



**Universidade Estadual de Maringá**

---

**Pós-Graduação em Física**

**Taiana Gabriela Moretti Bonadio**

**Biocompósitos de pentóxido de nióbio, hidroxiapatita e  $\beta$ -  
fosfato tricálcico: produção, caracterização e estudos *in*  
*vivo* como suportes ósseos denso e poroso**

**Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso**

**Coorientador: Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand**

---

**Maringá, 09/2014**



**Universidade Estadual de Maringá**

---

**Taiana Gabriela Moretti Bonadio**

**Biocompósitos de pentóxido de nióbio, hidroxiapatita e  $\beta$ -  
fosfato tricálcico: produção, caracterização e estudos *in*  
*vivo* como suportes ósseos denso e poroso**

**Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso**

**Coorientador: Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand**

Tese de doutorado apresentada à  
Universidade Estadual de Maringá  
para a obtenção do título de  
doutora em Física.

---

**Maringá, 09/2014**

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

B697b Bonadio, Taiana Gabriela Moretti  
Biocompósitos de pentóxido de nióbio,  
hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcico: produção,  
caracterização e estudos *in vivo* como suportes  
ósseos denso e poroso / Taiana Gabriela Moretti  
Bonadio. -- Maringá, 2014.  
28 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso.  
Coorientador: Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Física, 2014.

1. Biocompósitos. 2. *Scaffold*. 3. Regeneração  
Óssea. 4. Fosfatos de Cálcio. 5. Pentóxido de  
Nióbio. I. Baesso, Mauro Luciano, orient. II.  
Weinand, Wilson Ricardo, coorient. III. Universidade  
Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em  
Física. IV. Título.

CDD 21.ed. 530.0284

MN-001692

*Este trabalho é dedicado a todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação.*

## **AGRADECIMENTOS**

Sou uma pessoa de sorte, pois durante o período em que estive desenvolvendo esta pesquisa, tive o privilégio de contar com a ajuda de profissionais muito competentes que também são pessoas maravilhosas. Sou imensamente grata a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado. Em especial, agradeço:

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand pela orientação, paciência, amizade, comprometimento com o trabalho e pelas horas dedicadas. Professor Wilson, sei que nesses anos de trabalho passamos por muitos desafios e foi muito bom poder contar com você para tentar solucionar todos eles.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso pela orientação, confiança, amizade e conselhos. Professor Mauro, obrigada principalmente por sempre me incentivar e por acreditar no meu trabalho.

À grande parceira Prof<sup>a</sup>. Dra. Luzmarina Hernandes por aceitar participar desse projeto interdisciplinar, pela motivação, pela amizade e pelo conhecimento transmitido. Espero que essa continue por muitos e muitos anos.

Ao Prof. Dr. Antônio Medina Neto, por todas as discussões no decorrer desse trabalho, pela ajuda nas análises dos resultados de análises térmicas e por ter contribuído tanto para a minha formação desde o meu primeiro ano de graduação.

Aos Profs. Drs: Francielle Sato, Jurandir Hillmann Rohling, Ivair Aparecido dos Santos e Water Moreira Lima pela ajuda no decorrer desse trabalho, pelas sugestões, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade.

Ao meu namorado, marido e melhor amigo Valdirlei Fernandes Freitas pela compreensão de minhas ausências, pelo carinho, ajuda e companheirismo durante esse trabalho.

À doutoranda Jaciele Marcia Rosso (Jaci, Jessy...) pela amizade, pela ajuda no processamento das amostras e por estar sempre por perto.

À Dra. Gisele Bianchi (Gi, Gabriela,...) e ao Dr. Diogo Zampiere Montanher (Tuiú) pela amizade e pela ajuda na realização das várias e várias medidas de DTA e TG.

A todos os colegas e amigos de pós graduação, não somente pelas conversas sobre o trabalho, mas, principalmente pelos cafezinhos e *happy hours*. Sem vocês meu doutorado teria sido bem mais difícil e bem menos divertido. Vou sentir saudades!

Aos alunos do Programa de Pós Graduação em Odontologia: Aline Gabriela Cândico, Helio Kiyochi Júnior e Humberto Pasquinelli pela realização dos procedimentos com animais e pelas análises histológicas.

À minha família pelo incentivo, pelos valores transmitidos, pelo amor e por ter acreditado em mim até nos momentos mais difíceis.

Agradeço também:

Ao Prof. Dr. Neri Alves e à técnica Glenda Gonçalves de Souza da UNESP por disponibilizar o microscópio eletrônico de varredura do Campus da UNESP-Presidente Prudente.

À Prof<sup>a</sup>. Selma Franco pelos materiais utilizados como agentes espaçadores nas cerâmicas porosas.

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

À técnica Katia Aparecida Kern Cardoso pelo préstimo na central de microscopia do COMCAP/UEM.

À técnica Alessandra Lonardonni pela ajuda com as medidas de espectroscopia Raman.

Ao Dr. Ivan Granemann de Souza Junior do Departamento de Agronomia da UEM pela ajuda com as medidas de análise química quantitativa.

Aos funcionários do Departamento de Física da UEM: Mônica, Jurandir, Marcio, Sergio e Marcos pela presteza no atendimento de nossas solicitações.

Ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia Ictiologia e Aqüicultura (NUPELIA-UEM) pelos ossos de peixe.

À Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM) pelo Óxido de Nióbio.

À CAPES pelo suporte financeiro.

*Aqueles que se sentem satisfeitos  
sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos  
são os únicos benfeitores do mundo.”  
(Walter S. Landor)*

## RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de biomateriais cerâmicos (densos e porosos), utilizando como matéria prima pentóxido de nióbio e a cerâmica bifásica hidroxiapatita -  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $HA\beta$ ), para atuarem como substitutos ósseos. Os compósitos baseados em  $Nb_2O_5$  e  $HA\beta$  foram produzidos via técnicas de metalurgia do pó. Adicionou-se ao  $Nb_2O_5$  quantidades em volume, entre 10 e 90% de  $HA\beta$ . Os resultados obtidos por análise térmica diferencial e a avaliação das propriedades físicas e mecânicas dos compósitos sinterizados em 1000 °C apontaram a composição (50% $HA\beta$ -50% $Nb_2O_5$ ) como sendo a mais adequada para as aplicações pretendidas. Essa amostra sinterizada em 1000 °C foi caracterizada por diferentes técnicas quanto às suas propriedades físicas, mecânicas e estruturais. Testes *in vivo* em defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos Wistar demonstraram que o compósito produzido foi biocompatível e apresentou as propriedades de osteocondução e osteoindução. Para a produção de biomateriais cerâmicos porosos (*scaffolds*) foi necessária uma otimização da temperatura de sinterização do compósito 50% $HA\beta$ -50% $Nb_2O_5$ . Várias temperaturas no intervalo entre 800 e 1150 °C foram testadas e avaliadas por diferentes técnicas. Análises de difração de raios X e espectroscopia Raman mostraram que entre 1000 e 1120 °C as estruturas cristalinas dos materiais são essencialmente as mesmas. Na temperatura de sinterização de 1080 °C todas as propriedades físicas e mecânicas analisadas foram maximizadas de modo que essa temperatura foi a escolhida como sendo a mais adequada para o processamento dos *scaffolds*. Esferas de lactose foram utilizadas como agente espaçador produzindo no material poros interconectados entre 100 e 200  $\mu$ m. Os *scaffolds* se mantiveram mecanicamente estáveis e foram implantados em ratos Wistar. Os testes *in vivo* demonstraram que o *scaffold* produzido apresentou uma estrutura tridimensional adequada para a ocorrência de angiogênese. Em conclusão, os resultados deste trabalho mostraram que o compósito  $Nb_2O_5$ - $HA\beta$ , tanto na sua forma densa como porosa, apresenta características de um material biocompatível com uma resposta biológica muito boa sendo uma alternativa promissora como material de substituição de tecido ósseo.

## ABSTRACT

The aim of this work was the development of ceramic biomaterials (dense and porous) using as raw materials niobium pentoxide and the biphasic ceramic of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $HA\beta$ ), to act as bone substitutes. Composites based in  $Nb_2O_5$  and  $HA\beta$  were produced via powder metallurgy techniques.  $Nb_2O_5$  was added in  $HA\beta$  in an amounts of volume between 10 and 90% of  $HA\beta$ . The results obtained by differential thermal analysis and by the evaluation of physical and mechanical properties of the composite sintered at 1000 ° C indicated the composition (50%  $HA\beta$ -50%  $Nb_2O_5$ ) as the most suitable for the intended applications. This sample sintered at 1000 ° C was characterized by different techniques regarding their physical, mechanical and structural properties. *In vivo* tests in critical-size defects in calvaria of Wistar rats demonstrated that the produced composite was biocompatible and has osteoconductive and osteoinductive properties. The production of porous ceramic biomaterials (scaffolds) required an optimization of the sintering temperature of the composite 50% $HA\beta$ -50%  $Nb_2O_5$ . Several temperatures between 800 and 1150 ° C were tested and evaluated with different techniques. X-rays Diffraction and Raman spectroscopy results showed that the crystal structures of the materials do not change between 1000 and 1120 ° C. In the sintering temperature of 1080 ° C, all the analyzed physical and mechanical properties were maximized, so this temperature was chosen for processing the scaffolds. Lactose spheres were used as spacer agent and it produced interconnected pores between 100 and 200 micrometers in the material. The scaffolds remained mechanically stable and were implanted in rats calvaria. *In vivo* tests demonstrate that the scaffolds presented three-dimensional structure appropriate for the occurrence of angiogenesis. In conclusion, the present results showed that the composite  $HA\beta$ - $Nb_2O_5$  in both forms (dense and porous), has characteristics of a biocompatible material with a very good biological response indicating it is a promising alternative as a replacement of bone tissue.

## Sumário

.....	i
.....	ii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	6
2.1. Objetivo geral .....	6
2.2. Objetivos específicos .....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
3.1. Breve histórico .....	7
3.2. Biomateriais na atualidade .....	10
3.3. A definição de biomateriais .....	13
3.4. A evolução do campo de biomateriais .....	14
3.5. Alguns dispositivos utilizados atualmente .....	16
3.5.1. Próteses Total de substituição quadril .....	16
3.5.2. Implantes Dentais .....	17
3.6. Biocerâmicas de fosfato de cálcio .....	18
3.6.1. Hidroxiapatita .....	19
3.6.2. $\beta$ – fosfato tricálcico - $Ca_3(PO_4)_2$ .....	21
3.7. Pentóxido de Nióbio .....	22
3.8. Materiais Compósitos .....	24
3.9. Scaffolds .....	25
3.10. O Tecido Ósseo .....	26
3.10.1 Células do osso .....	26
3.11. Células Tronco Mesenquimais .....	28
3.12. Osteoindução, Osteogênese, Osteocondução e Osteointegração .....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
4.1. Obtenção dos precursores .....	33
4.1.1. A cerâmica bifásica $HA\beta$ (hidroxiapatita - $\beta$ -fosfato tricálcico) .....	33
4.1.2. O pentóxido de Nióbio .....	33
4.1.3. Preparação dos compósitos .....	33
4.2. Procedimento cirúrgico .....	36
4.3. Pós cirúrgico .....	37
4.4. Estudos <i>ex vivo</i> .....	38
4.5. Caracterização .....	40
4.5.1. Análises térmicas: Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) .....	40
4.5.2. Difração de raios X .....	41
4.5.3 Análise Química Quantitativa .....	42
4.5.4. Espectroscopia Raman .....	43

4.5.5. Microscopia eletrônica de varredura.....	44
4.5.6. Variação dimensional .....	45
4.5.7. Densidade e porosidade .....	46
4.5.8. Microdureza Vickers.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1. Etapa I: Escolha dos precursores $HA\beta$ e $Nb_2O_5$ .....	49
5.1.1. Análise térmica TG e DSC da cerâmica bifásica $HA\beta$ .....	49
5.1.2. Análise por difração de raios X da cerâmica bifásica $HA\beta$ .....	50
5.1.3. Refinamento estrutural pelo método de Rietveld da cerâmica bifásica $HA\beta$ .....	52
5.1.4. Análise química quantitativa da cerâmica bifásica $HA\beta$ .....	54
5.1.5. Análise por espectroscopia Raman da cerâmica bifásica $HA\beta$ .....	54
5.1.6. Análise por difração de raios X do pentóxido de nióbio $Nb_2O_5$ .....	55
5.1.7. Análise por espectroscopia Raman do pentóxido de nióbio $Nb_2O_5$ .....	56
5.2. Parte II: Escolha da composição (em vol.%) para o compósito $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$ .....	58
5.2.1. Escolha do volume (%) de $HA\beta$ para o sistema $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$ .....	58
5.2.2. Análise térmica (DTA) .....	58
5.2.3. Análise da variação dimensional em função do volume (%) de $HA\beta$ .....	60
5.2.4. Densidade e porosidade em função da variação percentual de $HA\beta$ .....	61
5.2.5. Análise por difração de raios X do compósito $C5$ .....	62
5.2.5.1. Refinamento estrutural pelo método de Rietveld do compósito $C5$ .....	64
5.2.6. Análise por espectroscopia Raman do compósito $C5$ .....	65
5.2.7. Propriedades físicas e mecânicas do compósito $C5$ .....	67
5.2.8. Análise microestrutural por MEV do compósito $C5$ .....	67
5.2.9. Implantes <i>in vivo</i> do compósito $C5$ e do controle $HA\beta$ .....	69
5.2.9.1. Avaliação histológica .....	69
5.2.9.2. Análise do compósito $C5$ e da $HA\beta$ por microscopia de luz após o implante .....	69
5.2.9.3. Análise do compósito $C5$ e da $HA\beta$ por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	77
5.3. Parte III: Análise do compósito $C5$ e da cerâmica bifásica $HA\beta$ em função da temperatura de sinterização....	79
5.3.1. Análise Térmica diferencial (DTA) .....	79
5.3.2. Análise por difração de raios X do compósito $C5$ em função da temperatura .....	80
5.3.2.1. Refinamento pelo método de Rietveld .....	82
5.3.3. Análise por espectroscopia Raman do compósito $C5$ sinterizado em diferentes temperaturas.....	83
5.3.4. Resultados do refinamento pelo método de Rietveld.....	86
5.3.5. Propriedades físicas .....	88
5.3.5.1. Análise da variação dimensional de $C5$ e de $HA\beta$ em função da temperatura de sinterização .....	88
5.3.5.2. Análise da densidade e da porosidade de $C5$ e de $HA\beta$ em função da temperatura de sinterização...89	
5.3.6. Propriedades mecânicas .....	91

5.3.6.1. Microdureza Vickers .....	91
5.3.7. Microestrutura de $HA\beta$ e de $C5$ em função da temperatura de sinterização .....	93
5.3.7.1. Evolução da microestrutura de $HA\beta$ em função da temperatura de sinterização .....	93
5.3.7.2. Evolução da microestrutura de $C5$ em função da temperatura de sinterização.....	95
5.4. Parte 4: Produção de elementos porosos (scaffold) de $C5$ e $HA\beta$ .....	101
5.4.1. Escolha do elemento espaçador para obtenção de porosidade .....	101
5.4.2. Análise térmica (TG) e (DTA) do compósito $C5$ com a adição 50% de lactose.....	102
5.4.3. Análise da porosidade resultante da adição de lactose no compósito $C5$ por MEV .....	103
5.4.4. Análise da porosidade, densidade e microdureza Vickers .....	107
5.4.5. Análise histológica <i>ex vivo</i> .....	109
5.4.5.1. Implantes <i>in vivo</i> do compósito $C5$ e do controle $HA\beta$ na forma de scaffold.....	109
5.4.5.2. Análise do compósito $C5$ e da $HA\beta$ por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	113
6. CONCLUSÕES .....	118
7. PERSPECTIVAS .....	121
8. REFERENCIAS .....	122

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, surgiram dispositivos médicos inovadores que aumentaram significativamente o tempo de vida e a qualidade de vida de milhões de pessoas [1,2]. Os materiais adequados para a produção desses dispositivos são chamados de biomateriais.

Os biomateriais e os dispositivos feitos a partir desses são atualmente utilizados como “próteses” em cirurgias cardiovasculares, ortopédicas, dentais, oftalmológicas, de reconstrução e em outras intervenções, tais como, suturas cirúrgicas, bioadesivos e dispositivos de liberação controlada de drogas [2].

A demanda no uso de biomateriais é justificada pelo número de pessoas que anualmente necessitam da substituição de algum órgão ou tecido do organismo. Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil o número de pacientes na fila de transplante de órgãos e tecidos, em 2013, era superior a 38.000 pessoas [3]. Além disso, mesmo quando um paciente recebe um transplante de tecido, sempre há um risco significativo de rejeição e da transmissão de doenças [4,5].

A engenharia de tecidos e a ciência de biomateriais têm como objetivo reparar ou substituir tecidos doentes e danificados sem que haja necessidade de doadores de órgãos. Na engenharia de tecidos o intuito é o desenvolvimento de produtos para a substituição de órgãos danificados utilizando células vivas endógenas. Esse tipo de procedimento é vantajoso pois diminui consideravelmente o risco de rejeição dos transplantes e a transmissão de doenças, já que os tecidos substituídos são derivados do próprio tecido do paciente [2]. Outro caminho bastante adotado, principalmente na área de ciência de biomateriais, é o desenvolvimento de novos materiais artificiais que possam servir como substitutos de órgãos danificados.

O campo de biomateriais causa um impacto significativo em diversas áreas da sociedade (saúde, economia, ciência) e o seu interesse é justificado pelo fato de milhões de pessoas serem salvas ou obterem uma maior qualidade de vida devido seu uso. É o caso, por exemplo, dos materiais utilizados no reparo de fraturas ósseas [2].

Uma das principais causas do aumento da taxa de fraturas ósseas em todo mundo é a osteoporose [6]. A osteoporose ocorre predominantemente em pessoas idosas com idade superior a 50 anos e pode levar, nos casos mais avançados, à invalidez ou até mesmo à morte do paciente [7]. De acordo com o Censo de 2010 divulgado pelo IBGE, o Brasil possui uma tendência acelerada do envelhecimento da população. A projeção afirma que o número de brasileiros acima de 65 anos

deve quadruplicar até 2060 passando de 14,9 milhões (7,4 % do total) em 2013 para 58,4 milhões (26,7% do total) em 2060 [8]. Com isso, deverá haver uma crescente demanda por materiais para a substituição de tecidos ósseos danificados. Essa é uma tendência que ocorre não só no Brasil como em todo o mundo. Em 2010, cerca de 524 milhões de pessoas estavam com idade igual ou superior a 65 anos, o que representava 8% da população mundial. Contudo, estima-se que em 2050, este número deverá ser quase o triplo (cerca de 1,5 bilhões), o que representará 16% da população do mundo [9]. Isso deve contribuir para que ocorram muito mais cirurgias de enxerto ósseo em um futuro próximo.

Atualmente, cerca de 2,2 milhões de procedimentos de enxerto ósseos são realizados anualmente em todo o mundo, sendo cerca de 500.000, somente nos Estados Unidos [10]. A venda mundial de produtos ortopédicos chegou a US \$ 15 bilhões em 2001 e continuou a crescer a uma taxa anual de 13% [4]. Todos os fatores apresentados nessa sessão justificam as crescentes pesquisas no campo de novos substitutos ósseos.

Os substitutos ósseos considerados como “padrão ouro” são os enxertos autólogos, isto é, enxertos obtidos do próprio paciente, a partir de sítios ósseos doadores. Esses enxertos possuem propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras. Todavia, a morbidade pós-operatória relacionada à necessidade de uma segunda cirurgia, para a nova coleta de uma área óssea doadora é considerada um obstáculo para o emprego desse tipo de enxerto. Além disso, um eventual aumento de tempo e custos devido ao fato dos procedimentos serem realizados em ambiente hospitalar é visto com alguma resistência por parte dos pacientes [11].

Outros tipos comuns de enxertos ósseos são os alógenos e xenógenos. Os enxertos alógenos ou homogêneos são obtidos de indivíduos da mesma espécie, porém com diferentes genótipos. Esse tipo de enxerto tem como principais vantagens a eliminação de um sítio doador no paciente, a diminuição da quantidade de anestesia e do tempo cirúrgico, e a diminuição da perda de volume sanguíneo, entretanto, a utilização dos aloenxertos apresenta sempre o risco potencial de transmissão de doenças infecciosas. Além disso, nem sempre existe a disponibilidade ou acessibilidade fácil para recorrer aos bancos de ossos existentes que se debatem habitualmente com problemas ao nível do insuficiente volume de coleta [11,12].

Com relação aos enxertos xenógenos, eles correspondem a enxertos provenientes de outras espécies animais (ex: bovinos). Por esse motivo, necessitam de um tratamento antigênico, de deslipidização e desproteíntização, o que reduz substancialmente as suas capacidades

osteoadutoras. Sua resistência biomecânica é similar à do osso humano e tratamentos adequados para a sua obtenção podem evitar respostas imunológicas ou inflamatórias adversas. A ausência de proteína torna-o seguro para a utilização em humanos, deixando como restrições ao seu uso apenas os aspectos culturais e religiosos [11,12].

Para contornar os problemas de morbidade local, disponibilidade de volume, potencial de imunogenicidade, e a transmissão de doenças, o desenvolvimento dos substitutos ósseos artificiais representa uma boa alternativa. Todavia, ainda não existe nenhum substituto que encarne todas as qualidades ideais de um enxerto autólogo. Além disso, com exceção das proteínas morfogenéticas ósseas (*bone morphogenetic protein* - BMPs), estes produtos não costumam ter capacidades osteogênicas ou osteoadutoras, a menos que misturado com auto-enxerto ou aspirado de medula óssea (*bone marrow aspirate*- BMA) [13].

Diversas classes de materiais são utilizadas na confecção de implantes artificiais, como por exemplo, metais, polímeros, cerâmicas e compósitos [14]. 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 [15].

Os metais merecem destaque no seu emprego como substitutos ósseos por possuírem excelentes propriedades mecânicas, tais como: dureza, módulo elástico e resistência à fadiga. [14]. Entretanto, esses materiais podem apresentar certos inconvenientes como rejeições biológicas, indução de infecções, perda de massa óssea ou deslocamento na interface osso-implante devido à falta de compatibilidade estrutural e de superfície [16]. Logo, surgiu um novo conceito que diz respeito ao uso de cerâmicas como materiais biocompatíveis.

Na última década, foram produzidas algumas cerâmicas com propriedades mecânicas aceitáveis para substituição óssea, com a vantagem de estimularem o crescimento ósseo, acelerando o processo de recuperação das partes danificadas do corpo [17]. 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 porosidade e boa resistência mecânica [18]. 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 em virtude 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 química biomaterial-tecido ósseo [19].

Cerâmicas porosas de hidroxiapatita, por exemplo, podem ser preparadas quando se necessita de uma rápida recuperação do tecido ósseo. É o caso do preenchimento de cavidades oriundas de processos inflamatórios, osteoporose, acidentes e em alguns tipos de implantes ósseos. Os implantes porosos, mundialmente conhecidos como *scaffolds* (arcabouços), 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 os permeie possibilitando e facilitando a osseointegração [20].

Além da hidroxiapatita, outro fosfato de cálcio bastante utilizado em processos de regeneração óssea é o  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $Ca_3(PO_4)_2$ -  $\beta$ -TCP). Estruturalmente, a hidroxiapatita é mais parecida com o osso natural do que o  $\beta$ -TCP, no entanto, sua reabsorção é bem mais lenta do que a do  $\beta$ -TCP. A velocidade de dissolução do  $\beta$ -TCP é de 3 a 12 vezes maior que a da hidroxiapatita (HA) estequiométrica [37]. Isso quer dizer que enquanto a hidroxiapatita implantada permanece no organismo por anos a fase  $\beta$ -TCP é reabsorvida em semanas.

Estudos promissores vêm sendo realizados com cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio ( $\beta$ -TCP e hidroxiapatita). A combinação das propriedades destes dois materiais resulta em uma cerâmica reabsorvível capaz de desenvolver uma fixação bioativa na interface tecido-implante [15,21,22].

Como a grande maioria dos materiais cerâmicos, a hidroxiapatita e o  $\beta$ -TCP são materiais frágeis. Uma das maneiras para reforçar estas cerâmicas é desenvolver materiais compósitos, combinando as propriedades de bioatividade das cerâmicas de fosfato de cálcio com propriedades adequadas de outros materiais. Dentre os materiais mais utilizados como implantes, o titânio merece destaque devido a 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 de uma fina e aderente camada de óxidos (fenômeno de passivação) 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, essa 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 [23].

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  $Nb - OH$  que pode induzir a nucleação de apatita, o que o torna promissor para o desenvolvimento de biomateriais [24,25].

Por outro lado, no momento atual o número de publicações nacionais e internacionais, explorando a biocompatibilidade do nióbio e seu uso como substituto ósseo, ainda é muito menor do que o de outros biomateriais como o titânio e a hidroxiapatita. Trabalhos anteriores comprovaram que é possível desenvolver um compósito nanoestruturado utilizando o pentóxido de nióbio e a hidroxiapatita via metalurgia do pó. Isto foi feito a partir de cavacos de nióbio e de ossos de peixes [24,25,26].

Um compósito nanoestruturado utilizando uma mistura de hidroxiapatita obtida da calcinação de ossos de peixes a  $900\text{ }^\circ\text{C}$  e  $Nb_2O_5$  obtido pela oxidação de cavacos<sup>1</sup> de nióbio metálico foi desenvolvido por Nascimento e colaboradores (2011) [24]. A mistura nanoestruturada foi obtida por meio do processo de moagem em altas energias. Após otimização dos parâmetros de moagem, foram obtidas partículas com tamanho em torno de 60 nm e agregados com tamanho médio em torno de 100 nm. Além disso, o processo de moagem causou impactos na densidade, dureza e variação dimensional do compósito[24].

Recentemente, demonstramos que esses compósitos, quando submetidos a processos de sinterização, resultam em amostras com novas fases cristalinas. Essas fases cristalinas foram capazes de induzir a formação de apatita carbonatada em sua superfície, quando imersas em um fluido corpóreo simulado (SBF) [27]. Como a nucleação de apatita é um requisito essencial para que um material seja bioativo, esse trabalho parece ter acenado para o desenvolvimento de um novo e vantajoso biomaterial, do ponto de vista econômico, biológico e de engenharia.

A otimização dos parâmetros relacionados à composição e à sinterização desses compósitos bem como a viabilidade do seu uso *in vivo*, como substituto ósseo, foram objetivos desse trabalho.

---

<sup>1</sup> Cavaco é o termo utilizado para designar os resíduos de material removidos de uma peça durante o processo de usinagem metalúrgica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Desenvolver um compósito à base de pentóxido de nióbio, hidroxiapatita e  $\beta$  – fosfato tricálcico e avaliar a viabilidade de sua utilização *in vivo*.

### 2.2. Objetivos específicos

1- Produzir um material bifásico de hidroxiapatita/ $\beta$ -fosfato tricálcico (*HA/ $\beta$ -TCP*) por calcinação de ossos de peixe;

2- Produzir compósitos  $(100-x)Nb_2O_5 - (x)HA/\beta-TCP$  pelas técnicas da metalurgia do pó e moagem em alta energia (MA) utilizando diferentes concentrações de *HA/ $\beta$ -TCP* e diferentes temperaturas de sinterização;

3- Produzir, pelas técnicas da metalurgia do pó, peças de implante com baixa e alta porosidade (*scaffolds*) bem como avaliar sua estabilidade, porosidade e conectividade de poros para uso *in vivo*;

4- Caracterizar o material bifásico e as composições do sistema  $(100-x)Nb_2O_5 - xHA/\beta-TCP$  por diferentes técnicas: difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura associada com espectroscopia de raios X por dispersão de energia (MEV-EDS), espectroscopia Raman, absorção atômica com chama e colorimetria, análise térmica diferencial (DTA), análise termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC);

5- Avaliar as propriedades físicas e mecânicas dos materiais produzidos após o processo de sinterização;

6- Avaliar *ex vivo* o potencial dos materiais produzidos para estimular o desenvolvimento de tecido ósseo durante a regeneração da calvária de ratos Wistar em defeitos de tamanho crítico por meio de estudo em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura associada com espectroscopia de raios X por dispersão de energia (MEV-EDS).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Breve histórico

A introdução de materiais não biológicos no corpo humano ocorreu ao longo da história. Os restos mortais de um ser humano encontrado perto de Kennewick, Washington, EUA (muitas vezes referido como o "Kennewick Man") foram datados (com alguma controvérsia) sendo de 9.000 anos de idade. Este indivíduo, descrito por arqueólogos como uma pessoa alta e saudável, que vagou pela região que hoje conhecemos como o sul de Washington, tinha uma ponta de lança cravada em seu quadril, com aparente cura, de forma a não prejudicar significativamente suas atividades [2]. Este implante, não intencional ilustra a capacidade do corpo em lidar com materiais estranhos. A ponta de lança tem pouca semelhança com biomateriais modernos, mas era um implante "tolerado".

Ao contrário da ponta de lança, implantes intencionais também foram utilizados por civilizações antigas. Os povos maias, por exemplo, realizavam implantes dentais utilizando conchas marinhas "nácar" (cerca de 600 dC), e, aparentemente, conseguiram o que hoje chamamos de osseointegração, ou seja, uma integração com o osso. Da mesma forma, na França, foi encontrado um cadáver (200 dC) com um pino de ferro funcionando como implante dentário e também foi descrito como corretamente osseointegrado. Embora nesses procedimentos não haja ciência dos materiais e nem compreensão biológica envolvida, o seu sucesso (e longevidade) é impressionante. Nesses implantes a natureza de aceite do material pelo corpo humano, bem como da capacidade do ser humano em enfrentar e substituir a perda de uma função anatômico-fisiológica é destacada [2].

Contudo, segundo a literatura, a maioria dos implantes realizados antes de 1950, não tiveram sucesso devido à má compreensão dos fenômenos relacionados, por exemplo, à biocompatibilidade, estrutura química do implante, lixiviação, forma, mecânica e design.

Possivelmente, o primeiro estudo que avalia a reação biológica *in vivo*, em materiais de implante, foi realizado por Hslevert (1829). Ouro, prata, chumbo e amostras de platina foram estudados em cães. A platina, em particular, verificou-se ser bem tolerada.

O cirurgião Hansmann (1886) foi o primeiro a desenvolver e apresentar um processo para a fixação de fragmentos de osso por via subcutânea com um sistema de placas e parafusos. Ele utilizou tiras de metal revestidas de níquel que tinham furos para receber parafusos que também

eram revestidos de níquel [28]. Em 1924, A. Zierold publicou um estudo sobre a reação tecidual de vários materiais em cães. Ferro e aço foram corroídos rapidamente, levando à reabsorção do osso adjacente. Ouro, prata, chumbo e alumínio foram tolerados, mas inadequados mecanicamente. Stellite, uma liga de Co-Cr-Mo, foi bem tolerada e com propriedades mecânicas mais adequadas [2].

A história dos polímeros, como materiais de implantes, não é tão antiga como a dos metais simplesmente porque haviam poucos polímeros antes da década de 1940. Possivelmente, o primeiro caso de um implante polimérico tenha sido em 1941 quando o *nylon* foi utilizado para uma sutura. Artigos sobre o implante de celofane, um polímero feito a partir de fontes vegetais foram publicadas em 1939, afirmando que o mesmo poderia ser utilizado como um invólucro para os vasos sanguíneos [2].

Sem dúvida, o primeiro grande salto no desenvolvimento dos biomateriais ocorreu durante a primeira guerra mundial. Na tentativa de evitar a amputação de membros que haviam perdido suas funções, os cirurgiões buscavam materiais que não fossem nocivos e não sofressem rejeição como possíveis substitutos. Consequentemente, esses fatos, apesar de trágicos, contribuíram significativamente para o desenvolvimento tecnológico dos biomateriais [2].

Somente após a segunda guerra mundial é que houve precedentes para colaborações entre cirurgiões e cientistas. Os médicos e os odontologistas daquela época sentiram a necessidade de improvisar nas situações em que a vida ou a funcionalidade de seus pacientes estivesse em jogo. Além do mais, não havia normas regulatórias para a proteção do ser humano como as que conhecemos atualmente. Ao médico, fora implicitamente confiada a vida e a saúde dos pacientes. Assim sendo, muitos materiais foram julgados no calor do momento. Alguns, fortuitamente atingiram o objetivo. Estes ensaios foram de alto risco, mas geralmente de sucesso quando outras opções não estavam disponíveis [2].

Estes biomateriais *faire laissez*<sup>2</sup>, rapidamente evoluíram para uma nova ordem, caracterizada pela contribuição das ciências, engenharias, controle de qualidade pelo governo e da partilha de decisões antes de se tentar o alto risco de novos procedimentos. Ainda assim, uma base de idéias, materiais e tendências comuns nos dias atuais, foram construídas nessa época por indivíduos comprometidos, criativos e corajosos [2].

---

<sup>2</sup> *faire laissez*: Expressão símbolo do liberalismo econômico. A grosso modo significa ""deixai fazer, deixai ir, deixai passar". Essa expressão diz que deve-se deixar a pessoa/empresa/etc. agir com liberdade, sem interferência alguma

Em 1952, uma descoberta fortuita foi feita. O cirurgião ortopédico Per Ingvar Branemark da Universidade de Lund na Suécia implantou um dispositivo experimental em osso de coelho e observou o processo de cura. O dispositivo foi um cilindro de titânio que foi parafusado no osso. Depois de completar a experiência, que durou vários meses, ele tentou remover o dispositivo de titânio e o encontrou-o bem integrado no osso [29]. Branemark denominou fenômeno de "osseointegração", e explorou a aplicação de implantes de titânio para procedimentos cirúrgicos e odontológicos. Devido a essa descoberta, a maioria dos implantes dentários e muitos outros implantes ortopédicos agora são feitos de titânio e suas ligas [2,29].

Como dito anteriormente, os biomateriais desenvolvidos durante a guerra eram inicialmente destinados a outros fins (Reparo de aviões, automóveis, relógios e rádios) e eram “retirados da prateleira” para fabricar dispositivos médicos. Em contraste, a década de 1960 foi marcada pelo desenvolvimento de materiais, especificamente projetados, para aplicações biomédicas.

Um desses materiais foi a hidroxiapatita que é o principal mineral que ocorre naturalmente no osso, e por isso, tem uma aplicação na área médica. A hidroxiapatita é um material que pode ser obtida na forma de pó sem grandes dificuldades. Um dos primeiros trabalhos descrevendo aplicações biomédicas deste material foi feita por Levitt e colaboradores em 1969 que demonstraram que o prensado a quente de hidroxiapatita pode ter formas úteis para experimentação biológica [30].

O biovidro também foi designado como um biomaterial e é um dos primeiros materiais completamente sintéticos com propriedades altamente biocompatíveis. O biovidro foi desenvolvido pelo professor Larry Hench e colaboradores na Universidade da Florida [31]. Até 1967, o trabalho de Hench era focado em materiais vítreos e sua interação com a radiação nuclear [2].

Em agosto do mesmo ano ele foi motivado a modificar sua área de pesquisa por um coronel que tinha acabado de voltar do Vietnã. Esse coronel não estava particularmente interessado na resistência do vidro à radiação. Em vez disso, ele lançou um desafio para Hench: “Centenas de membros vem sendo amputados por causa de rejeições biológicas, pois o corpo humano não foi desenvolvido para aceitar materiais como os metais e materiais poliméricos que são utilizados para reparar o corpo. Se você pode fazer um material que vai resistir a raios gama, por que não fazer um material que o corpo não rejeita?”[2]

Hench voltou da conferência e começou um projeto financiado pelo Exército dos EUA no qual testava a adição de íons cálcio e fósforo em vidros silicato. Os vidros desenvolvidos por Hench foram implantados em fêmur de ratos e seis semanas depois, os pesquisadores resolveram retirar o vidro do osso para estudo e não conseguiram. A partir desses estudos, novas pesquisas realizadas por Hench e por outros pesquisadores desencadearam uma grande quantidade de trabalhos científicos, explorando a alta bioatividade dos biovidros [31].

A era moderna dos biomateriais foi desenvolvida principalmente com o intuito de controlar reações biológicas específicas. Ela é apoiada na rápida evolução da biologia moderna e em esforços multidisciplinares [2].

### **3.2. Biomateriais na atualidade**

Na década de 1960, quando foram efetivamente estabelecidos princípios e ideias fundamentais no campo de biomateriais, conceitos como o de receptores de superfície celular, fatores de crescimento, proteínas de ligação celular, células-tronco, e entrega gênica<sup>3</sup> eram controversos ou ainda não haviam sido descobertos. Assim, os pioneiros na área não poderiam ter concebido os biomateriais com essas ideias em mente [2].

No entanto, as novas ideias no campo de biologia foram rapidamente abraçadas por toda a comunidade de biomateriais. Da mesma forma, novas ideias também surgiram em ciência dos materiais tais como: separação de fases, anodização, modificação da superfície, análise de superfície. Essas ideias são amplamente utilizadas nas pesquisas atuais cujos esforços vêm sendo realizados principalmente nos seguintes temas: absorção de proteínas, materiais bioespecíficos, cura e a reação de corpo estranho, liberação controlada de medicamentos, engenharia de tecidos, medicina regenerativa e nanotectonologia.

O crescimento do campo de biomateriais é garantido, dentre outras coisas, pelo envelhecimento da população e pelo aumento da expectativa de vida nos países em desenvolvimento, bem como a capacidade crescente para tratar condições médicas antes intratáveis.

A ciência dos biomateriais, em sua forma atual, engloba ciências básicas como biologia, química e física, além de outras de conhecimento como: engenharia, medicina, direito. A transição

---

<sup>3</sup> Entrega gênica: processo de introdução de um DNA estranho em células hospedeiras.

da ciência básica de biomateriais para dispositivos médicos é dependente de: (1) um bom projeto de engenharia, (2) testes *in vitro* em animais e em humanos (3) regulamentação e (4) o envolvimento da indústria, permitindo o desenvolvimento e comercialização do produto [2]. A Figura 1 ilustra essas etapas.

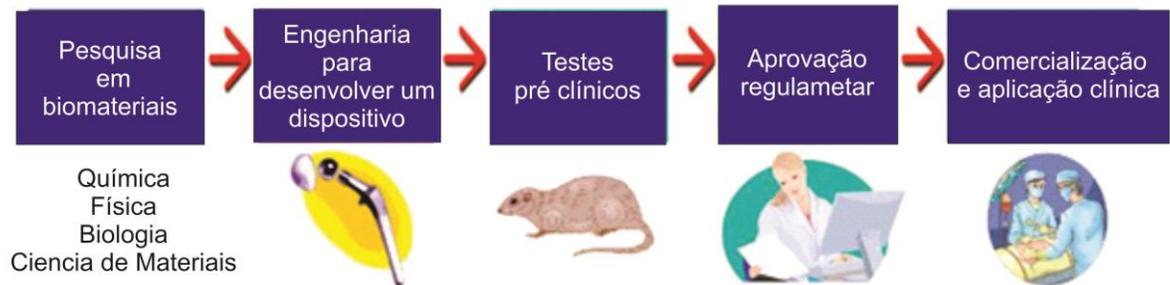


Figura 1. Os passos da ciência básica de biomateriais até os dispositivos médicos para aplicação clínica.

Na Tabela 1 estão listadas algumas aplicações de biomateriais utilizados atualmente e a estimativa do número de dispositivos médicos contendo biomateriais que são implantados a cada ano. O impacto humano e o tamanho do mercado comercial mundial para biomateriais e dispositivos médicos é impressionante.

Tabela 1. Principais materiais sintéticos e materiais naturais modificados utilizados em medicina [2].

<b>Aplicação</b>	<b>Biomateriais utilizados</b>	<b>Número por ano no mundo ou mercado mundial em US\$</b>
<b>Sistema ósseo</b>		
Substituição da articulação (quadril, joelho, ombro)	Titânio, aço inox, polietileno	2.500.000
Placas e parafusos de fixação óssea	Metais, ácido poliláctico (PLA)	1.500.000
Equipamentos para fusão espinhal		800.000
Cimento ósseo	Polimetilmetacrilato	(\$ 600M)
Reparo de defeitos ósseos	Fosfatos de cálcio	-
Tendões ou ligamentos artificiais	Fibras de poliéster	-
Implantes dentais	Titânio	( \$ 4B)
<b>Sistema cardiovascular</b>		
Próteses de vasos sanguíneos	Dacron, Teflon expandido	200.000
Válvulas cardíacas	Dacron, carbon, metais, tecido natural tratado	400.000
Marca-passo	Titânio, poliuretano	600.000
Desfibrilador implantável	Titânio, poliuretano	300.000
Stent	Aço inox, outros metais, PLA	1.500.000
Cateter	Teflon, silicone, poliuretano	1B (\$ 20B)
<b>Órgãos</b>		
Coração artificial auxiliar (CAA)	Poliuretano, titânio, aço inox	4000
Hemodiálise	Polysulfone	1.800.000 (\$70B)
Oxigenador sanguíneo	Silicone	1.000.000
Substitutos de pele	Colágeno, pele de cadáver, nylon, silicone	(\$ 1 B )
<b>Oftalmologia</b>		
Lentes de contato	Acrilato/metacrilato/ polímeros de silicone	150.000.000
Lentes intraoculares	Acrilato/metacrilato/ polímeros	7.000.000
Curativos com lentes de contato para córneas	Hydrogel	-
Implantes de drenagem de glaucoma	Silicone, polipropileno	(\$200M)
<b>Outros</b>		
Prótese coclear	Platina, platina-irídio, silicone	250.000 (usuários totais)
Implantes de seios	Silicone	700.000
Tela para hérnia	Silicone, polipropileno, Teflon	200.000 (\$4B)
Suturas	PLA, polidioxanona, polipropileno, aço inox	(\$ 2B)
Bolsas de sangue	Cloreto de polivinil	-
Tubos de ouvido (timpanostomia)	Silicone, Teflon	1.500.000
Dispositivo Intra-Uterino (DIU)	Silicone, cobre	1.000.000

### 3.3. A definição de biomateriais

Os conceitos de biomateriais já foram introduzidos sem uma definição, no entanto, para que os próximos capítulos sejam compreendidos, com mais facilidade, faz-se necessária a definição de biomaterial aprovada por um consenso de especialistas da área [32]:

“Um biomaterial é um material “não vivo” utilizado num dispositivo, com a intenção de interagir com sistemas biológicos.”

Embora biomateriais sejam mais frequentemente aplicados para satisfazer uma necessidade médica de diagnóstico ou terapêutica, se a palavra "médica" é removida, esta definição torna-se mais ampla e pode abranger uma vasta gama de aplicações. Se a palavra “não vivo” é removida, a definição se torna ainda mais geral e pode abordar muitas novas aplicações em engenharia de tecidos e órgãos artificiais híbridos, onde são utilizadas células vivas.

“A ciência de biomateriais” é o estudo (de perspectiva física ou biológica) de materiais com especial referência à sua interação com o ambiente biológico. Tradicionalmente, a ênfase no campo de biomateriais está na síntese, caracterização e nas interações biológicas hospedeiro-material. Ainda, muitos biomateriais induzem uma reação biológica não específica e isso nos leva a considerar uma definição amplamente utilizada: a de biocompatibilidade [32].

“Biocompatibilidade é a capacidade de um material realizar uma resposta apropriada no receptor, numa aplicação específica.”

Exemplos de “apropriada no receptor” incluem: resistência à coagulação sanguínea, resistência à colonização de bactérias e a cura sem complicações.

Exemplos de "aplicações específicas" incluem uma membrana de hemodiálise, um cateter urinário ou uma prótese de substituição da articulação do quadril, dentre outros dispositivos. Note-se que a membrana de hemodiálise pode estar em contato com o sangue do paciente durante cinco horas, o cateter pode ser inserido por uma semana e a articulação da anca pode ser posto em prática para a vida do paciente. Este conceito geral de biocompatibilidade foi estendido para a engenharia de tecidos, em que, os processos *in vitro* e *in vivo* são aproveitados, mediante a seleção cuidadosa de células, materiais e condições biomecânicas metabólicas e regenerar tecidos funcionais [2].

### 3.4. A evolução do campo de biomateriais

A pesquisa e desenvolvimento de biomateriais vêm sendo estimulada por avanços em biologia celular e molecular, química, ciência de materiais e engenharias. A comunidade biomateriais tem sido a principal contribuinte para a compreensão das interações dos materiais com o ambiente fisiológico. O desenvolvimento de biomateriais para aplicações na área da saúde tem evoluído através de três gerações, cada uma com um objetivo diferente conforme ilustrado na Figura 2 [2].

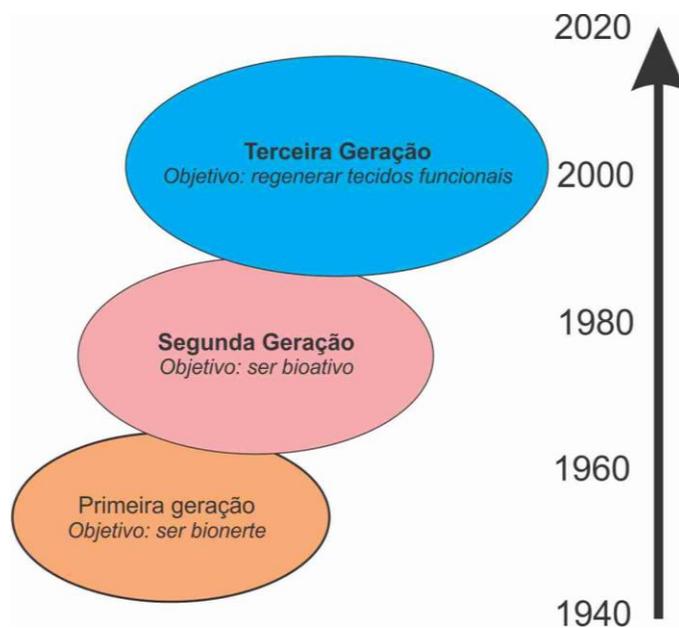


Figura 2. Evolução da ciência e tecnologia em biomateriais.

O objetivo dos primeiros biomateriais (primeira geração) foi alcançar uma combinação adequada entre suas propriedades funcionais com as do tecido substituído sem uma resposta prejudicial por parte do hospedeiro. Assim, como os materiais desenvolvidos durante a guerra, os biomateriais de primeira geração (a partir de 1950 e 1960) foram em grande parte compostos de materiais industriais conhecidos como *off-the-shelf* (fora da prateleira). Isto é, materiais amplamente disponíveis, que não foram desenvolvidos especificamente para uso médico. Eles foram selecionados por causa da combinação desejável de propriedades físicas específicas, para o uso clínico pretendido, e porque, eram bioinertes, ou seja, eles provocavam uma resposta mínima a partir dos tecidos do hospedeiro, portanto, eles foram considerados biocompatíveis.

O carbono pirolítico, originalmente desenvolvido na década de 1960 como um material de revestimento para partículas de combustível nuclear, é agora amplamente utilizado em composições modificadas para componentes de revestimento de válvulas cardíacas mecânicas [2].

A segunda geração de biomateriais evoluiu dos primeiros biomateriais, e destina-se a provocar uma reação controlada com os tecidos nos quais foram implantados, a fim de induzir um efeito terapêutico desejado. Na década de 1980, esses materiais bioativos foram utilizados clinicamente em cirurgias dentais e ortopédicas. Dentre os principais exemplos dessa geração estão os biovidros e as biocerâmicas utilizados em ortopedia, válvulas cardíacas, dispositivos de assistência ventricular e stents (utilizados em procedimentos de cateterismos). A segunda geração de biomateriais ainda incluía o desenvolvimento de biomateriais reabsorvíveis, com taxas de degradação adaptadas aos requisitos de uma aplicação pretendida. Assim, a interface discreta, entre o local do implante e o tecido hospedeiro pode ser eliminada em longo prazo, porque o material estranho seria, em última análise, degradado como é o caso das suturas composta por ácido poliglicólico-PLA, usada desde os anos 60. Muitos grupos continuam pesquisando polímeros biodegradáveis que precisam de propriedades tais como, resistência, flexibilidade, uma composição química condutora para o desenvolvimento do tecido, e uma taxa de degradação de acordo com a aplicação específica. Materiais poliméricos com outras propriedades novas como memória de forma e superfícies programáveis e interativas, que controlam o microambiente, celular ainda estão em investigação [2].

A terceira geração de biomateriais, a extensão lógica do estado da arte, vem progredindo rapidamente e tem o objetivo de apoiar e estimular a regeneração do tecido funcional. Ao longo de toda a história humana, a habilidade médica para realmente regenerar tecidos e órgãos perdidos, devido a uma doença ou trauma, era essencialmente inexistente; o papel do médico, no passado, estava aliado a medidas paliativas (aliviar os sintomas sem curar). Atualmente, com os avanços nas ciências, engenharia de tecidos e da medicina regenerativa, parece que a verdadeira substituição por tecido vivo será possível. Biomateriais irão desempenhar um papel-chave no desenvolvimento da engenharia de tecidos e na terapêutica regenerativa [2].

A engenharia de tecidos é um termo amplo que descreve um conjunto de ferramentas na interface das ciências biomédicas e engenharia, que utilizam células vivas (ou atrair células endógenas) para auxiliar a formação ou regeneração de um tecido [33]. No paradigma mais frequentemente utilizado, as células são semeadas num *scaffold* composto de polímero sintético ou

material natural, um tecido é maturado *in vitro*, e a construção é implantada na localização anatômica apropriada, como uma prótese. Um *scaffold* típico pode ser um material em uma configuração porosa, com a geometria desejada para a engenharia de tecidos, frequentemente modificada para aderir às células.

Dessa maneira, a engenharia de tecidos levou à substituição de bexiga, traqueia, pele, epitélio da córnea e cartilagem danificados. As direções futuras em biomateriais, engenharia de tecidos e terapias regenerativas, são realmente motivadoras e estão em discussão ativa [34].

### **3.5. Alguns dispositivos utilizados atualmente**

#### **3.5.1. Próteses Total de substituição quadril**

A articulação de quadril humano é submetida a níveis elevados de tensão mecânica, e recebe abuso considerável no decurso da atividade normal e extraordinária. Não é de se surpreender que, depois de 50 anos ou mais de tensão mecânica cíclica ou por causa de doença degenerativa ou ainda como a artrite, a articulação natural desgasta, levando à perda de mobilidade e, por vezes, confinamento a uma cadeira de rodas.

Próteses de articulação de quadril [Figura 3(a)], são fabricadas a partir de uma variedade de materiais, incluindo o titânio, aço inoxidável, ligas especiais de alta resistência, cerâmicas, compósitos, e polietileno de massa molecular ultra elevada. No Brasil são implantadas cerca de 150 mil próteses de quadril ao ano. Em 2004, foram gastos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), cerca de R\$ 103 milhões com implantes ortopédicos [35]. Na maioria dos casos, uma boa função é restaurada. Mesmo no caso de atividades esportivas, as substituições são possíveis, embora, para atividades que venham a ser sujeitas a uma alta tensão mecânica, geralmente não são aconselháveis.

Após 10-15 anos, muitos desses implantes falham, soltando, o que geralmente exige outra cirurgia (um processo de revisão). Implantes de metal sobre metal também experimentam problemas de corrosão e respostas adversas induzidas pelos íons metálicos liberados [2].

### 3.5.2. Implantes Dentais

Outro dispositivo biomédico comum nos dias de hoje são os implantes dentais como os mostrados na Figura 3(b). Estes dispositivos ao serem implantados formam uma âncora artificial, sobre a qual uma coroa dental é ajustada, Tais dispositivos são implantados em 2.000.000 pessoas a cada ano somente nos EUA [2], de acordo com a Associação Dental Americana. Um requisito especial de um material desta aplicação é a capacidade de formar uma boa vedação contra a invasão bacteriana onde o implante ultrapassa a gengiva.

Dentre os materiais utilizados como implante, o titânio é o mais utilizado. Uma das suas vantagens está relacionada a osseointegração, com o osso da mandíbula. No entanto, essa ligação vem sendo descrita como uma aposição apertada ou um ajuste mecânico e não, de fato, a uma ligação verdadeira [2].

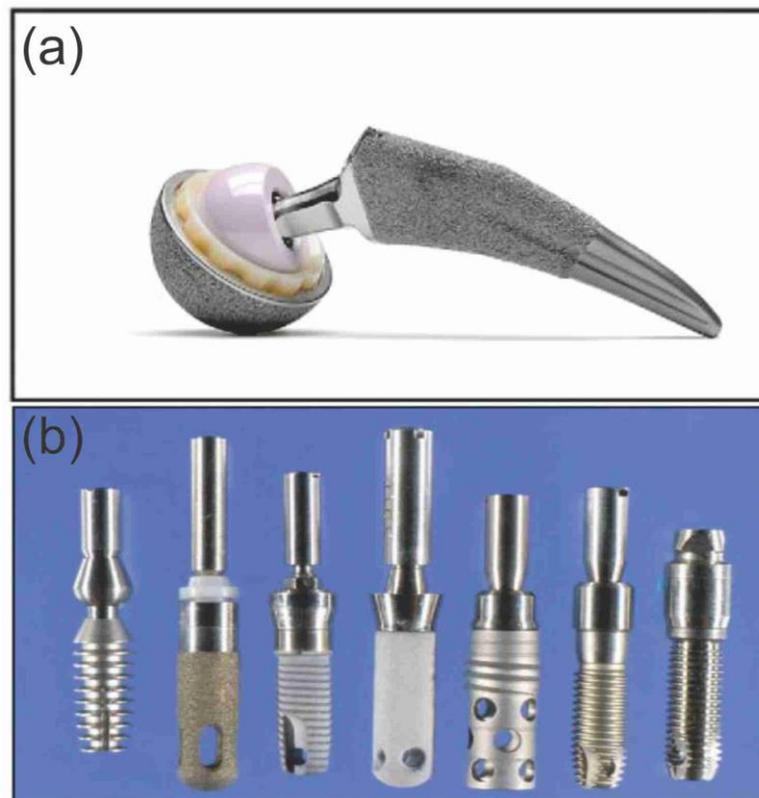


Figura 3. Exemplos de dispositivos biomédicos utilizados na atualidade. (a) Prótese de quadril. (b) Implantes dentais.

### 3.6. Biocerâmicas de fosfato de cálcio

Os fosfatos de cálcio têm merecido um lugar de destaque entre as biomateriais. Sua vasta 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 [19].

Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita (*HA*), 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 [2,19]

Outro fosfato de cálcio de grande importância como substituto ósseo é o  $\beta$ -fosfato tricálcico( $\beta$ -*TCP*) cuja fórmula estrutural é  $Ca_3(PO_4)_2$ . O  $\beta$ -*TCP* pertence à classe dos materiais biologicamente reabsorvíveis e pode ocorrer em duas diferentes estruturas cristalinas: monoclinica ( $\alpha$ -*TCP*) ou romboédrica ( $\beta$ -*TCP*). O  $\beta$ -*TCP* possui um papel importante no processo de biomineralização óssea por ser o precursor direto da apatita óssea [36]. Estruturalmente, a *HA* é mais parecida com o osso natural do que o  $\beta$ -*TCP*, no entanto, a propriedade de reabsorção da *HA* é bem menor do que a do  $\beta$ -*TCP*. A velocidade de dissolução do  $\beta$ -*TCP* é de 3 a 12 vezes maior que a da *HA* estequiométrica.

Isso quer dizer que enquanto a hidroxiapatita implantada permanece no organismo por anos, a fase  $\beta$ -*TCP* é reabsorvida em semanas [37]. A combinação das propriedades destes dois materiais resulta em uma cerâmica bifásica de fosfato de cálcio (*HA*- $\beta$ -*TCP*) reabsorvível e capaz de desenvolver uma fixação bioativa na interface tecido-implante [15,22].

L. Yubao e colaboradores demonstram que as cerâmicas bifásicas são biologicamente mais ativas que a *HA* pura [38]. Eles também afirmam que como a hidroxiapatita presente nos ossos é pouco cristalina, não estequiométrica e contém água incorporada na sua rede cristalina, a cerâmica bifásica 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 *HA* na formação de novo tecido ósseo [38]. Além disso, em comparação com a *HA* ou  $\beta$ -*TCP* isolados, um composto combinando esses dois materiais, leva a formação de osso mais rapidamente [39].

### 3.6.1. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita sintética é um dos materiais bioativos mais utilizados como enxerto ósseo, 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 [21].

Quando obedecida a estequiometria, a hidroxiapatita apresenta uma razão molar Ca/P de 1,67. Este valor foi obtido por meio das técnicas de difração de raios-X e difração de nêutrons. No caso das hidroxiapatitas deficientes em cálcio o valor da razão Ca/P pode variar em 10% [37].

A hidroxiapatita possui estrutura cristalina hexagonal com grupo espacial  $P63/m$  (176) caracterizado por uma simetria perpendicular aos três eixos “ $a$ ” equivalentes ( $a_1$ ,  $a_2$  e  $a_3$ ), formando um ângulo de  $120^\circ$  entre si. Os parâmetros de rede da cela unitária, para a hidroxiapatita estequiométrica correspondem a:  $a = b = 0,9432$  nm 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 (

Figura 4). Dessa maneira, a hidroxiapatita consiste de um esqueleto de tetraedros do grupo ( $PO_4^{3-}$ ) com dois átomos de oxigênio no plano basal e outros dois alinhados com o eixo cristalográfico “ $c$ ”. Na Figura 4 a célula unitária da hidroxiapatita é ilustrada. As esferas amarelas, azuis, fúcsias e vermelhas representam os átomos de cálcio, fósforo, oxigênio e hidrogênio, respectivamente.

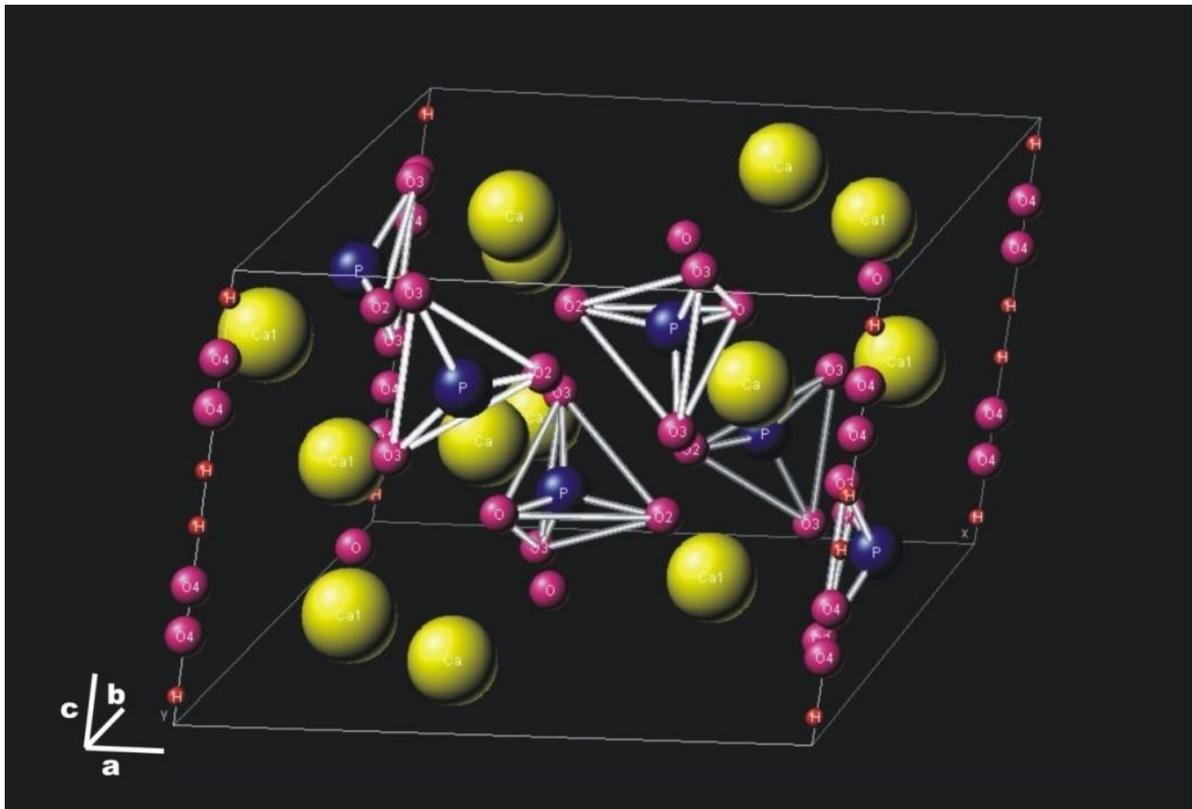


Figura 4: Representação esquemática da estrutura cristalina (cela unitária) da hidroxiapatita.

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) [37,36]. O íon carbonato é capaz de causar uma tensão na rede cristalina da *HA* 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 [21].

Os cátions  $K^+$  e  $Na^+$  são capazes de substituir o íons  $Ca^{2+}$  sem alterar os parâmetros de rede da *HA*, 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” [37,40].

Vários métodos são utilizados para sintetizar hidroxiapatita. Uma das primeiras técnicas para produzir *HA* foi a exposição hidrotérmica da fluorapatita ( $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$ ) a altas temperaturas e pressões (Levitt e colaboradores) [30]. Os métodos mais utilizados são por via úmida e via seca, mecano-síntese, hidrotermal, sono químico, sol-gel, entre outros [41].

Um método que se destaca por sua facilidade é a calcinação de ossos “*in natura*”. O método desenvolvido por Lima e Weinand [42], possibilita obter hidroxiapatita natural e de boa qualidade a partir de osso de peixe. Assim, é possível produzir um material natural cuja matéria prima se encontra disponível em qualquer região do país. Outra vantagem desse procedimento é seu baixo custo não só pelo fato de utilizar ossos de peixe (que não têm valor comercial expressivo), como também porque as temperaturas de calcinação empregadas são relativamente baixas (em torno de 900 °C) [20,42].

### 3.6.2. $\beta$ – fosfato tricálcico - $Ca_3(PO_4)_2$

O  $\beta$  – fosfato tricálcico é um material que pode ser facilmente reabsorvido pelo corpo animal. Além disso, por ser bioativo, atóxico, osteocondutor e biodegradável, não há a necessidade de uma segunda operação cirúrgica para remover o dispositivo implantado, após a cura se processar [43].

A cerâmica  $Ca_3(PO_4)_2$  possui razão  $Ca/P$  de 1,5 e pertence ao grupo espacial  $R3c$  de simetria hexagonal com cela unitária  $a = b = 1,0439$  nm e  $c = 3,7375$  nm. Para cada cela unitária hexagonal, há 21 formulas unitárias e 42 tetraedros ( $PO_4^{3-}$ ). A cela unitária da fase  $\beta$ -TCP está representada na Figura 5. As esferas em verde, laranja e vermelho representam os átomos de cálcio, fósforo e oxigênio, respectivamente.

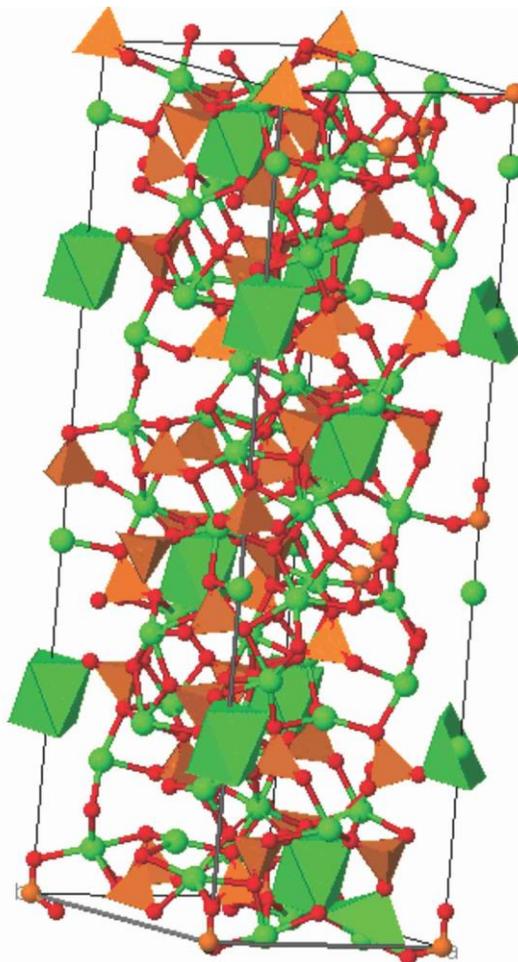


Figura 5: Representação esquemática da estrutura cristalina da fase  $\beta$ -TCP, adaptada da referência 44.

O  $\beta$ -TCP permite a substituição de 15% dos átomos de  $Ca^{2+}$  por  $Mg^{2+}$  sem alterar essencialmente sua estrutura. Quando o magnésio  $Mg^{2+}$  está presente na estrutura, o material apresenta menor solubilidade [36]. Se o  $Mg^{2+}$  ocupar a posição Ca (5), a estabilidade da rede aumenta, pois a substituição é de um cátion maior (raio iônico = 0,99Å) por um menor (raio iônico = 0,65 Å), no caso o  $Mg^{2+}$  [21].

### 3.7. 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 [45], 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 [25]. 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 de  $Nb_2O_5$  com fosfatos de cálcio, 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 ocorrência de reações de estado sólido, estimulando as transições de fase na formação dos compósitos [25].

O pentóxido de nióbio, em sua estrutura monoclinica, pode pertencer ao grupo espacial  $P2$  e é caracterizada por uma cela unitária com dois ângulos retos e um variável ( $\sim 115,7^\circ$ ) e parâmetros de rede próximos  $a: a = 2,038 \text{ nm}$ ,  $b = 0,3824 \text{ nm}$  e  $c = 1,936 \text{ nm}$ . Uma cela unitária do  $Nb_2O_5$  está ilustrada na Figura 6. As esferas vermelhas representam os átomos de  $O$  (oxigênio) e as brancas os átomos de  $Nb$  (nióbio).

A estrutura cristalina do pentóxido de nióbio é formada basicamente por octaedros  $NbO_6$  cujas ligações metal-oxigênio são maiores do que as forças de ligação do cristal. As vibrações internas do octaedro  $NbO_6$  devem, portanto, ser muito próximas às dos íons livres. Na fase monoclinica de grupo  $P2$ , o octaedro  $NbO_6$  é distorcido, pois os átomos não obedecem a regra de valência de Pauling. Além disso, além de octaedros, essa estrutura apresenta tetraedros discretos  $NbO_4$ , cuja concentração é muito menor do que a dos octaedros.

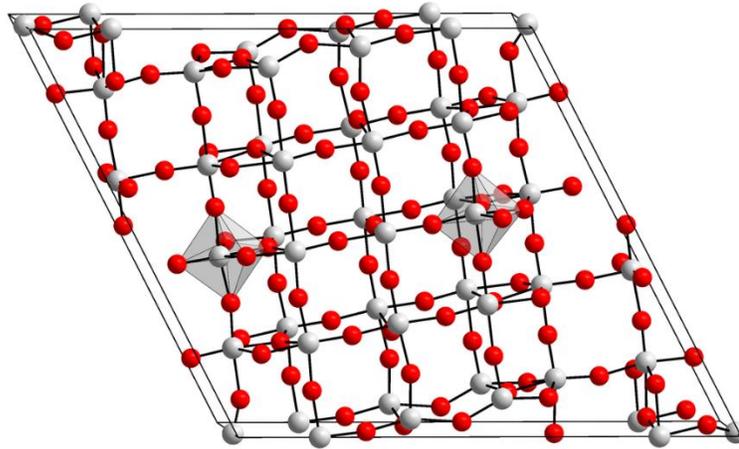


Figura 6: Representação esquemática da estrutura cristalina (cela unitária) do pentóxido de nióbio  $Nb_2O_5$ , adaptada da referência 44.

### 3.8. Materiais Compósitos

O termo compósito é empregado para designar a combinação de dois ou mais materiais na escala macroscópica ou microscópica, mas não em nível atômico. Essa combinação tem por objetivo combinar diferentes materiais produzindo um único material com propriedades superiores às dos seus componentes separados [46].

Uma destas fases normalmente é descontínua, rígida, mais resistente e é chamada de reforço, enquanto que a fase mais fraca é contínua e é chamada de matriz. Algumas vezes, devido às interações químicas e/ou outros efeitos de processo, uma fase adicional chamada interfase ocorre entre o reforço e a matriz. As propriedades de um material compósito dependem das propriedades dos constituintes como a geometria e distribuição de fases.

Um dos parâmetros importantes na preparação de um compósito é a fração volumétrica do reforço. A distribuição do reforço determina a homogeneidade ou uniformidade do sistema material. Quanto menos uniforme for à distribuição do reforço mais heterogêneo é o material resultante e maior é a probabilidade de falha nas áreas mais fracas [20,47].

Além disso, a fração de volume deve causar grandes impactos nas propriedades físicas do compósito quando há sinterização de fase líquida envolvida no processamento dos mesmos. Para certas composições eutéticas, a fase líquida cobre as partículas causando uma rápida densificação em temperaturas mais baixas que as necessárias para a sinterização no estado sólido. Esse efeito ocorre, por exemplo, nos sistemas cerâmicos  $ZnO.Bi_2O_3$  cuja formação de um líquido eutético rico em bismuto, controla a densificação e crescimento de grão no sistema [48].

### 3.9. Scaffolds

A palavra *scaffold*, originalmente inglesa, tem diversos significados tais como: suportes, andaimes, matrizes tridimensionais, arcabouços e estruturas. Neste trabalho, a palavra *scaffold* terá o significado de suporte poroso tridimensional.

Em biomateriais, *scaffolds* são aqueles materiais que possuem arcabouço tridimensional e poroso, com propriedades bioativas e biodegradáveis e que servem de molde para a formação do novo tecido.

Esses materiais devem possuir uma estrutura tal que mimetize os meios físicos e químicos do tecido saudável para guiar a migração, diferenciação e proliferação tecidual.

Quando utilizados para regeneração do tecido ósseo, os *scaffolds* geralmente possuem propriedades osteocondutivas, e raramente propriedades osteoindutivas ou osteogênicas [49,50]. Os *scaffolds* podem ser classificados em dois tipos: arcabouços que induzem a migração e o crescimento celular, provenientes de tecidos vizinhos para a formação de tecido ósseo; arcabouços carreadores de células osteogênicas autógenas, que foram colonizadas em biorreatores e subsequentemente reimplantadas no paciente [50].

Nos materiais cerâmicos, quanto maior o tamanho do poro, menor o tempo necessário para que ocorra o crescimento de vasos [51]. O tamanho ideal de poro deve variar entre 70 a 100 $\mu\text{m}$ , que permite a ocorrência de migração e transporte celular [52], até 300 $\mu\text{m}$ , tamanho que permite o desenvolvimento de um sistema de capilares, essencial para a neoformação óssea [53].

Além de poros de tamanho adequado, os scaffolds devem possuir uma boa conexão entre eles, para permitir adequada nutrição celular e crescimento tecidual. A porosidade, desta forma, irá permitir a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, além da deposição de matriz óssea nos espaços vazios [50].

Galois e Mainard (2004), relataram que, após quatro meses de observação, houve um crescimento ósseo de cerca de 76% em implantes cilíndricos de hidroxiapatita, com poros de 45 a 80 $\mu\text{m}$ , implantados em fêmur de coelhos, e este mesmo percentual de crescimento foi observado aos dois meses em poros de 200 a 250  $\mu\text{m}$ . Por outro lado, nos implantes compostos por  $\beta$ -TCP, com poros de 45 a 80  $\mu\text{m}$ , a colonização foi mais rápida e em uma maior proporção (cerca de 80%) em comparação com a HA. Estes estudos mostram que não somente o tamanho do poro influencia

diretamente o crescimento vascular e ósseo, mas também, que o tipo de material empregado influenciará no percentual de crescimento [52].

### **3.10. O Tecido Ósseo**

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo dinâmico que fornece suporte estrutural para os músculos esqueléticos transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Também atua exercendo proteção física de órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal medular, aloja e protege a medula óssea, formadora das células sanguíneas. Concomitantemente, os ossos também atuam como principal depósito de cálcio e fosfato [54].

Apesar do seu aspecto aparentemente inerte, os ossos são estruturas altamente dinâmicas, crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante toda a vida do organismo [55].

A matriz óssea consiste em um componente orgânico (sintetizado pelos osteoblastos), acrescido de uma parte inorgânica contendo depósitos de sais de cálcio inorgânico.

A parte inorgânica do osso consiste basicamente de sais cristalinos compostos principalmente por cálcio e fósforo, tendo como elemento predominante a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Todavia, na parte mineral podem conter também pequenas quantidades de íons como:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , dentre outros [56].

Colágeno do tipo I e uma matriz extra-fibrilar (proteoglicanos ou proteínas não colágenas) constituem o componente orgânico da matriz. As fibras de colágeno correspondem a aproximadamente 90% do total de proteínas do osso e estão orientadas de forma a conferir a estrutura lamelar do tecido ósseo. Os 10% restantes da fase orgânica da matriz é composto principalmente por, proteoglicanos, proteínas de adesão celular e proteínas relacionadas a fatores de crescimento [54].

#### **3.10.1 Células do osso**

O tecido ósseo é formado e sofre remodelação ao longo da vida, por meio da ação de duas linhagens de células; as células formadoras de tecido ósseo e as células de reabsorção óssea, que juntas com seus precursores e células associadas (células endoteliais, células nervosas) encontram-

se organizadas em unidades especiais, as unidades básicas multicelulares (BMUs – *basic multicellular unit*) [57].

As células formadoras ósseas são compostas basicamente de osteoblastos, osteócitos e células de revestimento (*lining cells*), e as células de reabsorção óssea são chamadas de osteoclastos.

As células responsáveis por depositar a matriz óssea são os osteoblastos. Eles são capazes de sintetizar osteóide, a fase orgânica da matriz óssea, constituída por colágeno tipo I, proteínas não colagênicas, proteoglicanos [58,60].

Além da produção dos componentes da matriz, estas células também funcionam como transmissores de sinais para a remodelação. Terminado o período de secreção ativa, os osteoblastos achatam-se e transformam-se em células de revestimento ósseo (*lining cells*) ou em osteócitos, podendo desaparecer do local de formação óssea, provavelmente por apoptose [60].

Os osteócitos são a forma madura do osteoblasto e encontram-se aprisionadas no interior da matriz óssea mineralizada, ocupando lacunas das quais partem canalículos. Cada lacuna contém apenas um osteócito. Dentro dos canalículos os prolongamentos destas células, estabelecem contatos através de junções comunicantes, por onde podem passar pequenas moléculas e íons, de um osteócito para o outro [54]. Esse arranjo permite aos osteócitos, participarem na regulação da homeostasia do cálcio sanguíneo, perceber a carga mecânica e transmitir essa informação às outras células dentro do osso [54].

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas [55], e extensamente ramificadas, que se originam da fusão de células da linhagem monócito-fagocítica dos tecidos hematopoiéticos e fazem parte das unidades básicas multicelulares (BMUs) [59]. Estas células são altamente especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea.

A reabsorção propriamente dita é um processo altamente organizado e sequencial constituído por duas fases consecutivas. A primeira fase consiste em um processo de acidificação da lacuna (através da produção de  $H^+$  e  $Cl^-$ ), provocando a dissolução dos cristais de hidroxiapatita, constituintes da fase mineral da matriz óssea. Na segunda fase, ocorre a degradação completa da fase orgânica por ação de numerosas enzimas proteolíticas (catepsinas e metaloproteinases da matriz) [55].

O osso reabsorvido começa a ser substituído por uma equipe de novos osteoblastos, este processo demora cerca de 3 meses [60].

### **3.11. Células Tronco Mesenquimais**

As células-tronco mesenquimais, são uma população heterogênea de células progenitoras, capazes de se transformarem em outras células, de diversos tecidos do corpo, como: osso, nervos, músculos e sangue. Esse processo de transformação é chamado diferenciação celular.

Quando as células troncas se transformam em osteócitos, por exemplo, elas passam por diversos estágios sucessivos de desenvolvimento, tais como: 1) célula-tronco mesenquimal; 2) células osteoprogenitoras; 3) pré-osteoblastos; 4) osteoblastos; e 5) osteócitos [61]. Durante a diferenciação, as células adquirem morfologia semelhante à dos osteoblastos e produzem fosfatase alcalina, que é um marcador precoce da diferenciação osteogênica, colágeno tipo I e matriz extracelular rica em cálcio [62]. Essas células também expressam osteocalcina, osteopontina, osteonectina, dentre outras proteínas, não colagênicas importantes para a mineralização da matriz óssea [60,62].

### **3.12. Osteoindução, Osteogênese, Osteocondução e Osteointegração**

O potencial regenerativo dos enxertos ósseos é governado por três mecanismos fundamentais: (a) Fornecer uma matriz osteocondutora, que permite a invasão celular e vascularização; (b) Fornecer fatores osteoindutivos, que recrutam e induzem as células mesenquimais a se diferenciarem em células formadoras de osso maduro e ou; (c) Fornecer células osteogênicas, contidas no interior do enxerto ósseo, capazes de produzir nova matriz óssea [58].

Osteoindução ocorre quando células mesenquimais indiferenciadas devidamente estimuladas por agentes indutores transformam-se em pré-osteoblastos, em seguida, em osteoblastos, iniciando o processo de osteogênese, e a formação de um novo tecido ósseo [58].

Osteogênese consiste na formação e desenvolvimento do osso (Lindhe *et al.*, 2005), é o processo associado com a função celular, no qual células em diferentes estágios de diferenciação são recrutadas, ativadas, proliferam e se diferenciam, a fim de produzir novo tecido ósseo. Neste mecanismo, os biomateriais são capazes de promover a formação óssea por carregarem consigo células ósseas [63].

Osteocondução consiste no processo pelo qual, um tecido vizinho, disponibiliza células osteogênicas, para que exerçam seu papel biológico [63].

Na osteocondução o biomaterial funciona como uma matriz física ou arcabouço para deposição de novo osso oriundo das imediações. É caracterizada por um processo de crescimento e invasão de vasos sanguíneos, de tecidos perivasculares e de células osteoprogenitoras do sítio receptor para o enxerto. O biomaterial é gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído por novo tecido ósseo [64].

Osseointegração é um processo que apresenta uma fixação rígida e clinicamente assintomática de materiais aloplásticos, realizada e sustentada no tecido ósseo durante as cargas funcionais. Pode ser dividida em três etapas, a primeira sendo caracterizada pela migração celular osteogênica, suportada pelo tecido de conexão. A segunda fase consiste na deposição de tecido ósseo por meio da mineralização da matriz, e a terceira, consiste na remodelação óssea ao redor do material.

O processo de osseointegração depende previamente de osteoindução e osteocondução, que são fenômenos inter-relacionados, mas não idênticos [65].

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Sabe-se que o tecido ósseo não é homogêneo em todas as partes do corpo de um animal. Assim, a substituição de um tecido ósseo natural por um sintético depende, dentre outros fatores, do local onde ele será implantado, pois diferentes propriedades físicas e mecânicas são requeridas. Por exemplo, em implantes de cabeça de fêmur é necessário um material extremamente denso para que haja sustentação e suporte de altas cargas. Em outros casos quando se necessita de um enxerto ósseo, como é o caso de muitos procedimentos odontológicos, é necessário que um arcabouço poroso seja empregado para que ocorra crescimento de tecidos vivos dentro do implante.

Nesse trabalho foram desenvolvidos materiais para servir como alternativa de substitutos ósseos para dois tipos distintos de aplicação. Uma delas, como um suporte denso biocompatível (*bulk*) e a outra como arcabouço macroporoso tridimensional (*scaffold*). Sendo assim, os procedimentos experimentais empregados durante esse trabalho foram divididos em quatro etapas.

##### **Etapa I – Seleção e caracterização da matéria prima**

Primeiramente, foi realizada a seleção e caracterização da matéria prima a ser utilizada. A cerâmica bifásica ( $HA\beta$ ), composta de hidroxiapatita ( $HA$ ) e  $\beta$ -fosfato tricalcico ( $\beta$ -TCP), foi produzida a partir da calcinação de ossos de peixe (*Pseudoplatystoma corruscans*). Além disso, nesta etapa do trabalho, o pentóxido de nióbio ( $Nb_2O_5$ ) cedido pela CBMM passou por um tratamento térmico para a obtenção de um precursor monofásico. Os precursores foram caracterizados por diferentes técnicas, como pode ser especificado no fluxograma da Figura 7

##### **Etapa II – Escolha da composição, preparação do *bulk* e testes *in vivo***

Em trabalhos anteriores, compósitos nano-estruturados do sistema  $(100-x)Nb_2O_5-(x)HA\beta$ , sinterizados a 1000 °C, foram testados quanto a suas propriedades físico-mecânicas [24] e de bioatividade *in vitro* em fluido corpóreo simulado (SBF) [27]. No presente trabalho, análises térmicas e de propriedades físicas e mecânicas foram empregadas para que uma das composições do sistema<sup>4</sup>  $(100-x)Nb_2O_5-(x)HA\beta$  fosse selecionada para a realização de testes *in vivo*.

---

<sup>4</sup> A quantidade “x” na equação  $(100-x)Nb_2O_5-(x)HA\beta$  representa a proporção em volume de  $HA\beta$ . Assim, as composições do sistema, foram definidas variando-se a proporção (em volume) entre seus dois componentes ( $Nb_2O_5$  e  $HA\beta$ ).

Nesta etapa os testes *in vivo* foram realizados em calvárias de ratos Wistar e esses procedimentos serão explicados nas sessões seguintes.

### **Etapa III – Otimização da temperatura de sinterização**

Um dos grandes desafios desse trabalho foi a inserção de macroporos nas matrizes cerâmicas do sistema  $Nb_2O_5-HA\beta$  e da cerâmica bifásica  $HA\beta$  de modo que estas se mantivessem mecanicamente estáveis. Para que esse desafio fosse vencido, uma otimização da temperatura de sinterização do compósito  $Nb_2O_5-HA\beta$  foi pretendida. Desse modo, nessa terceira fase do trabalho foram realizadas análises térmicas, estruturais, morfológicas, físicas e mecânicas, para que uma temperatura adequada de sinterização fosse escolhida. As técnicas utilizadas nessas análises estão mostradas no fluxograma da Figura 7 e serão descritas ao longo desse capítulo.

### **Etapa IV – Preparação do *scaffold* e testes *in vivo***

Com a temperatura de sinterização do compósito  $Nb_2O_5-HA\beta$  escolhida, nessa quarta e última etapa do trabalho, o foco foi o processamento dos *scaffolds* utilizando lactose como agente espaçador, bem como o implante desses *scaffolds* em ratos Wistar para estudos *in vivo*. Para isso, diferentes porcentagens de lactose foram testadas de modo que a porosidade mais adequada e com um mínimo de estabilidade mecânica para o material fosse conseguida.

Em seguida, os *scaffolds* foram implantados nos defeitos de calvária de ratos Wistar para posterior avaliação de suas propriedades como substituto ósseo.

As etapas citadas acima estão esquematizadas na Figura 7 e serão explicadas ao longo desse capítulo.

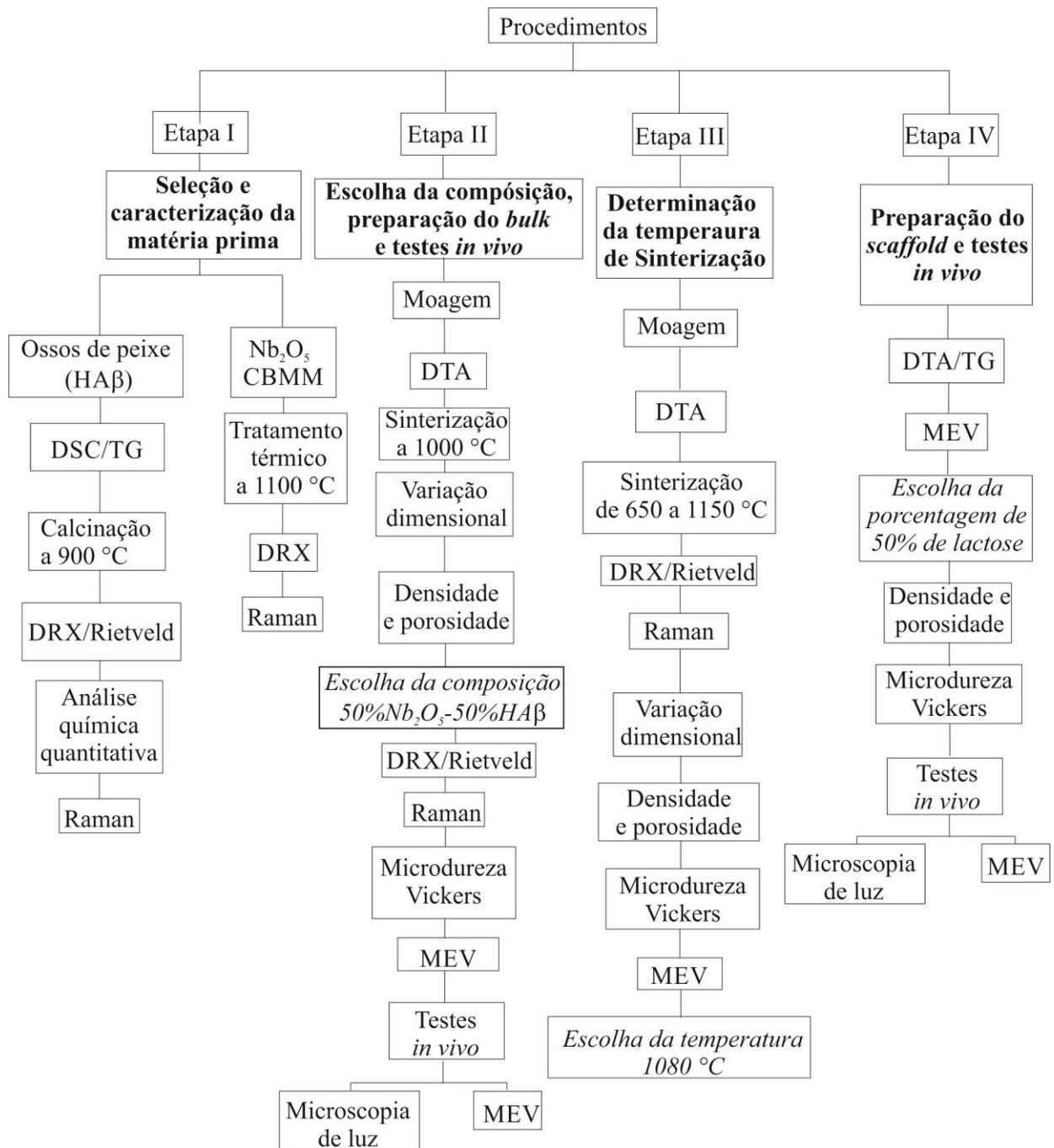


Figura 7. Esquema representativo dos procedimentos experimentais desenvolvidos neste trabalho.

## 4.1. Obtenção dos precursores

### 4.1.1. A cerâmica bifásica $HA\beta$ (hidroxiapatita - $\beta$ -fosfato tricálcico)

Para a produção da cerâmica bifásica ( $HA\beta$ ) utilizada neste trabalho, foram utilizados ossos do peixe pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) cedidos pelo Núcleo de Pesquisas em Limnologia Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA-UEM). Primeiramente, os ossos foram limpos em água quente e lavados diversas vezes com escova para remoção da maior parte dos resíduos orgânicos (músculo, cartilagens). Em seguida, o material foi seco em ar e calcinado a 900°C por 8 horas, em atmosfera livre. Com o processo de calcinação todos os resíduos orgânicos foram eliminados restando apenas as fases minerais do osso. O material foi triturado em almofariz de ágata e submetido à moagem de alta energia por 8 horas a 300 rpm em um moinho planetário Retsch PM 100 (Haan, Alemanha), utilizando-se vaso de moagem e esferas de zircônia e uma razão massa esfera/massa pó de 6:1.

### 4.1.2. O pentóxido de Nióbio

O pentóxido de nióbio foi cedido pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM, Araxá, Brasil). Para a eliminação de fases indesejáveis, foi realizado um tratamento térmico à temperatura de 1100 °C, em atmosfera livre por 2 h. Após o tratamento térmico o material foi triturado em um almofariz de ágata e moído por 1 h a 300 rpm em um moinho planetário Retsch PM 100 (Haan, Alemanha), utilizando-se vaso de moagem e esferas de zircônia com razão massa esfera/massa pó de 6:1.

### 4.1.3. Preparação dos compósitos

Neste estudo, diversos compósitos foram desenvolvidos pelas técnicas da metalurgia do pó (PM) utilizando pós precursores de  $HA\beta$  e  $Nb_2O_5$ . Os compósitos foram produzidos variando-se o volume percentual (vol.%) dos constituintes  $HA\beta$  e  $Nb_2O_5$ . Para tanto, a densidade teórica do material foi previamente determinada. Em processos envolvendo metalurgia do pó, essa propriedade física geralmente é determinada por uma relação envolvendo as densidades teóricas e os volumes de cada um dos componentes separadamente (regra das misturas) [66]. Ou seja,

$$\rho_c = \sum_{j=1}^n p_j \rho_j \quad (1)$$

Sendo:

$\rho_c$ : densidade teórica do compósito;

$p_j$ : porcentagem volumétrica de cada compósito;

$\rho_j$ : densidade de cada elemento do compósito;

$n$ : número de elementos do compósito.

Com a densidade teórica determinada, o volume do compósito para uma determinada massa desejada de compósito ( $m_c$ ) deve ser:

$$V_c = \frac{m_c}{\rho_c} \quad (2)$$

E o volume de cada um dos precursores deve ser:

$$V_j = p_j V_c \quad (3)$$

Logo, 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:

$$m_j = \rho_j V_j \quad (4)$$

De acordo com esse procedimento, para o processamento do sistema  $(100-x)Nb_2O_5-x HA\beta$ , os pós de pentóxido de nióbio ( $Nb_2O_5$ ) e da cerâmica bifásica ( $HA\beta$ ) foram misturados nas seguintes proporções de volume:  $x = 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80$  e  $90$  em vol.%.

Após medir a quantidade de massa para cada proporção selecionada, os precursores na forma de pó foram misturados e homogeneizados utilizando-se um almofariz e pistilo de ágata, por cerca de dez minutos. A etapa de homogeneização é importante para que haja uma distribuição homogênea de partículas, proporcionando ao final do processo, um material de densidade uniforme [67].

Após a homogeneização, a mistura dos pós passou pelo processo de moagem de alta energia em um moinho Retsch PM 100 (Haan, Alemanha), utilizando-se vaso de moagem e esferas de zircônia. A razão massa esfera/massa pó foi de 6:1 e os compósitos foram moídos durante 3 horas a 300 rpm.

A preparação dos compósitos após a fase de moagem foi diferente para as etapas II, III e IV do trabalho.

Para os materiais em forma de *bulk*, (etapa II) os compósitos do sistema  $(100-x)Nb_2O_5-(x)HA\beta$  passaram pelos processos de prensagem uniaxial e sinterização. A prensagem foi realizada em uma pressão de 450 MPa em moldes cilíndricos previamente dimensionados para levar em conta a contração linear do material na sinterização. Dessa maneira, ao final do processo de sinterização as pastilhas devem medir exatamente 8,0 mm de diâmetro (diâmetro do defeito produzido na calvária) e aproximadamente 2,0 mm de espessura.

Após a prensagem, as pastilhas foram sinterizadas em 1000 °C, por duas horas em atmosfera de ar. A taxa de aquecimento foi de 6 °C/min e o resfriamento foi por inércia térmica. As pastilhas obtidas na etapa III do trabalho foram prensadas uniaxialmente a 450 MPa e em seguida sinterizadas por duas horas em atmosfera livre, nas temperaturas de 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1080, 1100, 1120 e 1150 °C.

Para os *scaffolds* (etapa IV), o compósito preparado com 50% de  $Nb_2O_5$  e 50% de  $HA\beta$ , foi misturado com diferentes porcentagens (vol.%) de lactose *SUPERTAB* (10, 20, 30, 40, 50 e 60 %).

As partículas de lactose *SUPERTAB* da DFE Pharma (Goch, Alemanha) possuem morfologia predominante esférica, e foram produzidas pelo processo de *spray dry*. Antes da mistura com o compósito, as partículas de lactose foram peneiradas sendo selecionadas aquelas com diâmetro entre 150 e 250  $\mu$ m.

A mistura (lactose + compósito) foi manualmente homogeneizada por dez minutos e então prensada uniaxialmente a 450 MPa. Para essa etapa, um novo molde cilíndrico foi utilizado para que ao final do processo de sinterização, as pastilhas ficassem com 8,0 mm de diâmetro e 2,0 mm de espessura. Após a prensagem, o material foi sinterizado em 1080 °C por duas horas.

Pastilhas de  $HA\beta$ , nas formas *bulk* e *scaffold* foram produzidas de forma semelhante para serem utilizadas como controle positivo nos testes pré-clínicos em animais e para que as suas propriedades (físicas, mecânicas, morfológicas) pudessem ser comparadas às dos compósito).

## 4.2. Procedimento cirúrgico

Essa etapa foi desenvolvida em parceria com o laboratório de Histotécnica Animal, do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM-UEM) e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PGO-UEM) sob a orientação e supervisão da Prof. Dra. Luzmarina Hernandez (DCM-UEM).

Foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), adultos, com 90 dias de idade, peso corporal entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer nº070/2014).

Primeiramente, as peças sinterizadas foram lixadas com lixas 400, 600 e 1200# até atingirem uma espessura de 0,8 mm. Na sequência, foram lavadas por 10 minutos em banho de ultrassom em três etapas: acetona, água e álcool. Após a lavagem as amostras foram secas em estufa a 40 °C durante no mínimo uma noite e esterilizadas em autoclave.

Tantos para o estudo em *bulk* quanto em *scaffold*, os animais foram divididos em 2 grupos: (I) Grupo controle positivo no qual os defeitos foram preenchidos com pastilhas de  $HA\beta$ ; (II) Grupo compósito, no qual os defeitos foram preenchidos com a pastilha do compósito 50% $Nb_2O_5$ -50% $HA\beta$ .

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma associação 1:1 de 0,1ml/100g de cloridrato de cetamina 10% (Ketamina®, Agener União, Brasília, Brasil) e 0,1ml/100g de cloridrato de xilazina 2% (Rompum®, Bayer AG, Leverkusen, Alemanha).

O procedimento cirúrgico pode ser dividido em quatro etapas principais: incisão, produção do defeito, implante e sutura. Essas etapas serão sucintamente citadas a seguir e estão ilustrados na Figura 8.

Após uma tricotomia da região da cabeça e anti-sepsia com iodo tópico, uma incisão transversal foi realizada com bisturi e lâmina, na região da calvária. Os tecidos moles foram afastados até que a área a ser removida fosse visualizada [Figura 8(a)].

Na calvária de cada animal, foi produzido um defeito ósseo com 8 mm de diâmetro, e 1mm de profundidade utilizando-se broca do tipo trefina Neodent (Curitiba, Brasil) [Figura 8(b)] acoplada a um motor elétrico cirúrgico Branemarck System (Zurique, Suíça) sob rotação de 1500

rpm com abundante irrigação com soro fisiológico estéril [Figura 8 (c)]. Na Figura 8 (d) o defeito produzido é mostrado.

A terceira etapa foi o preenchimento dos defeitos, com as pastilhas. Essa etapa está ilustrada na Figura 8 (e). Para isso, a pastilha foi cuidadosamente encaixada no defeito ósseo e imobilizada com o periósteo retalhado anteriormente. Após isso, a incisão foi suturada com fio de nylon e a região recebeu antissepsia local [Figura 8(f)]. É importante ressaltar que a incisão do periósteo não foi realizada imediatamente acima do defeito ósseo de modo que quando o periósteo foi reaproximado, a região de sutura ficou distante do defeito.

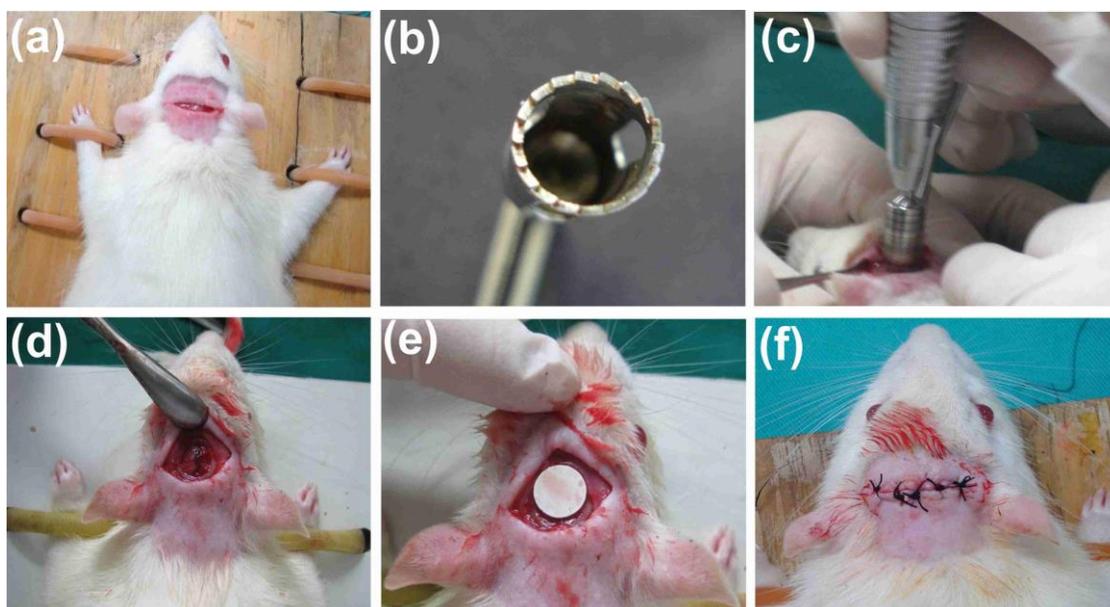


Figura 8. Etapas do procedimento cirúrgico: (a) incisão realizada com bisturi na região da calvária; (b) broca trefina utilizada para a produção do defeito ósseo; (c) processo de produção do defeito;(d) defeito produzido; (e) pastilha encaixada no defeito e (f) sutura.

### 4.3. Pós cirúrgico

Os animais foram observados no período inicial da recuperação anestésica e em seguida mantidos em gaiolas individuais em condições ambientais apropriadas, ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 20 °C, com ração específica para roedores e água *ad libitum*. Após 30 e 45 dias (n=5 animais/período/grupo), os animais foram eutanasiados através da infiltração do triplo da dose anestésica de cloridrato de cetamina com cloridrato de xilazina em partes iguais.

As amostras foram coletadas com uma margem de osso para o processamento histológico como ilustra a Figura 9.

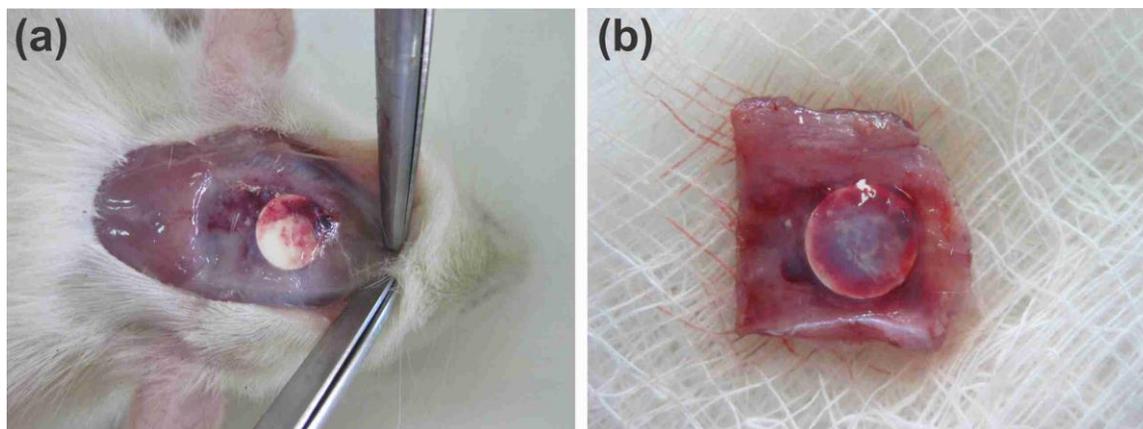


Figura 9. (a) Pastilha na calvária de um animal após 30 dias de implante; (b) Amostra coletada para análises de microscopia.

#### 4.4. Estudos *ex vivo*

As amostras da calvária contendo os defeitos com as pastilhas coletadas após a eutanásia foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 24 horas. A fixação é uma das etapas mais importantes da técnica histológica, pois interrompe o metabolismo celular, estabilizando as estruturas e os componentes bioquímicos intra e extracelulares, preservando e conservando os elementos teciduais [68].

Após a fixação foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de histologia por microscopia de luz visível. Para essas duas análises o preparo dos materiais foi diferente. Para as análises de MEV, o preparo das amostras foi bastante simples e consistiu primeiramente na realização de uma fratura transversal com uma navalha. Em seguida, o periósteo foi removido e por fim, tanto as superfícies das amostras como as superfícies de fratura foram metalizadas com um filme condutor de ouro. A metalização foi realizada pelo processo de “Sputtering” em um metalizador (Shimadzu IC-50 Ion Coater – Kyoto, Japão). As análises de microscopia eletrônica de varredura dos implantes na forma densa (*bulk*) foram realizadas no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM) em um microscópio Shimadzu Super Scan SS-550 (Kyoto, Japão). Para os implantes na forma de elementos porosos (*scaffold*), as amostras foram analisadas em um microscópio Carls Zeiss modelo EVO LS15 (Jena,

Alemanha). Essa parte do trabalho foi realizada na unidade da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Presidente Prudente-SP.

Para as análises histológicas, o preparo é bem mais delicado. Essa etapa foi toda realizada no Laboratório de Histotécnica do Departamento de Ciências Morfológicas, sob a supervisão da Prof. Dra. Luzmarina Hernandez (DCM-UEM).

Para facilitar o corte dos tecidos com o micrótomo, foi realizada a desmineralização das amostras de forma a remover os sais de cálcio presentes nas amostras e nos ossos. Os materiais foram descalcificados em solução de Morse (ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%) pelo período de 8 dias. Em seguida, as amostras foram divididas ao meio, incluídas em parafina e foram feitos cortes transversais com 7 µm de espessura, a partir do centro da amostra em um micrótomo Leica RM2245 (Wetzlar, Alemanha). Em seguida, os cortes foram corados com três diferentes corantes.

Em técnicas histológicas, é comum o uso de corantes para a identificação de diferentes estruturas. Os corantes utilizados nesse trabalho foram: hematoxilina e eosina (H&E), Azan e osteocalcina. Os corantes hematoxilina (azul-púrpura) e eosina (rosa) são os mais utilizados em avaliações morfológicas, pois permitem uma visão geral das estruturas dos materiais. O funcionamento desses corantes é baseado na afinidade ácido-base de seus componentes. Por exemplo, a eosina é um tipo de corante ácido, ou seja, possui carga negativa com afinidade por componentes básicos do tecido (catiônicos). Exemplos de estruturas coradas pela eosina são citoplasma e a matriz extracelular, que é rica em colágeno.

A hematoxilina é um corante básico. Logo, sua afinidade é por componentes ácidos do tecido, como é o caso do núcleo celular onde está localizado o DNA[68].

O azan, é um corante especial capaz de diferenciar a porção mais mineralizada do tecido ósseo da porção menos mineralizada ou não mineralizada (osteóide). Os osteóides ocorrem no processo de ossificação e se formam antes da maturação do tecido ósseo. Osteoblastos dão início ao processo de formação do tecido ósseo, ao secretarem tanto o osteóide quanto várias proteínas específicas [69]. Nesse trabalho as fibras colágenas mais antigas foram coradas em vermelho, enquanto as mais novas apresentaram coloração azul [70].

A osteocalcina é uma proteína não colagenosa presente nas células e na matriz celular. Essa proteína é sintetizada pelos osteoblastos, logo, a sua presença indica a formação e reparo ósseo, atuando como um sinal específico de migração e adesão de osteoclastos [71]. Além disso, a

osteocalcina é um bom marcador para se avaliar a capacidade osteogênica em estágios iniciais, pois pode ser facilmente medida sem qualquer perda celular, podendo ser detectada antes da mineralização [72].

Para detectar a osteocalcina, foi necessário um procedimento laboratorial, baseado em uma reação antígeno – anticorpo, a imunohistoquímica [73]. No caso da osteocalcina, ele funciona como antígeno e um anticorpo primário policlonal *Osteocalcin* produzido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), na concentração de 1:200, foi utilizado. Essas reações são identificadas utilizando-se um revelador. No caso, foi utilizado o *kit Histostain-Plus Broad Spectrum* (DAB) da Invitrogen Corporation, para revelar a reação.

As análises histológicas foram realizadas em um microscópio óptico Nikon® (Eclipse 80i, Shimjuku, Japão) acoplado com câmera de alta resolução Nikon® (DS-Fi1c, Shimjuku, Japão).

## **4.5. Caracterização**

### **4.5.1. Análises térmicas: Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)**

As técnicas de análises térmicas são amplamente utilizadas em várias áreas do conhecimento quando se deseja estudar o comportamento térmico de um material específico. Por meio dessas técnicas, variações nas propriedades físicas e químicas de um determinado material são detectadas em função do tempo ou da temperatura.

Dentre técnicas mais utilizadas para análise térmica estão a termogravimetria (TG), a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria de varredura diferencial (DSC).

A termogravimetria (TG) é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada. Já a técnica de análise térmica diferencial (DTA) detecta a diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência. Seu uso principal é detectar a temperatura inicial dos processos térmicos e caracterizá-los como sendo endotérmico ou exotérmico [74,75].

Na análise por DSC a amostra e a referência são dispostas sobre uma placa condutora. Ambos são aquecidos pela mesma fonte de calor. Em tal sistema, a cada reação, um fluxo de calor é estabelecido entre a amostra e a referência através da placa condutora, por sensores térmicos posicionados próximos a amostra e a referência, obtendo-se um sinal proporcional à diferença de

capacidade térmica entre elas [75]. Assim, a resolução do DSC é maior do que a do DTA, embora as mesmas transições sejam detectadas em ambos as técnicas.

O equipamento utilizado nesse trabalho para as essas três análises térmicas foi um Netzsch - modelo STA 409 PC (Selb, Alemanha) alocado no Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP/UEM).

Nesse equipamento é possível medir curvas de DTA ou DSC simultaneamente com as de TG e ele consiste basicamente de uma microbalança, um forno, termopares e um sistema de fluxo de gás. Todas as medidas foram realizadas colocando-se as amostras (pós ou osso) em cadinhos de alumina com uma taxa de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min em atmosfera contendo 70% de gás nitrogênio e 30% de gás oxigênio. A amostra utilizada como referência foi um cadinho de alumina vazio.

#### **4.5.2. Difração de raios X**

A difratometria de raios X (DRX) é uma técnica de suma importância no estudo de materiais no estado sólido, pois permite a determinação da estrutura cristalinas dos mesmos. Além de que, esta técnica permite apurar informações inerentes à natureza, tamanho e orientação dos cristais [76].

A técnica consiste basicamente no espalhamento de feixes de raios X pela estrutura atômica que compõe o material cristalino em análise. Os planos cristalinos servem como uma grade de difração fazendo com que o feixe de raios X, que varre um ângulo  $\theta$ , entre em condição de difração segundo a lei de Bragg expressa por [76,77]:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (5)$$

sendo:

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

$d$  : distância interplanar;

$\lambda$  : comprimento de onda;

$\theta$  : ângulo de Bragg.

As análises por DRX foram conduzidas utilizando um difratômetro Shimadzu XRD – 7000 (Kyoto, Japão) com radiação Cu K $\alpha$  ( $\lambda= 0,15418$  nm). Os intervalos de tempo de aquisição das medidas variaram de acordo com a análise desejada.

Para a identificação, os precursores  $HAB\beta$  e  $Nb_2O_5$  foram medidos na forma de pó e as amostras sinterizadas em forma de *bulk*, utilizando-se uma velocidade de varredura de 2°/minuto.

A identificação das fases cristalinas foi realizada comparando-se os padrões obtidos experimentalmente com o banco de dados do *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS).

A análise quantitativa de mais de uma fase cristalina não é trivial. Assim, métodos estatísticos são utilizados para simular o padrão de difração.

Nesse trabalho a quantificação dos parâmetros estruturais foi realizada pelo refinamento estrutural utilizando o método de Rietveld com o uso do programa *fullproff*. Para essas análises as medidas de DRX foram repetidas com as amostras trituradas para obter maior homogeneidade do cristal e com maior contagem, ou seja, com velocidade de varredura de 0,25°/minuto.

O modelo utiliza informações prévias da estrutura cristalina do material como parâmetros de rede, posições atômicas, ocupação de sítio e recria o padrão de difração dessa estrutura matematicamente. Esse padrão é então comparado com o padrão experimental e ajustado até que ambos os padrões de difração, calculado e experimental, sejam muito parecidos. O método Rietveld, consiste em minimizar os resíduos [78].

$$S = \sum_{i=1}^n w_i (I_{exp} - I_{calc})^2 \quad (6)$$

Sendo:

$I_{exp}$  : intensidade experimental;

$I_{calc}$ : intensidade calculada;

$w_i : 1/(I_{exp})^{1/2}$ , ou seja,  $w_i$  é o fator “peso” para cada ponto medido, conhecido também como o inverso da variância.

### 4.5.3 Análise Química Quantitativa

A análise química quantitativa foi realizada com o intuito de obter o teor de cálcio, magnésio e fósforo na cerâmica bifásica obtida a partir da calcinação de osso de peixe. Além disso, a razão

molar Ca/P do material pôde ser obtida. Para a determinação das quantidades de cálcio e magnésio, foi utilizado um espectrofotômetro de absorção atômica, marca GBC, modelo 932 AA (Melbourne, Austrália), com o uso de chama de ar-acetileno e para o teor de fósforo utilizou-se um espectrofotômetro, marca Micronal, modelo B 542 (São Paulo, Brasil). Para o fósforo a determinação foi realizada por colorimetria pela intensidade da cor azul do complexo fosfomolibídico. O teor dos elementos foi obtida nos extratos após a digestão nítrico-perclórica do pó calcinado

#### 4.5.4. Espectroscopia Raman

A técnica de espectroscopia Raman foi utilizada de modo a complementar as análises das fases cristalinas obtidas pelo DRX. Essa técnica permite avaliar os modos vibracionais de grupos funcionais moleculares por meio de um espectro em função do número de onda. Em particular, nesse trabalho as ligações, fósforo – oxigênio e nióbio – oxigênio, serão abordadas com respeito à suas configurações nas estruturas cristalinas.

No espalhamento Raman uma radiação monocromática (laser) incidente é espalhada pela molécula com uma energia ligeiramente diferente da radiação incidente (espalhamento inelástico). 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 [79,80].

As medidas dos precursores foram realizadas na forma de pó e as amostras sinterizadas em forma de *bulk*. No entanto, vários efeitos de luminescência foram detectados no decorrer das medidas “contaminando” o espectro Raman. Esses efeitos ocorreram para diferentes comprimentos de onda de excitação e para diferentes amostras. Dessa maneira, as medidas tiveram de ser realizadas em diferentes espectrômetros, com diferentes comprimentos de onda dependendo da necessidade.

Para as amostras  $Nb_2O_5$  e os compósitos do sistema  $Nb_2O_5$ - $H\alpha\beta$  sinterizados entre 800 e 1150 °C foi utilizado um espectrômetro FT-Raman Bruker Ram II acoplado a um FTIR Vertex 70V (Billerica, EUA) equipado com um detector de germânio refrigerado com nitrogênio líquido e com uma excitação de 1064 nm.

Para a amostra do compósito  $Nb_2O_5$ - $H\alpha\beta$  sinterizado a 650 °C foi utilizado um espectrômetro Bruker modelo SENTERRA (Billerica, EUA) acoplado a uma CCD com uma

excitação em 532 nm. Esse equipamento também foi utilizado com excitação de 785 nm para as amostras  $H\alpha\beta$  e para os compósitos sinterizados em 700 e 750 °C.

#### 4.5.5. Microscopia eletrônica de varredura

A microestrutura das amostras foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nessa técnica, elétrons gerados termo-ionicamente são acelerados através de duas ou três lentes eletromagnéticas em direção à amostra. A interação dos elétrons com a amostra gera diversos efeitos como: raios X, cátodo luminescência, elétrons secundários, elétrons retro-espalhados. Em particular, a emissão dos elétrons secundários que possuem baixa energia, depende sensivelmente da topografia da superfície da amostra e por isso são utilizados para produzir uma imagem de alta ampliação (entre 100 a 100.000 vezes), com boa profundidade de campo [81].

Uma análise composicional da amostra pode ser realizada utilizando-se o sinal dos raios-X característicos emitidos pela amostra durante a interação com o feixe de elétrons. Para tanto, se faz necessário o emprego de um detector de energia dispersiva de raios-X (EDS). 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 [81].

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram recobertas por um filme condutor de ouro pelo processo de *sputtering* em um metalizador Shimadzu (IC-50 Ion Coater, Kyoto, Japão). 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 (Kyoto, Japão).

Imagens de superfície e fratura foram realizadas. Para as imagens de fratura, as amostras foram fraturadas numa prensa Tempopress 2 da marca Struers (Ballerup, Dinamarca), utilizando um acessório construído em aço VC-131 o qual está ilustrado na Figura 10.

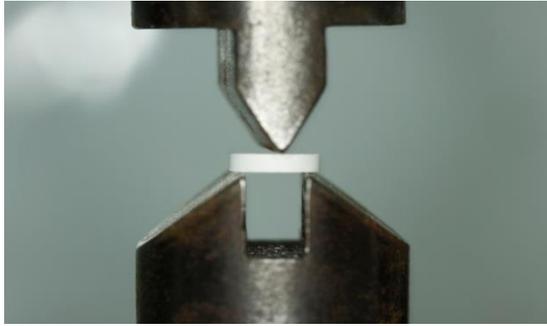


Figura 10. Fotografia mostrando o acessório adaptado à prensa tempopress 2 para o procedimento de fratura das amostras.

#### 4.5.6. Variação dimensional

A variação dimensional é um parâmetro extremamente importante para a produção de amostras em larga escala. Em particular, nesse trabalho, o conhecimento da variação dimensional proporcionou a produção de amostras que se encaixassem o melhor possível nos defeitos de calvária, isto é, amostras que após o processo de sinterização ficaram o mais próximo possível do defeito produzido pela broca trefina.

A variação dimensional foi obtida por comparação entre a medida do diâmetro da amostra a verde (antes da sinterização) e a medida do diâmetro após a sinterização. As medidas foram realizadas com um paquímetro digital Jomarca (Guarulhos, Brasil) com precisão de  $\pm 0,05$  mm. O valor da variação dimensional corresponde ao valor médio de duas medidas realizadas em 3 amostras. A variação dimensional foi calculada pela equação 7:

$$V_D(\%) = \frac{(L_F - L_I)}{L_I} * 100 \quad (7)$$

Sendo:

$V_D$ : variação dimensional percentual;

$L_I$ : dimensão inicial (diâmetro da peça a verde);

$L_F$ : dimensão final (diâmetro da peça sinterizada).

#### 4.5.7. Densidade e porosidade

Como os materiais produzidos nesse trabalho são porosos, o método empregado para a medida de densidade e de porosidade foi o Método de Imersão com líquido [82]. Esse método é baseado no princípio de Arquimedes.

Primeiramente, as pastilhas foram secas por 10 h em um forno mufla a 100 °C e na sequência suas massas foram medidas em uma balança digital Shimadzu AUW220D (Kyoto, Japão), com a utilização do acessório *Specific Gravity Measurement Kit*. A seguir, elas foram acomodadas e presas em uma bandeja como ilustrado na Figura 11. A bandeja com as pastilhas foi então colocada em um recipiente no interior de um dessecador, no qual um vácuo entre  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  Torr foi mantido por 2 h (Figura 11). O objetivo do sistema com baixa pressão (vácuo) é a retirada do ar de dentro dos poros abertos da pastilhas, pois se a amostra for simplesmente deixada em imersão, sob o líquido à pressão atmosférica, a pressão interna do ar nos poros pode dificultar o preenchimento dos mesmos pelo líquido. Em seguida, a bandeja foi inundada com água destilada pelo funil acoplado ao dessecador. Subsequentemente, o recipiente com água foi retirado do dessecador e um tempo de termalização de 30 minutos foi aguardado. Posteriormente, as medidas das massas das amostras impregnadas com água e das massas sob o empuxo da água foram realizadas. As medidas sob o empuxo foram realizadas utilizando uma cesta metálica presente no acessório *Specific Gravity Measurement Kit*. A densidade é obtida pela relação:

$$\rho_s = \left( \frac{m_s}{m_{imp} - m_e} \right) \rho_{\text{água}} \quad (10)$$

Sendo:

$\rho_s$ : densidade da amostra sinterizada;

$\rho_{\text{água}}$ : densidade da água na temperatura em que a medida foi realizada;

$m_s$ : massa da amostra sinterizada seca;

$m_{imp}$ : massa da amostra impregnada com água;

$m_e$ : massa da amostra sob o empuxo da água (suspensa).

A porosidade pelo método por imersão e penetração, é dada por:

$$\gamma(\%) = \left( \frac{m_{imp} - m_s}{m_{imp} - m_e} \right) * 100 \quad (11)$$

Sendo:

$\gamma(\%)$ : porosidade aberta percentual.

Os valores de densidade e de porosidade obtidos correspondem ao valor médio de medidas realizadas em 3 amostras.



Figura 11. Aparato experimental para imersão e impregnação das amostras com água para medidas de densidade e porosidade. Inserção: Bandeja onde as amostras foram acomodadas.

#### 4.5.8. Microdureza Vickers

##### *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  $136^\circ$  entre as faces opostas. Uma força aplicada na direção da amostra faz com que haja uma impressão na mesma. Quanto mais resistente for o material, menor será a penetração e, por consequência, menor será a impressão deixada na amostra.

A microdureza Vickers ( $H_v$ ) é dada por uma relação entre a carga aplicada  $Q$  e o quadrado da média das diagonais ( $L^2$ ) impressas pelo indentador na amostra (Equação 8) [83]:

$$H_v = \frac{1,8544Q}{L^2} \quad (8)$$

Sendo,

$$L = \frac{L1 + L2}{2} \quad (9)$$

As medidas de microdureza foram realizadas em uma máquina de ensaios (UMT-2 Multi-Specimen Test System, CETR, Campbell, EUA). Foram realizadas 10 indentações em cada pastilha sinterizada. A carga  $Q$  utilizada foi de 3 N e os valores de dureza são dados em N/m<sup>2</sup> (Pa).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Etapa I: Escolha dos precursores $HA\beta$ e $Nb_2O_5$

#### 5.1.1. Análise térmica TG e DSC da cerâmica bifásica $HA\beta$

Nas Figuras 12 (a) e (b) são apresentadas, respectivamente, as curvas de termogravimetria (TG) e de calorimetria diferencial de varredura (DSC) do osso de peixe, *in natura*, após a etapa de limpeza.

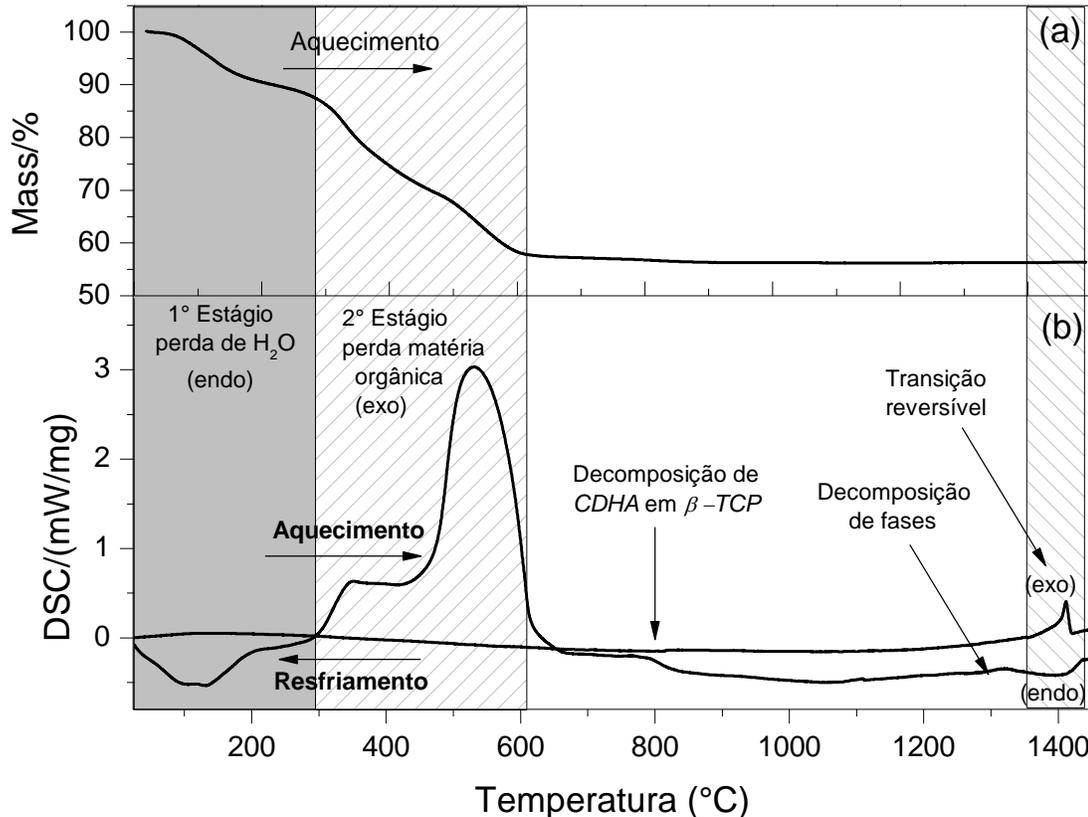


Figura 12. Curvas de: (a) TG e (b) DSC no intervalo de 20 a 1450 °C, com taxa de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min para o osso de peixe *in natura*.

No gráfico de TG é possível observar uma constante redução na massa do material desde o início do aquecimento. Em um primeiro estágio, compreendido do início do aquecimento até aproximadamente 300 °C, ocorre perda de água na forma de vapor. Essa evaporação representa uma perda de massa em torno de 15% e corresponde a uma reação endotérmica, a qual é mostrada

na curva de DSC. Um segundo estágio, compreendido entre 300 e 600 °C, há uma perda de 15% para 40% da massa do material. Essa acentuada perda de massa está associada a reações de combustão de matéria orgânica contida nos ossos. Na curva de DSC é possível observar que essas reações são exotérmicas com a presença predominante de dois picos largos, os quais podem estar relacionados com a combustão de proteína e gordura [84,85].

Acima de 600 °C há uma pequena perda de massa, cerca de 3%, que pode estar associada à perda de íons carbonato [85] e/ou hidroxila da hidroxiapatita [84]. Na curva de DSC também é possível observar uma transição em torno de 800 °C que pode ser atribuída à decomposição da hidroxiapatita carbonatada (CDHA) em  $\beta$ -TCP [86]. Em torno de 1300 °C inicia-se uma suave elevação na curva de aquecimento do DSC que pode ser devida a uma nova decomposição de fase que pode ocorrer em temperaturas superiores [103].

Uma última transição de fase (endotérmica) é observada na curva de aquecimento de DSC com início em torno de 1330 °C, a qual é reversível, como pode ser observada pela transição exotérmica na curva de resfriamento iniciada em 1400 °C. A decomposição da HA em altas temperaturas pode produzir diferentes fases cristalinas de fosfato de cálcio, tais como, óxido de cálcio (CaO),  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP) ( $\alpha - Ca_3(PO_4)_2$ ),  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) ( $\beta - Ca_3(PO_4)_2$ ), fosfato tetracálcico (T-TCP)  $Ca_4P_2O_9$  e/ou fosfato de cálcio amorfo (ACP) [103].

### 5.1.2. Análise por difração de raios X da cerâmica bifásica HA $\beta$

Na Figura 13 são apresentados os difratogramas de raios X das amostras de ossos de peixe após as etapas de limpeza, calcinação e moagem (a), bem como do material restante da análise por DSC até a temperatura de 1450 °C, que é mostrado na Figura 12 (b). No difratograma da amostra calcinada a 900 °C por oito horas e moída por 8 h a 300 rpm [Figura 13 (a)] é possível observar que o material é cristalino, ou seja, apresenta picos de difração estreitos e bem definidos. Além disso, o material se apresenta como uma cerâmica bifásica, cujas fases cristalinas identificadas foram:  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (hidroxiapatita - HA), e  $\beta$ - $Ca_3(PO_4)_2$  ( $\beta$ -fosfato tricálcico –  $\beta$ -TCP), que correspondem, respectivamente, às fichas padrão 9-0432-JCPDS e 9-0169-JCPDS. Essas fases são características de fosfatos de cálcio presentes nos tecidos ósseos. É importante ressaltar que a moagem realizada após o processo de calcinação não induz a formação de novas fases cristalinas,

conforme mostrado em trabalhos anteriores [20,26]. O efeito produzido pelo processo de moagem por 8 horas nos ossos de peixe calcinados é a redução no tamanho de partícula e no tamanho de cristalito, resultando em um material nanoestruturado [20,26].

Na Figura 13(b) é possível observar que após o tratamento térmico, até a temperatura de 1450 °C, há uma decomposição das fases HA e  $\beta$ -TCP em outras fases cristalinas, sendo que ao final do processo, o material é composto pelas fases  $\beta$  -  $Ca_3(PO_4)_2$  ( $\beta$ -TCP),  $\alpha$  -  $Ca_3(PO_4)_2$  ( $\alpha$ -TCP) e  $Ca_4P_2O_9$  (fosfato tetracálcico - T-TCP), correspondentes as fichas 9-0169-JCPDS, 9-0348-JCPDS e 11-0232-JCPDS, respectivamente.

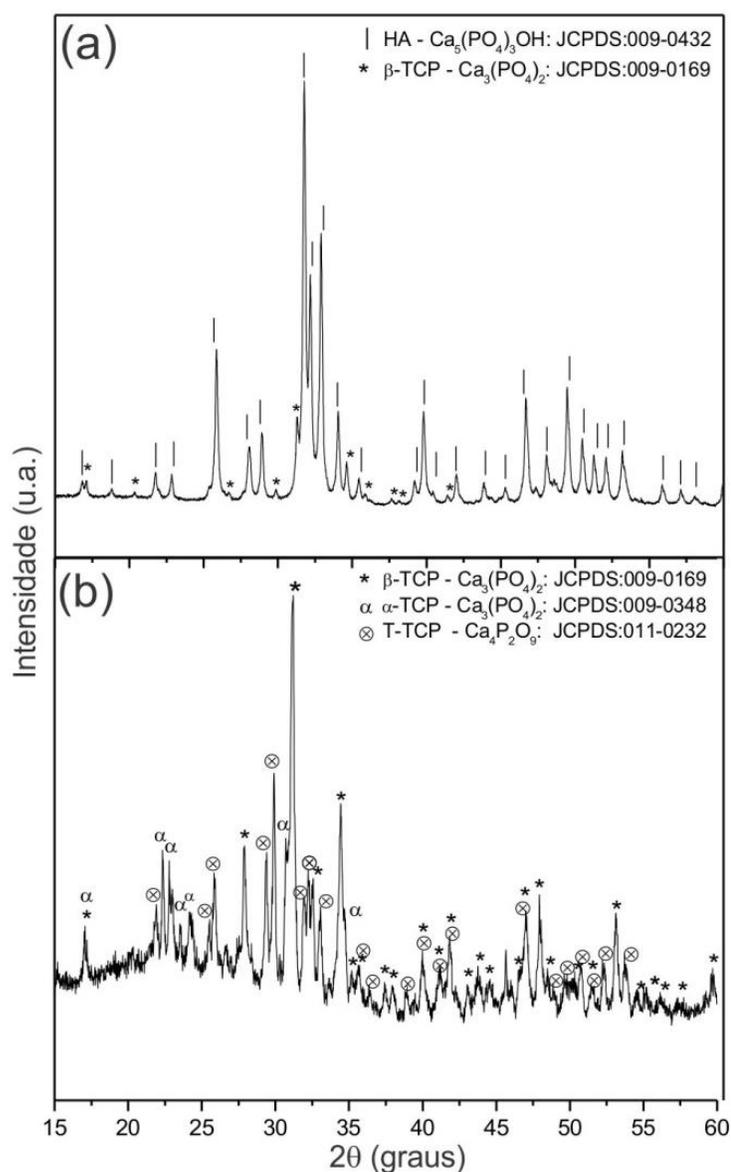


Figura 13. Difratogramas de raios X das amostras de osso de peixe: (a) após os processos de calcinação a 900 °C e moagem por 8 h a 300 rpm e (b) *in natura* resultante da análise por DSC após o tratamento térmico até 1450 °C.

### 5.1.3. Refinamento estrutural pelo método de Rietveld da cerâmica bifásica $HA\beta$

A fração de volume (vol.%) das fases  $HA$  e  $\beta$ - $TCP$  na amostra  $HA\beta$  foi determinada mediante o refinamento estrutural pelo método de Rietveld utilizando o programa *fullprof* que é um *software* de código livre encontrado no site <http://www.ill.eu/sites/fullprof>.

O perfil observado e o calculado, bem como suas diferenças estão apresentados na Figura 14. Os parâmetros iniciais usados nos refinamentos foram retirados do banco de dados ICSD, depositado no site: [www.portaldapesquisa.com.br/databases/sites](http://www.portaldapesquisa.com.br/databases/sites).

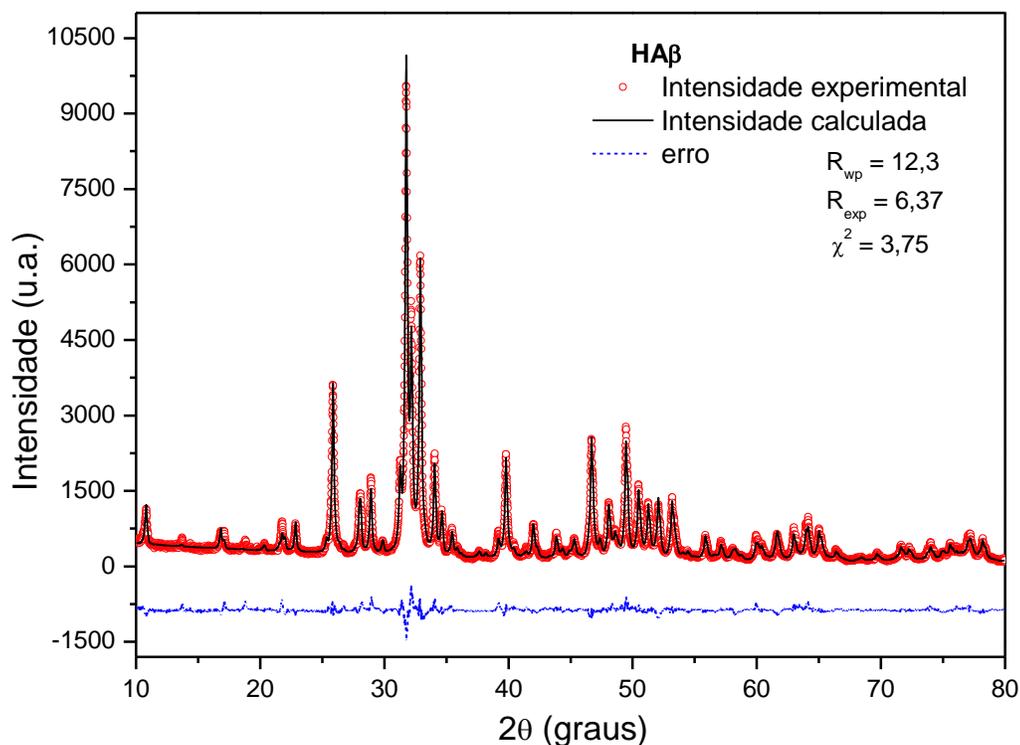


Figura 14. Perfis de difração de raios-X, experimental, calculado e suas diferenças (erro), obtidos do refinamento da amostra  $HA\beta$ , após o processo de limpeza, calcinação e moagem.

O modelo de espalhamento de raios X utilizado para a  $HA$  foi o de simetria hexagonal de grupo espacial  $P63/m$ , e para a fase  $\beta$ - $TCP$  foi utilizada a simetria hexagonal de grupo espacial  $R3c$ . O modelo se ajustou muito bem ao padrão experimental, como pode ser observado na Figura 14. Os parâmetros de rede e a fração de volume (%) de cada fase são apresentados na Tabela 2. Observa-se que a fase hidroxiapatita é majoritária, correspondendo à fração de volume de 87,61%, enquanto que a fase  $\beta$ - $TCP$  à fração de 12,4%. Esse resultado é semelhante ao obtido no trabalho

de Martínez-Castañón e colaboradores no estudo sobre nanopartículas de hidroxiapatita sintéticas, no qual o tratamento térmico a 900 °C induziu um percentual de 13% em volume da fase  $\beta$ -TCP no material produzido [86].

Tabela 2. Parâmetros de rede e fração (%) de volume da amostra  $HA\beta$  após o refinamento e comparação com as fichas 9-0432 e 9-0169 do padrão JCPDS.

	Fase: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$		Fase: $\beta$ - $Ca_3(PO)_2$	
	Parâmetros de Rede (Å)	Fração do Volume (%)	Parâmetros de Rede (Å)	Fração do Volume (%)
	$a = 9,422$	87,61	$a = 10,351$	12,39
	$b = 9,422$		$b = 10,351$	
	$c = 6,883$		$c = 37,072$	
9-0432-JCPDS	$a = 9,418$	9-0169-JCPDS	$a = 10,429$	
	$b = 9,418$		$b = 10,429$	
	$c = 6,886$		$c = 37,380$	

A decomposição de  $HA$  em  $\beta$ -TCP é característica de hidroxiapatitas deficientes de  $Ca$  [87], sendo que tal deficiência pode estar presente na amostra  $HA\beta$  produzida a partir de ossos de peixe. Além disso, comparando-se os parâmetros de rede das fichas estequiométricas (9-0432-JCPDS -  $HA$ ) e (9-0169-JCPDS -  $\beta$ -TCP) com os obtidos do refinamento, podemos observar que para a fase  $HA$  os valores são bastante parecidos, no entanto, para a fase  $\beta$ -TCP, ocorre uma diminuição significativa dos parâmetros de rede já na primeira casa decimal. Essa diferença implica em um deslocamento dos picos de difração para a direção de ângulos  $2\theta$  maiores. A diminuição dos parâmetros de rede da fase  $\beta$ -TCP pode estar relacionada a uma substituição do átomo cálcio presente no sítio A, por um átomo de magnésio, presente nos tecidos ósseos de origem animal. Além disso, o  $Mg^{2+}$  possui um raio iônico de  $\sim 0,65$  Å, enquanto o cálcio possui raio iônico de  $\sim 0,99$  Å e, por isso, ocorre uma contração dos parâmetros de rede. Se compararmos os valores obtidos do refinamento com os valores publicados na ficha 70-0682-JCPDS ( $a=b=10,34$  Å e  $c=37,07$  Å) referente a uma estrutura do tipo  $Ca_{(3-x)}Mg_x(PO_4)_2$ , nota-se que os parâmetros de rede são muito mais próximos do que os da ficha 9-0169-JCPDS, referente à fase  $(Ca_3(PO_4)_2)$  ( $\beta$ -TCP) estequiométrica. No trabalho de Kim e colaboradores, no qual uma cerâmica bifásica  $HA/\beta$ -TCP era dopada com íons de  $Mg$  [88], um comportamento semelhante ao da amostra  $HA\beta$  foi observado. Isto é, os íons  $Mg$  são preferencialmente incorporados na fase  $\beta$ -TCP, ocorrendo somente o deslocamento dos picos correspondentes a esta fase cristalina.

Assim, o fato do magnésio existir naturalmente nos materiais produzidos a partir de ossos de peixe, pode ser uma vantajosa propriedade. As substituições de *Mg* em fosfatos de cálcio aumentam a bioreabsorção e a bioatividade nos estágios iniciais de osteogênese estimulando a proliferação de osteoblastos [89,90]. Além disso, substituições apropriadas de *Mg* em fosfatos de cálcio faz com que a nucleação de apatita em SBF (fluido corpóreo simulado) seja mais rápida do que nos materiais puros sem a incorporação de *Mg* [91].

#### 5.1.4. Análise química quantitativa da cerâmica bifásica *HAβ*

A presença de magnésio na amostra *HAβ* foi confirmada pela análise química quantitativa dos elementos *Ca*, *Mg* e *P* e está apresentada na Tabela 3. É possível constatar que o *Mg* corresponde a um percentual de 0,53% da massa do material. Ademais, a razão molar Ca/P da amostra *HAβ* pôde ser determinada como sendo igual a 1,62. A razão Ca/P da *HA* e do *β-TCP* sintéticos são, respectivamente, iguais a 1,67 e 1,5, assim, a razão Ca/P de 1,62, obtida para a amostra *HAβ*, é um valor intermediário a essas duas fases. Outro fator que pode ter influenciado nesse valor é o fato do tecido ósseo natural/animal conter íons como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $CO_3^{2-}$ , dentre outros em sua estrutura [19].

Tabela 3. Resultados da análise química quantitativa dos elementos Ca, Mg e P obtida por absorção atômica e colorimetria.

Elemento	Massa (%)	Razão(Ca/P)
Ca	30,5	1,62
Mg	0,53	
P	14,45	

#### 5.1.5. Análise por espectroscopia Raman da cerâmica bifásica *HAβ*

O resultado da análise por espectroscopia Raman da amostra *HAβ* na forma de pó é mostrado na Figura 15. As bandas que aparecem na região entre 440 e 1100  $cm^{-1}$  são características do grupo fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) presentes na *HA* e no *β-TCP*. A única banda do *β-TCP* que aparece no espectro é aquela localizada em 972  $cm^{-1}$ . Geralmente, essa é a banda mais intensa dessa fase no espectro Raman e está relacionada ao modo de estiramento simétrico  $\nu_1$  [92,93]. Para a hidroxiapatita,

ligações do tipo (O – P – O) são observadas entre 430 e 610  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 448  $\text{cm}^{-1}$  é característica de uma ligação do modo  $\nu_2$ , duplamente degenerado, e as localizadas em 580, 592, 607 e 615  $\text{cm}^{-1}$  são características do modo  $\nu_4$ , triplamente degenerado [94]. As ligações de estiramento (P – O) são observadas nas demais bandas, sendo que a localizada em 960  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao modo de estiramento simétrico  $\nu_1$ , não degenerado. As bandas localizadas em 1029, 1048 e 1080  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao modo de estiramento antissimétrico  $\nu_3$ , triplamente degenerado [93,95].

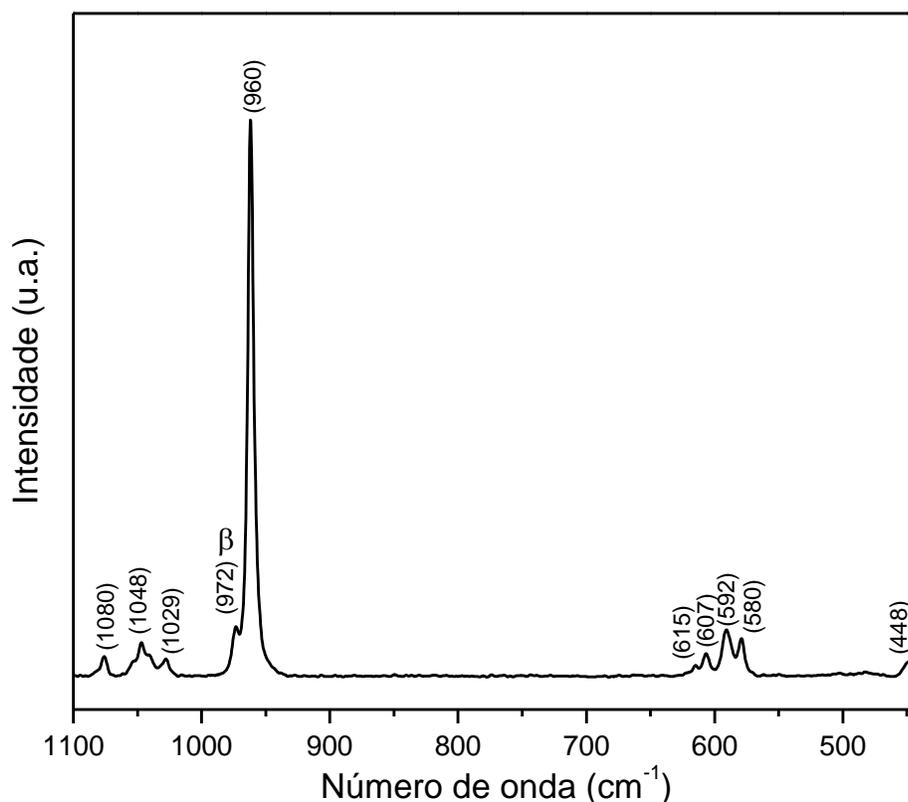


Figura 15. Espectro Raman da amostra  $HA\beta$  após os processos de limpeza, calcinação a 900  $^{\circ}\text{C}$  e moagem por 8h a 300 rpm.

### 5.1.6. Análise por difração de raios X do pentóxido de nióbio $\text{Nb}_2\text{O}_5$

Na Figura 16 são mostrados os difratogramas de raios X do pentóxido de nióbio antes e após o tratamento térmico. O pentóxido de nióbio da maneira como foi fornecido pela CBMM (Companhia Brasileira de Mineração e Metalurgia), isto é, antes do tratamento térmico, era composto por três diferentes estruturas cristalinas de pentóxido de nióbio, sendo duas delas conhecidas: a monoclinica (37-1468-JCPDS) e a hexagonal (7-0061-JCPDS), e a terceira de

estrutura não definida (32-0711-JCPDS). Estas estruturas foram identificadas comparando-se o padrão de espalhamento de raios X experimental com as fichas do padrão JCPDS. Após o tratamento térmico, observa-se que o pentóxido de nióbio ( $Nb_2O_5$ ) tornou-se monofásico com uma estrutura monoclinica de grupo espacial  $P2_1$ , correspondente à ficha 37-1468-JCPDS. Optou-se neste trabalho pelo uso do material tratado termicamente, por possuir uma única estrutura cristalina a qual é a mais citada na literatura científica.

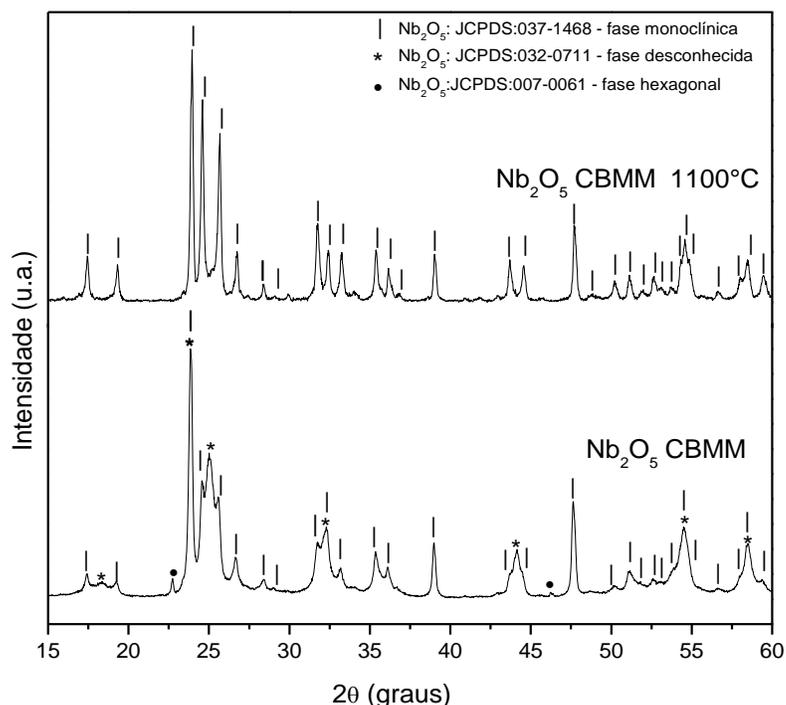


Figura 16. Difratomogramas de raios X do pentóxido de nióbio ( $Nb_2O_5$ ) cedido pela CBMM, antes e após o tratamento térmico a 1100 °C por 2 h em atmosfera de ar.

### 5.1.7. Análise por espectroscopia Raman do pentóxido de nióbio $Nb_2O_5$

O espectro Raman do pentóxido de nióbio após o tratamento térmico é mostrado na Figura 17. As bandas observadas para o pentóxido de nióbio  $Nb_2O_5$  monoclinico, de grupo espacial  $P2_1$ , correspondem às observadas por Balachandran e colaboradores [96].

As bandas localizadas entre 841, 894 e 994 $cm^{-1}$  são atribuídas a modos de vibração  $\nu_1$  e estão relacionados a diferentes graus de distorção dos poliedros presentes no  $Nb_2O_5$  [97,98]. A vibração  $\nu_1$  é a mais diagnosticada em óxidos e o fato de existirem três bandas desse tipo está associado a dois fatores: o primeiro, é que no  $Nb_2O_5$  monoclinico há dois tipos de octaedro: os de aresta-

compartilhada (*edge-shared*) e os de canto compartilhado (*corner-shared*). Assim, duas bandas desse modo são observadas: a banda em  $994\text{ cm}^{-1}$  (*edge-shared*) e a banda em  $894\text{ cm}^{-1}$  (*corner-shared*). Segundo Balachandran e colaboradores,  $5/28$  dos octaedros são do tipo *corner-shared*. Portanto, a banda em  $994\text{ cm}^{-1}$  é mais forte do que a banda em  $894\text{ cm}^{-1}$  [96]. O segundo fator está associado ao fato de existirem, além de octaedros, também tetraedros discretos  $\text{NbO}_4$ , cuja concentração é pequena comparada com a dos octaedros. Esses tetraedros são responsáveis pela ocorrência da pequena banda  $\nu_1$  em  $841\text{ cm}^{-1}$ . As bandas em  $632\text{ cm}^{-1}$  e o dubleto em  $659$  e  $675\text{ cm}^{-1}$  são característicos do modo  $\nu_2$  [96]. As bandas entre  $349$  e  $550\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao modo  $\nu_5$  e as bandas em  $263$ ,  $241$  e  $205$  ao modo  $\nu_6$  [97].

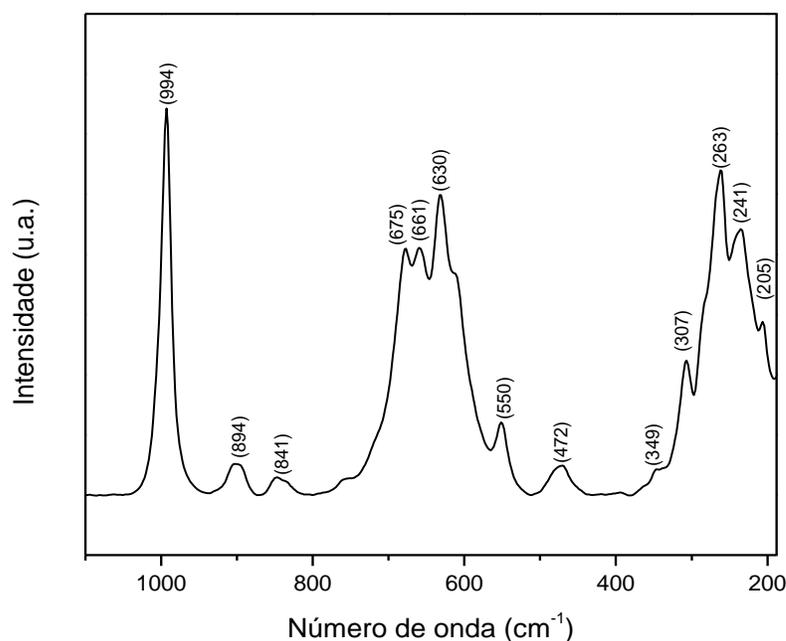


Figura 17. Espectro Raman da amostra  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , após o tratamento térmico em atmosfera livre a  $1100\text{ }^\circ\text{C}$  por 2h em atmosfera de ar.

## 5.2. Parte II: Escolha da composição (em vol.%) para o compósito $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$

### 5.2.1. Escolha do volume (%) de $HA\beta$ para o sistema $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$

Em trabalhos anteriores, a bioatividade do sistema  $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$ , sinterizado a  $1000^\circ\text{C}$ , foi testada em análises *in vitro* em fluido corpóreo simulado (SBF) para vários valores de  $x$  ( $x = 10, 20, 30, 40, 50$ ), sendo  $x$  o volume porcentual de  $HA\beta$  [27]. Em todas as composições testadas, observou-se a nucleação de apatita sobre a superfície do biomaterial, confirmando a bioatividade do mesmo [99]. Para os testes *in vivo* realizados no presente trabalho, optou-se pela escolha de uma única composição, uma vez que, para todas as composições estudadas, houve nucleação de apatita nos testes *in vitro*. Para essa escolha, amostras do sistema  $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$ , com  $x = 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80$  e  $90$  vol.% foram misturadas (regra das misturas - em vol.%), homogeneizadas e submetidas a processo de moagem por 3 h. O material processado foi analisado por diferentes técnicas para a escolha da composição.

### 5.2.2. Análise térmica (DTA)

Os resultados da análise térmica diferencial (DTA) para todas as composições estudadas estão apresentados na Figura 18. É possível observar que para todas as composições existem pelo menos dois expressivos picos endotérmicos que estão relacionados ao processo de fusão dos materiais, além de outros pequenos picos que serão posteriormente discutidos. É possível notar também que há uma grande variação da temperatura de transição em função da composição dos materiais. Na Figura 19 é mostrado o comportamento da temperatura de início da fusão (*on-set*) obtido pelas curvas de DTA para todas as composições estudadas. O procedimento adotado para a escolha da composição foi o de selecionar a amostra cujas reações ocorressem em temperaturas menores. Assim, a energia elétrica gasta para a produção do compósito seria a menor possível. Por esse ponto de vista, as amostras de composições intermediárias ( $60\%Nb_2O_5-40\%HA\beta$ ,  $50\%Nb_2O_5-50\%HA\beta$ ,  $40\%Nb_2O_5-60\%HA\beta$  e  $30\%Nb_2O_5-70\%HA\beta$ ) são as mais adequadas, uma vez que suas reações são antecipadas em termos de temperatura, o que proporciona pontos de fusão relativamente baixos, entre  $1023$  e  $1057^\circ\text{C}$ . Dentre essas composições, que possuem seus pontos de fusão antecipados, a que possui o menor ponto de fusão foi a do sistema  $(50\%Nb_2O_5-50\%HA\beta)$ ,

a qual foi à escolhida para a preparação das amostras nos procedimentos *in vivo* realizados neste trabalho.

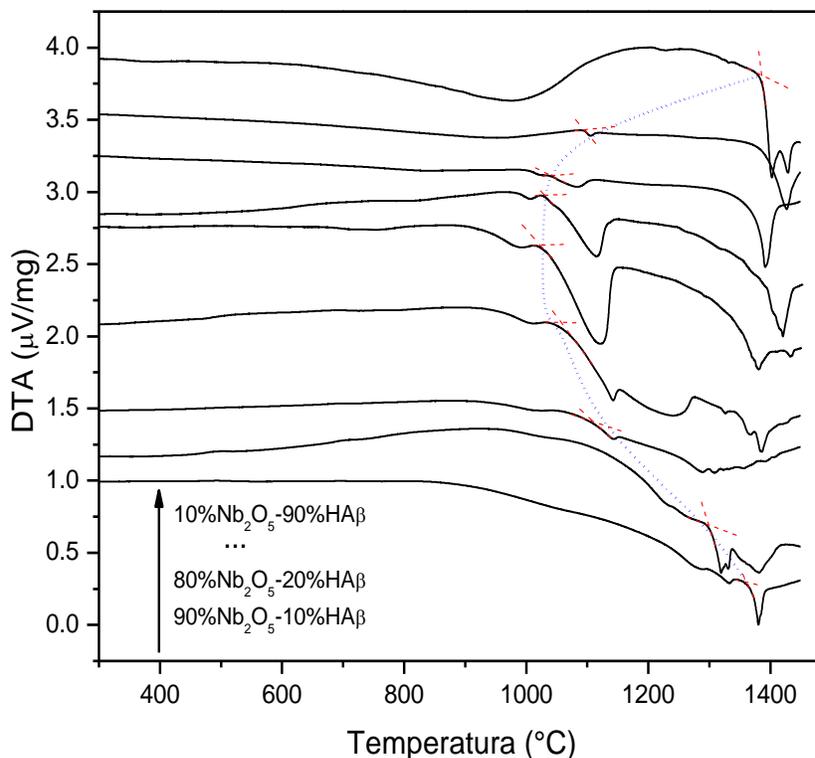


Figura 18. Curvas de análise térmica diferencial (DTA) no intervalo de 300 a 1450 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, para as amostras do sistema  $(100-x)\text{Nb}_2\text{O}_5-x\text{HA}\beta$  ( $x= 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80$  e  $90$  em vol.%). A linha tracejada é apenas um guia visual para efeito da localização do início do ponto de fusão.

O fenômeno de antecipação do ponto de fusão do sistema  $(100-x)\text{Nb}_2\text{O}_5-x\text{HA}$  é análogo ao que ocorre, por exemplo, nas ligas metálicas eutéticas. Nessas ligas, o sistema possui uma composição química entre os dois constituintes em que uma fase líquida se decompõe em duas fases sólidas em uma determinada temperatura. Isso faz com que a liga eutética possua um ponto de fusão menor que a de seus elementos constituintes [112]. Dessa maneira, conclui-se que uma adição adequada de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  na amostra  $\text{HA}\beta$  (ou vice-versa) faz com que o ponto de fusão de uma das fases formadas diminua drasticamente. O ponto de fusão do  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  é em torno de 1510 °C [100], o da hidroxiapatita 1670 °C e do  $\beta\text{-TCP}$  em torno de 1760 °C [101,102]. Como para a composição eutética  $(50\%\text{Nb}_2\text{O}_5-50\%\text{HA}\beta)$  a temperatura de início da fusão (on-set) ocorreu em torno de 1023 °C, o que representa cerca de 32, 38 e 41% de redução da temperatura de fusão dos materiais constituintes  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{HA}$  e  $\beta\text{-TCP}$ , respectivamente.

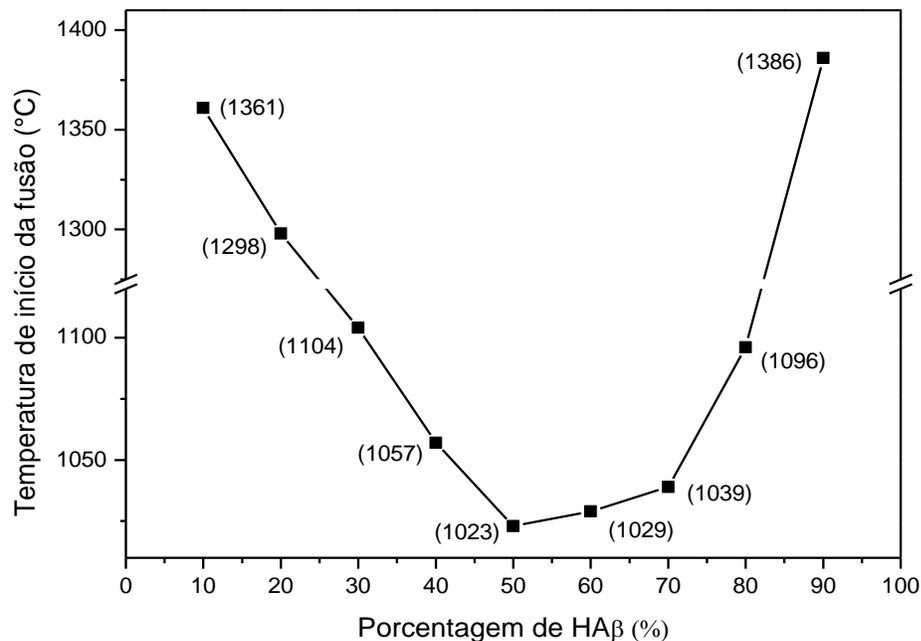


Figura 19. Temperaturas de início da fusão (on-set) para o sistema  $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$ , com  $x = 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80$  e  $90$  em vol.% obtidas das curvas de DTA. A linha contínua é apenas um guia visual.

### 5.2.3. Análise da variação dimensional em função do volume (%) de HAβ

A variação da temperatura de fusão influencia diretamente nas propriedades físicas e mecânicas dos materiais produzidos. Uma dessas propriedades é a variação dimensional. Na Figura 20 é apresentado o comportamento desse parâmetro em função da composição em volume percentual (vol.%) de HAβ, para as amostras correspondentes ao sistema  $(100-x) Nb_2O_5-xHA\beta$  ( $x = 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80$  e  $90$ ). As amostras foram sinterizadas a  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h em atmosfera ar.

De um modo geral, observa-se um aumento gradativo de contração no material até a composição de 50% de HAβ e, a partir dessa concentração, ocorre uma expansão. Para as amostras com concentração entre 10% e 50% em volume de HAβ, a contração linear (diametral) cresce de 0,4% para 6,1%, respectivamente. Esse comportamento está associado à contínua evolução da densificação do material, a qual produz uma redução do grau de porosidade e no tamanho dos poros [20]. Essa tendência, observada por Nascimento [25], à primeira vista parece não ser natural, visto que a diminuição da quantidade de  $Nb_2O_5$  no sistema implicaria em uma diminuição da densidade, pois o  $Nb_2O_5$  é mais denso do que a hidroxiapatita. No entanto, como as composições intermediárias

são mais reativas, é possível que haja uma antecipação do processo de sinterização, tornando-as mais densas. Para as composições com 60, 70 e 80 % de  $HA\beta$  em vol.%, ocorre uma leve expansão com o aumento percentual de  $HA\beta$  de 5,1 para 4,7%. Para a composição com 90% de  $HA\beta$ , observa-se uma contração linear da ordem de 2,1%.

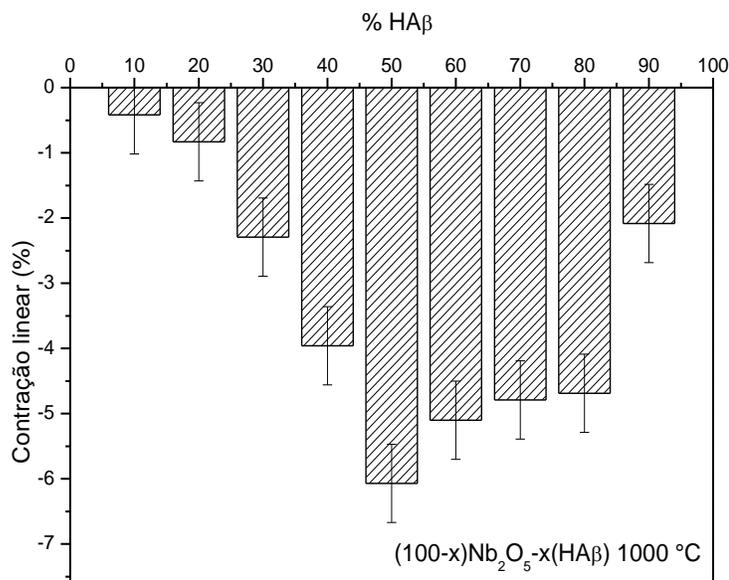


Figura 20. Contração linear (diametral) para as amostras do sistema  $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$  ( $x= 10, 20, 30,40,50,60, 70, 80, e 90$  vol.%) sinterizadas a  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h em atmosfera de ar.

#### 5.2.4. Densidade e porosidade em função da variação percentual de $HA\beta$

O efeito do aumento da concentração de  $HA\beta$  (vol.%) na densidade e na porosidade das amostras do sistema  $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$  é apresentado na Figura 21. Para a densidade há um aumento de  $2,0\text{ g/cm}^3$  na concentração de 10% de  $HA\beta$  para  $2,7\text{ g/cm}^3$  na concentração de 50%, correspondendo a um aumento relativo de  $\sim 28\%$ . A partir da concentração de 50% de  $HA\beta$  ocorre um decréscimo nos valores da densidade de  $2,7\text{ g/cm}^3$  com 50% para  $1,4\text{g/cm}^3$  com 90%, correspondendo a uma variação percentual de  $\sim 48\%$ . O valor da porosidade varia de 44% na concentração de 10% de  $HA\beta$ , atinge um mínimo com 50% (de  $\sim 29\%$ ) e uma porosidade de  $\sim 62\%$  para a concentração com 90% de  $HA\beta$ .

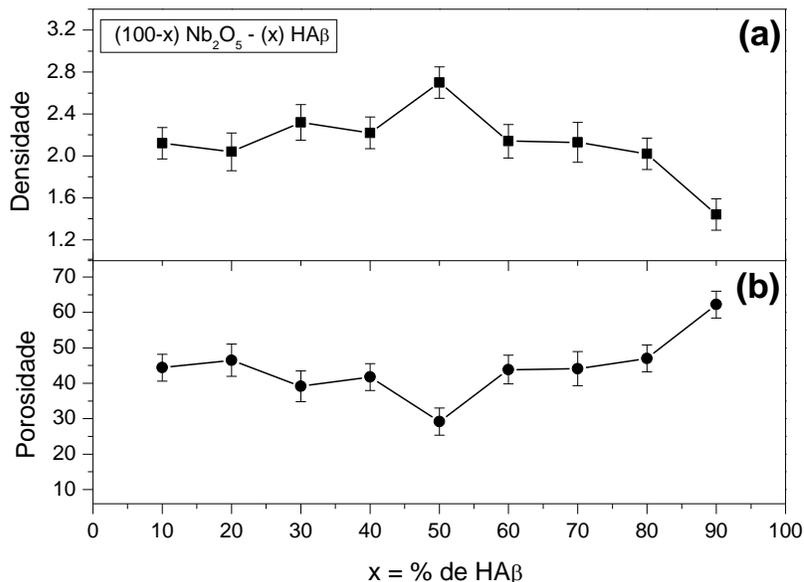


Figura 21. Densidade e porosidade para as amostras do sistema  $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$  ( $x= 10, 20, 30,40,50,60, 70, 80,$  e  $90$  vol.%), sinterizadas a  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  por  $2$  h em atmosfera livre.

Dentre essas composições para o sistema  $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$  que possuem seus pontos de fusão antecipados, a que possui o menor ponto de fusão, maior densificação e menor porosidade corresponde a composição com razão 1:1, ou seja,  $50\%Nb_2O_5$  e  $50\%HA\beta$ . Doravante, essa composição terá a nomenclatura *C5* (compósito *C5*), sendo a escolhida para a preparação das amostras nos procedimentos *in vivo* realizados neste trabalho, seja para amostras na forma densa (*bulk*) como também para as amostras porosas (*scaffold*).

### 5.2.5. Análise por difração de raios X do compósito *C5*

Na Figura 22 é mostrado o difratograma de raios-X do compósito *C5* sinterizado a  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  por  $2$  h em atmosfera de ar. Amostras produzidas com essa composição serão utilizadas na produção de amostras densas (*bulk*) e porosas (*scaffolds*) nos procedimentos de implantes *in vivo*.

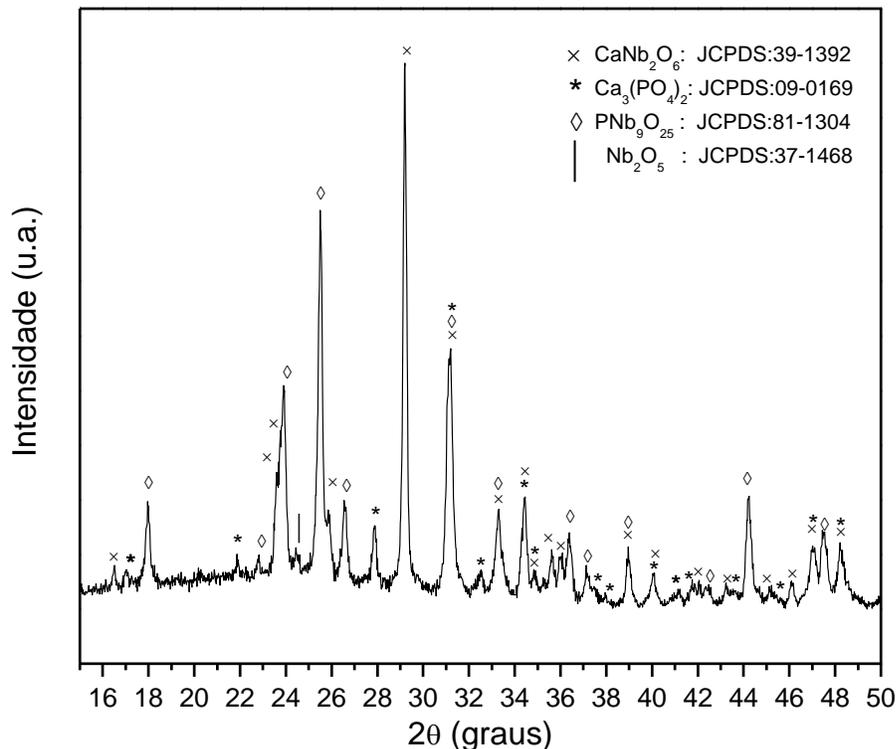


Figura 22. Padrões de difração para o compósito C5, sinterizado a 1000 °C por 2 h em atmosfera de ar. Fases identificadas: (|)  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , (X)  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$ , (H) HA,  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$  (◇) e (\*)  $\beta$ -TCP.

A identificação das fases foi realizada a partir do banco de dados JCPDS. Foram identificadas as seguintes fases cristalinas: (X) óxido de cálcio nióbio  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$  (Fersmita), (◇) óxido de fósforo nióbio  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$  e (\*)  $\beta$ - fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  que correspondem às fichas 39-1392-JCPDS, 81-1304-JCPDS e 09-0169-JCPDS, respectivamente. Além destas fases majoritárias, foi observado um pequeno pico em 24,4° que corresponde ao pico de 100% de intensidade da fase (|)  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  de acordo com a ficha 37-1468 - JCPDS. Dessa maneira, é possível perceber que o processo de sinterização do compósito C5 a temperatura de 1000 °C resultou na formação de três novas fases cristalinas. Todavia, uma quantidade residual de pentóxido de nióbio após a sinterização foi detectada. Essa quantidade é muito pequena, pois apenas o pico mais intenso do  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  foi detectado e, ainda assim, com baixa intensidade. Isso indica que praticamente toda a quantidade (%) de pentóxido de nióbio contribui nas transições para a formação das fases  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$  e  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$ . Além disso, observa-se que houve uma total decomposição da HA presente na cerâmica bifásica  $\text{HA}\beta$  para a fase  $\beta$ -TCP.

Segundo Muralithran e Ramesh, a decomposição da hidroxiapatita ocorre em temperaturas bem mais elevadas [103], no entanto, nenhum pico da HA foi observado nos difractogramas da

amostra C5 após o tratamento térmico a 1000 °C. A decomposição observada a esta temperatura pode ser decorrente do fato da composição contendo 50% de  $Nb_2O_5$  provocar uma antecipação das reações no processo de sinterização, conforme discutido anteriormente.

Em 2008, foi mostrado que vidros niobo-fosfato induziram a decomposição da hidroxiapatita estequiométrica, em fases  $\alpha$  e  $\beta$ -TCP [104]. Sendo assim, a decomposição do material em uma temperatura mais baixa provavelmente ocorreu devido à adição do Nióbio.

### 5.2.5.1. Refinamento estrutural pelo método de Rietveld do compósito C5

A proporção entre as fases cristalinas dos compósitos foi determinada por meio de refinamento estrutural utilizando o método de Rietveld. O modelo de espalhamento de raios X que melhor se ajustou ao padrão experimental obtido para esse compósito foi o seguinte: para a fase  $PNb_9O_{25}$ , uma estrutura tetragonal de grupo espacial  $I4/m$  foi aplicada. No caso da fase  $CaNb_2O_6$  a estrutura que proporcionou o melhor ajuste foi a ortorrômbica de grupo espacial  $Pbcn$ . Para as fases  $\beta$ -TCP e  $Nb_2O_5$ , as estruturas utilizadas foram as mesmas obtidas na identificação dos precursores, ou seja, hexagonal  $R3c$  e monoclinica  $P2$ , respectivamente.

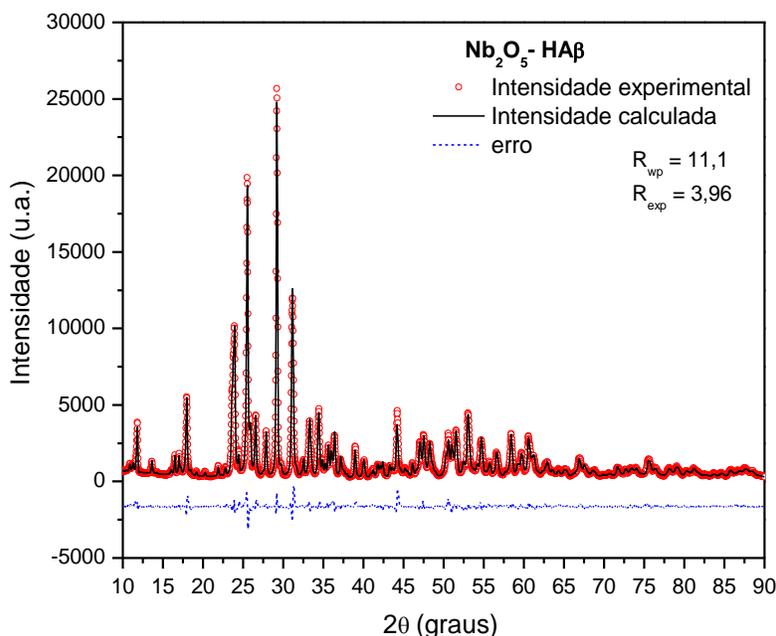


Figura 23. Perfis de difração de raios-X experimental e calculado e o erro (diferença entre os perfis), obtidos do refinamento da amostra C5, após a sinterização em 1000 °C por 2h em atmosfera de ar.

A boa concordância entre os padrões observado e calculado mostrada na Figura 23 é uma evidência de que as estruturas escolhidas para o refinamento são, de fato, as que compõem o compósito C5. As frações de volume (vol.%) obtidas do refinamento pelo método Rietveld estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Frações de volume (%) das fases cristalinas presentes na amostra C5, obtidas do refinamento pelo método de Rietveld.

Fase	Fração do volume (%)
$CaNb_2O_6$	34.46
$PNb_9O_{25}$	21.68
$Ca_3(PO_4)_2$	42.55
$Nb_2O_5$	1.31

### 5.2.6. Análise por espectroscopia Raman do compósito C5

As estruturas cristalinas obtidas do refinamento foram utilizadas como mecanismo auxiliar para as análises de espectroscopia Raman. Isso porque existe uma correlação entre os modos normais de vibração de um material com os poliedros de suas estruturas cristalinas, em particular, o comportamento do modo  $\nu_1$  que é dependente das conexões entre esses poliedros. Na Figura 24 é mostrado o espectro Raman da amostra C5 após o tratamento térmico a 1000 °C por 2 h em atmosfera de ar.

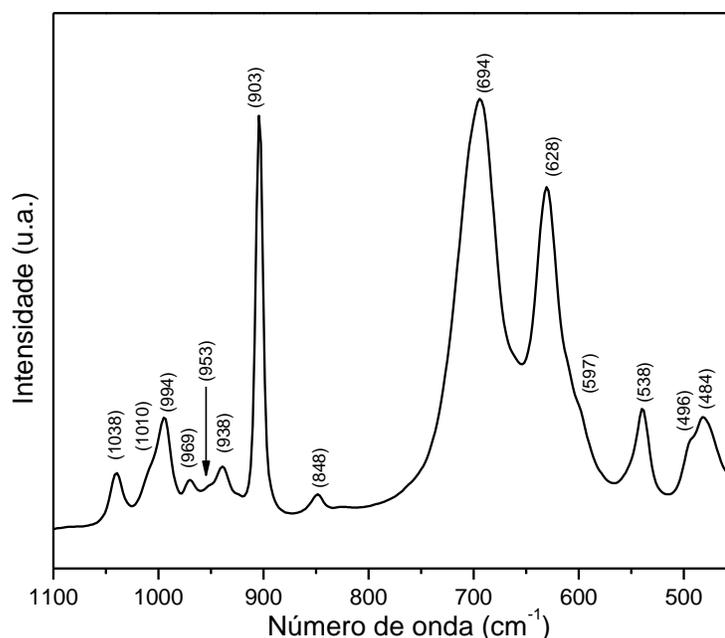


Figura 24. Espectro Raman da amostra C5 após o tratamento térmico em atmosfera livre a 1000 °C por 2h.

As bandas observadas em 903 e 848  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a modos normais de vibração  $\nu_1$  que ocorrem na fase  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$ . Modos  $\nu_3$  dessa fase são observados em 597 e 538  $\text{cm}^{-1}$  e os modos  $\nu_4$  identificados em 496 e 484  $\text{cm}^{-1}$ . A estrutura ortorrômbica  $Pbcn$  do  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$  possui octaedros  $\text{NbO}_6$ , cujas ligações podem ser do tipo corner e edge-shared [105,106]. Ao longo do eixo  $c$  existem “correntes” de octaedros  $\text{NbO}_6$ , todos conectados por edge-shared. Um canal se conecta com outro por corner-shared [105]. Por esse motivo, deve haver dois modos de vibração do tipo  $\nu_1$ . Um devido às ligações corner-shared e outro devidos às edge-shared.

Os picos relacionados à fase  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$  são observados em 1010, 694 e 628  $\text{cm}^{-1}$ , sendo o primeiro, atribuído ao modo de vibração  $\nu_1$  e os outros dois relacionados ao modo  $\nu_2$ . Um comportamento bastante incomum pode ser observado na intensidade relativa dessas bandas [97]. Geralmente, o modo de vibração  $\nu_1$  não possui baixa intensidade. No entanto, no espectro da Figura 24, é possível observar que os picos em 694 e 628  $\text{cm}^{-1}$  são bem mais intensos do que o pico em 1010  $\text{cm}^{-1}$ . Segundo McConnell e colaboradores, a causa deste efeito pode ser uma distribuição estatística de cátions sobre os sítios tetraedrais para dar um centro de simetria para o cristal, o que seria consistente com o grupo espacial  $I4/m$  da fase  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$  [97].

A banda em 994  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao modo de vibração  $\nu_1$  do precursor  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e está relacionada à pequena porcentagem deste material que não reagiu com a  $\text{HA}\beta$ . As bandas em 1038 e 938  $\text{cm}^{-1}$  podem estar relacionadas às ligações terminais do tipo  $\text{Nb} = \text{O}$ , que ocorre quando há distorções do octaedro  $\text{NbO}_6$  [107]. As bandas localizadas em 953 e 969  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao  $\beta$ -TCP [92], estando relacionadas ao modo de estiramento  $\nu_1$  de  $\text{PO}_4^{3-}$ , que é o mais intenso nessa fase. Nota-se claramente pela baixa intensidade desses picos que os modos de vibração referentes aos poliedros  $\text{NbO}_6$  e  $\text{NbO}_4$  das fases  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$  e  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$ , são bem mais expressivos na espectroscopia Raman do que os da fase  $\beta$ -TCP. Outro fato a se notar é que, embora a  $\text{HA}$  possua apenas o modo de vibração  $\nu_1$  centrado em 960  $\text{cm}^{-1}$ , no  $\beta$ -TCP são previstos dois picos (959 e 969  $\text{cm}^{-1}$ ) e um pequeno ombro em 962  $\text{cm}^{-1}$ . Isso ocorre porque, enquanto a hidroxiapatita pertencente ao grupo espacial  $P63/m$  e possui seis tetraedros de  $\text{PO}_4^{3-}$  cristalograficamente equivalentes em sua cela unitária, o  $\beta$ -TCP pertencente ao grupo espacial  $R3c$  e possui 42 tetraedros em sua cela, que não são cristalograficamente equivalentes. Há três “tipos” de tetraedros no  $\beta$ -TCP localizados em pontos genéricos do cristal e que diferem nas distâncias e ângulos das ligações intratetraedrais.

### 5.2.7. Propriedades físicas e mecânicas do compósito C5

Um dos objetivos para o desenvolvimento do compósito  $Nb_2O_5 - HA\beta$  foi a produção de um compósito cujas propriedades físicas e mecânicas fossem superiores às da hidroxiapatita pura e também da cerâmica bifásica  $HA\beta$ . Nesse contexto, esse objetivo foi alcançado. Os valores da densidade, porosidade e microdureza Vickers das amostras C5 e de  $HA\beta$  sinterizadas a 1000 °C por 2h em atmosfera de ar estão apresentados na Tabela 5. Observa-se um aumento relativo na densidade da ordem de 17% e, para a porosidade, um aumento menor, em torno de 7,5%, o que implica numa melhor sinteribilidade devido à adição do pentóxido de nióbio na cerâmica bifásica  $HA\beta$ . Isso pode ser observado no aumento relativo do valor de microdureza Vickers obtido para compósito C5 em relação à cerâmica bifásica  $HA\beta$  da ordem de 45% de  $1,07 \pm 0,3$  GPa para  $1,55 \pm 0,2$  GPa. Esse resultado mostra que a adição de 50% de  $Nb_2O_5$  na cerâmica bifásica  $HA\beta$ , produz um aumento relativo no valor da dureza da ordem de 45%.

Tabela 5. Densidade, porosidade e dureza Vickers, das amostras C5 e  $HA\beta$ , sinterizadas a 1000 °C por 2h em atmosfera de ar.

Amostra	Dureza Vickers (GPa)	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Porosidade (%)
C5	$1,55 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	29
$HA\beta$	$1,07 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,3$	27

### 5.2.8. Análise microestrutural por MEV do compósito C5

Na Figura 25 são apresentadas as micrografias de superfície e da secção transversal de fratura da amostra  $HA\beta$  e também do compósito C5 após o processo de sinterização a 1000 °C por 2h em atmosfera de ar.

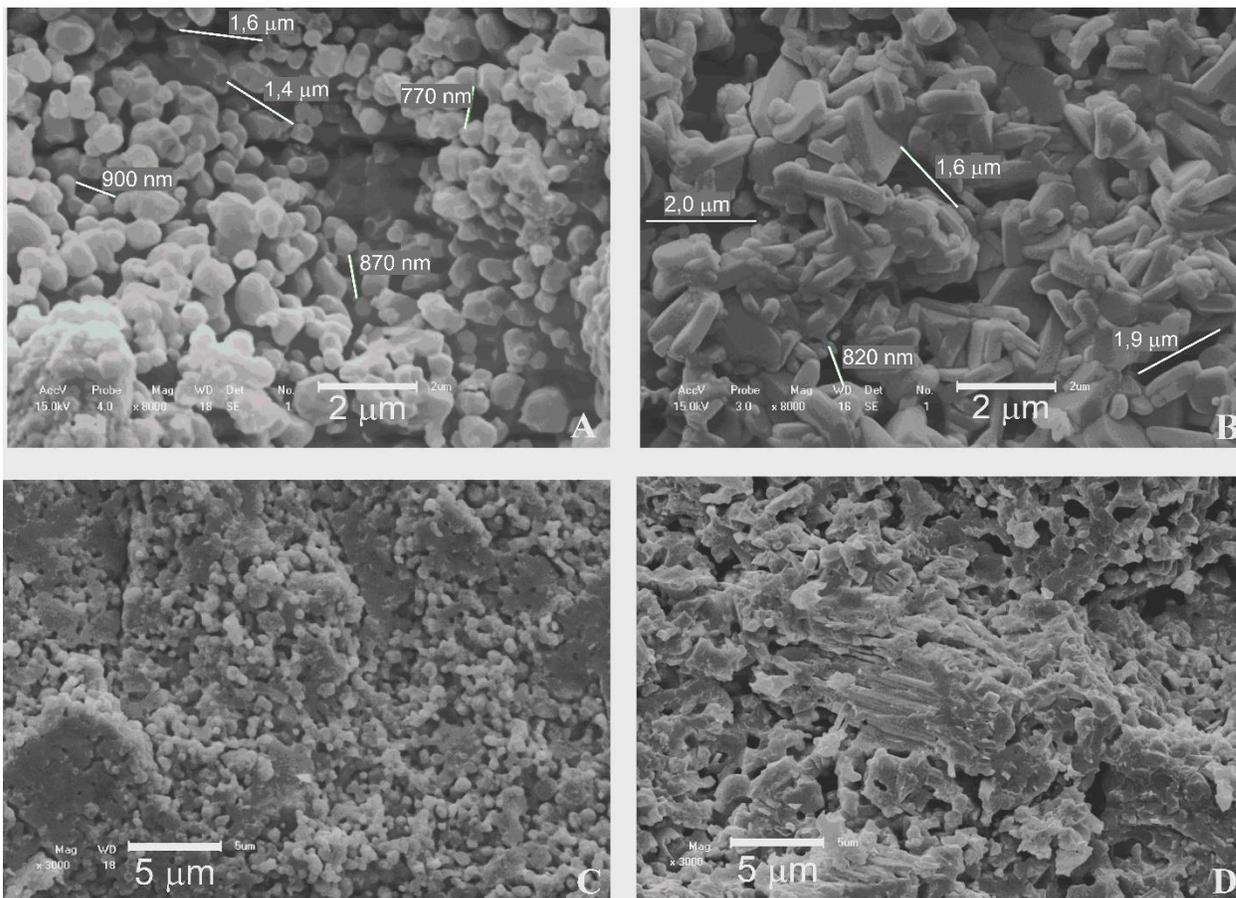


Figura 25. Micrografias da amostra  $HA\beta$  e do compósito  $C5$  após o processo de sinterização a  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2h em atmosfera de ar. (a) e (c) superfície e superfície de fratura da amostra  $HA\beta$ , respectivamente. (b) e (d) superfície e superfície de fratura do compósito  $C5$ , respectivamente.

No caso da superfície da amostra  $HA\beta$  [Figura 25(a)], a micrografia mostra um estado inicial de sinterização com o início de formação de pescoços e razoável grau de porosidade, com tamanho de poros num intervalo de  $0,3$  a  $1,6\text{ }\mu\text{m}$ . A micrografia da superfície do compósito  $C5$  mostrada na Figura 25(b) também mostra um estado inicial de sinterização, mas com uma morfologia de superfície diferente da observada na amostra  $HA\beta$ , sendo esta formada por uma estrutura com a presença de bastonetes e poros irregulares, cujos tamanhos são da ordem de  $1$  e  $2,5\text{ }\mu\text{m}$ .

As micrografias das superfícies de fratura das amostras  $HA\beta$  e  $C5$  são mostradas nas Figura 25(c) e (d), respectivamente. Observam-se em ambas as amostras uma fase inicial de sinterização com a formação de pescoços e pequenos núcleos de formação de grãos. Além disso, observa-se que a fratura ocorre predominantemente ao longo dos contornos de grão, ou seja, fraturas

intergranulares. As fraturas intergranulares são comuns em materiais frágeis e ocorrem na maioria dos materiais cerâmicos [20].

### **5.2.9. Implantes *in vivo* do compósito C5 e do controle HAβ**

#### **5.2.9.1. Avaliação histológica**

Nesse tópico serão apresentados os resultados das análises realizadas por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura para as amostras do compósito C5 e do controle HAβ, após o implante na calvária de ratos *Wistar*. Primeiramente, serão avaliados os efeitos da presença dos biomateriais C5 e HAβ em tecidos adjacentes ao implante para avaliação do potencial osteoindutor do compósito C5.

Na sequência, serão mostrados os efeitos de interação direta dos tecidos com os biomateriais e o potencial osteocondutor será discutido. Nas análises a amostra HAβ foi tratada como controle positivo.

#### **5.2.9.2. Análise do compósito C5 e da HAβ por microscopia de luz após o implante**

A primeira observação importante que deve ser feita acerca das análises dos defeitos é a seguinte: nos períodos de observação, em nenhum dos animais houve o desenvolvimento de uma resposta tecidual inflamatória e nem encapsulamento fibroso, o que deveria ocorrer, caso houvesse algum tipo de rejeição do biomaterial por parte do animal. Além disso, as margens ósseas adjacentes ao defeito sofreram remodelação durante todo o período de observação. Esse fenômeno está mostrado na Figura 26 e será discutido a seguir.

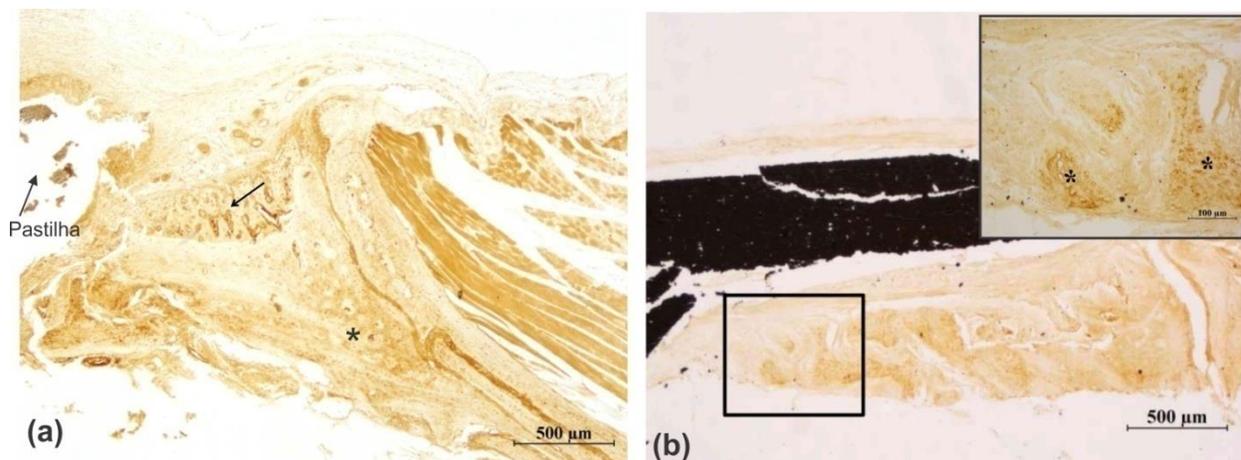


Figura 26. Fotomicrografia de defeitos na calvária de ratos: (a) preenchido com *HAβ* e (b) preenchido com *C5*. (a) a área de crescimento ósseo aposicional (seta). (a) e (b) regiões de remodelação óssea (\*). Coloração: osteocalcina.

Na Figura 26 (a) uma região de remodelação é mostrada para o defeito preenchido com *HAβ* após quinze dias de implante, e (b) para o compósito *C5* após trinta dias de implante. Essas regiões apresentam forte expressão de osteocalcina na matriz, em osteócitos e osteoblastos. Nas áreas de crescimento aposicional (crescimento de osso novo em cima de um osso pré-existente), esses mesmos elementos apresentaram maior intensidade de coloração para a osteocalcina [Figura 26(a) seta]. As áreas de remodelação do osso pré-existente provavelmente estavam sob a influência da desestabilização da calvária após remoção de parte da calota craniana. Além disso, outros fatores como a colocação do implante na forma de *bulk* somado à lenta reabsorção das pastilhas e ao acréscimo continuado de osso novo devem ter provocado constantes mudanças nas tensões musculares e no grau de mobilidade dos ossos remanescentes resultando em remodelação constante.

Na Figura 27 é possível observar centros de ossificação primária nos tecidos conjuntivos ao redor das pastilhas. Esses centros foram observados após sete dias no defeito preenchido com *HAβ* [Figura 27(a)], e após quinze dias, nos defeitos preenchidos com o compósito *C5* [Figura 27(b)]. O fato dos materiais (*HAβ* e *C5*) estimularem a formação desses núcleos “longe” do defeito pode indicar a propriedade de osteoindução dos mesmos. No entanto, sempre que havia um centro de ossificação primária, havia osteoclastos ao redor dos mesmos. Os osteoclastos são células que reabsorvem a matriz óssea e a sua presença pode ser justificada pelo fato de não existir um arcabouço para dar suporte à formação óssea. A região em destaque na Figura 27 (b), na qual podem ser observados diversos capilares e células, é um blastema ósseo que será discutido a seguir.

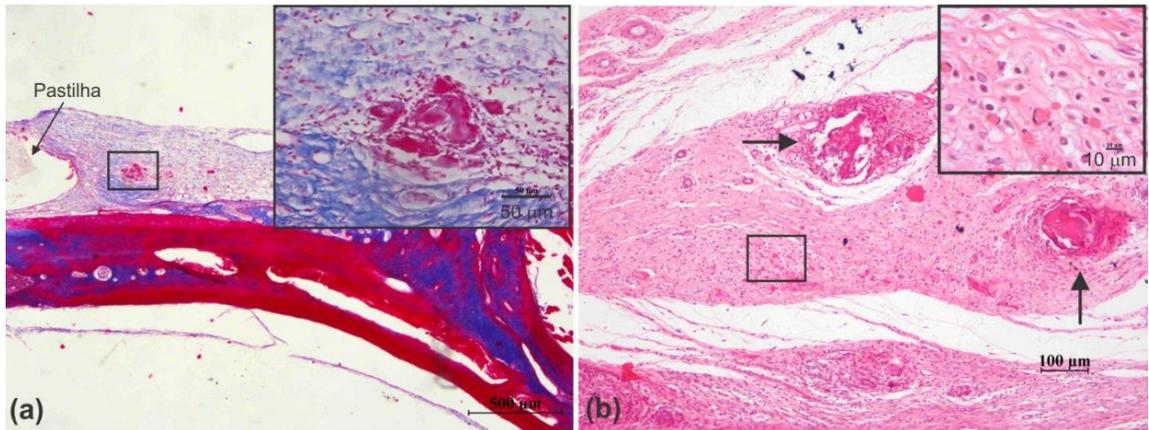


Figura 27. Fotomicrografia de defeitos na calvária de ratos: (a) preenchido com *HAβ* e (b) preenchido com *C5*. Em destaque na Figura 27 (a), um centro de ossificação primária. Em (b) a região em destaque corresponde a um blastema ósseo e as regiões com setas, a centros de ossificação primários. Coloração: (a) Azan, (b) H&E.

Na Figura 28 (a) e (b) são mostradas fotomicrografias dos defeitos na calvária de dois diferentes ratos 15 dias após o preenchimento com o compósito *C5*. A região da Figura 28 (b) corresponde à mesma região mostrada na Figura 27 (b). No perióstio<sup>5</sup> dos defeitos preenchidos com o compósito, foram observados grupos de células imunocoradas para osteocalcina, com organização tal que se assemelha a blastemas ósseos<sup>6</sup>. Para os animais analisados, essa configuração de blastema apareceu somente para defeitos preenchidos pelo compósito *C5*.

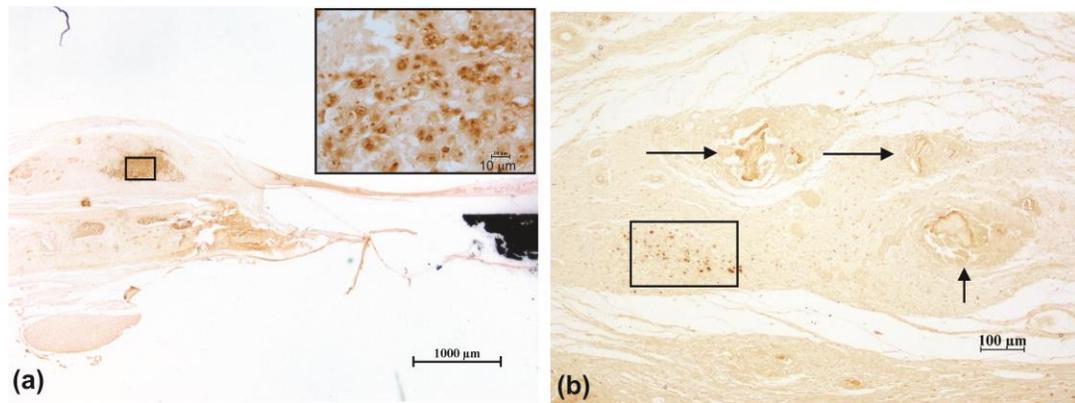


Figura 28 (a) e (b).Fotomicrografias dos defeitos na calvária de ratos 15 dias após o preenchimento com o compósito *C5*. As regiões em destaque são blastemas ósseos e as regiões com seta, centros de ossificação primária. Coloração: osteocalcina

<sup>5</sup>Perióstio: Membrana de tecido conjuntivo que envolve os ossos.

<sup>6</sup>Blastema ósseo: Conjunto de células mesenquimais, provenientes da medula óssea, em processo de diferenciação celular para posterior formação de matriz óssea.

A análise do corte, corados com H&E para uma mesma região [Figura 27 (b)], mostrou que na região onde ocorre o blastema há uma grande quantidade de capilares. Além disso, a comparação entre as duas imagens apontou para a formação de centros de ossificação primária a partir dos blastemas. Ou seja, os centros de ossificação seriam um estágio de evolução dos blastemas. Portanto, esses resultados sugerem que além de apresentar potencial osteoindutor, o compósito C5 apresentou potencial para induzir a formação óssea no tecido conjuntivo em locais mais distantes daquele da regeneração.

Outra evidência para o potencial osteoindutor tanto do compósito quanto para a *HAβ* foi a presença de células imunocoradas por osteocalcina na medula óssea e no periósteo dos animais (Figura 29). As células tronco-mesenquimais da medula óssea são células extremamente indiferenciadas. A imunocoloração dessas células indica que as mesmas provavelmente se diferenciarão em osteoblastos para posteriormente depositar matriz óssea. Esse fenômeno é uma evidência clara de osteoindução.

Figura 29 (a) e (b). Fotomicrografias dos defeitos na calvária de ratos preenchidos com: (a) e (c) *HAβ* 45 e 30 dias após o implante, respectivamente. (b) e (d) C5, 15 dias após o implante. Notar as células imunocoradas com osteocalcina (setas). Coloração: osteocalcina

Ademais, a dura-máter dos animais de ambos os grupos apresentou neoformações ósseas intramembranas com forma elíptica localizadas em áreas centrais do defeito, sem nenhuma conexão com as margens (Figura 30). Essas estruturas apresentaram coloração positiva para osteocalcina na região mais periférica.

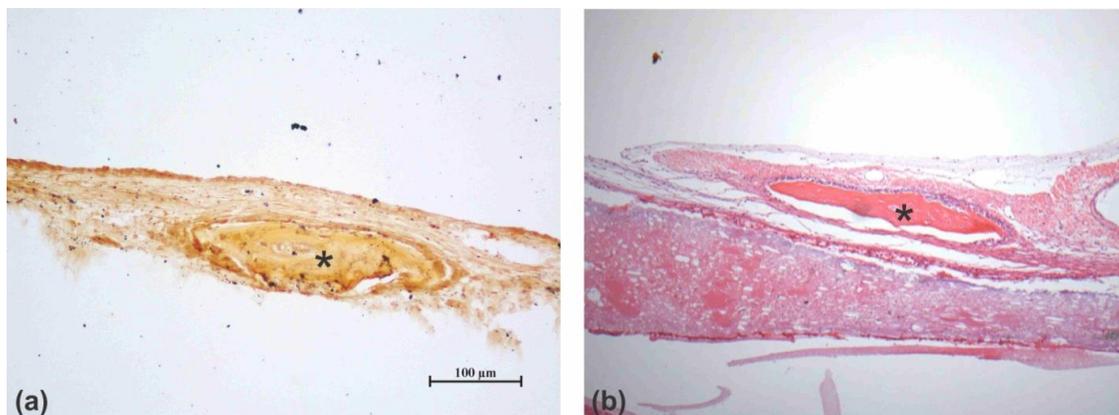


Figura 30. Formações ósseas intramembranas(\*) na duramater: (a) 15 dias após o implante do compósito C5 e (b) 30 dias após o implante da *HAβ*. Coloração (a) osteocalcina e (b) H&E.

A partir de agora, a interface osso-biomaterial será discutida para diferentes períodos de implantação. Na Figura 31 são mostradas fotomicrografias do defeito preenchido com a cerâmica *HAB* (a) e (b) e do compósito *C5* (c) e (d) 30 dias após os implantes. Nas Figura 31 (a) e (c) é possível observar uma fina camada acelular sobre as pastilhas (\*). Essa camada é caracterizada como uma linha de cimento. Na coloração H&E, a linha de cimento pode ser visualizada como uma banda basofílica, não colagenosa, de osso descalcificado [108]. Originalmente, essa estrutura foi descrita como uma linha encontrada em sítios de remodelação na interface entre o osso novo e o velho. A linha de cimento é produzida pelas células osteogênicas em diferenciação e é composta de duas proteínas não colagenosas, a osteopontina e a sialoproteína óssea, que fornecem locais específicos para deposição de fosfato de cálcio [109,110]

Na Figura 31(a) é possível notar ainda vasos sanguíneos e células osteogênicas (seta) depositadas diretamente sobre a superfície da pastilha. Na Figura 31(b) nota-se a deposição de matriz óssea diretamente sobre a superfície da amostra *HAB* sinalizando um efeito de osteocondução. Na Figura 31 (d) há um íntimo contato entre o compósito e o osso neo-formado.

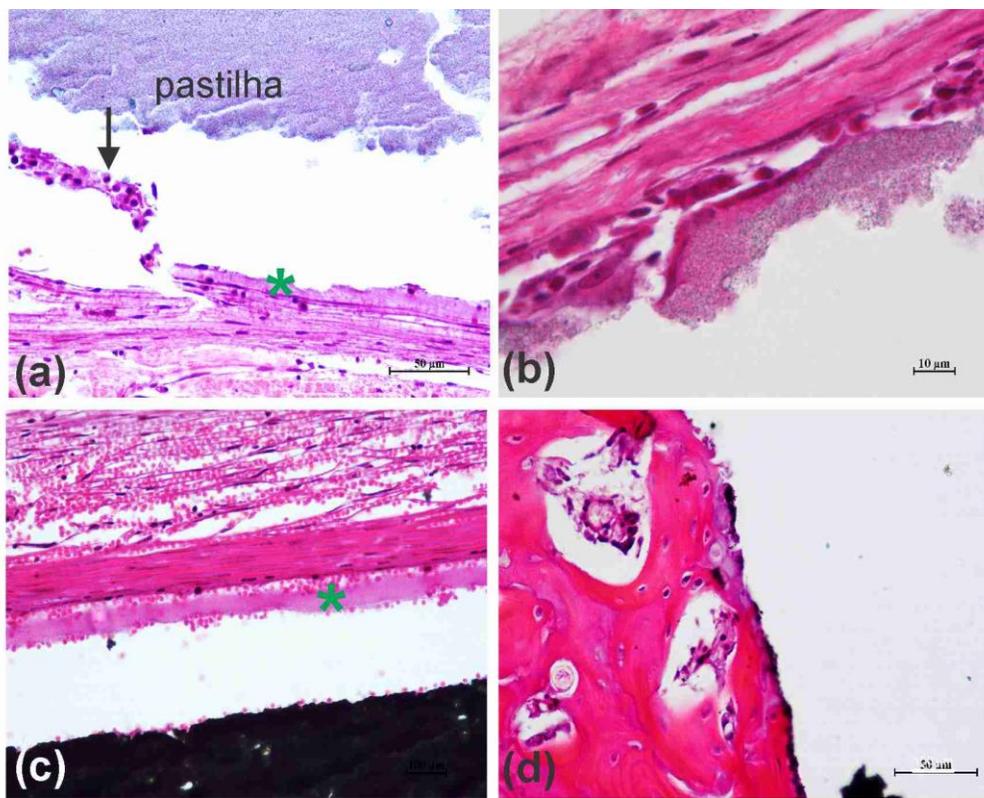


Figura 31. Fotomicrografia do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 30 dias após o implante de *HAB* [(a) e (b)] e do compósito *C5* [(c) e (d)]. Notar em (a) vasos sanguíneos e células osteogênicas (seta) em (a) e (c) linha de cimento (\*).

Na Figura 32 são mostradas as fotomicrografias do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 45 dias após o implante de *HAB* [(a)-(c)] e de *C5*[(d)-(f)]. Na Figura 32 (a) pode-se observar o defeito quase completamente preenchido por osso localizado sob o biomaterial. Em (b), uma ampliação da Figura (a), é possível observar no osso neo-formado uma área em contato direto com a pastilha. Em (c), podemos observar a deposição de matriz óssea diretamente sobre a superfície da pastilha (seta) o que novamente indica osteocondução. Nos defeitos preenchidos com o compósito, alguns defeitos apresentaram-se quase completamente fechados (d) e observou-se o contato direto do osso neo-formado com a pastilha do compósito (e), o que novamente indica que esse material apresenta atividade osteocondutora. Em (f) nota-se que a pastilha se encontra bem encaixada no defeito e que o osso neo-formado se adere intimamente ao material.

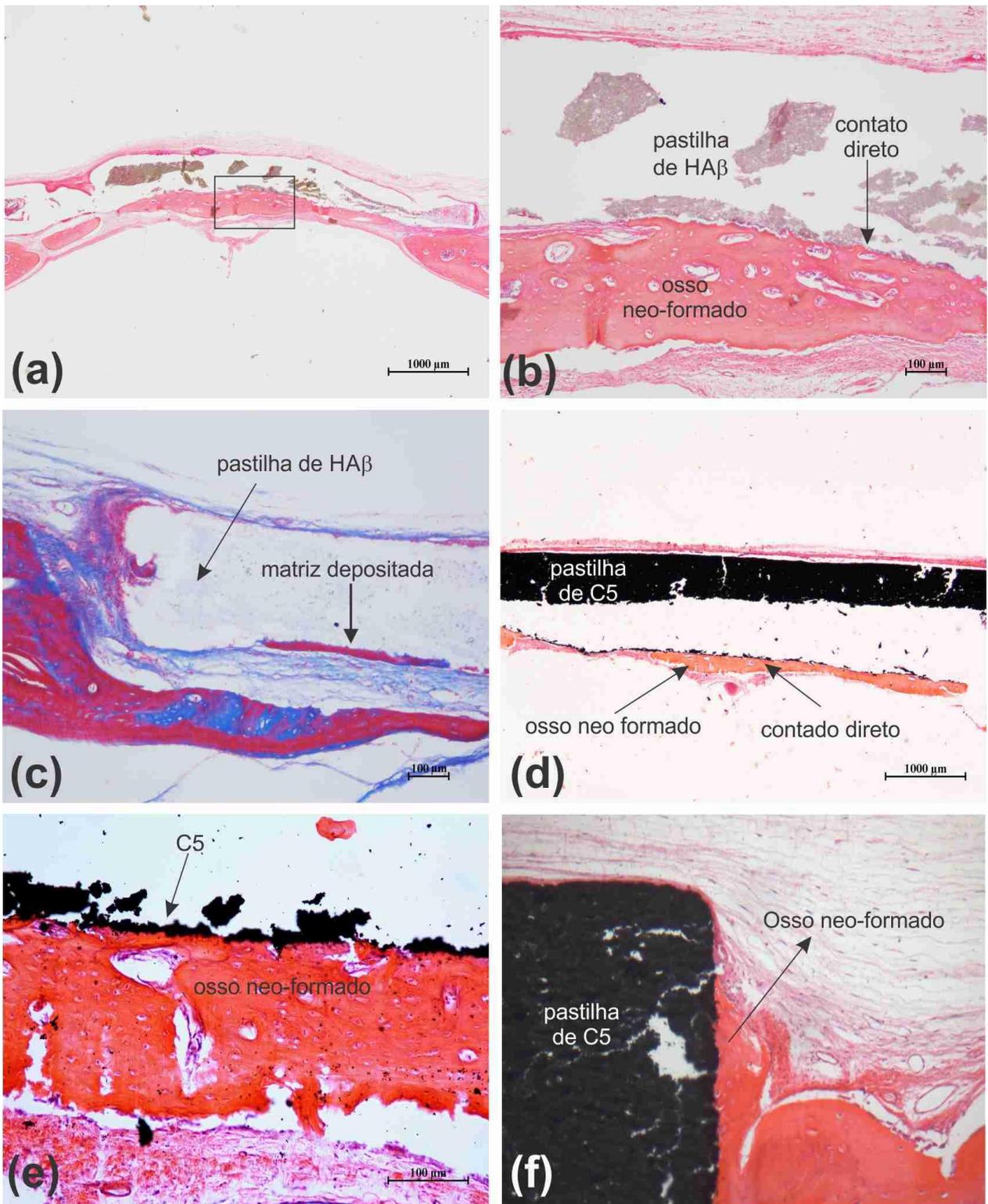


Figura 32. Fotomicrografia do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 45 dias após o implante de uma pastilha HAβ [(a)-(c)] e do compósito C5 [(d)-(f)]. Coloração [(a), (b), (d) – (f)] H&E, (c) Azan.

Os tecidos periféricos aos implantes apresentaram-se muito vascularizados e com a presença de células osteogênicas, além disso, não houve o desenvolvimento de resposta inflamatória típica. Todas essas evidências demonstram que o compósito foi bioativo e que ocorreu uma ligação interfacial entre o tecido ósseo e o implante.

Na Figura 33 são mostradas as fotomicrografias do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 60 dias após o implante com *HAβ* (a) e (b) e com o compósito *C5* (c) e (d). Nesse período, foram encontradas diversas regiões de intenso contato entre o tecido ósseo e as amostras. Essas regiões foram observadas tanto para as peças de *HAβ* como para as de *C5*. Nas Figura 33 (a) e (c) é possível observar a presença de vasos sanguíneos no interior de ambas as amostras. Esses vasos foram observados penetrando cerca de algumas dezenas de microns nas amostras. Acredita-se que o fato dessas amostras terem somente poros micrométricos, da ordem de 2μm, dificultou a entrada dos vasos sanguíneos para o interior das amostras limitando a interação dos tecidos ósseos com os biomateriais. Nas Figura 33 (b) e (d) é possível observar algumas células e matriz óssea penetrando os primeiros microns da *HAβ* e do *C5*.

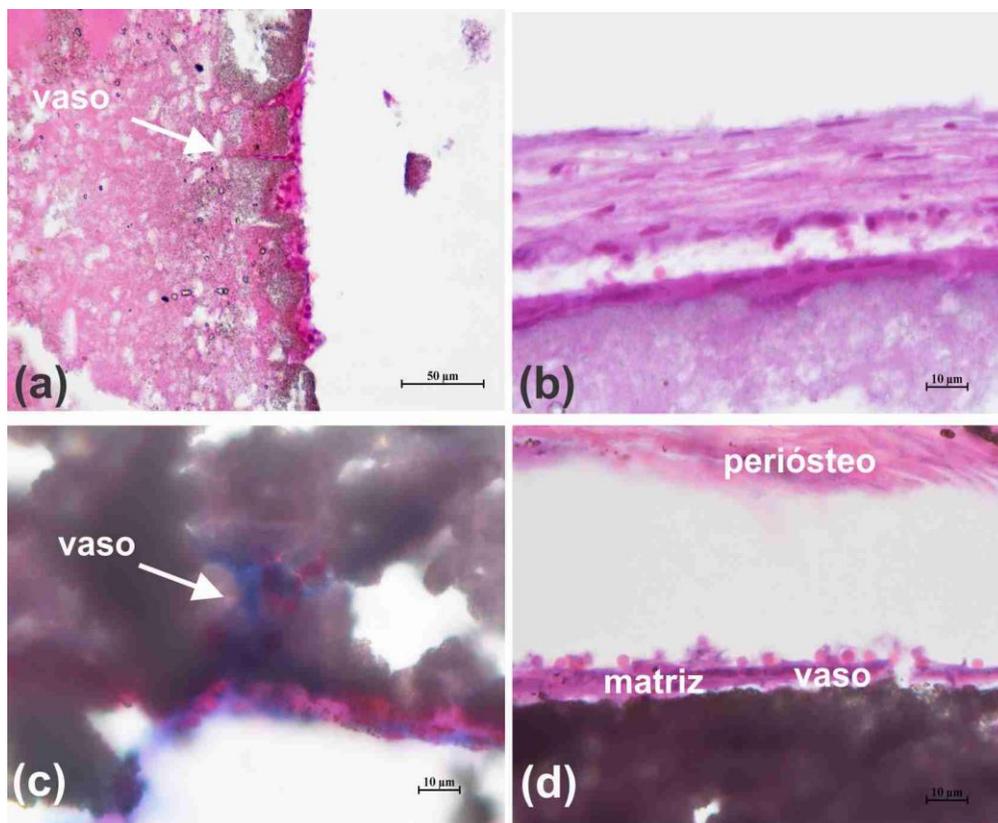


Figura 33. Fotomicrografia do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 60 dias após o implante de uma pastilha *HAβ* (a) e (b) e do compósito *C5* (c) e (d).

### 5.2.9.3. Análise do compósito *C5* e da *HAB* por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Neoformações ósseas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. Para essas análises, os tecidos moles e as pastilhas foram cuidadosamente removidos do defeito e a superfície da região de formação óssea foi metalizada com um filme condutor de ouro. Duas das regiões com neoformações são mostradas na Figura 34 (a) e (c), para o período de 15 dias de implante. Nessa Figura, as amostras com neoformações após a retirada das pastilhas de *C5* e *HAB* apresentam uma morfologia não regular em ambas as amostras. Todavia, esse efeito é mais expressivo para o compósito *C5* do que para a *HAB* sendo que duas nucleações ósseas são claramente observadas (\*).

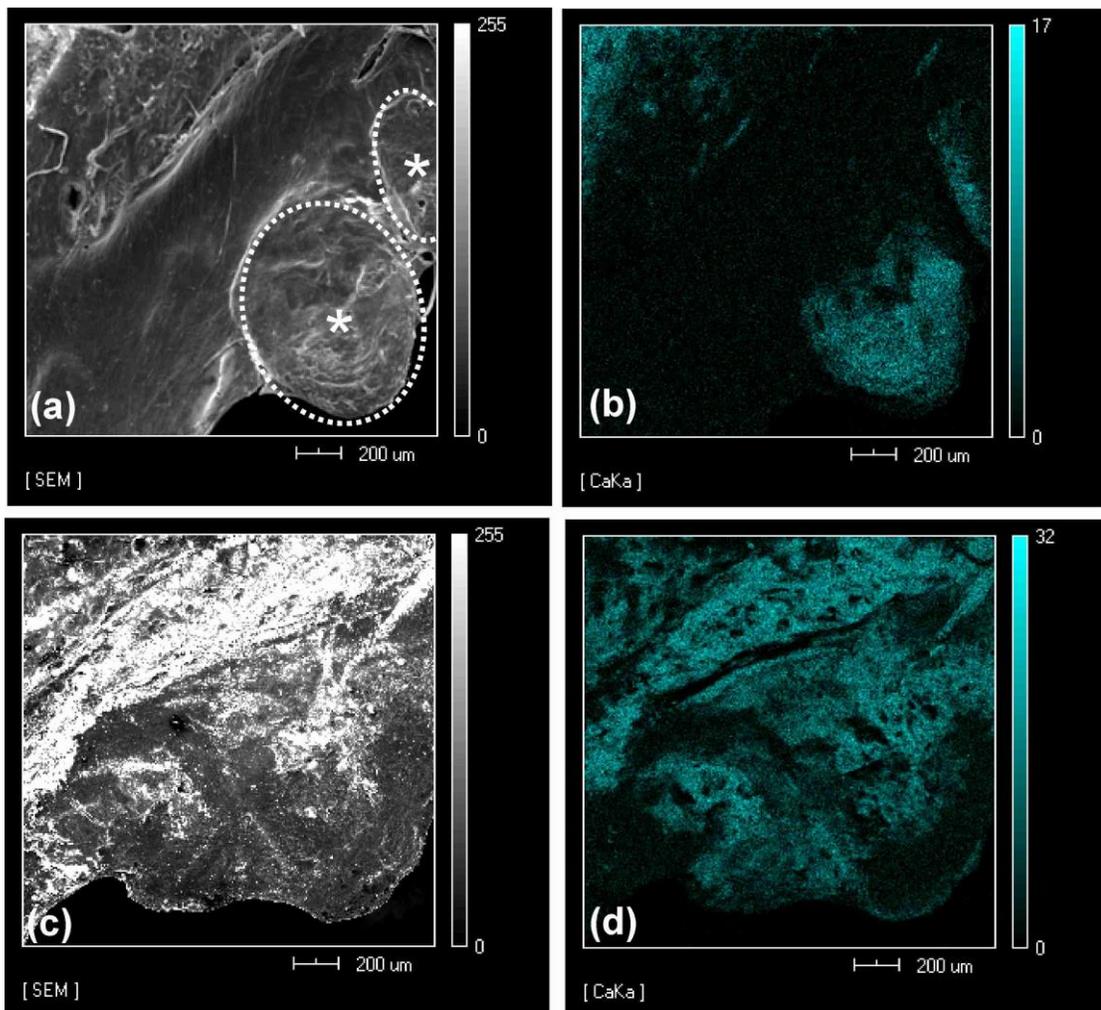


Figura 34. (a) e (c) Micrografia de uma formação óssea em um defeito ósseo após 15 dias de implante e após a remoção das pastilhas do compósito *C5* e da *HAB*, respectivamente. (b) e (d) mapeamento por EDS do elemento Ca para as regiões mostradas em (a) e (c), respectivamente.

O mapeamento do elemento cálcio nessas regiões de formação óssea foi obtido por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) e está mostrado na Figura 34 (b) e (d). Esse mapeamento mostrou uma distribuição muito diferente de cálcio em diferentes regiões dos ossos neoformados. Acredita-se que as regiões em que osso aparece mais mineralizado (regiões em ciano) podem ser pontos de contato entre o osso e o biomaterial. Em contrapartida, nas regiões onde não há contato, a mineralização é menor. Dessa maneira, os biomateriais ocorrem como “fontes de minerais” para a formação do osso, facilitando o estágio de mineralização do mesmo. Estruturas como estas também foram observadas aos 30 e 45 dias, sendo que formações ósseas dessa natureza não ocorreram de forma homogênea para todas as amostras analisadas.

O potencial osteocondutor dos biomateriais foi novamente observado na micrografia de superfície das amostras do controle *HAB* e do compósito *C5*, após 60 dias de implante. Na Figura 35 são mostradas imagens dessas superfícies para a amostra controle (a) *HAB* e para o compósito (b) *C5*. Para esse período, é possível observar que as superfícies de ambas as amostras encontram-se quase que completamente recobertas por matriz óssea.

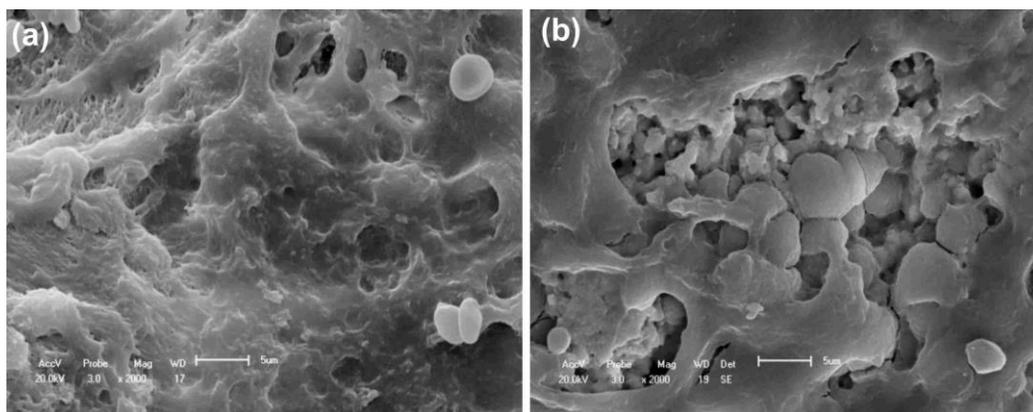


Figura 35. Micrografia da superfície da pastilha de: (a) *HAB* e (b) *C5*, 60 dias após a remoção das pastilhas dos defeitos.

Do ponto de vista biológico, o compósito *C5* e a amostra *HAB* na forma de *bulk*, apresentaram os requisitos necessários para serem utilizados como substitutos ósseos. Isto é, os resultados anteriores para esses materiais mostraram que eles foram bioativos, biocompatíveis e promoveram osteocondução, osteoindução e osseointegração quando implantado em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos. Além disso, uma grande quantidade de vasos sanguíneos e células osteogênicas foram observadas na superfície dos materiais, demonstrando uma intensa atividade para a formação óssea. Entretanto, alguns fatores observados ao longo do tempo demonstraram algumas dificuldades para o emprego desse material em determinados tipos de aplicação, na qual uma

recuperação mais rápida do tecido é desejada. Exemplos desses fatores são a entrada de vasos sanguíneos a poucos microns da superfície das pastilhas e o fato dos tecidos aparecerem sempre circun-adjacentes à superfície dos biomateriais e não no interior dos mesmos. Esses eventos possivelmente ocorreram pela falta de um grau adequado de porosidade das pastilhas o que dificultou a migração de células e tecidos para o seu interior.

Acredita-se que se o material possuísse uma porosidade maior, ele serviria como um arcabouço para que os tecidos adentrassem no seu interior promovendo uma maior interação com o biomaterial. Além disso, a ausência de tal arcabouço para dar suporte ao osso justificaria a presença do grande número de osteoclastos reabsorvendo a matriz neoformada como é o caso, por exemplo, dos centros de ossificação primária mostrados na Figura 27.

Esses fatores motivaram nossas tentativas de estudar os mesmos biomateriais ( $Nb_2O_5$ - $HA\beta$  e  $HA\beta$ ) na forma de um arcabouço poroso tridimensional (elemento poroso) comumente chamado de *scaffold*.

### **5.3. Parte III: Análise do compósito C5 e da cerâmica bifásica $HA\beta$ em função da temperatura de sinterização**

#### **5.3.1. Análise Térmica diferencial (DTA)**

O primeiro passo para a escolha da melhor temperatura de sinterização foi analisar detalhadamente a curva de DTA da amostra C5, observando tanto a etapa de aquecimento quanto a de resfriamento, como mostrado na Figura 36.

Na curva de aquecimento [Figura 36(a)] é possível observar seis regiões de transição de fase. Três delas relacionadas a mudanças estruturais de fases cristalinas ( $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$ ) e três relacionadas ao processo de fusão de cada uma dessas fases. É possível notar claramente que a linha de base antes e após as transições  $T_1$  e  $T_2$  é diferente. Na curva de resfriamento [Figura 36(b)], ao contrário do que ocorre na curva de aquecimento, apenas três picos são observados. Esses picos estão relacionados ao processo de solidificação das três fases cristalinas existentes no material. Ademais, enquanto a fusão das fases é um processo reversível, as transições de estrutura são irreversíveis. Assim, uma fase obtida em um tratamento térmico na amostra C5 deve se manter a mesma após o resfriamento.

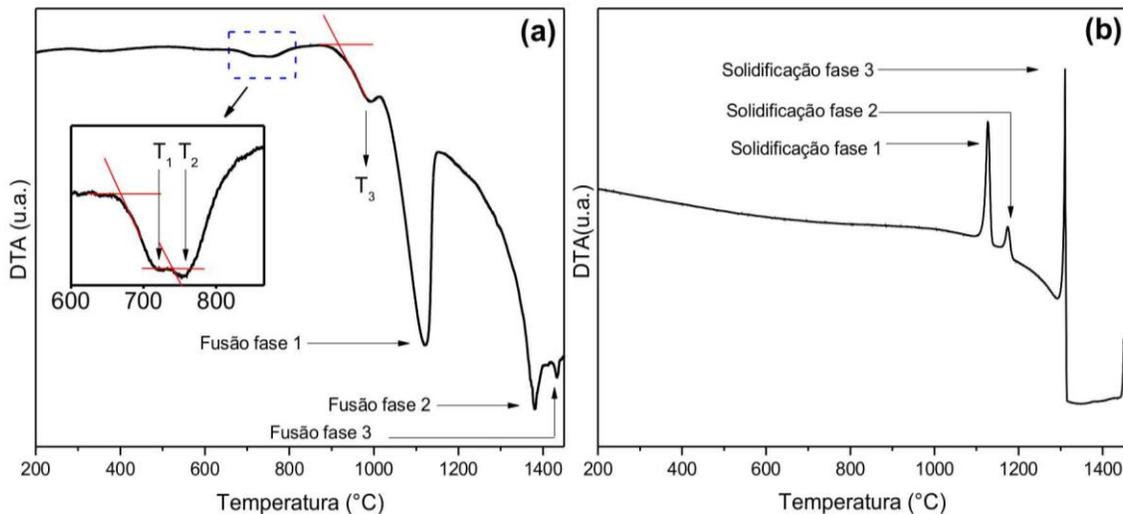


Figura 36. Curvas de DTA de: (a) aquecimento e (b) resfriamento entre 200 a 1450 °C para o compósito C5, após o processo de moagem por 3h a 300 rpm. (a) inserção: região entre 600 e 865 °C (quadro azul) mostrada com ampliação. T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>: transições estruturais.

A Análise Térmica Diferencial (DTA) é uma importante ferramenta para se determinar as temperaturas de transição de fase em materiais. Todavia, somente com essa técnica é impossível dizer qual é a transição que ocorre. Dessa maneira, optou-se por uma caracterização por difração de raios X e espectroscopia Raman das amostras do compósito C5, sinterizadas em diferentes temperaturas, não somente com o objetivo de escolher a melhor temperatura de sinterização, mas também para descobrir que fases são formadas em T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>.

### 5.3.2. Análise por difração de raios X do compósito C5 em função da temperatura

Na Figura 37 são mostrados os padrões de difração de raios X do compósito C5 sinterizado nas temperaturas de 650, 700, 750, 800, 850 e 900 °C. Na sequência, na Figura 38, são também apresentados os difratogramas referentes às temperaturas de: 950, 1000, 1050, 1100, 1120, 1130 e 1150°C.

As fases foram identificadas novamente com o uso do padrão JCPDS. Observa-se que para todas as temperaturas, muitos picos de distintas fases se sobrepõem, e isso dificulta significativamente a identificação das mesmas. Ainda assim, alguns comportamentos podem ser observados. Na temperatura de 650 °C os picos que aparecem são basicamente os das fases precursoras Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, HA, β-TCP, acompanhados de uma pequena reflexão em 2θ = 29,2°, relacionada

ao pico de 100% de intensidade da fase  $CaNb_2O_6$ . Nas temperaturas seguintes, observa-se um aumento progressivo dos picos dessa fase em relação às outras. Além disso, a partir de 750 °C, os picos da hidroxiapatita que não estão sobrepostos com os de outra fase desaparecem, ao passo que, os picos da fase  $\beta$ -TCP aumentam significativamente. A partir de 950 °C (Figura 38), ocorre uma diminuição expressiva dos picos da fase  $Nb_2O_5$ , mas, uma nova fase ( $PNb_9O_{25}$ ) aparece. A partir de 1050 °C os picos da fase  $Nb_2O_5$  são completamente eliminados. Por fim, podemos observar que na faixa compreendida entre 1050 e 1150 °C o compósito C5 é composto pelas fases:  $PNb_9O_{25}$ ,  $CaNb_2O_6$  e  $\beta$ -TCP.

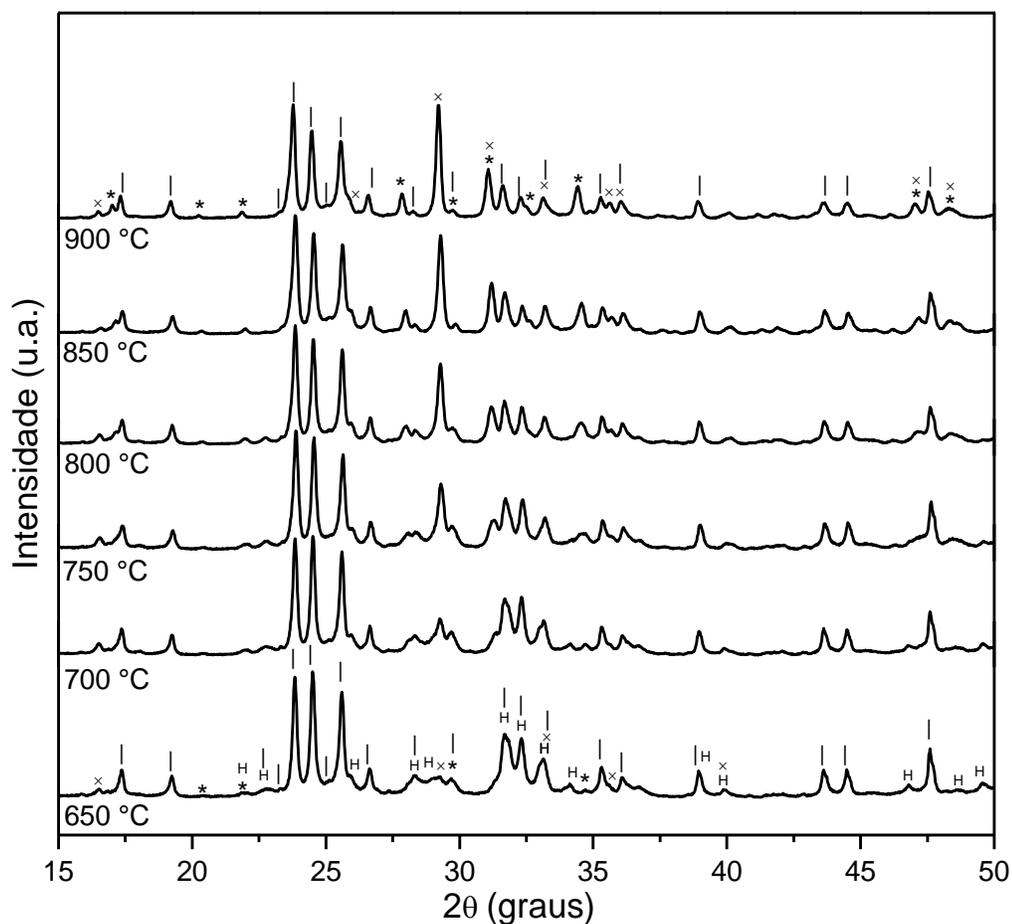


Figura 37. Padrões de difração de raios X para o compósito C5 sinterizados por 2h em atmosfera de ar, em diferentes temperaturas no intervalo entre 650 e 900 °C: (|)  $Nb_2O_5$ , (X)  $CaNb_2O_6$ , (H) HA e (\*)  $\beta$ -TCP.

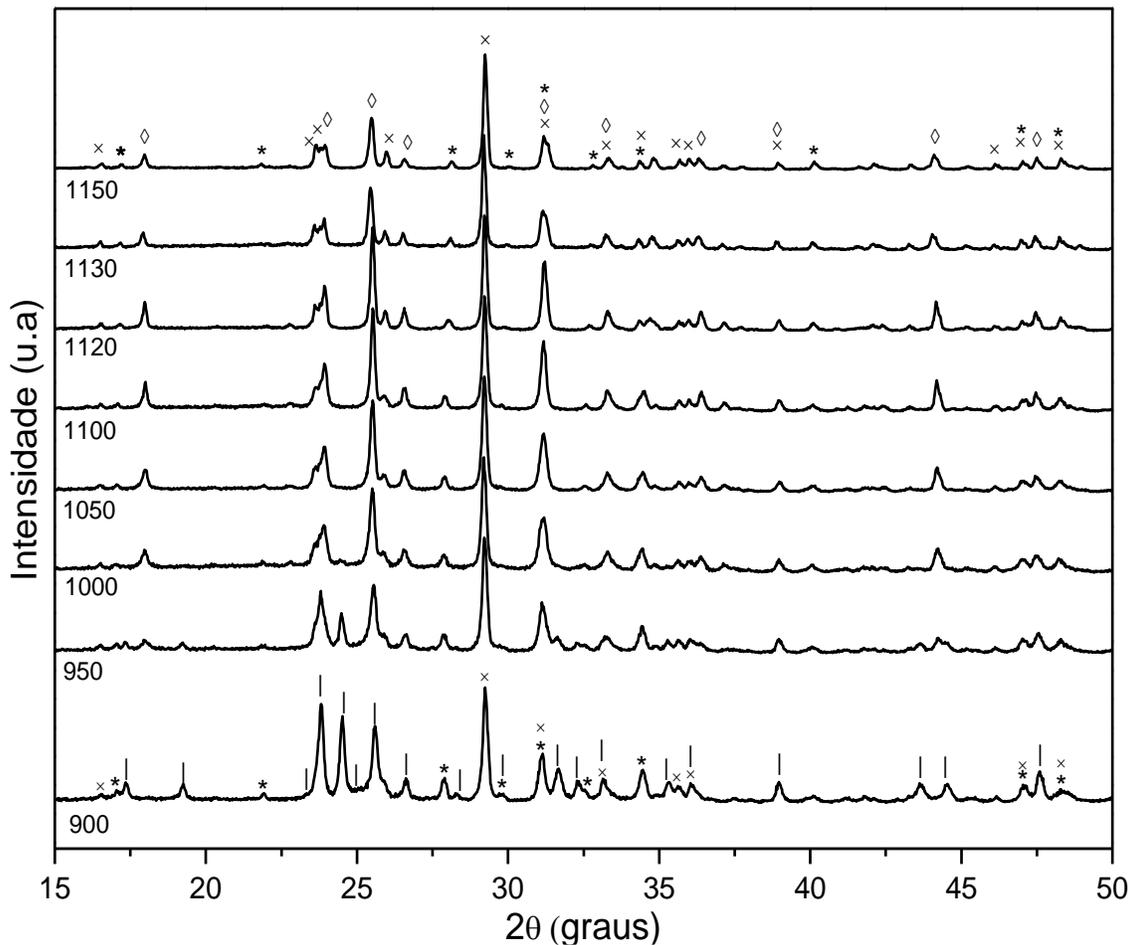


Figura 38. Padrões de difração para o compósito *C5* sinterizados por duas horas em diferentes temperaturas entre 900 e 1150 °C: (|)  $Nb_2O_5$ , (X)  $CaNb_2O_6$ , (◇)  $PNb_9O_{25}$  e (\*)  $\beta$ -TCP.

### 5.3.2.1. Refinamento pelo método de Rietveld

O método utilizado para a quantificação das fases cristalinas foi, novamente, o método de Rietveld. Todavia, antes que o método fosse empregado, uma certificação com respeito à presença das fases descritas anteriormente, foi realizada via análise por espectroscopia Raman.

A difração de raios X é um eficiente método para a identificação de fases cristalinas, todavia, quando há várias fases cristalinas podem ocorrer muitas sobreposições e isso dificulta a caracterização da estrutura do material. Dessa maneira, optou-se por realizar as análises de espectroscopia Raman, antes do refinamento estrutural, pelo fato dos difratogramas conterem uma grande quantidade de picos sobrepostos, especialmente para as temperaturas inferiores a 1000 °C.

A espectroscopia Raman é uma técnica extremamente sensível e pode ser utilizada como mecanismo complementar na identificação de fases cristalinas.

### **5.3.3. Análise por espectroscopia Raman do compósito C5 sinterizado em diferentes temperaturas**

Na Figura 39 é possível observar os espectros Raman da cerâmica bifásica  $HA\beta$ , do pentóxido de nióbio ( $Nb_2O_5$ ) e também do compósito C5 sinterizado em diferentes temperaturas entre 650 e 900 °C por 2h em atmosfera de ar. Para o compósito C5 as bandas relativas ao  $Nb_2O_5$  e localizadas em 994, 675, 661, 630, 611, 551 e 473  $cm^{-1}$ , ocorrem para todas as temperaturas de sinterização citadas. Por outro lado, a banda da HA em 961  $cm^{-1}$  ocorre somente para as temperaturas de 650 e 700 °C. As bandas localizadas em 903, 847, 538, 496 e 484  $cm^{-1}$  são características dos modos de vibração  $Nb-O$  da fase Fersmita ( $CaNb_2O_6$ ) [105] e aumentam com a temperatura em relação às outras bandas. Além disso, possivelmente as ligações  $Nb-O$  são mais ativas na espectroscopia Raman do que as do tipo  $P-O$ . Isso pode ser observado pelo fato de que a única banda da HA que aparece é a localizada em 961  $cm^{-1}$ . Contudo, esta é a banda mais intensa dessa fase e, ainda assim, ocorre com baixa intensidade. O mesmo ocorre para as bandas  $P-O$  da fase  $\beta-TCP$  em 953 e 971  $cm^{-1}$ , que aparecem no lugar da banda da HA a partir de 800 °C.

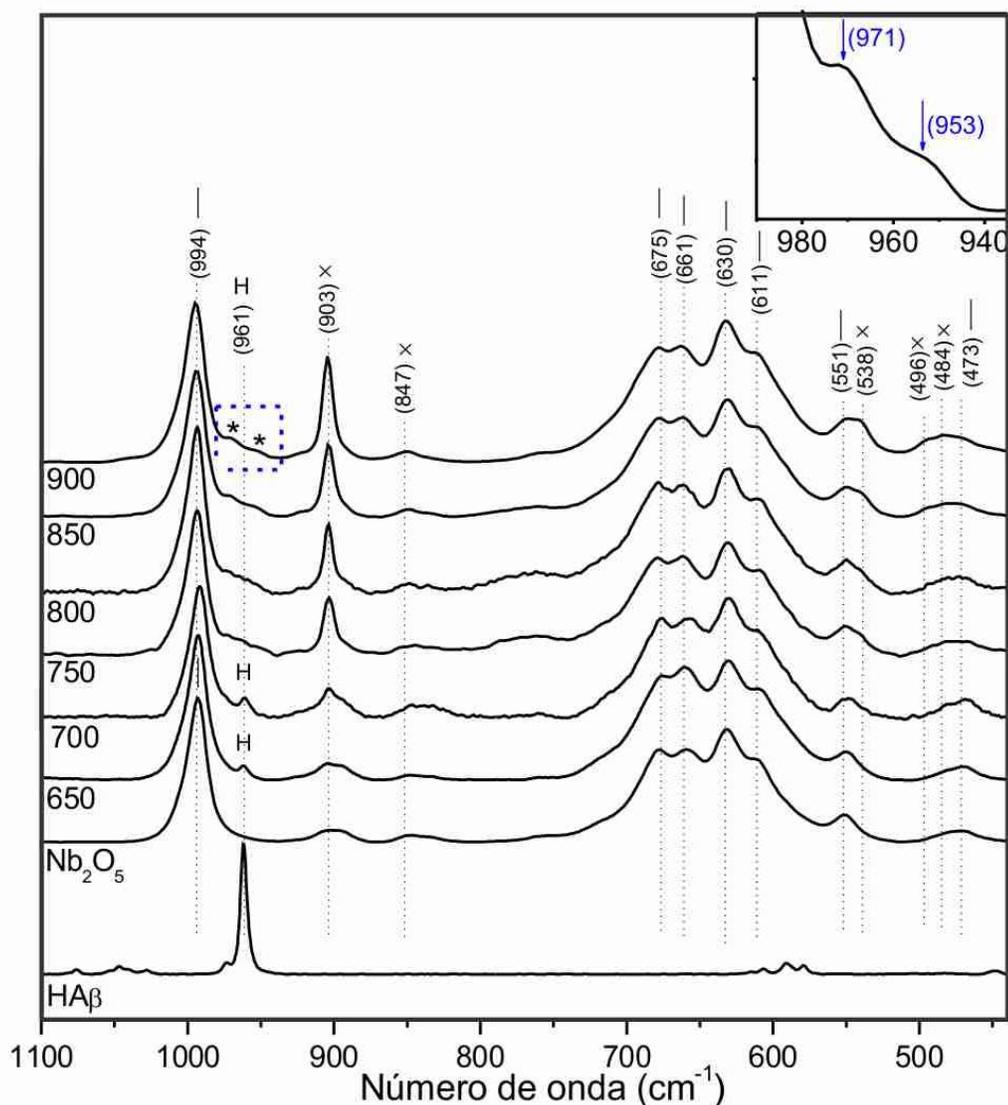


Figura 39. Espectros Raman da  $HA\beta$ , do  $Nb_2O_5$  e do compósito  $C5$ , após o tratamento térmico por 2h em atmosfera livre, em diferentes temperaturas entre 650 e 900 °C. Destaque: picos da fase  $\beta$ -TCP em escala ampliada.

A partir de 950 °C (Figura 40) há uma significativa redução das bandas referentes ao  $Nb_2O_5$ , ao passo que novas bandas localizadas em 628, 694, 1010  $cm^{-1}$  surgem. Essas bandas são atribuídas a modos de vibração da fase  $PNb_9O_{25}$  [97]. Além disso, a banda em 597  $cm^{-1}$  da fase  $CaNb_2O_6$ , que antes estava suprimida pelas bandas do  $Nb_2O_5$ , pode ser observada.

É interessante que as bandas da fase  $\beta$ -TCP também são reduzidas, porém a redução é bem menos acentuada que no caso do  $Nb_2O_5$ . A explicação para esse comportamento está no fato da energia térmica fornecida pela sinterização estimular a recombinação dos átomos de nióbio (Nb) e oxigênio (O) do pentóxido de nióbio, com o fósforo (P) da fase  $Ca_3(PO_4)_2$ , favorecendo a formação

da fase  $PNb_9O_{25}$ . Contudo, a diminuição é mais acentuada nos picos de  $Nb_2O_5$  do que no de  $\beta$ -TCP, uma vez que a formação de uma única cela unitária dessa fase requer nove átomos de nióbio (Nb) e um único átomo de fósforo (P). Além disso, pequenas bandas em 938 e 1038  $cm^{-1}$ , características de ligações terminais do tipo  $Nb = O$ , também são notadas. Essas bandas ocorrem geralmente em óxidos de nióbio mesoporosos, quando há distorções dos octaedros  $NbO_6$  [107]. A partir de 1050 °C as bandas referentes ao precursor  $Nb_2O_5$  não são mais observadas, isto é, o compósito é formado basicamente pelas fases  $CaNb_2O_6$ ,  $PNb_9O_{25}$  e  $Ca_3(PO_4)_2$ . Esse resultado é coerente com a interpretação dos difratogramas de raios X discutidos anteriormente. Assim, a identificação das fases cristalinas fica completa e é possível, inclusive, apontar o que é que ocorre em cada uma das transições estruturais discutidas nos resultados de DTA apresentados na Figura 36. A transição  $T_1$ , que se inicia em torno de 650 °C, está relacionada ao início da formação da fase  $CaNb_2O_6$ . A transição que se inicia em 740 °C ( $T_2$ ) está relacionada à decomposição de  $HA$  em  $\beta$ -TCP e, por fim, a transição  $T_3$  em 914 °C está relacionada ao início da formação da fase  $PNb_9O_{25}$ .

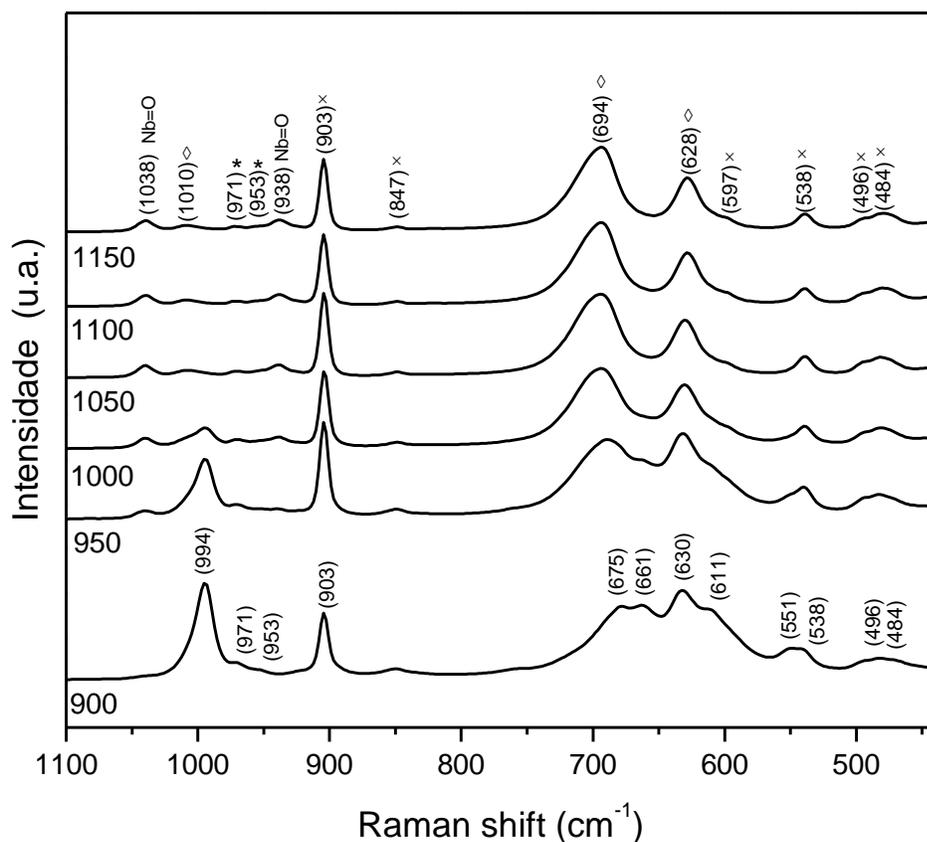


Figura 40. Espectros Raman da amostra  $C5$ , após o tratamento térmico em atmosfera livre, em diferentes temperaturas no intervalo entre 900 e 1150 °C.

### 5.3.4. Resultados do refinamento pelo método de Rietveld

Com as fases e as transições identificadas, o resultado do refinamento estrutural pode ser apresentado e discutido. Na Figura 41 são mostrados os perfis observados e calculados e suas diferenças (erro) resultado do refinamento da amostra *C5* sinterizada a 1100°C. A boa concordância entre os padrões observados e calculados é uma boa evidência de que estruturas escolhidas para o refinamento são, de fato, as que compõem o compósito *C5*. Um dos principais objetivos do refinamento foi à obtenção do comportamento da fração de volume (vol.%) das fases cristalinas em função da temperatura de sinterização.

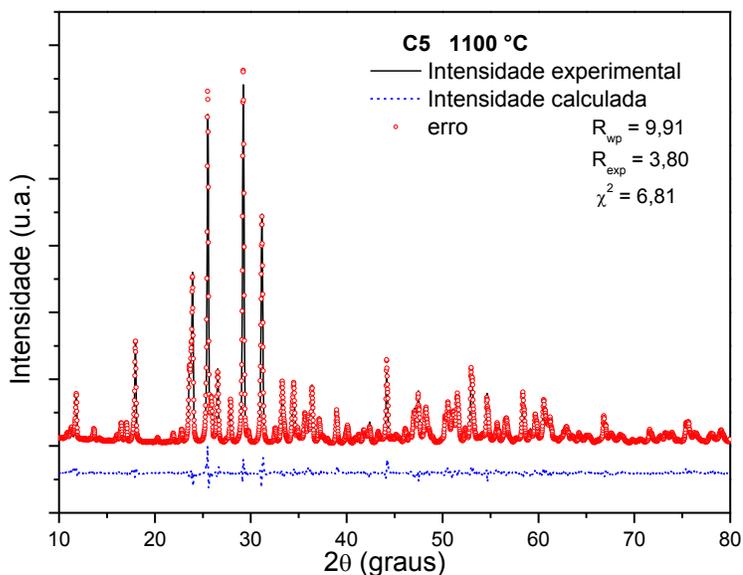


Figura 41. Perfis de difração de raios X experimental, calculado e erro obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra *C5*, sinterizadas em 1100°C.

Na Figura 42 esse comportamento é apresentado. De acordo com os resultados obtidos dos refinamentos, na temperatura de 650 °C, por exemplo, a fração de volume de  $Nb_2O_5$  é de 27,1%. Esse valor varia muito pouco até a temperatura de 900 °C, na qual a fração de volume é de 23,1%. Entre 900 e 1000 °C, com o surgimento da fase  $PNb_9O_{25}$ , há uma queda brusca na quantidade de  $Nb_2O_5$ , restando na temperatura de 1000 °C, apenas 1,3% dessa fase. Com relação ao comportamento da *HA*, sua fração de volume (vol.%) sofre uma queda muito leve entre as temperaturas de 650 e 700 °C, conforme a fase  $CaNb_2O_6$  aumenta suavemente. Para esse último

intervalo de temperatura, o  $\beta$ -TCP, que possui um aumento também muito suave, é praticamente 10% da quantidade de HA, ou seja, ele representa igual porcentual do que já existia na  $HA\beta$  antes das reações ocorrerem. No entanto, entre as temperaturas de 700 e 750 °C, há uma decomposição de toda a quantidade de HA em  $\beta$ -TCP, sendo que esta salta de 5,7% em 700 °C para 59,5% na temperatura de 750 °C. Após isso, a fase  $\beta$ -TCP diminui progressivamente de 59,2% em 750 °C até o valor de 37,1% em 1150 °C, ao passo que, a fase  $CaNb_2O_6$  aumenta progressivamente, de 18,7 para 46,6% nesse mesmo intervalo de temperatura. Já a fase  $PNb_9O_{25}$ , que é detectada pela primeira vez em 950 °C, sofre um aumento de 11,7% para 21,7% no intervalo de 950 a 1000 °C, e varia menos de 1% entre 1000 e 1120 °C.

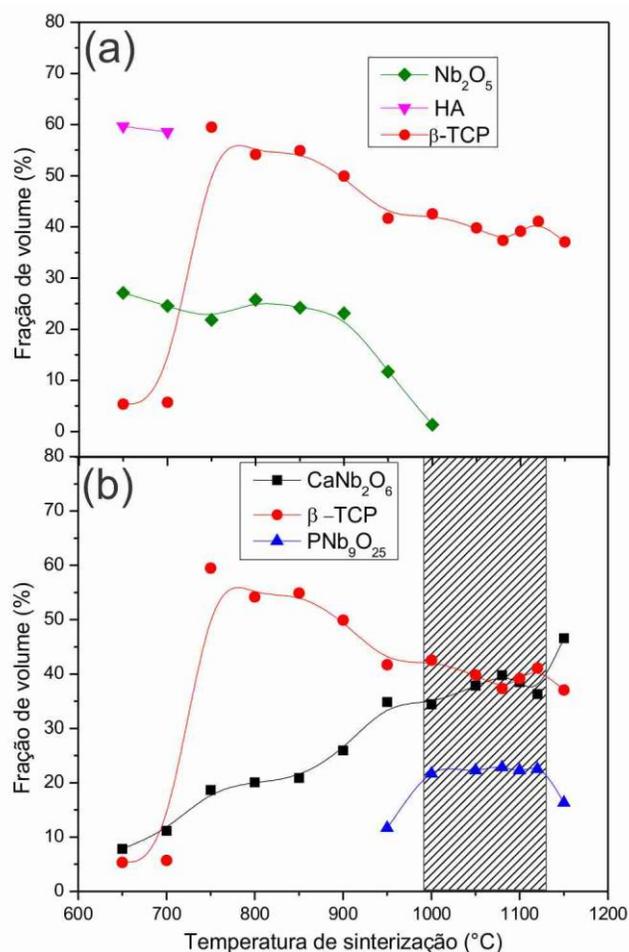


Figura 42. Comportamento das frações de volume (vol.%) das fases cristalinas do sistema C5 em função da temperatura de sinterização. (a) HA,  $Nb_2O_5$  e  $\beta$ -TCP; (b)  $CaNb_2O_6$ ,  $PNb_9O_{25}$  e  $\beta$ -TCP.

É importante observar na região destacada na Figura 42 (b) que, entre as temperaturas de 1000 e 1120 °C, todas as frações de volume (vol.%) variam muito pouco, isto é, qualquer amostra

sinterizada nessa faixa de temperatura terá aproximadamente a mesma proporção entre suas fases cristalinas. Esse resultado é muito importante já que um dos objetivos de estudar o compósito sinterizado em diferentes temperaturas era escolher a temperatura ideal de sinterização. Dessa maneira, a temperatura de sinterização deve ser escolhida quando a maximização das propriedades físicas e mecânicas for obtida e que esteja entre os limites entre 1000 e 1120 °C. Se uma temperatura fora dessa faixa fosse escolhida, o material de partida utilizado para os testes *in vivo* seria diferente daquele descrito na Parte II desse trabalho, e os resultados não poderiam ser comparados. Outro fato interessante a se notar é que entre as temperaturas de 1120 e 1150 °C, as mudanças são mais significativas o que pode estar relacionado a uma perda da estabilidade térmica do material.

### **5.3.5. Propriedades físicas**

#### **5.3.5.1. Análise da variação dimensional de C5 e de HAβ em função da temperatura de sinterização**

Pela técnica da metalurgia do pó, o conhecimento da variação dimensional de um material possibilita estimar a precisão dimensional para se produzir uma série de componentes em larga escala. Nesse trabalho, o conhecimento da contração linear (*linear shrinkage*) foi importante por dois motivos. O primeiro, pelo fato da broca a ser utilizada nos testes *in vivo* para a perfuração da calvária dos ratos possuir um diâmetro fixo. Assim, para que todas as amostras ficassem com mesmo diâmetro e se encaixassem perfeitamente no defeito da calvária, o valor correspondente à contração linear deve ser acrescido para cada tipo de amostra a verde. Além disso, as amostras do compósito C5 e da cerâmica bifásica (HAβ) possuem contrações lineares diferentes e que devem ser consideradas no processamento do material pela técnica da metalurgia do pó (PM). O segundo motivo seria para estudar o comportamento dimensional do material em função da temperatura de sinterização, de modo a escolher a temperatura ideal de sinterização. O comportamento da variação dimensional para a composição selecionada, C5, e da cerâmica bifásica HAβ, como função da temperatura de sinterização, é apresentada na Figura 43.

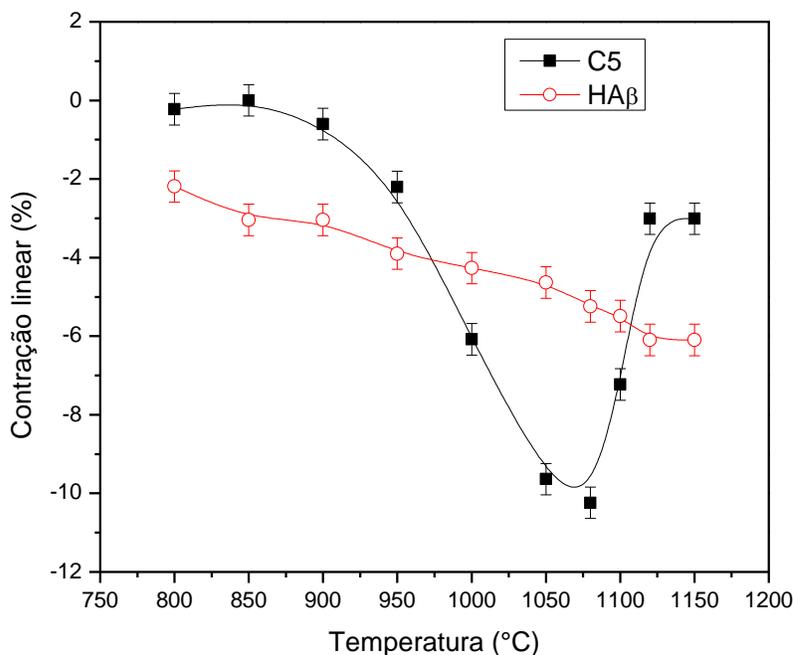


Figura 43. Variação da variação dimensional para o compósito *C5* e para a cerâmica bifásica *HAβ*, em função da temperatura de sinterização. As linhas contínuas são apenas guias visuais.

Para o compósito *C5* o aumento da temperatura de sinterização produz uma variação acentuada da contração linear (%). Entre as temperaturas de 800 e 900 °C não há uma variação significativa deste parâmetro (menos de 1%). Contudo, entre de 900 e 1080 °C, a contração linear do compósito aumenta significativamente de 0,6 para 10,2%, quando atinge um valor máximo. Após essa temperatura, o material volta a expandir, chegando a um valor mínimo de 3,0% na temperatura de 1150 °C. Esta expansão possivelmente está associada à diminuição da densificação do material e relacionada ao aumento da porosidade. A contração linear (%) da amostra *HAβ* também sofre influência da temperatura, porém de modo bem menos expressivo do que a do compósito *C5*. De modo geral, a contração linear da amostra *HAβ* possui um aumento quase que linear com a temperatura de sinterização, variando de 2,19 % em 800 °C para 6,09 % em 1150 °C.

### 5.3.5.2. Análise da densidade e da porosidade de *C5* e de *HAβ* em função da temperatura de sinterização

Na Figura 44 (a) e (b) são mostrados o comportamento da densidade e da porosidade das amostras *C5* e *HAβ*, respectivamente, em função da temperatura de sinterização. Para cerâmica bifásica (*HAβ*), observa-se um pequeno aumento na densidade e um decréscimo na porosidade. A densidade passa de um valor de 2,3 g/cm<sup>3</sup>, na temperatura de 800°C, para 2,5 g/cm<sup>3</sup> em 1150 °C,

correspondendo a um aumento relativo da ordem de 9%. Para a porosidade no referido intervalo de temperatura, há um decréscimo na porosidade de 27 para 21%. O aumento da densificação está relacionado à maior sinterabilidade do material face ao aumento da temperatura de sinterização e que produz uma gradual redução na porosidade.

Para o compósito *C5* há três intervalos de temperatura com comportamentos distintos. Entre 800 e 950 °C, os valores de densidade são muito próximos e oscilam em torno de 2,5 g/cm<sup>3</sup>, ou seja, nesse intervalo, a temperatura de sinterização pouco influenciou para a densificação do material. Com relação à porosidade, ela atinge valores em torno de 35%, o que representa um valor mais alto que os da amostra *HAB*, que nesse intervalo possui valores entre 27 e 31%. O segundo intervalo a ser considerado é entre 1000 e 1080 °C. Para essa faixa de temperatura, a densidade aumenta de forma aguda de 2,7 g/cm<sup>3</sup> em 1000 °C, para o valor máximo de 3,6 g/cm<sup>3</sup> em 1080 °C, ao passo que, a porosidade do material cai abruptamente de 28 para 9%. A densidade teórica do compósito, determinada pela regra das misturas, é da ordem de 3,8 g/cm<sup>3</sup>. Dessa maneira, na temperatura de 1080 °C, a densidade do material está próxima da densidade teórica, o que implica uma densificação e uma sinterabilidade efetivas. Além disso, nessa temperatura, a porosidade do compósito é muito menor do que a da amostra *HAB* sinterizada na mesma temperatura (~2,5 vezes). Após essa temperatura, situa-se o terceiro intervalo, no qual a densidade do compósito volta a cair com o aumento da porosidade, sendo que, para temperatura de 1150 °C a densidade decresce para 3,18 g/cm<sup>3</sup> e a porosidade aumenta para 17%.

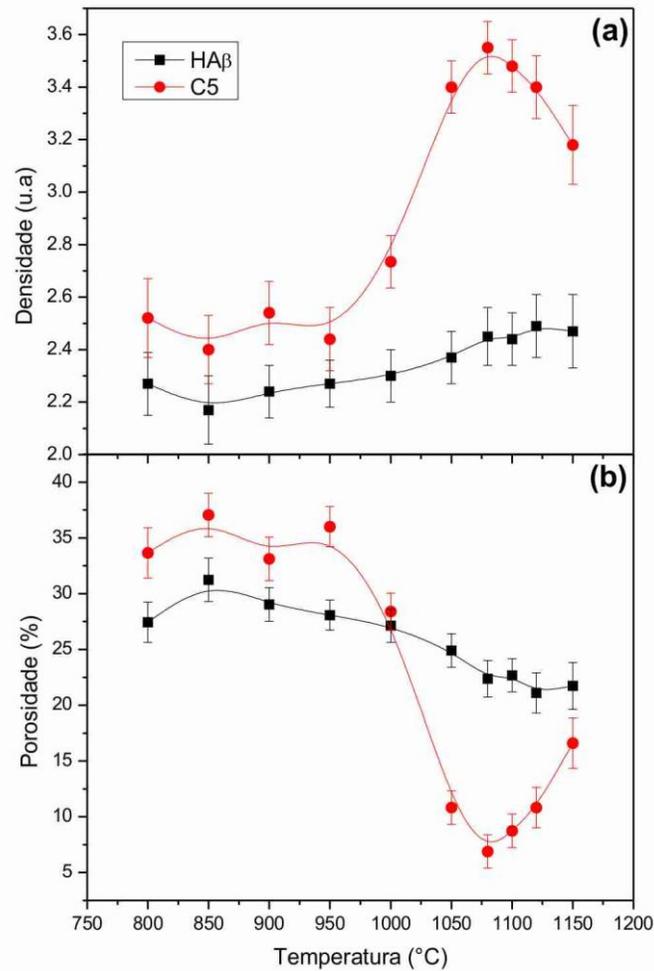


Figura 44. (a) Densidade e (b) Porosidade do compósito *C5* e da cerâmica *HAβ*, em função da temperatura de sinterização. As linhas contínuas são apenas guias visuais.

### 5.3.6. Propriedades mecânicas

#### 5.3.6.1. Microdureza Vickers

Os valores médios dos resultados dos ensaios de microdureza Vickers, do compósito *C5* e da cerâmica bifásica *HAβ*, em função da temperatura de sinterização, estão mostrados na Figura 45. Para os ensaios utilizou-se uma carga de 3 N. Os resultados indicam que a temperatura de sinterização afeta de forma significativa os valores de microdureza dos materiais ensaiados. Para as temperaturas de 900 e 950 °C os valores de microdureza, para as duas amostras, estão muito

próximos (em torno de 1 GPa). A partir de 950 °C observa-se um aumento para ambas as amostras, contudo, o aumento é muito mais expressivo para o compósito *C5*. O valor máximo de microdureza para o compósito *C5* ocorre para a temperatura de 1080 °C e corresponde a 4,4 GPa. Esse valor é quase três vezes maior que o referente à *HAlβ* de 1,6 GPa sinterizada na mesma condição. Por outro lado, a partir de 1080 °C, enquanto a microdureza da *HAlβ* continua aumentar a uma taxa lenta até atingir 1,97 GPa em 1150 °C já os valores de microdureza para o compósito *C5* sofrem uma diminuição brusca.

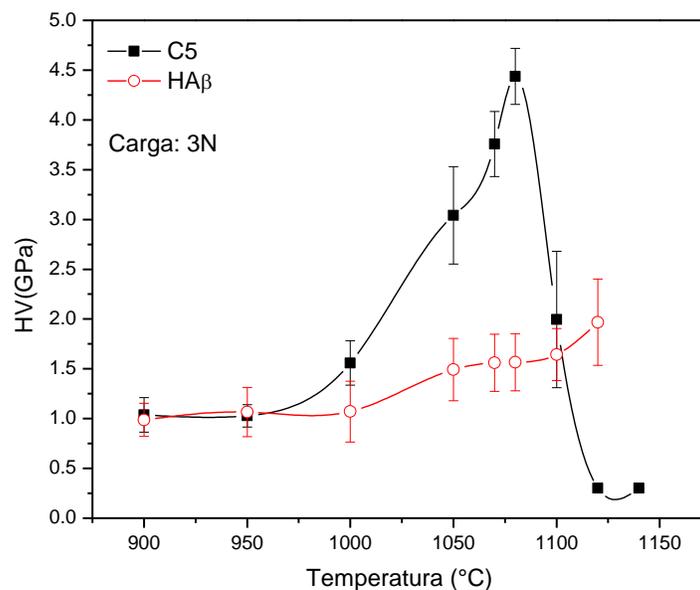


Figura 45. Microdureza Vickers do compósito *C5* e da cerâmica *HAlβ*, em função da temperatura de sinterização. As linhas contínuas são apenas guias visuais.

A partir de 1120 °C, inclusive, não foi mais possível obter valores consistentes de microdureza para o compósito *C5*. Isso ocorreu porque as indentações quase sempre atingiam poros ou bolhas na superfície do material, tornando impossível a realização de medidas confiáveis de suas diagonais. Esse aumento possivelmente está relacionado com o processo de coalescência de poros, fenômeno que pode ocorrer em processos de sinterização com a presença de fase líquida, a qual produz uma diminuição da densidade do material devido ao aumento da porosidade [112].

Dessa maneira, tendo em vista os resultados de microdureza Vickers, contração linear, densidade e porosidade mostrados anteriormente, constata-se que essas propriedades para o compósito *C5* são todas maximizadas na temperatura de sinterização de 1080 °C. Todavia, após essa temperatura, essas grandezas diminuem de forma significativa. Essa característica ocorre

tipicamente para temperaturas acima das temperaturas chamadas de eutéticas. Como dito anteriormente nesse trabalho, possivelmente na composição 50% $Nb_2O_5$ –50% HA ocorre uma antecipação do ponto de fusão.

### **5.3.7. Microestrutura de $H\alpha\beta$ e de C5 em função da temperatura de sinterização**

#### **5.3.7.1. Evolução da microestrutura de $H\alpha\beta$ em função da temperatura de sinterização**

A evolução da microestrutura das amostras  $H\alpha\beta$ , sinterizadas no intervalo de 800 a 1150°C, é apresentada nas micrografias de superfície na Figura 46.

Todas as amostras exibem um razoável grau de porosidade o que indica que a sinterização para esse intervalo de temperatura corresponde a um estado de pré - sinterização. Para temperaturas inferiores a 1050 °C é possível notar a formação de pescoços e o progressivo aumento dos mesmos. As setas indicam a morfologia de pescoços para a temperatura de 950 °C. A partir de 1050°C núcleos mais densificados podem ser distinguidos. A morfologia desses núcleos foi descada para a temperatura de 1100 °C na Figura 46. Nesses núcleos a união entre as partículas é maior e é possível notar o início de uma estrutura de grãos. Tanto a quantidade como a área desses núcleos crescem com o aumento da temperatura, o que está relacionado com o aumento da área superficial de contato entre os grãos, que possibilita o aumento de vias de transferência de massa relacionadas aos fenômenos de difusão volumétrica [20].

As micrografias da superfície de fratura das amostras  $H\alpha\beta$  estão mostradas na Figura 47. Na análise dessas micrografias é possível notar que para as temperaturas de sinterização empregadas a cerâmica bifásica ( $H\alpha\beta$ ) é um material frágil, pois a fratura ocorre ao longo dos contornos dos grãos, ou seja, uma fratura do tipo intergranular, característica de materiais cerâmicos. Entretanto, o aumento de temperatura de sinterização causa um aumento na sinterabilidade do material e, como consequência, as propriedades físicas e mecânicas do material podem ser maximizadas, conforme discutido anteriormente.

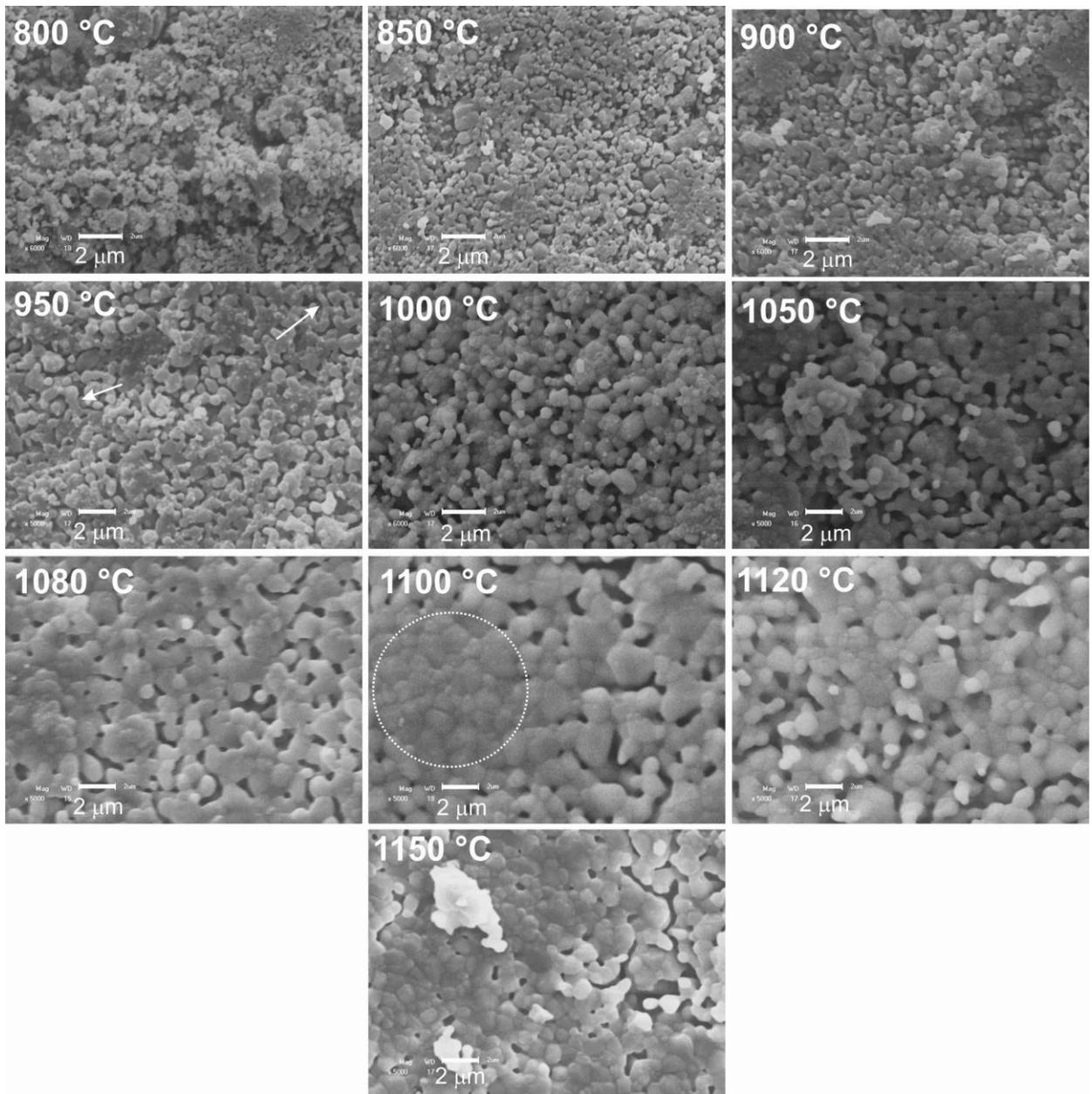


Figura 46. Micrografias de superfície de amostras  $HA\beta$  sinterizadas em diferentes temperaturas entre 800 e 1150 °C por 2 h em atmosfera de ar.

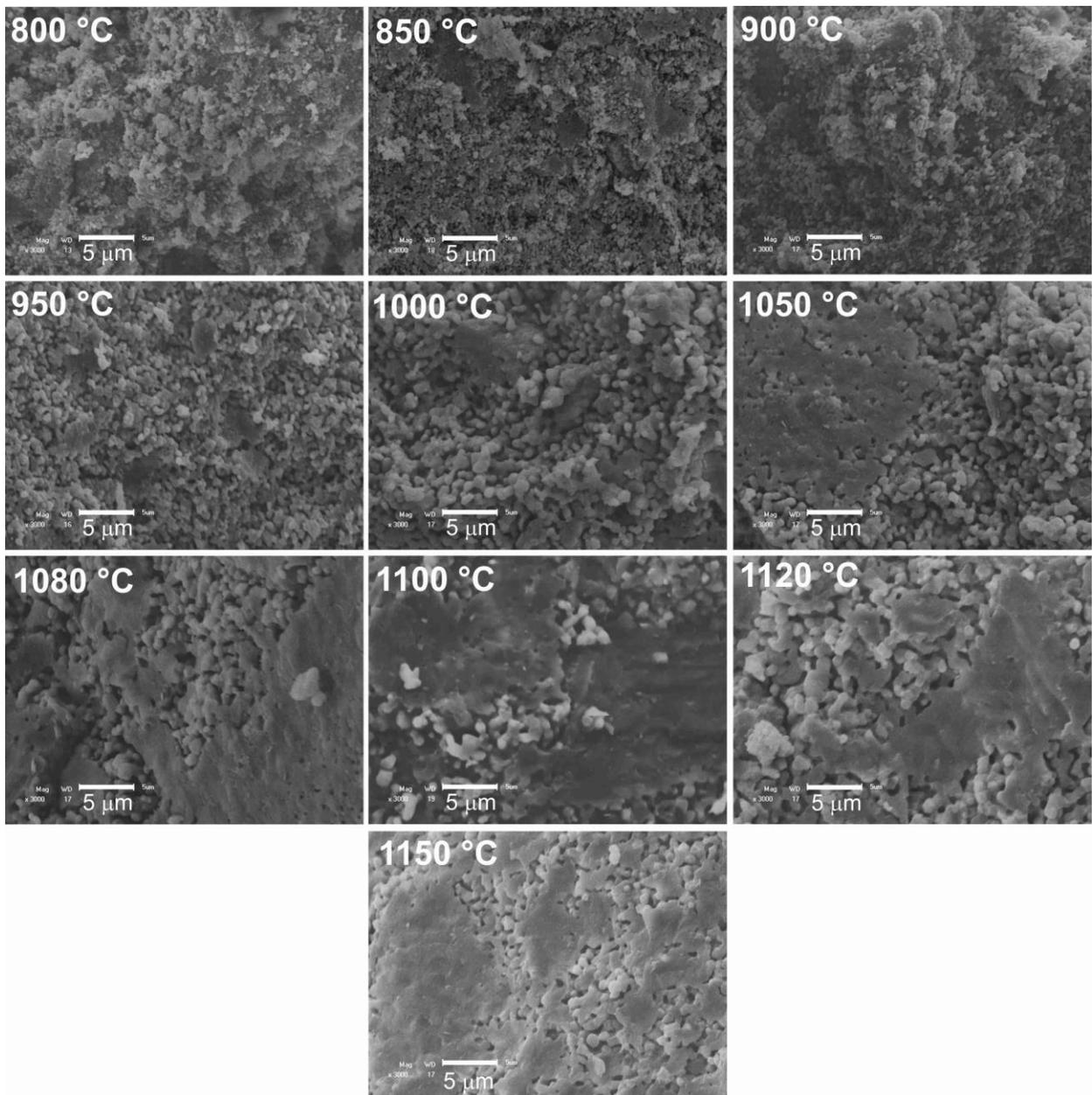


Figura 47. Micrografias da superfície da fratura de amostras *HAβ* sinterizadas nas temperaturas entre 800 e 1150 °C por 2 h em atmosfera de ar.

### 5.3.7.2. Evolução da microestrutura de *C5* em função da temperatura de sinterização

Na Figura 48 é possível observar a evolução da morfologia de superfície das amostras do compósito *C5* sinterizadas em diferentes temperaturas entre 800 e 1150 °C. Nessas amostras o processo de sinterização é um pouco mais complexo e possivelmente ocorre uma etapa de

sinterização via fase líquida. O primeiro estágio de sinterização ocorre entre as temperaturas de 800 e 950 °C e é análogo ao ocorrido para a *HAB*, isto é, a formação e aumento de pescoços, correspondendo a uma etapa de pré-sinterização. No entanto, a partir de 1000 °C há uma mudança na morfologia de superfície das amostras com a ocorrência de uma estrutura com a presença de bastonetes, poros irregulares e a presença de grãos. Para as temperaturas entre 1050 e 1080 °C há um aumento representativo na densificação do material e um aumento no tamanho de grãos, relacionados à melhor sinterabilidade, sendo o menor grau de porosidade observado na temperatura de 1080 °C. Na temperatura de 1050 °C foram avistados muitos núcleos de maior densificação, cuja união entre grãos é maior, no entanto, ainda se observa a presença de pescoços. Na temperatura de 1050 °C, o grau de densificação do material é superior à de 1000 °C e poucos poros podem ser observados. Acredita-se que nessa temperatura inicia-se o processo de sinterização via fase líquida. Nesse caso, pelo menos uma das fases do material deve estar no estado líquido. Essa suposição está muito próxima dos resultados de DTA discutidos anteriormente nos quais a fusão para amostra C5 pode estar ocorrendo por volta de 1023 °C. Quando há uma fase líquida envolvida no processo, três etapas podem ser descritas: primeiramente, o líquido molha o sólido formando pescoços entre as partículas, juntando-as por forças de capilaridade. Em um estágio intermediário ocorre uma dissolução do sólido no líquido e a precipitação nos grãos. Posteriormente, ocorre o arredondamento e acomodação dos grãos, o que se acredita estar ocorrendo para a amostra C5 entre as temperaturas de 1080 e 1100 °C. Quando o processo é efetivo, após o arredondamento ocorre o crescimento e acomodação dos grãos [111,112]. Entretanto, nas temperaturas de 1100 e 1120 °C ocorre novamente um aumento da porosidade na superfície e, como consequência, um decréscimo na densidade. Aparentemente, na temperatura de 1150 °C a superfície do material parece ser mais densa e com a ausência de poros. No entanto, mais adiante serão discutidos resultados que mostrarão que o material sinterizado a essa temperatura possui alta porosidade.

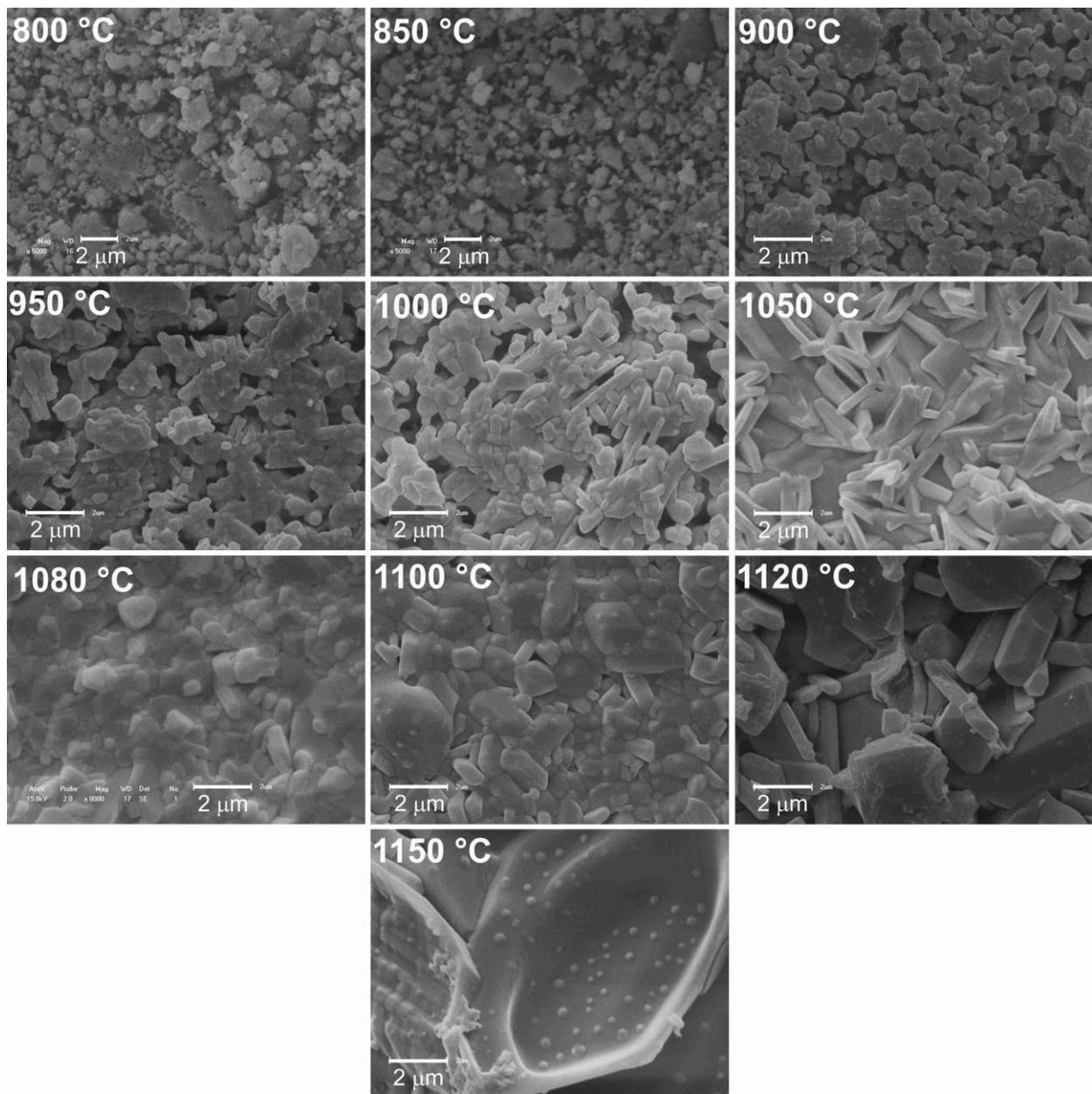


Figura 48. Micrografias da superfície das amostras do compósito *C5* sinterizadas em diferentes temperaturas entre 800 e 1150 °C por 2 h em atmosfera de ar.

Nas Figuras 49 a 51 são mostradas as micrografias da superfície de fratura das amostras do compósito *C5* sinterizadas em diferentes temperaturas entre 800 e 1150 °C. Na Figura 49 foram adquiridas com ampliação de 3000 vezes, enquanto a Figura 50 e a Figura 51 com ampliação 60 vezes. Observando-se as micrografias com ampliação de 3000 vezes (Figura 49) nota-se novamente que entre 800 e 950 °C ocorre à formação e crescimento de pescoços com o aumento da temperatura de sinterização. Em 1000 °C núcleos de densificação já podem ser observados.

Em 1050 °C a estrutura de grãos é mais bem definida e as fraturas são do tipo intergranulares. Além disso, uma quantidade significativa de poros aparece, porém esse estágio de sinterização é mais avançado do que para temperaturas inferiores. Entre 1080 e 1150 °C a micro-estrutura é bem mais densificada e os grãos se tornam cada vez maiores. Todavia, quando as micrografias de menor ampliação são observadas (Figura 50 e Figura 51), um fato curioso pode ser notado. A amostra de 1080 °C possui poucos e pequenos poros, no entanto, para as temperaturas superiores a 1080 °C, a porosidade do material aumenta expressivamente. Ademais, o tamanho médio dos poros aumenta com o aumento da temperatura de sinterização e essa é uma evidência de que ocorre o fenômeno de coalescência de poros. O fenômeno de coalescência ocorre comumente em ligas eutéticas, quando o tempo ou a temperatura de sinterização, via fase líquida, é superado [112].

Nos processos de sinterização pode ocorrer a formação de gases e destes ficarem aprisionados nos poros. Assumindo que esses gases possuam certa difusividade através da matriz, eles podem se difundir, deslocando-se dos poros menores (maior pressão interna) para os poros maiores, gerando um aumento do tamanho médio de poro. Dessa maneira, ocorre uma diminuição da pressão interna desses poros e, conseqüentemente, uma diminuição na densidade e um aumento da porosidade. Nestes casos, quanto maior for o tempo de sinterização, maiores serão os efeitos relativos ao fenômeno de coalescência [111,112]. Além do mais, conforme a temperatura de sinterização ultrapassa o seu valor ideal, mais gás deve ser liberado e, conseqüentemente, mais poros surgirão (a temperatura típica de sinterização por fase líquida é ligeiramente superior a temperatura eutética).

O fato da amostra C5 sinterizada a 1150 °C aparentar ter uma estrutura densa na sua superfície (Figura 48) pode decorrer do fato de que com o aumento da temperatura de sinterização e com a presença de fase líquida significativa no estágio de resfriamento, a fase líquida “escorreu” pela superfície do material, fazendo com que esta ficasse lisa. Uma evidência disso pode ser observada na Figura 52, na qual são exibidas duas fotografias da amostra do compósito C5 sinterizadas em 1080 e 1150 °C. Após o resfriamento a amostra sinterizada em 1080 °C ficou com o formato natural de pastilha, enquanto que a amostra sinterizada a 1150 °C ficou com um formato convexo e com uma superfície lisa, entretanto, a análise da superfície da fratura (Figura 51) mostra uma severa porosidade por coalescência.

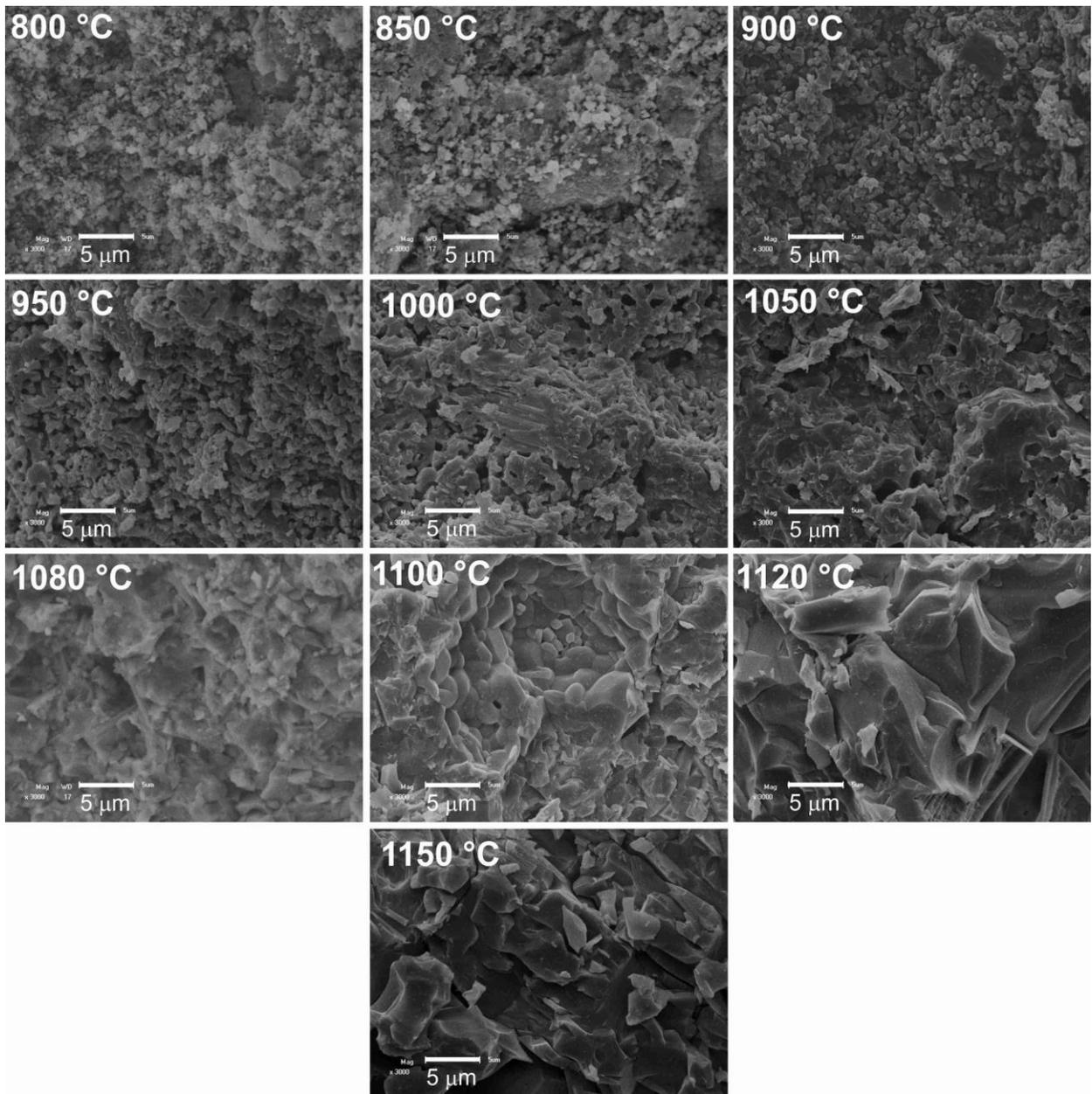


Figura 49. Micrografias da superfície de fratura das amostras C5 sinterizadas em diferentes temperaturas entre 800 e 1150 °C por 2 h em atmosfera de ar.

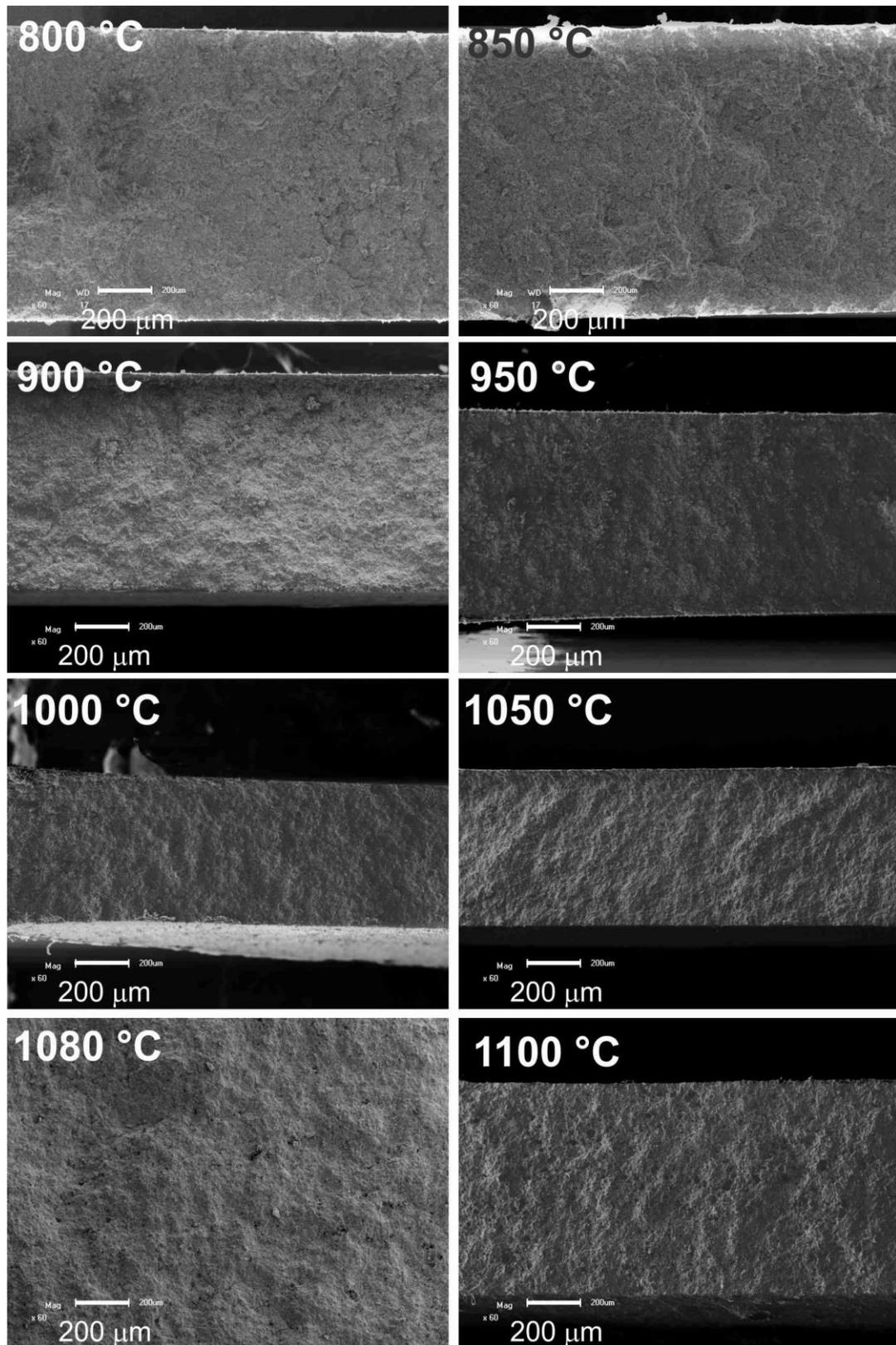


Figura 50. Micrografias de fratura com ampliação de 60x das amostras  $HA\beta$  da sinterizadas em diferentes temperaturas entre 800 e 1100 °C.

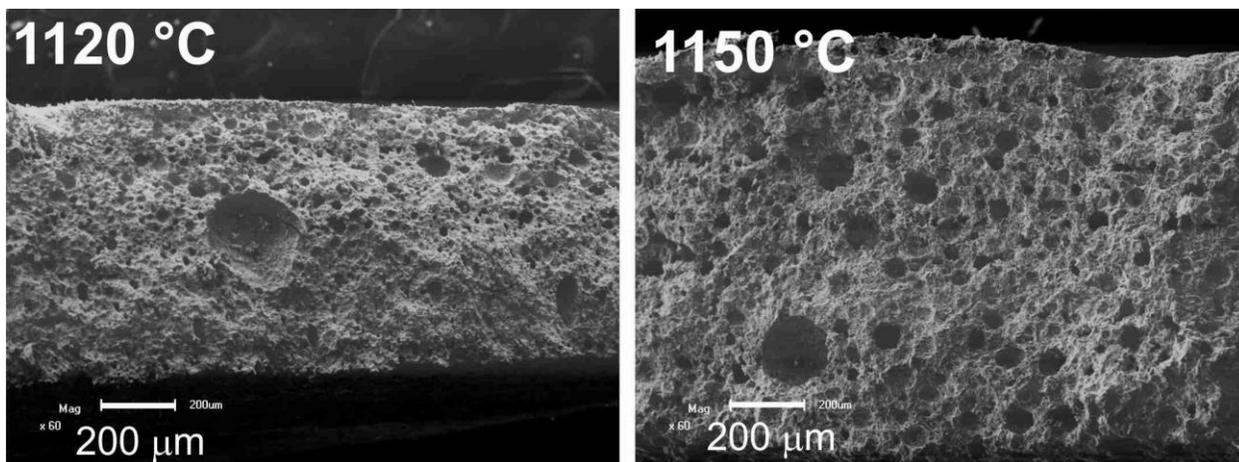


Figura 51. Micrografias de fratura com ampliação de 60x das amostras C5 da sinterizadas nas temperaturas de 1120 e 1150 °C



Figura 52. Fotografias das amostras de C5 sinterizadas em 1080 e 1150 °C.

#### 5.4. Parte 4: Produção de elementos porosos (scaffold) de C5 e HA $\beta$

##### 5.4.1. Escolha do elemento espaçador para obtenção de porosidade

Como visto anteriormente, um dos principais desafios desse trabalho foi a determinação da composição em volume (%) e da temperatura de sinterização para o sistema  $(100-x)Nb_2O_5-xHA\beta$  para a produção de elementos densos (*bulk*) e de elementos porosos (*scaffold*). A composição (vol.%) e a temperatura escolhidas foram aquelas que maximizaram as propriedades físicas e mecânicas do sistema. Face aos resultados apresentados e discutidos na parte 2 e 3 deste trabalho, foi selecionada a composição  $50\%Nb_2O_5-50\%HA\beta$  e a temperatura de sinterização de 1080 °C.

Com a composição e a temperatura de sinterização determinadas, o próximo desafio foi escolher o agente espaçador que permitisse, via metalurgia do pó, uma porosidade adequada para a produção de elementos porosos. Dentre alguns elementos espaçadores testados, foi selecionada a lactose na forma de partículas esféricas, com diâmetro entre 100 e 250  $\mu\text{m}$ . A porcentagem de lactose (vol.%) foi escolhida de forma que permitisse a máxima porosidade possível para que o compósito se mantivesse mecanicamente estável. Todavia, no caso do *scaffold* é necessário ainda um controle do tamanho e da conectividade dos poros para que os resultados *in vivo* sejam satisfatórios.

#### **5.4.2. Análise térmica (TG) e (DTA) do compósito C5 coma adição 50% de lactose**

Essa análise tem como objetivo investigara possibilidade da adição de lactose no compósito C5 produzir fases adicionais no processo de sinterização, além daquelas já identificadas neste estudo.

Na Figura 53 são apresentadas as curvas de TG e DTA para a mistura de 50% de lactose no compósito C5. Na curva de termogravimetria (TG) é possível observar uma acentuada redução da massa do material entre 180 e 550 °C. Essa redução está associada ao processo de eliminação da lactose. Nas curvas de DTA, no intervalo em questão, é possível observar transições exotérmicas que devem estar relacionadas aos processos de fusão e evaporação da lactose. Entre 550 e 1200 °C, a curva de DTA é análoga à observada para o material sem lactose, como pode ser observado na Figura 36, ou seja, é possível notar as transições T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> e a primeira fusão do compósito C5. Como a lactose é totalmente eliminada até a temperatura de 550 °C, a formação de fases do processo de sinterização para o compósito C5 permanece inalterada. Assim, o efeito da lactose é simplesmente físico, isto é, o de agente espaçador para a produção de poros, e, portanto, não altera o processo de sinterização.

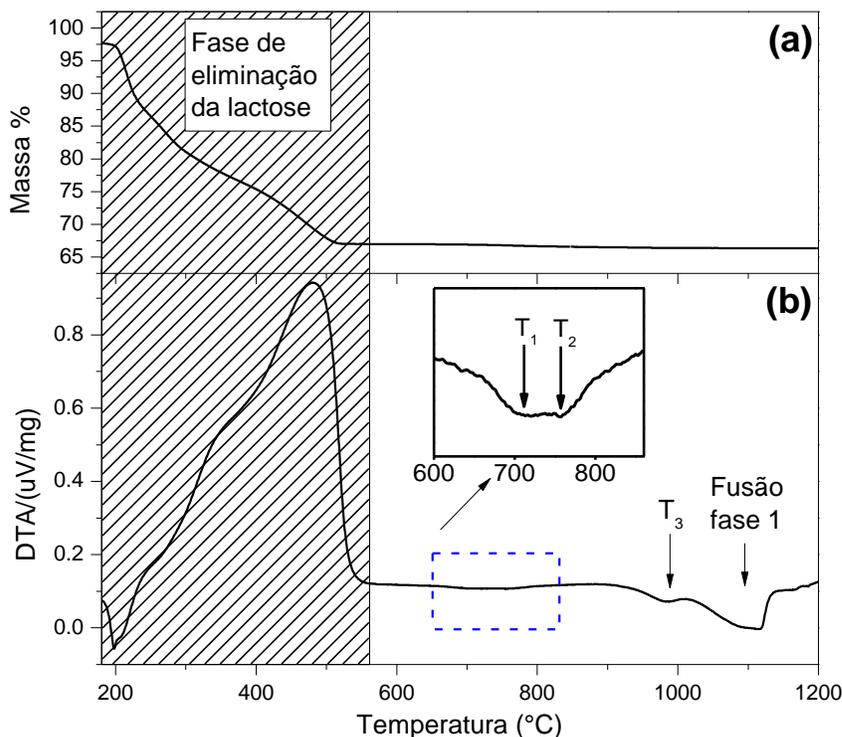


Figura 53. Curvas de (a) TG e (b) DTA de 180 a 1200 °C para a adição de 50% em volume de lactose no compósito C5. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10 °/min.

### 5.4.3. Análise da porosidade resultante da adição de lactose no compósito C5 por MEV

Várias porcentagens (vol.%) de lactose entre 10 e 60% foram testadas para a formação de poros nos compósito C5. Após o processo de sinterização as amostras foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados desses testes serão discutidos a seguir.

Nas Figura 54 e Figura 55 são mostradas as micrografias dos *scaffolds* C5 sinterizados a 1080 °C por 2 h em atmosfera de ar, em função da quantidade (vol.%) de lactose, a saber: 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60%. Houve tentativas de introduzir uma porcentagem maior do que 60%, entretanto, a quantidade de poros produzida era tão grande que nenhuma das amostras testadas nessas condições apresentava alguma estabilidade mecânica.

Para as porcentagens de 10 e 20% de lactose, observam-se poucos poros, de formato ovalado entre 100 e 200 μm e que se encontram isolados na matriz cerâmica. Nenhuma dessas porcentagens de lactose seria razoável para o uso como *scaffold*, pois, como não há interligação dos poros, o processo de angiogênese ficaria comprometido. A partir de 30% de lactose, é possível observar

conexões entre os poros, o que facilitaria a chegada de células ósseas para o interior do material. As interconexões aumentam conforme a porcentagem de lactose aumenta e, em alguns casos, quando há mais de dois poros primários envolvidos, poros superiores a 300  $\mu\text{m}$  podem ser observados. A amostra com maior quantidade de poros foi a com adição de 60% de lactose, entretanto, a estabilidade mecânica das amostras nessas condições era pequena e perdia essa estabilidade nos processos de lixamento e limpeza dos materiais. Dessa maneira, optou-se pelo uso da amostra contendo 50% de lactose em volume percentual para a produção de elementos porosos para implantes *in vivo*.

Imagens da superfície do *scaffold* com 50% de lactose, após os processos de lixamento e limpeza, podem ser observadas na Figura 56. Nas Figura 56 (a) e (b), com maior ampliação, a microestrutura de regiões sem poros é mostrada e, nas Figura 56 (c) e (d), os poros e suas conexões podem ser observados.

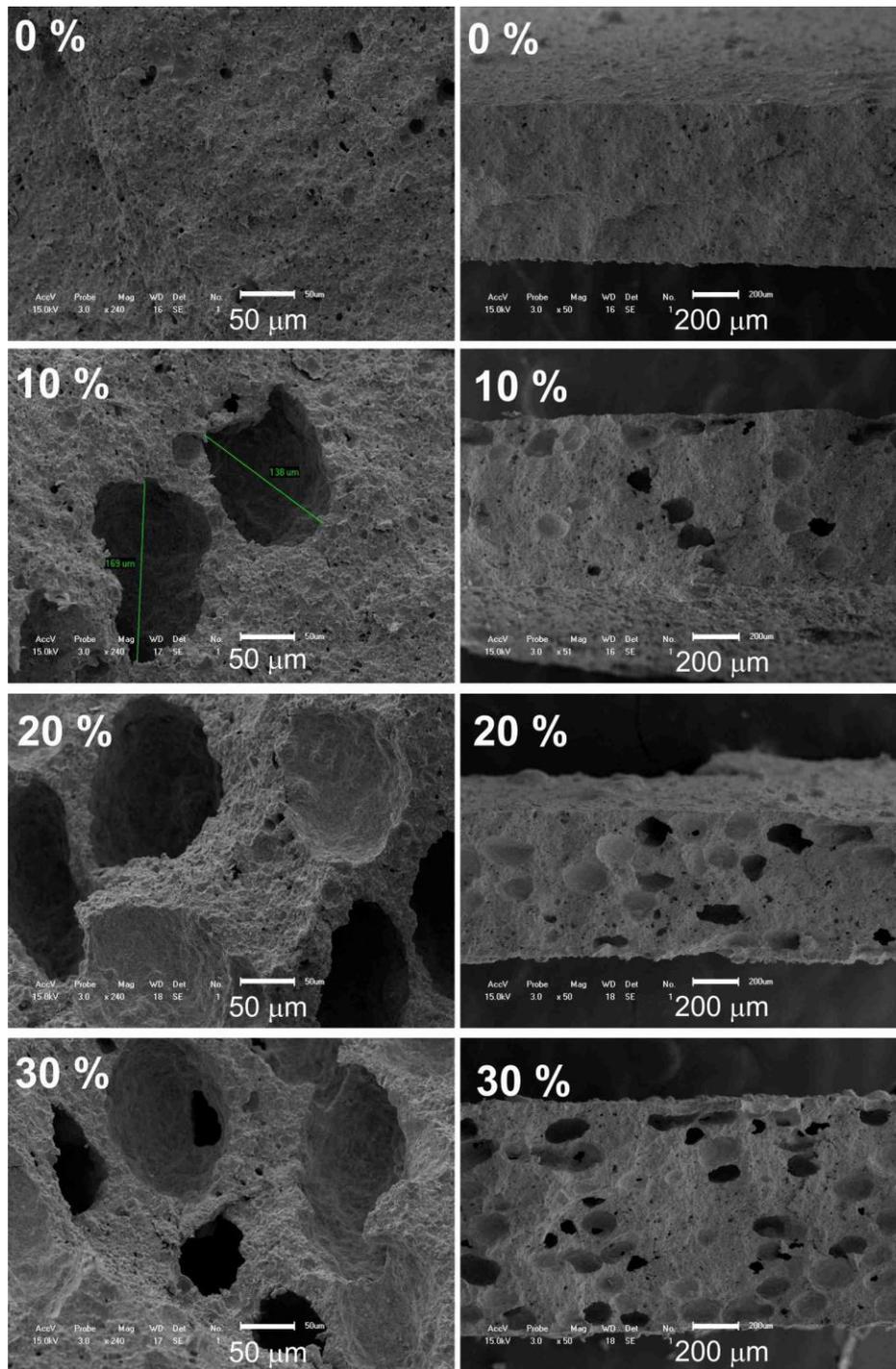


Figura 54. Micrografias de fratura do *Scaffold C5* para as porcentagens de 0, 10, 20, 30 vol.% de lactose, após o processo de sinterização a 1080 °C.

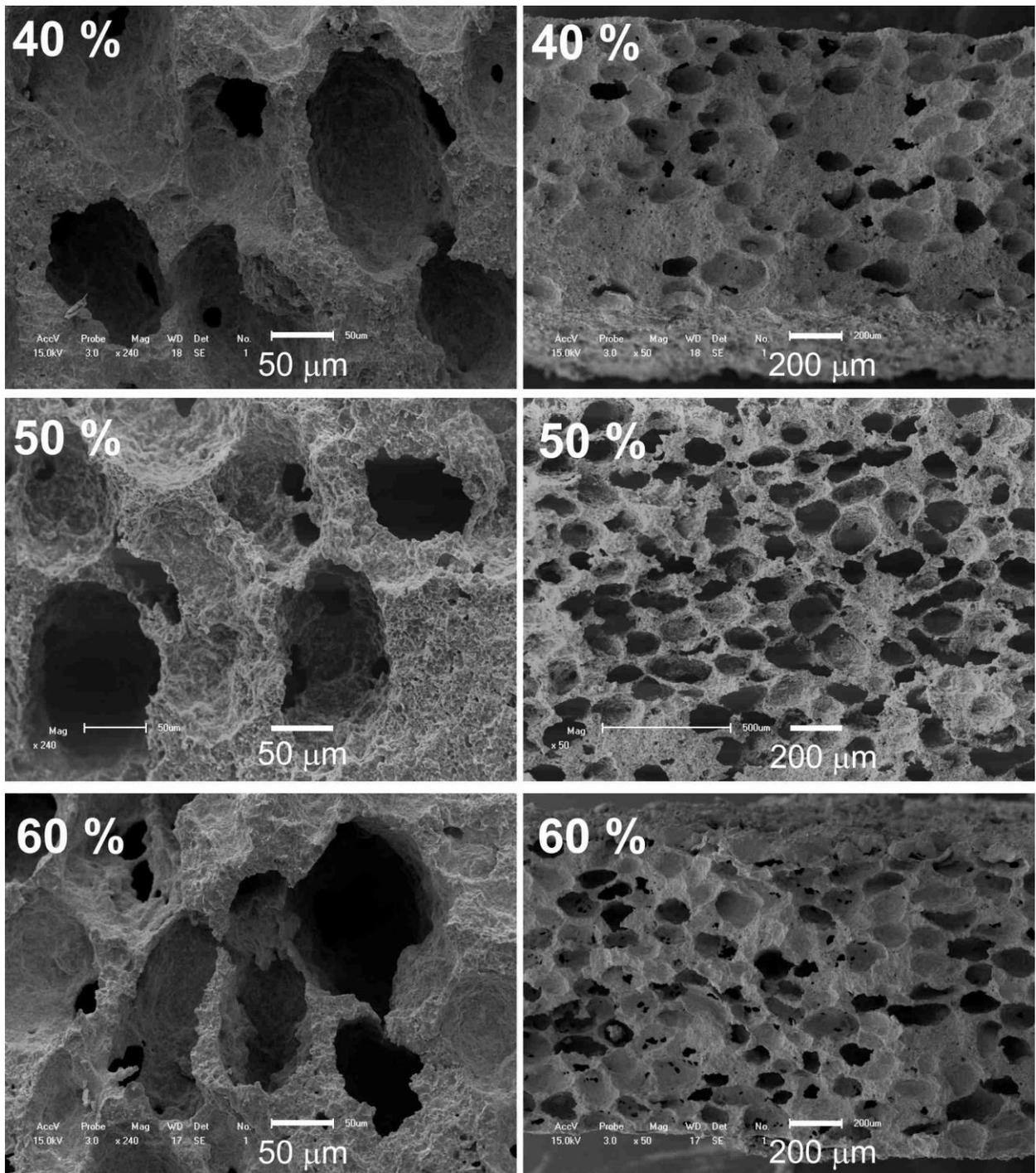


Figura 55. Micrografias da superfície de fratura do *Scaffold C5* para as porcentagens de 40, 50 e 60% de lactose, após o processo de sinterização a 1080 °C.

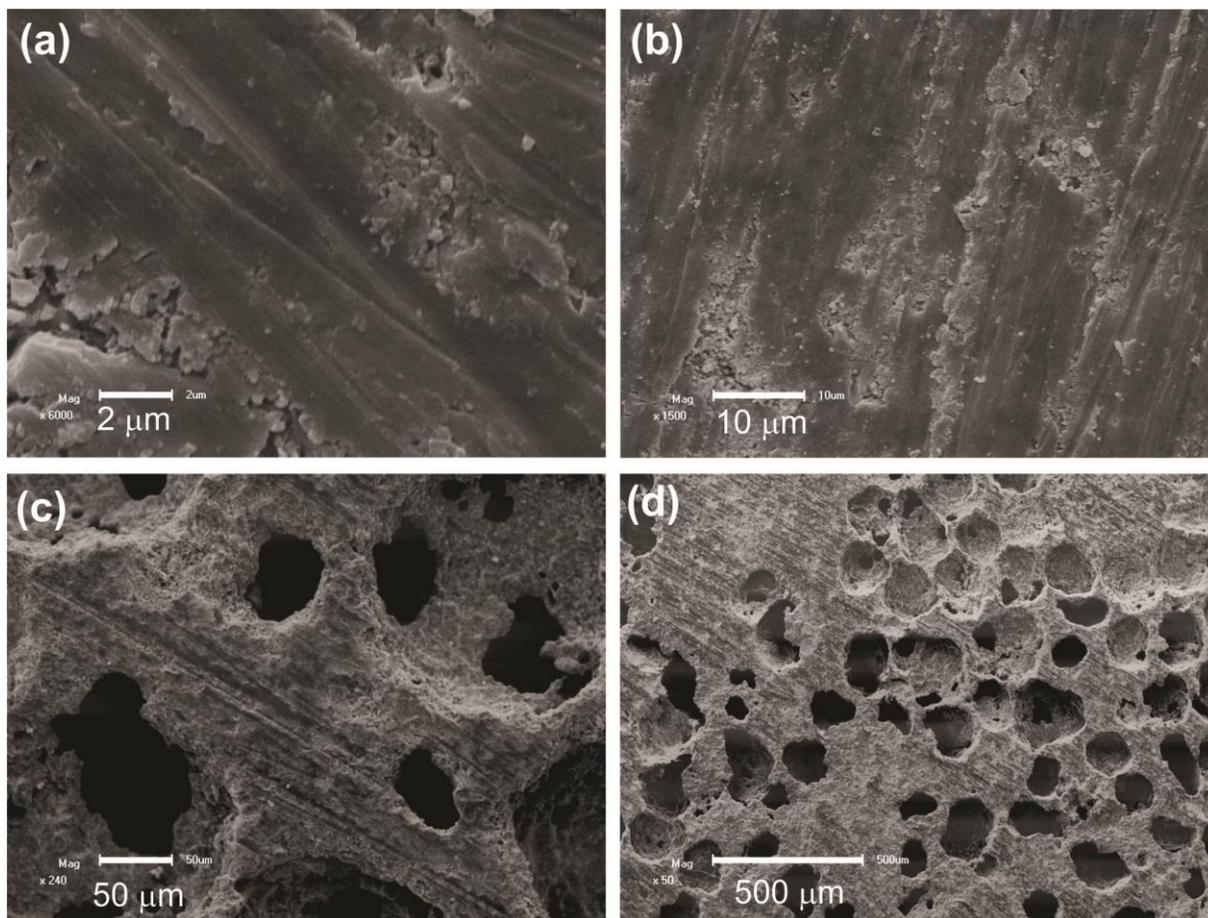


Figura 56. Micrografias de superfície do *Scaffold C5* para a porcentagem de 50% de lactose, após o processo de sinterização a 1080 °C.

#### 5.4.4. Análise da porosidade, densidade e microdureza Vickers

As propriedades físicas, como densidade e porosidade, e mecânica, como microdureza Vickers, foram empregadas para avaliar o *scaffold C5* com 50% de elemento espaçador (lactose) e sinterizadas a 1080 °C por 2 h em atmosfera de ar. No caso da microdureza Vickers, as medidas foram realizadas em regiões sem poros e não foram observadas alterações significativas nos seus valores, com relação às amostras sem a adição de elemento espaçador, já discutidas anteriormente e produzidas com os mesmos parâmetros de sinterização. No entanto, para a densidade e porosidade, os resultados apresentaram grandes diferenças.

A título de comparação, *scaffolds HA $\beta$* , foram produzidos para serem utilizados como parâmetro de controle nos testes *in vivo*, sendo sinterizados nas mesmas condições e com o mesmo percentual em volume de elemento espaçador (lactose). Os resultados de densidade, porosidade e

microdureza Vickers para o *scaffold C5* e *scaffold HAβ*, ambos com a adição de 50% do elemento espaçador (lactose), estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Densidade e porosidade do *scaffold C5* e *scaffold HAβ* ambos com produzidos com 50% lactose.

Amostra	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Porosidade (%)	Microdureza Vickers (GPa)
<i>Scaffold C5</i> (50% lactose)	2,12 ± 0,04	44,5 ± 0,9	4,4 ± 0,3
<i>Scaffold HAβ</i> (50% lactose)	1,37 ± 0,03	56,3 ± 0,3	1,6 ± 0,5

Comparando-se os valores de densidade para as duas amostras de *scaffold*, é possível perceber que a densidade do *C5* é cerca de 60% maior do que a do *HAβ*. Isso indica que mesmo com uma grande quantidade de poros, o compósito *C5* possui uma densidade superior a da cerâmica bifásica *HAβ* quando da sua utilização para a produção de elementos porosos. Comparando o valor da densidade obtida para o *scaffold C5* com a densidade do compósito *C5* na forma densa, é possível notar uma diminuição na densidade da ordem de 40%. Essa diminuição foi muito parecida com a que ocorreu com o *HAβ*, da ordem de 44%. Com relação às porosidades, os valores obtidos são muito próximos do valor calculado desejado (50%). Para o *C5*, foi determinada uma porosidade aberta de 44,5%, enquanto para o *HAβ*, foi obtido um valor de 56,3%. Os valores de densidade dos *scaffold* produzidos, como eram de se esperar, apresentam valores inferiores ao das respectivas amostras densas. Assim, a adição de lactose na razão 1:1 em vol.% no compósito *C5* e também na cerâmica *HAβ*, foi eficiente para a produção de poros interconectados, nos respectivos materiais. Segundo Bose e colaboradores, o tamanho de poros para que ocorra a difusão de nutrientes e oxigênio para a sobrevivência das células deve ser de no mínimo 100 μm [113].

## **5.4.5. Análise histológica *ex vivo***

### **5.4.5.1. Implantes *in vivo* do compósito C5 e do controle HA $\beta$ na forma de scaffold**

#### **5.4.5.1.1. Análise do compósito C5 e da cerâmica HA $\beta$ por microscopia de luz**

Na Figura 57 são mostradas as fotomicrografias do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 15 dias após o implante dos scaffolds na calvária do rato. As figuras de (a) a (c) estão relacionados a implantes com o scaffold HA $\beta$  e de (d) a (f), a implantes do scaffold compósito C5. Nas imagens mais panorâmicas [Figura 57 (a) e (c)] é possível perceber a invasão de tecidos em vários poros, desde a borda até o centro das amostras o que mostra que a conectividade dos poros é suficiente para o processo de vascularização. Infelizmente, as imagens referentes aos implantes com o scaffold C5 são mais difíceis de visualizar e isso ocorre devido a um artefato de técnica. No processo de descalcificação, que é realizado antes da inclusão em parafina, o compósito não é completamente desmineralizado. Assim, o material fica mais difícil de cortar e solta os resíduos que são observados como um pó preto nas imagens. Além disso, parte do material que se soltou da lâmina se perdeu nos cortes. A coloração preta do compósito nas imagens ocorre simplesmente pelo fato da luz não o atravessar. Mesmo com essas condições adversas, importantes morfologias puderam ser avaliadas e serão mostradas a seguir.

Nas Figura 57 (b) e (f) é possível observar alguns vasos sanguíneos e preenchimento de tecido conjuntivo no interior dos poros. Esse evento é de suma importância nas fases iniciais de formação óssea, pois as células osteogênicas que se diferenciam em osteoblastos, chegam até o biomaterial, sempre guiadas por um vaso sanguíneo. Assim, o osso sempre deve se formar ao redor desses vasos. Na Figura 57 (c) é possível observar a presença de células osteogênicas (seta), próximas à superfície da HA $\beta$ . Esse evento já foi observado anteriormente para os implantes em *bulk* (denso), no entanto, desta vez ele ocorre dentro de um poro. Um processo de neo formação óssea foi observado para o compósito C5 na Figura 57 (e), indicando osteocondução do material para o interior dos poros.

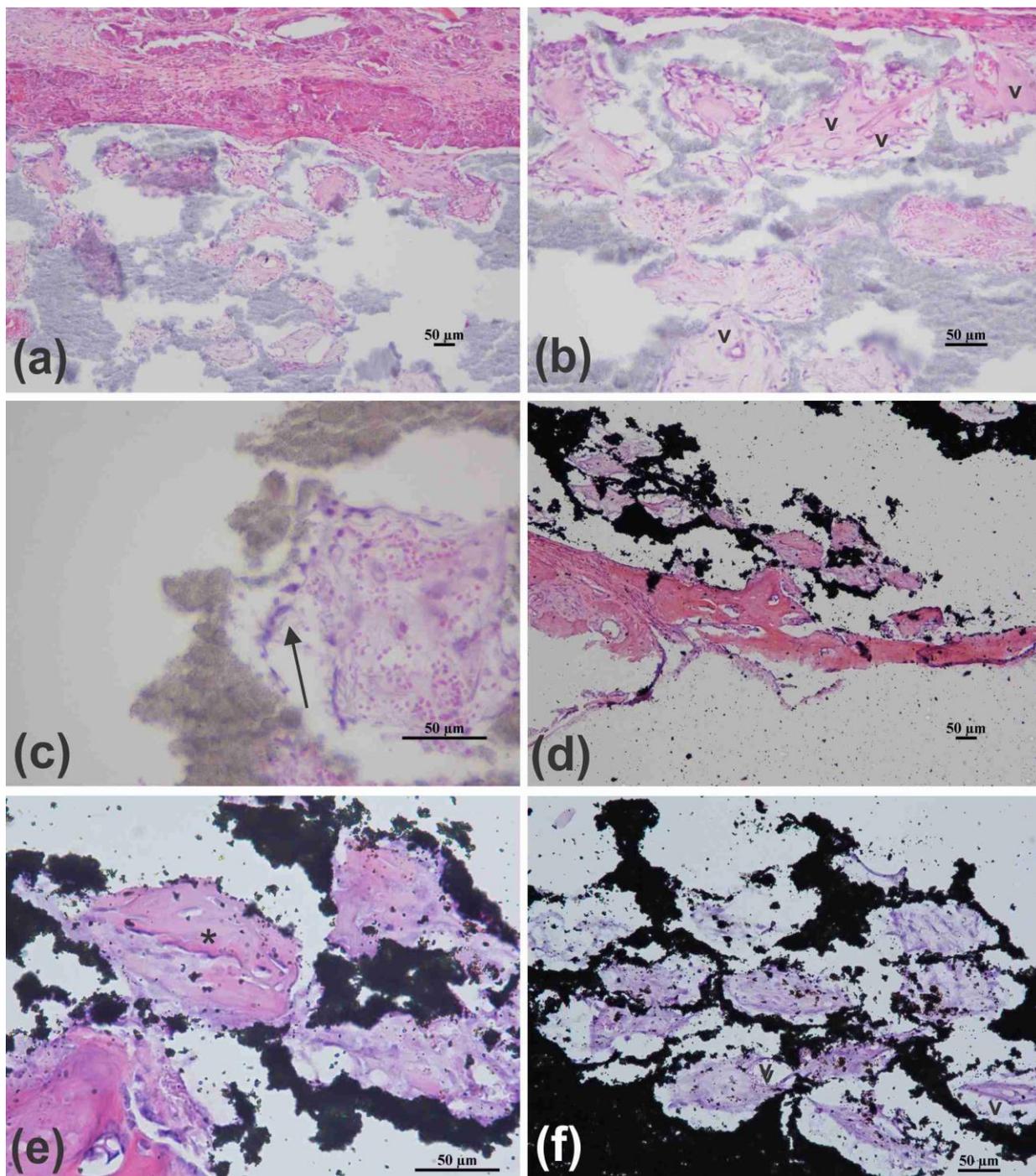


Figura 57. Fotomicrografias dos defeitos ósseos produzidos na calvária de ratos 15 dias após o implante dos *scaffolds* HAβ [(a)-(c)] e do compósito C5 [(d)-(f)]. Notar vasos (v), neoformação óssea (\*) e células osteogênicas (seta). Coloração: H&E.

Na Figura 58 são mostradas as fotomicrografias do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 45 dias após o implante dos *scaffolds* HAβ e C5. Para esse período, o número de vasos

detectados no interior dos poros, para ambos os grupos, aumentou significativamente. Além disso, foram observados poros com formações ósseas em diferentes estágios de maturação tanto para o compósito *C5* quanto para a *HAβ*. Algumas formações estavam bastante uniformes preenchendo toda a área do poro e contendo somente osteócitos em seu interior. Formações desse tipo podem ser observadas na Figura 58 (a) e (b). Em formações menos maduras havia a deposição de matriz óssea e os osteoblastos puderam ser observados na Figura 58 (c) e (e). Além disso, mesmo após 45 dias, em alguns poros apareceram vasos e tecidos conjuntivos, o que pode indicar formações ósseas bastante preliminares com se observa na Figura 58 (b) e (f). A morfologia dessas estruturas foi observada mais detalhadamente nas imagens de microscopia eletrônica de varredura.

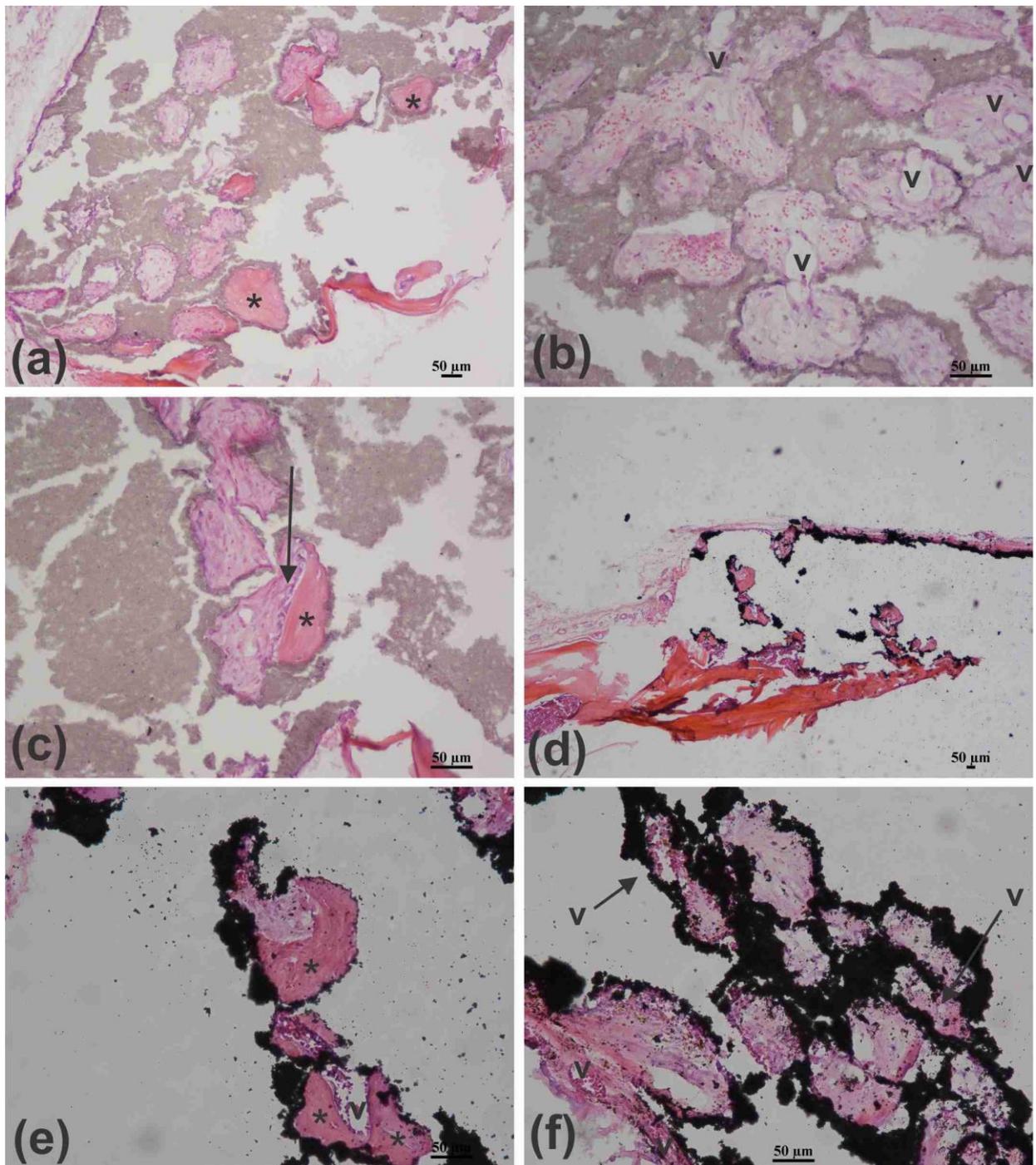


Figura 58. Fotomicrografias dos defeitos ósseos produzidos na calvária de ratos 45 dias após o implante dos *scaffolds* HAβ [(a)-(c)] e do compósito C5 [(d)-(f)]. Notar vasos (v), neoformações ósseas (\*) osteoblastos (seta). Coloração: H&E

#### **5.4.5.2. Análise do compósito C5 e da HA $\beta$ por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Na Figura 59 é possível constatar como ficou a morfologia do *scaffold* HA $\beta$  45 dias após o implante na calvária de rato *Wistar*. Na Figura 59 (a) é possível visualizar, de forma panorâmica, que uma grande quantidade de poros estava completamente preenchida por tecido ósseo ou tecido conjuntivo. Em um desses poros sanguíneo [Figura 59 (b)] foi possível observar a presença de um vaso (seta) e, em volta deste, a deposição de matriz sobre a pastilha [Figura 59(c)]. Em outra região [Figura 59 (d)], um espesso vaso sanguíneo (seta) foi observado atravessando vários poros. Ao lado desse vaso, várias células com prolongamentos interligados por uma estrutura colagenosa foram observadas [Figura 59 (d) e (e)]. Acredita-se que essas células sejam osteoblastos ou células osteogênicas pelo fato de estarem em volta de um vaso e depositando um material que pode ser matriz óssea. Na Figura 59 (f) uma micrografia panorâmica da região da face cerebral pode ser observada. Nessa micrografia é possível observar que o estágio de ossificação é mais avançado do que o mostrado para a face capilar. É possível observar um denso recobrimento em quase toda a amostra. No entanto, novamente, o recobrimento não é uniforme em toda a extensão da amostra como foi mostrado anteriormente.

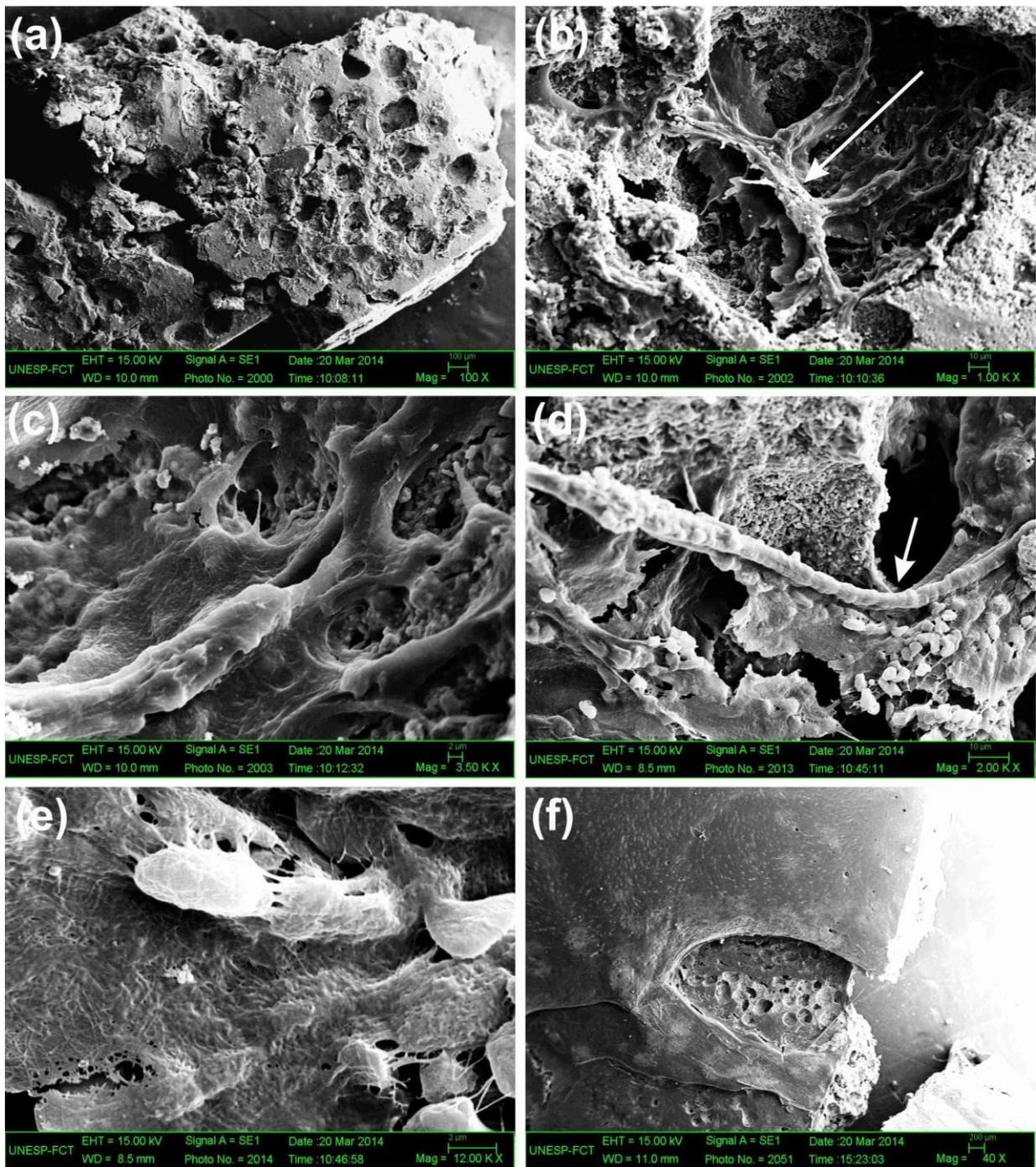


Figura 59. Micrografias de superfície de *scaffolds* HA $\beta$  retirados da calvária de ratos 45 dias após o implante. (a-e) face capilar (f) face cerebral. As setas indicam vasos sanguíneos.

Na Figura 60 micrografias de superfície de *scaffolds* C5 retirados da calvária de ratos 45 dias após o implante podem ser observadas. Na Figura 60 (a) uma imagem panorâmica da face

cerebral do *scaffold* pode ser visualizada. Nessa imagem é possível observar uma região de osso antigo muito bem aderida ao *scaffold* por uma interface que os “prende”. Essa região pode ser considerada como uma região de osseointegração. Sobre o *scaffold*, foi observada uma morfologia arredondada que pode estar relacionada a uma acrescência globular. Essas estruturas ocorrem na etapa de mineralização e, de acordo com Davies e colaboradores, elas formam a linha de cimento como visualizado na análise histológica para os implantes na forma de *bulk*. Essas acrescências globulares cobrem a superfície de reabsorção do osso velho antes da deposição de matriz de colágeno do osso novo [114,115]. Na Figura 60 (c) é possível notar um vaso recoberto por matriz no interior de um poro, o qual é mostrado mais detalhadamente na Figura 60 (d). Ao redor desse vaso um tecido bastante celularizado pode ser observado. Na Figura 60(e) uma região totalmente recoberta da superfície *scaffold* é mostrada. Na região em questão, é possível observar a morfologia dos feixes colágenos e das células que provavelmente os estão depositando. A morfologia da face cerebral de um *scaffold* retirado da calvária 45 dias após o implante é mostrada na Figura 60 (f). Novamente, o recobrimento da região não é regular e é maior do que o da face capilar preenchendo praticamente toda a superfície do *scaffold*.

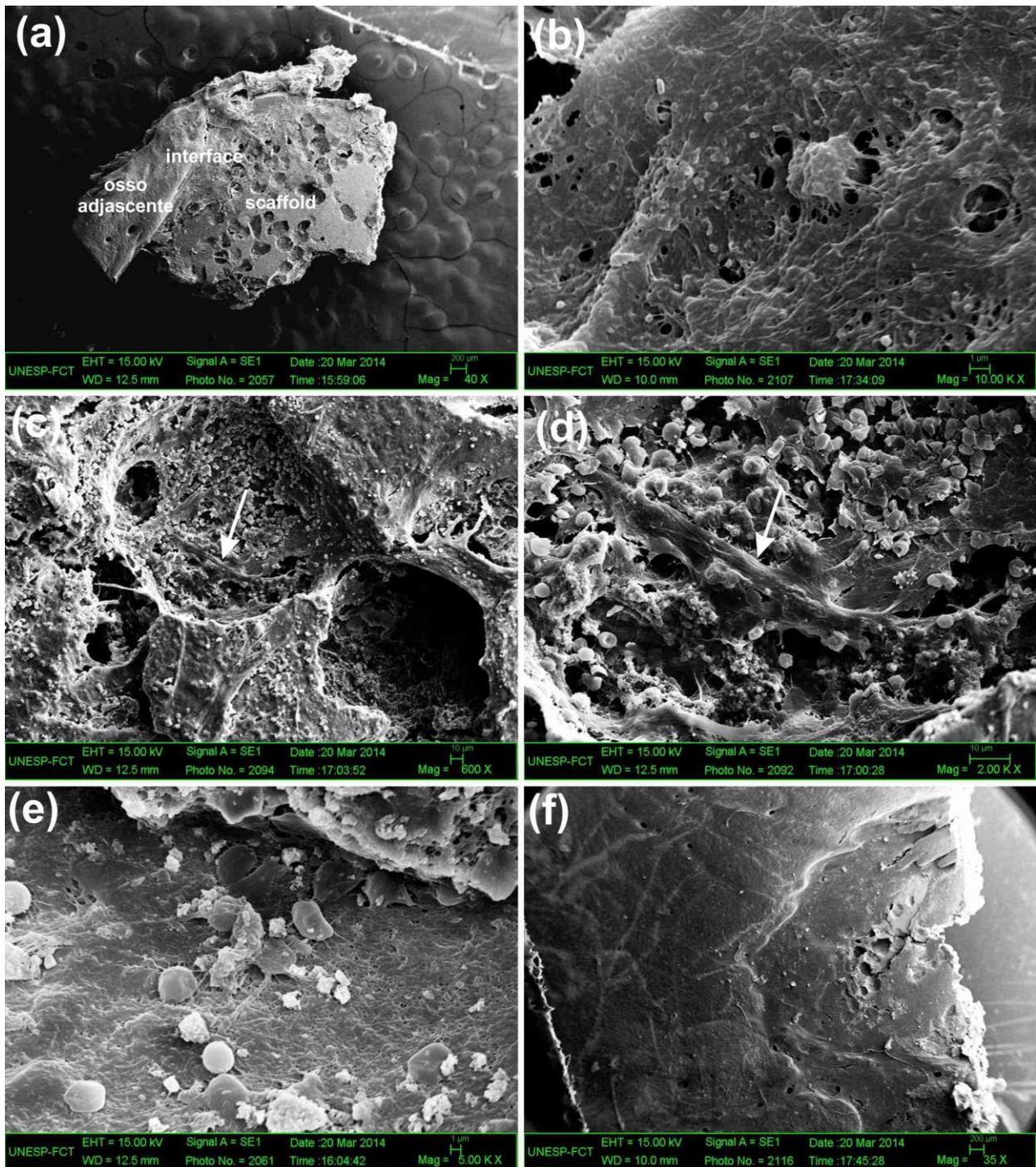


Figura 60. Micrografias de superfície de *scaffolds* C5 retirados da calvária de ratos 45 dias após o implante. (a-e) face capilar (f) face cerebral. As setas indicam o vaso sanguíneo.

Na Figura 61 a morfologia de fratura dos *scaffolds* 45 dias após o implante é mostrada. As morfologias foram análogas para os dois grupos (C5 e HAb), isto é, nas imagens panorâmicas [Figura 61 (a) e (c)] é possível notar que no meio da pastilha os poros estão praticamente todos preenchidos por matriz ou tecido conjuntivo. Nas imagens mais aproximadas, Figura 61 (b) e (d),

é possível observar que um mesmo vaso passa por diferentes poros. Essas imagens confirmam que, mesmo para as partes mais internas dos scaffolds, há uma grande quantidade de tecido e vasos sanguíneos, ou seja, houve conectividade suficiente entre os poros para que o tecido ósseo chegasse até o meio da amostra.

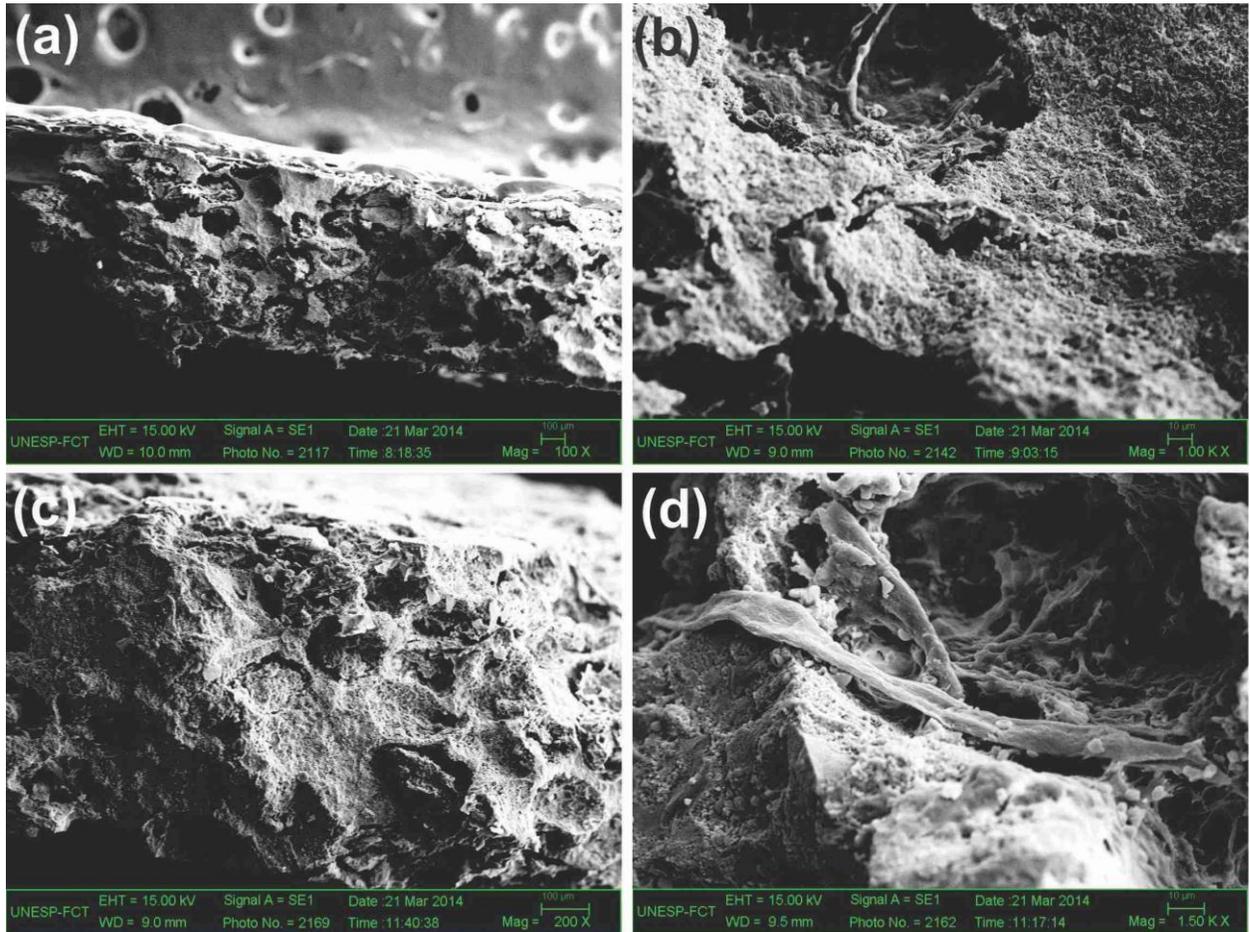


Figura 61. Micrografias de fratura de *scaffolds* HAB [(a) e (b)] e C5 [(c) e (d)] retirados da calvária de ratos 45 dias após o implante.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram atingir os objetivos inicialmente propostos de produzir uma cerâmica bifásica ( $HA/\beta-TCP$ ), de determinar a composição e a temperatura de sinterização ideal para o compósito C5, de produzir dispositivos porosos (elementos porosos/*scaffolds*) e de avaliar o comportamento desses materiais em testes *in vivo* e *ex vivo*.

As seguintes conclusões são válidas com relação à cerâmica bifásica ( $HA/\beta-TCP$ ):

- Ossos de peixe, devidamente selecionados, e calcinados a 900 °C por 8 h em atmosfera de ar, permitem obter uma cerâmica bifásica ( $HA/\beta-TCP$ ) com fração de volume (%) da fase  $\beta-TCP$  da ordem de 12% e uma razão molar Ca/P de 1,62;
- O processo de moagem dos ossos calcinados por 8 h em moinho de energia não induz a formação de fases adicionais, sendo o efeito da moagem a redução no tamanho de partícula e no tamanho de cristalito, resultando em um material nanoestruturado;
- A presença de magnésio (Mg) no material pode produzir substituições nos sítios de cálcio (Ca), preferencialmente nos sítios da fase  $\beta-TCP$ ;

Conclusões relacionadas à obtenção e otimização do compósito C5 quanto à concentração (vol.%) dos constituintes e à temperatura de sinterização:

- A variação da concentração (vol.%) do constituinte ( $HA/\beta-TCP$ ) no compósito C5 induz, de forma geral, uma antecipação do início do ponto de fusão (*on-set*);
- Das composições investigadas às composições intermediárias: (60% $Nb_2O_5$ -40% $HA\beta$ , 50% $Nb_2O_5$ -50% $HA\beta$ , 40% $Nb_2O_5$ -60% $HA\beta$  e 30% $Nb_2O_5$ -70% $HA\beta$ ) são as que têm o início do ponto de fusão (*on-set*) mais antecipado;
- A antecipação do ponto de fusão observado possivelmente está relacionada à sinterização com fase líquida e a sistemas eutéticos, cujos pontos de fusão são menores que o de seus elementos constituintes;
- A composição (50% $Nb_2O_5$ -50% $HA\beta$ ) foi a que apresentou a maior antecipação do início do ponto de fusão, a uma temperatura de ~ 1023 °C, abaixo da temperatura dos constituintes HA (1670 °C),  $\beta-TCP$  1760 °C) e do  $Nb_2O_5$  (1512 °C);

- A composição *C5* foi a que apresentou a maior contração linear (~ 6,1%), maior densidade (~ 2,7 g/cm<sup>3</sup>) e a menor porosidade (~ 29%);
- Para a composição *C5* sinterizada na temperatura de 1000 °C por 2 h em atmosfera de ar foram identificadas as fases cristalinas: óxido de cálcio nióbio  $CaNb_2O_6$  (Fersmita), óxido de fósforo nióbio  $PNb_9O_{25}$  e  $\beta$ -fosfato tricálcico  $Ca_3(PO_4)_2$ , bem como uma pequena quantidade residual de pentóxido de nióbio ( $Nb_2O_5$ );
- As frações de volume (%) das fases cristalinas presentes no compósito *C5* sinterizado a 1000 °C, determinadas pelo refinamento por Rietved, mostraram que a fase majoritária é a  $\beta$ -TCP (~ 42%) seguida por  $CaNb_2O_6$  (~ 35%),  $PNb_9O_{25}$  (~ 22%) e  $Nb_2O_5$  (~ 1%);
- A densidade e a microdureza Vickers do compósito *C5* sinterizado a 1000 °C são superiores as da cerâmica bifásica  $HA\beta$ , indicando que a adição de pentóxido de nióbio produz um reforço na cerâmica bifásica;
- O compósito *C5*, quando sinterizado na temperatura de 650 °C, apresenta as fases dos precursores  $HA$ ,  $\beta$ -TCP,  $Nb_2O_5$  e o surgimento da fase  $CaNb_2O_6$  (Fersmita). A partir dessa temperatura até 950 °C surge a fase  $PNb_9O_{25}$  e, na faixa entre 1050 e 1150 °C, o compósito *C5* é composto somente pelas fases:  $PNb_9O_{25}$ ,  $CaNb_2O_6$  e  $\beta$ -TCP.
- As frações de volume (%) das fases cristalinas presentes no compósito *C5* sinterizado entre 1000 e 1120 °C variam muito pouco, enquanto abaixo e acima desse intervalo as mudanças são bem significativas;
- As propriedades físicas e mecânicas do compósito *C5* são maximizadas na temperatura de 1080 °C, sendo um comportamento característico de sistemas eutéticos;
- A análise por MEV mostra que o tamanho dos poros aumenta com a temperatura de sinterização devido ao fenômeno de coalescência de poros que ocorre em sistemas eutéticos e na sinterização com a presença de fase líquida;
- A composição com a adição de 50% de  $HA\beta$  (*C5*), sinterizada na temperatura de 1080 °C, foi a que apresentou os melhores resultados com relação às propriedades físicas e mecânicas;
- O uso da lactose como agente espaçador para a formação de poros nos materiais estudados foi eficiente tanto para a cerâmica bifásica como para o compósito *C5*;

- Os *scaffolds* produzidos para o compósito *C5* e para a cerâmica *HAβ* com a concentração 50% (vol.) de lactose são mecanicamente estáveis, com porosidade e conectividade de poros adequados, para implantes *in vivo*;

- Os resultados *in vivo* demonstraram que o compósito *C5* e a amostra *HAβ* possuem comportamento osteocondutor, osteoindutor e de osteointegração. Além disso, foi comprovado que esses materiais na forma de *scaffold* possuem uma estrutura tridimensional que facilita o processo de angiogênese.

## 7. PERSPECTIVAS

Durante e após a realização desse trabalho, surgiram novas ideias que visam dar continuidade ao estudo de biomateriais a base de óxido de nióbio e cerâmicas de fosfato de cálcio.

Pretende-se, por exemplo, analisar e quantificar os efeitos de osteoindução dos materiais estudados nesse trabalho em áreas ectópicas, como por exemplo, em implantes subcutâneos em ratos.

Além disso, visando confirmar se a geometria dos *scaffolds* desenvolvidos são eficientes para efeitos de osteocondução em enxertos ósseos, um estudo *in vivo* com os materiais na forma de grânulos, com uma superfície de contato maior, deve ser realizado.

Como os materiais utilizados nesse estudo são obtidos de fontes naturais, uma avaliação quantitativa de citotoxicidade se faz necessária. Esse estudo será realizado em breve utilizando cultura de osteoblastos e fibroblastos.

Um mapeamento de outras propriedades mecânicas tais como resistência à fadiga, flexão e compressão pode ser interessante para determinar para quais áreas do corpo humano os materiais desenvolvidos nesse trabalho podem ser melhores empregadas.

## 8. REFERENCIAS

---

- [1] Shepperd J. A., Apthorp H., Bone J. “A contemporary snapshot of the use of hydroxyapatite coating in orthopaedic surgery” *Joint Surg Br*, 87 (2005) 1046-1049.
- [2] Ratner B., Hoffman A. S., Schoen F. J. and Lemons J. E. “Biomaterials Science. An Introduction of materials in medicine” 3 edição, Elsevier, Canada (2013).
- [3] Portal Brasil. Balanço do ministério da saúde. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/09/pais-dobrou-numero-de-doadores-de-orgaos-em-dez-anos>. Acesso em 5 de agosto de 2014.
- [4] Pham C., Greenwood J., Cleland H., Woodruff P., Maddern G. “Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review” *Burns*, 33 (2007) 946-957.
- [5] Drexler J. W. “Materials Engineering for Enhanced Tissue Scaffold Mechanical Properties” Tese (doutorado), 91, The Ohio State University, Columbus-OH-USA (2010).
- [6] Johnell O., Kanis J. A., Odén A., Sernbo I., Redlund-Johnell I., Petterson C., Laet C., Jönsson B. “Fracture risk following an osteoporotic fracture” *Osteoporosis International*, 15 (2004) 175-179.
- [7] Arcos D., Boccaccini A. R., Bohner M., Díez-Pérez A., Epple M., Gómez-Barrena E., Herrera A., Planell JA., Rodríguez-Mañas L., Vallet-Regí M. “The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis.” *Acta Biomaterialia*, 10 (2014) 1793.
- [8] Instituto Brasileiro de Geografia e estatística - IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em 04 de junho de 2014.
- [9] U.S. Department of Health and Human Services - National Institute on Aging. “Global Health and Aging”. Disponível em [http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/global\\_health\\_and\\_aging.pdf](http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/global_health_and_aging.pdf). Acessado em 10 de Agosto de 2014.
- [10] Hanninka G. and Arts C. J. J. “Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration?” *Injury, Int. J. Care Injured*, 42 (2011) S22–S25.
- [11] Teixeira L. J. C, “Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos.” Tese (Doutorado), (2009), Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, RJ.
- [12] Gutierrez, M. “Substitutos ósseos – Conceitos gerais e estado actual.” *Arquivos de Medicina*, 19 (2006) 153-62.
- [13] Bhatt, R. A., Rozental, T. D. “Bone Graft Substitutes” *Hand Clin*, 28 (2012) 457–468.
- [14] Park J., Lakes R. S. “Biomaterials: An Introduction” 3<sup>th</sup> Edition, Springer, New York, (2003).
- [15] Dorozhkin. S. “Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics” *BIO*, 1 (2011) 1-51.
- [16] Bento D. A, “Análise de resistência mecânica em implantes de osso: um enfoque numérico e experimental”, Tese (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC (2003).
- [17] Gomide, V. S. “Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita – alumina e hidroxiapatita – titânia para fins biomédicos”. Tese (Doutorado), UNICAMP, Campinas, (2005).
- [18] Hench, L. “Biomaterials: a forecast for the future”, *Biomaterials*, 19, (1998) 1419-1423.
- [19] Oréfice, R. L., Pereira, M. M., Mansur, S. H., Biomateriais: fundamentos e aplicações, Ed. Cultura Médica, 1ª Edição Rio de Janeiro, (2006).

- 
- [20] Weinand, W. R. "Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis." Tese (doutorado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá-Pr (2009).
- [21] Ribeiro. C. "Processamento e caracterização de cerâmicas à base de hidroxiapatita e fosfato tricálcico" Tese (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, São Paulo - SP (2003).
- [22] Bouler J. M, Dactiulsi G. "In vitro carbonated apatite precipitation calcium phosphate pellets presenting various HAP -  $\beta$ -TCP ration"; Key Engineering Materials, 192 (2001) 119.
- [23] Szesz E. M. "Improved tribo-mechanical behavior of CaP-containing TiO<sub>2</sub> layers produced on titanium by shot blasting and micro-arc oxidation" Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1 (2014) 1-11.
- [24] Nascimento W. J., Bonadio T. G. M., Freitas V. F., Weinand W. R., Baesso M. L., Lima W. M. "Nanostructured Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-natural hydroxyapatite formed by the mechanical alloying method: A bulk composite" Materials Chemistry and Physics, 130 (2011) 84.
- [25] Nascimento W. J. "Preparação e caracterização físico-mecânica, microestrutural e térmica de compósitos à base de nióbio e hidroxiapatita." Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá-Pr (2009).
- [26] Bonadio T. G. M., "Estudos dos Compósitos TiO<sub>2</sub>-Hidroxiapatita e Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Hidroxiapatita: Comportamento Físico-mecânico, Estrutural e de Bioatividade" Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá-Pr (2011).
- [27] Bonadio. T. G. M., Sato. F., Medina. A. N., Weinand. W. R, Baesso M. L. "Bioactivity and structural properties of nanostructured bulk composites containing Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and natural hydroxyapatite" Journal of Applied Physics, 113 (2013) 223505.
- [28] Sauerbier, S., Schön, R., Otten. J, Schmelzeisen, R., Gutwald, R. "The development of plate osteosynthesis for the treatment of fractures of the mandibular body e A literature review" Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 36 (2008) 251-259.
- [29] Branemark P.I. "Regeneration of bone marrow" Acta Anat, 59 (1964) 1-46.
- [30] 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.
- [31] Clark, A. B., Hench L. L. Paschall H. A. "The influence of surface chemistry on implant interface histology: A theoretical basis form implant material selection" J. Biomed. Mater. Res, 10 (1976) 161-177.
- [32] Williams, D. F. "Definitions in Biomaterials". Elsevier, Amsterdam (1987).
- [34] Rodrigues L. R. "*Scaffolds* baseados em nanopartículas de fosfatos de cálcio para engenharia tecidual óssea" Tese (Doutorado), UNICAMP, Campinas (2010).
- [35] Cartilha de apoio médico e científico ao judiciário (Capítulo 08-pág 22). Disponível em: [http://www.unimedfesp.coop.br/caju/capitulo\\_08.html](http://www.unimedfesp.coop.br/caju/capitulo_08.html). Acessado em 10 de agosto de 2014.
- [36] Elliott, J. C. "Structure and Chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates", Elsevier Science, London U.K. (1995).
- [37] Hench L. L., Wilson, J. "An introduction to bioceramics" World Scientific, Singapore (1993).

- 
- [38] Yubao L., Xingdong Z., Groot. K., “Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 18 (1997) 737.
- [39] Liu B. and Lun D. X. “Current Application of  $\beta$ -tricalcium Phosphate Composites In orthopaedics” *Orthopaedic Surgery*, 4 (2012) 139-144.
- [40] Iwayama Y. “Sintered carbonate apatite as bioresorbable bone substitutes.” *Journal Biomedical Materials Research*, 39 (1998) 603.
- [41] Rodrigues, L. R. “Síntese e caracterização de hidroxiapatita etitânica nanoestruturadas para a fabricação de compósitos” Tese (Mestrado), UNICAMP, Campinas-Sp (2008).
- [42] Patentes Online. Disponível em: <http://www.patentesonline.com.br>. Acessado em 14 de agosto de 2014.
- [43] Dorozhkin S. V. “Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials” *J. Mater Sci*, 44 (2009) 2343.
- [44] Inorganic Crystal Structure Database – ICSD. Disponível em: [http://www.fiz-karlsruhe.de/icsd\\_home.html](http://www.fiz-karlsruhe.de/icsd_home.html). Acessado em 28 de julho de 2014.
- [45] Departamento Nacional de Producao Mineral. Disponível em: <http://www.dnpm.gov>. Acessado em 23 de agosto de 2014.
- [46] Sastre, R., Aza, S., Román, J. S., “Biopolímeros de origen natural” *Biomateriales*, 12 (2004) 515.
- [47] Smith, W. F., “Princípios de Ciência e Engenharia dos Materiais” 2ª ed., McGraw-Hill, Columbus OH-USA (1993).
- [48] Nobre, M. A. L. “Engenharia de microestrutura em varistor à base de ZnO: evidências de homogeneidade e correlação com reações químicas” *Cerâmica*, 51 (2005) 13-18.
- [49] BLOM, A. “Which scaffold for which application?” *Curr. Orthop.*, 21 (2007) 280-287.
- [50] Oliveira, L.S. A. F. “Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras” *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 9 (2010) 37-44.
- [51] Klenke. F. M. “Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo”. *J Biomed Mater Res A*, 85, (2008) 87-108.
- [52] Galois, L. Mainard, D. “Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: An experimental study”. *Acta Orthop Belg*, 70 (2004) 598-603.
- [53] Teixeira L. J. C. “Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos.” Tese (Doutorado), Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias - RJ (2009).
- [54] Junqueira, L. C., Carneiro, J. “Histologia Básica” 12ª Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ (2013).
- [55] Judas F., Palma P., Falacho R. I., Figueredo H. “Estrutura de Dinamica do Tecido Osseo” Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina Disciplina de Ortopedia, 2012.
- [56] LeGeros, R. Z., “Calcium phosphate in oral biology and medicine” *Monographs in oral science*, 15, S. Karger, NY, (1991).
- [57] Frost, H. M. J. “Why should many skeletal scientists and clinicians learn the Utah paradigm of skeletal physiology” *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 2, (2001) 121-130.

- 
- [58] Miron, R. J., Zhang Y. F. "Osteoinduction: A Review of Old Concepts With New Standards." *Journal of Dental Research*, 91 (2012) 736-744.
- [59] JILKA, R. L. "Biology of the Basic Multicellular Unit and the Pathophysiology of Osteoporosis" *Medical and Pediatric Oncology*, 41 (2013) 182-185.
- [60] Candido A. G. "Compósito baseado em HA- $\beta$ TCP-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> estimula a osteoindução durante o reparo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos" Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá-Pr (2014).
- [61] Heng, B. C., Cao, T., Lee, E. H. "Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage *n vitro*". *Stem Cells*, 22 (2004) 1152-1167.
- [62] Payushina, O. V., Domaratskaya E. I., Starostin V. I. "Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential" *Cell Biology*, 33 (2006) 2-18.
- [63] Gomes P. S., Fernandes M. H. "Models in Bone-Related Research: The Relevance of Calvarial Defects in the Assessment of Bone Regeneration Strategies." *Laboratory Animals*, 45 (2011) 14-24.
- [64] Bauer T., Muschler G. F. "Bone Graft Materials". In: *Clinical Orthopedics and Related Research*, 371 (2000) 10-27.
- [65] Albrektsson T., Johansson C. "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration". *European Spine Journal*, 10 (2001) S96-S101.
- [66] Lima, W. M., "Materiales compuestos de matriz acero inoxidable austenítico reforzado com intermetálicos: comportamento mecânico, a corrosión y desgaste", Tese de doutorado apresentada para a obtenção do título de doutor. Universidad Carlos III de Madrid, (1999).
- [67] S/N "Determination of density of Compacted or Sintered metal Powders". MPIF Standard, n°42,1986
- [68] Molinaro E. M., Caputo L. F. G., Gitirano, Amendoeira M. R. R. "Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde Rio de Janeiro" EPSJV; IOC, 2009.
- [69] Ottaviani G, Jaffe N. "The epidemiology of osteosarcoma". In: Jaffe N. et al. "Pediatric and Adolescent Osteosarcoma". New York (2009) Springer.
- [70] Kiyochi H. J. "Estudo *ex vivo* do compósito hidroxiapatita-pentóxido de Nióbio (HA-Nb) como biomaterial empregado para o reparo ósseo em defeitos de calvária" Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá-Pr (2013).
- [71] Chenu. C. "Osteocalcin Induces Chemotaxis, Secretion of Matriz Proteins, and Calcium mediated Intracellular Signaling in Human Osteoclast-like Cells". *The Journal of Cell Biology*, 127 (1994) 1149-1158.
- [72] Nakamura. A. "Osteocalcina Secretion as an Early Marker of *In Vitro* Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells". *Tissue Engineering*, 15 (2009) 169-180.
- [73] Hayashi F. "Avaliação imuno-histoquímica de defeitos de furca classe II tratados pelo retalho deslocado coronariamente, associado ou não, à regeneração tecidual guiada e exertos de tecido reparativo de alvéolos." Tese (Doutorado), Universidade Estadual de São Paulo-USP, São Paulo-Sp (2009).
- [74] Wendhausen, P. A. P. "Análises térmicas" Apostila do curso de caracterização de materiais III da UFSC.
- [75] Gallagher P. K. "Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry" Elsevier Science B. V. Amsterdam (1998).

- 
- [76] Padilha, A. F. “Materiais de Engenharia: Microestrutura e Propriedades”, Curitiba, Brasil (2000)
- [77] Cullity, B.D “Elements of X-Ray diffraction” Addison-Wesley Publishing Company, USA (1956)
- [78] Young, R. A. “The Rietveld method” Oxford University Press, New York (1995).
- [79] Sala. O. “Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho” Editora da Unesp (1996).
- [80] Colthup N. B., Daly L.H, “Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy”, Academic Press Inc, 3th edition Wiberley (1990).
- [81] Goodhew P. J., Humphreys J., Beamlan R. “Electron Microscopy and Analysis”, 3 th Edition. Taylor & Francis, London (2001).
- [82] Ferreira, R. A. N. “Modelo para o comportamento de microesferas combustíveis de tório e urânio na peletização” Tese (Doutorado), UNICAMP, Campinas-SP (2000).
- [83] Souza S. A. “Ensaio mecânicos de materiais metálicos Fundamentos teóricos e práticos” 5 th edição, São Paulo, (1982).
- [84] Sobczak-Kupiec. A., Wzorek. Z. “The influence of calcination parameters on free calcium oxide content in natural hydroxyapatite” *Ceramics International*, 38 (2012) 641–647.
- [85] Goto. T., Sasaki. K. “Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination” *Ceramics International*, 40 (2014) 10777–10785.
- [86] Martínez-Castañón G. A. “Preparation and characterization of nanostructured powders of hydroxyapatite” *Superficies y Vacío*, 25 (2012) 101-105.
- [87] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Chem. Int. Ed.*, 41 (2002) 3130.
- [88] Kim. D. H “Preparation and *In Vitro* and *In Vivo* Performance of Magnesium Ion Substituted Biphasic Calcium Phosphate Spherical Microscaffolds as Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Microcarriers” *Journal of Nanomaterials*, 201 (2013) 1-9.
- [89] Bigi A. “Rietveld structure refinements of calcium hydroxylapatite containing magnesium,” *Acta Crystallographica Section B*, 52 (1996) 87–92.
- [90] Yasukawa A., Ouchi S., Kandori A., Ishikawa T., “Preparation and characterization of magnesium-calcium hydroxyapatites,” *Journal of Materials Chemistry*, 6 (1996) 1401– 1405.
- [91] Kim T. W. “In situ synthesis of magnesium-substituted biphasic calcium phosphate and in vitro biodegradation,” *Materials Research Bulletin*, 47 (2012) 2506–2512.
- [92] Carbajal. L., Serena. S., Caballero A., Saínez M.A., Detsch R., Boccaccini. A. R. “Role of ZnO additions on the  $\alpha/\beta$  phase relation in TCP based materials:Phase stability, properties, dissolution and biological response” *Journal of the European Ceramic Society*, 34 (2014) 1375–1385.
- [93] Gao C. “Enhanced sintering ability of biphasic calcium phosphate by polymers used for bone scaffold fabrication” *Materials Science and Engineering C*, 33 (2013) 3802–3810.
- [94] Aza, P. N., Guitián, F., Santos, C., Aza, S., Cuscó, R., Artús, L. “Vibrational properties of calcium phosphate compounds. 2. Comparison between hydroxyapatite and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate” *Chem. Mater.* 9 (1997) 916-922

- 
- [95] Lukić. M. “Dense fine-grained biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics designed by two-step sintering” *Journal of the European Ceramic Society*, 31 (2011) 19–27.
- [96] Balachandran. U., Eror N. G. “Raman spectrum of the high temperature form of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>” *Journal of materials science letters*, 1 (1982) 384.
- [97] McConnel A. A., Anderson J. S., Rao C. N. R. “Raman spectra of niobium oxides” *Spectrochimica Acta*, 32 (1976) 1067-1076.
- [98] Bolzon. L. B. “Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> como Fotocatalisador para Degradação de Índigo de Carmina” Tese (Mestrado), Universidade de Brasília-UnB (2007).
- [99] Kokubo T., Takadama H. “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?” *Biomaterials*, 27 (2006) 2907-2915.
- [100] Gasik M. “Handbook of Ferroalloys: Theory and Technology” Elsevier, London U.K. (2013).
- [101] Museu de belas artes. Disponível em: [http://cameo.mfa.org/wiki/Calcium\\_hydroxyapatite](http://cameo.mfa.org/wiki/Calcium_hydroxyapatite). Acessado em 23 de julho de 2014.
- [102] Mirhadi B., Mehdikhani B., Askari N. “Synthesis of nano-sized  $\beta$ -tricalcium phosphate via wet precipitation” *Processing and Application of Ceramics*, 5 (2011) 193-198.
- [103] Muralithran G., Ramesh S. “The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite” *Ceramics International*, 26 (2000) 221- 230.
- [104] Prado da Silva M. H, Ramirez M., Granjeiro J. M., Rossi A. M. “In vitro assessment of new niobium phosphate glasses and glass ceramics” *Key Engineering Materials*, 229 (2008) 361-363.
- [105] Husson. E., Repelin Y., Dao N. Q., Brusset H. “Normal coordinate analysis for *CaNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub>* of columbite structure” *The Journal of Chemical Physics*, 66 (1977) 5173.
- [106] Cho I. S. “Preparation, Characterization, and Photocatalytic Properties of CaNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub> Nanoparticles.” *J. Am. Ceram. Soc.*, 92 (2009) 506.
- [107] Ayudhya S. K., Soottitawat A., Prasertdam P., Satayaprasert C. “Effect of aging on the properties of mesoporous niobium oxide” *Mat. Chem. Phys.*, 110 (2008) 387.
- [108] Davies, J. E. Hosseini, M. M. “Histodynamics of endosseus wound healing”. *Bone Engineering*, (2000) 1-14.
- [109] Davies, J. E. “Mechanisms of endosseous integration”. *International Journal of Prosthodontics*, 11 (1998) 391-401.
- [110] Ebner V. “V. Ueber den feineren Bau der Knochensubstanz” *SberAkadWiss Wien*, 3 (1875) 72.
- [111] German. R. M., Suri. P., Park. S. J. “Review: liquid phase sintering” *J. Mater Sci.*, 44 (2009) 1–39.
- [112] German. R. M. “Liquid phase sintering” Plenum Press, Nova York, (1985).
- [113] Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A. “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds” *Trends in Biotechnology*, 30 (2012) 546-554.
- [114] Davies, J. E., Baldan N. “Scanning electron microscopy of the bone–bioactive implant interface” *J Biomed Mater Res.*, 36 (1997) 429-440.

---

[115] Zhou, H., Chenecky R., Davies J. E. "Deposition of cement at reversal lines in rat femoral bone" *Journal of Bone and Mineral Research*, 9 (1994) 367-374.