g

Nota: A quantidade de HCl adicionada na ordem 5, representa cerca de 80% do volume total usado na preparação do SBF.

A solução de **SBF sem cálcio e fosfato** foi preparada por dissolução de todos os sais que compõem o SBF com excepção dos sais de cálcio e fosfato. Foi tamponada tal como a solução anterior.

A solução **HBSS** é uma solução comercial (Sigma ref<sup>a</sup> H8264), não carecendo de qualquer preparação. Esta solução foi conservada no frio, tal como as restantes soluções preparadas.

Para a preparação da solução de SBF isenta do tampão Tris (**SBF0**) teve-se o cuidado de ajustar o valor de pH a 7,3 por adição de HCl 1 mol·dm<sup>-3</sup> na ordem 5 da Tabela 4.2 e no final, de modo a evitar a formação de precipitados devido à ausência do tampão. A solução ficou perfeitamente límpida após a preparação e permaneceu assim no recipiente armazenado no frio, por períodos máximos de 30 dias.

Cada ensaio foi realizado em 10,0 cm<sup>3</sup> de solução. A quantidade de pó para cada ensaio foi de 250 mg, por ser esta a massa aproximada de cada pastilha de cerâmico. Devido ao polimento, a massa final dos cerâmicos não foi constante, mas oscilou em torno do valor referido. Estas condições de incubação correspondem aproximadamente a uma relação superfície exposta / volume de solução de 20 mm<sup>2</sup>·cm<sup>-3</sup> no caso dos corpos cerâmicos,  $1,7 \times 10^3$  mm<sup>2</sup>·cm<sup>-3</sup> para o pó C e  $6,2 \times 10^2$  mm<sup>2</sup>·cm<sup>-3</sup> para o pó S.

Os tempos de incubação dos pós variaram entre 15 minutos e 30 dias, tendo-se realizado para cada um dos ensaios um mínimo de 3 réplicas. No caso dos corpos cerâmicos os tempos variaram entre 1 e 30 dias. Ao contrário do que aconteceu com os pós, a observação das superfícies dos cerâmicos mostrou falta de reprodutibilidade na mineralização. Esta falta de reprodutibilidade traduziu-se no tempo de detecção inicial da mineralização, em particular na solução de SBF e HBSS com e sem adição de albumina. Por este motivo, realizaram-se nestes casos 5 réplicas. Um factor que poderá influenciar os aspectos acima referidos é a manipulação diferente de pós calcinados e cerâmicos. No caso dos pós a manipulação é reduzida se comparada com os corpos cerâmicos (ver secção 3.3). Estudos de energia livre superficial e determinação de ângulos de contacto estáticos e dinâmicos com estes corpos cerâmicos nestas mesmas soluções mostraram igualmente a falta de reprodutibilidade referida<sup>1,2,3</sup>.

---

<sup>1</sup> Serro APVA, Biomíneralização de materiais de implante: estudos de molhabilidade. Dissertação apresentada na Universidade Técnica de Lisboa para obtenção do grau de Doutor, 2001

Após cada um dos ensaios o pó foi filtrado e seco a 37°C durante uma noite. Os cerâmicos foram instantaneamente imersos em água ultra-pura, para retirar vestígios da solução e de seguida secos nas mesmas condições dos pós. Na solução resultante mediu-se o valor do pH e, posteriormente, a concentração de cálcio e fósforo totais por ICP. Sempre que se verificou contaminação da solução, por aparecimento de cor amarela, a solução e o material incubado foram desprezados e realizado novo ensaio.

Na preparação das soluções com adição de albumina houve o cuidado de agitar lentamente as soluções para evitar a formação de espuma. Na medição do pH nestas soluções houve cuidados adicionais na limpeza do eléctrodo, devido à possível adsorção de proteína na superfície do mesmo. Por isso o eléctrodo foi lavado com uma solução de HCl 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> e água abundante, entre leituras.

Os recipientes empregues para os ensaios com os corpos cerâmicos foram de dois tipos (Figura 4.1). O frasco A (de tampa azul) é de polipropileno e o L (de tampa laranja) é de polietileno. No frasco A a amostra foi suspensa verticalmente por um fio de nylon preso na tampa, enquanto que no frasco L a amostra foi suportada verticalmente pelo fundo cónico, tal como se pode observar na imagem. O posicionamento vertical das amostras pretendeu evitar deposição gravítica na superfície voltada para cima, caso as amostras fossem colocadas na horizontal. Nos ensaios com os pós usou-se apenas o recipiente A.

A utilização dos dois tipos de recipientes não teve nenhum intuito específico; o seu uso foi devido a diferente disponibilidade no laboratório. Contudo este aspecto mostrou-se importante e traduziu-se na diferença de resultados obtidos nos ensaios realizados em recipientes diferentes, tendo-se inclusivamente verificado que a cinética da mineralização era influenciada pelo tipo de recipiente usado. Como se pode observar na Figura 4.1, a diferente geometria dos frascos influencia directamente o acesso da solução ao cerâmico; consequentemente, a migração de iões originada por gradientes de concentração gerados aquando do

---

<sup>2</sup> Marques PAAP, Serro AP, Saramago BJ, Fernandes AC, Magalhães MCF, Correia RN. Mineralisation of two phosphate ceramics in biological model fluids (HBSS and SBF). *J Mat Chem* (2003), DOI:10.1039

<sup>3</sup> Marques PAAP, Serro AP, Saramago BJ, Fernandes AC, Magalhães MCF, Correia RN. Mineralisation of two phosphate ceramics in HBSS: role of albumin. *Biomaterials* (2003) **24**: 451-460

início da mineralização pode também ser influenciada. Os perfis da concentração de cálcio e fosfato total e de pH obtidos foram semelhantes nas séries realizadas nos dois tipos de frascos, mas com atraso no caso dos ensaios nos frascos L. Este atraso variou de solução para solução.

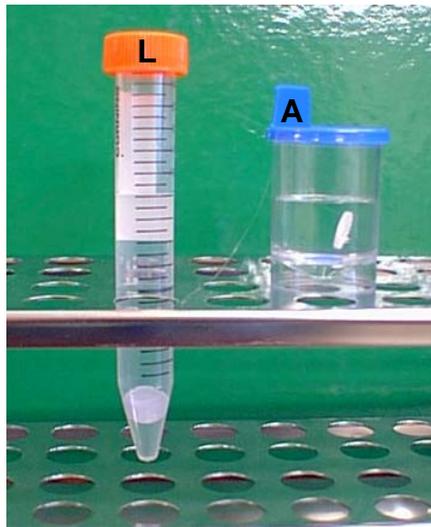


Figura 4.1 – Frascos onde se realizaram os ensaios de mineralização dos cerâmicos. Pode igualmente visualizar-se a posição das amostras.

Os perfis apresentados nos gráficos seguintes foram os obtidos pela média de valores obtidos nas experiências realizadas nos recipientes A.

Para clarificar a leitura nos pontos seguintes os pós serão designados por  $X_p$  e os corpos cerâmicos por  $X_c$ .

### 4.3. Incubações realizadas na ausência de albumina. Resultados experimentais e sua análise

#### 4.3.1 Incubação em água

##### 4.3.1.a – Resultados experimentais

A análise química das soluções resultantes da imersão dos pós em água permitiu verificar dissolução do material sólido. Na Figura 4.2 representa-se a evolução das concentrações totais de cálcio e fosfato e do pH ao longo do tempo nas soluções aquosas em contacto com as amostras  $S_p$  (Figura 4.2A) e  $C_p$  (Figura 4.2B). Nestes gráficos estão representados os valores médios de três réplicas, bem como o desvio padrão respectivo.

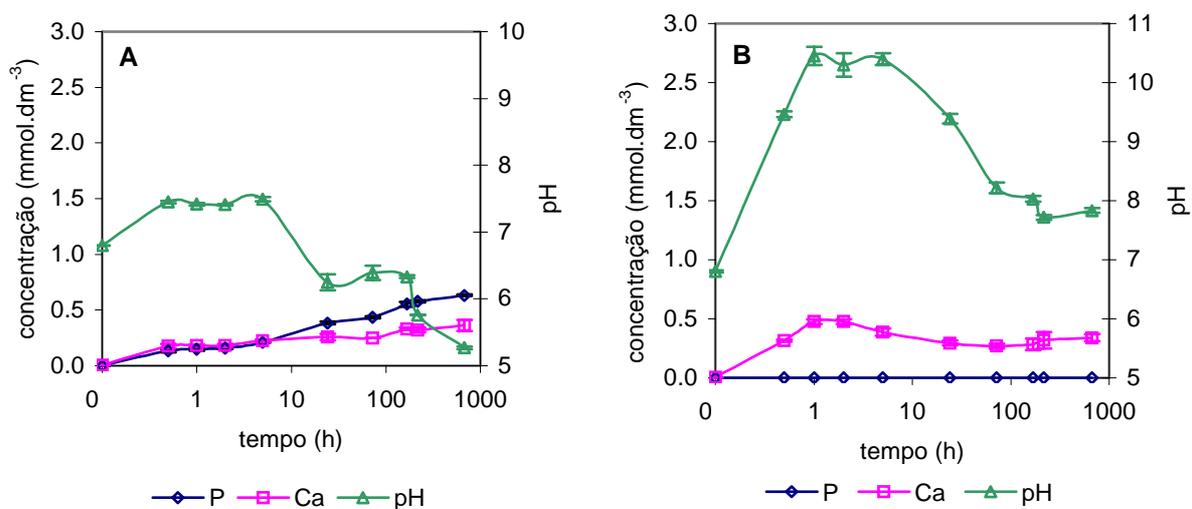


Figura 4.2 - Variação das concentrações totais de cálcio e fosfato e do pH ao longo do tempo de incubação de  $S_p$  (A) e de  $C_p$  (B) em água.

Na Figura 4.3 está representada a evolução da sobressaturação relativa de HAP e de OCP para as amostras  $S_p$ , tal como a relação Ca/P calculada a partir das concentrações totais de cálcio e fósforo. Não foi possível efectuar o mesmo tipo de cálculos para o material  $C_p$ , uma vez que a concentração de fosfato se situou abaixo do limite de detecção da técnica empregue.

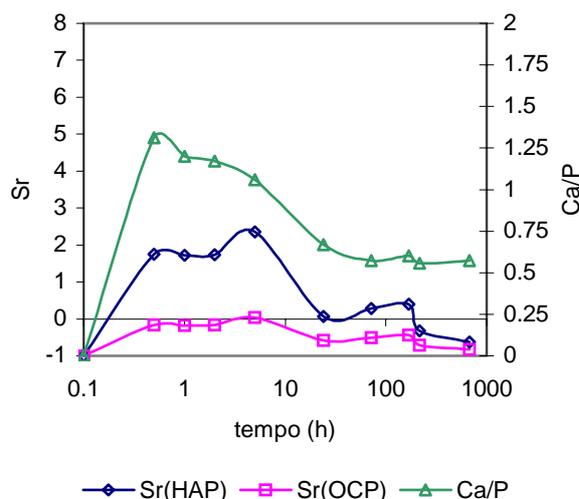


Figura 4.3 – Variação da sobresaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_p$  em água.

Pela observação dos gráficos anteriores é possível verificar que o comportamento de dissolução dos dois pós é significativamente diferente.  $S_p$  apresentou maior dissolução do que  $C_p$ , tendo a solução resultante ficado sobresaturada relativamente à HAP.

No caso de  $S_p$  ocorreu dissolução tendencialmente congruente de cálcio e fosfato durante as primeiras 5 horas de ensaio. Após este tempo a concentração de ambos os iões aumentou, ocorrendo um aumento ligeiro da concentração de fosfato relativamente à de cálcio, com descida simultânea do pH e conseqüente diminuição da sobresaturação.

Logo após 30 minutos detectou-se na superfície de  $S_p$  a presença de cristais em forma de agulhas (Figura 4.4A). A análise destes cristais por EDS revelou apenas a presença de cálcio, fósforo e oxigénio. A relação molar Ca/P determinada nas áreas ocupadas pelos cristais oscilou em torno de 1,6, mas este valor pode apresentar um erro resultante de interferência do substrato, uma vez que o mesmo valor se verificou quer nas superfícies mineralizadas, quer nas sem mineralização visível.

Em  $S_p$  é igualmente visível a dissolução de pequenas porções de grãos, tal como ilustrado na Figura 4.4.B. A análise pontual por EDS nos locais em

dissolução deu uma relação molar Ca/P próxima de 1,5, em contraste com um valor próximo de 1,67 na área circundante. Esta análise permite concluir que os grãos em dissolução são de  $\alpha$ -TCP, o que está de acordo com a maior solubilidade, em soluções aquosas, desta fase relativamente à HAP.

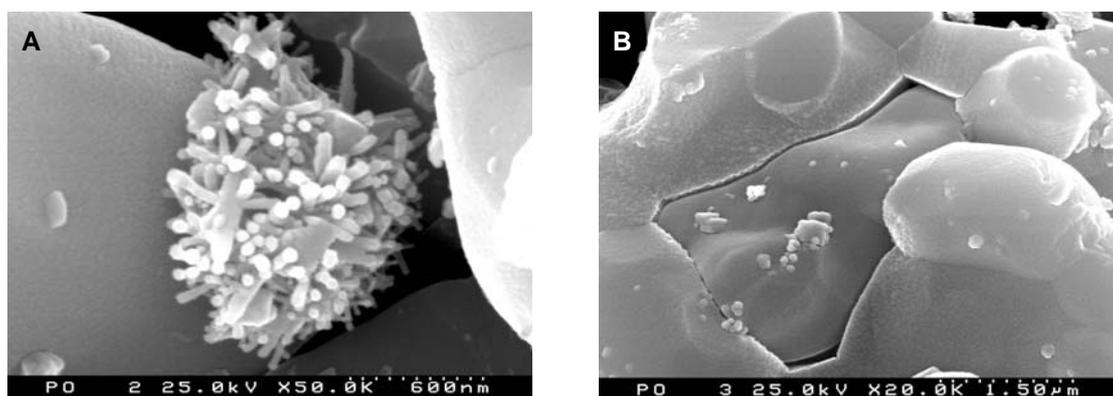


Figura 4.4 - Superfície de  $S_p$  após incubação em água durante (A) 30 minutos e (B) 1 hora.

A observação da superfície dos pós para tempos de incubação mais longos mostrou que não houve grande evolução do processo de mineralização, tal como seria de esperar pelo perfil de sobressaturação relativa em HAP. Esta situação está ilustrada na Figura 4.5, onde se pode observar o aspecto da superfície dos pós para 28 dias de imersão.

A análise por DRX dos pós incubados não detectou a presença de qualquer fase adicional. Entretanto foi possível presenciar diminuição da intensidade das riscas de  $\alpha$ -TCP ao longo do tempo de incubação, até ao seu desaparecimento. Esta observação permitiu não só corroborar o resultado da análise obtida por SEM / EDS (dissolução dos grãos de  $\alpha$ -TCP), como também permitiu detectar o tempo para o qual esta fase se dissolveu totalmente, e que neste caso ocorreu no intervalo entre 5 e 24 horas.

A técnica de FTIR não foi sensível às alterações superficiais dos pós, não se tendo verificado qualquer alteração nos espectros ao longo do tempo.

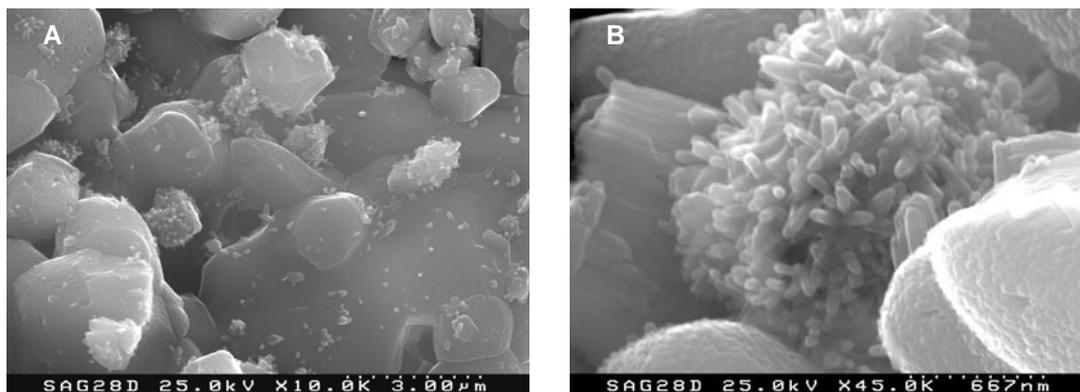


Figura 4.5 - Micrografias da superfície de  $S_p$ , com ampliação de 10 vezes (A) e de 45 vezes (B), após incubação em água durante 28 dias.

O pó  $C_p$  originou uma reacção alcalina em contacto com a água: em 30 minutos o pH subiu de 6,80 (valor inicial da água) para 9,46. Esta subida de pH foi acompanhada por dissolução de cálcio, enquanto que a concentração de fosfato em solução ficou sempre abaixo do limite de detecção da técnica. A justificação mais provável para este comportamento estará na presença de uma pequena quantidade de óxido de cálcio, embora não se tenha detectado esta fase no pó calcinado (DRX realizado em câmara de alta temperatura) nem tão pouco de hidróxido de cálcio resultante duma possível hidratação do óxido (DRX normal).

Por observação no microscópio electrónico não se detectou precipitação na superfície de  $C_p$ , o que está de acordo com a ausência de sobressaturação no meio.

#### 4.3.1.b – Análise dos resultados

De acordo com a literatura<sup>4,5</sup> a formação de óxido de cálcio ocorre em HAP's com relação Ca/P superior a 1,67 durante o aquecimento a temperaturas superiores a 550 °C. Esta relação Ca/P é encontrada em HAP's carbonatadas tipo

<sup>4</sup> Ababou A, Assolant B, Heughebaert M. Influence des conditions de calcination sur l'évolution morphologique de l'hydroxyapatite. *Ann. Chim. Fr* (1994) **19**: 165-175

<sup>5</sup> Elliot JC. Carbonate apatites from aqueous systems. In: Elliot JC ed. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates*. Elsevier, Amsterdam (1994).

B (substituição de  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$ ). No decorrer do aquecimento os grupos carbonato decompõem-se com libertação de  $\text{CO}_2$  e formação de  $\text{CaO}$ . No que diz respeito à HAP  $C_p$ , quer a informação do fabricante quer a análise realizada por ICP indicaram uma relação Ca/P de  $1,67 \pm 0,07$ . Entretanto a análise por infravermelho mostrou a presença de grupos carbonato. Não é possível estabelecer se a carbonatação verificada é apenas superficial ou se os grupos carbonato fazem parte da estrutura. Neste último caso a relação Ca/P poderá ser ligeiramente superior a 1,67, no limite do erro das determinações, justificando assim o comportamento deste material.

Comparando os resultados obtidos pela imersão dos dois pós em água verificou-se que  $S_p$  é mais reactivo do que  $C_p$ . A existência de cristais após 30 minutos de imersão indica que a solubilidade do  $\alpha$ -TCP proporciona localmente uma sobressaturação crítica ( $S_c$ ) relativamente à HAP, adequada à nucleação e crescimento de cristais. Este fenómeno poderá ser local, uma vez que a  $S_{r(\text{HAP})}$  global máxima verificada (1,99) é baixa se comparada com o valor de  $S_{r(\text{HAP})}$  de 3,17 no SBF (solução metaestável). No entanto, como neste caso se reúnem as condições necessárias à ocorrência de nucleação heterogénea, o que não acontece numa solução aquosa simples de SBF, a  $S_{r(\text{HAP})}$  verificada pode ser suficiente para que se verifique nucleação e crescimento de cristais de HAP. A morfologia acicular dos cristais e a relação Ca/P em torno de 1,6 está de acordo com a cristalização de uma fase apatítica<sup>6, 7</sup>.

Na tentativa de interpretar as formas das curvas representadas nas Figuras 4.2A e 4.3, que traduzem o comportamento do sólido  $S_p$  em solução, consideraram-se etapas distintas durante a dissolução e cristalização de fases apatíticas.

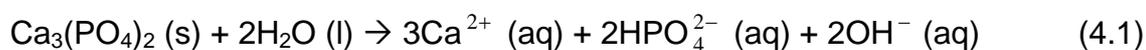
A primeira etapa, definida para  $t < 30$  minutos, corresponde à zona do gráfico onde há um aumento das concentrações totais de cálcio e de fosfatos

---

<sup>6</sup> Brown PW, Hocker N, Hoyle S. Variations in solution chemistry during the low temperature formation of hydroxyapatite. *J Am Ceram Soc* (1991) **74**: 1848-4854

<sup>7</sup> Moreno EC, Varughese K. Crystal growth of calcium apatites from dilute solutions. *J Cryst Growth* (1981) **53**: 20

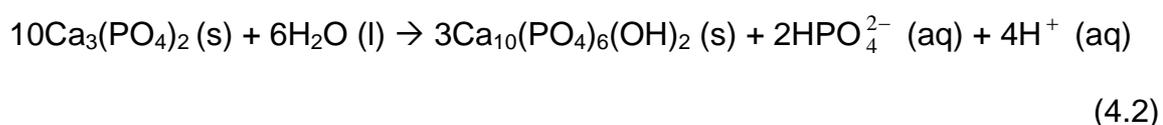
dissolvidos na solução assim como aumento do pH. Este processo pode traduzir-se pela equação química 4.1:



que explica a existência de uma concentração de íons cálcio ligeiramente superior à de íons fosfato. A relação Ca/P verificada após 30 minutos foi de 1,3. Durante esta dissolução a sobressaturação foi aumentando, até se iniciar a nucleação. O processo de nucleação, e mesmo de crescimento de cristais de HAP à superfície do grão, ocorreu para um tempo inferior a 30 minutos, visto que para este tempo já são visíveis (Figura 4.4A).

No intervalo de tempo entre 30 minutos e 5 horas a composição da solução não sofreu alterações apreciáveis, mantendo-se praticamente constante a sobressaturação relativa em HAP. Durante este intervalo de tempo deve ter ocorrido, simultaneamente, a dissolução do  $\alpha$ -TCP, a multiplicação de núcleos e até o crescimento de cristais da fase apatítica.

Tendo-se dissolvido todo o  $\alpha$ -TCP, algures entre 5 e 24 horas, o processo de crescimento da fase apatítica terá continuado até a solução atingir um equilíbrio metaestável com uma fase apatítica. Após a dissolução total do  $\alpha$ -TCP ocorreu diminuição dos valores de pH da solução aquosa, uma diminuição acentuada dos valores de sobressaturação relativa e uma inversão na concentração total de íons cálcio e fosfato dissolvidos. A inversão das concentrações totais destes íons, assim como o abaixamento do pH podem ser explicados através da equação 4.2 que pretende traduzir o processo de transformação de fases



Na escrita da equação química neste formato considerou-se que a fase sólida formada era a HAP estequiométrica, o que é pouco provável. De facto a estequiometria da HAP aumenta com o aumento de pH e a solução resultante dos processos descritos na etapa 3 tem um pH relativamente baixo.

Após 24 horas de ensaio, deverá ocorrer um período de indução para a conversão da fase apatítica, entretanto formada, numa apatite mais estequiométrica ou simplesmente um processo de reestruturação da rede da própria HAP.

No gráfico da Figura 4.2B, respeitante à incubação do sólido  $C_p$ , há uma grande variação do pH do meio sem que haja uma variação acentuada da composição da solução em termos de concentrações totais de cálcio e fosfatos. Havendo no sólido iões como  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ , é provável que estes iões existam também na solução aquosa. A sua oxidação, respectivamente, a  $Fe^{3+}$ , e  $Mn^{4+}$ , com conseqüente hidrólise e formação das espécies  $Fe(OH)^{2+}$ ,  $Fe(OH)_2^+$ ,  $Fe(OH)_3$  e  $MnO_2$  origina a libertação de iões  $H^+$  que poderão contribuir para o abaixamento do pH.

### **4.3.2. Incubação em solução tampão de Tris / HCl**

#### **4.3.2a – Resultados Experimentais**

A variação das concentrações totais de cálcio e fosfato e do pH ao longo do tempo de imersão é apresentada na Figura 4.6 para os pós e na Figura 4.7 para os cerâmicos.

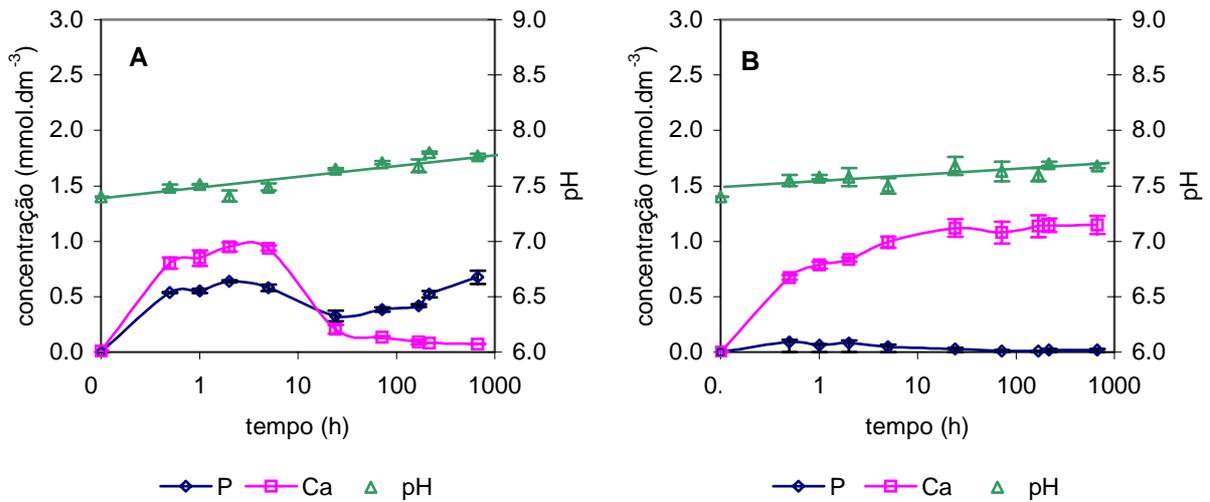


Figura 4.6 - Variação das concentrações totais de cálcio e fósforo e do pH ao longo do tempo de incubação de S<sub>p</sub> (A) e de C<sub>p</sub> (B) em solução aquosa de Tris/HCl.

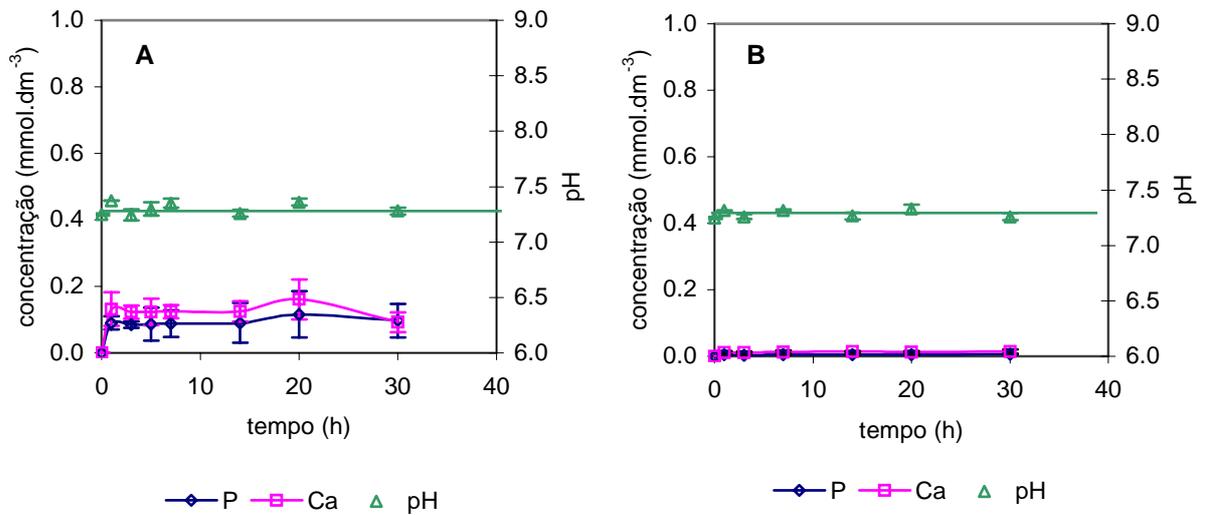


Figura 4.7 - Variação das concentrações totais de cálcio e fósforo e do pH ao longo do tempo de incubação de S<sub>c</sub> (A) e de C<sub>c</sub> (B) em solução aquosa de Tris/HCl.

As curvas de variação de S<sub>r(HAP)</sub>, S<sub>r(OCP)</sub> e do quociente Ca/P na solução Tris/HCl estão representadas na Figura 4.8 para os pós e na Figura 4.9 para os cerâmicos.

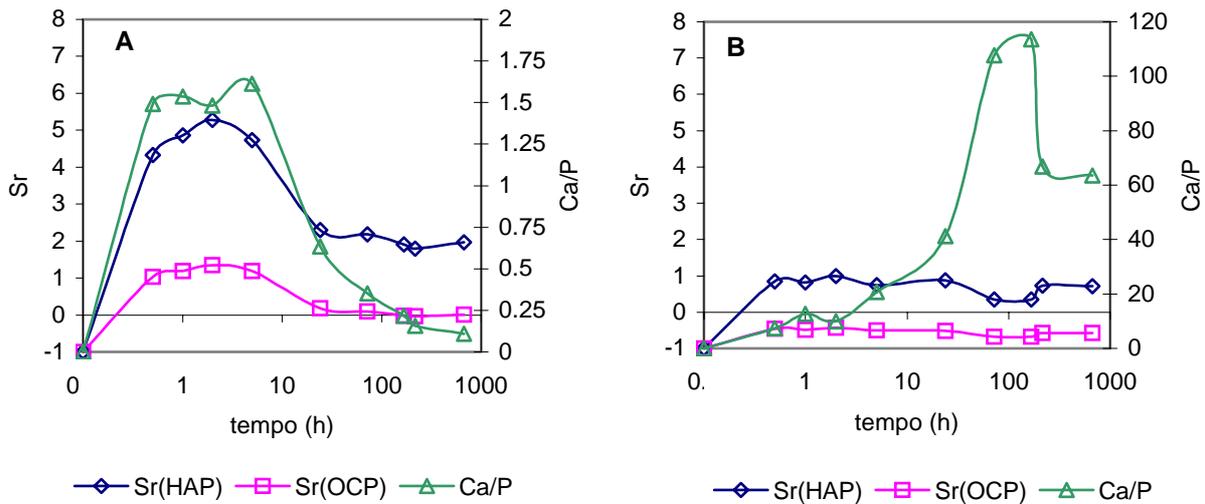


Figura 4.8 – Variação da sobresaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_p$  (A) e  $C_p$  (B) em solução aquosa de Tris/HCl.

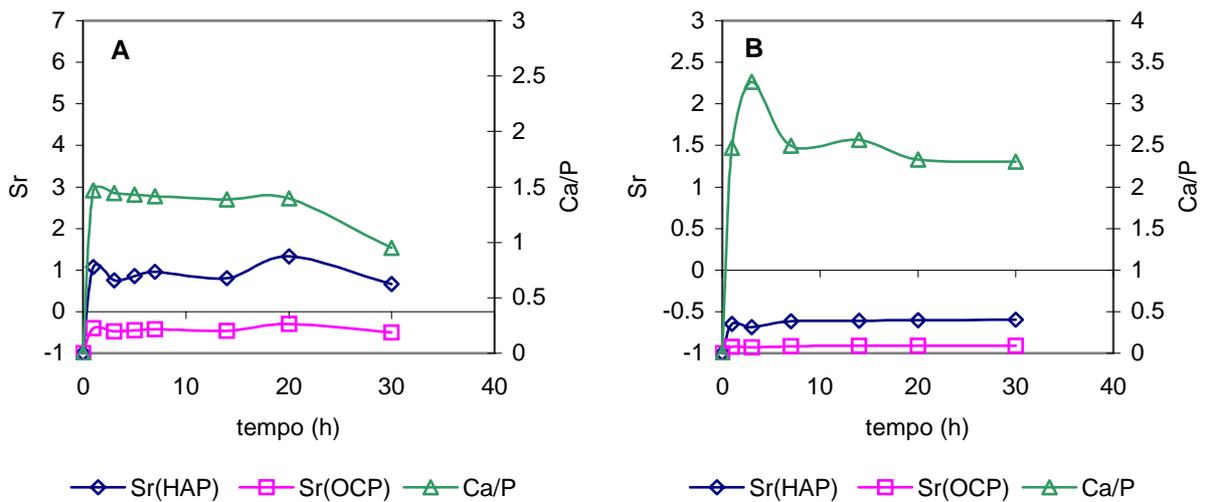


Figura 4.9 – Variação da sobresaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_c$  (A) e  $C_c$  (B) em solução aquosa de Tris/HCl.

A existência de precipitados sobre os pós  $S_p$  já foi observada para 30 minutos de ensaio, tal como se pode ver na Figura 4.10A, onde é igualmente visível a dissolução do  $\alpha$ -TCP. O desaparecimento do  $\alpha$ -TCP ocorreu entre 5 e 24 horas, tal como na imersão em água pura, no entanto este intervalo de tempo é demasiado largo para se poder inferir sobre a influência da presença do tampão

na cinética de dissolução do  $\alpha$ -TCP. Contudo, seria de esperar uma maior velocidade de dissolução desta fase devido à capacidade de complexação entre a molécula de Tris e o cálcio<sup>8,9</sup>.

A superfície do pó para 28 dias de imersão mostrou mineralização mais abundante do que a verificada em água. Além da maior extensão da mineralização foi observada a presença de cristais em forma de placas misturados com cristais em forma de agulhas (Figura 4.10B).

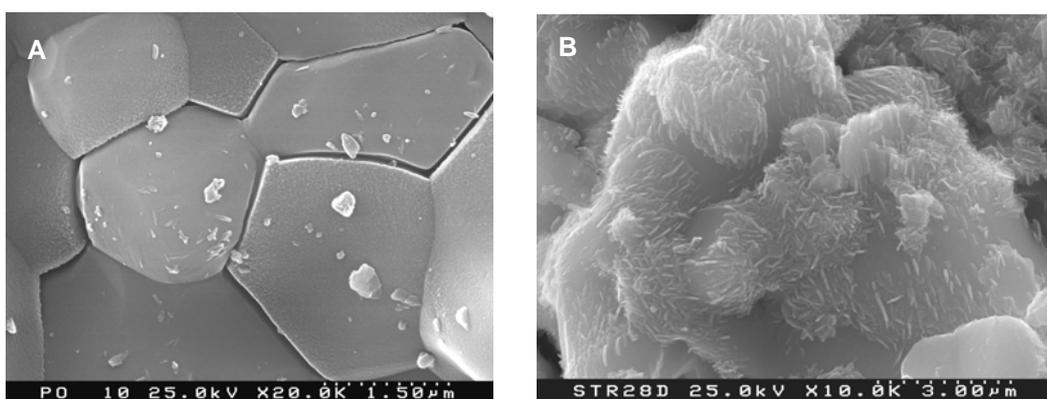


Figura 4.10 - Superfície de  $S_p$  após incubação em solução tampão Tris / HCl durante (A) 30 minutos e (B) 28 dias.

Em relação ao comportamento do sólido  $C_p$ , a análise por SEM não detectou indícios de precipitação, indicando que a ligeira subida do valor de  $S_{r(HAP)}$  verificada não foi suficiente para a ocorrência de nucleação detectável.

A reactividade do cerâmico  $C_c$  foi muito baixa nesta solução como se pode observar no gráfico da Figura 4.7.B. A observação por SEM da superfície destes cerâmicos mostrou igualmente a ausência de qualquer alteração superficial. Pelo contrário, o cerâmico  $S_c$  apresentou reactividade elevada. Logo após 1 dia de incubação, a relação molar Ca/P na solução aproximou-se de 1,5 indicando dissolução da fase  $\alpha$ -TCP.

<sup>8</sup> Hlavác J, Rohanová D, Helebrant A. The effect of tris-buffer on the leaching behaviour of bioactive glass-ceramics. *Ceram Silik* (1994) **38**: 119-22.

<sup>9</sup> Sigel H, Scheller KH, Prus B. Metal ion / Buffer interactions. Stability of alkali and alkali earth ion complexes with triethanolamine (Tea), 2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris) and 2-[Bis(2-hydroxyethyl)-amino]2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Bistris) in aqueous and mixed solvents. *Inorg Chim Acta* (1982) **66**: 147-155.

A análise por SEM das superfícies dos cerâmicos  $S_c$  mostrou igualmente reactividade significativa da superfície ao fim 1 dia de imersão (Figura 4.11).

Na micrografia de ampliação  $\times 5.0K$  é possível observar a cavitação originada pela dissolução do  $\alpha$ -TCP e o início de mineralização nas áreas circundantes. Tal como se pode visualizar em maior ampliação existem áreas de maior densidade de mineralização, formadas por placas e agulhas, juntamente com áreas de densidade menor onde predomina a morfologia acicular.

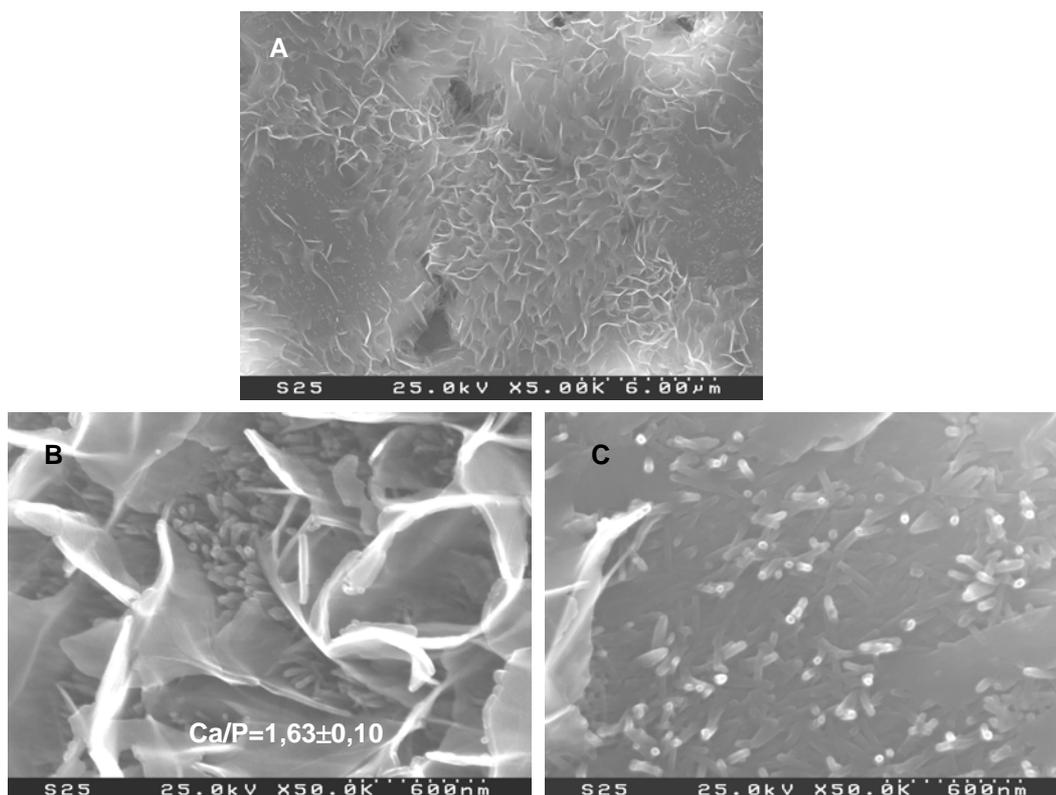


Figura 4.11 – Superfície do cerâmico  $S_c$  após 1 dia de incubação em solução tampão Tris / HCl

Após 3 dias de ensaio as cavidades deixadas pela dissolução dos grãos de  $\alpha$ -TCP são bastante mais visíveis (Figura 4.12). É interessante verificar a evolução da camada de mineralização, cujo crescimento ocorreu segundo orientações preferenciais (Figura 4.12B). Sendo HAP a matriz do cerâmico, a morfologia observada poderá ser devida a orientações diferentes dos planos cristalinos da superfície da HAP que proporcionam condições de crescimento epitaxial diferente.

Para tempos de incubação entre 3 e 30 dias, as morfologias mantiveram-se, como se exemplifica na Figura 4.13. A relação Ca/P nas zonas de mineralização situou-se entre  $1,61 \pm 0,10$  e  $1,64 \pm 0,10$  para os tempos estudados.

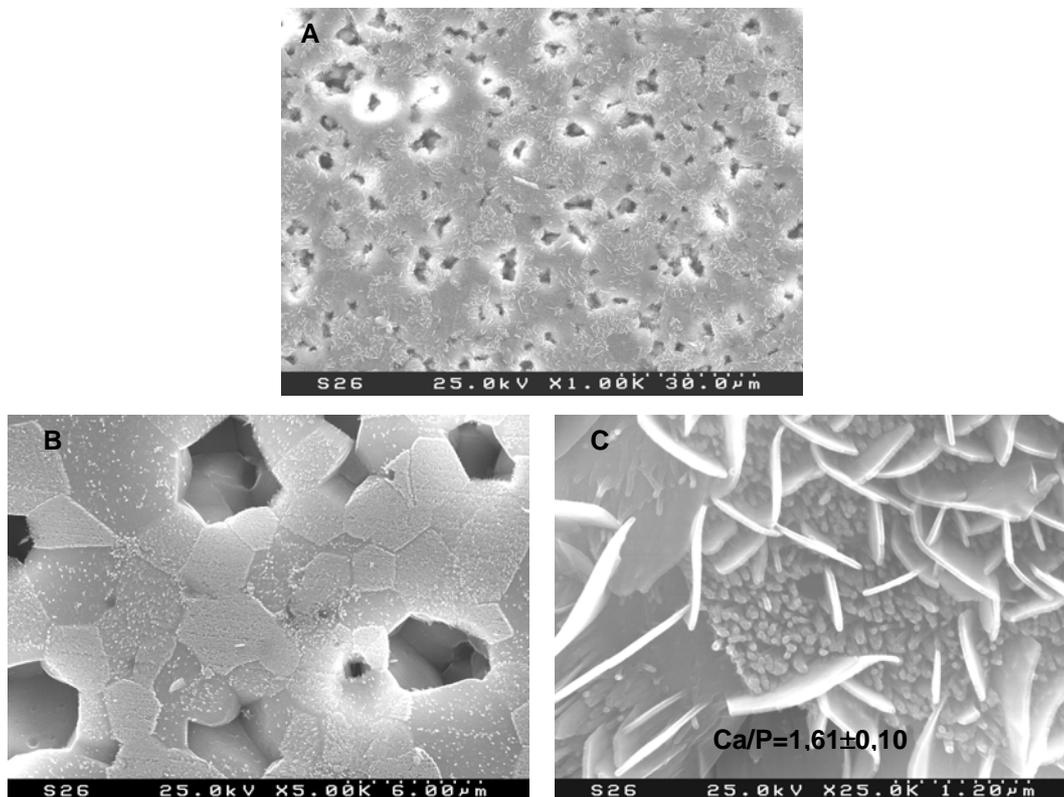


Figura 4.12 - Micrografias da superfície do cerâmico  $S_c$  após 3 dias de incubação em solução tampão Tris / HCl

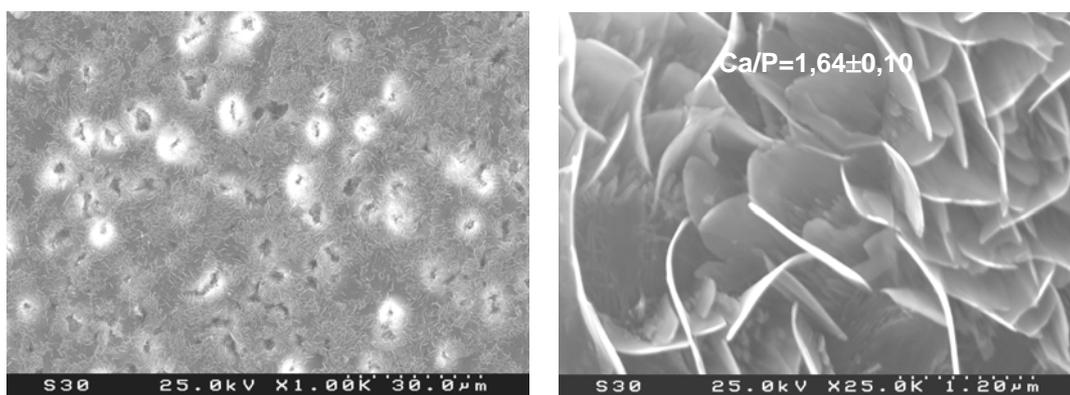


Figura 4.13 - Micrografias da superfície do cerâmico  $S_c$  após 30 dias de incubação em solução tampão Tris / HCl

A análise por FTIR das superfícies dos cerâmicos mostra uma diminuição da intensidade das bandas de absorção no decurso da incubação (Figura 4.14). Na superfície incubada durante 1 dia é possível ainda observar bandas adicionais às da HAP. Na Figura 4.14B evidencia-se a zona de número de onda onde se detectam essas bandas (em comparação com a amostra virgem). A banda presente a cerca de  $1038\text{ cm}^{-1}$  é característica do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  pertencente a OCP<sup>10,11</sup>, e a banda a  $875\text{ cm}^{-1}$  pertence<sup>12,13</sup> ao grupo  $\text{HPO}_4^{2-}$  de OCP e das hidroxiapatites deficientes em cálcio.

Por difracção de raios X (em ângulo rasante) das superfícies dos cerâmicos incubados não se observou alteração significativa relativamente à superfície não incubada. As únicas diferenças poderiam residir na presença de OCP que só é distinguível da HAP em quantidade apreciável (risca (100) a  $2\theta \approx 4$ ).

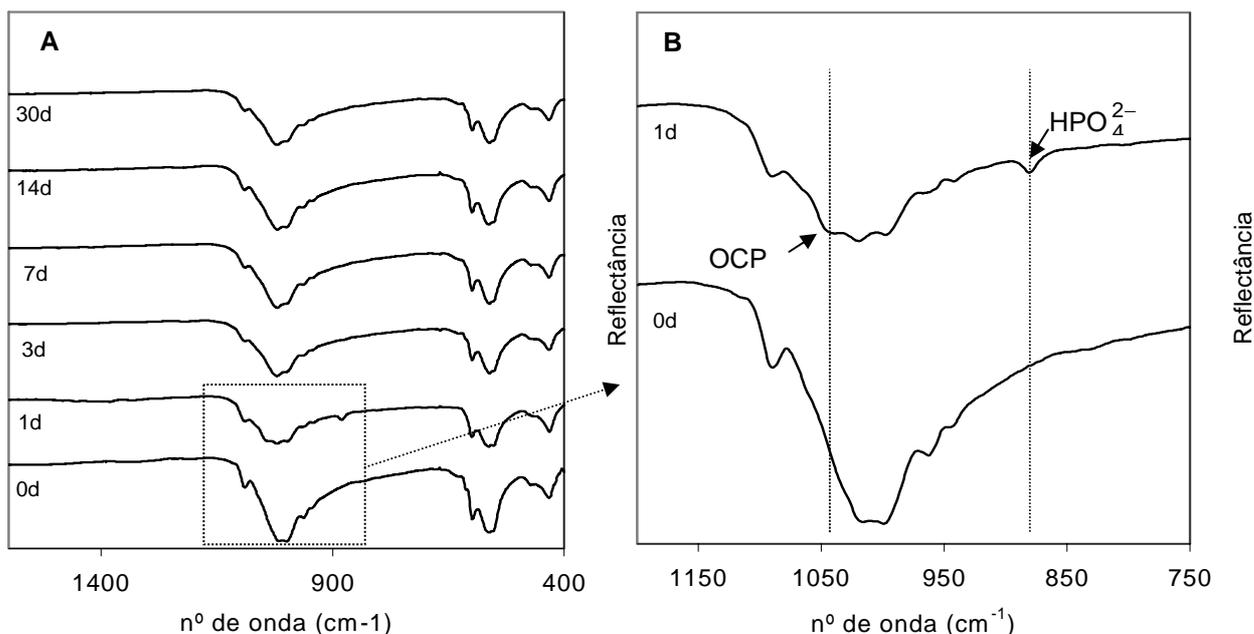


Figura 4.14 – Espectros de FTIR da superfície de  $S_c$  após incubação em solução Tris/HCl (A) para vários tempos (B) comparação entre 0 e 1 dias, evidenciando a presença de OCP.

<sup>10</sup> Gadaleta SJ, Paschalis EP, Betts F, Mendelson R, Boskey AL. Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: new correlations between X-ray diffraction and infrared data. *Calcif Tissue Int* (1996) **58**: 9-16

<sup>11</sup> Rey C, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age. 2: Investigations in the  $\nu_3\text{PO}_4$  domain. *Calcif Tissue Int* (1991) **49**: 383-388

<sup>12</sup> Elliot JC, Holcomb DW, Young RA. Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel. *Calcif Tissue Int* (1985) **37**: 372-375

<sup>13</sup> Amrah-Bouali S, Rey C, Lebugle A, Bernache D. Surface modifications of hydroxyapatite ceramics in aqueous media. *Biomaterials* (1994) **15**: 269-272

#### 4.3.2.b – Análise dos resultados

A análise dos gráficos das Figuras 4.6 e 4.8 e a sua comparação com os gráficos das Figuras 4.2 e 4.3 mostram que na presença do tampão Tris / HCl a dissolução de ambos os pós foi favorecida em relação ao que aconteceu em água. De facto, nas soluções tamponadas as concentrações totais de cálcio e fosfato são superiores às medidas nas experiências realizadas em água. Pode dizer-se que a capacidade tampão da solução foi efectiva no controlo do pH durante as reacções de dissolução dos materiais em solução Tris/HCl. O valor de pH manteve-se no intervalo  $7,59 \pm 0,15$  para S, e  $7,59 \pm 0,09$  para C, sendo contudo visível uma ligeira subida do pH ao longo do tempo.

É notória a maior reactividade de  $S_p$  em relação a  $C_p$ , como se pode observar pelas curvas de sobressaturação relativa na Figura 4.8.

Uma análise da forma das curvas representadas nas Figuras 4.6A e 4.8A, semelhante à realizada em 4.3.1b, leva à consideração de quatro etapas durante o processo de dissolução e cristalização de fases apatíticas.

A etapa 1, definida para  $t < 30$  minutos, corresponde à zona do gráfico onde há um aumento da concentração total de cálcio e fosfatos dissolvidos na solução, e que neste caso foi superior à observada na ausência de tampão, ficando a solução sobressaturada em relação a HAP e a OCP. Este processo de dissolução pode traduzir-se pela reacção química (4.1).

A comparação entre as curvas da sobressaturação relativa em HAP representadas na Figura 4.3 e 4.8A mostra alguma diferença no processo de nucleação e crescimento de novas fases. Se na solução em água parece existir uma velocidade constante de dissolução e cristalização que faz com que os valores das concentrações dos iões se mantenham aproximadamente constantes (Figura 4.2A), neste caso é notório um aumento das concentrações totais de cálcio e fosfato (Figura 4.6A) que só diminuirá no período entre as 5 e as 24 horas. A relação molar Ca/P em solução, para este período, oscilou em torno de 1,5, reflectindo, por um lado, a dissolução do  $\alpha$ -TCP e indicando, por outro, que a

fase ou fases em nucleação / crescimento apresentam uma relação Ca/P média em torno de 1,5.

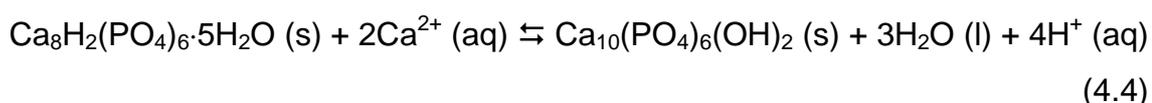
A etapa 3 corresponde ao crescimento dos cristais e à exaustão do  $\alpha$ -TCP com diminuição acentuada dos valores da sobresaturação relativa e uma inversão na concentração total dos iões cálcio e fosfatos dissolvidos.

A cristalização de HAP partir de  $\alpha$ -TCP pode ser traduzida pela equação (4.2) e a de OCP pela equação química (4.3):



A presença possível destas duas fases sólidas (OCP e HAP) é sugerida por análise de microscopia electrónica das superfícies dos pós cerâmicos como referido em 4.3.2.a.

Numa quarta etapa este sistema atingirá um equilíbrio dinâmico entre a HAP e o OCP em que este sólido se converterá lentamente em HAP. Esta conversão pode traduzir-se pela equação química (4.4) e nela haverá consumo de iões cálcio



Mantendo-se o pH, por acção do tampão Tris/HCl, e diminuindo a concentração total de cálcio é natural que haja aumento da concentração total de fosfato para que a solução se mantenha em equilíbrio com as fases sólidas referidas. Prolongando o período de incubação, e dadas as características termodinâmicas do OCP, será de prever uma transformação completa deste sólido em HAP.

A maior lentidão de reacção dos cerâmicos em relação aos pós calcinados permitiu detectar a presença de OCP nas amostras incubadas durante 24 horas. Estudos para tempos inferiores teriam refinado o intervalo de tempo em que

ocorreria o aparecimento desta fase. Contudo não se espera um mecanismo de dissolução muito diferente do observado com o pó calcinado.

Para que se forme OCP, a dissolução do cerâmico  $S_c$  em solução de Tris/HCl terá de proporcionar uma sobressaturação local elevada. Pelos cálculos efectuados a partir das medições feitas no seio da solução, não se verificou sobressaturação relativa de OCP, pelo que este fenómeno terá de ser local. A formação de OCP foi evidenciada por FTIR para 1 dia de incubação. Também a morfologia em placas sugere a formação desta fase.

Segundo Doi *et al*<sup>14</sup>, a natureza das fases que crescem depende do grau de sobressaturação da solução; a sobressaturações elevadas, os primeiros cristais que se formam têm morfologia planar semelhante à de OCP, enquanto que para valores abaixo do produto de solubilidade de OCP se formam cristais de HAP aciculares. A presença de misturas de agulhas e placas verificada leva a supor a existência de zonas de sobressaturação diferencial: zonas de maior sobressaturação junto aos grãos de  $\alpha$ -TCP e zonas de sobressaturação menor nas áreas circundantes.

O desaparecimento das bandas de absorção no infravermelho características de OCP para  $t > 1$  dia evidencia a transformação desta fase em HAP. É referido por Doi e Eanes<sup>15</sup> que as apatites resultantes da conversão de OCP podem manter a morfologia de placas, o que explicará a morfologia encontrada.

A ausência de reactividade de  $C_c$  nesta solução evidencia uma cinética de dissolução de HAP muito lenta. A curva de sobressaturação relativa da solução em relação a HAP (Figura 4.9B) indica que esta solução pode não ter atingido a saturação em relação a este sólido mesmo ao fim de 30 dias de imersão. A observação da superfície do cerâmico  $C_c$  parece corroborar esta conclusão. A ausência de depósito na superfície dos cerâmicos é uma consequência de a solução nunca ter atingido a sobressaturação crítica para nucleação.

---

<sup>14</sup> Doi Y, Eanes ED. Transmission electron microscopic study of calcium phosphate formation in supersaturation solutions seeded with apatite. *Calcif Tissue Int* (1994) **36**: 39-47

<sup>15</sup> Ban S, Maruno S. Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in modified body fluid. *Biomaterials* (1998) **19**: 1245-1253

### 4.3.3. Incubação em SBF sem adição de cálcio e fosfato

#### 4.3.3.a - Resultados experimentais

As variações das concentrações totais de cálcio e fosfato e do pH ao longo do tempo de incubação dos pós em SBF sem adição de cálcio e fosfato são apresentadas na Figura 4.15. Na Figura 4.16 apresentam-se as curvas respectivas de variação de  $S_{r(HAP)}$ ,  $S_{r(OCP)}$  e do quociente Ca/P.

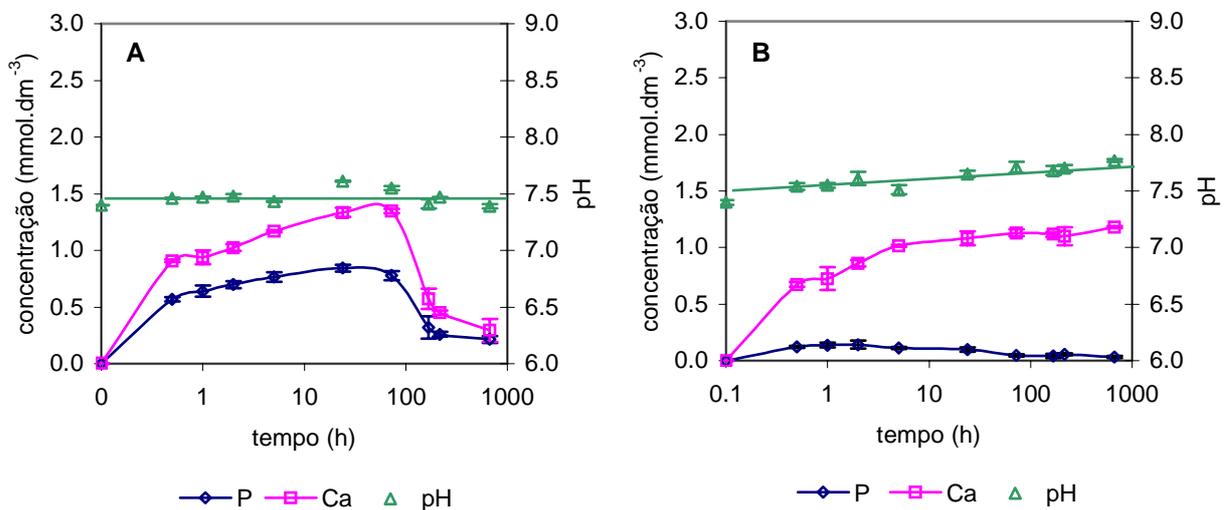


Figura 4.15 - Evolução das concentrações de cálcio e fosfato, de pH durante a incubação de  $S_p$  (A) e de  $C_p$  (B) em SBF sem cálcio e sem fosfato.

As curvas apresentadas em 4.15B e 4.16B são semelhantes, respectivamente às curvas 4.6B e 4.8B, indicando que os processos são praticamente iguais nas duas situações.

Para o sólido  $S_p$  observou-se que ao fim de 30 minutos já existia cristalização de uma nova fase (Figura 4.17A), tal como nos casos anteriores, mas o tempo de dissolução total do  $\alpha$ -TCP ocorreu agora algures no intervalo de tempo 3 e 5 dias. A curva da relação Ca/P inicia a descida quando todo o  $\alpha$ -TCP se dissolveu, para  $t > 5$  dias.

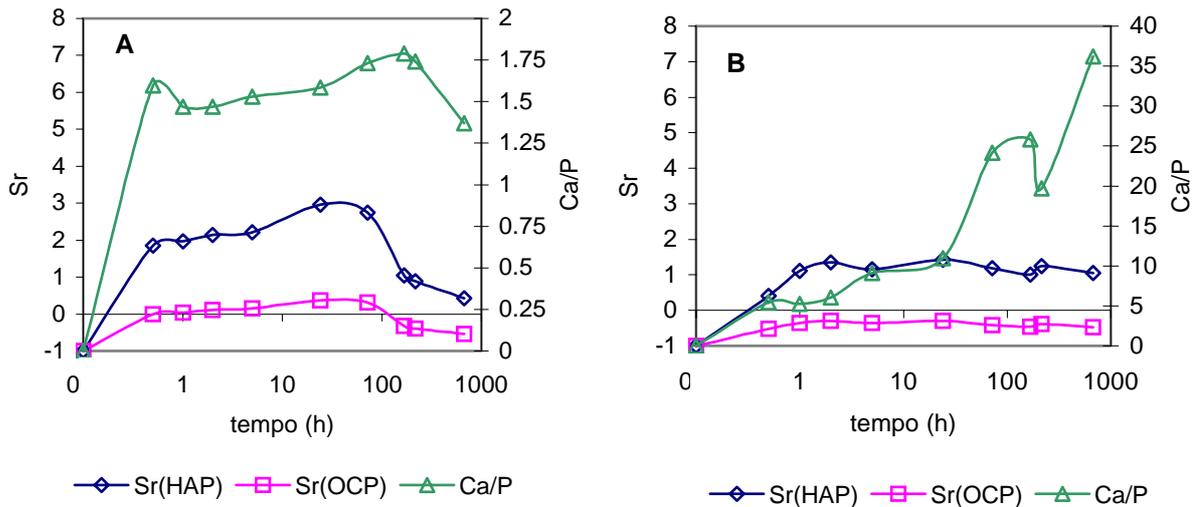


Figura 4.16 – Variação da sobresaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_p$  (A) e  $C_p$  (B) em SBF sem adição de cálcio e fosfato.

A observação da superfície dos pós para 28 dias de imersão mostrou mineralização mais abundante do que nas situações anteriormente descritas e predominância de cristais em forma de placas, tal como se pode observar na Figura 4.17B. A análise por EDS mostrou relação molar Ca/P =  $1,59 \pm 0,12$  no sólido.

Apesar da maior abundância de mineralização observada no SEM para 28 dias de incubação de  $S_p$ , as análises por FTIR e DRX, não mostraram qualquer alteração relativamente ao pó virgem.

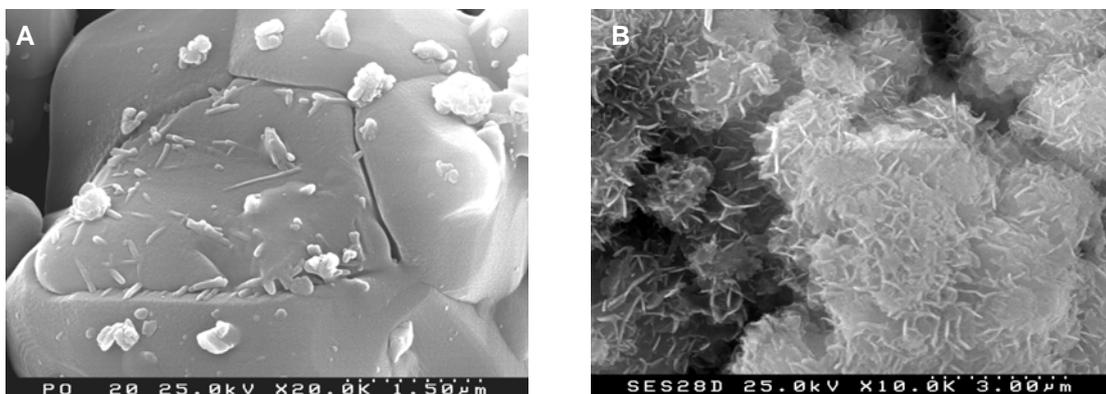


Figura 4.17 - Superfície de  $S_p$  após incubação em SBF sem adição de cálcio e fosfato durante (A) 30 minutos e (B) 28 dias.

#### 4.3.3.b – Análise dos resultados

Mais uma vez o sólido  $C_p$  foi menos reactivo. A dissolução verificada não terá sido suficiente para alcançar valores de  $S_{r(\text{HAP})}$  críticos para a nucleação e crescimento, pelo menos em tamanho ou quantidade detectáveis por SEM.

Para o sólido  $S_p$  verificou-se que a composição da solução SBF sem cálcio e fosfato retardou a cinética de dissolução de  $\alpha$ -TCP relativamente às soluções anteriores. Não será de esperar que os iões constituintes desta solução tenham individualmente um efeito directo na dissolução. No seu conjunto actuam no aumento da força iónica ( $I$ ) do meio. Na solução de Tris/HCl  $I$  é aproximadamente zero, enquanto que neste caso tem um valor em torno de  $0,16 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . O aumento de  $I$  implica diminuição dos coeficientes de actividade dos iões e consequente atenuação dos valores de sobressaturação relativa do meio. Por este motivo, comparando os gráficos das Figuras 4.8A e 4.16A se verifica que os valores de  $S_{r(\text{HAP})}$  atingidos na solução de Tris/HCl são superiores aos da solução de SBF sem cálcio e fosfato para valores de concentrações em cálcio, fosfato e pH semelhantes nas duas soluções.

Para o período de 30 minutos  $< t < 3$  dias, do balanço de dissolução – reprecipitação resultou um aumento gradual, embora ligeiro, da relação Ca/P em solução, assim como da sobressaturação do meio, chegando a solução a ficar ligeiramente sobressaturada em OCP entre 1 e 5 dias.

Como nas situações anteriores o processo de dissolução e recristalização inicia-se com a dissolução de fosfatos de cálcio, mais rápida e extensa para  $\alpha$ -TCP, e ao fim de 30 minutos de incubação já se observou a formação de cristais novos na superfície dos grãos.

A velocidade de dissolução total do  $\alpha$ -TCP foi claramente retardada nesta solução e a concentração total de cálcio e fosfatos, no período de 30 minutos a 3 dias, foi superior à dos casos anteriores. A maior concentração total de cálcio e fosfatos neste intervalo de tempo pode ser explicada por vários factores:

- a) aumento de solubilidade com a força iónica da solução;

b) Inibição da precipitação de fases apatíticas permitindo que na solução permaneça uma concentração mais elevada de cálcio e fosfato;

c) menor estabilidade das fases apatíticas precipitadas e, portanto, maior solubilidade.

A situação b) é pouco provável uma vez que a observação, por SEM, dos pós incubados mostrou que, para todos os tempos, a precipitação foi mais abundante do que nas duas situações previamente estudadas.

Nas discussões anteriores considerou-se como determinante da concentração total inicial de cálcio e fosfatos o processo de dissolução do  $\alpha$ -TCP. Contudo, tem que se ter em consideração que enquanto não se atingir um valor crítico para a sobressaturação da apatite, esta também se dissolverá, embora em menor extensão do que a fase  $\alpha$ -TCP.

Dos iões presentes na composição de SBF, os de magnésio, sódio, potássio e hidrogenocarbonato são referidos como intervenientes na cinética de formação e nas características morfológicas e fisico-químicas das fases de fosfato de cálcio<sup>16,17,18,19,20,21</sup>. A presença destes iões na solução de trabalho deve influenciar o processo de cristalização da nova apatite que será menos estável do que a cristalizada nos meios anteriores. A relação molar Ca/P da fase cristalizada ao fim de 28 dias de imersão (1,59) pode reflectir tanto a incorporação na rede de alguns dos iões presentes na solução, como a existência de apatite não estequiométrica menos estável.

Ao contrário do que se verificou nas situações anteriores a relação Ca/P na solução aquosa manteve-se na gama 1,5 a 1,8 após 30 minutos de imersão, não havendo um decréscimo notório durante o tempo da experiência, como se

---

<sup>16</sup> Bigi A, Falini G, Foresti E, Gazzano M, Ripamonti A. Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization. *J. Inorg Biochem* (1993) **49**: 69-78

<sup>17</sup> TenHuisen KS, Brown PW. Effects of magnesium on the formation of calcium-deficient hydroxyapatite formation from  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ . *J. Biomed Mater Res* (1997) **35**: 306-314

<sup>18</sup> Nordstrom EG, Karlsson KH. Carbonated doped hydroxyapatite. *J Mater Sci-Mater Med* (1990) **1**: 182-184

<sup>19</sup> Kopolos J, Koutsoukos PG. Formation of calcium phosphates in aqueous solutions in the presence of carbonate ions. *Langmuir* (1999) **15**: 6557-6562

<sup>20</sup> Pieters IY, De Mayer EAP, Verbeeck RMH. Influence of  $\text{Na}^+$  of carbonated hydroxyapatite obtained by the hydrolysis of octacalcium phosphate. *Inorg Chem* (1998) **37**: 6392-6395

<sup>21</sup> Vilbok H, Knubovets R, Veiderma M. Synthesis and thermal transformations of Ca, Mg-Carbonateapatite. *Proc Estonian Acad Sci Chem* (1992) **41**: 45-51

verificou anteriormente. A forma da curva Ca/P mostra que a relação entre concentrações totais destes elementos na solução poderia tender, a mais longo prazo, para a verificada nas duas situações anteriores, mais uma vez traduzindo um retardamento nos processos de envelhecimento ou uma maior estabilização das fases sólidas em presença. Não havendo inversão das concentrações totais de cálcio e fosfato na solução com o tempo, pode concluir-se que a fase apatítica que se vai formando deve ter uma relação molar Ca/P semelhante à da fase que se dissolveu, ou seja à volta de 1,5. A fase precipitada é formada predominantemente por placas. Esta morfologia é atribuída ao OCP ou a HAP deficiente em cálcio que se formou via OCP. Embora a solução não se encontre sobressaturada em relação ao OCP (pode ter havido uma ligeira sobressaturação apenas entre 1 e 5 dias) a presença dos iões  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , e  $HCO_3^-$  poderá induzir o crescimento de fases apatíticas com estruturas mais desordenadas.

#### **4.3.4. Incubação em plasmas sintéticos sem tampão (HBSS e SBF0)**

O HBSS é uma das soluções bastante utilizadas para ensaios *in vitro* de materiais com possibilidade de aplicação biológica. Esta solução não possui o tampão Tris/HCl e é menos concentrada em cálcio e fosfato do que o SBF. Com o objectivo de comparar o comportamento dos materiais nas duas soluções não tamponadas (em HBSS e SBF), realizou-se um estudo intermédio numa solução de sobressaturação relativa inicial comparável à de SBF, mas sem tampão, SBF0.

##### **4.3.4.a – Resultados experimentais obtidos em HBSS**

Esta solução contrasta com as anteriores pela presença inicial de cálcio e fosfato, o que faz com que a solução seja de início sobressaturada relativamente às fases HAP e OCP.

Apresentam-se de seguida as evoluções das concentrações totais de cálcio e fosfato nas soluções de incubação dos pós (Figura 4.18) e dos corpos cerâmicos (Figura 4.19). Na Figura 4.20 apresentam-se as curvas de variação de  $S_{r(HAP)}$ ,  $S_{r(OCP)}$  e do quociente Ca/P para os pós e na Figura 4.21 para os corpos cerâmicos.

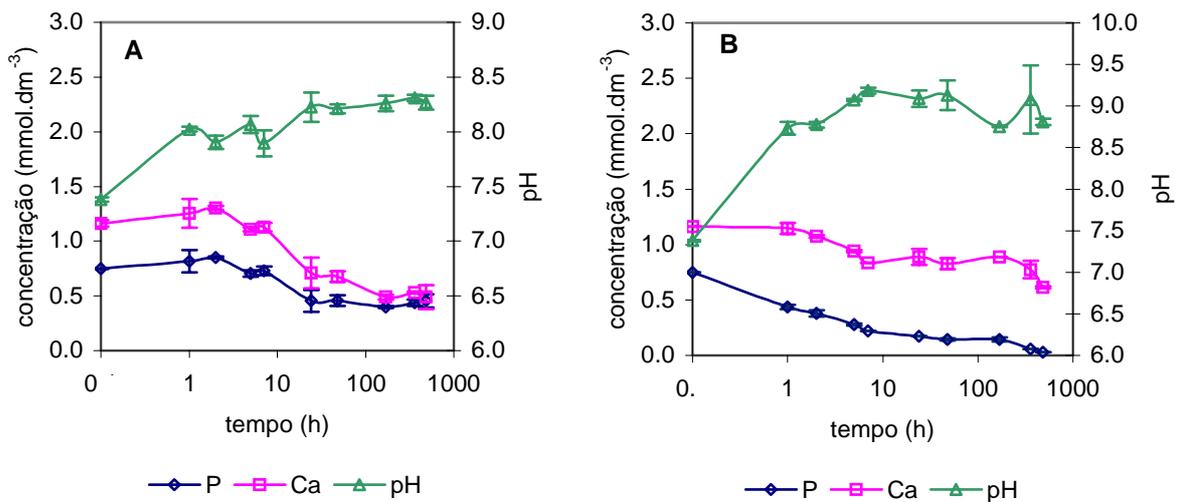


Figura 4.18 - Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e de pH ao longo do tempo de incubação de (A)  $S_p$  e (B)  $C_p$  em HBSS.

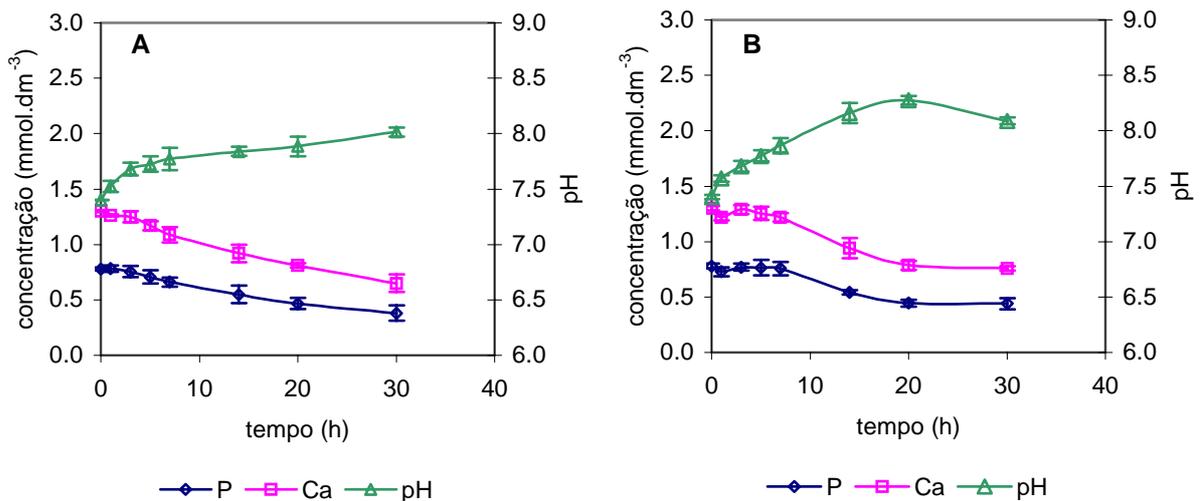


Figura 4.19- Evolução das concentrações totais de cálcio, fósforo e de pH ao longo do tempo de incubação de (A)  $S_c$  e (B)  $C_c$  em HBSS.

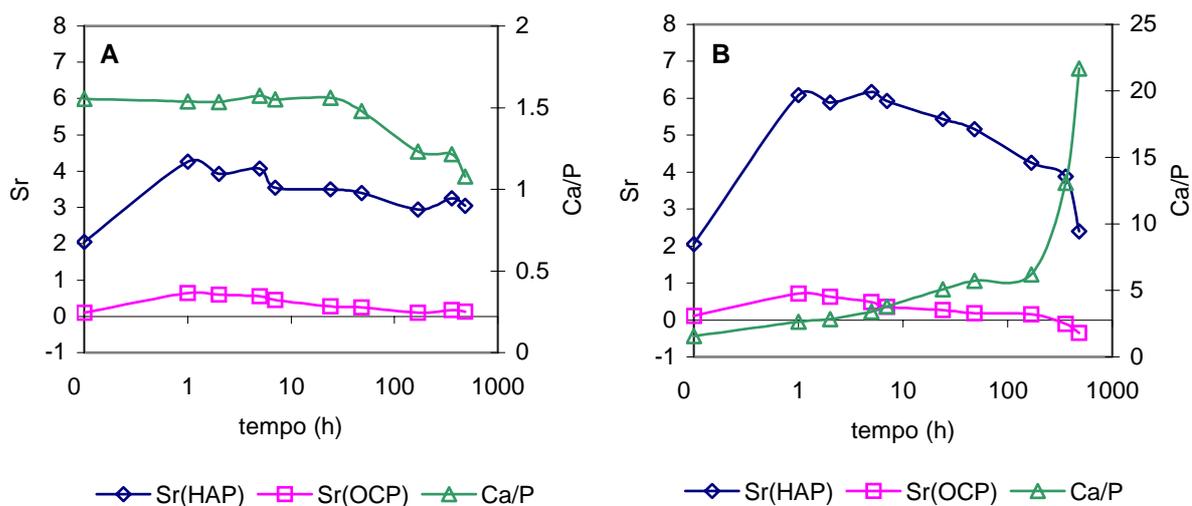


Figura 4.20 – Variação da sobresaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_p$  (A) e  $C_p$  (B) em HBSS.

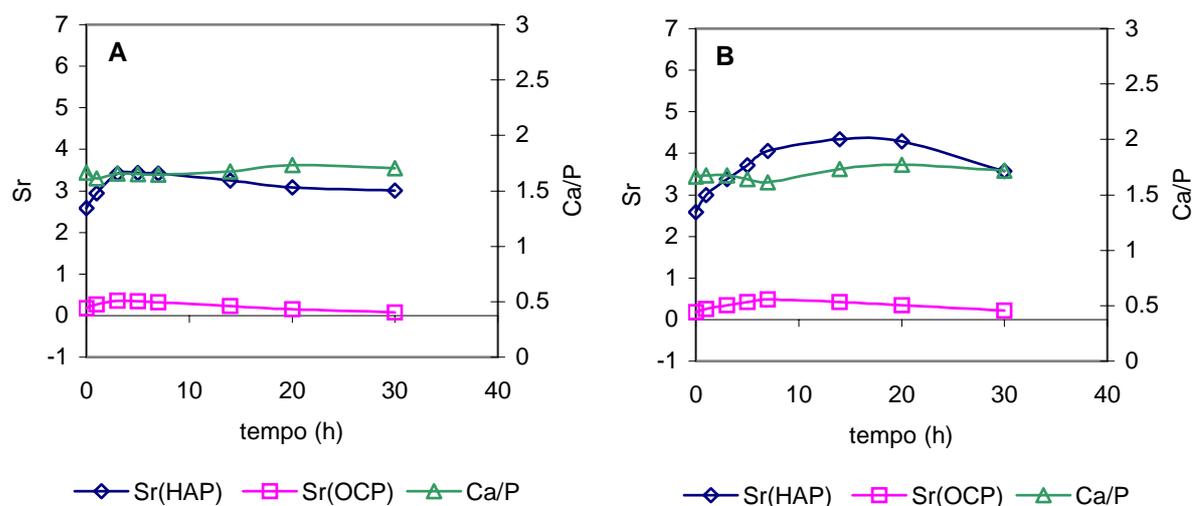


Figura 4.21 – Variação da sobresaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_c$  (A) e  $C_c$  (B) em HBSS.

Mais uma vez para 30 minutos de imersão do pó  $S_p$  já se verificou a formação de depósito cristalino. Os primeiros cristais formados, de forma cilíndrica alongada, cresceram em agregados adquirindo uma conformação semelhante a anêmonas, tal como se pode observar na figura 4.22A. A forma dos cristais para tempos longos permaneceu acicular, (Figura 4.22B). A análise

pontual por EDS mostrou uma relação Ca/P média de  $1,65 \pm 0,12$ . Não se verificou dissolução total do  $\alpha$ -TCP durante os tempos estudados, como se confirmou por DRX.

No sólido  $C_p$  só se observou sinais de mineralização ao fim de 7 dias de imersão (Figura 4.23A). Após 20 dias a superfície dos pós apresentou o aspecto ilustrado na Figura 4.23B.

No caso dos corpos cerâmicos é notória a subida de pH ocorrida durante a incubação de ambos os materiais, em particular de  $C_c$ . A subida de pH aumenta consideravelmente a supersaturação do meio, embora acompanhada pelo decréscimo das concentrações de cálcio e fosfato (Figuras 4.19 e 4.21). Como seria de prever pelas curvas de  $S_{r(HAP)}$  apresentadas, ocorreu mineralização em ambos os cerâmicos. Os primeiros sinais de mineralização em  $S_c$  ocorreram entre 3 e 7 dias de incubação e em  $C_c$  entre 7 e 14 dias.

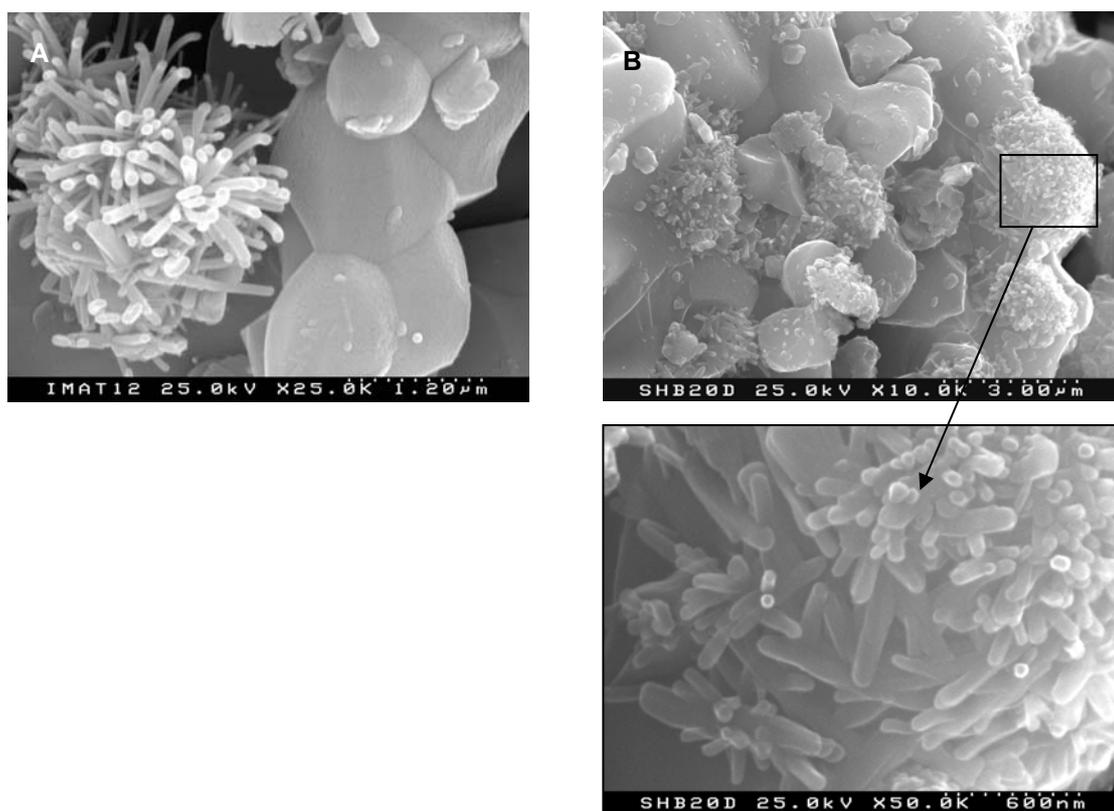


Figura 4.22 – Superfície de  $S_p$  (A) após 30 minutos e (B) após 20 dias de imersão em HBSS.

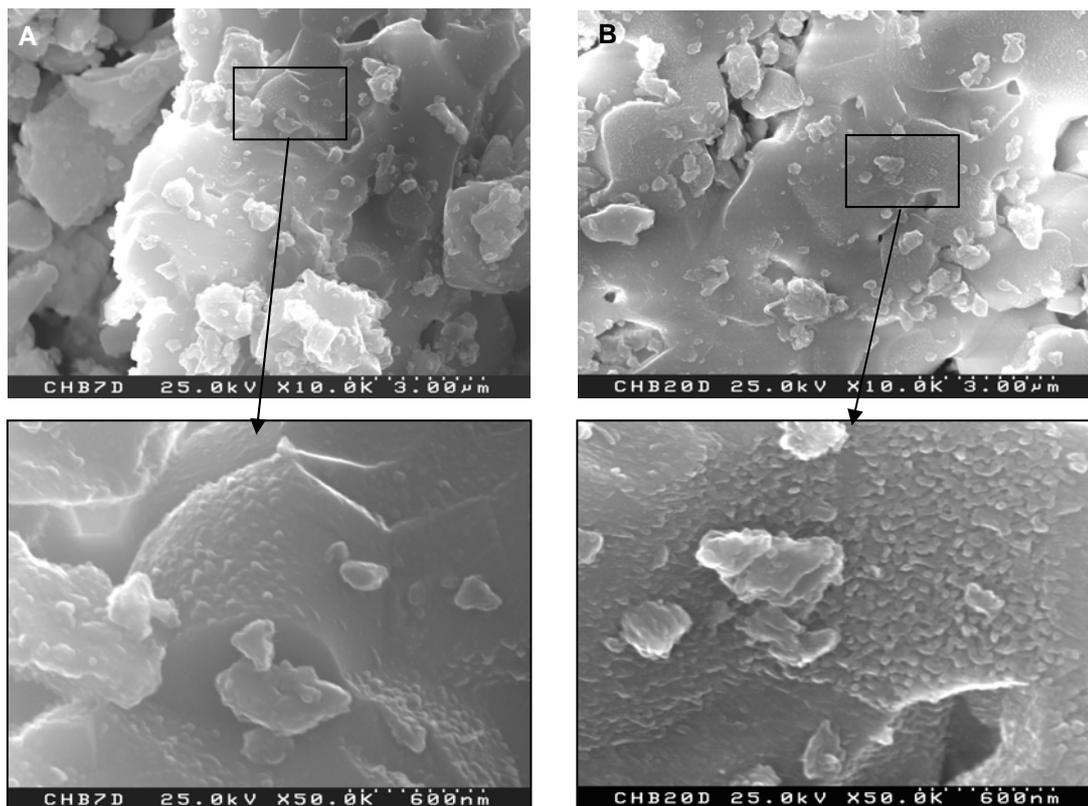


Figura 4.23 – Superfície de  $C_p$  (A) após 7 dias e (B) após 20 dias de imersão em HBSS.

Na observação da superfície dos cerâmicos por microscopia electrónica verificou-se alguma irreprodutibilidade, particularmente no cerâmico S. Esta situação é ilustrada na Figura 4.24 (A e B). Como se pode observar, em 7 dias de ensaio, determinadas superfícies apresentaram: (A) crescimentos localizados; (B) zonas com camadas de cerca de 2,5  $\mu\text{m}$  de espessura, com relação molar Ca/P de  $1,54 \pm 0,12$ . Após 30 dias de ensaio a camada de mineralização cresceu, mas libertando os locais de dissolução dos grãos de  $\alpha$ -TCP (Fig. 4.24C). Em D exemplifica-se a morfologia da camada. A relação molar Ca/P determinada ao fim de 30 dias foi de  $1,56 \pm 0,11$ . Nestas camadas detectou-se a presença de sódio e magnésio. Estes catiões poderão estar adsorvidos ou incluídos na rede apatítica por substituição do cálcio<sup>22,23,24</sup>. Uma vez que os cerâmicos, após incubação foram

<sup>22</sup> Doi Y, Eanes ED. Transmission electron microscopic study of calcium phosphate formation in supersaturation solutions seeded with apatite. *Calcif Tissue Int* (1994) **36**: 39-47

<sup>23</sup> Maeyer EAP, Verbeeck RMH. Possible substitution mechanisms for sodium and carbonate in calcium hydroxyapatite. *Bull Soc Chim Belg* (1993) **102**: 601-609

passados por água destilada, o sódio e o magnésio deverão estar de facto na rede. Deste modo pode calcular-se a relação molar (catiões / P), obtendo-se, para 7 dias o valor 1,63 e para 30 dias 1,69.

Nos espectros de FTIR (Figura 4.25A) foi possível observar a presença de carbonatos ( $\sim 1395$ ,  $1430$  e  $862\text{ cm}^{-1}$ ), além das bandas características da HAP. A banda a  $862\text{ cm}^{-1}$  é igualmente atribuível à vibração P-OH do grupo  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

Os difractogramas de raios X das camadas (Figura 4.25B) mostram baixo grau de cristalinidade, em particular da camada formada em 30 dias. Os picos presentes coincidem com as reflexões da HAP, verificando-se um aumento da intensidade relativa do pico de difracção (002) relativamente ao pico (211), com o tempo de incubação, o que sugere um desenvolvimento preferencial daqueles planos, paralelamente à superfície, durante o crescimento da camada.

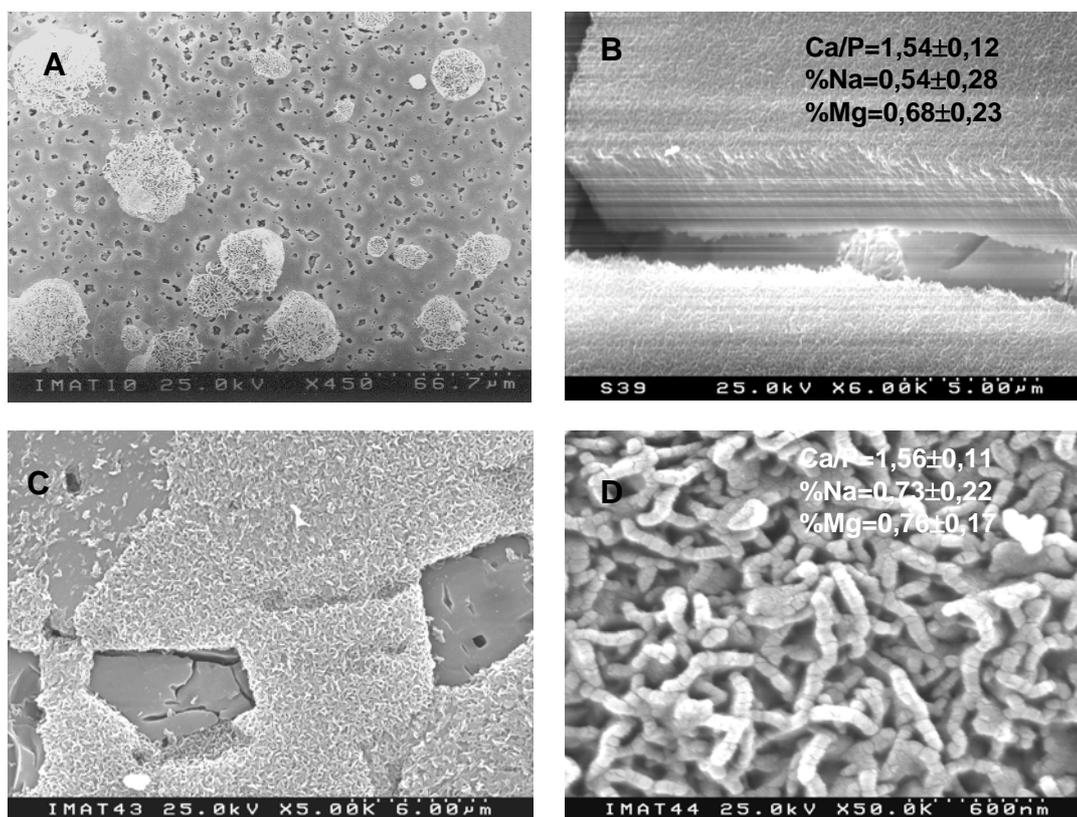


Figura 4.24 – Micrografias da superfície do cerâmico  $S_c$  após 7 dias (A,B) e 30 dias (C,D) de incubação em solução de HBSS.

<sup>24</sup> Marques, PAAP. Síntese e Caracterização de Hidroxiapatite sem e com Substituições Catiónicas pelos Iões Magnésio, Sódio e Potássio. Dissertação apresentada na Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre, 1997

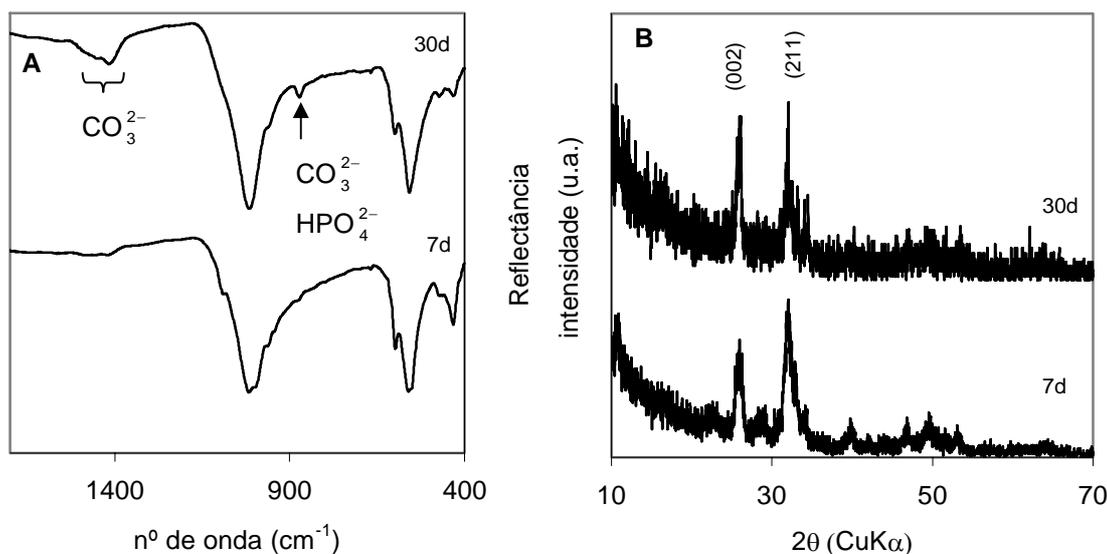


Figura 4.25 –Espectros de FTIR (A) e difractogramas de raios X (ângulo rasante) (B) da superfície dos cerâmicos  $S_c$  incubados em HBSS.

Em  $C_c$ , a camada formada ao fim de 14 dias cobre toda a superfície e destaca-se por incidência do feixe electrónico, tal como se pode observar na Figura 4.26A. Por este motivo não foi possível determinar a sua espessura. Pode ver-se o pormenor da microestrutura desta camada, com relação  $Ca/P = 1,61 \pm 0,12$ , na Figura 4.26B. Para 30 dias de incubação a camada deixou de revelar o efeito referido, apresentando também uma microestrutura mais densa (Fig. 4.26C e D). A espessura média determinada foi de  $2,5 \mu m$ . Embora a relação  $Ca/P$  se tenha mantido em torno de 1,61, a camada para 30 dias de ensaio é mais rica em magnésio e sódio, a que corresponde uma relação (catião / P) de 1,70.

Nos espectros de FTIR (Figura 4.27A) observa-se a presença de carbonatos ( $\sim 1400$  e  $1430 \text{ cm}^{-1}$ ), além dos picos característicos de HAP. Para 14 dias a presença de um pico de absorção a  $\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$  pode ser devida também ao carbonato<sup>25</sup> ou a um modo de flexão da molécula de  $H_2O$  associada a HAP<sup>26</sup>. A presença de água explicará a fissuração da camada sob o feixe electrónico, por desidratação provocada pelo aquecimento. Na zona de  $3600 \text{ cm}^{-1}$  observou-se

<sup>25</sup> Shimoda S, Aoba T, Moreno EC, Miake Y. Effect of solution composition on morphological and structural features of carbonated calcium apatites. *J Dent Res* (1990) **69**: 1731-1740

<sup>26</sup> Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *J Biomed Mater Res* (2002) **62**: 600-612

neste espectro uma banda larga, atribuída a moléculas de  $H_2O^{27}$ , a qual não está presente no espectro de 30 dias (esta zona não é mostrada na Figura 4.27 A).

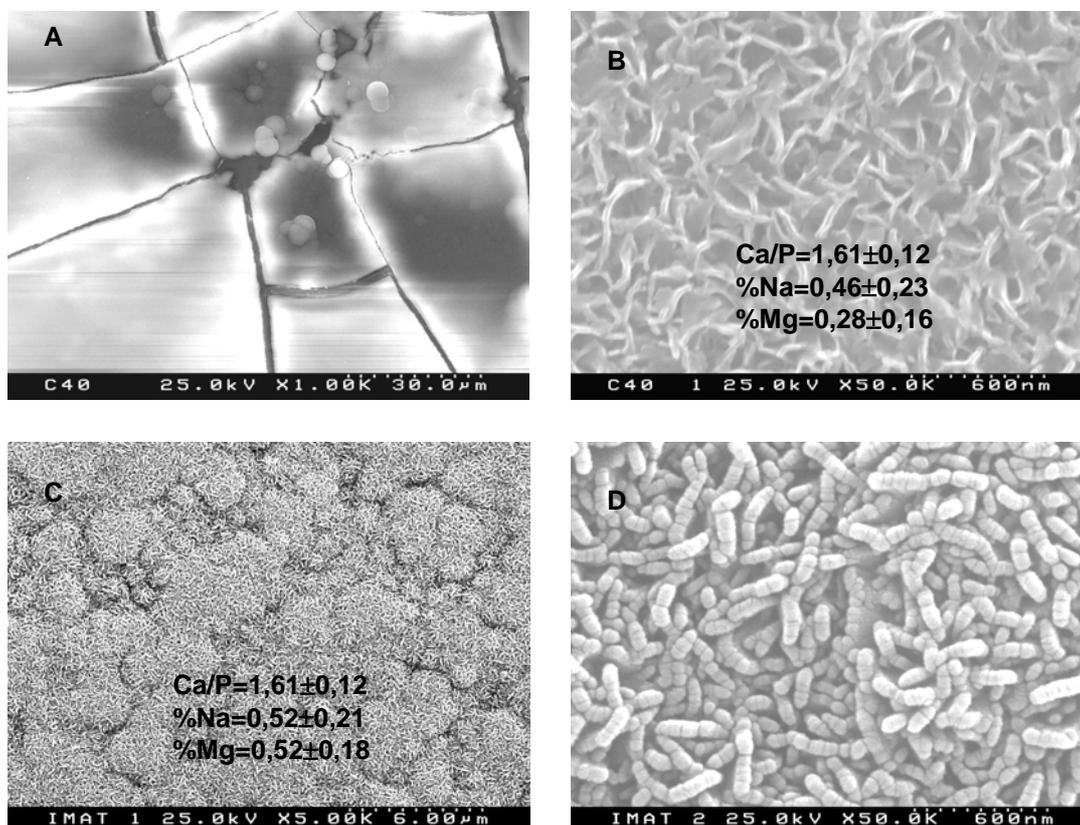


Figura 4.26 – Micrografias da superfície do cerâmico C<sub>c</sub> após 14 (A,B) e 30 dias (C,D) de incubação em solução de HBSS

Os difractogramas de raios X das camadas formadas (Figura 4.27B) mostram baixo grau de cristalinidade. Os picos presentes identificam-se com os de HAP, verificando-se um aumento da intensidade relativa do pico de difracção (002) relativamente ao pico (211), tal como se verificou na camada formada em S<sub>c</sub>.

<sup>27</sup> Yubao L, Klein CPAT, de Wijn J, Van de Meer S, de Groot K. Shape change and phase transition of needle-like non-stoichiometric apatite crystals. *J Mater Sci: Mater in Med* (1994) 5: 263-268

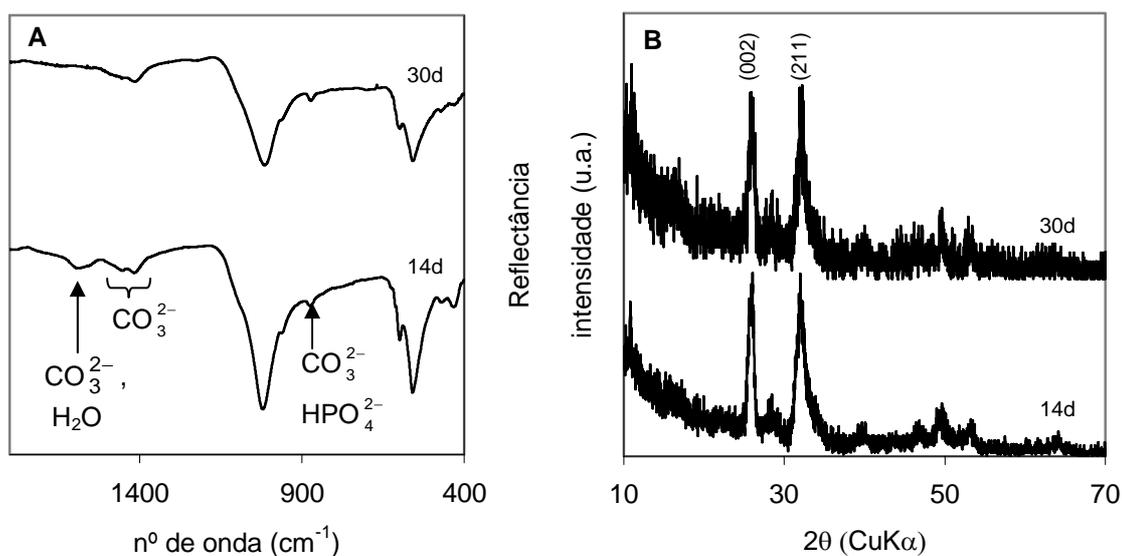


Figura 4.27 - Espectros de FTIR (A) e difractogramas de raios X (ângulo razante) (B) das superfícies dos cerâmicos  $C_c$  incubados 14 e 30 dias em HBSS.

#### 4.3.4.b – Resultados experimentais obtidos em SBF0

Na Figura 4.28 pode observar-se a variação do pH e das concentrações totais de cálcio e fosfato ao longo do tempo para as amostras  $S_p$  (gráfico 4.28A) e  $C_p$  (gráfico 4.28B). A mesma representação é feita para os cerâmicos na Figura 4.29.

Nos gráficos das Figuras 4.30 e 4.31 estão representadas a evolução da sobressaturação relativa em HAP e em OCP, assim como a relação molar Ca/P em solução, respectivamente para os pós e para os cerâmicos.

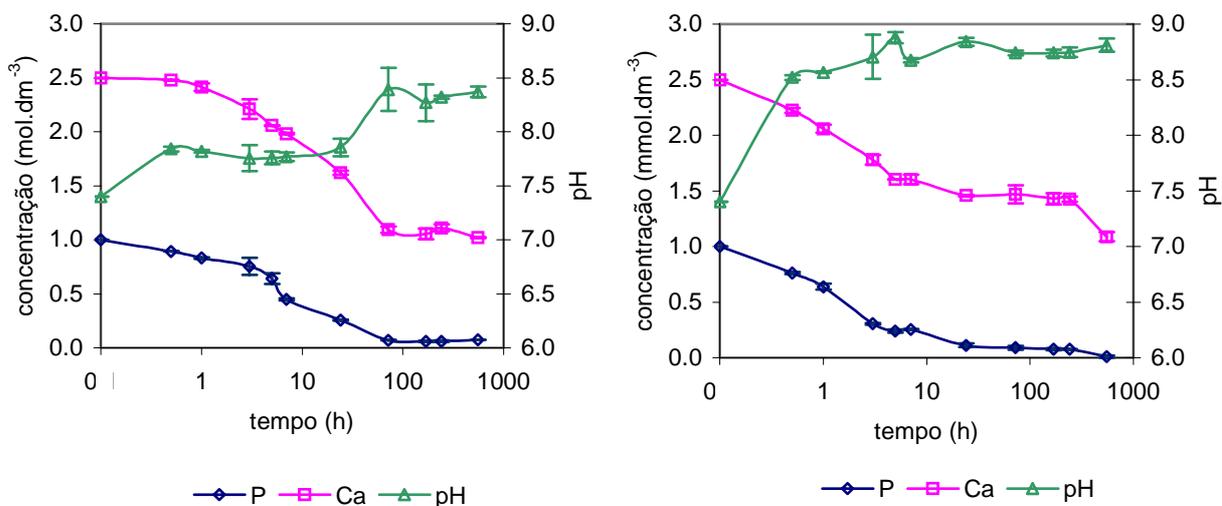


Figura 4.28 - Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e do pH ao longo do tempo de incubação de (A)  $S_p$  e (B)  $C_p$  em SBF0.

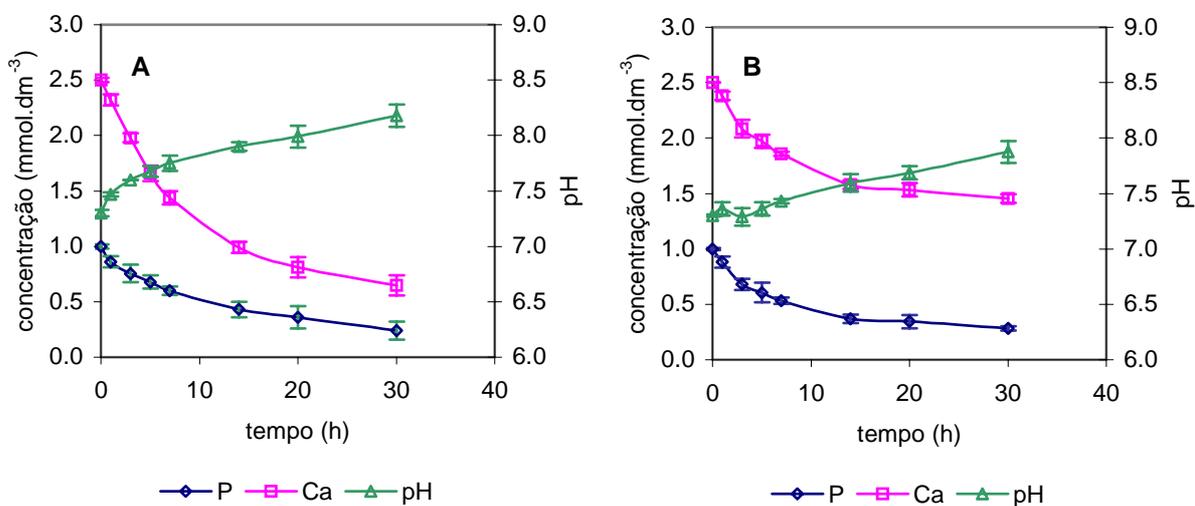


Figura 4.29 - Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e do pH ao longo do tempo de incubação de (A)  $S_c$  e (B)  $C_c$  em SBF0.

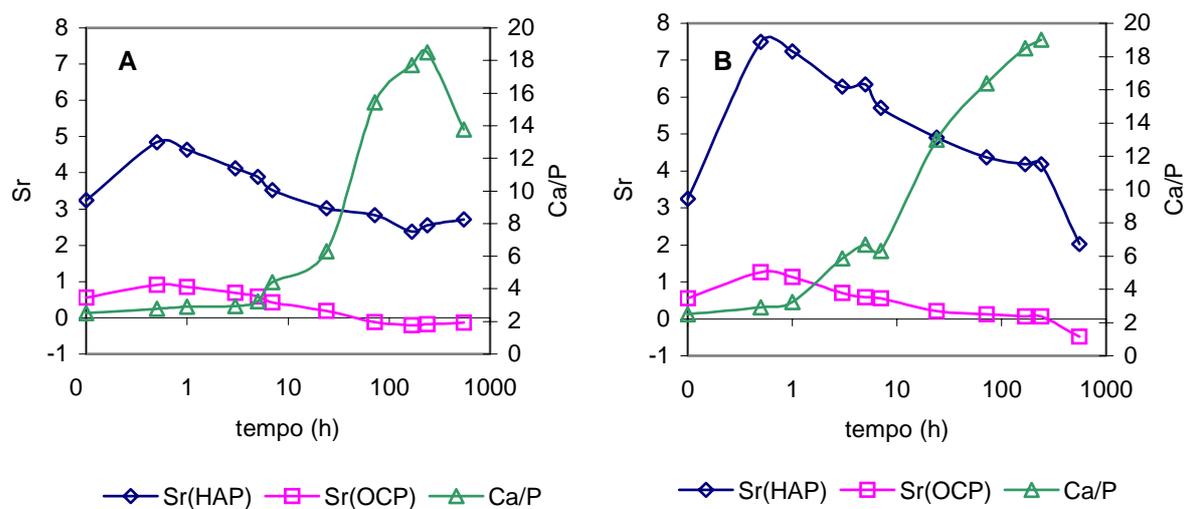


Figura 4.30 – Variação da sobressaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_p$  (A) e  $C_p$  (B) em SBF0.

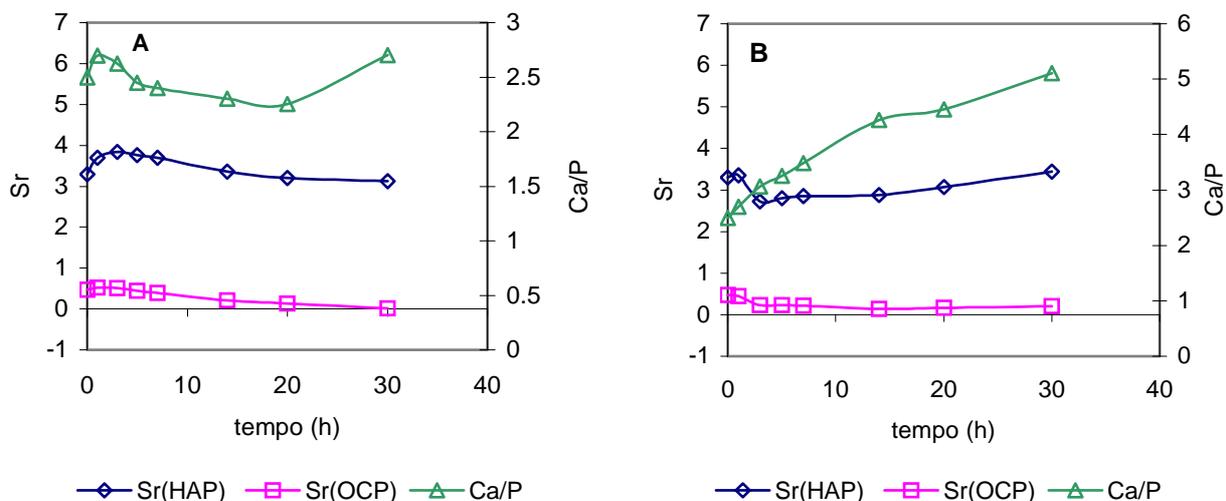


Figura 4.31 – Variação da sobressaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_c$  (A) e  $C_c$  (B) em SBF0.

Mais uma vez a superfície de  $S_p$  mostrou formação de cristais para 30 minutos de ensaio (Figura 4.32A). Como no caso do HBSS, a dissolução de  $\alpha$ -TCP não foi total.

A precipitação à superfície dos pós foi muito mais abundante do que nas soluções anteriormente estudadas (Figura 4.32B). A análise pontual, por EDS, destas formações forneceu uma relação molar Ca/P média de  $1,63 \pm 0,12$ . Detectaram-se vestígios de magnésio e sódio.

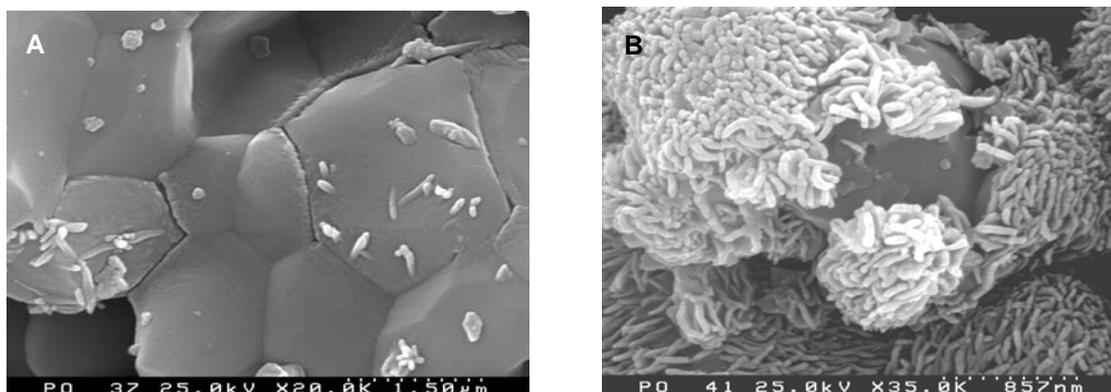


Figura 4.32 - Superfície de  $S_p$  após (A) 30 minutos e (B) 23 dias de imersão em SBF sem Tris.

O espectro de infravermelho deste pó para 23 dias de incubação (Figura 4.33) mostrou a presença de pequenos picos de absorção de grupos carbonato em torno de  $1400 \text{ cm}^{-1}$ . Neste espectro é também visível um alargamento dos modos vibracionais  $\nu_3$  dos grupos fosfato relativamente ao espectro do pó virgem (ver Capítulo 3) o que poderá indicar menor cristalinidade da fase precipitada relativamente ao substrato.

A análise por difracção de raios X deste pó não é muito elucidativa, uma vez que o sinal do substrato é muito intenso, sendo quase impossível detectar outras fases. Verifica-se apenas uma elevação da linha de fundo para  $2\theta < 20^\circ$ , o que pode indicar que a fase formada na superfície dos grãos é menos cristalina do que o substrato, como seria de esperar pela morfologia observada no SEM.

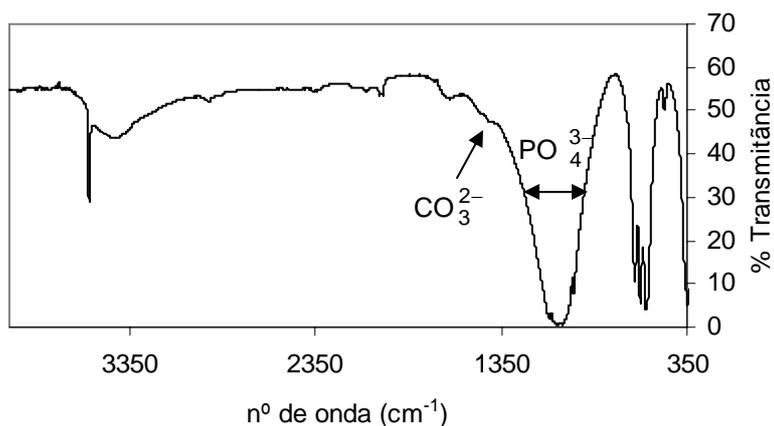


Figura 4.33- Espectro de infravermelho do pó  $S_p$  após 23 dias em SBF sem Tris.

No caso de  $C_p$ , embora se tenha verificado decréscimo dos perfis de cálcio e fósforo em solução, de modo semelhante ao verificado para  $S_p$ , só se observou os primeiros sinais de precipitação detectáveis por SEM ao fim de 3 dias de imersão. Na Figura 4.34A pode observar-se o depósito de partículas esféricas encontrado. Para os tempos seguintes, este tipo de depósito deu lugar às formações na superfície dos grãos (Figura 4.34B). A análise pontual por EDS detectou uma relação molar Ca/P  $1,67 \pm 0,13$ .

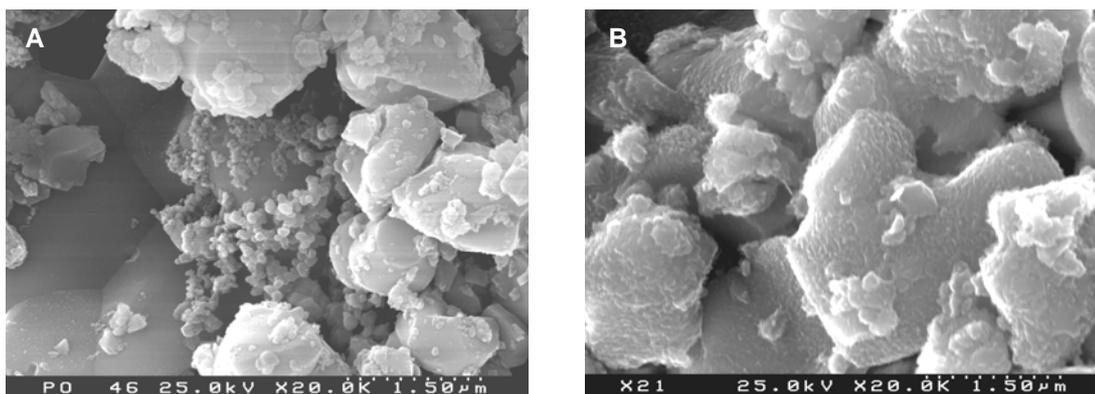


Figura 4.34- Micrografias da superfície de  $C_p$  após (a) 3 dias e (b) 23 dias de imersão em SBF sem Tris.

As curvas apresentadas na Figura 4.29 referentes à incubação dos corpos cerâmicos denotam decréscimos acentuados das concentrações de cálcio e

fosfato logo após 1 dia de incubação de ambos os cerâmicos, o que coincide com a presença de camadas de mineralização em ambos os cerâmicos ao fim de 1 dia.

Na Figura 4.35A pode observar-se que para 1 dia de imersão de  $S_c$  se observa uma camada contínua, friável por incidência do feixe electrónico. Esta camada apresentou uma morfologia fina semelhante a grãos de arroz que com o tempo evoluiu para uma microestrutura em forma de placas, como se exemplifica em B para 14 dias de incubação. Nesta Figura pode observar-se o aspecto da superfície do substrato numa zona de fractura da camada. Pode igualmente observar-se dissolução do grãos de  $\alpha$ -TCP. Foi ainda possível medir a espessura das camadas formadas, tendo-se verificado um crescimento a velocidade crescente para tempos inferiores a 20 dias (Figura 4.36), o que está de acordo com os perfis de concentrações de cálcio e fosfato observados. A relação molar Ca/P das camadas, entre 1 e 30 dias oscilou entre  $1,57 \pm 0,12$  e  $1,63 \pm 0,12$  com quantidades crescentes de sódio e magnésio. Para 30 dias a camada formada apresentou relação Ca/P =  $1,63 \pm 0,12$  com 0,70% de sódio e magnésio.

Os resultados das análises destas camadas por FTIR e raios X (Figura 4.37) são idênticos aos obtidos em HBSS, com excepção da variação já referida na intensidade relativa dos picos principais da HAP, que em SBF0 não foi tão perceptível.

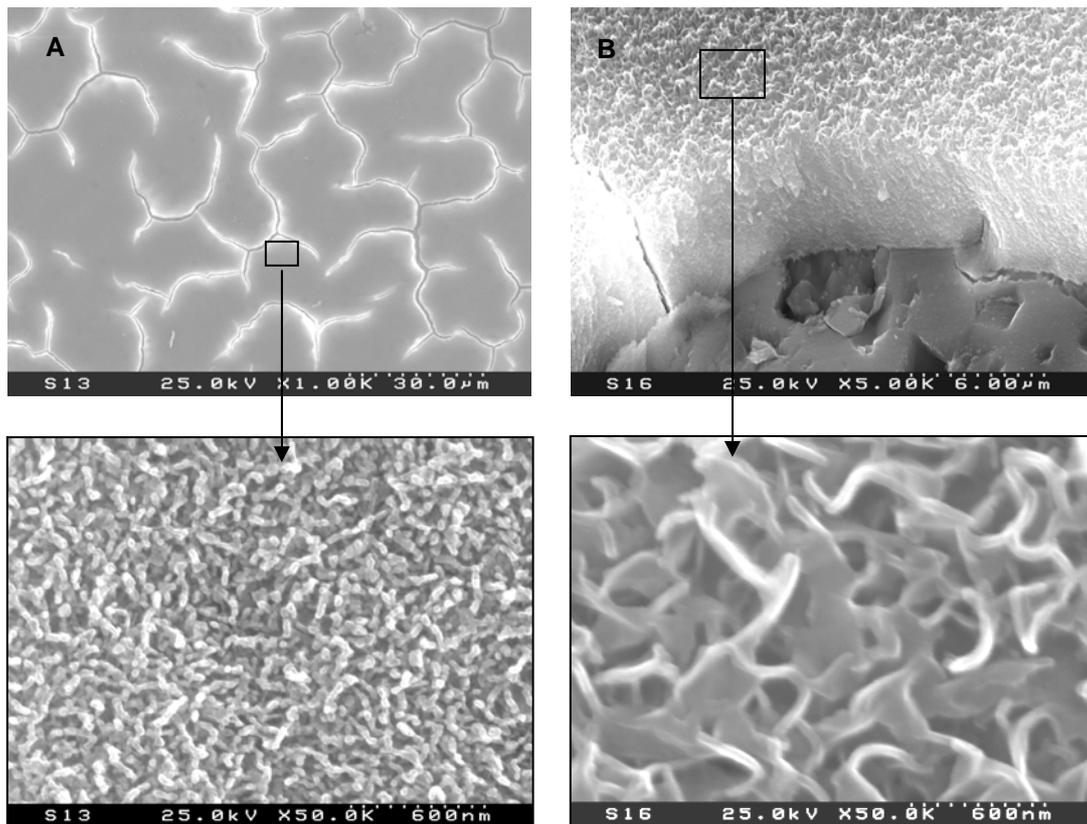


Figura 4.35 - Superfície do cerâmico  $S_c$  após 1 (A) e 14 (B) dias de incubação em solução de SBF0.

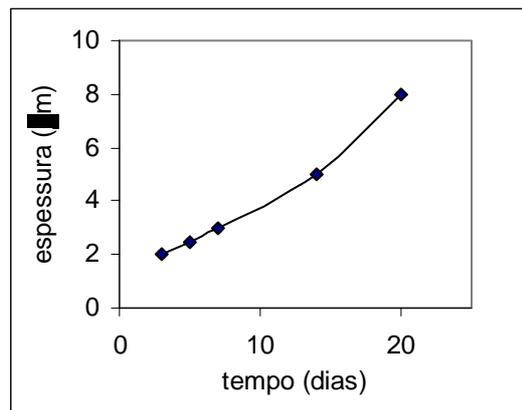


Figura 4.36 - Evolução da espessura das camadas formadas na superfície de  $S_c$  ao longo do tempo de incubação em SBF0

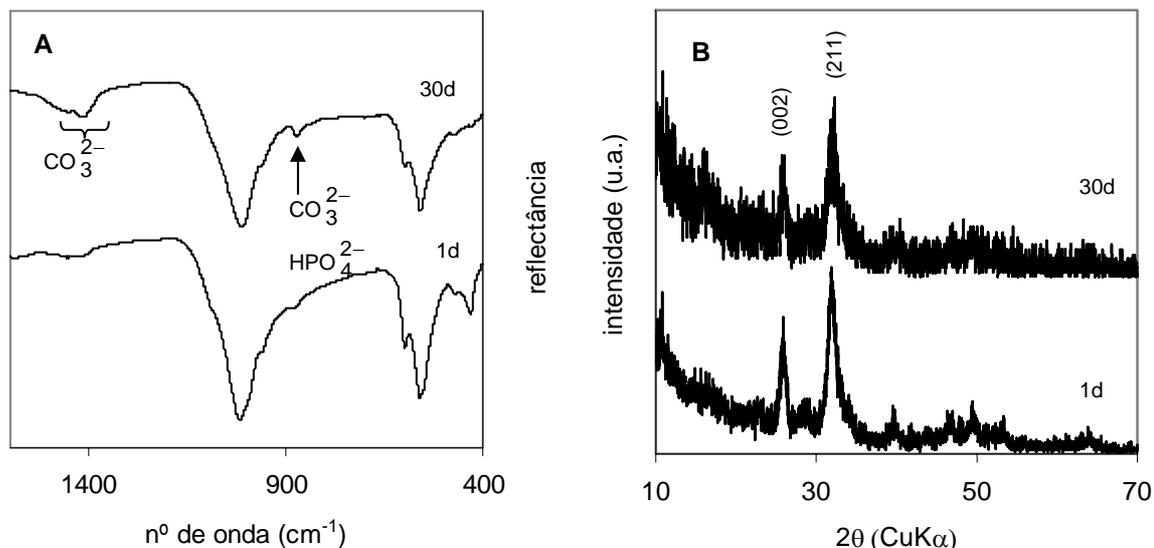


Figura 4.37 – Espectros de FTIR (A) e difractogramas de raios X (ângulo rasante) (B) da superfície dos cerâmicos  $S_c$  incubados em SBF sem tampão Tris / HCl.

A observação por SEM da superfície dos cerâmicos  $C_c$  após 1 dia de incubação mostrou uma camada fracturada pelo feixe electrónico (Figura 4.38A). A camada tornou-se mais espessa ao longo do tempo de incubação, tendo atingido a espessura máxima de 3  $\mu\text{m}$  em 7 dias de ensaio. Para os tempos seguintes a espessura e a morfologia não sofreram alteração visível. Os valores da relação Ca/P das camadas, determinados por EDS, oscilaram entre  $1,55 \pm 0,12$  e  $1,65 \pm 0,13$ , respectivamente entre 1 e 30 dias de imersão, também com quantidades crescentes de sódio e magnésio.

As análises por FTIR e por difracção de raios X foram idênticas às obtidas para  $S_c$  em SBF0.

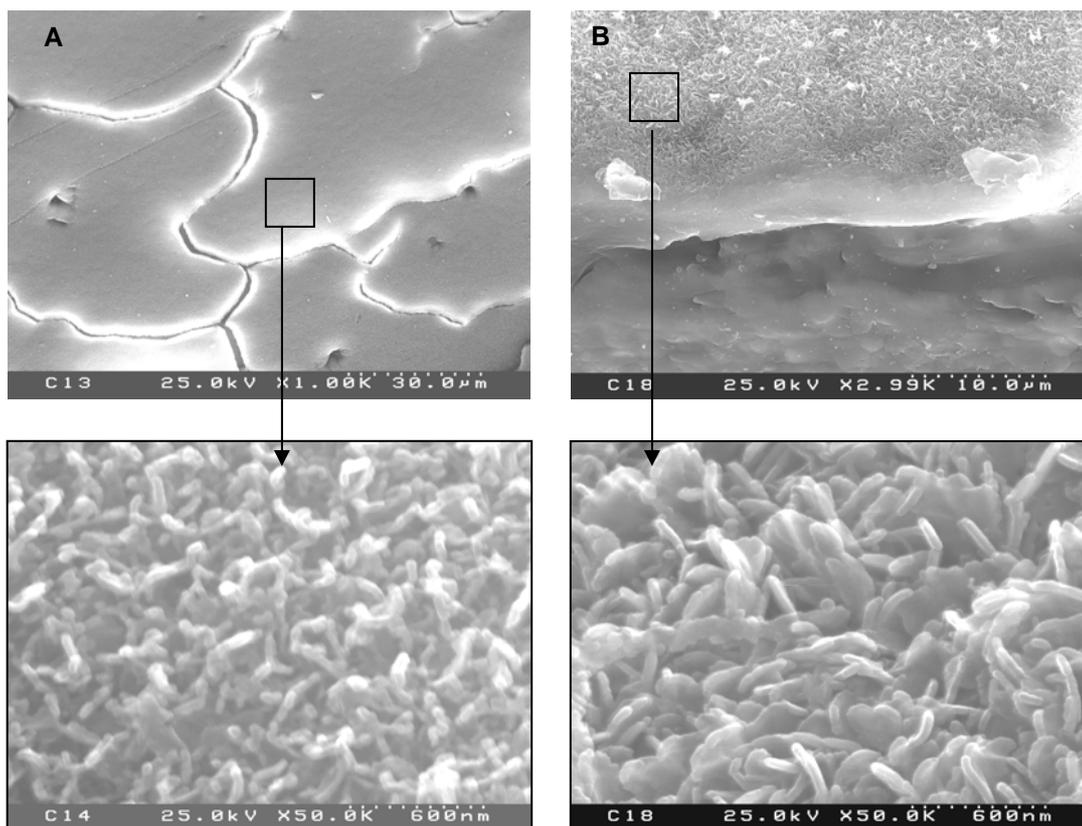


Figura 4.38 – Superfície do cerâmico  $C_c$  após 1 dia (A) e 30 dias de incubação em solução de SBF sem tampão Tris / HCl

#### 4.3.4.c – Análise de resultados

Como era esperado, o pH da solução foi variando ao longo do tempo de incubação, por não haver em ambas as soluções, uma substância que tivesse capacidade tampão apreciável.

Apesar de as soluções já serem inicialmente sobressaturadas verificou-se um aumento da sua sobressaturação relativa em HAP resultante fundamentalmente do aumento de pH. Esta variação de pH não é fácil de explicar. As concentrações totais de cálcio e fosfatos dissolvidos vão diminuindo progressivamente com o tempo como resultado de formação de HAP. A formação de HAP a partir dos seus iões constituintes resulta na produção de iões  $H^+$ , sendo de esperar um abaixamento de pH e não um aumento.

A subida de pH logo nos tempos iniciais de incubação dos cerâmicos foi inesperada. Em particular no cerâmico C não seria de prever, pela área superficial exposta, influência da eventual presença de óxido de cálcio na subida de pH. A própria manipulação prévia dos cerâmicos (polimento e lavagem) deve eliminar o óxido de cálcio superficial. Resolveu-se então estudar o comportamento das soluções ao longo do tempo sem material imerso. Assim fez-se um ensaio em branco, colocando 10,0 cm<sup>3</sup> de HBSS e de SBF0 na estufa, à temperatura de 37°C tendo-se verificado que em 7 dias, o valor de pH subiu até cerca de 8,6. Em alguns dos recipientes testados verificou-se opalescência, particularmente em SBF0, indicando formação espontânea de fases sólidas a partir da solução, que não foram analisadas devido ao carácter coloidal que impossibilitou a sua filtração.

Daqui se conclui que as soluções HBSS e SBF0 são instáveis, provocando o aumento da temperatura um correspondente aumento de pH. Com esta variação de pH de 7,4 para 8,6, a sobressaturação de HBSS passa de valores de  $S_{r(HAP)} = 2,1$  e  $S_{r(OCP)} = 0,1$  para valores de  $S_{r(HAP)} = 6,9$  e  $S_{r(OCP)} = 1,1$ . De um modo equivalente, no caso do SBF0 a  $S_{r(HAP)}$  sobe de 3,3 para 10,7 e a  $S_{r(OCP)}$  de 0,5 para 1,9.

Esta diferença de valores de sobressaturação relativa em relação à HAP e ao OCP e eventualmente a concentração diferente de outros iões constituintes destas soluções, como sódio e magnésio originou tipos de mineralização diferentes nas duas soluções.

O tipo de cristais formados à superfície de  $S_p$  em HBSS (Figura 4.22) evidencia uma possível cristalização lenta, proporcionada por uma sobressaturação não muito elevada. Uma sobressaturação baixa proporciona uma taxa de nucleação menor, e conseqüentemente, origina cristais maiores por crescimento, enquanto que, para valores de supersaturação elevados a taxa é maior e o tamanho final dos cristais menor. A mineralização verificada neste mesmo pó em SBF0 foi mais abundante e de características menos cristalinas (Figura 4.32). O atraso verificado na dissolução do  $\alpha$ -TCP terá sido devido à sobressaturação inicial destas soluções. Entretanto, a precipitação à superfície

dos grãos pode também contribuir para esse efeito, por oclusão dos grãos de  $\alpha$ -TCP.

A mineralização verificada em  $C_p$  por imersão em HBSS, embora escassa, terá sido originada pela subida de pH, a qual aumentou a sobressaturação relativa do meio. Nas situações anteriores a ausência de formação de cristais foi sempre interpretada como resultado de uma ausência de sobressaturação crítica que induzisse a nucleação.

Por imersão do sólido  $C_p$  em SBF0, a variação da curva  $S_{r(HAP)}$  ao longo do tempo indica a formação de fosfatos de cálcio para valores de tempo maiores do que 30 minutos sendo de esperar a formação de núcleos de cristalização e consequente crescimento. A ocorrência de cristais visíveis somente nas amostras com tempos de incubação superiores a 3 dias deve resultar do tamanho demasiado pequeno dos cristalitos formados a tempos inferiores. Os primeiros depósitos detectados neste material apresentam uma morfologia diferente das fases de fosfato de cálcio até agora consideradas. Este mesmo tipo de depósito foi obtido por Ferraz *et al*<sup>28</sup> após 7 e 14 dias de imersão de HAP em SBF, tendo sido identificado por XPS como HAP deficiente em cálcio. A morfologia observada na Figura 4.34B, parece evidenciar crescimento de placas a partir da superfície dos pós.

Relativamente aos corpos cerâmicos, os resultados obtidos em HBSS e SBF0 foram idênticos, embora com cinética de mineralização mais rápida em SBF0, favorecida pela sobressaturação superior.

A maior espessura das camadas formadas em  $S_c$ , ter-se-á devido essencialmente à dissolução de  $\alpha$ -TCP, a qual terá fornecido para a solução quantidades acrescidas de cálcio e fosfato. A mineralização verificada terá sido devida, pelo menos provavelmente, a uma precipitação espontânea originada na instabilidade da solução, facilitada pela presença de substratos de fosfato de cálcio, que favorecem a nucleação heterogénea.

---

<sup>28</sup> Ferraz MP, Monteiro FJ, Santos JD. CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass hydroxyapatite double-layer plasma-sprayed coating: In vitro bioactivity evaluation. *J Biomed Mater Res* (1999) **45**: 376-383

Pelos resultados obtidos nesta secção pode concluir-se que quer os pós quer os cerâmicos mineralizaram nas soluções de HBSS e SBF0, com formação de camadas apatíticas carbonatadas e deficientes em cálcio.

Estes resultados evidenciam ainda a importância da presença de um tampão nos fluidos mineralizantes.

#### 4.3.5. Incubação em SBF

##### 4.3.5.a – Resultados experimentais

Os valores de pH e das concentrações totais de cálcio e fosfato nas soluções de imersão dos pós e dos corpos cerâmicos em SBF são apresentados respectivamente na Figura 4.39 e 4.40.

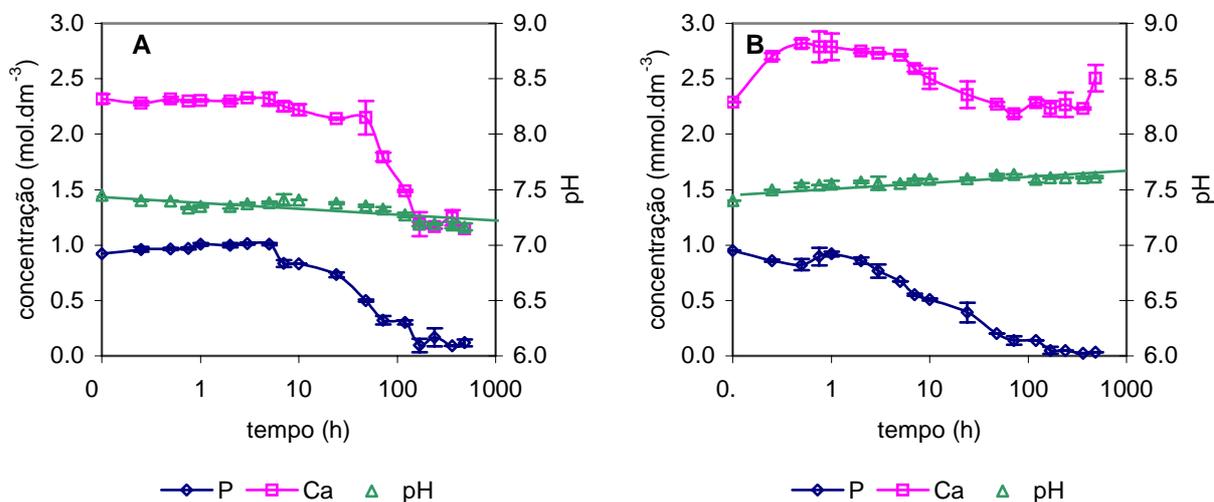


Figura 4.39 - Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e de pH ao longo do tempo de incubação de (A) S<sub>p</sub> e (B) C<sub>p</sub> em SBF.

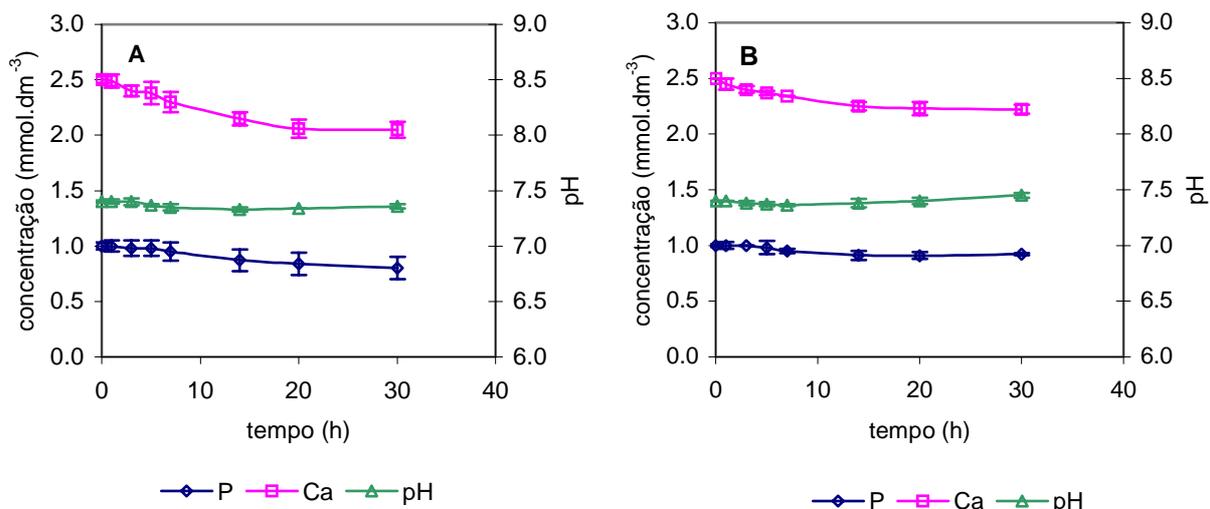


Figura 4.40 - Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e de pH ao longo do tempo de incubação de (A) S<sub>c</sub> e (B) C<sub>c</sub> em SBF.

Nas Figuras 4.41 e 4.42 apresentam-se as curvas de variação de S<sub>r(HAP)</sub>, S<sub>r(OCP)</sub> e do quociente Ca/P, respectivamente para os pós e para os corpos cerâmicos.

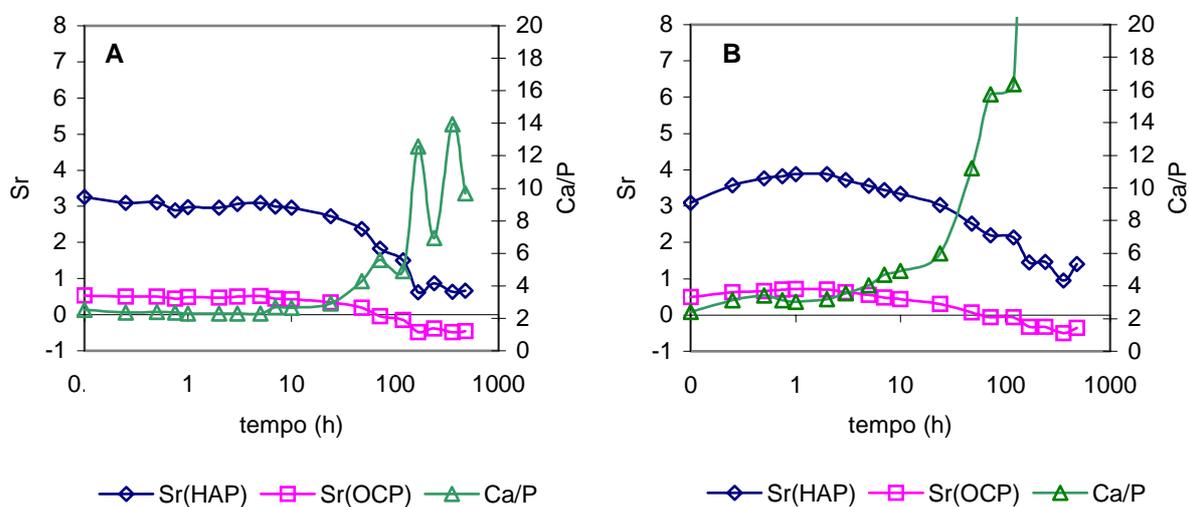


Figura 4.41 – Variação da sobressaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para S<sub>p</sub> (A) e C<sub>p</sub> (B) em SBF.

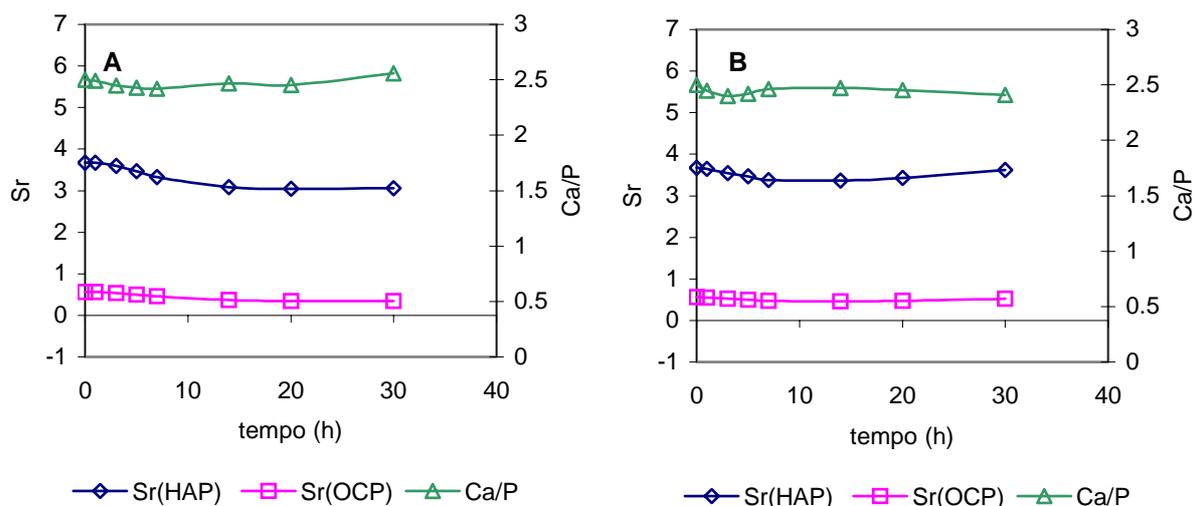


Figura 4.42 – Variação da sobressaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_c$  (A) e  $C_c$  (B) em SBF.

Apesar da constância de concentrações até 7 horas observada na Figura 4.39A, observou-se formação de cristais sobre o sólido  $S_p$  para o primeiro tempo estudado, que neste caso foi de 15 minutos. A dissolução total do  $\alpha$ -TCP ocorreu entre 1 e 2 dias, altura em que se inicia o decréscimo das concentrações totais de cálcio e fosfato.

A morfologia inicial da mineralização foi acicular (Figura 4.43A). Para tempos superiores a 1 dia a camada de mineralização passou a ser constituída predominantemente por placas, mantendo-se esta morfologia até final dos ensaios. Esta situação está ilustrada na Figura 4.43B. A análise por EDS da superfície destes pós deu uma relação molar Ca/P média de  $1,63 \pm 0,11$ .

O espectro de infravermelho do pó  $S_p$  incubado para tempos maiores que 5 dias é tipificado na Figura 4.44. Por comparação deste espectro com o do pó original, é possível detectar a presença de novas bandas em torno de  $1400 \text{ cm}^{-1}$ , atribuíveis ao ião carbonato. Não se detecta qualquer alteração nos difractogramas de raios X dos pós incubados em comparação com o do pó inicial.

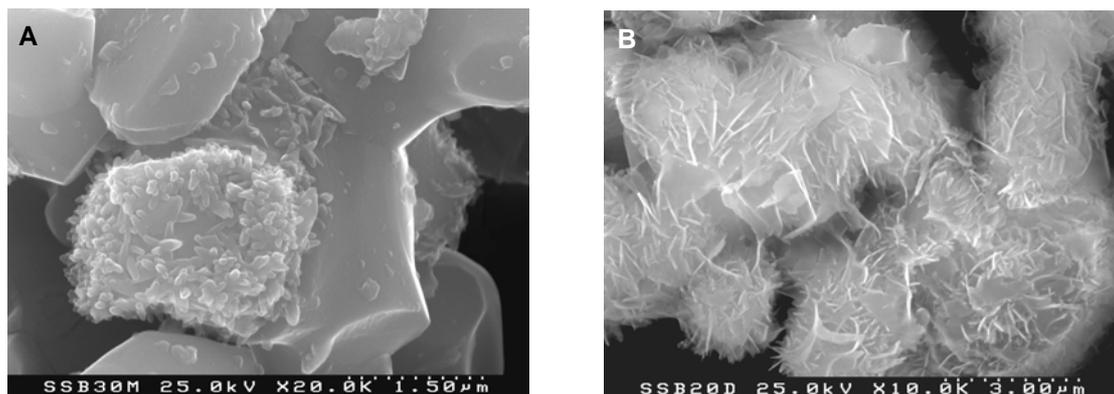


Figura 4.43 – Superfície de  $S_p$  (A) após 30 minutos e (B) após 20 dias de imersão em SBF.

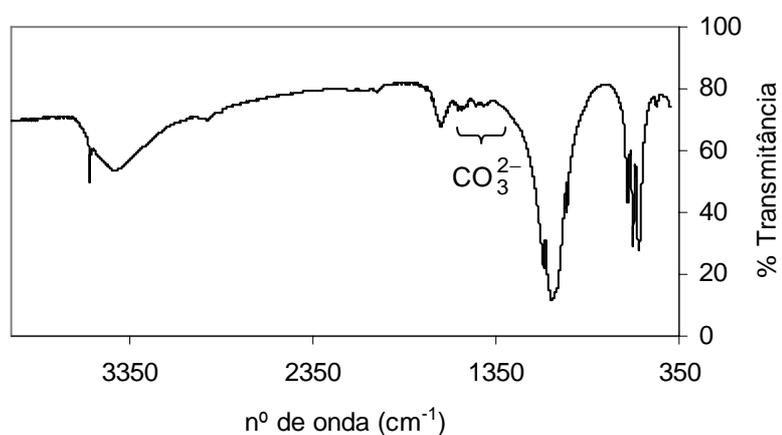


Figura 4.44 - Espectro de infravermelho do pó  $S_p$  após 20 dias de imersão em SBF.

Relativamente ao pó  $C_p$ , pela análise do gráfico da figura 4.39B é possível observar um aumento inicial da concentração de cálcio em solução, comparável ao verificado na incubação deste pó em água. A concentração total de fosfato decresce ao longo do tempo. Só se detectou mineralização ao fim de 5 dias de incubação (Figura 4.45A). Verificou-se aparecimento de cristais com crescimento preferencial em algumas faces dos grãos iniciais do pó. Esta situação manteve-se como se pode observar numa imagem geral da superfície do pó após 20 dias de incubação (Figura 4.45B). Devido à fraca mineralização não foi possível caracterizar os precipitados por qualquer outra técnica.

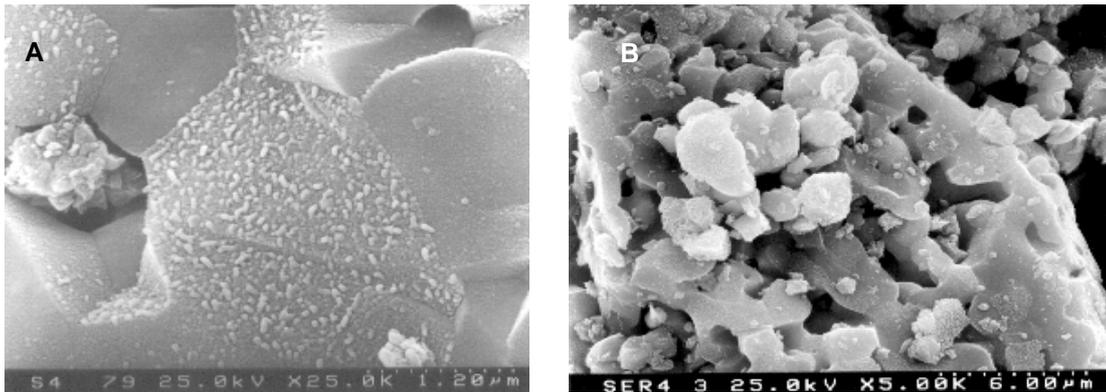


Figura 4.45 - Superfície de  $C_p$  (A) após 5 dias e (B) após 20 dias de imersão em SBF.

No caso dos corpos cerâmicos verificou-se mineralização em ambos, tendo oscilado os tempos de início de precipitação entre 7 e 14 dias em  $S_c$ , e entre 14 e 20 dias em  $C_c$ . As imagens das Figuras 4.46 e 4.47 exemplificam o tipo de cristalização observado, respectivamente para  $S_c$  e  $C_c$ .

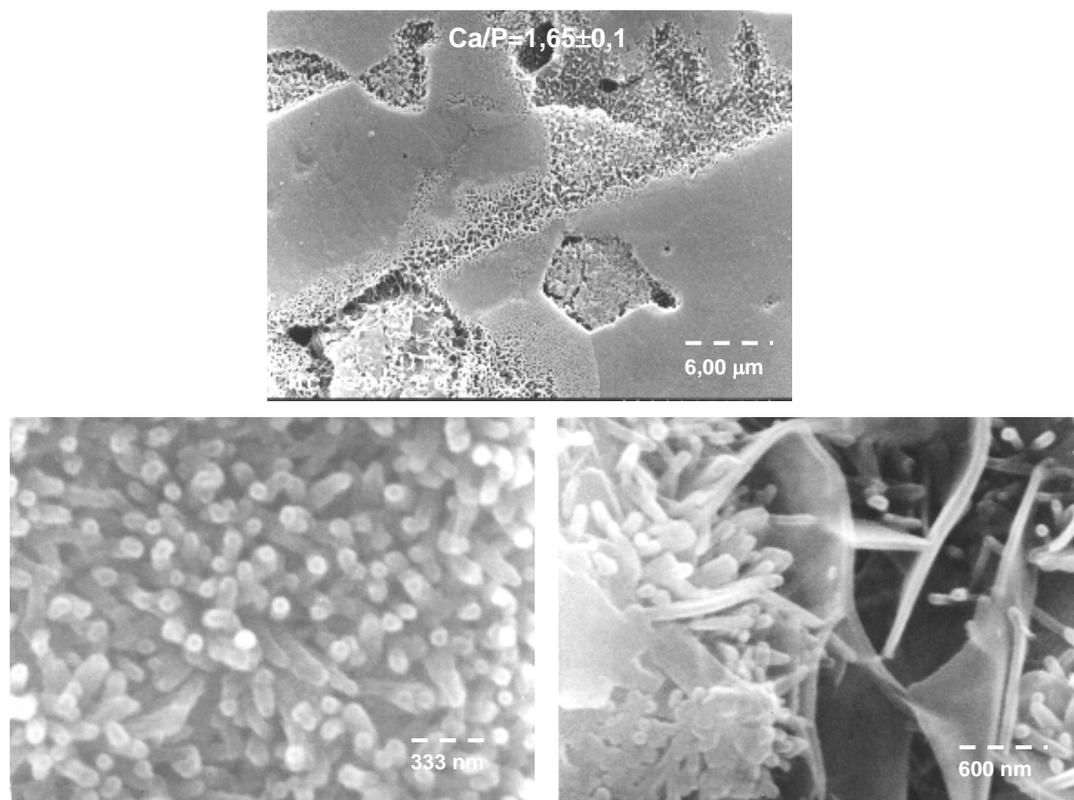


Figura 4.46 - Superfície do cerâmico  $S_c$  após 20 dias de incubação em solução SBF.

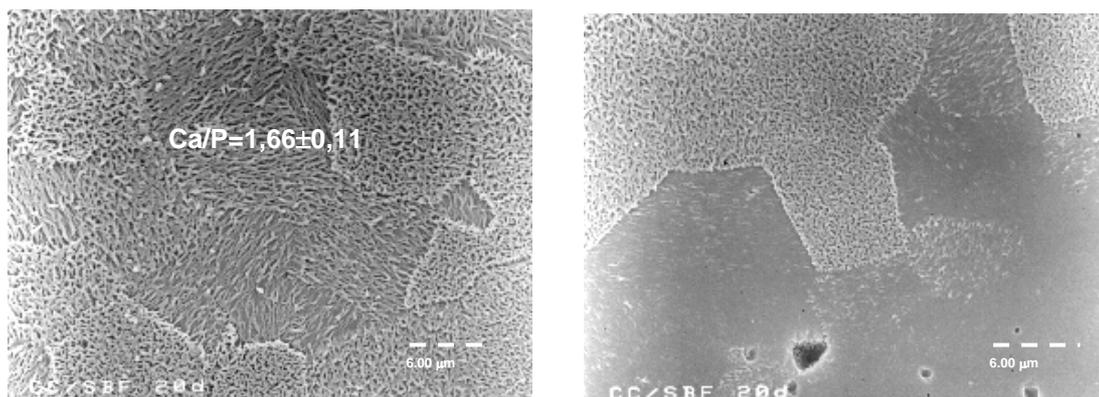


Figura 4.47 - Superfície do cerâmico  $C_c$  após 20 dias de incubação em solução SBF.

As análises por FTIR e por DRX de ambos os cerâmicos incubados em SBF não mostraram diferenças assinaláveis, relativamente às superfícies virgens, provavelmente devido à espessura reduzida das camadas e à semelhança entre camada e substrato.

#### 4.3.5.b – Análise dos resultados

Os valores de pH e das concentrações totais de cálcio e fosfato nas soluções de imersão apresentados nas Figuras 4.39 e 4.40, mostram uma boa estabilidade dos valores de pH do meio devido à presença do tampão Tris/HCl. Ao contrário da maioria das situações estudadas anteriormente, neste caso a variação da sobressaturação é devida principalmente a variações das concentrações totais de cálcio e de fosfato.

A estabilidade das concentrações de cálcio e fosfato até 1 dia de imersão de  $S_p$  terá resultado de um balanço constante entre os processos de dissolução de  $\alpha$ -TCP e de precipitação de uma apatite. Após este período ocorreu decréscimo das concentrações de ambos os iões e, apesar da presença do tampão Tris/HCl, verificou-se um ligeiro decréscimo dos valores de pH, o que está de acordo com o consumo de iões  $OH^-$  durante a precipitação de HAP.

A dissolução total do  $\alpha$ -TCP ocorreu mais cedo do que em SBF sem cálcio e fosfato, pelo que se conclui que a presença de cálcio e fosfato na solução não inibe neste caso a dissolução de fosfato de cálcio. A diferença detectada ( $3 < t < 5$  dias em SBF sem cálcio e fosfato e  $1 < t < 2$  dias em SBF) deverá estar relacionada com a maior dinâmica do processo de dissolução-reprecipitação verificado em SBF, originada pelos valores de sobressaturação relativa superiores em SBF.

Comparando ainda esta solução com HBSS e SBF0, a diferença provém do facto de neste caso o pH permanecer constante e não haver uma variação muito grande da sobressaturação relativa. Como a solução já é inicialmente sobressaturada, a dissolução de  $\alpha$ -TCP promoverá uma sobressaturação local elevada, em relação à HAP, iniciando-se rapidamente a mineralização nos pós. Os processos de dissolução e de mineralização são opostos na contribuição que dão para o valor do pH do meio, tendendo o balanço final para valores mais ácidos, como traduzido pela equação 4.2, mas a presença do tampão Tris/HCl parece ser efectiva na compensação.

A morfologia encontrada na superfície de  $S_c$  para 20 dias de ensaio em SBF assemelha-se à verificada para 1 dia de incubação em solução tampão de Tris/HCl. O mecanismo inicial de mineralização deve ser idêntico, embora com uma cinética muito diferente. Esta diferença na cinética de mineralização foi igualmente verificada no caso dos pós imersos nestas soluções. A principal causa para esta diferença deverá residir nos valores de força iónica e de sobressaturação inicial da solução.

A observação da superfície  $C_c$  após 20 dias de ensaio em SBF evidencia um crescimento preferencial de acordo com os planos cristalográficos do substrato, dando origem a uma contrastação dos grãos do cerâmico. A mineralização verificada neste cerâmico ocorrerá por intermédio de um mecanismo diferente do verificado em  $S_c$ . A solução de SBF é sobressaturada relativamente à HAP, pelo que não será de esperar dissolução do cerâmico. O crescimento observado deverá ser resultado de nucleação heterogénea, favorecida pela presença da superfície de fosfato de cálcio, proporcionando

crescimento epitaxial. No cerâmico  $S_c$ , embora ocorra igualmente nucleação heterogênea, esta deverá ser iniciada pela dissolução da fase  $\alpha$ -TCP.

#### 4.4. Incubações na presença de albumina dissolvida

De acordo com Peters<sup>29</sup> sabe-se, desde os anos 30, que da quantidade total de cálcio que circula no plasma (25 mM) cerca de 45% é livre, 45% está ligado às proteínas do soro, principalmente a albumina, e os restantes 10% estão complexados com moléculas menores como fosfato e citrato. De acordo com este dado os valores de sobressaturação das soluções onde se dissolveu albumina foram calculados retirando 45% da concentração de  $Ca^{2+}$  livre calculada usando o mesmo programa que nos cálculos anteriores.

Assim, as curvas de sobressaturação relativa a seguir apresentadas traduzem essa percentagem de complexação. Para comparação representam-se a tracejado nos mesmos gráficos as curvas de sobressaturação relativa calculadas sem considerar a complexação referida.

##### 4.4.1. Incubação em HBSS

###### 4.4.1.a – Resultados experimentais

Os valores de pH e das concentrações totais de cálcio e fosfato nas soluções de imersão dos pós e dos cerâmicos em HBSS com albumina (HBSSA) são apresentados respectivamente, nas Figuras 4.48 e 4.49.

---

<sup>29</sup> Peters T Jr. Ligand binding by albumin. *In*: All about albumin, biochemistry, Genetics and medical applications. Academic Press, San Diego (1992)

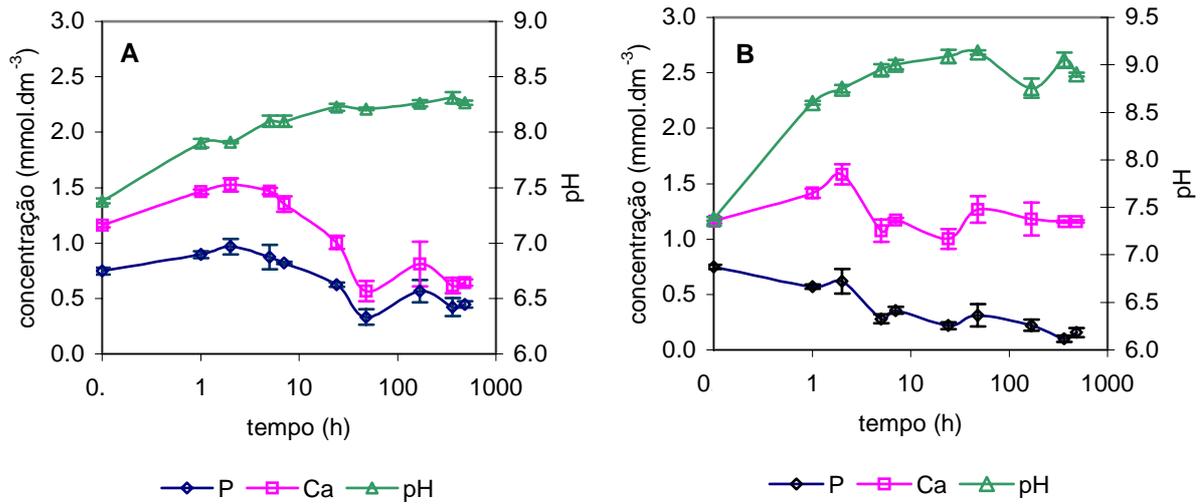


Figura 4.48 – Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e do pH ao longo do tempo de incubação de (A)  $S_p$  e (B)  $C_p$  em HBSSA.

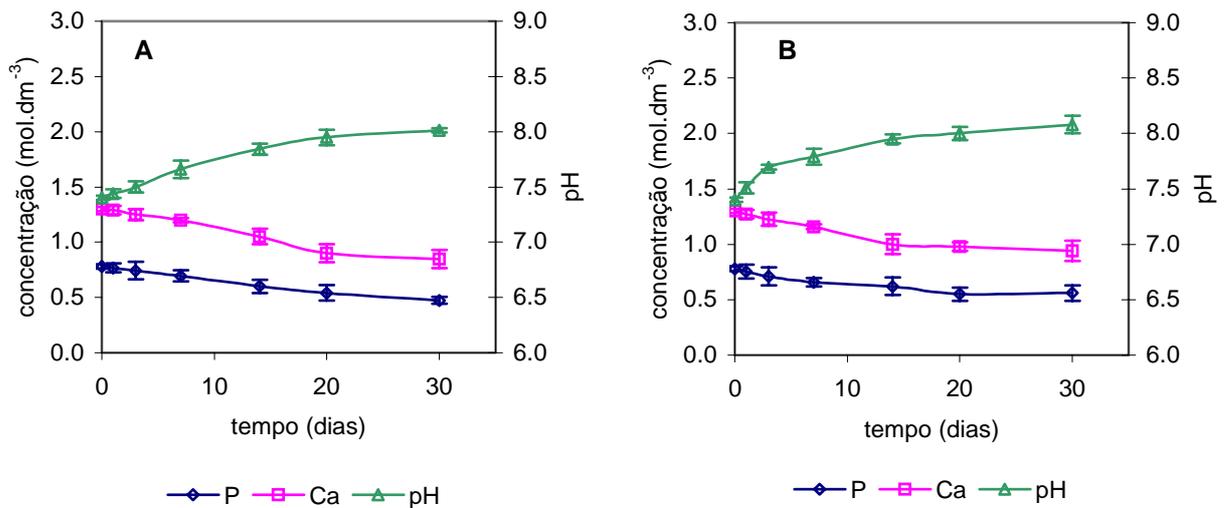


Figura 4.49 – Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e do pH ao longo do tempo de incubação de (A)  $S_c$  e (B)  $C_c$  em HBSSA.

Nas Figuras 4.50 e 4.51 apresentam-se as curvas de sobressaturação relativa respectivamente para  $S_c$  e  $C_c$ .

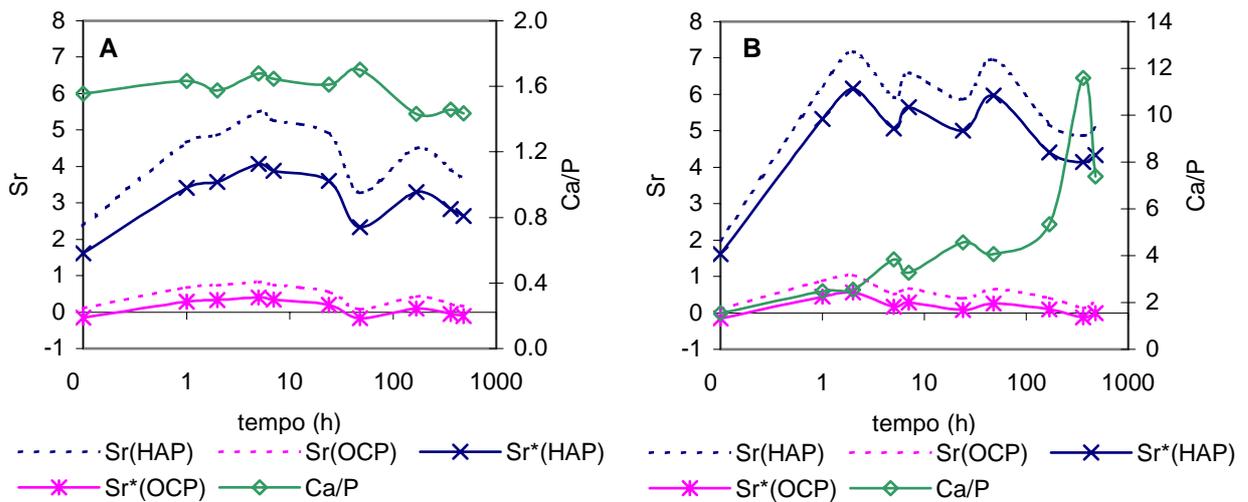


Figura 4.50 – Variação da sobresaturação relativa em HAP e em OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_p$  (A) e  $C_p$  (B); \*cálculos considerando 45% de cálcio complexado com albumina.

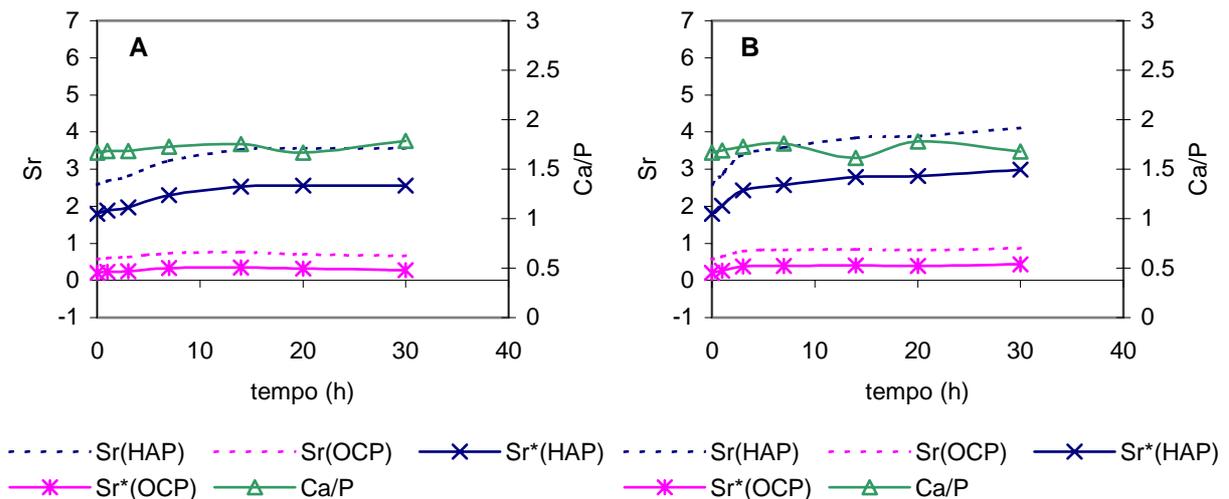


Figura 4.51 – Variação da sobresaturação relativa em HAP e em OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_c$  (A) e  $C_c$  (B) \*cálculos considerando 45% de cálcio complexado com albumina.

No pó  $S_p$  só se observou sinais de mineralização após 1 dia de imersão (Figura 4.52A). Por comparação com o tempo de 30 minutos detectado para a mesma solução na ausência de albumina, pode concluir-se que esta proteína interfere no processo de mineralização. Também a morfologia dos precipitados

obtidos é diferente, como se pode observar comparando as figuras 4.22 e 4.52. A dissolução total do  $\alpha$ -TCP não se verificou durante os tempos de ensaio.

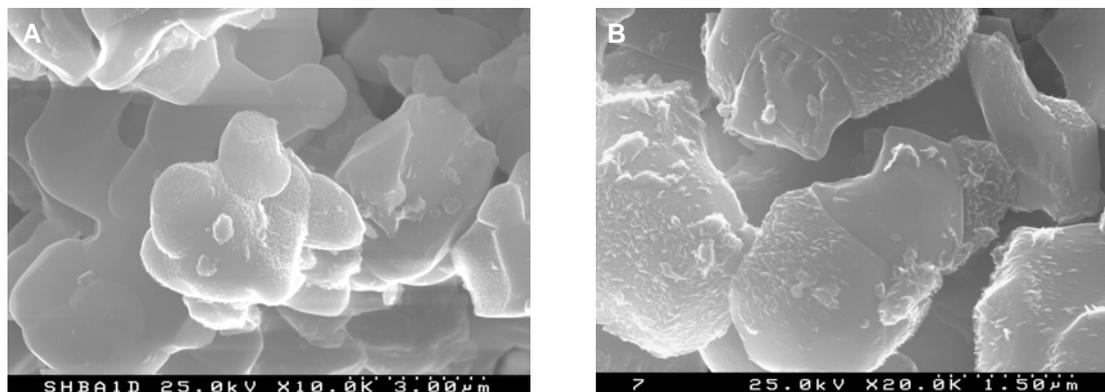


Figura 4.52 - Micrografia da superfície de  $S_p$  após 1 dia (A) e 23 dias (B) de imersão em HBSS com albumina

A precipitação em  $C_p$  foi, tal como no caso anterior, reduzida. Na Figura 4.53 apresenta-se o aspecto da superfície do pó imerso 20 dias.

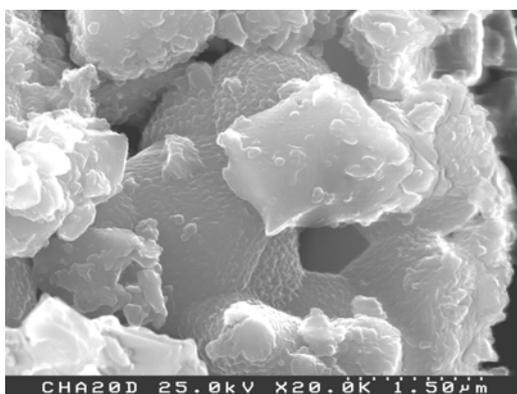


Figura 4.53 - Micrografia da superfície de  $C_p$  após 20 dias de imersão em HBSS com albumina

No caso dos corpos cerâmicos, pela comparação entre os perfis de concentração iónica das soluções após incubação de ambos os cerâmicos em HBSSA (Figura 4.49) e em HBSS sem albumina (Figura 4.19), observou-se menor

variação das concentrações iónicas em presença de albumina. Este factor pode ser indicador de menor reactividade das superfícies em meio com albumina.

Por SEM confirmou-se que o início de mineralização foi inibido em HBSSA. Na superfície de  $S_c$ , os primeiros sinais de mineralização observaram-se para 14 dias de ensaio (Figura 4.54A). Observou-se também menor dissolução dos grãos de  $\alpha$ -TCP. Na Figura 4.54B, pode observar-se a camada entretanto formada para 30 dias de ensaio.

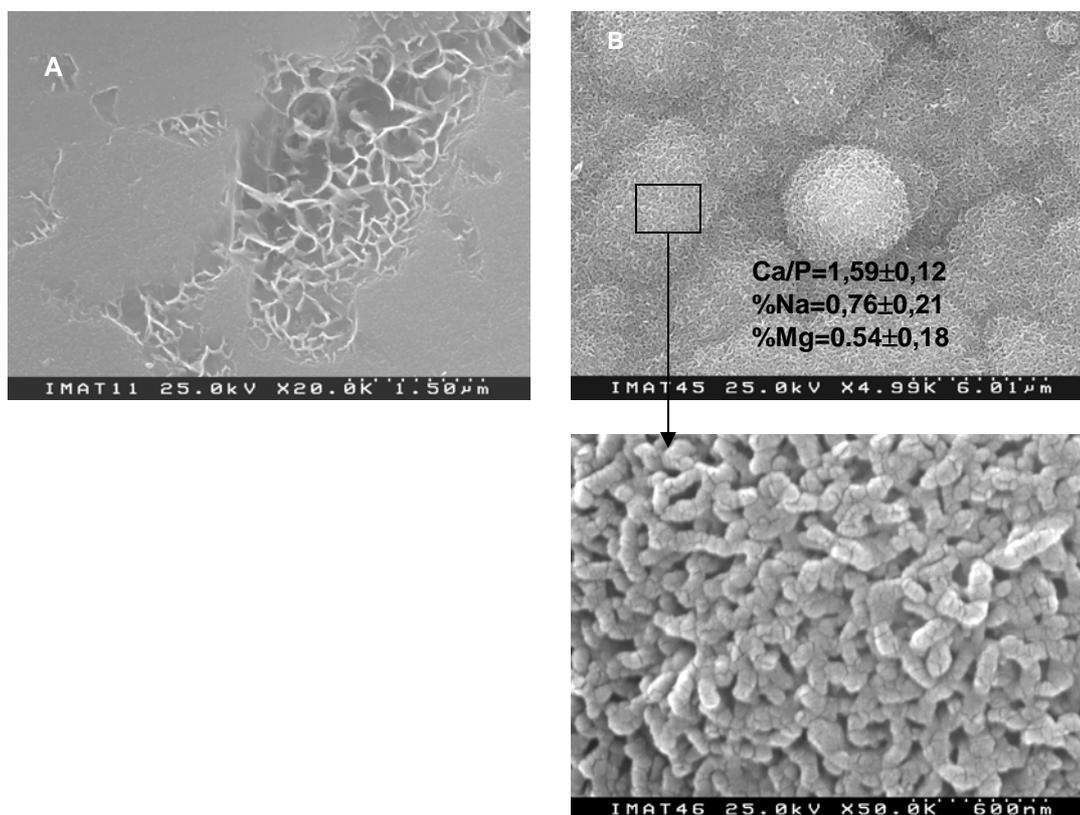


Figura 4.54. Superfície do cerâmico  $S_c$  após (A) 14 dias e (B) 30 dias de imersão em HBSS com albumina dissolvida no meio.

Em  $C_c$  a mineralização foi incipiente. Na Figura 4.55A podem observar-se vestígios de precipitação para 14 dias de imersão e na Figura 4.55B, uma zona de mineralização, não generalizada pela superfície, obtida para 30 dias de ensaio.

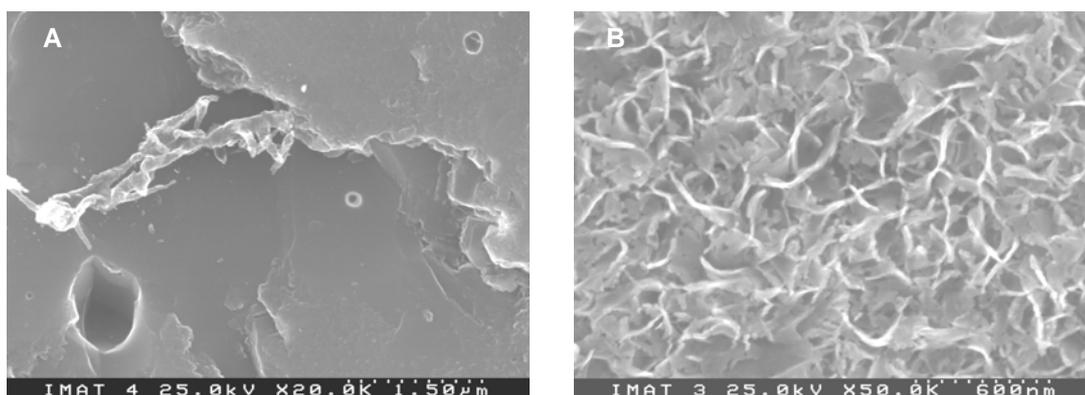


Figura 4.55. Superfície do cerâmico  $C_c$  após (A) 14 dias e (B) 30 dias de imersão em HBSS com albumina dissolvida no meio.

#### 4.4.1.b – Análise dos resultados

A dissolução de albumina em HBSS provocou um claro atraso da mineralização nos pós e nos corpos cerâmicos, relativamente aos resultados obtidos em HBSS sem albumina.

A dissolução de  $\alpha$ -TCP foi francamente inibida, o que terá sido um dos motivos para o atraso do início de mineralização observado em  $S_p$ .

Como se pode verificar nas Figuras 4.50 e 4.51, a presença de albumina diminui a sobressaturação relativa das soluções por complexação com o cálcio. Por outro lado, a dissolução de albumina aumenta a viscosidade das soluções dificultando a difusão iónica, de considerar também que a adsorção da proteína na superfície dos materiais poderá também contribuir para o efeito inibidor.

Estes três factores, diminuição da sobressaturação relativa por complexação com o cálcio, aumento da viscosidade da solução e adsorção à superfície dos materiais, terão sido responsáveis pelos resultados obtidos.

#### 4.4.2. Incubação em SBF

##### 4.4.2.a – Resultados experimentais

Nas Figuras 4.56 e 4.57 pode observar-se a variação do pH e das concentrações totais de cálcio e fosfato ao longo do tempo de incubação em SBF com albumina (SBFA), respectivamente dos pós e dos cerâmicos. Nas Figuras 4.58 e 4.59 estão representadas as variações da sobressaturação relativa em HAP e em OCP e relação molar Ca/P para as mesmas soluções.

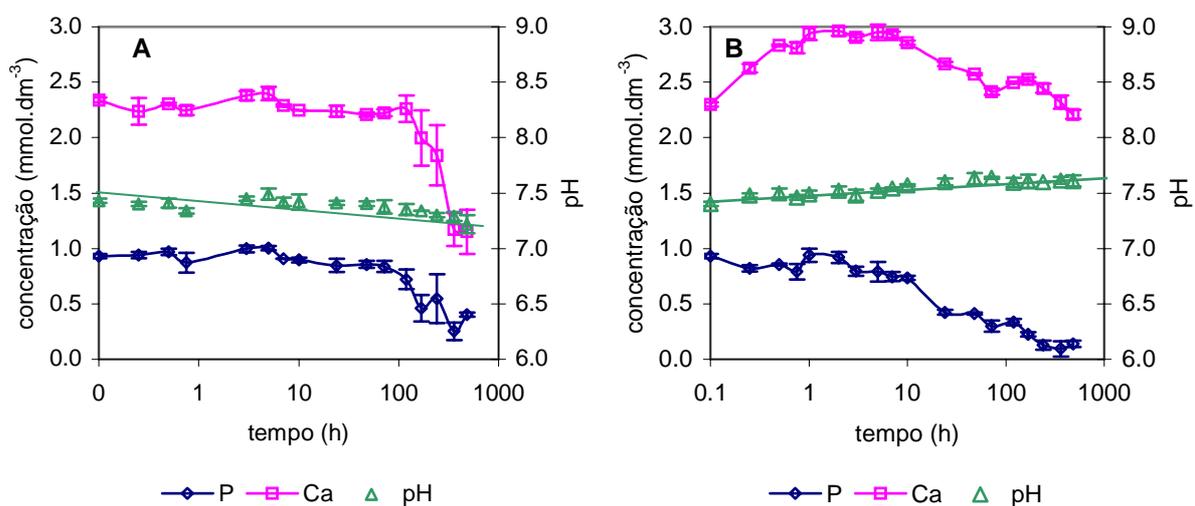


Figura 4.56 - Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e de pH ao longo do tempo de incubação de (A)  $S_p$  e (B)  $C_p$  em SBF com albumina.

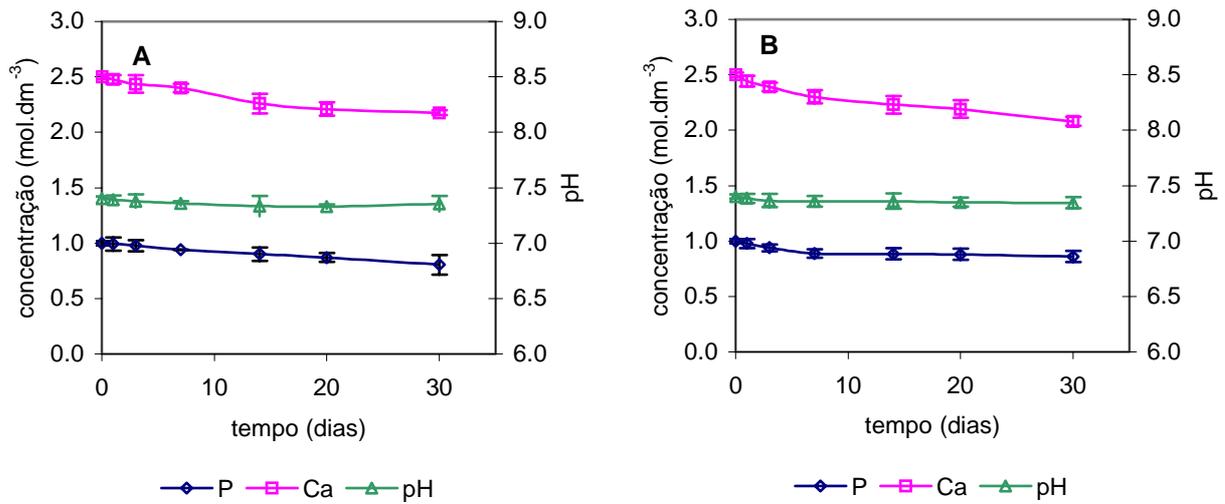


Figura 4.57 - Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e de pH ao longo do tempo de incubação de (A) S<sub>c</sub> e (B) C<sub>c</sub> em SBF com albumina.

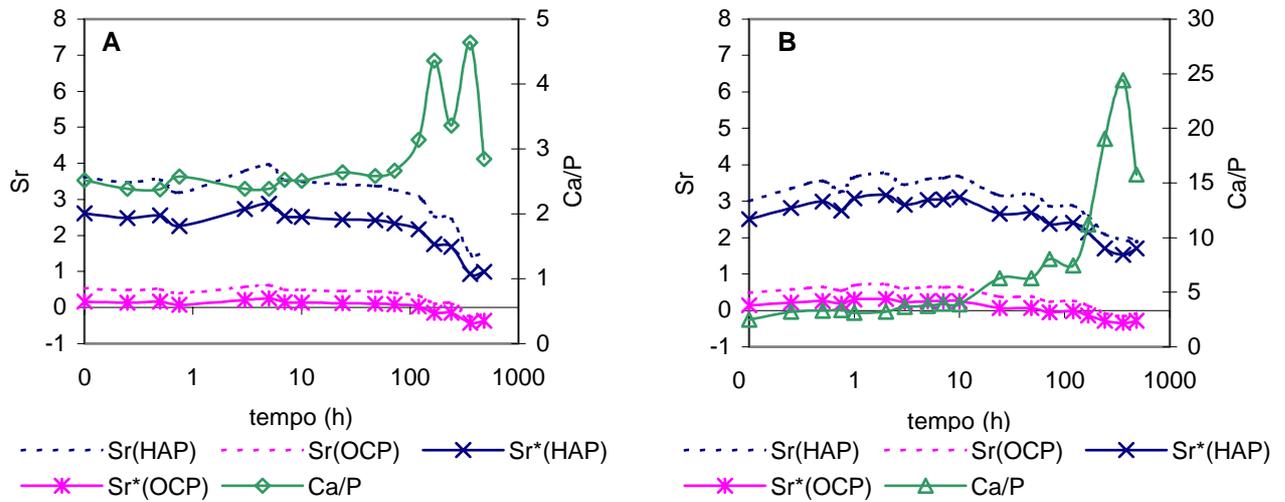


Figura 4.58 – Variação da sobressaturação relativa em HAP e em OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para S<sub>p</sub> (A) e C<sub>p</sub> (B). \*cálculos considerando 45% de cálcio complexado com albumina.

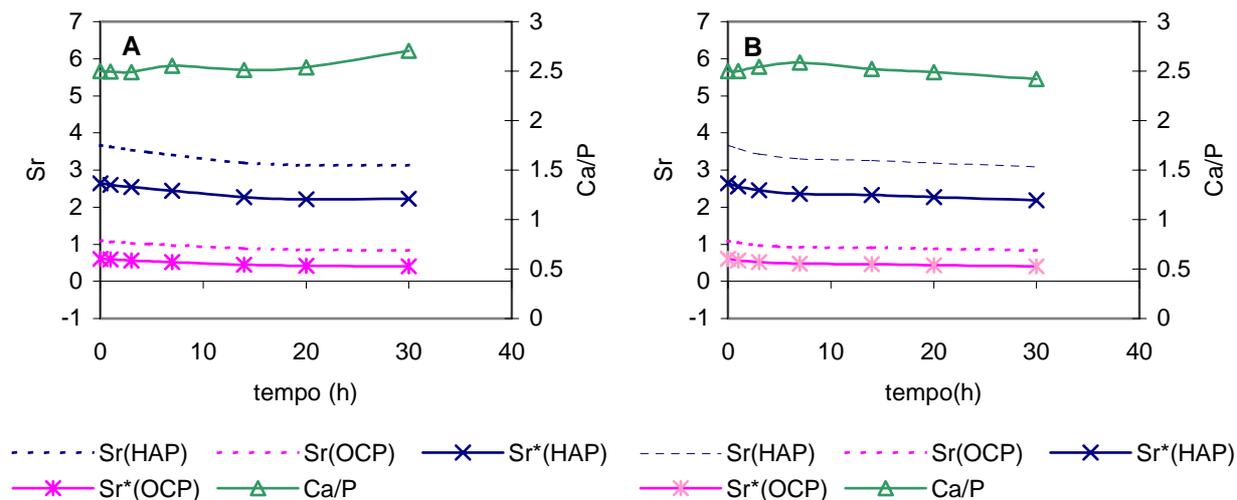


Figura 4.59 – Variação da sobresaturação relativa em HAP e em OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_c$  (A) e  $C_c$  (B). \*cálculos considerando 45% de cálcio complexado com albumina.

No pó  $S_p$  a formação de cristais à superfície só foi verificada a partir de experiência realizada para 1 hora de imersão, enquanto que na solução sem albumina já havia cristais ao fim de 15 minutos. A dissolução total do  $\alpha$ -TCP também foi retardada de 2 para 5 dias.

A morfologia dos precipitados obtidos para 20 dias de imersão foi a de uma mistura de placas e agulhas (Figura 4.60B), não muito diferente da morfologia dos precipitados na mesma solução sem albumina.

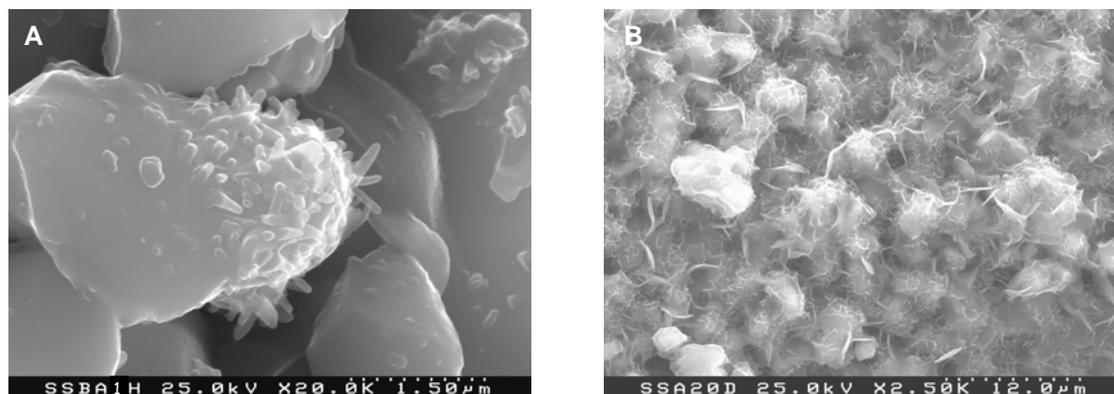


Figura 4.60 - Micrografia da superfície de  $S_p$  (A) após 1 hora e (B) após 20 dias de imersão em SBF com albumina

Na superfície de  $C_p$  a mineralização foi também claramente retardada pela presença de albumina. O aspecto da superfície dos pós incubados 20 dias, é mostrado na Figura 4.61.

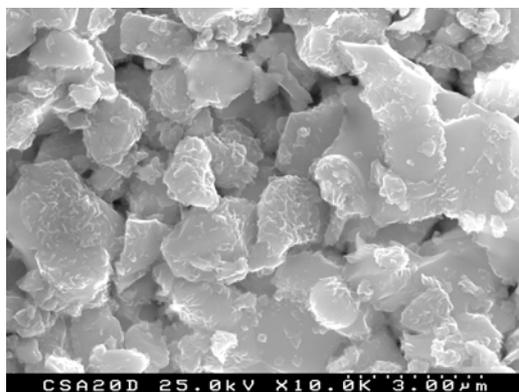


Figura 4.61 - Micrografia da superfície de  $C_p$  após 20 dias de imersão em SBF com albumina.

Por SEM não se detectou mineralização na superfície do cerâmico  $C_c$ . Em  $S_c$ , a mineralização foi reduzida, tendo-se verificado grande irreprodutibilidade quanto à detecção dos primeiros sinais de mineralização, tendo estes em média ocorrido em 14 dias de ensaio. No final dos tempos estudados (30 dias), observou-se presença de uma camada apatítica de morfologia irregular (Figura 4.62). Nas superfícies observadas, a dissolução de  $\alpha$ -TCP não foi tão evidente como em casos anteriores.

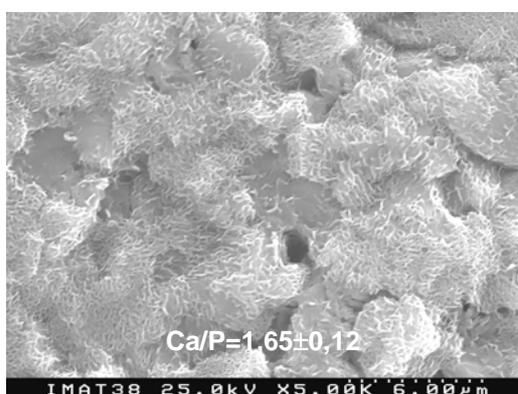


Figura 4.62 – Superfície de  $S_c$  após 30 dias de incubação em SBF com albumina dissolvida.

#### 4.4.2.b – Análise dos resultados

Tal como em HBSSA a presença de albumina retardou a cinética de mineralização dos pós e dos cerâmicos em SBFA. Também retardou a dissolução de  $\alpha$ -TCP.

Os factores responsáveis por este comportamento serão semelhantes aos discutidos em 4.4.1.b.

#### 4.5. Incubações realizadas com pré-adsorção de albumina

O comportamento dos cerâmicos em presença de albumina diferiu nas duas situações testadas: dissolução de albumina no meio ou pré-adsorção de albumina na superfície do cerâmico, como se verá de seguida.

Os cerâmicos condicionados 2 horas na solução salina de albumina foram observados por SEM. Como se pode observar na Figura 4.63, a superfície de  $S_c$  após condicionamento,  $S_{cA}$ , apresenta dissolução apreciável dos grãos de  $\alpha$ -TCP, enquanto que na superfície de  $C_{cA}$  não se observa qualquer alteração relativamente à original.

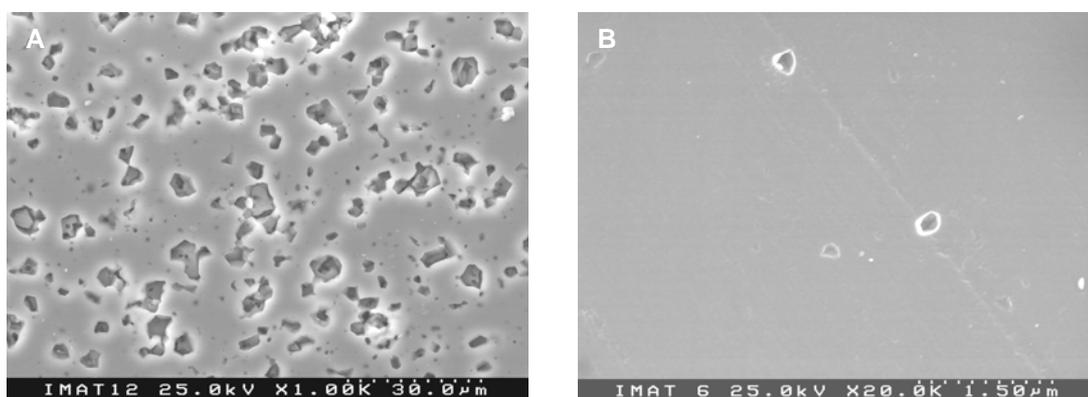


Figura 4.63 – Superfície dos cerâmicos  $S_{cA}$  (A) e  $C_{cA}$  (B) após 2 horas de condicionamento em solução salina de albumina.

Estas superfícies foram analisadas por XPS (Espectroscopia de fotoelectrão de raio-X), tendo-se detectado cerca de 8 e 10% (% atômica) de azoto, respectivamente, em  $S_{CA}$  e  $C_{CA}$ . Nas amostras virgens não se detectou azoto, o que permite concluir que, tal como se esperava, a albumina foi adsorvida em ambos os cerâmicos.

Estas superfícies foram também observadas por microscopia de força atômica (AFM). As superfícies de  $C_c$  após condicionamento em albumina tornaram-se menos rugosas, o que poderá ser devido à camada proteica (Figura 4.64). Não é possível mostrar imagens da superfície  $S_{CA}$ , uma vez que a rugosidade elevada originada pela dissolução de  $\alpha$ -TCP não permitiu a obtenção de imagens por AFM.

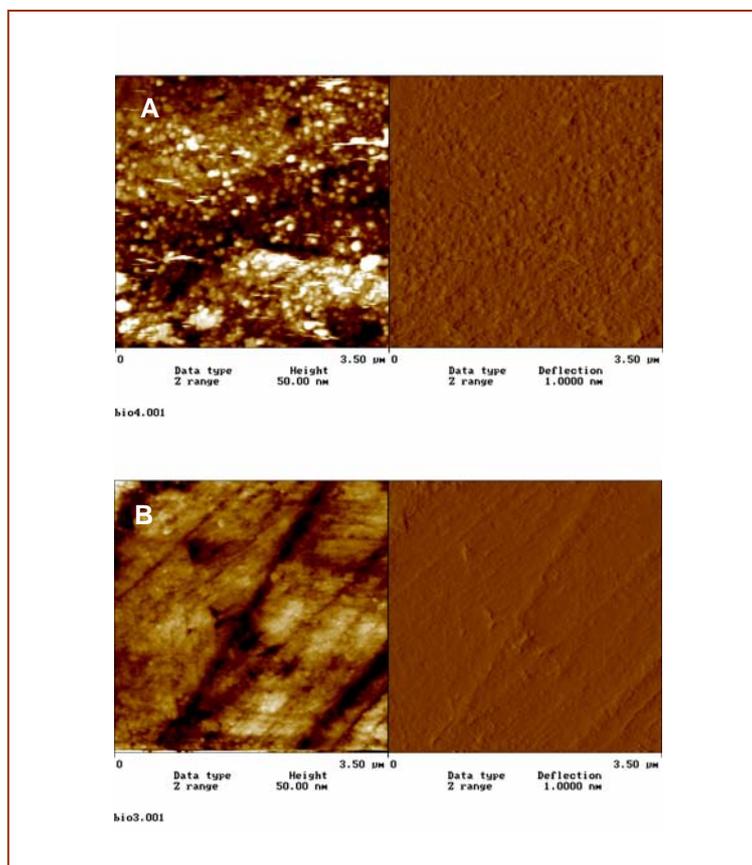


Figura 4.64 – Micrografias de Força Atômica das superfícies C antes (A) e após (B) adsorção de proteína.

#### 4.5.1 – Incubação em HBSS

##### 4.5.1.a – Resultados experimentais

Tal como se tinha assistido na incubação de  $S_c$  e  $C_c$  em HBSS, também aqui se observou subida dos valores de pH ao longo do tempo de imersão. A subida de pH leva ao aumento da sobressaturação do meio apesar do decréscimo das concentrações de cálcio e fósforo total, como se pode observar na Figura 4.65. Este efeito é particularmente acentuado em  $C_{Ac}$ .

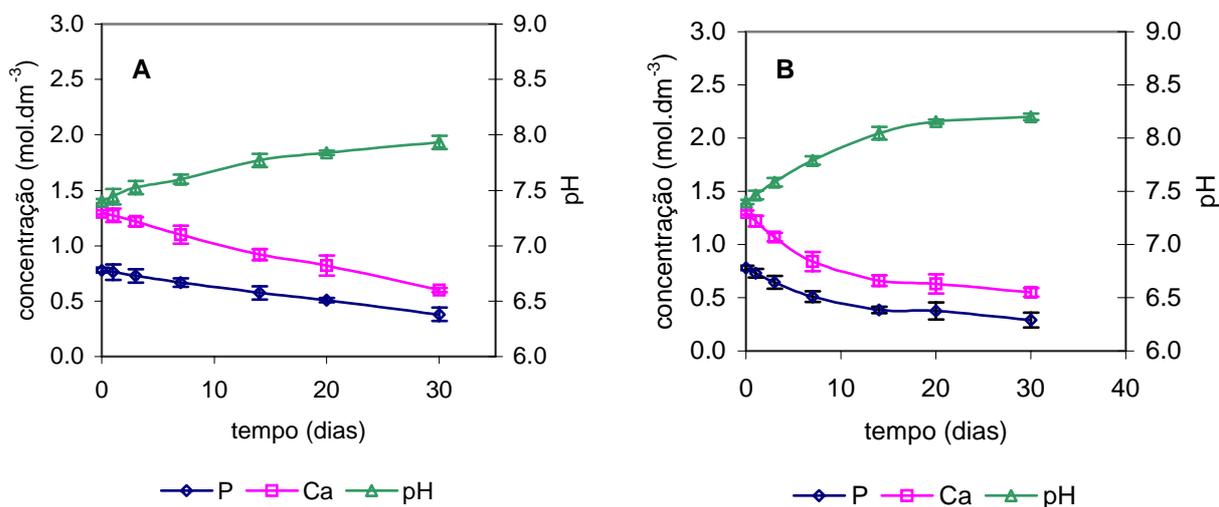


Figura 4.65 - Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e de pH ao longo do tempo de incubação de (A)  $S_{Ac}$  e (B)  $C_{Ac}$  em HBSS.

Na Figura 4.66 estão representadas as variações da sobressaturação relativa em HAP e em OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo.

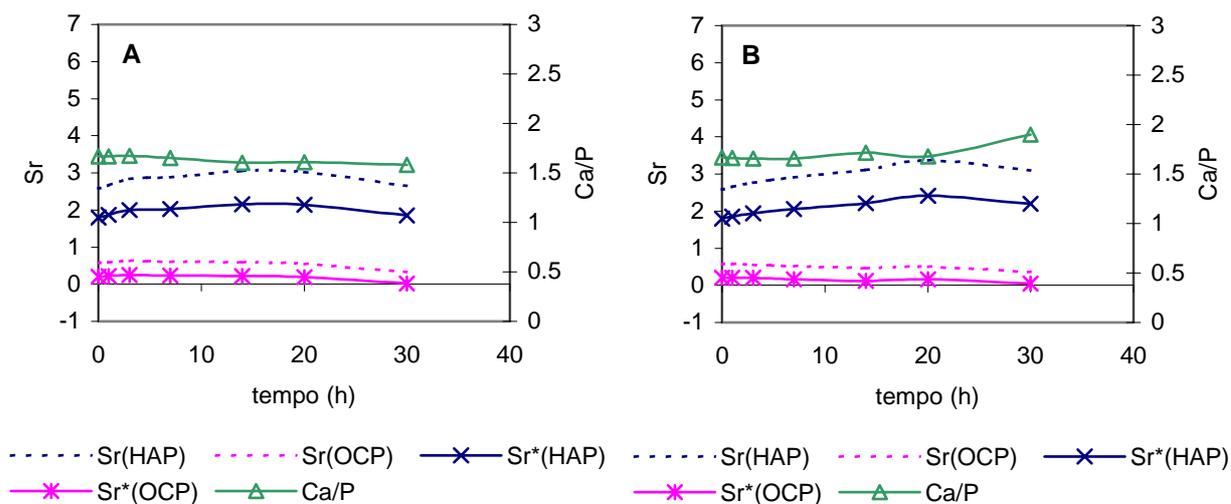


Figura 4.66 – Variação da sobresaturação relativa em HAP e em OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_{Ac}$  (A) e  $C_{Ac}$  (B). \*cálculos considerando 45% de cálcio complexado com albumina.

A diferença entre as curvas de sobresaturação relativa calculadas sem considerar e considerando 45% de  $Ca^{2+}$  ligado às moléculas de albumina poderá ser menor nestes casos. A albumina está agora adsorvida na superfície dos cerâmicos, podendo passar alguma fração para a solução durante a imersão. Deve pois considerar-se que as curvas reais de sobresaturação relativa estarão compreendidas entre as duas curvas traçadas na Figura 4.66.

O condicionamento prévio dos cerâmicos em albumina promoveu a mineralização em HBSS; foi no entanto difícil estabelecer tempos de indução para a mineralização, devido a alguma irreprodutibilidade dos resultados nos tempos iniciais. Em 14 dias de ensaio observou-se em ambos os cerâmicos a formação de camada espessa ( $\approx 2,7 \mu\text{m}$  de espessura), cobrindo toda a superfície (Figura 4.67). Para os tempos seguintes, manteve-se o tipo de microestrutura e composição. As camadas atingiram um máximo de  $3,2 \mu\text{m}$  de espessura em 30 dias de ensaio. De notar a descontinuidade entre camada e substrato na Figura 4.67B.

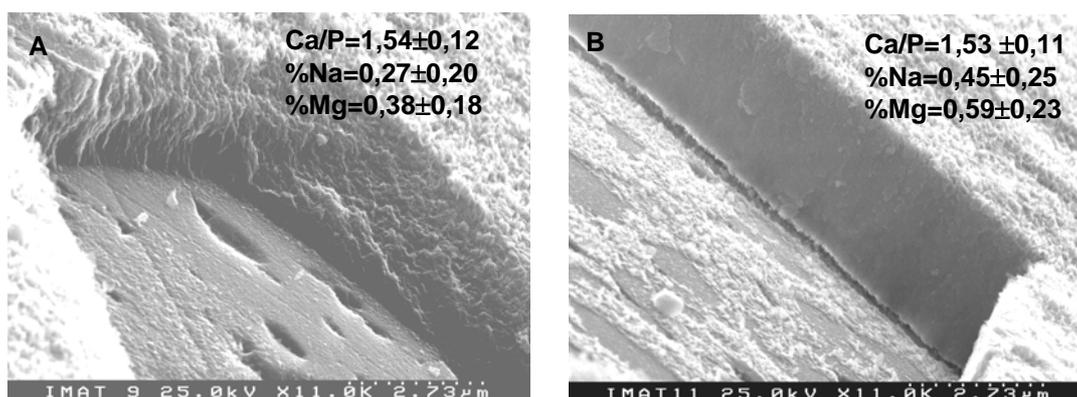


Figura 4.67 – Superfície dos cerâmicos  $S_{Ac}$  (A) e  $C_{Ac}$  (B) após 14 dias em HBSS.

Embora a análise por EDS tenha revelado composições químicas das camadas muito próximas para ambos os cerâmicos, a análise por FTIR mostra diferenças estruturais nas camadas formadas em 14 dias de imersão: em  $S_{Ac}$  observam-se bandas de absorção características de HAP pouco cristalina, sem presença de carbonatos (Fig. 4.68); em  $C_{Ac}$  observa-se a presença de bandas atribuíveis a OCP (Fig. 4.69). Para os tempos seguintes, 20 e 30 dias, já não se observa esta fase, apenas as bandas de absorção características de HAP com pequeno grau de carbonatação. Nestas figuras apresentam-se, para comparação, espectros obtidos após condicionamento dos cerâmicos em solução de albumina, os quais não apresentam qualquer alteração relativamente aos espectros das amostras virgens.

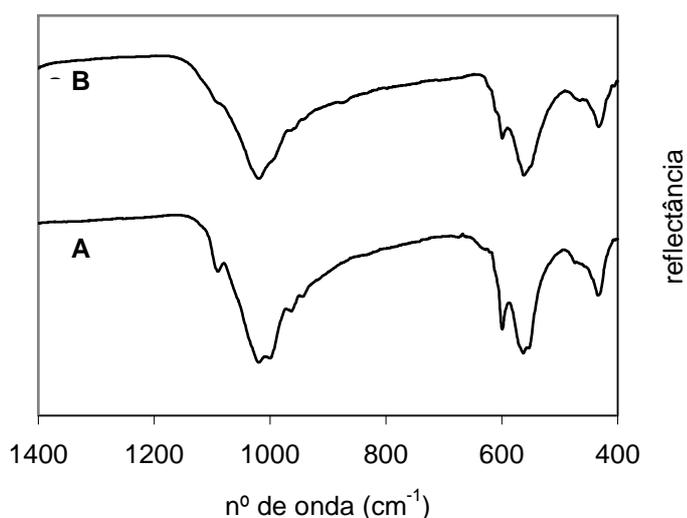


Figura 4.68 – Espectros de FTIR da superfície de  $S_c$  condicionado 2 horas em solução salina de albumina (A) e  $S_{Ac}$  incubado 14 dias em HBSS (B).

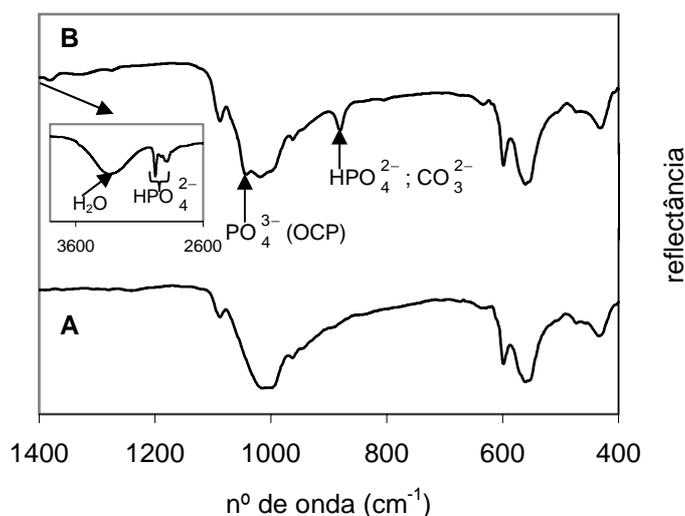


Figura 4.69 – Espectros de FTIR da superfície de  $C_c$ : condicionado 2 horas em solução salina de albumina (A);  $C_{Ac}$  incubado 14 dias em HBSS (B).

#### 4.5.1.b – Análise dos resultados

As diferenças usualmente observadas entre os dois cerâmicos devido à presença de  $\alpha$ -TCP foram, neste caso, atenuadas pela dissolução prévia desta fase durante o condicionamento.

A mineralização em  $C_{cA}$  terá envolvido a formação inicial de OCP; o mesmo não se detectou em  $S_{cA}$ . No entanto, os valores de sobressaturação relativa em OCP foram semelhantes nas soluções resultantes da incubação de ambos os cerâmicos. Uma explicação possível deverá relacionar-se com a camada de albumina adsorvida na superfície, que poderá interferir no processo de nucleação. Embora não se tenha quantificado a albumina adsorvida nos cerâmicos, os resultados obtidos parecem indicar maior adsorção em  $C_c$ . Esta diferença de adsorção poderá ter ocorrido devido à dissolução de  $\alpha$ -TCP durante o condicionamento: poderão ter ocorrido duas situações: 1) devido à dissolução de cálcio, parte da albumina terá ficado complexada em solução, daí a menor concentração à superfície de  $S_c$ ; 2) a albumina é uma proteína ácida e a extração de íons  $Ca^{2+}$  poder tornar a superfície  $S_c$  mais negativa,

consequentemente desfavorável para a adsorção de albumina. As duas situações, obviamente relacionadas, poderão ter contribuído para o mesmo fim. Peters afirma que esta proteína tem vários grupos com capacidade de se associarem aos iões cálcio e este facto poderá ter gerado uma  $S_{r(OCP)}$  local superior em  $C_{cA}$  e daí a detecção de OCP.

Em  $C_c$  a adsorção de proteína terá sido uniforme, como parecem indicar as imagens de AFM (Figura 4.68). A mineralização, originada em parte pela instabilidade já referida da solução de HBSS, poderá ter sido favorecida pela camada proteica actuando como agente nucleador dos fosfatos de cálcio. Inclusivamente, esta afinidade deverá ter aumentado a sobressaturação local, com conseqüente formação de OCP.

#### **4.5.2 – Incubação em SBF**

##### **4.5.2.a – Resultados experimentais**

A evolução das concentrações de cálcio, fosfato total e pH após imersão de  $S_A$  e  $C_A$  em SBF está representada na Figura 4.70. Estes perfis não se afastam muito dos observados por incubação dos cerâmicos virgens em SBF.

Na Figura 4.71 estão representadas as variações da sobressaturação relativa em HAP e em OCP e relação molar Ca/P das soluções. Tal como se referiu para a Figura 4.66, deve considerar-se que os valores de sobressaturação relativa destas soluções se encontram no intervalo entre as duas curvas apresentadas.

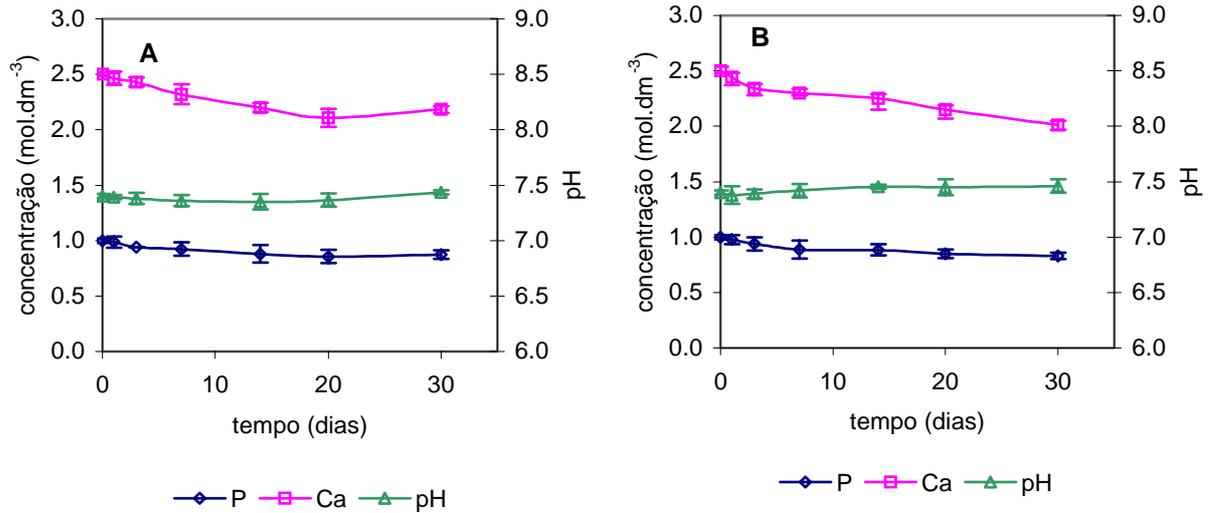


Figura 4.70 - Evolução das concentrações totais de cálcio, fosfato e de pH ao longo do tempo de incubação de (A)  $S_{Ac}$  e (B)  $C_{Ac}$  em SBF.

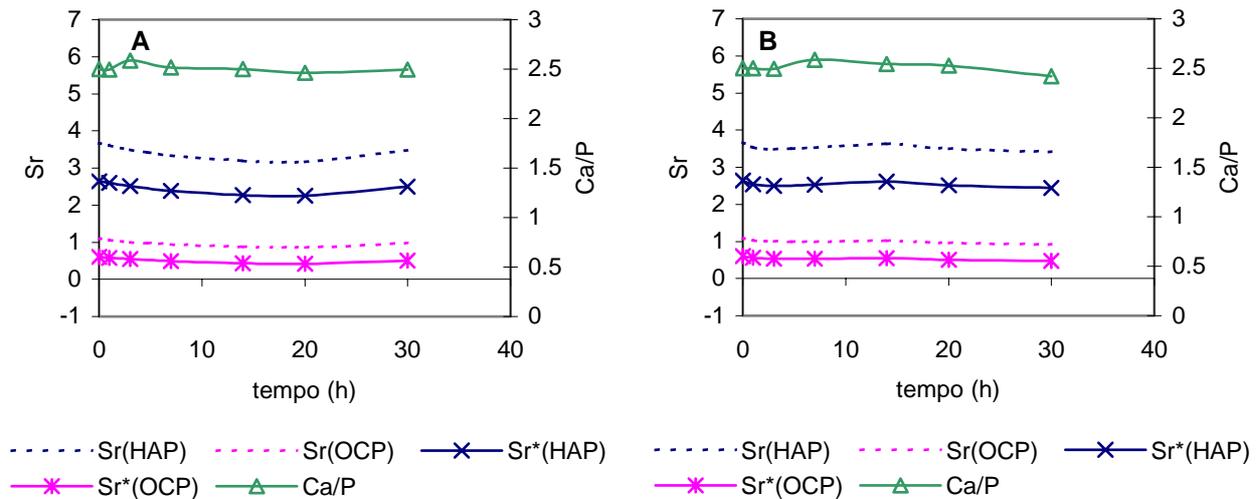


Figura 4.71 - Variação da sobresaturação relativa em HAP e em OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo para  $S_{Ac}$  (A) e  $C_{Ac}$  (B). \*cálculos considerando 45% de cálcio complexado com albumina.

A análise por SEM das superfícies  $S_{Ac}$ , mostrou mineralização incipiente. Observou-se dissolução generalizada dos grãos de  $\alpha$ -TCP, em grande parte já proveniente do condicionamento em solução salina de albumina, como exemplificado na Figura 4.72.

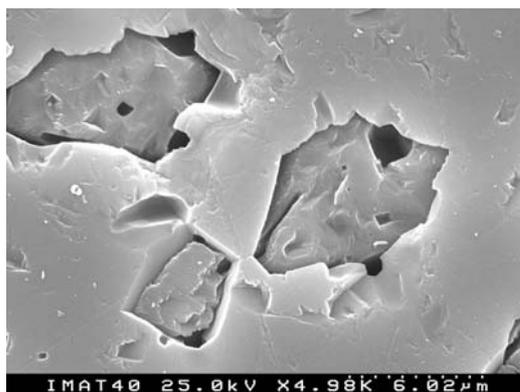


Figura 4.72 – Superfície de  $S_A$  após 30 dias de imersão em SBF.

Na superfície de  $C_{AC}$  incubada em SBF não se observaram sinais de mineralização mesmo após 30 dias de ensaio.

#### 4.5.2.b – Análise dos resultados

A dissolução inicial de  $\alpha$ -TCP durante o condicionamento de  $S$  em solução salina de albumina terá sido um dos factores responsáveis pela mineralização incipiente observada na superfície de  $S_{cA}$  em SBF, uma vez que menos cálcio e fosfato terá passado para a solução.

Por outro lado, a camada de proteína adsorvida poderá também ter inibido a continuação da dissolução desta fase em SBF. Estes dois factores terão contribuído para a inibição da mineralização relativamente à situação em que não é feito o condicionamento prévio.

Em  $C_{cA}$ , não se observou mineralização.

Nas condições experimentais realizadas, a presença de albumina adsorvida nos cerâmicos inibiu a mineralização em SBF na superfície dos cerâmicos. No entanto algo foi acontecendo na solução porque as concentrações totais de cálcio dissolvido foram diminuindo com o tempo.

A albumina adsorvida na superfície altera o processo de nucleação.

#### 4.6. Discussão

A diferença principal entre os dois materiais reside na presença de  $\alpha$ -TCP em S, tornando S mais reactivo do que C. A diferença de reactividade baseia-se na solubilidade de  $\alpha$ -TCP, superior à de HAP nas mesmas condições. A dissolução rápida de  $\alpha$ -TCP aumenta a sobressaturação local, iniciando-se a mineralização predominantemente por um processo de dissolução – nucleação, em geral na zona circundante onde existia o  $\alpha$ -TCP.

Nenhuma das soluções estudadas, inclusivamente o SBF, é saturada relativamente ao  $\alpha$ -TCP, pelo que ocorre sempre dissolução desta fase quando os materiais são incubados. Verificou-se que a velocidade de dissolução varia com a composição do meio, em particular com a força iónica, pH e presença do tampão Tris/HCl.

Nas soluções estudadas com sobressaturação inicial nula em relação à HAP (água e solução de Tris/HCl) não se observaram vestígios de mineralização em C durante o período de tempo estudado, o que evidencia solubilização lenta da HAP.

A cinética de mineralização dos corpos cerâmicos é mais lenta do que a dos pós, como seria de esperar pela diferença de área superficial exposta. Este facto faz com que sejam detectadas alterações na solução de incubação cujo início poderá não estar directamente relacionado com o substrato. Está neste caso, a subida de pH das soluções sem tampão (HBSS e SBF0). À temperatura de 37°C, o conjunto de reacções de equilíbrio químico entre as diversas espécies iónicas em solução provoca aumento de pH. Este aumento provoca, subsequentemente, subida dos valores de supersaturação, podendo observar-se nucleação e crescimento de fosfatos de cálcio. Esta precipitação será facilitada pela presença do substrato que proporciona locais adequados a nucleação heterogénea. De todo este processo resultará uma camada de mineralização cujo mecanismo iniciador se deve à ausência de um tampão eficaz na solução.

Pode então concluir-se que a solução comercial HBSS não é adequada para simular a componente inorgânica do plasma sanguíneo, devido à ausência

de um tampão eficaz. Outras limitações desta solução foram já discutidas no Capítulo 1.

A importância da presença de um tampão eficaz foi reforçada com os ensaios realizados em SBF0, onde o maior valor de supersaturação do meio favoreceu a formação de camadas espessas de HAP carbonatada deficiente em cálcio.

A incubação de S em solução de Tris/HCl favoreceu a dissolução de  $\alpha$ -TCP, evidenciada pela relação Ca/P de 1,5 obtida na solução após 30 minutos e 1 dia de ensaio para os pós e para os cerâmicos respectivamente. A dissolução terá tornado a solução sobressaturada relativamente ao OCP, uma vez que foi possível detectar esta fase por FTIR nos cerâmicos. Da incubação de C nesta solução não se detectaram alterações superficiais até 30 dias de ensaio, indicando uma cinética lenta de dissolução da HAP.

Por incubação dos corpos cerâmicos em SBF verificou-se que o tipo de mineralização ocorrida na superfície de S se assemelhou à obtida em solução Tris/HCl, se bem que com cinética muito mais lenta. Este resultado estará de acordo com o atraso de dissolução de  $\alpha$ -TCP em SBF, como verificado no estudo dos pós. No cerâmico C imerso em SBF, o tipo de mineralização verificada, crescimento preferencial segundo alguns planos cristalinos do substrato, parece evidenciar crescimento epitaxial de HAP.

Dos resultados obtidos se conclui ser necessário ter em solução um tampão eficaz. O Tris/HCl mostrou ser eficaz no seu comportamento tampão; no entanto introduz no sistema uma variável: complexa com o cálcio, interferindo no mecanismo de mineralização. Além disso, não é um tampão biológico.

Verificou-se que a presença de albumina no meio tem efeito retardador da mineralização e da dissolução do  $\alpha$ -TCP. O efeito inibidor da albumina no processo de mineralização está bem documentado<sup>30,31,32</sup>. São vários os argumentos apresentados para justificar a inibição, sendo um deles a capacidade

---

<sup>30</sup> Lima J, Sousa SR, Ferreira A, Barbosa MA. Interactions between calcium, phosphate, and albumin on the surface of titanium. *J Biomed Mater Res* (2001) **55**: 45-53

<sup>31</sup> Kaufmann EEAB, Ducheyne P, Radin S, Bonnel DA, Composto R. Initial events at the bioactive glass surface in contact with protein-containing solutions. *J Biomed Mater Res* (2000) **52**: 825-830

<sup>32</sup> Serro APVA, Fernandes AC, Saramago BJV, Norde W. Bovine serum albumin adsorption on titania surfaces and its relation to wettability aspects. *J Biomed Mater Res* (1999) **46**: 376-381

de a albumina se ligar aos íons cálcio, ficando estes menos disponíveis para participar nas reacções de mineralização e ocorrendo diminuição da sobressaturação relativa do meio. Quanto ao efeito retardador da proteína dissolvida em HBSS e SBF na dissolução do  $\alpha$ -TCP, tal não seria de esperar: o argumento apresentado anteriormente deveria verificar-se, ou seja, a capacidade de complexação entre albumina e cálcio deveria favorecer a dissolução do trifosfato de cálcio. Estudos de dissolução de revestimentos de HAP em presença de albumina realizados por Bender *et al*<sup>33</sup> mostraram que a libertação de cálcio na presença de albumina foi significativamente superior relativamente à libertação em solução sem proteína. No nosso caso, factores como o aumento da viscosidade da solução e adsorção de proteína na superfície do substrato, podem dificultar a difusão iónica e deste modo, serem responsáveis pelos resultados encontrados.

O pré-condicionamento dos substratos em solução salina de albumina promoveu a dissolução de  $\alpha$ -TCP em S, tornando este cerâmico menos reactivo em posterior incubação em SBF. A menor quantidade de  $\alpha$ -TCP não terá permitido atingir os valores de sobressaturação relativa críticos para a precipitação e a adsorção de proteína poderá também ter inibido a dissolução posterior desta fase em SBF.

Em C ter-se-á adsorvido uma camada homogénea no pré-condicionamento, que terá inibido o crescimento de cristais em SBF. Na ausência de pré-condicionamento, observou-se crescimento epitaxial para 20 dias de incubação em SBF (Figura 4.47). A presença da camada proteica terá impedido a nucleação heterogénea.

A subida do pH na solução de HBSS terá promovido a mineralização nos dois substratos. Neste caso, as espessuras finais obtidas foram inclusivamente superiores às obtidas sem pré adsorção de albumina. As moléculas de proteína podem ter funcionado como agentes nucleadores de fosfatos de cálcio formados a partir de valores de sobressaturação relativa elevados devido à subida de pH. Em C observou-se formação de OCP, que posteriormente terá sido convertido em

---

<sup>33</sup> Bender SA, Bumgardner JD, Roach MD, Bessho K, Ong JL. Effect of protein on the dissolution of HA coatings. *Biomaterials* (2000) 21: 299-305

HAP carbonatada. A composição desta camada, mais rica em magnésio e sódio do que a formada em S, onde não se detectou OCP, está de acordo os dados da literatura que referem a inclusão de impurezas na transição de OCP a HAP.

---

## ESTUDO DE UM PLASMA COM TAMPÃO DE $\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$

### 5.1. Introdução

Os plasmas inorgânicos simulados empregados nos estudos de mineralização apresentam várias limitações, como é de esperar. Algumas delas foram discutidas nos capítulos anteriores, tendo-se concluído, em particular, que a presença de um tampão eficaz no meio de mineralização assim como a composição do próprio meio são importantes no mecanismo de mineralização.

Para além da natureza do tampão, a baixa concentração de  $\text{HCO}_3^{2-}$  e, por outro lado, a concentração elevada de  $\text{Cl}^-$  são limitações identificadas por alguns autores<sup>1,2,3,4</sup>; no entanto, as alternativas por eles propostas envolvem a substituição do tampão Tris/HCl pelo tampão Hepes/NaOH, não eliminando, assim, a presença de moléculas estranhas ao plasma e aumentando a concentração de ião  $\text{Na}^+$  acima dos valores fisiológicos.

---

<sup>1</sup> Kim HM, Miyazaki T, Kokubo T, Nakamura T. Revised Simulated body fluid, *Key Eng Mater* (2000) **192-195**: 47-50

<sup>2</sup> Kim HM, Kishimoto K, Miyaji F, Kokubo T, Yao T, Suetsugu Y, Tanaka J, Nakamura T. Composition and structure of apatite formed on organic polymer in SBF with a high content of carbonate ion. *J Mater Sci - Mater Med* (2000) **11**: 421-426

<sup>3</sup> Dorozhkina EI, Epple M, Dorozhkin SV. Biomimetic drystallization of calcium phosphates under constant conditions from revised SBF. *Key Eng Mater* (2003) **240-242**: 85-88

<sup>4</sup> Oyane A, Onuma K, Ito A, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. *J Biomed Mater Res* (2003) **64A**: 339-348

O plasma contém uma mistura de sistemas tampão, sendo maioritários os sistemas  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{HProteína}/\text{Proteína}^5$ . O equilíbrio  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  tem um contributo elevado para a capacidade tampão do plasma e fluidos intersticiais em especial nos casos em que  $p_{\text{CO}_2}$  se mantenha quase constante.

A capacidade tampão de um par ácido/base conjugado é mais elevada quando a gama de pH da solução está no intervalo de uma unidade acima ou abaixo do valor de  $pK$  do par considerado. No caso do par  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ , o  $pK$  tem o valor de 6,1 a 310 K, por isso não seria de esperar a sua eficiência numa solução aquosa a pH 7,4. Na realidade, a eficiência deste par reside no facto de estar presente num sistema fisiológico, no qual a pressão parcial de  $\text{CO}_2$  ( $p_{\text{CO}_2}$ ), é ajustada de acordo com as necessidades homeostáticas: se o pH plasmático diminui, diminui a concentração de  $\text{HCO}_3^-$  e forma-se  $\text{CO}_2$ , que é expelido. Deste modo a relação  $[\text{HCO}_3^-]/p_{\text{CO}_2}$  não varia significativamente. Uma subida de pH aumenta  $[\text{HCO}_3^-]$  e o dióxido de carbono consumido é repostado pelo metabolismo, mantendo a relação  $[\text{HCO}_3^-]/p_{\text{CO}_2}$ .

A capacidade tampão depende igualmente das concentrações do par conjugado ácido/base. Quanto maior a concentração, maior a capacidade de resistir a variações de pH. Por exemplo, no plasma sanguíneo a pH 7,4, seria de esperar que o equilíbrio entre  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  com uma constante  $pK = 6,7$  a 310 K, tivesse uma capacidade tampão mais elevada do que o equilíbrio  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ . Contudo a concentração do fosfato é cerca de 20 vezes inferior à do par  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ . Ao considerar a capacidade tampão, ambos os valores,  $pK$  e concentração do par conjugado, são importantes.

De qualquer modo, o tampão fosfato é irrelevante em estudos de mineralização, na medida em que o fosfato é consumido durante o processo.

---

<sup>5</sup> Baggot J. Gas transport and pH regulation. In: *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. Ed Devlin TM. Wiley-Liss. N Y (1997)

Na continuação do trabalho apresentado, considerou-se relevante desenvolver um sistema que utilizasse um fluido inorgânico de composição próxima da do plasma tamponizado com  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ . Com a presença deste par pretende-se não só um tampão natural, como simultaneamente uma concentração de  $\text{HCO}_3^-$  próxima dos valores plasmáticos. Pretendeu-se ao mesmo tempo estudar a composição e morfologia das camadas de mineralização formadas nesta solução.

Kim *et al*<sup>6,7</sup> mostraram que a apatite formada em SBF é diferente da apatite óssea em composição e estrutura. Estes autores atribuíram esta diferença à concentração elevada de cloreto e baixa concentração de hidrogenocarbonato no SBF, comparativamente ao plasma.

Segundo Iijima *et al*<sup>8</sup> de entre as várias impurezas presentes nas apatites biológicas, o ião carbonato é o mais proeminente e é particularmente importante: o osso contém cerca de 3,5% em peso (determinado em osso bovino adulto e seco); o esmalte dentário em crescimento e maduro contém, respectivamente, 5 e 3% em peso. Uma vez que os fluidos humanos contêm pelo menos 10 a 25  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  de carbonato, este deve afectar o processo de formação da apatite biológica.

Este capítulo foi separado em dois sub-capítulos. No primeiro são referidos os aspectos teóricos considerados para o desenvolvimento do sistema tampão e a montagem experimental desenvolvida para a obtenção do plasma inorgânico carbonatado; no segundo apresenta-se os resultados de mineralização dos corpos cerâmicos obtidos por incubação neste meio, na ausência e na presença de albumina.

---

<sup>6</sup> Kim HM, Kishimoto K, Miyaji F, Kokubo T, Yao T, Suetsugu Y, Tanaka J, Nakamura T. Composition and structure of the apatite formed on PET substrate in SBF modified with various ionic activity products *J Biomed Mater Res* (1999) **46**: 228-235

<sup>7</sup> Kim HM, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. Composition of apatite produced in simulated body fluid. *In: Bioceramics 14*. Brown S, Clarke I, Williams P eds. Trans Tech Publications Ltd. Switzerland (2001)

<sup>8</sup> Iijima M, Kamemizu H, Wakamatsu N, Goto T, Doi Y, Moriwaki Y. Effects of  $\text{CO}_3^{2-}$  ion on the formation of octacalcium phosphate at pH 7.4 and 37°C. *J Cryst Growth* (1994) **135**: 229-234

## 5.2. Plasma inorgânico carbonatado (PIC)

### 5.2.1. Considerações gerais

O estudo do sistema tampão  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  envolve a consideração dos equilíbrios de dissolução do  $\text{CO}_2$  em meio aquoso apresentados na Tabela 5.1. O equilíbrio C não foi considerado nos cálculos subsequentes, uma vez que a actividade do ião carbonato a pH 7,4 é cerca de três ordens de grandeza inferior à do ião hidrogenocarbonato.

Tabela 5.1. Equilíbrios químicos envolvendo as espécies carbonato em solução aquosa e valores das constantes de equilíbrio químico respectivas, a 310 K e  $I = 0,16 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

	Equilíbrio	Constante
A	$\text{CO}_2 (\text{g}) \rightleftharpoons \text{CO}_2 (\text{aq})$	$pK_H = 1,61^{5,9}$
B	$\text{CO}_2 (\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} (\text{l}) \rightleftharpoons \text{H}^+ (\text{aq}) + \text{HCO}_3^- (\text{aq})$	$pK_{a1} = 6,10^{5,9}$
C	$\text{HCO}_3^- (\text{aq}) \rightleftharpoons \text{H}^+ (\text{aq}) + \text{CO}_3^{2-}$	$pK_{a2} = 10,2^{10}$

Os equilíbrios A e B podem ser conjugados obtendo-se a Equação 6.1.

$$\text{pH} = pK_{a1} + pK_H + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{p_{\text{CO}_2}} \quad (6.1)$$

onde  $p_{\text{CO}_2}$  representa a pressão parcial do gás. A equação (1) é um caso particular da equação de Henderson-Hasselbalch<sup>5,9</sup> que relaciona pH com concentrações do par ácido/base presente na solução.

<sup>9</sup> Amado LD. Determinação de  $p\text{CO}_2$ , excesso de bases, bases tampão, bicarbonatos e  $\text{CO}_2$  total, pela determinação do pH sanguíneo. In: *Líquidos orgânicos-metabolismo da água, electrólitos e ácido-base*. Ed Prelo, Lisboa

<sup>10</sup> Stumm W, Morgan JJ. Dissolved carbon dioxide. In: *Aquatic Chemistry, an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. Wiley Interscience 2<sup>a</sup> ed, NY (1981)

Os ensaios *in vitro* são normalmente realizados em sistemas em contacto com a atmosfera do laboratório, onde a pressão parcial de dióxido de carbono não será muito diferente do valor médio verificado actualmente na atmosfera terrestre:  $p_{\text{CO}_2} = 0,036 \text{ kPa}$ . Devido ao equilíbrio da solução com a atmosfera, torna-se difícil manter em solução a concentração de hidrogenocarbonato desejada,  $27 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , para pH em torno de 7,3 devido à solubilidade baixa do dióxido de carbono, traduzida pela constante de Henry.

Para resolver o problema anterior ter-se-á que aumentar a pressão parcial de  $\text{CO}_2$  na fase gasosa em contacto com a solução, de modo a aumentar a concentração de  $\text{HCO}_3^-$ , sem variar o pH, como se conclui a partir da Equação (6.1).

Com base nas considerações apresentadas concebeu-se um sistema aberto onde uma mistura de azoto e dióxido de carbono em concentrações apropriadas está em contacto com uma solução de SBF preparada sem adição de Tris/HCl.

### 5.2.2. Método Experimental

A solução inorgânica usada para estes ensaios foi preparada segundo a receita original de Kokubo sem adição de Tris/HCl, modificada como se segue. Após a adição de hidrogenofosfato de potássio e antes da adição dos sais de magnésio e cálcio, adicionam-se algumas gotas de HCl  $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  até pH 7,25, em vez dos  $40 \text{ cm}^3$  (por  $\text{dm}^3$  de solução) usados no SBF. Esta adição tem por objectivo baixar o pH de modo a evitar precipitação de fosfatos de cálcio e magnésio. No final o pH da solução é novamente ajustado a 7,3 por adição de algumas gotas de HCl. No total adicionam-se cerca de  $2,5 \text{ cm}^3$  de HCl, em vez de  $50 \text{ cm}^3$  adicionados na preparação original do SBF. Esta solução mantém-se perfeitamente límpida durante o armazenamento no frigorífico, por períodos de tempo semelhantes aos de conservação do SBF (cerca de 1 mês), se tomados os devidos cuidados de assepsia.

Na Figura 5.1 representa-se a montagem experimental desenvolvida para o uso do tampão de  $\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$  em sistema aberto (a pressão total é a atmosférica)

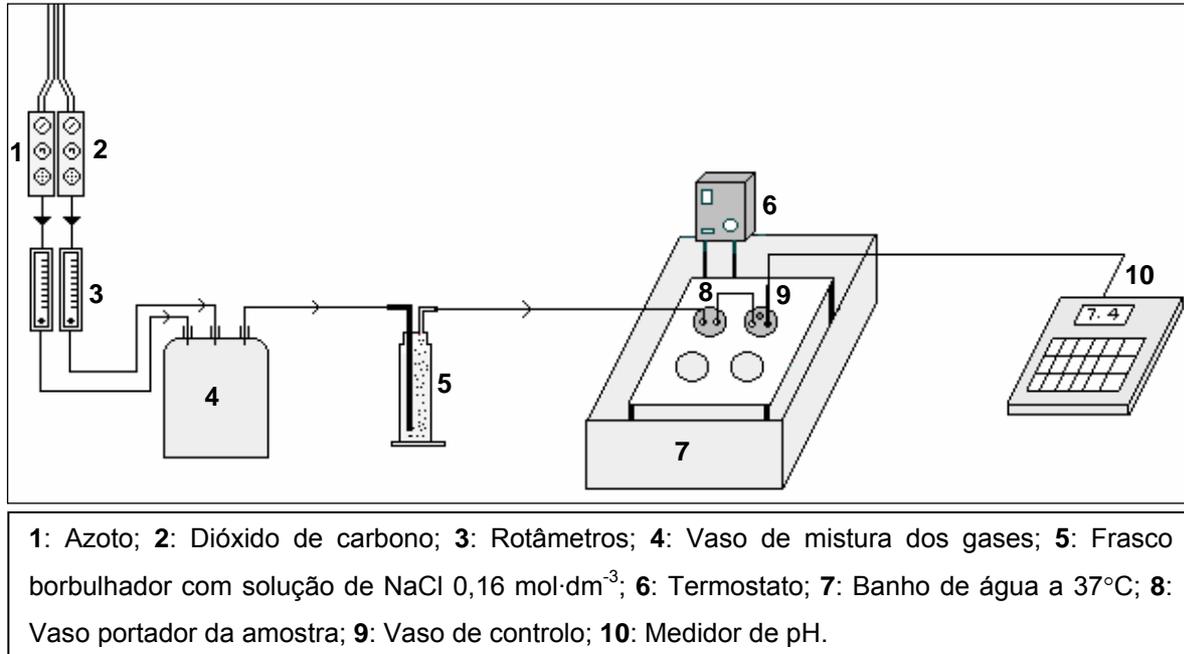


Figura 5.1 – Montagem experimental desenvolvida para estudos de mineralização em fluido inorgânico simulado sob uma mistura gasosa de  $\text{CO}_2/\text{N}_2$ .

Com o objectivo de dosear a quantidade de  $\text{CO}_2$  na mistura gasosa optou-se por misturar este gás com um gás considerado inerte, o azoto. Este último serve também como gás de arrasto do  $\text{CO}_2$ .

Os dois gases são doseados por intermédio de dois rotâmetros calibrados previamente. A pressão parcial do dióxido de carbono é determinada pela lei de pressão parcial de gases:

$$p_{\text{CO}_2} = \frac{y_{\text{CO}_2}}{y_{\text{CO}_2} + y_{\text{N}_2}} P \quad (5.2)$$

onde  $y_x$  representa o caudal volúmico gasoso do componente X e  $P$  é a pressão atmosférica.

Após doseamento os gases são misturados num vaso hermeticamente fechado (4). De seguida, a mistura passa por uma solução de NaCl (5) de força iónica  $0,16 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (mesma força iónica do fluido simulado), com o objectivo de humedecer a mistura gasosa, evitando evaporação da solução de mineralização. A mistura é então borbulhada em  $50,0 \text{ cm}^3$  de solução inorgânica (8).

A solução mineralizante é colocada num recipiente de teflon com tampa hermética que possui duas aberturas perfeitamente seladas, por onde circula o gás. Em cada ensaio, colocam-se dois recipientes deste tipo em série, com o mesmo volume de solução. No primeiro recipiente (8) coloca-se a amostra e no segundo (9) faz-se borbulhar a mistura gasosa proveniente do anterior, evitando-se assim, evaporação da solução no primeiro vaso.

Na fase de optimização do processo usou-se no primeiro recipiente uma tampa com uma terceira abertura, onde foi colocado o eléctrodo de pH. No decorrer das experiências verificou-se que, uma vez atingido o equilíbrio atmosfera/solução, os valores de pH não variavam entre os dois vasos. Por este motivo passou a controlar-se o pH no segundo recipiente. Isto permitiu mobilidade do eléctrodo sem interferir no recipiente com a amostra.

A pressão parcial de  $\text{CO}_2$  foi ajustada de modo a manter o pH da solução entre 7,3 e 7,4. A Figura 5.2 representa a concentração de  $\text{HCO}_3^-$  em função da pressão parcial de  $\text{CO}_2$ , calculadas de acordo com a Equação 5.1 para os valores de pH referidos. As duas linhas verticais definem a gama de concentrações fisiológicas em  $[\text{HCO}_3^-]$  referidas na literatura<sup>5,11</sup>, 24 a  $27 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Os valores limite de pressão parcial de  $\text{CO}_2$  calculados, que podem ser usados na experiência sem sair dos limites desejados, situam-se na área assinalada no gráfico a cor cinzenta.

Experimentalmente verificou-se que após um período inicial (cerca de 45 minutos), necessário ao estabelecimento do equilíbrio atmosfera/solução, é possível manter o pH da solução entre 7,3 e 7,4, ajustando a pressão parcial do  $\text{CO}_2$  entre 5,0 e 7,2 kPa, o que está de acordo com os valores calculados.

---

<sup>11</sup> Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed Mat Res* (1990) **24**: 721-734

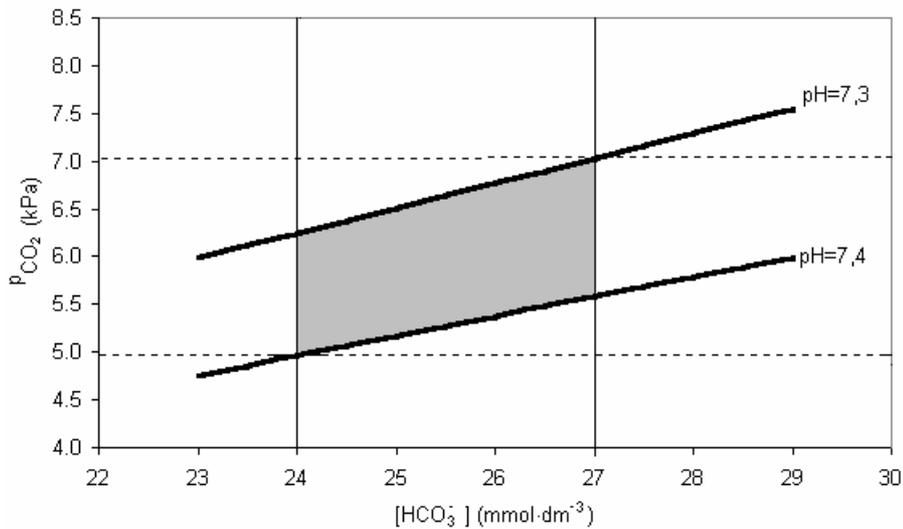


Figura 5.2: Representação gráfica da equação de Henderson-Hasselbalch para o par  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ .

A área a cor cinzenta representa a zona de trabalho.

### 5.3. Ensaios de mineralização dos corpos cerâmicos em PIC com e sem albumina dissolvida no meio.

Realizaram-se ensaios de mineralização dos cerâmicos em PIC, com e sem adição de albumina. Para poder comparar os resultados obtidos neste meio com os obtidos em SBF normal, foi necessário repetir ensaios em  $50,0 \text{ cm}^3$  de SBF, uma vez que o volume de solução pode interferir no processo cinético de mineralização. Por este motivo realizaram-se, em paralelo, ensaios em PIC e em SBF. As amostras foram colocadas na vertical, em suportes de acrílico com pequenas ranhuras concebidos para o efeito. Colocaram-se dois cerâmicos em simultâneo dentro de cada recipiente com  $50,0 \text{ cm}^3$  de solução. Nos ensaios realizados em PIC as amostras foram inseridas na solução apenas após estabilização do valor de pH.

Os cuidados de esterilização de todos os materiais mantiveram-se. Nas soluções de PIC em que se dissolveu albumina foi necessário colocar dois filtros de seringa ( $0,22 \mu\text{m}$ ) na entrada e saída de gases, para evitar contaminação por bactérias.

Os resultados obtidos mostraram que a cinética de mineralização de ambos os cerâmicos é mais rápida nas condições destas experiências do que nas condições estudadas no capítulo 4. Por este motivo, os tempos estudados foram de 1, 3 e 7 dias. O tempo máximo de 7 dias foi escolhido, não só porque ambos os materiais apresentaram reactividade para este tempo, mas também porque se verificou ser este o tempo de duração da botija de azoto usada. Deste modo, evitou-se que ocorresse corte de gás no decorrer das experiências, com consequente variação da composição da solução.

Os valores de pH foram controlados diariamente, tendo sido necessário ajustar ocasionalmente a pressão parcial de  $\text{CO}_2$ , sem que os limites representados na Figura 5.2 tivessem sido ultrapassados.

As soluções resultantes das incubações dos cerâmicos foram analisadas por ICP, tal como indicado nos capítulos anteriores. Foram realizadas no mínimo duas réplicas para cada tempo.

De seguida apresentam-se os resultados obtidos em PIC por comparação com os resultados obtidos em  $50,0 \text{ cm}^3$  de SBF. Por uma questão de clareza apresentam-se em primeiro lugar os resultados obtidos com o cerâmico S e depois com o cerâmico C.

Não se apresentam os valores de variação do pH porque este não foi medido directamente na solução de imersão mas no vaso de controlo, sendo regulada a  $p_{\text{CO}_2}$  de forma a manter o pH neste vaso no intervalo 7,3-7,4. Este processo baseou-se no princípio de que as variações de  $p_{\text{CO}_2}$  à saída do vaso de reacção podem estar relacionadas com variações do pH do meio aquoso reaccional, considerando que os rotâmetros debitavam um caudal estável.

Para os cálculos de sobressaturação relativa do meio considerou-se o valor médio de pH 7,35.

### 5.3.1. Na ausência de albumina

#### 5.3.1.1. Cerâmico S

Os perfis das concentrações de cálcio e fósforo totais nas soluções de PIC e de SBF estão representados na Figura 5.3. Os valores de sobresaturação relativa e relação Ca/P calculados nas mesmas soluções apresentam-se na Figura 5.4.

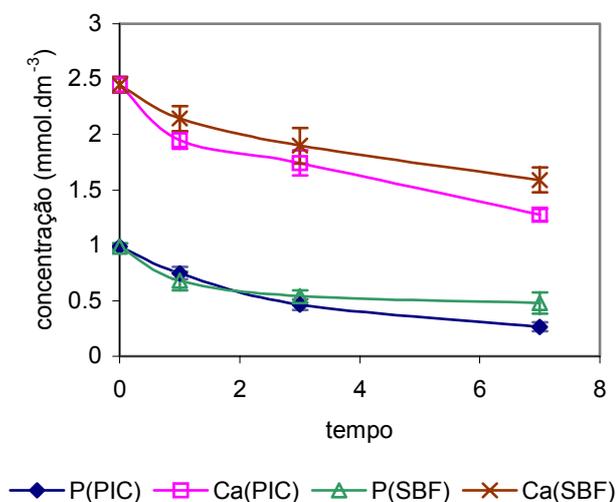


Figura 5.3 – Variação das concentrações de cálcio e fósforo totais ao longo do tempo de incubação de S em PIC e em SBF

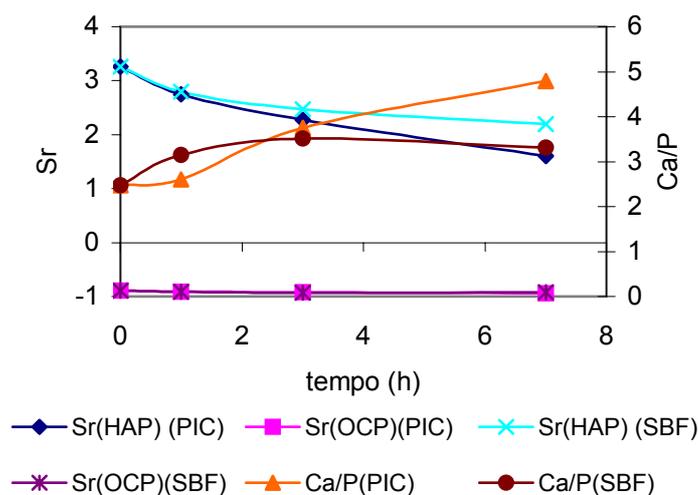


Figura 5.4 – Variação da sobresaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo das soluções PIC e SBF após imersão do cerâmico S.

O decréscimo das concentrações totais de fosfato e de cálcio em solução foi maior no caso das experiências realizadas em PIC do que em SBF; conseqüentemente, a sobressaturação relativa também diminuiu de forma mais acentuada naquela solução.

Na Figura 5.5 apresentam-se as micrografias dos cerâmicos após 1 dia de incubação em ambos os fluidos. Os resultados foram um pouco irregulares, tal como já se tinha verificado anteriormente em solução de SBF (Capítulo 4). Foi possível observar no mesmo cerâmico, áreas de dissolução de  $\alpha$ -TCP com vestígios de mineralização e zonas cobertas por camada de mineralização. Esta situação está ilustrada na Figura 5.5, nas micrografias com  $\times 5K$  de ampliação. Esta irreprodutibilidade deve-se provavelmente ao início de formação da camada de mineralização.

Nos cerâmicos imersos em PIC os precipitados parecem crescer em eflorescências, enquanto que em SBF o crescimento é mais homogêneo. A morfologia dos precipitados, idêntica em ambos os casos, é difícil de definir: trata-se de um crescimento de placas irregulares. A análise elementar por EDS não foi conclusiva, isto é, os valores determinados foram próximos de 1,65 provavelmente devido a interferência de sinal do substrato.

Após 3 dias de imersão verificou-se crescimento de camada em toda a superfície dos cerâmicos. A morfologia é agora mais bem definida, semelhante a placas, sendo o tamanho dos cristais menor em PIC do que em SBF. As camadas distinguem-se também pela relação molar Ca/P e pela presença de magnésio e sódio na camada formada em PIC. As espessuras das camadas são próximas. Esta situação está ilustrada na Figura 5.6.

Para 7 dias de incubação as diferenças entre as camadas formadas nos dois meios acentuam-se, como se pode observar na Figura 5.7. A morfologia da camada após 7 dias de imersão em PIC apresenta aspecto denso e assemelha-se a lâminas de extremidades arredondadas. A relação molar Ca/P de 1,71 sugere a presença de grupos  $\text{CO}_3^{2-}$ , por substituição de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ , substituição esta, acompanhada pela entrada de iões  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ . Em SBF observa-se uma camada constituída por mistura de placas e agulhas.

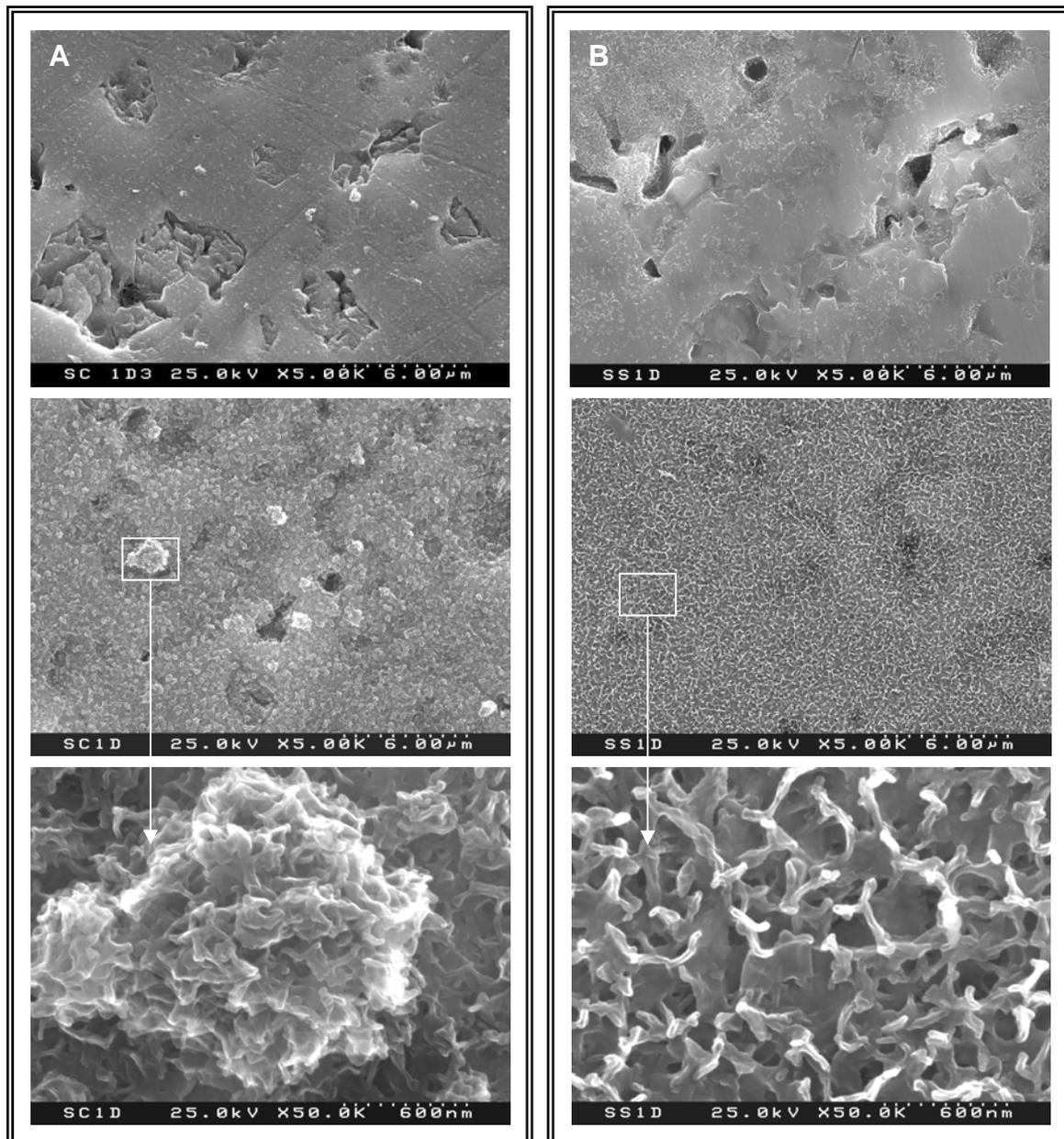


Figura 5.5. Superfície de S após 1 dia de incubação em (A) PIC e em (B) SBF, onde se vê que as superfícies apresentavam diferenças após o mesmo tempo de incubação

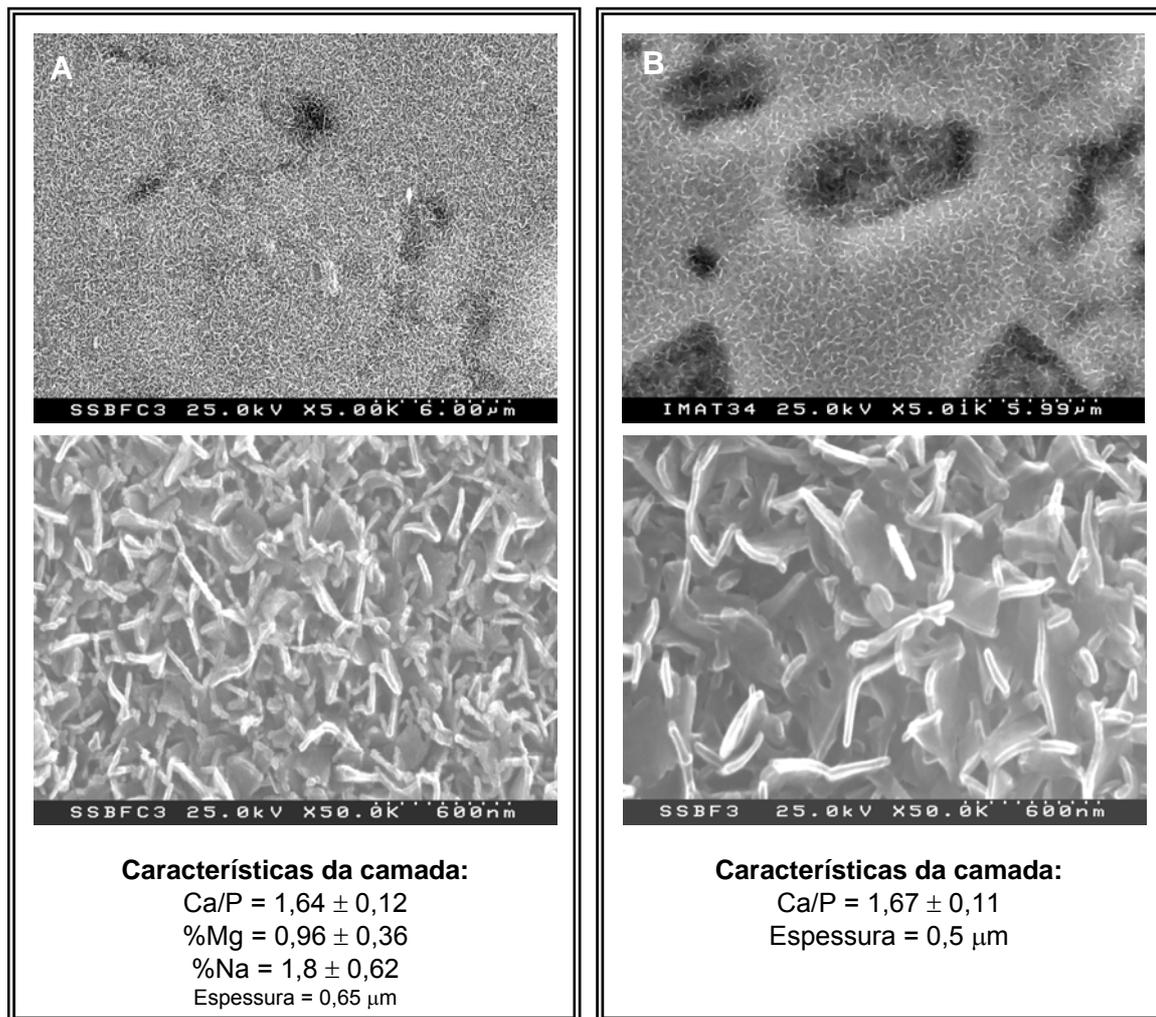


Figura 5.6. Superfície de S e características das camadas formadas após 3 dias de incubação em (A) PIC e (B) SBF

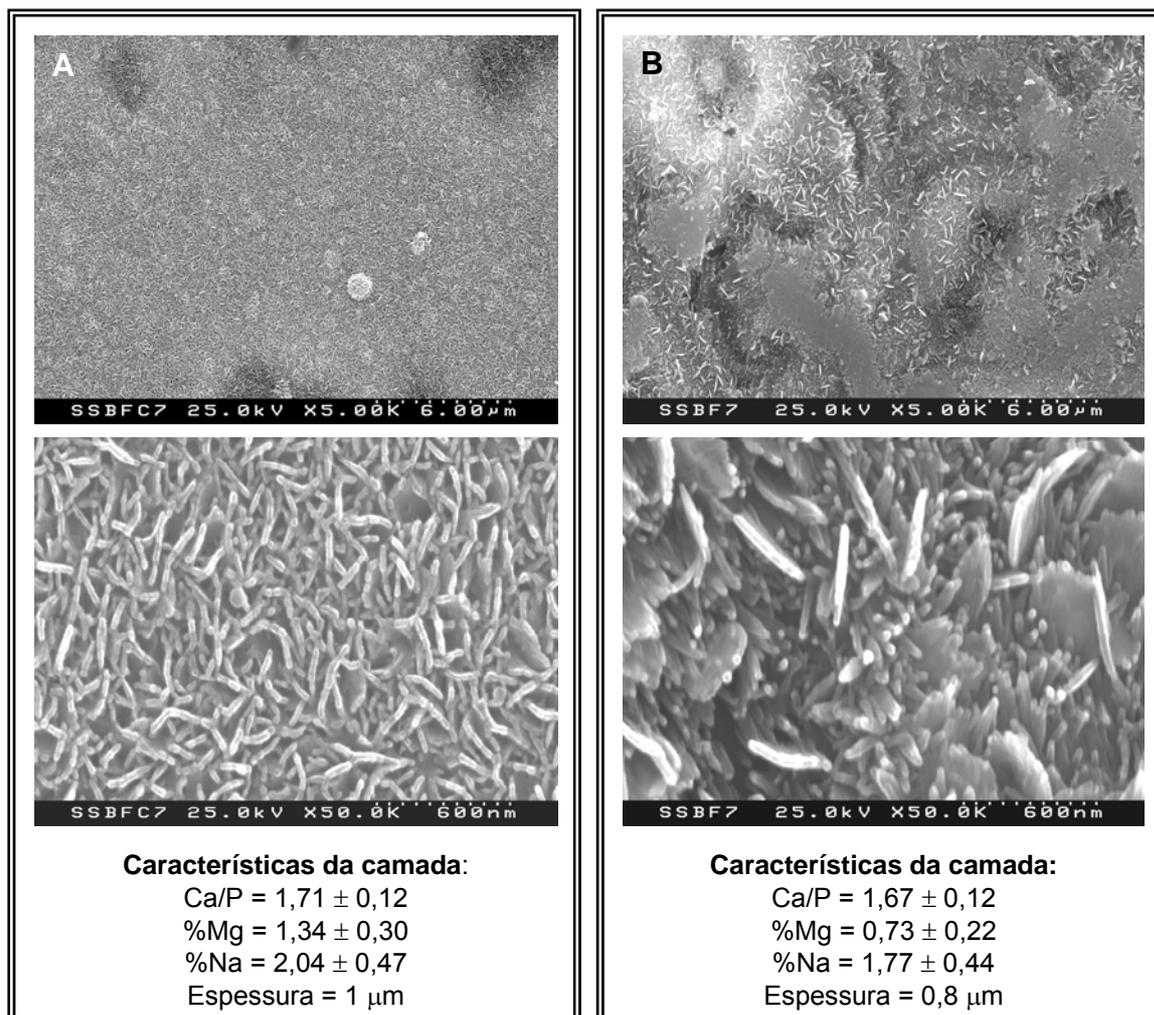


Figura 5.7. Superfície de S e características das camadas formadas após 7 dias de incubação em (A) PIC e (B) SBF

A análise destas superfícies por FTIR evidencia a participação da fase OCP no processo de crescimento da camada em PIC (Figura 5.8), o que não se observa em SBF (Figura 5.9). Para 1 dia não são ainda visíveis alterações no espectro, relativamente à amostra virgem. Em 3 dias de imersão em PIC o espectro da camada mostra presença de grupos característicos do OCP (assinalados na Figura 5.8). Para 7 dias, parece estar a ocorrer uma transição de OCP para HAP: a banda de reflectância característica do  $\text{PO}_4^{3-}$  em ambiente OCP, situada a  $1040 \text{ cm}^{-1}$ , encontra-se deslocada para ambiente apatítico, em torno de

$1030\text{ cm}^{-1}$ . A presença de íões  $\text{HPO}_4^{2-}$  é ainda visível para este tempo. De salientar que a banda presente a  $875\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída em simultâneo aos grupos  $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ . A presença de grupos carbonato é igualmente visível para 3 e 7 dias de ensaio em torno de  $1400\text{ cm}^{-1}$ .

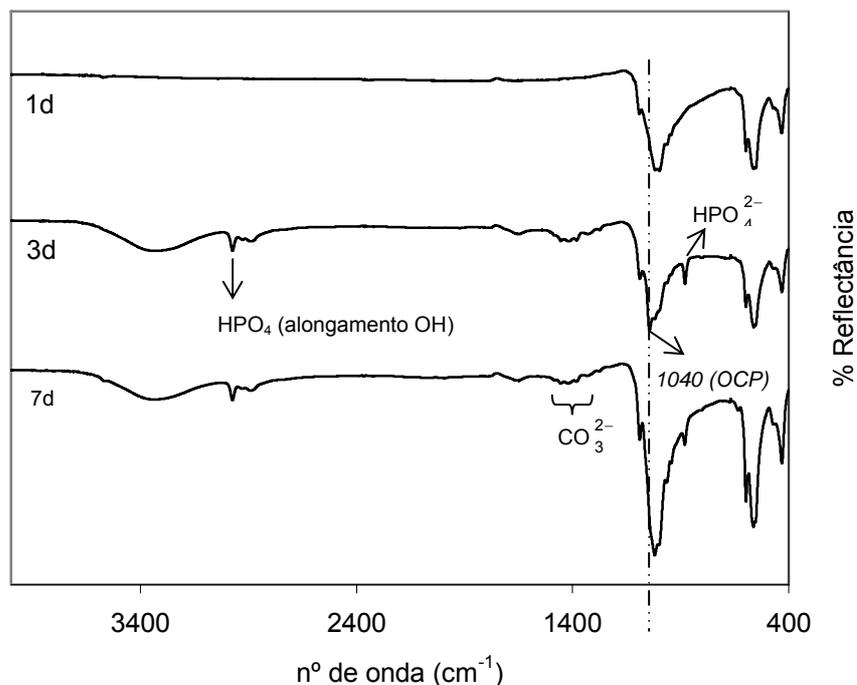


Figura 5.8. Espectros de FTIR da superfície dos cerâmicos S incubados em PIC. Na figura estão assinalados os grupos atribuídos à fase OCP de acordo com Fowler<sup>12</sup> e Rey<sup>13</sup>.

A análise por FTIR dos cerâmicos incubados em SBF mostra menor definição do espectro obtido para a amostra de 3 dias, podendo indicar menor cristalinidade da camada formada para este tempo. A presença de  $\text{CO}_3^{2-}$  é já visível neste espectro, sendo mais acentuada para 7 dias de ensaio.

<sup>12</sup> Fowler BO, Marković M, Brown WE. Octacalcium phosphate. 3. Infrared and raman vibrational spectra. *Chem Mater* (1993) **5**: 1417-1423

<sup>13</sup> Rey C, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age. 2: Investigations in the  $\nu_3\text{ PO}_4$  domain. *Calcif Tissue Int* (1991) **49**: 383-388

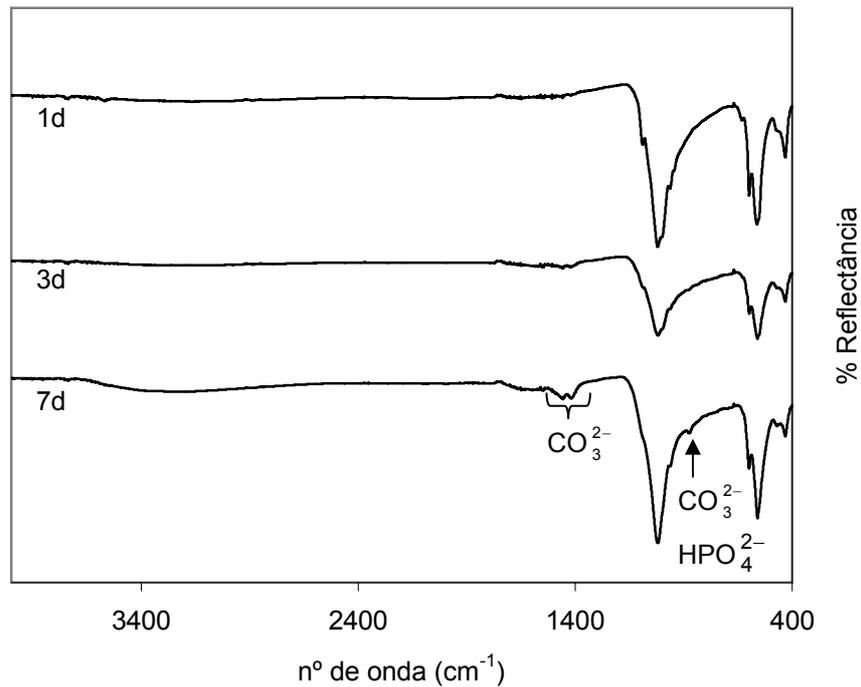


Figura 5.9. Espectros de FTIR da superfície dos cerâmicos S incubados em SBF.

Na análise por difracção de raios X não se observam diferenças significativas nos difractogramas das superfícies incubadas após 1 e 3 dias quer em PIC, quer em SBF relativamente à superfície virgem, como se pode observar, respectivamente, nas Figuras 5.10 e 5.11. Pelo contrário, os difractogramas das superfícies dos cerâmicos incubados 7 dias mostram diferenças: em PIC a camada formada é pouco cristalina, enquanto que em SBF se observa texturização segundo o plano (100) da HAP.

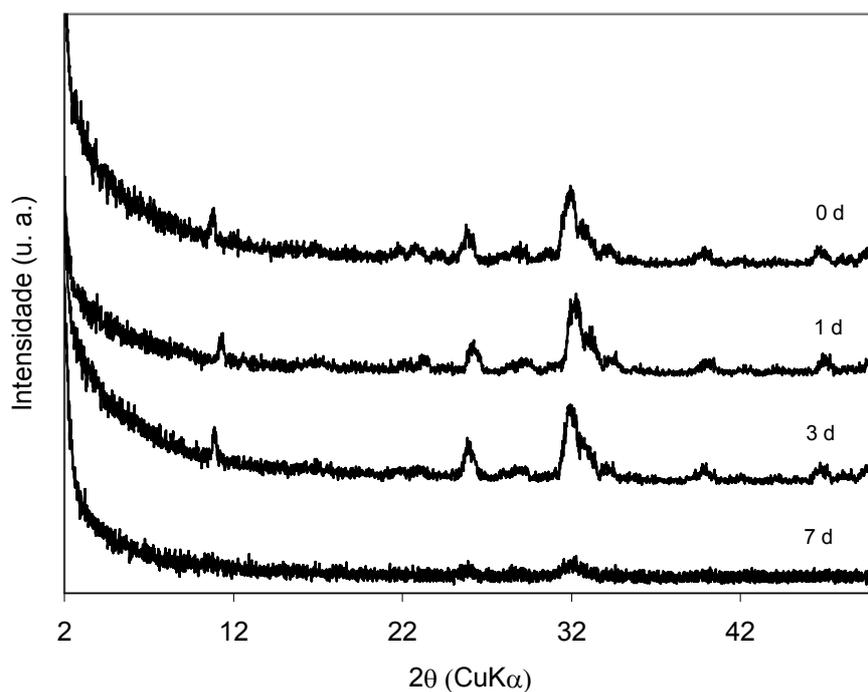


Figura 5.10. Difractogramas de raios X de ângulo rasante dos cerâmicos S incubados 1, 3 e 7 dias em FSIC, em comparação com o difractograma da superfície virgem (0 dias).

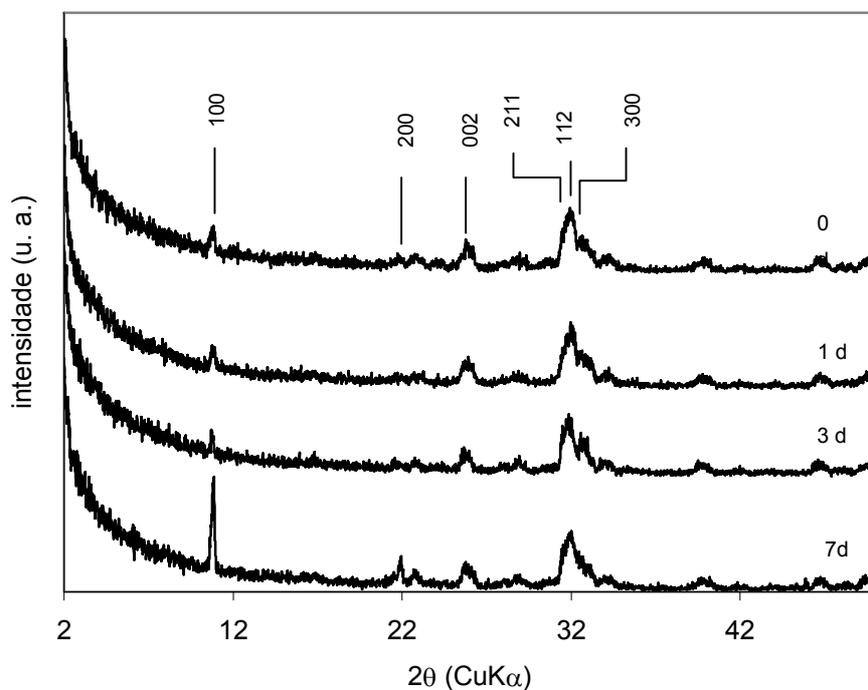


Figura 5.11. Difractogramas de raios X de ângulo rasante dos cerâmicos S incubados 1, 3 e 7 dias em SBF, em comparação com o difractograma da superfície virgem (0 dias).

### 5.3.1.2. Cerâmico C

São de assinalar os decréscimos nas concentrações de cálcio e fósforo total (Figura 5.12), semelhantes às que se verificaram para o sólido S (Figura 5.3). Na Figura 5.13 apresentam-se as variações de sobressaturação relativa e relação molar Ca/P correspondentes.

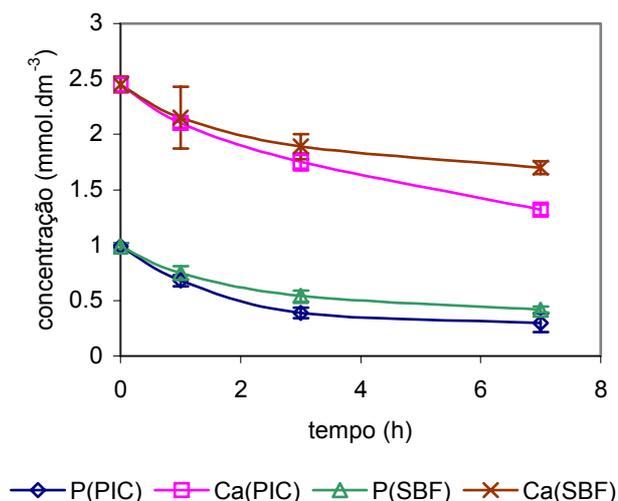


Figura 5.12 – Variação das concentrações de cálcio e fosfato totais ao longo do tempo de incubação de C em (A) FSIC e em (B) SBF

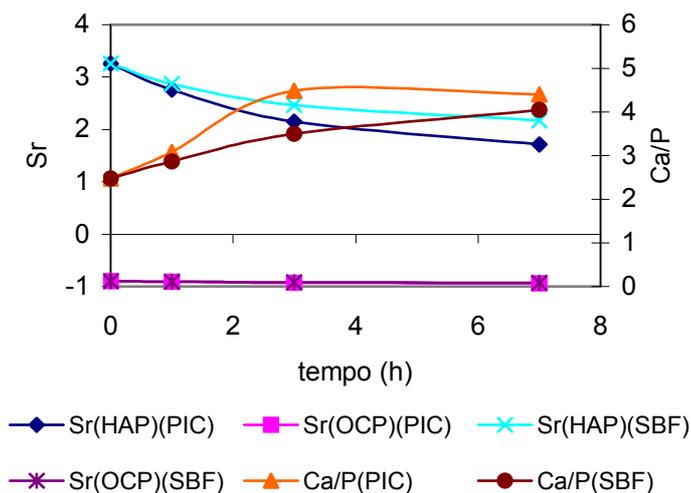


Figura 5.13 - Variação da sobressaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fosfato das soluções PIC e SBF após imersão do cerâmico C.

Os perfis anteriores são indicadores de precipitação, o que se verifica nas Figuras apresentadas nas páginas seguintes.

Foi surpreendente a rápida formação de camada por incubação de C em PIC; logo após 1 dia de imersão observou-se presença de mineralização generalizada por toda a superfície (Figura 5.14A). Ao longo do tempo a camada aumentou em espessura, mantendo a relação molar Ca/P do sólido em torno de 1,7, com aumento de sódio e magnésio, o que estará associado a um aumento da carbonatação da camada. Para 7 dias observou-se aumento de tamanho das placas (Figura 5.16A). Nas micrografias de menor ampliação verifica-se que o crescimento da camada se processa em eflorescências, tal como verificado em S.

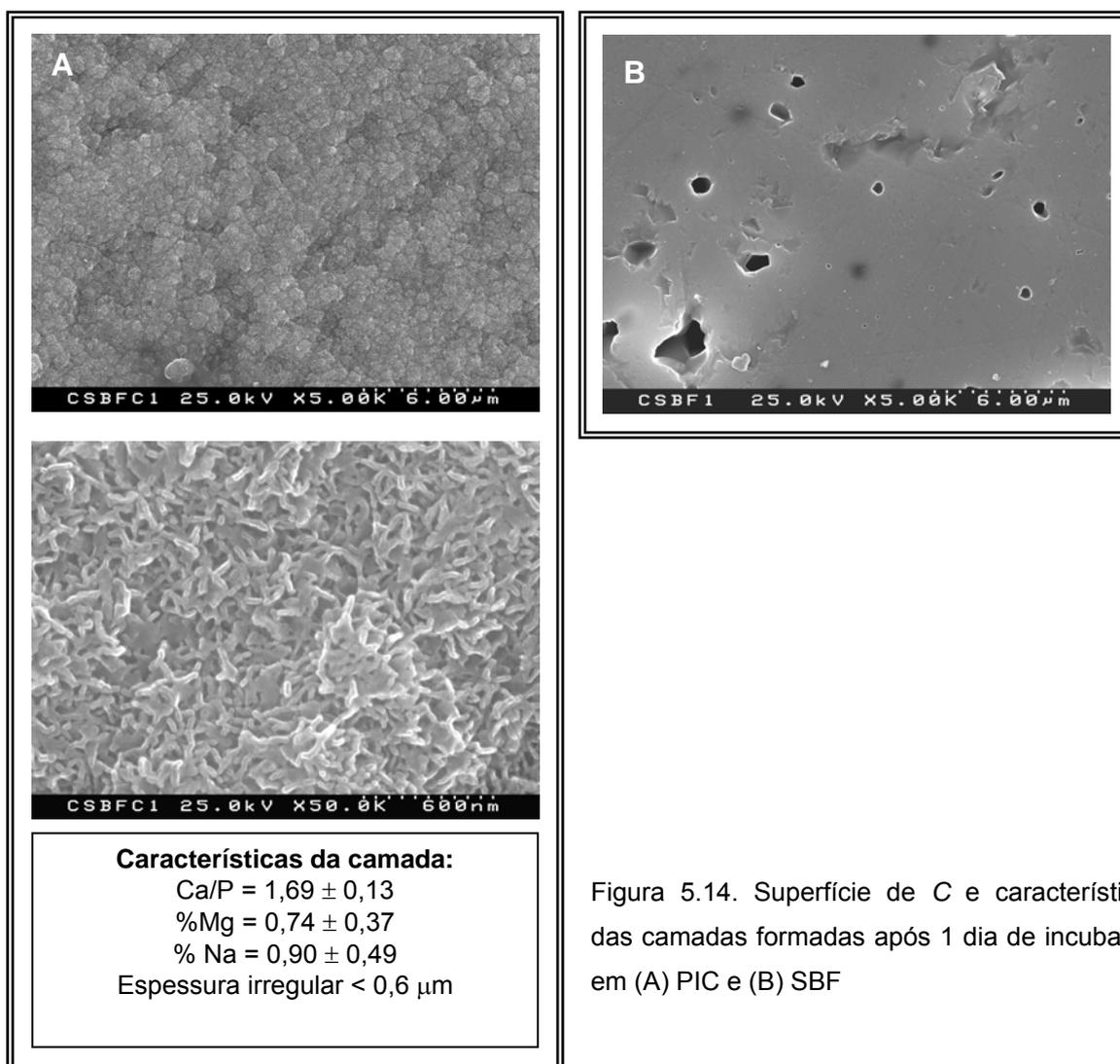


Figura 5.14. Superfície de C e características das camadas formadas após 1 dia de incubação em (A) PIC e (B) SBF

Em SBF não se conseguiu detectar vestígios de mineralização para 1 dia de ensaio (Figura 5.14B). Para 3 dias foi já possível observar zonas de mineralização, como se mostra na Figura 5.15B, embora localizadas. Para 7 dias a camada cobre toda a superfície (Figura 5.16B).

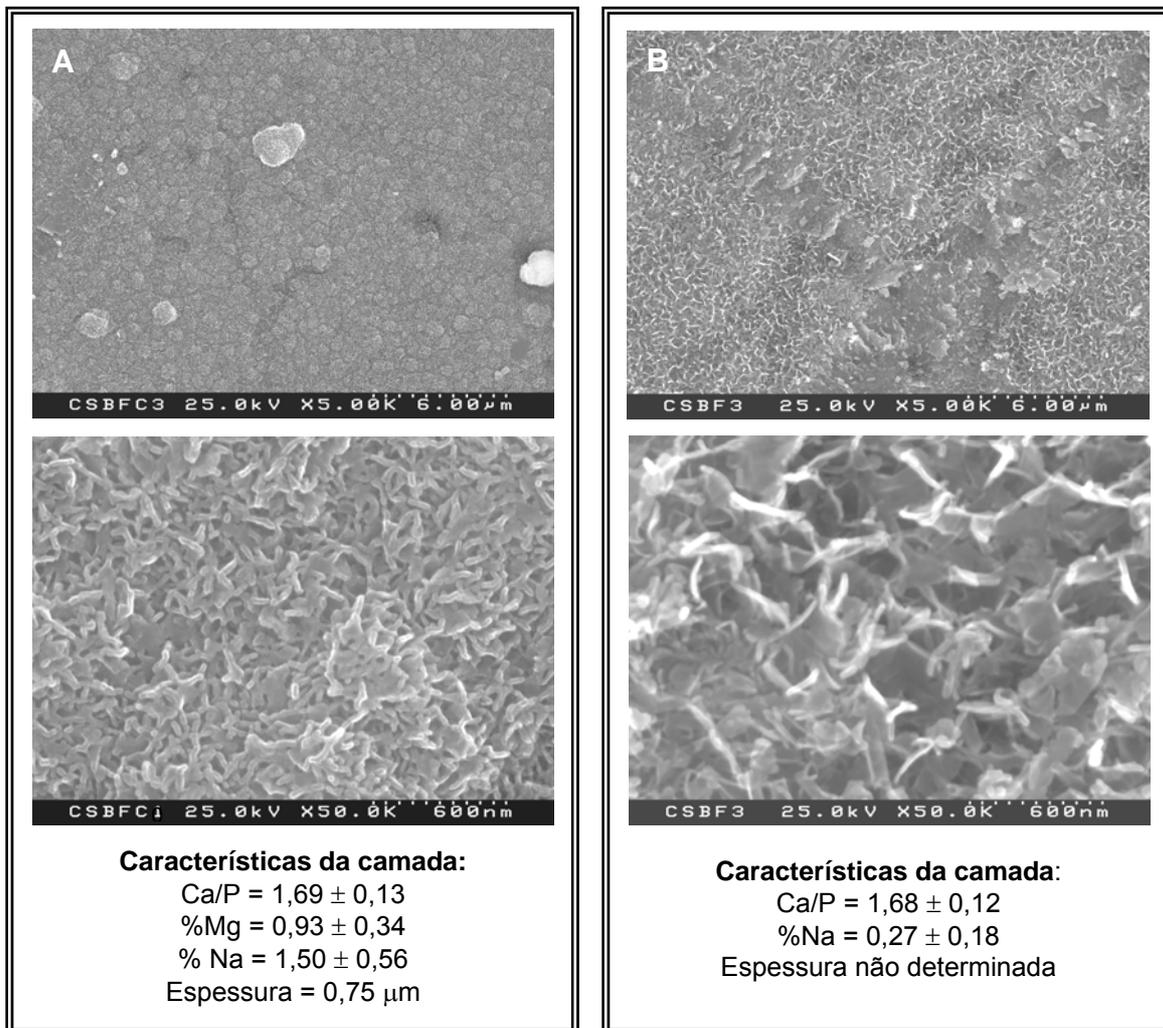


Figura 5.15. Superfície de C e características das camadas formadas após 3 dias de incubação em (A) PIC e (B) SBF

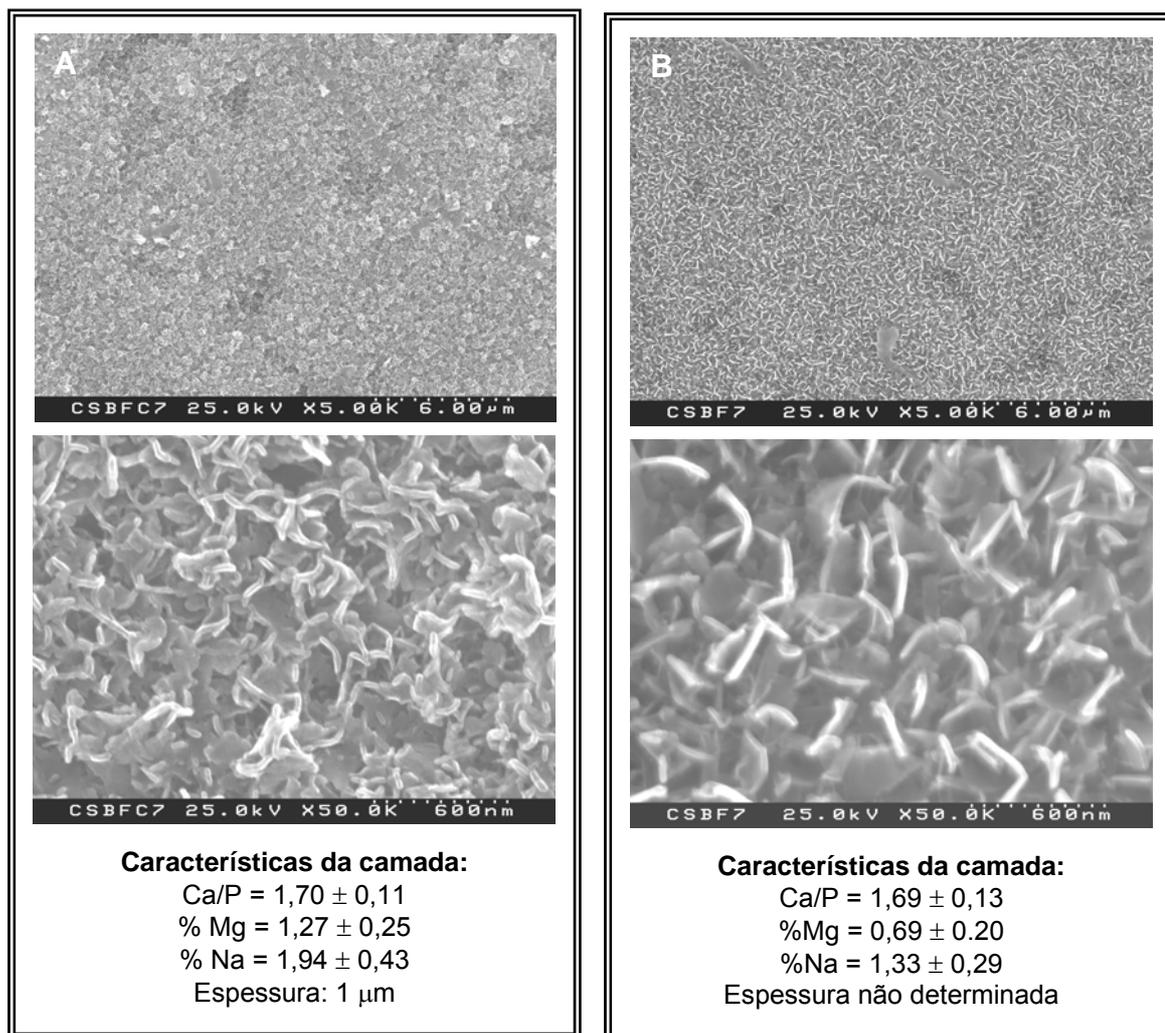


Figura 5.16. Superfície de C e características das camadas formadas após 7 dias de incubação em (A) PIC e (B) SBF

As superfícies C imersas em PIC apenas apresentam picos de absorção FTIR característicos de HAP carbonatada (Figura 5.17), sendo no entanto evidente uma diminuição progressiva da cristalinidade da camada obtida e um aumento da sua carbonatação. Os espectros de FTIR das camadas formadas por imersão em SBF (Figura 5.18) apresentam alterações menos acentuadas.

Tal como para S (Figura 5.10) a camada obtida após 7 dias em PIC é pouco cristalina. As camadas formadas em SBF produziram também difractogramas semelhantes aos observadas na Figura 5.11, não se verificando agora, no entanto, a texturização (100) exibida por S.

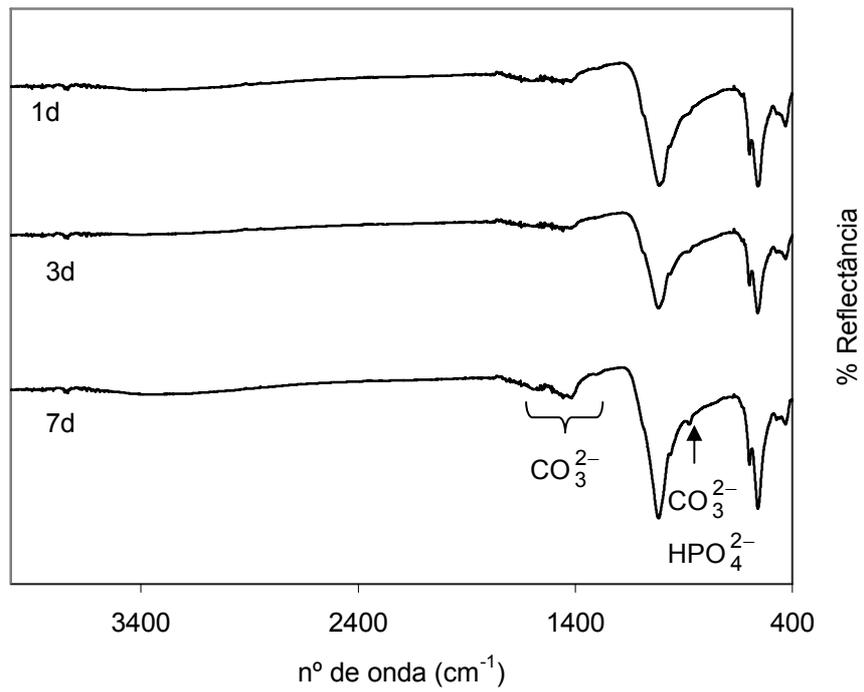


Figura 5.17 - Espectros de FTIR dos cerâmicos C após incubação em PIC

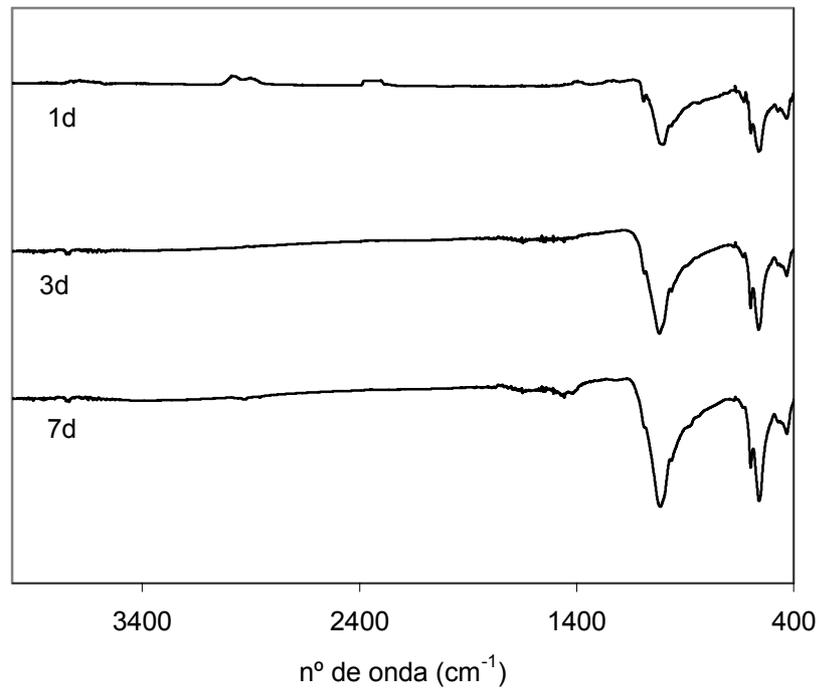


Figura 5.18 - Espectros de FTIR dos cerâmicos C após incubação em SBF

### 5.3.1.3. Discussão

Em primeiro lugar é de salientar o aumento da taxa de mineralização em  $50,0 \text{ cm}^3$  de SBF, em comparação com os resultados obtidos em  $10,0 \text{ cm}^3$  (Capítulo 4). Daqui se poderá concluir que o volume de solução em contacto com a amostra interfere com a cinética de mineralização. No capítulo 4 tinha-se já chegado a esta conclusão aquando dos ensaios nos recipientes A e L (Figura 4.1) que, pela sua diferente geometria, influenciam o acesso da solução ao cerâmico. Contudo neste caso pode também haver influência do material de que é constituído o próprio recipiente. O estudo desta situação esteve fora do âmbito desta tese.

No entanto, existe outro factor a considerar nos ensaios realizados em  $50,0 \text{ cm}^3$  de solução: neste caso, os recipientes de teflon estão inseridos num banho termostaticado com água em circulação (Figura 5.1), . A vibração do motor e a própria circulação da água, introduzem no sistema alguma agitação que afecta o interior dos recipientes. Estudos realizados por Hata *et al*<sup>14</sup> mostraram que a velocidade de crescimento de uma camada apatítica em substratos imersos em SBF pode aumentar apreciavelmente com a agitação. Isto indica que o crescimento de apatite é controlado pelo transporte de iões na vizinhança da interface substrato / fluido.

Ambos os factores, volume de solução e agitação, terão assim contribuído para o aumento da taxa de mineralização.

A morfologia das camadas formadas nos cerâmicos imersos em SBF é análoga à obtida em meio de volume restrito. A sobressaturação inicial do SBF proporciona crescimento de HAP. A morfologia em forma de placas poderá indicar o envolvimento inicial da fase OCP, embora este não tenha sido detectado por FTIR. Dos resultados obtidos com os pós é de esperar que haja inicialmente um aumento das concentrações de iões cálcio e fosfato (com aumento da sobressaturação relativa da HAP e do OCP) que não foram assinaladas nestas

---

<sup>14</sup> Hata K, Kokubo T. Growth of a bonelike apatite layer on a substrate by a biomimetic process. *J Am Ceram Soc* (1995) **78**: 1049-53

experiências por deverem ocorrer para períodos de tempo inferiores a 1 dia. O próprio aumento do volume da solução impede a detecção de pequenas variações de concentração. A possibilidade de um aumento inicial de  $S_{r(\text{OCP})}$  pode explicar a formação de depósitos apatíticos em forma de placas. Como se disse anteriormente há vários autores<sup>15,16,17</sup> que referem depósitos deste tipo, indicando que a apatite se formou via OCP.

O aspecto da camada formada em 7 dias de incubação do cerâmico S em SBF difere das restantes, pela mistura de placas e agulhas (Figura 6.6B). Por DRX observou-se existir crescimento preferencial da HAP segundo o plano (100). O mesmo não se observou em C. Ban *et al* num estudo realizado sobre deposição electroquímica de fosfatos de cálcio em titânio obtiveram, de acordo com as condições das experiências, depósitos de placas, de agulhas e misturas de ambas. Concluíram que quando se formou apenas apatite, os cristais apresentaram morfologia acicular alongada segundo a direcção (001). Quando a apatite se formou via OCP, os cristais apresentaram forma de placas e cresceram segundo o plano (100), o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. Esta ocorrência deverá estar relacionada com diferente composição da solução devido a dissolução de  $\alpha$ -TCP, visível na micrografia de menor ampliação da Figura 5.7B. A dissolução desta fase aumentará a sobressaturação local, proporcionando zonas de sobressaturação diferencial, com formação simultânea de HAP e OCP; com o tempo de incubação o OCP transformar-se-á em HAP mantendo a morfologia planar. Doi *et al* também referem que a natureza do crescimento depende do grau de saturação da solução; a sobressaturações elevadas, os primeiros cristais que se formam têm o aspecto de placas de OCP, enquanto que a sobressaturações menores (abaixo do produto de solubilidade do OCP) se formam cristais de apatite em forma de agulhas.

Em PIC alterou-se a morfologia e a composição das camadas. As principais características foram: tamanho de cristalito menor; morfologia exclusiva

---

<sup>15</sup> Ban S, Maruno S. Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in modified body fluid. *Biomaterials* (1998) **19**: 1245-1253

<sup>16</sup> Elliot JC. Structure of calcium-deficient hydroxyapatites. In: *Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates*. Elsevier, Amsterdam (1994)

<sup>17</sup> Doi Y, Eanes ED. Transmission electron microscopic study of calcium phosphate formation in supersaturation solutions seeded with apatite. *Calcif Tissue Int* (1994) **36**: 39-47

de placas; presença de sódio e magnésio em quantidades superiores às encontradas nas camadas formadas em SBF.

De salientar ainda o envolvimento claro da fase OCP no decurso da mineralização observada em S, detectado por FTIR e a característica amorfa das camadas formadas para 7 dias de ensaio (Figura 5.10), verificada também em C.

O carbonato pode entrar na rede apatítica por substituição do fosfato (HAP tipo B) ou por substituição do grupo hidróxido (HAP tipo A). O segundo tipo ocorre em reacções de síntese de HAP realizadas a temperaturas elevadas e em atmosfera de dióxido de carbono, originando um material bastante cristalino. O primeiro tipo ocorre nas reacções de precipitação em meio aquoso; este tipo de substituição diminui a cristalinidade e o tamanho de precipitado<sup>18,19,20,21</sup>. É ainda referida<sup>18</sup> a possibilidade de ocorrer uma substituição dupla, denominada AB, formada por precipitação em solução aquosa com baixo teor de carbonato.

Uma vez que o carbonato é mais pequeno que o fosfato e é planar, pode introduzir distorções na rede apatítica. O balanço de carga é conseguido à custa de criação de lacunas de cálcio, ou pela incorporação de impurezas catiónicas de valência inferior, por exemplo sódio<sup>22</sup>. Estas características estão de acordo com a morfologia e composição das camadas formadas em PIC.

Quanto ao envolvimento claro do OCP no processo de mineralização em S, ele dever-se-á a oscilações da relação Ca/P local à superfície dos cerâmicos, ocasionada pela dissolução do  $\alpha$ -TCP. Iijima et al estudaram o efeito do carbonato na formação do OCP a pH 7,4 e 37°C, tendo verificado que o carbonato altera a relação OCP/apatite do produto, dependendo da relação Ca/P da solução. Embora as condições experimentais destes autores tenham sido muito diferentes das realizadas neste trabalho e, por isso, impossíveis de transpor em pormenor as conclusões tiradas, interessa salientar que a morfologia dos

---

<sup>18</sup> Barralet J, Best S, Bonfield W. Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: an investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration. *J Biomed Mater Res* (1998) **41**: 79-86

<sup>19</sup> Ito A, Maekawa K, Tsutsumi S, Ikaxaki F, Tateishi T. Solubility product of OH-carbonated hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* (1997) **36**: 522-528

<sup>20</sup> Cuisinier FJG, Steuer P, Voegel JC, Apfelbaum F, Mayer I. Structural analyses of carbonate-containing apatites samples related to mineralised tissues. *J Mater Sci:-Mater in Med* (1995) **6**: 85-89

<sup>21</sup> Chickerur NS, Tung MS, Brown WE. A mechanism for incorporation of carbonate into apatite. *Calcif Tissue Int* (1980) **32**: 55-62

<sup>22</sup> De Maeyer EAP, Verbeeck RMH, Naessens DE. Optimization of the preparation of  $\text{Na}^+$  -and  $\text{CO}_3^{2-}$ -containing hydroxyapatite by the hydrolysis of monetite. *J Cryst Growth* (1994) **135**: 539-547

produtos foi de placas para várias quantidades de carbonato (0-20mM), mas a espessura e o tamanho de cristal diminuíram com o aumento da concentração de carbonato. Estes resultados indicam que o carbonato afecta significativamente a composição e morfologia finais dos cristais. Kapolos *et al*<sup>23</sup> concluíram que a presença de iões carbonato resultou na redução da velocidade de crescimento dos cristais e que a incorporação de carbonato na apatite favoreceu a formação de placas.

Nas condições experimentais deste trabalho, e pela comparação dos ensaios de mineralização em SBF e em PIC, pode ainda concluir-se que a mineralização terá sido mais rápida e abundante no último meio. As camadas formadas em PIC apresentam tamanho de cristalito menor e são menos cristalinas. Uma vez que a desordem estrutural introduzida pelos iões carbonato na rede apatítica e a diminuição de cristalinidade torna esta fase mais solúvel<sup>19,24,25</sup>, poder-se-á recorrer à regra de Ostwald<sup>26</sup> para justificar a mineralização mais rápida e abundante em PIC, uma vez que esta regra diz que a fase que precipita primeiro não é a fase termodinamicamente mais estável, mas uma metaestável.

Interessa ainda referir que com o aumento da quantidade de carbonato no sistema se poderia correr o risco de obter precipitação de carbonato de cálcio conjuntamente com a fase apatítica. No entanto, tal não se detectou por DRX nem SEM/EDS. Para o valor médio de pH de trabalho (7,3), a solução não se encontra saturada relativamente à calcite (forma mais estável do  $\text{CaCO}_3$ ) e como não se chega a verificar aumento da concentração de cálcio em solução por dissolução dos substratos, a solução permanece insaturada relativamente a esta fase.

---

<sup>23</sup> Kapolos J, Koutsoukos PG. Formation of calcium phosphates in aqueous solutions in the presence of carbonate ions. *Langmuir* (1999) **15**: 6557-6562

<sup>24</sup> LeGeros R Z, Orly I, Gregoire M, Daculsi G. Substrate surface dissolution and interfacial biological mineralisation. *In: The Bone-Biomaterial Interface*. Cap. 7. Davies JE ed, University of Toronto Press (1990)

<sup>25</sup> Okazaki M, Moriwaki Y, Aoba T, Doi Y, Takahashi J. Solubility behavior of  $\text{CO}_3$  apatites in relation to crystallinity. *Caries Res* (1981) **15**: 477-483

<sup>26</sup> Feenstra TP, Bruyn PL. The Ostwald rule of stages in precipitation from highly supersaturated solutions: a model and its application to the formation of the nonstoichiometric amorphous calcium phosphate precursor phase. *J Colloid Interface Sci* (1981) **84**: 66-72

### 5.3.2. Na presença de albumina

#### 5.3.2.1. Cerâmico S

Nos gráficos da Figura 5.19 observam-se diferenças entre os perfis das concentrações das soluções após incubação dos cerâmicos S em PIC e em SBF, ambos com albumina dissolvida (respectivamente APIC e ASBF). Em APIC, observa-se decréscimo ligeiro das concentrações de cálcio e fósforo total, indicativo de precipitação. Em ASBF, detecta-se aumento das concentrações referidas, indiciando dissolução do cerâmico.

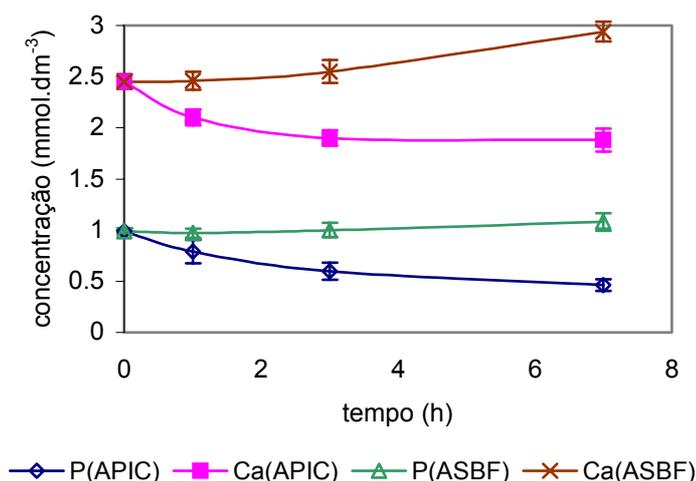


Figura 5.19 - Variação das concentrações de cálcio e fósforo totais ao longo do tempo de incubação de S em APIC e em ASBF

Na Figura 5.20 representam-se as variações de sobressaturação relativa dos meios e respectivas variações Ca/P totais. Neste caso não se fizeram correcções nos cálculos de sobressaturação relativa de acordo com a complexação albumina- $\text{Ca}^{2+}$ , uma vez que se pretende apenas um estudo comparativo entre perfis de sobressaturação entre APIC e ASBF.

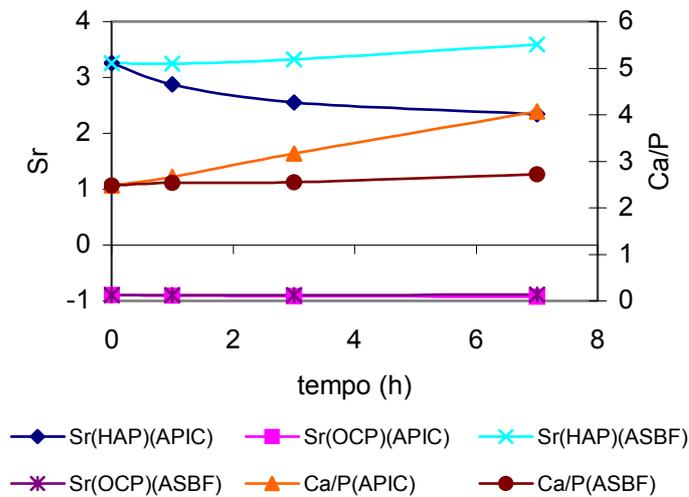


Figura 5.20 - Variação da sobresaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo das soluções APIC e ASBF após imersão do cerâmico S.

Por observação SEM da superfície de S imersa em APIC detectou-se a existência de mineralização já para 1 dia, embora não generalizada. Em ASBF existiam apenas vestígios (imagem não mostrada) após o mesmo tempo. Para 3 dias de imersão o aspecto das superfícies é o apresentado na Figura 5.21.

As formações superficiais em S imerso em SBFA são diferentes das habituais. No entanto, a análise química por EDS não identificou nenhum outro elemento além de cálcio, fósforo e oxigênio. Para 7 dias de ensaio (Figura 5.22B) é visível a dissolução de  $\alpha$ -TCP e a presença de agulhas dispersas na superfície.

Após 7 dias de imersão em APIC a camada formada sobre o cerâmico S apresentava-se distribuída por toda a superfície (Figura 5.22A) com uma morfologia em lâminas arredondadas, entrelaçadas entre si, criando canais. A coesão entre estas camadas e o substrato parece ser elevada como se exemplifica na Figura 5.23.

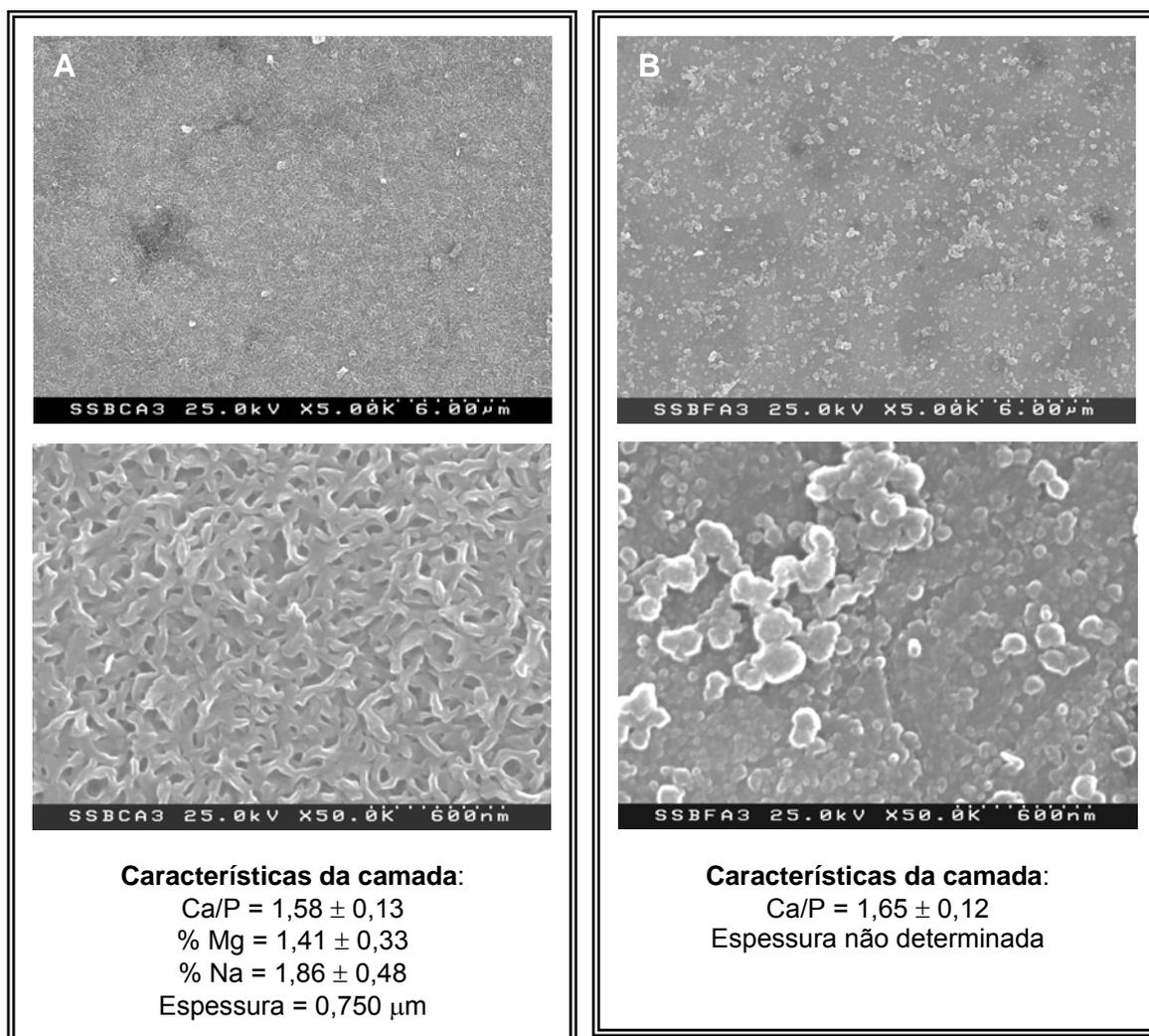


Figura 5.21. Superfície de S e características das camadas formadas após 3 dias de incubação em (A) APIC e (B) ASBF.

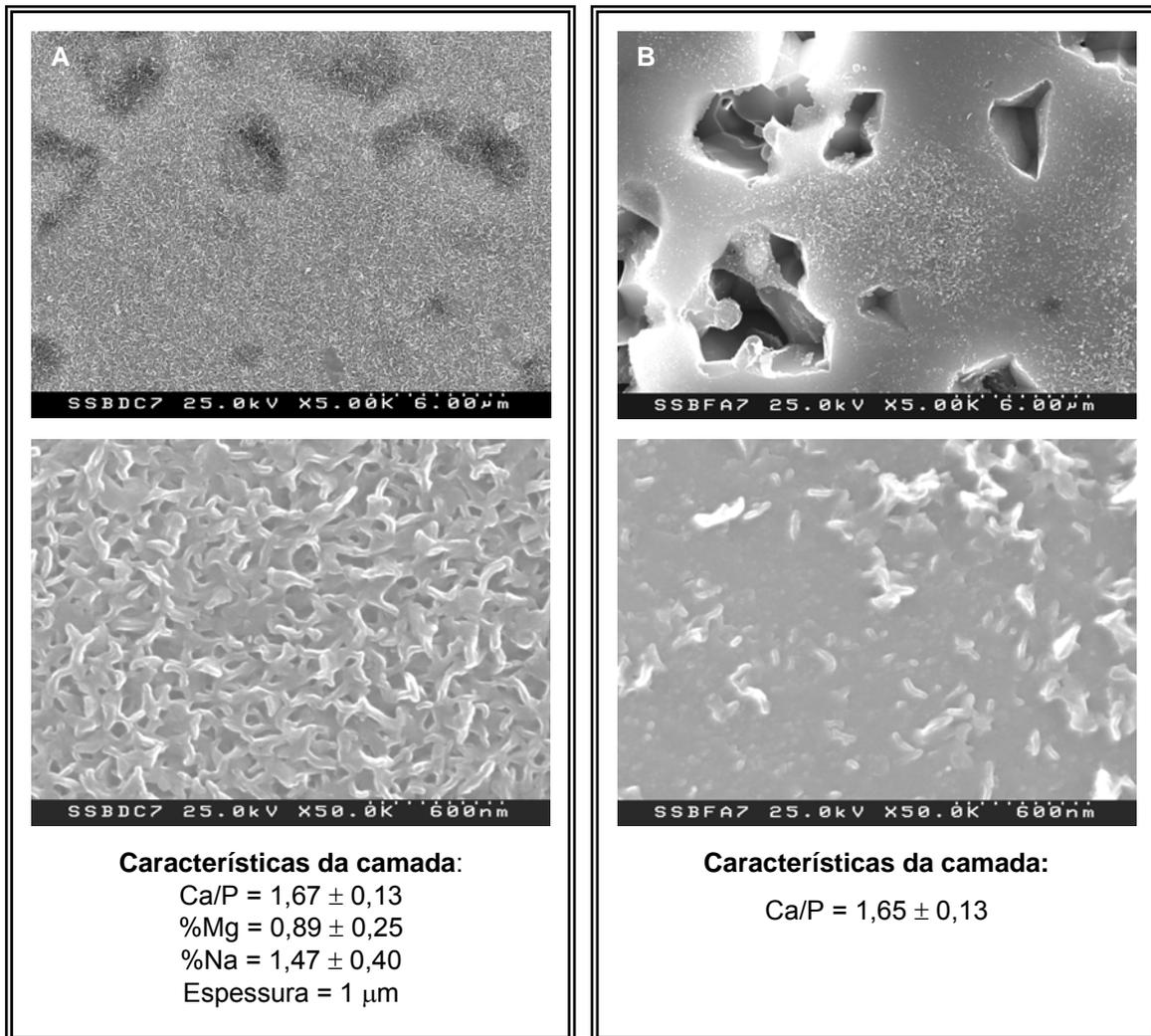


Figura 5.22 - Superfície de S e características das camadas formadas após 7 dias de incubação em (A) APIC e (B) ASBF.

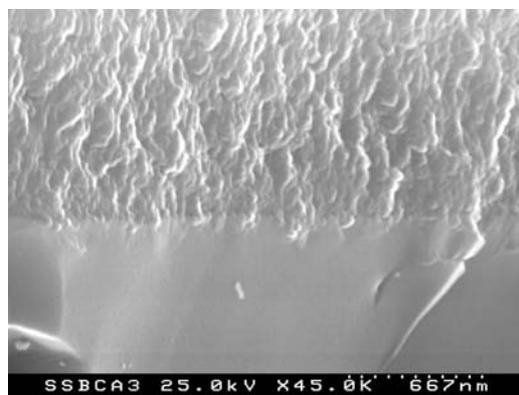


Figura 5.23 – Perfil da interface camada / substrato, numa zona de fractura do cerâmico S incubado 3 dias em APIC

Os espectros de FTIR dos cerâmicos incubados em APIC (Figura 5.24) apresentam, para além das bandas características da apatite, bandas adicionais que podem ser atribuíveis ao carbonato, ou (mais provavelmente) à albumina, se observarmos o espectro desta proteína, obtido nas mesmas condições dos cerâmicos (ver bandas  $1647$ ,  $1566$  e  $1394\text{ cm}^{-1}$ ) (Figura 5.25). É ainda visível uma diminuição da cristalinidade logo após 3 dias de imersão.

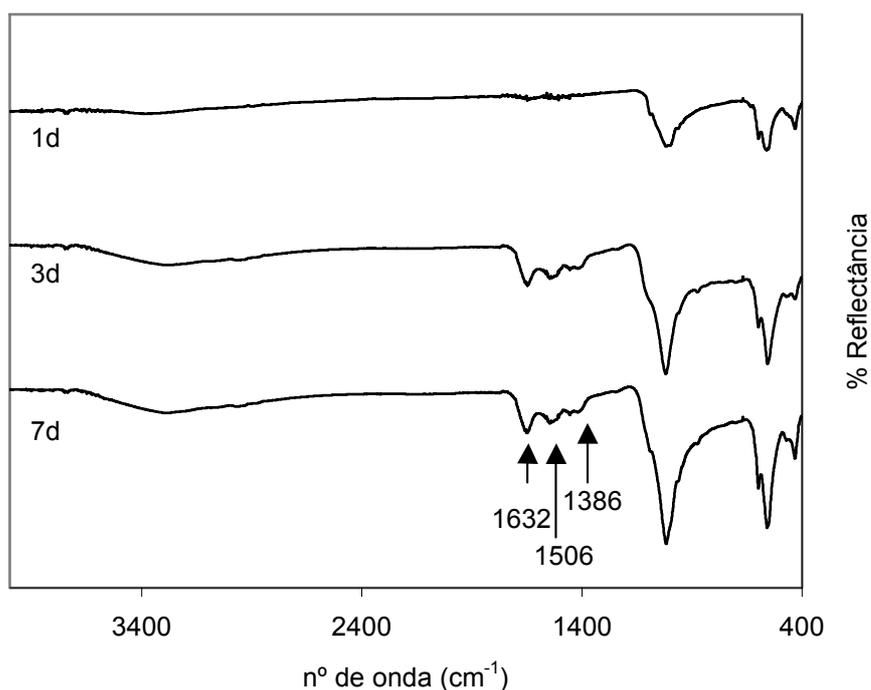


Figura 5.24. Espectros de FTIR dos cerâmicos S após incubação em APIC

O facto de a banda de absorção a cerca de  $870\text{ cm}^{-1}$ , devida ao ião carbonato, estar pouco definida nos espectros de S, aumenta a probabilidade de as bandas assinaladas se deverem à contribuição conjunta dos grupos carboxílicos da albumina e do carbonato.

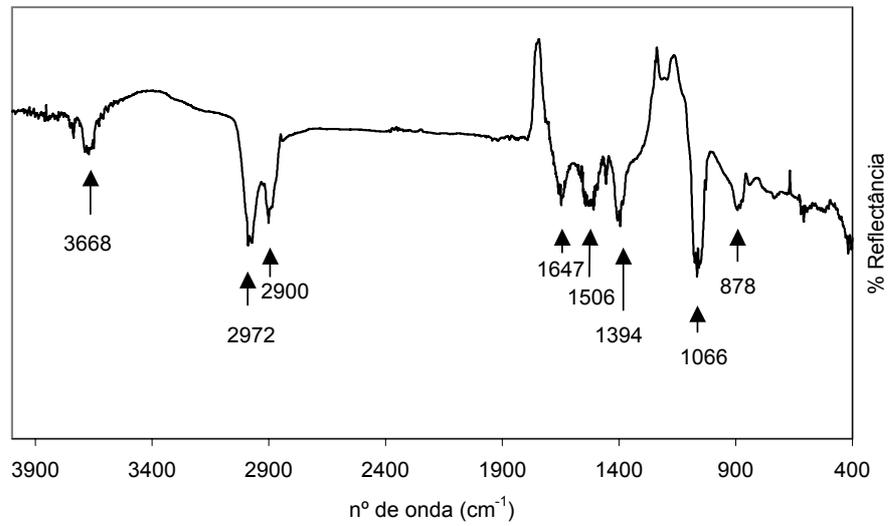


Figura 5.25. - Espectro de FTIR da albumina, obtido a partir do pó, nas mesmas condições dos ceramicos (reflectância difusa).

Nos espectros obtidos em ASBF não se observam bandas extra às da HAP (Figura 5.26).

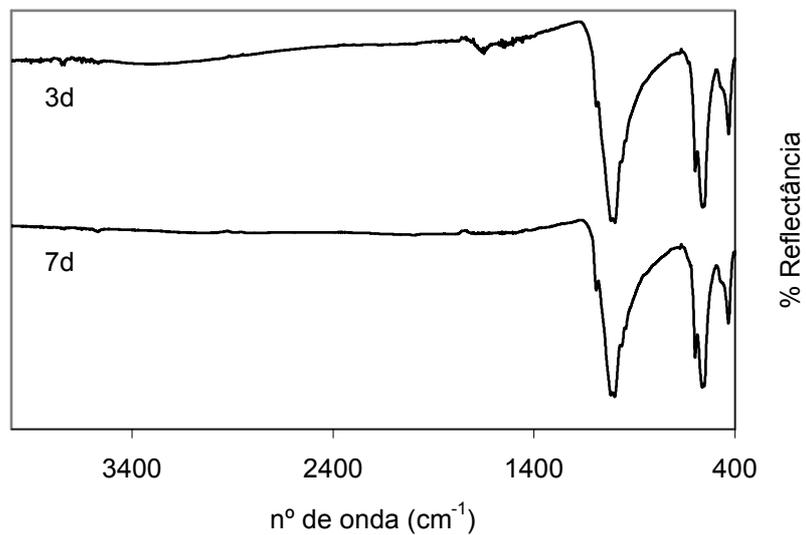


Figura 5.26 - Espectros de FTIR dos cerâmicos S após incubação em ASBF.

### 5.3.2.2. Cerâmico C

Pela observação dos perfis da Figura 5.27, detecta-se decréscimo acentuado das concentrações totais de cálcio e fósforo em APIC e uma diminuição menor das mesmas em ASBF. As curvas de  $S_{r(\text{HAP})}$  apresentadas na Figura 5.28 evidenciam esse facto.

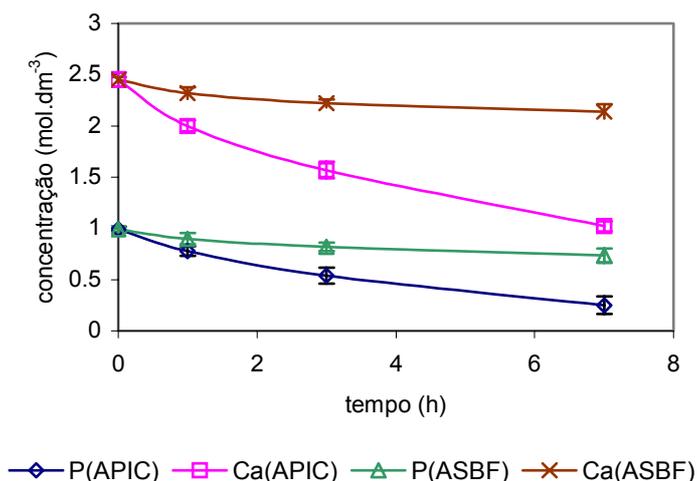


Figura 5.27 - Variação das concentrações de cálcio e fósforo totais ao longo do tempo de incubação de C em APIC e em ASBF

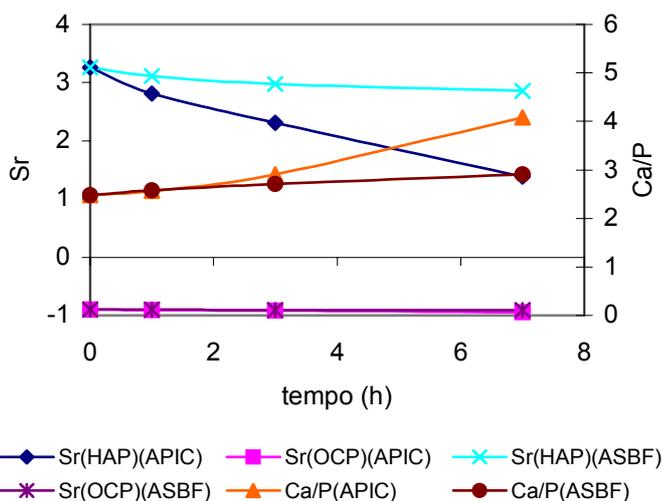


Figura 5.28 - Variação da sobressaturação relativa da HAP e do OCP e relação molar Ca/P das concentrações totais de cálcio e fósforo das soluções PIC e SBF após imersão do cerâmico C.

Tal como seria de esperar, por observação SEM das superfícies imersas em ASBF não se detectaram alterações significativas nas superfícies dos cerâmicos.

Pelo contrário, em APIC detectou-se mineralização abundante. Após 1 dia de ensaio a mineralização não está ainda generalizada por toda a superfície, mas para 3 dias observa-se uma camada com 1  $\mu\text{m}$  de espessura, passando para 3  $\mu\text{m}$  em 7 dias. Estas camadas podem ser observadas, respectivamente, nas Figuras 5.29 e 5.30.

O aumento considerável da espessura da camada entre 3 e 7 dias de ensaio é acompanhado por uma diminuição da relação Ca/P de 1,71 para 1,56 e de um aumento das concentrações de magnésio e sódio. A morfologia da camada formada após 7 dias apresenta-se menos densa (Figura 5.30), o que pode justificar o aumento de espessura.

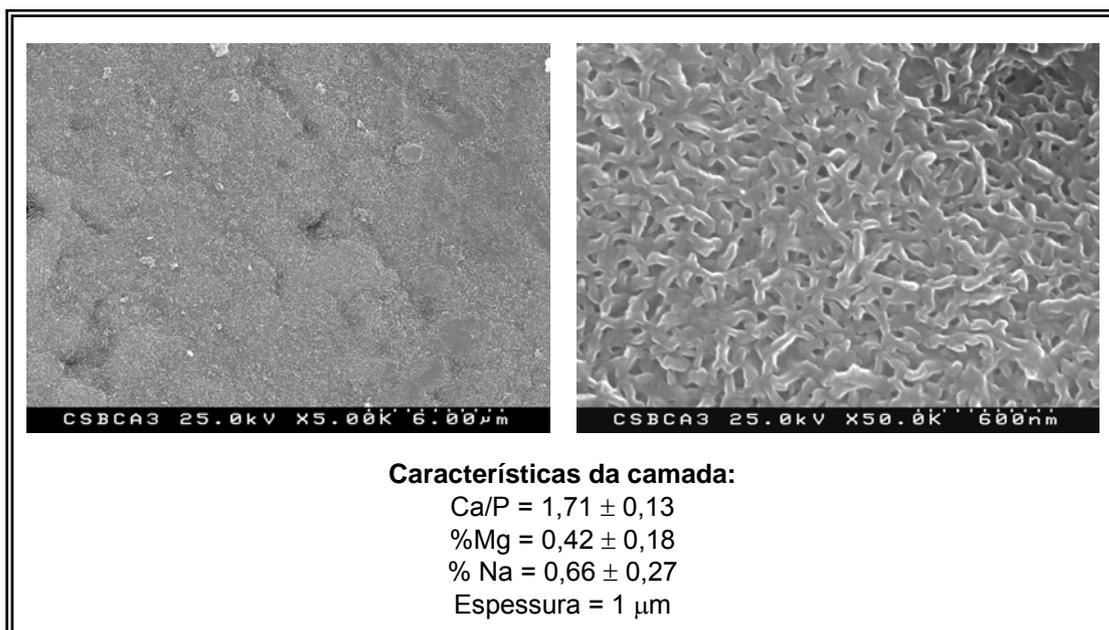


Figura 5.29 - Superfície de C e características das camadas formadas após 3 dias de incubação em APIC.

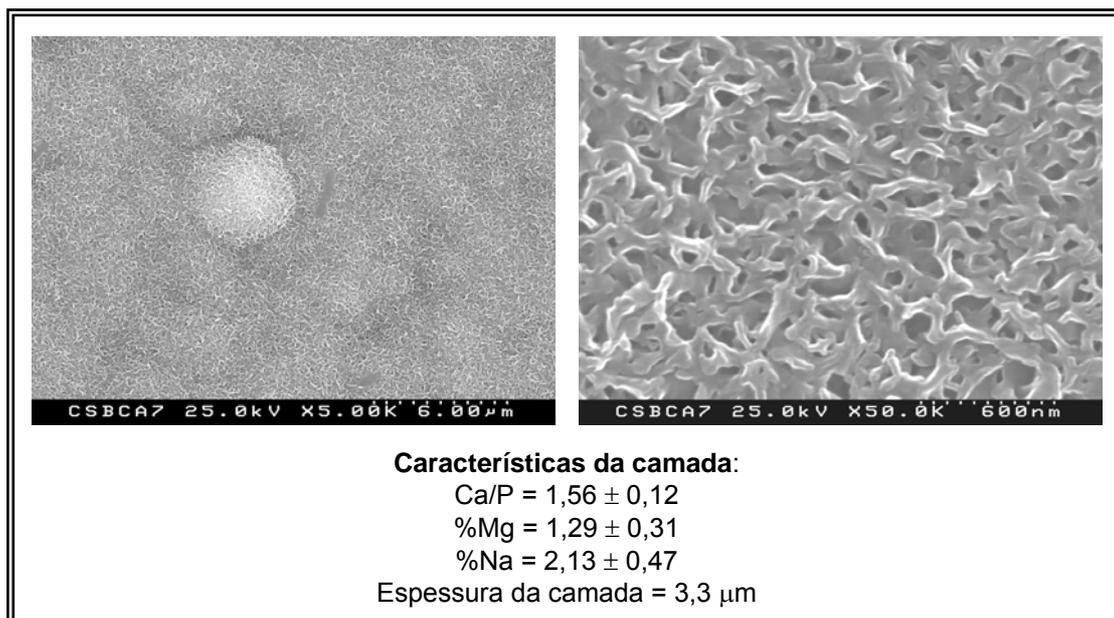


Figura 5.30 - Superfície de C e características das camadas formadas após 7 dias de incubação em APIC

Tal como no cerâmico S, também em C se observa continuidade entre substrato e camada no perfil da fractura (Figura 5.31).

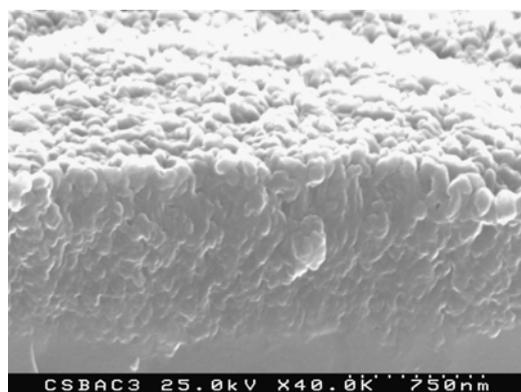


Figura 5.31 – Perfil da interface camada / substrato, numa zona de fractura do cerâmico C incubado 3 dias em APIC

Na Figura 5.32 podem observar-se os espectros de infravermelho das camadas formadas.

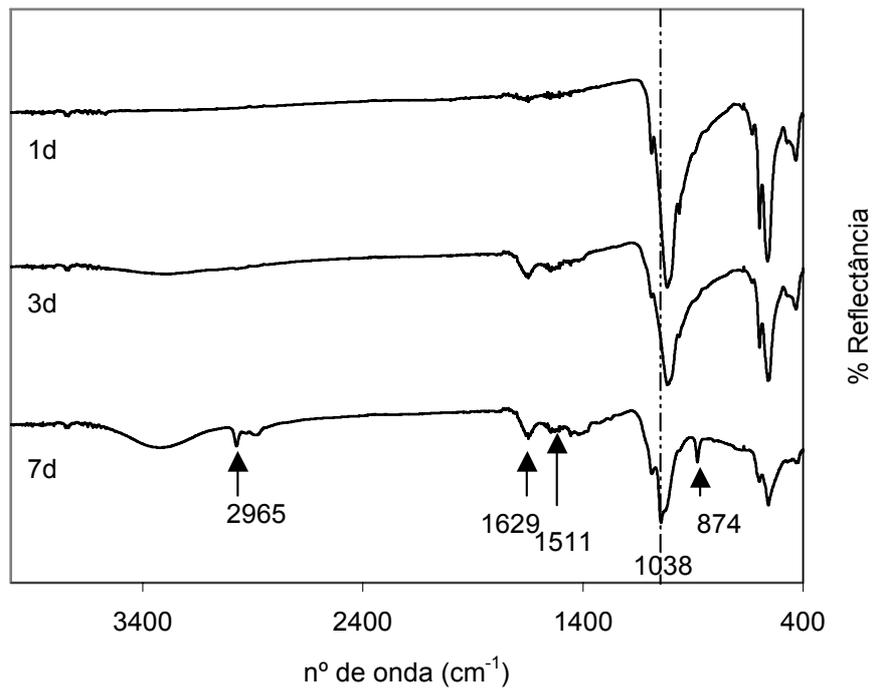


Figura 5.32. Espectros de FTIR dos cerâmicos C após incubação em APIC

Na Figura 5.33 podem observar-se os DRX das camadas formadas em C, imersas 3 e 7 dias em APIC.

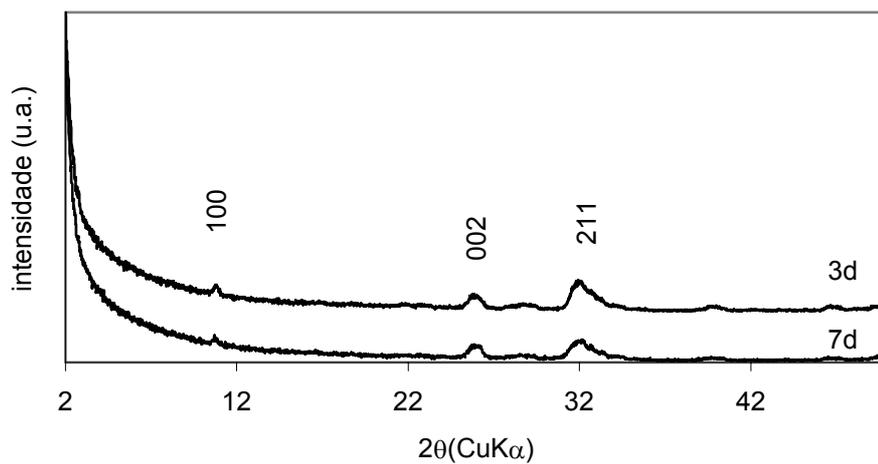


Figura 5.33 – Difractogramas de raios X (ângulo rasante) das superfícies C incubadas 3 e 7 dias em APIC.

### 5.3.2.3. Discussão

Em relação aos ensaios realizados em ASBF, não se obteve nada de novo relativamente ao esperado. A albumina dissolvida em SBF retardou a mineralização na superfície de C, mesmo em condições de maior volume de solução e agitação.

Em APIC os resultados foram surpreendentes: a mineralização não foi inibida, sendo até mais abundante em C que nos ensaios em PIC. O sólido S apresenta já uma baixa cristalinidade ao fim de 3 dias de imersão em APIC, como se pode inferir dos espectros de FTIR (Figura 5.24). Nas soluções sem albumina este abaixamento de cristalinidade só era evidente nos espectros traçados para 7 dias de incubação. A presença de albumina parece assim, acelerar as transformações esperadas ao nível da camada depositada.

Comparando as imagens das Figuras (5.7A e 5.22A) parece que as camadas superficiais cristalizadas em APIC são mais amorfas do que as cristalizadas no mesmo meio sem albumina. Esta observação pode ser sustentada pelo facto de a camada formada em presença de albumina incorporar esta proteína ou maior quantidade de carbonato. A presença de carbonato diminui a cristalinidade da apatite<sup>27,28,29</sup>.

Os espectros de FTIR das camadas formadas em APIC (Figuras 5.24 e 5.32) parecem evidenciar inclusão de moléculas de albumina. Esta situação não foi verificada em nenhum outro ensaio realizado em presença de albumina. Por este motivo, a composição do plasma inorgânico carbonatado terá favorecido não só o crescimento de uma camada de apatite em presença de albumina, como favorecido a sua inclusão.

Tendo este trabalho por finalidade estudar o comportamento de fosfatos de cálcio com a estrutura de apatite em meios aquosos com composição inorgânica semelhante à do plasma, pode-se comparar a composição da fase sólida obtida

---

<sup>27</sup> Bocchi G, Valdre G. Physical, chemical, and mineralogical characterization of carbonate-hydroxyapatite concretions of the human pineal gland. *J Inorg Biochem* (1993) **49**: 209-220

<sup>28</sup> Cuisinier FJG, Steuer P, Voegel JC, Apfelbaum F, Mayer I Structural analyses of carbonate-containing apatites samples related to mineralised tissues. *J Mater Sci- Mater Med* (1995) **6**: 85-89

<sup>29</sup> Fernandez E, Planell JA, Best SM. Precipitation of carbonated apatite in the cement system  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3$ . *J Biomed Mater Res* (1999) **47**: 466-471

após imersão em soluções de PIC com albumina com a composição das fases inorgânicas dos tecidos normais calcificados – esmalte, dentina e ossos – apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Composição média do osso, esmalte e dentina humanos (valores expressos em percentagem)<sup>30</sup>.

composição	esmalte	dentina	osso
Cálcio	36,5	35,1	34,8
Fósforo	17,7	16,9	15,2
Sódio	0,5	0,6	0,9
Potássio	0,08	0,05	0,03
Magnésio	0,44	1,23	0,72
Carbonato	3,5	5,6	7,4
Fluoreto	0,01	0,06	0,02
Cloreto	0,3	0,01	0,13
Pirofosfato	0,02	0,10	0,07
Ca/P	1,63	1,61	1,71
(produtos de ignição (950 °C))	HAP + $\beta$ -TCP	HAP + $\beta$ -TCP	HAP + CaO

Dos dados apresentados nas Figuras 5.22A e 5.30 e compilados na Tabela 6.3 pode ver-se que os sólidos obtidos têm uma relação Ca/P comparável com a de algumas fases inorgânicas apresentadas na Tabela 6.2, embora as percentagens de magnésio e sódio sejam mais elevadas.

Tabela 6.3 – Composição das camadas apatíticas formadas nos cerâmicos após 7 dias de incubação em APIC (valores expressos em percentagem).

Composição	Cerâmico S	Cerâmico C
Magnésio	0,89 ± 0,25	1,29 ± 0,31
Sódio	1,47 ± 0,40	2,13 ± 0,47
Ca/P	1,67 ± 0,13	1,56 ± 0,13

<sup>30</sup> LeGeros RZ. Calcium phosphates in enamel, dentin and bone. *In*: Calcium phosphates in oral biology and medicine. Myers HM ed. Karger, San Francisco (1991)

---

## CERÂMICOS EM CULTURA CELULAR

### 6.1. Introdução

Como conclusão desta dissertação faz-se uma referência breve ao trabalho que se realizou para avaliação da biocompatibilidade dos cerâmicos e da influência da actividade osteoblástica na mineralização superficial.

A colonização e adesão celulares reflectem a forma como as células reagem ao material a que são expostas. Várias células dependem de fixação para sobreviverem, como por exemplo osteoblastos e fibroblastos. Os osteoblastos são células importantes na osteointegração dos implantes, têm capacidade para sintetizar e produzir matriz extracelular e controlar a sua mineralização e consequentemente regular o crescimento da ligação osso – implante. São, pois células chave para estudar o desempenho de um implante, e a avaliação do seu comportamento num potencial biomaterial pode ajudar a conhecer a sua possível biocompatibilidade.

É muito variada a investigação sobre o comportamento celular em presença de fosfatos de cálcio<sup>1,2,3,4</sup>. Contudo, o efeito das propriedades da HAP na resposta biológica não está ainda totalmente compreendido. A resposta celular depende das características físicas e químicas do substrato e em particular da sua composição química, cristalinidade, tamanho de partícula e estrutura superficial. Por exemplo, o tratamento superficial da HAP, como a sinterização a várias temperaturas, resulta em variações das características químicas e cristalográficas e influencia a actividade osteoblástica<sup>5</sup>.

Tinha-se por objectivo com este trabalho comparar o comportamento dos cerâmicos C e S em meio de cultura celular. No entanto, os estudos envolvendo material biológico apresentam uma variabilidade e contingência muito maiores que os estudos meramente químicos, provenientes não só das características dos materiais, mas fundamentalmente da ocorrência de contaminações e morte celular. Os estudos com osteoblastos foram muito dificultados por todas estas razões. As contaminações por bactérias foram muito frequentes e dificultaram a progressão dos estudos pretendidos.

Os resultados a seguir apresentados têm apenas por objectivo ilustrar as alterações superficiais dos cerâmicos em meio de cultura celular.

---

<sup>1</sup> Hulshoff JEG, van Dijk K, Ruijter JE, Rietveld FJR, Ginsel LA, Jansen JA. Interfacial phenomena: An *in vitro* study of the effect of calcium phosphate (Ca-P) ceramic on bone formation. *J Biomed Mater Res* (1998) **40**: 464-474

<sup>2</sup> Midy V, Rey C, Bres E, Dard M. Basic fibroblast growth factor adsorption and release properties of calcium phosphate. *J Biomed Mater Res* (1998) **41**: 405-411

<sup>3</sup> Ong JL, Hoppe CA, Cardenas HL, Cavin R, Carnes DL, Sogal A Raikar GN. Osteoblast precursor cell activity on HA surfaces of different treatments. *J Biomed Mater Res* (1998) **39**: 176-183

<sup>4</sup> Deligianni DD, Katsala DN, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment. *Biomaterials* (2001) **22**: 87-96

<sup>5</sup> Frayssinet P, Rouquet N, Fages J, Durand M, Vidalain PO, Bonel G. The influence of sintering temperature on the proliferation of fibroblastic cells in contact with hydroxyapatite-bioceramics. *J Biomed Mater Res* (1997) **35**: 337-47

## 6.2. Metodologia Utilizada

Para a obtenção de culturas primárias de células osteogénicas de medula óssea foram sacrificados ratos Wistar machos, com cerca de 6 semanas, para extracção dos fémures. Os extremos dos ossos foram cortados e a medula óssea expelida pelas epífises por escorrimento, ao injectar 1 cm<sup>3</sup> de meio de cultura. As células obtidas foram recolhidas num frasco de cultura contendo 15 cm<sup>3</sup> de meio standard. Este é constituído por  $\alpha$ -Minimal Essencial Medium ( $\alpha$ -MEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos ( 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  de fungizona e 50  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  de sulfato de gentamicina). O meio foi renovado após as primeiras 24 horas para remover as células não aderentes. Subsequentemente o meio foi renovado a cada 3 dias. As culturas foram mantidas numa atmosfera modificada de 95% de ar com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Ao fim de 7 dias as células foram extraídas dos frascos com tripsina e ressuspensas em meio standard suplementado com  $\beta$ -glicerofosfato (10 mol·dm<sup>-3</sup>), ácido ascorbico (10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) e dexametazona.

Os cerâmicos, previamente inseridos em placas de cultura de 24 poços, foram inoculados com suspensão celular com densidade de  $2\times 10^4$  células/cm<sup>3</sup> e incubados durante 4 horas a 37°C. Após incubação cada cerâmico (agora revestido com uma camada celular) foi transferido para uma placa de cultura de 24 poços nova contendo 500 mm<sup>3</sup> de meio standard, suplementado com 50  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  de ácido ascórbico, dexametazona e 10 mmol·dm<sup>-3</sup> de  $\beta$ -glicerofosfato. As células foram também adicionadas a poços sem discos por forma a servir de controle nas mesmas condições.

Foram preparadas placas para os tempos experimentais: 3, 7, 14, 18 e 21 dias. As placas foram cultivadas sob as mesmas condições das culturas primárias. No final de cada tempo, as células foram lavadas com uma solução tampão salina de fosfato (PBS) e uma parte dos cerâmicos + células congelados a -20 °C para posterior análise das proteínas e da actividade da enzima fosfatase alcalina. O meio celular foi congelado à mesma temperatura para posterior leitura

da osteocalcina (apenas a 18 e 21 dias). Nos diferentes tempos uma parte das células foi fixada para análise de SEM.

Para tentar distinguir os efeitos da presença celular e da composição do meio, realizaram-se alguns ensaios suplementares onde se incubaram os cerâmicos em meio acelular, ou seja no meio  $\alpha$ -MEM sem células. Este meio contém  $\text{CaCl}_2$  ( $0,264 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{NaHCO}_3$  ( $2,200 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{NaCl}$  ( $6,800 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  ( $0,158 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{KCl}$  ( $0,400 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $0,200 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), aminoácidos, vitaminas, glucose ácido lipóico vermelho de fenol e piruvato de sódio. O pH desta solução é de 7,4. Os cerâmicos foram sujeitos ao mesmo ciclo de renovação de solução, tal como na presença de células. Ao fim de 21 dias estes cerâmicos foram observados por SEM.

### 6.3. Resultados

Nas Figuras 6.1 e 6.2 apresentam-se várias micrografias das superfícies dos cerâmicos S e C. Com as imagens apresentadas pretende-se ilustrar a diversidade de morfologias observadas. Ambos os cerâmicos mostram adesão celular e formação de matriz extracelular fibrosa característica das células osteoblásticas. No entanto ocorreu contaminação durante os ensaios particularmente no cerâmico S, é possível observar, em particular nas micrografias 6.1B, C, e F, formações ovais correspondentes a bactérias. Em conjunto com os aspectos referidos é possível observar imagens de mineralização familiares das obtidas em capítulos anteriores, nomeadamente a presença de placas nas Figuras 6.1A e 6.2B e E.

Na sequência dos resultados obtidos nos capítulos anteriores, foi surpreendente observar a reactividade elevada dos cerâmicos em meio de cultura celular.

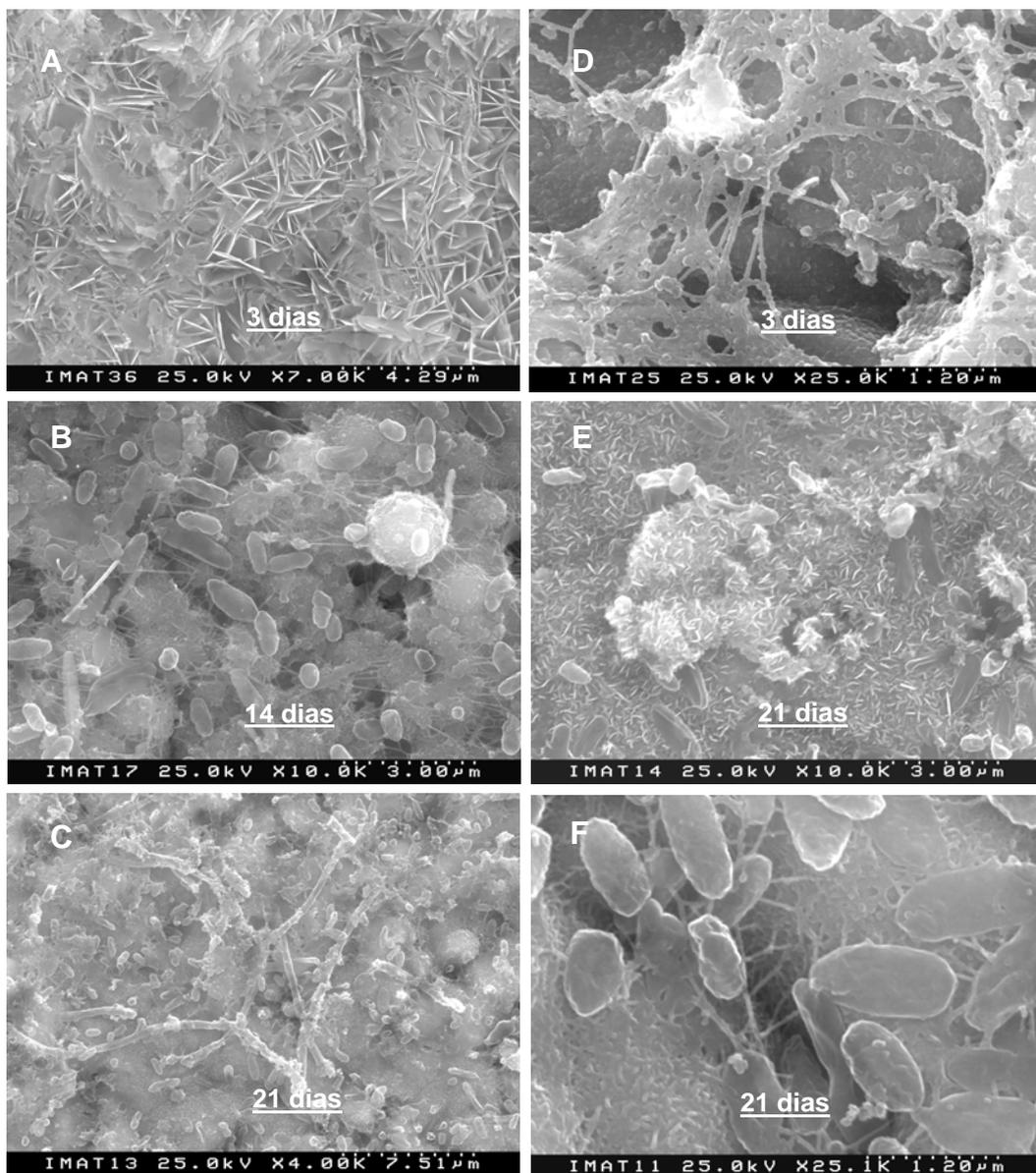


Figura 6.1. Superfície dos cerâmicos S incubados em cultura celular para diversos tempos

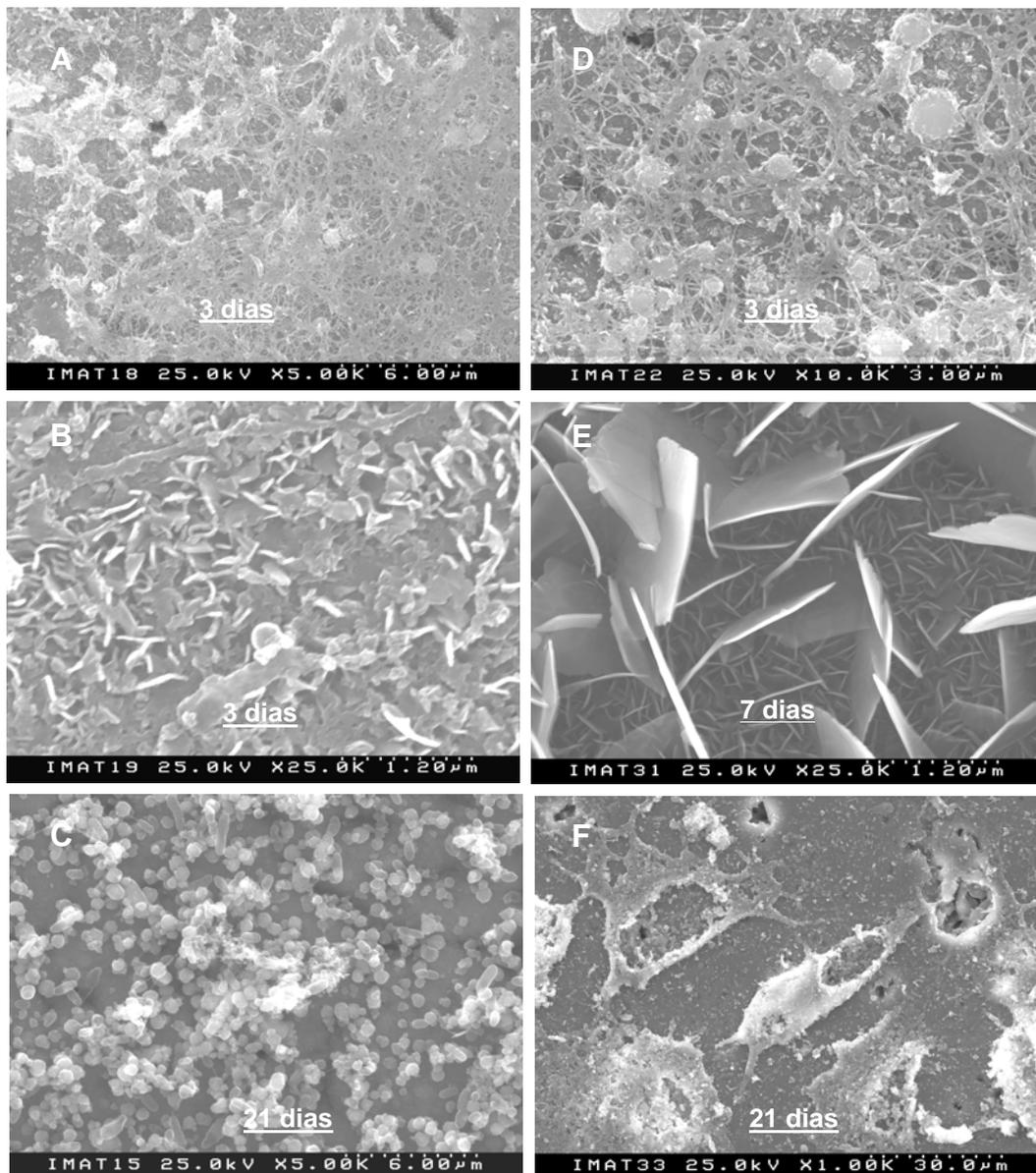


Figura 6.2. Superfície dos cerâmicos C incubados em cultura celular para diversos tempos

Nas Figuras 6.3 e 6.4 apresenta-se respectivamente para S e C, o aspecto das superfícies destes cerâmicos após 21 dias de incubação em  $\alpha$ -MEM. As superfícies S apresentaram uma reactividade superior às de C. Na Figura 6.3A pode observar-se o aspecto geral da superfície. Na Figura 6.4 as micrografias apresentadas são aspectos não generalizados pela superfície. Os cristais cúbicos observados em 6.4A apresentaram um conteúdo elevado de sódio e cloreto, sendo por isso, cloreto de sódio, cuja formação pode ter sido proporcionada por

alguma evaporação da solução (as placas de incubação não são hermeticamente fechadas).

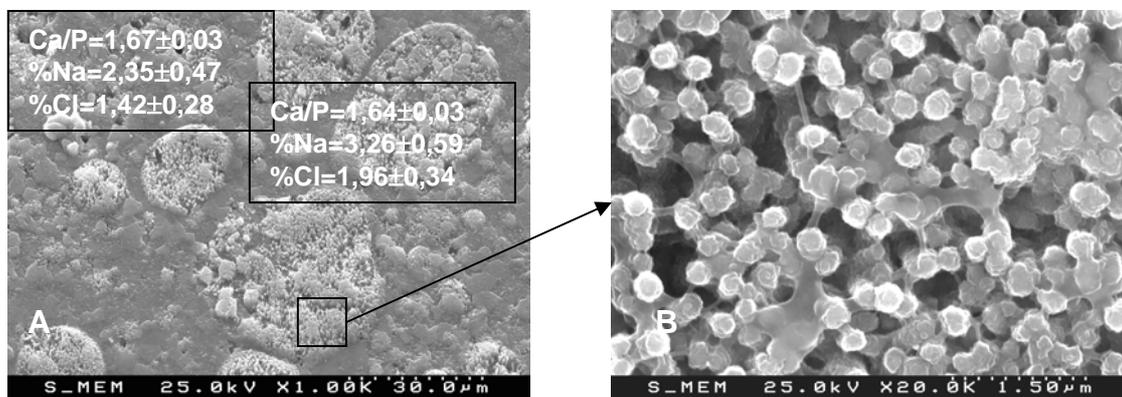


Figura 6.3 – Superfície do cerâmico S após 21 dias de incubação em meio  $\alpha$ -MEM.

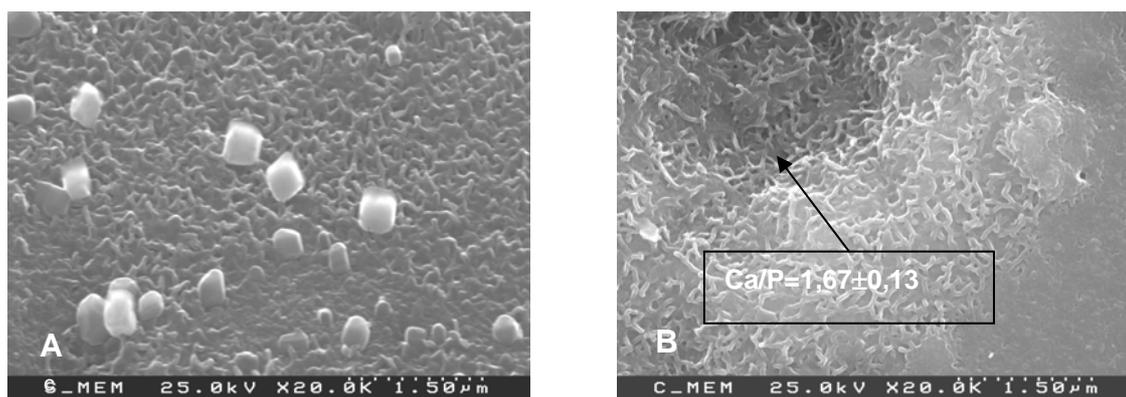


Figura 6.4 – Superfície do cerâmico C após 21 dias de incubação em meio  $\alpha$ -MEM.

Os resultados prévios da proliferação celular avaliada a partir da análise da proteína total indicam um padrão de proliferação celular semelhante entre os materiais testados e o controle. A hidroxiapatite comercial é a que apresenta os valores menores de proliferação celular. No que diz respeito à actividade da enzima fosfatase alcalina ambos os cerâmicos apresentam valores mais elevados que o controle no que se refere à actividade desta enzima.

#### 6.4. Discussão

Pode dizer-se que os resultados obtidos em meio celular se assemelham aos encontrados na literatura sobre este tipo de biomateriais, isto é, os materiais testados são osteocondutores. Devido à escassez de resultados não se pode tirar nenhuma conclusão comparativa, ou seja, qual o material que apresenta melhores propriedades de osteocondução.

No meio  $\alpha$ -MEM sem células a dissolução de  $\alpha$ -TCP no cerâmico S terá sido responsável pelas alterações superficiais verificadas. Na superfície de C observou-se mineralização escassa juntamente com formação de cloreto de sódio devido provavelmente a evaporação da solução.

Tentando comparar os resultados obtidos na presença de células com os obtidos nos capítulos anteriores, para além da diferente composição do meio tem de se referir o volume de solução de cerca de 1 cm<sup>3</sup> e a renovação do meio a cada três dias de incubação. Se por um lado, o volume reduzido de solução contribui para menor extensão das reacções, a renovação do meio actua em sentido contrário, ou seja, favorece as reacções uma vez que repõe as concentrações da solução.

Para justificar a reactividade dos cerâmicos em meio celular observada nas micrografias de ambos os cerâmicos para 3 dias de ensaio, altura em que ainda não se renovou a solução, admite-se que a acidificação do meio devida à actividade celular dissolve iões cálcio e fosfato, sobressaturando o microambiente e promovendo, quer a precipitação de fosfatos estáveis em meio ácido, convertíveis posteriormente em HAP, quer a reprecipitação de HAP quando o pH recuperar o valor fisiológico (7,4 a 37°C) após sucessivas renovações de solução.

Estes resultados são escassos para se poderem tirar conclusões sobre a influência da composição dos dois cerâmicos no comportamento celular.

---

## SÍNTESE E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

O presente trabalho teve como finalidade estudar as alterações que poderiam ocorrer no conjunto solução aquosa / fosfato de cálcio comercial quando este último está imerso nos dois meios até agora mais utilizados para estudos de biomineralização: SBF e HBSS.

O facto de as hidroxiapatites comerciais apresentarem todas elas uma composição elementar mais ou menos variada e extensa para além dos constituintes fundamentais – cálcio e fósforo - originou a necessidade de se sintetizar um material apatítico com um grau de pureza mais elevado. Quanto aos meios aquosos optou-se, como se viu, por estudar em primeiro lugar a situação mais simples, que correspondia à imersão dos sólidos em água de grau de pureza elevado, indo sucessivamente complicando o meio, tendo em atenção os dois aspectos que se consideraram mais importantes: a estabilização do pH e a influência de iões comuns (cálcio e fosfato). Para tentar compreender o efeito de cada um destes parâmetros por si só realizaram-se as experiências em água, água + Tris/HCl e SBF sem cálcio e fosfato.

Os ensaios preliminares envolvendo os cerâmicos imersos em HBSS e SBF tinham mostrado que a ausência de tampão no HBSS originava alterações importantes na solução mineralizante tendo-se investigado por isso o comportamento de ambos os cerâmicos num SBF sem tampão (SBF0).

Sendo a cinética das reacções influenciada pelo estado de divisão do material promoveu-se o estudo comparativo dos cerâmicos na forma de pó e na forma de corpo compacto.

A complexa componente orgânica do plasma dos seres vivos vertebrados foi neste trabalho simplificada com a utilização de albumina.

Do conjunto de experiências realizadas pode concluir-se que nas reacções entre fosfatos de cálcio e plasma simulado existe um conjunto de parâmetros que influenciam essas mesmas reacções:

1) **pH e natureza do tampão** - o controlo do valor do pH em torno de 7,3 é fundamental. Para isso é necessário ter em solução um tampão eficaz. Nas condições das experiências realizadas pode dizer-se que o tampão Tris/HCl foi eficaz no controlo do pH. A conhecida capacidade de complexação da molécula Tris deve ser tida em consideração na explicação dos resultados obtidos. A substituição deste tampão pelo tampão biológico  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  foi conseguida. Do conjunto de experiências realizadas na solução plasmática com este tampão concluiu-se que a cinética do processo nucleação/crescimento de cristais à superfície de ambos os cerâmicos foi superior. As camadas formadas são microcristalinas e pensa-se de composição mais próxima das que se formarão *in vivo*;

2) **Sobressaturação média e local** – o cálculo da sobressaturação relativa em relação a uma dada fase resultante das medidas de concentrações médias dos iões em solução não reflectirá o valor de sobressaturação junto à interface sólido/solução. Em especial na presença de fases solúveis, como  $\alpha$ -TCP no cerâmico S, a sobressaturação local será muito diferente da medida no seio da solução e a composição da fase sólida formada é influenciada pela sobressaturação local ;

3) **Presença e natureza de impurezas no material** – a reactividade do material é fortemente influenciada pela presença de impurezas. No cerâmico S a

presença de  $\alpha$ -TCP aumentou a reactividade deste material, tendo-se verificado que o processo de dissolução desta fase foi influenciado pela composição da solução. A presença de iões magnésio, ferro e manganês no cerâmico comercial pode ter sido inibidora da cristalização de outras fases sólidas à sua superfície.

4) **Presença e repartição de albumina** – a dissolução de albumina nas soluções de SBF e HBSS retardou a mineralização devido à diminuição da sobressaturação relativa da solução causada pela complexação entre albumina e cálcio. Quando esta proteína foi pré-adsorvida na superfície dos cerâmicos verificaram-se duas situações: no cerâmico S o processo de mineralização foi igualmente retardado devido à dissolução do  $\alpha$ -TCP durante a pré-incubação, o que alterou as características superficiais deste material; no cerâmico C incubado em HBSS, a mineralização terá sido promovida pela presença da camada proteica, provavelmente por fenómenos de complexação entre albumina e cálcio à superfície do cerâmico. Pelo contrário, a dissolução de albumina na solução de plasma inorgânico carbonatado (PIC) promoveu a deposição de uma camada apatítica.

5) **Relação superfície da amostra / volume de solução e agitação** – verificou-se que a diminuição da relação superfície / volume e a agitação favoreceram a cinética de formação de camada apatítica.

Das conclusões desta tese emergem várias possibilidades de realização de outros trabalhos entre os quais se consideram mais importantes os que se relacionam com o aperfeiçoamento do sistema de incubação em plasma inorgânico simulado com adição de proteínas. Em particular, proporcionar um fluxo controlado de solução mineralizante, equilibrada com o tampão  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ , através do recipiente da amostra de modo a obter uma composição constante do meio. Em alternativa desenvolver um sistema computadorizado que permita a monitorização das concentrações em solução e reposição das mesmas com auxílio de microburetas acopladas.

Na tentativa de aproximação aos processos *in vitro*, seria importante trabalhar com concentrações mais elevadas de albumina e eventualmente

adicionar outras proteínas, o que levanta o problema de lidar com soluções de viscosidade elevada e controlar com rigor a assepsia do ambiente de trabalho.

O controlo local de concentrações com o auxílio de microeléctrodos seria importante nestas condições.

Face à importância dos processos biomiméticos seria interessante estudar a deposição de camadas formadas por imersão em plasma inorgânico simulado com adição de albumina (APIC) em outros substratos, por exemplo titânio e materiais poliméricos.

Finalmente, do ponto de vista químico, seria importante reunir, de forma crítica, dados termodinâmicos sobre constantes de solubilidade e de complexação das várias espécies possíveis de existirem nestas soluções, com o objectivo de calcular sobressaturações relativas de várias fases sólidas com maior rigor. Só dessa forma se poderá elaborar com rigor mecanismos de biomineralização.