

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

18



RELATÓRIO DE ESTÁGIO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCERÂMICAS DE HIDROXIAPATITA
E FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO CARBONATADO**

KARINA DONADEL

ORIENTADOR: PROF. Dr. MAURO CÉSAR MARGHETTI LARANJEIRA



03753155

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCERÂMICAS DE HIDROXIAPATITA E
FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO CARBONATADO**

Relatório de estágio curricular obrigatório
realizado no laboratório Quitech - UFSC

KARINA DONADEL

ORIENTADOR: PROF. Dr. MAURO CÉSAR MARGHETTI LARANJEIRA

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2004.

AGRADECIMENTO

A DEUS, pela capacidade e saúde para poder concluir este trabalho

Aos meus pais, NILTO E NEUSA por estarem sempre ao meu lado me dando força, amor e muito carinho e também pela oportunidade que me deram para realizar este sonho.

Ao meu irmão Daniel por ser meu amigo e pela sua colaboração em todos os momentos que precisei.

Ao meu namorado Gilson pelo amor, compreensão e apoio durante todos os momentos da realização deste trabalho.

Ao prof Dr Mauro C. M. Laranjeira pela sua amizade e apoio e por ter me dado essa oportunidade de desenvolver esse trabalho junto ao grupo Quitech,

Aos colegas do grupo Quitech pela amizade, apoio durante a realização deste trabalho.

Ao prof Dr João Cardoso e prof Dr Kleber D. Machado do Departamento de Física da UFSC, pela ajuda na realização das análises de raio-X e em especial ao Dr Kleber D. Machado pela interpretação de alguns dados obtidos .

Ao prof Dr Luiz Henrique M. Prates do Departamento de Odontologia da UFSC pela ajuda na realização do teste de resistência mecânica a compressão do material.

A todos os colegas do curso de química

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biocerâmicas.....	1
1.2 Hidroxiapatita.....	4
1.3 Fosfato de Cálcio Amorfo Carbonatado.....	6
1.4 Quitosana.....	7
2.OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral.....	9
2.2 Objetivo Específico.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Reagentes e Equipamentos.....	10
3.1.1 Reagentes.....	10
3.1.2 Equipamentos.....	10
3.2 Métodos.....	11
3.2.1 Síntese da Hidroxiapatita (HAp).....	11
3.2.2 Síntese do Fosfato de Cálcio Amorfo Carbonatado (C-ACP).....	11
3.2.3 Preparação das soluções de Quitosana e Fosfato de sódio bibásico heptahidratado.....	11
3.2.4 Preparação dos blocos cilíndricos a partir de HAp , C-ACP e QTS.....	12
3.2.5 Preparação dos blocos cilíndricos a partir de HAp , C-ACP e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12
3.2.6 Teste de desintegração das biocerâmicas.....	13
3.2.7 Caracterização das biocerâmicas.....	13
3.2.7.1 Análise de Difração de Raios-X.....	13
3.2.7.2 Espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR).....	13
3.2.7.3 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	13

3.2.7.4 Resistência Mecânica.....	14
4. RESULTDOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 Difração de raios-X: HAp ,C- ACP e amostra F ₂	15
4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	19
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura da HAp , C- ACP e das biocerâmicas.....	22
4.4 Resistência Mecânica das biocerâmicas.....	24
4.5 Teste de desintegração das biocerâmicas em água.....	25
5.CONCLUSÕES.....	26
6. REFERNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos biopolímeros quitina e quitosana.....	7
Figura 2: Fotos das biocerâmicas.....	12
Figura 3: Difractogramas da hidroxiapatita – a) 60°C e b) 900 °C.....	16
Figura 4: Difractogramas do fosfato de cálcio amorfo carbonatado – a) 80°C e b) 900 °C.....	17
Figura 5: Difractograma da amostra F ₂ (C-ACP + HAp + Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O) com simulação da hidroxiapatita.....	18
Figura 6: Espectogramas FTIR - QTS, HAp, C-ACP, Q ₁ e Q ₂	20
Figura 7: Espectogramas FTIR - HAp, C-ACP, F ₁ e F ₂	21
Figura 8: Micrografia em MEV dos pós a) HAp e b) C-ACP e das biocerâmicas c) Q ₁ , d) Q ₂ , e) F ₁ e f) F ₂	23

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das biocerâmicas.....	3
Tabela 2: Parâmetros de rede obtidos pelo método de Rietveld.....	18
Tabela 3: Bandas características dos grupos funcionais no espectro de FTIR.....	22
Tabela 4: Composição das biocerâmicas com as resistências mecânicas.....	24

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C-ACP	Fosfato de cálcio amorfo carbonatado
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
HAp	Hidroxiapatita
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
QTS	Quitosana

RESUMO

Neste trabalho foram preparados os compostos hidroxiapatita (HAp) e fosfato de cálcio amorfo carbonatado (C-ACP), pelo método de via úmida, que acontece pela precipitação dos fosfatos de cálcio em solução aquosa.

A partir destes compostos sintetizados foram preparadas as pastas de biocerâmicas na proporção de 2:1 de C-ACP e HAp, respectivamente com soluções de fosfato de sódio bibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (amostras F_1 e F_2), e solução de quitosana 4% (amostras Q_1 e Q_2). Estas pastas foram colocadas em um molde com 10mm de comprimento e 5mm de diâmetro e os blocos cilíndricos formados foram tratados a 50°C (amostras F_1 e Q_1) e 900°C (amostras F_2 e Q_2).

Os pós HAp e C-ACP e os blocos cilíndricos de biocerâmicas foram caracterizados através das técnicas de difração de raios-X, absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), resistência mecânica à compressão e também foi realizado o teste de desintegração em água das biocerâmicas.

Os raios-X dos pós de HAp e C-ACP e da amostra F_2 mostraram que com aumento da temperatura o material apresentou maior cristalinidade e também a transformação do C-ACP a hidroxiapatita. Pela espectroscopia de IV pôde-se verificar que não houve interação dos líquidos usados para fazer a pasta com os pós HAp e C-ACP, pois os espectros não apresentaram deslocamentos significativos das bandas características dos grupos funcionais PO_4^{3-} , CO_3^{2-} e OH^- desses compostos em relação às amostras. Os resultados de IV também mostraram que após o processo de sinterização algumas bandas características dos grupos funcionais desapareceram.

A análise de MEV revelou a diferença na morfologia da HAp e do C-ACP e a porosidade das amostras, onde apenas a amostra Q_2 apresentou uma superfície mais porosa. O estudo da resistência mecânica a compressão mostrou que as amostras preparadas a 50°C (F_1 e Q_1) apresentaram menor resistência mecânica em relação às amostras preparadas a 900°C (F_2 e Q_2), sendo esse aumento na resistência atribuído ao processo de sinterização.

As biocerâmicas preparadas neste trabalho oferecem possibilidades de aplicação como material biomimético ótimo para a substituição óssea em implantes nas áreas de medicina e odontologia.

1. INTRODUÇÃO

1.1) Biocerâmicas

O desenvolvimento de biomateriais cerâmicos se deve à necessidade de se obter um material artificial para a reconstrução óssea em cirurgias de correção odontológica e ortopédica, visto que nem sempre é possível realizar um implante utilizando tecidos humanos ou de animais¹.

A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a 1894 quando Dreesman relatou o uso de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) como um possível substituto para ossos. Este material apresenta uma resistência muito baixa e é completamente reabsorvido pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e degradação. Tais propriedades pouco atrativas praticamente excluíram a utilização do gesso como biocerâmica implantável.

A década de 70 marcou início do uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que possibilitam a sua classificação como biocerâmicas. A primeira biocerâmica com uso muito difundido neste período foi a alumina densa ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), que se apresenta como bioinerte. Este material devido a sua boa biocompatibilidade e elevada resistência mecânica vem sendo usado com frequência até hoje em próteses ortopédicas que substituam ossos ou parte deles que são submetidos, na sua atividade funcional, a esforços elevados².

Além da alumina densa, outras cerâmicas como a zircônia (ZrO_2), o dióxido de titânio (TiO_2), os fosfatos de cálcio e as vitro-cerâmicas de sílica/fosfato de cálcio atualmente apresentam uso difundido. O uso das biocerâmicas tem se estendido desde o emprego isolado do material até outras formas de utilização, como por exemplo, no revestimento de próteses metálicas ou na associação com materiais poliméricos, tais como o colágeno².

As biocerâmicas são também utilizadas como implantes para recuperar partes do corpo, usualmente os tecidos duros do sistema músculo-esquelético, tais como ossos ou dentes. Também pode ser incluída a aplicação de revestimento cerâmico em fibra de carbono para a substituição de válvulas do coração. Várias composições cerâmicas têm sido testadas *in vitro*, porém poucas têm sido aplicadas em estudos clínicos^{3,4}.

A escolha de um material para ser usado como biomaterial passa necessariamente pela análise de um conjunto de requisitos que devem ser encontrados. O efeito do ambiente orgânico no material (corrosão, degradação) e o efeito do material no organismo são fenômenos que devem ser estudados com extremo cuidado, pois a eles está associada a chamada "biocompatibilidade". Dentre esses dois últimos aspectos, a interação dos tecidos vivos com o biomaterial, associada com o tipo de resposta do organismo à presença do material, é o ponto mais desafiador no desenvolvimento de biomateriais.

Os tipos de interações entre tecido-implante são fundamentalmente dependentes do tipo de material e podem ser reunidos nos seguintes grupos: tóxico, não tóxico (bioinerte), bioativo e biodegradável⁵. De acordo com a Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais realizada na Inglaterra em 1986, o termo bioinerte não é adequado já que todo material induz algum tipo de resposta do tecido hospedeiro, mesmo que mínima, devendo por este motivo ser evitado. No entanto, o termo ainda é comumente utilizado, tendo sido definido por June Wilson como sendo um material que apresenta uma resposta mínima, não resultando na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro. Uma cerâmica bioativa (termo ainda aceito) é definida como aquela que induz uma atividade biológica específica. Como exemplo destas últimas destacam-se a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e os biovidros².

Outra classificação é a estabelecida por Larry Hench, na qual as cerâmicas são agrupadas em 4 classes, de acordo com a resposta desenvolvida na interface do tecido vivo/implante (Tabela 1).

Um das desvantagens apresentadas pelas biocerâmicas é a reduzida resistência mecânica, que restringe seu uso a regiões que não requeiram sustentação. Estas têm sido empregadas nas formas densas ou porosas, como indicado na Tabela 1. Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas podem favorecer o crescimento de tecido através deles, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, a resistência do material in vivo².

Tabela 1. Classificação das biocerâmicas^{2,3,6}.

Tipo de biocerâmica	Tipo de interação com os tecidos	Exemplos
Inertes	Cerâmicas densas, não porosas, inertes; conectadas por crescimento de osso dentro de irregularidade da superfície; não há interações químicas nem biológicas.	Alumina (Al_2O_3)
Porosas	Ocorre o crescimento interno dos tecidos através dos poros.	Al_2O_3 (policristalino poroso), metais porosos revestidos com hidroxiapatita.
Bioativas	Cerâmicas densas, não porosas, com superfícies reativas; ocorre uma forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, hidroxiapatita e vitro-cerâmicos
Reabsorvíveis	As cerâmicas reabsorvíveis densas, não porosas (ou porosas), são degradadas e substituídas lentamente pelos tecidos	Gesso, fosfato tricálcio(TCP) e sais de fosfato de cálcio

O grande número de artigos relacionados com as rotas de síntese têm mostrado uma profunda influência dos métodos de preparação sobre as propriedades das biocerâmicas. Entre as variáveis determinantes destas propriedades, a estequiometria, a estrutura cristalina e a porosidade são determinantes para o comportamento biológico de tais materiais. Genericamente, o preparo de uma cerâmica e, portanto, de uma biocerâmica, envolve 3 etapas fundamentais: (1) preparo do pó; (2) secagem parcial do bloco conformado e (3) aquecimento a altas temperaturas para obtenção do bloco sinterizado.

Após a síntese, as partículas do pó são moldadas na forma desejada, por compactação a altas pressões ou umectação do pó e posteriormente submetendo-se à sinterização a temperaturas elevadas. Outra alternativa é a compactação sob pressão e

aquecimento de maneira simultânea. Durante a última etapa do processo de obtenção de cerâmicas, o aquecimento do material a altas temperaturas, leva a fusão superficial das partículas do pó, fazendo com que elas aglomerem e formem um bloco sólido e denso. No entanto, este procedimento resulta em cerâmicas com poros da ordem de alguns μm , dimensão pouco interessante para materiais utilizados em implantes ósseos².

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro. Tais características positivas podem ser explicadas pela natureza química destes materiais que por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico ente fluido biológico e a cerâmica.

Uma forma conveniente de classificar os vários fosfatos de cálcio é através de sua razão molar Ca/P. Vários fosfatos de cálcio que possuem razão variando de 0,5 a 2,0 podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons cálcio e fosfato, sob condições alcalinas ou ácidas. Estes fosfatos podem ser transformados em cerâmicas biocompatíveis e osteocondutoras, isto é, com capacidade para fazer com que o crescimento ósseo ocorra sobre a superfície e através dos poros do material².

Biocerâmicas a base de fosfato de cálcio têm sido usadas na medicina e na odontologia há aproximadamente 20 anos. Aplicações incluem implantes dentários, dispositivos percutâneos, uso em tratamento peridental, aumento de ruga alveolar, ortopédicos, cirurgia maxilofacial, otorrinolaringologia e cirurgia espinal. As diferentes fases de biocerâmicas de fosfato de cálcio que são usadas dependem do material desejado, reabsorvível ou material bioativo^{7,8}.

1.2) Hidroxiapatita (HAp)

A pesquisa em torno da síntese dos compostos de fosfatos de cálcio tomou grande impulso quando se percebeu que a hidroxiapatita (HAp) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, razão Ca/P 1,67, um dos mais importantes representantes destes compostos, está presente em quantidades substanciais no tecido mineralizado de ossos e dentes dos vertebrados e 60-70% da fase mineral do osso humano^{9,10}.

As apatitas biológicas, as quais estão presentes na fase mineral dos tecidos calcificados como esmalte, dentina e ossos, diferenciam-se um pouco em estequiometria, composição, cristalinidade, propriedades físicas e mecânicas da hidroxiapatita pura¹¹.

Para explicar os processos de biossíntese do osso tentou-se sintetizar a HAp em laboratório. A partir de então métodos de síntese de vários compostos de fosfato de cálcio começaram a ser desenvolvidos. Não demorou muito e ficou claro que o material obtido apresentava grande semelhança com aquele encontrado no osso e tinha um enorme potencial para a utilização como auxiliar na regeneração^{9,10}.

De Jong foi o primeiro a observar a semelhança entre os padrões de difração de raios-X da fase mineral do osso e da hidroxiapatita, em 1926. Entretanto, a fase mineral dos ossos não possui uma composição muito bem definida, além de mostrar variações durante os estágios de maturação e envelhecimento dos tecidos duros. Sua estrutura cristalina e razão Ca/P, no entanto, assemelha-se às da hidroxiapatita, apresentando ainda a presença dos íons Na⁺, Mg²⁺, CO₃²⁻, citratos e, em menores quantidades, K⁺, Cl⁻ e F⁴⁻. Levando-se em consideração apenas os elementos principais, a composição da fase mineral pode ser representada pela fórmula abaixo da apatita contendo vacâncias iônicas⁷:



Onde \square representa uma vacância.

A hidroxiapatita (HAp) tem sido estudada como material para implantação óssea e sua excelente bioatividade e osteocondutividade tem sido claramente estabelecida. Entretanto, a implantação de HAp é somente possível em situações de baixas tensões ou apenas de tensões de compressão¹². O uso clínico da hidroxiapatita é limitado devido a sua lenta biodegradação. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a HAp começa a ser reabsorvida após 4 ou 5 anos de implante. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais os processos de degradação são concomitantes com a reposição do osso em formação².

Pós de HAp geralmente são sintetizados a partir de soluções aquosas para uso em aplicações biocerâmicas. É conhecido que hidroxiapatita de cálcio é a menos solúvel e o composto mais estável das fases de fosfato de cálcio em soluções aquosas em valores de pH

maiores que 4,2. Esta tem sido usualmente preparada em meio altamente alcalino para assegurar a estabilidade térmica e a pureza da fase dos pós resultantes da sinterização em temperatura elevada (1100-1300°C).

Para implantes ósseos ou dentários, duráveis por muitos anos, utiliza-se um material pouco solúvel, constituído por HAp pura. Quando se deseja que o implante seja reabsorvido pelo corpo, cedendo lugar ao tecido ósseo novo, usa-se uma cerâmica mais solúvel, geralmente constituída por uma mistura de hidroxiapatita com outros fosfatos⁷.

Nos últimos anos pesquisas têm demonstrado que as utilidades da HAp se estendem para outras áreas de grande interesse. Sua utilização como suporte na cromatografia de coluna para a separação de diversas proteínas, remoção de metais como Cd, Pb, Cu, Mn, Al e Ni e também vem sendo pesquisada a possibilidade de ser usada como catalisador para tratamento de gases tóxicos antes que atinjam atmosfera⁹.

1.3) Fosfato de Cálcio Amorfo Carbonatado (C-ACP)

A parte mineral dos tecidos calcificados é constituída por um de fosfato de cálcio apatítico carbonatado que tem a particularidade de apresentar simultaneamente os íons HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} . Apesar da síntese das apatitas carbonatadas serem bem conhecidas, poucos métodos permitem prepará-las.

Essas apatitas apresentam uma composição química comparável àquela dos ossos. Esses compostos possuem uma grande importância, pois são suscetíveis para serem utilizados como biomateriais de substituição óssea¹³.

O fosfato de cálcio amorfo (ACP), é um fosfato altamente solúvel. É um importante intermediário na formação da hidroxiapatita (HAp), seu potencial como aditivo para remineralização deve-se primeiramente porque é um precursor da fase hidroxiapatita, tendo biocompatibilidade tanto com os tecidos duros e moles, comparável com a HAp e/ou vários fosfatos di tri e tetra de cálcio¹⁴.

O fosfato de cálcio amorfo pode ser utilizado para curar cáries incipientes, expulsando íons cálcio e fosfato em proporções adequadas, podendo formar o mineral das estruturas dentárias. Também pode ser utilizado em hipersensibilidade dentária e alguns problemas ósseos¹⁵.

1.4) Quitosana

A quitosana, QTS, β -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, é o derivado mais importante da quitina β -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose. A quitina é um polímero natural extraído das cascas de crustáceos tais como camarão, siri, caranguejo e lagosta. Pode ser encontrado também em cascas de alguns insetos tais como baratas, besouros e alguns fungos⁷. A Figura 1 mostra as estruturas químicas da quitina e quitosana.

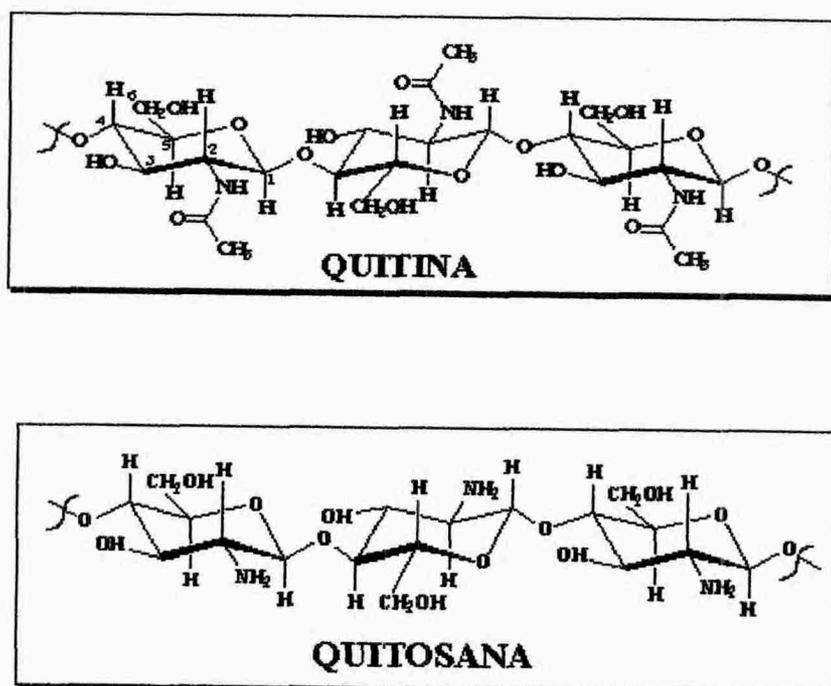


Figura 1 : Estrutura dos biopolímeros quitina e quitosana

A quitosana é a forma N-desacetilada da quitina que é obtida depois de tratamento da quitina com NaOH 50% a quente¹⁶. A quitina ao ser transformada em quitosana modifica suas propriedades, onde a QTS é insolúvel em água e solúvel na maior parte dos ácidos orgânicos, como ácido acético e inorgânicos como ácido clorídrico¹⁷.

A quitosana possui muitas aplicações tecnológicas e é utilizada, por exemplo, no tratamento de efluentes industriais devido à sua facilidade de interagir com as partículas

coloidais e devido também à presença de grupos amino em suas cadeias, o que confere a esse polímero um potencial de coagulação maior que o dos coagulantes usuais¹⁸. Ela também tem sido bastante utilizada na medicina, odontologia e farmacologia como biomateriais, pois é um polímero biocompatível, atóxico e biodegradável, além de possuir inúmeras propriedades biológicas¹⁹.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento de biocerâmicas a partir da mistura bifásica de fosfatos de cálcio com possível aplicação em medicina e odontologia.

2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar a hidroxiapatita (HAp), pelo método de via úmida, através de precipitação de sais de cálcio e fosfato em meio básico.
- Sintetizar o fosfato de cálcio amorfo carbonatado (C-ACP) pelo método de via úmida.
- Preparar as pastas de biocerâmicas a partir dos pós de HAp e C-ACP e uma solução de quitosana 4%.
- Preparar as pastas de biocerâmicas a partir dos pós de HAp e C-ACP e uma solução de fosfato de sódio 0,2 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- Preparar os blocos cilíndricos a partir das pastas de biocerâmicas.
- Fazer o teste de desintegração das biocerâmicas em água.
- Caracterizar HAp, C-ACP e as biocerâmicas através das técnicas de difração de raios-X, absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), resistência mecânica a compressão .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Equipamentos

3.1.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes para a preparação das biocerâmicas: Nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - Nuclear, Fosfato de amônio dibásico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ - Nuclear, Hidróxido de amônio (NH_4OH) - Nuclear, Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - Reagen, Fosfato de sódio bibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - Nuclear, Hidróxido de sódio (NaOH) - Nuclear, Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) - Vetec, Difosfato tetrasódico $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ – Resimapi e Quitosana – Purifarma . Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

3.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a preparação das biocerâmicas foram:

Balança analítica marca Shangping Eletronic Balance, modelo FAI 6045, Espectrofotômetro de Infravermelho Perkin Elmer FTIR, Aparelho de Microscopia Eletrônica de Varredura, marca Philips, modelo XL30 do Laboratório de Materiais (LabMat) do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC, Incubadora Minishaker, marca Marconi, modelo MA 832, Mufla Jung, modelo 0912, Aparelho de Difração de raios-X, Rigaku-Miniflex, do Departamento de Física, Máquina de Ensaio para medir Resistência Mecânica , marca 3M, modelo Instron 4444 do Departamento de Odontologia .

3.2. Métodos

3.2.1. Síntese da Hidroxiapatita (HAp)²⁰

Foram misturados 0,152 mol de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 0,090 mol de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e dissolvidos em água destilada. Em seguida, adicionou-se 340 ml de NH_4OH 25% na solução opaca, a reação foi aquecida a uma temperatura de 65°C sob vigorosa agitação. Posteriormente o béquer foi tampado, a solução foi aquecida até o ponto de fervura e após duas horas de fervura a solução foi deixada esfriar em temperatura ambiente. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco para obter o produto.

Reação esperada:



3.2.2. Síntese do Fosfato de Cálcio Amorfo Carbonatado (C-ACP)²¹

Foram misturados e dissolvidos em água, 0,182 mol de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 0,0105 mol de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ formando a solução A. Em outro recipiente foram misturados 0,387 mol de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,25 mol NaOH , 0,357 mol NaHCO_3 e 0,00752 mol $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ em água, formando a solução B. Em seguida as soluções A e B foram misturadas e foi obtido um precipitado branco. Este foi lavado até atingir o pH 8 e seco para obter o produto.

3.2.3. Preparação das Soluções de Quitosana (QTS) e Fosfato de sódio bibásico heptahidratado $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Foi preparada uma solução dissolvendo-se sob agitação 4g de quitosana em 100 ml de ácido acético 5% (v/v) até a completa homogeneização, resultando em uma solução viscosa com aproximadamente 4% (m/v) de quitosana.

A solução de fosfato de sódio bibásico heptahidratado $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi preparada com uma concentração de 0,2 molar.

3.2.4. Preparação dos blocos cilíndricos de biocerâmica a partir de HAp , C-ACP e QTS.

A pasta foi preparada em uma proporção de 2:1 em peso de C-ACP : HAp com uma solução de QTS 4% . A pasta formada foi colocada em um molde de 10 mm de comprimento por 5 mm de diâmetro, em seguida os blocos cilíndricos de biocerâmicas foram retirados do molde e tratados nas temperaturas de 50°C por 2 horas e sinterizados a 900°C por uma hora, sendo chamadas então estas amostras de Q₁ e Q₂ respectivamente.

3.2.5. Preparação dos blocos cilíndricos de biocerâmica a partir de HAp , C-ACP e Na₂HPO₄.7H₂O.

A pasta foi preparada na mesma proporção que a anterior, porém o líquido usado para formar a pasta foi uma solução de Na₂HPO₄.7H₂O 0,2M. O molde e o tratamento térmico foram os mesmos. Estas amostras foram chamadas de F₁ e F₂.

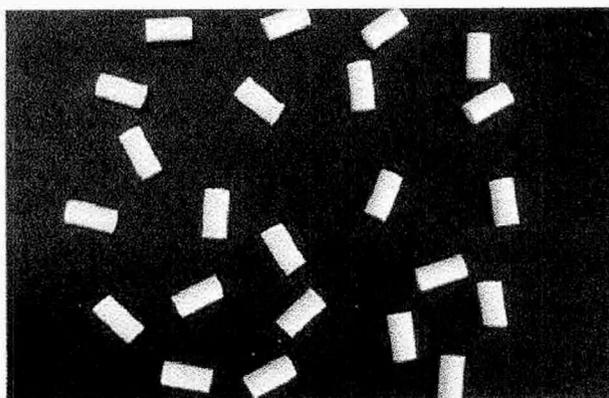


Figura 2: Foto das biocerâmicas

3.2.6. Teste de desintegração para as amostras F_1 , F_2 , Q_1 e Q_2 em água.

As amostras das biocerâmicas foram colocadas em água por um período de 24hs, 48hs e 168hs. O objetivo deste teste foi simular o ambiente fisiológico, utilizando a água, para observar se as biocerâmicas seriam desintegradas, visando assim o implante. A observação foi feita pesando-se as amostras até peso constante.

3.2.7. Caracterização das biocerâmicas

3.2.7.1 Análise de Difração de Raios-X

A análise foi feita no Laboratório do Departamento de Física da UFSC, com a supervisão do prof. Dr. João Cardoso e prof. Dr. Kleber D. Machado, onde analisou-se os pós de partida HAp, C-ACP e a amostra F_2 , o qual foram examinados com o Rigaku-Miniflex usando radiação ($K\alpha$) da lâmpada Cu ($\lambda = 1,5418\text{\AA}$). As análises foram feitas para observar quais as fases presentes no material.

3.2.7.2 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho com FTIR foram obtidos na de 4000 a 400 cm^{-1} , das amostras na forma de pó a qual foram misturadas com KBr de grau espectroscópico (Infravermelho Perkin Elmer FTIR). Os espectros de absorção no infravermelho podem ser usados para a identificação de compostos puros ou para a detecção de impurezas.⁷

3.2.7.3. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises dos pós HAp e C-ACP e das biocerâmicas utilizando o MEV do Laboratório de Materiais (LabMat da UFSC), foram feitas para determinar a porosidade e morfologia do material. Estas amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro para poder efetivar as análises microscópicas.

3.2.7.4 Teste de Resistência Mecânica

O teste de Resistência Mecânica a foi realizado no Laboratório do Departamento de Odontologia da UFSC, com a supervisão do prof. Dr. Luiz Henrique M. Prates, utilizando o equipamento da 3M, Instron 4444. Neste aparelho foi medida a resistência de compressão em Newtons (N), numa velocidade de 1mm/min., sendo essa força transformada em Mega Pascal (MPa).

O teste teve como objetivo medir a carga máxima suportada pelas biocerâmicas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Difração de Raios- X

Esta técnica foi utilizada para comprovar se as fases presentes nos compostos sintetizados eram hidroxiapatita e fosfato de cálcio amorfo carbonatado. Uma boa resolução do sinal (pico) no difratograma com larguras de linha estreitas são características de materiais cristalinos, ao passo que materiais amorfos não difratam, somente espalham a radiação.

A Figura 3a mostra o padrão de raios-X medido para HAp preparada a 60°C. Essa medida foi simulada pelo método de Rietveld²² considerando-se a fase hidroxiapatita descrita no cartão JCPDS – 730294 e ICSD – 22060 e os dados estruturais obtidos podem ser vistos na Tabela 2. Através da análise do difratograma pode-se observar que a hidroxiapatita é a única fase cristalina presente na amostra, não apresentando assim as fases contaminantes como β -TCP e CaO que podem ser formadas durante o processo de fabricação da HAp. As diferenças dos parâmetros de rede, diminuição do parâmetro a e aumento do parâmetro c , da hidroxiapatita em relação a HAp do cartão (Tabela 2) são usualmente associados a contaminação da HAp com CO_3^{2-} . Essa contaminação pode ser confirmada através do IV (seção 4.2).

A Figura 3b mostra a HAp sinterizada a 900°C por uma hora. Após o processo de sinterização a cristalinidade aumenta e a fase hidroxiapatita continua sendo a única presente na amostra, não apresentando assim contaminação por β -TCP e CaO. Os parâmetros de rede obtidos são mostrados na Tabela 2, destacando-se os parâmetros de rede a, b, c e os tamanhos dos cristalitos.

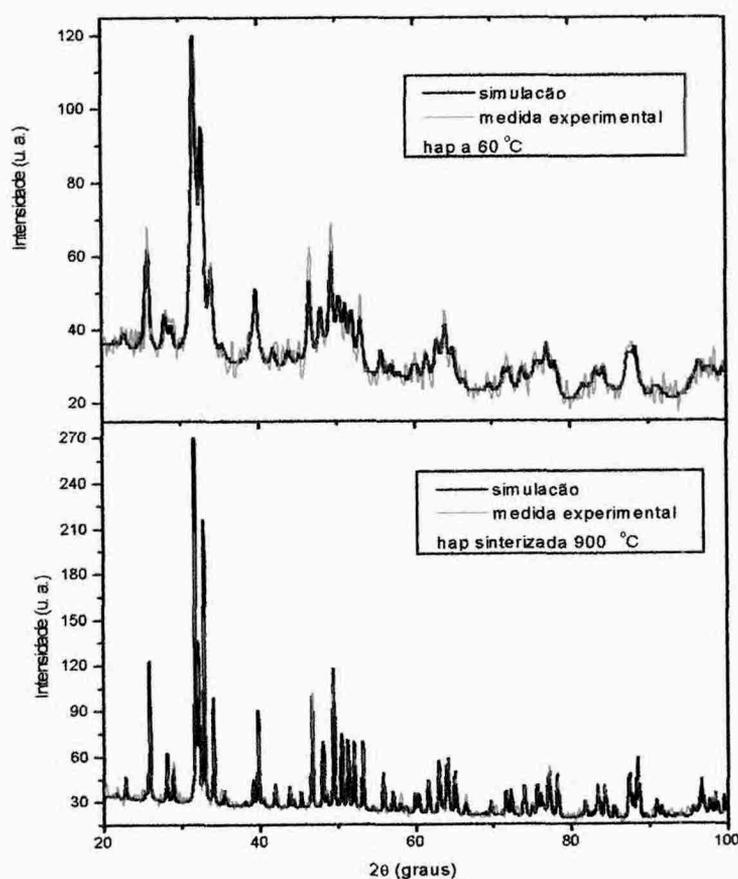


Figura 3: Difratoograma da hidroxiapatita: a) 60°C e b) 900°C

A Figura 4a mostra o padrão de raios-X medido para o C-ACP preparado a 80°C, que é muito similar ao mostrado na fig.3a da HAp. Essa medida também foi simulada pelo método de Rietveld²² e apresenta a hidroxiapatita como a principal fase e uma fase amorfa em menor quantidade formada pelo fosfato de cálcio amorfo carbonatado que está encoberta no ruído de fundo. Através dos parâmetros de rede mostrados na tabela 2, pode-se observar um decréscimo do parâmetro a e um aumento do parâmetro c do C-ACP em relação a HAp do cartão. Essa mudança pode ser explicada pelo fato do C-ACP ser preparado com reagentes contendo íons CO_3^{2-} , o que causa a substituição dos íons PO_4^{3-} por CO_3^{2-} . As bandas de carbonato são confirmadas através do IV (seção 4.2).

A Figura 4b do C-ACP sinterizado a 900°C por uma hora, que é similar a fig 3b, mostra o crescimento da fase hidroxiapatita e o aumento da cristalinidade. Os parâmetros

de rede estruturais são mostrados na Tabela 2. Observa-se que nesta amostra já não existe mais a fase amorfa fosfato de cálcio amorfo carbonatado. Através da simulação pelo método de Rietveld²² utilizando a hidroxiapatita a 900°C como mostrado na Fig. 4b, pôde-se observar que o método de preparação do fosfato de cálcio amorfo carbonatado (C-ACP) seção 3.2.2, produziu uma hidroxiapatita muito mais cristalina do que a preparada pelo método mostrado na seção 3.2.1. Este resultado representa uma importante contribuição para a continuidade deste trabalho e geração de tecnologias inovadoras na área de biomateriais.

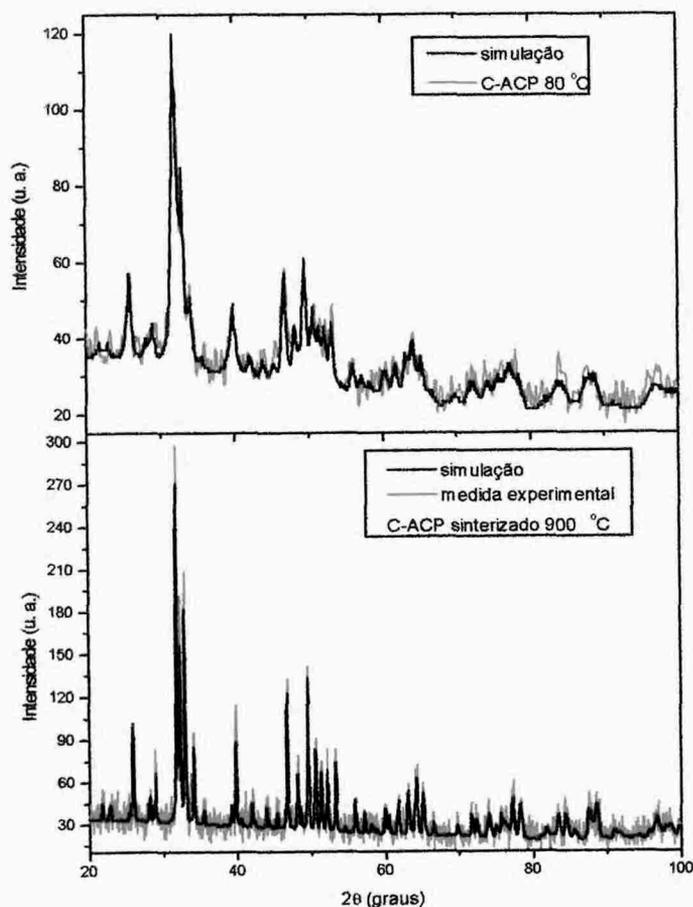


Figura 4: Difratoograma do fosfato de cálcio amorfo carbonatado : a) 80°C e b) 900°C

Figura 5 mostra o padrão de difração de raios-X medido para a amostra F₂ produzida com HAp + C-ACP + NA₂HPO₄·7H₂O a 900°C por uma hora. Através do método de Rietveld²² foi feita a simulação com a hidroxiapatita a 900°C, o qual observa-se

na Figura 5 que a amostra após o tratamento térmico apresentou uma única fase como sendo a hidroxiapatita, comprovando então que o fosfato de cálcio amorfo carbonatado transformou-se em HAp quando sinterizado.

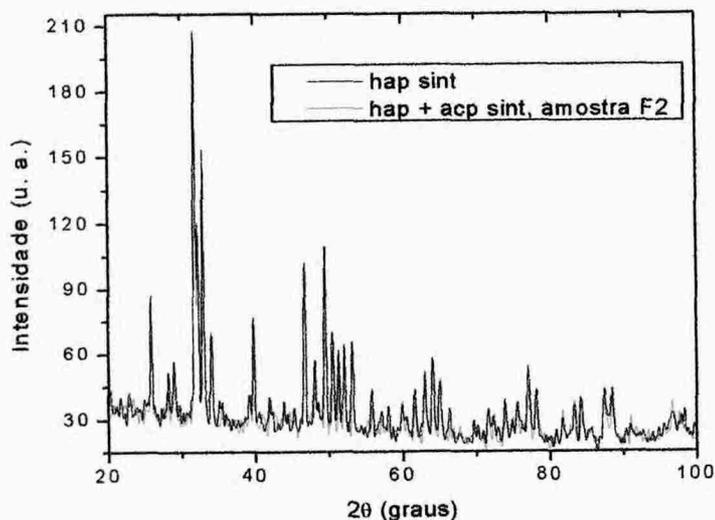


Figura 5: Difratograma da amostra F₂ (HAp + C-ACP + Na₂HPO₄) com hidroxiapatita na simulação

Tabela 2: Parâmetros de Rede obtidos pelo método de Rietveld²²

Amostra	a = b (Å)	c (Å)	Cristalito (Å)
HAp do cartão	9.432	6.881	-----
HAp	9.4207	6.8898	164
HAp sinterizada	9.4236	6.8847	536
C-ACP	9.4023	6.8877	322
C-ACP sinterizado	9.4213	6.8731	467
F ₂	9.4241	6.8825	561

4.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A caracterização da HAp, C-ACP, QTS e das amostras de biocerâmicas F₁, F₂, Q₁ e Q₂ foram monitoradas por espectroscopia na região do infravermelho, onde estas amostras foram analisadas na forma de pastilhas com KBr.

A Figura 6 mostra os espectros de IV da QTS, HAp, C-ACP, Q₁ e Q₂. No espectro IV da QTS (Fig. 6^a), pode-se observar na região próxima a 3426 cm⁻¹ uma banda característica referente às vibrações de estiramento do grupo OH das hidroxilas, aparece também em 2878 cm⁻¹, uma banda atribuída ao estiramento C-H, em 1658 cm⁻¹ aparece uma banda de estiramento C=O da amida I e próxima a 1591 cm⁻¹ observa-se uma banda que é atribuída à deformação NH₂.

O espectro de IV da HAp, mostrado na Fig. 6b é típico de hidroxiapatita carbonatada, onde ocorre a substituição nos sítios de fosfato por carbonato. As bandas referentes aos modos vibracionais do carbonato que aparecem em 1420 e 1453 e próximos a 870 cm⁻¹, não deveriam aparecer, pois na síntese da hidroxiapatita não foi utilizado nenhum precursor de CO₃²⁻, sendo que a presença desse íon carbonato pode ser atribuída a contaminação dos reagentes ou também pode vir do ar. Porém esse carbonato não é indesejável, pois a hidroxiapatita biológica é constituída por carbonato. As vibrações de estiramento dos íons OH⁻ da hidroxila que aparecem ~ 3573 cm⁻¹ estão encobertas pela banda larga 3447cm⁻¹ de moléculas de água que podem estar livres ou adsorvidas, aparece também uma banda de H₂O em 1639 cm⁻¹. O espectro mostra também os modos vibracionais do grupo fosfato PO₄³⁻ que são mostrados através das vibrações de estiramento como um pequeno ombro em ~ 967 cm⁻¹ e uma banda mais definida em 1035 cm⁻¹ e vibrações de deformação em 603 e 567 cm⁻¹ e aparece uma pequena banda referente ao PO₄³⁻ em 470 cm⁻¹. O estiramento P-O aparece como um ombro em 1095 cm⁻¹.

A Fig. 6c mostra o espectro do C-ACP, as bandas que aparecem em 3454 e 1645 cm⁻¹ são bandas características de moléculas de água estruturais ou adsorvidas na amostra, as bandas que aparecem 1036cm⁻¹ e um ombro em 967cm⁻¹ são atribuídas a vibrações de estiramento do PO₄³⁻, de forma que as bandas que aparecem em 604 cm⁻¹ e 567cm⁻¹ são atribuídas a vibrações de deformação do PO₄³⁻, aparece também uma banda menor do PO₄³⁻ 470 cm⁻¹. O estiramento P-O é mostrado através de um pequeno ombro em 1095

cm^{-1} . O espectro mostrou também as bandas referentes aos modos vibracionais do carbonato CO_3^{2-} que aparecem em 873, 1418 e 1464 cm^{-1} . As Figuras 6d e 6e, são os espectros de IV das amostras $Q_1(50^\circ\text{C})$ e $Q_2(900^\circ\text{C})$. Através dos espectros pode-se observar que as bandas referentes às vibrações de estiramento do PO_4^{3-} aparecem 967 e 1037 cm^{-1} e as vibrações de deformação aparecem 567 cm^{-1} e 604 cm^{-1} , e uma pequena banda do PO_4^{3-} 470 cm^{-1} , ~ 1100 uma vibração do P-O. Os modos vibracionais do CO_3^{2-} aparecem próximo a 873, 1420 e 1461 cm^{-1} e as bandas de H_2O que aparecem em 3444 e 1643 cm^{-1} na amostra Q_1 estão todas presentes na HAp e C-ACP. Analisando os espectros, verifica-se que as bandas de quitosana não aparecem, pois essa está numa quantidade muito pequena que não interagiu com os grupos funcionais dos fosfatos HAp e C-ACP. Na amostra Q_2 as vibrações de estiramento dos íons OH aparecem um pouco mais definidas em 3569 cm^{-1} , possui também uma banda adicional de OH vizinhas as bandas dos íons fosfato em 633 cm^{-1} , de acordo com outros trabalhos esta banda é somente observada em hidroxiapatitas cristalinas. As bandas referentes ao do íon CO_3^{2-} desaparecem devido ao processo de sinterização e também verificou-se uma redução da banda larga de H_2O 3440 cm^{-1} .

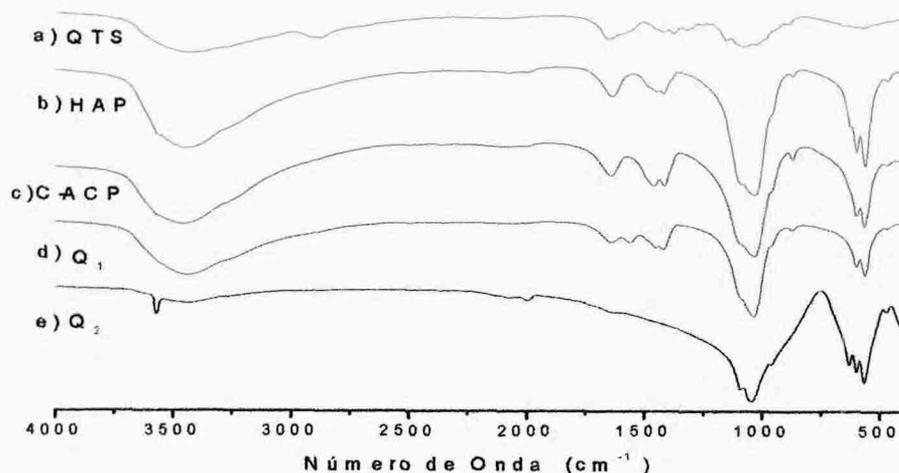


Figura 6: Espectrogramas de FTIR: QTS, HAp, C-ACP, Q_1 e Q_2

A Figura 7 mostra os espectros de IV da HAp, C-ACP, F₁ e F₂. As bandas características dos grupos funcionais da HAp Fig. 7a e C-ACP Fig. 7b já foram mencionadas no espectro anterior. O espectro da amostra F₁ Fig. 7c mostra os grupos funcionais pertencentes a HAp e C-ACP que são do fosfato onde as bandas aparecem em 470, 567, 603 e 967, e 1036 cm⁻¹, um ombro ~ 1100 cm⁻¹ P-O, CO₃²⁻ 870, 1420 e 1459 cm⁻¹, as bandas de água em 1644 e 3448 cm⁻¹ verifica-se que não há interação química com o fosfato de sódio heptahidratado Na₂HPO₄·7H₂O que foi usado como um “acelerador” no endurecimento da pasta.

No espectro da Fig. 7d aparece a amostra sinterizada a 900°C F₂, onde mostra o desaparecimento das bandas de carbonato e o aparecimento da banda da hidroxila em 3568 cm⁻¹ que estava encoberta pela H₂O e também o aparecimento de uma banda do íon OH⁻ em 633 cm⁻¹.

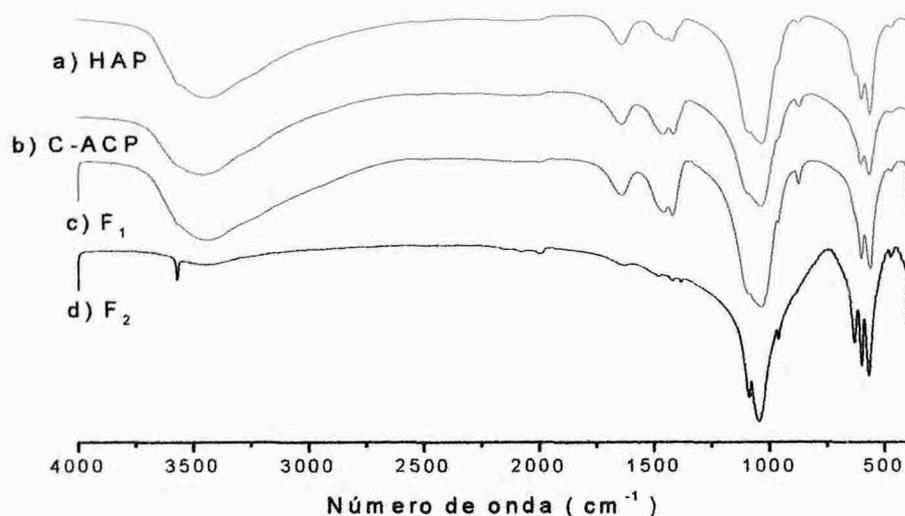


Figura 7: Espectrogramas de FTIR: HAp, ACP, F₁ e F₂

Tabela 3: Bandas características dos grupos funcionais no espectro de FTIR

Número de onda (cm ⁻¹)					
Amostras	Amino	PO ₄ ³⁻	CO ₃ ²⁻	OH	H ₂ O
QTS	2878;1654; 1590;	-	-	3426	-
HAp	-	470;567;603;967; 1035; 1095;	870; 1420; 1453	3575	1639;3447
C-ACP	-	470;567;604;967; 1036; 1095;	873; 1418;1464	-	1645;3454
Q1	-	470;567;604;967; 1037;1100	873; 1420;1461	Encoberta pela água	1643;3444
Q2	-	470;569;602;967; 1047;1100	-	633; 3569	3440
F ₁	-	470;567;603;967; 1036;1100	873; 1420;1459	Encoberta pela água	1644;3448
F2	-	468;570;601;965; 1047;1095	-	3568; 633	3446

4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta técnica permite que as superfícies de materiais sólidos sejam analisadas com relação à sua morfologia e porosidade.

As micrografias 8a e 8b mostram as morfologias dos pós de fosfato de cálcio amorfo carbonatado (80°C) e de hidroxiapatita (60°C). A morfologia do C-ACP mostra uma maior irregularidade na distribuição e tamanho dos cristais, enquanto que da HAp mostra uma distribuição melhor e os tamanhos dos cristais são mais uniformes.

Como visto na seção 4.1 (Figura 4a) a fase principal que aparece no difratograma do fosfato de cálcio amorfo carbonatado é a hidroxiapatita, porém observando as micrografias estes possuem morfologias diferentes, mostrando então a presença de uma pequena

quantidade de fase de C-ACP. As micrografias 8c e 8d mostram a superfície fraturada das amostras de biocerâmica Q_1 e Q_2 . A amostra Q_1 com poucos poros observando a micrografia 8c e a amostra Q_2 conforme a micrografia 8d, apresentou uma superfície porosa com tamanho de poros de 1,48 a 10,8 μm . Esta porosidade está relacionada com o processo de sinterização, pois a quitosana usada para fazer a pasta se decompõe a temperaturas maiores formando então poros na biocerâmica.

Analisando a micrografia 8e da amostra F_1 verifica-se que esta apresenta uma superfície pobre em poros e a micrografia 8f amostra F_2 aprecem pequenos poros.

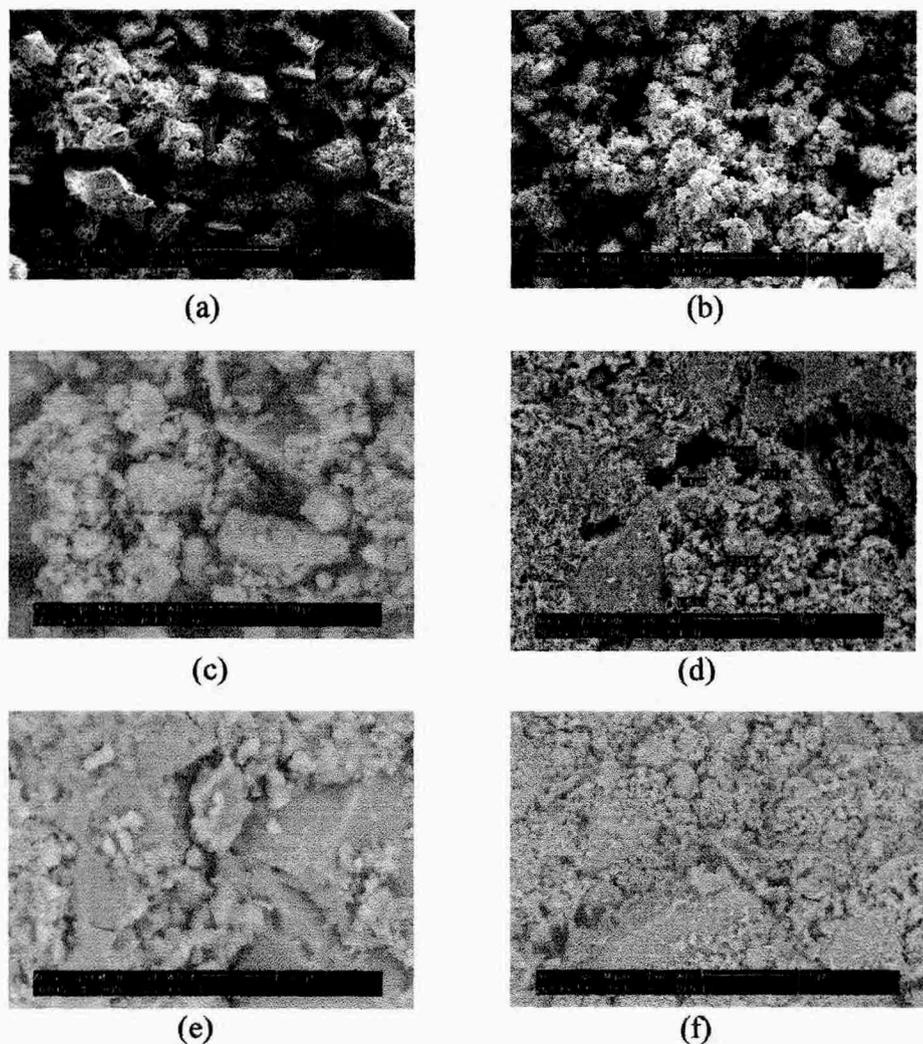


Figura 8: Micrografia em MEV dos pós a) C-ACP e b) HAP e das amostras c) Q_1 , d) Q_2 , e) F_1 e f) F_2

4.4. Resistência Mecânica a compressão das Biocerâmicas

Esta técnica foi utilizada para medir a carga máxima em mega Pascal que as biocerâmicas agüentavam. A amostra $F_1(50^\circ\text{C})$ apresentou uma resistência mecânica baixa 1,34 MPa comparando com a amostra sinterizada $F_2(900^\circ\text{C})$ cuja resistência mecânica foi de 27,5 MPa. A amostra $Q_1(50^\circ\text{C})$ apresentou uma resistência mecânica mais elevada 4,11MPa em relação a $F_1(50^\circ\text{C})$, pois possui em sua composição o polímero quitosana o qual lhe confere essa maior resistência. Porém a amostra Q_1 apresentou resistência mecânica mais baixa em relação à amostra Q_2 sinterizada a 900°C cuja resistência é 23,0 MPa. Essa resistência diminuiu um pouco comparando com a amostra F_2 também sinterizada, isto se deve a quitosana que esta presente somente na amostra Q_2 que ao ser sinterizada esta quitosana se decompõe formando poros, como visto na seção 4.3 (fig.8d), onde estes poros fazem com que a resistência mecânica diminua. Na amostra F_2 como não tem quitosana a sinterização fez com que o produto ficasse mais denso.

A grande diferença na resistência mecânica das amostras sinterizadas F_2 e Q_2 em relação às não sinterizadas F_1 e Q_1 deve-se ao aumento da fase cristalina e também ao processo de sinterização, onde neste processo as pequenas partículas de um material se ligam entre si por difusão no estado sólido. O tratamento térmico resulta na transformação de um compactado poroso num produto resistente e denso, com isso o material sofre algumas alterações como redução da área superficial, redução do volume aparente total e aumento da resistência mecânica.

Tabela 4 : Composição das biocerâmicas com as resistências mecânicas

Amostras	Composição	Resistência Mecânica (MPa)
$F_1(50^\circ\text{C}/2\text{hs})$	C-ACP+HAp+ Na_2HPO_4	1,34
$F_2(900^\circ\text{C}/1\text{h})$	C-ACP+HAp+ Na_2HPO_4	27,5
$Q_1(50^\circ\text{C}/2\text{hs})$	C-ACP+HAp+QTS	4,11
$Q_2(900^\circ\text{C}/1\text{h})$	C-ACP+HAp+QTS	23,0

4.5 Teste de Desintegração das biocerâmicas em água

Este teste foi realizado para observar a desintegração das biocerâmicas em H₂O nos intervalos de 24, 48 e 168hs. As amostras F₁ e Q₁ preparadas em baixa temperatura apresentaram uma pequena desintegração durante os sete dias, desintegraram 10% no máximo o qual essa percentagem foi atingida em 60-70hs, logo após esse tempo a desintegração permaneceu constante.

Porém as amostras que foram tratadas a 900°C F₂ e Q₂ não apresentaram desintegração quando deixadas em água por sete dias. Visando o implante em locais submetidos a grande esforço mecânico e que não deseja-se uma reabsorção rápida do material estas biocerâmicas sinterizadas e íntegras em água apresentaram ótimas propriedades para serem implantadas.

5. CONCLUSÕES

Através deste trabalho pôde-se concluir que:

A técnica de difração de raios-X em amostras pulverizadas é fundamental para caracterizar todas as fases presentes no material e também o grau de cristalinidade deste.

O método de preparação do fosfato de cálcio amorfo carbonatado (C-ACP) produziu uma hidroxiapatita (HAp) de maior cristalinidade, do que o método convencional de produzir a hidroxiapatita.

O infravermelho foi uma boa técnica para comprovar as bandas características do material e também para mostrar o desaparecimento de algumas bandas após o processo de sinterização.

Através dos valores da resistência mecânica e do teste de desintegração, pôde-se observar que as biocerâmicas de menor resistência mecânica e que desintegraram um pouco têm a possibilidade de serem implantadas na forma de pasta, onde se deseja uma reabsorção mais rápida do material. Já as biocerâmicas sinterizadas apresentaram maior resistência e não desintegraram, mostrando assim a possibilidade de serem implantadas em locais que sejam submetidos a cargas maiores.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ogawa, C. A., Plepis, A. M. G., Liberação de Ciprofloxacina em Compósito Hidroxiapatita: Colágeno. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* 17(3) , p. 123-130, 2001.
2. Kawachi E.Y., Betran C., Reis dos R.R. e Alves O. L. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. *Química Nova* 23 (4), p. 518-522, 2000.
3. Hench L. L. and Ethridge E. C. In *Biomaterials; An Interfacial Approach*. Academic Press. New York, p. 3, 1982.
4. Hulbert S.F., Bokros J.C., Hench L. L., Wilson J., and heimke G. *Ceramics in Clinical Applications: Past, Present, and Future*; p. 189-213 In *High Tech. Ceramics*, edited by P. Vincenzini Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1987.
5. Pereira A. P. V., Vasconcelos W. L. e Oréfice R.L. Novos Biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 9, p.104-109, 1999.
6. Hench, L.L. Bioceramics: from Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.*, 74, n 7, p.1487-1510, 1991.
7. Finisie, M.R., Preparação de Pastas de Biocerâmicas a partir de Fosfatos de Cálcio e Quitosana aplicáveis em osteointegração, 2001, Dissertação(Mestre em Química)- Departamento de Química – UFSC- Florianópolis.
8. Finisie, M.R., Atche, J., Fávere, V.T., Laranjeira, M.C.M. Synthesis of Calcium-Phosphate and Chitosan Bioceramics for Bone Regeneration. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 73(4), p. 525-532, 2001.
9. Fernandes, G.F., Biomateriais de Fosfato de Cálcio Sintetizados por Vias Úmidas e Hidrotérmica, 2001, Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química – UFSC – Florianópolis.
10. Fernades, G.F., Laranjeira, M.C.M. Calcium Phosphate Biomaterials from Marine Algae. Hydrothermal Synthesis and Characterisation. *Química Nova* 23(4), p. 441-446, 2000.

11. Bayraktar, D., Tas, A. C. Chemical Preparation of Carbonated Calcium Hydroxyapatite Powders at 37°C in Urea-containing Synthetic Body Fluids. *Journal of the Ceramic Society* 19, p.2573-2579, 1999.
12. Rigo, E.C.S., Oliveira, L.C., Santos, L. A . Boschi e A.O., Carrodegua, R.G. Implantes Metálicos Recobertos com Hidroxiapatita. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* 15(1-2) , p. 21-29, 1999.
13. Dabbarh, F., Lebugle, A., Taitai, A., Bennani, M. Influence de Séchage Sur La Composition de Phosphates de Calcium Carbonatés, Analogues Osseux. *Ann. Chim. Sci. Mat*, 25, p. 339-348, 2000.
14. Park, M.S., Eanes, E.D., Antonucci, J.M., Skrtic, D. Mechanical Properties of Bioactive Amorphous Calcium Phosphate/ Methacrylate Composites. *Dent Mater*, 14, p. 137-141, 1998.
15. Disponível em: <http://www.webodontologica.com/> Arquivo pesquisado em 8 de janeiro de 2004.
16. Knaul, J. Z. , Hudson, S. M., Creber, K. M. . Improved Mechanical Properties of Chitosan Fibers. *Journal of Applied Polymer Science* 72, p.1721-1732, 1999.
17. Mathur, N.K., Narang, K.C., Versatile Polyssacharides from marine animals. *Journal of Chemical Education* 67, n.11, p.938, 1990.
18. Fugimoto, J., Reis, E. A. O . Petri, D.F.S., Filho, S.P.C., Formação de Multicamadas de Polissacarídeos e Proteínas. *Química Nova* 25 (5), p.757-761, 2002.
19. Tonhi E., Plepis A.M.G. Obtenção e Caracterização de Blendas Colágeno-Quitossana. *Química Nova* 25(6), p. 943-948, 2002.
20. Engin, N.O., Tas, A.C. Preparation of Porous $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.*, 83(7), p. 1581-1584, 2000.
21. Lee, D.D., Rey, C., Ailova, M. Bone substitution material and a method of its manufacture. US Pat. 6,214,368, 2001.
22. Rietveld, R.A. *J. Appl. Cryst* ,28 , p.366,1995