UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

VIVIAN CESARINO

**Precusores funcionalizantes de poros à base de alginato para obtenção de
cerâmicas bioativas**

São Carlos
2016

VIVIAN CESARINO

Precusores funcionalizantes de poros à base de alginato para obtenção de cerâmicas bioativas

Versão Corrigida

Original na Unidade

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bellini Ferreira

**São Carlos
2016**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

CESARINO, VIVIAN.

C421p Precusores funcionalizantes de poros à base de alginato para obtenção de cerâmicas bioativas / VIVIAN CESARINO; orientador Eduardo Bellini Ferreira. São Carlos, 2016.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento Caracterização e Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Materiais macroporosos. 2. Bioatividade. 3. Poros funcionais. 4. Biovidro. 5. Fosfato de cálcio. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **VIVIAN CESARINO**.

Título da dissertação: "Precusores funcionalizantes de poros à base de alginato para obtenção de cerâmicas bioativas".

Data da defesa: 04/04/2016

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. **Eduardo Bellini Ferreira**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof. Titular **Hellmut Eckert**
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Prof. Dr. **Murilo Camuri Crovace**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Resultado:

aprovado

aprovado

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:
Prof. Associado **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Ao meu marido Daniel, que me apoiou com muito carinho em mais essa etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eduardo Ferreira, que contribuiu para minha formação acadêmica desde a graduação até o mestrado. Um verdadeiro educador e orientador que sempre colaborou para o meu amadurecimento científico.

Ao Prof. Dr. Rafael Salomão, por compartilhar seu conhecimento e contribuir para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos do GEMaV e da pós graduação, Marcelo, Roger, Raul, José, Leandro, Cesar, Felipe, Mirian e Lucíola. Obrigada pela amizade!

Ao Vitor, Secretário do PPG-CEM, que pacientemente me instruiu, sempre que necessário.

Ao PPG-CEM e ao SMM-EESC-SP, por colocarem os laboratórios e a infraestrutura à disposição.

Aos técnicos Pedro, João e Silvano, pela ajuda nos ensaios realizados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais, Jerônimo e Ivani. Nada poderia conquistar nessa vida sem o amor e ensinamento de vocês. Obrigada por serem os melhores pais que eu poderia ter.

A minha irmã Ivana, que me ensinou o amor pela ciência e pela vida acadêmica. Você me ajudou a ser uma profissional melhor.

Ao meu irmão João, que me encoraja a vencer todas as dificuldades que encontro.

Aos meus avós Iracema e Domingos, que acompanham e torcem por eu vencer cada etapa de minha vida.

À família Virgílio, em especial à Marisa e o Carlos, que me receberam como uma filha. Obrigada pelo apoio e carinho.

A minha família, tios, primos e sobrinhos, por torcerem sempre para meu sucesso. Vocês são pessoas muito importantes em minha vida.

A meus cunhados, Sabrina, Alcides, Bruno e Andreia, pelo incentivo durante esse período.

Muito obrigada a todos!

“Que vossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”
Charles Chaplin

RESUMO

CESARINO, V. **Precursos funcionalizantes de poros à base de alginato para obtenção de cerâmicas bioativas**. 111p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A complexidade de desenvolver novas tecnologias para aplicações em reconstituição óssea se deve à necessidade de combinar várias propriedades químicas e físicas para que o material proporcione o desempenho almejado. Particularmente, em aplicações que visam osteogênese, os enxertos sintéticos devem ser bioativos, possuir porosidade com volume, geometria e interconectividade de poros controlados, além de ter boas propriedades mecânicas, dentro de limites relativamente rígidos. Por essa razão, o recobrimento de materiais bioinertes com cerâmicas bioativas se tornou o foco da presente pesquisa. O objetivo desse estudo foi desenvolver um novo método de produção de enxertos cerâmicos com macroporosidade funcionalizada, onde a formação e o revestimento dos poros são realizados em uma única etapa. Foi realizado o estudo de recobrimento com vidro bioativo e fosfato de cálcio. Para isso, agentes porogênicos na forma de grânulos (de 600 μm a 2 mm de diâmetro) foram sintetizados pelo método da gelificação de uma solução aquosa de alginato de sódio gotejada em solução de nitrato de cálcio (0,5 M), com incorporação de outros elementos para a formação de biovidro ou fosfato de cálcio. Esses grânulos foram conglomerados a um vidro ou alumina em pó, formando um compósito, que foi tratado termicamente para sinterização e formação de poros. No caso da matriz vítrea, a sinterização ocorreu com cristalização simultânea e concorrente. As cerâmicas resultantes foram caracterizadas por microscopia óptica e eletrônica de varredura, sendo possível observar a formação de macroporos aproximadamente esféricos (de 600 μm a 2 mm de diâmetro) revestidos internamente por uma camada de material com possível composição bioativa.

Palavras-chave: Materiais macroporosos, bioatividade, poros funcionais, biovidro, fosfato de cálcio.

ABSTRACT

CESARINO, V. **Functionalizing precursors of pores based on alginate to obtain bioactive ceramics**. 111p. Dissertação (Mestrado) –Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A tough requirement in the manufacture of implants for medicine is to conciliate appropriate mechanical properties and the porosity necessary for bone ingrowth. It is further important to control the fraction, morphology, size, surface to volume ratio and interconnectivity of pores. The difficulty in matching these characteristics is a deterrent for practical applications. High strength materials coated with a bioactive layer can overcome this problem. Therefore, the aim of the present study was to develop a new method for production of implants with functionalized macro porosity on ceramic. The production of a porous glass-ceramic and the internal coating of the pores with a bioactive material were performed in situ. The bioactive glass coating and calcium phosphate coating were studied. In order to achieve this goal, a porogenic agent in the form of beads (from 600 μm to 2 mm diameter) were prepared by the gelation of a water solution of sodium alginate into calcium nitrate solution (0.5 M), and incorporation of other components to yield the Bioglass composition or a calcium phosphate. The beads were further mixed with glass or ceramic powder and the assembly was heat treated for sintering. In the case of glass, the sintering occurred with concurrent crystallization. The obtained ceramics were characterized by optical and scanning electronic microscopy, which indicated that the porogenic beads acted successfully as a sacrificial template to produce functionalized macro pores.

Keywords: macroporous materials, bioactivity, functional pores, bioglass, calcium phosphate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Evolução dos biomateriais.....	32
Figura 2: Relação da composição do biovidro com a classe bioativa (HENCH, 2015b).....	38
Figura 3: Diagrama de fase da solubilidade de diversos compostos de CaP em função do pH. A solubilidade é dada em função da concentração de Ca. (BEN-NISSAN, 2014)	41
Figura 4: Representação esquemática de osteocondução induzida por revestimento CaP....	48
Figura 5: Esquema dos blocos M e G do alginato de sódio(YANG; XIE; HE, 2011).....	49
Figura 6 : Estrutura caixa de ovo do alginato de cálcio.	50
Figura 7: Esquema de métodos de produção de cerâmicas porosas.....	54
Figura 8: Esquema da síntese de cerâmicas com poros revestidos.	61
Figura 9: Aparato usado na síntese de grânulos de alginato.	63
Figura 10: Esquema do mecanismo de síntese da vitrocerâmicas com poros revestidos.....	65
Figura 11: Quebra das ligações glicosídica do alginato durante o tratamento térmico.	67
Figura 12: Curva TG (preta) e DTG (azul) de grânulos de (A) alginato de cálcio e (B) xerogel de silicato de sódio. Aquecimento de 10 °C/min, ar sintético (20 ml/min) e massa inicial 3,3 g. 68	
Figura 13 Curva TG (preta) e DTG (azul) de grânulos obtidos do gotejamento de uma solução de alginato de sódio e silicato de sódio em solução de nitrato de cálcio 0,5 M.....	70
Figura 14: Imagens de câmera digital dos grânulos obtidos a partir de soluções contendo 1% (A), 2% (B) e 3% (C) de alginato e 10% de Na ₂ O.2,38SiO ₂ (%m/m).....	72
Figura 15: Micrografia MEV-FEG com sinal de elétrons secundários dos grânulos provenientes de soluções contendo 1% (A)(D), 2% (B)(E) e 3% (C)(F) de alginato e 10% de Na ₂ O.2,38SiO ₂	73
Figura 16: Microscopia óptica de cerâmicas sinterizadas com grânulos provenientes de soluções contendo 1% (A), 2% (B) e 3% (C) de alginato e 10% de Na ₂ O.2,38SiO ₂ (% m/m). .	74
Figura 17: Micrografia MEV-FEG, com sinal de elétrons secundários, de cerâmicas sinterizadas com grânulos provenientes de soluções contendo 1% (A), 2% (B) e 3% (C) de alginato e 10% de Na ₂ O.2,38SiO ₂ (% m/m).....	75
Figura 18 Imagens de câmera digital de grânulos provenientes de soluções contendo 1% (A), 2% (B) e 3% (C) de alginato e 10% de Na ₂ O.SiO ₂ (% m/m).	77

Figura 19: Micrografia MEV-FEG, com sinal de elétrons secundários, de grânulos sintetizados a partir de soluções contendo 1% (A)(D), 2% (B)(E) e 3% (C)(F) de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$ (% m/m).....	78
Figura 20: Microscopia óptica de cerâmicas sinterizadas com grânulos provenientes de soluções contendo 2% (A) e 3% (B) de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$ (% m/m).	79
Figura 21: Micrografia MEV-FEG, com sinal de elétrons secundários, da superfície de poros gerados por grânulos obtidos a partir de soluções contendo 2% (A) e 3% (B) de alginato e 10% $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$	80
Figura 22: Imagens de câmera digital de grânulos sintetizados a partir de soluções contendo 1% (A), 2% (B), 5% (C) e 7% (D) de metassilicato de sódio e 3% de alginato, em massa.	82
Figura 23 Microscopia óptica de cerâmicas sinterizadas com grânulos obtidos a partir de soluções contendo 1% (A), 2% (B), 5% (C) e 7% (D) de metassilicato de sódio e 3% de alginato (% m/m).....	83
Figura 24: Micrografia (A) óptica e (B) MEV-FEG da superfície dos poros gerados por grânulos provenientes de soluções contendo 3% de alginato e 7% de metassilicato de sódio.	84
Figura 25: Difratomogramas de raio X dos grânulos de soluções com pH 1, 2, 3, 4 e 5.....	86
Figura 26: Difratomogramas de raios X de grânulos de soluções com pH 6, 7, 8, 9, 10 e 11.....	87
Figura 27: Micrografias MEV-FEG da superfície de grânulos obtidos de solução de alginato de cálcio gotejada em soluções PBS de diferentes pHs.....	90
Figura 28: Micrografias FEG-SEM dos grânulos sintetizados em solução PBS de diferentes pHs, obtidas com elétrons retroespalhados.	92
Figura 29: Imagens de câmera digital de grânulos de alginato após 24 h na solução de PBS em pH 12 (A) e pH 13(B).	93
Figura 30: Micrografias MEV-FEG da secção transversal de grânulos sintetizados em solução PBS com diferentes pHs, obtidas com elétrons retroespalhados.	94
Figura 31 Micrografias FEG-SEM da interface alginato/CaP sintetizadas em diferetes pHs... ..	95
Figura 32: Microscopias óticas dos poros revestidos utilizando grânulos sintetizadas em diferentes pHs.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos principais da família dos fosfatos de cálcio (HABRAKEN et al., 2015)...	41
Tabela 2 Exemplos de modelo sacrificiais relatados na literatura Adaptado de (STUDART et al., 2006)	55
Tabela 3: Resultado semiquantitativo de EDS da superfície de grânulos provenientes de soluções com diferentes concentrações de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$	73
Tabela 4: Resultado semiquantitativo de EDS dos poros formados por grânulos a partir de soluções com diferentes concentrações de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$	75
Tabela 5: Resultado semiquantitativo de EDS do material residual no interior de poros formados por grânulos obtidos a partir de soluções com diferentes concentrações de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$ (% m/m).....	76
Tabela 6: Resultados semiquantitativos de EDS de grânulos sintetizados a partir de soluções com diferentes concentrações de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$	78
Tabela 7: Resultado semiquantitativo de EDS da superfície dos poros formados por grânulos de soluções com diferentes concentrações de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$	80
Tabela 8: Resultado semiquantitativo de EDS dos poros formado por grânulos a partir de solução com 3% alginato e 7% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$	84

LISTA DE SIGLAS

CFC.	Cerâmicas de fosfato de cálcio
CaP.	Fosfato de cálcio
SBF.	Fluido corporal simulado
HCA.	Hidroxicarbonato apatita
MCPM.	Fosfato monocálcico monohidrato
DCPA.	Fosfato dicálcico
DCPD.	Fosfato dicálcico dihidratado
OCP.	Fosfato octacálcico
HAP.	Hidroxiapatita precipitada
ACP.	Fosfato de cálcio amorfo precipitado
MCP.	Fosfato monocálcio
α -TCP.	α -Fosfato tricálcico
β -TCP.	β -fosfato tricálcico
HA.	Hidroxiapatita
Kps.	Produto de solubilidade
Alg. Ca ⁺⁺ .	Alginato de cálcio
m/m	Massa de soluto por massa de solução
T _{ge} ,	Taxa de gelificação
CV.	coeficiente de variação
EDS.	Espectroscopia de energia dispersiva de raio X
MEV-FEG.	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 OBJETIVO.....	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
3.1 Biomateriais.....	31
3.2 Vidros bioativos	36
3.3 Biocerâmicas de fosfato de cálcio.	39
3.4 Revestimentos de materiais inertes.....	45
3.5 Alginato.....	49
3.6 Cerâmicas porosas.....	54
4 METODOLOGIA	59
4.1 Formação e funcionalização de poros com biovidro	59
4.2 Formação e funcionalização de poros com fosfato de cálcio	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
5.1 Poros revestidos com biovidro	67
5.2 Poros revestidos com diferentes fases cristalinas de fosfato de cálcio	85
6 CONCLUSÕES	99
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais vêm causando um grande impacto na medicina devido à possibilidade de novos tratamentos de lesões e diversas doenças, em especial ósseas. Quando o interesse é a substituição completa de um osso, o enxerto deve apresentar propriedades mecânicas e químicas adequadas a fim de evitar complicações ao paciente. O enxerto ósseo deve ser esterilizável, possuir propriedades mecânicas comparáveis a do tecido em questão e apresentar porosidade interconectada que permita o fluxo de fluidos, a migração de células e vascularização (JONES, 2013). Além disso, o material deve ser bioativo, ou seja, apresentar resposta biológica favorável após sua implantação, de modo a proporcionar uma forte ligação do enxerto ao tecido hospedeiro e estimular a regeneração óssea (HOLZAPFEL et al., 2013).

Materiais bioativos induzem respostas celulares específicas (positivas), sendo capazes de se ligarem a tecidos vivos e promoverem sua regeneração. Esses materiais podem ser tanto osteoindutores como osteocondutores. Os enxertos osteoindutores estimulam as células tronco mesenquimais, presentes no tecido circunjacente ao enxerto, gerando diferenciação fenotípica em osteoblastos e crescimento de tecido ósseo em sua superfície (HENCH, 2013). O Bioglass45S5 (46,1 SiO₂, 24,4 Na₂O, 26,9 CaO e 2,6 P₂O₅, % mol) é um representante desta classe (HENCH, 2006). Apesar de estudos mostrarem que o Bioglass® é possivelmente o material conhecido que mais estimula a regeneração óssea (JONES, 2013), a dificuldade de produzi-lo com porosidade adequada e suas propriedades mecânicas limitadas inviabilizam seu uso para determinadas aplicações. Os enxertos osteocondutores possuem uma superfície onde as células responsáveis pela produção de tecido ósseo conseguem aderir, facilitando sua fixação. Esses enxertos, tais como alguns fosfatos de cálcio, apresentam bons índices de bioatividade, mas também propriedades mecânicas aquém das necessidades. Portanto, obter um material que atenda às exigências de osteoindução e osteocondução de forma combinada é um grande desafio.

Uma possibilidade de combinar essas propriedades é através do recobrimento da superfície de materiais que possuam boas propriedades mecânicas, embora mais inertes, com materiais bioativos (HERNANDEZ-MONTELONGO et al., 2014). Como a superfície do

enxerto é a região que mais interage com o corpo do paciente, tal modificação pode melhorar sua biocompatibilidade e estimular a osteocondução, preservando a resistência à fratura.

As técnicas físicas de recobrimento com vidro bioativo ainda não são muito eficazes. Para revestir um determinado material com o Bioglass®, por exemplo, os coeficientes de expansão térmica da cobertura e do substrato devem ser compatíveis para evitar o descolamento do vidro (GOMEZ-VEGA et al., 2000), mas essa compatibilidade é dificilmente alcançada. Outro problema é que esse vidro, em particular, cristaliza-se rapidamente durante a sinterização, dificultando sua densificação e a aplicação como recobrimento. Métodos de deposição de fosfato de cálcio para funcionalização de superfícies são entretanto bastante estudados e bem desenvolvidos. Utilizando técnicas de revestimento com plasma, pode-se controlar a microestrutura, a espessura do recobrimento e as fases presentes. Tais técnicas são muito reproduzíveis, porém são muito custosas (SURMENEV, 2011).

As técnicas químicas via úmida tais como sol-gel (POURHASHEM; AFSHAR, 2014) e deposição eletroforética (MEHDIPOUR; AFSHAR; MOHEBALI, 2012) também não são totalmente satisfatórias, pois o vidro formado em geral possui baixa concentração de óxidos de metais alcalinos, que prejudica a formação da hidroxiapatita, diminuindo a bioatividade. As técnicas químicas, por outro lado, possibilitam a incorporação de componentes orgânicos na matriz óssea, que auxiliam o processo de cicatrização do osso (SURMENEV; SURMENEVA; IVANOVA, 2014a). Entretanto, a maioria das técnicas químicas apresentam pouca aderência do material depositado (LIU; YANG; TROCZYNSKI, 2002).

A maioria dos processos descritos acima é aplicada para materiais metálicos. Apesar de serem inertes e possuírem boa tenacidade à fratura, sua utilização para substituição óssea é restrita. Além da bioatividade, a possibilidade de vascularização é uma condição necessária para a cicatrização de ossos defeituosos (CAMILO, 2010) e os enxertos devem então apresentar porosidade com volume, geometria e interconectividade controlados para que a mesma ocorra adequadamente. Nesse quesito, o procedimento de metalurgia do pó utilizado para obter materiais metálicos porosos é muito custoso.

Cerâmicas podem ser uma alternativa interessante para ligas metálicas na produção de alguns enxertos. Além da fácil obtenção da porosidade, esses materiais podem alcançar

alta tensão de compressão e baixa taxa de desgaste. As cerâmicas também são resistentes aos ataques microbianos e bastante biocompatíveis (BOCCACCINI ALDO R., 2014). Entretanto, a falta de bioatividade compromete sua utilização.

Uma das técnicas mais utilizadas para obtenção de cerâmicas porosas é a do molde de sacrifício, que consiste na preparação de um compósito bifásico de um material ou modelo de sacrifício regularmente disperso em uma matriz cerâmica. Durante o processo de sinterização, o modelo se decompõe e é eliminado, deixando poros em seu lugar. A grande vantagem desse método é a possibilidade de adaptar a morfologia, tamanho e distribuição dos poros às especificações necessárias.

Tendo em vista a dificuldade de controlar simultaneamente a bioatividade, a porosidade e a resistência mecânica em um único material, a motivação deste trabalho foi obter um agente porogênico para formar poros funcionalizados em matriz cerâmica de alta resistência e tenacidade.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Em função da necessidade de produzir enxertos que possuam boas propriedades mecânicas e alta bioatividade, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um agente porogênico diferenciado, que ao ser incorporado em uma matriz cerâmica, cristalina ou vítrea, forma poros e os funcionaliza com um material de interesse. Utilizando esse agente porogênico em uma matriz com propriedades mecânicas e físicas ideais para uma determinada aplicação é possível obter um enxerto ósseo cerâmico com macroporosidade revestida com material bioativo e que possua os requisitos mecânicos necessários, ou seja, um enxerto ósseo ideal.

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos:

- Desenvolver grânulos a base de alginato que em sua composição tragam os elementos necessários para, após um tratamento térmico em altas temperaturas, formar poros revestidos de material bioativo.
- Avaliar a habilidade dos grânulos em produzir poros revestidos com um material bioativo de interesse.
- Desenvolver grânulos a base de alginato contendo fosfato de cálcio (CaP).
- Estudar a relação das fases de fosfato de cálcio com o pH utilizado na síntese. Avaliar as microestruturas das fases formadas.
- Avaliar a habilidades desses grânulos em produzir poros revestidos com CaP.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Biomateriais causam um enorme impacto na medicina devido à modernização no tratamentos de lesões e diversas doenças. Apesar de ser um assunto tratado há décadas, o campo de pesquisa continua muito interessante, já que nenhum material individualmente é adequado para todas as situações e novas aplicações são continuamente desenvolvidas como os avanços da medicina.

Os biomateriais interagem diretamente com o sistema biológico para tratar, aumentar ou substituir um tecido, órgão ou função no corpo humano. . O desenvolvimento desses materiais para aplicações médicas e odontológicas vem evoluindo desde a década de 1960. Inicialmente os biomateriais eram desenvolvidos de modo a combinar as propriedades mecânicas necessárias para a função almejada sem provocar uma resposta prejudicial ao corpo (bioinerte) (SOUSA, 2011). Entretanto, devido ao pouco conhecimento de ciências dos materiais na época, o desenvolvimento desses enxertos se baseava em tentativa e erro. Os biomateriais não eram projetados com preocupações estéticas, mas com sua funcionalidade e usabilidade. Com o avanço da tecnologia e o conhecimento mais profundado das reações entre um objeto estranho e o corpo humano, surgiram os materiais bioativos, que são capazes de provocar uma resposta biológica específica na interface do material, e os biodegradáveis, que estimulam a recuperação do tecido danificado e são absorvidos pelo organismo. Desde então, pesquisadores têm desenvolvido novas estratégias para criação de materiais mais eficazes e menos invasivos para aplicações em medicina.

A Figura 1 mostra a evolução dos biomateriais em relação a seu uso clínico e o tempo de avanço nas pesquisas (HOLZAPFEL et al., 2013). A evolução dos biomateriais é atrelada ao melhor entendimento da ciência dos materiais, química, biologia e engenharia. Dessa forma, as características essenciais dos biomateriais mudam ao longo do tempo.

3.1.1 Evolução dos biomateriais

O principal objetivo dos biomateriais produzidos na década de 60 e 70 (primeira geração) era combinar propriedades funcionais químicas e físicas de forma que o enxerto

fosse o mais similar possível ao osso substituído, a fim de evitar rejeições pelo organismo (HOLZAPFEL et al., 2013).

No âmbito dos materiais metálicos, ligas de cromo-cobalto, titânio e aço inoxidável AISI 316L foram os mais estudadas por serem inertes e possuírem ótima resistência mecânica e corrosiva (NAVARRO et al., 2008). Charnley *et al.* (CHARNLEY, 1960) desenvolveram no início dos anos 1960 a primeira prótese de quadril de aço inox (com mais de 12% de Cromo).

Figura 1 Evolução dos biomateriais.
Adaptado de: HOLZAPFEL et al., 2013

O óxido de alumínio (Al_2O_3) foi a biocerâmica mais estudada nessa época, devido a sua ótima resistência a corrosão, desgaste e boa biocompatibilidade. A primeira aplicação das biocerâmicas consistiu na substituição das cabeças femorais metálicas tradicionais por de alumina de alta pureza e densidade (BOUTIN, 1972). As cerâmicas altamente porosas também chamaram a atenção por promoverem o crescimento ósseo e induzirem a estabilização da prótese.

Borracha de silicone, polietileno (PE), resinas acrílicas, poliuretanos, polipropileno (PP) polimetil-metacrilato (PMMA) são os polímeros mais encontrados na primeira geração de biomateriais (NAVARRO et al., 2008). Cimentos ósseos a base de acrílicos desempenharam e continuam a desempenhar uma função importante na ancoragem de próteses. Esse cimento preenche o espaço entre a prótese e o osso atuando como um tampão elástico, transferindo a carga sobre o enxerto para o osso o mais uniformemente possível (KUEHN; EGE; GOPP, 2005).

Com base no melhor entendimento da resposta dos materiais frente ao organismo, entre os anos 1980 e 2000 surgiu a segunda geração de biomateriais. O objetivo era o desenvolvimento de materiais que provocassem reposta biológica específica, controlada e com efeito terapêutico no ambiente fisiológico. Esses materiais foram denominados bioativos (HENCH; THOMPSON, 2010) e alcançaram sucesso clínico nas áreas ortopédica e odontológica devido a sua habilidade de fixação, reparação e regeneração do osso. Isso é possível devido a reações de troca iônica entre o enxerto bioativo e os fluidos corpóreos ao redor, formando uma camada de hidroxiapatita carbonatada biologicamente ativa. As características químicas e cristalográficas da camada formada e da fase mineral do osso são equivalentes. Sendo assim, a fixação do enxerto ocorre por ligação entre cristais de hidroxicarbonato de apatita e colágeno (DAGUANO, 2011). Os principais materiais que possuem essas características são as cerâmicas a base de fosfato de cálcio, vidros, vitrocerâmicas bioativa e compósitos desses materiais.

A segunda geração de biomateriais também foi definida pelo desenvolvimento de materiais absorvíveis que exibiam uma desagregação química controlada, bem como a reabsorção das cadeias moleculares. Esses materiais são basicamente polímeros como, por exemplo, poliglicólico (PGA), polilactato (PLA), polidioxanona (PDS), poli (3-caprolactona) (PCL), poli-hidroxibutirato (PHB), poliortoéster, e quitosano (NAVARRO et al., 2008). Esses materiais ainda são muito utilizados como próteses temporárias, estruturas porosas tridimensionais (*scaffolds*) para engenharia de tecidos, além de aplicações farmacológicas (*"Drug delivery system"*) (NAIR; LAURENCIN, 2007).

Os materiais que possuem bioatividade combinada com a biodegradabilidade são capazes de estimular respostas específicas em níveis moleculares. Esses materiais fazem parte da terceira geração (HENCH, 2002). São basicamente compósitos de matriz absorvível

com presenta de partículas de material bioativo (segundo uma estratégia descrita na literatura como engenharia de tecidos) ou materiais na forma de pó, solução ou micropartículas que estimulam a regeneração do tecido (Regeneração do tecido *in situ*).

Essas três gerações devem ser interpretadas como evolução conceitual e não cronológica, uma vez que cada geração representa o progresso sobre os requisitos e características dos materiais envolvidos. Isto significa que, neste momento, existem investigações e desenvolvimentos dedicados a biomateriais que, de acordo com as suas propriedades, podem ser considerados de primeira ou segunda geração.

3.1.2 Características dos biomateriais.

Para os biomateriais serem bem sucedidos no uso clínico, eles devem combinar diferentes propriedades químicas e físicas, dependendo de sua finalidade. Algumas dessas características são descritas a seguir.

Biotoxicidade: Biomateriais não devem ser tóxicos para o organismo, a não ser que sejam desenvolvidos para essa finalidade, como é o caso dos materiais para “*drug delivery*” (Metodologia de administração controlada de um composto farmacêutico para alcançar um efeito terapêutico em humanos ou animais (TIWARI et al., 2012)). É então correto concluir que os biomateriais não devem liberar nenhuma substância além daquelas para que foram projetados.

Biocompatibilidade: As palavras “biomateriais” e “biocompatibilidade” evidenciam o desempenho biológico de materiais. A biocompatibilidade é um termo descritivo que indica a capacidade de um material induzir uma resposta apropriada no organismo para uma aplicação específica (BLACK; HASTINGS, 1998). Ou seja, a habilidade de entrar em contato com os tecidos do corpo humano sem causar um grau inaceitável de danos para o mesmo. Materiais que são biocompatíveis são chamados biomateriais, que portanto não devem ser cancerígenos e tóxicos, devem possuir compatibilidade com o sangue e não causar reações alérgicas e inflamatórias.

Inflamação e Cura: Mecanismos biológicos são estimulados pelo contato do enxerto com o organismo. A lesão de tecidos estimula uma sequência de reações inflamatórias que conduzem à cura. Dependendo da localização anatômica do enxerto e do tipo de material usado, a intensidade e a duração da reação inflamatória varia. A compreensão de como um

objeto estranho muda a sequência normal das reações inflamatórias é uma preocupação importante na pesquisa de biomateriais (RATNER et al., 2013)

Requisitos mecânicos e desempenho físico: As propriedades mecânicas devem ser cuidadosamente estudadas e analisadas em cada aplicação específica de biomateriais. Enxertos que exigem ações cíclicas devem possuir boa resistência à fadiga. Ductilidade (8%) é importante em odontologia, devido à necessidade de moldagem do enxerto à boca do paciente. Compatibilidade de dureza é importante para diminuir o desgaste (entre o enxerto e o dente oposto, por exemplo). E alta tenacidade à fratura evita a ruptura do enxerto em determinadas aplicações (SAINI, 2015). O módulo elástico do enxerto, por exemplo, é quase sempre maior que o do osso a ser substituído e sua magnitude varia de 4 a 30 GPa GPa (LONG; RACK, 1998) Uma grande diferença do módulo elástico entre o osso e o enxerto geram *stress shielding* (*redução da densidade de um osso, reabsorção óssea, devido à retirada da carga normal que incide sobre esse osso por um implante*), enfraquecendo o osso e deteriorando a interfase osso/enxerto. Propriedades físicas também devem ser consideradas ao selecionar biomateriais. A membrana de diálise deve ter uma permeabilidade específica, por exemplo, assim como o enxerto usado na articulação de quadril deve ter alta lubrificidade (PATEL; GOHIL, 2012).

Alta resistência à corrosão: A corrosão libera íons que são indesejáveis, resultando em inflamações que podem se espalhar por todo o corpo vivo (SINGH; DAHOTRE, 2007).

Bioatividade: São reações de natureza química entre tecido ósseo e o material implantado (osteointegração), auxiliando a recuperação do tecido danificado e facilitando a fixação do enxerto.

Osteocondução: habilidade do biomaterial em servir de suporte para a formação de um novo osso em sua superfície (T. KOKUBO, 2008).

Osteoindução: Capacidade do enxerto em induzir a formação de um novo osso sem a presença de elementos osteogénicos.

Porosidade: Enxertos para osteogênese devem ser o mais semelhantes possível à estrutura óssea a qual substituirá. Entre outras características, o enxerto deve possuir porosidade controlada. Materiais porosos facilitam o crescimento interno do tecido e proporcionam a fixação do enxerto (principalmente os materiais com superfície bioativa),

devido a interfaces multifuncionais, resultando em uma maior vida útil da prótese (BIOMATERIALS; HENCH; WILSON, 2014). A porosidade ideal para aplicação em biomateriais deve ser maior que 70% em volume. O tamanho ideal de poro para proporcionar um crescimento continuado do osso e permitir a migração e transporte celular ainda é muito discutido e varia de 200 a 900 μm . . Estudos realizados em ratos com próteses de hidroxiapatita sólida e porosa comprovaram que a osteogênese, ou seja, a formação de um tecido ósseo ocorrem apenas nas estruturas porosas. (KUBOKI et al., 1998).

Devido ao desafio de combinar as propriedades necessárias para uma dada aplicação, o recobrimento bioativo de estruturas porosas e com boas propriedades mecânicas é uma solução bastante interessante. Os materiais considerados para essa finalidade são os vidros bioativos e os fosfatos de cálcio.

3.2 Vidros bioativos

Desde a descoberta do Bioglass® há 45 anos foram publicados mais de 1000 trabalhos que descrevem as propriedades e performance de vidros bioativos *in vitro* e *in vivo*. Várias aplicações clínicas foram desenvolvidas e aprovadas por agências reguladoras para aplicações comerciais nas áreas médica e odontológica (HENCH, 2015a).

Os vidros bioativos foram descobertos em 1969 como forma alternativa material para regeneração óssea (HENCH; JONES, 2015). Estudos *in vivo* demonstraram que a interação de vidros bioativos com ossos ocorre mais rapidamente que a de outras biocerâmicas. Estudos *in vitro* indicam que as propriedades osteogênicas dos biovidros são resultado da dissolução de sua superfície, cujos produtos estimulam as células osteoprogenitoras no nível genético (JONES, 2013). A dissolução do biovidro leva à formação de camadas de hidroxicarbonato apatita (HCA), a qual interage com fibrilas de colágeno do osso danificado para formação da ligação osso/enxerto.

Hench *et al* (HENCH; PASCHALL, 1973). descreve o mecanismo de formação da HCA na superfície do biovidro em cinco etapas.

1. Rápida troca catiônica dos íons Na^+ e Ca^{2+} por H^+ da solução, criando ligações Si-OH na superfície do vidro:

resultando em uma região rica em sílica.

2. Aumento do pH na região superficial do enxerto devido à formação de NaOH. Dissolução de fosfato, se presente na composição do vidro.
3. Quebra das ligações Si-O-Si do vidro em razão do aumento do pH, formando o composto Si(OH)₄ e agregando grupos silanol (Si-OH) na interface vidro-solução.

Os grupos silanol se condensam por polimerização próximos à superfície do vidro, formando uma camada rica em sílica.

4. Migração dos íons Ca⁺ e PO₄³⁻ para a superfície do vidro formando um composto amorfo CaO-P₂O₅ sobre a camada rica em sílica.
5. Formação de HCA através da incorporação de hidroxila e carbonato, presentes na solução, e cristalização do filme CaO-P₂O₅.

Apesar desse mecanismo ter sido sugerido na década de 60, estudos recentes com ressonância magnética nuclear (RMN) confirmaram a ocorrência da reação de polimerização da sílica (SKIPPER et al., 2005) e ensaios de difração de raios X (DRX) confirmaram a formação de fosfato de cálcio amorfo antes da formação da camada de HCA (MARTIN et al., 2009).

As interações biológicas da interface do osso com a camada de HCA do enxerto ainda não são bem compreendidas. É provável que a ligação osso-biovidro envolva incorporação de fibras de colágeno, ligações de células progênicas, diferenciação celular e mineralização. Porém, não há muitas evidências de cada uma dessas etapas (JONES, 2013).

Wilson *et al.* (WILSON et al., 1981) descobriram que vidros bioativos podem formar fortes ligações tanto com o osso quanto com o tecido mole. Seus estudos mostraram que enxertos produzidos com Bioglass 45S5 interagem fortemente com a fibrilas de colágeno.

Os estudos de Wilson et al. também relacionaram a composição do vidro no diagrama ternário SiO₂-CaO-Na₂O com a classe de bioatividade (Figura 2). O máximo de sílica aceitável para que o vidro bioativo tenha propriedade de osteogênese é 52% SiO₂. Entre 52 e 60% de sílica, o vidro tem apenas a habilidade de ligação com o osso e não com tecido mole. Nesta composição apenas a reação de osteocondução está presente, ou seja, ocorre crescimento de osso ao longo da interface devido a lentas reações superficiais. É importante

salientar que nesses casos, a repostas na interface é apenas extracelular. Para os materiais pertencentes a essa classe, ocorre apenas ligação osso-prótese, sendo possível ou não a ligação com os tecidos moles. As reações de formação da HCA são muito lentas, impossibilitando as ligações com fibras de colágeno.(HENCH, 2015b).

A primeira composição estudada mostrando a habilidade de ligação de osso vivo com material sintético vítreo foi a 46.1 mol.% SiO_2 , 24.4 mol.% Na_2O , 26.9 mol.% CaO e 2.6 mol.% P_2O_5 , que é próxima ao ponto eutético ternário (HENCH, 2006). Este vidro, posteriormente denominada como 45S5 Bioglass®, possui alta bioatividade e é muito usado clinicamente. De forma geral, vidros com composição próxima ao ponto eutético ternário são osteoindutores. Nesses casos, a osteogênese ocorre devido à rápida reação na superfície do vidro, gerando resposta extracelular e intracelular com o ambiente fisiológico.

Figura 2: Relação da composição do biovidro com a classe bioativa (HENCH, 2015b).
Adaptado de :HENCH, 2006

Há dois métodos mais utilizados para a produção de biovidros: i) processo tradicional de fusão/solidificação e, ii) métodos sol-gel. No método de fusão, os óxidos são apropriadamente misturados em quantidades específicas, aquecidos a altas temperaturas para fusão e vertidos em moldes. O método sol gel é uma síntese basicamente química em que a os precursores da composição desejada polimerizam-se à temperatura ambiente para formação de um gel. Esse gel é uma rede inorgânica de sílica ligada covalentemente que quando aquecida acima de 600°C forma vidro. A principal diferença entre os dois processos

é que o vidro formado por fusão é denso enquanto pelo processo sol-gel possui uma porosidade inerente (SEPULVEDA; JONES; HENCH, 2001).

Os vidros bioativos já obtiveram muito sucesso em aplicações clínicas. Dentre os dispositivos monolíticos de biovidros, podem-se destacar os enxertos de mandíbula, ouvido médio, dispositivos a serem inseridos em locais de extração de dentes (WRIGHT; DUPUY, 1985), e a reparação do osso orbital (AITASALO et al., 2001). Biovidros são muito usados na forma de partículas por médicos e ortopedistas, por ser facilmente injetada no osso danificado, estimulando a recuperação óssea. Na área odontológica, o material particulado também é utilizado como ferramenta de esterilização do canal radicular, antes da inserção de enxertos. Uma aplicação bastante inovadora foi a inserção de partículas de biovidro na pasta de dente, para tratamento de hipersensibilidade.

Apenas das inúmeras aplicações, a baixa resistência mecânica deste material compromete a sua aplicabilidade em funções estruturais.

3.3 Biocerâmicas de fosfato de cálcio.

Durante os últimos anos, o desenvolvimento de materiais cerâmicos para reparação e reconstrução óssea cresceu consideravelmente. As cerâmicas de fosfato de cálcio (CFC) se destacam dentre as biocerâmicas por apresentarem alta bioatividade e biocompatibilidade, ausência de toxicidade local e sistêmica, e ausência de inflamações ao serem implantadas (BEST et al., 2008).

Ao contrário da grande maioria dos materiais poliméricos (naturais e sintéticos) e metálicos usados em aplicações biomédicas, os fosfatos de cálcio são constituintes principais dos ossos e dentes, logo, estão amplamente presentes no corpo humano. Sendo assim, CFC possuem alta biocompatibilidade e é relativamente fácil obter sua certificação (HABRAKEN et al., 2015). CFC possuem algumas vantagens, como a possibilidade de serem produzidas em larga escala a preços relativamente baixos, e propriedades biológicas muito interessantes, como a adesão a osteoblastos (ou seja osteocondução) e a estimulação para formação de osso novo (isto é, osteoindução) através do recrutamentos de células do estroma (tecido de sustentação) da medula óssea para locais ectópicos, ou seja, fora do

posicionamento correto (SONG; HABIBOVIC; YUAN, 2013). Dependendo da circunstâncias, estudos mostram que as CFC também podem induzir a formação de tecido mole.

O mecanismo de osteocondução pode ser explicado devido à formação de uma camada de HCA sobre a superfície do biomaterial a base de CaP. Essa camada adsorve proteínas ao redor do enxerto (a partir do ambiente biológico) fixando células ósseas que proliferam e se diferenciam, resultando na biomineralização e formação da matriz (LEGEROS, 2008). A biomineralização consiste no acúmulo de um mineral composto principalmente por íons fosfato e cálcio, formando um sal de CaP, o qual subsequentemente estrutura-se em hidroxiapatita. O osso recém-formado segue o contorno da superfície do enxerto cerâmico e, dessa forma, o enxerto serve de guia e sustentação para o crescimento ósseo.

Cerâmicas de fosfato de cálcio são mais conhecidas por serem osteocondutivas. Entretanto, inúmeras CFC foram reportadas por terem a habilidade de formar osso em diferentes animais sem a adição de elementos osteogênicos (CHENG et al., 2013; LEGEROS, 2008; RIPAMONTI, 1996; YAMASAKI; SAKAI, 1992; YUAN et al., 1999). Para algumas CaP, o fenômeno de indução óssea é atribuído à topografia, geometria, porcentagem de porosidade, e ao tamanho de poro. Combinações de microporosidade e concavidade, por exemplo, demonstraram ser importantes características por permitirem a adsorção e retenção de elementos osteogênicos e/ou células osteoprogenitoras, permitindo assim a osteoindução (LEGEROS, 2008).

3.3.1 Compostos de fosfato de cálcio

Existe uma família de cerâmicas de fosfatos de cálcio onde as propriedades de cada composto podem ser caracterizadas de acordo com a relação entre os íons cálcio e fósforo na estrutura. Para compostos quimicamente puros, Ca/P pode variar de 0,5 a 2,00. A Tabela 1 mostra os principais compostos de CaP, sua fórmula química, a razão cálcio/fósforo, o símbolo correspondente e seu produto de solubilidade (K_{PS}).

Uma importante propriedade do fosfato de cálcio para aplicações em biomateriais é seu comportamento *in vivo*, que pode ser predito pela solubilidade em água. De forma geral, quanto menor a relação Ca/P, mais ácido e solúvel é o composto. A Figura 3 mostra o diagrama de fase dos compostos de fosfato de cálcio. A hidroxiapatita (HA) é a fase mais

termodinamicamente estável quando o pH é maior que 4,2. Entre os pHs 2 e 4,2, a brushita é a fase estável. Em pH muito ácidos (pH<2) a fase MCPM é a fase mais termodinamicamente estável (BEN-NISSAN, 2014).

Figura 3: Diagrama de fase da solubilidade de diversos compostos de CaP em função do pH. A solubilidade é dada em função da concentração de Ca. (BEN-NISSAN, 2014)

Em pH fisiológico do sangue (entre 7 a 7,5) pode-se concluir que a solubilidade dos CaP e consequentemente a sua degradação in vivo aumenta na ordem MCPM→αTCP→DCPD→OCP→βTCP→HA

Os fosfatos de cálcio podem ser sintetizados por síntese hidrotérmica, através de técnicas de micro-ondas, precipitações de emulsões, sol-gel, cristalização a partir de soluções, deposição química, eletrodeposição e síntese mecânico-químico. O método utilizado em cada caso depende do tipo desejado de morfologia, estrutura e composição química (SÁNCHEZ-ENRÍQUEZ; REYES-GASGA, 2013).

Tabela 1: Compostos principais da família dos fosfatos de cálcio (HABRAKEN et al., 2015)

Nome	Fórmula química	Ca/P	Mineral	Símbolo	LogKsp
Fosfato monocalcico monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,50	-	MCPM	Alta Solubilidade
Fosfato dicálcico	CaHPO_4	1,00	Monetita	DCPA	6,90
Fosfato dicálcico dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00	Brushita	DCPD	6,59
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	-	OCP	96,6
Hidroxiapatita precipitada	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	1,33-1,67	-	PHA	
Fosfato de cálcio amorfo precipitado	$\text{M}_u(\text{Ca}_3)(\text{HPO}_4)_{3v}(\text{PO}_4)_{3y} \cdot z\text{H}_2\text{O}$	0,67-1,5	-	ACP	

Fosfato monocalcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5	-	MCP	Alta solubilidade
α -fosfato tricálcico	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	-	α -TCP	
β -fosfato tricálcico	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	-	β -TCP	29,9
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	Hidroxiapatita	HA	116,8
Oxyapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1,67	-	OXA	

Dentre esses compostos, podemos destacar o fosfato monocalcico monohidrato, fosfato dicálcico (monetita), fosfato dicálcico dihidratado (brushita) e hidroxiapatita, que foram observadas no presente trabalho.

3.3.2 Fosfato monocalcico monohidrato (MCPM)

O MCPM é o composto mais ácido dentre os ortofosfatos de cálcio. Devido a sua alta solubilidade, o MCPM não é um material atrativo para síntese de próteses e enxertos. No entanto, ele pode ser utilizado em combinação com outros compostos, tais como α -TCP (cimentos ósseos de brushita) e CaO. Ao utilizar o MCPM em cimentos ósseos de apatita é possível formar brushita ou HA de acordo com as reações (HO; HUANG; CHANG, 2007):

O fosfato monocalcico pode ser utilizado como aditivo em cimentos de apatita para diminuir a solubilidade e facilitar a aplicabilidade (CORREA, 2012), e como precursor para a síntese de monetita e hidroxiapatita através de tratamento hidrotérmico (JINAWATH et al., 2001).

Fosfato dicálcico (monetita)

A monetita (CaHPO_4) pode ser utilizada como material substituto ósseo por apresentar boa biocompatibilidade e bioatividade. Recentemente, vem surgindo um grande interesse por esse material, pois sua reabsorção *in vivo* é mais rápida comparada à HA (TORRES et al., 2015). Estudos de Tamimi et al. mostraram a possibilidade de utilizar a monetita na regeneração de osso em coelhos (TAMIMI et al., 2008) e na correção de defeitos ósseo em humanos (TAMIMI et al., 2010). Porém, a baixa resistência mecânica desse material limita seu uso (MOURA, 2012).

A principal aplicação da monetita é em cimentos ósseos que reagem à temperatura corporal precipitando hidroxiapatita. Pesquisas recentes mostram que cimentos de monetita

são altamente bioativos e possuem alta taxa de bioreabsorção e alta capacidade de remodelação óssea *in vivo* (BOROUJENI, 2012).

Muitos minerais de fosfato de cálcio utilizados como biocerâmicas são sintetizados tendo como reagente a monetita. O α -TCP (DUNCAN et al., 2014) e a hidroxiapatita (PRADO DA SILVA et al., 2001) são alguns desses minerais.

Sendo a forma anidra da brushita, a monetita pode ser preparada através da modificação das condições de precipitação de brushita. Em pH extremamente baixos, em ambientes deficientes em água, ou na presença íons metálicos, a cristalização da brushita é perturbada dando origem a monetita. Também é possível obter fosfato dicálcico por decomposição térmica da brushita conforme a reação abaixo (TAMIMI et al., 2012).

Fosfato dicálcico dihidratado (brushita)

Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) é um componente chave no sistema dos fosfatos de cálcio, pois pode ser utilizado no recobrimento de materiais ortopédicos devido a suas propriedades únicas na mineralização biológica (TOSHIMA et al., 2014) e como material funcional, tal como o componente abrasivo de pastas de dente (TOSHIMA et al., 2014).

Assim como a monetita, a brushita também é conhecida por ser precursora de outras fases do sistema CaP. Como já mencionado, a decomposição térmica da brushita gera monetita. Já em meio aquoso fisiológico (pH 7~7,5), ocorre formação da hidroxiapatita (KUMAR; DASARATHY; RILEY, 1999).

Em meio levemente ácido, as condições de equilíbrio favorecem a formação da fase brushita. No entanto, por ser instável, sua aplicação é bastante complexa (LEE; KUMTA, 2010). Entretanto, devido a sua química instável e a sua tendência de hidrolisar, a brushita é um excelente precursor de HA, tornando-se um composto de grande interesse para aplicação em cimentos ósseos.

Os cimentos ósseos de brushita foram descobertos em 1989 por Mirtchi *et al.*. Esse cimento foi preparado através de misturas de fosfato monocálcico monohidratado e β -fosfato tricálcico, que reagem exotermicamente formando a brushita (MIRTCHI; LEMAITRE; TERAQ, 1989).

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (reação de formação da brushita)

Estudos subsequentes mostraram que os cimentos de brushita são muito biocompatíveis, além de possuírem uma grande vantagem em relação aos cimentos de HA: sua capacidade de serem reabsorvidos em condições fisiológicas (TAMIMI; SHEIKH; BARRALET, 2012).

Hidroxiapatita

O osso humano é formado a partir de um material híbrido orgânico/inorgânico, sendo que 70% (m/m) é constituído de fosfato de cálcio (inorgânico) e 30% (m/m) colágeno. Singa *et al.* constataram que os cristais de CaP constituintes do osso se assemelham a estruturas de hidroxiapatita sintética (KON et al., 1995). Devido a essas similaridades inorgânicas a HA vem sendo amplamente utilizada em enxertos ósseos.

Sendo a fase mais termodinamicamente estável do sistema CaP em fluido corporal, a HA pode promover a osteocondução sem causar inflamações locais e sistêmicas, toxicidade ou rejeição de corpo estranho (MARINI et al., 2004). Quando o enxerto de HA é implantado, camadas de hidroxiapatita carbonatada são formadas em sua superfície, contribuindo para a ligação do enxerto ao osso vivo e resultando na estabilização do enxerto (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

Estudos recentes também mostram que partículas de HA inibem o crescimento de algumas células cancerígenas (LI et al., 2008). Atualmente, é um material comumente escolhido para diversas aplicações biomédicas, como substituição óssea para tratamentos de defeitos periodontais (HANES, 2007), enxertos do ouvido médio (QING et al., 2008), sistemas de engenharia de tecidos (KULANTHAIVEL et al., 2016), liberação controlada de drogas (*drug delivery system*) (MUCALO, 2015), próteses odontológicas (YILMAZ et al., 2013) e revestimento de enxertos inertes (ASRI et al., 2016).

A hidroxiapatita pode ser sintetizada por diversos métodos, como precipitação em via úmida, sol-gel, desproteinização de tecido ósseo, tratamento hidrotérmico de corais e utilizando outros CaP como precursores. Seguem algumas reações químicas de formação da HA (COSTA et al., 2009):

Método Via Úmida

Reação ácido-base Reação entre sais de fosfato **Métodos Via Seca** **3.4 Revestimentos de materiais inertes**

Um enxerto ósseo sintético ideal é um material poroso que atua como um modelo e substrato para o crescimento do osso em três dimensões, biocompatível e bioativo para melhor e mais rápido fixar o enxerto, e vincula-se ao osso hospedeiro sem induzir a formação de tecido fibroso. Além disso, deve ter porosidade interligada para permitir o fluxo de fluidos, migração de células e vascularização, e suportar a mesma carga mecânica do osso hospedeiro mantendo um nível adequado de propriedades até a reconstrução do osso vivo.

Os vidros e cerâmicas de fosfato de cálcio bioativos possuem interessantes propriedades de osteoindução e osteocondução, porém, para algumas aplicações, não possuem as propriedades mecânicas necessárias. Por essa razão, métodos de revestimento de materiais inertes com bioativos são utilizados, uma vez que a superfície do enxerto é a primeira parte a interagir com o hospedeiro. Modificações de superfície melhoram as propriedades biocompatíveis e osteocondutoras de diferentes enxertos.

A adesão entre o revestimento e o substrato, e o elevado custo relacionado com o escalonamento industrial são os fatores que restringem a aplicação generalizada de enxertos recobertos em escala comercial (BOSCO et al., 2012).

3.4.1 Revestimentos com vidro bioativo

Durante os últimos 30 anos, vidros bioativos e cerâmicas foram clinicamente empregados principalmente como materiais a granel em aplicações não estruturais, tais como em enxertos do ouvido médio. Devido a seu potencial em osteoindução e

osteocondução uma aplicação promissora é sua utilização como revestimento de materiais inertes. Entretanto, revestimentos de vidros bioativos não são muito aplicados (SOLA et al., 2011).

Os vidros bioativos são mais estudados para recobrimento de enxertos metálicos não só com o objetivo de proporcionar a osteoindução mas também para proteger o metal da corrosão em meio ao fluido corporal. O grande desafio do recobrimento de biovidro em ligas metálicas é adequação da dilatação térmica do vidro à do metal, a fim de evitar tensões térmicas que possam resultar na quebra do revestimento ou em sua delaminação. O biovidro 45S5, por exemplo, não possui coeficiente térmico semelhante ao das ligas de titânio e similares (JONES, 2013). Dessa forma, novas composições de vidro devem ser desenvolvidas para essa aplicação.

Apesar de serem poucos estudados, também é possível aplicar recobrimentos vítreos em cerâmicas. Kirsten *et al.* (KIRSTEN et al., 2015) obtiveram sucesso recobrimdo zircônia com biovidro para aplicação em enxerto dentário. Hamadouche *et al.* (HAMADOUCHE et al., 2000) concluíram que enxertos de alumina recobertos com Bioglass® via sol-gel possuem melhor habilidade de fixação com o osso hospedeiro.

A técnica mais utilizada de recobrimento com vidro bioativo é a esmaltagem. Este processo é relativamente simples e barato, além de possibilitar a obtenção de camadas finas e grossas. As principais desvantagens da esmaltagem é o eventual desenvolvimento de tensões térmicas residuais e a dificuldade de recobrir poros muito pequenos. As técnicas via sol-gel vêm sendo muito estudadas, uma vez que é possível a produção de vidros com composições diferenciadas, entretanto a bioatividade dos biovidros obtidos por essa método é menor. Isso porque a quantidade de metais alcalinos nesses vidros é menor, diminuindo a solubilidade do vidro *in vivo* e retardando a formação da camada de HAC. Técnicas de deposição eletroforética, aspersão térmica e tecnologia de filmes finos também são utilizadas.

3.4.2 Revestimentos com CaP

O composto CaP mais utilizado em revestimentos bioativos é a hidroxiapatita. Foi definido pela Organização Internacional de Padronização que os revestimentos CaP devem atender especificações mínimas de espessura, composição de fase cristalina, razão CaP,

microestrutura, textura, rugosidade do revestimento e propriedades mecânicas (SØBALLE; OVERGAARD, 1996). Mudanças nesses parâmetros podem produzir revestimentos com bioatividade e durabilidade diferentes. O revestimento de HA deve possuir a maior pureza possível (>95%) e razão Ca/P de 1,67 (ASTM, 1988).

Atualmente, duas metodologias são utilizadas na aplicação de revestimentos CaP sobre um material inerte poroso: técnicas de deposição física e técnicas via úmida.

As técnicas de deposição física foram as primeiras a serem utilizadas. Dentre elas estão os processos de aspersão térmica, como pulverização de plasma atmosférico (APS), pulverização de plasma sob vácuo, suspensão de spray de plasma, pulverização de plasma líquido e processos diferenciais como a deposição por laser pulsado (PLD), por deposição assistida de feixe de íons (IBAD) e por radiofrequência (RF) (SURMENEV; SURMENEVA; IVANOVA, 2014b). Uma desvantagem comum desses métodos é que os componentes orgânicos da matriz óssea extracelular que desempenham um papel essencial no processo de cicatrização não podem ser aplicados utilizando essas técnicas.

A técnica via úmida baseiam-se na modificação da superfície do material inerte com grupos funcionais que são eficazes para a nucleação de CaP, como o Ti-OH. O material com a superfície modificada é então imerso numa solução de CaP supersaturada, com concentrações de íons, pH e temperatura aproximadamente iguais às do plasma sanguíneo humano. Isso irá possibilitar a formação de uma camada superficial uniforme e densa composta de apatita de baixa cristalinidade. Junto com a camada de apatita é possível imobilizar substâncias terapêuticas, proteínas, vitaminas e agentes antibactericida. As técnicas via úmida mais utilizadas são: sol-gel, oxidação plasma eletrolítico, eletroforéticas, deposição eletroquímica, deposição por electrospray e deposição de imersão alternativa (SURMENEV; SURMENEVA; IVANOVA, 2014b).

A principal função do revestimento é promover a osteocondução do osso a ser formado. A teoria de Rahbek *et al.* explica esse fenômeno. Quando o material revestido é implantado, ocorre dissolução parcial de cálcio e fósforo na sua forma iônica devido à diminuição do pH local (RAHBK *et al.*, 2000). Esses íons precipitam em forma de cristais de apatita que podem incorporar proteínas orientando a adesão de tipos específicos de células na superfície. Além disso, o aumento da concentração de cálcio e fósforo estimula a quimiotaxia (processo pelo qual as células são obrigadas a se movimentarem através de um

estímulo químico). Uma vez que a osteocondução ocorreu, o revestimento é absorvido. Esse esquema pode ser visto na Figura 4.

Figura 4: Representação esquemática de osteocondução induzida por revestimento CaP

Adaptado de: CUNNINGHAM et al., 2009

A maioria dos estudos atuais mostra que o revestimento proporciona um benefício significativo tanto *in vitro* como *in vivo* comparado com enxertos sem revestimentos. Entretanto, os enxertos revestidos com CaP não são viáveis economicamente. As técnicas de deposição física que em sua maioria utilizam plasma possuem taxas de deposição relativamente baixas que podem resultar em enxertos caros. As técnicas via úmida são complexas e difíceis de serem produzidas em larga escala (SURMENEV; SURMENEVA; IVANOVA, 2014b). Portanto, outras vias eficazes para a fabricação de revestimentos devem ser determinadas.

Nos métodos conhecidos atualmente, o material a receber o recobrimento já deve possuir porosidade controlada. Dessa forma, é de grande interesse um método que produz poros nos enxertos e os funcionaliza (atribui propriedade) em apenas uma etapa.

3.5 Alginato

O alginato é um polissacarídeo não ramificado constituído pelos ácidos D-manurônico (bloco M) L-gulurônico (bloco G) dispostos de maneira irregular em blocos de porções variáveis de ligações GG, MG e MM. A ligação do ácido manurônico é do tipo β dessa forma os segmentos do bloco M são lineares e de conformação flexível; o ácido gulurônico, por sua vez, possui a ligação do tipo α o que produz um impedimento estérico químico (grupos moleculares interferindo mecanicamente com outros grupos na estrutura) ao redor dos grupos carboxila(-COOH). Por esta razão os segmentos de bloco G são dobrados e possuem conformação estrutural rígida (YANG; XIE; HE, 2011). A Figura 5 mostra as ligações entre os blocos M e G do alginato de sódio.

Figura 5: Esquema dos blocos M e G do alginato de sódio(YANG; XIE; HE, 2011)

As possíveis fontes para a extração de alginato são bactérias e algas, porém o alginato disponível comercialmente é produzido a partir das algas, devido a sua abundância e fácil extração. A composição de copolímero, a sequência dos blocos M e G e os pesos moleculares variam com a espécie que deu origem ao copolímero. A principal fonte de alginato são as algas marinhas castanhas, pertencentes à classe *Phaeophyceae*, na qual o polissacarídeo é mais abundante, podendo representar até 40 % de sua massa seca (SEGATO, 2007).

O alginato é conhecido por ser um biopolímero biocompatível, não tóxico e não imunogênico, além de ser biodegradável (MI, 2002). Esse polímero natural vem ganhando destaque no área da biomedicina. Os alginatos são atualmente utilizados como curativos para o tratamento de feridas agudas ou crônicas, desempenhando um papel fundamental na progressão da fibrose cística. Sua principal aplicação é a síntese de hidrogéis a partir da formação de ligações cruzadas para a encapsulação de células (PAWAR; EDGAR, 2012).

Os hidrogéis de alginato são formados quando as regiões de blocos G das cadeias poliméricas se aproximam na presença de íons bivalentes, formando uma estrutura dimérica. Esses íons bivalentes se alojam nos interstícios entre as cadeias de alginato, interagindo com o ânion carboxilato e com grupos hidroxila. Dessa forma, o alginato adquire alta resistência, formando uma fileira de ligações cruzadas eletrostáticas reversíveis e fortes conhecidas como estrutura caixa de ovo (YOON et al., 2014) (Figura 6).

Figura 6 : Estrutura caixa de ovo do alginato de cálcio.

Adaptado de : YOON et al., 2014

Além dos blocos G, os blocos MG também podem formar ligações cruzadas, mas de intensidade mais fraca. Portanto, alginato com alto teor do bloco G formam géis mais fortes. A afinidade dos alginatos com os íons bivalentes diminui na seguinte ordem: $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn$ (PAWAR; EDGAR, 2012). No entanto os íons de cálcio são os mais comumente utilizados dando origem ao alginato de cálcio (Alg. Ca^{++}).

As ligações cruzadas no Alg. Ca^{++} podem ser formadas por “difusão”, durante a qual os íons de reticulação difundem-se na solução de alginato a partir de um reservatório externo, ou por “configuração interna”, onde a fonte de íons bivalentes situa-se dentro da solução de alginato e um distúrbio controlado (tipicamente o pH ou a solubilidade dos íons) desencadeia a liberação dos íons em solução. A diferença principal desses métodos é que

na difusão um gradiente de cálcio se forma ao longo da espessura do alginato, enquanto no método de configuração interna a concentração de íons é uniforme (PAWAR; EDGAR, 2012).

Dentre os hidrogéis de alginato, o Alg Ca^{++} é o mais utilizado como biomaterial. Esses hidrogéis podem dissolver parcialmente quando em contato com fluidos corporais, resultado de uma permuta iônica (criando um ambiente úmido interessante para tratamento de feridas. Também são capazes de incorporar e liberar agentes terapêuticos. Além disso, esse polímero vem sendo extensivamente estudado em engenharia de tecidos para regeneração de pele, cartilagem, osso, tecido cardíaco e síntese de *scaffolds*. Os *scaffolds* são estruturas artificiais tridimensionais que mimetizam uma matriz extracelular para adesão, migração e proliferação celular, e regeneração do tecido/osso em três dimensões. A arquitetura e estrutura do *scaffold* irá definir a forma final do tecido regenerado (DONGLU SHI, 2006). Compósitos alginato-biovidro e alginato-CaP vêm chamando a atenção dos pesquisadores devido a suas promissoras características

3.5.1 Compósito alginato e biovidro

Compósitos de alginato e biovidro mostram-se promissores uma vez que combinam as características do biovidro de proliferação celular e diferenciação osteogênica com a fácil conformação do alginato.

Luo *et al.* desenvolveram um material compósito consistindo de pastas de alginato concentradas com vidro bioativo mesoporoso para fabricação de *scaffolds* por impressão 3D (LUO et al., 2013). Foi verificado que as partículas de biovidro melhoram significativamente as propriedades mecânicas e a capacidade de mineralização dos *scaffold* de alginato. A aplicação desse compósito em curativos também é promissora, pois a combinação do hidrogel de alginato e biovidro pode resultar num material que estimula a angiogênese e cria um ambiente úmido, melhorando a cicatrização de feridas crônicas (ZENG et al., 2015). No campo da odontologia, Srinivasan *et al.* (SRINIVASAN et al., 2012) estudaram a regeneração de células de fibroblastos e de osteossarcoma do ligamento periodontal em humanos e concluíram que a aderência e a proliferação celular dos *scaffolds* de alginato e nano-vidro bioativo eram significativamente melhores comparados aos *scaffolds* apenas de alginato.

Compósitos de alginato e biovidro também são utilizados em recobrimentos de materiais inertes. Nessa aplicação, o alginato age como ligante para auxiliar a aderência das

partículas de vidro bioativo na superfície do enxerto e possibilitar o controle da libertação *in situ* de produtos de dissolução, através da qual o crescimento ósseo pode ser melhorado (PISHBIN et al., 2011). A técnica de deposição eletroforética é a mais utilizada para essa finalidade (CHEN et al., 2013)(CORDERO-ARIAS et al., 2014)(CORDERO-ARIAS et al., 2015).

Apesar de promissoras, pesquisas envolvendo grânulos de alginato e biovidro são pouco relatados na literatura. Zeng et al. desenvolveram um compósito em forma de grânulos para serem utilizados como transportadores celulares. Os resultados mostraram que esses grânulos induzem a deposição de apatita em sua superfície em contato com SBF, e que é possível encapsular células MC3T3-E1 melhorando a proliferação celular e a diferenciação osteogênica (ZENG et al., 2014).

É importante frisar que não foi encontrado nenhum artigo na literatura que utiliza alginato como reagente para a síntese do biovidro, como proposto nessa dissertação.

3.5.2 Compósito alginato e fosfato de cálcio.

Compósitos de alginato e CaP têm demonstrado excelentes aplicações no campo da biomedicina, podendo ser utilizados na engenharia de tecido ósseo, transporte de células, *scaffolds* e curativos para feridas crônicas. A adição de CaP no polímero de alginato melhora significativamente a resistência mecânica (resistência à compressão e módulo elástico), e a adesão de células de proliferação (LIN; YEH, 2004)(TURCO et al., 2009)

O composto de fosfato de cálcio mais utilizado em compósitos de alginato é a hidroxiapatita, uma vez que obtém sucesso em sistemas de transporte de enzimas, antibióticos e antifúngicos (SANGEETHA; THAMIZHAVEL; GIRIJA, 2013). Estudos *in vivo* foram realizados com o compósito alginato-HA em ratos e foi possível observar a formação de um novo osso ao redor do enxerto. Foi constatado que as moléculas de alginato formam complexos altamente aniônicos que são capazes de absorver células como os osteoblastos (VENKATESAN et al., 2015). Estudos *in vitro* avaliaram positivamente esse compósito quanto à libertação controlada de agentes antibióticos (SIVAKUMAR; PANDURANGA RAO, 2002).

Aplicações desse compósito na forma de grânulos são muito comuns devido à facilidade de encapsulamento e liberação de fármacos, resultado das propriedades adsorventes da HA e da capacidade de difusão dos compostos solúveis através da membrana de alginato (SIVAKUMAR; PANDURANGA RAO, 2002). Fármacos como hidrocortisona

(MURATA et al., 2009) e gentamicina (SIVAKUMAR; PANDURANGA RAO, 2002) foram encapsulados com sucesso nos grânulos de alginato-HA.

Apesar de menos utilizados, compósitos alginato-monetita e alginato-brushita vêm atraindo interesse na última década, pois são metaestáveis em condições fisiológicas e podem ser absorvidos mais rapidamente que a hidroxiapatita (AMER et al., 2014).

Os métodos frequentemente utilizados para a preparação de compósitos alginato-CaP são a mistura mecânica do composto de fosfato de cálcio com o alginato e a formação *in situ* do CaP no polímero decorrente de reações de precipitação e/ou cristalização. A preparação *in situ* é uma abordagem promissora devido à interação química entre o polímero e o CaP (SANGEETHA; THAMIZHAVEL; GIRIJA, 2013).

No método de preparação *in situ*, pequenas mudanças na síntese podem influenciar a fase e estrutura formadas. Xie et al. (XIE et al., 2010) estudaram o efeito do agente mineralizador Na_2HPO_4 . Em sua síntese, foram adicionadas porcentagens diferentes de fosfato de sódio na solução de alginato, que foi posteriormente gotejada na solução reticulante de CaCl_2 com pH controlado em 7,2. Foi verificado que quanto maior a concentração do agente mineralizador, maior é a porcentagem do composto HA formado e maior a sua cristalinidade. Son et al. (SON et al., 2012) verificou o efeito da porcentagem do alginato em solução. Nessa síntese, uma solução de nitrato de cálcio e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ foi gotejada em soluções de alginato com pH constante de 10. Os autores concluíram que a única fase formada foi a hidroxiapatita e que quanto maior a porcentagem de alginato, menor o tamanho dos cristais formados, sendo possível obter nano HA. Rajkumar et al. (RAJKUMAR; MEENAKSHISUNDARAM; RAJENDRAN, 2011a) também estudaram o efeito da porcentagem de alginato e concluíram que além da taxa de crescimento dos cristais ser menor para soluções mais concentradas do polímero, a capacidade de adsorção em meio SBF aumenta com o aumento da concentração de alginato. Amer et al. (AMER et al., 2014) obtiveram as fases monetita e brushita. Em sua síntese, soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ com diferentes concentrações foram adicionadas a uma solução de alginato e posteriormente gotejadas em solução de nitrato de cálcio. Foi concluído que a concentração do agente mineralizador afeta a estrutura dos fosfatos de cálcio formados.

Não foi encontrado na literatura um estudo sistemático do efeito do pH da solução de agente mineralizador no composto a ser formado.

3.6 Cerâmicas porosas

Contrariamente aos materiais metálicos e estruturas poliméricas porosas, poros têm sido tradicionalmente evitados em componentes cerâmicos devido à sua natureza inerentemente frágeis. Entretanto, quando a aplicação é como biomateriais, a porosidade controlada e interconectada é de suma importância, pois facilita o crescimento interno do tecido e proporciona maior fixação do enxerto. Em caso dos enxertos apresentarem superfície bioativa, a osteocondução ocorre mais rapidamente em materiais porosos.

Os métodos mais utilizados para fabricação de cerâmicas porosas são *réplica*, *template* de sacrifício e métodos de aeração. A Figura 7 esquematiza esses métodos.

Figura 7: Esquema de métodos de produção de cerâmicas porosas.

Adaptado de (STUDART et al., 2006)

O método da réplica (Figura 7a) fundamenta-se na impregnação de uma estrutura modelo, sintética ou natural, com a morfologia porosa que pretende-se obter, com uma suspensão ou solução precursora do material cerâmico. Após a impregnação, o excesso da

suspensão é removido por um sistema de rolos que permite a formação de um revestimento cerâmico fino sobre as escoras da estrutura celular inicial. O material passa por um tratamento térmico para degradar a estrutura modelo, e sinterizar a cerâmica. Cerâmicas porosas obtidas com o método da réplica podem alcançar níveis de porosidade aberta de 40% a 95%, caracterizadas por uma estrutura reticulada de poros altamente interligados com tamanhos entre 200 μm e 3 mm. A principal desvantagem é que as estruturas normalmente sofrem microtrincas durante a pirólise do material modelo, o que prejudica as propriedades mecânicas da peça final (STUDART et al., 2006).

O método de *template* de sacrifício consiste na preparação de um compósito bifásico constituído de uma matriz de partículas cerâmicas e uma fase de sacrifício que é inicialmente distribuída homogeneamente. Esse compósito é tratado termicamente para decompor termicamente o material de sacrifício e sinterizar a cerâmica. Esse método produz poros na cerâmica como uma réplica negativa do *template* original de sacrifício. Uma grande variedade de materiais de sacrifício tem sido usada como formadores de poros, incluindo produtos orgânicos naturais e sintéticos, sais, líquidos, metais e compostos cerâmicos. Em comparação com outros métodos de produção de cerâmicas porosas, essa técnica possibilita o controle da porosidade em relação à distribuição de tamanhos e morfologia dos poros através da escolha apropriada do material sacrificial.

A forma como o material sacrificial é extraído do compósito consolidado depende principalmente do tipo de agente porogênicos utilizado. A tabela 2 mostra uma grande variedade de agentes porogênicos utilizados ultimamente como material de sacrifício. Observa-se que esses materiais podem ser produtos orgânicos naturais e sintéticos, sais, líquidos, metais e compostos de cerâmica.

Tabela 2 Exemplos de modelo sacrificiais relatados na literatura Adaptado de (STUDART et al., 2006)

Material de sacrifício	Composição
Sintéticos orgânicos	
Grânulos de PVC	Al_2O_3 , PZT, $\text{Zr}_4(\text{PO}_4)$
Grânulos de PS	SiO_2 , TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{--SiO}_2$, Zeolita, Al_2O_3
Grânulos de PEO ou PVB	PZT, Hidroxiapatita
Grânulos de PMMA ou PMMA–PEG	SiO_2 , SiC, Hidroxiapatita, PZT, trifosfato de cálcio

Resina fenólica	Si ₃ N ₄
Nylon	SiC
Acetato de celulose	SiO ₂
Geis poliméricos	SiO ₂ , TiO ₂
Naftalina	Fosfato de cálcio
Natural orgânicos	
Gelatina	Al ₂ O ₃
Ervilhas e sementes de Celulose	Al ₂ O ₃
Celulose	Al ₂ O ₃ , Mullita
Algodão	PZT
Sacarose	SiC
Cera	Al ₂ O ₃
alginato	Al ₂ O ₃ , PZT, SiO ₂ -Na ₂ O-CaO-MgO, hidroxiapatita
Amido	mullita, Si ₃ N ₄ , CaCO ₃ , diatomita, cordierita
Líquidos	
Liofilização	Al ₂ O ₃
Canfeno	Al ₂ O ₃ , SiO ₂ , Si ₃ N ₄ , Al ₂ O ₃ -SiO ₂
água	TiO ₂ , Al ₂ O ₃ , Hidroxiapatita, SiO ₂ , CaCO ₃ , FeOOH,
Emulsões de oleos	Al ₂ O ₃ , SiO ₂ , Si ₃ N ₄ , Al ₂ O ₃ -SiO ₂
Sais	
NaCl	SiC
BaSO ₄ e SrSO ₄	Al ₂ O ₃
K ₂ SO ₄	PbTiO ₃
Metais/cerâmicas	
Níquel	YSZ, Al ₂ O ₃
Carbono (grafite, fibra, nanotubos)	
SiO ₂ (partículas, fibras)	SiC, mullita
ZnO 27	SiC
	NiO

Compostos orgânicos sintéticos ou naturais são frequentemente extraídos do compósito por meio de pirólise, através de longos tratamentos térmicos a temperaturas entre 200 e 600 °C. O tempo demorado para tratamento térmico a fim de garantir a pirólise completa dos componentes orgânicos e a grande quantidade de subprodutos gasosos gerados durante este processo são as principais desvantagens da utilização de materiais orgânicos como fase de sacrifício. Os agentes porogênicos líquidos, tais como água e óleos, ou uma fase sólida que pode ser facilmente sublimada ou dissolvida são materiais sacrificiais geralmente extraídos por via química em vez de meios térmicos.

No método de aeração, cerâmicas porosas são produzidas por incorporação de ar em uma suspensão do material em pó, a qual é subsequentemente estabilizada de modo a

manter a estrutura de bolhas criada. A porosidade total resultante na cerâmica é diretamente relacionada à quantidade de gás incorporada à suspensão. O tamanho de poro, por outro lado, é determinada pela estabilidade da suspensão porosa antes da secagem. Antes do tratamento térmico, esses materiais são termodinamicamente instáveis e por isso devem ser sinterizados o mais rapidamente possível. Dessa forma o aspecto mais crítico desse método é a dificuldade em estabilizar as bolhas de ar incorporadas à suspensão.

Assim, no presente trabalho testou-se a possibilidade de incorporar diferentes elementos formadores material bioativo em grãos de alginato, e posteriormente incorporar os grãos obtidos a compactos de partículas cerâmicas tratados termicamente para formação de poros funcionalizados em matriz cerâmica.

4 METODOLOGIA

4.1 Formação e funcionalização de poros com biovidro

4.1.1 Materiais

Os reagentes silicato de sódio [$\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O} = 1$ ou 2,38] (UNAPROSIL, Brasil), ácido fosfórico (85% de pureza, MERCK, Brasil), nitrato de cálcio (99% de pureza, SYNTH, Brasil), alginato de sódio de baixa viscosidade (VETEC, Brasil) e ácido acético (MERCK, Brasil) foram utilizados como precursores para a síntese dos grânulos. Para a síntese da matriz cerâmica porosa foram utilizados alumina calcinada (A1000SG, ALMATIS, EUA), de diâmetro médio de partícula equivalente a $0,5 \mu\text{m}$ e densidade $3,99 \text{ g/cm}^3$, e polivinil butiral (Butvar® B-98, Sigma-Aldrich) como ligante e etanol (99,5 % pureza, Sigma-Aldrich).

4.1.2 Síntese de grânulos porogênicos

A elaboração dos grânulos se iniciou pela preparação de uma suspensão de 50 ml alginato de sódio e uma solução de 50 ml silicato de sódio contendo diferentes concentrações de cada componente (% m/m). Após a mistura dos componentes, as soluções foram colocadas em uma estufa a 60°C por 24 horas para completa dissolução e homogeneização, e com isso garantir que os lotes de grânulos sintetizados possuísem composição química regular.

O silicato de sódio se dissolve em água pela combinação de dois mecanismos principais: a troca de íons e a quebra das ligações na rede de SiO_2 devido ao ataque de íons OH^- , introduzindo espécies altamente complexas na solução e formando géis (PHAM; HATZIGNATIOU, 2016).

As soluções de alginato de sódio e silicato de sódio foram misturadas com auxílio de um bastão de vidro, até obtenção de uma única solução de coloração e viscosidade uniforme. A suspensão assim obtida foi colocada em uma seringa de 20 ml, conectada a um banho térmico a 50°C (Brookfield, TC 550), e gotejada em uma solução de 500 ml de nitrato de cálcio 0,5 M acidificada com 0,012 M de ácido fosfórico e 0,12 M de ácido acético. Os íons de cálcio coagulam o alginato ligando-se ionicamente aos blocos do monômero α -L-glucorônico (G), formando uma rede tridimensional (SIKORSKI et al., 2007), granulando a

solução gotejada. A solução de nitrato de cálcio foi acidificada para auxiliar a gelificação do silicato, pois esse processo é catalisado com a diminuição do pH (PHAM; HATZIGNATIOU, 2016). Grãos porogênicos de referência nos ensaios de termogravimetria também foram sintetizados a partir de uma solução contendo apenas alginato (3% m/m) gotejada em 500 ml de solução de nitrato de cálcio 0,5 M, de modo similar ao descrito acima, exceto que não foi adicionado silicato de sódio sendo assim a solução aglutinante não necessitou ser acidificada.

As esferas permaneceram em contato com a solução coagulante por 24 h. Em seguida, foram enxaguadas com água destilada, imersas em 200 ml de etanol PA por 24 h para remoção da água residual, e secas à 80 °C em estufa por mais 24 h. Um esquema do processo pode ser observado na Figura 8.

4.1.3 Fabricação da cerâmica com poros funcionalizados

Os grânulos produzidos no presente trabalho foram projetados para serem aplicados em uma variedade de matrizes vítreas e vitrocerâmicas, entretanto foram inicialmente avaliados em uma matriz de alumina, que possui comportamento térmico conhecido, alta temperatura de sinterização e é relativamente inerte ao ataque químico pelo material residual do grânulo, que eventualmente se funde em altas temperaturas. Com isso, pôde-se avaliar o processo de decomposição do alginato e a formação da camada funcionalizada na superfície dos poros.

Para a preparação da matriz de alumina, polivinil butiral (PVB) foi misturado como ligante à alumina em pó para conferir resistência mecânica ao material à verde, após prensagem. A mistura foi realizada em uma suspensão alcoólica (etanol) contendo (em volume) 13% alumina e 2% PVB, homogeneizada por 2 h em um moinho de bolas, utilizando-se um jarro de moagem de plástico e bolas de zircônia. A suspensão foi deixada em uma capela com exaustão até a evaporação total do etanol. Após a evaporação total do etanol, o material obtido foi posteriormente triturado em um almofariz de porcelana e passado em uma peneira de 80 mesh para granulação final e adequação do pó para prensagem.

Os grânulos porogênicos (10% em massa) foram então misturados ao pó de alumina aglomerada e o composto foi prensado uniaxialmente a 47 MPa. Os compactos resultantes foram sinterizados a 1500 °C, de acordo com o seguinte tratamento térmico: aquecimento a

1 °C/min até 600 °C e permanência por 1 h; novo aquecimento a 5 °C/min até a temperatura máxima, permanência por 2 horas; e resfriamento a 5 °C/min até a temperatura ambiente. O tratamento térmico foi elaborado a partir dos ensaios de termogravimetria.

Figura 8: Esquema da síntese de cerâmicas com poros revestidos.

4.1.4 Caracterização dos grânulos e dos poros funcionalizados.

O comportamento térmico das esferas foi caracterizado por termogravimetria (Pyris 1 TGA, Perkin Elmer-Pyris, EUA). A microestrutura dos materiais obtidos foi caracterizada por microscopia óptica (Hirox-KH-7700, Japão) e eletrônica de varredura MEV-FEG (Inspect F-50, FEI, Holanda). O corante vermelho fucsina foi utilizado para aumentar o contraste das

imagens por microscopia óptica. Foi necessário depositar uma fina camada condutiva de ouro pelo processo de "sputtering" utilizando uma fonte de tensão da ordem de 2 KV nas amostras a serem ensaiadas por MEV.

A composição química foi caracterizada por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS), realizada no MEV citado acima.

4.2 Formação e funcionalização de poros com fosfato de cálcio

4.2.1 Materiais

Os seguintes reagentes comerciais foram utilizados como precursores para a síntese dos grânulos porogênicos: ácido fosfórico (85% de pureza, MERCK, Brasil), nitrato de cálcio (99% de pureza, SYNTH, Brasil), alginato de sódio de baixa viscosidade (VETEC, Brasil) e hidróxido de sódio (VETEC, Brasil). Para a síntese da cerâmica porosa foi utilizado vidro de janela em pó no sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$, com alta porcentagem de SiO_2 (~70% SiO_2 , 17% Na_2O e 5% CaO , em massa) e diâmetro médio de partícula equivalente a 325 μm , e polivinil butiral (Butvar® B-98, Sigma-Aldrich). Todas as soluções foram preparadas com água destilada.

4.2.2 Síntese dos grânulos de alginato e fosfato de cálcio

A elaboração dos grânulos se iniciou pela preparação de uma suspensão aquosa de 200 ml de alginato de sódio 3% em massa. Para garantir a homogeneização, a solução foi misturada com auxílio de um bastão de vidro até obter coloração e viscosidade uniformes, e permaneceu por 24 horas em estufa a 60 °C. A suspensão formada foi colocada em uma seringa de 20 ml conectada a um banho térmico controlado com um termostato para manter a temperatura do sistema constante a 50 °C (Brookfield, TC 550). Como a temperatura tem influência direta na viscosidade, monitorá-la é muito importante para controlar o fluxo de gotejamento e a geometria dos grânulos formados. A suspensão foi gotejada em uma solução reticulante de 700 ml de nitrato de cálcio 0,5 M com agitação constante. A temperatura da solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, foi controlada em 25°C com o auxílio de outro banho térmico com termostato (Brookfield, TC 550) para facilitar a reprodutibilidade da síntese (Figura 9).

Durante a coagulação com formação de ligações cruzadas no alginato, o pH da solução aumenta devido à dissolução do íon Na^+ e formação de NaOH . Esse fato pode dificultar a reticulação do polímero, uma vez que o alginato degrada em meios muito básicos. Dessa forma, o pH da solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi monitorado com um peagâmetro digital (Gehaka, PG 2000) e acidificação com uma solução de 1 M de ácido nítrico para manter o pH da solução constante em 6

Figura 9: Aparato usado na síntese de grânulos de alginato.

As esferas permaneceram em contato com a solução coagulante por 24 horas e em seguida foram lavadas com água destilada. Para formação do material bioativo na superfície dos grânulos, as mesmas foram expostas a soluções mineralizadoras de 200 ml de fosfato de sódio em diferentes pHs por 24 h e lavadas novamente com água destilada. Os íons de cálcio provenientes do polímero e os íons de fósforo da solução PBS formam precipitados de fosfato de cálcio na superfície dos grânulos. As fases do precipitado são muito sensíveis à variação do pH, podendo formar diferentes compostos em diferentes concentrações.

Para a remoção da água residual, os grânulos formados permaneceram imersos em 100 ml de etanol PA por 24 h e foram em seguida secos em estufa a 80 °C por 24 h. Detalhes da síntese podem ser observados na Figura 10.

4.2.3 Fabricação de cerâmica com poros funcionalizados

Nesse caso, foi escolhido incorporar os grânulos em um vidro de janela, pois a vitrocerâmica obtida a partir dele possui natureza química e propriedades (resistência mecânica elevada e alta durabilidade química) próximas às do material que se deseja desenvolver para futura aplicação biológica. Entretanto, o foco desse trabalho foi avaliar a habilidade de formação e funcionalização de poros dos grânulos em questão.

Primeiramente foi necessário misturar o pó do vidro com o ligante PVB (Polivinil butiral), que confere resistência mecânica ao material a verde. Para isso, foi preparada uma suspensão de vidro de janela (13% em volume), PVB (2%) e etanol (85%), a qual foi homogeneizada por 2 horas em moinho de bolas utilizando jarro de moagem de plástico e bolas de zircônia. A suspensão foi deixada em uma capela com exaustão até a evaporação total do etanol. O material obtido foi triturado em um almofariz e passado em uma peneira de 80 mesh para granulação fina.

Os grânulos porogênicos foram então misturados manualmente e brandamente (sem prensagem) ao pó cerâmico obtido (10% em massa de grânulos). Os corpos de prova resultantes foram sinterizados a 760 °C, segundo o programa de tratamento térmico: aquecimento a 1 °C/min até 760 °C e permanência por 2 hora; resfriamento a 5 °C/min até a temperatura ambiente.

4.2.4 Caracterização dos grânulos e dos poros funcionalizados

A morfologia e composição química dos materiais em estudo foram verificadas por microscopia óptica (ZEISS SteREO Discovery.V8), microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) (MEV-FEG Inspect F-50, FEI, Nederland). As estruturas cristalinas de fosfato de cálcio na superfície dos grânulos foram avaliadas por espectroscopia de raio x (Defratograma Rigaku Rotaflex modelo RU200B a 50 kV e 100 mA, com comprimento de onda da radiação Cu de $\lambda = 1.542 \text{ \AA}$).

Figura 10: Esquema do mecanismo de síntese da vitrocerâmicas com poros revestidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Poros revestidos com biovidro

5.1.1 Caracterização térmica dos grânulos

Como os grânulos serão sinterizados juntos com a cerâmica, é importante conhecer seu comportamento em altas temperaturas, a fim de definir um tratamento térmico que assegure a eliminação total do material orgânico. Para compreender a curva de termogravimetria (TG e sua derivada DTG) dos grãos obtidos a partir de soluções de silicato de sódio, alginato de sódio e nitrato de cálcio é necessário conhecer como esses materiais respondem ao aumento de temperatura separadamente.

A Figura 12 apresenta curvas de TG e DTG de grânulos sintetizados apenas com alginato de sódio em solução de nitrato de cálcio. Na curva TG podem ser observados quatro intervalos característicos de perda de massa. O primeiro (25 – 217,55 °C) é referente à desidratação e à quebra parcial das ligações glicosídicas do polímero (Figura 11). Entre as temperaturas 217,55 e 373,54 °C ocorre a formação de um composto carbonoso intermediário, que é oxidado com o aumento da temperatura (375 – 701 °C). Após o término da oxidação, pode-se observar uma ligeira perda de massa (701 – 758 °C) que corresponde à decomposição parcial do carbonato de cálcio, resultando na formação do óxido de cálcio (ZHANG et al., 2011).

Figura 11: Quebra das ligações glicosídica do alginato durante o tratamento térmico.

Figura 12: Curva TG (preta) e DTG (azul) de grânulos de (A) alginato de cálcio e (B) xerogel de silicato de sódio. Aquecimento de 10 °C/min, ar sintético (20 ml/min) e massa inicial 3,3 g.

A estabilidade térmica do grânulo a base de silicato de sódio também foi avaliada (Figura 12 B). A curva TG apresenta apenas um evento térmico entre 25 – 300 °C que corresponde à desidratação do gel. Após essa temperatura, o material atinge um patamar sem perda de massa.

A Figura 13 apresenta as curvas TG e DTG de grânulos obtidos a partir de uma mistura de alginato de sódio (23% m/m) e silicato de sódio (77% m/m) gotejada em solução de nitrato de cálcio 0,5 M. A curva da Figura 13A foi obtida utilizando os mesmos parâmetros

de análise térmica das curvas da Figura 12, ou seja, aquecimento a 10 °C/min, fluxo de 20 ml/min de ar sintético e massa inicial de aproximadamente 3 g. Pode-se observar a ausência dos picos na DTG correspondentes à decomposição térmica do alginato acima de 235°C. O material apresentou picos de perda de massa entre 25 a 235 °C e continuou perdendo massa gradualmente até 900 °C, a temperatura limite superior do ensaio. Observou-se que o resíduo da decomposição apresentou coloração pretejada (característica de formação de fuligem), indicando pirólise incompleta do material orgânico. A presença do silicato de sódio dificultou a degradação total do polímero e sua eliminação na forma de compostos voláteis. Para solucionar esse problema, foi necessário aplicar uma isoterma por 2 horas em 600 °C (Figura 13B). A curva TG da Figura 13B apresenta etapas de perda de massa em torno de 200 °C e durante a isoterma em 600 °C. É provável que dessa forma o alginato se degrade e seja eliminado por completo, já que a curva TG atinge um patamar. O resíduo no fundo do recipiente apresentou coloração branca, indicando a queima completa do material orgânico. É possível observar nas termogravimetrias da Figura 12 A e B que as perdas de massa dos materiais resultantes das sínteses com alginato de cálcio e silicato de sódio foram de, respectivamente, 86,3% e 28,9%. Já a perda de massa dos grânulos resultantes da síntese de alginato de sódio e silicato de sódio (Figura 13 B) foi de 41,7%. Sendo assim, estima-se matematicamente que esses grânulos são compostos de 22,3% de alginato e 77,7% de silicato de sódio. Entretanto, para confirmar esse resultado, experimentos complementares como EDS e difração de raios X devem ser realizados.

Assim, a partir dos resultados obtidos por termogravimetria foi possível desenvolver um tratamento térmico para a degradação total da parte orgânica.

Figura 13 Curva TG (preta) e DTG (azul) de grânulos obtidos do gotejamento de uma solução de alginato de sódio e silicato de sódio em solução de nitrato de cálcio 0,5 M.

5.1.2 Caracterização morfológica e química dos grânulos e dos poros formados

Os grânulos desenvolvidos foram utilizados como *template* de sacrifício para formação de poros funcionais em uma matriz cerâmica. A funcionalização dos poros inicia-se a partir da decomposição térmica dos grânulos porogênicos. Nesse processo, o alginato é decomposto e sua parte orgânica é eliminada na forma gasosa, restando CaO, silicato de sódio ($\text{Na}_2\text{O} \cdot x\text{SiO}_2$) e P_2O_5 proveniente do ácido fosfórico. Para que o revestimento possua alto índice de bioatividade, as proporções dos componentes podem ser projetadas para que

o vidro formado possua composição similar a do Bioglass® (HENCH et al., 1971). Para testar a possibilidade de se obter grânulos com diferentes composições químicas, aproximando-as da do Bioglass 45S5, foram sintetizados grânulos a partir de soluções com diferentes porcentagens de alginato de sódio e contendo silicato de sódio com diferentes razões $\text{Na}_2\text{O}/\text{SiO}_2$.

5.1.2.1 Grânulos de alginato e $\text{Na}_2\text{O} \cdot 0,38\text{SiO}_2$ e a sua eficácia como agente formador e funcionalizador de poros cerâmicos.

O efeito da concentração de alginato na habilidade de formação de grânulos porogênicos foi estudado. A concentração de silicato de sódio $\text{Na}_2\text{O} \cdot 0,38\text{SiO}_2$ foi mantida constante (10% m/m) e o teor de alginato foi variado nas seguintes proporções: 1%, 2% e 3% (m/m). A solução de nitrato de cálcio 0,5 M foi acidificada para catalisar a gelificação do silicato de sódio. Para isso, foi utilizado 7% de ácido fosfórico em volume da solução $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, uma vez que o fósforo está presente na composição de vidros bioativos tradicionais.

A Figura 14 mostra imagens de câmera digital dos grânulos sintetizados com diferentes concentrações de alginato. Utilizando o software ImagePro, foi possível mensurar o diâmetro médio (média dos diâmetros medidos a cada 2 graus passando pela centroide) dos grânulos de cada composição. Os grânulos com 1% de alginato são os que apresentaram menores valores de diâmetro, entre 0,4 e 0,8 mm, enquanto os grânulos com 2% e 3% do polímero variaram de 1 a 1,2 mm e 1,3 a 1,5 mm, respectivamente. O coeficiente de variação (CV) geométrica (desvio padrão expresso como uma porcentagem média) foi calculado para cada tipo de grânulo. Os grânulos obtidos da solução com 1% apresentaram o maior CV (0,17), comparado com os grânulos das outras sínteses (0,10 e 0,08, para soluções de 2% e 3% alginato, respectivamente). Assim, quanto menor a concentração de alginato, mais irregular e menos simétrica é a geometria das esferas. Esse fato provavelmente está relacionado à reologia da solução de alginato, pois quanto maior a concentração de alginato, maior a viscosidade da solução a ser gotejada (FU et al., 2011) e menor a propensão das gotas de se deformarem em contato com a solução de nitrato de cálcio.

Figura 14: Imagens de câmera digital dos grânulos obtidos a partir de soluções contendo 1% (A), 2% (B) e 3% (C) de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$ (%m/m).

Nas micrografias eletrônicas de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) da Figura 15, pode-se observar diferenças no aspecto da superfície das esferas obtidas a partir de soluções de diferentes composições. Os grânulos obtidos das soluções com menor teor de alginato (Figura 15 A e B) apresentaram maior concentração de compostos precipitados em sua superfície. Tais compostos possuem morfologia diferente, dependendo da concentração de alginato na solução precursora, como é mostrado nos detalhes das imagens de MEV-FEG (Figura 15 D, E e F). Os grânulos da solução de 1% de alginato (Figura 15D) apresentaram cristais superficiais com uma distribuição de tamanhos, enquanto os provenientes da solução de 2% alginato (Figura 15E) apresentaram cristais lamelares mais uniformes de tamanho aproximado de 5 μm . Nos grânulos provenientes da solução de 3% alginato (Figura 15F) constata-se uma quantidade menor de compostos superficiais, ficando mais evidente a superfície lisa do polímero abaixo.

Quanto maior a quantidade de alginato maior a quantidade de cálcio usada para formação de ligações cruzadas. Sendo assim, pode-se concluir que os grânulos provenientes da solução com 3 % de alginato foram os que sequestraram mais cálcio da solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ no processo de ligação entre as cadeias, restando em menos íons Ca^{2+} para formar cristais de fosfatos na superfície dos grânulos.

A Tabela 3 apresenta o resultado semiquantitativo de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) dos grânulos em questão. É possível constatar a presença dos elementos cálcio, fósforo, silício e sódio. A porcentagem dos elementos cálcio e fósforo é menor para os grânulos formados a partir da solução com maior concentração de alginato, que resultou em menor quantidade de cristais de fosfatos fixos em sua superfície. Sendo assim, pode-se

concluir que o material superficial é formado por fosfatos de cálcio provenientes da reação entre o excesso de íons Ca^{2+} e íons PO_4^{3-} .

Figura 15: Micrografia MEV-FEG com sinal de elétrons secundários dos grânulos provenientes de soluções contendo 1% (A)(D), 2% (B)(E) e 3% (C)(F) de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$.

Tabela 3: Resultado semiquantitativo de EDS da superfície de grânulos provenientes de soluções com diferentes concentrações de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$.

Elemento	Porcentagem em massa			Porcentagem atômica		
	1% Alginato	2% Alginato	3% Alginato	1% Alginato	2% Alginato	3% Alginato
O	48,2	52,8	63,7	66,6	70	78,6
Na	1,3	2,1	2	1,3	1,9	1,7
Si	5,3	6	3,8	4,2	4,5	2,7
P	18,8	18,5	13,4	13,4	12,7	8,6
Ca	26,6	20,8	17,1	14,7	11	8,6

Para avaliar a habilidade dos grânulos de formar e funcionalizar poros, os mesmos foram prensadas juntamente com alumina em pó, de diâmetro médio de partícula equivalente a $0,5 \mu\text{m}$ e densidade $3,99 \text{ g/cm}^3$, e sinterizados a 1500°C por 2 horas. Esse tratamento térmico foi definido a partir dos resultados da termogravimetria, ou seja, um patamar de 2 horas foi realizado para garantir a eliminação total da parte orgânica. Foi

escolhida uma cerâmica a base de alumina para realizar os testes por ser uma matriz inerte. Cerâmicas ou vidros a base de SiO_2 , CaO , Na_2O dificultariam a análise dos resultados, por reagirem com o material inorgânico resultante da decomposição dos grânulos.

A microestrutura das cerâmicas sinterizadas foi caracterizada por microscopia óptica (Figura 16). Observa-se que, em todas as situações, os grânulos produziram poros parcialmente preenchidos. A parte orgânica dos grânulos sofreu decomposição térmica deixando um espaço vazio, porém a parte inorgânica não fundiu completamente ou se depositou na superfície interna dos poros, formando assim poros contendo um material residual. Apesar dos grânulos não fundirem totalmente, é possível notar uma região esbranquiçada ao redor dos poros, onde o corante não penetrou completamente, o que indica uma região mais densa, de poros não conectados. Isso pode indicar que houve formação parcial de líquido proveniente do material dos grânulos durante a sinterização, que permeou entre os poros do compacto cerâmico em pó, tornando essa região mais densa.

Figura 16: Microscopia óptica de cerâmicas sinterizadas com grânulos provenientes de soluções contendo 1% (A), 2% (B) e 3% (C) de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 0,38\text{SiO}_2$ (% m/m).

A Figura 17 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura da cerâmica sinterizadas com grânulos. Nota-se que não é visível a presença de material depositado na superfície interior dos poros, entretanto nota-se uma maior rugosidade em sua superfície. A

Tabela 4 mostra os resultados semiquantitativos da análise complementar de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) dos poros em discussão. Os resultados em todas as situações são similares, não indicando a presença de silício, sódio, cálcio ou fósforo. A porcentagem em massa da alumina é 52,92% oxigênio e 47,07% alumínio, resultado semelhante ao encontrado nas medidas de EDS. Apesar dos espectros de EDS indicarem apenas a composição da matriz cerâmica alumina na parede do poro, é ainda possível que exista uma fina camada recoberta que não pode ser observada pela técnica EDS. Para realizar EDS foi selecionada uma área no interior do poro e o sinal de um possível material em sua superfície interna pode ser muito fraco comparado ao sinal maior do volume logo abaixo.

Figura 17: Micrografia MEV-FEG, com sinal de elétrons secundários, de cerâmicas sinterizadas com grânulos provenientes de soluções contendo 1% (A), 2% (B) e 3% (C) de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$ (% m/m).

Tabela 4: Resultado semiquantitativo de EDS dos poros formados por grânulos a partir de soluções com diferentes concentrações de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$.

Elemento	Porcentagem em massa			Porcentagem atômica		
	1% Alginato	2% Alginato	3% Alginato	1% Alginato	2% Alginato	3% Alginato
O	49,8	49,8	49,7	62,7	62,6	62,6
Na	0,7	0,6	0,4	0,6	0,5	0,4
Al	48,8	48,5	49,3	36,4	36,2	36,8
Si	0,6	0,8	0,2	0,4	0,6	0,1
P	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1
Ca	0,3	0,4	0,5	0,2	0,2	0,3

Também foram realizadas análises de EDS no material resultante da decomposição dos grânulos presente no interior dos poros. Como pode ser verificado na **Erro! Autoreferência de indicador não válida.**, o elemento majoritário é o silício, provavelmente na forma de óxido (SiO_2). Entretendo os elementos sódio, cálcio e fósforo também compõem o material residual em menor porcentagem. Sendo assim, conclui-se que as concentrações de silicato de sódio e alginato nas soluções precursoras não foram suficientes para obtenção de uma camada espessa de revestimento na superfície dos poros. Possivelmente a quantidade de componentes fundentes nos grânulos não foi suficiente para reagir com todo o silício na temperatura de sinterização. A estratégia adotada em seguida foi então substituir o $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$ pelo metassilicato de sódio ($\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$), com o propósito de aumentar a concentração de óxido de sódio nos grânulos. O sódio rompe as ligações da rede tridimensional da sílica, resultando na diminuição de suas temperaturas de transição vítrea e de fusão (YET-MING CHIANG, DUNBAR P. BIRNIE, 1996).

Tabela 5: Resultado semiquantitativo de EDS do material residual no interior de poros formados por grânulos obtidos a partir de soluções com diferentes concentrações de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$ (% m/m).

Elemento	Porcentagem em massa			Porcentagem atômica		
	1% Alginato	2% Alginato	3% Alginato	1% Alginato	2% Alginato	3% Alginato
O	54,8	54,7	54,7	68,5	68,6	68,4
Na	1,8	1,8	1,6	1,6	1,5	1,4
Si	36	35	37,7	26	25	26,9
P	3,5	3,7	2,8	2,2	2,4	1,8
Ca	4	4,5	3,4	1,9	2,3	1,7

5.1.2.2 Grânulos de alginato e metassilicato de sódio ($\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$) e caracterização de sua eficácia como agente formador e funcionalizador de poros em matriz cerâmica.

Primeiramente, a porcentagem de alginato foi variada (1%, 2%, 3%, m/m) enquanto a de metassilicato permaneceu constante (10% m/m). A Figura 18 apresenta imagens de câmera digital dos grânulos obtidas com essa síntese.

Utilizando 1% e 2% de alginato na síntese, não foi possível obter grânulos regulares (Figura 18A e B). A regularidade dos grânulos é correlacionada com a viscosidade da solução de alginato gotejada. Quanto menor a viscosidade da solução na gota, maior sua irregularidade. Como a solução de metassilicato de sódio é mais básica que a de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$, inicia-se um processo de degradação do alginato, diminuindo a viscosidade da solução e dificultando a formação de grânulos (SEGATO, 2007). Para concentrações baixas de alginato a viscosidade é ainda menor, o que agrava o problema. Sendo assim, os grânulos obtidos a partir da solução com 3% alginato (CV do diâmetro = 0,06) possuem tamanho e geometria mais regulares (Figura 18C), quando comparados aos grânulos de soluções com 2% alginato (CV=0,24).

Um fato importante a ser considerado é que a habilidade de formação do gel (T_{ge}), tempo de necessário para formação do gel, do metassilicato é inferior a do $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$ (HAMOUDA; AMIRI, 2014). A T_{ge} depende da porcentagem e do pH da solução de silicato. Como as soluções de metassilicato são mais básicas, a habilidade natural de gelificação do silicato diminui (LINK, 2013). Consequentemente, a viscosidade da solução alginato- $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$ também diminui, dificultando a formação de grânulos simétricas.

Figura 18 Imagens de câmera digital de grânulos provenientes de soluções contendo 1% (A), 2% (B) e 3% (C) de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$ (% m/m).

A Figura 19 apresenta micrografias de MEV-FEG mostrando em detalhes a morfologia dos grânulos provenientes de soluções de metassilicato de sódio e 1%, 2% ou 3% de alginato. Nota-se que também há material fixado (fosfato de cálcio) em suas superfícies, entretanto de tamanho menor ($\sim 2 \mu\text{m}$) comparados aos das sínteses com $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$ ($\sim 5 \mu\text{m}$). Analisado as imagens ampliadas dos grânulos contendo metassilicato (Figura 19D, E e F) nota-se que sua superfície é rugosa, provavelmente devido à degradação do alginato.

As medidas de EDS (Tabela 6) mostraram que as porcentagens de cálcio e fósforo mantiveram-se praticamente inalteradas em todas as sínteses. Isso pode indicar que o composto cristalino na superfície dos grânulos é basicamente o mesmo, apesar da composição do polímero.

Figura 19: Micrografia MEV-FEG, com sinal de elétrons secundários, de grânulos sintetizados a partir de soluções contendo 1% (A)(D), 2% (B)(E) e 3% (C)(F) de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$ (% m/m).

Tabela 6: Resultados semiquantitativos de EDS de grânulos sintetizados a partir de soluções com diferentes concentrações de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$.

Elemento	Porcentagem em massa			Porcentagem atômica		
	1% Alginato	2% Alginato	3% Alginato	1% Alginato	2% Alginato	3% Alginato
O	55,5	55,4	53,8	71,6	72,5	70,3
Na	3	2,1	1,8	2,7	2,6	1,7
Si	3,3	3,3	5,5	2,4	2,2	4,1
P	23,7	23,5	24,3	15,8	18	16,1
Ca	14,8	16	14,9	7,7	7,4	7,8

Os grânulos obtidos a partir de soluções com 2% e 3% alginato foram sinterizados com alumina a 1500 °C. Constatou-se que as duas composições agiram como *template* de sacrifício criando poros nas cerâmicas. O comportamento dos grânulos com 1% de alginato não foi avaliado, pois sua geometria irregular produziria poros com muito grandes e de formatos indesejados. A

Figura 20 mostra imagens de microscopia ótica dos poros formados a partir de grânulos contendo 2 e 3 % de alginato. É interessante notar que em ambos os casos os grânulos agiram como *template* de sacrifício, formando poros sem material residual na cerâmica. Quando o corante foi gotejado sobre a cerâmica, observou-se que o mesmo não penetrou a superfície como nas amostras anteriores. Esse fato pode indicar que o líquido proveniente da fusão total dos grânulos em altas temperaturas percolou através da porosidade do compacto de alumina em pó antes de sua densificação.

Como pode ser observado nas micrografias MEV-FEG (Figura 21), a superfície dos poros obtidos apresenta rugosidade diferente da matriz cerâmica, podendo indicar a presença de um revestimento. O EDS (Tabela 7) dessas regiões apontou que os revestimentos dos poros obtidos de grânulos das soluções com 2% e 3% de alginato são compostos por Al e P.

Figura 20: Microscopia ótica de cerâmicas sinterizadas com grânulos provenientes de soluções contendo 2% (A) e 3% (B) de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$ (% m/m).

Figura 21: Micrografia MEV-FEG, com sinal de elétrons secundários, da superfície de poros gerados por grânulos obtidos a partir de soluções contendo 2% (A) e 3% (B) de alginato e 10% $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2,38\text{SiO}_2$.

Tabela 7: Resultado semiquantitativo de EDS da superfície dos poros formados por grânulos de soluções com diferentes concentrações de alginato e 10% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$.

Elemento	Porcentagem em massa		Porcentagem atômica	
	2% Alginato	3% Alginato	2% Alginato	3% Alginato
O	51,4	53,6	65,5	67,5
Na	0,3	0,9	0,3	0,8
Al	25,1	21,5	19	16,1
Si	0,2	0,1	0,1	0,1
P	23,1	15,6	15,2	15,6
Ca	0,2	0,1	0,1	0,1

Com os resultados obtidos, pode-se avaliar o efeito da concentração de metassilicato de sódio na habilidade de funcionalização dos grânulos foi avaliado. A variação da concentração do alginato na síntese dos grânulos interfere na sua geometria e morfologia. Entretanto, a quantidade de alginato não influenciou a habilidade dos grânulos em formar e funcionalizar poros, pois as características dos revestimentos obtidos foram muito similares.

5.1.3 Efeito da concentração de metassilicato de sódio

Nesse estudo, a concentração do alginato de sódio foi mantida constante (3% m/m), enquanto o metassilicato de sódio foi variada (1%, 2%, 5% e 7% m/m). A solução aglutinante

(nitrato de cálcio) foi acidificada com 0,2% de ácido fosfórico e 0,75% de ácido acético. Apesar do óxido de fósforo ser extremamente importante para o vidro ter alto índice de bioatividade (JONES, 2015), foi necessário diminuir a quantidade de H_3PO_4 na solução, pois o PO_4^{-3} tende a sequestrar os íons Ca^{2+} do alginato e precipitar fosfato de cálcio (RAJKUMAR; MEENAKSHISUNDARAM; RAJENDRAN, 2011b), dificultando a permanência do cálcio nos grânulos. Além disso, o recobrimento obtido anteriormente com grânulos reticulados em solução acidificada apenas com ácido fosfórico apresentaram apenas P e Al.

As imagens de câmera digital (Figura 22A) mostram que os grânulos obtidas a partir da solução com 5% $\text{Na}_2\text{O}.\text{SiO}_2$ apresentaram geometria e tamanho mais irregulares, comparados aos de outras concentrações. Possivelmente a membrana de alginato de cálcio formada com 5% de metassilicato foi muito fina resultando em uma geometria irregular após a secagem. Utilizando o software ImajePro, foi possível medir o diâmetro médio (média dos diâmetros medidos a cada 2 graus passando pela centroide) dos grânulos de cada composição. Os grânulos de soluções contendo 1% e 2% $\text{Na}_2\text{O}.\text{SiO}_2$ apresentaram valores menores de diâmetro, entre 1,2 e 1,7 mm, enquanto os grânulos de soluções com 5% e 7% de silicato variaram entre 1,9 e 2,0 mm. O coeficiente de variação (CV) dos diâmetros foi calculado para cada síntese. Foi possível constatar que os grânulos de solução contendo 5% de silicato apresentaram maior valor de CV (0,11) comparados aos grânulos de soluções com 1%, 2% e 7% silicato (CV = 0,07, 0,09 e 0,09, respectivamente). Dessa forma, pode-se afirmar que os grânulos de solução com 5% de silicato possuem distribuição de tamanho mais irregular.

Figura 22: Imagens de câmera digital de grânulos sintetizados a partir de soluções contendo 1% (A), 2% (B), 5% (C) e 7% (D) de metassilicato de sódio e 3% de alginato, em massa.

Os grânulos sintetizados a partir de soluções com diferentes porcentagens de metassilicato de sódio foram posicionados no interior de compactos de alumina em pó e, após um tratamento térmico de sinterização, foi verificado que apenas os grânulos com maior porcentagem de metassilicato atuaram como agentes porogênicos e funcionalizantes de poros. As microscopias ópticas (Figura 23) das amostras sinterizadas mostram que os grânulos com menor porcentagem de $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$ formaram poros parcialmente preenchidos. Observa-se que, nesses casos, que os grânulos retraíram devido à decomposição da parte orgânica. Observa-se na Figura 23C que mesmo após a decomposição da parte orgânica, não foi possível obter poros. Isso reforça a teoria de que nessa síntese a membrana de Alg Ca^{++} formada foi muito fina. O resultado mais promissor foi obtido utilizando-se grânulos de

solução com 7% metassilicato (Figura 23D e Figura 24), que possibilitaram a obtenção de poros de tamanhos regulares e sem resíduo interno. É interessante observar que estes poros estão revestidos, aparentando ter ocorrido uma sinterização por fase líquida dos grânulos.

Uma possível explicação é que os grânulos produzidos com 7% de metassilicato possuem maior quantidade de Na_2O para quebrar as ligações Si-O, diminuindo o ponto de fusão dos grânulos.

Figura 23 Microscopia óptica de cerâmicas sinterizadas com grânulos obtidos a partir de soluções contendo 1% (A), 2% (B), 5% (C) e 7% (D) de metassilicato de sódio e 3% de alginato (% m/m).

Assim como ocorreu na síntese de 10% de metassilicato, o corante fucsina não foi absorvido pela totalmente na cerâmica sintetizada com grânulos de 7% Na_2OSiO_2 (Figura 24 A).

Os detalhes de um poro cerâmico obtido com grânulo de solução com 7% de metassilicato foram analisados utilizando MEV-FEG (Figura 24B) com sinal retroespalhado. É

possível constatar a presença de uma região mais brilhante na parede do poro, o que indica a presença de elementos de maior peso atômico. Uma análise por EDS (Tabela 8) da região mais clara indicou a presença de átomos de cálcio, fósforo, sódio e sílica. Apesar da área de revestimento ser pequena, há indícios de que um material com composição interessante em termos de bioatividade tenha se formado no interior do poro. A área revestida pequena pois o líquido formado que atingiu valores baixos de viscosidade durante o processo de sinterização e percolou para o interior da amostra.

Figura 24: Micrografia (A) óptica e (B) MEV-FEG da superfície dos poros gerados por grânulos provenientes de soluções contendo 3% de alginato e 7% de metassilicato de sódio.

Tabela 8: Resultado semiquantitativo de EDS dos poros formado por grânulos a partir de solução com 3% alginato e 7% de $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$.

Elemento	Porcentagem em massa	Porcentagem atômica
O	38,90	58,06
Na	3,30	3,47
Al	0,18	0,25
Si	2,39	1,99
P	19,82	15,14
Ca	35,41	21,09

5.2 Poros revestidos com diferentes fases cristalinas de fosfato de cálcio

Neste estudo, o revestimento de poros cerâmicos com biomaterial foi obtido pela decomposição de grânulos de alginato e fosfato de cálcio durante a fase de sinterização da cerâmica.

5.2.1 Caracterização da fase cristalina do precipitado formando.

A cristalização de fosfatos de cálcio depende de vários fatores como o pH, meio de precipitação, temperatura e concentração dos íons de cálcio e fósforo (CORREA, 2012).

Nos experimentos a seguir, a porcentagem de alginato na solução (3% m/m) e a concentração da solução mineralizadora tampão PBS foram mantidas constantes, de forma que a solução permaneceu supersaturada. Para estudar diferentes fases cristalinas que podem ser formadas na superfície dos grânulos, apenas o pH da solução tampão foi variado.

Analisando os difratogramas de raios X das Figura 25 e 26, pode-se observar a presença de diferentes fases cristalinas de fosfato de cálcio variando apenas o pH da solução de fosfato de sódio.

A formação dos fosfatos de cálcio nesse tipo de experimento é conhecida como método de coprecipitação. Nesse método, uma fase metaestável é formada inicialmente e passa por alguns processos intermediários de recristalização até a formação de uma fase termodinamicamente estável para uma dada condição de processo (BIOTECNOLOGIA; FERNANDA; SANTOS, s.d.).

Grânulos sintetizados em solução de pH 1 possuem em sua composição apenas uma fase termodinamicamente estável que é o fosfato monocálcico monohidratado (MCPM). Esse composto possui relação Ca/P igual a 0,5 e, apesar de boas propriedades bioativas, o material é extremamente solúvel e possui alta taxa de degradação em meio fisiológico, o que não o torna atrativo para aplicações como biomaterial. Apenar disso, o MCPM é muito utilizado como aditivo de cimentos de apatita, aumentando sua solubilidade e aplicabilidade. (CORREA, 2012).

Figura 25: Difratoigramas de raio X dos grânulos de soluções com pH 1, 2, 3, 4 e 5.

Figura 26: Difratoigramas de raios X de grânulos de soluções com pH 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

Entre os pHs 2 e 3 ocorre a formação da fase monetita (CaHPO_4) e do composto NaH_2PO_4 . O hidrogênio fosfato de sódio foi provavelmente resultado da reação do sódio residual com a solução tamponada fosfato salina (PBS). Esse composto é um sal extramente solúvel e muito utilizado no setor de alimentos. Não possui bioatividade, porém é utilizado na

formação de poros em biomateriais, uma vez que se decompõe em dióxido de carbono na presença de ácido (AZER et al., 2009).

A reação de formação da monetita é endotérmica (ENGSTRAND; PERSSON; ENGQVIST, 2014), sendo assim, esse composto não é muito simples de obter. Mesmo assim, as condições do presente experimento favoreceram a formação dessa fase. Hossein Eshtiagh-Hosseini *et al.* (ESHTIAGH-HOSSEINI et al., 2008) e Jokić *et al.* (JOKIĆ et al., 2011) mostraram que em soluções de baixo pH e excesso de nitrato de cálcio e/ou NaH_2PO_4 a formação da fase monetita é favorecida.

Os grânulos sintetizados em pHs de 4 a 6 são compostos pelas fases brushita e monetita. A precipitação da brushita é exotérmica e em pHs mais neutros a formação dessa fase é mais espontânea, comparada à monetita (ENGSTRAND; PERSSON; ENGQVIST, 2014).

Apesar de serem biocompatíveis, as fases monetita e brushita possuem $\log(K_{ps})$ em torno de 7, ou seja, também possuem alta solubilidade, dificultando a aplicação em biomateriais. Entretanto, essas fases podem ser utilizadas como materiais precursores da hidroxiapatita (JOKIĆ et al., 2011). Em pHs mais básicos, ocorre a formação da hidroxiapatita (HA). Nos pHs 8 e 9 observou-se a presença de fosfato de octacálcio (OCP) juntamente com a HA.

Segundo o modelo de Ostwald (FEENSTRA; DE BRUYN, 1981), em meios supersaturados a fase a se precipitar primeiro não é termodinamicamente estável, mas sim uma fase metaestável. Em outras palavras, a formação de uma fase estável é precedido por uma série de estados de alta energia. Feenstra *et al.* aplicaram o modelo para precipitação de fosfato de cálcio em meios alcalinos. Para pHs maiores que 7, a primeira fase a se formar é o fosfato de cálcio amorfo (ACP), seguida de OCP, que depois lentamente é recristalizada dando lugar à hidroxiapatita. A primeira fase a se formar é o ACP, pois a solução supersaturada induz a formação de pequenos clusters que não formam um composto cristalino. A composição do ACP depende da composição da solução. A supersaturação da solução é diminuída (devido à formação do ACP), dando início à cristalização do OCP. Como nesse caso os clusters são maiores, há possibilidade de formação do arranjo cristalino (FEENSTRA; DE BRUYN, 1981). Em solução mineralizadora de pH 8 e 9 não foi possível converter totalmente o OCP em HA.

Em pH 11, observam-se picos referentes ao carbonato de cálcio em conjunto com a HA. Como o meio está muito básico, o alginato começa a se degradar. Possivelmente o carbono proveniente do polímero degradado reagiu com o cálcio das ligações cruzadas.

5.2.2 Caracterização morfologia dos grânulos de fosfato de cálcio

A Figura 27 mostra imagens superficiais dos grânulos em diferentes pHs, comprovando-se visualmente a influência do pH na formação dos fosfatos de cálcio. É notória a presença de cristais com estrutura poliedral de CaP em pHs 3, 4 e 5. Possivelmente é a fase monetita, pois é a única estrutura em comum nessas condições. É interessante observar que esse poliedro aumenta consideravelmente de tamanho em meios mais alcalinos.

Apesar do ensaio do difração de raios X comprovar a presença de cristais de monetita e brushita em pH 6, não é possível constatar essas estruturas na imagem de MEV. Eventualmente, o alginato encobriu as estruturas cristalinas, impossibilitando a análise. Em pH 7 pode-se observar a brushita composta por lâminas finas dispostas de maneira irregular. Na literatura é possível encontrar morfologias similares de brushita (LIM et al., 2009).

As sínteses dos grânulos obtidos em solução de fosfato de sódio mais básica formam hidroxiapatita, porém pode-se observar que as estruturas formadas em pH 8 e 9 diferem das em pHs 10 e 11. De acordo com os difratogramas de raios X, em pHs 8 e 9 houve formação de OCP, porém nas imagens de MEV não é possível diferenciar as fases HA e OCP. Nos pHs 10 e 11 observam-se nanocristais de HA, que são muito bioativos, uma vez que possuem uma maior área superficial.

Figura 27: Micrografias MEV-FEG da superfície de grânulos obtidos de solução de alginato de cálcio gotejada em soluções PBS de diferentes pHs.

Na Figura 28 são mostradas as imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) obtidas com sinal de elétron secundário de grânulos sintetizados em soluções com diferentes pHs. Observa-se que os grânulos formados em soluções de pHs mais ácidos

possuem geometria mais regulares e são menos rugosos. Os resultados obtidos estão relacionados à habilidade do alginato de cálcio em absorver água em diferentes pHs.

Os grânulos sintetizados em pHs mais baixos tendem a absorver menos água. Nessas condições, grupos carboxílicos do alginato são ionizados em radicais $-\text{COOH}$, uma vez que o pK_a do alginato é 3,2 e quanto menor essa constante maior a tendência do ácido em se ionizar. A ligação de hidrogênio nos grupos carboxilatos resultam em uma interação mais forte polímero-polímero, comparada à polímero-água (HUA et al., 2010). Já em soluções mais neutras e básicas, os grupos carboxílicos tendem a se ionizar em $-\text{COO}^-$ liberando íons H^+ . A alta concentração de H^+ no interior dos grânulos aumenta sua pressão osmótica, proporcionando uma maior capacidade de absorção de água. Além disso, a repulsão eletrostática dos íons carboxilato causa relaxamento da cadeia macromolecular, fato que pode contribuir com a habilidade de absorver água dos grânulos (ABD EL-GHAFFAR et al., 2012).

Sendo assim, os grânulos sintetizados em soluções menos ácidas absorveram mais água e aumentaram mais de volume durante o processo de fabricação. Após a secagem, os mesmos perdem uma maior porcentagem de água, resultando em uma superfície mais rugosa.

Figura 28: Micrografias FEG-SEM dos grânulos sintetizados em solução PBS de diferentes pHs, obtidas com elétrons retroespalhados.

A Figura 29 mostra imagens de câmera digital dos grânulos sintetizadas em pH 12(A) e 13 (B). Acima de pH 11 o alginato degrada totalmente não sendo possível obter grânulos para a aplicação desejada (CAO et al., 2005).

Figura 29: Imagens de câmera digital de grânulos de alginato após 24 h na solução de PBS em pH 12 (A) e pH 13(B).

Para entender melhor o efeito do pH na morfologia dos grânulos, foram feitos cortes transversais nos mesmos (Figura 30). Em todos os casos foi possível observar a precipitação de uma fina camada de fosfato de cálcio sobre o polímero. É interessante observar que em meios mais ácidos os grânulos resultantes são ocos, enquanto nos demais pHs o interior dos grânulos é formado de polímero maciço.

O cálcio utilizado na formação do fosfato é proveniente do Ca^{2+} utilizado na reticulação do alginato de sódio. Estudos mostram que a degradação do alginato de cálcio é acelerada na presença da solução mineralizadora uma vez que as ligações cruzadas de Ca^{2+} são facilmente quebradas para a formação dos fosfatos (ABD EL-GHAFFAR et al., 2012). Haug et al. (HAUG et al., 1963) estudaram a degradação do alginato em diferentes pH e concluíram que a degradação desse polímero é mais lenta em pH mais neutros.

O fato dos grânulos em pH 1 serem maciços não está muito claro. Em meio ácido, o alginato pode se transformar em ácido algínico, que por sua vez é insolúvel em água (SEGATO, 2007). Provavelmente, os grânulos sintetizados em pH 1 formaram esse composto e não sofreram decomposição.

Todos os grânulos obtidos são interessantes para utilização como agente porogênico, uma vez que o material orgânico será decomposto na etapa de tratamento térmico, levando à formação de poros.

Figura 30: Micrografias MEV-FEG da secção transversal de grânulos sintetizados em solução PBS com diferentes pHs, obtidas com elétrons retroespalhados.

A Figura 31 mostra com maior ampliação a interface polímero/fosfato de cálcio onde é possível identificar nitidamente a camada cristalina. Podemos observar que em pH 1 o polímero possui aspecto diferente que nos demais pHs. Isso pode confirmar a teoria da formação de outro composto (algina). Além disso, a síntese em pH 1 é a única em que pode-se observar que os cristais cresceram para o interior do polímero.

Interessante analisar que no pH 6 a espessura do polímero é muito pequena e a composição da grânulos é praticamente fosfato de cálcio. Nos pH 8 e 10 é notória a presença de um gradiente de cor radial o que indica que a reação inicia na superfície e avança para o interior das grânulos

Figura 31 Micrografias FEG-SEM da interface alginato/CaP sintetizadas em diferentes pHs.

A espessura da camada ao longo do perímetro não é uniforme (Figura 31). Muitos grânulos estavam no mesmo recipiente durante a cristalização criando áreas de contato esfera/esfera. Isso impossibilita que a solução PBS fique em contato uniformemente em toda o perímetro do grânulo. Mesmo assim, foi possível estimar a espessura de fosfato de cálcio com o auxílio do software Photoshop. Neste teste, a espessura da camada superficial ao longo da borda da secção transversal dos grânulos foi medida dez vezes e sua média calculada. O resultado pode ser analisado no Gráfico 1 a seguir.

Gráfico 1: Variação da espessura da camada superficial de fosfato de cálcio em função do pH.

Pode-se notar que a espessura é praticamente constante até o pH 5 (~5 µm) indicando que a velocidade de cristalização do fosfato é basicamente a mesma em meios mais ácidos. A espessura aumenta drasticamente em pH 6 e volta a diminuir no pH 7. Nos pHs mais básicos percebe-se que a espessura aumenta com o aumento do pH, indicando uma maior velocidade de reação de precipitação em meios mais básicos.

O fato dos grânulos sintetizados em meios alcalinos não serem ocos pode estar relacionado à alta taxa de precipitação do CaP. Em meios alcalinos a formação da camada de fosfato de cálcio possivelmente ocorreu rapidamente, protegendo o interior dos grânulos do meio agressivo da solução de fosfato de sódio.

5.2.3 Caracterização dos poros revestidos

Esses grânulos foram misturados a um vidro soda-cal-sílica comercial em pó. Após um tratamento térmico de sinterização, o poro formado foi analisado. As micrografias óticas (Figura 32) mostram os poros formados pelos grânulos provenientes de soluções com pHs 1 a 11. Pode-se observar que em todos os casos os grânulos agiram como *template* de sacrifício e formaram poros na vitrocerâmica. É possível verificar que o interior dos poros apresenta coloração diferente da matriz, indicando que os poros foram revestido com o CaP.

Figura 32: Microscopias óticas dos poros revestidos utilizando grânulos sintetizadas em diferentes pHs

Examinando os poros dos grânulos de pHs mais básicos é possível verificar que a presença de material no interior do poro é maior. Isso está relacionado ao fato da espessura das camadas de fosfato de cálcio na superfície dos grânulos serem maiores em meios básicos, obtendo-se assim poros com revestimentos mais espessos. Provavelmente a reação de precipitação do CaP é mais rápida em meios mais básicos, e a espessura das camadas podem ser alteradas modificando-se o tempo de permanência da esfera na solução de fosfato de sódio.

O tamanho ideal de poros foi estabelecido na faixa de 100 a 400 μm , pois proporciona um crescimento contínuo do osso no seu interior, bem como a migração e transporte de nutrientes. Como pode ser observado, o tamanho de poros obtidos no presente trabalho é de aproximadamente 1 mm de diâmetro, maior que o recomendado (OTSUKI et al., 2006). Entretanto, é possível obter grânulos menores diminuindo-se a viscosidade do alginato de sódio e reduzindo-se o tamanho da gota.

A proposta apresentada nessa dissertação para a formação de poros com revestimento bioativo *in situ* e em apenas uma etapa é inédita e promissora. A metodologia é simples e de baixo custo, e pode ser uma alternativa interessante para a produção de bio-*scaffolds* com função estrutural.

6 CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos podemos concluir que:

- Utilizando a metodologia inédita desenvolvida, foi possível produzir grânulos que possuem elementos necessários para a formação de revestimentos bioativos. O mecanismo proposto combina condensação do polímero alginato com íons de Ca^{++} simultaneamente com a precipitação de partículas de silicato ou fosfato de cálcio.
- Os grânulos obtidos de solução de alginato e silicato de sódio de razão $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$ 2,38 apresentaram geometria regular, porém não formaram poros. Apesar de indícios de formação de uma fase líquida durante a sinterização dos grânulos com a cerâmica, foi observado material residual no poro.
- A síntese dos grânulos de alginato com silicato contendo concentração maior de sódio ($\text{SiO}_2.\text{Na}_2\text{O}$) é promissora. Grânulos com concentrações mais elevadas do metassilicato formaram poros de aproximadamente 1 mm de diâmetro. A análise de EDS no interior dos poros indicou a presença de um composto a base de cálcio e fósforo, composto que pode possuir interessantes propriedades bioativas. Além disso, foi notada a formação de uma fase líquida durante o processo de sinterização, que penetrou na matriz cerâmica.
- A síntese de alginato com fosfato de cálcio também é muito promissora. Foi possível obter grânulos de alginato com a superfície recoberta por compostos de CaP. O estudo da relação do pH da solução PBS mineralizadora com a fase formada indicou a possibilidade de obter quatro fases cristalinas de CaP (MCPM, monetita, brushita e HA).
- Os diferentes pHs das soluções PBS também influenciam a morfologia dos grânulos. Grânulos sintetizados em meios básicos apresentaram morfologia enrugada e maciça, enquanto grânulos obtidos da síntese em meio ácido.
- Todos os grânulos de alginato e CaP agiram como agentes porogênicos e funcionalizadores de poros. Através dos resultados obtidos, concluiu-se que grânulos produzidos em solução PBS básica formam camadas de revestimento

mais espessa, podendo indicar que a reação de precipitação do fosfato de cálcio em meio básico é mais rápida.

- O resultado obtido do estudo da influência do pH na fase cristalina formada é de grande interesse para a área de biomateriais, uma vez que grânulos de alginato com CaP são muito utilizados em sistemas de “*drug delivery system*”.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a possibilidade de obtenção de poros interconectados utilizando os grânulos de alginato e silicato de sódio ou fosfato de cálcio.
- Estudar metodologias de obtenção de grânulos com tamanhos menores para formação de microporos.
- Caracterizar a fase líquida formada nos grânulos contendo alginato e $\text{Na}_2\text{OxSiO}_2$
- Estudar diferentes tratamentos térmicos para formação de poros usando grânulos de alginato e metassilicato de sódio. Possivelmente a temperatura de sinterização utilizada foi mais alta que a necessária, influenciando a viscosidade do líquido formado durante o tratamento térmico, dificultando a funcionalização do poro.
- Estudar de forma mais aprofundada o comportamento reológico do alginato e a relação com a morfologia do grânulo.
- Síntese de scaffolds com porosidade superior a 50% em volume.
- Testes de bioatividade *in vitro* e *in vivo*.
- Caracterização mecânicas das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-GHAFFAR, M. A. et al. pH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release. **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 2, p. 667–75, 20 jun. 2012.
- AITASALO, K. et al. Repair of orbital floor fractures with bioactive glass implants. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 59, n. 12, p. 1390–1395, 2001.
- AMER, W. et al. Smart designing of new hybrid materials based on brushite-alginate and monetite-alginate microspheres: Bio-inspired for sequential nucleation and growth. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 35, p. 341–6, 1 fev. 2014.
- ASRI, R. I. M. et al. A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol–gel and electrochemical depositions on biocompatible metals. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 57, p. 95–108, abr. 2016.
- ASTM. **Standard specification for composition of ceramic hydroxyapatite for surgical implants. F1185-88**, 1988.
- AZER, S. S. et al. Effect of home bleaching systems on enamel nanohardness and elastic modulus. **Journal of dentistry**, v. 37, n. 3, p. 185–90, mar. 2009.
- BEN-NISSAN, B. **Advances in Calcium Phosphate Biomaterials**. 1st. ed. Sydney, Australia: Springer Science & Business, 2014. v. 2
- BEST, S. M. et al. Bioceramics: Past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, n. 7, p. 1319–1327, 2008.
- BIOMATERIALS, S.; HENCH, L. L.; WILSON, J. Surface-Active Biomaterials. **American Association for the Advancement of Science**, v. 226, n. 4675, p. 630–636, 2014.
- BLACK, J.; HASTINGS, G. (EDS.). **Handbook of Biomaterial Properties**. Boston, MA: Springer US, 1998.
- BOCCACCINI ALDO R., P. X. M. **Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers, 2nd Edition**. [s.l.: s.n.].
- BOROUJENI, N. M. **Monetite Cement Composites for Orthopedic and Dental Applications**. Toledo: The University of Toledo, 2012.
- BOSCO, R. et al. Surface Engineering for Bone Implants: A Trend from Passive to Active Surfaces. **Coatings**, v. 2, n. 4, p. 95–119, 2012.
- BOUTIN, P. Total arthroplasty of the hip by fritted aluminum prosthesis. Experimental study and 1st clinical applications. **Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot**, p. 58, 1972.
- CAMILO, C. C. **CLAUDIA CRISTIANE CAMILO Implantes de alumina em gradiente funcional de porosidade recobertos com hidroxiapatita e biovidro: avaliação da osseointegração**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2010.
- CAO, Y. et al. pH-induced self-assembly and capsules of sodium alginate. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 2189–2196, 2005.
- CHARNLEY, J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. **J. Bone Joint Surg**, v. 42B, p. 28 – 30, 1960.

CHEN, Q. et al. Alginate/Bioglass® composite coatings on stainless steel deposited by direct current and alternating current electrophoretic deposition. **Surface and Coatings Technology**, v. 233, p. 49–56, out. 2013.

CHENG, L. et al. Osteoinduction of calcium phosphate biomaterials in small animals. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 33, n. 3, p. 1254–60, 1 abr. 2013.

CORDERO-ARIAS, L. et al. Electrophoretic deposition of nanostructured TiO₂ /alginate and TiO₂ -bioactive glass/alginate composite coatings on stainless steel. **Advances in Applied Ceramics**, v. 113, n. 1, p. 42–49, 21 jan. 2014.

CORDERO-ARIAS, L. et al. Electrophoretic Deposition of Nanostructured Titania-Bioactive Glass/Alginate Coatings on Stainless Steel. **Key Engineering Materials**, v. 654, p. 159–164, 15 jul. 2015.

CORREA, T. H. DO A. **OBTENÇÃO DE BIOCIMENTO A BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO NANOESTRUTURADO A PARTIR DE CASCA DE OVO GALINÁCEO TARCÍLIA**. CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO, 2012.

COSTA, A. C. F. M. et al. **Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações** 2009

CUNNINGHAM, B. W. et al. Bioactive titanium calcium phosphate coating for disc arthroplasty: analysis of 58 vertebral end plates after 6- to 12-month implantation. **Spine Journal**, v. 9, n. 10, p. 836–845, 2009.

DAGUANO, J. K. M. DE F. **Biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema 3CaO.P2O5-SiO2-MgO para aplicações biomédicas: processamento e caracterizações estruturais, mecânicas e biológicas**. Lorena: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2011.

DONGLU SHI. **Introduction to Biomaterials**. Beijing,: Tsinghua University Press, 2006.

DUNCAN, J. et al. The role of the chemical composition of monetite on the synthesis and properties of α -tricalcium phosphate. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 34, p. 123–9, 1 jan. 2014.

ENGSTRAND, J.; PERSSON, C.; ENGQVIST, H. The effect of composition on mechanical properties of brushite cements. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 29, p. 81–90, jan. 2014.

ESHTIAGH-HOSSEINI, H. et al. Preparation of anhydrous dicalcium phosphate, DCPA, through sol–gel process, identification and phase transformation evaluation. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, n. 32, p. 3854–3857, ago. 2008.

FEENSTRA, T. .; DE BRUYN, P. . The ostwald rule of stages in precipitation from highly supersaturated solutions: a model and its application to the formation of the nonstoichiometric amorphous calcium phosphate precursor phase. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 84, n. 1, p. 66–72, nov. 1981.

FU, S. et al. Relevance of Rheological Properties of Sodium Alginate in Solution to Calcium Alginate Gel Properties. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 2, p. 453–460, 2011.

GOMEZ-VEGA, J. M. et al. Novel Bioactive Functionally Graded Coatings on Ti6Al4V. **Advanced Materials**, v. 12, n. 12, p. 894–898, 1 jun. 2000.

HABRAKEN, W. et al. Calcium phosphates in biomedical applications : materials for

the future ? **Biochemical Pharmacology**, v. 00, n. 00, 2015.

HAMADOUCHE, M. et al. Bioactivity of sol-gel bioactive glass coated alumina implants. **Journal of biomedical materials research**, v. 52, n. 2, p. 422–429, 2000.

HAMOUDA, A.; AMIRI, H. Factors Affecting Alkaline Sodium Silicate Gelation for In-Depth Reservoir Profile Modification. **Energies**, v. 7, p. 568–590, 2014.

HANES, P. J. Bone replacement grafts for the treatment of periodontal intrabony defects. **Oral and maxillofacial surgery clinics of North America**, v. 19, n. 4, p. 499–512, vi, nov. 2007.

HAUG, A. et al. **The Degradation of Alginates at Different pH Values.** *Acta Chemica Scandinavica*, 1963. Disponível em: <<http://actachemscand.org/doi/10.3891/acta.chem.scand.17-1466>>

HENCH, L. L. et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 5, n. 6, p. 117–141, 1 nov. 1971.

HENCH, L. L. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014–1017, 2002.

HENCH, L. L. The story of Bioglass®. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 11, p. 967–978, 2006.

HENCH, L. L. **An Introduction to Bioceramics**. 2nd. ed. Florida: World Scientific, 2013.

HENCH, L. L. Bioglass: 10 milestones from concept to commerce. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 432, p. 2–8, 2015a.

HENCH, L. L. Opening paper 2015- Some comments on Bioglass: Four Eras of Discovery and Development. **Biomedical glasses**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 2015b.

HENCH, L. L.; JONES, J. R. Bioactive Glasses: Frontiers and Challenges. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. November, p. 1–12, 2015.

HENCH, L. L.; PASCHALL, H. A. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. **Journal of biomedical materials research**, v. 7, n. 3, p. 25–42, jan. 1973.

HENCH, L. L.; THOMPSON, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 7 Suppl 4, n. May, p. S379–S391, 2010.

HERNANDEZ-MONTELONGO, J. et al. Calcium phosphate/porous silicon biocomposites prepared by cyclic deposition methods: spin coating vs electrochemical activation. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 34, p. 245–51, 1 jan. 2014.

HO, Y.-C.; HUANG, F.-M.; CHANG, Y.-C. Cytotoxicity of formaldehyde on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 83, n. 2, p. 340–344, 2007.

HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 4, p. 581–603, abr. 2013.

HUA, S. et al. pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads

prepared by combined Ca^{2+} crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 5, p. 517–523, 2010.

JINAWATH, S. et al. Hydrothermal synthesis of monetite and hydroxyapatite from monocalcium phosphate monohydrate. **International Journal of Inorganic Materials**, v. 3, n. 7, p. 997–1001, nov. 2001.

JOKIĆ, B. et al. Synthesis and characterization of monetite and hydroxyapatite whiskers obtained by a hydrothermal method. **Ceramics International**, v. 37, n. 1, p. 167–173, jan. 2011.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 1, p. 4457–86, jan. 2013.

JONES, J. R. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta biomaterialia**, v. 23 Suppl, p. S53–82, set. 2015.

KIRSTEN, A. et al. Bioactive and thermally compatible glass coating on zirconia dental implants. **Journal of dental research**, v. 94, n. 2, p. 297–303, 2015.

KON, M. et al. Development of calcium phosphate based functional gradient bioceramics. **Biomaterials**, v. 16, n. 9, p. 709–14, 1995.

KUBOKI, Y. et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. **Journal of biomedical materials research**, v. 39, n. 2, p. 190–9, fev. 1998.

KUEHN, K.-D.; EGE, W.; GOPP, U. Acrylic bone cements: composition and properties. **The Orthopedic clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 17–28, v. 2005.

KULANTHAIVEL, S. et al. Cobalt doped proangiogenic hydroxyapatite for bone tissue engineering application. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 58, p. 648–58, 1 jan. 2016.

KUMAR, M.; DASARATHY, H.; RILEY, C. Electrodeposition of brushite coatings and their transformation to hydroxyapatite in aqueous solutions. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 45, n. 4, p. 302–310, 1999.

LEE, D.; KUMTA, P. N. Chemical synthesis and stabilization of magnesium substituted brushite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 7, p. 934–943, ago. 2010.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chemical reviews**, v. 108, n. 11, p. 4742–53, 2008.

LI, J. et al. Effect of nano- and micro-hydroxyapatite/chitosan-gelatin network film on human gastric cancer cells. **Materials Letters**, v. 62, n. 17-18, p. 3220–3223, jun. 2008.

LIM, H. et al. Fabrication and characterization of 1D brushite nanomaterials via sucrose ester reverse microemulsion. **Ceramics International**, v. 35, n. 7, p. 2891–2897, 2009.

LIN, H.-R.; YEH, Y.-J. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 71, n. 1, p. 52–65, 15 out. 2004.

LINK, M. **Influência da razão $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$ do silicato de sódio na defloculação de**

suspensões aquosas empregadas na conformação por colagem de barbotinas. Porto Alegre – RS: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2013.

LIU, D.-M.; YANG, Q.; TROCZYNSKI, T. Sol–gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 691–698, fev. 2002.

LONG, M.; RACK, H. . Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. **Biomaterials**, v. 19, n. 18, p. 1621–1639, set. 1998.

LUO, Y. et al. Hierarchical mesoporous bioactive glass/alginate composite scaffolds fabricated by three-dimensional plotting for bone tissue engineering. **Biofabrication**, v. 5, p. 15005–13, 2013.

MARINI, E. et al. The presence of different growth factors does not influence bone response to hydroxyapatite: preliminary results. **Journal of Orthopaedics and Traumatology**, v. 5, n. 1, p. 34–43, 1 abr. 2004.

MARTIN, R. A. et al. A study of the formation of amorphous calcium phosphate and hydroxyapatite on melt quenched Bioglass® using surface sensitive shallow angle X-ray diffraction. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 4, p. 883–888, 2009.

MEHDIPOUR, M.; AFSHAR, A.; MOHEBALI, M. Electrophoretic deposition of bioactive glass coating on 316L stainless steel and electrochemical behavior study. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 24, p. 9832–9839, out. 2012.

MI, F. Drug release from chitosan–alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 1, p. 61–72, 1 abr. 2002.

MIRTCHI, A. A.; LEMAITRE, J.; TERAQ, N. Calcium phosphate cements: study of the beta-tricalcium phosphate--monocalcium phosphate system. **Biomaterials**, v. 10, n. 7, p. 475–80, set. 1989.

MOURA, F. N. **Monetita E Hidroxiapatita Parcialmente Substituída**. Rio de Janeiro: INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA, 2012.

MUCALO, M. **Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications**. New Zealand: Elsevier, 2015.

MURATA, Y. et al. Drug Release Profile from Calcium-Induced Alginate-Phosphate Composite Gel Beads. **International Journal of Polymer Science**, v. 2009, p. 4, 2009.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 8-9, p. 762–798, 2007.

NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 5, n. 27, p. 1137–1158, 2008.

OTSUKI, B. et al. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: Three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. **Biomaterials**, v. 27, n. 35, p. 5892–5900, 2006.

PATEL, N.; GOHIL, P. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 2, n. 4, p. 91–101, 2012.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties

and applications. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3279–305, abr. 2012.

PHAM, L. T.; HATZIGNATIOU, D. G. Journal of Petroleum Science and Engineering Rheological evaluation of a sodium silicate gel system for water management in mature , naturally-fractured oil fi elds. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 138, p. 218–233, 2016.

PISHBIN, F. et al. Electrophoretic deposition of chitosan/45S5 Bioglass® composite coatings for orthopaedic applications. **Surface and Coatings Technology**, v. 205, n. 23-24, p. 5260–5268, set. 2011.

POURHASHEM, S.; AFSHAR, A. Double layer bioglass-silica coatings on 316L stainless steel by sol–gel method. **Ceramics International**, v. 40, n. 1, p. 993–1000, jan. 2014.

PRADO DA SILVA, M. H. et al. Transformation of monetite to hydroxyapatite in bioactive coatings on titanium. **Surface and Coatings Technology**, v. 137, n. 2-3, p. 270–276, mar. 2001.

QING, Y. et al. Inflammatory responses to Hydroxyapatite implants in middle ear in rats. **Journal of Otology**, v. 3, n. 1, p. 24–28, jun. 2008.

RAHBK, O. et al. Sealing effect of hydroxyapatite coating: a 12-month study in canines. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 71, n. 6, p. 563–73, 2000.

RAJKUMAR, M.; MEENAKSHISUNDARAM, N.; RAJENDRAN, V. Development of nanocomposites based on hydroxyapatite/sodium alginate: Synthesis and characterisation. **Materials Characterization**, v. 62, n. 5, p. 469–479, maio 2011a.

RAJKUMAR, M.; MEENAKSHISUNDARAM, N.; RAJENDRAN, V. Development of nanocomposites based on hydroxyapatite/sodium alginate: Synthesis and characterisation. **Materials Characterization**, v. 62, n. 5, p. 469–479, maio 2011b.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2013.

RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. **Biomaterials**, v. 17, n. 1, p. 31–5, jan. 1996.

SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7591–621, ago. 2013.

SAINI, M. Implant biomaterials: A comprehensive review. **World Journal of Clinical Cases**, v. 3, n. 1, p. 52, 2015.

SÁNCHEZ-ENRÍQUEZ, J.; REYES-GASGA, J. Obtaining Ca(H₂PO₄)(2)·H₂O, monocalcium phosphate monohydrate, via monetite from brushite by using sonication. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 3, p. 948–54, maio 2013.

SANGEETHA, K.; THAMIZHAVEL, A.; GIRIJA, E. K. Effect of gelatin on the in situ formation of Alginate/Hydroxyapatite nanocomposite. **Materials Letters**, v. 91, p. 27–30, jan. 2013.

SANTOS, M. F. **Sistemas baseados em amido termoplástico : pectina contendo hidroxiapatita nanoestruturada visando liberação de fósforo em meio aquoso**. SÃO CARLOS: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2013.

SEGATO, M. P. **Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais**

alcalinos , alcalino-. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2007.

SEPULVEDA, P.; JONES, J. R.; HENCH, L. L. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses. **Journal of biomedical materials research**, v. 58, n. 6, p. 734–40, 2001.

SIKORSKI, P. et al. Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium-alginate gels from fiber X-ray diffraction. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 7, p. 2098–103, jul. 2007.

SINGH, R.; DAHOTRE, N. B. Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 18, n. 5, p. 725–51, maio 2007.

SIVAKUMAR, M.; PANDURANGA RAO, K. Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres. **Biomaterials**, v. 23, n. 15, p. 3175–81, 2002.

SKIPPER, L. J. et al. The structure of a bioactive calcia–silica sol–gel glass. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, n. 24, p. 2369, 2005.

SØBALLE, K.; OVERGAARD, S. The current status of hydroxyapatite coating of prostheses. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 78, n. 5, p. 689–91, set. 1996.

SOLA, A et al. Bioactive glass coatings: a review. **Surface Engineering**, v. 27, n. 8, p. 560–572, 2011.

SON, K. D. et al. Effect of alginate as polymer matrix on the characteristics of hydroxyapatite nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 132, n. 2-3, p. 1041–1047, fev. 2012.

SONG; HABIBOVIC, P.; YUAN, H. The homing of bone marrow MSCs to non-osseous sites for ectopic bone formation induced by osteoinductive calcium phosphate. **Biomaterials**, v. 34, n. 9, p. 2167–2176, 2013.

SOUSA, S. K. **Biomateriais Na Regeneração Óssea Biomateriais Na Regeneração Óssea**. Goiânia: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, 2011.

SRINIVASAN, S. et al. Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 274–283, jan. 2012.

STUDART, A. R. et al. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 89, n. 6, p. 1771–1789, jun. 2006.

SURMENEV, R. A; SURMENEVA, M. A; IVANOVA, A. A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis - A review. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 557–79, fev. 2014a.

SURMENEV, R. A. A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, n. 8-9, p. 2035–2056, nov. 2011.

SURMENEV, R. A.; SURMENEVA, M. A.; IVANOVA, A. A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis--a review. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 557–79, fev. 2014b.

T. KOKUBO. **Bioceramics and Their Clinical Applications**. Washington dc: Elsevier, 2008.

TAMIMI, F. et al. Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 87, n. 4, p. 980–5, 15 dez. 2008.

TAMIMI, F. et al. Resorption of monetite granules in alveolar bone defects in human patients. **Biomaterials**, v. 31, n. 10, p. 2762–9, abr. 2010.

TAMIMI, F. et al. The effect of autoclaving on the physical and biological properties of dicalcium phosphate dihydrate bioceramics: brushite vs. monetite. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 8, p. 3161–9, ago. 2012.

TAMIMI, F.; SHEIKH, Z.; BARRALET, J. Dicalcium phosphate cements: brushite and monetite. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 2, p. 474–87, fev. 2012.

TIWARI, G. et al. Drug delivery systems: An updated review. **International journal of pharmaceutical investigation**, v. 2, n. 1, p. 2–11, jan. 2012.

TORRES, J. et al. Monetite granules versus particulate autologous bone in bone regeneration. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 200, p. 126–33, jul. 2015.

TOSHIMA, T. et al. Morphology control of brushite prepared by aqueous solution synthesis. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v. 2, n. 1, p. 52–56, mar. 2014.

TURCO, G. et al. Alginate / Hydroxyapatite Biocomposite For Bone Ingrowth : A. **Biomacromolecules**, v. i, p. 1575–1583, 2009.

VENKATESAN, J. et al. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 269–81, jan. 2015.

WILSON, J. et al. Toxicology and biocompatibility of bioglasses. **Journal of biomedical materials research**, v. 15, n. 6, p. 805–17, nov. 1981.

WRIGHT, A. F.; DUPUY, J. (EDS.). **Glass ... Current Issues**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1985.

XIE, M. et al. Alginate-controlled formation of nanoscale calcium carbonate and hydroxyapatite mineral phase within hydrogel networks. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 9, p. 3665–75, set. 2010.

YAMASAKI, H.; SAKAI, H. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. **Biomaterials**, v. 13, n. 5, p. 308–12, jan. 1992.

YANG, J.-S.; XIE, Y.-J.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 33–39, fev. 2011.

YET-MING CHIANG , DUNBAR P. BIRNIE, W. D. K. **Physical Ceramics: Principles for Ceramic Science and Engineering**. [s.l: s.n.].

YILMAZ, E. D. et al. Fracture behavior of hydroxyapatite nanofibers in dental enamel under micropillar compression. **Scripta Materialia**, v. 68, n. 6, p. 404–407, mar. 2013.

YOON, J. et al. Improvement of desolvation and resilience of alginate binders for Si-based anodes in a lithium ion battery by calcium-mediated cross-linking. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 16, n. 46, p. 25628–35, 14 dez. 2014.

YUAN, H. et al. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. **Biomaterials**, v. 20, p. 1799–1806, 1999.

ZENG, Q. et al. Bioglass/alginate composite hydrogel beads as cell carriers for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 102, p. 42–51, 2014.

ZENG, Q. et al. Design of a thermosensitive bioglass/agarose–alginate composite hydrogel for chronic wound healing. **J. Mater. Chem. B**, v. 3, p. 8856–8864, 2015.

ZHANG, J. et al. Pyrolysis products and thermal degradation mechanism of intrinsically flame-retardant calcium alginate fibre. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 5, p. 936–942, maio 2011.