

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS
CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

CAMILA RODRIGUES DOS REIS

**FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* MACROPOROSOS DE
HIDROXIAPATITA**

BELO HORIZONTE

2014

CAMILA RODRIGUES DOS REIS

FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* MACROPOROSOS DE
HIDROXIAPATITA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientador: Hermes de Souza Costa
Coorientador: Fernando Jorge Mendes Monteiro

BELO HORIZONTE

2014

CAMILA RODRIGUES DOS REIS

**FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* MACROPOROSOS DE
HIDROXIAPATITA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Aprovado em 20/02/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Hermes de Souza Costa - Orientador

Prof. Sidney Nicodemos da Silva

Prof. Jacyara Maria Vieira

À minha família, ao meu namorado e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, aos meus irmãos, avós e à minha tia, pelo apoio incondicional. Por acreditar sempre em mim e por torcerem pelo meu sucesso. Vocês são os meus exemplos maiores de caráter e por vocês quero alçar voos ainda maiores.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, pela oportunidade de realização do curso e do intercâmbio de mobilidade acadêmica para a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Aos professores Fernando Jorge Monteiro e Hermes de Souza Costa, pelo auxílio efetivo na realização deste trabalho e pelo direcionamento, que permitiu o amadurecimento das minhas críticas, e por serem profissionais e pessoas exemplares.

Às meninas do laboratório de biocompósitos cerâmicos da Universidade do Porto, em especial a Catarina e a Susana, pelo auxílio e ensinamentos na condução dos experimentos.

Ao Jorge Ferreira, do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), por fazer o ensaio de DRX das minhas amostras.

À Viviana Correia Pinto, do Laboratório de Biomecânica do Porto (LABIOMEP) e ao Mário A. Pires Vaz, do Instituto de Engenharia Mecânica e Gestão Industrial (Inegi), da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, pela realização do ensaio de compressão das minhas amostras.

Ao Instituto de Engenharia Biomédica (INEB), por permitir a realização dos ensaios de FTIR das minhas amostras no equipamento da instituição.

Ao Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), por fazer o ensaio de microscopia eletrônica de varredura das minhas amostras.

Ao Bruno, do Laboratório de Caracterização de Materiais do Cefet-MG, pelo apoio na realização dos ensaios de granulometria a laser, EDS das amostras, DRX do pó de hidroxiapatita e da MEV da esponja de poliuretano.

Aos colegas de turma, em especial a Fernanda, as Bárbaras, as Érikas, a Lorena e o Lucas, pela amizade e companheirismo em todos os momentos desta trajetória.

Ao Luiz, pelo companheirismo sincero e verdadeiro, pela paciência, por estar sempre ao meu lado, por me ajudar a crescer e torcer pelo meu sucesso.

Aos amigos, Thaís, Julia, Vinícius, Tâmara, Ludmila, Juliana, Yasmim, Luísa, Ana Luiza e Karol, por se fazerem sempre presentes, mesmo quando não estão perto fisicamente.

À equipe e amigos da Academia Passo Básico Dança de Salão, por todos os momentos de descontração propiciados.

RESUMO

Diante da crescente demanda por materiais sintéticos de reposição óssea e das fontes limitadas de enxertos autógenos, é necessário o desenvolvimento contínuo dos biomateriais de reposição óssea para conseguir otimizar a produção e atender a essa demanda. Para desempenhar a função de enxerto de reposição óssea, os biomateriais devem apresentar um design apropriado, aliado às propriedades mecânicas e biológicas. A técnica de processamento utilizada para a fabricação de cerâmicas porosas envolveu o preparo de suspensões à base de hidroxiapatita (HA), água e dispersante. Os *scaffolds* (suportes) foram produzidos pelo processo de replicação de espuma polimérica, no qual esponjas de poliuretano foram infiltradas com suspensões seguido da retirada do excesso de suspensão e tratamento térmico. Após a sinterização, o material foi caracterizado, utilizando as técnicas de MEV, EDS, DRX, FTIR e ensaio de compressão. Os resultados mostraram que a biocerâmica produzida foi processada adequadamente, pois os *scaffolds* apresentaram morfologia replicada da matriz polimérica, conforme previsto. A suspensão utilizada exibiu viscosidade adequada para preencher o molde homogeneamente. O tratamento térmico gerou a consolidação das partículas, manteve a forma moldada e promoveu um aumento da resistência a compressão da estrutura resultante. A MEV revelou que os *scaffolds* apresentam poros esféricos interconectados, medindo entre 15 nm e 375,7 µm de diâmetro aproximado, tamanho apropriado para crescimento celular dentro do enxerto. O DRX revelou uma cristalinidade de 69%. O FTIR confirmou a presença de grupos característicos da HA e de carbonato, indicando tratar-se de uma HA cálcio deficiente. O valor médio de resistência à compressão alcançou o valor de $(2,1 \pm 0,63)$ MPa, o que restringe o uso do material apenas para aplicações de baixa carga.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, enxerto ósseo, biocerâmica macroporosa, replicação da matriz polimérica.

ABSTRACT

Given the growing demand for synthetic bone replacement materials and limited sources of autogenous grafts, it is necessary the continued development of biomaterials for bone replacement to achieve optimal production and meet that demand. Materials for bone graft replacement must have an appropriate design, combined with mechanical and biological properties. The processing technique used in the fabrication of porous ceramics involved the preparation of HA's suspensions, with hydroxyapatite (HA), water and dispersant. The scaffolds were produced by the polymeric foam replication process in which polyurethane sponges were infiltrated with suspensions, followed by removal the excess of slurry and heat treatment. After sintering, the material was characterized using SEM, EDS, XRD, FTIR techniques and compression tests. The results showed that the bioceramic produced was processed properly, because the scaffolds showed morphology of the polymer matrix replicated as expected. The suspension exhibited suitable viscosity used once filled in the mold evenly. The heat treatment consolidated the particles and kept the molded shape promoted an increase in the compressive strength of the resulting structure. The SEM revealed that the scaffolds have interconnected spherical pores, which measure between 15 nm and 375.7 μ m approximate diameter size suitable for cell growth within the graft. The XRD showed a crystallinity of 69 %. FTIR confirmed the presence of the characteristic and carbonate groups, indicating that it was a calcium deficient HA. The compression strenght reached a value of 3.1 MPa, which restricts the use of the material only for low load applications.

Keywords: hydroxyapatite , bone graft , macroporous bioceramics , replication of the polymer matrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expectativa global de anos de vida saudável.....	14
Figura 2 - Desenho esquemático do tecido ósseo compacto e esponjoso.	22
Figura 3 - Esquema da estrutura do osso esponjoso.....	22
Figura 4 - Estrutura hierárquica do osso.....	23
Figura 5 - Esquema dos níveis microestrutural e sub-microestrutural do osso cortical.....	23
Figura 6 - Representação esquemática da fisiologia óssea.....	24
Figura 7 - Estrutura cristalina hexagonal compacta da hidroxiapatita	29
Figura 8 - Possíveis regiões do esqueleto humano de aplicações da HA, como enxerto de reposição óssea.	33
Figura 9 - Imagens ilustrando diferentes designs possíveis para materiais de enxerto ósseo, contendo HA.....	34
Figura 10 - Padrão de difração de raios-X para a hidroxiapatita.....	35
Figura 11 - Representação de um microscópio eletrônico de varredura, destacando os seus principais componentes.	36
Figura 12 - Determinação das espécies químicas presentes na HA, por análise elementar, usando espectroscopia de energia de dispersão	37
Figura 13 - Espectro FTIR de amostra de HA com os grupos funcionais e o número de onda evidenciados	38
Figura 14 - Fluxograma do processo de fabricação dos <i>scaffolds</i> de HA	40
Figura 15 - Imagens de materiais e equipamentos utilizados no processamento dos <i>scaffolds</i> de hidroxiapatita.....	41
Figura 16 - Esquema representativo da matriz polimérica, antes e depois da imersão na suspensão de HA.	44
Figura 17 - Gráfico temperatura x tempo, utilizado no tratamento térmico.....	45
Figura 18 - Imagem das amostras sobre uma base de alumina, dentro do forno de laboratório, utilizado no tratamento térmico.....	45
Figura 19 - Imagens do conjunto de peneiras utilizadas no processamento dos <i>scaffolds</i> de HA.	46
Figura 20 - Imagem do analisador de partículas Cilas 1090	47
Figura 21 - Microscópio eletrônico de varredura utilizado na obtenção das imagens de MEV deste trabalho.....	48

Figura 22 - Aparelho utilizado na realização do FTIR, pertencente ao Instituto de Engenharia Biomédica (INEB).....	49
Figura 23 - Equipamento utilizado na difração de raio X.	49
Figura 24 - Esquema do efeito dos poros durante o ensaio de compressão.	50
Figura 25 - Equipamento utilizados no ensaio de compressão das amostras de HA.	50
Figura 26 - Distribuição granulométrica da partículas de HA, analisadas com o uso de dispersante.	52
Figura 27- Morfologia das partículas de HA, obtidas pela análise em MEV.....	53
Figura 28 - Espectro EDS mostrando picos referentes aos elementos característicos detectados na HA estudada.....	54
Figura 29 - FTIR do pó de HA.	55
Figura 30 - Padrão de DRX obtido para o pó de HA.	56
Figura 31 - Padrão de DRX de uma hidroxiapatita, obtido na literatura.....	57
Figura 32 - MEV da esponja de poliuretano com morfologia tridimensional e diâmetro de poro de 600µm, aproximadamente.	58
Figura 33 - Representação da sinterização.	60
Figura 34 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de HA.....	62
Figura 35 - Imagens dos grânulos de HA, obtidas por MEV, destacando medidas de macroporosidade e mesoporosidade.....	62
Figura 36 - Espectro de EDS mostrando os picos do <i>scaffold</i>	63
Figura 37 - Padrão de DRX dos grânulos de HA.	64
Figura 38 - FTIR dos grânulos de HA.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência dos problemas de saúde responsáveis pelos anos vividos com qualidade de vida abaixo da real.	15
Tabela 2 - Composição do osso.....	20
Tabela 3 - Propriedades biomecânicas do osso.	20
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas da HA.	32
Tabela 5 - Variações da temperatura no tratamento térmico.	44
Tabela 6 - Tamanho de partícula da hidroxiapatita	51
Tabela 7 - Quantidade de cada elemento químico presente na amostra analisada por EDS.	53
Tabela 8 - Comparação do FTIR do pó de HA com valores descritos na literatura.....	56
Tabela 9 - Quantidade de cada elemento químico presente nos <i>scaffolds</i> analisada por EDS.	63
Tabela 10 - Comparação do FTIR dos grânulos de HA com valores descritos na literatura. ..	65
Tabela 11 - Resistência a compressão das amostras de HA	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
ASTM	American Society for Testing and Materials
Dolapix	Nome comercial de compostos do tipo PAA ou PMAA
HÁ	Hidroxiapatita
PAA	Poliácido Acrílico
PMAA	Poliácido Metil-Acrílico
PU	Poliuretano
%m	Percentual em massa
DRX	Difração de raio-X
FTIR	<i>Fourier transform infrared</i>
EDS	Espectroscopia de energia de elétrons
GPa	Giga Pascal
MPa	Mega Pascal
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
µm	Micrometro
TT	Tratamento térmico
Nm	Nanometro
°C	Graus Celsius
BMPs	Proteínas morfogênicas ósseas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	Objetivo	17
2.1	Objetivos específicos	17
3	JUSTIFICATIVA	18
4	REVISÃO DA LITERATURA	19
4.1	Tecido ósseo	19
<i>4.1.1</i>	<i>Composição e propriedades mecânicas</i>	<i>19</i>
<i>4.1.2</i>	<i>Estrutura do osso</i>	<i>21</i>
<i>4.1.3</i>	<i>Calcificação do osso</i>	<i>23</i>
4.2	Fatores necessários aos <i>scaffolds</i> biomiméticos	24
<i>4.2.1</i>	<i>Osteocondução</i>	<i>25</i>
<i>4.2.2</i>	<i>Osteogênese</i>	<i>25</i>
<i>4.2.3</i>	<i>Osteoindução</i>	<i>25</i>
<i>4.2.4</i>	<i>Osteointegração</i>	<i>25</i>
4.3	Materiais de enxerto	26
4.4	Processamento de matrizes cerâmicas sintéticas porosas de HA	27
<i>4.4.1</i>	<i>Suspensões coloidais</i>	<i>27</i>
<i>4.4.2</i>	<i>Dispersante</i>	<i>28</i>
<i>4.4.3</i>	<i>Hidroxiapatita (HA)</i>	<i>28</i>
<i>4.4.3.1</i>	<i>HA como um implante</i>	<i>30</i>
<i>4.4.3.2</i>	<i>Aplicações da HA</i>	<i>32</i>
4.5	Caracterização da HA	34
<i>4.5.1</i>	<i>Ensaio de distribuição granulométrica</i>	<i>34</i>
<i>4.5.2</i>	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	<i>35</i>
<i>4.5.3</i>	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	<i>35</i>
<i>4.5.4</i>	<i>Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)</i>	<i>37</i>
<i>4.5.5</i>	<i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	<i>37</i>

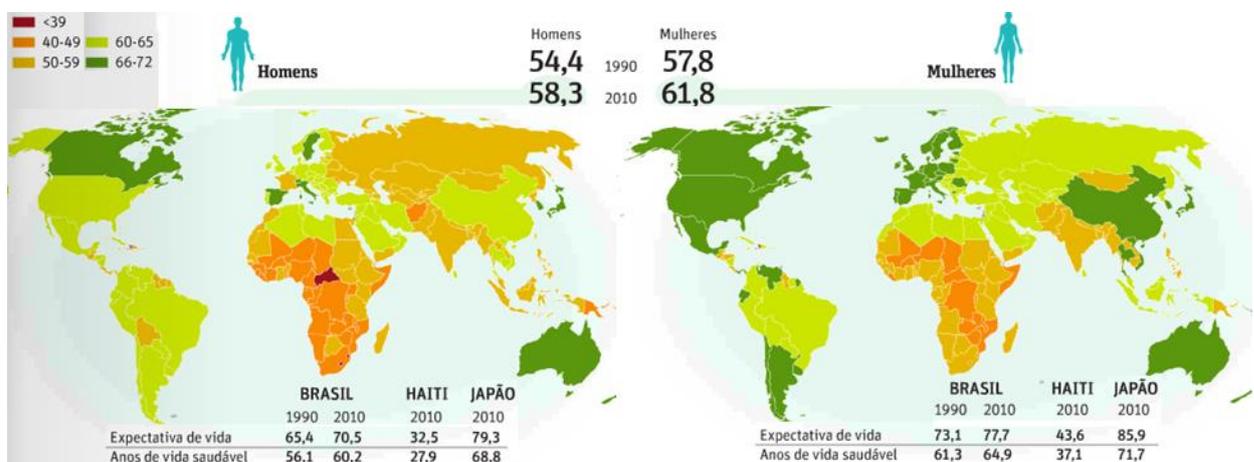
4.5.6	Ensaio de compressão	38
5	Procedimento experimental	40
5.1	Materiais e Equipamentos	42
5.1.1	Hidroxiapatita	42
5.1.2	Água deioizada	42
5.1.3	Dispersante	42
5.1.4	Moldes de poliuretano	42
5.2	Síntese	43
5.2.1	Procedimento	43
5.2.2	Imersão da esponja na suspensão	43
5.3	Tratamento térmico	44
5.4	Obtenção dos grânulos	46
5.5	Caracterização	46
5.5.1	Distribuição granulométrica	46
5.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de energia de elétrons	47
5.5.3	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	48
5.5.4	Difração de raio X (DRX)	49
5.5.5	Ensaio de compressão	50
6	Resultados	51
6.1	Caracterização dos materiais	51
6.1.1	Caracterização do pó de HA	51
6.1.2	Caracterização do molde de poliuretano	57
6.2	Suspensão	58
6.3	Imersão	59
6.4	Tratamento térmico	60
6.5	Caracterização dos scaffolds	61
6.5.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia de elétrons (EDS)	61

<i>6.5.2</i>	<i>Difração de raio X (DRX)</i>	64
<i>6.5.3</i>	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier dos grânulos</i>	64
<i>6.5.4</i>	<i>Ensaio de compressão</i>	67
7	Conclusões	68

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população mundial fez com que doenças ósseas se tornassem um problema de saúde pública, devido à sobrecarga da estrutura física (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). A Figura 1 revela que o aumento da expectativa de vida veio acompanhado de uma redução em sua qualidade, uma vez que os anos de vida saudável são, em média, 16% menores que os vividos (COSTA, 2010).

Figura 1 - Expectativa global de anos de vida saudável.



Fonte: COSTA, 2010.

Diante disso, um dos setores de maior demanda é o de ortopedia, o qual diversos autores alertam para a urgência na priorização de políticas públicas voltadas aos problemas osteoarticulares e para a necessidade de desenvolvimento de novos materiais (XU et al, 2011).

Na Tabela 1 estão listados os dez problemas de saúde que mais afetam a população mundial, fazendo com que o tempo de vida com qualidade diminua, e dois deles estão diretamente ligados à ortopedia (COSTA, 2010). Os problemas associados à estrutura óssea podem ser causados por trauma, tumores, doenças ósseas, defeitos congênitos e envelhecimento (XU et al., 2011).

Uma outra demanda verificada neste contexto é o aprimoramento dos dispositivos já disponíveis para a correção de problemas existentes, visando possibilitar uma melhor qualidade de vida aos pacientes (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Diante da elevada ocorrência de defeitos ósseos, a necessidade de biomateriais adequados que atuem como materiais para substituição e regeneração da estrutura óssea é indispensável na solução de grande parte dos problemas citados (XU et al., 2011). No entanto,

para que eles sejam capazes de desempenhar a função desejada e estimular uma resposta adequada nos tecidos vivos, é preciso que eles possuam um conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas.

Tabela 1 - Prevalência dos problemas de saúde responsáveis pelos anos vividos com qualidade de vida abaixo da real.

Prevalência	Problema de saúde
1	Dor nas costas
2	Depressão
3	Anemia por falta de ferro
4	Dor no pescoço
5	Doença pulmonar obstrutiva crônica
6	Problemas musculoesqueléticos
7	Transtornos de ansiedade
8	Enxaqueca
9	Diabetes
10	Queda

Fonte: COSTA, 2012

A busca por uma alternativa de um material - substituto ósseo - que reproduza as propriedades estruturais do osso, combinando porosidade necessária, interconectividade, bioatividade e resistência mecânica é um dos principais desafios enfrentados pelos cientistas da área (GREENWALD et al., 2003). O equilíbrio entre as propriedades do material, a arquitetura do implante e a bioatividade, visando satisfazer os requisitos de resistência e tenacidade adequados, bem como osteocondutibilidade e osteoindutividade é, por enquanto, uma limitação de um biomaterial para a reparação e regeneração de grandes defeitos ósseos, em aplicações de alto suporte de carga (ROOHANI-ESFAHANI et al., 2013).

Neste contexto, a hidroxiapatita se enquadra como um biomaterial poroso para reconstituição óssea. Ela apresenta um conjunto de propriedades adequadas à aplicação como biomateriais, uma vez que a HA é o constituinte predominante da fase mineral do osso. A maioria dos substratos a base de hidroxiapatita são materiais osteocondutores ideais e quando associados a BMPs (proteínas morfogênicas) endógenas adequadas, eles passam a ser osteoindutores, pois induzem a osteogênese (LANZA et al., 2007). Entretanto, a resistência

mecânica é um fator limitante para aplicação da HA em estruturas ósseas sujeitas à alta carga (ROOHANI-ESFAHANI et al., 2013).

No presente trabalho será descrita a fabricação de *scaffolds*, pelo método da impregnação de esponja polimérica com suspensão a base de hidroxiapatita, para potencial uso como material de enxerto ósseo. Além disso, o material utilizado e produzido será caracterizado por meio dos métodos de:

- Análise granulométrica (realizada apenas na HA pré-processada);
- Microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Espectroscopia de energia de dispersão (EDS);
- Difração de raios X (DRX);
- Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);
- Ensaio de compressão.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Produzir um biomaterial capaz de substituir o osso, em procedimentos cirúrgicos para correção de defeitos ósseos, que apresente alta porosidade e resistência mecânica suficiente para manter a sua forma e função durante a regeneração óssea.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir *scaffolds* biocerâmicos de matriz porosa, fabricados utilizando a técnica de replicação de uma matriz polimérica de poliuretano (PU) com uma suspensão à base de HA.
- Caracterizar os materiais utilizados e a microestrutura dos *scaffolds* produzidos, utilizando técnicas de análise do tamanho do poro, morfologia do material e da interconectividade entre os poros.
- Realizar ensaios mecânicos para avaliar a resistência à compressão admitida pelo material.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar da capacidade de autoregeneração e autoremodelação do tecido ósseo, existem muitas circunstâncias cujos enxertos ósseos são imprescindíveis devido a defeitos ósseos, de origem traumática ou não traumática.

As fraturas mais prevalentes são: quadril, tornozelo, tíbia e fibula (FERRAZ et al., 2004). Dados recentes mostram que cerca de 152 mil próteses de quadril foram implantadas nos Estados Unidos. Estima-se que este número aumente para cerca de 272 mil no ano de 2030 (HCUP, 2007).

De acordo com a AAOS (Academia Americana de Cirurgiões), existem, aproximadamente, 6,3 milhões de casos de fraturas por ano, nos Estados Unidos. Os custos associados a estas fraturas são extremamente altos, por exemplo, procedimentos com enxertos ósseos custaram 18,3 bilhões de dólares em 2007 (STEVENS et al., 2008).

Além disso, o mercado de enxertos ósseos está em constante crescimento. Segundo uma pesquisa de mercado realizada pela Medtech Insight, as vendas destes enxertos ósseos ultrapassou os 980 milhões dólares nos Estados Unidos, em 2001 e ano seguinte foi cerca de 1160 milhões de dólares (STEVENS et al., 2008).

No Brasil as estatísticas mostram que, em 2004, os gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) com ortopedia totalizaram cerca de 60 milhões de reais, aproximadamente, sendo que somente o procedimento de artroplastia total de quadril gerou um gasto de cerca de R\$ 30 milhões na compra de próteses. Somado a isso, houve ainda aproximadamente 1500 cirurgias de revisão, somente em 2004, responsáveis por um gasto adicional de quase R\$ 7 milhões em próteses (COSTA, 2010).

Diante de todos os dados e custos crescentes apresentados, percebe-se a grande importância dessa área no setor da saúde. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento contínuo destes materiais, visando à otimização da produção de enxertos ósseos sintéticos, apropriado para cada caso clínico.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado e altamente vascularizado, que constitui o elemento principal do esqueleto. Ele é continuamente remodelado durante todo o tempo de vida de um indivíduo (LARANJEIRA, 2012).

Proporcionar um suporte mecânico; ser um reservatório para os minerais e regulador do metabolismo destes, particularmente de cálcio e de fosfato; e proteger os órgãos vitais são as principais funções do osso. Entretanto, para que todas elas sejam desempenhadas, o tecido ósseo deve estar equilibrado e saudável (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; XU et al., 2011).

O tecido ósseo constitui um exemplo de tecido dinâmico, uma vez que apresenta uma capacidade única de autoregeneração e autoremodelação. Por esse motivo, ele é continuamente remodelado durante todo o tempo de vida de um indivíduo (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; LARANJEIRA, 2012). Esforços de compressão tendem a aumentar a atividade osteoclástica, decompondo a matriz, enquanto os esforços de tração promovem o crescimento por atividade osteoblástica. Como o osso é um órgão dinâmico, que está em constante atividade, esses processos de deposição e absorção nunca param, entretanto têm suas velocidades alteradas, de forma que muitas doenças podem surgir em decorrência dessa variação natural que pode ser estimulada pelas atividades e modo de vida humanos (RATNER et al, 2004).

4.1.1 *Composição e propriedades mecânicas*

A matriz do osso é composta, precisamente, de duas fases principais a orgânica (fase proteica) e a inorgânica (fase mineral). A composição do osso varia pouco nas diferentes partes do esqueleto. As células são incorporadas em uma matriz 50% fibrosa e 50% mineral, aproximadamente (LANZA et al., 2007). As fases são constituídas por vários componentes que consistem, em proporções decrescentes, em minerais, colágeno, água, proteínas não-colágenas, lipídios, elementos vasculares e células, conforme detalhado na Tabela 2.

A Tabela 2 mostra que o principal componente da fase mineral do osso é a HA e o da fase orgânica é o colágeno. O colágeno atua como um quadro estrutural e a HA, na forma de cristais, fortalece o osso (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005). Do ponto de vista da ciência dos materiais, o osso é classificado como um compósito, no qual a fase mineral suporta quase

toda a carga mecânica e a fase orgânica funciona como material ligante, que absorve impacto e fornece flexibilidade ao osso (RIVERA-MUÑOZ, 2011).

A água (H₂O) também é encontrada em quantidades significativas em todos os ossos humanos. Ela é uma das substâncias mais essenciais ao corpo, pois não há célula que sobreviva sem água. A quantidade de H₂O presente no osso é um determinante importante do seu comportamento mecânico (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005). As propriedades biomecânicas do osso são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2 - Composição do osso

Fase inorgânica	%m	Fase orgânica	%m
Hidroxiapatita	~60	Colágeno	20
Carbonato	~4	Água	~9
Citrato	~0,9	Outras proteínas (osteonectina, osteocalcina, osteopontina, trombospondina, proteínas	~3
Sódio	~0,7	morfo genéticas, sialoproteína)	
Magnésio	~0,5		
Traços de Cl ⁻ , F ⁻ , K ⁺ , Sr ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ .		Traços de polissacarídeos, lipídios, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos	

Fonte: Adaptado de MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005

Tabela 3 - Propriedades biomecânicas do osso.

Propriedades	Medidas	
	Osso cortical	Osso esponjoso
Módulo de Young (GPa)	14-20	0,05-0,5
Resistência à tração (Mpa)	50-150	10-20
Resistência à compressão (Mpa)	170-193	5-10
Tenacidade à fratura (Mpa. m ^{1/2})	2-12	0,1
Densidade (g/cm ³)	18-22	0,1-1,0
Densidade aparente (g/cm ³)	1,8-2,0	0,1-1,0
Superfície/volume ósseo (mm ² /mm ³)	2,5	20
Volume ósseo total (mm ³)	1,4x10 ⁶	0,35x10 ⁶
Superfície interna total (mm ²)	3,5x10 ⁶	7,0x10 ⁶

Fonte: Traduzido de MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005

Os lípidos são também necessários para as funções celulares e representam cerca de 2% do osso. Eles desempenham um papel importante no processo de biomineralização inicial. O grau de biomineralização é o fator mais importante para determinar a competência biomecânica do osso (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

4.1.2 Estrutura do osso

Diferentemente da composição óssea, a organização estrutural do osso varia drasticamente entre locais distintos do esqueleto, de tal forma que as propriedades biomecânicas também mudam consideravelmente, a fim de suportar as diferentes cargas às quais o esqueleto humano é submetido (PRUITT; CHAKRAVARTULA, 2011).

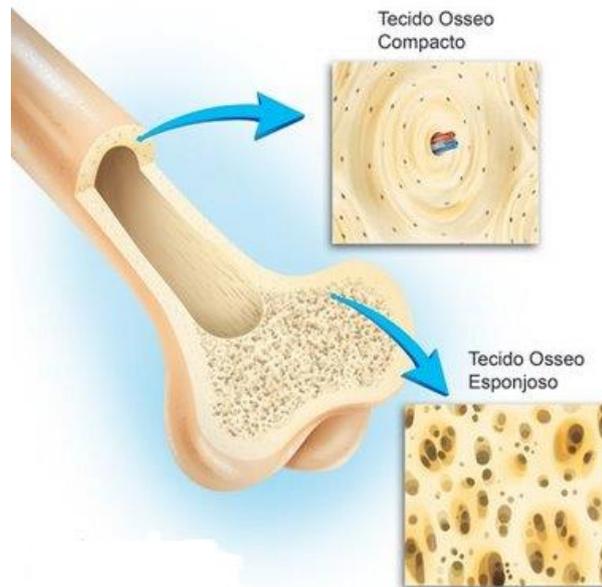
Macroscopicamente, o osso é formado por um compartimento cortical denso e um trabecular poroso. Microscopicamente, ele é constituído por osteons, nos ossos trabecular e cortical, com um arranjo de lamelas, composto por células incorporadas em uma matriz de colágenos do tipo I e cristais de HA mineralizado, conforme detalhado na Figura 4. (LANZA et al., 2007).

FERREIRA; PATERLINI, 2011, detalharam os vários níveis de unidades estruturais do osso, e organizou-os em escalas de macro a nano. Dessa forma, ele dividiu o tecido ósseo em cinco níveis estruturais:

- Macroestrutura: osso cortical e osso trabecular (Figura 2);
- Microestrutura: ósteons;
- Sub-microestrutura: lamelas;
- Nanoestrutura: fibra colágena formada por um conjunto de fibrilas;
- Sub-nanoestrutura: moléculas colágenas de uma fibrila e cristais minerais.

O osso esponjoso ocupa cerca de 20% do total do osso e pode ser chamado também de trabecular. É mais leve e, portanto, menos denso que o osso compacto. Possui alta porosidade, conforme detalhado na Figura 3, e, conseqüentemente, maior concentração de vasos sanguíneos, quando comparado ao osso compacto. A arquitetura porosa é facilmente visível ao microscópio de baixa potência ou até mesmo a olho nu, conforme ilustrado na Figura 2, uma vez que o diâmetro dos poros pode variar da escala micrométrica à milimétrica (FERREIRA; PATERLINI, 2011).

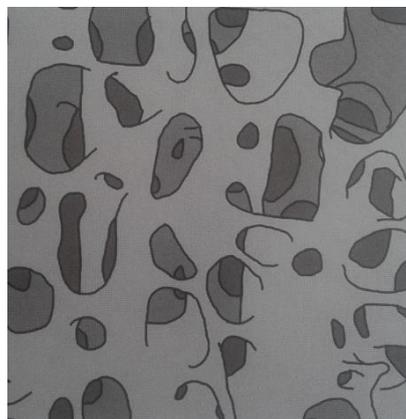
Figura 2 - Desenho esquemático do tecido ósseo compacto e esponjoso.



Fonte: Adaptado de CASTRO,2009.

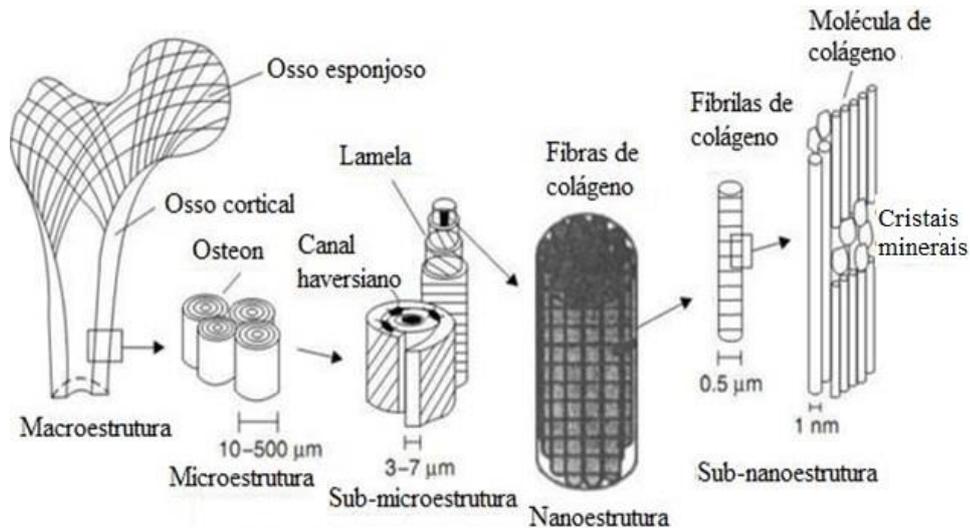
Por outro lado, o osso compacto (Figura 5) é muito mais denso que o esponjoso e pode ser chamado osso cortical ou denso. Ele ocupa cerca de 80% do total da massa do osso no nosso esqueleto (PRUITT, CHAKRAVARTULA, 2011). Apresenta, portanto, uma menor porosidade e, conseqüentemente, uma menor concentração de vasos sanguíneos. Sua arquitetura porosa não é visível a olho nu, uma vez que o diâmetro dos poros pode variar entre 10 e 20 μm e eles são separados por intervalos de 200 a 300 μm (FERREIRA; PATERLINI, 2011). As funções de osso compacto são suportar esforços de tração, compressão, e torção, enquanto o osso esponjoso suporta, principalmente, os esforços compressivos (LANZA et al., 2007).

Figura 3 - Esquema da estrutura do osso esponjoso.



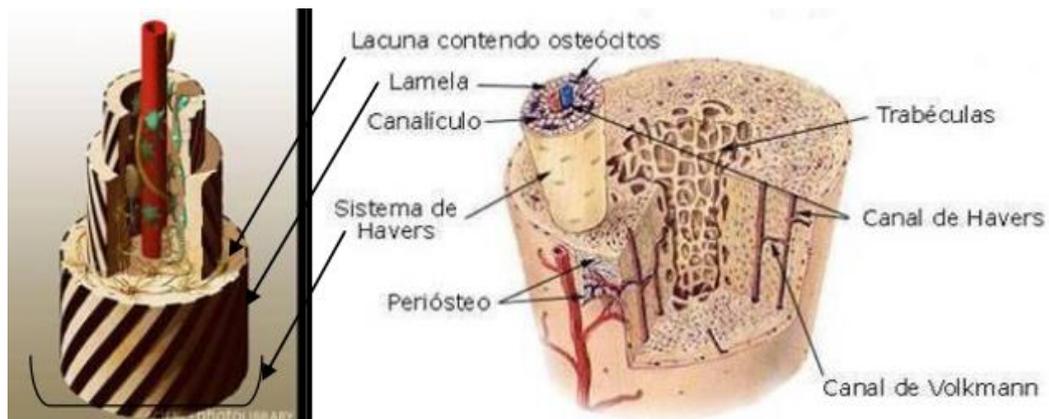
Fonte: PRUITT, CHAKRAVARTULA, 2011 .

Figura 4 - Estrutura hierárquica do osso.



Fonte: Adaptado de LARANJEIRA, 2012.

Figura 5 - Esquema dos níveis microestrutural e sub-microestrutural do osso cortical.



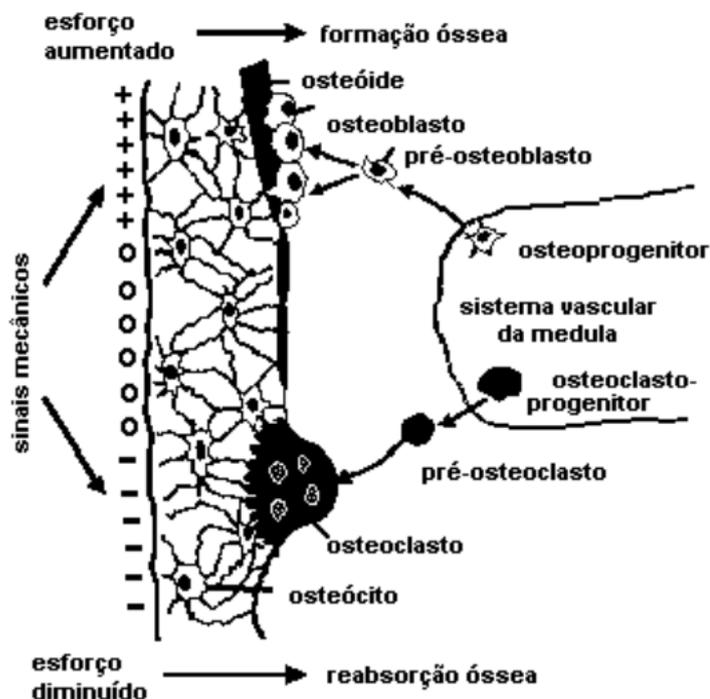
Fonte: FERREIRA; PATERLINI, 2011

4.1.3 Calcificação do osso

A produção do osso inicia-se com a secreção do colágeno, feita por células denominadas osteoblastos. Em seguida, acontece a polimerização dos monômeros de colágeno, para formar fibras de colágeno e o tecido resultante transforma-se em osteóide. Os osteoblastos, que ficam aprisionados no osteóide, são chamados de osteócito, conforme ilustrado na Figura 6 (COSTA, 2006; RATNER et al, 2004).

Alguns dias após a formação do osteóide, inicia-se a precipitação de sais de cálcio sobre as superfícies das fibras colágenas, originando ninhos, que se multiplicam rapidamente, e crescem até se transformarem em cristais de hidroxiapatita (RATNER et al, 2004).

Figura 6 - Representação esquemática da fisiologia óssea.



Fonte: COSTA, 2006

A atividade das células osteoblásticas é contínua, de maneira a formar um novo osso, constantemente. Em contrapartida, o osso também é constantemente absorvido na presença de osteoclastos, que constituem grandes células fagocitárias multinucleadas. As taxas de deposição óssea e de absorção são iguais, de modo que, em condições normais de funcionamento, a massa total de osso permanece constante (COSTA, 2006).

4.2 Fatores necessários aos *scaffolds* biomiméticos

A utilização de *scaffolds* como enxertos ósseos visa recuperar os defeitos nos ossos, por meio da regeneração de tecidos vivos e consequente restabelecimento de função. Para que este objetivo seja alcançado com sucesso é necessário que o material utilizado seja osteocondutor, osteoindutivo, biocompatível e biodegradável (LANZA et al., 2007).

Além disso, os *scaffolds* devem apresentar uma porosidade que suporte e possibilite o crescimento celular interno e neovascular (SALGADO et al., 2004).

4.2.1 Osteocondução

Osteocondução é o crescimento ósseo sobre uma superfície. A osteocondutividade é a capacidade do enxerto suportar a ligação de células e permitir a migração das células e a formação de novos vasos.

Este fenômeno descreve o crescimento de capilares, tecido perivascular e células osteoprogenitoras na estrutura tridimensional de um implante ou enxerto e é caracterizado pela formação óssea por anexação de tecido até a superfície do enxerto. Os materiais osteocondutores são biocompatíveis e formam uma estrutura suporte para deposição e proliferação celular, por meio da atividade osteoblástica, produzindo um novo osso (COSTA, 2006).

4.2.2 Osteogênese

Osteogênese é o processo de formação do osso a partir da ação de células vivas dentro do enxerto. O novo osso é regenerado pelos osteoblastos e pelas células que se originam na medula, transferidas com o enxerto (COSTA, 2006).

4.2.3 Osteoindução

Osteoindução é a estimulação e ativação de células formadoras do osso do tecido circundante (MATSUNO et al., 2010). Uma outra definição proposta é o processo pelo qual a osteogênese é induzida (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001).

Os enxertos osteoindutores são capazes de induzir a diferenciação em células osteogênicas ou estimular a proliferação das células existentes (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005)

A osteoindução da HA pode ser otimizada por meio da adição de BMPs em uma matriz de HA. Os BMPs são proteínas morfogenéticas ósseas, capazes de promover a formação de osso novo em locais de ossos defeituosos (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

4.2.4 Osteointegração

A osteointegração é a ligação entre a superfície do osso e o material do enxerto.

4.3 Materiais de enxerto

Diante de casos de perdas ósseas de grande volume, a estratégia padrão é a utilização de materiais para enxertos ósseos, que incluem autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos. Cada tipo tem suas vantagens e desvantagens.

O autoenxerto consiste na retirada de material ósseo do corpo do paciente com perda óssea para enxertar na região deficiente. Ele apresenta as vantagens de não causar resposta imunológica adversa e são os melhores indutores da formação de um novo osso, devido à sua capacidade osteogênica. No entanto, sua quantidade disponível é limitada, dependendo da anatomia e condições fisiológicas da área doadora. Além disso, a aplicação destes enxertos pressupõe cirurgia adicional para a colheita, resultando em mais dor para o paciente. Existem outras desvantagens associadas com o risco de morbidade do sítio doador como fratura, dor de longa duração, danos nos nervos, e possível infecção (TAMPIERI et al., 2001; SOPYAN et al., 2007).

Os aloenxertos são transplantados de indivíduos da mesma espécie que o receptor, mas de genótipos diferentes. O material é obtido pela retirada de tecido ósseo de cadáveres, que é processado e armazenado em banco de ossos. Eles estão disponíveis em quantidade considerável e apresentam boa resistência mecânica. Entretanto são imunogênicos e não são tão osteoindutores, como os autoenxerto. A transmissão de doenças, como hepatite e HIV pode acontecer neste tipo de enxerto. Além disso, a armazenagem é cara, pode alterar as propriedades mecânicas e a resposta biológica (COSTA, 2006; SOPYAN et al., 2007)

Os xenoenxertos são materiais extraídos da porção inorgânica de ossos de animais. Esse osso é triturado, descalcificado e seco, antes de ser usado em humanos (COSTA, 2006).

Dessa forma, diante dos argumentos apresentados em aplicações de enxertos ósseos de origem natural, o desenvolvimento de materiais de substituição óssea sintéticos são de grande importância.

A HA é um material de substituição óssea sintético amplamente estudado. Recentemente, a HA macroporosa ganhou atenção especial, devido à forte ligação com o osso, pois os poros proporcionam uma interligação mecânica que conduz a uma fixação firme do material nos tecidos adjacentes (SOPYAN et al., 2007).

4.4 Processamento de matrizes cerâmicas sintéticas porosas de HA

Existem várias técnicas para fabricar biocerâmicas de matriz porosa. *Gel casting* de esponjas, a incorporação de partículas orgânicas voláteis em pós cerâmicos, e a replicação de esponjas poliméricas são exemplos de técnicas utilizadas na obtenção de biocerâmicas de matriz porosa (FERRAZ et al., 2004; SOPYAN et al., 2007)

As técnicas de *gel casting* e de incorporação de partículas orgânicas com pós cerâmicos resultam em estrutura porosa com poros fechados não uniformes e baixa interconectividade. O método da esponja polimérica gera uma estrutura com tamanho de poro controlável, interconectados e geometria desejável, contudo a resistência mecânica é muito baixa para aplicações que exijam alta carga (COSTA, 2006; FERRAZ et al., 2004) .

O método de replicação da esponja polimétrica tem sido amplamente usado por diversos pesquisadores (COSTA, 2006; FICAI et al., 2007; MATEUS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2010; LARANJEIRA et al., 2010; LARANJEIRA, 2012; TRIPATHI; BASU, 2012; GERVASO et al., 2012). Entretanto, a técnica apresenta problemas relacionados ao controle do processamento e das propriedades finais da biocerâmica. O processamento é influenciado pelo controle da suspensão coloidal.

4.4.1 *Suspensões coloidais*

A utilização de pós finos no processamento de cerâmicas avançadas promove a redução da temperatura de sinterização e à obtenção de propriedades interessantes, relacionadas a microestrutura fina. Entretanto, o uso destes pós geram problemas de processamento, em virtude da tendência de eles aglomerarem, devido a interações de Van der Waals e forças de superfície. A aglomeração pode resultar em uma dispersão não homogênea, que gera uma morfologia irregular do material cerâmico. Além disso, a aglomeração das partículas de pó pode levar a um aumento indesejado da viscosidade da dispersão. Nestes casos, a adição de solvente pode não ser aceitável, pela necessidade de remoção de altas quantidades de líquido e pelo aumento do risco de segregação (ROEDER, R. K *et al*, 1995; SHQAU, 2005).

Para evitar a formação de aglomerados e garantir o empacotamento homogêneo da cerâmica, adiciona-se um dispersante apropriado e/ou promove-se a dispersão por ação mecânica. Quando o único método utilizado para quebra dos aglomerados é por ação mecânica, efeitos indesejados podem ocorrer, como por exemplo introduzir ao impurezas ao material e reaglomeração. Dessa forma, o uso de um dispersante em suspensões coloidais torna-se

necessário no processamento estudado neste trabalho. O entendimento e controle das interações entre as partículas cerâmicas em uma suspensão coloidal possibilita a obtenção de microestrutura do corpo verde e densidade de empacotamento apropriados. Essas interações podem ser controladas com aditivos químicos, por meio de três rotas principais: dispersão eletrostática, estérica e eletroestérica (SHQAU, 2005).

A dispersão por efeito eletrostático envolve moléculas ou íons capazes de adsorver-se às partículas e elevar o potencial elétrico de superfície, estendendo sua camada difusa

Na dispersão por efeito estérico, moléculas com elevada massa molar estabilizam o sistema, devido ao impedimento estérico. As moléculas do dispersante se ligam às partículas cerâmicas em alguns sítios, que têm alta afinidade com a superfície, e as porções restantes das moléculas poliméricas se projetam para a solução, permanecendo solvatadas pelo líquido, sendo responsáveis pela estabilização (COSTA, 2006).

O dispersante eletroestérico apresenta uma combinação dos dois mecanismos descritos e sobretudo se apresenta como um polímero carregado. Ele possui sítios para sua fixação na superfície, as porções solvatadas também são carregadas, gerando uma dupla repulsão, eletrostática e estérica. O poliácido acrílico é um exemplo de dispersante que possui este mecanismo (SHQAU, 2005; COSTA, 2006).

4.4.2 *Dispersante*

No processamento de suspensões densas de partículas finas HA é necessário o uso de polímeros dispersantes, a fim de obter alta fluidez, viscosidade adequada e alta performance da cerâmica processada (YASUDA et al., 2002).

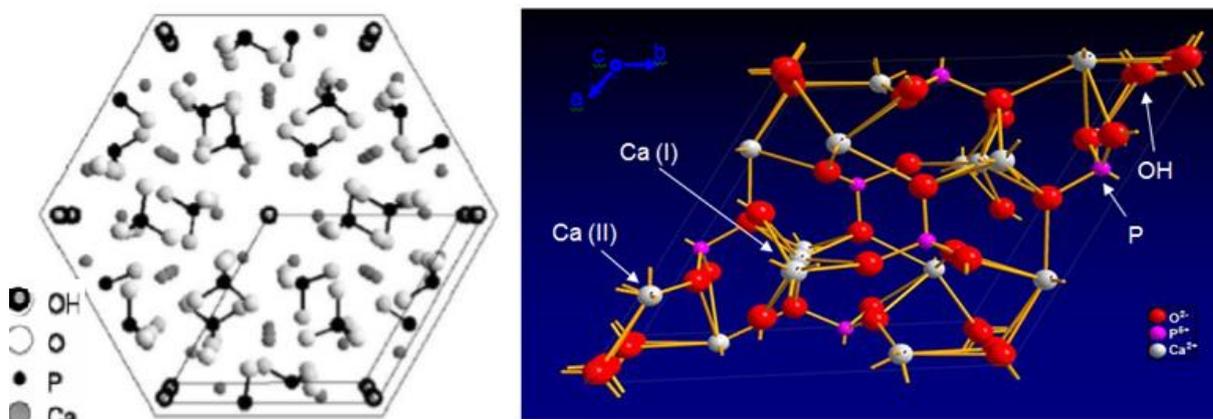
O dispersante escolhido para o processamento dos grânulos de HA foi o Dolapix CE 64 (D64), pois de acordo com a literatura, o D64 melhora a densidade do *scaffold* de HA (VAZ et al., 1999). O D64 é um nome comercial para um poliácido acrílico (PAA) (SHQAU, 2005). O PAA atua por mecanismo de dispersão por repulsão eletrostática e efeito estérico (COSTA, 2006).

4.4.3 *Hidroxiapatita (HA)*

O termo “apatita” é aplicado a um grupo de compostos que apresentam a fórmula geral $M_{10}(XO_4)_6Z_2$, onde M^{2+} é um cátion metálico e XO_4^{3-} e Z^- são os ânions. O nome de cada apatita depende dos elementos dos radicais M, X e Z. No caso da HA, M é o cálcio (Ca^{2+}), X é o fósforo

(P^{5+}) e Z é a hidroxila (OH^-) (RIVERA-MUÑOZ, 2011). A hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ consequentemente, apresenta uma razão atômica Ca/P igual a 1,67. A HA cristaliza em uma estrutura cristalina hexagonal compacta, embora em alguns casos ela possa ser monoclinica (RIVERA-MUÑOZ, 2011). A Figura 7 representa a célula unitária da HA, tridimensionalmente e os parâmetros de rede a, b e c da estrutura medem 9.418 Å, 9.418 Å e 6.884 Å, respectivamente.

Figura 7 - Estrutura cristalina hexagonal compacta da hidroxiapatita



Fonte: adaptado de MUÑOZ, 2011

A estrutura da HA é formada por um arranjo tetraédrico de fosfato (PO_4^{3-}), que constitui o "esqueleto" da célula unitária. Dois dos átomos de oxigênio estão alinhados com o eixo c e os outros dois ficam em um plano horizontal. Dentro da célula unitária, os fosfatos são divididos em duas camadas, com alturas de 1/4 e 3/4, respectivamente, o que resulta na formação de dois tipos de canais ao longo do eixo c, denotados por A e B.

Os canais A são ocupados por oxigênio, fosfato e íons de cálcio II (Ca (II)), conforme indicado na Figura 7. Os canais B são formados pelos íons Ca (I) e no centro deste canal existem radicais hidroxila, com diferentes orientações.

A forma monoclinica da HA é mais ordenada e termodinamicamente estável. Ela é formada em altas temperaturas e nunca foi observada nos tecidos ósseos (RIVERA-MUÑOZ, 2011).

Dentre os diversos fosfatos de cálcio existentes, a HA é termodinamicamente a fase mais estável, em condições fisiológicas (GERVASO et al., 2012). A HA possui uma excelente biocompatibilidade e bioatividade quando em contato com o tecido e células ósseas, provavelmente devido a similaridade com os tecidos duros do nosso corpo. Os fosfatos de cálcio são os principais constituintes minerais dos tecidos calcificados. Os fosfatos de cálcio presentes

no nosso organismo possuem cristais no formato de agulha e medem de 5-20 nm de largura e 60 nm de comprimento, aproximadamente (FERRAZ et al., 2004).

Apesar de existir o modelo de hidroxiapatita estequiométrica, vale citar que a HA do osso é na forma de cristais nanométricos e apresenta uma razão Ca/P <1,67 e não contém apenas os íons e radicais característicos da HA (FERRAZ et al., 2004; MUÑOZ, 2011). Além deles, elas podem conter traços de CO_3^- , Mg, Na, F e Cl (FERRAZ et al., 2004).

Sendo assim, um aspecto que deve ser destacado é o fato de quanto mais próximo o valor de Ca/P for de 1,67, maior será a estabilidade do material no corpo humano e, portanto, melhor será a bioatividade. Além disso, deve-se observar o grau de cristalinidade, uma vez que a cristalinidade nos tecidos para o esmalte do dente, por exemplo, é muito elevada, enquanto na dentina e no osso, é muito baixo. Isto indica que a reatividade depende do grau de cristalinidade, devido ao fato de a reatividade na dentina e no osso ser maior do que no esmalte do dente (RIVERA-MUÑOZ, 2011).

4.4.3.1 HA como um implante

Existem vários critérios a serem considerados no projeto de um *scaffold* de biocompósito cerâmico, tais como: estrutura altamente porosa para apoiar a fixação, a proliferação das células e a produção de matriz extra-celular; uma rede de poros interconectados, para promover a troca de nutrientes e resíduos; substrato biocompatível e reabsorvível com taxas de degradação controlável (TEIXEIRA et al., 2008). Isto conduzirá a uma química adequada de superfície para a fixação das células, proliferação e diferenciação e uma arquitetura reprodutível de tamanho e forma clinicamente relevante. Além disso, os *scaffolds* devem imitar morfologia do osso esponjoso (Figura 2), estrutura e função, para otimizar a integração do tecido circundante.

Na fabricação de biomateriais a base de HA deve-se considerar todos os fatores já citados e o fato de as diferenças na estrutura e composição das apatitas também depender das diferentes técnicas de processamento, bem como da temperatura e da atmosfera em que são feitas (TEIXEIRA et al., 2008)..

A HA atua no reparo ósseo servindo como *scaffold* para as interações celulares e a formação de matriz óssea extracelular, proporcionando um suporte para a formação do novo tecido. Os *scaffolds* servem, inicialmente, como meios osteocondutores para o crescimento do novo tecido que está sendo depositado e em um segundo momento, promove-se a formação de novos centros de crescimento ósseo, por meio da osteogênese (GERVASO et al., 2012). Para

executar estas funções, o *scaffold* deve atender a certos critérios, incluindo propriedades mecânicas semelhantes às do local de reparação óssea, biocompatibilidade, biodegradabilidade e porosidade (GERVASO et al., 2012).

A porosidade, no contexto deste trabalho, é definida como a porcentagem de espaço vazio em um sólido e que influencia o crescimento ósseo, uma vez que permite a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, bem como a vascularização (TEIXEIRA et al., 2008).

O tamanho de poro mínimo, requerido para ocorrência da regeneração do tecido é geralmente 100 μm . No entanto, observou-se que tamanhos de poros superiores a 300 μm tendem a apresentar uma maior penetração de tecido mineralizado, em comparação com tamanhos de poro menores (TEIXEIRA et al., 2008).

Em tamanhos de poros de 75 μm , dificilmente haverá tecido mineralizado dentro do *scaffold*. Acredita-se que isso é uma consequência do retardo no crescimento celular proporcionado pela menor penetração da neovascularização, bem como o fornecimento de nutrientes (TEIXEIRA et al., 2008).

A importância da porosidade adequada deve-se ao fato de o tamanho do poro superior a 150 μm ser um requisito essencial para a osteocondução. Outro parâmetro importante é que a resistência da HA (principalmente à esforços compressivos) é inversamente proporcional ao volume de macroporosidade (TAMPIERI et al., 2001). Diante do exposto, o desenvolvimento de biomateriais porosos, com gradientes de poros semelhantes aos ossos cortical e esponjoso e grau de interligação adequado é um importante desafio a ser trabalhado.

A HA permite que os tecidos cresçam dentro de sua estrutura, devido à interconexão dos poros, reduzindo a encapsulação, aumentando a velocidade de crescimento do tecido ósseo e reduz o período de recuperação. Favorece também o suporte nutricional do tecido dentro de seus poros, uma continuidade com o osso, já que os poros incentivam o crescimento celular, o crescimento fibrovascular, a formação de osteóide e o crescimento do osso mineralizado (TAMPIERI et al., 2001)..

As propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas da HA, como um implante, estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas da HA.

Propriedades	Dados experimentais
Composição química	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Ca/P	1,67
Estrutura cristalina	Hexagonal
Módulo de Young (GPa)	80-110
Módulo de elasticidade (GPa)	114
Resistência a compressão (Mpa)	400-900
Resistência à flexão (MPa)	115-200
Densidade (g/cm^3)	3,16
Densidade relativa (%)	95-99,5
Tenacidade à fratura ($\text{MPa m}^{1/2}$)	0,7-1,2
Dureza (HV)	600
Temperatura de decomposição	>1000
Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	1614
Constante dielétrica	7,40-10,47
Condutividade térmica ($\text{W}/\text{cm K}$)	0,013
Biocompatibilidade	Alta
Bioatividade	Alta
Biodegradação	Baixa
Compatibilidade celular	Alta
Osteocondução	Alta

Fonte: Adaptado de MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005

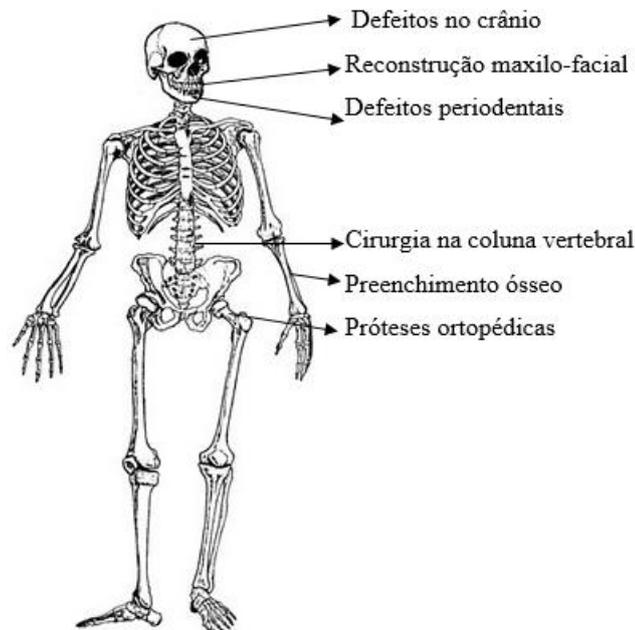
4.4.3.2 Aplicações da HA

A HA pode ser usada: como um material ortopédico ou odontológico, conforme ilustrado na Figura 8, como enchimento da coluna de cromatografia de afinidade para separar proteínas e catalisadores industriais, na liberação controlada de fármacos, na terapia genética, como cimento ósseo, e resíduos de remediação de água (SALIMI et al., 2012). A HA tem sido amplamente aplicada no campo da medicina, como um material de reparação óssea, devido à sua excelente bioatividade, biocompatibilidade, osteocondutividade e a capacidade de promover a osseointegração. Bioatividade é a capacidade do implante de formar uma ligação

química direta com os tecidos circundantes. Devido às características descritas, a HA é um material ideal para enxertos ósseos.

A necessidade de enxertos ósseos sintéticos depende da complicação dos defeitos ósseos. Por exemplo, se o defeito for menor, o osso tem a sua própria capacidade de autoregeneração, em poucas semanas. Portanto, neste caso, a cirurgia não é necessária. No entanto, defeitos graves, que envolvem perda de volume ósseo, o osso não consegue regenerar, sendo necessário efetuar a cirurgia, para restaurar a função do tecido danificado (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

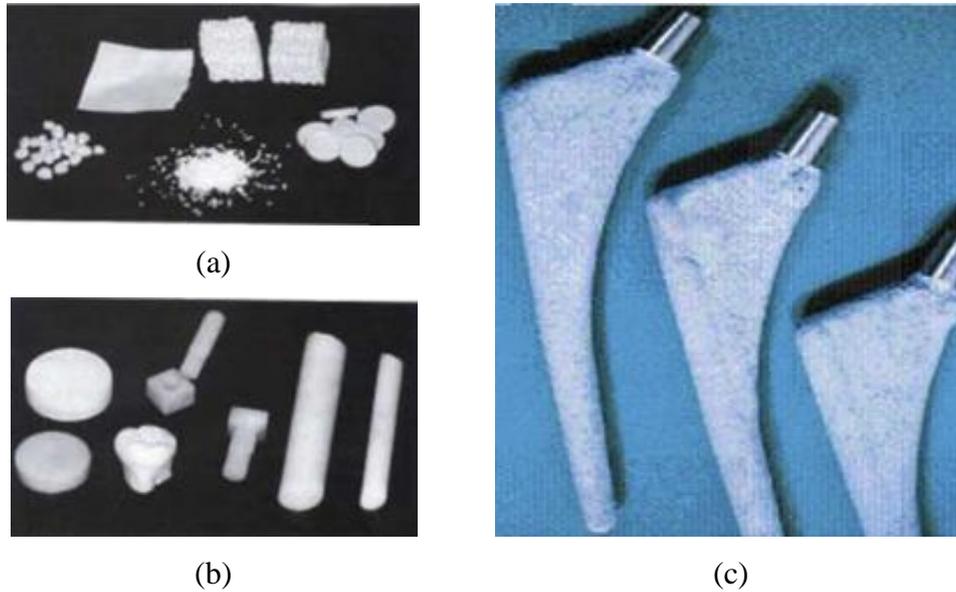
Figura 8 - Possíveis regiões do esqueleto humano de aplicações da HA, como enxerto de reposição óssea.



Fonte: Adaptado de MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005.

A Figura 9 ilustra diferentes *designs* possíveis para os enxertos ósseos à base de HA. Essas variações são devido aos diferentes esforços que os ossos são submetidos, de acordo com a sua localização no esqueleto. Sendo assim, o enxerto vai apresentar formato e tamanho específico, de acordo com o osso que ele está substituindo.

Figura 9 - Imagens ilustrando diferentes designs possíveis para materiais de enxerto ósseo, contendo HA.



(a) e (b) diferentes formas e tamanhos de HA. (c) bioimplantes revestidos com HA

Fonte: MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005.

4.5 Caracterização da HA

A caracterização de materiais é baseada na necessidade de encontrar padrões de comparação que possam ser estabelecidos para os materiais e permitir identificar as estruturas encontradas nos diversos níveis de organização e relacioná-las com fatores que influenciam na seleção de materiais, para proporcionar um melhor desempenho.

Existem várias técnicas utilizadas na caracterização dos materiais, dentre as quais podemos citar: a análise química por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; análise cristalina realizada por difração de raios X (DRX), análise microestrutural por microscopia eletrônica de varredura, complementada por meio da análise química utilizando detector de energia dispersiva (EDS) e o ensaio de distribuição granulométrica.

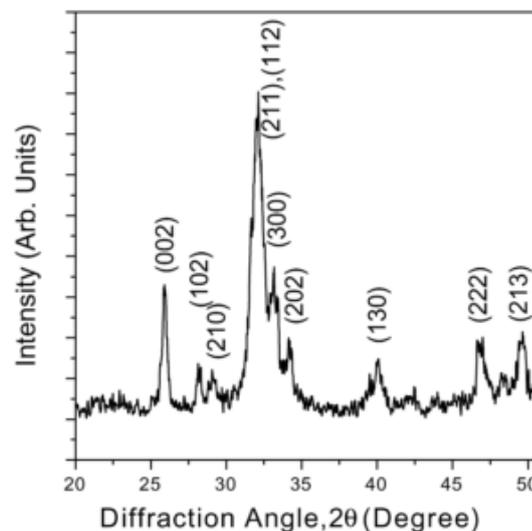
4.5.1 Ensaio de distribuição granulométrica

O ensaio de granulometria é o processo utilizado visando a determinação da percentagem em massa que cada faixa especificada de tamanho de partículas representa na massa total ensaiada. Através dos resultados obtidos desse ensaio é possível a construção da curva de distribuição granulométrica.

4.5.2 Difração de raios X (DRX)

A técnica de DRX permite a identificação das fases cristalinas de um material observado. Estes cristais constituem uma estrutura, espacialmente organizada, capaz de difratar um feixe de raio X (CANEVAROLO, 2007). A análise da difração de um material pode resultar na determinação da constituição das fases, do tamanho de cristalitos, da orientação preferencial dos cristais, entre outras características. Isto é possível pois cada material possui um arranjo cristalino único. A Figura 10 representa os picos padrões, característicos de uma amostra de HA.

Figura 10 - Padrão de difração de raios-X para a hidroxiapatita.



Fonte: PANDA et al., 2003

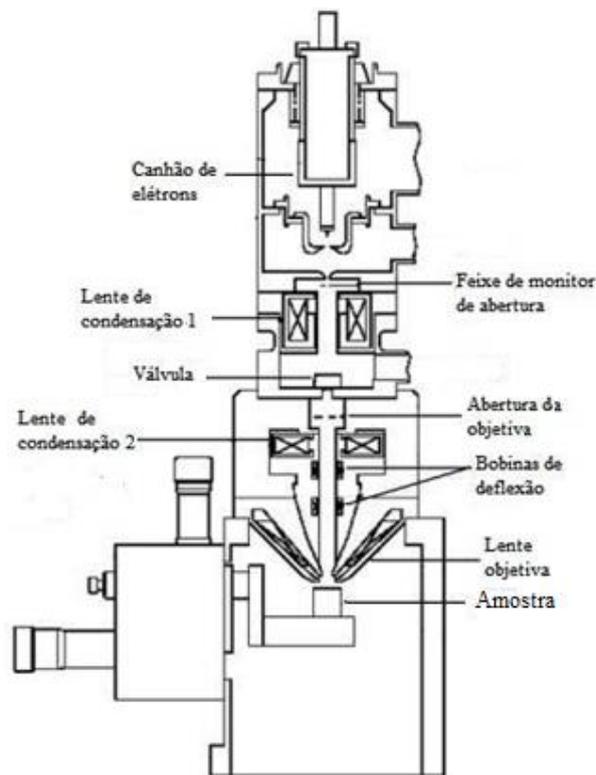
Na técnica de DRX é necessário possuir um gerador de raios X. Neste, uma fonte de feixe de elétrons acelerados, a partir de uma diferença de potencial, colide com um alvo metálico provocando a emissão dos raios-X. Os raios-X alcançam a amostra e observa-se a difração quando ocorre uma interferência construtiva entre os raios difratados (RATNER et al., 2004).

4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) a imagem é formada devido à interação do material analisado com um feixe de elétrons, oriundo de um filamento de tungstênio. O feixe

é acelerado através de uma diferença de potencial. No caminho dos elétrons, que consiste em uma atmosfera controlada de vácuo, o feixe eletrônico atravessa um sistema de lentes eletromagnéticas, diafragmas, a fim de reduzir o diâmetro do feixe e focalizá-lo sobre a superfície da amostra, e por bobinas. A função das bobinas é defletir o feixe e controlar a varredura. Por fim, o feixe incide na câmara onde a amostra se encontra, conforme ilustra o esquema da Figura 11 (ORÉFICE et al., 2006; CANEVAROLO, 2007).

Figura 11 - Representação de um microscópio eletrônico de varredura, destacando os seus principais componentes.



Fonte: Adaptado de HAFNER, 2007.

A MEV permite captar imagens amplificadas com aparência tridimensionais e que apresentam resoluções de até 0,5nm, com excelente profundidade de foco. Esta técnica possibilita obtenção de imagens biológicas. No entanto, é necessário fazer um tratamento prévio para que os resultados obtidos sejam coerentes com a realidade (CANEVAROLO, 2007).

Quando o material a ser analisado é não-condutivo, deve-se depositar uma fina camada de metal, para minimizar o acúmulo de carga negativa do feixe atômico. As amostras biológicas secas ainda devem passar por um processo de metalização para se tornarem condutoras e melhorarem a emissão dos sinais na câmara que comporta a amostra (CANEVAROLO, 2007).

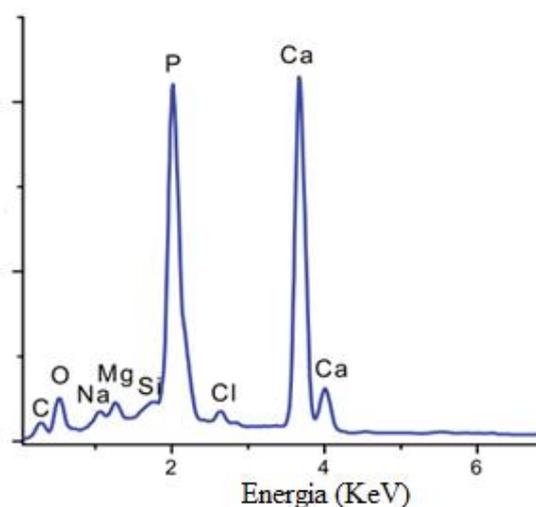
Esta técnica é utilizada para identificar as fases e segregações do material analisado, analisar fraturas e caracterização microestrutural (CANEVAROLO, 2007).

4.5.4 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A técnica de espectroscopia de energia de dispersiva (EDS) é utilizada em conjunto ao MEV, uma vez que os dois equipamentos são montados juntos. O EDS gera informações químicas da amostra analisada. As informações qualitativas e quantitativas sobre os elementos presentes são obtidas através da captação dos raios-X característicos. A análise química da amostra é dada em um espectro criado a partir da energia dos raios-X detectados e é convertida em contagem eletrônica através de um analisador multicanal. O espectro pode então ser observado, indicando a composição química da amostra (CAMPOS, 2009).

A Figura 12 ilustra um gráfico resultante de uma análise por EDS da HA. Por meio da relação atômica $Ca/P=1,67$ pode-se concluir que o gráfico é referente à uma amostra de HA.

Figura 12 - Determinação das espécies químicas presentes na HA, por análise elementar, usando espectroscopia de energia de dispersão



Fonte: Adaptado de RIVERA-MUÑOZ, 2011.

4.5.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

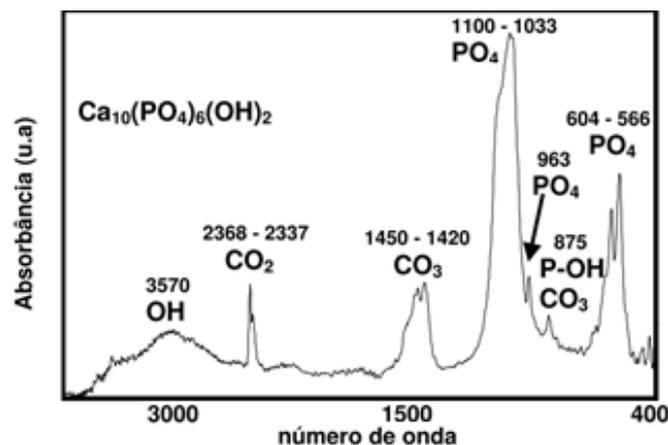
As análises de espectroscopia no infravermelho permitem observar moléculas orgânicas e inorgânicas na faixa de número de onda de 4.000 a 400 cm^{-1} . Esta técnica produz informações sobre a vibração das unidades atômicas e moleculares. Para ocorrer absorção da radiação no

infravermelho, uma molécula deve sofrer uma mudança no momento dipolo, devido à sua movimentação vibracional ou rotacional. Os momentos dipolo são criados pela distribuição das cargas nas moléculas e grupamentos químicos presentes nestas. Como as moléculas vibram e possuem momento dipolo, um campo é estabelecido e este pode interagir com o campo elétrico associado à radiação (CANEVAROLO, 2007).

A amostra é normalmente granulada e misturada a um material, brometo de potássio (KBr), que atua como matriz não-absorvente, diluindo-a (10% a 5% em peso). Através disso, aumenta-se a proporção do feixe de infravermelho que é refletido de forma difusa pelo material. Usando espectrômetros de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) pode-se obter uma grande melhora na razão sinal/ruído e na acurácia espectral (CAMPOS, 2009).

Por meio do espectro obtido pelo FTIR é possível de confirmar a fase da HA (Figura 13), por meio da presença de picos observados em 3573cm^{-1} e 631cm^{-1} , que são atribuídos ao grupo químico OH^{-1} . Picos na região de 600cm^{-1} e 1100cm^{-1} são devidos aos modos de dobramento e estiramento da ligação P-O do grupo fosfato, característicos da HA. O pico fraco de absorção em 880cm^{-1} pode ser atribuída à vibração P-O-H no grupo $(\text{HPO}_4)^{2-}$, que existe na HA não estequiométrica. O pico de vibração da $(\text{PO}_4)^{3-}$ são os presentes nas faixas de 603 e 568cm^{-1} (PANDA et al., 2003; COSTA, 2006; LARANJEIRA, 2012)

Figura 13 - Espectro FTIR de amostra de HA com os grupos funcionais e o número de onda evidenciados



Fonte: COSTA, 2006.

4.5.6 Ensaio de compressão

Para analisar as propriedades mecânicas de corpos de prova com elevada porosidade estrutural, é importante caracterizar o efeito da porosidade relacionado ao tamanho da

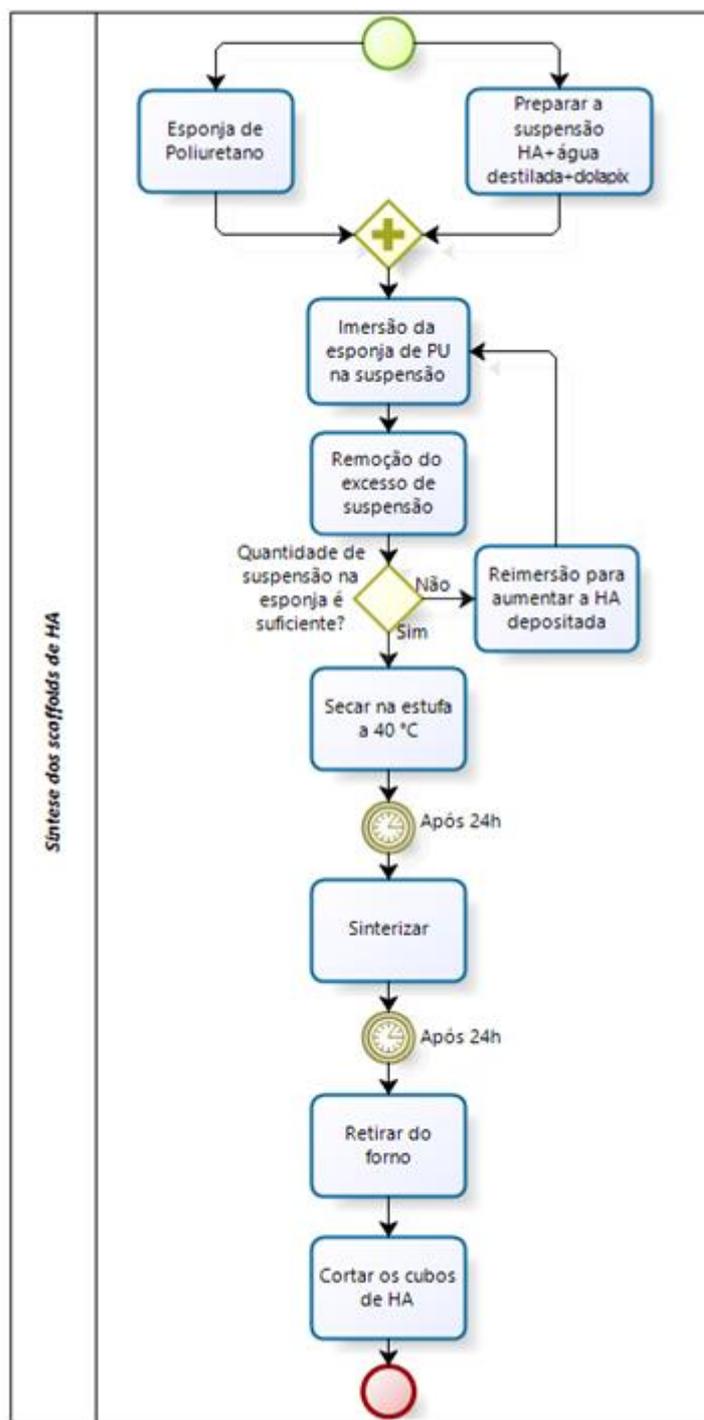
macroporosidade e a resistência à compressão. Isto deve ser feito para otimizar a compreensão da relação entre porosidade e resistência e para possibilitar um desenvolvimento de uma HA porosa que apresente propriedades mecânicas compatíveis às necessárias para o desenvolvimento da função do enxerto (COSTA, 2006; CANEVAROLO, 2010).

A carga média necessária para a ruptura do osso trabecular humano, derivado da região próxima da tibia, é de $(3,5 \pm 1,9)$ MPa. Os valores variam de acordo com a zona de extração da amostra: (1 a 15) MPa para osso trabecular da cabeça do fêmur, (3 a 23) MPa para osso cortical do platô da tibia (COSTA, 2006).

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

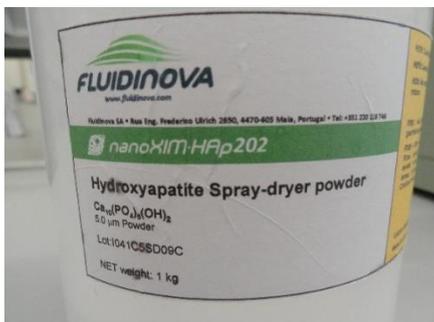
Neste trabalho foram fabricados grânulos cerâmicos de matriz porosa, a base de hidroxiapatita, utilizando-se um molde de poliuretano como matriz porosa, conforme detalhado na Figura 14.

Figura 14 - Fluxograma do processo de fabricação dos *scaffolds* de HA



Fonte: Própria autora

Figura 15 - Imagens de materiais e equipamentos utilizados no processamento dos *scaffolds* de hidroxiapatita



(a)



(b)



(c)



(d)



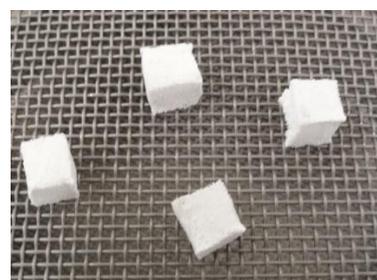
(e)



(f)



(g)



(h)

(a) pó de HA utilizado nos experimentos, (b) balança para pesagem da massa de HA, (c) backer e agitador magnético, (d) pipetas volumétricas automáticas, espátula e a massa de HA, utilizada na suspensão, (e) equipamentos utilizados na homogeneização da pasta de HA, (f) amostras, sobre uma base de alumina, dentro do forno usado no tratamento térmico, (g) conjunto de peneiras, utilizado para delimitar o tamanho dos grânulos, (h) grânulos sobre uma peneira antes do corte.

Fonte: Própria autora

Para a execução da rota de síntese, apresentada na Figura 14, foram utilizados os equipamentos e os principais materiais, ilustrados na Figura 15.

5.1 Materiais e Equipamentos

5.1.1 Hidroxiapatita

O pó cerâmico utilizado foi a hidroxiapatita, cedido pela Fluidinova S.A. (Maia-Portugal), com 5 μm de tamanho médio de partícula, segundo informado pelo fabricante. A caracterização do pó de HA foi feita por meio da espectroscopia de energia dispersiva (EDS), da microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o equipamento FEI Quanta 400 FEG; da difração de raio X (DRX), realizada com o difratômetro Rigaku Dmax-III-VC, da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), feita no espectrômetro System 2000 da Perkin–Elmer e da distribuição granulométrica, feita no analisador de partículas Cilas 1090.

5.1.2 Água deionizada

Utilizou-se a água deionizada como solvente da suspensão cerâmica.

5.1.3 Dispersante

O dispersante utilizado no preparo da suspensão de HA para promover a estabilização e homogeneização foi o Dolapix CE 64 (Zschimmer-Schwarz, Lahnstein, Alemanha). Ele é constituído por ácidos carboxílicos e possui um pH próximo de 7.

5.1.4 Moldes de poliuretano

Na fabricação das cerâmicas macroporosas utilizou-se matrizes tridimensionais de poliuretano cortadas no formato cúbico, com aproximadamente 10 mm de aresta.

A morfologia e a porosidade da esponja foram obtidas por meio das imagens adquiridas no MEV.

5.2 Síntese

A rota de síntese foi realizada, conforme descrito em trabalhos anteriores (LARANJEIRA, 2012). Os resultados apresentados pela pesquisadora foram os que mais se aproximaram dos objetivos desejados neste trabalho. Portanto, adotou-se o processamento descrito nesta tese.

5.2.1 *Procedimento*

As suspensões foram feitas em condições ambientes ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). A proporção, em massa, de material utilizado para prepará-las foi de 51,3% de HA, 46,2% de água e 2,5% de agente dispersante.

A) Diluição da hidroxiapatita no solvente

Pesar a hidroxiapatita e adicioná-la à água deionizada, sob agitação magnética, durante 20 min, para homogeneizar.

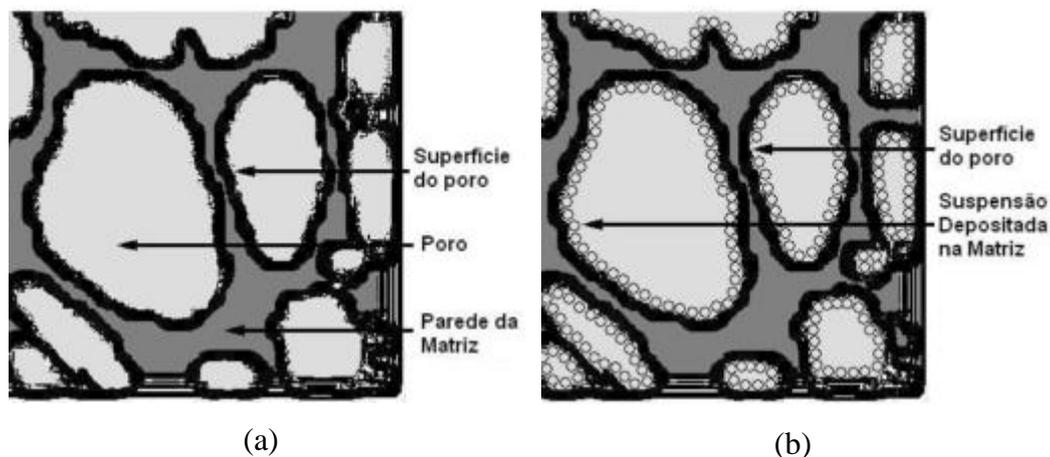
B) Adição do agente dispersante

Adicionar o dispersante. Paralelamente, adiciona-se também o restante da HA, mantendo a agitação vigorosa da suspensão, durante 15 minutos, aproximadamente, até homogeneizar.

5.2.2 *Imersão da esponja na suspensão*

Imediatamente após o preparo das suspensões de HA, as esponjas de PU foram imersas na suspensão, com auxílio de uma pinça. As esponjas foram comprimidas, para remover o ar contido na matriz, permitindo a entrada da suspensão em todo o interior da esponja de PU, obtendo-se assim um resultado conforme ilustrado no esquema da Figura 16. As esponjas foram colocadas em estufa a 40°C , durante 24 horas, para desidratação da suspensão.

Figura 16 - Esquema representativo da matriz polimérica, antes e depois da imersão na suspensão de HA.



(a) Antes, (b) depois da imersão na suspensão.

Fonte: COSTA, 2006

5.3 Tratamento térmico

Após a desidratação na estufa, as esponjas foram colocadas dentro do forno, sobre uma base de alumina (Figura 18), e submetidas ao tratamento térmico, durante 24h, de acordo com a Tabela 5 e o gráfico, representado na Figura 17.

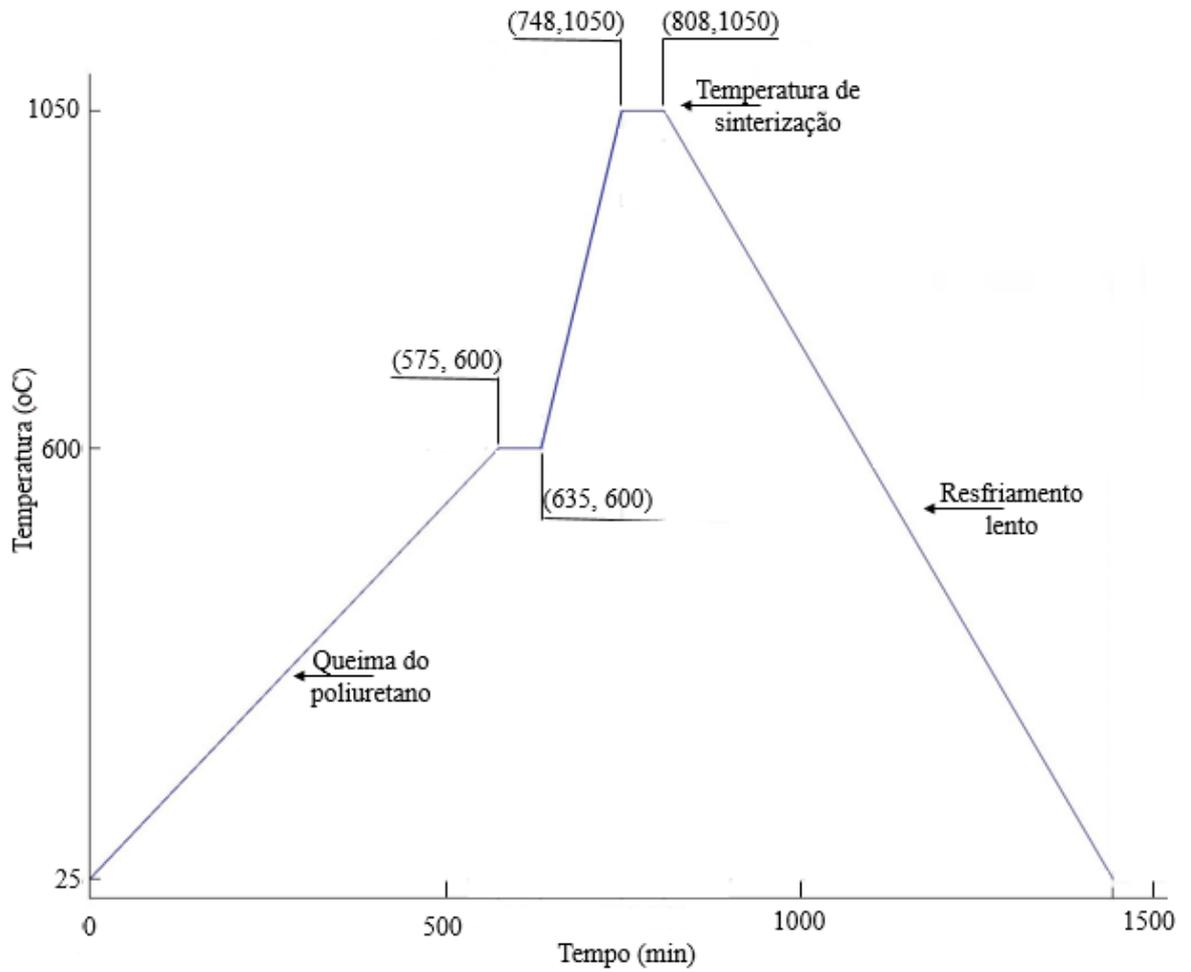
Tabela 5 - Variações da temperatura no tratamento térmico.

$T_{\text{inicial}} (^{\circ}\text{C})$	$T_{\text{final}} (^{\circ}\text{C})$	Tempo (min)
25	600	575
600	600	60
600	1050	113
1050	1050	60
1050	25	631

Fonte: Própria autora

A base de alumina foi utilizada para evitar uma possível contaminação e facilitar o manuseio das amostras, ao colocá-las e retirá-las do forno.

Figura 17 - Gráfico temperatura x tempo, utilizado no tratamento térmico.



Fonte: Própria autora.

Figura 18 - Imagem das amostras sobre uma base de alumina, dentro do forno de laboratório, utilizado no tratamento térmico.



Fonte: Própria autora.

5.4 Obtenção dos grânulos

Os cubos de HA foram transformados em grânulos logo após o tratamento térmico. Para isso, foram utilizadas uma série de peneiras, a fim de obter-se grânulos em uma mesma faixa granulométrica. Neste trabalho foram utilizadas peneiras 10 mesh e 14 mesh (série Tyler), de 1,70 mm e 1,18 mm de abertura, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 19 (a). Os cubos foram cortados com o auxílio de uma lâmina de aço cirúrgico.

Figura 19 - Imagens do conjunto de peneiras utilizadas no processamento dos *scaffolds* de HA.



(a) Especificações das peneiras utilizadas, (b) *scaffolds* sobre as peneiras, antes do corte.

Fonte: Própria autora.

5.5 Caracterização

5.5.1 Distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica do pó de HA foi obtida por meio do analisador de tamanho de partículas Cilas 1090 – *Particle Size Analyzer* (Figura 20), pertencente ao Laboratório de Caracterização de Materiais do Cefet-MG, usando o comprimento de onda de 635 a 830 nm, com faixa de operação de 0,04 a 500 μm . Para a análise, o pó de HA foi adicionado em água, contendo o mesmo agente dispersante (Dolapix CE 64, nome comercial para compostos do tipo PAA ou PMAA) utilizado na suspensão de HA.

Figura 20 - Imagem do analisador de partículas Cilas 1090



Fonte: Própria autora.

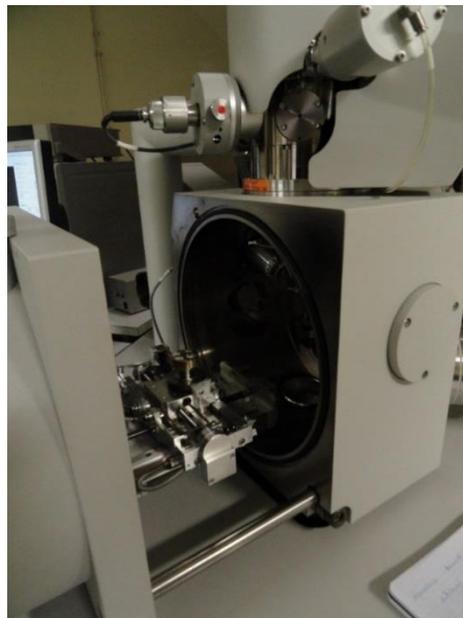
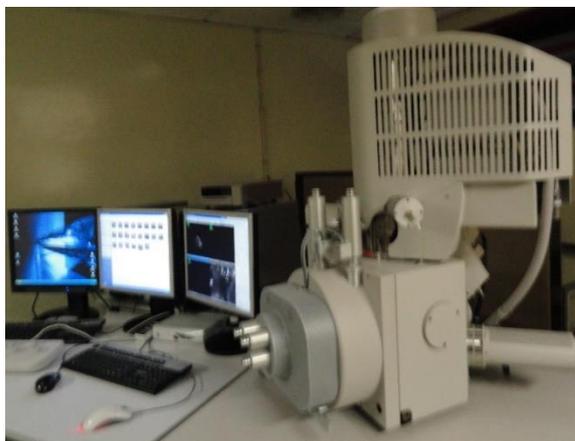
5.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de energia de elétrons

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no FEI Quanta 400 FEG ESEM / EDAX Genesis X4M (Figura 21). A preparação da amostra foi feita por meio da fixação dos grânulos de HA em um suporte de alumínio, aderidos no porta amostra com Araldite®.

Analisou-se, inicialmente, as amostras de pó de HA e grânulos de HA por EDS. Posteriormente, as amostras foram revestidas, por *sputtering*, com uma liga de paládio e ouro. O recobrimento foi feito para tornar a superfície condutora ao feixe de elétrons do MEV, evitando assim, a formação de carga estática. Desta forma, facilita-se a visualização da amostra durante o ensaio, diminuindo-se os ruídos da imagem.

O MEV foi utilizado para determinar a morfologia das amostras, o tamanho e a distribuição dos macro e mesoporos, usando o "Image J", como software de análise de imagem.

Figura 21 - Microscópio eletrônico de varredura utilizado na obtenção das imagens de MEV deste trabalho.



Fonte: Própria autora.

5.5.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectros de infravermelho foi feita em um sistema de FTIR 2000 da Perkin-Elmer (Figura 22), com resolução de 4 cm^{-1} e 100 varreduras, pertencente ao Instituto de Engenharia Biomédica (INEB). As amostras dos grânulos estudados foram previamente moídas com um almofariz de quartzo e adicionou-se 200 mg de KBr a cada 2 mg de HA. O pó obtido foi comprimido em uma matriz de aço e posteriormente analisado. Os espectros resultantes desta análise informam os principais grupos funcionais presentes nas amostras de HA, antes e depois do processamento.

Figura 22 - Aparelho utilizado na realização do FTIR, pertencente ao Instituto de Engenharia Biomédica (INEB).



Fonte: Própria autora.

5.5.4 Difração de raio X (DRX)

As amostras foram analisadas por DRX, antes e depois do processamento. Para execução da DRX utilizou-se uma radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54056$), com 2θ variando entre 4° e 80° e passo igual $0,02^\circ \cdot \text{s}^{-1}$. O equipamento utilizado foi o ilustrado na Figura 23, pertencente ao Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), localizado em Porto, Portugal.

Figura 23 - Equipamento utilizado na difração de raio X.



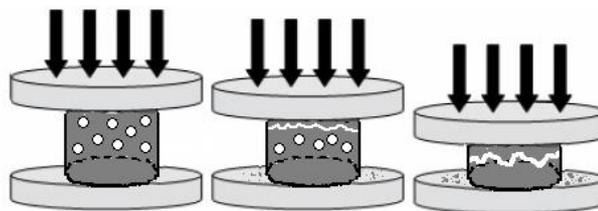
Fonte: Própria autora.

Para construção do gráfico e cálculo das frações das fases cristalina e amorfa das amostras foi utilizado o programa MATLAB. Inicialmente, calculou-se a área total sob o espectro da amostra. Em seguida, foi traçada a linha da base, construída por meio de uma cópia da linha base do difratograma. A partir disso, calculou-se a área entre a linha do espectro e a linha da base, que representa a porção cristalina do material. O cálculo da fase amorfa do material foi feito subtraindo-se a área total sob o gráfico da área correspondente à fase cristalina.

5.5.5 Ensaio de compressão

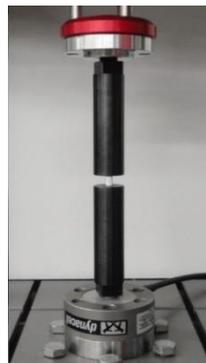
O ensaio de compressão foi feito utilizando-se corpos de prova cilíndricos, adaptando o previsto na norma ASTM C 1424 – 99 - *Standard Test Method for Monotonic Compressive Strength of Advanced Ceramics at Ambient Temperature*, com as seguintes dimensões: 4 mm de diâmetro e 8 mm de altura. O equipamento utilizado, pertencente ao Laboratório de Biomecânica do Porto (LABIOMEPE), para fazer os ensaios foi a máquina Instron Fast Track 8800, com uma célula de carga Dynacell Instron Série 2527 (Figura 25), de 2kN. O ensaio foi realizado sob o controle de um computador e a carga foi aplicada axialmente para as amostras com uma velocidade de cruzeta de $0,1\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$, até a ocorrência de uma falha frágil catastrófica, conforme esquematizado na Figura 24.

Figura 24 - Esquema do efeito dos poros durante o ensaio de compressão.



Fonte: Própria autora.

Figura 25 - Equipamento utilizado no ensaio de compressão das amostras de HA.



Fonte: Própria autora.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização dos materiais

6.1.1 Caracterização do pó de HA

A análise do tamanho de partícula da hidroxiapatita por granulometria a laser revelou que o pó é constituído por duas faixas granulométricas, uma na escala nanométrica e a outra na micrométrica, conforme detalhado na Figura 26 e resumido na Tabela 6.

Tabela 6 - Tamanho de partícula da hidroxiapatita

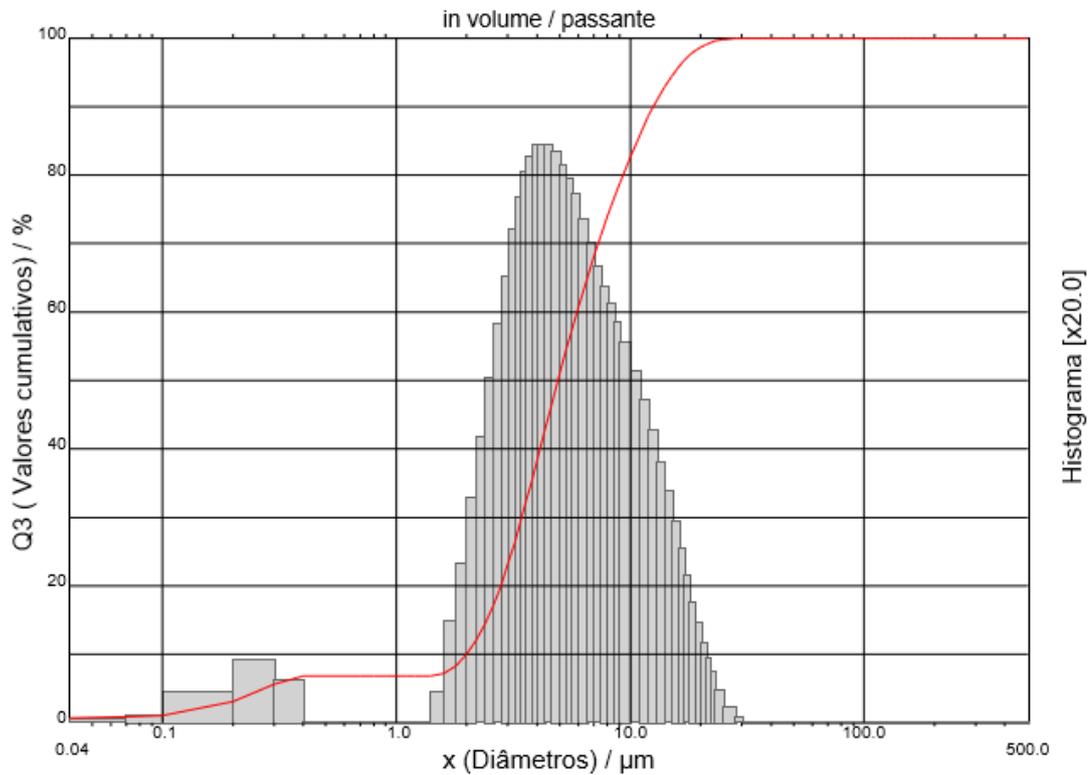
Faixas	Tamanho (μm)
d ₁₀	2,00
d ₅₀	4,91
d ₉₀	12,58
d _{médio}	6,19

Fonte: Própria autora.

A imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura do pó, da forma como recebida pelo fabricante, revelou uma distribuição de partículas tendendo ao formato esférico, conforme ilustrado na Figura 27, e o diâmetro apresentou uma ampla faixa de variação. A análise dessa figura mostrou que as partículas apresentaram tamanho entre 0,5 nm a 10 μm , aproximadamente, confirmando os resultados obtidos na análise por granulometria a laser.

O ensaio de espectroscopia de energia de elétrons realizado nesse aglomerado de partículas, cujo gráfico é mostrado na Figura 28, evidenciou os componentes majoritários cálcio (Ca) e fósforo (P) em picos intensos. Já os elementos carbono (C) e oxigênio (O) estão presentes em menor quantidade com os picos menos intensos. A razão molar obtida pela análise dos dados da Tabela 7 revelou um Ca/P de 1,64, valor menor que o esperado para a HA.

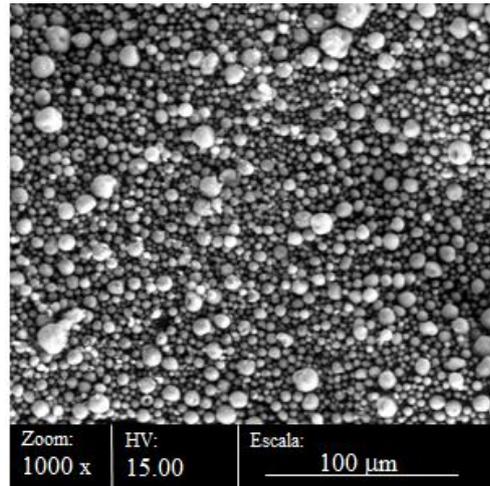
Figura 26 - Distribuição granulométrica da partículas de HA, analisadas com o uso de dispersante.



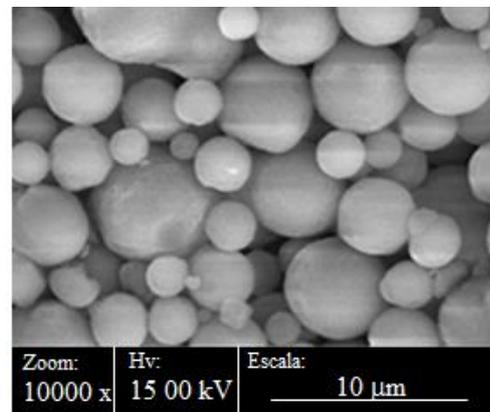
Fonte: Própria autora.

O pequeno pico de carbono na Figura 28 pode ser fruto da presença do grupo carbonato (CO_3^-), indicando que o material estudado é uma hidroxiapatita cálcio deficiente, assim como a maioria das HAs presentes nos meios biológicos (RIGO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2008). O carbonato substitui o fosfato (PO_4^{3-}) ou a hidroxila (OH^-) e a neutralidade das cargas é mantida por deficiência de Ca^{2+} ou pela substituição por Na^+ . Como não foi identificado nenhum íon Na^+ , podemos concluir que a presença do carbonato e a razão $\text{Ca/P} < 1,67$ confirmam que a HA estudada é cálcio deficiente.

Figura 27- Morfologia das partículas de HA, obtida pela análise em MEV



(a)



(b)

(a) Aumento de 1000 vezes, (b) aumento 10000 vezes.

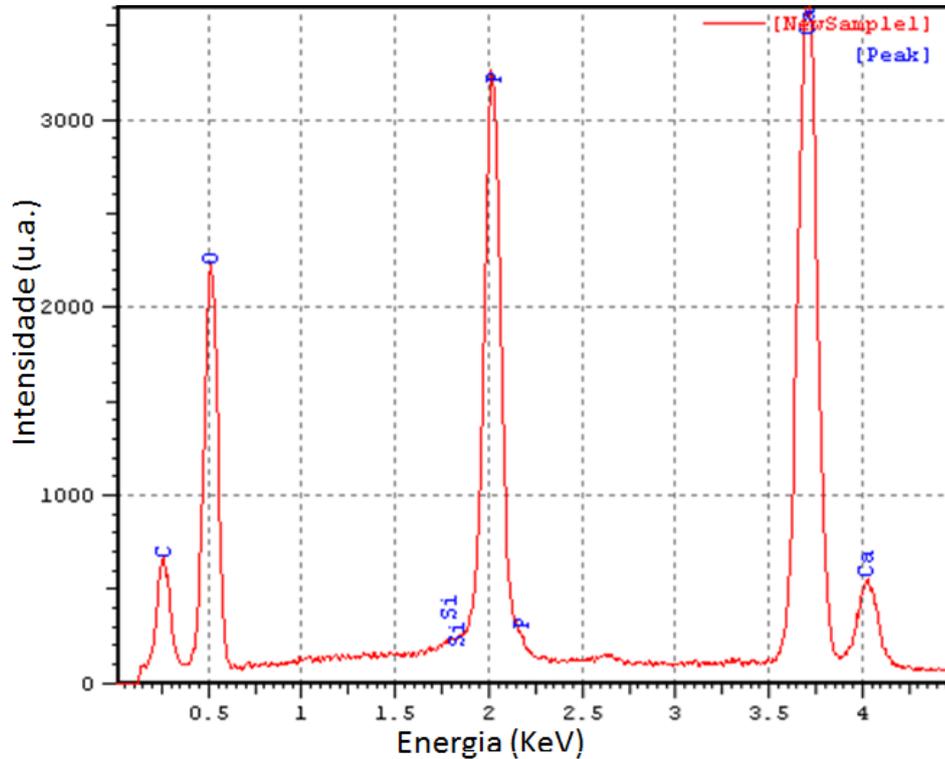
Fonte: Própria autora.

Tabela 7 - Quantidade de cada elemento químico presente na amostra analisada por EDS.

Elemento	%
C	18,34
O	53,36
Si	0,27
P	10,58
Ca	17,45

Fonte: Própria autora

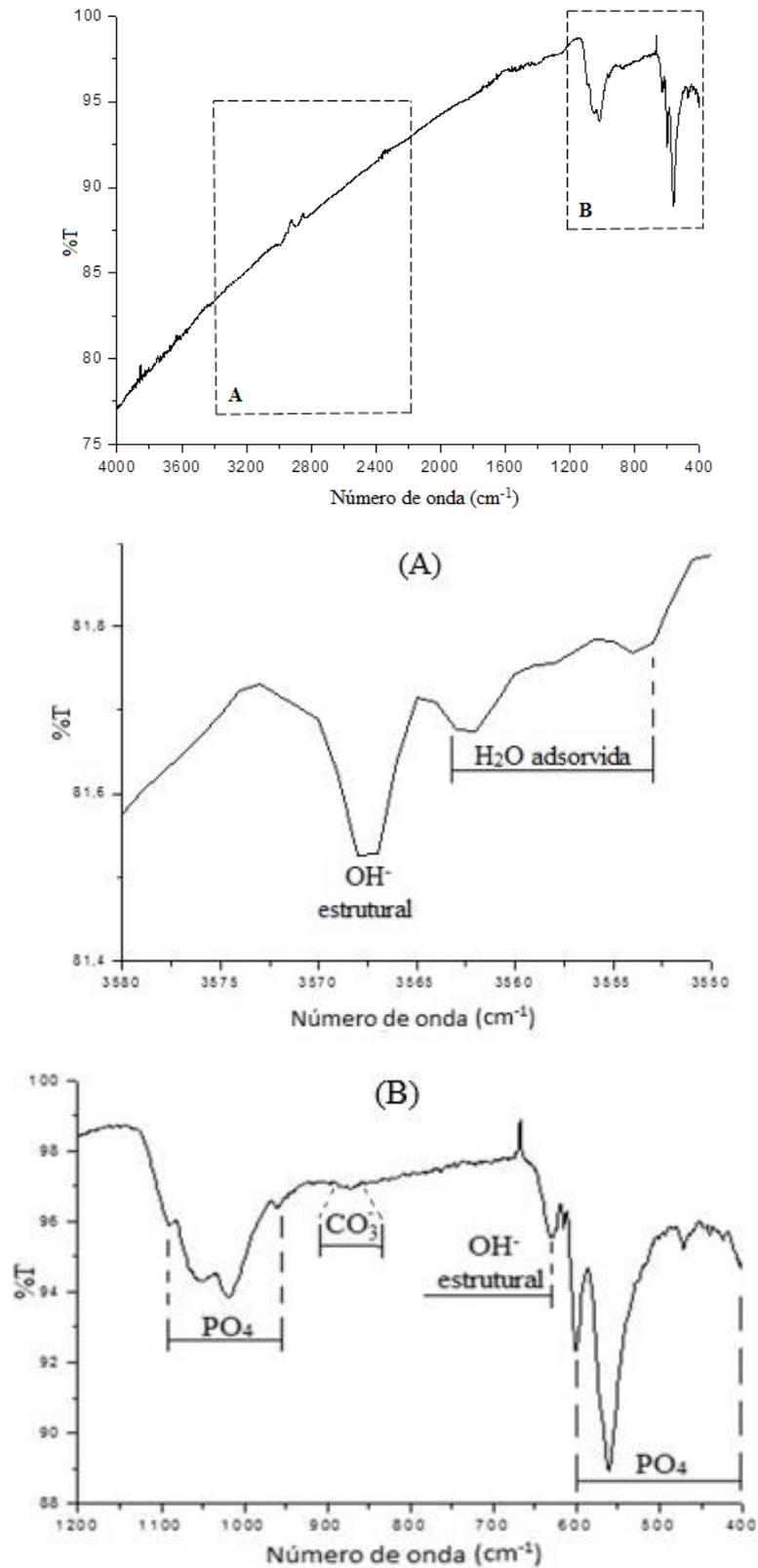
Figura 28 - Espectro de EDS mostrando picos referentes aos elementos detectados na HA estudada.



Fonte: Própria autora.

A Figura 29 ilustra o gráfico obtido na caracterização por espectroscopia de infravermelho da hidroxiapatita, que mostrou os principais modos de absorção característicos desse material, representados pelas bandas 471 cm^{-1} , 561 cm^{-1} , 600 cm^{-1} , 961 cm^{-1} , 1029 cm^{-1} , 1090 cm^{-1} , referentes ao grupo PO_4^{3-} , as bandas 631 cm^{-1} e 3568 cm^{-1} , do grupo OH^- e 873 cm^{-1} do grupo CO_3^- , conforme indicado na comparação feita na Tabela 8. A inclinação do gráfico Figura 29, a partir do comprimento de onda 1200 cm^{-1} , é um indicativo de água adsorvida no material (LARANJEIRA, 2012).

Figura 29 - FTIR do pó de HA.



Os gráficos (A) e (B) são ampliações das regiões de ocorrência dos principais picos.

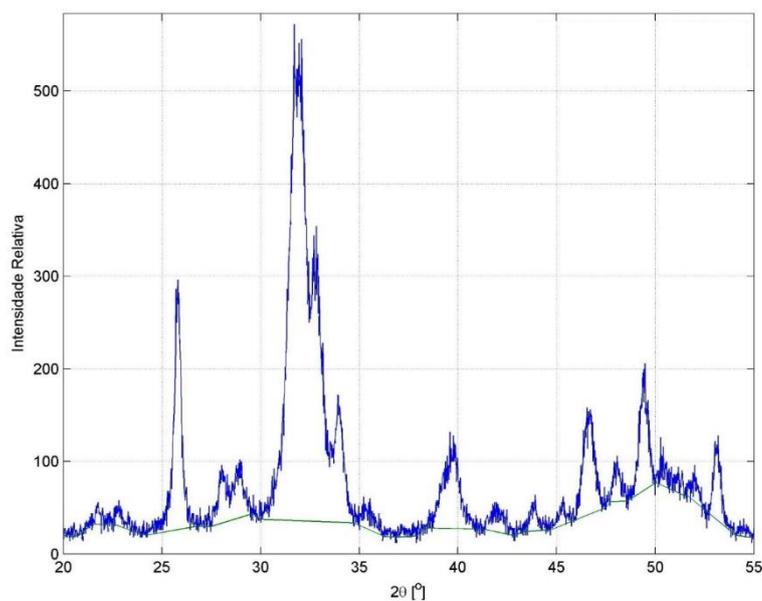
Fonte: Própria autora.

Tabela 8 - Comparação do FTIR do pó de HA com valores descritos na literatura.

Grupos característicos	Número de onda (cm ⁻¹) (adaptado de PANDA et al., 2003)	Número de onda (cm ⁻¹) do pó de HÁ
PO ₄ ³⁻	473	471
PO ₄ ³⁻	565	561
PO ₄ ³⁻	574	-
PO ₄ ³⁻	603	600
OH ⁻	632	631
CO ₃ ⁻	873	873
PO ₄ ³⁻	961	961
PO ₄ ³⁻	1031	1029
PO ₄ ³⁻	1092	1090
OH estrutural	3568	3568

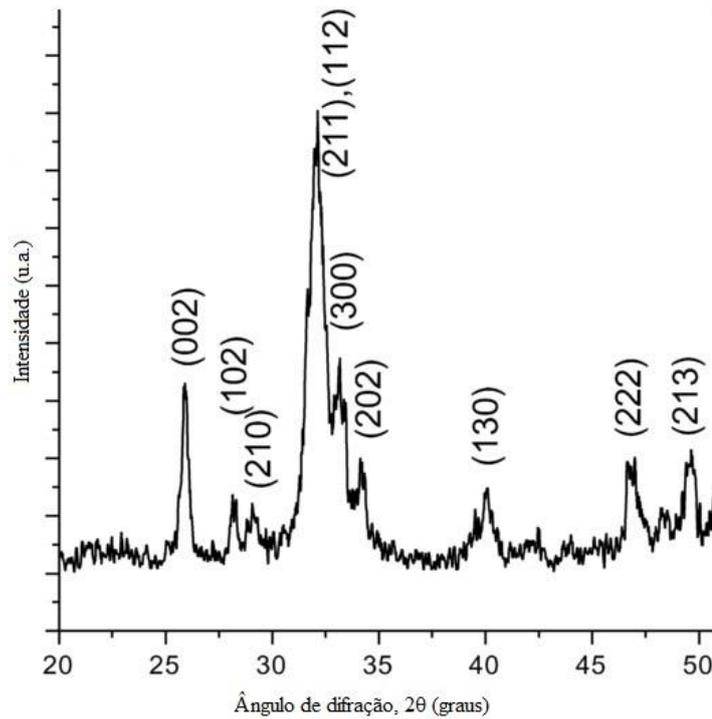
Fonte: Própria autora.

A Figura 30 ilustra um perfil típico da difração de raio X da HA, uma vez que segue o padrão descrito na literatura, como exemplificado na Figura 31. A análise da Figura 30 revelou que o material apresenta fases amorfas e cristalinas, com valores de 38% e 62%, respectivamente, calculados por meio das áreas sob o gráfico.

Figura 30 - Padrão de DRX obtido para o pó de HA.

Fonte: Própria autora.

Figura 31 - Padrão de DRX de uma hidroxiapatita, obtido na literatura.



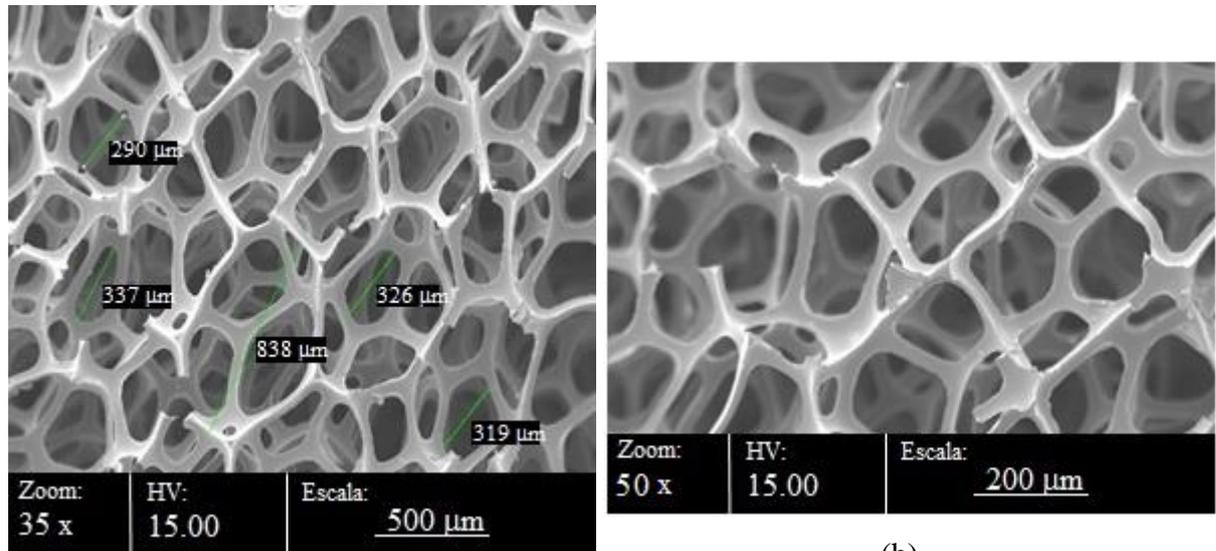
Fonte:(PANDA et al., 2003).

6.1.2 Caracterização do molde de poliuretano

A espuma de poliuretano foi utilizada como matriz para a fabricação da estrutura cerâmica tridimensional, visando à obtenção de um design semelhante à estrutura do osso esponjoso, conforme representado na Figura 3. Sendo assim, a morfologia deste poliuretano tem um papel decisivo nas características finais da biocerâmica produzida.

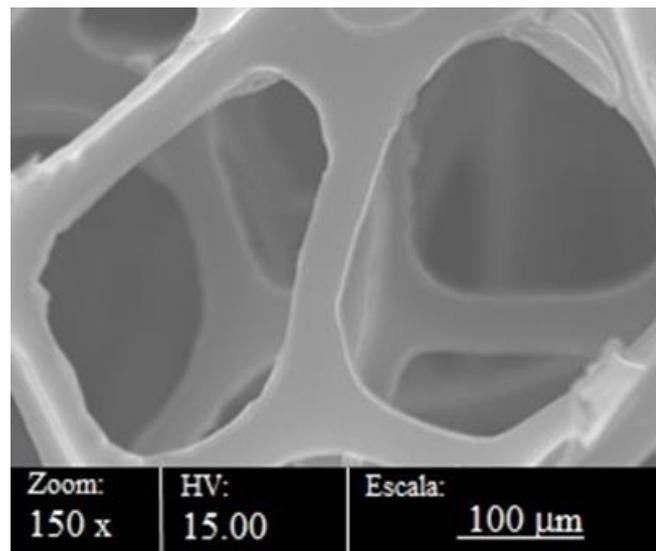
As imagens contidas na Figura 32 mostram que o PU utilizado apresenta uma morfologia tridimensional, cujo diâmetro aproximado dos poros é de 600 μm e a interconectividade entre os poros variam de 250 a 340 μm . A espessura média da parede do poro é de 50 μm e os poros possuem um formato arredondado.

Figura 32 - MEV da esponja de poliuretano com morfologia tridimensional e diâmetro de poro de 600 μm , aproximadamente.



(a)

(b)



(c)

Em (a) o aumento utilizado foi de 35 vezes, (b) 50 vezes e (c) 150 vezes.

Fonte: Própria autora.

6.2 Suspensão

As suspensões com alta concentração de sólido, como as estudadas neste trabalho, foram estabilizadas por meio da adição de dispersantes, buscando diminuir a viscosidade da suspensão, possibilitando a distribuição homogênea por toda a matriz de PU (COSTA, 2006).

O dispersante utilizado na suspensão de hidroxiapatita foi o DOLAPIX CE 64. De acordo com a literatura (VAZ et al., 1999), o D64 melhora a densidade do *scaffold* de HA. O efeito defloculante do D64 é resultado de uma troca de cátions do aditivo com a cerâmica, e a influência sobre a dupla camada elétrica das partículas é associada a esta troca (ZSCHIMMER, SCHWARS, 2013). No entanto, quando utilizado em grandes quantidades, ele pode comprometer a porosidade do *scaffold*.

Por meio da observação de testes das quantidades de D64 utilizadas, percebeu-se que, fixando-se a quantidade de água, se o percentual de dispersante usado fosse maior que o escolhido, o *scaffold* resultante teria uma porosidade não homogênea. Isso aconteceu devido à concentração da suspensão na base do *scaffold*, após a secagem causado pela ação da gravidade sobre a suspensão de baixa viscosidade. O resultado foi uma matriz excessivamente porosa na parte superior do *scaffold* e na inferior a matriz não foi replicada, pois os poros foram preenchidos com o excesso de suspensão, oriundo da parte de cima da cerâmica. Ao utilizar menos dispersante, a suspensão ficou muito viscosa e não preencheu toda a matriz, de modo que o *scaffold* resultante não replicou a porosidade, uma vez que os poros superficiais do polímero foram preenchidos com a suspensão e no interior havia vários vazios. O *scaffold*, nesse caso, apresentou uma resistência, aparentemente, maior que os outros, porém a porosidade não condizia com o objetivo deste trabalho.

Desta forma, é importante utilizar a quantidade adequada de D64 para obter-se o equilíbrio entre a densidade e a porosidade necessária. Além disso, o uso do D64 auxilia na dispersão do pó de hidroxiapatita (ZSCHIMMER & SCHWARS, 2011).

Após as análises da caracterização feitas nas amostras do material em estudo, é possível concluir que o dispersante e a quantidade escolhidos foram apropriados, uma vez que a morfologia pretendida foi alcançada.

6.3 Imersão

Esta etapa do processamento dos grânulos é decisiva para a porosidade final do material. Uma quantidade excessiva de suspensão resulta em grânulos pouco porosos, uma vez que os poros da matriz de PU serão totalmente preenchidos. Este não é o alvo deste trabalho, pois a baixa porosidade dificulta o crescimento ósseo, que deixa de atuar como reforço do material e por isso não consegue cumprir o objetivo de algumas das aplicações propostas para este material, como enxerto ósseo e a liberação controlada de fármaco, por exemplo. Já quando a

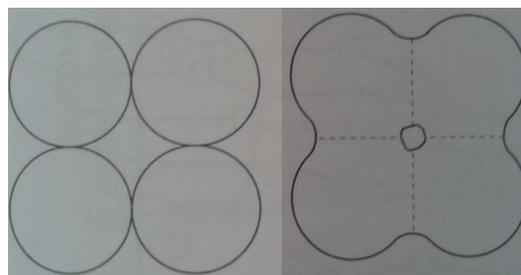
quantidade de suspensão imersa, recobrimo a superfície da espuma de poliuretano, é insuficiente, os grânulos serão demasiadamente porosos. As paredes que delimitam a macroporosidade dos grânulos também serão muito porosas, resultando em um material com baixíssima resistência mecânica, susceptível à fratura pela simples manipulação. Para evitar a deposição excessiva de HA no poliuretano, foi desenvolvida uma suspensão com a viscosidade adequada, de maneira a permitir que a suspensão permeie por todo o volume da matriz de poliuretano, sem ocorrer segregação da suspensão para a parte inferior do material. Além disso, imediatamente após a imersão, fez-se uma compressão suave nas amostras, com o auxílio de espátulas, forçando a saída do excesso de suspensão dos poros. Estes procedimentos possibilitaram uma deposição mais homogênea e específica nas paredes dos poros da matriz, copiando a forma porosa da esponja.

De outra forma, a quantidade insuficiente de suspensão na matriz, foi evitada realizando-se imersões sucessivas da espuma de PU na suspensão. Isso foi feito após observar que uma única imersão resultava em cobertura insuficiente dos poros da matriz. A realização de imersões sucessivas resultou em recobrimento mais eficiente da matriz.

6.4 Tratamento térmico

O objetivo do tratamento térmico foi remover os solventes presentes na biocerâmica depositada na parede. Além disso, ele visou queimar a matriz de poliuretano e o aditivo usado na fabricação da suspensão e fornecer energia térmica para promover a densificação do material, com o objetivo de obter resistência suficiente para que o material desempenhe devidamente suas funções nas aplicações propostas.

Figura 33 - Representação da sinterização.



(a)

(b)

(a) partículas antes do tratamento térmico, (b) estrutura sólida após o tratamento térmico.

Fonte: Adaptado de PRUITT, CHAKRAVARTULA, 2011.

Para a remoção do solvente e a queima da matriz de PU utilizou-se uma taxa de aquecimento lenta, igual a $1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, até atingir $600\text{ }^{\circ}\text{C}$. A escolha desta taxa foi feita a fim de evitar a ruptura das amostras e impedir contração abrupta da estrutura e ruptura. O patamar em 1050°C tem a função de promover a formação e aumento progressivo dos pontos de contato das partículas de HA, conforme ilustrado no esquema da Figura 33 e na microscopia eletrônica do *scaffold* da Figura 34 (b). A consequência esperada disso no desempenho do *scaffold* é o aumento da resistência.

6.5 Caracterização dos *scaffolds*

Após o tratamento térmico nos *scaffolds*, os resultados obtidos foram influenciados em grande parte pelo processamento cerâmico, em especial àquele relacionado com viscosidade da suspensão durante a deposição da camada cerâmica nas paredes da matriz polimérica.

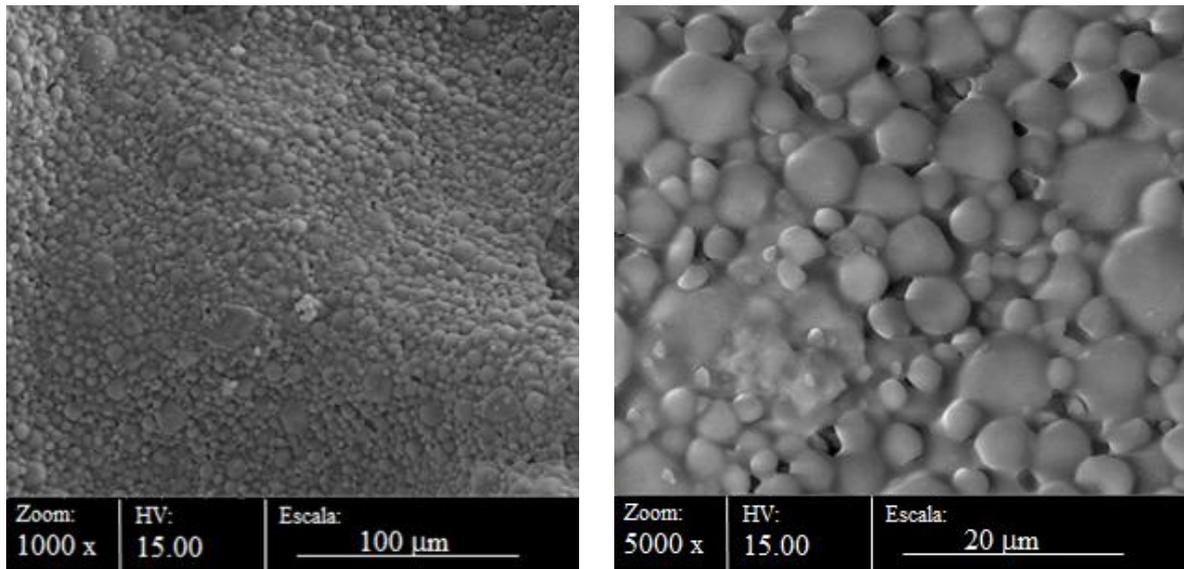
Os ensaios descritos abaixo mostram as mudanças no material proporcionadas pelo processamento cerâmico e tratamento térmico.

6.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia de elétrons (EDS)

A morfologia, a macro e microestrutura das amostras foram analisadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras de HA, tratadas termicamente, apresentam uma estrutura altamente macroporosa (Figura 35(a)) totalmente interligada (Figura 34), conforme recomendado na literatura (LANZA et al., 2007), permitindo o crescimento e a nutrição celular.

Pela análise de MEV também foi possível observar que os grânulos de HA mantiveram a morfologia de aglomerados esféricos inicial (Figura 34). Além disso, a estrutura não entrou em colapso durante o tratamento térmico. Nessa etapa foram formadas pequenas áreas de contato entre as partículas, indicando a ocorrência da consolidação (Figura 34 (b)), uma vez que o particulado fino foi submetido a um tratamento térmico de $1050\text{ }^{\circ}\text{C}$, que é inferior às temperaturas capazes de promover a densificação. Entretanto, essa temperatura ($1050\text{ }^{\circ}\text{C}$) não promove uma alteração de fase da HA, que é estável até $1360\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 34 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de HA.



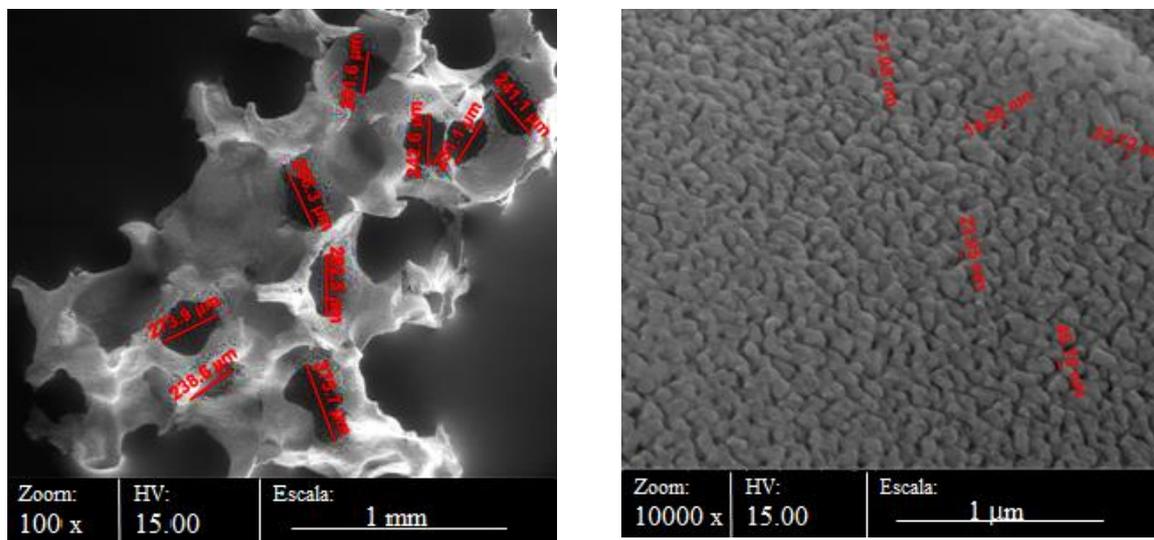
(a)

(b)

(a) ampliação de 1000 vezes, (b) e de 5000 vezes.

Fonte: Própria autora.

Figura 35 - Imagens dos grânulos de HA, obtidas por MEV, destacando medidas de macroporosidade e mesoporosidade.



(a)

(b)

(a) destaque de macroporosidades, (b) destaque de mesoporosidades.

Fonte: Própria autora.

As imagens obtidas permitiram a visualização do tamanho dos meso e macroporos (Figura 35 (a) e (b), respectivamente). De acordo com as medidas feitas, os macroporos podem variar de 201,6 µm a 375,7 µm de diâmetro aproximado. Já os mesoporos podem medir de

14,58 nm a 46,7 nm de diâmetro aproximado. A Figura 35 ilustra que foi alcançada a replicação da morfologia do molde de poliuretano, conforme esperado.

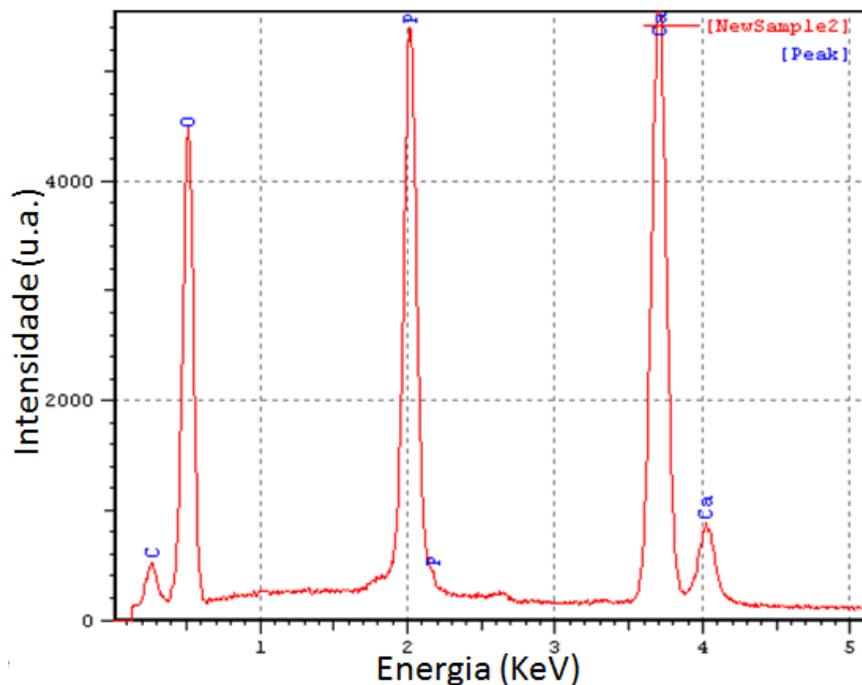
O ensaio de espectroscopia de energia de elétrons realizado nos *scaffolds*, cujo gráfico é mostrado na Figura 36, evidenciou os componentes majoritários cálcio (Ca) e fósforo (P) em picos intensos. Já os elementos carbono (C) e oxigênio (O) estão presentes em menor quantidade, com os picos menos intensos. A razão molar, obtida pela análise dos dados da Tabela 9, revelou um Ca/P de 1,65.

Tabela 9 - Quantidade de cada elemento químico presente nos *scaffolds* analisada por EDS.

Elemento	%
C	8,42
O	61,53
P	11,26
Ca	18,62
Sr	0,17

Fonte: própria autora.

Figura 36 - Espectro de EDS mostrando os picos do *scaffold*.

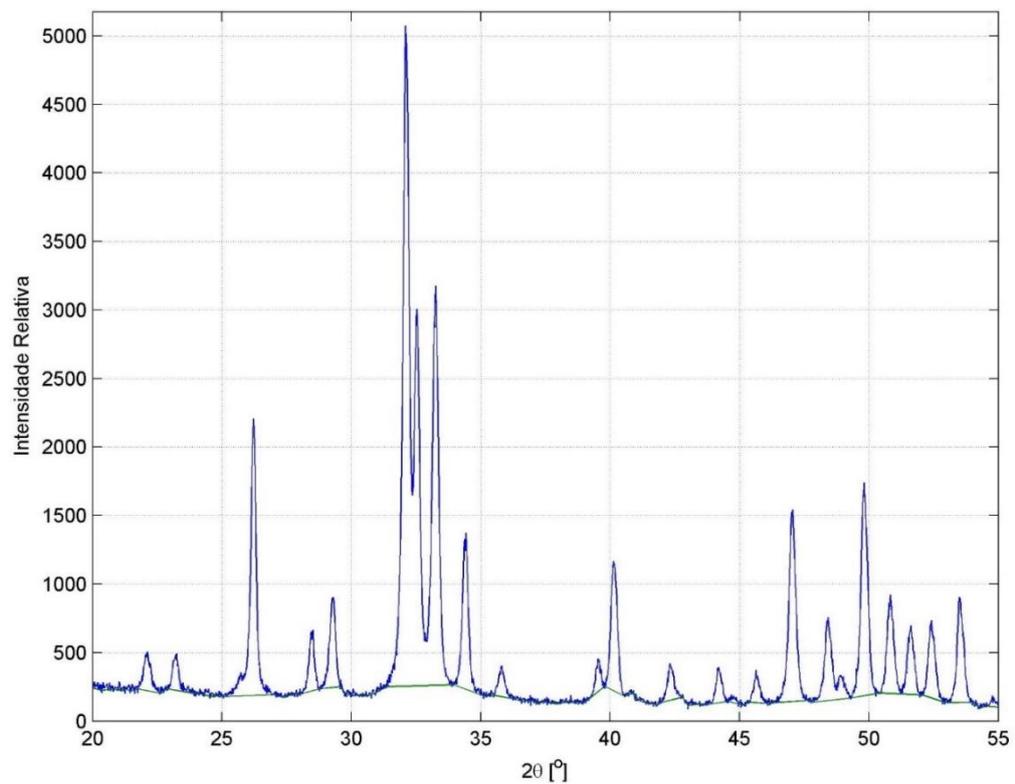


Fonte: Própria autora.

6.5.2 Difração de raio X (DRX)

A técnica de DRX revelou que a amostra analisada corresponde à hidroxiapatita (Figura 37). Comparando a difração de raio X das amostras antes e depois do tratamento térmico (TT), foi observado que, após o TT, o material tornou-se mais cristalino. A fração amorfa e cristalina dos grânulos de HA foi calculada por meio da área das curvas do gráfico da Figura 37 e equivalem a 31% e 69%, respectivamente.

Figura 37 - Padrão de DRX dos scaffolds de HA.



Fonte: Própria autora.

6.5.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier dos grânulos

A presença dos grupos PO_4^{3-} nas bandas 473 cm^{-1} , 563 cm^{-1} e 599 cm^{-1} do OH^- nas bandas 629 cm^{-1} e 3572 cm^{-1} , característicos da HA, foram confirmados, conforme detalhado na Tabela 10. A diminuição da inclinação da curva do gráfico na região cujas ordenadas variam de 4000 a 1600 cm^{-1} , na Figura 38 indica que o tratamento térmico reduziu a quantidade de água adsorvida no material.

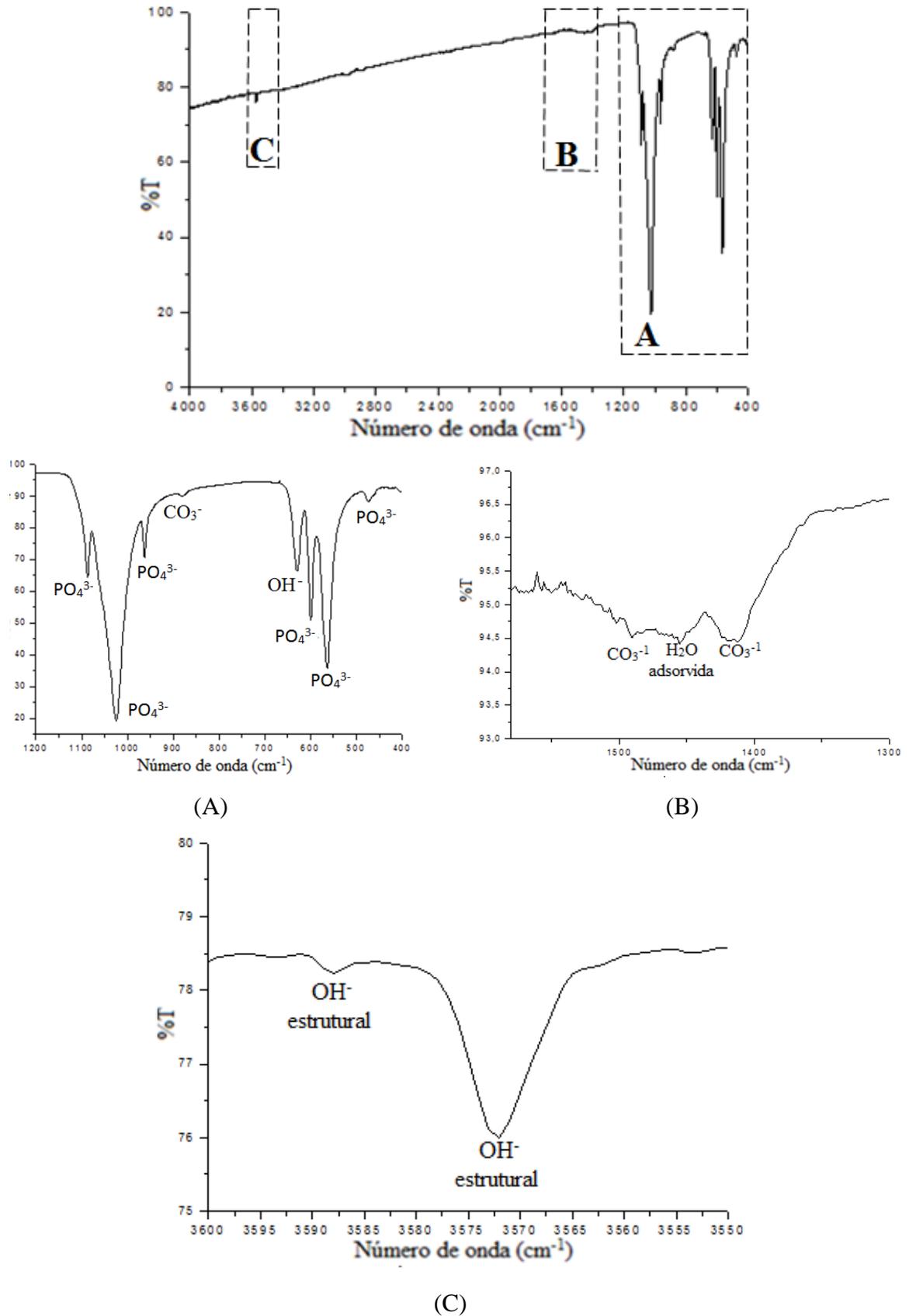
Além disso, o espectro sugere que a HA utilizada possui o carbonato como substituinte devido à presença das bandas nos números de onda de 880 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} e 1460 cm^{-1} , que são indicativos da substituição de íons de carbonato (STOCH et al., 2000), confirmando a hipótese de que a hidroxiapatita em questão é cálcio deficiente.

Tabela 10 - Comparação do FTIR dos grânulos de HA com valores descritos na literatura.

Grupos característicos (PANDA et al., 2003)	Número de onda (cm^{-1}) (adaptado de PANDA et al., 2003)	Número de onda (cm^{-1}) dos grânulos de HA
PO_4^{3-}	471	473
PO_4^{3-}	565	563
PO_4^{3-}	604	599
OH^- estrutural	635	629
CO_3^-	873	880
PO_4^{3-}	961	963
PO_4^{3-}	1031	1025
PO_4^{3-}	1096	1089
CO_3^-	1420	1420
CO_3^-	1480	1460
OH^- estrutural	3568	3572

Fonte: Própria autora.

Figura 38 - FTIR dos grânulos de HA.



(A), (B) e (C) são ampliações das regiões de ocorrência dos principais picos.

Fonte: Própria autora.

6.5.4 Ensaio de compressão

Os resultados obtidos neste ensaio estão representados na Tabela 11 e a resistência à compressão que o material apresentou foi de 2,1 MPa, aproximadamente. Em um estudo encontrado na literatura (KWON et al., 2002) observou-se que a resistência à compressão da HA, produzida pelo método de imersão de uma matriz em uma suspensão, pode variar de 0,3 a 3,3 MPa para materiais com porosidade em uma faixa entre 95 e 65%, respectivamente. Isso sugere que a resistência à compressão, descrita na Tabela 11, está coerente com os dados encontrados na literatura. No entanto, se comparado a valores da resistência à compressão suportada pelo osso natural (10 a 50 MPa (LANZA et al., 2007)), este valor precisa ser maior.

Uma possível solução para essa propriedade mecânica insuficiente para a aplicação proposta seria a incorporação de micropartículas de HA em um *scaffold* de material polimérico, conforme observado em alguns exemplos na literatura. O poliácido lático (PLGA) é um exemplo de material que pode ser usado como matriz em uma espuma compósita de PLGA e cristais de HA. Segundo os resultados descritos por Hollister (HOLLISTER, 2005), estes *scaffolds* exibem resistência à compressão, que podem variar de 10 a 10000 MPa, de acordo com o percentual de HA utilizado no compósito.

Tabela 11 - Resistência a compressão das amostras de HA

Amostra	Resistência compressiva (MPa)
1	3,1
2	1,1
3	2,4
4	2,2
5	1,5
6	2,4
Média	2,1
Desvio padrão	0,63

Fonte: Produzido pela autora

7 CONCLUSÕES

Os experimentos, os resultados e a discussão, realizados neste trabalho, nos permite estabelecer algumas conclusões.

A HA utilizada na síntese dos grânulos foi caracterizada como cristalina, contendo 64% do material nesta fase. Ela possui um tamanho médio de partícula de aproximadamente 6 μm e apresenta uma morfologia regular. Estão presentes duas faixas granulométricas, das quais 7% é manométrica e 93% é micrométrica. O EDS detectou a presença de carbono, indicando a presença dos íons carbonato e permitiu o cálculo da razão Ca/P igual a 1,64 e, por isso, essa HA pode ser usada em aplicações biológicas e com características favoráveis para a biodegradação. A análise de FTIR confirmou que o material utilizado é HA cálcio deficiente, devido à presença dos íons carbonato. A DRX revelou os picos característicos da HA.

As suspensões com alta concentração de pó foram capazes de escoarem, devido ao uso do dispersante adequado, recobrirem os moldes de PU utilizados e promoveram uma reprodução da forma do molde.

O ciclo térmico utilizado no tratamento térmico dos grânulos foi apropriado para a aplicação proposta ao material, uma vez que manteve a forma moldada e promoveu um aumento da resistência à compressão da estrutura resultante.

Os *scaffolds* apresentaram porosidade adequada para o crescimento celular, com macroporos variando de 201,6 μm a 375,7 μm , aproximadamente. Eles são predominantemente cristalinos (69%) e apresentam um Ca/P igual a 1,65. Além disso, o DRX, o FTIR e o EDS confirmaram que o material não sofreu alteração de fase no tratamento térmico e permaneceram na fase dos fosfatos de cálcio correspondente à HA.

O método de processamento adotado neste trabalho mostrou-se efetivo para a síntese de biomateriais aplicados como enxertos ósseos. Isso é uma consequência da estrutura altamente porosa, que permite o crescimento e a ancoragem de próteses ao osso adjacente, além de receber o suprimento de sangue e de nutrientes.

Referências Bibliográficas

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, v. 10, n. 2, p. S96-S101, 2001.

CANEVAROLO J., S., V., et al. Técnicas de caracterização de polímeros. **Artliber, São Paulo**, v. 430, 2007.

CAMPOS, D. M. **Produção e caracterização de colágeno tipo I e de compósitos hidroxiapatita-colágeno para regeneração óssea**. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE.

CASTRO, M. **Tecido ósseo**. Disponível em: <<http://tecciencia.ufba.br/corpo-humano/blog/tecido-osseo>>. Acesso em 10 de jun. 2013, 21:30:15.

COSTA, F.N.D. **Retrato das Condições de Saúde em 2010**. Disponível em: <<http://fernandonogueiracosta.wordpress.com/2012/12/19/retrato-das-condicoes-de-saude-em-2010/>>. Acesso em: 02 de jan. 2014, 10:13:25.

COSTA, H.D.S. **Síntese, Caracterização e Avaliação do Comportamento Degradativo de Híbridos Porosos de Poli (Álcool Vinílico)/Vidro Bioativo**. 2010. 145 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia da UFMG, Belo Horizonte.

COSTA, H. D. S. **Fabricação de biocerâmicas de matriz porosa com estrutura em alumina, recobrimento superficial de fosfato de cálcio e zinco incorporado à superfície**, 2006. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Escola de Engenharia da UFMG, Belo Horizonte.

FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J.; MANUEL, C. M. Hydroxyapatite nanoparticles : A review of preparation methodologies. **Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics**, v. 2, n. 2, p. 74–80, 2004.

FERREIRA, C.; PATERLINI, P. **Propriedades mecânicas em flexão e torção do osso cortical bovino**, 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro.

FICAI, A.; ANDRONESCU, E.; VOICU, G.; FICAI, D. Advances in Collagen / Hydroxyapatite Composite Materials. In **Advances in Composite Materials for Medicine and Nanotechnology**. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/advances-in-composite-materials-for-medicine-and-nanotechnology/advances-in-collagen-hydroxyapatite-composite-materials>>. Acesso em 15 de jan. 2014, 15:20:13.

GERVASO, F.; SCALERA, F.; KUNJALUKKAL PADMANABHAN, S.; SANNINO, A.; LICCIULLI, A. High-Performance Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications. **International Journal of Applied Ceramic Technology**, v. 9, n. 3, p. 507–516, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7402.2011.02662.x>>. Acesso em: 11/3/2013.

GREENWALD, A. S et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 83, n. 2_suppl_2, p. S98-103, 2003. Disponível em: <<http://jbjs.org/article.aspx?articleid=24901L>>.

GUASTALDI, A.; APARECIDA, A. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352–1358, 2010.

HCUP - Healthcare Cost & Utilization Project, Agency for Healthcare Research and Quality, 2007. MERRILL, Chaya; ELIXHAUSER, Anne. Hospital Stays Involving Musculoskeletal Procedures, 1997–2005. Disponível em <http://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb34.pdf>. Acesso em 08/09/2013.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature materials**, v. 4, n. 7, p. 518–24, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16003400>. Acesso em 05/05/2013

KWON, S.; JUN, Y.; HONG, S.; LEE, I.; KIM, H. Calcium Phosphate Bioceramics with Various Porosities and Dissolution Rates. **Journal of American Ceramic Society**, v. 85, p. 3129–3131, 2002.

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. Terceira ed. Academic Press, 2007.

LARANJEIRA, M. S. **Reciprocal interaction between human microvascular endothelial cells and mesenchymal stem cells on macroporous granules of nanostructured-hydroxyapatite agglomerates**. 2012. 149f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto.

LARANJEIRA, M. S.; FERNANDES, M. H.; MONTEIRO, F. J. Innovative macroporous granules of nanostructured-hydroxyapatite agglomerates: bioactivity and osteoblast-like cell behaviour. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95, n. 3, p. 891–900, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20845490>>. Acesso em: 11 de mar. 2013, 17:45:10.

MATEUS, A. Y. P.; BARRIAS, C. C.; RIBEIRO, C.; FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J. Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 86, n. 2, p. 483–93, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975824>>. Acesso em: 13/3/2013.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, v. 65, n. 15-16, p. 2385–2406, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026635380500285X>>. Acesso em: 3/6/2013.

ORÉFICE, Rodrigo Lambert; PEREIRA, Marivalda; MANSUR, Herman Sander. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Cultura Médica, 2006.

PANDA, R. N.; HSIEH, M. F.; CHUNG, R. J.; CHIN, T. S. FTIR , XRD , SEM and solid state NMR investigations of synthesized by hydroxide-gel technique. **Journal of Physics and**

Chemistry of Solids, v. 64, p. 193–199, 2003.

PRUITT, L. A.; CHAKRAVARTULA, A. M. **Mechanics of biomaterials: fundamental principles for implant design**. Cambridge University Press, 2011.

RATNER, B. et al. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego, California, p. 162-164, 2004.

RAFNER, B. **Scanning Electron Microscopy Primer**. Disponível em: <http://www.charfac.umn.edu/instruments/sem_primer.pdf>. Acesso em: 13 de abr. 2013.

RIVERA-MUÑOZ, E. Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization. **Biomedical Engineering: frontiers and challenge**, 2011. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/17643/InTech-Hydroxyapatite_based_materials_synthesis_and_characterization.pdf>. Acesso em: 24/8/2013.

ROEDER R. K., STEINLAGE, G.A., BOWMAN, K. J. Preventing segregation during centrifugal consolidation of particulate suspensions: Particle Drafting, **Journal of the American Ceramic Society**, 78(9), 2367 (1995).

ROOHANI-ESFAHANI, S. I.; DUNSTAN, C. R.; LI, J. J.; et al. Unique microstructural design of ceramic scaffolds for bone regeneration under load. **Acta biomaterialia**, v. 2617, n. March, p. 11, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467040>>. Acesso em: 14/3/2013.

SALIMI, M. N.; BRIDSON, R. H.; GROVER, L. M.; LEEKE, G. A. Effect of processing conditions on the formation of hydroxyapatite nanoparticles. **Powder Technology**, v. 218, p. 109–118, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003259101100670X>>. Acesso em: 9 de set. 2013.

SALGADO, Antônio J.; COUTINHO, Olga P.; REIS, Rui L. Bone-tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromolecular Bioscience**, v.4, p.743–765, 2004.74.

SHQAU, K. Electrosteric dispersants used in colloidal processing of ceramics. , **Group Inorganic Mate Science, Department Materials Science & Engineering, Ohio State University** , v. 6 Jan., 2005.

SOPYAN, I et al. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 8, n. 1, p. 116-123, 2007.

STEVENS, B.; YANG, Y.; MOHANDAS, A.; STUCKER, B.; NGUYEN, K. T. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 85, n. 2, p. 573–82, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17937408>>. Acesso em: 24 de jun. 2013.

STOCH, J.; SZARANIEC, J.; TRYBALSKA, B.; BROZ, A. FTIR absorption – reflection study of biomimetic growth of phosphates on titanium implants. **Journal of Molecular**

Structure, v. 555, p. 375–382, 2000.

TAMPIERI, A; CELOTTI, G.; SPRIO, S.; DELCOGLIANO, A; FRANZESE, S. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1365–70, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336309>>. .

TEIXEIRA, S.; FERNANDES, M. H.; FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J. Proliferation and mineralization of bone marrow cells cultured on macroporous hydroxyapatite scaffolds functionalized with collagen type I for bone tissue regeneration. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 95, n. 1, p. 1–8, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20740596>>. Acesso em: 11/3/2013.

TEIXEIRA, S.; FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J. Biocompatibility of highly macroporous ceramic scaffolds: cell adhesion and morphology studies. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 19, n. 2, p. 855–9, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17665126>>. Acesso em: 11/3/2013.

TRIPATHI, G.; BASU, B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. **Ceramics International**, v. 38, n. 1, p. 341–349, 2012. Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272884211006481>>. Acesso em: 11/3/2013.

VAZ, L.; LOPES, A B.; ALMEIDA, M. Porosity control of hydroxyapatite implants. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 10, n. 4, p. 239–42, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15348157>>.

XU, W.; LIAO, X.; LI, B.; LI, T. Biomaterials and bone tissue engineering. In: **Bioelectronics and Bioinformatics (ISBB), 2011 International Symposium on**. IEEE, 2011 . p.224–227. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6107687>>. Acesso em: 24 de ago. 2013.

YASUDA, Hiroyuki Y. et al. Preparation of Porous Hydroxyapatite/alpha-Tricalcium Phosphate Composites by a Colloidal Process. **Materials Transactions**, v. 43, n. 6, p. 1332–1335, 2002.