

TAIANA GABRIELA MORETTI BONADIO

ESTUDOS DOS COMPÓSITOS TIO2-HIDROXIAPATITA E Nb2O5-HIDROXIAPATITA: COMPORTAMENTO FÍSICO-MECÂNICO, ESTRUTURAL E DE BIOATIVIDADE

Este exemplar compreende a redação final da dissertação de mestrado defendida pela Taiana Gabriela Moretti Bonadio.

Maringá, 03 de novembro de 2011.

Banca Examinadora:

Imand
Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso – presidente
Musica
Profa Dra. Nerde Kazue Kuromoto - UFPR
S Asphynes
Prof. Dr. Walter Moreira Lima - UEM
- Wiener/
Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand - UEM

Maringá 2011



Taiana Gabriela Moretti Bonadio

Estudos dos Compósitos TiO₂-Hidroxiapatita e Nb₂O₅-Hidroxiapatita: Comportamento Físicomecânico, Estrutural e de Bioatividade

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso

Co- Orientador: Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand



Taiana Gabriela Moretti Bonadio

Estudos dos Compósitos TiO₂-Hidroxiapatita e Nb₂O₅-Hidroxiapatita: Comportamento Físicomecânico, Estrutural e de Bioatividade

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso

Co- Orientador: Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do título de mestre em Física.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) (Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Г

B697e	Bonadio, Taiana Gabriela Moretti Estudos dos compósitos TiO2-Hidroxiapatita e Nb2O5-Hidroxiapatita: comportamento físico-mecânico, estrutural e de bioatividade / Taiana Gabriela Moretti Bonadio Maringá, 2011. 124 f. : il. col., fotos., figs., tabs.
÷	Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso. Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós- Graduação em Física, 2011.
	 Hidroxiapatita. 2. Compósitos. 3. Sinterização. 4. Biomateriais. 5. Fluido corpóreo simulado (SBF). I. Baesso, Mauro Luciano, orient. II. Weinand, Wilson Ricardo, co-orientador. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.
	CDD 21.ed. 530.413

AHS-00927

-

AGRADECIMENTOS

- Especialmente ao professor Wilson Ricardo Weinand pela orientação, conhecimento transmitido, amizade, atenção, dedicação e comprometimento com o trabalho.

- Ao professor Mauro Luciano Baesso, pela orientação, confiança, pelo apoio na montagem do laboratório para Estudos de Materiais Biocompatíveis e pelas sugestões ao longo do trabalho.

- Ao professor Walter Moreira Lima pelas discussões que tanto contribuíram para meu aprendizado e para a evolução do trabalho.

 Ao professor Antônio Medina Neto, pela ajuda e discussão das análises de espectroscopia Raman e de bioatividade.

- Aos professores Jurandir Hillmann Rohling e Franciele Sato pela ajuda com as medidas de espectroscopia Raman.

- Ao aluno do Departamento de Química Tiago Detomini pela ajuda nos ensaios de compressão.

- Ao professor Emerson Giroto por ter disponibilizado os equipamentos de propriedades mecânicas do Departamento de Química.

- Aos funcionários do Departamento de Física Jurandir, Marcio, Serginho, Marcos e Akiko.

- À funcionária do Departamento de Química Ana Maria Bareli pela obtenção dos espectros de FTIR.

- Ao meu marido Valdirlei Fernandes Freitas pela compreensão, carinho, ajuda e companheirismo durante esse trabalho.

- À minha família por ter acreditado em mim até nos momentos mais difíceis.

 - Ao Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP/UEM), pelo suporte nas análises de microscopia.

- Ao CNPQ pelo suporte financeiro.

RESUMO

O desenvolvimento de biocerâmicas combinando à bioatividade da hidroxiapatita com propriedades adequadas de outros materiais foi o principal objetivo deste trabalho. Compósitos TiO₂-hidroxiapatita e Nb₂O₅-hidroxiapatita foram produzidos por ação mecânica (MA) e técnicas da metalurgia do pó. O compósito TiO₂-HAp foi produzido na proporção 1:1 em volume e sinterizado nas temperaturas de 1000, 1100, 1200 e 1300°C. Os efeitos destas condições nos compósitos produzidos foram observados por diferentes técnicas, avaliando-se as propriedades físicas, mecânicas, estruturais e de bioatividade "in vitro". Observa-se uma sensível melhora nas propriedades físicas e mecânicas do compósito com o aumento da temperatura de sinterização. Contudo, após os testes de imersão em SBF verifica-se, nas temperaturas de 1200 e 1300°C, uma diminuição tanto na espessura como na adesão da camada de apatita nucleada na superfície do substrato. Nos compósitos Nb₂O₅-HAp, adicionou-se ao Nb_2O_5 quantidades 10, 20, 30, 40 e 50% em volume de HAp. As amostras desse compósito foram compactadas a 350 MPa e sinterizadas na temperatura de 1000 °C em atmosfera livre. Os compósitos obtidos foram observados por diferentes técnicas, quanto às propriedades estruturais e a habilidade de induzir a nucleação de apatita, quando submetidos a testes de bioatividade em fluido corpóreo simulado (SBF). A quantidade (vol.%) de hidroxiapatita produziu variações no número de fases dos compósitos sinterizados e, como conseqüência, na fração de volume (%) de cada fase. Observa-se também variações na espessura da camada de apatita formada no substrato após os ensaios "in vitro", em função das proporções de HAp nos compósitos. Em conclusão, os resultados deste trabalho mostraram que os compósitos TiO_2 -HAp e Nb_2O_5 -HAp possuem as características de materiais bioativos. Além disso, foi observado que a temperatura de sinterização e a utilização de ar como atmosfera reativa reduzem os custos de produção dos compósitos, indicando que, com um mínimo de infra-estrutura e um baixo consumo de energia, é possível produzir peças para restauração óssea que apresentem características de um material bioativo. Finalmente, foi demonstrado que as propriedades estruturais e de bioatividade dos compósitos podem ser controladas por meio da concentração dos reagentes e da temperatura de sinterização.

Palavras chave: hidroxiapatita, compósitos, sinterização, biomateriais, fluido corpóreo simulado (SBF).

ABSTRACT

The main of this work was the development of bioceramics combining the hydroxyapatite bioactivity with appropriate properties of other materials. Composites TiO_2 - hydroxyapatite and Nb₂O₅-hydroxyapatite were produced by mechanical alloying (MA) and powder metallurgy techniques. The composite TiO_2 - Hap was produced in the ratio 1:1 by volume and sintered at temperatures of 1000, 1100, 1200 and 1300 ° C. Studies by different techniques showed that the preparation condition affected the physical, mechanical, structural and "in vitro" bioactivity properties. A great improvement in the physical and mechanical properties of the composites were observed when the sinterization temperature was increased. However, soaking the composites sintered at 1200 and 1300 ° C in simulated body fluid (SBF), decreases in both thickness and adhesion of the apatite layer on the substrate surface were observed. The Nb_2O_5 -hydroxyapatite composites were produced by mixing the hydroxyapatite with Nb₂O₅ both with ratios of 10 20, 30, 40 and 50% in volume. The mixtures were compacted at 350 and sintered at 1000 ° C in free atmosphere. Different techniques were used to study the structural properties of the composite and its ability to induce apatite nucleation when soaking in the SBF solution. The hydroxyapatite amount (vol.%) produced variations in the number of phases of the sintered composites and, consequently, the volume fraction (%) of each phase. Changes of the apatite thickness formed on the substrate were observed after the "in vitro" tests performed as a function of HAp proportions in the composites. In conclusion, the results of this work showed that the composites TiO_2 -HAp e Nb_2O_5 -HAp presented characteristics of bioactive materials. In addition, it was observed that the sintering temperatures and the use of air as reactive atmosphere reduce the composites production costs, indicating that, with a minimum laboratorial structure and with a low energy consumption, it is possible to produce bone repair devices that present characteristics of bioactive materials. Finally, it was demonstrated that the structural properties and the bioactivity of the composites can be controlled by means of the material composition and the sintering temperatures.

Key words: hydroxyapatite composites, sintering, biomaterials, simulated body fluid (SBF).

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCÃO	1
1.1 OBJETIVOS	4
	0
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. BIOMATERIAIS	6
2.1.1. Biocerâmicas	9
2.1.2. Cerâmicas de fosfato de cálcio	
2.1.2.1. Hidroxiapatita	
2.1.2.2. β – fosfato tricálcico - Ca ₃ (PO ₄) ₂	14
2.1.3. Rutilo - TiO ₂	15
2.1.4. Nb_2O_5 - Pentóxido de Nióbio	
2.1.5. Biocompósitos	
2.2. TESTES DE BIOATIVIDADE "IN VITRO"	19
CAPÍTULO 3	
3. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	23
3.1 MOAGEM	23
3.2 SINTERIZACÃO	25
3.3 MICROSCOPIA FI FTRÔNICA DE VARREDURA	26
34 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X	27
3.4.1. Cálculo do tamanho do cristalito.	
3.4.2. Análise quantitativa de fases - método Rietveld	
3.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	32
3.6. ESPECTROSCOPIA RAMAN	34
3.7. PROPRIEDADES FÍSICAS	36
3.7.1. Densidade (método de Arquimedes)	
3.7.2. Variação Dimensional	
3.8. PROPRIEDADES MECÂNICAS	37
3.8.1. Microdureza Vickers	
3.8.2. Resistência à compressão axial	
CAPÍTULO 4	
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
4.1 ORTENÇÃO DOS PRECURSSORES	42
4.2 PREPARAÇÃO DOS COMPÓSITOS NA FORMA DE PÓ	42
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS SINTERIZADOS	45
4.3.1. Propriedades Físicas	
4.3.2. Propriedades mecânicas	
4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura	46
4.3.4. Difratometria de raios-X	46
4.3.5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	47
4.4. TESTES DE BIOATIVIDADE "IN VITRO"	47
4.4.1. Preparação das soluções para testes de bioatividade	
4.4.2. Procedimento para a imersão das amostras em SBF	
4.5. ESPECTROSCOPIA RAMAN	49
CAPÍTULO 5	53

SUMÁRIO

5. RE	SULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1.	ANÁLISE DA MATÉRIA PRIMA UTILIZADA	53
	5.1.1. Analise por difratometria de raios-X da HAp, do TiO ₂ e do Nb ₂ O ₅	
	5.1.2. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR	R) da HAp, do TiO_2
	e do Nb ₂ O ₅	
5.2.	COMPÓSITO [50% (HAP + B-TCP) + 50% TIO ₂]	60
	5.2.1. Seleção do tempo de moagem	
	5.2.3. Análise do compósito HT50 após a compactação e sinterização	64
	5.2.3.1. Propriedades físicas	64
	5.2.3.1.1. Variação dimensional	64
	5.2.3.1.2. Densidade e porosidade	65
	5.2.3.2. Propriedades mecânicas	
	5.2.3.2.1. Microdureza Vickers e resistência à compressão	
	5.2.4. Análise da evolução microestrutural dos compósitos HT50	67
	5.2.5. Análise por difratometria de raios-X dos compósitos HT50	69
	5.2.5.1. Estudo da influência da temperatura no tamanho do cristalito	73
	5.2.6. Testes de bioatividade "in vitro"	74
	5.2.6.1. Introdução	74
	5.2.6.2.1. Caracterização por difratometria de raios-X	75
	5.2.6.2.2. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura	
	5.2.6.3. Testes "in vitro" do compósito HT50 em SBF 1,5	
	5.2.6.3.1. Caracterização por difratometria de Raios-X	
	5.2.6.3.2. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura	
PA	RTE II	93
5.3.	COMPÓSITO (100-x) NB ₂ O ₅ - (x) HAP	93
	5.3.1. Introdução	
	5.3.2. Caracterização estrutural do compósito (100-x)Nb ₂ O ₅ -(x)HAp	
	5.3.2.1. Análise por difratometria de raios-X	
	5.3.2.2. Análise por espectroscopia Raman	
	5.3.3. Testes de bioatividade "in vitro" com SBF 1,5	
	5.3.3.1. Análise por difratometria de raios- X	
	5.3.3.2. Análise por espectroscopia Raman	
	5.3.3.3. Análise por microscopia eletrônica de varredura	
6. CC	NCLUSÕES	
7. RE	FERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Durante as duas Grandes Guerras ocorreram inúmeras mutilações de órgãos humanos no transcorrer das batalhas. Na tentativa de evitar a amputação de membros que haviam perdido suas funções, buscavam-se materiais que não fossem nocivos e não sofressem rejeição como possíveis substitutos. Consequentemente, esses fatos, apesar de trágicos, contribuíram para um grande salto no desenvolvimento tecnológico dos biomateriais.

As primeiras tentativas de substituição de partes do corpo humano durante a guerra foram frustrantes. Com isso, estabeleceu-se na época como objetivo a identificação de materiais que, além das propriedades estruturais e de não provocarem sérios danos à saúde do paciente, não fossem rejeitados pelo organismo.

Após esses eventos, o Comitê Americano para o Tratamento de Fraturas do Colégio Americano de Cirurgiões recomendou formalmente, em 1947, que fossem utilizados aços inoxidáveis como materiais para implante em casos de fratura. Desde então, vários materiais sintetizados em laboratório foram criados, desenvolvidos, testados e considerados adequados ou não para a utilização em implantes com as mais variadas funções [1,2].

A importância no desenvolvimento de biomateriais envolve, dentre outras coisas, o envelhecimento da população. À medida que o ser vivo envelhece, ocorrem desgastes de várias formas. Embora muitos fatores responsáveis pelo envelhecimento não sejam compreendidos, as conseqüências são bastante claras. Dentes causam dor, articulações se tornam artríticas, ossos ficam frágeis e quebram, os poderes de audição e visão diminuem, dentre outras coisas. E, como se estes processos naturais não fossem o bastante, a popularização dos esportes de alto risco levaram a uma onda de doenças relacionadas ao osso [3]. A importância de se aperfeiçoar e desenvolver materiais para próteses dentárias e ortopédicas está inserida neste contexto. Uma prova disso é que só nos Estados Unidos, cerca de 2 a 3 milhões de partes artificiais são implantadas a cada ano [3].

Além disso, a violência do trânsito nos dias atuais exige que se aumente a demanda de pesquisas em materiais para substituições ósseas. A literatura internacional estima que 45% dos acidentes de trânsito, envolvendo motorista e acompanhante, resultam em fraturas e ferimentos faciais [4]. Segundo o Departamento Nacional de Infraestrutura e Transportes (DNIT), Órgão do Ministério dos Transportes, no período compreendido entre 01/01/2011 a

31/08/2011 ocorreram no Brasil um total de 125.642 acidentes de trânsito, dois quais 33,7% apresentaram vítimas com ferimentos e 3,67% resultaram em morte. Só no estado do Paraná, neste mesmo período, foram registrados 14.208 acidentes de trânsito dos quais mortos representam 2,8% e feridos 34,9% [5].

Diante desses fatos, pesquisas visando o desenvolvimento de biomateriais são de extrema importância. Existem diversos materiais que atualmente são utilizados na confecção de implantes artificiais, como por exemplo, metais, polímeros, cerâmicas e compósitos [6]. Além disso, o emprego de materiais sintéticos em próteses ósseas e dentárias é clinicamente bem estabelecido devido à maior praticidade e segurança em relação aos transplantes de uma pessoa para outra [7].

Os metais têm um merecido destaque no emprego de substitutos ósseos devido ao fato de possuírem excelentes propriedades mecânicas, tais como: dureza, módulo elástico e resistência à fadiga [6]. Entretanto, esses materiais podem apresentar certos inconvenientes como rejeições biológicas, infecções, perda de massa óssea e deslocamento na interface osso-implante devido à falta de compatibilidade estrutural e de superfície [8]. Logo, surgiu um novo conceito que diz respeito ao uso de cerâmicas como materiais biocompatíveis.

Atualmente, são produzidas algumas cerâmicas com propriedades mecânicas aceitáveis para substituições ósseas, com a vantagem de estimularem o crescimento ósseo, acelerando o processo de recuperação das partes do corpo danificadas [4]. As cerâmicas de um modo geral são mais adequadas, em relação aos metais, do ponto de vista estético, de biocompatibilidade e de resistência química. Algumas cerâmicas densas, como alumina e zircônia, possuem baixa porosidadade e boa resistência mecânica [9]. Essas cerâmicas são utilizadas em reconstituição de cabeça de fêmur e em implantes dentários.

As cerâmicas a base de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, destacam-se pela propriedade de bioatividade. Sua utilização na substituição do tecido ósseo ocorre devido ao fato de sua composição química ser similar à da matriz óssea. Tal fato favorece a melhor interação entre o tecido vivo e o material implantado com a formação de uma ligação biomaterial-tecido ósseo [3].

Cerâmicas porosas de hidroxiapatita, por exemplo, podem ser preparadas quando se necessita de uma rápida recuperação do tecido ósseo. É o caso, por exemplo, do preenchimento de cavidades oriundas de processos inflamatórios, osteoporose, acidentes e em alguns tipos de implantes ósseos. Os implantes porosos possuem grande área superficial o que permite uma maior área de contato melhorando, assim, a interface implante-tecido ósseo, pois

os poros interconectados permitem que o tecido vivo permeie estes poros possibilitando e facilitando a osseointegração [10].

Como a grande maioria dos materiais cerâmicos, a hidroxiapatita é um material frágil. Uma das maneiras para reforçar esta cerâmica é desenvolver materiais compósitos, combinando as propriedades de bioatividade da hidroxiapatita com propriedades adequadas de outros materiais.

A maior parte dos implantes metálicos é manufaturada de titânio devido as suas propriedades mecânicas e por ser resistente a corrosão, inclusive em meios oxidantes ricos em cloreto, fator principal para seu uso como biomaterial. Esta resistência decorre da formação (fenômeno de passivação) de uma fina e aderente camada de óxidos estáveis na sua superfície como o TiO_2 , TiO e Ti_2O_3 , a qual protege o seu interior do meio circundante. A espessura desta camada de óxidos depende das condições ambientais.

Por outro lado, esta camada protetora é pouco reativa e não permite a ligação química com o osso, ocorrendo apenas à formação de um tecido fibroso (ligação morfológica). Por esta razão, pesquisas buscam alternativas para modificar essa superfície mediante a deposição de camadas de TiO_2 , criando assim certa rugosidade e tornando-a mais reativa.

O TiO_2 é um material biocompatível, atóxico e resistente à corrosão. Estas características têm motivado a realização de estudos para se verificar sua viabilidade para produção de materiais compósitos por ação mecânica (MA) e técnicas da metalurgia do pó. Esta combinação pode resultar em um material com propriedades mecânicas intermediárias e que, possivelmente, facilitaria sua ancoragem ao osso vivo [4].

Outro material com propriedades semelhantes às do titânio, porém bem menos estudado, é o nióbio. O nióbio, além de ser um material biocompatível, é um dos minérios mais abundantes no Brasil, que possui cerca de 90% das reservas mundiais. A afinidade do nióbio com o oxigênio possibilita a formação de uma camada de óxidos fina e aderente, como o Nb_2O_5 em sua superfície. Este óxido possui em sua superfície o grupo funcional Nb - OH, o que o torna promissor para o desenvolvimento de biomateriais, pois pode induzir a nucleação de apatita [11,12].

Prévios trabalhos comprovaram que é possível desenvolver um compósito nanoestruturado utilizando o pentóxido de nióbio e a hidroxiapatita [11,12]. Esses trabalhos apontaram para o desenvolvimento de novos e vantajosos materiais bioativos. Por outro lado, atualmente o número de publicações nacionais e internacionais, explorando a

biocompatibilidade do nióbio, é muito menor do que o do titânio. Desta forma, parece promissor desenvolver um compósito Nb_2O_5 -HAp e estudar suas propriedades [11].

1.1. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e caracterizar materiais compósitos TiO_2 hidroxiapatita e Nb_2O_5 -hidroxiapatita e avaliar os mesmos em testes de bioatividade "in vitro".

Os objetivos específicos são:

Parte I

- 1. Caracterizar os pós precursores do TiO_2 e da HAp por difratômetria de raios-X, espectroscopia na região do infravermelho e microscopia eletrônica de varredura;
- Produzir a partir dos pós de *TiO*₂ e de HAp, materiais compósitos via ação mecânica (MA) e técnicas da metalurgia do pó;
- Sinterizar os compósitos em atmosfera de ar após o processo de conformação em temperaturas pré-estabelecidas;
- Caracterizar os materiais sinterizados pelas técnicas de difratômetria de raios-X, refinamento estrutural pelo método de Rietveld, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS);
- 5. Avaliar as propriedades físicas e mecânicas das amostras sinterizadas;
- Realizar testes de bioatividade "in vitro" nos compósitos em SBF convencional e SBF1,5 em função do tempo de imersão;
- Caracterizar as superfícies das amostras após os testes de bioatividade "*in vitro*" pelas técnicas de difratometria de raios-X, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS).

Parte II

 Produzir a partir dos pós de Nb₂O₅ e HAp materiais compósitos via ação mecânica e técnicas da metalurgia do pó;

- Sinterizar os compósitos em atmosfera livre após o processo de conformação em temperaturas pré-selecionadas;
- Caracterizar os compósitos (100-x)Nb₂O₅-(x)HAp x = 10, 20, 30, 40 e 50% por meio das técnicas de difratômetria de raios-X, refinamento estrutural pelo método de Rietveld e espectroscopia Raman;
- 4. Realizar testes de bioatividade "in vitro" dos compósitos em SBF 1,5;
- Avaliar as superfícies das amostras após os testes de bioatividade "*in vitro*" por difratometria de raios-X, espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS).

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOMATERIAIS

O estudo de materiais para aplicação nas áreas médica e odontológica é de suma importância na ciência dos materiais. Isso pode ser notado, por exemplo, pelo aumento do número de publicações nacionais e internacionais nesta área nas últimas décadas [7]. Exemplos comuns dessa aplicação são suturas, cateteres, válvulas cardíacas, marca passos, implantes mamários, placas de fixação de fratura, parafusos em ortopedia, entre outros. Em odontologia esses materiais são utilizados em fios ortodônticos assim como em próteses totais para substituição da articulação e etc. [3,7]. O ser humano se preocupa com a substituição de partes do corpo perdidas ou danificadas desde a antiguidade. A origem da palavra prótese vem do grego, "pro" que significa "em lugar de", e "thesis", colocar, ou seja, "colocar no lugar de" [13]. O Historiador Romano Heródoto relata em 484 a. C. a respeito de um homem persa que escapou das algemas de ferro que prendiam sua perna cortando fora seu pé e substituindo por um pé de madeira. [14]. Antigos textos chineses de medicina mencionam provas de que os imperadores Chin Nong (3216 a.C.) e Hou Ang-Ty (2637 a.C.) já relatavam sobre reimplantes e transplantes [10]. A descoberta recente de uma prótese funcional¹, publicada este ano na revista britânica "The Lancet", chamou a atenção dos historiadores pela sua riqueza de detalhes. A egiptóloga Jacky Finch, da Universidade de Manchester, encontrou dedos artificiais com mais de 2600 anos. Os dedos foram detalhadamente elaborados utilizando madeira, couro e uma dobradiça que imita a flexibilidade das juntas. Nas peças foram encontrados sinais de desgaste, o que indica que as próteses foram utilizadas em vida [15].

¹ A prótese funcional permite ao amputado a realização das funções que correspondiam ao membro que perdeu, diferentemente de uma prótese puramente estética.



Figura 1: Imagem de um dedo artificial de madeira encontrada por cientistas da Universidade de Manchester, obtida da referência 16.

Durante as últimas décadas, tanto o envelhecimento da população quanto a popularização de esportes de alto risco levaram a uma onda de doenças relacionadas ao osso. A importância das pesquisas para o desenvolvimento e otimização de materiais para próteses dentárias e ortopédicas está inserida neste contexto. Além disso, o emprego de materiais sintéticos em próteses ósseas e dentárias é clinicamente bem estabelecido devido à maior praticidade e segurança em relação aos transplantes de uma pessoa para outra. Assim, os itens implantáveis devem ser preparados a partir de uma classe especial de materiais chamados de materiais biomédicos ou, simplesmente, biomateriais. Todos os materiais sólidos são geralmente classificados em quatro grandes grupos: metais, cerâmicas, polímeros e compósitos. Da mesma forma, todos os biomateriais são também classificados em quatro grupos: biometais, biopolímeros, biocerâmicas e biocompósitos conforme mostrado na Tabela 1 [7,17]. Todos eles desempenham um papel muito importante na substituição e regeneração dos tecidos vivos. Cada biomaterial possui uma classificação de acordo com o seu comportamento fisiológico, isto é, os biomateriais podem ser bioinertes, bioativos ou reabsorvíveis.

Os materiais bioinertes ou biotoleráveis são apenas tolerados pelo organismo sendo isolados dos tecidos adjacentes por uma camada fibrosa. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso, menor é a tolerabilidade dos tecidos naturais ao material. Exemplos de materiais biotoleráveis são os metais, polímeros sintéticos e algumas cerâmicas.

Os materiais bioativos promovem a ligação química com o tecido ósseo, fato este conhecido como osseointegração. Exemplos deste tipo de material são as cerâmicas de fosfato

de cálcio, como a hidroxiapatita, e os biovidros. Os biomateriais reabsorvíveis são aqueles que atuam por um período junto ao tecido biológico e depois são degradados, solubilizados ou fagocitados² pelo organismo, isso ocorre por exemplo com o fosfato tricálcico (*TCP*) e o poli ácido lático (*PLA*)[2,10,18].

Material	Vantagens	Desvantagens	Exemplos
Biopolímeros (nylon,	Resiliente ³	Fraco	Suturas, vasos
silicone, poliéster, etc)	Fácil de fabricar	Deforma com o tempo	sanguíneos, olhos,
		Pode degradar	nariz.
Biometais (Ti e suas	Forte	Pode corroer	Próteses, implantes
ligas, ligas de Co-Cr,	Dúctil	Denso	dentários de raiz, placas
etc.)	Resistente	Resistente Difícil de obter	
Biocerâmicas	Bastante biocompatível	Não resistente	Implantes dentais e
(alumina, zircônia,		Fraco em tensão	ortopédicos.
fosfatos de cálcio)		Frágil	
Biocompósitos	Forte	Difícil de obter	Cimento dental, resina
(carbono-carbono,	Feito sob medida		dental.
fibras reforçadas com			
cimento ósseo, etc)			

Tabela 1: Classificação dos materiais utilizados no corpo humano [6].

Todavia, todo biomaterial deve possuir certas propriedades de relativa importância para o sucesso de um implante, são elas:

- Biocompatibilidade;
- Bioadesão;
- Características biomecânicas favoráveis;
- Resistência à corrosão;
- Processabilidade.

² Fagocitose é o englobamento e digestão de partículas pelo organismo.

³ Resiliente é todo material que após sofrer uma lesão retorna sua forma original.

A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade do material responder favoravelmente a uma aplicação específica com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias e tóxicas quando em contato com tecidos vivos ou fluidos orgânicos [9]. Além disso, devem atender ao requisito de funcionalidade para o qual foram projetados ocorrendo, assim, a interação com células, músculos ou ligamentos, gordura, ossos e órgãos [9,12].

2.1.1. Biocerâmicas

As cerâmicas abrangem uma grande variedade de materiais naturais e sintéticos tais como vidros, tijolos, pedras, concreto, isolantes dielétricos, materiais magnéticos, refratários e etc. A característica comum desses materiais é serem constituídos por íons metálicos e não metálicos. Esses materiais são caracterizados pela alta resistência à compressão e baixa resistência à tração [19].

Os materiais cerâmicos têm sido estudados há anos para as mais diversas finalidades, inclusive na área médica. A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a 1894 quando um médico relatou o uso do gesso (CaSO₄. $\frac{1}{2}$ H₂O) como um possível substituto ósseo [10]. Porém, este material apresenta resistência mecânica baixa e é completamente reabsorvido pelo organismo, resultando em rápida fragmentação e degradação. Essas propriedades são pouco atrativas e praticamente excluíram a utilização do gesso como biocerâmica implantável [10]. Nos anos 70 foram desenvolvidas novas cerâmicas com propriedades melhoradas e sua utilização aumentou consideravelmente até os dias de hoje. Posteriormente, seu uso foi estendido para aplicações em sistemas locomotores e coroas dentais em razão de sua boa aparência [2,20].

Uma importante propriedade no uso de biocerâmicas é a porosidade. A quantidade e distribuição de poros nos materiais cerâmicos influenciam fortemente a resistência, o módulo de elasticidade, a resistência à oxidação, a resistência ao desgaste e outras propriedades importantes. Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material, a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento de tecido vivo no seu interior, fazendo com que ocorra uma forte ligação entre o tecido vivo e o implante. Quando os poros atingem certo tamanho, os implantes aceleram o processo de cura, pois permitem o crescimento de colágeno seguido de mineralização de tecido ósseo através da porosidade interconectada [4].

2.1.2. Cerâmicas de fosfato de cálcio

Os fosfatos de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as biocerâmicas. Sua utilização na substituição do tecido ósseo ocorre devido ao fato de sua composição ser similar à da matriz óssea. Tal similaridade favorece a melhor interação entre o tecido vivo e o material implantado com a formação de uma ligação biomaterial-tecido vivo [3]. Uma maneira conveniente de classificar os vários fosfatos de cálcio existentes é por meio de sua razão molar Ca/P, conforme mostrado na Tabela 2.

Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita, por ser o principal componente presente na fase mineral dos ossos, é sem dúvida a cerâmica mais estudada e a mais utilizada para as finalidades clínicas. Estudos têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser absorvida gradualmente após quatro ou cinco anos de implante. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação. As biocerâmicas de fosfato de cálcio se degradam com uma velocidade na seguinte ordem: $CaHPO_4 \cdot 2H_2O > CaHPO_4 > Ca(HPO_4)_2(PO_4) \cdot 5H_2O > Ca_3(PO_4)_2 > Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. A reabsorção do material, que representa esta degradação, é causada pela dissolução que depende da solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico (Tabela 2) [3].

Apenas dois fosfatos de cálcio são estáveis quando estão em contato com o meio aquoso como o sangue: o fosfato dicálcico dihidratado (*CaHPO*₄·2*H*₂*O*) estável em pH < 4,2 e a hidroxiapatita (*Ca*₁₀(*PO*₄)₆(*OH*)₂) estável em pH > 4,2. Em altas temperaturas, outras fases como o β -*TCP* (*Ca*₃(*PO*₄)₂) são estáveis.

Pesquisadores importantes no estudo de biomateriais como L.L. Hench propõem que quando amostras de *TCP*s (fosfatos tricálcicos) são postas em contato com fluidos corpóreos pode ocorrer a formação de *HAp* na superfície delas pela sua reação com H_2O [21,22]:

$$4Ca_{3}(PO_{4})_{2} + 2H_{2}O \rightarrow Ca_{10}(PO_{4})_{6}(OH)_{2} + 2Ca^{2+} + 2HPO_{4}^{2-}$$
(1)

Há estudos que consideram o *TCP*, com razão Ca/P = 1,5, como sendo uma hidroxiapatita deficiente de cálcio [22].

			Solubilidade	Estabilidade
Razão molar	Composto	Fórmula química	em 25 °C	do pH em
(Ca/P)			-log(K _s)	solução aquosa
				a 25°C
0,5	Fosfato de monocálcio	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	1,14	0,0-2,0
	monohidratado (MCPM)			
0,5	Fosfato de monocálcio	$Ca(H_2PO_4)_2$	1,14	Estável acima
	anidro (MCPA)			de 100°C
1,0	Fosfato dicálcico	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	6,59	2,0-6,0
	dihidratado (DCPD)			
1,0	Fosfato dicálcico anidro	$CaHPO_4$	6,90	Estável acima
	(DCPA)			de 100°C
1,33	Fosfato de octacálcio	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4\cdot5H_2O$	96,6	5,5-7,0
	(OCP)			
1,5	α- fosfato tricálcico (α-	α - Ca ₃ (PO ₄) ₂	25,5	Não precipitado
	TCP)			em solução
				aquosa
1,5	β- fosfato tricálcico (β-	β - Ca ₃ (PO ₄) ₂	28,9	Não
	TCP)			precipitado em
				solução aquosa
1,2-2,2	Fosfato de cálcio amorfo	$Ca_{x}H_{y}(PO_{4})_{z} \cdot nH_{2}O, n = 3-4,5$	Não pode ser	~5,0-12,0
	(ACP), Apatita		medido	Sempre
			precisamente4	metaestável
1,5-1,67	Hidroxiapatita deficiente	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$	~85	6,5-9,5
	de cálcio (CDHA)	(0 <x<1)< td=""><td></td><td></td></x<1)<>		
1,67	Hidroxiapatita (HAp)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	116,8	9,5-12
1,67	Fluorapatita (FAp)	$Ca_{10}(PO_4)_6(F)_2$	120,0	7-12
1,67	Oxiapatita (OAp)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆	~69	Não precipitado
				em solução
				aquosa
2,0	Fosfato tetracálcico	Ca ₄ (PO ₄)O	38-44	Não precipitado
	(TTCP)			em solução
				aquosa

Tabela 2: Fosfatos de cálcio e suas propriedades [7,3].

Estruturalmente, a *HAp* é mais parecida com o osso natural do que o β -*TCP*, no entanto, a *HAp* possui a propriedade de reabsorção bem menor que a fase β -*TCP*. A velocidade de dissolução do β -*TCP* é de 3 a 12 vezes maior que a da *HAp*

 $^{^4}$ Não pode ser medido precisamente. Entretanto, os seguintes valores foram encontrados: 25,7 ± 0,1 (pH =

^{7,40),} $29,9 \pm 0,1$ (pH = 6,00), $32,7 \pm 0,1$ (pH = 5,28). Na medida comparativa de dissolução em solução tampão ácida é: ACP >> α -TCP >> β -TCP > CDHA >> HÁ > FA.

estequiométrica[18]. Isso quer dizer que enquanto a hidroxiapatita implantada permanece no organismo por anos, a fase β -*TCP* é reabsorvível em semanas.

Estudos promissores vêm sendo realizados com cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (β -*TCP* e *HAp*). A combinação das propriedades destes dois materiais resulta em uma cerâmica reabsorvível capaz de desenvolver uma fixação bioativa na interface tecido-implante [7, 23, 24].

L. Yubao e colaboradores demonstram que as cerâmicas bifásicas são biologicamente mais ativas que a HAp pura. Eles também afirmam que como a hidroxiapatita presente nos ossos é pouco cristalina, não estequiométrica e contém água incorporada na rede cristalina, a hidroxiapatita contendo a fase β -*TCP* pode ser mais parecida com a hidroxiapatita mineral encontrada em ossos, podendo ser esta a razão pela qual as cerâmicas bifásicas apresentam desempenho superior a *HAp* na formação de novo tecido ósseo [25].

2.1.2.1. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita sintética é um dos materiais bioativos mais utilizados, pois permite a formação de ligações químicas com a hidroxiapatita óssea, promovendo a osseointegração. Essas ligações são de natureza covalente e isso faz com que a interface entre o tecido vivo e o implante suporte esforços mecânicos significativos [23].

Quando obedecida a estequiometria, a hidroxiapatita apresenta uma razão molar Ca/P de 1,67. Este valor foi obtido por meio das técnicas de difratometria de raios-X e difratometria de nêutrons. No caso das hidroxiapatitas deficientes em cálcio o valor da razão Ca/P pode variar em 10% [18].

A hidroxiapatita possui estrutura cristalina hexagonal com grupo espacial $P6_{3/m}$ (176) caracterizado por uma simetria perpendicular aos três eixos "a" equivalentes (a1, a2 e a3), formando um ângulo de 120° entre si. Os parâmetros de rede da célula unitária correspondem a: "a" = "b" = 0,9432nm e "c" = 0, 6881 nm.

Na hidroxiapatita, os átomos de fósforo aparecem sempre cercados por quatro átomos de oxigênio situados nos vértices de um tetraedro como pode ser observado na Figura 2. A esses tetraedros de fosfato dá-se o nome de ortofosfato. Na Figura 2 as esferas em amarelo, azul, rosa e vermelho representam os átomos de cálcio, fósforo, oxigênio e hidrogênio, respectivamente.



Figura 2: Representação esquemática da estrutura cristalina (célula unitária) da hidroxiapatita.

Eventualmente podem ocorrer substituições de sítios no interior da estrutura cristalina. No caso da hidroxiapatita, os elementos Ca^{2+} , PO_4^{3-} e *OH* são substituídos por outros íons com cargas de mesmo sinal. É o caso, por exemplo, do grupo carbonato CO_3^{2-} que pode tanto ocupar a posição estrutural do *OH* (substituição do tipo A) como ocupar a posição do íon PO_4^{3-} (substituição do tipo B) [18, 26]. O íon carbonato é capaz de causar uma tensão na rede cristalina da *HAp* fazendo com que a taxa de dissolução do material aumente. Isso ocorre inclusive nos ossos que, por sua vez, têm muitos elementos substituídos em sua estrutura cristalina [23].

Os cátions K^+ e Na^+ são capazes de substituir o íons Ca^{2+} sem alterar os parâmetros de rede da HAp, no entanto a substituição que ocorre quando o Ca^{2+} é substituído pelo Mg^{2+} é capaz tanto de alterar parâmetros de rede da estrutura cristalina quanto diminuir a cristalinidade do material. Substituições de OH por Cl comumente alteram parâmetros de rede sem alterar a cristalinidade. As substituições do tipo B do carbonato alteram os parâmetros de rede e a cristalinidade e a substituição por HPO_4^{2-} não alteram a cristalinidade, mas aumenta o parâmetro de rede "a" [18,27].

Vários métodos são utilizados para sintetizar hidroxiapatita. Uma das primeiras técnicas para produzir *HAp* foi a exposição hidrotérmica da fluorapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6F_2$) a altas temperaturas e pressões (Levitt e colaboradores) [28]. Os métodos mais utilizados são por via úmida e via seca, mecanosíntese, hidrotermal, sono químico, sol-gel, entre outros [2].

Um método que se destaca por sua facilidade é a calcinação de ossos "*in natura*". O método desenvolvido por Lima e Weinand [29] possibilita obter a hidroxiapatita natural e de boa qualidade a partir de osso de peixe. Assim, é possível produzir hidroxiapatita natural com matéria prima disponível em qualquer região do país. Outra vantagem desse procedimento é seu baixo custo. As temperaturas de calcinação empregadas podem ser alcançadas em fornos do tipo mufla que tenham um simples controle de temperatura. O processo de produção caracteriza-se por empregar uma faixa de temperatura compreendida entre 750 e 950° em atmosfera livre [10, 29].

2.1.2.2. β – fosfato tricálcico - $Ca_3(PO_4)_2$

O β – fosfato tricálcico possui maior solubilidade do que *HAp*. Logo ele é mais rapidamente reabsorvido pelo corpo vivo. Por ser bioativo, atóxico, osteocondutor e biodegradável não há a necessidade de uma segunda operação cirúrgica para remover o dispositivo após a cura se processar [30].

A cerâmica $Ca_3(PO_4)_2$ possui razão Ca/P de 1,5 e pertence ao grupo espacial R3c de simetria hexagonal com célula unitária "a" = "b" = 1,0439 nm e "c" = 3,7375 nm apresentando 21 fórmulas unitárias por célula unitária hexagonal. Segundo Elliott esse material possui um papel importante no processo de biomineralização óssea por ser o precursor direto da apatita óssea [26]. A célula unitária da fase β -*TCP* está representada na Figura 3. As esferas em verde, laranja e vermelho representam os átomos de cálcio, fósforo e oxigênio, respectivamente.



Figura 3: Representação esquemática da estrutura cristalina da fase β -TCP, adaptada da referência 31.

A fase β -fosfato tricálcico permite a substituição de 15% dos átomos de Ca^{2+} por Mg^{2+} sem alterar essencialmente sua estrutura. Quando a substituição excede esta porcentagem ocorre a diminuição dos parâmetros de rede na estrutura cristalina. Quando o magnésio Mg^{2+} está presente na estrutura, o material apresenta menor solubilidade [26]. Se o Mg^{2+} ocupar a posição Ca(5), a estabilidade da rede aumenta, pois a substituição é de um cátion maior por um menor, no caso o Mg^{2+} . O efeito de estabilidade estrutural provocada pela substituição do cálcio pelo magnésio explica a ocorrência de cálculos dentários e várias calcificações patológicas [23].

2.1.3. Rutilo - TiO₂

Dentre os materiais mais utilizados em implantes cirúrgicos, o titânio se destaca e têm ganhado a preferência entre os cirurgiões. Desde a sua introdução em 1947, estima-se que mais de mil toneladas de componentes de titânio são utilizados anualmente na medicina e na odontologia. As aplicações do titânio e suas ligas na área biomédica abrangem desde

dispositivos cardíacos até aplicações estruturais como parafusos e pinos em implantes odontológicos e próteses ósseas para braços, pernas e articulações [10].

O titânio possui excelente resistência à corrosão em diversos meios, inclusive em meios oxidantes ricos em cloreto, fator fundamental para o seu uso como biomaterial. Esta resistência é devida ao fenômeno de passivação, pela formação de uma fina e aderente camada de óxidos estáveis (TiO_2 , TiO e Ti_2O_3) em sua superfície, a qual protege o seu interior do meio circundante. Assim, os implantes a base de titânio comercialmente puro apresentam na sua superfície uma camada de TiO_2 , que por sua vez impede a corrosão, pois não permite que os tecidos vivos interajam diretamente com o metal [4].

Todavia, em um implante é vantajoso ter uma estrutura com certa porosidade (rugosidade) para assegurar a sua ligação com o tecido vivo e, assim, ativar a osseointegração. Desse modo, muitas pesquisas buscaram obter uma superfície artificial com essas características depositando uma camada de TiO_2 mais reativa sobre o material (implante). A partir daí surge o interesse em descobrir as propriedades desse material para fins biológicos como, por exemplo, associado à HAp para a produção de um biomaterial com propriedades intermediárias [4].

O TiO_2 é encontrado em três fases distintas: brookita (ortorrômbica), anatase (tetragonal) e rutilo (tetragonal). A fase brookita não é interessante para nossos estudos porque apresenta grande instabilidade. A fase anatase inicia a mudança para a fase rutilo quando aquecida acima de 900 °C, sendo a fase rutilo a mais comum e mais conhecida entre as três [2,4]. Sob condições ambientais, a cristalinidade da fase rutilo é termodinamicamente mais estável que as fases anatase e brookite, porém a estabilidade termodinâmica depende das dimensões das partículas, ou seja, para partículas com diâmetros inferiores a 14 nm, a fase anatase é mais estável que a do rutilo [32].

É conhecido na literatura que o TiO_2 é um material biocompatível, atóxico e resistente à corrosão. Além disso, a possibilidade de se desenvolver um compósito cerâmico para fins biomédicos se torna economicamente mais viável com o TiO_2 do que com o Ti metálico, pois a sua síntese é realizada em atmosfera de ar e em temperaturas inferiores às do metal.

O TiO_2 na fase do rutilo possui cristais em uma forma mais compacta do que a da anatase. O rutilo pertence ao grupo espacial $P4_2/mnm$ caracterizado por três eixos ortogonais entre si formando uma estrutura tetragonal, como mostrado na Figura 4, na qual as esferas em cinza representam os átomos de *Ti* (titânio) e as em vermelho os átomos de O (oxigênio). Os parâmetros de rede da célula unitária correspondem a: $a = b = 0,4592 \text{ nm}, c = 0,2959 \text{ nm}, V = 6,245 \text{ nm}^3$ e densidade $\rho = 4,25 \text{ g/ cm}^3$ [32].



Figura 4: Representação esquemática da estrutura cristalina (célula unitária) do rutilo – TiO₂, adaptada da referência 31.

2.1.4. Nb₂O₅ - Pentóxido de Nióbio

Um dos metais mais abundantes em solo brasileiro é o nióbio apesar de sua baixa concentração na crosta terrestre. O Brasil possui 90% do nióbio mundial em suas reservas [33], sendo que no ano de 2007, de toda a produção mundial de nióbio (133.928 toneladas), cerca de 96,6 % foram provenientes das reservas brasileiras, com um aumento na produção de 23,3 % em relação ao ano de 2006 [12]. O nióbio possui propriedades físicas e mecânicas muito parecidas com as do titânio como alto ponto de fusão, boa resistência mecânica e etc. Contudo, atualmente o número de publicações nacionais e internacionais explorando a biocompatibilidade do nióbio ainda é muito menor do que o do titânio. O nióbio, assim como o titânio é um material que apresenta alta afinidade com o oxigênio podendo formar, por exemplo, o Nb_2O_5 , NbO_2 e NbO, sendo destes o Nb_2O_5 , o mais estável.

Tanto o nióbio puro quanto o óxido de nióbio são materiais que apresentam boa biocompatibilidade e resistência à corrosão. Pelo fato do nióbio metálico ser um material altamente reativo e com alto ponto de fusão, exige que as técnicas convencionais de produção sejam acompanhadas de sistemas sofisticados para altas temperaturas e controle de atmosfera, o que eleva o custo de produção. Por outro lado, o pentóxido de nióbio pode ser sinterizado em atmosfera livre e também em menores temperaturas. Daí o interesse em se estudar a viabilidade da produção de biocompósitos $Nb_2O_5 - Hap$ com propriedades intermediárias. O

pentóxido de nióbio é um material menos reativo e possui um ponto de fusão menor do que o nióbio metálico, além disso, é um material frágil o que possibilita o seu processamento por ação mecânica (MA) com outros materiais, por exemplo, a hidroxiapatita. Este processo facilita a formação de reações de estado sólido facilitando as transições de fase na formação dos compósitos [12].

O pentóxido de nióbio pertence ao grupo espacial P2/m, cuja estrutura cristalina é monoclínica caracterizada por uma célula unitária com dois ângulos retos e um variável (~115,7°) e parâmetros de rede a = 2,038 nm, b = 0,3824 nm e c = 1,936 nm. Uma célula unitária do Nb_2O_5 está ilustrada na Figura 5. As esferas vermelhas representam os átomos de O (oxigênio) e as azuis os átomos de Nb (nióbio).



Figura 5: Representação esquemática da estrutura cristalina (célula unitária) do pentóxido de nióbio Nb_2O_5 , adaptada da referência 31.

2.1.5. Biocompósitos

O termo compósito é empregado para designar a combinação de dois ou mais materiais na escala macroscópica ou microscópica em que os materiais mantêm sua identidade física e química inicial. Essa combinação tem por objetivo combinar diferentes materiais produzindo um único material com propriedades superiores às dos seus componentes separados [34].

A combinação entre cerâmicas e alguns outros materiais como metal, polímero e cerâmicas tem sido usada para produzir compósitos de alto desempenho. O objetivo é fazer

uso de propriedades características de cada fase unindo-as num único material. Os materiais componentes do compósito são chamados de matriz e reforço. A matriz confere a estrutura ao compósito, enquanto os reforços realçam as propriedades físicas e químicas.

Como dito anteriormente, as cerâmicas bioativas de fosfato de cálcio, tais como a *HAp* e o β -*TCP*, são de grande interesse no uso de biomateriais, entretanto, elas possuem baixas propriedades mecânicas. Uma alternativa para melhorar essas propriedades é o desenvolvimento de materiais compósitos pela adição de uma fase de reforço, referente a um material com melhores propriedades mecânicas como, por exemplo, a alumina, dióxido de titânio, zircônia, entre outras [35,36].

Nesse contexto, esforços são concentrados visando a obtenção de compósitos cerâmicos que melhorem as propriedades mecânicas das matrizes $HAp \ e \ \beta$ -TCP. Além disso, a maioria dos implantes metálicos utilizados são de titânio e, como dito anteriormente, estes formam espontaneamente uma camada estável de TiO_2 sobre sua superfície, dificultando a interação com o tecido vivo. Um implante necessita de uma estrutura superficial micromorfológica (rugosidade e porosidade) não só para assegurar a ancoragem mecânica do osso na superfície, mas também para ativar a osseointegração. Dessa maneira, muitas pesquisas buscam essa superfície estrutural a partir do depósito de uma camada de TiO_2 sobre a superfície do metal, tornando-a muito mais reativa. A partir daí, surge o interesse em se estudar as propriedades deste material para fins biológicos quando combinado à HAp, podendo vir a formar um material compósito com propriedades intermediárias [4].

2.2. TESTES DE BIOATIVIDADE "IN VITRO"

Materiais artificiais implantados em defeitos ósseos são geralmente encapsulados por um tecido fibroso, levando ao seu isolamento a partir do osso circundante. No entanto, em 1972, Hench et al. mostram que o sistema Na_2O -CaO- SiO_2 - P_2O_5 (biovidro) cria espontaneamente um vínculo com osso vivo sem a formação de tecido fibroso circundante, ou seja, o material se liga estruturalmente ao osso. Pouco tempo depois, mostrou-se que vários tipos de cerâmica, tais como hidroxiapatita sinterizada, β -fosfato tricálcico sinterizado e vitrocerâmicas, também estabelecem ligação direta ao osso vivo, e estão sendo usados clinicamente como substitutos ósseos importantes [37]. Contudo, essas cerâmicas não são mecanicamente compatíveis com o osso circundante. Assim, o desenvolvimento de materiais bioativos com propriedaes mecânicas superiores ao dessas cerâmicas é desejada. Esta meta, levou os pesquisadores de biomateriais a duas perguntas: quais são os materiais capazes de se ligar ao osso vivo e se as experiências com animais (cobáias) são o único caminho para se testar a sua ligação ao osso vivo [37].

Em 1990, foi realizado um experimento comparando a formação de apatita "*in vivo*" e "*in vitro*" na vitrocerâmica A-W, o qual validou os testes "*in vitro*" para se avaliar a formação de apatita num material. Enquanto que nos mesmos testes, realizados em 1991, em materiais contendo Al_2O_3 na matriz vítrea, não se observou a formação de apatita nem "*in vivo*" e nem em SBF [37,38].

Com base nesses resultados, em 1991, Kokubo e colaboradores afirmam que o requisito essencial para um material se unir ao osso vivo é a formação de apatita em sua superfície quando em contato com o tecido vivo, e que a formação de apatita pode ser reproduzida em um fluido corpóreo simulado (SBF). O fluido recebeu este nome por ter concentrações iônicas e pH próximos aos do plasma do sangue humano [39].

A proposta foi que a bioatividade de um material pode ser prevista a partir da formação de apatita em sua superfície quando imersa em SBF. Desde então, a bioatividade de vários tipos de materiais são avaliadas por esse método.

Análises detalhadas da superfície nucleada por apatita realizadas após a imersão em SBF por difração de raios-X (TF-XRD "*thin-film* – *XRD*), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão comprovaram que a apatita formada é semelhante ao do osso mineral em composição e estrutura. Conseqüentemente, uma ligação química forte é formada entre o material implantado e o tecido ósseo via camada de apatita.

Esse resultado foi muito importante, pois além do teste de bioatividade "*in vitro*" ser mais prático, ele contribui para a redução de experimentos utilizando animais. Os testes "*in vivo*" são mais complicados devido às avaliações em comitês de ética e dificuldade de manipulação dos animais. Contudo, para alguns testes o uso de animais não deve ser descartado, quando se deseja, por exemplo, analisar o crescimento de células ou realizar estudos de citotoxidade os testes "*in vivo*" tornam-se necessários. No entanto, estudos preliminares via SBF, podem reduzir a quantidade de animais sacrificados, bem como a duração dos experimentos [37].

O SBF proposto por Kokubo passou por várias modificações até se atingir a compósição mais utilizada atualmente. O SBF original, utilizado pelo próprio Kokubo, em

estudos com as vitrocerâmicas A-W em 1990, não continha o íon SO_4^{2+} que está presente no plasma sanguíneo. Isso foi corrigido em um artigo publicado em 1991 [40] e desde então o SBF vem sendo corrigido por muitos pesquisadores. Na Tabela 3 estão mostradas algumas composições do SBF que serão descritas mais adiante.

i	Concentração iônica (mM)							
	Na ⁺	K^+	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl	HCO ₃ ⁻	HPO_4^{-2}	SO4 ²⁻
SBF Original	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0
SBF Corrigido (c-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
SBF Revisado (r-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF Novo e melhorado (n-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5
Plasma sanguíneo humano	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Tabela 3: Concetrações iônicas dos SBF's e do plasma sanguíneo humano [37].

Como pode ser verificado na Tabela 3, o SBF corrigido é mais rico em íons Cl^{-} e mais pobre em íons HCO_{3}^{-} do que o plasma humano. Em 2003, Oyane e colaboradores tentaram corrigir esta diferença [41] preparando o chamado SBF revisado (r-SBF), em que as concentrações de Cl^{-} e HCO_{3}^{-} diminuíram e aumentaram, respectivamente, para os níveis do plasma sanguíneo humano. No entanto, o carbonato de cálcio tem uma forte tendência de se precipitar a partir deste SBF, pois é supersaturado com respeito não só à apatita, mas também à calcita. Em 2004, Takadama e colaboradores propuseram um novo e melhorado SBF (n-SBF) com a diminuição da quantidade de Cl, deixando a concentração dos íons HCO_{3}^{-} igual à do (c-SBF) [42].

O SBF melhorado (n-SBF) foi comparado com o SBF corrigido (c-SBF), em relação as suas estabilidades e reprodutibilidades na formação de apatita em materiais sintéticos. Ambos os SBFs foram submetidos a uma rodada de testes em dez institutos de pesquisa. Como resultado, foi confirmado que o c-SBF não difere do n-SBF em estabilidade e reprodutibilidade. Devido a este resultado, o método de preparação do c-SBF foi cuidadosamente verificado em estabilidade criando-se um protocolo mais simples para que o SBF pudesse ser mais facilmente preparado, sendo utilizado por pequisadores do mundo inteiro [37,42].

Importantes estudos visando compreender os mecanismos de nucleação da apatita em SBF foram realizados em diversos géis óxidos preparados pelo método sol-gel. Percebeu-se

que nos géis de SiO_2 , TiO_2 , ZrO_2 , Nb_2O_5 e Ta_2O_5 houve formação de apatita. A superfície desses materiais é rica em radicais hidroxila OH, ou seja, estão carregadas negativamente em SBF. Todavia, o gel de Al_2O_3 não induz nucleação de apatita pois está carregado positivamente.

Esses resultados indicam que os grupos *Si-OH*, *Ti-OH*, *Zr-OH*, *Nb-OH* e *Ta-OH* na superfície dos géis são efetivos para induzir a formação de apatita em suas superfícies. Consequentemente, esses materiais são capazes de promover a osseointegração quando implantados no corpo vivo.

Em 2003, o SBF, após uma adequação no método de preparação, foi reconhecido pelo Comitê Técnico - ISO/TC150 da Organização Internacional para Padronização (*International Organization for Standardization*) como uma solução capaz de medir a capacidade de formação de apatita em materiais para implantes [37].

Em alguns casos, quando se deseja acelerar o processo de nucleação de apatita, é comum a utilização de um SBF com concentração iônica 50% maior que a do SBF convencional. Este SBF tem a mesma função do original e sua funcionalidade é bem estabelecida no mundo. A única diferença é que com a modificação os resultados são mais rápidos [37].

CAPÍTULO 3

3. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

3.1. MOAGEM

A moagem de alta energia consiste basicamente no processamento de materiais no estado sólido sob a forma de pó em um vaso de moagem de alta dureza contendo esferas também de alta dureza. O vaso de moagem, juntamente com os pós, é submetido a um movimento altamente energético por meio de vibração e/ou rotação. Durante o processo de moagem, as partículas dos pós são repetidamente laminadas, soldadas a frio, quebradas e resoldadas. As forças do impacto entre as esferas, o vaso e o pó deformam as partículas do pó plasticamente, fraturando-as. Devido ao constante impacto das esferas, a estrutura das partículas é continuamente refinada, porém, depois de certo tempo, o tamanho das partículas atinge um limite mínimo e um estágio estacionário é atingido. Isso ocorre quando é atingido um balanço entre a taxa de soldagem que tende a aumentar o tamanho das partículas e a taxa de fratura que tende a diminuir o tamanho das mesmas. As pequenas partículas são capazes de resistir à deformação sem sofrer fratura e, assim, tendem a se unir em grandes aglomerados. Desse modo, ambos, pequenas partículas e aglomerados, tendem a conduzir o pó a um tamanho intermediário de partícula. Neste estágio, o pó encontra-se homogêneo (cada partícula possui todos os componentes iniciais na proporção em que foram misturados) e as partículas já atingiram seu limite de dureza devido ao acúmulo de energia.

Diferentes tipos de equipamentos de moagem de alta energia são usados. Eles diferem em sua capacidade, eficiência de moagem, sistemas de resfriamento e aquecimento. O moinho usado neste trabalho foi um moinho do tipo planetário. Esse moinho é extensivamente utilizado para moagem de alta energia e tem capacidade de moer pequenas quantidades de pó a cada moagem. O vaso de moagem é colocado sobre um suporte giratório, o movimento do suporte faz o vaso girar em torno do seu próprio eixo, gerando uma força centrípeta, a qual atua nas esferas que colidem entre si. Os impactos ocorrem tanto entre as esferas como também contra a parede do vaso de moagem, estes impactos promovem a moagem do pó [43], como é ilustrado na Figura 6.



Figura 6: Esquema representativo do movimento das esferas no interior do vaso de moagem, obtido da referência 43.

O tempo de moagem é um dos parâmetros mais importantes a ser controlado. Normalmente o tempo de moagem é definido de modo a alcançar um estado estável entre a fratura e a soldagem a frio nas partículas do pó. O tempo requerido de moagem depende do tipo de moinho, da intensidade de moagem, da razão entre as massas do pó e das bolas e da temperatura.

É importante ressaltar que para longos intervalos de tempo de moagem pode haver contaminação dos pós por parte das esferas e/ ou pelo vaso de moagem. Neste caso ocorre a formação de fases espúrias, sendo importante que o pó seja moído em curtos intervalos de tempo, levando em conta o estado final desejado [43].

3.2.SINTERIZAÇÃO

A sinterização é uma das etapas mais importantes no processamento cerâmico via metalurgia do pó. Nesta etapa, ocorrem os processos de interação físico-químicos entre as diversas partículas que formam o material a ser sinterizado [44].

O processo ocorre quando as partículas estão em um estreito contato, e a temperatura é suficientemente alta para produzir a união por coalescência. Em alguns casos, quando se trabalha com sistemas com vários componentes e a temperatura supera a temperatura de fusão de algum dos componentes, ocorre a formação de uma fase líquida. A sinterização de um

material provoca usualmente muitas mudanças nas suas propriedades. Nas cerâmicas, em geral, o processo de sinterização aumenta a resistência mecânica, a condutividade térmica e a densidade [45].

A sinterização é dividida basicamente em três etapas: inicial, intermediária e final. No estágio inicial ocorre o rearranjo de partículas do pó, e a formação de pescoço nos pontos de contato entre as partículas (Figura 7(b)) e a densificação aumenta de 50 a 60%, devido ao melhor empacotamento de partículas. Na etapa intermediária (Figura 7(c)) ocorre o crescimento do tamanho dos pescoços e a quantidade de poros é consideravelmente reduzida, havendo aproximação entre os centros das partículas. Logo, são formados os contornos de grão. Os movimentos dos contornos de grão fazem com que grãos maiores cresçam as custas de grãos menores. Este estágio perdura enquanto os canais dos poros estiverem conectados, e se encerra quando esses se tornam isolados. O estágio final (Figura 7 (d)) é caracterizado pela eliminação lenta dos poros fechados por difusão proporcionando o transporte de massa ao longo dos contornos de grão.

Geralmente, na fase final do processo de sinterização, ocorre um aumento considerável do tamanho dos grãos. O crescimento dos grãos, quando não controlado, costuma deixar poros isolados no interior destes grãos e esses poros são difíceis de serem removidos [46].



Figura 7: (a) Representação de um material antes da sinterização. (b) etapa inicial, (c) intermediária e (d) etapa final do processo de sinterização, retirada da referência 47.

3.3.MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Com a microscopia eletrônica de varredura é possível observar a microestrutura e morfologia do material que se deseja estudar com ampliações entre 100 e 100.000 vezes, aproximadamente. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), elétrons gerados termoionicamente em um filamento de tungstênio são acelerados através de duas ou três lentes eletromagnéticas. Desta maneira, um feixe de elétrons em uma câmara de vácuo pode ser utilizado para verificar a microestrutura de um composto e seus constituintes, observando-se defeitos, porosidade, morfologia, tamanho, orientação, composição, entre outros.

Em um microscópio eletrônico de varredura são utilizados dois dos sinais provenientes da interação elétron-amostra para gerar a imagem: os elétrons secundários e os elétrons retro-espalhados. Os elétrons secundários, por possuírem baixa energia, são atraídos para o detector por um potencial positivo. O detector dos elétrons retro-espalhados é posicionado de forma a capturar o maior número possível desses elétrons. Isso porque elétrons retro espalhados são mais energéticos e oferecem grande dificuldade para serem atraídos para um respectivo detector [48]. A interação de um feixe de elétrons com uma amostra, bem como os tipos de sinais gerados desta interação, estão ilustrados na Figura 8 [47].



Figura 8: Representação dos principais sinais gerados na interação de um feixe de elétrons com uma amostra, adaptada da referência 48.

A emissão dos elétrons secundários depende sensivelmente da topografia da superfície da amostra e apresenta imagem com boa profundidade de foco para ampliações entre 10 e 100.000 X. Os elétrons retroespalhados possuem altas energias que podem ser iguais à do feixe de elétrons incidente, pois resulta principalmente de colisões elásticas com a superfície da amostra.

Para a formação das imagens em um microscópio eletrônico de varredura, faz-se uso de dois detectores, cada um deles para uma fonte diferente de sinal. Em ambos os detectores, quando os elétrons os atingem, produzem uma corrente elétrica que é amplificada eletronicamente pelo microscópio e utilizada para construir a imagem da amostra. Uma terceira análise que pode ser obtida em um microscópio eletrônico de varredura é a análise composicional da amostra. Esta análise é realizada a partir do sinal dos raios-X característicos emitidos pela amostra durante a interação com o feixe de elétrons. Para tanto, se faz necessário a utilização de um detector de energia dispersiva de raios-X (EDX). Este detector permite uma análise qualitativa e semi quantitativa da composição da amostra analisada, possibilitando a identificação dos elementos químicos presentes e, conseqüentemente, a determinação da proporção entre eles [47].

3.4.DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X

A difratometria de raios-X é uma importante ferramenta para a identificação e caracterização estrutural de materiais cristalinos. Esta técnica, além de permitir a identificação das fases cristalinas que compõem um material, fornece informações sobre a natureza e os parâmetros estruturais do cristal desta fase.

Quando um feixe de raios-X, com determinada freqüência, incide em uma rede cristalina com comprimento de onda (λ) próximo da distância do espaçamento dos átomos nesta rede, acontecem fenômenos de interferência construtiva e destrutiva [49]. Para que os feixes difratados sofram interferência construtiva, é preciso que a diferença entre os caminhos percorridos pelos feixes de raios-X sejam um múltiplo inteiro do comprimento de onda λ . Por exemplo, o feixe difratado pelo segundo plano de átomos percorre uma distância (*PO* + *OQ*) a mais do que o feixe difratado pelo primeiro plano de átomos, como se observa na Figura 9. A condição para que ocorra interferência construtiva é:
$$PO + OP = n\lambda = 2d\sin\theta \tag{2}$$

sendo:

n : 1, 2, 3, 4,...;

d : distância interplanar;

 λ : comprimento de onda;

 θ : ângulo de Bragg.



Figura 9: Difração dos feixes de raios-X por planos atômicos, obtida da referencia 49.

Na Figura 10 é mostrado um esquema do funcionamento de um difratômetro de raios-X. O feixe de raios-X, gerado pela fonte S, passa pelo colimador A e incide na amostra C, a qual está sobre o suporte H. A amostra sofre movimento de rotação em torno do eixo O, perpendicular ao plano da Figura 10. O feixe difratado passa pelos colimadores B e F e incide no detector G, o qual está sobre o suporte E. Os suportes E e H são acoplados mecanicamente de modo que o movimento de 2 x graus do detector é acompanhado pela rotação de 1 x graus da amostra. O contador pode varrer toda faixa de ângulos com velocidade constante ou ser posicionado em uma posição desejada. A intensidade do feixe difratado é medida pelo contador, que pode ser um contador proporcional, Geiger de cintilação ou ainda um semicondutor [49]. Os difratogramas obtidos no difratômetro são comumente identificados por programas computacionais, que são os gráficos de intensidade em função do ângulo de difração. As amostras são identificadas comparando o padrão de difração obtido com padrões catalogados, como o arquivo JCPDS - Joint Committe on Powder Difraction Standards [50].



Figura 10: Diagrama esquemático de um difratômetro de raios-X, obtido da referencia 49.

3.4.1. Cálculo do tamanho do cristalito

O tamanho de cristalito (D_{hkl}) é determinado pela equação de Scherrer (Equação 3) a partir da medida da largura de um pico de difração no ponto onde a intensidade cai pela metade de seu valor máximo, "*full width at half maximum - FWHM*", ou simplesmente chamada de largura a meia altura (β) [50].

j

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta\cos\theta}$$
(3)

sendo:

- k: coeficiente de forma com valores entre 0,9 e 1;
- λ : comprimento de onda da radiação CuK α ;
- β : largura da meia altura (FWHM),
- θ : ângulo de difração de Bragg.

Para eliminar possíveis erros relacionados ao instrumento, a largura a meia altura foi corrigida do fator instrumental (β_{int}), referente ao padrão hexaboreto de lantânio (*LaB*₆), de acordo com a Equação 4.

$$\beta = \sqrt{\beta_{\rm int}^2 - \beta_{\rm exp}^2} \tag{4}$$

em que:

 β_{int} : é a largura da meia altura do padrão *LaB*₆;

 β_{exp} : é a largura da meia altura experimental.

Para determinar a largura da meia altura foram realizadas deconvoluções utilizando a função pseudo-Voigt que é uma função composta por uma fração da função gaussiana e outra da função Lorentziana [51].

3.4.2. Análise quantitativa de fases - método Rietveld

O método de Rietveld é amplamente utilizado na caracterização de materiais estudados por difração de raios-X. Com esse método é possível fazer o refinamento ou o ajuste dos parâmetros de uma estrutura cristalina a partir de dados obtidos pela difratometria de raios-X da amostra. Desta forma, é possível obter informações estruturais da amostra como posições atômicas, parâmetro de rede, agitação térmica, quantidade de fases cristalinas, orientação preferencial, etc. Esses parâmetros são refinados a partir do *método dos mínimos quadrados*, que consiste em minimizar a soma dos quadrados da diferença entre a intensidade calculada e a experimental para cada ponto do padrão de difração [52]. Matematicamente, o método dos mínimos quadrados minimiza a quantidade:

$$S = \sum_{i=1}^{n} w_i (I_{obs} - I_{calo})^2$$
(5)

sendo:

*I*_{obs} : intensidade observada ou experimental;

*I*_{calc}: intensidade calculada;

 $W_i : I/I_{obs}$, ou seja, W_i é o "peso" para cada ponto medido, conhecido também como o inverso da variância.

A função matemática, que melhor se ajusta ao formato dos picos de difração, é denominada função perfil e, a escolha da função perfil mais adequada para cada refinamento é um fator importante. A função perfil pode ser uma função Gaussiana, Lorentziana, Polinomial, entre outras. Neste trabalho foi utilizada a função pseuso-Voight (pV), que possui contribuições das funções Lorentzina e Gaussina:

$$pV(x) = \eta L(x) + (1 - \eta)G(x)$$
(6)

em que:

 η : porcentagem da função Lorentziana;

 $(1-\eta)$: porcentagem da função Gaussiana.

A identificação da melhor função perfil de reflexão depende muito do equipamento e da fonte de radiação e, estão relacionadas com o perfil de largura H_k (ou FWHM) [53], dado pela equação de Caglioti (Equação 7) [54]. Além disso, essa variável é utilizada para calcular o tamanho de cristalito numa dada direção (hkl) de difração.

$$H_k = U \tan^2 \theta + V \tan \theta + W = (FWHM)^2$$
⁽⁷⁾

Em que U, V e W são parâmetros refináveis.

Uma das necessidades de se trabalhar com métodos residuais, como o método de Rietveld, é estabelecer indicadores que permitam observar a evolução dos ajustes em cada ciclo, para julgar se o processo de refinamento é satisfatório ou não. Para tanto, são comumente usados os chamados R-valores (fatores de confiança), dados por:

R-fator de estrutura = R_F =
$$\sum_{i=1}^{n} \left| \frac{(F_{i(obs)})^{1/2} - (F_{i(calc)})^{1/2}}{(F_{i(obs)})^{1/2}} \right|$$
 (8)

R-fator de Bragg = R_B =
$$\sum_{i=1}^{n} \left| \frac{({}^{"}I_{ih(obs)}{}^{"}) - (I_{ih(calc)})}{I_{ih(obs)}} \right|$$
 (9)

$$R-padrão = R_P = \sum_{i=1}^{n} \left| \frac{(I_{i(obs)}) - (I_{i(calc)})}{I_{i(obs)}} \right|$$
(10)

R- peso padrão = R_{WP} =
$$\sum_{i=1}^{n} \sqrt{\frac{w_i (I_{i(obs)} - I_{i(calc)})^2}{w_i (I_{i(obs)})^2}}$$
 (11)

$$R-esperado = R_{EXP} = \sqrt{\frac{N-P}{\sum_{i=1}^{n} w_i (I_{i(obs)})^2}}$$
(12)

O valor de $I_{ih(obs)}$ aparece entre aspas porque as intensidades de Bragg geralmente não são observadas diretamente. Do ponto de vista matemático, R_{WP} é o mais significativo dos Rvalores, porque o numerador é o resíduo que está sendo minimizado. Pela mesma razão, é também aquele que melhor reflete o progresso do refinamento. Outro critério numérico útil é a "qualidade do ajuste", χ^2 , dada por:

$$\chi^{2} = (N - P) \left(\frac{R_{WP}}{R_{EXP}} \right)$$
(13)

Sendo:

- N: número de pontos experimentais
- P: número de parâmetros de ajuste

Quanto mais próximo de 1 estiver o valor de χ^2 , melhor é o refinamento. Contudo, o χ^2 é um parâmetro delicado do ponto de vista matemático devido ao fato dele depender da razão (R_{WP}/R_{EXP}). Esta razão depende, dentre outras coisas, da qualidade da medida experimental. Por exemplo, se a medida for feita em contagem muito baixa, o R_{EXP} é relativamente alto e a razão (R_{WP}/R_{EXP}) fica pequena, mesmo que o refinamento não esteja convergindo, podendo levar a uma conclusão equivocada a respeito do refinamento. Portanto, o χ^2 é importante pois avalia a qualidade do refinamento, no entanto, ele nunca deve ser avaliado isoladamente. Um bom refinamento deve ser feito analisando simultaneamente a concordância gráfica entre os valores experimentais e calculados, os R- fatores e o χ^2 .

3.5.ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A espectroscopia na região do infravemelho foi utilizada neste trabalho para se observar os grupos funcionais presentes na matéria prima e nos compósitos, principalmente os

íons fosfatos, carbonatos e hidroxila, característicos na hidroxiapatita e em outros fosfatos de cálcio.

A região da radiação no infravermelho está situada entre o comprimento de onda (λ) 0,75 µm e 1000 µm. Isso corresponde aos números de onda⁵ 13.333 e 10 cm⁻¹. A radiação infravermelha, quando absorvida, converte-se em energia de rotação ou de vibração molecular. As mudanças de níveis de energia é um processo quantizado, porém o espectro vibracional costuma aparecer como uma séria de bandas ao invés de linhas, isso ocorre porque cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional. A freqüência ou comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos. Neste trabalho, as bandas de vibração observadas foram as que ocorrem entre 4000 e 400 cm⁻¹ (infravermelho médio). As posições das bandas no espectro do infravermelho são apresentadas em número de onda, cuja unidade é o cm⁻¹. Essa unidade é diretamente proporcional à freqüência energia. As intensidades das bandas podem ser expressas em transmitância⁶ ou absorbância⁷.

Somente as vibrações que resultam em uma alteração rítmica do momento dipolar da molécula são observadas no infravermelho. O campo elétrico alternado produzido pela mudança de distribuição de carga que acompanha a vibração acopla a vibração molecular com o campo magnético oscilante da radiação eletromagnética, o que resulta em absorção de energia radiante [55]. As medidas de espectrometria do infravermelho são realizadas em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Figura 11).

A radiação infravermelha emitida por uma fonte é separada em dois feixes, um deles percorrendo uma distância fixa e o outro uma distância variável (conseguida a partir de um espelho móvel). O feixe combinado passa pela amostra e é focado no detector. Quando a diferença entre os comprimentos de onda é um múltiplo inteiro do feixe invariante, ocorre interferência construtiva. Quando a diferença é um múltiplo ímpar de um quarto do comprimento de onda, ocorre interferência destrutiva. O resultado é um conjunto de oscilações construtivas e destrutivas chamado de interferograma. O interferograma, que é obtido em função do tempo, é convertido em um espectro em função do número de onda por meio de uma transformada de Fourier [55,56].

⁷ Absorbância =
$$\log_{10}(\frac{1}{Transmitância})$$

⁵ Número de onda é definido como o inverso do comprimento de onda = $1/\lambda$.

⁶ Transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida e a energia radiante que nela incide.



Figura 11: Diagrama esquemático de um espectrofotômetro de FT-IR, adaptado da referência 55.

3.6. ESPECTROSCOPIA RAMAN

A técnica de espectroscopia Raman permite avaliar vários grupos funcionais moleculares por meio de um espectro em função do número de onda característico de cada vibração.

O efeito Raman refere-se ao espalhamento inelástico da luz e assim como no caso da espectroscopia no infravermelho, o efeito está relacionado aos modos de vibração molecular. Contudo, os mecanismos físicos envolvidos nas duas técnicas são diferentes. Consequentemente, nem todas as bandas que aparecem no espectro Raman aparecem no espectro de FTIR e vice-versa, de forma que essas técnicas são consideradas complementares [57].

No espalhamento Raman a radiação incidente é espalhada pela molécula com uma energia ligeiramente diferente da radiação incidente. Este processo envolve a variação da

polarizabilidade da molécula provocada pela radiação incidente. Assim, o espalhamento Raman está intimamente ligado ao momento de dipolo da molécula que depende diretamente do campo elétrico da radiação incidente [58]

Se a polarização é constante, o espalhamento que a radiação sofreu é elástico, porém se a molécula muda sua polarizabilidade, ou seja, muda o centro de carga, então o espalhamento é inelástico ou Raman [59]. O Espalhamento elástico da radiação é chamado de efeito Rayleigh. No efeito Raman, dois tipos de espalhamento devem ser levados em conta. Quando o fóton incidente possui energia maior que o fóton espalhado o efeito é conhecido como espalhamento Raman Stokes, se, por outro lado, a radiação incidente, após ser absorvida pela molécula, for emitida com energia maior que a inicial o efeito é chamado de anti-Stokes.

No caso do espalhamento do tipo Stokes o fóton incidente encontra a molécula no estado fundamental de energia, e o fóton espalhado a deixa em um estado vibracional excitado, e ao re-emitir o fóton, ela não retoma exatamente ao estado fundamental e sim a um estado com energia ligeiramente maior E_1 . No caso do efeito Raman Anti-Stokes, a molécula encontra-se num estado excitado E_1 absorve a energia do fóton e, ao emiti-lo novamente, parte de sua energia é transferida para o mesmo. Desta maneira a molécula volta para o estado fundamental E_0 de energia [59].

A espectroscopia Raman requer o uso de fontes de luz monocromática e de alta freqüência (laser), visto que a técnica baseia-se no pequeno deslocamento da freqüência a partir da luz incidente [60]. A Figura 12 ilustra as interações Rayleigh e Raman.



Figura 12: Esquema dos diagramas de energia dos espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes e Raman Anti-Stokes, adaptado da referencia 59.

3.7. PROPRIEDADES FÍSICAS

3.7.1. Densidade (método de Arquimedes)

A densidade e a variação dimensional são dois parâmetros importantes a serem analisados nos processos de sinterização. A densidade das amostras sinterizadas foi determinada pelo método de Arquimedes de acordo com a norma MPIF Standard 42-1986 [61,10], a partir da Equação 14:

$$\rho_{s} = \frac{m_{s}}{\frac{(m_{T} - m_{a})}{\rho_{a}} - \frac{(m_{T} - m_{s})}{\rho_{v}}}$$
(14)

sendo:

 ρ_s : densidade da amostra sinterizada;

 ρ_a : densidade do líquido (água);

 ρ_{v} : densidade do impermeabilizante (verniz);

 m_s : massa da amostra sinterizada seca;

 m_T : massa total seca (amostra+impermeabilizante);

*m*_a: massa total em imersão.

Com o resultado da medida de densidade é possível estimar a porosidade percentual do material sinterizado, sendo necessário conhecer a densidade teórica do compósito determinada pela regra das misturas (seção 4.2). A porosidade percentual é dada por:

$$\gamma(\%) = (1 - \frac{\rho_s}{\rho_c})^* 100 \tag{15}$$

em que:

 $\gamma(\%)$: porosidade percentual;

 ρ_c : densidade teórica do material.

3.7.2. Variação Dimensional

A variação dimensional é determinada por comparação entre a medida (linear) da amostra em verde (antes da sinterização) e a medida após a sinterização. Neste trabalho a variação dimensional foi obtida pela Equação 16:

$$\Delta L(\%) = \frac{(L_F - L_I)}{L_I} *100$$
(16)

sendo:

 ΔL : variação dimensional linear percentual; L_I : dimensão inicial (antes da sinterização); L_D : dimensão final (após a sinterização);

3.8. PROPRIEDADES MECÂNICAS

As propriedades mecânicas de um material são determinadas por meio de vários ensaios. Existem os ensaios destrutivos (tração, impacto, flexão, fadiga e etc.) e os ensaios não destrutivos (dureza) que, em certos casos, podem não inutilizar a peça ensaiada.

A escolha do ensaio mais interessante ou mais adequado para cada material depende da finalidade deste, dos tipos de esforços que esse material vai sofrer e das propriedades mecânicas que se deseja medir [4]. Dois testes adequados para materiais cerâmicos são a microdureza Vickers e a compressão axial, os quais estão descritos abaixo:

3.8.1. Microdureza Vickers

A técnica de microdureza Vickers fornece informação sobre a resistência do material à deformação plástica localizada devido à penetração de uma ponta, ou indentador. Nesta técnica, utiliza-se um penetrador de diamante, na forma piramidal, com um ângulo de 136° entre as faces opostas, como mostrado na Figura 13 [62].



Figura 13: Penetrador (indentador) e a impressão Vickers, retirado da referência 62.

A dureza Vickers é dada pela razão entre a carga aplicada Q e a área de contato A, que é a soma das áreas das quatro faces deixadas no material pelo indentador [62]:

$$H_{v} = \frac{Q}{A} = 2Q \frac{\frac{\sin 136^{\circ}}{2}}{L^{2}} = \frac{1,8544Q}{L^{2}}$$
(17)

$$L = \frac{L1 + L2}{2} \tag{18}$$

sendo:

 H_{v} : microdureza Vickers (kgf/mm²);

Q: carga aplicada (kgf);

A: área superficial piramidal (mm²);

L: valor médio do comprimento das diagonais (mm) $L = \frac{L1 + L2}{2}$

1 kgf/mm² ► HV (Hardness Vickers) ► equivale a 9,806.10⁶ Pa

3.8.2. Resistência à compressão axial

O teste de compressão pode ser usado para determinar a força máxima suportada por uma amostra bem como a sua tensão de ruptura. Uma amostra é deformada até sua ruptura com uma carga padrão de compressão ao longo da direção axial [63]. Este tipo de ensaio é bastante utilizado nas indústrias de construção civil. Às vezes, a grande exigência requerida para um projeto é a resistência à compressão. Esse é o caso, por exemplo, de bases de máquinas, barramentos, etc. Em linhas gerais, a compressão é um esforço axial que tende a provocar um encurtamento do corpo de prova [4,63].



Figura 14: Representação esquemática da máquina de ensaio de compressão, adaptada da referência 64.

Na Tabela 4, são listados alguns valores de compressão axial para alguns ossos do corpo humano.

Pesquisadores	Valores de resistência à compressão (MPa)	Osso analisado	
Dempster e Liddicoat [65]	134	Fêmur	
Ko [66]	134	Fêmur	
McElhanney [67]	143	Fêmur	
Ascenzi e Bonucci [68]	90,6-116	Fêmur	
Schoenfeld et al. [69]	0,15-13,7	Cabeça de fêmur	
Carter e Hays [69]	1-13	Tíbia	
Martens et al. [69]	0,6-10,2	Cabeça de fêmur [*]	
Linde e Hvid [70]	5,3	Tíbia próxima	

Tabela 4: Valores encontrados na literatura referentes à resistência à compressão em ossos humanos.

* Medidas realizadas em diferentes regiões da cabeça de fêmur, por isso a grande variação nos valores obtidos.

CAPÍTULO 4

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Visando alcançar os objetivos propostos no início deste trabalho, foi importante a escolha de um procedimento experimental apropriado possibilitando a realização das diferentes etapas previstas. Desta maneira foi realizada primeiramente a seleção da matéria prima a ser utilizada. Essa fase preliminar consistiu na produção da hidroxiapatita a partir de ossos de peixes bem como a caracterização de todos os precurssores (HAp, TiO_2 e Nb_2O_5) por difratometria de raios-X e espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A partir de então, o procedimento foi dividido em duas etapas:

Parte I

Essa fase é dedicada à produção, caracterização, e realização de testes de bioatividade *"in vitro*", utilizando o fluido corpóreo simulado (SBF), no compósito (*TiO*₂-*HAp*).

Na preparação dos compósitos, foram avaliados diferentes parâmetros de moagem e sinterização. A caracterização das cerâmicas produzidas foi realizada por diferentes técnicas, como pode ser observado no fluxograma apresentado na Figura 15.

Parte II

Nesta etapa, compósitos do sistema $(100-x)Nb_2O_5$ -(x) Hap foram produzidos por métodos pré-estabelecidos [11,12]. Em seguida, foi realizada a caracterização das amostras por difratometria de raios-X e espectroscopia Raman e por fim os testes de bioatividade "*in vitro*" foram empregados utilizando o fluido corpóreo simulado (SBF).

O desenvolvimento experimental deste trabalho está sintetizado no fluxograma apresentado na Figura 15 e as suas diferentes etapas serão detalhadamente explicadas ao longo deste capítulo.



Figura 15: Fluxograma representativo dos procedimentos experimentais utilizados

4.1. OBTENÇÃO DOS PRECURSSORES

Para a produção da hidroxiapatita utilizada neste trabalho, usou-se ossos do peixe pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) cedidos pelo Núcleo de Pesquisas em Limnologia Ictiologia e Aqüicultura (NUPELIA-UEM). Primeiramente, os ossos foram limpos em água quente e lavados diversas vezes com escova. Com isso foi removida uma boa parte dos resíduos orgânicos (carne, cartilagens, etc.). Em seguida, o material foi seco e, então calcinado a 900 °C por 8 horas, eliminando assim qualquer resíduo orgânico dos ossos, ou seja, após a calcinação restou apenas a fase mineral dos ossos. Após isso, o material foi triturado em almofariz de ágata e submetido à moagem por 8 horas em um moinho Retsch PM 100, utilizando-se vaso de moagem e esferas de aço inox. Os parâmetros utilizados no processo de moagem estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de moagem da hidroxiapatita após calcinação.

ço inoxidável
00 rpm
0 min/10min
/1
h
r
() () ()

Rutilo (TiO_2) comercial com pureza analítica (PA) de 98% (VETEC) foi utilizado para a produção dos compósitos (TiO_2 -HAp).

O pentóxido de nióbio (Nb_2O_5) usado na produção dos compósitos (100-x) Nb_2O_5 . (x)HAp), foi obtido pela oxidação de cavacos de nióbio metálico cedidos pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM). O tratamento térmico foi realizado na temperatura de 1000 ° C em atmosfera livre por 1h. Após a reação o material foi triturado em um almofariz de ágata.

4.2. PREPARAÇÃO DOS COMPÓSITOS NA FORMA DE PÓ

Para a obtenção dos compósitos na forma de pó é necessário um conhecimento prévio da densidade teórica do compósito, que pode ser obtida pela regra da misturas [71], expressa matematicamente pela equação 19:

$$\boldsymbol{\rho}_{c} = \sum_{j=1}^{n} \boldsymbol{p}_{j} \boldsymbol{\rho}_{j} \tag{19}$$

sendo:

 ρ_c : densidade do compósito;

 p_i : porcentagem volumétrica de cada compósito;

 ρ_i : densidade de cada elemento do compósito;

n: número de elementos do compósito.

Conhecendo o valor da densidade teórica do compósito e, escolhendo a massa de material (compósito) que se deseja obter, é possível determinar o volume do compósito:

$$V_c = \frac{M_c}{\rho_c} \tag{20}$$

Contudo, o compósito foi determinado em relação ao volume de cada componente, que corresponde ao volume do compósito multiplicado pelo percentual de cada elemento, de forma que:

$$V_j = p_j V_c \tag{21}$$

Assim, para obter a massa de cada componente (M_j) no compósito, basta multiplicar a equação acima pela densidade dos elementos utilizados para formar o material pretendido:

$$M_j = \rho_j V_j \tag{22}$$

em que:

V_c: volume do compósito;

 V_i : volume de cada elemento do compósito;

 M_i : massa de cada elemento do compósito.

As amostras para o sistema TiO_2 - HAp foram misturadas na proporção de 1:1 em volume percentual de acordo com a regra das misturas. Enquanto que, para o sistema (100-*x*)Nb₂O₅(*x*)HAp, as amostras foram misturadas nas proporções de x = 10, 20, 30, 40 e 50% de HAp, também pela regra das misturas. Após a mistura, as amostras foram homogeneizadas, sendo esta uma etapa importante na preparação de um material. A

distribuição homogênea dos aglomerados de partículas favorece a produção de reações de estado sólido na condição de sinterização empregada. A homogeneidade dos pós deve proporcionar uma densidade uniforme, que favorece as propriedades físico-mecânicas do material compósito obtido [72]. Após a homogeneização, a mistura passou pelo processo de moagem em um moinho Retsch PM 100, utilizando-se um vaso de moagem de aço inox e esferas também deste material. As condições da moagem estão especificadas na Tabela 6.

Vaso de moagem e esferasAço inoxidávelVelocidade de rotação 300 rpm Ciclo/ pausa 30 min/10min Razão bola/ massa $6/1$ Tempo de moagem (sistema TiO_2 -HAp) $2, 4, 8, 12, 16 \text{ h}$ Tempo de moagem (sistema $(100-x)Nb_2O_{5.}(x)HAp)$ 3 h	$1 abeta 0. Condições da moagem dos sitemas 110_2 \cdot 110_2 \cdot 110_2 \circ 5_2(x) = 100_2 \cdot 100_2 \cdot$				
Velocidade de rotação 300 rpm Ciclo/ pausa 30 min/10min Razão bola/ massa $6/1$ Tempo de moagem (sistema TiO_2 -HAp) $2, 4, 8, 12, 16 \text{ h}$ Tempo de moagem (sistema $(100-x)Nb_2O_{5.}(x)HAp)$ 3 h	Vaso de moagem e esferas	Aço inoxidável			
Ciclo/ pausa $30 \min/10\min$ Razão bola/ massa $6/1$ Tempo de moagem (sistema TiO_2 -HAp) $2, 4, 8, 12, 16 \ln$ Tempo de moagem (sistema $(100-x)Nb_2O_5.(x)HAp)$ $3 \ln$	Velocidade de rotação	300 rpm			
Razão bola/ massa $6/1$ Tempo de moagem (sistema TiO_2 -HAp) $2, 4, 8, 12, 16 h$ Tempo de moagem (sistema (100-x)Nb_2O_5.(x)HAp) $3 h$	Ciclo/ pausa	30 min/10min			
Tempo de moagem (sistema TiO_2 - HAp)2, 4, 8, 12, 16 hTempo de moagem (sistema (100-x) $Nb_2O_5(x)HAp$)3 h	Razão bola/ massa	6/1			
Tempo de moagem (sistema (100-x) $Nb_2O_{5.}(x)HAp$) 3 h	Tempo de moagem (sistema <i>TiO</i> ₂ - <i>HAp</i>)	2, 4, 8, 12, 16 h			
	Tempo de moagem (sistema $(100-x)Nb_2O_{5-}(x)HAp$)	3 h			
Atmosfera Ar	Atmosfera	Ar			

Tabela 6: Condições da moagem dos sitemas TiO_2 - $HAp \in (100-x)Nb_2O_5(x)HAp$

Após o processo de moagem o material resultante do compósito TiO_2 -HAp foi compactado a 40 MPa, uniaxialmente, e então prensadas isostaticamente a 117 MPa, obtendose amostras com diâmetros de 10 mm e espessura de 2 mm. No caso do sistema (100-x) $Nb_2O_{5-}(x)HAp$, o material resultante da moagem foi prensado uniaxialmente a 350 MPa obtendo-se amostras também com diâmetros de 10 mm e espessura de 2 mm.



Figura 16: Moinho Retsch PM 100 utilizado no processo de moagem.

As amostras do sistema TiO_2 -HAp foram sinterizadas nas temperaturas: 1000, 1100, 1200 e 1300 °C por três horas. As amostras correspondentes ao sistema $(100-x)Nb_2O_5(x)HAp$ foram sinterizadas por uma hora a 1000°C conforme trabalhos prévios [11,12].

Em ambos os sistemas utilizou-se atmosfera livre e uma taxa de aquecimento de 6° /min.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS SINTERIZADOS

4.3.1. Propriedades Físicas

A variação dimensional foi obtida por comparação entre a medida do diâmetro da amostra antes da sinterização e a medida do diâmetro após a sinterização. As medidas foram realizadas com um paquímetro digital Jomarca com precisão de \pm 0,01 mm. O valor da variação dimensional corresponde ao valor médio de duas medidas realizadas em 12 amostras.

A densidade das amostras foi determinada pelo método de Arquimedes (seção 3.7.1). A medida das massas foi feita em uma balança digital Shimadzu AUW220D, com 5 dígitos e o acessório Specific Gravity Measurement Kit. O valor da densidade obtido é o valor médio referente às medidas realizadas em 6 amostras.

4.3.2. Propriedades mecânicas

A dureza Vickers foi analisada em um micro durômetro HVS – 1000 com indentador de diamante, conforme a norma ASTM 384-89. Nos testes, foi utilizada uma carga de 500 gf durante 15 segundos. O valor da microdureza corresponde ao valor médio de 10 indentações realizadas em cada amostra.

Os testes de compressão axial foram realizados em uma máquina universal de ensaios mecânicos LLOYD, modelo LR10k, conforme norma ASTM C773 – 88 (2011). Os ensaios foram realizados com célula de carga de 10 kN à velocidade de 3mm/min até a ruptura dos corpos de prova. Os corpos de prova para os ensaios de compressão foram preparados com dimensões de 10 mm de diâmetro por 10 mm de altura.

4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM) em um microscópio Shimadzu SuperScan SS-550. As micrografias foram obtidas tanto para os precursores na forma de pó quanto para os corpos cerâmicos. O material na forma de pó foi disperso em acetona e depositado em um suporte metálico. No caso dos corpos cerâmicos, primeiramente foram feitas micrografias superficiais e, posteriormente, da superfície de fratura. As amostras foram fraturadas numa prensa Tempopress 2 da marca Struers utilizando um acessório construído em aço VC-131 o qual está mostrado na Figura 17. Para as análises de microscopia eletrônica as amostras foram recobertas por um filme condutor de ouro pelo processo de "Sputtering". As micrografias foram obtidas em diferentes ampliações com aceleração do feixe de 15 keV por meio do detector de elétrons secundários. Com o auxílio do detector de raios-X (característicos), foram realizadas análises qualitativas e semi-quantitativas dos elementos constituintes das amostras, por espectrocopia de raios-X por dispersão de energia (EDS).



Figura 17: Fotografia mostrando o procedimento de fratura das amostras

4.3.4. Difratometria de raios-X

As análises por difratometria de raios-X foram conduzidas utilizando um difratômetro Shimadzu XRD – 7000 com radiação Cu K_{α}. Os intervalos de tempo de aquisição das medidas variaram de acordo com a análise desejada. Os difratogramas obtidos foram utilizados para a identificação das fases cristalinas, no cálculo do tamanho do cristalito, nos refinamentos estruturais pelo método de Rietveld e na detecção da formação de apatita na superfície dos materiais submetidos aos testes de bioatividade "*in vitro*".

4.3.5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho foi realizada no Departamento de Química-UEM em um espectrofotômetro Bomem MD 100, no intervalo de 400 a 4000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹. O método de medida utilizado foi a transmitância através de pastilha de KBr (brometo de potássio). Para isso, o pó do material a ser analisado foi diluído em pó de KBr na proporção de 2 para 100 mg e, em seguida, compactado. O espectro é obtido pela diferença entre o espectro da mistura (amostra+KBr) e o espectro do KBr.

4.4. TESTES DE BIOATIVIDADE "IN VITRO"

Os testes de bioatividade foram realizados utilizando um fluido corpóreo simulado, o SBF (simulated body fluid) desenvolvido por Kokubo [37]. O fluido é uma solução sintética de concentração iônica semelhante à do plasma sanguíneo. Em nossos experimentos foi utilizado um SBF com a mesma concentração proposta por Kokubo (SBF convencional) e outro 50% mais concentrado (SBF 1,5) [37]. O fluido foi preparado seguindo o protocolo proposto por Kokubo e Takadama em 2006 [37]. Na Tabela 7 estão relacionados os reagentes utilizados na preparação de 1000 ml de SBF convencional e de SBF 1,5, bem como suas respectivas quantidades.

Ordem	Reagente	Fórmula Química	SBF conv.	SBF 1,5
1°	Cloreto de sódio	NaCl	8,035 g	12,0525 g
2°	Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	0,355 g	0,5325 g
3°	Cloreto de Potássio	KCl	0,225 g	0,3375 g
4°	Potássio fosfato dibásico trihidrato	$K_2HPO_4\ .\ 3H_2O$	0,231 g	0,3465 g
5°	Cloreto de magnésio	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311 g	0,4665 g
6°	Ácido clorídrico	HCl- 1M	39 ml	58,5 ml
7°	Cloreto de cálcio	CaCl ₂	0,292 g	0,438 g
8°	Sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	0,072 g	0,108 g

Tabela 7. Relação dos reagentes e suas quantidades para a preparação do SBF (convencional e 1,5) [37].

4.4.1. Preparação das soluções para testes de bioatividade

Para preparar o SBF, as massas dos reagentes foram medidas em uma balança analítica e dissolvidas em um Becker de polipropileno com água deionizada a $36,5^{\circ}$ C (temperatura média do corpo humano). A temperatura é mantida constante utilizando-se um banho Maria com agitador magnético acoplado a um controlador de temperatura (Figura 18). O procedimento é dividido basicamente em três etapas. Na primeira, os reagentes do 1° ao 8° são dissolvidos um a um dentro da solução. Na segunda, utiliza-se o Tris hidroximetil amino metano (TRIS) e o *HCl* para ajustar o pH da solução em 7,4 (pH do sangue). Na terceira, por fim, o SBF é filtrado em uma membrana com poros de 0,2 µm com auxílio de uma seringa. Depois de preparado o SBF deve ser conservado em um refrigerador entre 5 e 10°C por até 28 dias.



Figura 18: Esquema do sistema utilizado no preparo do SBF, adaptado da referência 73.

4.4.2. Procedimento para a imersão das amostras em SBF

Cada amostra, na forma de discos, foi imersa em 30 ml de SBF em frascos de polipropileno sendo a solução renovada a cada três dias. O volume adequado de SBF para a imersão das amostras foi determinado, de acordo com a norma ISO/FDIS-23316(2007) [73], pela equação:

$$V_{S} = \frac{S_{A}}{10} \tag{23}$$

sendo,

 $V_{\rm S}$: volume de SBF em mm³;

 S_A : área superficial da amostra em mm².

No entanto, esta equação é válida apenas para materiais não porosos. O cálculo acima para as amostras com 1,5 mm de espessura e 10 mm de diâmetro resulta em, aproximadamente, 20 ml de SBF. Como as cerâmicas utilizadas são porosas, foram utilizados 30 ml de solução para todas as amostras. Antes de serem submersos, todas as amostras tiveram sua superfície lixada com lixa 600# e, na sequência, lavadas em ultra-som primeiramente com acetona e em seguida com água destilada e deionizada. As amostras do compósito $TiO_2 - HAp$ ficaram em imersão na solução durante 7, 14 e 28 dias. As amostras do sistema Nb_2O_5 -Hap ficaram em imersão por 28 dias. Os testes foram realizados em condições fisiológicas, ou seja, em 36,5 °C e com pH de aproximadamente 7,4. Depois de retiradas, as peças foram borrifadas suavemente com água deionizada e armazenadas em uma estufa bacteriologia a 40 °C.

4.5. ESPECTROSCOPIA RAMAN

As análises de espectroscopia Raman foram realizadas no sistema $(100-x)Nb_2O_5$. (x)HAp em dois espectrômetros. No caso das medidas realizadas antes dos testes de bioatividade foi utilizado um espectrômetro Bruker modelo Vertex 70v (Figura 19a), utilizando-se um detector de diodo LN-Ge. Os espectros apresentados no trabalho correspondem ao valor médio de 10 medidas. No caso das medidas realizadas após os testes de imersão foi utilizado um espectrômetro Bruker modelo SENTERRA acoplado a uma CCD para medidas confocais (Figura 19b). A ampliação óptica da amostra durante as medidas foi de 100x utilizando um laser com comprimento de onda de 785 nm. Em cada espectro foi realizada uma média de 8 medidas, cada uma adquirida durante 3 segundos.



Figura 19: Espectrômetros Raman utilizados. (a) Vertex 70v. (b) SENTERRA, obtidas da referencia 74.

Nas análises de perfil de profundidade foram escolhidos 5 pontos na superfície (P_1 , P_2 , P_3 , P_4 e P_5), conforme a Figura 20. Primeiramente, um espectro foi coletado na superfície da amostra e em seguida as medidas foram realizadas a cada 2 µm de profundidade, num total de 10 camadas (C_1 , C_2 , C_3 ... C_{10}). Estas análises foram possíveis variando-se a profundidade de foco das medidas.



Figura 20. Representação esquemática ilustrando a posição dos pontos selecionados na determinação do perfil de profundidade da camada de apatita via espectroscopia confocal Raman.

Para a análise da quantidade de apatita nucleada nas amostras foi adotado o seguinte procedimento: primeiramente, calculou-se a integral de área em uma banda característica da apatita. Em seguida, calculou-se a integral de área em uma banda característica do substrato e, por fim, calculou-se a razão entre elas. O procedimento foi realizado para todos os pontos medidos na amostra e as áreas foram calculadas conforme a Figura 21.



Figura 21: Procedimento para o cálculo da integral de área das bandas no espectro Raman.

Outra importante análise realizada no espectrômetro SENTERRA foi o mapeamento de superfície. Com ele é possível estudar a concentração e homogeneidade de elementos contidos na superfície da amostra como é mostrado na Figura 22. Neste caso, por exemplo, a parte (a) refere-se a uma imagem da interface entre uma camada de apatita e o substrato. A região à esquerda refere-se à parte com apatita, e a região à direita refere-se ao substrato sem apatita (possivelmente a camada apatita foi arrancada mecanicamente). Já a parte (b) representa a distribuição da quantidade de fosfato, obtida por espectroscopia Raman, exatamente na região mostrada em (a). O procedimento adotado nesta parte foi novamente o cálculo da razão entre as integrais de área da banda da apatita e a área de uma banda préexistente no substrato. Logo, com essa técnica é possível analisar a distribuição de apatita após os testes "*in vitro*".



Figura 22: (a) Imagem da interface entre uma camada de apatita e o substrato. (b) Mapeamento Raman da distribuição de fosfato na superfície da amostra.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o propósito de analisar, de forma analítica e quantitativa os diferentes compósitos produzidos e efetuar possíveis comparações entre as principais propriedades avaliadas, a matéria prima utilizada neste estudo foi caracterizada empregando-se técnicas apropriadas. Os resultados obtidos nos testes de caracterização da matéria prima serão apresentados e discutidos. A caracterização da matéria prima definirá que tipo de compósito deve ser produzido e quais propriedades devem ser avaliadas para se obter um compósito com características de um material biocompatível e/ou bioativo.

5.1. ANÁLISE DA MATÉRIA PRIMA UTILIZADA

A caracterização da matéria prima consiste principalmente no emprego da difratometria de raios X e de espectroscopia na região do infravermelho. A primeira técnica empregada associada ao método de refinamento de Rietveld determina de forma quantitativa as fases presentes na matéria prima utilizada neste estudo. A segunda técnica confirma e identifica distintas bandas de vibração dos grupos funcionais PO_4^{3-} e OH^- característicos da hidroxiapatita e do β -fosfato de tricálcico e também de íons CO_3^{2-} .

5.1.1. Analise por difratometria de raios-X da HAp, do TiO_2 e do Nb_2O_5

Na Figura 23 são apresentados os difratogramas de raios-X das amostras de ossos de peixe após as etapas de limpeza, calcinação e moagem. No difratograma da amostra após o processo limpeza (osso limpo) observa-se uma fase predominantemente amorfa, característica de estruturas ósseas com material orgânico, como o colágeno [75]. As fases inorgânicas identificadas com o uso do programa X´pert HighScore são características dos fosfatos de cálcio presentes nos tecidos ósseos: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (hidroxiapatita - HAp), $Ca_2P_2O_7$ (β-pirofosfato de cálcio) e β - $Ca_3(PO_4)_2$ (β-fosfato tricálcico – β -TCP), correspondentes às fichas padrão 09-0432-JCPDS, 09-0346-JCPDS e 09-0169-JCPDS, respectivamente.

No difratograma da amostra calcinada a 900 °C por oito horas (osso calcinado) foram identificadas as fases cristalinas da *HAp* e do β -*TCP*, correspondentes as fichas 09-0432-JCPDS e 09-0169-JCPDS, respectivamente. A fase β -*TCP* presente no material pode estar relacionada à utilização de ossos de peixes jovens e sua quantidade porcentual será avaliada no refinamento estrutural pelo método de Rietveld. Estudos realizados por Lima e colaboradores [76], sobre calcinação de ossos de peixe, mostraram que a utilização de ossos de peixes mais velhos produziu somente a fase da hidroxiapatita.



Figura 23: Difratograma de raios-X das amostras de osso de peixe após a limpeza (osso limpo), calcinação (osso calcinado) e moagem (osso calcinado e moído): *HAp* (H) e β -*TCP* (β).

Por outro lado, analisando o difratograma de raios-X da amostra moída por oito horas com velocidade de rotação de 300 rpm percebe-se que o processo de moagem não induz a formação de novas fases cristalinas. No entanto, há uma diminuição da resolução e um alargamento dos picos de difração, fatores que indicam uma redução do tamanho de cristalito, pois este é inversamente proporcional à largura a meia altura do pico de difração [77]. O efeito do processo de moagem no tamanho de cristalito (D_{hkl}) foi avaliado pela equação de Scherrer (seção 3.4.1). A análise foi realizada para o pico mais intenso em torno de 2 θ = 31,8°, correspondente ao plano (211) da HAp. Os resultados mostram uma redução no tamanho de cristalito de 65,8 nm para 33,7 nm, da ordem de 48,8%.

A fração de volume (%) das fases HAp e β -*TCP* na amostra calcinada e moída, foi determinada mediante o refinamento estrutural pelo método de Rietveld utilizando o

programa "fullprof". O perfil observado e o calculado, suas diferenças e as posições de Bragg, são mostrados na Figura 24.



Figura 24: Perfis de difração de raios-X experimental e calculado obtidos do refinamento da amostra $HAp + \beta$ -*TCP*, após a moagem. A região em destaque corresponde ao intervalo de 2 θ entre 29° e 37°, a qual indica os principais picos da fase HAp (H) e da fase β -*TCP* (β).

Os parâmetros estruturais e a fração de volume (%) de cada fase são apresentados na Tabela 8. Observa-se que a fase hidroxiapatita é majoritária, correspondendo à fração de volume de 87,61% enquanto a fase β -*TCP* à fração de 12,39%.

	Fase: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ Grupo espacial: $P63/m$		Fase: $Ca_3(PO_4)_2$ Grupo espacial: $R3c$		
	$\alpha = \beta =$	$\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$ Sistema: hexagonal		$\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$ Sistema: Romboedral	
	Sistem				
	Parâmetros de rede (Å)	Fração de volume (%)	Parâmetros de rede (Å)	Fração de volume (%)	Critérios de ajuste (%)
	a = 9,422		a = 10,35		$R_{wp} = 12,3$
	b = 9,422	87,61	b = 10,35	12,39	$R_{exp} = 6,37$
	c = 6,883		c = 37,07		$\chi^{2} = 3,75$
	a = 9,418		a = 10,42		
09-0432-JCPDS	b = 9,418	09-0169-JCPDS	b = 10,42		
	c = 6,886		c = 37,38		

Tabela 8: Parâmetros estruturais de $(HAp + \beta - TCP)$ após o refinamento.

Na Figura 25 é mostrado o difratograma de uma amostra do pó de TiO_2 utilizado neste trabalho para a produção do compósito [50% ($HAp + \beta$ -TCP) + 50% TiO_2]. Na parte baixa da figura são mostradas as linhas de difração do TiO_2 correspondentes a ficha padrão 21-1276 -JCPDS. A identificação da fase por comparação à ficha mostra somente a presença da fase TiO_2 , sistema tetragonal e grupo espacial $P4_2/mnm$.



Figura 25: Difratograma de raios-X do *TiO*₂ e as linhas de difração referentes à ficha padrão JCPDS: 21-1276.

Na Figura 26 está apresentado o difratograma de raios-X do Nb_2O_5 utilizado na produção dos compósitos (100-x) $Nb_2O_5(x)HAp$ com os respectivos índices (hkl). As reflexões na parte baixa da figura são referentes à ficha padrão 37–1468 JCPDS. A identificação da fase

foi realizada por comparação à ficha. Desta maneira, observa-se somente a presença da fase Nb_2O_5 , referente à estrutura monoclínica de grupo espacial P2/m.



Figura 26: Difratograma de raios-X do Nb₂O₅ e as linhas de difração referentes à ficha padrão JCPDS: 37-1468

5.1.2. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da *HAp*, do *TiO*₂ e do *Nb*₂*O*₅

O resultado da análise por espectroscopia no infravermelho (FT-IR) da amostra " $HAp + \beta$ -TCP" após a moagem é apresentada na Figura 27. São identificados os grupos funcionais PO_4^{3-} e OH característicos da HAp e do β -TCP e também do grupo CO_3^{2-} .

As bandas de absorção características da HAp e relacionadas ao grupo funcional PO_4^{3-} são identificadas em 472,5 cm⁻¹, 568,9 cm⁻¹ e 601,7 cm⁻¹ e atribuídas ao modo de deformação de ligações O – P – O. A primeira é proveniente do modo (v₂) duplamente degenerado e as outras duas do modo triplamente degenerado (v₄). A banda em 962,4 cm⁻¹ corresponde ao modo de estiramento simétrico (v₁) não degenerado das ligações P – O [78]. As bandas localizadas em 1045,3 e 1091,6 cm⁻¹ representam os modos de estiramento assimétrico com tripla degenerescência (v₃) das ligações P – O. Para o grupo funcional *OH*⁻ são observadas vibrações em 632,6 cm⁻¹ e em 3571,9 cm⁻¹, correspondentes ao modos rotacional (v_L) e de estiramento de (v_s), respectivamente.

A banda em 1637,4 cm⁻¹ corresponde ao modo de deformação (v_2) do grupo H – O – H e a banda larga e de baixa intensidade em 3440,7 cm⁻¹ é característica da presença de água adsorvida na amostra. A pequena banda próxima a 1417,5 cm⁻¹ é atribuída ao modo de estiramento assimétrico (v_3) indicando traços de íons carbonato (CO_3^{2-}) no material [79].



Figura 27: Espectro na região do infravermelho FT-IR da amostra HAp + β-TCP após os processos de limpeza, calcinação a 900°C por 8 h e moagem por 8 h a 300 rpm.

As bandas de absorção do grupo funcional PO_4^{3-} e identificadas em 946,9 cm⁻¹, 983,6 cm⁻¹ e em 1122,4 cm⁻¹ são atribuídas ao β -*TCP*. As duas primeiras correspondem ao modo de estiramento simétrico (v₁) de P – O e em 1122,4 cm⁻¹ ao modo de estiramento assimétrico (v₃) de P – O [79]. A identificação destas três bandas vibracionais, relacionadas à fase β -*TCP*, complementa e confirma a análise por DRX quanto a presença das fases *HAp* e β -*TCP* no material, ambos com excelentes propriedades bioativas para o uso no desenvolvimento de biomateriais [79].

O resultado da análise por espectroscopia do infravermelho (FT-IR) da amostra de TiO_2 utilizado neste trabalho é apresentada na Figura 28. Observa-se bandas largas associadas ao titânio localizadas em 405 e 516 cm⁻¹ relacionadas ao modo de vibração (v₂) de TiO_6 e uma banda em 667 cm⁻¹ correspondente ao modo (v₁) de Ti – O [80,81], além da banda pouco resolvida em 2356 cm⁻¹, correspondente ao CO_2 [82].



Figura 28: Espectro na região do infravermelho (FT-IR) do TiO₂.

No caso do pentóxido de nióbio, o espectro mostrado na Figura 29 indica suas principais bandas características. As bandas em 494 e 748 cm⁻¹ são referentes aos dobramentos assimétricos do tipo $v_4 e v_3$, respectivamente. A vibração do tipo dobramento fora do plano pode ser observada em 614 cm⁻¹[83]. A banda entre 850 e 800 cm⁻¹ e a banda em 557 são atribuídas ao modo de estiramento, sendo a primeira referente à ligação Nb – O – Nb e a segunda à ligação Nb – O[84,85].



Figura 29: Espectro na região do infravermelho (FT-IR) do Nb₂O₅.

PARTE I

5.2. COMPÓSITO [50% ($HAp + \beta$ -TCP) + 50% TiO₂]

Os pós de TiO_2 e de ($HAp + \beta$ -TCP) para a produção do compósito [50% ($HAp + \beta$ -TCP) + 50% TiO_2] foram misturados na proporção de 1:1 (vol. %). Por simplicidade de notação, no decorrer deste trabalho adotar-se-á, para esse compósito, a nomenclatura: HT50. Após a mistura, homogeneização, moagem e compactação, o compósito HT50 foi sinterizado nas temperaturas de 1000, 1100, 1200 e 1300 °C. Estudar-se-á os efeitos da temperatura de sinterização nas propriedades físicas, mecânicas e estruturais e, por fim, será avaliada a bioatividade desses compósitos "*in vitro*" em solução sintética com composição iônica semelhante a do plasma sanguíneo "*simulated boody fluid*" (SBF).

5.2.1. Seleção do tempo de moagem

O processo de sinterização é fortemente influenciado pelas características dos pós como: tamanho, forma, distribuição granulométrica, estrutura, condições de superfície e pelas técnicas de processamento. Pós na forma de grânulos aproximadamente esféricos são os mais indicados para processos de conformação pela sua fluidez, proporcionando um melhor empacotamento e como conseqüência, uma maior densidade.

A evolução da morfologia do compósito *HT50* após o processo de moagem pode ser observada nas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentadas na Figura 30.

Verifica-se que os pós das amostras moídas por 2 e 4 horas apresentam-se na forma de aglomerados com formas arredondadas e com tamanhos na ordem de 4 μ m, sendo que as partículas que compõem esses aglomerados são da ordem de nanômetros. As amostras moídas por intervalos de tempo mais longos apresentaram aglomerados grandes.



Figura 30: Micrografias dos pós do compósito *HT50* após a moagem por diferentes intervalos de tempo: (a) antes da moagem, (b) 2 h, (c) 4 h, (d) 8 h, (e) 12 h e (f) 16 h.

Nota-se ainda, que para intervalos de tempo de moagem superiores a 4 horas a morfologia dos aglomerados de partículas não é homogênea e isso é desfavorável para um bom empacotamento no processo de compactação. Um bom fator de empacotamento implica em melhores propriedades físicas e mecânicas na cerâmica. Pela morfologia apresentada pelos pós após o processo de moagem, há duas possíveis escolhas para o tempo de moagem: 2 ou 4

horas. Para a escolha, as amostras após a moagem foram analisadas por difratometria de raios-X e avaliados os tamanhos de cristalitos relativos às fases HAp e TiO_2 .

Os difratogramas de raios-X das amostras moídas nos diferentes intervalos de tempo são mostrados na Figura 31, na qual se observa a evolução da forma dos picos de difração da *HAp* e do rutilo.

Utilizando-se do banco de dados do programa "X-Pert HighScore", foram identificadas somente as fases cristalinas: HAp, β -TCP e TiO_2 . Isso indica que a moagem não produziu fases cristalinas adicionais, o seu único efeito foi sobre o tamanho e a morfologia dos aglomerados de partículas.



Figura 31: Difratogramas de raios-X do compósito *HT50* após a moagem por diferentes intervalos de tempo: antes da moagem, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h e 16 h.

Os tamanhos de cristalito (D_{hkl}) das amostras moídas foram calculados a partir da equação de Scherrer conforme os procedimentos apresentados na seção 3.4.1. Para o estudo

63

foram selecionados os picos mais intensos da hidroxiapatita e do rutilo correspondentes aos planos (211) e (110), respectivamente. O resultado desta análise é mostrado na Figura 32.



Figura 32: Variação do tamanho de cristalito em função do tempo de moagem para os planos (211) da HAp e (110) do TiO_2 .

Observa-se que o pó de partida do TiO_2 possui cristalitos cerca de 3 vezes maiores que os da fase *HAp*. Para os intervalos de tempo de moagem analisados (2, 4, 6, 8 e 10) a razão entre eles é mantida em torno de 2,5.

O tamanho de cristalito para as duas fases mostra um sensível decréscimo após 2 h de moagem. Para a *HAp* da ordem de 42% (33,8 para 19,6 nm) e para o TiO_2 de 66% (100,9 para 34,8 nm). Para intervalos de tempo de moagem superiores a 4 h observa-se uma flutuação no tamanho de cristalito podendo indicar certa tendência à estabilização do tamanho de cristalito com o aumento do tempo de moagem [77].

As análises dos resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV), fornecendo a morfologia e os tamanhos de aglomerados de partículas, dos obtidos por difratometria de raios-X, revelando a redução no tamanho de cristalito, foram utilizadas para definir o intervalo de tempo de 2 horas para o processo moagem do compósito *HT50*.
5.2.3. Análise do compósito HT50 após a compactação e sinterização

5.2.3.1. Propriedades físicas

5.2.3.1.1. Variação dimensional

O conhecimento desta propriedade possibilita estimar a precisão dimensional de componentes para produção em larga escala, via metalurgia do pó. O comportamento desta propriedade em função da temperatura de sinterização para o compósito *HT50* é apresentado na Figura 33.



Figura 33: Variação dimensional (contração linear) do compósito *HT50* em função da temperatura de sinterização.

Observa-se uma variação acentuada da contração linear em função da temperatura de sinterização. Os valores observados indicam que para 1300 °C ocorre uma maior contração do que a 1000 °C. Esta variação está associada ao aumento da densificação e diminuição da porosidade das amostras sinterizadas. Provavelmente, deve ocorrer uma sinterização reativa, pois ocorre o fenômeno de difusão de massa do rutilo para a hidroxiapatita e vice versa. Além disso, a sinterização pode reduzir a porosidade e como conseqüência produzir uma contração

mais acentuada. A contração linear, em relação às amostras a verde⁸, para as temperaturas de 1000 °C e 1300 °C correspondem a 1,34 % e 9,44 %, respectivamente.

5.2.3.1.2. Densidade e porosidade

A densidade do compósito *HT50* sinterizado nas diferentes temperaturas foi determinada pelo método de Arquimedes conforme a seção 3.7.1. Na Figura 34 é mostrado o efeito do aumento da temperatura de sinterização na densidade e na porosidade dos compósitos após o processo de sinterização. De forma geral, observa-se um aumento na densidade e um decréscimo na porosidade em função do aumento da temperatura. A menor densidade de 2,89 g/cm³ foi obtida para a temperatura 1000 °C, enquanto a maior de 3,48 g/cm³ para 1300 °C, mostrando um crescimento relativo da densidade em torno de 18%.



Figura 34: Variação da densidade e da porosidade dos compósitos *HT50* em função da temperatura de sinterização.

Por outro lado, há um decréscimo na porosidade de 21,97% para 5,94% no citado intervalo de temperatura. O aumento da densificação e da contração dimensional são devidos a maior sinterabilidade do material com o aumento da temperatura, produzindo uma gradual redução na porosidade e no tamanho de poros. A porosidade é um fator importante no desenvolvimento de biomateriais para implantes, pois os poros são necessários quando se

⁸ Amostra a verde é a amostra avaliada após o processo de compactação (antes do processo de sinterização).

deseja obter crescimento de tecidos vivos no interior do implante [81], bem como para nucleação de apatita no material.

5.2.3.2. Propriedades mecânicas

5.2.3.2.1. Microdureza Vickers e resistência à compressão

Os valores médios dos resultados dos ensaios de dureza Vickers (H_v) e de resistência à compressão (σ_c) em função da temperatura de sinterização para o compósito *HT50* são mostrados na Tabela 9. Na tabela também são apresentados, para efeito de comparação, os valores correspondentes a (*HAp* + β -*TCP*).

Os resultados mostram que a temperatura de sinterização é um fator importante nas propriedades de dureza e de resistência à compressão. A dureza aumenta com a temperatura de sinterização tanto para a ($HAp + \beta$ -TCP) quanto para o compósito HT50. Nota-se que os valores de dureza do compósito estudado são superiores aos da hidroxiapatita. Isso mostra que o TiO_2 serviu de reforço para a matriz hidroxiapatita melhorando esta propriedade.

Observa-se para a dureza Vickers da ($HAp + \beta$ -TCP) um aumento relativo de ~ 371% (0,38 para 1,79 GPa) enquanto que para HT50 esse aumento foi da ordem de 401% (0,49 para 2,06 GPa). Com relação aos resultados dos ensaios de resistência à compressão nota-se para a ($HAp + \beta$ -TCP) um aumento relativo de ~ 43% (41,73 para 59,78 MPa), enquanto para o compósito esse aumento foi da ordem de 405% (21,13 para 106,62 MPa). Os valores de dureza Vickers e de resistência à compressão obtidos neste estudo são comparáveis aos obtidos pior Oktar, F. N. [86], no estudo de compósitos a base de hidroxiapatita bovina com 5 e 10% de TiO_2 . Na Tabela 10 estão apresentados alguns valores de microdureza Vickers e de resistência à compressão reportados na literatura para compósitos a base de hidroxiapatita obtida de osso de bovino (BHA) com 5 e 10 % de titânio metálico (Ti) e também com 5 e 10 % de dióxido de titânio (TiO_2)[86,87].

T ℃	HT50		(HAp + β -TCP).		
	H _v (GPa)	σ _c (MPa)	H _V (GPa)	σ _c (MPa)	
1000	$0,\!46 \pm 0,\!09$	21,13 ± 3,21	$0,38 \pm 0,06$	$41,73 \pm 3,81$	
1100	$0,\!75\pm0,\!16$	$43,53 \pm 11,96$	$0{,}58\pm0{,}10$	$33,\!17\pm 5,\!63$	
1200	$1,23 \pm 0,29$	$48,\!49 \pm 9,\!29$	$1,11 \pm 0,19$	$40,08 \pm 8,23$	
1300	$2,\!06\pm0,\!17$	$106,\!62 \pm 18,\!82$	$1,\!79\pm028$	$59{,}78 \pm 7{,}85$	

Tabela 9: Valores de microdureza Vickers (H_v) e resistência à compressão axial (σ_c) para o compósito *HT50* e para a (HAp + β -TCP).

Tabela 10: Resultados reportados da literatura para compósitos Ti-BHA e TiO₂-BHA [86,87].

BHAp – Ti [87]			BHAp – Ti [87]			
T℃	5% Ti		10% Ti			
	H _V (GPa)	σ_{c} (MPa)	H _v (MPa)	σ _c (MPa)		
1000	0,14	17,12	0,13	23,90		
1100	0,17	20,49	0,27	24,01		
1200	0,68	44,65	0,92	48,83		
1300	1,63	50,47	2,31	43,29		
BHAp – TiO ₂ [86]			BHAp –TiO ₂ [86]			
T ℃	5% TiO ₂		10%	10% TiO ₂		
	H _V (GPa)	σ _c (MPa)	H _V (GPa)	σ _c (MPa)		
1000	0,56	26,2	0,77	23,90		
1100	0,67	43,0	1,32	24,01		
1200	1,40	86,2	1,76	48,83		
1300	2,00	105,0	2,42	43,29		

5.2.4. Análise da evolução microestrutural dos compósitos HT50

A microestrutura dos compósitos sinterizados nas diferentes temperaturas foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na Figura 35, são apresentadas as micrografias do compósito *HT50* sinterizado nas temperaturas de 1000, 1100, 1200 e 1300 °C. As micrografias (a), (c), (e) e (g) são referentes às superfícies das amostras enquanto as micrografias (b), (d), (f) e (h) correspondem às superfícies das fraturas.



Figura 35: Micrografias (MEV) do compósito HT50 após a sinterização. (a), (c), (e) e (g) superfícies das amostras sinterizadas a 1000, 1100, 1200 e 1300 °C, respectivamente. (b), (d), (f) e (h) superfícies de fratura das amostras sinterizadas a 1000, 1100, 1200 e 1300 °C, respectivamente.

As micrografias das superfícies fraturadas do compósito indicam que o mesmo corresponde a um material frágil e que a fratura ocorre ao longo dos contornos de grão, ou seja, fratura intergranular. Entretanto, o aumento de temperatura de sinterização aumenta a sinterabilidade produzindo uma maior interação entre as partículas que constituem os compósitos. Este efeito é mais acentuado em temperaturas superiores a 1100°, contudo, a fratura continua sendo frágil, pois esta é uma característica de todo material cerâmico. Por outro lado, observa-se um aumento gradual da densificação, devido ao crescimento do tamanho de grão que está relacionado ao aumento da área superficial de contato entre eles. Isto possibilita o aumento da transferência de massa pelos processos de difusão e como conseqüência redução na porosidade do material.

5.2.5. Análise por difratometria de raios-X dos compósitos HT50

Os resultados de difratometria de raios-X do compósito *HT50* moído por duas horas a 300 rpm em atmosfera de ar e sinterizados nas temperaturas de 1000,1100,1200 e 1300°C, estão mostrados na Figura 36. A identificação de fases foi feita a partir do banco de dados JCPDS (Joint Committee on Powder Difraction Standards) utilizando o programa "X⁻ Pert HighScore", sendo identificadas as fases cristalinas do (\diamond) *TiO*₂, do (*) titanato de cálcio (*CaTiO*₃) e do (•) β -trifosfato de cálcio [*Ca*₃(*PO*₄)₂ - β -*TCP*], correspondentes às fichas padrão 21-1276-JCPDS, 42-0423-JCPDS e 09-0169 - JCPDS, respectivamente.



Figura 36: Difratogramas dos compósitos *HT50* sinterizados a 1000, 1100, 1200 e 1300°C e indicação dos planos cristalográficos das fases identificadas utilizando o programa "X Pert HighScore".

As fases identificadas após a sinterização mostram que o processo produziu a decomposição da *HAp*. Observa-se também a existência de picos de difração referentes ao precursor TiO_2 , indicando que apenas uma fração deste material contribuiu para a formação da fase $CaTiO_3$. Na parte superior da Figura 36 estão indicados os planos cristalográficos (hkl) referentes às fases cristalinas identificadas.

Para avaliar os parâmetros estruturais relativos às fases identificadas no compósito após o tratamento térmico, procedeu-se o refinamento estrutural pelo método de Rietveld utilizando o programa "FULLPROF". As estruturas adotadas para o início do refinamento estrutural correspondem às fichas: 21-1276-JCPDS, 42-0423-JCPDS e 09-169-JCPDS.

Nas Figuras 36 a 39 estão apresentados os padrões experimentais e calculados, suas diferenças (erro) e as posições de Bragg para cada fase presente no compósito *HT50* após o processo de sinterização. A boa concordância entre os perfis calculados e experimentais obtidos no refinamento permitiu determinar com boa precisão a fração de volume (%) das fases cristalinas do compósito, bem como avaliar possíveis alterações nos parâmetros de rede com o aumento da temperatura.



Figura 37: Padrões experimentais e calculados após o refinamento para o compósito HT50, sinterizado a 1000°C.



Figura 38. Padrões experimentais e calculados após o refinamento para o compósito HT50, sinterizado a 1100°C.



Figura 39: Padrões experimentais e calculados após o refinamento para o compósito HT50, sinterizado a 1200°C.



Figura 40: Padrões experimentais e calculados após o refinamento para o compósito HT50, sinterizado a 1300°C.

Na Tabela 11 são mostrados os valores dos parâmetros de rede, da fração de volume (%) de cada fase e os critérios de ajuste (parâmetros estatísticos) relacionados ao refinamento.

Observa-se que a temperatura pouco alterou a quantidade (fração de volume %) das fases cristalinas no compósito o que indica que não ocorreu decomposição das mesmas. Isso quer dizer que para as temperaturas estudadas as fases cristalinas foram mantidas e praticamente na mesma proporção. Para a fase TiO_2 há um decréscimo da fração de volume de 59,21% em 1000 °C para 55,64% em 1300 °C, enquanto que para as fases $CaTiO_3$ e $Ca_3(PO_4)_2$ ocorre um aumento de 6,18 para 9,01% e de 34,61 para 35,35%, nas temperaturas de 1000 e 1300 °C, respectivamente.

	Fase: TiO ₂ Grupo espacial: $P4_2/mnm$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$ Sistema: Tetragonal		Fase: CaTiO ₃ Grupo espacial: <i>Pc m n</i> $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$ <i>Sistema: Ortorrômbico</i>		Fase: $Ca_3(PO_4)_2$ Grupo espacial: $R3c$ $\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$ Sistema: Romboedral	
	Parâmetros	Fração de	Parâmetros	Fração de	Parâmetros	Volume
T °C	de rede	volume	de rede	volume	de rede	Fracional
	Å	(%)	Å	(%)	Å	(%)
	a = 4,5932		a = 5,3878		a = 10,4028	
1000	b = 4,5932	59,21	b =7,6448	6,18	b = 10,4028	34,61
	c = 2,9589		c =5,4356		c = 37,3649	
	a = 4,5940		a = 5,3879		a = 10,4039	
1100	b = 4,5940	59,78	b = 7,6446	6,24	b = 10,4039	33,99
	c = 2,9594		c = 5,4388		c = 37,3679	
	a = 4,5937		a = 5,3857		a = 10,4045	
1200	b = 4,5937	58,72	b = 7,6443	6,92	b = 10,4045	34,35
	c = 2,9592		c = 5,4398		c = 37,3369	
	a = 4,5941		a = 5,3845		a = 10,4055	
1300	b = 4,5941	55,64	b = 7,6442	9,01	b = 10,4055	35,35
	c = 2,9595		c = 5,4412		c = 37,3036	
ICDDS	a = 4,5899		a = 5,3848		a = 10,3640	
JCIDS	b = 4,5899		b = 7,6377		b = 10,3640	
	c = 2,9580		c = 5,4567		c = 37,2388	
Critérios	T: 1000 °C	T: 1100 °C	T: 1200 °C	T: 1300 °C		
de ajuste	$R_{wp} = 14,1$	$R_{wp} = 16,3$	$R_{wp} = 16,5$	$R_{wp} = 16,4$		
(%)	$R_{ex p} = 8,56$	$R_{exp} = 8,64$	$R_{exp} = 8,31$	$R_{exp} = 8,62$		
(70)	$\chi^2 = 2,71$	$\chi^2 = 3,55$	$\chi^2 = 3,94$	$\chi^2 = 3,60$		

Tabela 11: Parâmetros estruturais obtidos no refinamento Rietveld para o compósito *HT50* sinterizados a 1000, 1100, 1200 e 1300°C.

5.2.5.1. Estudo da influência da temperatura no tamanho do cristalito

A temperatura de sinterização alterou também a cristalinidade do material como pode ser observado nos resultados referentes à variação do tamanho de cristalito, apresentados na Tabela 12. O tamanho de cristalito foi avaliado pela equação de Scherrer conforme os procedimentos apresentados seção 3.4.1. Foram analisados os picos mais intensos de cada fase, correspondentes aos planos (hkl): (110) para o TiO_2 , (020) para o $CaTiO_3$ e (0210) para o $Ca_3(PO_4)_2$.

	Fase: <i>TiO</i> ₂	Fase: CaTiO ₃	Fase: $Ca_3(PO_4)_2$
(hkl)	(110)	(020)	(0210)
	Tamanho do cristalito	Tamanho do cristalito	Tamanho do cristalito
T ℃	(nm)	(nm)	(nm)
1000	93,2	35,2	47,64
1100	108,3	48,9	49,64
1200	121,1	55,1	52,62
1300	122,3	60,8	57,90

Tabela 12: Variação do tamanho do cristalito em função da temperatura de sinterização nos compósitos *HT50* após o processo de sinterização.

O tamanho de cristalito aumentou para todas as fases com o aumento da temperatura de sinterização. Isso quer dizer que à medida que a temperatura de sinterização aumenta o material torna-se mais cristalino. Para as fases TiO_2 , $CaTiO_3$ e $Ca_3(PO_4)_2$ o aumento relativo do tamanho do cristalito entre as temperaturas de 1000 e 1300 °C corresponde a: 31,22%, 72,73% e 21,54%, respectivamente.

Observa-se que a temperatura de sinterização afetou muito mais as propriedades físicas e mecânicas do compósito *HT50* do que suas propriedades estruturais.

5.2.6. Testes de bioatividade "in vitro"

5.2.6.1. Introdução

Os testes de bioatividade "*in vitro*" possibilitam avaliar a formação de apatita sobre o substrato. Como o substrato é um compósito constituído de HAp e TiO_2 , ele poderá liberar íons Ca^{2+} , Na^{2+} e K^+ de sua superfície, possibilitando trocas iônicas com o íon H_3O^+ do SBF. Essas trocas possibilitam a formação de grupos Ti – OH sobre a superfície do substrato além dos já existentes. Por outro lado, moléculas de H_2O do SBF reagem simultaneamente com o grupo Ti – O – Ti do TiO_2 , para formar grupos adicionais de Ti – OH que por sua vez induzem a nucleação de apatita. Os íons Ca²⁺, Na^{2+} e K^+ aceleram o processo de nucleação da apatita pelo aumento da atividade iônica do produto (IAP) [88,89,90].

Além disso, possivelmente a interação eletrostática entre os íons de cargas opostas é um dos mecanismos decisivos no processo de nucleação de apatita, por exemplo, os íons OH^{-} da superfície do substrato atraem os íons Ca^{2+} do SBF de maneira que a superfície fica positivamente carregada. Esta carga positiva, por sua vez, começa a atrair os íons negativos de fosfato $(PO_4^{2^-})$ dando início à formação de fosfato de cálcio amorfo sendo que as primeiras formações possuem razão *Ca/P* menores que 1,5. Este fosfato de cálcio se transforma nas próximas etapas de nucleação, em apatita com razão *Ca/P* aproximadamente igual a 1,65 que é próxima à razão da apatita óssea, podendo conter pequenas concentrações de *Mg* e *Na*. Uma vez nucleada, a apatita pode crescer espontaneamente pela absorção dos íons cálcio e fosfato do fluido, pois este é altamente supersaturado com relação à apatita [91,92].

5.2.6.2. Testes "in vitro" dos compósitos HT50 em SBF convencional

5.2.6.2.1. Caracterização por difratometria de raios-X

Os difratogramas de raios–X referentes ao compósito *HT50* em função do tempo de imersão em SBF convencional estão apresentados nas Figuras 40 a 43. O crescimento de apatita é tão pouco pronunciado que não foi possível analisar os difratogramas em uma escala de intensidade linear. Para evidenciar melhor o efeito do crescimento de apatita nas amostras, a intensidade dos picos de difração em torno de $2\theta = 31,8^{\circ}$ foi ampliada e construiu-se uma escala apropriada para uma melhor visualização da formação de apatita, como mostrado à direita das Figuras 40 a 43. O fato de existirem poucas regiões nucleadas, suficientes para se alinhar ao feixe de raios-X e ainda espalhá-lo coerentemente, dificultou a detecção da formação de apatita na superfície. A condição de difração necessária, segundo a lei de Bragg (seção 3.4), exige que haja feixes coerentemente espalhados para haver interferência construtiva. Como não há uma nucleação expressiva na superfície das amostras, o pico de difração de apatita próximo a $2\theta = 31,8^{\circ}$ ficou pouco evidenciado em relação aos picos do substrato. Contudo, o fato deste pico aparecer nos difratogramas após os testes de imersão e o de estar ausente no difratograma do substrato antes da imersão (0 dias) indica a formação de apatita na superfície do material.

Nas amostras sinterizadas às temperaturas de 1000°C e 1200°C (Figura 41 e Figura 43), o pico de difração (211) em escala ampliada é visível para todos os intervalos de tempo de imersão. Para a temperatura de 1100°C (Figura 42) esse pico em escala ampliada é observado para 15 e 28 dias de imersão, enquanto que para 1300°C (Figura 44), somente é visível para 28 dias.

Um fato importante a ser mencionado é que, por limitações experimentais, as análises foram realizadas em um difratômetro de raios-X convencional e não em um equipamento com o acessório para filmes finos (TF-XRD "*thin-film* – *XRD*"), que é o recomendado nos testes de bioatividade. O DRX em sua montagem convencional tem um alcance em torno de 30 μ m, ou seja, se a camada de apatita for da ordem de nanômetros, são necessários intervalos de tempo de contagem altos para se obter uma boa estatística das difrações relacionadas aos elementos da camada de apatita [17,93].



Figura 41: Difratogramas de raios – X do compósito *HT50* sinterizado a 1000°C após diferentes intervalos de tempo de imersão em SBF convencional.



Figura 42: Difratogramas de raios – X do compósito *HT50* sinterizado a 1100°C após diferentes intervalos de tempo de imersão em SBF convencional.



Figura 43: Difratogramas de raios – X do compósito *HT50* sinterizado a 1200°C após diferentes intervalos de tempo de imersão em SBF convencional.



Figura 44: Difratogramas de raios – X do compósito HT50 sinterizado a 1300°C após diferentes intervalos de tempo de imersão em SBF convencional.

5.2.6.2.2. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura

A morfologia de algumas regiões nucleadas nos compósitos HT50 após 15 e 28 dias de imersão, e seus respectivos espectros de raios-X por dispersão de energia (EDS), estão apresentados nas Figuras 44 a 51. O EDS indicado pela letra (*b*) foi obtido fora da região selecionada, enquanto o espectro indicado com a letra (*c*) foi obtido dentro da região selecionada, ou seja, com nucleação de apatita.

As análises dos resultados apresentados nas Figuras 44 a 51 mostram que existem núcleos de apatita formados nas amostras após a imersão em SBF convencional. Nos espectros EDS correspondentes às regiões (*c*) os picos relativos ao cálcio e ao fósforo são bem mais intensos do que os de titânio. Por outro lado, nas regiões (*b*), fora do setor selecionado, os picos do titânio são os mais intensos. Portanto, as regiões (*c*) possivelmente são oriundas do processo de nucleação de apatita em SBF convencional. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por difração de raios-X discutidos na sessão anterior. Assim, não existe um crescimento denso e uniforme de apatita quando as amostras são imersas em SBF convencional para os intervalos de tempo de imersão estudados. O que se verifica é a formação de pequenas regiões, principalmente dentro de poros e dos macros poros, em que a apatita começa a se formar. A existência de regiões de alta porosidade sobre a superfície da amostra favorece o processo de nucleação, devido ao fato destas regiões possuírem maior energia superficial necessitando, assim, de uma menor energia de ativação do fluido para que ocorra a formação de apatita. Possivelmente, se estas amostras ficassem por mais tempo imersas em SBF convencional, mais apatita se formaria em sua superfície.



Figura 45: (a) Micrografia de uma região com nucleação de apatita no compósito *HT50* sinterizado a 1000°C após imersão por 15 dias em SBF 1,0. (b) Espectro de EDS medido fora da região selecionada. (c) Espectro de EDS medido dentro da região selecionada.



Figura 46: (a) Micrografia de uma região com nucleação de apatita no compósito *HT50* sinterizado a 1000°C após imersão por 28 dias em SBF 1,0. (b) Espectro de EDS medido fora da região selecionada. (c) Espectro de EDS medido dentro da região selecionada.



Figura 47: (a) Micrografia de uma região com nucleação de apatita no compósito *HT50* sinterizado a 1100°C após imersão por 15 dias em SBF 1,0. (b) Espectro de EDS medido fora da região selecionada. (c) Espectro de EDS medido dentro da região selecionada.



Figura 48: (a) Micrografia de uma região com nucleação de apatita no compósito *HT50* sinterizado a 1100°C após imersão por 28 dias em SBF 1,0. (b) Espectro de EDS medido fora da região selecionada. (c) Espectro de EDS medido dentro da região selecionada.



Figura 49: (a) Micrografia de uma região com nucleação de apatita no compósito *HT50* sinterizado a 12000°C após imersão por 15 dias em SBF 1,0. (b) Espectro de EDS medido fora da região selecionada. (c) Espectro de EDS medido dentro da região selecionada.



Figura 50: (a) Micrografia de uma região com nucleação de apatita no compósito *HT50* sinterizado a 1200°C após imersão por 28dias em SBF 1,0. (b) Espectro de EDS medido fora da região selecionada. (c) Espectro de EDS medido dentro da região selecionada.



Figura 51: (a) Micrografia de uma região com nucleação de apatita no compósito *HT50* sinterizado a 1300°C após imersão por 15 dias em SBF 1,0. (b) Espectro de EDS medido fora da região selecionada. (c) Espectro de EDS medido dentro da região selecionada.



Figura 52: (a) Micrografia de uma região com nucleação de apatita no compósito *HT50* sinterizado a 1000°C após imersão por 15 dias em SBF 1,0. (b) Espectro de EDS medido fora da região selecionada. (c) Espectro de EDS medido dentro da região selecionada.

5.2.6.3. Testes "in vitro" do compósito HT50 em SBF 1,5

5.2.6.3.1. Caracterização por difratometria de Raios-X

Os testes de bioatividade com SBF 1,5, ou seja, com a solução 1,5 vezes mais concentrada que o SBF convencional possibilitou avaliar e confirmar a formação de apatita sobre o substrato. O recobrimento observado na superfície das amostras é mais expressivo que no caso da imersão em SBF convencional.

A análise por difratometria de raios-X do compósito *HT50* sinterizado em diferentes temperaturas e imersos em SBF 1,5 por 7, 15 e 28 dias, estão apresentados nas Figura 53 a Figura 56. Observa–se nos difratogramas o surgimento de novos picos de difração que não existiam na análise realizada no substrato antes da imersão (0 dias). Estes picos são característicos do processo de crescimento de apatita na superfície da amostra e estão indicados pelas setas nas Figuras 52 a 55. Nos difratogramas dos substratos, antes da imersão (0 dias), estão indicados os planos cristalográficos (hkl), bem como as respectivas fases cristalinas obtidas por comparação com os padrões do JCPDS.



Figura 53: Difratogramas de raios-X dos compósitos *HT50* sinterizados a 1000°C após a imersão em SBF 1,5 por 7, 15 e 28 dias.



Figura 54: Difratogramas de raios-X dos compósitos *HT50* sinterizados a 1100°C após a imersão em SBF 1,5 por 7, 15 e 28 dias.



Figura 55: Difratogramas de raios-X dos compósitos *HT50* sinterizados a 1200°C após a imersão em SBF 1,5 por 7, 15 e 28 dias.



Figura 56: Difratogramas de raios-X dos compósitos HT50 sinterizados a 1300°C após a imersão em SBF 1,5 por 7, 15 e 28 dias. A região em destaque é referente ao crescimento da apatita segundo o plano (002), em torno de $2\theta = 26^{\circ}$.

Observa-se nos difratogramas um aumento progressivo na intensidade do pico (002) da apatita próximo ao ângulo de Bragg $2\theta = 26^{\circ}$ para todas as temperaturas de sinterização e todos os intervalos de tempo de imersão. O aumento deste pico com o tempo de imersão é um indicativo do aumento da camada de apatita na superfície do substrato. Para evidenciar o efeito do crescimento de apatita na amostra sinterizada a 1300°C, pouco visível, as intensidades dos difratogramas em torno de $2\theta = 26^{\circ}$ foram ampliadas. Construiu-se, então, uma escala apropriada para possibilitar uma melhor visualização da formação da apatita como indicado a direita da Figura 56.

Na análise do pico (211) da apatita próximo ao ângulo de Bragg $2\theta = 31,8^{\circ}$, observase que até o período de 15 dias de imersão este pico é bastante pronunciado, diferentemente do que se observa nos difratogramas para 28 dias de imersão. Uma possível explicação para este comportamento seria a existência de fases distintas no processo do crescimento da apatita. As primeiras nucleações que aparecem ocorrem geralmente nos poros e provavelmente apresentam maior cristalinidade pelo fato de sofrerem uma influência da morfologia dos poros, apresentando um ordenamento diferente do que ocorre em regiões de pouca porosidade na superfície do substrato. Aparentemente, em uma fase posterior da nucleação, a camada de apatita tende a crescer de forma mais amorfa, como pode ser observado nos difratogramas relativos aos períodos de 28 dias de imersão. Assim, após a camada atingir certa espessura a fase amorfa predomina, como se observa nos difratogramas.

Um indicativo para a confirmação desta hipótese é o fato da apatita crescer com distintas morfologias conforme pode ser observado na análise por microscopia eletrônica de varredura mostrada na Figura 57. Essa análise é referente a uma amostra do compósito *HT50* sinterizado a 1300°C após a imersão por 15 dias em SBF 1,5.



Figura 57: (a) Imagem obtida por MEV de uma região com nucleação de apatita no compósito *HT50* sinterizado a 1300°C após 15 dias de imersão em SBF 1,5. (b) Imagem ampliada da região selecionada em (a). Na parte baixa das micrografias (a) e (b) as análises de EDS das regiões (*i*) e (*ii*), respectivamente.

A Figura 57 (b) mostra uma ampliação da região demarcada na Figura 57 (a). Os espectros de EDS apresentados na parte baixa da figura correspondem às regiões selecionadas (*i*) e (*ii*) na Figura 57 (b). É possível notar que as regiões (*i*) e (*ii*) são morfologicamente diferentes e numa primeira análise cogitou-se a possibilidade de serem regiões de diferentes composições. Contudo, após uma cuidadosa análise por espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS), percebeu-se que os espectros das regiões (*i*) e (*ii*) são semelhantes, sendo os picos de titânio detectados de baixa intensidade indicando que estas regiões são, na verdade, características do processo de crescimento de apatita, porém em diferentes etapas.

A cristalização da camada de apatita na superfície do rutilo foi observada por Fredrik Lindberg e colaboradores [94]. Em seu trabalho sobre policristais e monocristais de rutilo (TiO_2) , ele observou por HR-TEM, um certo ordenamento nos cristais de apatita que cresciam na superfície do substrato. Esse ordenamento foi observado para o caso em que a camada de apatita estava próxima à superfície do substrato. Todavia, esse ordenamento cristalino possuía curto alcance, sendo que a camada mais externa de apatita se apresentava numa forma amorfa.

5.2.6.3.2. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura

Um parâmetro interessante a se observar é a variação da espessura da camada de apatita em função da temperatura de sinterização e do tempo de imersão em SBF 1,5. Nas Figuras 57 a 59 são apresentadas as micrografias (MEV) obtidas dos compósitos *HT50* após a sinterização e imersão em SBF 1,5. As figuras à esquerda são relativas às superfícies das amostras e, as da direita, às superfícies de fratura com medidas locais da espessura da camada de apatita.

Na Figura 58 estão contidas as micrografias referentes aos testes de bioatividade realizados por 7 dias de imersão. Na Figura 58 (a) é possível observar a presença de alguns núcleos de apatita na superfície da amostra, muito parecidos com os núcleos gerados nos testes com o SBF convencional, apresentados nas Figuras 44 a 51 e na região (*ii*) da Figura 57 (b). Esse resultado foi surpreendente já que, com o SBF mais concentrado, um crescimento mais uniforme de apatita na superfície da amostra era esperado. Na Figura 58 (b) é apresentada a imagem da superfície da fratura da amostra *HT50* sinterizada a 1000°C. Nesta imagem pode-se observar uma alta porosidade no interior da amostra, indicando que a temperatura de sinterização não é adequada para produzir os diferentes efeitos de sinterização no material, proporcionando uma fratura extremamente frágil. Além disso, não foi possível observar a nucleação da apatita mesmo com ampliações maiores. Entretanto, uma densa camada de apatita é formada nas amostras sinterizadas a 1100 °C e 1200 °C como se pode observar nas Figura 58 (c) e (e), apesar de existirem regiões não recobertas como a observada no centro da micrografia da Figura 58 (c).

As superfícies de fratura das amostras de 1100 °C e 1200 °C, bem como as medidas das espessuras da camada de apatita, são mostradas nas Figura 58 (d) e (f). A espessura da camada formada no substrato não demonstrou ser exatamente uniforme ao longo da amostra,

isso ocorre possivelmente pelo fato das amostras apresentarem uma porosidade distribuída aleatoriamente ao longo da superfície da amostra, fazendo com que o processo de crescimento da apatita sofra a influência da variação de energia superficial em diferentes regiões do substrato.

As micrografias da superfície e da fratura da amostra sinterizada a 1300 °C são apresentadas nas Figura 58 (g) e (h), respectivamente. Embora não se observe crescimento em toda a superfície, foi encontrada uma pequena região na amostra fraturada na qual foi possível medir a camada local de apatita (Figura 58 (h)), sendo que esta é semelhante à região (i) na Figura 57 (b).

Nas temperaturas de sinterização de 1000 °C e 1300 °C a formação de apatita não foi expressiva. No entanto, essas amostras possuem uma importante diferença ao serem observadas: a sinterizada em 1000 °C é mais porosa não apresentado nucleação com a morfologia da região (*i*) da Figura 57 (b); na sinterizada em 1300 °C ocorrem os dois tipos de nucleação, no entanto, o crescimento com a morfologia apresentada na região (*i*) (Figura 57 (b)) aparenta ser privilegiada. Uma possível explicação para este fato é que a diminuição da porosidade faz com que a amostra sofra menos influência da energia superficial. Isso deve induzir um crescimento mais expressivo na superfície da amostra facilitando a formação de camadas menos cristalinas.

Para 15 dias de imersão em SBF 1,5, ocorre uma nova etapa no processo de formação de apatita. Nesta fase a camada de apatita é mais espessa, com trincas e distribuída em toda a superfície do substrato, com exceção da amostra sinterizada a 1300 °C. Nas Figura 59 (a), (c), (e) e (g) são mostradas as micrografias da superfície das amostras e nas (b), (d), (f) e (h) às superfícies de fratura. As imagens revelam uma progressiva diminuição da camada de apatita na superfície do substrato com o aumento da temperatura de sinterização. Além disso, pequenos núcleos internos ao substrato foram encontrados como mostrado, por exemplo, na Figura 59 (f). Esses núcleos foram localizados a cerca de 10 µm da superfície. Provavelmente, os poros presentes nas amostras permitiram que o fluido permeasse até o seu interior.

Na Figura 60 são apresentadas as micrografias das amostras submetidas ao testes de bioatividade em SBF 1,5 após 28 dias de imersão. A formação de uma densa camada de apatita pode ser observada na superfície das amostras para todas as temperaturas de sinterização. Nas Figura 60 (b), (d), (f) e (h) correspondentes as superfícies de fratura, são apresentadas as medidas da espessura da camada de apatita, realizadas a partir da superfície. Observa-se, com o aumento da temperatura de sinterização, uma gradual diminuição da

camada de apatita de 18 µm a 1000 °C para 1,4 µm a 1300 °C, possivelmente associada à redução do grau de porosidade. Além disso, pelas morfologias apresentadas na Figura 60 é possível notar que a adesão entre a camada de apatita e o substrato é mais efetiva quando a temperatura de sinterização é mais baixa, ou seja, 1000 e 1100°C. Um dos motivos para que isso ocorra é o fato de menores temperaturas permitirem a interconexão entre os poros, ou seja, eles formam pequenos vasos comunicantes entre si (porosidade interconectada). Assim, à medida que a apatita cresce em um dos poros ela se conecta a apatita de outro poro, produzindo uma ligação com o substrato muito mais forte do que ocorreria se o crescimento fosse puramente superficial.

apatita m 7,8 μm 4 um 🕯 ,7 μm (g) (h apatita 0

Figura 58: Micrografias (MEV) de uma região de crescimento de apatita do compósito *HT50* após a sinterização e a imersão em SBF 1,5 por 7 dias. (a), (c), (e) e (g) superfícies das amostras sinterizadas a 1000, 1100, 1200 e 1300 °C, respectivamente. (b), (d), (f) e (h) superfícies de fraturas das amostras sinterizadas a 1000, 1100, 1200 e 1300 °C, respectivamente.



Figura 59: Micrografias (MEV) de uma região de crescimento de apatita do compósito *HT50* após a sinterização e a imersão em SBF 1,5 por 15 dias. (a), (c), (e) e (g) superfícies das amostras sinterizadas a 1000, 1100, 1200 e 1300 °C, respectivamente. (b), (d), (f) e (h) superfícies de fraturas das amostras sinterizadas a 1000, 1100, 1200 e 1300 °C, respectivamente.



Figura 60: Micrografias (MEV) de uma região de crescimento de apatita do compósito *HT50* após a sinterização e a imersão em SBF 1,5 por 28 dias. (a), (c), (e) e (g) superfícies das amostras sinterizadas a 1000, 1100, 1200 e 1300 °C, respectivamente. (b), (d), (f) e (h) superfícies de fraturas das amostras sinterizadas a 1000, 1100, 1200 e 1300 °C, respectivamente.

PARTE II

5.3. COMPÓSITO (100-x) Nb₂O₅ - (x) HAp

5.3.1. Introdução

Os procedimentos experimentais relacionados à preparação, produção e caracterização do compósito $(100-x)Nb_2O_5$ -(x)HAp na forma de pó, bem como, os procedimentos envolvendo a preparação de amostra via compactação seguida de sinterização foram realizados em trabalhos anteriores [11,12].

Esta parte do trabalho têm por objetivo realizar a caracterização estrutural do compósito $(100-x)Nb_2O_{5-}(x)HAp$ por difratometria de raios-X e espectroscopia Raman, bem como realizar testes de bioatividade "in vitro" utilizando SBF 1,5.

Na etapa relacionada aos testes de bioatividade do compósito, um estudo por espectroscopia Raman foi realizado para se estimar a espessura média da camada de apatita sobre o substrato.

A discussão que diz respeito aos estudos de preparação do compósito e a obtenção de amostras sinterizadas não será, portanto, aqui apresentada. Selecionou-se dentre os compósitos estudados [11,12] o compactado a 350 MPa e sinterizados a 1000 °C em atmosfera de ar para as composições : x = 10, 20, 30, 40 e 50% de *HAp*.

5.3.2. Caracterização estrutural do compósito (100-x)Nb₂O₅-(x)HAp

5.3.2.1. Análise por difratometria de raios-X

Na Figura 61 são mostrados os difratogramas de raios-X do compósito $(100-x)Nb_2O_5$ -(x)HAp sinterizado a 1000 °C em atmosfera de ar para as composições x = 10, 20, 30, 40 e 50% de HAp.

A identificação das fases foi realizada a partir do banco de dados JCPDS utilizando o programa X'Pert HighScore. Foram identificadas as seguintes fases cristalinas: (\otimes) óxido de cálcio nióbio *CaNb*₂*O*₆ (Fersmita), (\diamond) óxido de fósforo nióbio *PNb*₉*O*₂₅ e (\oplus) β -trifosfato de cálcio *Ca*₃(*PO*₄)₂, que correspondem às fichas padrão 39-1392-JCPDS, 81-1304-JCPDS e 09-

0169-JCPDS, respectivamente. Além destas fases majoritárias, foram observadas pequenas reflexões, relacionadas à fase do precursor (•) Nb_2O_5 , conforme ficha 37-1468 - JCPDS, principalmente nas amostras com menor quantidade (%) de hidroxiapatita. Analogamente ao que ocorreu no compósito *HT50*, o processo de sinterização proporcionou a decomposição da hidroxiapatita em outras fases cristalinas. No entanto, neste compósito a quantidade residual de pentóxido de nióbio após a sinterização foi muito pequena e apenas os picos mais intensos e, ainda assim, com baixa intensidade foram detectados. Isso indica que praticamente toda a quantidade (%) de pentóxido de nióbio contribui nas transições para a formação das fases $CaNb_2O_6$ e PNb_9O_{25} .



Figura 61: Difratogramas dos compósitos $(100-x)Nb_2O_5-(x)HAp$ sinterizados a 1000°C com x= 10, 20, 30, 40 e 50% de *HAp* e indicação dos planos cristalográficos das fases identificadas no programa X Pert HighScore.

5.3.2.1.1. Fração volumétrica (%) das fases via método de Rietveld

O fato do sistema (100-x) Nb_2O_5 -(x)HAp ter como variável a quantidade (vol. %) de HAp, sugere que a fração de volume (%) de cada fase cristalina produzida no processo de sinterização seja diferente para cada valor de x (x = 10, 20, 30, 40 e 50%). Assim, para a quantificação percentual das fases obtidas após o processo de sinterização procedeu-se o refinamento estrutural pelo método de Rietveld. O processo foi realizado utilizando-se um modelo contendo uma estrutura ortorrômbica Pbcn na fase $CaNb_2O_6$ acompanhado de uma estrutura tetragonal I4/m referente à fase PNb_9O_{25} e uma estrutura romboédrica R3c para a fase $Ca_3(PO_4)_2$. A baixa concentração do precursor Nb_2O_5 existente nos compósitos após a sinterização dificultou a inclusão desta fase no refinamento, visto que a aplicação do método dos mínimos quadrados utilizando quatro fases cristalinas dificulta a convergência do refinamento. A única amostra em que foi possível realizar o refinamento com as quatro fases ($CaNb_2O_6$, PNb_9O_{25} , $Ca_3(PO_4)_2$ e Nb_2O_5) foi a com 10% de HAp reagente e mesmo para esta amostra, a fração de volume (%) de Nb_2O_5 obtida foi da ordem de 10%.

Nas Figuras 61 a 65 são apresentados os perfis experimentais e calculados, suas diferenças (erro) e as posições de Bragg. Na Tabela 13 são mostrados os valores dos parâmetros de rede, da fração de volume (%) e os critérios de ajuste (parâmetros estatísticos) obtidos do refinamento do compósito $(100-x)Nb_2O_5$ -(x)HAp.

A boa concordância entre os perfis calculados e experimentais, obtidos no refinamento, permitiu determinar com boa precisão a fração de volume (%) das fases cristalinas do compósito, bem como avaliar possíveis alterações nos parâmetros de rede com a variação da composição.

Observa-se uma tendência de aumento da fração de volume (%) da fase PNb_9O_{25} com a diminuição da HAp de 16,95% (x = 50) para 40,65 % (x = 10). Isso ocorre porque a formação da fase PNb_9O_{25} é privilegiada pelo aumento da quantidade de pentóxido de nióbio no compósito, uma vez que esta fase requer nove átomos de nióbio para a formação de uma única célula unitária. A mesma tendência de aumento, mas em menor proporção, é verificada para a fase $CaNb_2O_6$, de 35,53% (x = 50) para 37,62% (x = 10). Por outro lado, para a fase $Ca_3(PO_4)_2$ observa-se um decréscimo progressivo de 47,52% (x = 50) para 11,39% (x = 10). No trabalho realizado por Yang e colaboradores, foi observado que a HAp, quando submetida a tratamentos térmicos em atmosfera livre, pode se decompor em outros fosfatos de cálcio como β -*TCP*, α -*TCP* e *TTCP* (fostato tetracálcico) [95]. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho tanto para os compósitos *HT50* quanto para o sistema (*100-x*)*Nb*₂*O*₅-(*x*)*HAp*, indicam apenas a transformação da *HAp* na fase β -*TCP*.

Como dito anteriormente, o refinamento com a fase precursora Nb_2O_5 só foi possível para a amostra com 10% de *HAp* resultando numa fração de volume (%) para esta fase da ordem de 10%. A inclusão desta fase no refinamento para as composições com x = 20, 30, 40 e 50% de HAp, não apresentou convergência no processo de refinamento.



Figura 62: Padrões obtidos após o refinamento no compósito 50%Nb2O5-50%HAp sinterizado a 1000°C.



Figura 63: Padrões obtidos após o refinamento no compósito 60%Nb2O5-40%HAp sinterizado a 1000°C.



Figura 64: Padrões obtidos após o refinamento no compósito 70%Nb2O5-30%HAp sinterizado a 1000°C.



Figura 65: Padrões obtidos após o refinamento no compósito 80%Nb2O5-20%HAp sinterizado a 1000°C.



Figura 66: Padrões obtidos após o refinamento no compósito 90%Nb2O5-10%HAp sinterizado a 1000°C.

	Fase: $CaNb_2O_6$		Fase: <i>PNb</i> ₉ O ₂₅		Fase: $Ca_3(PO_4)_2$	
	Grupo espacial: Pb c n		Grupo espacial: 14/m		Grupo espacial: R3c	
	Simetria or	torrômbica	Simetria tetragonal		Simetria Romboédrica	
	$\alpha = \beta =$	$\gamma = 90^{\circ}$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$		$\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$	
	Parâmetros	Fração de	Parâmetros	Fração de	Parâmetros	Fração de
HAp	de rede	volume	de rede	volum	de rede	volume
(%)	Å	(%)	Å	(%)	Å	(%)
	a = 14,958		a = 15,5897		a = 10,4028	
50	b = 5,7496	35,53	b = 15,5897	16,95	b = 10,4028	47,52
	c = 5,2179		c = 3,8237		c = 37,3649	
	a =14,9607		a = 15,5922		a = 10,3994	
40	b = 5,7489	36,15	b = 15,5922	23,42	b = 10,3994	40,42
	c = 5,2193		c = 3,8247		c = 37,2178	
	a = 14,9521		a = 15,5861		a = 10,3841	
30	b = 5,7481	36,41	b = 15,5861	31,21	b = 10,3841	32,37
	c = 5,2175		c = 3,8232		c = 36,9568	
	a = 14,9507		a = 15,587		a = 10,3565	
20	b = 5,7513	39,72	b = 15,587	40,85	b = 10,3565	19,43
	c = 5,2191		c = 3,8235		c = 36,8866	
	a = 14,9527		a = 15,5936		a = 10,3343	
10	b = 5,7538	37,62	b = 15,5936	40,65	b = 10,3343	11,39
	c = 5,2207		c = 3,8246		c = 36,9903	
Padrão	a = 14,926		a = 15,639		a = 10,429	
JCPDS	b = 5,752		b = 15,639		b = 10,429	
	c = 5,204		c = 3,8317		c = 37,38	
Critérios	<i>x</i> = 50	x = 40	<i>x</i> = 30	x = 20	<i>x</i> = 10	
de ajuste	$R_{wp} = 13,0$	$R_{wp} = 13,9$	$R_{wp} = 14,5$	$R_{wp} = 16,2$	$R_{wp} = 16,1$	
(%)	$R_{exp} = 5,72$	$R_{exp} = 4,94$	$R_{exp} = 4,89$	$R_{exp} = 4,48$	$R_{exp} = 5,12$	
	$\chi^2 = 5,21$	$\chi^2 = 7,89$	$\chi^2 = 8,82$	$\chi^2 = 10,0$	$\chi^2 = 13,0$	

Tabela 13: Parâmetros obtidos do refinamento Rietveld para os compósitos Nb₂O₅ - Hap sinterizados a 1000°C.

5.3.2.2. Análise por espectroscopia Raman

Na Figura 67 são apresentados os espectros Raman do sistema $(100-x)Nb_2O_5-(x)HAp$ sinterizados a 1000 °C. Os espectros (a), (b), (c), (d) e (e) correspondem a x = 10, 20, 30, 40 e 50% de HAp, respectivamente.
As bandas referentes à fase Fersmita $CaNb_2O_6$ são localizadas em 538, 847 e 903 cm⁻¹, enquanto as bandas referentes à fase PNb_9O_{25} estão em 692 e 630 cm⁻¹ [96,97]. As bandas em 938, 1000 e 1038 cm⁻¹ podem ser atribuídas ao estiramento terminal das ligações Nb=O [98,99]. A banda em 995 cm⁻¹ presente na amostra com 10 % de *HAp* corresponde ao estiramento metal/oxigênio da fase Nb₂O₅ [98]. As bandas largas localizadas em 956 e 969 são associadas ao grupo fosfato (PO_4^{-3}) da fase $Ca_3(PO_4)_2$ [100].



Figura 67: Espectros Raman dos compósitos (*100-x*) Nb_2O_5 -(*x*)HAp sinterizados a 1000 °C em função da variação do volume (%) de HAp. (a), (b), (c), (d) e (e) correspondem a *x* = 10, 20, 30, 40 e 50% de HAp, respectivamente.

5.3.3. Testes de bioatividade "in vitro" com SBF 1,5

Os mecanismos de nucleação da apatita no sistema $(100-x)Nb_2O_5-(x)HAp$, possivelmente ocorrem de forma similar ao do processo de formação da apatita no compósito *HT50*, visto na sessão (5.2.6.1) deste trabalho, no entanto, desta vez ao invés de termos na superfície do substrato o grupo funcional Ti - OH, têm-se o grupo Nb - OH. Como o substrato é um compósito constituído de HAp e Nb_2O_5 , ele poderá liberar íons positivos (como o Ca^{2+}) de sua superfície, possibilitando trocas iônicas com o íon H_3O^+ do SBF que possibilitam a formação de grupos Nb - OH adicionais na superfície do substrato. Além disso, a liberação de íons positivos do substrato produz uma mudança do pH local do fluido, aumentando a atividade iônica do produto (IAP) que conseqüentemente acelera o processo de nucleação de apatita [88,89,90].

A ação de forças eletrostáticas faz com que os íons *OH* da superfície do substrato atraiam os íons Ca^{2+} do fluido de maneira que a superfície fica positivamente carregada. Esta carga positiva, por sua vez, começa a atrair os íons negativos fosfato PO_4^{3-} dando início à formação dos fosfatos de cálcio. Após isso a apatita cresce espontaneamente pela absorção dos íons cálcio e de fosfato contidos no fluido conforme explicado com mais detalhes na seção 5.2.6.1.

5.3.3.1. Análise por difratometria de raios-X

Os difratogramas das amostras do sistema $(100-x)Nb_2O_5$ -(x)HAp com x = 10, 20, 30, 40 e 50% realizados após 28 dias de imersão em SBF 1,5 estão apresentados na Figura 68. No difratograma da parte alta da figura estão indicados os picos (002) e (211) da apatita localizados próximos a $2\theta = 26^\circ$ e $2\theta = 32^\circ$, respectivamente.



Figura 68: Difratogramas dos compósitos (100-x) Nb_2O_5 -(x)HAp sinterizados a 1000°C com x= 10, 20, 30, 40 e 50% de HAp após 28 dias de imersão em SBF 1,5.

Com exceção da amostra com x = 10% de *HAp*, observa-se que os picos de difração dos planos (002) e (211) são mais intensos que os relacionados ao substrato, indicando a nucleação de apatita no material após a imersão em SBF1,5.

A ausência destes picos na amostra com x = 10% de *HAp* pode estar relacionada à limitação experimental. Regiões da amostra com pequenas nucleações podem dificultar a condição de difração e não serem detectadas pelo equipamento. Além disso, a medida foi realizada em um equipamento convencional com goniômetros dispostos numa montagem conhecida como " θ - 2θ ". Nesta montagem o feixe de raios-X penetra vários mícrons na amostra antes de ser difratado e coletado no detector. Assim, se as camadas de apatita forem finas e ainda pertencerem a regiões separadas na amostra, são necessários grandes intervalos de tempo de contagens para se obter uma boa estatística sobre as difrações devidas a elementos do filme [93]. Neste caso é recomendado o uso de um acessório para filmes finos (TF-XRD "*thin-film* – *XRD*") em que o feixe penetra rasante à superfície [37,93].

Como no caso do compósito TiO_2 -HAp (sessão 5.2.6.2), a escala de intensidade dos picos (002) e (211) foi ampliada para se visualizar estes picos de difração. No entanto, no compósito $(100-x)Nb_2O_5$ -(x)HAp existe uma sobreposição dos principais picos da apatita (002) e (211) com os picos (111) da fase fersmita e (-414) da fase do pentóxido de nióbio respectivamente, o que dificulta distinguir os picos do substrato dos da apatita.

Diante das dificuldades experimentais acima apresentadas, foram necessárias análises de espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para compreender a ausência dos picos relacionados à apatita na amostra com 10% de *HAp*.

5.3.3.2. Análise por espectroscopia Raman

Segundo Notingher e colaboradores, a apatita formada em um substrato pode facilmente ser identificada por espectroscopia Raman pela observação da banda característica da apatita situada em 960 cm⁻¹[101]. Esta banda corresponde à vibração simétrica de P - O do grupo fosfato [102]. Notingher afirma ainda que a quantidade de apatita formada possa ser estimada por comparação entre a intensidade da banda em 960 cm⁻¹ e a intensidade de uma banda característica do substrato [101].

No presente trabalho, essa análise foi realizada utilizando-se um espectrômetro Raman com microscópico confocal. Foram selecionados 5 pontos da superfície da amostra conforme diagrama mostrado na Figura 69. Para cada ponto (P₁, P₂, P₃, P₄ e P₅) foi realizado o estudo do de perfil de profundidade da camada de apatita. O primeiro espectro foi obtido com o foco na superfície da amostra e os demais a cada 2 μ m, num total de 10 camadas (C₁,C₂,...,C₁₀).



Figura 69: Diagrama representativo do procedimento utilizado nas medidas do perfil de profundidade.

Nas Figuras 69 a 73 são apresentados os espectros Raman dos compósitos (100-x)Nb₂O₅-(x)HAp (x = 10, 20, 30, 40 e 50% de HAp) após a imersão por 28 dias em SBF1,5.

Observa-se nos espectros que a intensidade da banda localizada em 960 cm⁻¹ quando comparada a intensidade de uma banda do substrato (903 cm⁻¹), diminui com o aumento da profundidade de foco para todas as concentrações de *HAp* indicando um decréscimo na concentração de fosfato da superfície para o interior da amostra. Assim, quanto mais profundo for o foco menor será a intensidade da banda de apatita em relação a uma banda pré-existente. O limite é alcançado quando a espessura da camada de apatita for vencida. Neste ponto, o aumento da profundidade de foco deixa de alterar a razão (A_{960}/A_{903}) entre estas bandas.



Figura 70: Espectros Raman da amostra $50\% Nb_2O_5$ - 50% HAp após a imersão por 28 dias em SBF1,5 em função da profundidade da camada de apatita medidos a partir da superfície da amostra.



Figura 71: Espectros Raman da amostra $60\% Nb_2O_5 - 40\% HAp$ após a imersão por 28 dias em SBF1,5 em função da profundidade da camada de apatita medidos a partir da superfície da amostra.



Figura 72: Espectros Raman da amostra $70\% Nb_2O_5 - 30\% HAp$ após a imersão por 28 dias em SBF1,5 em função da profundidade da camada de apatita medidas a partir da superfície da amostra.



Figura 73: Espectros Raman da amostra 80% Nb₂O₅ - 20% HAp após a imersão por 28 dias em SBF1,5 em função da profundidade da camada de apatita medidas a partir da superfície da amostra.



Figura 74: Espectros Raman da amostra 90% Nb₂O₅ - 10% HAp após a imersão por 28 dias em SBF1,5 em função da profundidade da camada de apatita medidas a partir da superfície da amostra.

A análise do perfil de profundidade da camada de apatita nas amostras foi realizado pela razão entre a integral de área referente à banda da apatita em 960 cm⁻¹ e a integral de área da banda da fersmita ($CaNb_2O_6$) do substrato em 903 cm⁻¹. Essa razão (A_{960}/A_{903}) foi determinada para os 5 pontos selecionados conforme indicado na Figura 69. O valor médio da razão entre estes 5 pontos em função da profundidade em µm, para todas as composições, são mostradas nas Figuras 75 a 78.



Figura 75: Comportamento da razão A_{960}/A_{903} do espectro Raman como função da profundidade da amostra $50\%Nb_2O_5 - 50\%HAp$ após 28 dias de imersão em SBF 1,5 e ajuste exponencial.



Figura 76: Comportamento da razão A_{960}/A_{903} do espectro Raman como função da profundidade da amostra $60\%Nb_2O_5 - 40\%HAp$ após 28 dias de imersão em SBF 1,5 e ajuste exponencial.



Figura 77: Comportamento da razão A_{960}/A_{903} do espectro Raman como função da profundidade da amostra 70%Nb₂O₅- 30%HAp após 28 dias de imersão em SBF 1,5 e ajuste exponencial.



Figura 78: Comportamento da razão A_{960}/A_{903} do espectro Raman como função da profundidade da amostra $80\%Nb_2O_5 - 20\%HAp$ após 28 dias de imersão em SBF 1,5 e ajuste exponencial.



Figura 79: Comportamento da razão A_{960}/A_{903} do espectro Raman como função da profundidade da amostra $90\%Nb_2O_5 - 10\%HAp$ após 28 dias de imersão em SBF 1,5 e ajuste exponencial.

Observa-se nas Figuras 74 a 78 que os valores experimentais se ajustam a uma função exponencial decrescente por meio da Equação 24:

$$S(z) = S_o + A \exp^{(-\frac{z}{\tau})}$$
(24)

sendo,

S: razão entre as áreas das bandas de 960 cm⁻¹ e 903 cm⁻¹ (A_{960}/A_{903});

 S_0 : constante de estágio de saturação;

A: amplitude;

z: profundidade da amostra em µm;

 τ : parâmetro que estima a quantidade de fosfato em uma determinada profundidade da amostra.

Os pontos em preto representam os valores referentes às médias das razões A_{960}/A_{903} para as 5 regiões medidas e a linha em vermelho o ajuste exponencial calculado por meio da Equação 24.

Considerando a razão A_{960}/A_{903} como um valor diretamente proporcional à concentração de apatita formada pode-se estimar por meio da Equação 24, um valor para o parâmetro "z" como uma função do parâmetro " τ " e com isso estimar a espessura da camada de apatita no substrato. Dessa maneira, a concentração de apatita deve decair a uma taxa de $\frac{(\tau/z)}{e}$ em relação ao seu valor inicial (100%). Por exemplo, na profundidade em que $z = 1 \tau$, a concentração de apatita será 1/e do valor inicial, ou seja, em torno de 37%. Se $z = 2 \tau$ a concentração de apatita será 1/2e do valor inicial, logo para esta profundidade observa-se uma queda de aproximadamente 87% da quantidade inicial de apatita. Acredita-se que após a espessura $z = 2 \tau$ o limite entre a camada de apatita e o substrato foi ultrapassado, pois a concentração de fosfato proveniente da banda de 960 cm⁻¹ é muito pequena comparada à inicial. Isso significa que possivelmente a espessura da camada de apatita esteja próxima a $z = 2 \tau$.

Na Tabela 14 são mostrados os valores de 2 τ referentes à espessura da camada de apatita para as composições analisadas. A análise dos resultados mostra que a espessura máxima da camada de apatita, obtida por espectroscopia Raman, ocorre para x = 30% de *HAp* e a mínima para x = 10%.

Tabela 14: Espessura da camada de apatita determinada por espectroscopia confocal Raman após a imersão por 28 dias em SBF1,5 para as amostras do sistema $(100-x)Nb_2O_5-(x)HAp \text{ com } x = 10, 20, 30, 40 \text{ e } 50\%$ de HAp.

Amostra	2 τ (μm)
50%Nb ₂ O ₅ -50%HAp	7,08±0,42
$60\% Nb_2O_5-40\% HAp$	8,96±0,94
$70\% Nb_2O_530\% HAp$	10,26±1,54
$80\% Nb_2O_520\% HAp$	6,66±0,84
$90\% Nb_2O_5-10\% HAp$	4,58±0,36

Um dos motivos para o uso da técnica de espectroscopia Raman neste trabalho foi para entender o razão pela qual os picos de difração de raios-X da apatita não foram observados na amostra com 10% de *HAp*. Uma possível causa seria o fato da amostra não ser bioativa, no entanto, a análise por espectroscopia Raman permitiu observar variações na banda do grupo funcional $PO_4^{3^-}$ em 960 cm⁻¹, característica da nucleação de apatita na amostra, ou seja, com propriedades bioativas. Ressalte-se, que dos 5 pontos selecionados na amostra com 10% de *Hap*, em apenas 3 foi observada a variação desta banda, portanto, existem regiões na amostra sem ou com pouca nucleação. Além disso, de todos os valores de espessura estimados por espectroscopia Raman, o da amostra 90%*Nb*₂*O*₅-10%*HAp* foi o menor. Portanto, o mais difícil de ser detectado. Para exemplificar este fato o espectro Raman de uma região não nucleada na superfície da amostra 90%*Nb*₂*O*₅-10%*HAp* é mostrada na Figura 80 . Os espectros foram obtidos em função da profundidade de foco e observa-se que a banda em 960 cm⁻¹, característica da formação da apatita, não foi detectada.



Figura 80: Espectros Raman de uma região não nucleada por apatita na amostra 90%Nb₂O₅-10%HAp após 28 dias de imersão em SBF 1,5 em função da profundidade a partir da superfície.

Assim, o recobrimento da apatita não ocorre de forma uniforme na superfície da amostra com 10% de *HAp*. Possivelmente, este foi o principal fator que dificultou a detecção da formação de apatita por difratometria de raios-X. Supondo que o pico de difração da

apatita existe, ele ocorre com baixa intensidade. Assim, mesmo que a escala do difratograma seja ampliada, melhorando-se a sua visualização, os picos (002) e (211) da apatita seriam sobrepostos aos picos (111) e (-414) das fases fersmita e pentóxido de nióbio, respectivamente.

Para visualizar a distribuição dos núcleos de apatita na amostra $90\%Nb_2O_5$ -10%HAp, foi realizado na sua superfície um mapeamento com 2000 pontos. Os espectros obtidos foram normalizados pela banda da fersmita em 903 cm⁻¹ e os resultados estão mostrados nas Figura 81 (a) e (b). Na Figura (a) observam-se regiões nas quais esta banda é bem pronunciada indicando a presença de apatita e outras (regiões em azul) com ausência de nucleação. Na Figura (b) são mostrados os espectros de uma região nucleada e outra sem nucleação.

Um fato interessante de se observar é que mesmo nas amostras em que a nucleação da apatita foi expressiva, como é o caso da amostra $50\%Nb_2O_5$ -50%HAp, a camada de apatita na superfície não é uniforme. Para esta amostra foi realizado um mapeamento com 600 pontos, igualmente espaçados, em uma região da superfície com aproximadamente 0,064 mm². Os espectros foram normalizados pela banda da fersmita em 903 cm⁻¹ e os resultados são mostrados na Figura 82.



Figura 81: (a) Espectros de 2000 pontos da superfície da amostra $90\%Nb_2O_5$ -10%HAp. (b) Espectros de duas regiões da amostra. As curvas em azul e em vermelho representam regiões com e sem nucleação de apatita, respectivamente.



Figura 82: (a) Espectros de 600 pontos da superfície da amostra $50\%Nb_2O_5$ -50%HAp. (b) Espectros de duas regiões da amostra. As curvas em vermelho e em azul representam regiões com e sem nucleação de apatita, respectivamente.

Para melhor observar a variação da concentração de apatita formada na superfície da amostra, a razão A_{960}/A_{903} foi novamente calculada. O resultado está apresentado na Figura 83 em uma mapa 2D na forma de curvas de nível. O padrão de cores representa a variação da razão A_{960}/A_{903} . As regiões em alaranjado correspondem a maiores concentrações de apatita enquanto as regiões em azul correspondem a regiões com pouca quantidade de apatita.



Figura 83: Mapa 2D da razão A₉₆₀/A₉₀₃ para a amostra 50%Nb₂O₅-50%HAp após 28 dias de imersão em SBF 1,5.
O padrão de cores representa a quantidade de apatita em diferentes pontos da superfície da amostra. As cores alaranja e azul indicam regiões com maior e menor concentração de apatita, respectivamente.

Na Figura 83 notam-se regiões com diferentes concentrações de apatita na superfície da amostra $50\%Nb_2O_5$ -50%HAp indicando claramente a falta de homogeneidade do recobrimento de apatita no substrato. A técnica de espectroscopia Raman mostrou ser uma importante ferramenta para se avaliar a nucleação de apatita em testes "*in vitro*".

5.3.3.3. Análise por microscopia eletrônica de varredura

A evolução e a morfologia da nucleação de apatita nos compósitos $(100-x)Nb_2O_5$ -(x)Hap (x =20, 30, 40 e 50% de HAp), sinterizados a 1000 °C e imersos em SBF 1,5 por 28 dias estão apresentadas na Figura 84. Na Figura 84 (a_i, i = 1 – 5) é mostrada a morfologia da superfície das amostras após o processo de sinterização. Para as amostra com 10 e 20% há a predominância de grãos alongados em formato de bastões. Para as amostras com 40 e 50% de HAp é possível notar que a maioria dos grãos são arredondados e bastante irregulares. Para a amostra com 30% de HAp há a coexistência de partículas arredondadas e na forma de bastões. Aparentemente para essa amostra as duas morfologias aparecem na mesma proporção e com porosidade uniforme entre 1 e 2 µm. Na Figura 84 (b_i, i = 1 – 5) é mostrada a morfologia da superfície do substrato com nucleação de apatita, enquanto na Figura 84 (c_i, i = 1 – 5) é mostrada a morfologia da secção transversal após a fratura, para x = 10, 20, 30, 40 e 50% de HAp. Observa-se que uma densa camada de apatita foi nucleada na superfície do substrato para todas as composições após 28 dias de imersão em SBF 1,5. Nas micrografias relativas à secção transversal das amostras fraturadas foi possível avaliar a espessura da camada de apatita nucleada e sua adesão ao substrato.

A maior espessura observada corresponde a amostra com x = 30% de *HAp* na ordem de 13 µm e para as demais composições valores entre 7 e 9 µm. Ressalte-se que a camada de apatita não apresenta uma nucleação uniforme na superfície do substrato, assim, estas espessuras podem variar. Comparando estes valores de espessura com os obtidos por espectroscopia Raman, mostrados na Tabela 14, observa-se uma boa concordância entre eles. Assim, as duas técnicas Raman e MEV permitem detectar a nucleação de apatita e também estimar a sua espessura. Há que se considerar que a microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que danifica a amostra impossibilitando o seu uso em outras técnicas enquanto a espectroscopia confocal Raman não.

Com respeito ao compósito $90\%Nb_2O_5$ -10%HAp não foi observada a nucleação de apatita em toda a superfície do substrato como pode ser observado na Figura 85 em que foram observadas nucleações em algumas regiões da superfície do substrato. Análises de EDS mostradas na figura foram realizadas na região selecionada na Figura 85(b). O espectro de EDS à esquerda foi realizado fora da região demarcada e o da direita dentro desta. Esta última refere-se a uma região com nucleação de apatita, pois há um aumento da intensidade dos picos referentes ao cálcio e ao fósforo. De forma geral, para esta composição, observam-se regiões com pouca nucleação de apatita podendo corresponder a um estágio inicial de nucleação. Possivelmente, se a amostra fosse imersa em SBF 1,5 por um período de tempo maior, toda a sua superfície seria recoberta por apatita como no caso das amostras com 20, 30, 40 e 50% de *HAp*.



Figura 84: Micrografias (MEV) dos compósitos (100-x) Nb_2O_5 -(x)HAp (x = 50, 40, 30 e 20% de HAp) após a imersão por 28 dias em SBF 1,5: (a_i, i = 1 – 5) correspondem às superfícies das amostras antes da imersão, (b_i, i = 1 – 5) correspondem às superfícies das amostras após a imersão e (c_i, i = 1 – 5) às superfícies de fratura das amostras após a imersão.



Figura 85: (a) e (b) Imagem obtida por MEV de uma regiões com nucleação de apatita no compósito *100x)Nb*₂O₅-(*x)HAp* sinterizado a 1000°C após 28 dias de imersão em SBF 1,5. Na parte baixa da figura são mostrados os espectros de EDS da região (b). A esquerda: EDS feito na região fora do quadro inserido. A direita: EDS feito na região dentro do quadro inserido

6. CONCLUSÕES

As técnicas de produção e de caracterização, utilizadas neste estudo, permitiram alcançar os objetivos inicialmente propostos nesta dissertação e relacionados aos compósitos [50% ($HAp + \beta$ -TCP) + 50% TiO_2] e (100-x) Nb_2O_5 -(x)HAp (x = 10, 20, 30, 40 e 50%). Com base nos resultados obtidos, algumas conclusões a respeito das propriedades desses materiais são apresentadas:

Com relação à Parte I do trabalho, referente ao compósito à base de TiO₂ e HAp+ β -TCP, conclui-se que:

• A calcinação de ossos de peixes jovens pode produzir, além da hidroxiapatita, a fase β -tricálcio fosfato. Para as condições de calcinação e de moagem utilizadas neste estudo, à fração de volume (%) da fase β -TCP, obtida pelo método de Rietveld, foi da ordem 12%. A análise por FTIR confirma a presença da fase β -TCP pela identificação de bandas características do grupo funcional PO_4^{3-} e relacionadas a esta fase.

• Não foi observada nenhuma fase adicional (espúria) nos difratogramas relativos à fase *TiO*₂, utilizada como material precursor na produção dos compósitos.

• O intervalo de tempo de 2 horas para o processo de moagem dos compósitos proporcionou uma maior homogeneidade dos aglomerados de partículas, além de produzir materiais nanoestruturados, com tamanho de cristalito para a fase HAp de 19,6 nm e para a fase TiO_2 de 34,8 nm.

• O tratamento térmico dos compósitos induz reações químicas, sendo o compósito resultante constituído pelas fases: TiO_2 , β -TCP e $CaTiO_3$. Contudo, os resultados obtidos do refinamento estrutural pelo método de Rietveld mostram que o aumento da temperatura de sinterização no intervalo de 1000°C a 1300°C, não alterou de forma significativa a fração de volume (%) das fases cristalinas identificadas.

• Observou-se um sensível aumento das propriedades físicas e mecânicas dos compósitos com o aumento da temperatura de sinterização e, que essas propriedades são um pouco superiores as das amostras de *HAp* produzidas nas mesmas condições.

• Pequenos núcleos de apatita foram observados nos compósitos *HT50*, para todas as temperaturas de sinterização, após a imersão por 15 e 28 dias em SBF convencional.

• Os compósitos *HT50*, quando submetidos a ensaios de imersão em SBF1,5, apresentam nucleação de apatita em suas superfícies sendo identificáveis tanto pela técnica de difrotometria de raios-X convencional, como por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

• As análises por MEV mostram duas tendências importantes na nucleação da apatita nesses compósitos. A primeira é que a camada de apatita é mais espessa nas temperaturas de sinterização mais baixas, o que possivelmente está associada à maior porosidade destes compósitos. A segunda, como era de se esperar, a espessura da camada de apatita aumenta com o aumento do intervalo de tempo de imersão no SBF1,5.

• A adesão entre a camada de apatita e o substrato também é maior nas temperaturas mais baixas e possivelmente, associada à maior porosidade do material.

Com relação à Parte II do trabalho, referente ao sistema $(100-x)Nb_2O_5-(x)HAp$, conclui-se que:

• As análises de difratometria de raios-X dos compósitos $(100-x)Nb_2O_5-(x)HAp$, mostram que o tratamento térmico a 1000°C induz reações químicas, produzindo a decomposição da HAp em outras fases e, que o compósito resultante é formado pelas fases: β -*TCP*, *CaNb*₂*O*₆, *PNb*₉*O*₂₅ e *Nb*₂*O*₅.

• Os resultados obtidos, do refinamento pelo método de Rietveld, mostram variações significativas na fração de volume (%) das fases com o aumento da concentração de *HAp* e, ainda, que essas variações influenciam a bioatividade dos compósitos nos testes "in vitro".

• A formação de apatita na superfície de todos os compósitos foi detectada pelas técnicas de difratometria de raios-X, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de raios-X, dispersão de energia e espectroscopia confocal Raman.

• A espessura da camada de apatita nucleada na superfície das amostras foi determinada com boa precisão pelas técnicas de espectroscopia confocal Raman e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia.

Tendo em vista os resultados gerais obtidos nas partes 1 e 2 deste trabalho, conclui-se, por fim:

• Que os compósitos estudados, TiO_2 -HAp e Nb_2O_5 -HAp, possuem as características de materiais bioativos.

• A temperatura de sinterização e a utilização de ar como atmosfera reativa reduzem os custos de produção dos compósitos, indicando que, com um mínimo de infra-estrutura e

um baixo consumo de energia, é possível produzir peças de implantes que apresentem características de um material bioativo. As propriedades estruturais e de bioatividade dos compósitos podem ser controladas por meio da concentração dos reagentes e da temperatura de sinterização.

6.1. PERSPECTIVAS

Visando dar continuidade a essa pesquisa, pretende-se estudar a interação da superfície dos compósitos desenvolvidos no presente trabalho com células e tecidos vivos. Pretende-se, portanto, realizar estudos *"in vivo"* como forma de verificar a osteocondutividade do material, bem como prever se este induz ou não algum efeito de toxidade, inflamação, etc.

Além disso, a partir dos resultados do presente trabalho, mostrando diferentes morfologias e possíveis diferenças de cristalinidade na formação de apatita, tornou-se interessante estudar as interfaces entre o substrato e a apatita formada. Essa investigação pode ser feita, por exemplo, por HR-TEM (microscopia de alta resolução).

Outra perspectiva é estudar as trocas iônicas que ocorrem entre o material e o SBF. Deve ser feito, então, um estudo por espectroscopia Raman e FTIR com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes nas amostras em diferentes etapas do processo de nucleação da apatita e, por fim, estudar os mecanismos físico-químicos que fazem com que os materiais sejam mais ou menos bioativos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[2] Rodrigues, L.R. "Síntese e caracterização de hidroxiapatita etitânia nanoestruturadas para a fabricação de compósitos" Dsc mestrado, UNICAMP (2008).

[3] Oréfice, R.L "Biomateriais: Fundamentos e Aplicações" Rio de Janeiro, (2006)

[4] Gomide, V.S. "Desevolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita – alumina e hidroxiapatita – titânia para fins biomédicos". UNICAMP, Campinas, (2005)

[5] www.dnit.gov.br (Ministério dos Transportes)

[6] Park "Biomaterials: An Introduction" 3th Edition

[7]Dorozhkin.S. "Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics" BIO (2011)

[8] Bento D.A, "Análise de resistência mecânica em implantes de osso: um enfoque numérico e experimental. Dsc Mestrado Engenharia Mecânica UFSC(2003)

[9] Hench, L., "Biomaterials: a forecast for the future", Biomaterials, 19, (1998)

[10] Weinand, W.R. "Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis." Tese de doutorado apresentada ao departamento de física UEM (2009).

[11] Nascimento W.J., Bonadio T.G.M., Freitas V.F., Weinand W.R., Baesso M.L., Lima W.M. "Nanostructured Nb₂O₅–natural hydroxyapatite formed by the mechanical alloying method: A bulk composite" Materials Chemistry and Physics 130 (2011) 84

[12] Nascimento W.J. "Preparação e caracterização físico-mecânica, microestrutural e térmica de compósitos à base de nióbio e hidroxiapatita." Dsc mestrado.UEM (2009)

[13] http://www.clinicarios.com.br/implante.htm

[14] A protetização do amputado de membro inferior; disponível no endereço suzanaf.sites.uol.com.br/jan 2000/próteses.htm

[15] The Lancet maggazine (edição de 12 de fevereiro, 2011)

[16]http://www.cienciahoje.pt/55

[17] Souza, G.B. "Caracterizações físicas, químicas e de bioatividade de superfícies de titânio modificadas para apliacações biomédicas." Curitiba (2010).

[18] Hench, L.L., Wilson, J., "An introduction to bioceramics, Singapore: World Scientific",(1993)

[19] Van Vlack. "Princípios de ciências dos materiais" São Paulo(1970)

[20] Vallet-Regi, M. Ceramics for medical applications, J. Chem Soc Dalton, 2, 97-108, 2001.

[21] Cao. W, Hench L.L. "Bioactive materials" Ceramics International 22 (1996) 493

^[1] Bini, R.A. "Recobrimentos cerâmicos bioativos pelo processo sol-gel sobre Ti c.p. modificado por laser empregados em implantes." Dsc de Mestrado Universidade Estadual Paulista (2007)

[22] Lin. C et al. "Petal-like apatie formed on the surface of tricalcium phosphate ceramic after soaking in distilled water". Biomaterials 22 (2001) 2981

[23] Ribeiro. C. "Processamento e caracterização de cerâmicas à base de hidroxiapatita e fosfato tricálcico" Dsc mestrado (2003) IPEN

[24] Bouler J.M, Dactiulsi G. "In citro carbonated apatite precipitation calcium phosphate pellets presenting various HAP - β-TCP ration"; Key Engineering Materials 192 (2001) 119

[25] Yubao L, Xingdong Z, Groot. K, "Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate. Biomaterials 18 (1997) 737.

[26] Elliott, J.C. "Structure and Chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates", Elsevirer Science (1995)

[27] Iwayama .y et al. "Sintered carbonate apatite as bioresorbable bone substitutes." Journal Biomedical Materials Research." 39 (1998) 603

[28]Levitt, S.R.; Crayton, P.H.; Monroe, E.A.; Condrate, R.A. "Forming Method for Apatite Prostheses." J. Biomed. Mater. Res., 3 (1969) 683–684

[29] http://www.patentesonline.com.br

[30] Dorozhkin S.V. "Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials." J. Mater Sci 44 (2009) 2343

[31]http://icsd.fiz-karlsruhe.de.w10001.dotlib.com.br

[32]Orendorz et al "Phase transformation and particle growth in nanocrystalline anatase TiO_2 films (2007).

[33] Departamento Nacional de Producao Mineral: http://www.dnpm.gov.

[34] Sastre, R., Aza, S., Román, J. S., "Biopolímeros de origen natural" *Biomateriales*. Faenza, Itália., (2004) 515

[35] Chiba. A; Kimura.S, Raghkandan.K, Morizono Y. "Effect of alumina addition on hydroxyapatite biocomposites fabricated by underwater-shock compaction". Materials Science Engineering A, 350 (2003) 179

[36] Fidanceska. E et al. "Fabrication and characterization of porous bioceramic composites based on hydroxyapatite and titania." Materials Chemistry and Physics, v. 103, p. 95-100, 2007

[37] T. Kokubo, H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?" Biomaterials 27 (2006) 2907-2915

[38] Kokubo T. et al. "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. J. Biomed Mater Res 24 (1990) 721

[39] Kokubo T "Bioactive glass ceramics: properties and applications." Biomaterials 12 (1991) 155

[40]Ohtsuki C, Kushitani H, Kokubo T, Kotani S, Yamamuro T. "Apatite formation on the surface of Ceravitaltype glass ceramic in the body." J Biomed Mater Res 25 (1991)1363–70.

[41]Oyane A, Kim HM, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. "Preparation and assessment of revised simulated body fluids." J Biomed Mater Res 65A (2003) 188

[42]Takadama H, Hashimoto M, Mizuno M, Kokubo T. "Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials." Phos Res Bull17 (2004) 119–25.

[43]C. Suryanarayana, "Progress In Materials Science" 46, (2001)

[44] Uskokovic. D et al. " A contribution to some phenomenological relation in crystalline powder compact sintering", Modern Developments in Powder Metallurgy, 6 (1974) 369

[45] Chiaverini V. "Metalurgia do Pó Técnica e Prdutos" Associação Brasileira de Metais São Paulo (1988)

[46] Fonseca F.M, "Biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por gelcasting. Dsc mestrado IME (2007)

[47] G.S. Dias, "Mecanossíntese e caracterização de cerâmicas Bi (1-x)LaxFeO₃ obtidas por diferentes rotas de sinterização". Dsc mestrado apresentada ao departamento de Física UEM

[48] P.J. Goodhew, J. Humphreys, R. Beamland," Electron Microscopy and Analysis", 3th Edition. Taylor & Francis, London (2001)

[49] A.F. Padilha, "Materiais de Engenharia: Microestrutura e Propriedades", Curitiba, Brasil (2000)

[50] Azaroff, L.V e Buerguer, M.J. "The Powder method in X-Ray Crystallography, McGraw Hill, 1958

[51] Baju F.S., Cumbrera F.L. "The Use of the Pseudo-Voigt Function in the Variance Method of X-ray Line-Broadening Analysis" J. Appl. Cryst. 30 (1997) 427-430

[52] Young, R.A. "The Rietveld method" Oxford University Press, New York (1995)

[53]Maia, A.G." Sinterização de nanopartículas de NiO por gelatina comestível." Universidade Federal do Ceará (2005).

[54]Caglioti. G, Paoletti,A; Ricci,F.P. "Choice of coliimators for a crystal spectrometer for neutron diffraction, Nuclear Instrument, (1958).

[55]R.M. Silverstein, "Spectrometric Identification of organic compounds", 7th edition

[56] W. Bueno "Manual de espectroscopia vibracional". Sao Paulo: McGraw-Hill, 1990

[57] Skoog D.A; Holler F.J; Nieman T.A. "Princípios de Análise Instrumental"Bookman, Toronto, (2002) 5° edicao.

[58] Sala. O, "Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho" Editora da Unesp (1996)

[59]Colthup N.B, Daly L.H, Wiberley "Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Academic Press Inc, 3th edition (1990)

[60] Carter R. A. B, "Estudo do tecido mamário por espectroscopia Raman" Dsc Mestrado. Departamento de Engenharia biomédica da Universidade do Vale do Paraíba (2004).

[61] Determination of Density of Compacted or Sintered Metal Powders, MPIF Standard, 42-(1986).

[62] S.A.Souza, "Ensaios mecânicos de materiais metálicos Fundamentos teóricos e práticos" 5th edição, São Paulo, (1982).

[63] Callister, W.D, Materials Science and Engineering: An Introduction, New Yourk, (1991)

[64]Lepienski C.M. "Tópicos de Física do Estado Sólido Propriedades Mecânicas Medidas por Indentação Instrumentada" Notas de aula. Departamento de Física Universidade Federal do Paraná (2007).

[65] Dempster, W.T., e Liddicoat, R.T. "Compact bone as a non isotropic material" Am.J. Anat. 91, (1953)331

[66] Ko, R. The tension test upon the compact substance of the long bones og human extremities. 53 (1953) 503

[67] McElhaney, J. Dynamic response of bone and muscle tissue. J. Appl. Physiol. 21, 1966, 1231

[68] Ascenzi A. e Bonucci E. The tensile properties of single osteons. Anat. Rec. 158 (1967)1967

[69] Wang et all, "Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of boné" Tissue Engineering 6 (2000), 361-381.

[70] Linde F. e Hvid I. "The effect of constraint on the mechanical behaviour of trabecular bone specimens." J. Biomech. 22, 1989 485-490.

[71] Lima, W. M., "Materiales compuestos de matriz acero inoxidable austenítico reforzado com intermetálicos: comportamiente mecânico, a corrosión y desgaste", Tese de doutorado apresentada para a obtenção do título de doutor. Universidad Carlos III de Madrid, (1999).

[72] "Determination of density of Compacted or Sintered metal Powders". MPIF Standard, n°42,1986

[73]ISO FDIS 23317,2007 "Impants for surgery – In vitro evaluation for apatite – forming ability of implant materials"

[74]<u>www.brukeroptics.com</u>

[75] Sena L. A. "Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas" Tese de doutorado UFRJ. (2004)

[76] Lima, W.M., Weinand, W.R., Paesano Jr. A., Ortega, F.H.M.; Effect of the calcination time of fish bones in the synthesis of hydroxyapatite, Materials Science Forum, Switzerland, 498, (2005), 600.

[77]C. Suryanarayana, Mechanical Alloying and Milling, Pergamon, Progress in Materials Science, 46 (2001) 39

[78] Koutsopoulos S "Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods" "Journal of Biomedical Materials Research 62,(2002) 600

[79]Siddharthan, A., Seshadri, S. K., Sampath Kumar, T. S., Microwave accelerated synthesis of nanosized calcium deficient by microwave irradiation, J. Materials Science: Materials in medicine, 15 (2004) 1279

[80]C.C. Silva, M. A. Valente, M.P.F. Graça, A.S.B. Sombra, Solid State Science, 06 (2004) 1374

[81]P.Brånemark, G.Zarb,., T.Albrektsson, "Tissue integrated prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry". Chicago-USA: Quintessence Publishing; 1985.

[82] Almeida A.F.L., Fechine P.B.A, Sasaki J.M., Ayala A.P, Góes J.C., Pontes D.L. Margulis W, Sombra A.S.B., "Optical and electrical properties of barium titanate-hydroxyapatite composite screen-printed thick films." Solid State Sciences, 6 (2004) 267.

[83] Park Zin et al. "Infrared spectra and electrical conductivity of the solid solutions x (MgO)+ $(1-x)\alpha$ -Nb₂O₅; 0,01<x<0,09." Bull Korean Chem Soc 13 (1992) 127

[84] Aronne A et al. "Sol-gel synthesis and structural characterization of niobium-silicon mixed-oxide nanocomposites". J So-Gel Sci Technol 43 (2007) 193

[85] Patil P.S. et al. "Properties ofspray deposited niobium oxide thin films" Journal of Materials Science: Materials in Eleletronics 16 (2005) 35.

[86]Oktar F.N. "Hydroxyapatite-TiO2 composites" Materials Letters 60 (2006) 2207-2210

[87] Oktar F.N. "Sintering effect on mechanical properties of composites of natural hydroxyapatites and titanium" Ceramics International 35 (2009) 2965–2971

[88] Kim H.M., Miyaji. F, Kokubo T, Nakamura T. "Bioactivity of $Na_2O - CaO - SiO_2$ glasses. J.Am.Ceram. Soc, 1995; 78; 2405 – 11.

[89] Kim H.M., Miyaji. F, Kokubo T,Kobayashi M, Nakamura T. "Bioactivity of $M_2O - TiO_2 - SiO$ (M = Na, K) glasses: an in vitro evalution." J Chem Soc Japan,69 (1996); 2387

[90] Ohtsuki C, Kokubo T , Yamamuro T. Mechanism of apatite formation on $CaO - SiO_2 - P_2O_5$ glasses in a simulated body fluid. J. Non Crys Solids 143 (1992) 84

[91] Kim H.M, Kokubo T, Kawashita, M, Nakamura T. "Process of calcification on artificial materials" <u>Z</u> Kardiol. 2001;90 Suppl 3:86-91

[92] Kim H.M, Kokubo T, Himeno T, Kawashita, M, Nakamura T. "The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an *in vitro* assessment" J. R. Soc. Interface 1 (2004) 17

[93] Cullity.B.D "Elements of X-Ray diffraction" (1956) Addison-Wesley Publishing Company, USA

[94] Fredrik Lindberg et al. "Hydroxylapatite growth on single-crystal rutile substrates". *Biomaterials* 29 (2008) 3317–3323

[95] Yang, Y; Kim; K.H; Agrawal, C.M. e Ong, L. J. "Interation of hydroxyapatite-titanium at elevated temperature in vacuum environment" Biomaterials, 25, (2003), 2927

[96] Silva, R.A et al. "Growth and Characterization of columbite CaNb2O6 high quality single crystal fiber" Journal of Crystal Growth 262 (2004) 246

[97] Dussauze M "Génération de second harmonique dans des verres borophosphate de sodium et niobium par polarisation thermique."Thèse présentée à L'Université Bordeaus I pour obtenir le grade de docteur, (2005)

[98] Huang BX, Wang K, Church JS, Li YS "Characterization of niobium by raman and infrared spectroscopy". Electrochimica Acta 1999;44: 2571-77.

[99] Ayudhya SK, Soottitantawat A, Praserthdam P, Satayaprasert C. Effect of aging on the properties of mesoporous niobium oxide. Mat Chem and Phys 2008;110:387-92.

[100]Fowler. B, Markovic M e Brown W. "Octacalcium Phosphate Infrared and Raman Vibrational Spectra" Chem Mater 5 (1993) 1417

[101] Hench L.L. et al. "Aplication of Raman microspectroscopy to the characterisation of bioactive materials" Materials Characterization 49 (2003) 255.

[102]Rehman.I et al. "Structural evaluation of human and sheeo bone and comparisons with hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy." J Biomed Mater Res 29 (1995) 1287.